

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 26 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790064

研究課題名(和文)新規GPCRシグナル検出系TG $\alpha$ 切断アッセイを用いたGPCRのリガンド探索研究課題名(英文) Screening for ligands of G protein-coupled receptors using the newly developed TG $\alpha$  shedding assay

研究代表者

井上 飛鳥 (INOUE, Asuka)

東北大学・薬学研究科(研究院)・助手

研究者番号：50525813

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：本研究において、研究代表者が独自に開発したトランスフォーミング増殖因子アルファ(TGF $\alpha$ )切断アッセイを用い、Gタンパク質共役型受容体(GPCR)のリガンド探索を行った。並行して共役する三量体Gタンパク質の評価系を構築した。リゾホスファチジルセリンにより特異的に活性化される3種類の受容体(P2Y10, GPR174, A630033H20)、リゾホスファチジルグルコースにより活性化される1種類の受容体、酸化リン脂質に応答する2種類の受容体を同定した。CRISPR-Cas9システムを用いてGタンパク質欠損HEK293細胞を作製し、Gタンパク質の共役活性を定量的に評価できる手法を確立した。

研究成果の概要(英文)：In this KAKENHI project, by employing the newly developed transforming growth factor  $\alpha$  (TG $\alpha$ ) shedding assay, I screened for G protein-coupled receptors (GPCRs) that respond to bioactive molecules and developed an assay system that can quantify coupling efficiency of heterotrimeric G proteins. I identified three orphan GPCRs (P2Y10, GPR174, A630033H20) as lysophosphatidylserine-specific receptors, one GPCR as a lysophosphatidylglucoside receptor and two GPCRs as oxidized phospholipid receptors. I generated G protein-deficient HEK293 cells using the CRISPR-Cas9 system and successfully applied them to analyze G protein coupling of GPCRs.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：Gタンパク質共役型受容体 GPCR TG $\alpha$  リゾリン脂質 リゾホスファチジルセリン CRISPR HEK293 エクトドメイン切断

## 1. 研究開始当初の背景

G タンパク質共役型受容体 (G protein-coupled receptor, GPCR) は、ヒトゲノムにおいて最大の遺伝子ファミリーを形成し、様々な生理的・病的現象に関与する。これまでに開発された薬物の約3割がロドプシンファミリーの GPCR を標的とすることが知られ、創薬の標的分子の最重要のタンパク質群である。

現在、内因性リガンドが不明の受容体 (オーファン GPCR) がロドプシンファミリーに65個残されており (IUPHAR データベースを元に研究代表者が独自に集計)、これらオーファン GPCR のリガンドの同定は GPCR 研究の最重要課題の一つである。しかし、リガンド同定はポストゲノム直後の3年間 (2003-2006年) には11個だったのが、その後の3年間 (2007-2009年) わずか2個と低いペースに留まっている。この要因としては、cAMP 応答やカルシウム応答など通常の GPCR シグナル検出系で容易に検出される GPCR は大方調べ尽くされたためと考えられる。従って、残されたオーファン GPCR のリガンドを首尾よく同定するためには、既存の方法とは異なるシグナルを検出する新規 GPCR 活性化検出法が必要である。

研究代表者は、生理活性リゾリン脂質リゾホスファチジン酸 (LPA) がその特異的 GPCR を介し、上皮成長因子受容体 (EGFR) のリガンド1つである TGF $\alpha$  のエクストドメイン切断と細胞外への放出を促進すること、さらにこの TGF $\alpha$  の切断と EGFR の活性化が毛根 (毛包組織) の形成に必須な役割があることを明らかにした (Inoue et al., EMBO J 2011, 図1A)。この研究過程で、GPCR 活性化により TGF $\alpha$  が形質膜で切断されるという現象を利用した新規 GPCR シグナル検出法 (TGF $\alpha$  切断アッセイと命名) を創案した。図1Bに TGF $\alpha$  切断アッセイの原理を示す。本アッセイでは、アルカリホスファターゼ融合 TGF $\alpha$  (AP-TGF $\alpha$ ) と GPCR を一過的に HEK293 細胞に発現させ、リガンド刺激後に膜型プロテアーゼによって切断される培養上清中の AP 活性を指標に GPCR の活性化を評価できる。

