

博士論文

循環器領域における GPCR リガンド探索のための  
新規高感度アッセイ系の確立

木戸 命

循環器領域における GPCR リガンド探索のための  
新規高感度アッセイ系の確立

所属：東京大学大学院医学系研究科内科学専攻

指導教員名：小室 一成

申請者名：木戸 命

共同研究者名：

池田 祐一、熊谷 英敏、伊藤 薫

## 目次

|  |    |
|--|----|
| 目次   | 2  |
| 要旨   | 3  |
| 略語一覧   | 4  |
| 序文   | 6  |
| 材料と方法  | 12 |
| 結果   | 27 |
| ・細胞膜型転写因子と細胞膜型プロテアーゼを組み合わせた人工遺伝子回路<br>の設計とその実証実験 |    |
| ・ $G\alpha_{12/13}$ シグナルによって発現が誘導される遺伝子群の網羅的同定   |    |
| ・ ゲノムに人工遺伝子回路が組み込まれた <b>HeLa</b> 細胞の作成           |    |
| ・ 二つの因子を <b>knockin</b> する有用性                    |    |
| ・ 新規アッセイ法と従来アッセイ法の比較                             |    |
| ・ リガンド既知全ヒト <b>GPCR</b> に対する本新規アッセイ系での分析結果       |    |
| 考察   | 66 |
| 謝辞   | 70 |
| 引用文献   | 71 |

## 要旨

G タンパク質共役型受容体 (GPCR) は創薬標的として優れた受容体分子群である。循環器疾患領域においては、G $\alpha$ 12/13 と共役する GPCR が最近注目されている。しかし、G $\alpha$ 12/13 シグナルを検出する簡便・高感度なアッセイ系が存在しないため、これら受容体を標的とした化合物スクリーニングは殆ど実施されていない。

そこで本研究では、「G $\alpha$ 12/13 シグナルを増幅する人工遺伝子回路」をゲノムに組み込んだ細胞を樹立し、この細胞を用いた G $\alpha$ 12/13 シグナルに対する簡便・高感度な新規アッセイ系を構築した。今後はこのアッセイ系を使用し、G $\alpha$ 12/13 と共役する GPCR を標的とした化合物スクリーニングを展開する。

## 略語一覽

|         |   |
|---------|---|
| Cas9:   | CRISPR-associated protein 9                               |
| CRE:    | cAMP response element                                     |
| CRISPR: | clustered regularly interspaced short palindromic repeats |
| CTGF    | connective tissue growth factor                           |
| DP:     | donor plasmid   |
| DSB:    | double-strand break                                       |
| EDTA:   | ethylenediaminetetraacetic acid                           |
| FPKM:   | fragments per kilobase of exon per million reads mapped   |
| GPCR    | G protein-coupled receptor                                |
| HITI:   | homology-independent targeted integration                 |
| HRV:    | human rhinovirus  |
| IRES:   | internal ribosomal entry site                             |
| LPA:    | Lysophosphatidic acid                                     |
| LPI:    | Lysophosphatidylinositol                                  |
| MCS:    | multiple cloning site                                     |
| NECA:   | 5'-N-Ethylcarboxamido adenosine                           |
| NFAT:   | nuclear factor of activated T cells                       |

|        |   |
|--------|---|
| NHEJ:  | non-homologous end joining                          |
| PAM:   | protospacer-adjacent motif                          |
| PBS:   | phosphate buffered saline                           |
| PC:    | positive control                                    |
| PCR:   | polymerase chain reaction                           |
| PEST:  | proline/glutamic acid/serine/threonine-rich motives |
| sgRNA: | single guide RNA                                    |
| SRE:   | serum response element                              |
| SRF:   | serum response factor                               |
| TMGV:  | transmembrane Gal4VP64                              |
| TM3C:  | transmembrane 3C                                    |
| 3'UTR: | 3 prime untranslated region                         |

## 序文

G タンパク質共役型受容体（GPCR）は、細胞膜上に存在する特徴的な 7 回膜貫通型構造を持つ受容体分子群である(1)。神経伝達物質やホルモン等のリガンドによる刺激を受けると、GPCR は構造変化を起こし、細胞質側に存在する三量体 G タンパク質を活性化する。それによって G タンパク質が GDP 結合型から GTP 結合型に変化し、細胞内へ様々なシグナルを伝達する。

ヒトの GPCR はヒトゲノム解析により約 850 種見つかっているが、その内約 550 種が嗅覚・味覚などに関与する感覚受容体群である。残り約 300 種は、生体内の多種多様な生理活性物質を認識する受容体分子群であると考えられており、これらの GPCR は有望な創薬ターゲットとなる(2-4)。実際、現在市販されている医薬品の約 4 割が GPCR をターゲットにしている。しかし、これら約 300 種の GPCR の内、既に受容体作動薬・拮抗薬が十分に開発されている受容体は約 50 種程度であり、標的薬が不十分ではあるが少数開発されている受容体を合わせても約 100 種に留まっている。よって残りの約 200 種は創薬ターゲットとして依然未開発のままである（図 1）(5)。これら未開発の受容体の中には、現時点で利用可能なアッセイ系では効率よくその活性をモニターできない受容体や、未だリガンド不明のオーファン受容体（リガンドが不明であると下流シグナル

も不明であるため、化合物スクリーニングのための適切なアッセイ系を構築・設計することが困難) などが数多く含まれる(6)。

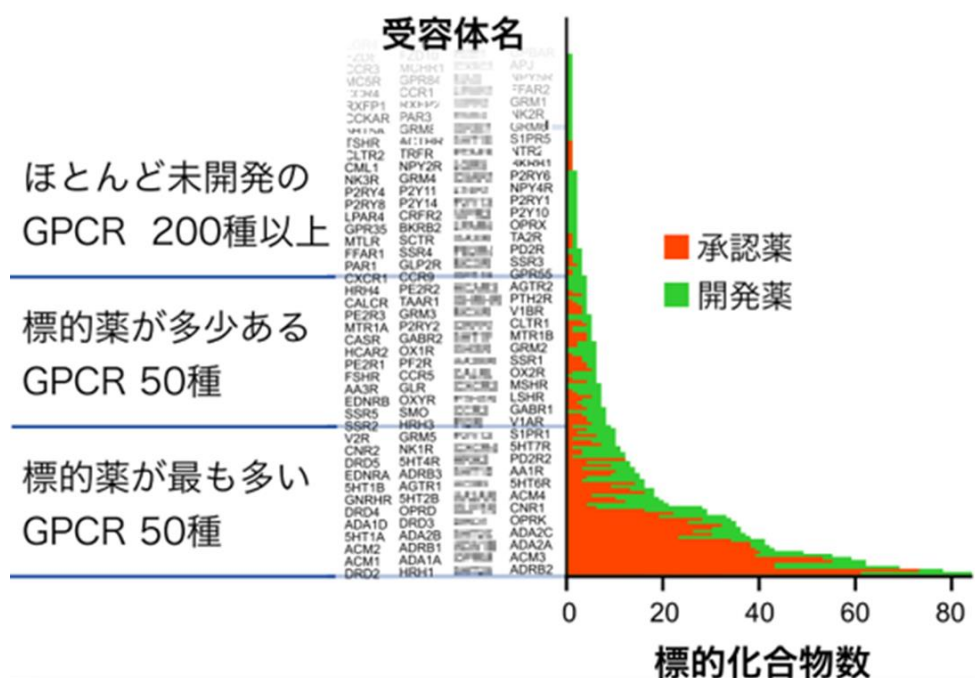


図 1. GPCR には未開拓な創薬標的が多数存在している(5)

上図のように、標的薬が既に開発されている GPCR（感覚受容体以外）は 100 種ほどであり、未開発な GPCR は依然として 200 種類以上存在する。

循環器疾患領域においては、 $\alpha$  アドレナリン受容体作動薬・拮抗薬、 $\beta$  アドレナリン受容体作動薬・拮抗薬、アンギオテンシン受容体拮抗薬、バソプレシン受容体拮抗薬など、GPCR をターゲットとした医薬品が既に多数開発されている(7-10)が、これらの医薬品だけでは治療効果が不十分な疾患や病態も数多く存在する。



よって、現時点で未開発のまま残存している約 200 種の GPCR の内、心血管系に発現する GPCR をターゲットにした創薬スクリーニングを実施し、それら受容体に作用する化合物を同定できれば、循環器疾患領域における革新的な治療薬開発へと繋がる可能性がある。そのためには、それら受容体の活性を効率よく検出するための新規 GPCR アッセイ系の構築が不可欠である。

GPCR 直下で活性化される三量体 G タンパク質は  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  の三つのサブユニットにより複合体を構成している(1-3)。G $\alpha$  サブユニットには G $\alpha$ s、G $\alpha$ i/o、G $\alpha$ q、G $\alpha$ 12/13 の 4 種類のサブタイプが存在し、G $\alpha$  のサブタイプによって GPCR との結合や活性化する下流シグナルが異なる。G $\alpha$ s はアデニル酸シクラーゼを活性化して細胞内 cAMP を増加させる。G $\alpha$ i/o はアデニル酸シクラーゼを阻害することで cAMP を減少させ、G $\alpha$ s シグナルを抑制する。G $\alpha$ q はホスホリパーゼ C $\beta$  を活性化して、細胞内 Ca<sup>2+</sup>を増加させる。G $\alpha$ 12/13 は RhoA を活性化し細胞骨格に影響を及ぼす (図 2) (11,12)。

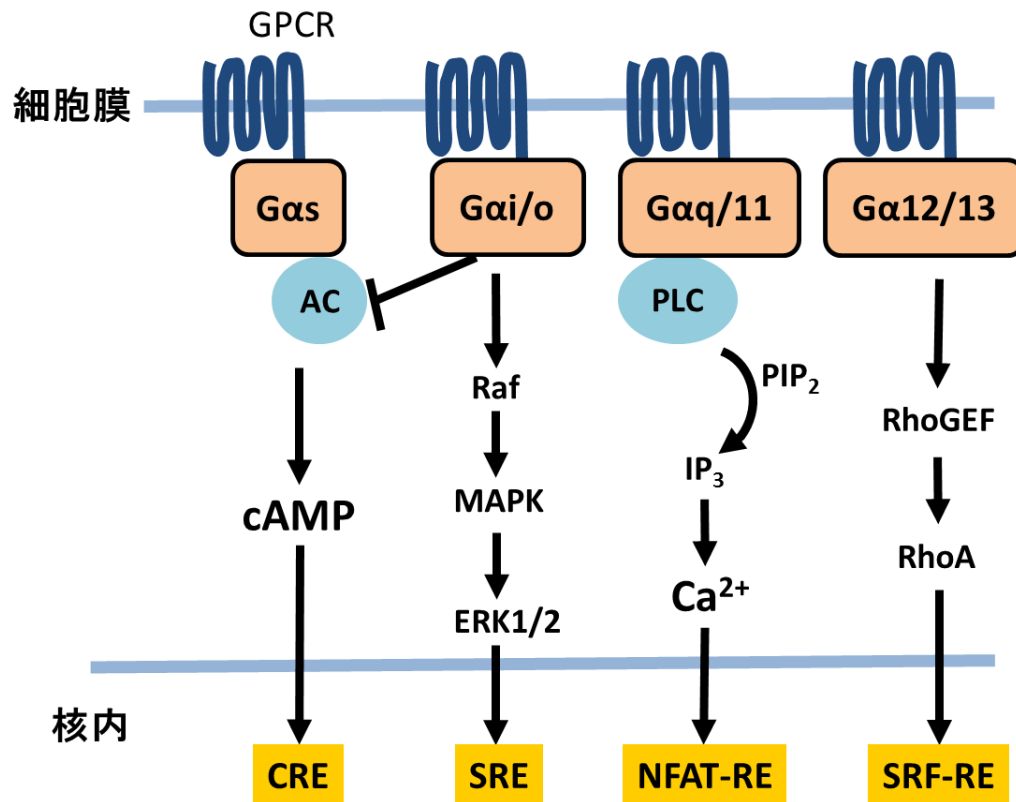


図 2. GPCR シグナリングとレポーターアッセイ系

GPCR と共役する G タンパク質の種類によって様々なシグナルが発生する。

Gas は、アデニル酸シクラーゼ (AC) の活性化を引き起こし、細胞内 cAMP を増加させる。シグナルの検出には、cAMP 応答配列 (CRE) を利用したレポーターアッセイ系が用いられる。

Gai/o は、Gas と逆に AC を抑制する。また、Raf を活性化させるシグナルも存在するため、ERK に反応する血清応答配列 (SRE) を利用したレポーターアッセイ系が知られている。

Gaq/11 はホスホリパーゼ C (PLC) を活性化させて、細胞内 Ca<sup>2+</sup> を増加させる。Ca<sup>2+</sup> に反応する NFAT 応答配列 (NFAT-RE) を利用したレポーターアッセイ系で活性を測定できる。

Gα12/13 は RhoA を活性化して細胞骨格に関与し、血清応答因子 (SRF) を活性化させる。

これら 4 種類のシグナルの中でも近年、心血管系における  $G\alpha_{12/13}$  シグナルの重要性が注目されている(12-14)。1997 年には、 $G\alpha_{13}$  遺伝子を全身で knockout したマウスが作成され、血管系の発達不全により胎生致死を引き起こすことが報告された(15)。また 2012 年には、 $G\alpha_{13}$  遺伝子を成獣で心筋細胞特異的に knockout したマウスにおいて、圧負荷によって惹起される心筋細胞の肥大と心臓の線維化が抑制されることが報告された(16)。またこのフェノタイプに  $G\alpha_{13}$  下流の RhoA が関与していることも示唆された。以上のことから、循環器疾患領域において  $G\alpha_{13}$  シグナルは極めて重要であると考えられている。

GPCR に作用する化合物をスクリーニングする際には、標的とする GPCR がどの  $G\alpha$  に共役するかをあらかじめ知り、その  $G\alpha$  シグナルに対応するアッセイ系を用意する必要がある(17-20)。しかし、 $G\alpha_{12/13}$  シグナルを検出できるアッセイ系は現時点で既にいくつか知られているものの(21-23)、high throughput screening (HTS) に対応可能な簡便で高感度なアッセイ系は存在しない。そのため、その重要性にも関わらず、 $G\alpha_{12/13}$  と共役する GPCR を対象とした化合物スクリーニングは現在までほとんど実施されてこなかった。また興味深いことに、現時点でオーファンとして残っている GPCR の内、かなりの受容体が  $G\alpha_{12/13}$  と共役する可能性があることが最近報告された(23)。よって、 $G\alpha_{12/13}$  シグナルを効率よくモニターできる新たなアッセイ系を確立すれば、 $G\alpha_{12/13}$  と共役する

GPCR のみならずオーファン GPCR に対する化合物スクリーニングも実施可能となることが期待される。

本研究では、まず Gα12/13 が活性化された際にその下流で発現が誘導される遺伝子を、全ヒト遺伝子を対象にした RNA seq 解析を用いて網羅的に同定した。次に、それら遺伝子の中から本研究の目的に相応しい二つの遺伝子を選択し、選択された二つの遺伝子の転写調節機構を利用して Gα12/13 シグナルを増幅できる人工遺伝子回路を設計した。さらに、この人工遺伝子回路を細胞内ゲノムに組み込んだアッセイ用細胞を樹立し、このアッセイ用細胞を用いて Gα12/13 シグナルを高感度に検出できるレポーターアッセイ系を確立することができた。今後は、この新規アッセイ系により、Gα12/13 に共役する GPCR およびオーファン GPCR をターゲットとした化合物スクリーニングを展開していく予定である。

## 方法と材料

### 【細胞培養】

HeLa 細胞（ATCC CCL-2）は、10%非働化ウシ胎児血清（SIGMA 社）および Penicillin- Streptomycin（ナカライテスク社）を加えた、ダルベッコ改変イーグル培地（ナカライテスク社）を用いて、温度 37℃、5% CO<sub>2</sub> インキュベーター内で培養した。3～4 日毎に継代を行っており、継代時は培地を吸引後、リン酸緩衝生理食塩水（PBS, ナカライテスク社）で洗浄し、Trypsin-EDTA（ナカライテスク社）を用いて、細胞を剥がし、上記培地へ置換後、任意の細胞数をディッシュへ播種した。

細胞の扱いの容易さ、遺伝子導入効率、アッセイ系との相性などを考慮し、本研究では HeLa 細胞を用いることとした。本研究の目的は、循環器系に発現する GPCR に作用する化合物のスクリーニングに供するアッセイ系を構築することであるが、標的となる GPCR が生体内と同様な三次元構造および翻訳後修飾を維持した状態で HeLa 細胞の細胞膜上に発現されると推定できるので、HeLa 細胞を本アッセイ系に用いることにデメリットは特段にないと考える。

## 【人工遺伝子回路構成因子の作成】

### 1. 細胞膜型人工転写因子 (TMGV : transmembrane Gal4VP64) の作成

ストップコドンで欠失させたヒト IL2 受容体  $\alpha$  鎖の C 末端に、HRV プロテアーゼ 3C 認識切断配列 (LEVLFQGP) を含むアミノ酸配列 GSSSLEVLFQG PGSSS をインフレームで連結し、その C 末端にさらに開始コドンで欠失させた Gal4VP64 (GV : 人工転写因子) をインフレームで連結した。

### 2. 細胞膜型 HRV プロテアーゼ 3C (TM3C : transmembrane 3C) の作成

ストップコドンで欠失させたヒト IL2 受容体  $\alpha$  鎖の C 末端に、GS リンカー配列 (GGGGSGGGSGGGGS)、開始コドンとストップコドンと共に欠失させた HRV プロテアーゼ 3C を順にインフレームで連結し、さらにその C 末端に当該タンパク質を不安定化させる目的で PEST 配列 (オルニチン脱炭酸酵素由来) を付加した。

### 【人工遺伝子回路によるシグナル増幅実証実験】

96 well プレートに HeLa 細胞を播種した (16,000 cell/well)。翌日、細胞膜型人工転写因子を発現するプラスミド (pMXs-TMGV: 75 ng/well)、細胞膜型 HRV プロテアーゼ 3C を発現するプラスミド (pMXs-TM3C: 75 ng/well)、ルシフェラーゼレポーター (UAS-luc: 25 ng/well) をリポフェクション法 (FuGENE6: プロメーガ社) によって一過性に遺伝子導入した (合計 175 ng/well)。遺伝子導入 24 時間後に培養上清を捨て、luciferase 用の基質を添加し、発光シグナルをプレートリーダーにて測定した。なお、pMXs-TMGV および pMXs-TM3C は、ベクターである pMXs を用いて段階希釈されているものを使用した(24)。これにより細胞にトランスフェクションされる DNA 量は一定に保った状態 (上記のようにそれぞれ 75 ng/well) で、TMGV および TM3C のレポーターに対する容量依存的な作用を検証した。

【次世代シーケンサーを用いた RNA seq 解析：Gα12/13 シグナルによって発現が有意に増加する遺伝子群の網羅的同定】

以下の 7 つの実験条件を設定した。GPR55 および LPAR6 は Gα12/13 と特異的に共役する GPCR としてよく知られており、LPI (Lysophosphatidylinositol) は GPR55 のリガンド、LPA (Lysophosphatidic acid) は LPAR6 のリガンドである。

条件 1. HeLa 細胞 (野生型)

条件 2. HeLa 細胞 (野生型) + mock + LPI 10 μM (1 時間刺激)

条件 3. HeLa 細胞 (野生型) + GPR55 + Vehicle (1 時間刺激)

条件 4. HeLa 細胞 (野生型) + GPR55 + LPI 10 μM (1 時間刺激)

条件 5. HeLa 細胞 (野生型) + mock + LPA 10 μM (1 時間刺激)

条件 6. HeLa 細胞 (野生型) + LPAR6 + Vehicle (1 時間刺激)

条件 7. HeLa 細胞 (野生型) + LPAR6 + LPA 10 μM (1 時間刺激)

HeLa 細胞を 6cm ディッシュに播種した ( $5.0 \times 10^5$  cell/6cm)。翌日、条件 2・5 の細胞には mock (pMXs vector) 2 μg を、条件 3・4・6・7 の細胞には GPR55 もしくは LPAR6 を発現するプラスミド (pMXs-GPR55 もしくは pMXs-LPAR6) 2 μg を、リポフェクション法 (FuGENE6: プロメガ社) にて HeLa 細胞に一過性に導入した。遺伝子導入から 24 時間後、細胞を上記の各リガンドで 1 時間刺激し、



