

## 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

井上 飛鳥<sup>1,2</sup>, 青木 淳賢<sup>1,3</sup><sup>1</sup>東北大学大学院薬学研究科分子細胞生化学分野, <sup>2</sup>JST・さきがけ, <sup>3</sup>JST・CREST

### 1. はじめに

Gタンパク質共役型受容体 (GPCR) はヒトゲノム中に約 800 種類の遺伝子が存在し, 最大の遺伝子ファミリーを形成する. このうち Class A (別名, ロドプシン型) に属する GPCR は, 約 270 種類存在し<sup>1)</sup>, 主に水溶性の低分子リガンドにより活性化される. 歴史的に Class A GPCR は創薬の重要な標的群であり, 市販薬の半数程度が GPCR を介して薬理作用を発揮していると見積もられている. 近年も GPCR を標的とした医薬品開発は成功を収めており, その例としてフィンゴリモド (多発性硬化症治療薬; 標的は  $\text{S1P}_1$  スフィンゴシン 1-リン酸受容体), ミラベグロン (過活動膀胱治療薬;  $\beta_3$  アドレナリン受容体), トルバブタン (利尿薬;  $\text{V}_2$  バソプレシン受容体) などが挙げられる. 一方, いまだにリガンドが同定されていない GPCR は多数 (IUPHAR データベース<sup>1)</sup>によると, Class A GPCR のうち 79 種類) 存在し, これらはオーファン (孤児) GPCR と呼ばれている. ノックアウトマウスやヒト遺伝病等の解析から, オーファン GPCR が疾患に関与することが示されている. 例えば, GPR3 がアルツハイマー病に対して促進的に働くこと<sup>2)</sup>や, GPR15 が大腸炎に対して防御的に機能すること<sup>3)</sup>が報告されている. したがって, オーファン GPCR を標的としたアゴニスト (作動薬) やアンタゴニスト (拮抗薬) が新規の疾患治療薬となることが期待される. しかし, 多くのオーファン GPCR において, どの下流シグナルが活性化されるか不明のため, アゴニストやアンタゴニストの評価系の構築が困難である. 最近我々は,  $\text{TGF}\alpha$  (トランスフォーミング増殖因子  $\alpha$ ) 切断アッセイと名付けた新たな GPCR 活性化検出法を開発し, このアッセイ系がリガンド既知 GPCR のみならずオーファン

GPCR の解析にも極めて有用な手法であることを示した<sup>4)</sup>. 本稿では, この  $\text{TGF}\alpha$  切断アッセイについて紹介する.

### 2. 主な GPCR 活性化検出法

一般的に, GPCR の活性化は, 主に三量体 Gタンパク質の下流のシグナルを検出することで評価される. 三量体 Gタンパク質は分子の相同性と下流シグナルの特異性から, 4 種類のクラス ( $G_s$ ,  $G_i$ ,  $G_{q/11}$ ,  $G_{12/13}$ ) に分類される\*<sup>1</sup>. 例えば,  $G_s$  はアデニル酸シクラーゼの活性化を介した cAMP 産生,  $G_i$  はアデニル酸シクラーゼの阻害による cAMP 産生抑制,  $G_{q/11}$  はホスホリパーゼ C を介した細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  流入,  $G_{12/13}$  は Rho グアニンヌクレオチド交換因子 (Rho-GEF) を介したアクチンストレスファイバー形成, にそれぞれ関与しており, これらの細胞内シグナル現象が GPCR の活性化の指標として利用される (図 1). また, 三量体 Gタンパク質への  $\text{GTP}\gamma\text{S}$  (非水解性の GTP アナログ) の取り込みや転写因子の活性化を利用したレポーター遺伝子発現 (cAMP 応答配列や血清応答配列) をプロモーターに有するルシフェラーゼ遺伝子など) も使用される (図 1). また, 活性化後のリン酸化 GPCR と  $\beta$  アレスチンの会合を利用した GPCR 活性化検出法も開発されている.