研究代表者は研究開始当時までに115個のリガンド既知の GPCR を用いて、TGF $\alpha$  切断アッセイで各々の GPCR の活性化検出できるかを予備検討し、そのうち75個 (65%) の GPCR について活性化の検出が可能であることを見出ししていた。

## 2. 研究の目的

GPCR のリガンド同定は、生理・病理機能の解明のみならず創薬に密接に関わる重要な研究課題である。さらに、GPCR がどの G タンパク質 ( $G_s$ ,  $G_i$ ,  $G_q$ ,  $G_{12}$  の4種類に分類される) に共役するかを解析することも、GPCR の機能解明や創薬開発において必須の情報である。

本研究では研究代表者が新規に開発した

TGF $\alpha$  切断を担う G タンパク質シグナルを解析し、TGF $\alpha$  切断アッセイの特徴付けを行うことを始めの目標とした。次に、本アッセイ系を用い、オーファン GPCR のリガンド探索を行い、新規のリガンド-GPCR のペアを同定することを目指した。

本研究過程において、TGF $\alpha$  切断に関与するシグナル経路として  $G_{12}$  シグナルと  $G_q$  シグナルが示唆された。既存の GPCR 活性化検出法は  $G_{12}$  シグナルを感度よく検出することが困難であることが知られていたため、 $G_{12}$  シグナルを選択的に検出する手法への改良を試みた。TGF $\alpha$  切断応答を誘導することが示唆された  $G_q$  シグナルを遮断することにより、 $G_{12}$  シグナルを選択的に検出できるものと想定した。この仮説を検証するため、 $G_q$  タンパク質を欠損させた細胞および  $G_q$  タンパク質と  $G_{12}$  タンパク質の両者を欠損させた細胞 ( $\Delta G_{q/12}$  細胞) を樹立し、この細胞における TGF $\alpha$  切断応答を評価し、 $G_{12}$  シグナル選択的な活性化を検出できるかどうかを検証した。

さらに、本研究過程において、TGF $\alpha$  切断は外来性に発現させた  $G\alpha$  サブユニットの活性化を効率よく検出することを見出した。キメラ  $G\alpha$  サブユニット (C末端6アミノ酸を別の  $G\alpha$  サブユニット由来の配列に置換) を  $\Delta G_{q/12}$  細胞に発現させ、TGF $\alpha$  切断応答を評価し、各種 G タンパク質の共役活性が評価できるかどうかを検証した。

## 3. 研究の方法

GPCR の発現ベクターをとアルカリホスファターゼ融合 TGF $\alpha$  (AP-TGF $\alpha$ ) を HEK293 細胞に一過的に発現させ、この発現細胞に各種生理活性化合物を加えた際の AP-TGF $\alpha$  の放出量を測定した。関与する G タンパク質を調べる場合、 $G\alpha$  サブユニットに対する RNAi を行った。G タンパク質欠損細胞の確立は CRISPR-Cas9 システムを用いた。この細胞にキメラ  $G\alpha_q$  サブユニット ( $G\alpha_q$  サブユニットの C末端6アミノ酸を各種  $G\alpha$  サブユニット由来の配列に置換) と評価対象の GPCR を発現させ、TGF $\alpha$  切断アッセイを行った。

## 4. 研究成果

TGF $\alpha$  切断応答に関与する G タンパク質シグナルに関して各種シグナル伝達阻害剤を用いて検証したところ、 $G_{12}$  シグナルに加えて  $G_q$  シグナルも関与していることが判明した。 $G_s$  シグナルや  $G_i$  シグナルは TGF $\alpha$  切断応答に関与していなかった。 $G\alpha$  サブユニットに対する siRNA を細胞にトランスフェクションして関与する G タンパク質を検討したところ、 $G\alpha_{12}$  サブユニット、 $G\alpha_{13}$  サブユニット、 $G\alpha_q$  サブユニット、 $G\alpha_{11}$  サブユニットが TGF $\alpha$  切断応答を担うことが明らかとなった。また、キメラ  $G\alpha$  サブユニットを用いて  $G\alpha_{12}$  サブユニット、 $G\alpha_{13}$  サブユニット、 $G\alpha_q$  サブユニット、 $G\alpha_{11}$  サブユニット由来のシグナルを誘導したところ、TGF $\alpha$  切断応答が誘導される