刺激後すぐに細胞から Sepasol-RNA I Super G (ナカライテスク社) を用いて total RNA を回収した。1 条件ごとに 3 回実験を行なった。これらの total RNA から mRNA を精製し、mRNA サンプルを次世代シーケンサーによる RNA seq 解析に供した。

## **【Ga12/13 シグナルを増幅する人工遺伝子回路を組み込んだアッセイ用細胞の樹立】**

### 1-1. CRISPR 用プラスミド (pX330-NR4A1-3'UTR) および TMGV ドナープラスミド (TMGV donor plasmid : DP-TMGV) の構築

ゲノムの標的部位 (NR4A1 遺伝子座の 3'UTR) に DNA 二重鎖切断 (double-strand-break : DSB) を起こすための CRISPR 用プラスミドを pX330-U6-Chimeric\_BB-CBh-hSpCas9 (addgene #42230) を基に構築した (pX330-NR4A1-3'UTR) (図 3) (25-30)。

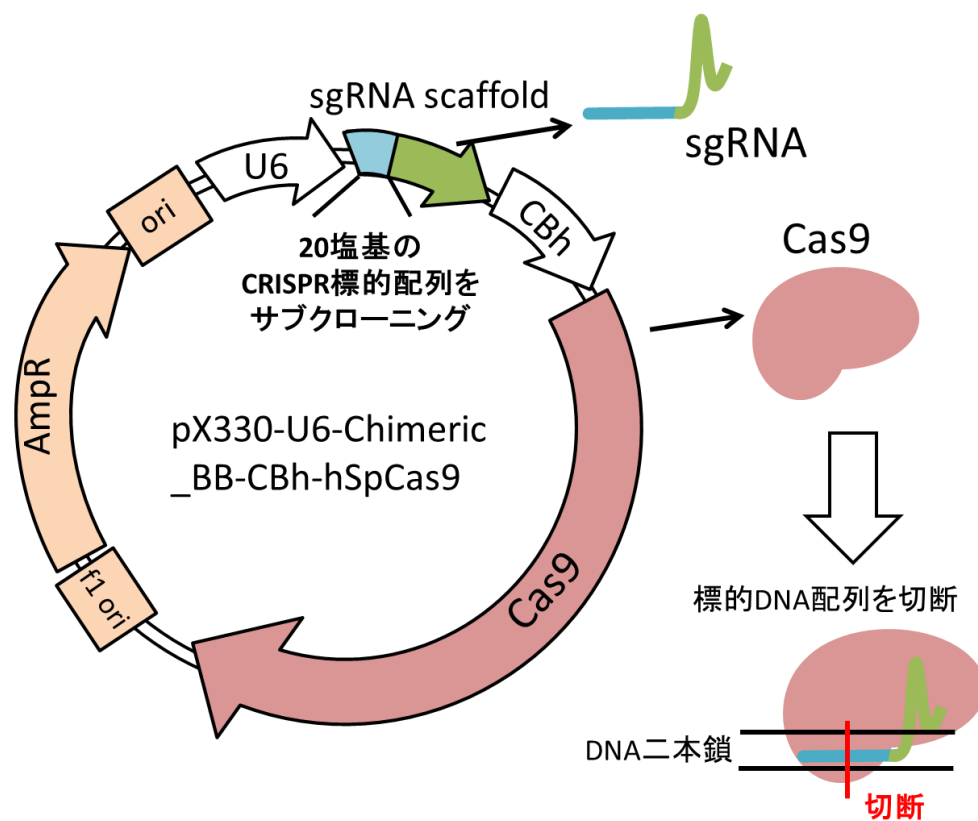


図 3. CRISPR-Cas9 用ベクターデザイン

pX330-U6-Chimeric\_BB-CBh-hSpCas9（以下 pX330）は、①ヒト U6 プロモーターの下に gRNA scaffold を連結させた「U6-gRNA カセット」と、②CBh プロモーターによって SpCas9（*Streptococcus pyogenes* Cas9）を発現させる「CBh-SpCas9 カセット」を同一ベクター上に設計したベクターである。

sgRNA scaffold 中のクローニングサイトにアニーリングした合成オリゴを挿入する。このベクターを導入するだけでゲノム上の標的部位に DSB を起こすことができる。

TMGV の N 末端側に IRES (internal ribosome entry site) 配列を付加した遺伝子断片 (IRES-TMGV 断片) を作成し、その N 末端側に flox-Blastcidin 耐性遺伝子カセット (loxP で Blastcidin 耐性遺伝子カセットの両脇が挟まれている) を連結した(31)。この DNA 断片の N 末端側および C 末端側に上記の pX330-NR4A1-3'UTR が認識する配列をさらに付加し、pBlue Script プラスミドにクローニングした (TMGV donor plasmid : DP-TMGV) (図 4)。

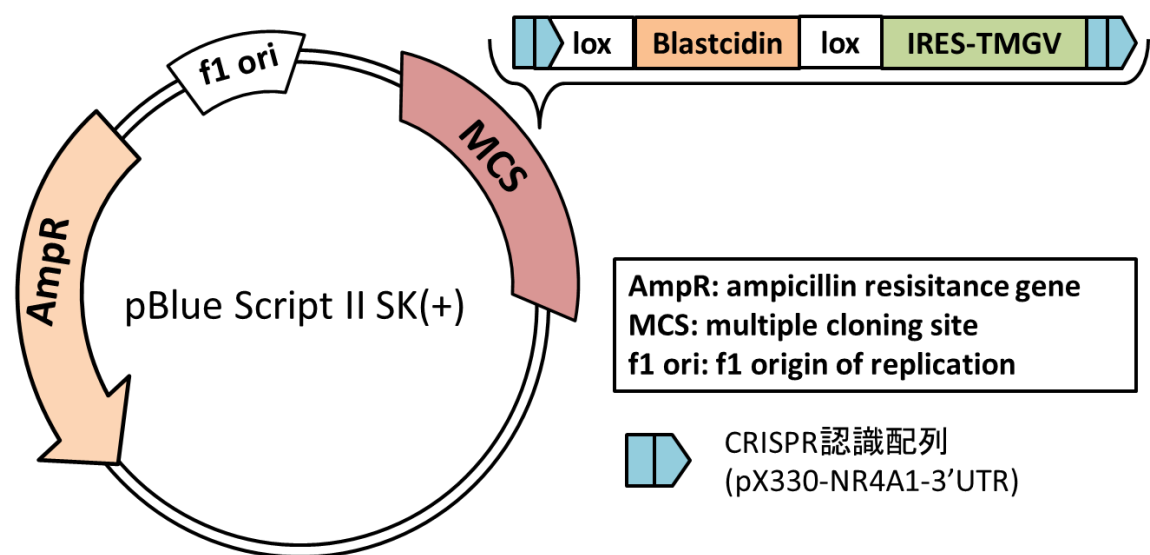


図 4. TMGV donor plasmid デザイン

pBlue Script vector の MCS 領域に、knockin インサート配列の両端を CRISPR 認識配列で挟んだカセットをサブクローニングし、DP-TMGV を作成した。

## 1-2. HeLa 細胞のゲノム内 NR4A1 遺伝子座 3'UTR に IRES-TMGV 断片を knockin

(図 5)

HeLa 細胞を  $5 \times 10^5$  cell/6 cm ディッシュで播種し、翌日に「pX330-NR4A1-3'UTR 3  $\mu$ g + DP-TMGV 0.03  $\mu$ g」をリポフェクション法 (FuGENE6 : プロメガ社) によって一過性に遺伝子導入した。導入した翌日に、細胞培養液に Blastcidin を 10  $\mu$ g/mL となるように添加し、約二週間培養した。Blastcidin 存在下で増殖した HeLa 細胞を限界希釈し、モノクローン化した。モノクローン化したそれぞれのクローンからゲノムを回収し、標的部 (NR4A1 遺伝子座 3'UTR) に

「flox-Blastcidin カセット-IRES-TMGV」遺伝子断片が挿入されているか、genomic PCR 法にて確認した。

「flox-Blastcidin カセット-IRES-TMGV」遺伝子断片が挿入されたクローンに Cre-recombinase を一過性に遺伝子導入し (細胞を  $5.0 \times 10^5$  cell/6cm ディッシュで播種し、翌日に pMXs-iCre-IRES-puromycin 3  $\mu$ g をリポフェクション法で導入した)、遺伝子導入翌日に細胞培養液に puromycin を 10  $\mu$ g/mL となるように添加し、三日間培養した。

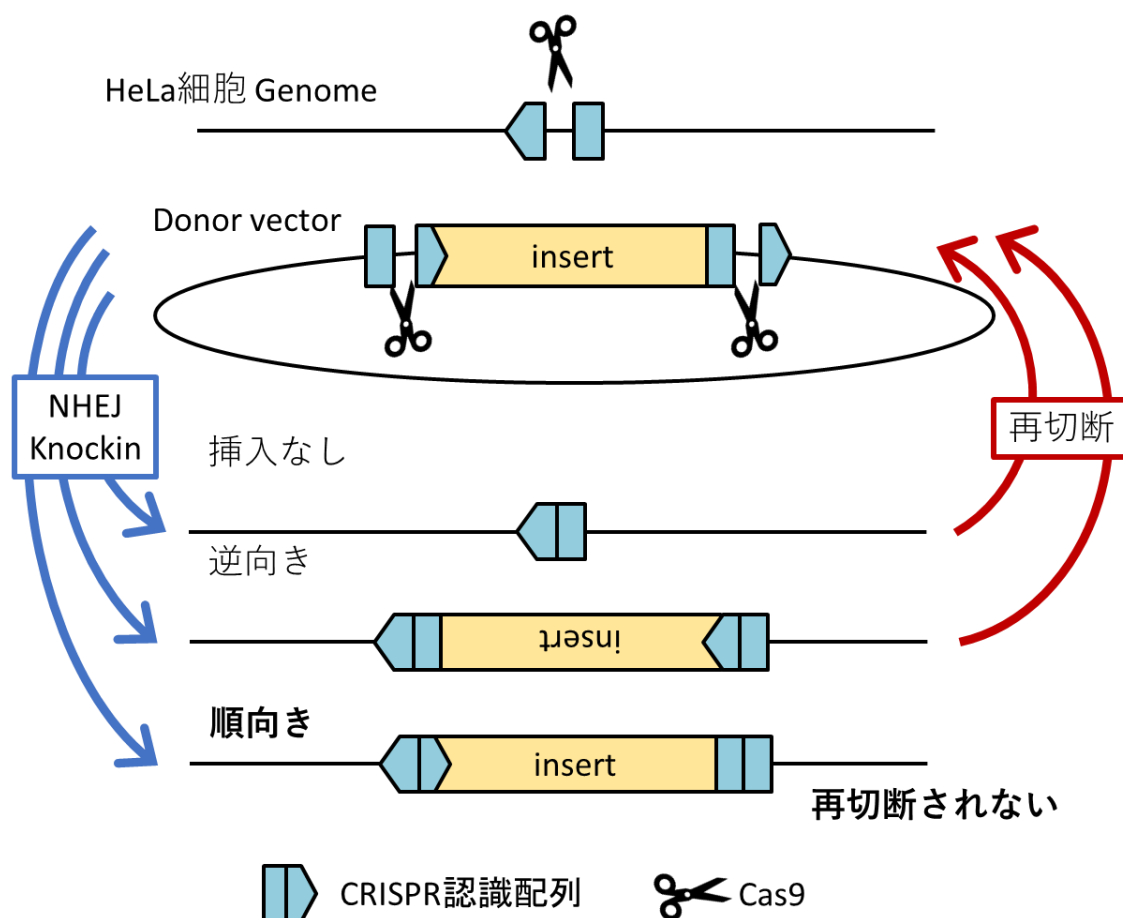


図 5. HITI 法による CRISPR-knockin の概要(32-34)

①インサート配列の両端に、挿入先であるゲノム上の CRISPR-Cas9 標的配列と逆向きの配列を設定したドナーベクターを作成し、ゲノム上の標的配列を認識する CRISPR-Cas9 ベクターと併せて細胞に導入する。②CRISPR-Cas9 システムによりゲノム上の標的部位とドナーベクター上のインサート配列の両端に DSB が作成され、インサート配列が切り出される。③NHEJ を介した knockin によりインサートが入らずに修復された場合や、インサートが逆向きに挿入された場合は、CRISPR-Cas9 標的配列が再度作成されて、再切断される。④インサートが順向きに挿入されるか、修復部位に indel が形成されるまで再切断が繰り返されるため、インサート配列を高効率に順向きに挿入することができる。

本研究での knockin ではこの HITI 法を用いてインサートを knockin している。

### 1-3. 樹立されたモノクローンの選別

上記の手順により樹立されたモノクローン群を以下の方法でさらに選別した。

クローンそれぞれを 24,000 cell/well で 96 穴プレートに播種した。96 well プレートの 1 well につき GPR55 発現プラスミド (pMXs-GPR55) 60 ng + TM3C 発現プラスミド (pMXs-TM3C) 10 ng + UAS-luciferase 30 ng のプラスミドカクテルをリポフェクション法 (FuGENE6 : プロメガ社) によって遺伝子導入した。導入して 24 時間後に GPR55 のリガンドである LPI (濃度 : 3  $\mu$ M、300 nM、0 nM) で細胞を 6 時間刺激した。刺激後、培養上清を捨て、luciferase 用の基質を添加して発光シグナルを測定した。同様のアッセイを LPAR6 とそのリガンドである LPA を用いても実施した。この二つのアッセイにおいて、最も鋭敏に反応するクローン (N182) を選別した。

### 2-1. CRISPR 用プラスミド (pX330-CTGF-3'UTR) および TM3C ドナープラスミド (TM3C donor plasmid : DP-TM3C) の構築

CRISPR 用プラスミドとして、CRISPR の標的配列を CTGF 遺伝子座 3'UTR に設計した pX330-CTGF-3'UTR を構築した (図 3)。

TM3C の N 末端側に IRES (internal ribosome entry site) 配列を付加した遺伝子断片 (IRES-TM3C 断片) を作成し、その N 末端側に flox-Neomycin 耐性遺伝子

カセット（loxP で Neomycin 耐性遺伝子カセットの両脇が挟まれている）を連結した。この DNA 断片の N 末端側および C 末端側に上記の pX330-CTGF-3'UTR が認識する配列をさらに付加し、pBlue Script プラスミドにクローニングした（TM3C donor plasmid : DP-TM3C）（図 6）。

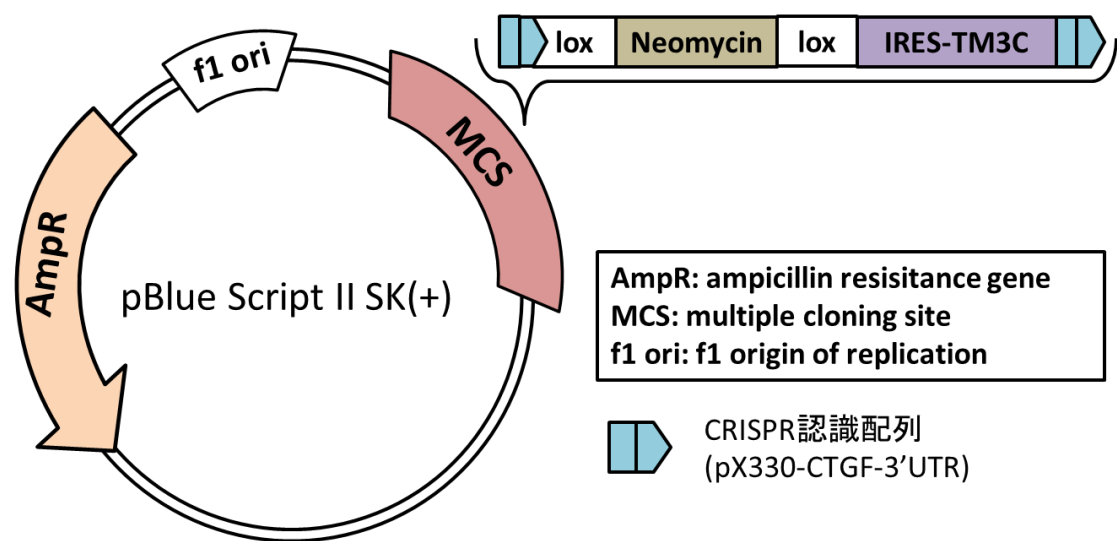


図 6. TM3C donor plasmid デザイン

pBlue Script vector の MCS 領域に、knockin インサート配列の両端を CRISPR 認識配列で挟んだカセットをサブクローニングし、DP-TM3C を作成した。

2-2. 上記 1-3. にて同定した N182 クローンのゲノム内の CTGF 遺伝子座 3'UTR に IRES-TM3C 断片を knockin (図 5)

上記 1-3. にて同定した N182 モノクローン細胞を  $5.0 \times 10^5$  cell/6cm ディッシュで播種し、翌日に「pX330-CTGF-3'UTR 3  $\mu$ g + DP-TM3C 0.03  $\mu$ g」をリポフェクション法 (FuGENE6 : プロメガ社) で一過性に遺伝子導入した。導入翌日、細胞培養液に G418 を 1 mg/mL となるように添加して約 2 週間培養した。この時点で生存している細胞に Cre-recombinase を一過性に遺伝子導入し (細胞を  $5.0 \times 10^5$  cell/6cm ディッシュで播種し、翌日に pMXs-iCre-IRES-puromycin 3  $\mu$ g をリポフェクション法で導入した)、遺伝子導入翌日に細胞培養液に puromycin を 10  $\mu$ g/mL となるように添加し、三日間培養した。Puromycin によるセレクション後の細胞を限界希釈し、モノクローン化した。モノクローン化したそれぞれのクローンからゲノムを回収し、標的部位 (CTGF 遺伝子座 3'UTR) に「IRES-TM3C」遺伝子断片が挿入されているか、genomic PCR 法にて確認した。



### 2-3. 樹立されたクローンの選別

樹立されたモノクローンそれぞれに対して、96 well プレーットの 1 well につき「GPR55 発現プラスミド (pMXs-GPR55) 60 ng + UAS-luciferase 30 ng」のプラスミドカクテルをリポフェクション法 (FuGENE6: プロメガ社) によって遺伝子導入した。導入して 24 時間後に GPR55 のリガンドである LPI (濃度: 3  $\mu$ M、300 nM、0 nM) で細胞を 6 時間刺激した。刺激後、培養上清を捨て、luciferase 用の基質を添加して発光シグナルを測定した。同様のアッセイを「LPAR6 とそのリガンドである LPA」および「ADORA2A とそのリガンドである NECA」を用いて実施した。これらのアッセイにおいて、最も鋭敏に反応するクローン (NCP41) を選別した。

### **【ヒト GPCR ライブラリーの構築】**

リガンドが既知であるヒト GPCR218 種を哺乳動物細胞用発現ベクターの一つである pMXs にクローニングし、ヒト GPCR 発現プラスミドライブラリーを構築した(35-37)。

### 【NCP41 細胞を利用した新規 GPCR アッセイプロトコール】

NCP41 細胞を 24,000 cell/well で 96 well プレートに播種した。播種して 24 時間以内に「GPCR 発現プラスミド (pMXs-GPCR) 60 ng + UAS-luciferase 30 ng」/well のプラスミドカクテルをリポフェクション法 (FuGENE6：プロメガ社) で遺伝子導入した。導入して 24 時間後の細胞をリガンドで刺激した。6 時間後、培養上清を捨て、luciferase 用の基質を添加し、発光シグナルをプレートリーダーで測定した。

尚、トランスフェクションの効率は、蛍光タンパク質 EGFP を発現するプラスミドを本実験と並行してトランスフェクションすることでモニターし、その効率は常時 30-50%程度であった。使用するプラスミドの量およびトランスフェクションの条件は、リガンド-受容体の用量反応曲線が最も明確になるように調整した。