上記に挙げた既存の GPCR 活性化検出法には複数の問題点が存在する. 例えば, 一つのアッセイ系で検出できる GPCR の割合が低い (最大でも半数程度) こと,  $G_{12/13}$  シグナルを高精度・高感度に測定する手法は確立されていないこと (アクチンストレスファイバー形成等でも活性化は評価できるが, 定量性が低い), 一般に高価な検出機器 (発光, 蛍光等) やランニングコスト (シグナル検出試薬等) が必要であることが挙げられる. また, 一部のアッセイ系では GPCR 遺伝子の改変 (蛍光タンパク質等との融合など) や安定細胞株を作製する必要がある. さらに, ほとんど

$\text{TGF}\alpha$  shedding assay is useful for identifying ligands for orphan GPCRs

Asuka Inoue and Junken Aoki (Laboratory of Molecular and Cellular Biochemistry, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Tohoku University, 6-3, Aoba, Aramaki, Aoba-ku, Sendai, Miyagi 980-8578, Japan)

\*<sup>1</sup> 三量体 Gタンパク質のサブユニット ( $G\alpha\beta\gamma$ ) のうち,  $G\alpha$  サブユニットが GDP/GTP 結合本体であり, GPCR への結合とシグナル伝達に関与する (図 1). ヒトにおいて,  $G\alpha_s$ ,  $G\alpha_i$ ,  $G\alpha_{q/11}$ ,  $G\alpha_{12/13}$  は, それぞれ 2, 8, 4, 2 種類のメンバー (異なる遺伝子にコード) が存在する.