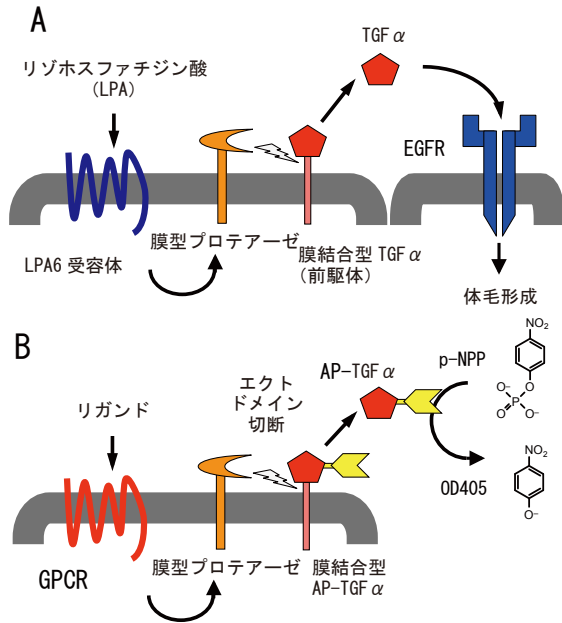


図1 TGF $\alpha$ 切断の生理機能と GPCR アッセイへの応用

(A) 体毛形成におけるリゾホスファチジン酸 (LPA) の作用機構。LPA6 受容体を介した TGF $\alpha$  切断と上皮成長因子受容体 (EGFR) の活性化が体毛形成に重要な役割を担う。(B) TGF $\alpha$  切断アッセイの原理。アルカリホスファターゼ (AP) と TGF $\alpha$  の融合タンパク質 (AP-TGF $\alpha$ ) のエクストドメイン切断と培養上清への放出量を測定する。切断された AP-TGF $\alpha$  は培養上清中の AP 活性を AP の基質であるパラニトロフェニルリン酸 (p-NPP) の吸光反応により定量する。切断膜型プロテアーゼは HEK293 細胞が内在性に高発現する。

ことがわかった。以上から、TGF $\alpha$  切断応答には関与する G タンパク質は G<sub>q</sub> (G $\alpha_q$  サブユニット、G $\alpha_{11}$  サブユニット) および G<sub>12</sub> (G $\alpha_{12}$  サブユニット、G $\alpha_{13}$  サブユニット) であることが明らかとなった (図2)。

前述した LPA6 受容体による体毛形成メカニズムに関与する膜型プロテアーゼとして TACE (別名 ADAM17) の関与が示されていた。そこで、HEK293 細胞の TGF $\alpha$  切断応答に TACE が関与するかどうかを明らかにするため、TACE に対する RNAi を行った。その結果、TGF $\alpha$  切断応答が顕著に阻害されることがわかり、HEK293 細胞の主要な TGF $\alpha$  切断を担う膜型プロテアーゼが TACE であることがわかった (図2)。

各種生理活性化合物に対するオーファン GPCR のスクリーニングの結果、リゾホスファチジルセリン (LysoPS) により活性化される 3 種類の GPCR (P2Y10, GPR174, A630033H20) を見出した (図3)。さらにリゾホスファチジルグルコースにより活性化される 1 種類の GPCR、酸化リン脂質に反応する 2 種類の GPCR を同定した。

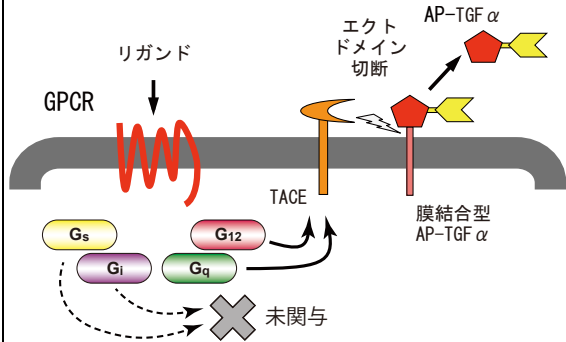


図2 HEK293 細胞で TGF $\alpha$  切断に関与する因子 GPCR がリガンド (アゴニスト) に結合することにより、G<sub>q</sub> タンパク質や G<sub>12</sub> タンパク質が活性化し、その下流で膜型プロテアーゼである TACE の活性化が誘導され、AP-TGF $\alpha$  のエクストドメイン切断が起こる。G<sub>q</sub> タンパク質は G $\alpha_q$  サブユニットまたは G $\alpha_{11}$  サブユニットが構成因子であり、G<sub>12</sub> タンパク質は G $\alpha_{12}$  サブユニットまたは G $\alpha_{13}$  サブユニットが構成因子である。