### 【従来法による Gα12/13 シグナルの検出】

HeLa 細胞もしくは HEK293T 細胞 (CRL-3216) を 24,000 cell/well で 96 穴プレートに播種した。播種して 24 時間以内に「pMXs-GPR55 (もしくは pMXs-LPAR6) 60 ng + SRF-luciferase 30 ng」/well のプラスミドカクテルをリポフェクション法で遺伝子導入した。導入して 24 時間後にリガンド (LPI もしくは LPA) で刺激

し、6 時間後培養上清を捨てた。luciferase 用の基質を添加して発光シグナルを測定した。

#### 【N182 クローン細胞と外因性プロテアーゼによる Ga12/13 シグナルの検出】

GPR55、LPAR6 に対して N182 クローン細胞と外因性プロテアーゼを用いてアッセイを行った。N182 細胞 (IRES-TMGV のみ knockin) を 24,000 cell/well で 96 穴プレートに播種した。播種後 24 時間以内に「pMXs-GPR55 (もしくは pMXs-LPAR6) 60 ng + TM3C 発現プラスミド (pMXs-TM3C) 10 ng + UAS-luciferase 30 ng」/well のプラスミドカクテルをリポフェクション法で遺伝子導入した。導入から 24 時間後に細胞をリガンドで刺激し、さらに 6 時間後に細胞培養液の上清を捨てた。luciferase の基質を添加して発光シグナルを測定した。

## 結果

### 【細胞膜型転写因子と細胞膜型プロテアーゼを組み合わせた人工遺伝子回路の設計とその実証実験】

本研究では、Ga12/13 シグナルに対する簡便・高感度なアッセイ系の開発を目指し、以下のような「Ga12/13 シグナルを増幅する人工遺伝子回路」を設計した。

Ga12/13 シグナルの活性化によって発現量が有意に増加する遺伝子群から、その Ga12/13 シグナルに対する反応性およびその遺伝子の内在性発現レベルを考慮し、二つの遺伝子を選別する（ここでは仮に遺伝子 X および遺伝子 Y とする）。これら二つの遺伝子の転写調節機構を利用して、①「遺伝子 X の転写調節機構」によって「プロテアーゼ切断領域を有する細胞膜型人工転写因子（TMGV）」の発現が直接制御され、②「遺伝子 Y の転写調節機構」によって「細胞膜型プロテアーゼ（TM3C）」の発現が直接制御されるような人工遺伝子回路を設計した（図 7）。尚、上記の TMGV および TM3C は本研究用に新規に設計した人工遺伝子である。

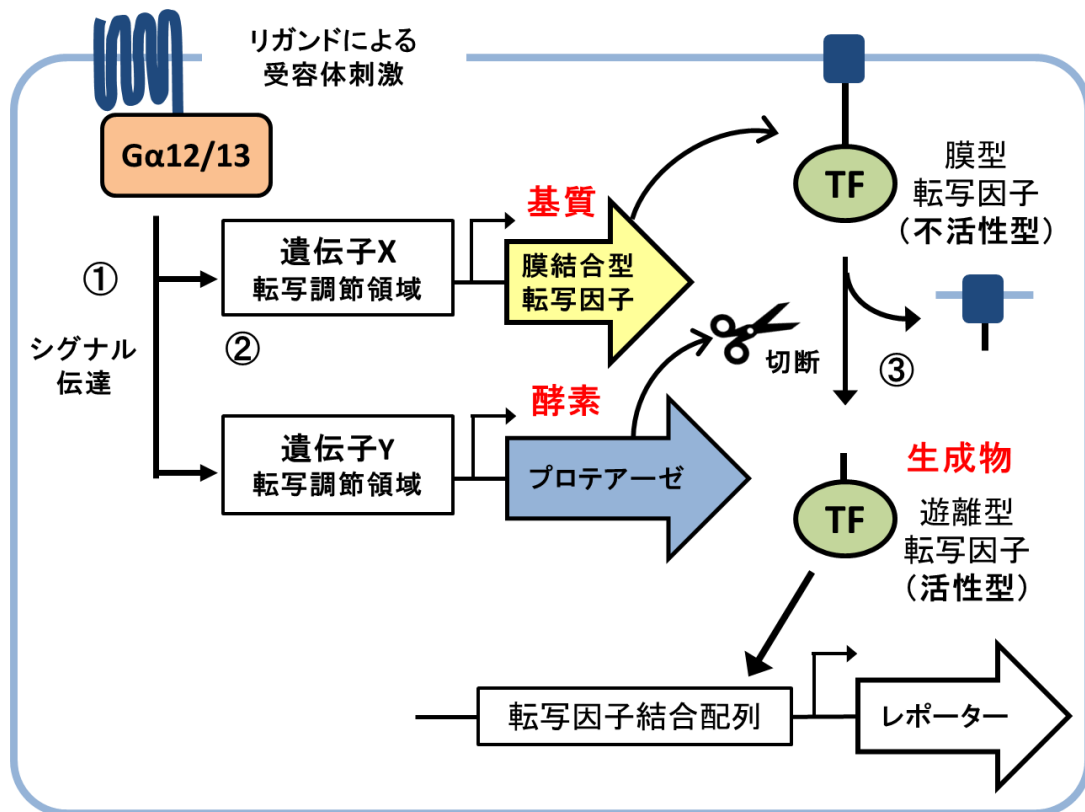


図 7. Gα12/13 シグナル増殖スキーム

①リガンドによって Gα12/13 に共役する GPCR が刺激されると、下流にシグナルが伝達される。②受容体刺激によって発現が増幅される遺伝子 X 及び Y の転写調節機構と、膜結合型転写因子及びプロテアーゼの発現が連動するように遺伝子回路を設計する。③膜結合型のままでは転写因子としては不活性であるが、プロテアーゼの働きによって膜から切り離されると遊離型となり核内でレポーター遺伝子の転写を誘導する。

この人工遺伝子回路では、Gα12/13 が活性化するとその下流で「遺伝子 X の転写調節機構」が活性化され、「プロテアーゼ切断領域を有する細胞膜型人工転写因子」が発現する。発現した人工転写因子は細胞膜に結合するのでこのままでは不活性である。一方、これと並行して「遺伝子 Y の転写調節機構」も活性化されるため、「細胞膜型プロテアーゼ」も発現する。発現したプロテアーゼは、

人工転写因子に連結されているプロテアーゼ切断領域に作用して転写因子を細胞膜から切り離し、切り離された転写因子（遊離型転写因子）は、核内へと移行し活性型となる。このようにこの人工遺伝子回路においては、「プロテアーゼ切断領域を有する細胞膜型人工転写因子」を基質、「細胞膜型プロテアーゼ」を酵素、「遊離型転写因子」を生産物、とする酵素反応が  $G\alpha 12/13$  シグナル依存的に開始される。これを酵素反応初期の単純化したモデルで考えれば、生産物の量（遊離型転写因子の量）は、基質である「プロテアーゼ切断領域を有する細胞膜型人工転写因子」の細胞内濃度と、酵素である「細胞膜型プロテアーゼ」の細胞内濃度の積に比例する。また、遊離型転写因子の量は、レポーター遺伝子の発現量を指標に定量的に検出することができる。すなわち、この人工遺伝子回路により、 $G\alpha 12/13$  シグナルの活性化状態は「遺伝子 X の転写調節機構」および「遺伝子 Y の転写調節機構」の活性化度合いの積へと変換され、最終産物であるレポーター遺伝子の発現量を発光などによって定量すれば、相乗的に増幅された出力を得ることができる。

次に、上記の酵素反応を介在させたシグナル増幅モデルが実際に機能するかを確かめるための検証実験を行った。細胞膜型人工転写因子を発現させるプラスミド（pMXs-TMGV）と細胞膜型プロテアーゼを発現させるプラスミド（pMXs-TM3C）、さらにレポーターとして UAS-luciferase プラスミドをそれぞれ HeLa 細胞に一過性に遺伝子導入した。二因子のプラスミド量（pMXs-TMGV および pMXs-TM3C）を段階希釈によって変化させることで luciferase 活性がどのように変化するかを検証した。

それぞれのプラスミド量の増加に伴う luciferase 活性の増幅率を測定したところ、例えば「細胞膜型転写因子 25 ng/well + 細胞膜型プロテアーゼ 0.075 ng/well」での活性と、「細胞膜型転写因子 75 ng/well + 細胞膜型プロテアーゼ 0.75 ng/well」での活性を比較すると、後者の luciferase 活性は前者の luciferase 活性に比して 26.4 倍に増加していた（図 8）。図に示すように、二因子のプラスミドが共に増えたときの増加率は、因子毎の増加率の積とほぼ等しくなったことから、上記のシグナル増幅モデルが実証されたと考えられる。

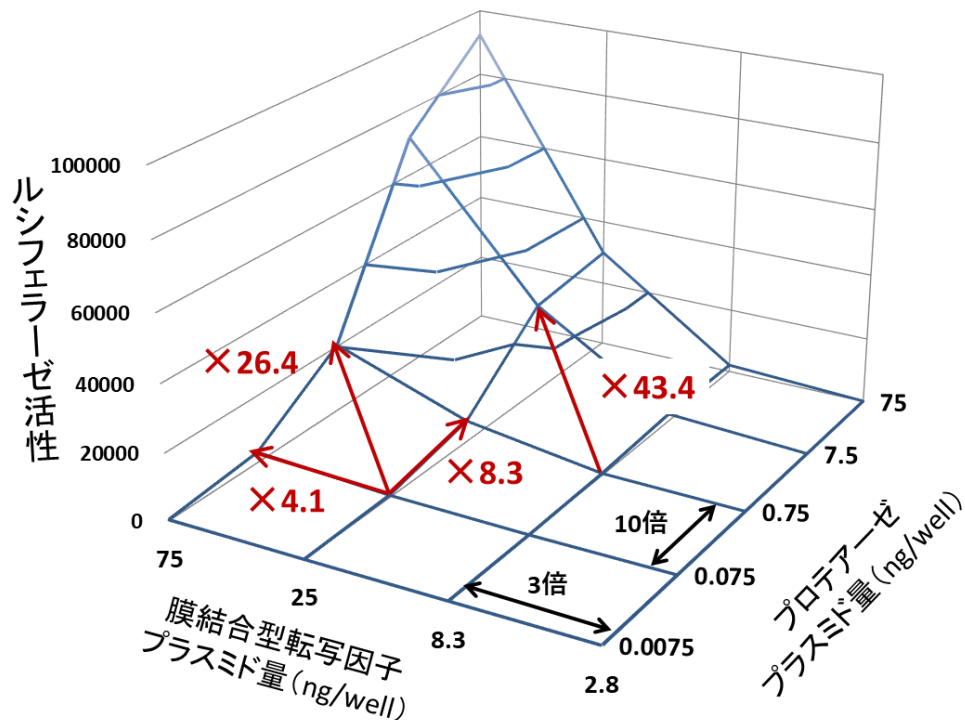


図 8. 膜結合型転写因子とプロテアーゼの相乗効果実証実験

膜結合型転写因子とプロテアーゼは 96 穴プレート上で HeLa 細胞に外因性に一過性に発現させた。膜結合型転写因子は 75 ng/well から 1/3 ずつ濃度を下げて添加し、プロテアーゼは 75 ng/well から 1/10 ずつ濃度を下げて添加した。転写因子とプロテアーゼそれぞれのプラスミド量の増加によるルシフェラーゼ活性の増加率を見た。

図のように、2 因子が共に増加した時のルシフェラーゼ活性の増加率は、転写因子とプロテアーゼそれぞれの増加率の積からなっている。



### 【Gα12/13 シグナルによって発現が誘導される遺伝子群の網羅的同定】

全ヒト遺伝子を対象とした RNA seq 解析によって Gα12/13 シグナルによって発現が誘導される遺伝子群を同定した(38,39)。

GPR55 および LPAR6 は Gα12/13 と特異的に共役する GPCR としてよく知られている。そこで HeLa 細胞に GPR55 または LPAR6 を遺伝子導入により一過性に過剰発現させ、導入後 24 時間してから GPR55 発現細胞には LPI (10 μM)、LPAR6 発現細胞には LPA (10 μM) を添加して 1 時間刺激した。これらの細胞から mRNA を回収し、RNA seq によって全ヒト遺伝子の発現量を解析した (図 9)。

本解析により、GPR55-Gα12/13 シグナルおよび LPAR6-Gα12/13 シグナルの活性化によって有意に発現が増加した遺伝子群を網羅的に同定した (表 1)。それらの遺伝子のうち、①リガンド刺激前後で発現量が 5 倍以上増加、かつ②刺激前の遺伝子発現量が FPKM (fragments per kilobase of exon per million reads mapped) で 10 以上、である遺伝子は NR4A1 と CTGF (connective tissue growth factor) であった。尚、本研究内容とは直接関連しないが、NR4A1 は細胞内転写因子、CTGF は分泌タンパク質をそれぞれコードする遺伝子である。それぞれの遺伝子については引用文献中の以下の論文を参照されたい(40,41)。

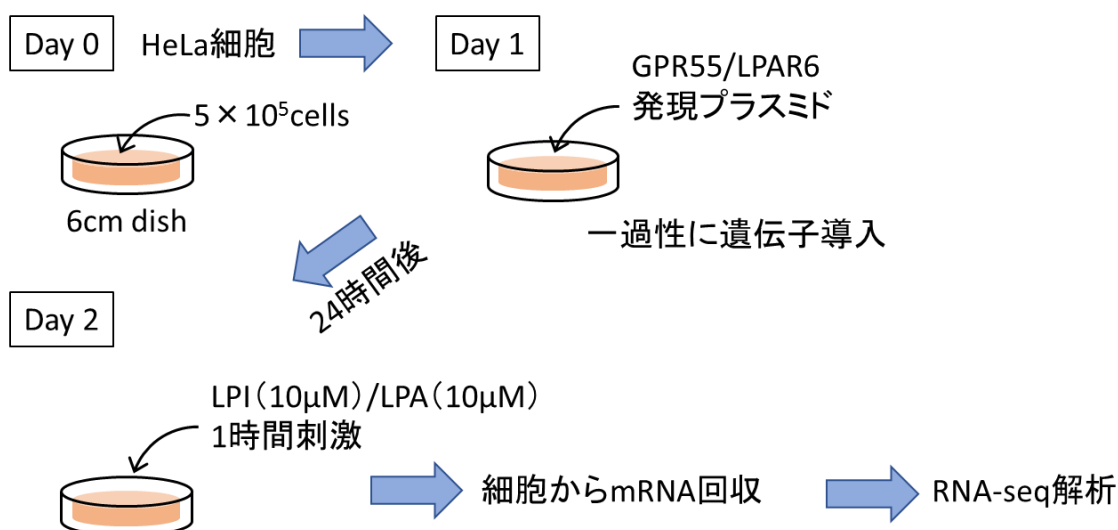


図 9. RNA seq 実験スキーム

HeLa 細胞を 6 cm ディッシュに播種し、次の日に GPR55 もしくは LPAR6 をリポフェクション法にて外因性に導入した。遺伝子導入 24 時間後にそれぞれのリガンドで 1 時間刺激し、mRNA を回収して解析をした。

表 1. RNA seq 遺伝子リスト

| GPR55    | FPKM     |          | fold change | LPAR6 | FPKM     |         | fold change |
|----------|----------|----------|-------------|-------|----------|---------|-------------|
|          | vehicle  | LPI      |             |       | vehicle  | LPI     |             |
| EGR3     | 0.040564 | 0.881269 | 21.7253969  | EGR2  | 0.275695 | 2.83615 | 10.28727398 |
| CCL20    | 0.12649  | 1.53926  | 12.16902522 | ARC   | 0.175445 | 1.65634 | 9.440793411 |
| EGR2     | 0.12466  | 1.44175  | 11.56545805 | FOSB  | 2.14831  | 14.9138 | 6.942107983 |
| CTGF     | 11.4859  | 100.345  | 8.736363716 | CTGF  | 19.2674  | 131.886 | 6.84503358  |
| NR4A1    | 68.0321  | 523.016  | 7.687782679 | NR4A1 | 82.2894  | 513.795 | 6.24375679  |
| FOSB     | 3.45864  | 21.5061  | 6.218079939 | CCL20 | 0.287106 | 1.5503  | 5.399747828 |
| RMPR     | 9.16575  | 46.4846  | 5.071554428 | NR4A3 | 8.06405  | 39.9693 | 4.956479685 |
| NR4A3    | 8.91904  | 43.3226  | 4.857316482 | EGR1  | 5.14917  | 23.6102 | 4.585243835 |
| DUSP5    | 15.9976  | 75.0706  | 4.692616392 | DUSP5 | 23.4861  | 107.605 | 4.581646165 |
| ARC      | 0.383036 | 1.67611  | 4.375855011 | THBS1 | 15.3175  | 63.0592 | 4.116807573 |
| CRISPLD2 | 0.266217 | 1.09492  | 4.112885353 |       |          |         |             |

FPKM (fragments per kilobase of exon per million reads mapped) は遺伝子の発現量を示している。GPR55 もしくは LPAR6 を一過性に発現させた細胞におけるリガンド刺激前後の遺伝子発現量と、その増加率をまとめた。リガンド刺激前の発現量が FPKM10 以上かつ、GPR55 と LPAR6 の両方で増加率が 5 倍以上の遺伝子は CTGF と NR4A1 の二つであった。

## 【ゲノムに人工遺伝子回路が組み込まれた HeLa 細胞の作成】

上記で設計した人工遺伝子回路をゲノムに組み込むため、CRISPR-Cas9 システムを用いて、HeLa 細胞のゲノム上にある NR4A1 遺伝子座 3'UTR に IRES-TMGV（細胞膜型転写因子）断片を（1st）、CTGF 遺伝子座 3'UTR に IRES-TM3C（細胞膜型プロテアーゼ）断片を（2nd）順次 knockin した（図 10）。

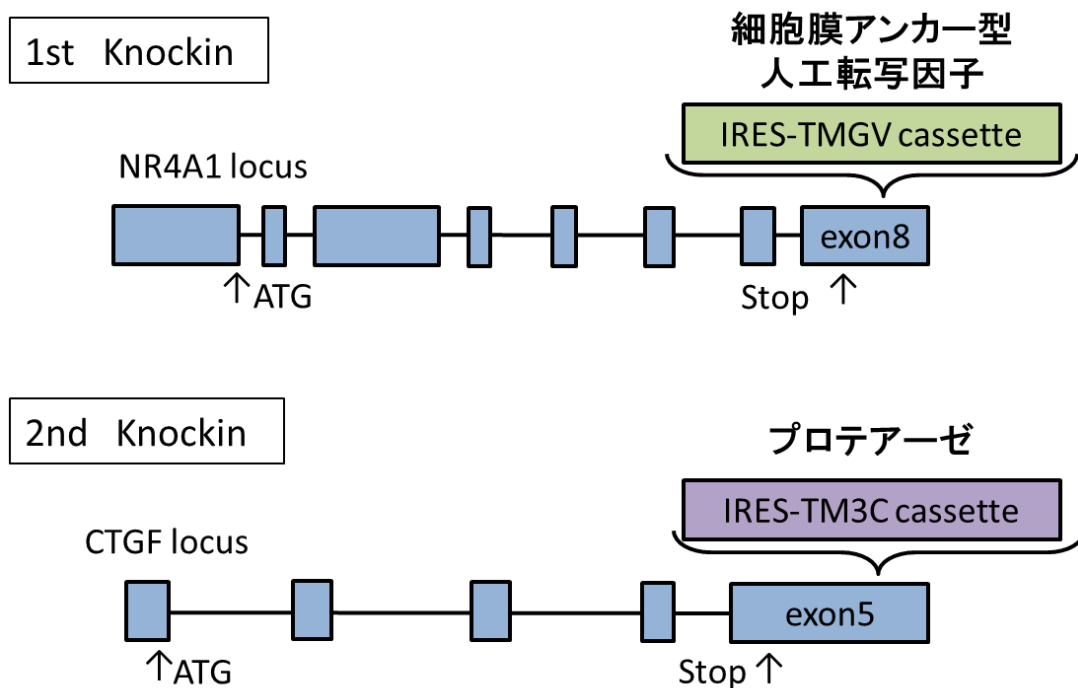


図 10. Double knockin 細胞の概要

HeLa 細胞のゲノム上に存在する NR4A1 遺伝子の exon8 の 3'UTR に、IRES-TMGV カセットを挿入（1st knockin）し、その後さらにゲノム上の CTGF 遺伝子の exon5 の 3'UTR に IRES-TM3C カセットを挿入（2nd knockin）する。