## テクニカルノート

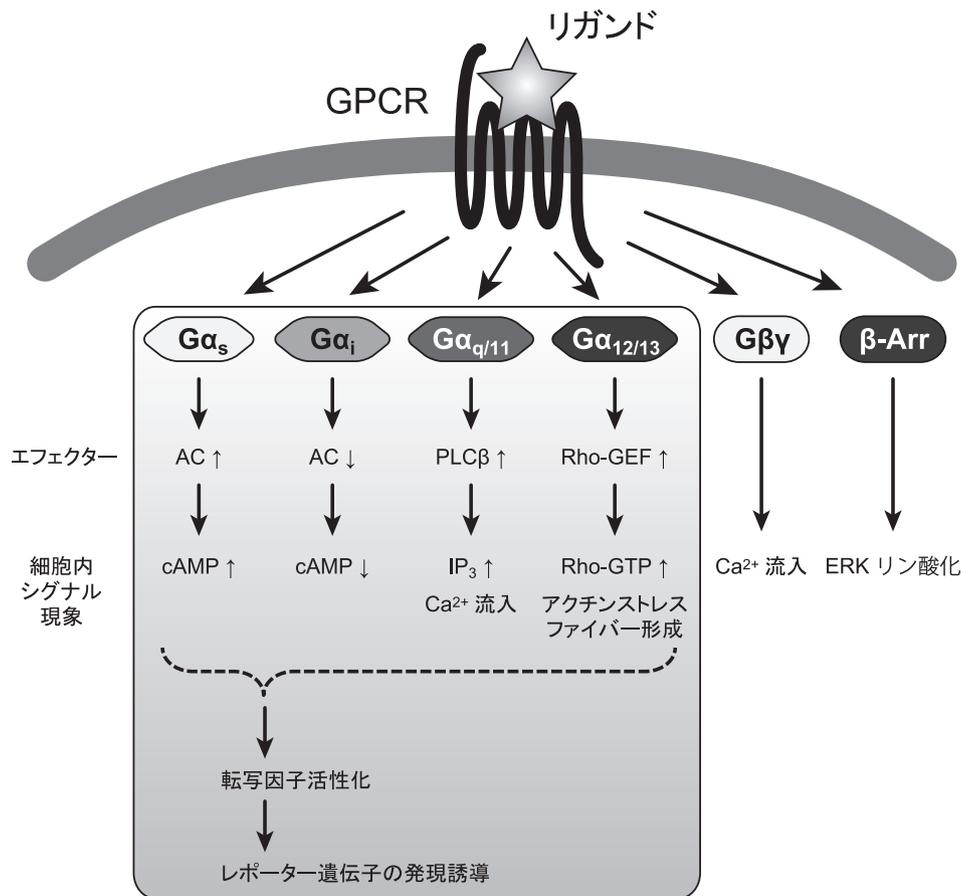


図1 GPCR シグナル

三量体Gタンパク質のG $\alpha$ サブユニットが主要なシグナル伝達を担う(枠部分)。G $\alpha$ サブユニットは4種類に分類され、それぞれ特異的なエフェクターを介して細胞内シグナル現象を引き起こす。細胞内シグナルにより種々の転写因子が活性化され、転写因子応答配列を有するレポーター遺伝子の発現を誘導する。G $\beta\gamma$ サブユニットや $\beta$ -アレクチン( $\beta$ -Arr)の下流でも細胞内シグナルが誘導される。GPCRの活性化は表記の細胞内シグナル現象やタンパク質相互作用を利用して検出される。 $\uparrow$ は活性化・増加を表し、 $\downarrow$ は抑制・減少を表す。AC(アデニル酸シクラーゼ)、PLC $\beta$ (ホスホリパーゼC- $\beta$ )、Rho-GEF(Rhoグアニンヌクレオチド交換因子)。

どのオーファンGPCRにおいて共役する三量体Gタンパク質は明らかになっておらず、どのアッセイ系を適用すればよいか判断がつかない。TGF $\alpha$ 切断アッセイは、これらの問題点をほぼクリアしている<sup>4)</sup>。すなわち既存の手法と比較した際の長所として、(1)約90%ものGPCRの活性化を検出できること、(2)G $_{12/13}$ シグナルを高感度かつ高精度に検出できること、(3)汎用される機器(プレート対応吸光度測定機)と安価な検出試薬(96ウェルプレート1枚あたり約20円)で実験が行えること、(4)特殊なGPCR発現ベクターを作製する必要はないこと、(5)一過性発現に対応していることが挙げられる。したがって、TGF $\alpha$ 切断アッセイはGPCR活性化検出法の有用な第一選択肢といえる。

3. TGF $\alpha$ 切断アッセイの原理と手法

TGF $\alpha$ <sup>\*2</sup>は上皮成長因子受容体(EGFR)のリガンドの一つであり、膜貫通型前駆体タンパク質として発現する。前駆体TGF $\alpha$ は膜型プロテアーゼによりエクドメイン切断を受けて、遊離型(50アミノ酸)として細胞外へと放出される。TGF $\alpha$ 切断アッセイでは、このTGF $\alpha$ のエクドメイン切断がGPCRの活性化により誘導されることを利用する。TGF $\alpha$ を簡便に測定するために、前駆体TGF $\alpha$

\*2 TGF $\alpha$ と類似した名称の増殖因子に、TGF $\beta$ と腫瘍壊死因子 $\alpha$ (TNF $\alpha$ )があるが、これらはTGF $\alpha$ とは構造が全く異なるファミリーに属し、受容体も異なる。