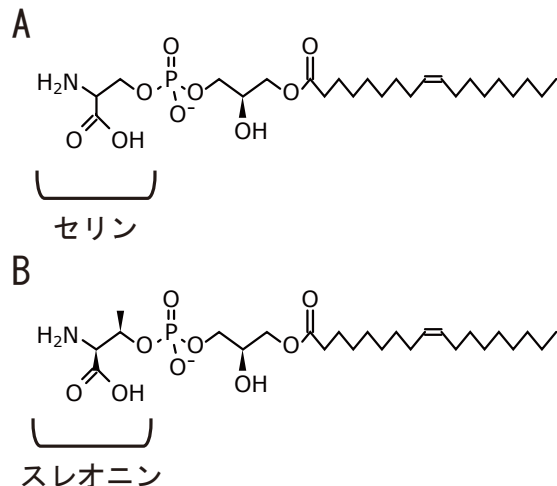


図3 ホスファチジルセリン (LysoPS) とその構造類似体

(A) LysoPS の構造。LysoPS は極性頭部にアミノ酸であるセリンを結合する。LysoPS を特異的に認識し、活性化される 3 種類の GPCR (P2Y10, A630033H20, GPR174) を同定した。(B) リゾホスファチジルスレオニン (LysoPT) の構造。LysoPT は LysoPS にメチル基が 1 カ所付加した構造である。上記 3 種類の LysoPS 受容体は LysoPT には全く応答しないことから、極性頭部を厳密に認識することがわかる。

上記の LysoPS により活性化される 3 種類の GPCR のリガンド特異性を検討したところ、試した脂質や核酸の中で LysoPS 以外に対する応答性は全く検出されず LysoPS 特異的な受容体と考えられた。これら LysoPS 受容体の共役する G タンパク質を解析したところ、

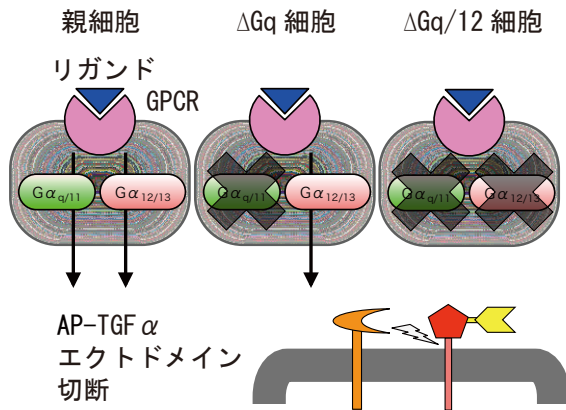


図4 Gタンパク質欠損細胞を用いたG12選択的シグナル検出

親細胞ではGqとG12依存的なAP-TGF $\alpha$ のエクトドメイン切断応答が起こる。Gqを欠損させた細胞( $\Delta$ Gq細胞)では、G12のみに依存的なAP-TGF $\alpha$ 切断応答が起こり、GqとG12を欠損させた細胞( $\Delta$ Gq/12細胞)では、AP-TGF $\alpha$ 切断応答は起こらない。従って、 $\Delta$ Gq細胞でのGPCR刺激によるTGF $\alpha$ 切断応答と $\Delta$ Gq/12細胞でのGPCR刺激によるTGF $\alpha$ 切断応答を比較することで、G12選択的なシグナルを評価できる。