## 1. Single knockin HeLa 細胞の作成 (1st knockin) (図 11)

HeLa 細胞のゲノム上に存在する NR4A1 遺伝子の exon8 の 3'UTR を knockin 標的部  
位とした (図 12)。PAM 配列の上流 20 塩基を sgRNA に設定することで、  
Cas9 タンパク質によって PAM 配列の上流 3 塩基目の標的部  
位を切断する  
CRISPR 用プラスミド (図 3) を作成した。

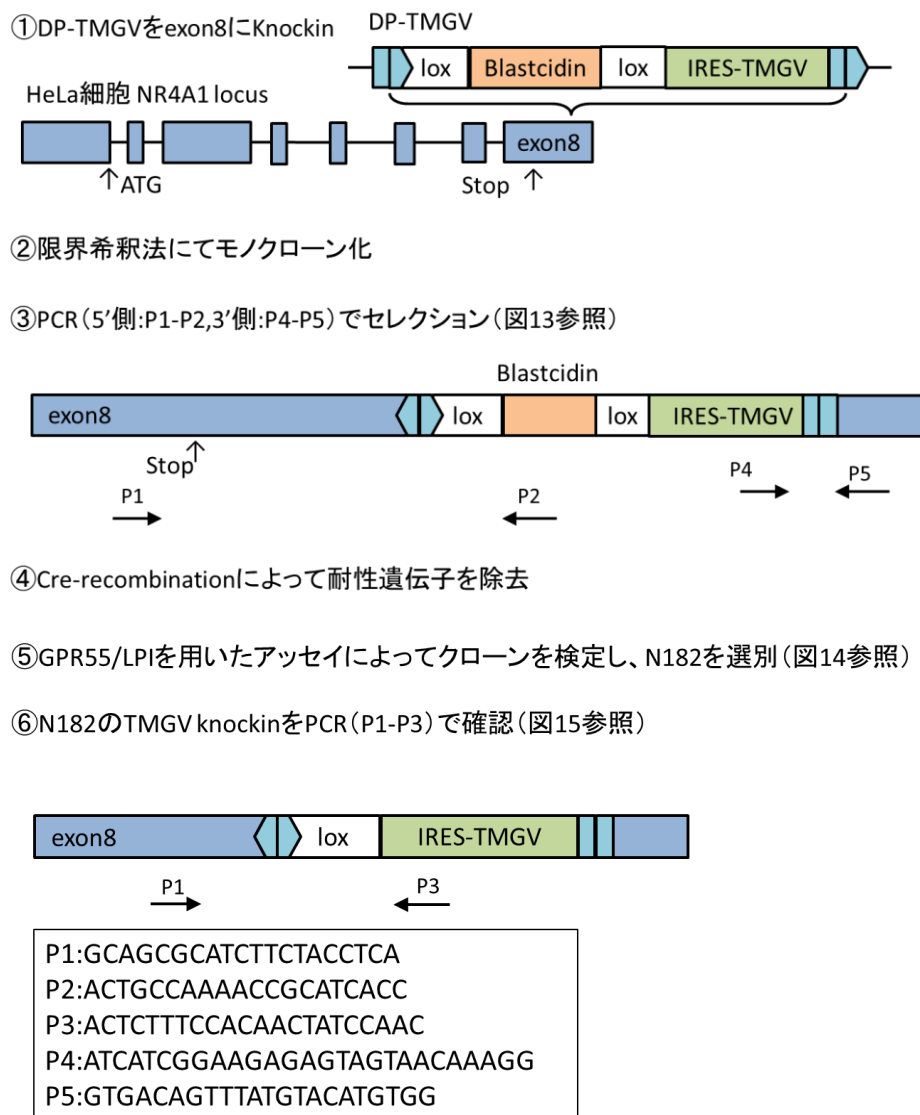


図 11. 1st knockin 概要

①Blastcidin 耐性遺伝子を loxP で挟み、その 3'側に IRES-TMGV 断片を連結させたカセットを、HeLa 細胞における NR4A1 遺伝子の Exon8 の 3'UTR に knockin した。②knockin 細胞を限界希釈法でモノクローン化した。③各クローンのインサートの 5'側と 3'側の二か所をターゲットとする PCR を施行し、knockin 成功クローン群を選別した。④これらのクローン群に対して Cre-recombination によって Blastcidin 耐性遺伝子を除いた。⑤GPR55 とそのリガンドである LPI を用いて Gα12/13 シグナルに対する各クローンの反応性を検定し、反応の良いクローンを選別した。⑥得られた N182 細胞に IRES-TMGV のみが knockin されている (Blastcidin 耐性遺伝子が除去されているか) を PCR 法で確認した。

# Human NR4A1 3'UTR

```

2641 gcttgcttgt cgatgtccct gccttcgcct gcctctctgc ccttgctctc atcaccgacc
      atgggct gcaggagccg cggcgggtgg aggagctgca gaaccgcac gccagctgcc
Exon 8 aggagca cgtggcagct gtggcgggcg agccccagcc agccagctgc ctgtcacgtc
2821 tgttgggcaa actgcccagag ctgcggaccc tgtgcaccca gggcctgcag cgcattctct
2881 acctcagct agaggacttg gtgccccctc caccatcat tgacaagatc ttcattggaca
2941 cgctgc Stop tgacccctg cctgggaaca cgtgtgcaca tgcgcactct catatgccac
3001 cccatgtgcc tttagtccac ggacccccag agcaccacca agcctctct gtag
3061 aatgactcca ccttctcacc tgctccagga ggtttgagg gagct 切断 PAM
3121 ggggatgcct tcatgggggt gacccacga tttgtcttat cccccagc ctggccccgg
3181 cctttatgtt ttttgtaaga taaaccgttt sgRNA ggcctgtgt gtaataagc
3241 ccagtgtgtc tgtaaataca ggaagaaaga ggagcggggc tgggaggaag
3301 ggatggggcc cgccttcctg ggcagccttt ccagcctcct gctggctctc tcttctacc
3361 ctccctccac atgtacataa actgtcactc taggaagaag acaaatgaca gattctgaca
3421 tttatatttg tgtattttcc tggatttata gtatgtgact tttctgatta atatatttaa
3481 tatattgaat aaaaaataga catgtagtgt gaactgaaa aaaaaaaaaa

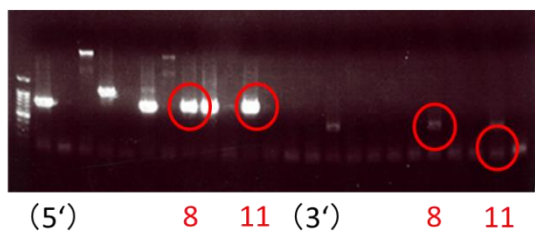
```

図 12. 1st knockin 標的配列

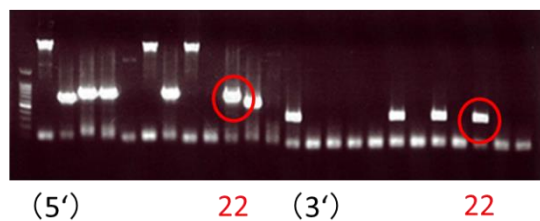
NR4A1 遺伝子の Exon8 の Stop コドンより下流を CRISPR 標的部位に設定した。PAM 配列 (プロトスペーサー隣接配列) である TGG の上流 20 塩基を sgRNA にすると、PAM 配列から 3 塩基上流で DNA 二重鎖が切断される。

Blastcidin 耐性遺伝子を loxP 配列で挟んだ遺伝子カセットの 3'末端に IRES-TMGV 配列を結合させた遺伝子断片を有するドナープラスミド (DP-TMGV : 図 4) と CRISPR 用プラスミドを同時に一過性に HeLa 細胞に遺伝子導入し、Blastcidin 存在下で二週間セクションした。抗生剤存在下で増殖した細胞を限界希釈法にてモノクローン化して各クローンからゲノムを回収した。ゲノム上の knockin 部位の両端 (5'側、3'側) に PCR プライマーを設計 (図 11) し、genomic PCR 法で knockin の成否を判定した結果、33 個の陽性クローンが選別された (図 13)。その後 Cre-recombination により Blastcidin 耐性遺伝子を除き、IRES-TMGV 配列のみをゲノム上に残した。

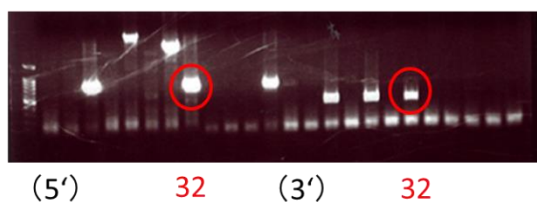
#1—12



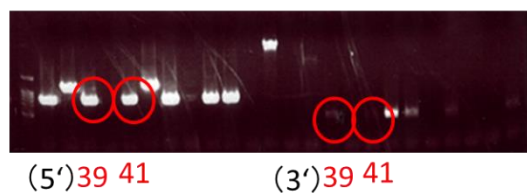
#13—24



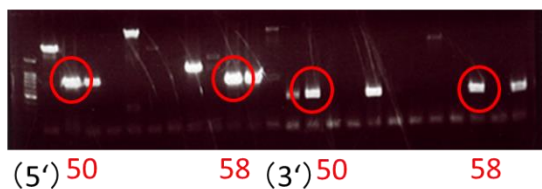
#25—36



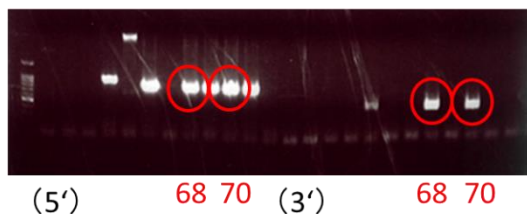
#37—48



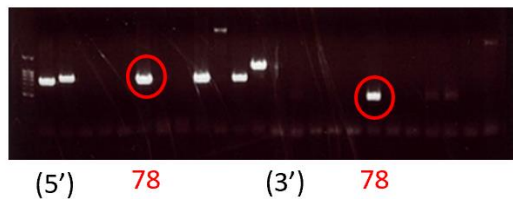
#49—60



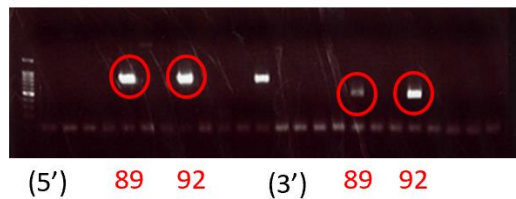
#61—72



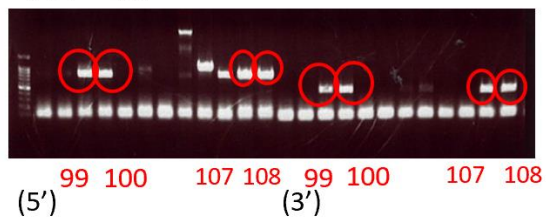
#73—84



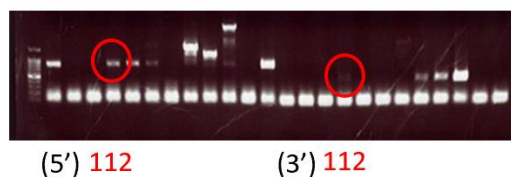
#85—96



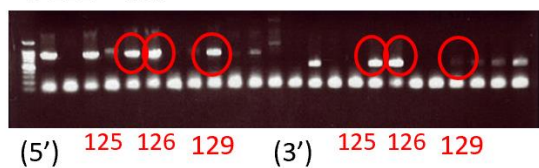
#97—108



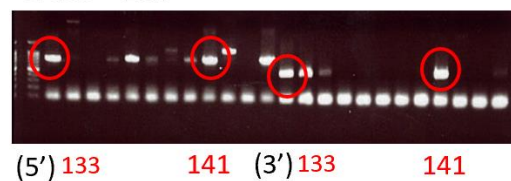
#109—120



#121—132



#133—144





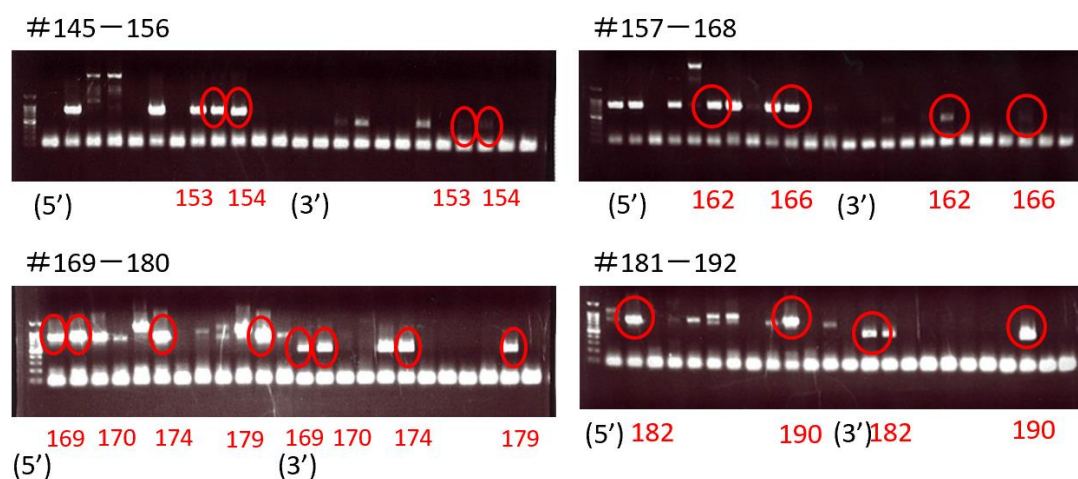


図 13. Pre Cre NR4A1 knockin clone の選別(PCR 結果)

モノクローン化して得られた 192 個のクローンそれぞれについて、5'側と 3'側の PCR 産物を電気泳動で確認した。両方に想定されるバンドが出ているクローンを 33 個選別した。

次に、GPR55 とそのリガンドである LPI (3  $\mu$ M) を用いて、選別された 25 クローンそれぞれの G $\alpha$ 12/13 シグナルに対する反応性を検定した。その結果、Signal/Background 比 (S/B 比) が 10 倍以上だったクローンが一つだけ同定された (N182) (図 14)。本クローンにおいては LPAR6 の LPA (3  $\mu$ M) に対する反応性も S/B 比が 10 倍以上と良好であった。N182 クローンのゲノム改変部位を確かめるために、knockin 部位の 5'側の PCR プライマーで PCR をかけた (図 15)。PCR 産物の電気泳動結果およびシーケンス結果から計画通り IRES-TMGV 断片が NR4A1 遺伝子座 3'UTR に knockin されていることを確認した。そこで N182 クローンを 2nd knockin に用いた。

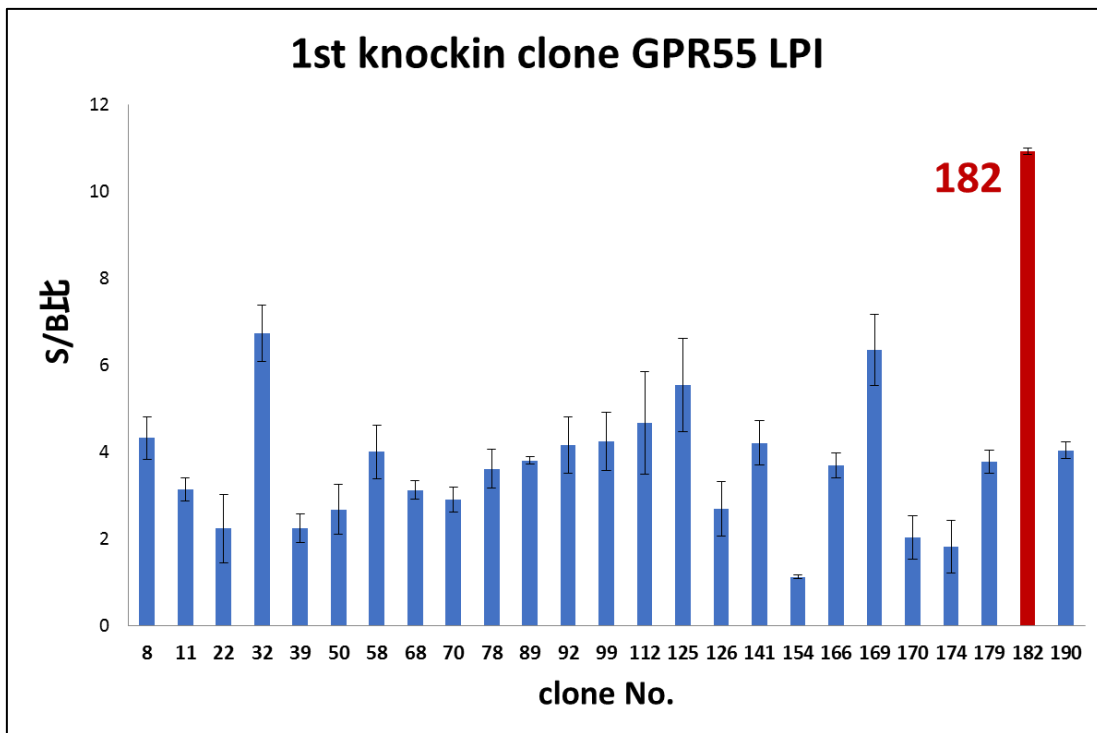


図 14. Post Cre NR4A1 knockin clone の選別(Gα12/13 アッセイ)

PCR によって選別された 33 クローンから Gα12/13 シグナルに対する反応性の良いクローンを選ぶために、培養可能であった 25 クローンについて GPR55 とそのリガンドである LPI によるアッセイを行った。その結果、No.182 クローンは最も高い S/B 比を示した。この N182 クローンを 2nd knockin に用いた。

各アッセイはトリプレケートで二回以上実施し、代表的なデータを図に示した。

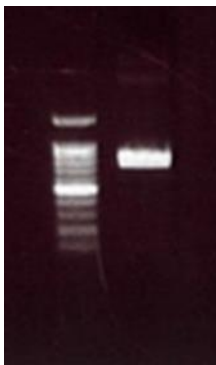


図 15. Post Cre NR4A1 knockin clone の選別(PCR 結果)

N182 細胞についてインサートの 5'側 (P1-P3) の PCR 産物を電気泳動で確認した。これによりインサートが正しく挿入されていることが分かった。

## 2. Double knockin HeLa 細胞の作成 (2nd knockin) (図 16)

IRES-TMGV 断片が knockin された N182 細胞における CTGF 遺伝子座 (exon5 の 3'UTR 領域) を次の knockin 標的部ととした。ストップコドン下流の 3'UTR 領域から PAM 配列を選んだが、PAM 配列が antisense 鎖にあるため、CRISPR によって切断される標的部は PAM 配列から 3 塩基下流の配列である (図 17)。