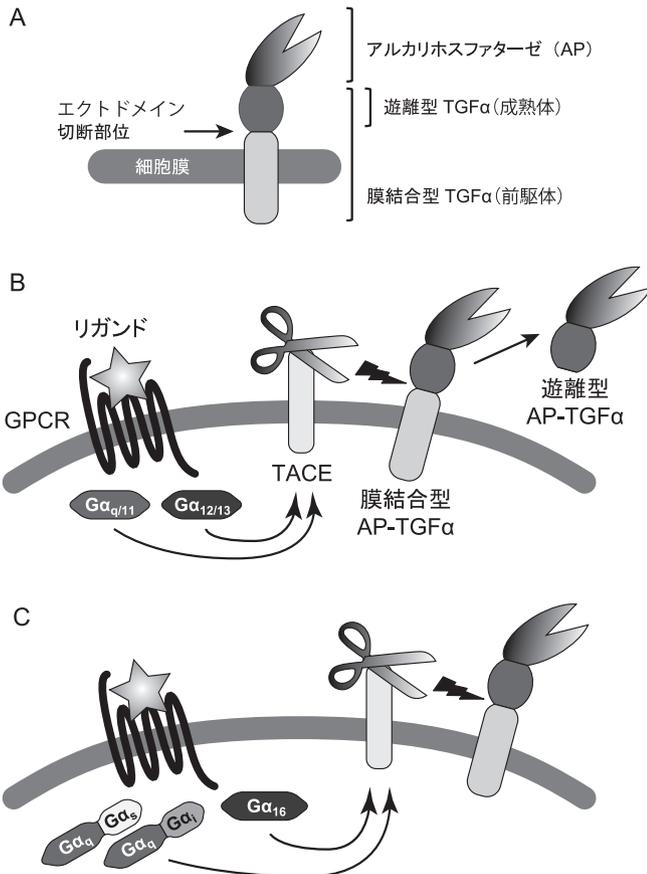


図2 TGFα切断アッセイの原理

(A) AP-TGFαの構造。TGFαの細胞外側 (N末端側) にAPが融合している。(B)  $G_{q/11}$  共役型受容体や  $G_{12/13}$  共役型受容体の場合、HEK293細胞に内在的に発現する  $G_{q/11}$  や  $G_{12/13}$  が活性化されるとAP-TGFα切断が起こる。 $G_{q/11}$  や  $G_{12/13}$  のエフェクター分子 (ホスホリパーゼC-β, プロテインキナーゼC, Rho, ROCKなど) を介してAP-TGFα切断酵素のTACEが活性化される<sup>3)</sup>。(C)  $G_i$  共役型受容体や  $G_{12/13}$  共役型受容体の場合、 $G_{\alpha}$  サブユニット (C末端6アミノ酸を  $G_{\alpha_s}$  や  $G_{\alpha_i}$  に置換したキメラ  $G_{\alpha_q}$  または  $G_{\alpha_{16}}$ ) を共発現させる。この細胞では、GPCRの活性化により  $G_{q/11}$  シグナルが誘導することができ、AP-TGFα切断が生じる。

の細胞外領域にアルカリホスファターゼ (AP) が融合したレポーターコンストラクト (AP-TGFα<sup>5)</sup>) を用いる (図2A)。前駆体AP-TGFαと遊離型AP-TGFαは、それぞれ細胞と培養上清のAP活性を *p*-ニトロフェニルリン酸 (*p*-NPP) の呈色反応 (波長405 nmのエンドポイント吸光度測定) により評価できる。

我々は、以下の理由でHEK293細胞を用いてTGFα切断アッセイを行っている。HEK293細胞は一過的な遺伝子強制発現系において遺伝子産物の高い発現を示す。これは、安定した実験結果を得るために重要な要素である。また、HEK293細胞にはAP-TGFα切断を担うTNFα変換酵

素<sup>3)</sup>(TACE, 別名ADAM17) が内在性に高発現している。我々は、CHO-K1細胞やPC12細胞でもAP-TGFα切断が起こることを確認しているが、現在までのところHEK293細胞で最も安定した結果を得ている。しかし、GPCRの種類によってはHEK293細胞より良い結果を与える細胞株があることは否定できず、この点は今後の課題である。

