

論文の内容の要旨

論文題目 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

氏名 木戸 命

G タンパク質共役型受容体 (GPCR) は、細胞膜上に存在する 7 回膜貫通型の受容体分子群である。GPCR にリガンドが結合すると GPCR に構造変化が生じ、共役する三量体 G タンパク質が活性化され下流にシグナルが伝達される。GPCR は創薬ターゲットとして適した分子群であり、実際に現在上市されている医薬品の約 4 割は GPCR をターゲットとしている。循環器疾患領域においては、 α アドレナリン受容体作動薬・拮抗薬、 β 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 を標的とした医薬品が多数開発されているが、これら既存の医薬品だけでは治療効果が不十分な疾患も存在する。そこで GPCR を介した未知の作用の中に、循環器疾患の病態生理に関わるものが未だ存在するとの作業仮説の下、新規 GPCR リガンド探索を通じた革新的な治療薬開発が求められている。

GPCR と共役する三量体 G タンパク質は α 、 β 、 γ の三つのサブユニットにより複合体を形成する。 $G\alpha$ サブユニットはそのアミノ酸配列の違いにより $G\alpha_s$ 、 $G\alpha_i/o$ 、 $G\alpha_q/11$ 、 $G\alpha_{12/13}$ の四種類に大別され、それぞれ活性化する下流のシグナルが異なる。なかでも、心血管系における $G\alpha_{12/13}$ シグナルが近年注目されており、マウスにおいて $G\alpha_{13}$ をコードする遺伝子を破壊すると内皮細胞が血管形成に寄与できなくなり胎生致死を引き起こすこと、圧負荷によって誘導される心筋肥大と心臓の線維化が心臓特異的 $G\alpha_{13}$ ノックアウトマウスにおいて抑制されること、などが報告されている。

GPCR リガンド探索の際には、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。 $G\alpha_{12/13}$ 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、ハイスループットスクリーニングに対応可能な簡便で高感度なアッセイ系は存在しない。よって、この課題を解決する新規アッセイ系を開発すれば、 $G\alpha_{12/13}$ に共役する GPCR を標的とした新規リガンド探索を効率化・加速化できる。

そこで本研究では、 $G\alpha_{12/13}$ シグナルに対する簡便・高感度なアッセイ系を開発するために、まず「 $G\alpha_{12/13}$ シグナルを増幅する人工遺伝子回路」をゲノム内に組み込んだアッセイ用ゲノム改変細胞の樹立を目指した。培養細胞 (HeLa 細胞) に、 $G\alpha_{12/13}$ と特異的に共役する GPCR である GPR55 を一過性に発現させ、GPR55 を活性化するリガンドで 1 時間刺激した。刺激前後の細胞からそれぞれ回収した mRNA を、次世代シーケンサーによる RNA seq 解析にかけ、GPR55- $G\alpha_{12/13}$ 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を網羅的に同定した。またこれと同様の実験を、 $G\alpha_{12/13}$ と特異的に共役する異なる GPCR (LPAR6) を用いても実施した。この二つの実験によりそれぞれ同定された遺伝子群の中で、①刺激前後で遺伝子発現

量が5倍以上増加、②刺激前の遺伝子発現量が FPKM (fragments per kilobase of exon per million reads mapped) 値で10以上、の二条件を満たす遺伝子は NR4A1 と CTGF のみであった。

次に、Gα12/13 シグナルを細胞内で増幅することを目的に、①「NR4A1 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」の発現が直接制御され、②「CTGF の転写調節機構」によって「プロテアーゼ」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、それを上記 RNA seq 実験で使用した HeLa 細胞のゲノムに組み込むことを計画した。この人工遺伝子回路が組み込まれた HeLa 細胞では、Gα12/13 が活性化されると「NR4A1 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型となる。一方、Gα12/13 が活性化されると「NR4A1 の転写調節機構」の活性化と独立・並行して「CTGF の転写調節機構」も活性化されるため、その下流で「プロテアーゼ」が発現する。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。このように本細胞においては、「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、「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 Gα12/13 シグナル依存的に開始される。この酵素反応を反応初期の単純化したモデルで捉えれば、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「プロテアーゼ」の細胞内濃度の積に比例する。また、あらかじめ「遊離型転写因子によりレポーター遺伝子が発現誘導されるコンストラクト」を設計し、それを上記細胞に遺伝子導入しておけば、遊離型転写因子の量(酵素反応の生産物の量)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が組み込まれた HeLa 細胞を用いることにより、Gα12/13 の活性化状態は「NR4A1 の転写調節機構」および「CTGF 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。