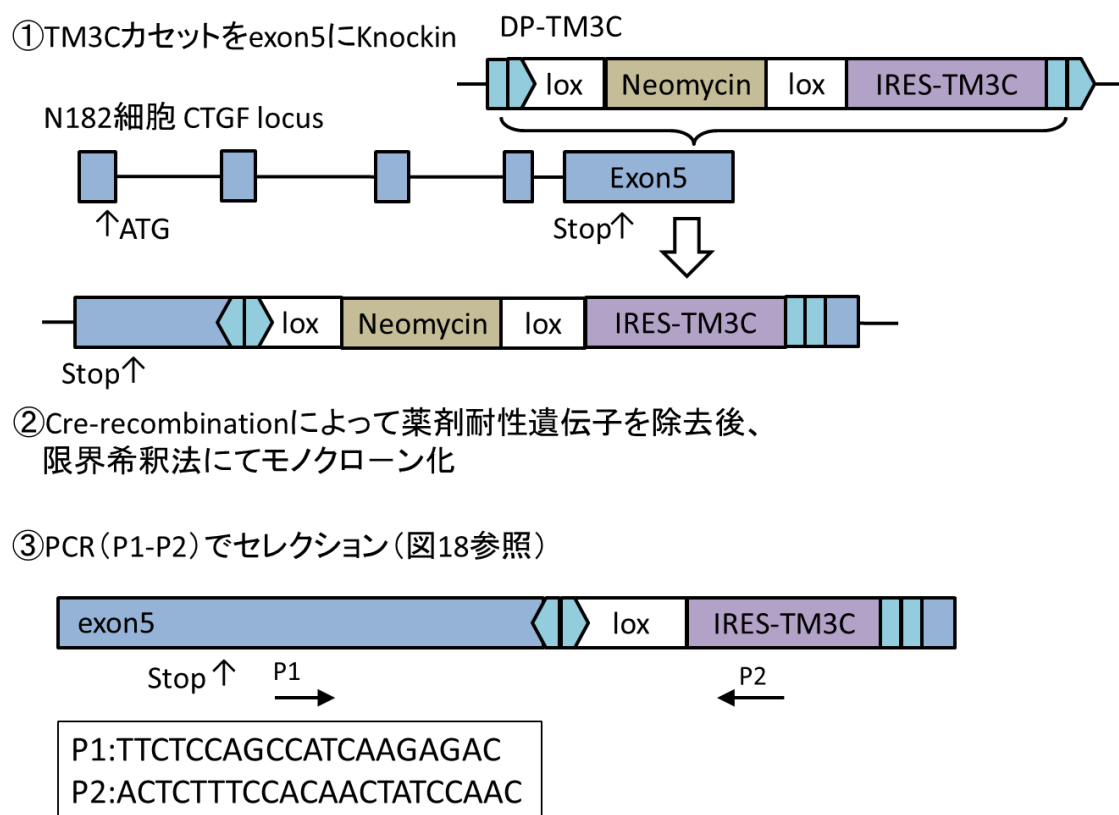


図 16. 2nd knockin 概要

①Neomycin 耐性遺伝子を loxP 配列で挟み、IRES-TM3C (プロテアーゼ) 発現遺伝子断片と連結させたカセットを、N182 細胞における CTGF 遺伝子の Exon5 の 3'UTR に knockin した。②Cre-recombination によって Neomycin 耐性遺伝子を除き、IRES-TM3C カセットのみが挿入された状態にした後、限界希釈法でモノクローン化した。③インサートが正しく挿入されているかを 5'側の PCR (P1-P2) によって確認した。

# Human CTGF 3'UTR

```

901 gccgcctgtg catggtcagg ccttgccaag ctgacctgga agagaacatt aagaagggca
    agtgcac cgtactccc aaaatctcca agcctatcaa gtttgagctt tctggctgca
Exon 5   gcatgaa gacataccga gctaaattct gtggagtatg taccgacggc cgatgctgca
1081 cccccacag aaccaccacc ctgccggtgg agttcaagtg ccctgacggc gaggtcatga
1141 agaagaacat gatgttcacg aagacctgtg cctgccatta :ccc ggagacaatg
1201 acatctttga atcgctgtac tacaggaaga tgtacggaga Stop tga agccagagag
1261 tgagagacat taactcatta gactggaact tgaactgatt cacatctcat tttccgtaa
1321 aaatgatatt agtagcacia gttattttaa tctgtttttc taactggggg aaaagattcc
1381 caccacaattc aaaacattgt gccatgtcaa acaaatagtc tatcaacccc agacactggt
1441 ttgaagaatg ttaagacttg acagtggaa acattagta cacagacca gaatgtatat
1501 taagggtgtg ctttaggagc agtgggaggg taccagcaga aaggtagta tcatcagata
1561 gcatcttata cgagtaatat gcctgctatt tgaagtgtaa ttgagaagga aaattttagc
1621 gtgctcactg acctgcctgt agccccagtg aca gga tgtgcattct ccagccatca
1681 agagactgag tcaagttggt ( PAM cc tgtcgattag actggacagc ttgtggcaag
1741 tgaatttgcc tgtaacaagc cagatttttt aaaatttat tgtgtgtgtg
1801 tgtgtgtgtg tatatatata tatatgtaca gttatctaa sgRNA gttgtttgtg
1921 cctttttatt tttgttttta atgctttgat atttcaatgt tagcctcaat ttctgaacac
1981 cataggtaga atgtaaagct tgtctgatcg ttcaaagcat gaaatggata cttatatgga
2041 aattctgctc agatagaatg acagtccgtc aaaacagatt gtttgcaaag gggaggcatc
2101 agtgtccttg gcaggctgat ttctaggtag gaaatgtggt agcctcactt ttaatgaaca
2161 aatggccttt attaaaaact gagtgactct atatatgctga tcagtttttt cacctggaag
2221 catttgcttc tactttgata tgactgtttt tcggacagtt tatttggtga gagtgtgacc
2281 aaaagttaca tgtttgcacc tttctagttg aaaataaagt gtatatTTTT tctataaa
  
```

図 17. 2nd knockin 標的配列

CTGF 遺伝子の Exon5 の 3'UTR を CRISPR の標的配列に設定した。PAM 配列は通常の TGG の反対鎖かつ逆向きの、CCT に設定した。そのため、sgRNA は CCT 下流の 20 塩基となり、sgRNA の 5'側から 3 塩基の部位に DSB が起きる。

Neomycin 耐性遺伝子を loxP で挟んだ遺伝子カセットの 3'側に IRES-TM3C 配列を結合させた遺伝子断片を有するドナープラスミド (DP-TM3C : 図 6) と CRISPR 用プラスミドを同時に一過性に N182 細胞に導入した。導入後 G418 存在下で二週間セクションした。その後 Cre-recombination によって薬剤耐性遺伝子を除去した。Cre-recombination 後の細胞を限界希釈法でモノクローン化し、得られた各クローンからゲノムを回収した。次に knockin 部位の 5'側プライマーを用いた genomic PCR 法にて、IRES-TM3C 配列が正しい位置に knockin されているかを確認した。その結果、38 個のクローンが knockin 成功群として検出された (図 18)。

これら 38 クローンそれぞれに対して、GPR55 または LPAR6 の発現プラスミドと UAS-luciferase プラスミドを外因性の一過性に発現させた。24 時間後にそれぞれのリガンドである LPI (3  $\mu$ M)、LPA (3  $\mu$ M)で 6 時間刺激して S/B 比を測定した結果、GPR55 および LPAR6 の両方で S/B 比 20 以上のクローンが 11 個検出された (図 19)。

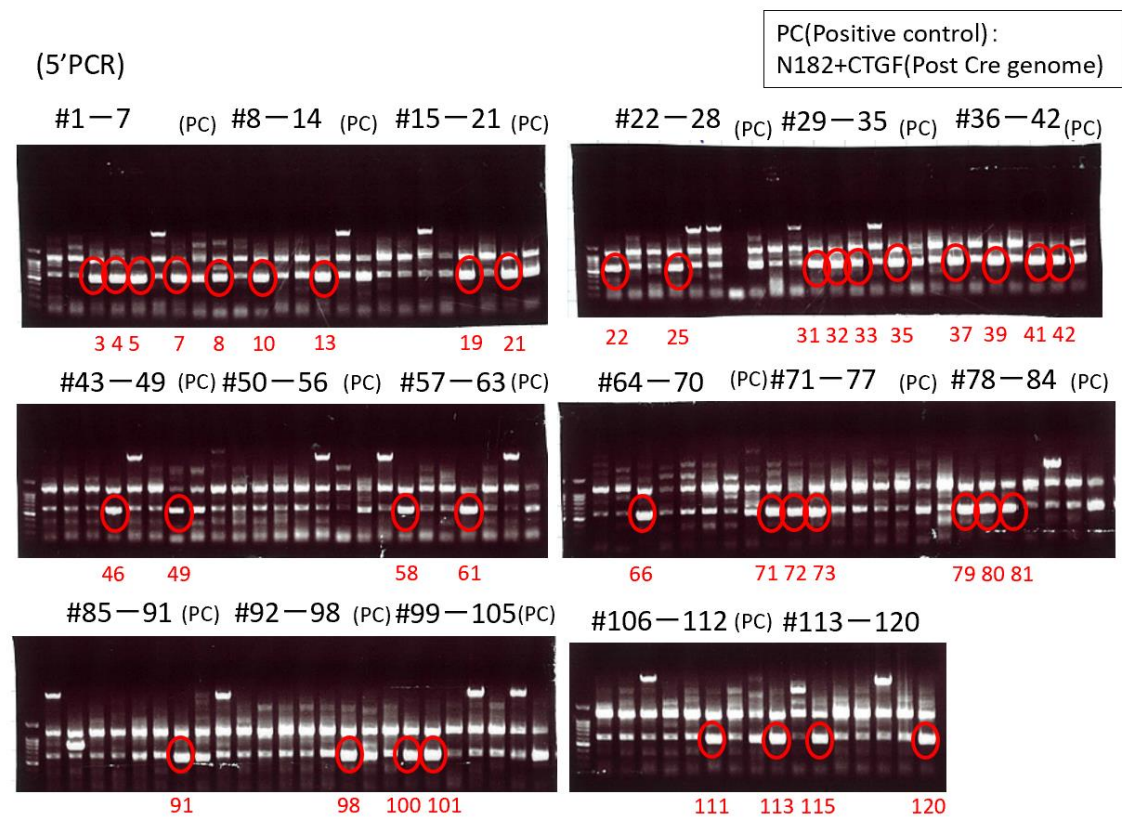


図 18. Post Cre double knockin clone の選別(PCR 結果)

インサートが正しく挿入されているか確認するために、120 個のクローンの 5'側の PCR 産物 (P1-P2) を電気泳動で確認した。Positive control (PC) としてモノクローン化していない Double knockin 細胞 (バルク) を用いた。その結果、38 個のクローンが選別された。

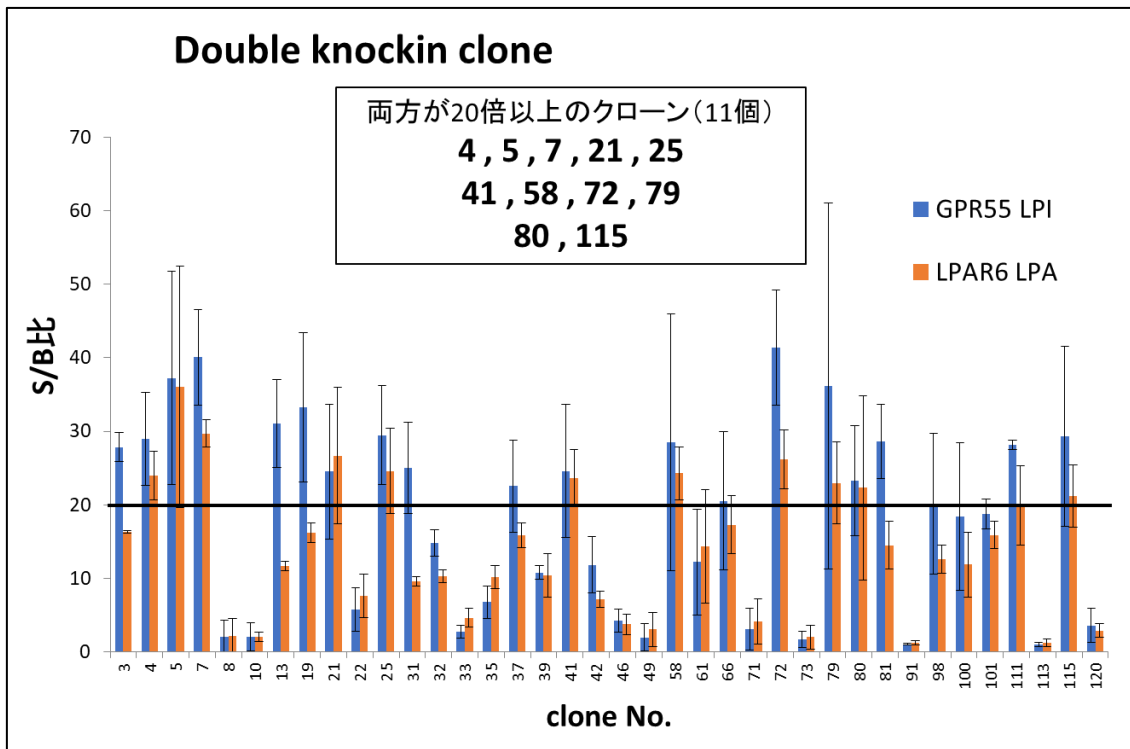


図 19. Post Cre double knockin clone の選別 (Ga12/13 アッセイ)

PCR によって選別した 38 クローンの Ga12/13 シグナルに対する反応性を検定した。両方のアッセイ結果で S/B 比が 20 以上のクローンが 11 個選別された。各アッセイはトリプレケートで二回以上実施し、代表的なデータを図に示した。



選別された 11 クローンの一部を使用して、 $G\alpha_{12/13}$  以外の  $G\alpha$  に共役する GPCR に対する反応性について検証したところ、 $G_{\alpha s}$  と共役する GPCR に対する反応性がクローンごとにかなり異なることが判明した。そこで、選別された 11 クローン全てにおいて、ADORA2A ( $G_{\alpha s}$  と特異的に共役する GPCR として知られている) の NECA (1  $\mu$ M) に対する反応性を測定した。その結果、最も S/B 比が高いクローン (NCP41) を同定した (図 20)。

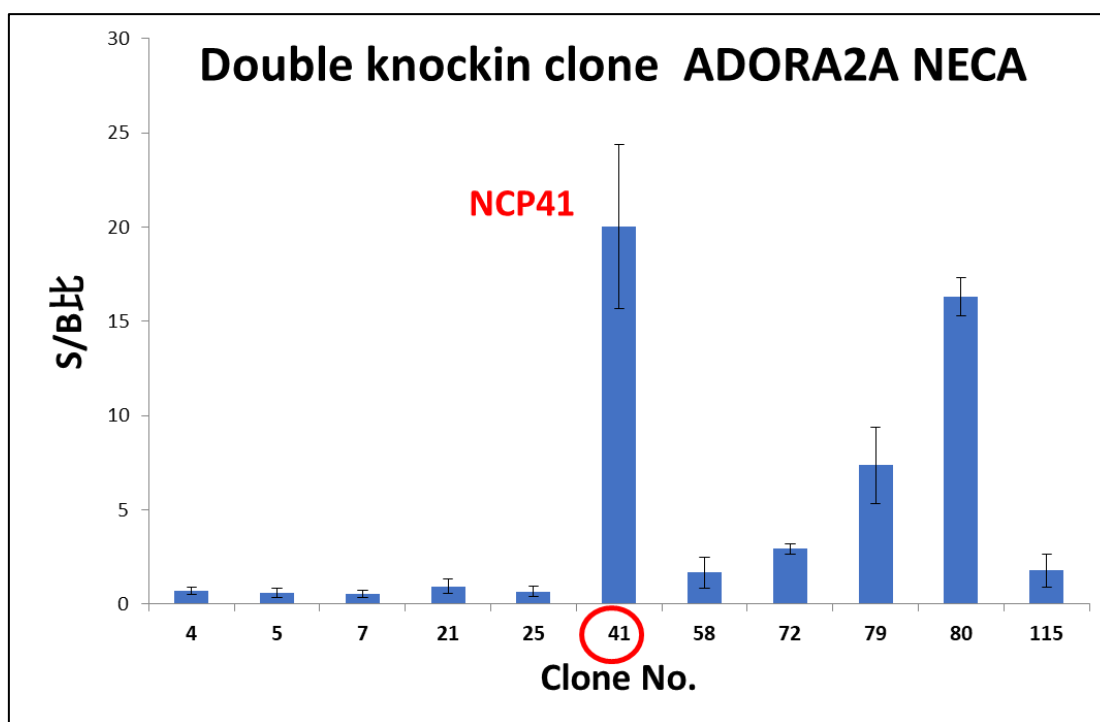


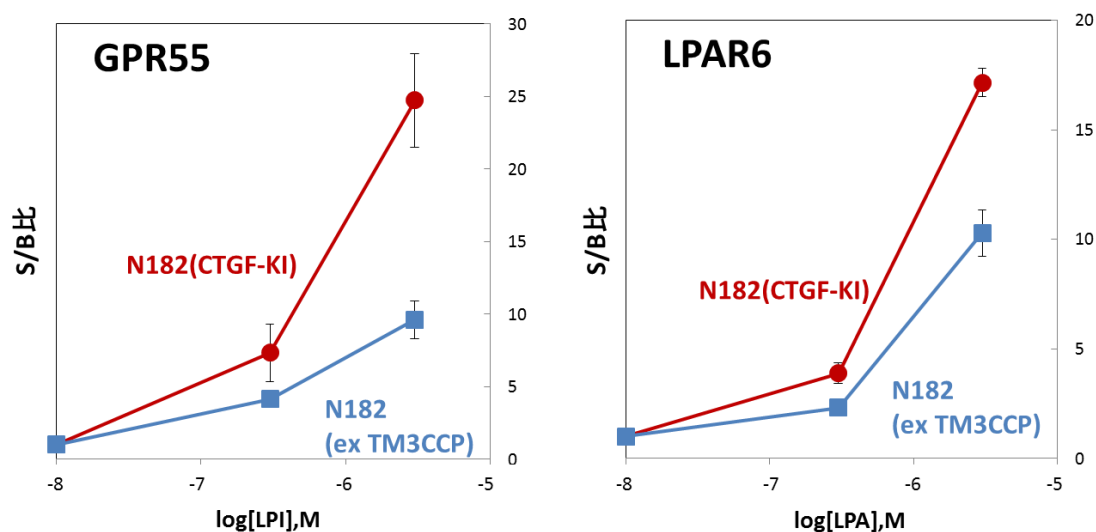
図 20. Post Cre double knockin clone の選別 ( $G_{\alpha s}$  アッセイ)

$G\alpha_{12/13}$  シグナルに対する反応性を指標に選別した 11 個のクローンに対して、 $G_{\alpha s}$  と共役する GPCR である ADORA2A を用いてアッセイを行った結果、最も S/B 比の高かった No.41 のクローンが選別された。各アッセイはトリPLICATEで二回以上実施し、代表的なデータを図に示した。

## 【二つの因子を **knockin** する有用性】

TMGV と TM3C の両方を **knockin** することが本アッセイ系の感度・反応性(S/B比)を本当に高めているのかを検証するために、**single knockin** 細胞と **double knockin** 細胞で  $G\alpha_{12/13}$  シグナルに対する反応性の違いを比較した。NR4A1 の 3'UTR に TMGV を **knockin** したのみの **single knockin** 細胞 (N182) には「GPCR 発現プラスミド + TM3C 発現プラスミド + UAS-luciferase」を外因性に遺伝子導入してアッセイを行い、**double knockin** 細胞 (クローンセレクション前のバルク状態の細胞) には「GPCR 発現プラスミド + UAS-luciferase」を外因性に導入してアッセイを行った。それぞれの細胞について、GPR55 と LPAR6 の二つの受容体を用いて測定した。各アッセイはトリPLICATEで二回以上実施し、代表的なデータを以下の図で示した。

結果は、GPR55 と LPAR6 両方の受容体において **double knockin** 細胞の方が有意に強く  $G\alpha_{12/13}$  シグナルに反応することが明らかとなった (図 21)。これにより、TMGV と TM3C の両方を **knockin** することで (すなわち、TMGV と TM3C の両方の因子に  $G\alpha_{12/13}$  シグナル依存的な発現誘導がかかることで) アッセイ感度が高まることが実証された。



**N182(CTGF-KI) bulk** : NR4A1+CTGF Knockin (**Double**)

**N182(ex TM3C)** : NR4A1 Knockin (**Single**) + TM3Cは外因性に遺伝子導入

図 21. Single knockin と Double knockin の比較

Single knockin 細胞と double knockin 細胞において、GPR55 もしくは LPAR6 を一過性に発現させ、それぞれのリガンドで刺激して活性を比較した。

二種類の細胞間における最大 S/B 比の差について、分散分析を行った結果 GPR55 では  $p=0.0017(<0.05)$ 、LPAR6 では  $p=0.0007(<0.05)$  となり、両方の受容体で double knockin 細胞の方が有意に高い活性を示した。各アッセイはトリPLICATEで二回以上実施し、代表的なデータを図に示した。

## 【新規アッセイ法と従来アッセイ法の比較】

### 1. Gα12/13 と特異的に共役する GPCR を用いて「NCP41 細胞を使用した本新規アッセイ法」と「従来のアッセイ法」を比較

今回樹立した NCP41 細胞を使用した新規アッセイ法の有用性を確かめるために、Gα12/13 シグナルの検出について従来のアッセイ法と比較した。新規法では NCP41 細胞を用いて GPR55 と LPAR6 それぞれについて UAS-luciferase によって Gα12/13 シグナルを検出し、従来法では ATCC (American Type Culture Collection) から購入した HeLa 細胞もしくは HEK293T 細胞を用いて GPR55 と LPAR6 それぞれについて SRF-luciferase で Gα12/13 シグナルを検出した。

その結果、従来アッセイ法では上記二つの GPCR のリガンド刺激に対する反応をほとんど検出できなかったのに対して、本新規アッセイ法では二つの GPCR で共に 40 倍以上の S/B 比が得られた (図 22)。当初の目的通り、NCP41 細胞を使用した本新規アッセイ法は Gα12/13 シグナルを検出する優れたシステムだと言える。

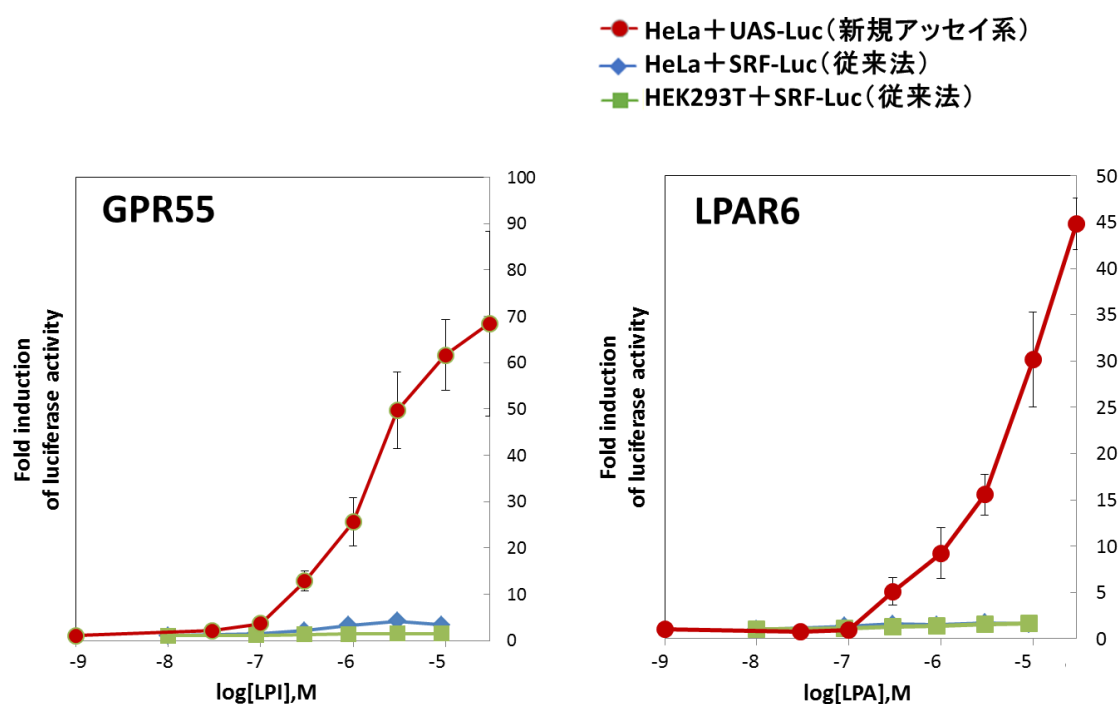


図 22. 新規アッセイ法と従来法の比較 (GPR55、LPAR6)

Gα12/13 と共役する受容体である GPR55 と LPAR6 について、新規アッセイ法と従来法でシグナル活性を比較した。各アッセイはトリプリケートで二回以上実施し、代表的なデータを図に示した。

GPR55 では S/B 比 70、LPAR6 では S/B 比 45 とどちらの受容体でも高い活性が得られた。

## 2. Gas、Gai/o、Gαq/11 と共役する GPCR を用いて「NCP41 細胞を使用した本新規アッセイ法」と「従来のアッセイ法」を比較

Gα12/13 以外の G タンパク質と共役する受容体、すなわち Gas と共役する ADORA2A、Gai/o と共役する OPRM1、Gαq/11 と共役する HRH1、の 3 つの GPCR について新規アッセイ系が適用できるかを検証した。それぞれのアッセイ実験はトリプリケートで二回以上実施し、代表的なデータを図に示した (図 23-25)。

結果、全ての受容体のシグナルを検出することができた。またこれらの結果は、以前の研究により報告されているこれら受容体の容量反応曲線とよく一致した(42-44)。つまり、 $G\alpha_{12/13}$  下流シグナルで発現誘導される NR4A1 と CTGF が他の  $G\alpha$  サブファミリーの下流でも活性化される可能性が示され、本アッセイ系が当初予定していた  $G\alpha_{12/13}$  シグナルだけでなく、 $G\alpha_s$ 、 $G\alpha_{i/o}$ 、 $G\alpha_{q/11}$  シグナルも検出できる網羅性と汎用性を有すると考えられた。

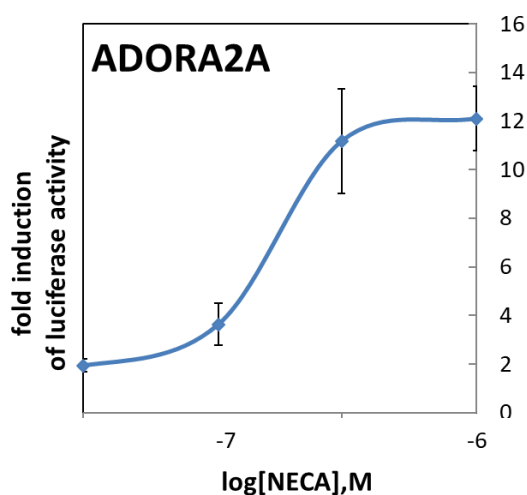


図 23. ADORA2A ( $G\alpha_s$ ) 新規アッセイ結果

今回確立した新規アッセイ法でシグナル活性を luciferase 発光によって測定した。NCP41 細胞に ADORA2A を一過性に発現させ、NECA で刺激した。アッセイはトリプリケートで二回以上実施し、代表的なデータを示した。

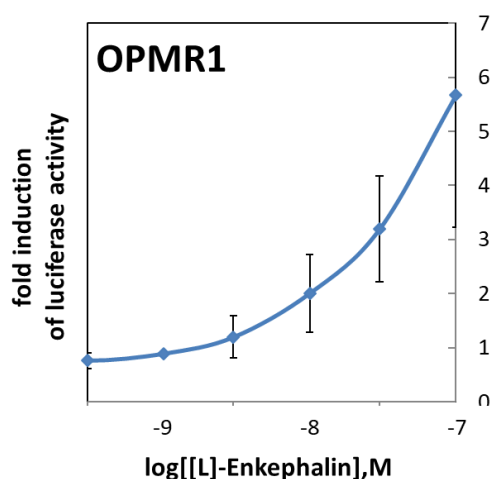


図 24. OPRM1 (Gαi/o) 新規アッセイ結果

NCP41 細胞において新規アッセイ法を用いてシグナルの活性を測定した。Gαi/o と特異的に共役する GPCR である OPRM1 を一過性に発現させ、リガンドである [L]-Enkephalin で刺激した。アッセイはトリPLICATEで二回以上実施し、代表的なデータを示した。

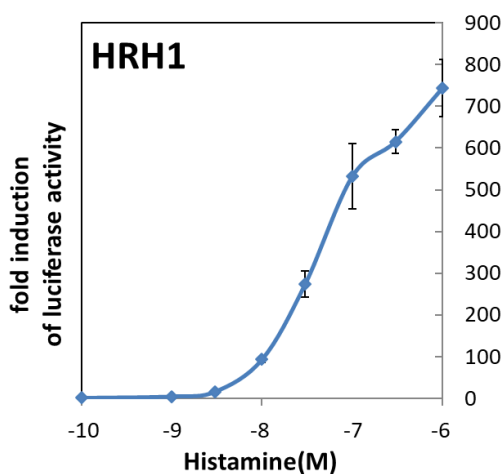


図 25. HRH1 (Gαq/11) 新規アッセイ結果

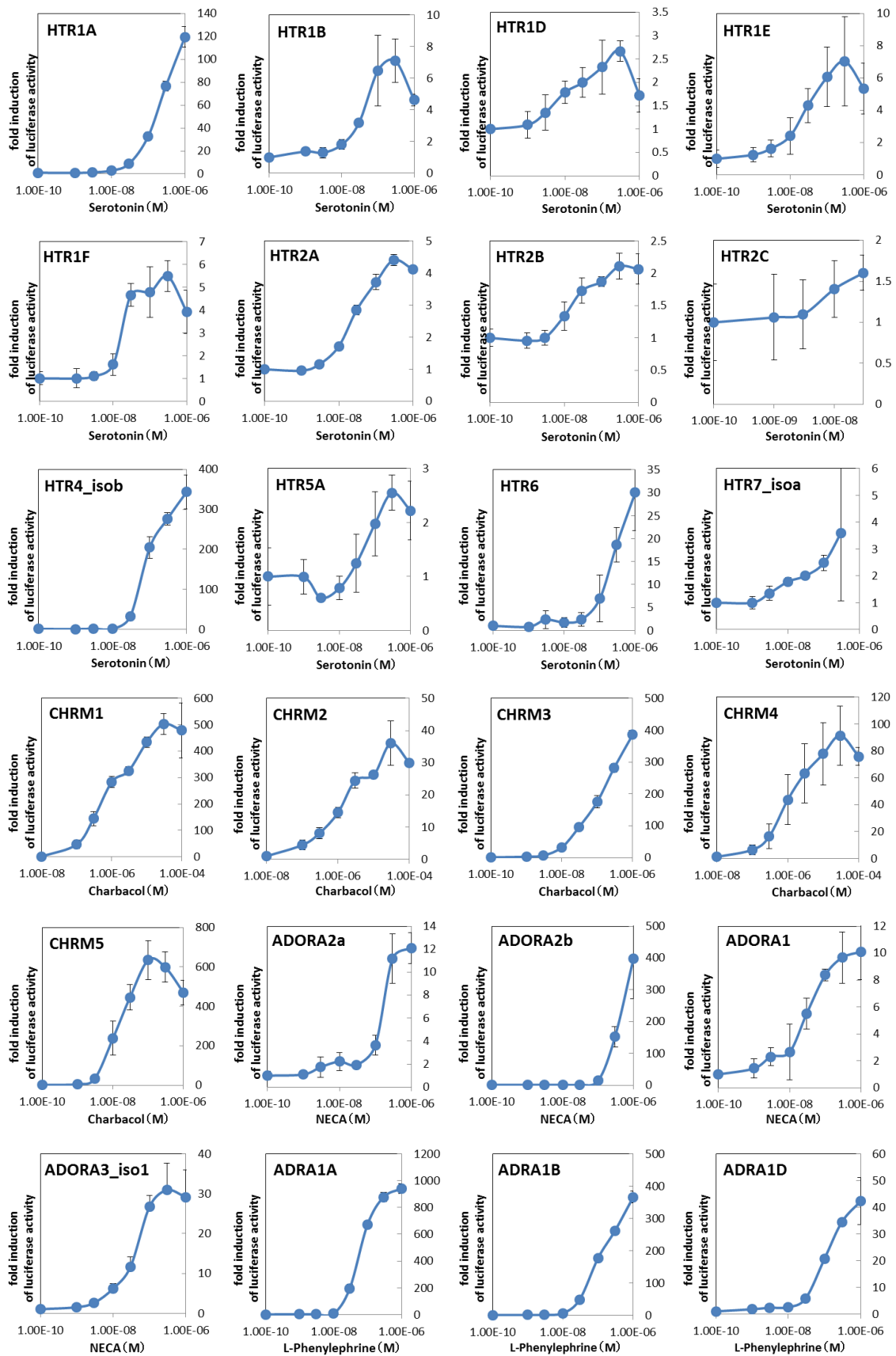
NCP41 細胞を用いた新規アッセイ法によって、HRH1 のシグナル活性を見た。Gαq/11 と特異的に共役する HRH1 を一過性に発現させ、リガンドである Histamine で刺激をした。アッセイはトリPLICATEで二回以上実施し、代表的なデータを示した。

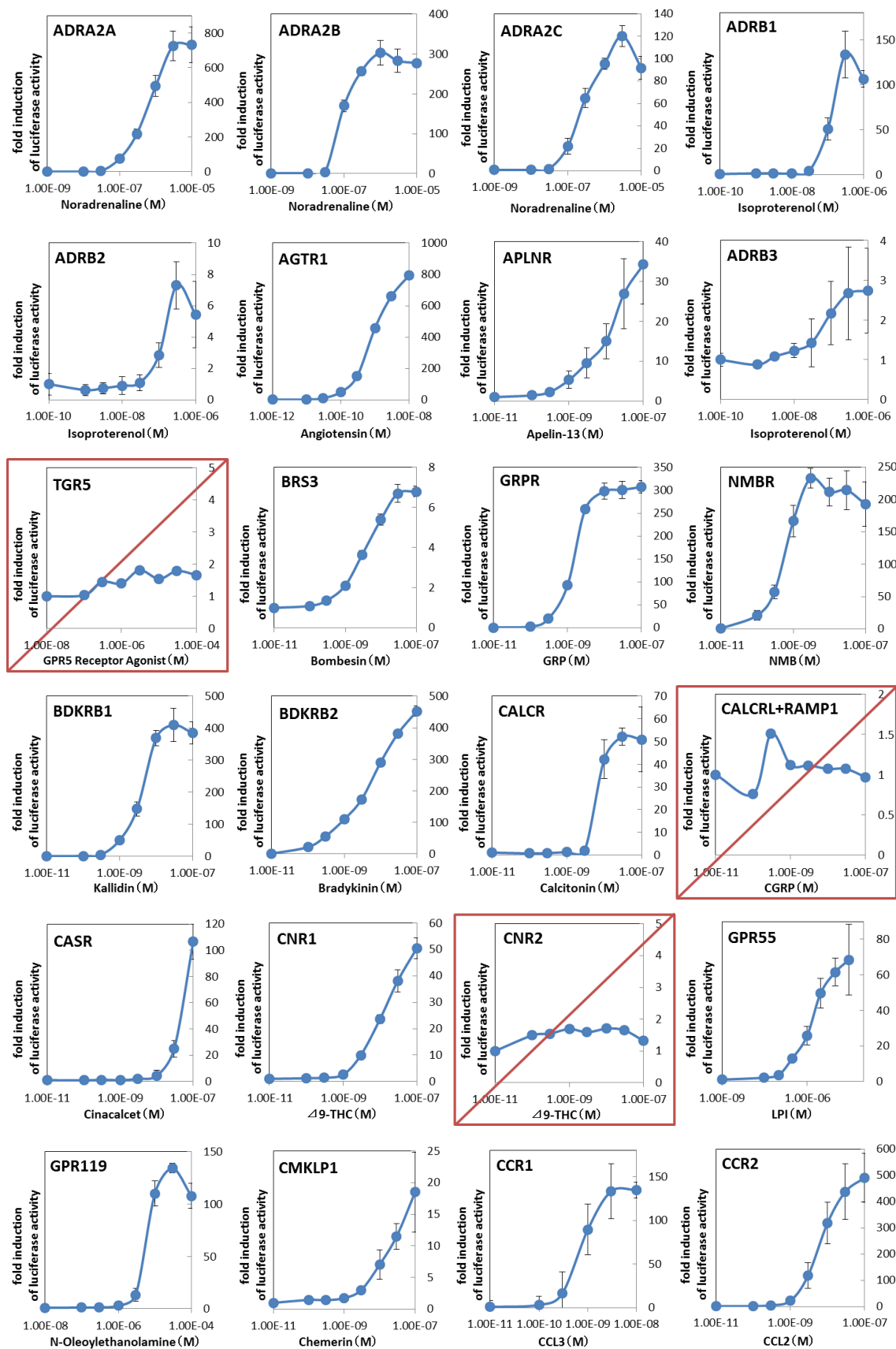
### 【リガンド既知全ヒト GPCR に対する本新規アッセイ系での分析結果】

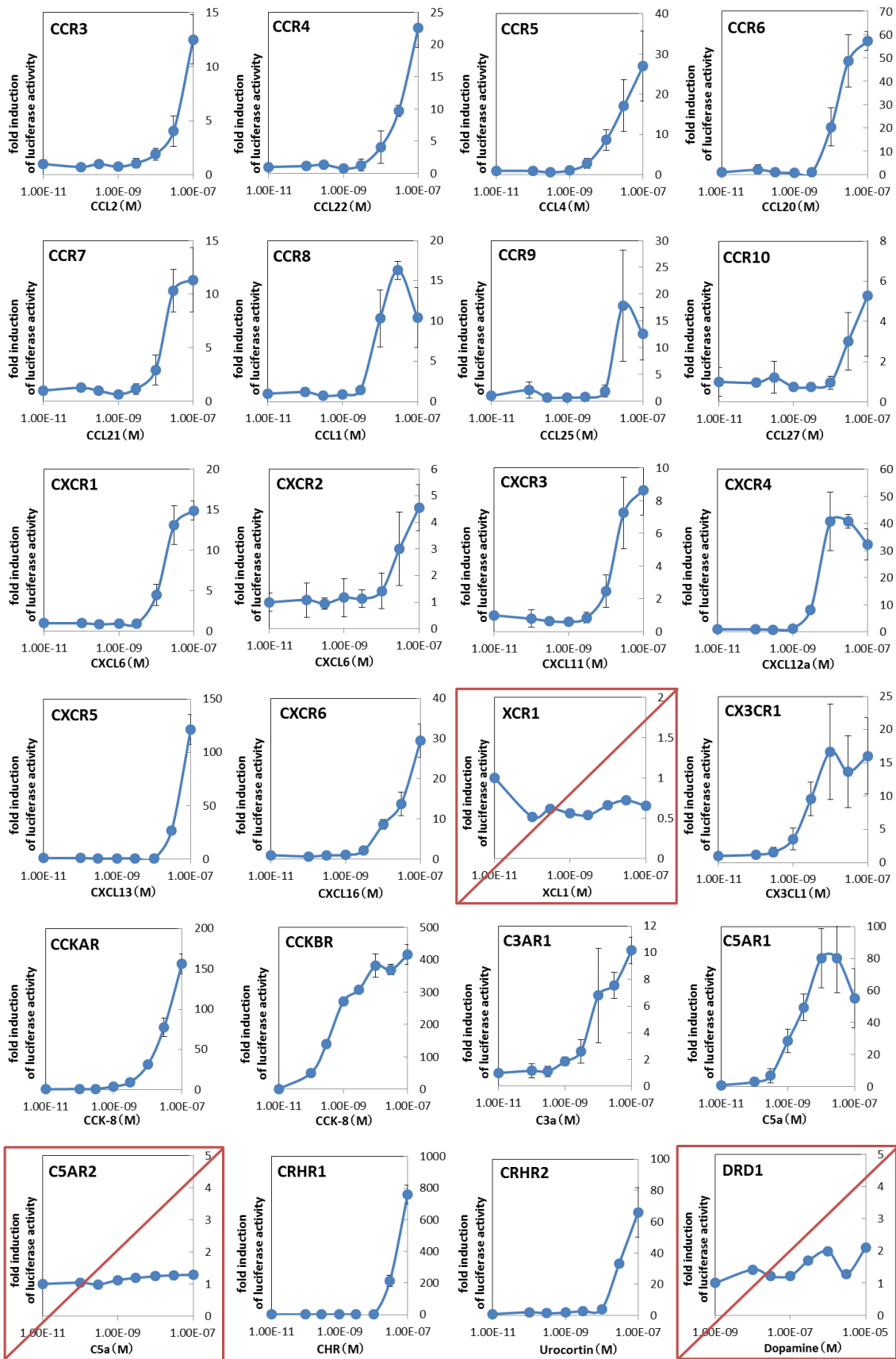
NCP41 細胞による新規アッセイ系を用いて、リガンド既知のヒト GPCR の全て（218 種）に対してアッセイを行った。全てのアッセイ実験はトリPLICATEで二回以上実施し、本論文では代表的なデータを提示した。アッセイによって、リガンド既知受容体 218 種の内、197 種の受容体で良好な容量反応曲線が得られた（図 26）。これはリガンド既知全ヒト GPCR の 90%をカバーしている結果であった。