4種類のGタンパク質シグナルの中で、 $G_{q/11}$  シグナルと  $G_{12/13}$  シグナルがTACEの活性化とAP-TGFα切断を誘導する一方、 $G_s$  シグナルや  $G_i$  シグナルはTGFα切断には関与しない (図2B)。一般的に、 $G_{\alpha}$  サブユニットのC末端の4から6アミノ酸残基がGPCRとの共役に関与することが知られている。そこで、TGFα切断アッセイで検出が困難であった  $G_s$  共役型受容体や  $G_i$  共役型受容体の活性化を検出するため、キメラ  $G_{\alpha}$  サブユニット ( $G_{\alpha_q}$  のC末端6アミノ酸を置換, 図2C) や  $G_{\alpha_{16}}$  サブユニット (種々のGPCRと非特異的に共役できることで知られる, 図2C) の共発現を試みた。その結果、キメラ  $G_{\alpha}$  サブユニットの共発現下、 $G_s$  共役型受容体や  $G_i$  共役型受容体の活性化によりAP-TGFα切断が誘導されることがわかった。これは、キメラ  $G_{\alpha}$  サブユニットが活性化状態の  $G_s$  共役型受容体や  $G_i$  共役型受容体に共役し、 $G_q$  シグナルを誘導することでAP-TGFα切断が引き起こされたためと考えられる。 $G_{\alpha_q}$  由来のキメラ  $G_{\alpha}$  サブユニットの代わりに、 $G_{\alpha_{12/13}}$  由来のキメラ  $G_{\alpha}$  サブユニットを用いても  $G_s$  共役型受容体や  $G_i$  共役型受容体の活性化を検出することは可能である。しかし、 $G_{\alpha_q}$  由来のキメラ  $G_{\alpha}$  サブユニットを用いた場合のほうがより強いAP-TGFα切断を引き起こすことがわかった。よって、筆者らは主に  $G_{\alpha_q}$  由来のキメラ  $G_{\alpha}$  サブユニットを用いている。 $G_{\alpha_q}$  サブユニットには8種類のメンバーが存在するため、著者らはC末端の6アミノ酸を網羅するように4種類 (一部のメンバーはC末端の6アミノ酸が同一) のキメラ  $G_{\alpha}$  サブユニット発現ベクターを作製し、キメラ  $G_{\alpha_{q/s}}$  と  $G_{\alpha_{16}}$  サブユニットを合わせた6種類の  $G_{\alpha}$  発現ベクターを混合して細胞に導入している<sup>4)</sup>。

TGFα切断アッセイでははじめに、目的のGPCRとAP-TGFαおよび  $G_{\alpha}$  サブユニットの発現プラスミドベクターをリポフェクション法によりHEK293細胞に導入する。翌日、細胞を剥がし、ハンクス緩衝液で懸濁し、96ウェルプレートに90  $\mu$ Lずつ播種する。30分後、GPCRリガ

<sup>3)</sup> TACEは名称の由来通りTNFα切断も引き起こすが、基質特異性が低くTGFαをはじめ種々の膜タンパク質のエクトドメイン切断に関与する。

<sup>4)</sup> ただし、最大のAP-TGFα切断応答を得たい場合、6種類の混合ではなく最適な  $G_{\alpha}$  サブユニットを1種類のみ共発現させた (あるいは共発現させない) 方がよい。

## テクニカルノート

ンドを 10  $\mu$ L ずつ添加し、60 分間培養する。その後、培養上清を 80  $\mu$ L ずつ別の 96 ウェルプレートに分注し<sup>5</sup>、*p*-NPP 溶液を 80  $\mu$ L ずつ添加する。*p*-NPP 添加後と 37°C で 60 分間反応させた後のプレートの吸光度を測定する。細胞側と培養上清側の AP 活性の比から、AP-TGF $\alpha$  の切断量を計算する。詳細な実験プロトコールおよびデータ例に関しては、筆者らの研究室の HP を参照されたい<sup>6</sup>。

### 4. オーフアン GPCR のリガンドの同定

筆者らは、TGF $\alpha$  切断アッセイを用いてオーファン GPCR のリガンド探索を行った。その結果、P2Y10, A630033H20, GPR174 の 3 種類の GPCR が、生理活性脂質リゾリン脂質の一種であるリゾホスファチジルセリン (LysoPS) により活性化されることを見出した<sup>4</sup>。これら 3 種類の GPCR は LysoPS の構造を特異的に認識し、極性基を変化させた LysoPS 類似体 (セリン残基をエタノールアミン残基やトレオニン残基への置換など) は全く活性を示さなかった。また、いずれの GPCR も G<sub>12/13</sub> と共役することがわかった。