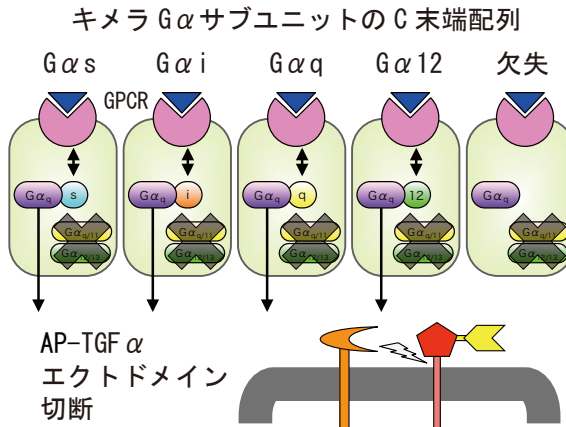


図5 Gタンパク質欠損細胞とキメラG $\alpha$ サブユニットを用いたGPCRのGタンパク質共役解析

GqとG12を欠損させた細胞( $\Delta$ Gq/12細胞)にC末端6アミノ酸を置換したキメラG $\alpha$ サブユニットとGPCRを発現させ、TGF $\alpha$ 切断アッセイを行う。GPCRとキメラG $\alpha$ サブユニットのC末端が相互作用した時にTGF $\alpha$ 切断応答が誘導される。

G<sub>12</sub>と共役することがわかった。また、マスト細胞上の脱顆粒反応を誘導するLysoPSアナログのリゾホスファチジルスレオニンに対しては全く応答しなかったことから、マスト細胞で脱顆粒応答を担うLysoPS受容体はこ

れら3種類のGPCRとは異なるものと考えられた。

前述の通り、TGF $\alpha$ 切断応答を担うGタンパク質シグナルはG<sub>12</sub>シグナルとG<sub>q</sub>シグナルであった。そこで、G<sub>12</sub>シグナルのみを選択的に検出する目的でG<sub>q</sub>を欠損させたHEK293細胞(*GNAQ*, *GNA11*の二重遺伝子ノックアウト細胞)とG<sub>q</sub>とG<sub>12</sub>を欠損させたHEK293細胞(*GNAQ*, *GNA11*, *GNA12*, *GNA13*の四重遺伝子ノックアウト細胞)をCRISPR-Cas9システムを用い作製した。これらのGタンパク質欠損細胞を用いたTGF $\alpha$ 切断アッセイを行うことで、G<sub>12</sub>シグナルを選択的かつ高精度に評価できることを実証した(図4)。さらに、G<sub>q</sub>とG<sub>12</sub>を欠損させたHEK293細胞にキメラG $\alpha_q$ サブユニット(G $\alpha_q$ サブユニットのC末端6アミノ酸を別のG $\alpha$ サブユニット由来の配列に置換)を導入し、TGF $\alpha$ 切断応答の回復を測定することで、4種類のGタンパク質(G<sub>s</sub>, G<sub>i</sub>, G<sub>q</sub>, G<sub>12</sub>)の共役活性を定量的に評価できることを実証した(図5)。今回研究代表者が開発した簡便にGPCRの共役するGタンパク質を解析する方法を用いることで、GPCRの機能の解明や創薬研究に大きく貢献するものと期待される。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計4件)

1. Nakanaga K, Hama K, Kano K, Sato T, Yukiura H, Inoue A, Saigusa D, Tokuyama H, Tomioka Y, Nishina H, Kawahara A, Aoki J. Overexpression of autotaxin, a lysophosphatidic acid-producing enzyme, enhances cardia bifida induced by hypo-sphingosine-1-phosphate signaling in zebrafish embryo. *Journal of Biochemistry*. 155:235-41 (2014). DOI: 10.1093/jb/mvt114、査読有り
2. Jiang G, Inoue A, Aoki J, Prestwich GD. Phosphorothioate analogs of sn-2 radyl lysophosphatidic acid (LPA): metabolically stabilized LPA receptor agonists. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 23:1865-9 (2013). DOI: 10.1016/j.bmcl.2013.01.002、査読有り
3. Yoshizawa M, Nakamura M, Farooq M, Inoue A, Aoki J, Shimomura Y. A novel mutation, c.699C>G (p.C233W), in the LIPH gene leads to a loss of the hydrolytic activity and the LPA6 activation ability of PA-PLA1 $\alpha$  in autosomal recessive woolly hair/hypotrichosis. *Journal of Dermatological Science*. 72:61-4 (2013). DOI: 10.1016/j.jdermsci.2013.05.001、査読