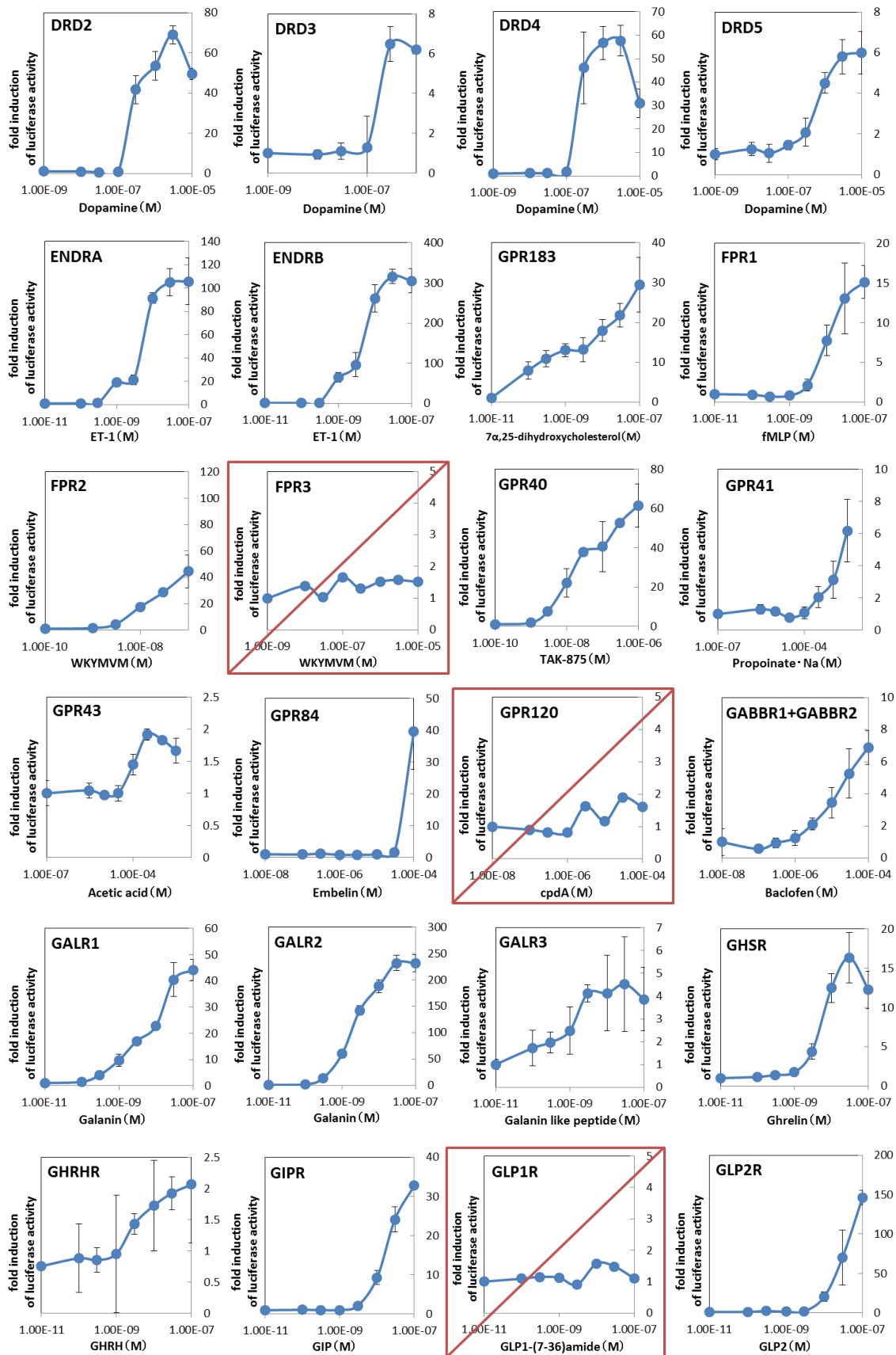
一部の受容体にて、高濃度のリガンド刺激にてむしろシグナルが低下することが認められた。この現象の理由として、1) 高濃度リガンドの非特異的な毒性、2) 強い刺激が入ったことによって惹起される受容体のダウンレギュレーション、3) 受容体下流シグナルの過度な活性化に対する細胞内ネガティブフィードバック機構の発動、などが考えられる。

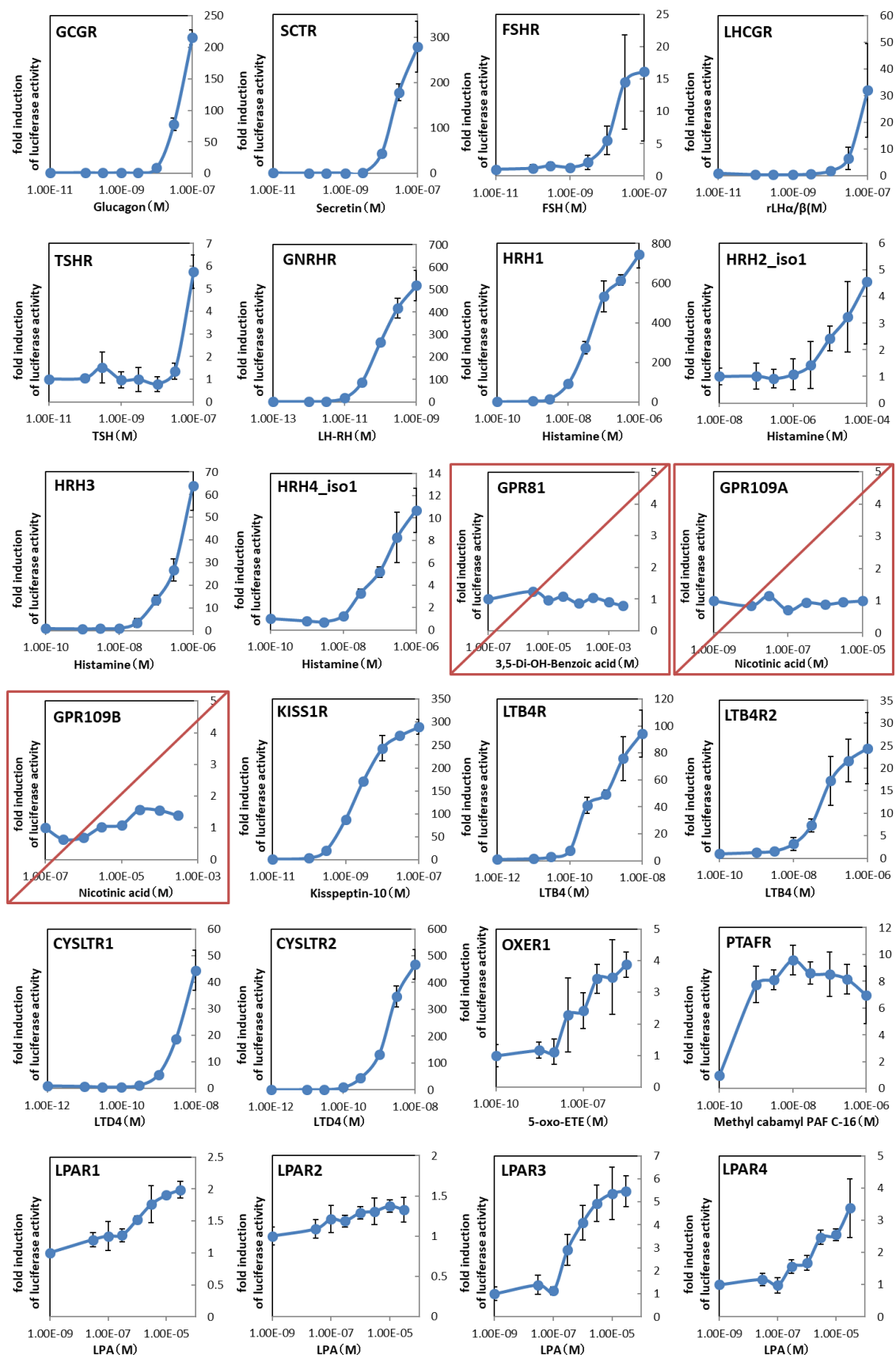


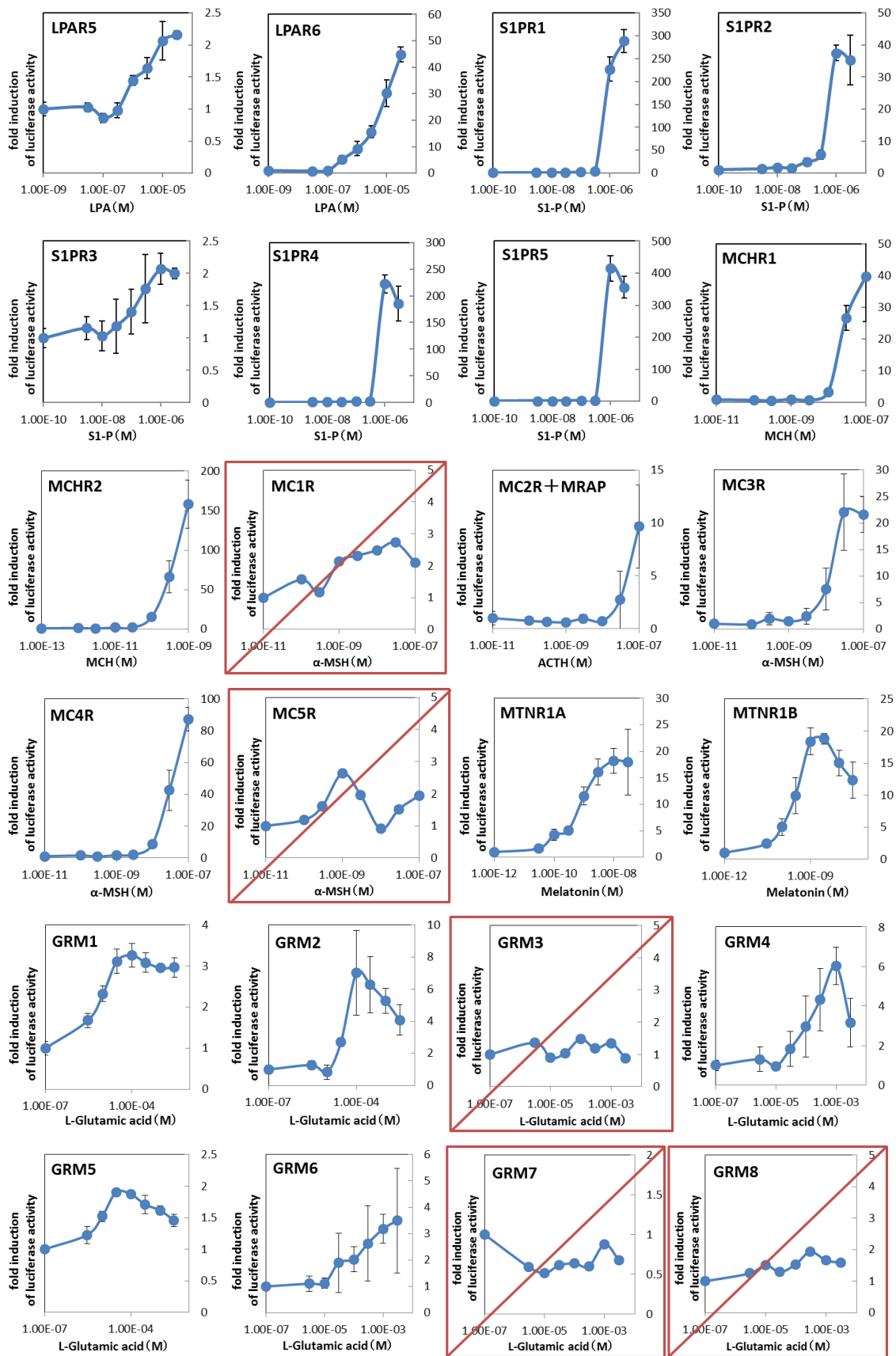


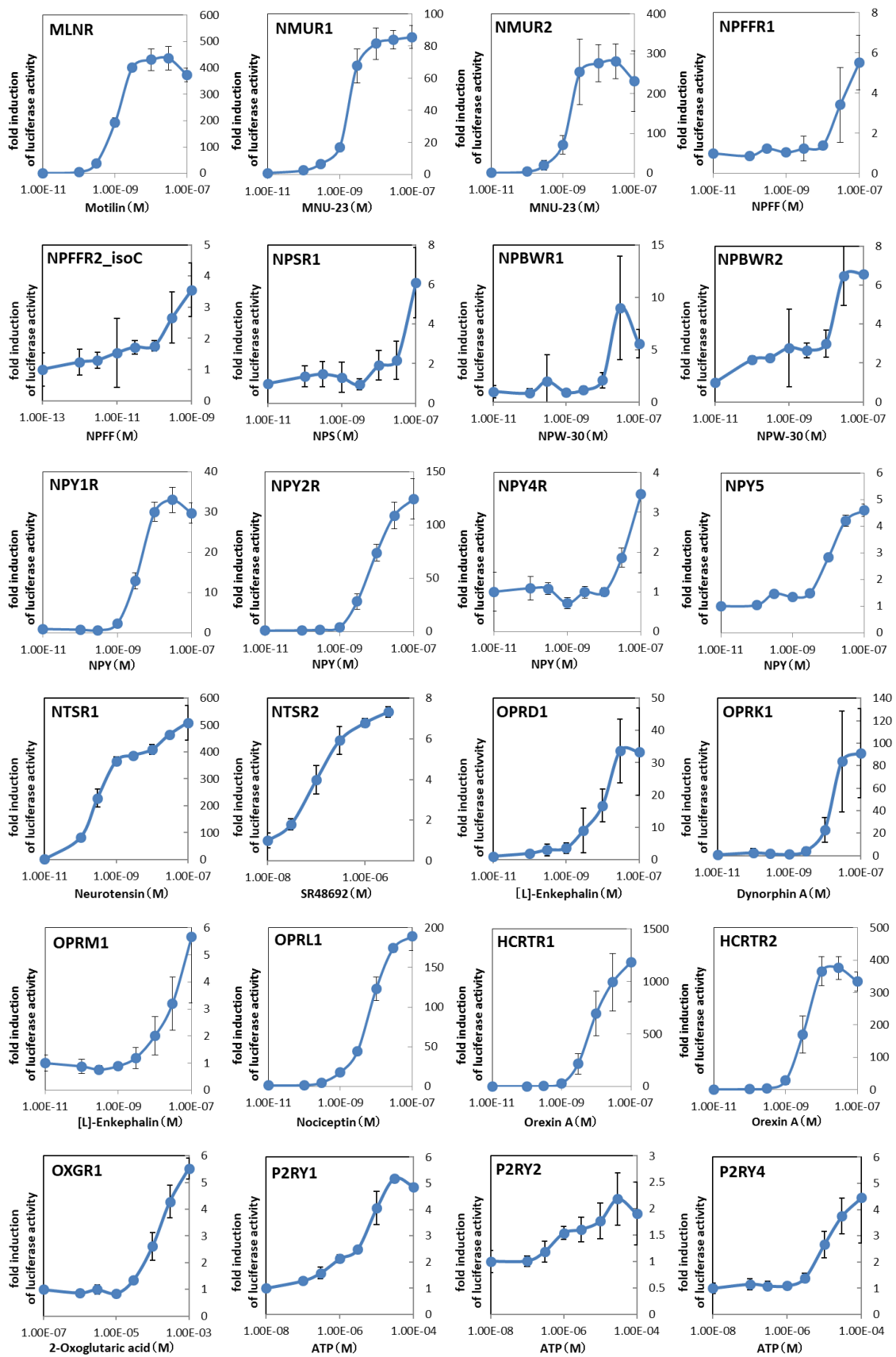




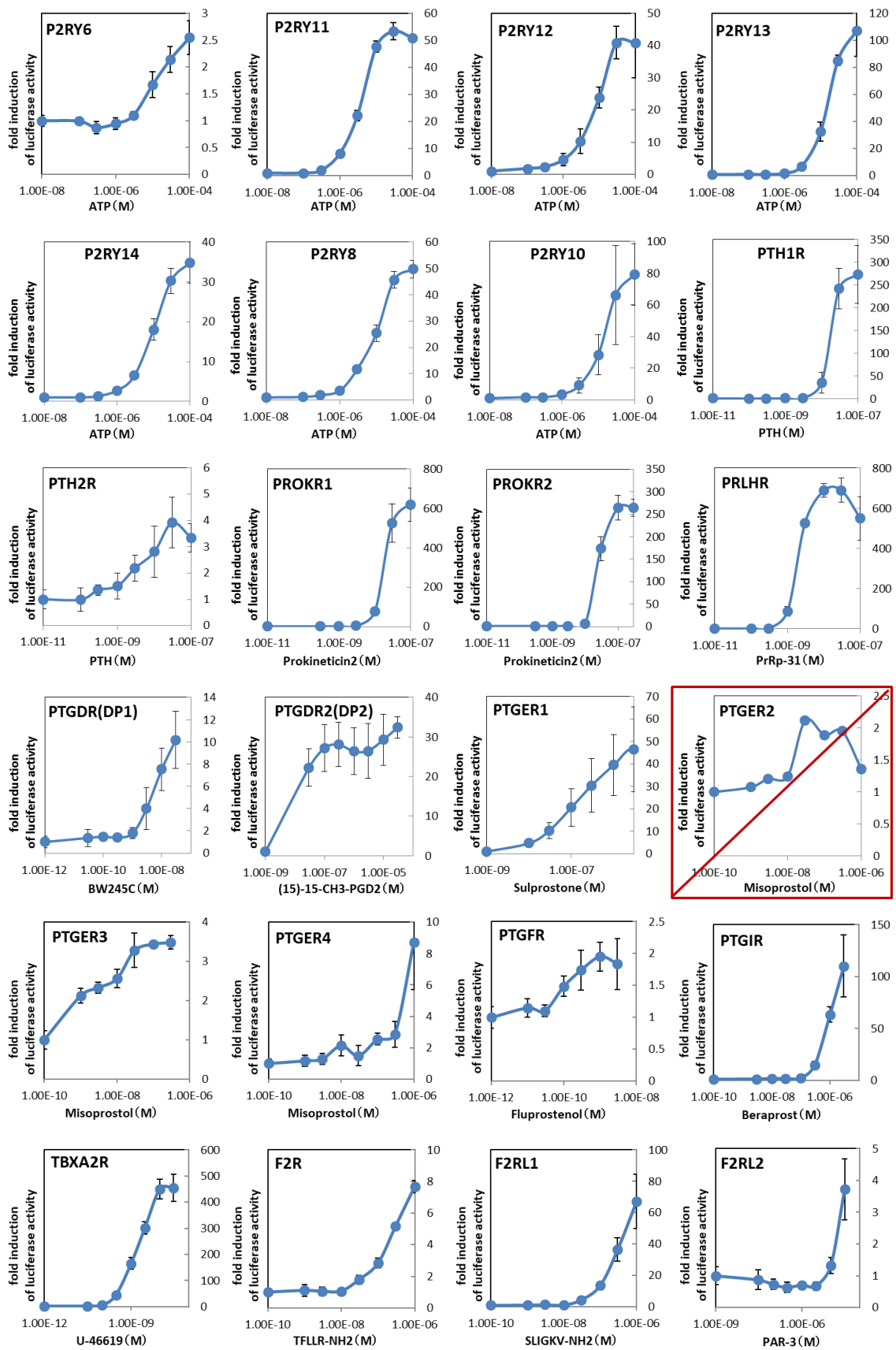




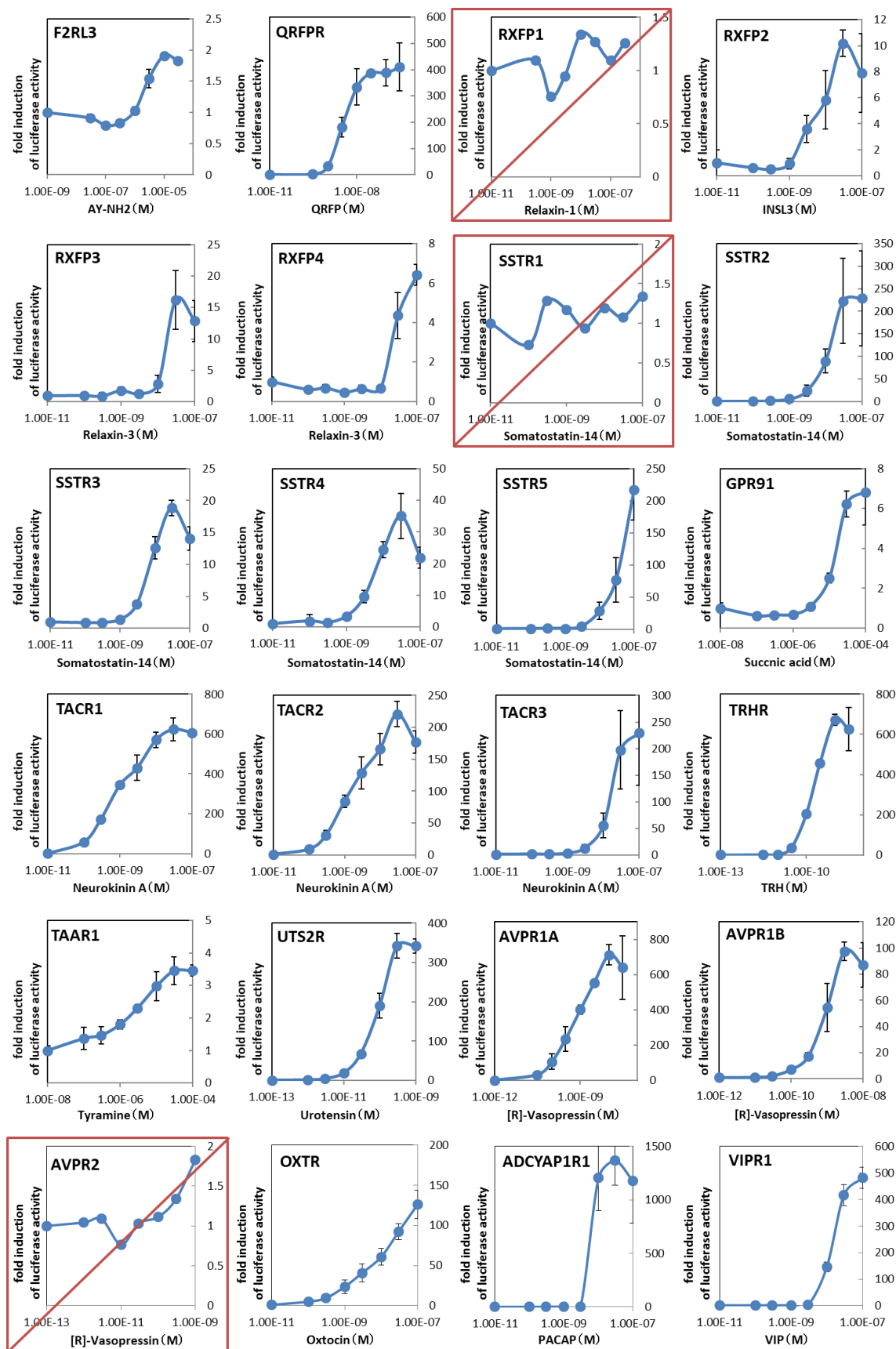












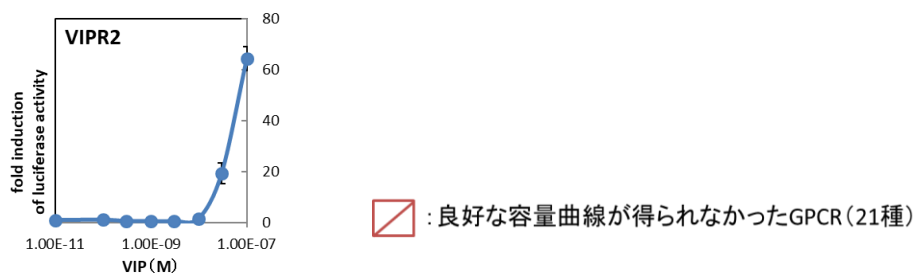


図 26. リガンド既知全 GPCR アッセイ結果

新規アッセイ法を用いてリガンド既知のヒト GPCR (218 種) についてそれぞれのリガンドで刺激し、シグナルの強度を luciferase 発光で確認した。各アッセイはトリPLICATEで二回以上実施し、代表的なデータを図に示した。

その結果、全体の 90% をカバーする 197 種の GPCR で良好な容量反応曲線が得られた。

## 考察

### 【今回確立した新規 GPCR リガンドアッセイ系の特徴】

本研究にて開発したアッセイ系は、①Gα12/13 シグナルの検出が格段に簡便かつ高感度である点、②Gα12/13 以外の G タンパク質（Gas、Gai/o、Gαq/11）シグナルも同一のアッセイ系で検出できる点、が従来系よりも優れている。以下で、この2点について考察する。

#### 1. 本アッセイ系は、Gα12/13 シグナル検出において従来法と比べて格段に簡便かつ高感度である

本研究では、Gα12/13 シグナルによって発現誘導を受ける二つの遺伝子（NR4A1、CTGF）の転写調節機構と、「基質（細胞膜型人工転写因子）」と「酵素（細胞膜型プロテアーゼ）」の発現を連動させることで、Gα12/13 シグナルに依存して細胞内で酵素反応が起こる人工遺伝子回路を構築した。酵素反応を介在させることにより、Gα12/13 シグナルの活性化状態は、NR4A1 と CTGF という二つの遺伝子の転写調節機構の活性化度合いの積へと変換され、結果的に相乗的に増幅された出力を得る。以上より、この人工遺伝子回路を組み込んだレポーター細胞を利用する本アッセイ系は、非常に高感度な系となる。

本研究で設計した人工遺伝子回路によるシグナル増幅コンセプトは、 $G\alpha_{12/13}$  シグナルの増幅のみならず、その他の細胞内シグナルを増幅する目的においても応用できる汎用性を有していると考えられる。

## 2. 本アッセイ系は、オーファン GPCR を標的とした化合物スクリーニングにも適用できる

$G\alpha_{12/13}$  以外の  $G\alpha$  サブファミリーと共役する GPCR (ADORA2A、OPRM1、HRH1) について本アッセイ系でシグナルの検出を試みたところ、従来法による結果に比べても遜色のない容量反応曲線が得られた (図 23-25)。図 2 に示したように、 $G\alpha_{12/13}$  以外の  $G\alpha$  サブファミリーにはそれぞれに適したレポーターアッセイ系が既に知られているが、これらのアッセイ系を用いても活性を検出することが難しい GPCR も多数存在する。例えば、 $G\alpha_s$  と共役する ADORA2A の活性は、CRE-レポーターアッセイでは検出できない。本アッセイ系によって、リガンド既知受容体 218 種の内、197 種の受容体 (活性検出率 90%) で良好な容量反応曲線が得られたという実験結果 (図 26) は、従来のアッセイ系を用いてその活性を検出することが難しかった GPCR の大部分に対して本アッセイ系が有効であることを示唆している。

オーファン GPCR を標的とする化合物スクリーニングを実施する際には、標的となるオーファン GPCR を刺激できるリガンドがそもそも存在しないため、共役する  $G\alpha$  の種類をあらかじめ予測することは困難であり、最悪のケースでは異なるアッセイ法を順次試す必要がある。本アッセイ系を用いれば、 $G\alpha$  の種類に関わらず同一アッセイフォーマットでシグナルを検出することができるため、標的 GPCR がどの  $G\alpha$  タンパク質と共役するのかをあらかじめ知っておく必要がない。よって、リガンド既知の GPCR だけでなく、リガンドが不明なオーファン GPCR に対しても本アッセイ系は従来法に比べて格段の優位性を有する。

## 【今後の計画と展望】

Gα12/13 と共役する GPCR やオーファン GPCR を対象とする化合物スクリーニングは、良いアッセイ系が開発されていなかったことや Gα の種類でアッセイ法が変わってしまうことなどの理由で未だ開拓の余地の多い分野となっている。

今回の新規アッセイ法の開発によって、この未開拓分野における化合物スクリーニングを効率化・加速化ができるかについて引き続き検討していく。

今後は本アッセイ系を用いて、オーファン GPCR を標的とした化合物スクリーニングを中心に行う予定である。またリガンド既知の GPCR については、特に従来法では活性を検出することが非常に困難であった受容体を対象に、新たな化合物スクリーニングを展開したいと考えている。

また、限界点としてこの結果が循環器系においても利用できるのかについて、今後検討していく予定である。

## 謝辞

本研究を実施するにあたり、多大な御指導を賜りました東京大学大学院医学系研究科循環器内科教授 小室 一成先生 に謹んで御礼を申し上げます。

本研究の立案、遂行にあたり、実験計画や実験手法について御指導と御協力を頂きました東京大学大学院医学系研究科ユビキタス予防医学講座特任准教授 池田 祐一先生 と、東京大学大学院医学系研究科先端臨床医学開発講座特任助教 熊谷 英敏先生 に心より感謝申し上げます。

次世代シーケンサーを用いた実験及び解析の御指導、御協力を頂きました理化学研究所統合生命医科学研究センター 伊藤 薫先生に深く御礼申し上げます。

最後に研究生活の様々な場面で御協力、御助言、御支援頂きました東京大学医学部附属病院循環器内科の皆様心より御礼申し上げます。

## 引用文献

1. Stewart A, Fisher RA. G Protein-coupled Receptors and RGS Proteins. Progress in Molecular Biology and Translational Science 133, 1-11(2015).
2. Latek D, Modzelewska A, Trzaskowski B, Palczewski K, Fillipek S. G protein-coupled receptors - recent advances. Acta Biochimica Polonica 59, 515-529(2012).
3. Fredriksson R, Lagerstrom MC, Lundin LG, Schioth HB. The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. Molecular Pharmacology 63, 1256-1272(2003).
4. Hauser AS, Chavali S, Masuho I, Jahn LJ, Martemyanov KA, Gloriam DE, Babu MM. Pharmacogenomics of GPCR Drug Targets. Cell 172, 41-54(2018).
5. Hauser AS, Attwood MM, Rask-Andersen M, Schioth HB, Gloriam DE. Trends in GPCR drug discovery: new agents, targets and indications. Nature Reviews Drug Discovery 16, 829-842(2017).
6. Laschet C, Dupuis N, Hanson J. The G protein-coupled receptors deorphanization landscape. Biochemical Pharmacology 153, 62-74(2018).
7. Ali DC, Naveed M, Gordon A, Majeed F, Saeed M, Ogbuke MI, Atif M, Zubair HM, Changxing L.  $\beta$ -Adrenergic receptor, an essential target in cardiovascular



- diseases. *Heart Failure Reviews*, 1-12(2019).
8. Pflieger J, Gresham K, Koch WJ. G protein-coupled receptor kinases as therapeutic targets in the heart. *Nature Reviews Cardiology* 16, 612-622(2019).
  9. Grisanti LA, Schumacher SM, Tilley DG, Koch WJ. Designer Approaches for G Protein–Coupled Receptor Modulation for Cardiovascular Disease. *JACC Basic to Translational Science* 3, 550-562(2018).
  10. Wang J, Gareri C, Rockman HA. G-Protein-Coupled Receptors in Heart Disease. *Circulation Research* 123, 716-735(2018).
  11. Dhanasekaran N, Dermott JM. Signaling by the G12 class of G proteins. *Cellular Signalling* 8, 235-245(1996).
  12. Strathmann MP, Simon MI. G alpha 12 and G alpha 13 subunits define a fourth class of G protein alpha subunits. *Proceeding of the National Academy of Sciences of USA* 88, 5582-5586(1991).
  13. He Z, Yang Y, Wen Z, Chen C, Xu X, Zhu Y, Wang Y, Wang DW. CYP2J2 metabolites, epoxyeicosatrienoic acids, attenuate Ang II-induced cardiac fibrotic response by targeting G $\alpha$ 12/13. *Journal of Lipid Research* 58, 1338-1353(2017).
  14. Ruppel KM, Willison D, Kataoka H, Wang A, Zheng YW, Cornelissen I, Yin L, Xu SM, Coughlin SR. Essential role for G $\alpha$ 13 in endothelial cells during

- embryonic development. Proceeding of the National Academy of Sciences of USA  
102, 8281-8286(2005).
15. Offermanns S, Mancino V, Revel JP, Simon MI. Vascular System Defects and Impaired Cell Chemokinesis as a Result of Gα13 Deficiency. *Science* 274, 533-536(1997).
  16. Takefuji M, Wirth A, Lukasova M, Takefuji S, Boettger T, Braun T, Althoff T, Offermanns S, Wettschureck N. G(13)-mediated signaling pathway is required for pressure overload-induced cardiac remodeling and heart failure. *Circulation* 126, 1972-82(2012).
  17. Azimzadeh P, Oison JA Jr, Balenga N. Reporter gene assays for investigating GPCR signaling. *Methods Cell Biology* 142, 89-99(2017).
  18. Fan F, Wood KV. Bioluminescent Assays for High-Throughput Screening. *Assay and Drug Development Technologies* 5, 127-136 (2007).
  19. Inglese J, Johnson RL, Simeonov A, Xia M, Zheng W, Austin CP, Auld DS. High-throughput screening assays for the identification of chemical probes. *Nature Chemical Biology* 3, 466-479(2007).
  20. Liu Y, Hermes J, Li J, Tudor M. Endogenous Locus Reporter Assays. *Methods in Molecular Biology* 1755, 163-177(2018).

21. Liu B, Wu D. Analysis of the Coupling of G12/13 to G Protein-Coupled Receptors Using a Luciferase Reporter Assay. *Methods in Molecular Biology* 237, 145-149(2004).
22. Inoue A, Ishiguro J, Kitamura H, Arima N, Okutani M, Shuto A, Higashiyama S, Ohwada T, Arai H, Makide K, Aoki J. TGF $\alpha$  shedding assay: an accurate and versatile method for detecting GPCR activation. *Nature Methods* 9, 1021-1029(2012).
23. Inoue A, Raimondi F, Kadji FMN, Singh G, Kishi T, Uwamizu A, Ono Y, Shinjo Y, Ishida S, Arang N, Kawakami K, Gutkind JS, Aoki J, Russell RB. Illuminating G-Protein-Coupling Selectivity of GPCRs. *Cell* 177, 1933-1947(2019).
24. Kitamura T, Koshino Y, Shibata F, Oki T, Nakajima H, Nosaka T, Kumagai H. Retrovirus-mediated gene transfer and expression cloning: powerful tools in functional genomics. *Experimental Hematology* 31, 1007-1014(2003).
25. Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nature Protocols* 8, 2281-2308(2013).
26. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 337, 816–821 (2012).

27. Mashiko D, Fujihara Y, Satouh Y, Miyata H, Isotani A, Ikawa M. Generation of mutant mice by pronuclear injection of circular plasmid expressing Cas9 and single guided RNA. *Scientific Reports* 3, 3355(2013).
28. Romanienko PJ, Giacalone J, Ingenito J, Wang Y, Isaka M, Johnson T, You Y, Mark WH. A Vector with a Single Promoter for In Vitro Transcription and Mammalian Cell Expression of CRISPR gRNAs. *PLoS ONE* 11, 12(2016).
29. Zhu P, Wu F, Mosenson J, Zhang H, He TC, Wu WS. CRISPR/Cas9-Mediated Genome Editing Corrects Dystrophin Mutation in Skeletal Muscle Stem Cells in a Mouse Model of Muscle Dystrophy. *Molecular Therapy Nucleic Acids* 7, 31-41(2017).
30. Mali P, Yang L, Esvelt KM, Aach J, Guell M, DiCarlo JE, Norville JE, Church GM. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science* 339, 823-826 (2013).
31. Song AJ, Palmiter RD. Detecting and Avoiding Problems When Using the Cre-lox System. *Trends Genet* 34, 333-340(2018).
32. Geisinger JM, Turan S, Hernandez S, Spector LP, Calos MP. In vivo blunt-end cloning through CRISPR/Cas9-facilitated non-homologous end-joining. *Nucleic Acids Research* 44, 76(2016).
33. Suzuki K, Tsunekawa Y, Hernandez-Benitez R, Wu J, Zhu J, Kim EJ, Hatanaka F,

- Yamamoto M, Araoka T, Li Z, Kurita M, Hishida T, Li M, Aizawa E, Guo S, Chen S, Goebel A, Sologalla RD, Qu J, Jiang T, Fu X, Jafari M, Esteban CR, Berggren WT, Lajara J, Nunez-Delicado E, Guillen P, Campistol JM, Matsuzaki F, Liu GH, Magistretti P, Zhang K, Callaway EM, Zhang K, Belmonte JC. In vivo genome editing via CRISPR/Cas9 mediated homology-independent targeted integration. *Nature* 540, 144-149(2016).
34. Suzuki K, Izpisua Belmonte JC. In vivo genome editing via the HITI method as a tool for gene therapy. *Journal of Human Genetics* 63, 157-164(2018).
35. Stevens RC, Cherezov V, Katritch V, Abagyan R, Kuhn P, Rosen H, Wuthrich K. The GPCR Network: a large-scale collaboration to determine human GPCR structure and function. *Nature Reviews Drug Discovery* 12, 25-34(2013).
36. Civelli O, Nothacker HP, Saito Y, Wang Z, Lin SH, Reinscheid RK. Novel neurotransmitters as natural ligands of orphan G-protein-coupled receptors. *Trends in Neurosciences* 24, 230-237(2001).
37. Howard AD, McAllister G, Feighner SD, Liu Q, Nargund RP, Van der Ploeg LH, Patchett AA. Orphan G-protein-coupled receptors and natural ligand discovery. *Trends in Pharmacological Sciences* 22, 132-140(2001).
38. Van Dijk EL, Auger H, Jaszczyszyn Y, Thermes C. Ten years of next-generation

- sequencing technology. Trends in Genetics 30, 418-426(2014).
39. Krupp M, Marquardt JU, Sahin U, Galle PR, Castle J, Teufel A. RNA-Seq Atlas—a reference database for gene expression profiling in normal tissue by next-generation sequencing. Bioinformatics 28, 1184-1185(2012).
40. Jeanneteau F, Barrere C, Vos M, De Vries CJM, Rouillard C, Levesque D, Dromard Y, Moisan MP, Duric V, Franklin TC, Duman RS, Lewis DA, Ginsberg SD, Arango-Lievano M. The Stress-Induced Transcription Factor NR4A1 Adjusts Mitochondrial Function and Synapse Number in Prefrontal Cortex. The Journal of neuroscience 38, 1335-1350(2018).
41. Ramazani Y, Knops N, Elmonem MA, Nguyen TQ, Arcolino FO, van den Heuvel L, Levchenko E, Kuypers D, Goldschmeding R, Connective tissue growth factor (CTGF) from basics to clinics. Matrix Biology 68-69, 44-66(2018).
42. Kull B, Arslan G, Nilsson C, Owman C, Lorenzen A, Schwabe U, Fredholm BB. Differences in the order of potency for agonists but not antagonists at human and rat adenosine A<sub>2A</sub> receptors. Biochemical Pharmacology 57, 65-75(1999).
43. Brasel CM, Sawyer GW, Stevens CW. A pharmacological comparison of the cloned frog and human *mu* opioid receptors reveals differences in opioid affinity and function. European Journal of Pharmacology 599, 36-43(2008).

44. Anthes JC, Gilchrest H, Richard C, Eckel S, Hesk D, West RE Jr, Williams SM, Greenfeder S, Billah M, Kreutner W, Egan RE. Biochemical characterization of desloratadine, a potent antagonist of the human histamine H1 receptor. *European Journal of Pharmacology* 449, 229-237(2002).