GPCR のアミノ酸配列を元に作成した系統樹から、P2Y10, A630033H20, GPR174 は GPR34 (当時、唯一同定されていた LysoPS 受容体<sup>7</sup>) と共にクラスターを形成していた<sup>4</sup>。このことから、進化の過程で、LysoPS を認識する GPCR が出現し、遺伝子重複を経て LysoPS 受容体群が形成されたと考えられる。事実、この 4 種類の LysoPS 受容体遺伝子はヒトやマウスで X 染色体上に存在し、そのうち P2Y10, A630033H20, GPR174 は近接した領域にタンデムに並んでいる。なお、A630033H20 のヒトオルソログは、ORF 中にフレームシフトを起こす変異が入っており、偽遺伝子 (遺伝子シンボル *P2RY10P2*) となっている。マウスとラットの A630033H20 は LysoPS により活性化された。筆者らはリゾリン脂質受容体の命名法に従い、上記の 4 種類の LysoPS 受容体を LPS<sub>1</sub> (GPR34), LPS<sub>2</sub> (P2Y10), LPS<sub>2L</sub> (LPS<sub>2</sub>-like; A630033H20), LPS<sub>3</sub> (GPR174) と呼ぶことを提唱している<sup>4</sup>。

### 5. 今後の展望

ゲノム解読の終了により、GPCR をコードする遺伝子はほぼすべて見いだされ、オーファン GPCR のクローニングはたやすく行えるようになった。ヒトゲノム解読が 2003 年に完了したのち、オーファン GPCR のリガンド同定の報告が相次いだ。最近そのペースは激減している。

筆者らは、今後新たなオーファン GPCR のリガンド同定を成功させるには、GPCR 活性化検出法やリガンド候補化合物を工夫する必要があると考えている。TGF $\alpha$  切断アッセイは、試したりガンド既知の GPCR のうち、約 90% もの種類について活性化の検出が可能であった。したがって、GPCR 活性化検出の第一選択肢として活用が期待される。

TGF $\alpha$  切断アッセイは、既存の GPCR 活性化検出法と比べ、特に G<sub>12/13</sub> シグナルの検出に優れていた。実際、今回見いだした 3 種類の LysoPS 受容体は、市販の化合物をライブラリーとすることで容易に同定できた。今後、リガンド候補化合物を充実させることや組織抽出物を用いることで、さらに多数の G<sub>12/13</sub> 共役型受容体を同定できるものと期待している。リガンドが同定されると報告のある GPCR に関しても、内因性のリガンドは異なる可能性があり、オーファン GPCR に加えてリガンド既知の GPCR もスクリーニングの候補受容体に加えておくことが望ましい。

本稿では省略したが、TGF $\alpha$  切断アッセイは GPCR の恒常活性 (リガンド非依存的な活性化) を検出することも可能であった。オーファン GPCR の中には恒常活性の高い受容体が報告されており、生体内では逆作動 (インバースアゴニスト) 活性を持つ内因性リガンドにより制御されている可能性がある。これまでに見いだされた逆作動活性を持つ内因性リガンドは、レチナール (ロドプシンリガンド) とアグーチ関連タンパク質 (AgRP; MC4 メラノコルチン受容体リガンド) のみである。TGF $\alpha$  切断アッセイを用いて、逆作動活性を示すリガンドのスクリーニングを行うことは今後の興味深い課題であろう。

筆者らは、HEK293 細胞以外に CHO-K1 細胞や PC12 細胞などでも AP-TGF $\alpha$  切断応答が起こることを観察している<sup>4</sup>。上記の細胞株を含め、他の細胞では膜型プロテアーゼや細胞内シグナル伝達分子 (三量体 G タンパク質等) の発現パターンが異なると考えられ、HEK293 細胞とは異なる GPCR シグナル (G<sub>s</sub>, G<sub>i</sub>, G $\beta\gamma$ ,  $\beta$ -アレスチン等) により AP-TGF $\alpha$  切断が誘導される可能性がある。また、TGF $\alpha$  以外にも種々のエクドメイン切断を受ける膜タンパク質が存在することから、これら膜タンパク質の AP 融合コンストラクトと細胞株を組み合わせることで、新たな GPCR シグナルを検出できる可能性もある。

GPCR シグナルによる TACE 活性化と TGF $\alpha$  切断は、EGFR のトランス活性化という観点からも興味深い。個体レベルにおける EGFR のトランス活性化の意義が判明している例は、LPA<sub>6</sub> リゾホスファチジン酸受容体の毛髪形成への関与<sup>8</sup>や AT1 アンジオテンシン II 受容体の腎疾患への関与<sup>9</sup>など、現時点では少数にとどまっている。TACE、

<sup>5</sup> 培養上清を分注する直前に、プレートを遠心すると分注する上清への細胞の混入が抑えられ、精度の高い実験結果を得ることができる。

TGF $\alpha$ , EGFR のノックアウトマウスは様々な異常が見いだされているものの, この経路がどのように制御されているかはほとんどわかっていない<sup>10-12)</sup>. 今後, GPCR による TACE や EGFR の活性化制御に着目することで, TACE 活性化や EGFR のトランス活性化の生理的・病理的役割が明らかになるものと期待される.

### 謝辞

AP-TGF $\alpha$  コンストラクトは愛媛大学医学部・東山繁樹教授に提供していただき, LysoPS アナログは東京大学薬学部・大和田智彦教授に合成していただいた. 本研究の重要なツールを提供していただいた先生方に改めて感謝の意を表したい.

1) <http://www.iuphar-db.org/DATABASE/>

2) Thathiah, A., Spittaels, K., Hoffmann, M., Staes, M., Cohen, A., Horre, K., Vanbrabant, M., Coun, F., Baekelandt, V., Delacourte, A., Fischer, D.F., Pollet, D., De Strooper, B., & Merchiers, P. (2009) *Science*, **323**, 946-951.

3) Kim, S.V., Xiang, W.V., Kwak, C., Yang, Y., Lin, X.W., Ota, M., Sarpel, U., Rifkin, D.B., Xu, R., & Littman, D.R. (2013)

*Science*, **340**, 1456-1459.

4) Inoue, A., Ishiguro, J., Kitamura, H., Arima, N., Okutani, M., Shuto, A., Higashiyama, S., Ohwada, T., Arai, H., Makide, K., & Aoki, J. (2012) *Nat. Methods*, **9**, 1021-1029.

5) Tokumaru, S., Higashiyama, S., Endo, T., Nakagawa, T., Miyagawa, J.I., Yamamori, K., Hanakawa, Y., Ohmoto, H., Yoshino, K., Shirakata, Y., Matsuzawa, Y., Hashimoto, K., & Taniguchi, N. (2000) *J. Cell Biol.*, **151**, 209-220.

6) <http://www.pharm.tohoku.ac.jp/~seika/H24/index.html>

7) Sugo, T., Tachimoto, H., Chikatsu, T., Murakami, Y., Kikukawa, Y., Sato, S., Kikuchi, K., Nagi, T., Harada, M., Ogi, K., Ebisawa, M., & Mori, M. (2006) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **341**, 1078-1087.

8) Inoue, A., Arima, N., Ishiguro, J., Prestwich, G.D., Arai, H., & Aoki, J. (2011) *EMBO J.*, **30**, 4248-4260.

9) Lautrette, A., Li, S., Alili, R., Sunnarborg, S.W., Burtin, M., Lee, D.C., Friedlander, G., & Terzi, F.A. (2005) *Nat. Med.*, **11**, 867-874.

10) Ohtsu, H., Dempsey, P.J., & Eguchi, S. (2006) *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **291**, C1-10.

11) Edwards, D.R., Handsley, M.M., & Pennington, C.J. (2008) *Mol. Aspects Med.*, **29**, 258-289.

12) Pastore, S., Mascia, F., Mariani, V., & Girolomoni, G. (2008) *J. Invest. Dermatol.*, **128**, 1365-1374.