上記コンセプトの細胞を樹立するために、まず①「プロテアーゼ切断領域を有する細胞膜型人工転写因子」をコードする DNA 配列の 5'上流に IRES 配列を付加した DNA カセットを作製し、このカセットを HeLa 細胞ゲノムの NR4A1 遺伝子座 3'UTR に CRISPR-Cas9 システムを用いてノックインした。引き続き②「プロテアーゼ」をコードする DNA 配列の 5'上流に IRES 配列を付加した DNA カセットを作製し、このカセットを CTGF 遺伝子座 3'UTR にノックインした。このように、HeLa 細胞の二つの異なる遺伝子座にゲノム改変(上記①および②のノックイン操作)を加えることで、「Gα12/13 シグナルを増幅する人工遺伝子回路」がゲノムに組み込まれた細胞(アッセイ用ゲノム改変細胞)を樹立した。

この細胞を利用した新規アッセイ系は以下の極めて簡便な手順で実施される:「試験対象となる GPCR を発現するコンストラクト」および「遊離型転写因子によりレポーター遺伝子(ルシフェラーゼ)が発現誘導されるコンストラクト」をアッセイ用ゲノム改変細胞に同時にトランスフェクションする。トランスフェクションから24時間後に細胞を被験物質により刺激し、6時

間刺激後、細胞のルシフェラーゼ活性を測定する。

Gα12/13 と共役する GPCR である GPR55 と LPAR6 を用いて、この新規アッセイ系と従来のアッセイ系を比較した。従来の方法ではリガンド刺激に対する応答がほとんど見られなかったこれら二つの GPCR に対して、新しいアッセイ系では共に 40 倍以上の S/B 比 (signal/background ratio) が得られたことから、新たなアッセイ系は目的通りに Gα12/13 を介したシグナルの高感度な検出を可能にすることが確かめられた。

次に、Gα12/13 以外の Gα と共役する GPCR、すなわち Gas と共役する ADORA2A、Gai/o と共役する OPRM1、Gaq/11 と共役する HRH1 についても本アッセイ系で検討したところ、いずれの受容体に対しても良好な容量反応曲線を得ることができた。この結果は、Gα12/13 の下流で活性化される遺伝子である NR4A1 および CTGF が、Gα12/13 以外の Gα の下流においても程度の差こそあれ活性化されることを示唆している。よって本アッセイ系は、当初期待されていた Gα12/13 を介したシグナルだけでなく、Gas、Gai/o、Gaq/11 を介したシグナルまでも広くカバーする網羅性・汎用性を有する可能性がある。そこで、本アッセイ系の GPCR に対する網羅性・汎用性を、リガンド既知のヒト GPCR 全て (218 種) を対象としてさらに検討したところ、186 受容体にて良好な容量反応曲線を得ることができた (カバー率 90%)。

以上の実験結果は、本アッセイ系が Gα12/13 と共役する GPCR のリガンド探索のみならず、オーファン GPCR (内因性リガンドが不明の GPCR) のリガンド探索にも適していることを示唆する。オーファン GPCR はリガンドが不明なためどの Gα と共役するかをあらかじめ予測することは難しい。共役する Gα の種類に依らず、同一のアッセイフォーマットで 90% の GPCR の活性を評価できる本アッセイ系を用いれば、このオーファン GPCR 特有のジレンマも解決できる可能性が高い。GPCR 創薬分野において、①Gα12/13 と共役する GPCR のリガンド探索、②オーファン GPCR のリガンド探索、はまだまだ未開拓の領域である。本アッセイ系の開発により、この二つの未開拓領域 (GPCR 創薬のブルーオーシャン) における GPCR リガンド探索の効率化・加速化が期待される。