有り

4. Inoue A, Ishiguro J, Kitamura H, Arima N, Okutani M, Shuto A, Higashiyama S, Ohwada T, Arai H, Makide K, and Aoki J. TGF $\alpha$  shedding assay: an accurate and versatile method for detecting GPCR activation. Nature Methods. 9:1021-9 (2012). DOI: 10.1038/nmeth.2172、査読有り

[学会発表] (計 8 件)

1. Inoue A, Aoki J. Dissecting G protein coupling of GPCRs using chimeric G $\alpha$  subunits and TGF $\alpha$  shedding assay. International Conference on Pharmacology and Drug Development (ICoPaDD). University of Singapore, Singapore. December 9 - 11, 2013
2. Inoue A, Ishiguro J, Aoki J. Identification and analysis of GPCRs that recognize oxidized phospholipids. 第86回日本生化学会大会、横浜、神奈川、2013年9月11-13日
3. Inoue A, Aoki J. A new tool to analyze G protein coupling of lipid mediator receptors. FASEB Summer Research Conferences, Lysophospholipid and other Related Mediators - From Bench to Clinic. Niseko, Hokkaido, Japan. August 4 - 9, 2013
4. 井上 飛鳥、青木 淳賢 「TGF $\alpha$ のエクトドメイン切断を利用した新規GPCRリガンド探索のアクセシ系」、第10回GPCR研究会、お台場、東京、2013年5月10-11日
5. Inoue A, Aoki J. A tool to comprehensively dissect G protein coupling of GPCRs: application of TGF $\alpha$  shedding assay and co-expression of chimeric G $\alpha$  subunits. Gordon Research Conferences, Molecular Pharmacology. Renaissance Tuscany Il Ciocco Resort, Lucca (Barga), Italy. April 28 - May 3, 2013
6. 井上 飛鳥、青木 淳賢 「TGF $\alpha$ 切断を用いたGPCRと三量体Gタンパク質の共役活性の評価系の確立」、日本薬学会第133年会、横浜、パシフィコ横浜、2013年3月28-30日
7. 井上 飛鳥、石黒 純、巻出 久美子、青木 淳賢 「毛髪形成メカニズムから派生したGタンパク質共役型受容体 (GPCR) の新規検出系の開発とその応用」、第85回日本生化学会大会、福岡、福岡国際会議場、2012年12月14-16日
8. 井上 飛鳥、石黒 純、巻出 久美子、青木 淳賢、「TGF $\alpha$ 切断を用いた脂質メディエーター受容体の検出法の開発」、第54回日本脂質生化学、福岡、九州大学、2012年6月7-8日

[図書] (計 4 件)

1. 井上 飛鳥、青木淳賢 「リゾホスファチジン酸 (LPA) の生理的機能」(総説)、医学のあゆみ、生命を支える脂質-最新の研究と臨床 248: 963-969 (2014)
2. 井上 飛鳥、青木 淳賢 「新規 GPCR 活性化検出法を利用したオーファン受容体のリガンドの同定」(解説)、生化学 85:1029-33 (2013)
3. 井上 飛鳥 「【最新生理活性脂質研究-実験手法、基礎的知識とその応用-】(第1章)技術編 TGF $\alpha$ 切断を用いた GPCR 活性化の新しい検出法」(解説)、遺伝子医学 MOOK 24:93-98 (2013)
4. 井上 飛鳥、青木 淳賢 「TGF $\alpha$ 切断を用いた GPCR の高感度・高精度な活性化検出法」(解説)、実験医学 31:1305-12 (2013)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: G タンパク質共役型受容体のシグナル伝達の検出方法  
発明者: 青木淳賢、井上 飛鳥  
権利者: 同上  
種類: 特許  
番号: PCT/JP2014/000992  
出願年月日: 2014年2月25日  
国内外の別: 国外

[その他]

ホームページ等  
<http://www.pharm.tohoku.ac.jp/~seika/H24/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井上 飛鳥 (INOUE, Asuka)  
東北大学・大学院薬学研究科・助手  
研究者番号: 50525813

(2) 研究分担者

( )

研究者番号:

(3) 連携研究者

( )

研究者番号: