

博士論文

一細胞アレイ化技術を用いた GPCR 動態の
ハイスループット解析技術の開発

37-157153

談 莫東

1, 緒言

Gタンパク質共役型受容体 (GPCR) は、臨床で用いられている医薬品の大部分がターゲットとしている重要な受容体であり、そのメカニズムの総合的な理解と GPCR に対する化合物評価系の開発が望まれている。従来の GPCR に対する薬剤の評価方法では、ルシフェラーゼを利用した下流のシグナルパスウェイの活性レベルや細胞内 Ca^{2+} や IP_3 など、細胞に内在性のセカンドメッセンジャーの産生量変化を測定・評価している⁽¹⁾。しかし、これらの手法は GPCR を直接観察しているわけではないため、アゴニストの評価においては、内在性の予期せぬ因子が、測定しているシグナルパスウェイに作用してしまった結果、偽陽性を引き起こす可能性があり、別の実験により、偽陽性が発生していないかを検討する必要がある。GPCR に対する阻害剤の評価においては、阻害剤が細胞毒性を示して細胞死もしくは下流シグナルの伝達に必要な経路を破壊させて偽陽性を引き起こしていないかに注意する必要がある。この問題に対処するには、細胞内の標的 GPCR の動態を直接観察することで解決可能である。一部の GPCR はリガンド依存的に細胞内局在を変化させて活性を調節していることが知られている⁽²⁾。特に、スフィンゴシン 1-リン酸 (S1P) 受容体の調節剤として知られる FIY720 は、初期エンドソームに取り込まれた S1P 受容体が通常細胞膜へ還流するところを、リソソームへ移行させて分解させることで受容体の量を減らし、その活性を低下させることが知られている。つまり、GPCR 発現細胞に作用させた化合物が GPCR に作用したかどうかを、GPCR を可視化してその局在変化で判断し、細胞の生死も判別することで化合物が細胞に対して毒性を示していないかを同時に解析することで判別可能である。そこで、蛍光標識された GPCR のリガンド依存的局在変化を直接的に観察し、細胞の生死も判別しながら、GPCR に対するリガンドや阻害剤同定に応用することができる系の構築を目指した。

マクロファージや好中球など貪食系の細胞で多く発現しているプロトン応答性 GPCR である GPR4 と OGR1 についてはリガンド濃度依存的に遊走性が変化することが知られている⁽³⁾。同様に、マクロファージ系細胞で多く発現している Leukotriene B4 (LTB4) 受容体 BLT1 を発現した細胞も LTB4 依存的な走化性を示すことが知られている。走化性のみによって GPCR に対する化合物の作用を評価した場合、細胞毒性によって細胞が死に至ってその走化性が低下したのか、それとも GPCR を不活性化して走化性に関わる GPCR のシグナルを低下させたのか区別がつかない。そのため、GPCR シグナル活性の変化を別の実験で確かめる必要がある。そこで、本研究では、走化性のみによる GPCR の活性評価だけでなく、GPCR の活性とリンクしたその局在変化も同時に解析することで、GPCR に対する薬剤の評価を行う系を構築した。

このようなハイコンテンツ解析により、複数の項目を同時に解析できるようになるため、従来法よりも精密かつ偽陽性の少ない薬剤評価系の開発が可能であると考えられる。ただし、細胞が基板上を遊走してしまった場合、使用する共焦点顕微鏡の撮像速度の関係上、精密な追跡および解析が困難になる。Ba/F3 細胞は浮遊細胞ではあるが、IL-3 などの刺激依存的な細胞の変形・仮足の伸長が観察される。そこで細胞を一細胞アレイ上に整列して固定し、細胞遊走に代わる指標として、細胞遊走と同様の細胞内骨格の伸長に伴う細胞形態変化を指標として用いる⁽⁴⁾。本研究では G2A、OGR1 と BLT1 をモデルとして、上記 2 点を同時に解析し、化合物に対する GPCR の応答性を解析する系の開発を行った (Fig. 1)。

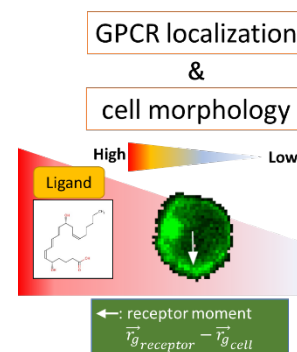


Fig. 1 GPCR に対する化合物の応答特性を多角的に評価する系の概念

2, PBAM を用いた一細胞アレイの構築

黄色ブドウ球菌由来のペプチド転移酵素 Sortase (SrtA) と AF488-DLPETGG を用いた、GPCR の N 末端特異的蛍光標識法により、その動態に影響を与えず、一細胞アレイ上で、刺激依存的な GPCR の局在変化を解析した。GPCR のモデルとして、プロトン応答性 GPCR として知られる SrtA タグ (LPETG₅) 融

合 G2A を一細胞アレイ上で解析した。一細胞アレイとは、光分解性リンカーをもつ PEG 脂質、PBAM (Photocleavable Biocompatible Anchor for Membrane)⁽⁵⁾ を修飾した基板であり、分子内の疎水的なオレイル基が細胞膜と相互作用することで、疎水性相互作用により細胞を基板上に固定化することができるようになる。PBAM はコラーゲンコート基板表面のアミノ基に NHS 基を介して修飾される。ここにフォトマスクを介して UV ($\lambda = 365 \text{ nm}$) を照射し、光分解性リンカーを切断することで目的の領域の細胞固定化能を失わせ、目的の細胞接着表面のパターンを基板上に描画することで、一細胞アレイを作製することができる。一細胞アレイ上に固定することで、細胞内の一定の領域を安定的に観察できるようにすることが可能となり、細胞の回転や上下動に由来する解析データのノイズを低減し、精度が向上した (Fig. 2)。

3, GPCR 動態の解析

3-1, G2A の pH 依存的局在変化の解析

コラーゲンコートガラス基板上に PBAM を修飾し、 $14 \mu\text{m}$ の円を、 $25 \mu\text{m}$ 間隔の格子状に並べたフォトマスクのパターンを UV ($\lambda = 365 \text{ nm}$) 照射により転写し、SrtA-HA-G2A 発現 Ba/F3 を播種・洗浄することで一細胞アレイを作製した。pH を $6.6 \rightarrow 7.7 \rightarrow 6.6$ と変化させて G2A の pH 依存的な局在変化を、一細胞アレイ上で観察・画像解析した。その結果、平均的な G2A の特性として、G2A は細胞外が塩基性の条件下で細胞内部に移行し、細胞外の pH を 6.6 に戻すと、G2A は可逆的に膜表面に還流することがわかった。先行研究と同様の結果であった⁽⁶⁾。

なお、画像解析は、画像処理ライブラリとして、OpenCV (Ver3.1) を利用した C++ のソフトウェアを VisualStudio2013 で作製して行った (Fig. 3)。手動で各細胞画像を四角形の ROI で切り出し後、画像の加減算をベースとした図に示した処理フローに従い、細胞膜と細胞内部、各領域の相対平

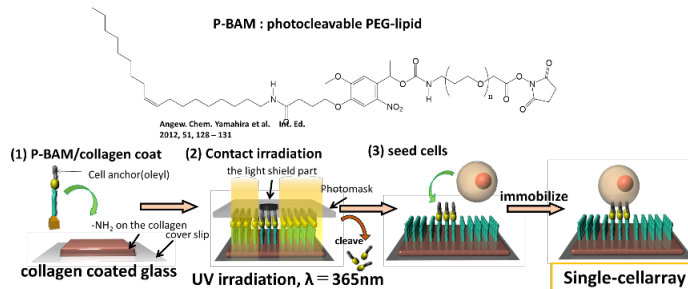


Fig. 2 PBAM による一細胞アレイ作製方法

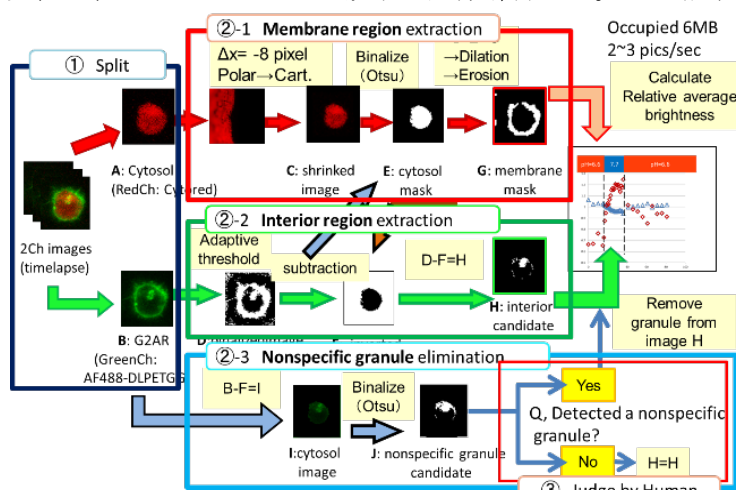


Fig. 3 細胞内 G2A の膜領域/細胞内相対平均輝度値の計算処理フロー

均の相対平

均輝度を計算した。考案した数理モデルにもとづいた GPCR 動態シミュレーションにより、G2A の細胞内移行速度定数と細胞膜への還流速度定数が pH 非依存的であることが分かった。

3-2, OGR1 の pH 依存的な局在変化の解析

まず、SrtA-HA-OGR1 Ba/F3 を BAM/コラーゲン基板に固定化した状態で、細胞外 pH を 6.6 → 7.7 → 6.6 と変化させたときの OGR1 の pH 依存的な局在変化を解析した。その結果、先行研究とは異なり、pH 6.6 → 7.7 で内部に移行することが観察された (Fig. 4)。しかし、pH 7.7 → 6.6 に戻したとき、細胞膜に還流する細胞としない細胞がおおよそ 1:1 の比で出現した。これは、OGR1 の内部移行は pH 依存的な特性によって駆動され、膜への還流に関わる内在性モータータンパク質の発現量が細胞によって異なっていた可能性が考えられる。あるいは、OGR1 は細胞内部の初期エンドソームに移行した後、膜への還流をせずに別経路である、後期エンドソームに輸送された後にリソソームへ輸送されて分解され、OGR1 が分解された後も蛍光標識に用いた AF488 は細胞内で分解されず、蛍光を発し続けていたため細胞内部に OGR1 がとどまり続けていたように観察された可能性がある。G2A 同様の GPCR 動態シミュレーションにより、細胞内移行速度定数と細胞膜への還流速度定数が pH 依存的であり、2 相性を示し、弱塩基性環境下では弱酸性条件下と比較して、ともに約 2 倍と大きくなることを示した。G2A ではプロトン感知に関わるヒスチジンペアが 1 個であるが、OGR1 では 2 個 (His-17:His-84 と His-20:His-269) ⁽⁷⁾ 存在することが 2 相性を示した原因だと推察された。

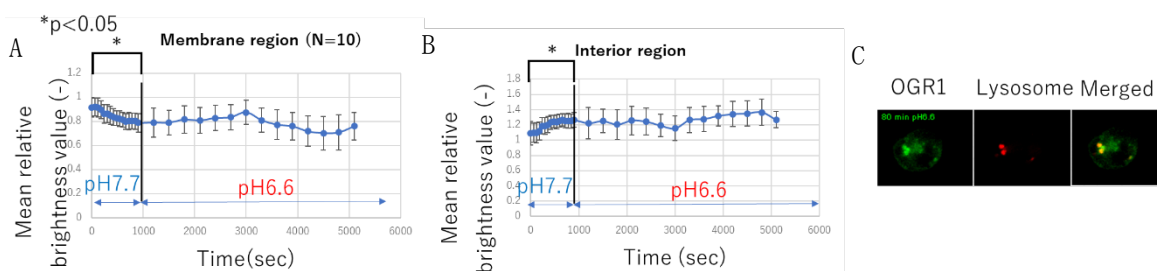


Fig. 4 OGR1 の pH 依存的な局在変化解析結果 (縦軸: 内部領域相対平均輝度、横軸: 時間 (秒))。A) 細胞膜へ OGR1 が還流した細胞集団、 B) 細胞膜へ OGR1 が還流しなかった細胞集団、 C) pH 7.7 で細胞内部に取り込まれた OGR1 (左: AF488 標識 OGR1、中央: Lysotracker Red、右: マージ画像)

3-3, LTB4 依存的な BLT1 の局在変化の解析

SrtA-HA-BLT1 を Ba/F3 細胞で発現させ、SrtA による蛍光標識後に LTB4 依存的な BLT1 の局在変化を解析しようとした。しかし、BLT1 の細胞外ドメインに存在する糖鎖修飾が高いため、ウェスタンブロットにより十分な発現量が確認されたにもかかわらず、免疫染色法や SrtA による蛍光標識を行っても十分なシグナル強度が得られなかった。そこで、糖鎖修飾を欠損させた BLT1 の変異体、SrtA-HA-BLT1/MT を Ba/F3 に発現させたところ、蛍光シグナルを 10 倍以上向上させることに成功した。SrtA-HA-BLT1/MT 発現 Ba/F3 に対して、OGR1 同様に SrtA を用いて BLT1/MT の蛍光標識を行った後、10 nM LTB4 で刺激した結果、刺激後 20 分経過時点でも細胞内部に移行した BLT1/MT の量は、相対平均輝度換算で 5% であり、大部分が細胞膜表面に留まっていたことが確認された (Fig. 5)。GPCR 動態シミュレーションからも、細胞膜への還流速度定数は G2A と OGR1 の 5 倍以上と大きいことが示された。こ

の結果から、BLT1はLTB4感受性を維持するため、LTB4を結合したBLT1は細胞内部に移行してLTB4が解離した後に、BLT1が速やかに細胞膜表面に還流させて、細胞遊走のために必要なシグナルを出し続けていることが示唆された。また、BLT1を発現したBa/F3は細胞のサイズが大きくなっていった。

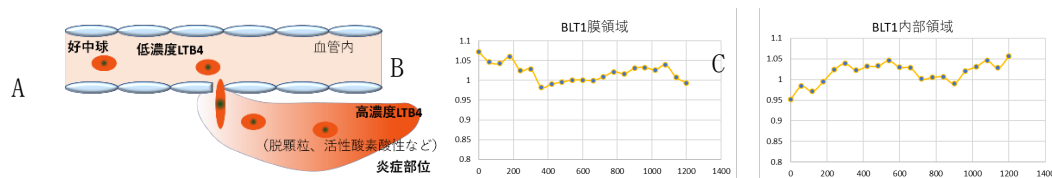


Fig. 5 A) BLT1を多く発現した好中球のLTB4濃度勾配に対する走化性。BLT1/MT刺激時の局在変化の様子 B)縦軸：膜領域相対平均輝度、横軸：時間(秒)、C)縦軸：内部領域相対平均輝度、横軸：時間(秒)(N=1)

3-4, LTB4 依存的な BLT1 の局在変化解析

BLT1 発現 Ba/F3 細胞を基板上に固定し、リガンド濃度勾配依存的な細胞の形状変化と AF488 標識 BLT1 の細胞膜上での局在変化を基に受容体の活性レベルを評価する系の構築を試みた。20~0 nM の LTB4 線形濃度勾配を形成したマイクロチップ上で AF488 標識 BLT1 発現 Ba/F3 を観察した結果、ごく一部の細胞でのみ、濃度勾配依存的な指向性をもった形状変化と BLT1 の仮足への局在を観察した。接着により、細胞の形状変化・仮足の伸展が抑制されたことが示唆された。今後、接着による細胞の形状変化抑制を低減するために、接着面積を縮小した一細胞アレイスポットへの固定および基板のコートに利用する PBAM の細胞固定化力の向上が必要となることが分かった。

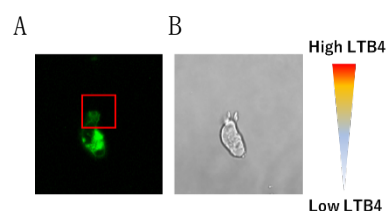


Fig. 6 A) AF488 標識 BLT1 B)BLT1 Ba/F3 DIC 画像 赤枠内：仮足上の BLT1

4, 結言

本研究によって、光分解性 PEG 脂質である PBAM と光リソグラフィー技術を用いて作製した一細胞アレイを用いて、非接着性の細胞上で発現・蛍光標識した GPCR の刺激依存的局在変化を解析する手法を確立した。確立した一細胞アレイ作製技術と解析手法を基に、プロトン応答性 GPCR である G2A と OGR1 の pH 依存的な局在変化の特性と LTB4 依存的な BLT1 の局在変化を解析した。BLT1 Ba/F3 に関しては濃度勾配依存的な形状変化を観察した。今後、GPCR の活性制御に対する小分子化合物の評価を、その局在変化や細胞の形態変化をもとに評価する手法の確立を目指す。本系は、新規の化合物評価系や創薬プラットフォームを開発する新たな基盤となるのではないかと期待している。

・参考文献

- 1) Martins SA, Trabuco JR, Monteiro GA, Chu V, Conde JP, Prazeres DM., Towards the miniaturization of GPCR-based live-cell screening assays, Trends in Biotechnology November 2012, Vol. 30, No. 11, 566-574, (2012)
- 2) Magalhaes AC, Dunn H, Ferguson SS., Regulation of GPCR activity, trafficking and localization by GPCR-interacting proteins. , British Journal of Pharmacology, 165, 1717-1736, (2012)
- 3) Justus CR, Yang LV., GPR4 decreases B16F10 melanoma cell spreading and regulates focal adhesion dynamics through the G13/Rho signaling pathway, Experimental Cell Research. 334, 100-113 (2015)
- 4) Katsuno H, Toriyama M, Hosokawa Y, Mizuno K, Ikeda K, Sakumura Y, Inagaki N., Actin Migration Driven by Directional Assembly and Disassembly of Membrane-Anchored Actin Filaments, Cell Reports 12, 648-660 (2015)
- 5) Yamahira S, Yamaguchi S, Kawahara M, Nagamune T., Collagen surfaces modified with photo-cleavable polyethylene glycol-lipid support versatile single-cell arrays of both non-adherent and adherent cells, Macromol. Biosci., 14, 1670-1676. (2014)
- 6) Lan W, Yamaguchi S, Yamamoto T, Yamahira S, Tan M, Murakami N, Zhang J, Nakamura M, Nagamune T. , Visualization of the pH-dependent dynamic distribution of G2A in living cells, The FASEB Journal article. 28, 3965-3974 (2014)
- 7) Ludwig MG *et al.* Proton-sensing G-protein-coupled receptors., Nature, 425, 93-98(2003)

【発表状況】

・発表論文

- 1) Modong Tan, Satoshi Yamaguchi, Shinya Yamahira, Motonao Nakamura and Teruyuki Nagamune, Quantitative image cytometry for analyzing intracellular trafficking of G protein-coupled receptors on a chemically trapping single cell array, Lab Chip, 17, 1933-1938, (2017)
- 2) Modong Tan, Satoshi Yamaguchi, Motonao Nakamura and Teruyuki Nagamune, Real-time monitoring of pH-dependent intracellular trafficking of ovarian cancer G protein-coupled receptor 1 in living leukocytes, J Biosci Bioeng, submitted

・学会発表など

- 1) 談 莫東・山口 哲志・蘭 婉君・山平 真也・中村 元直・長棟 輝行、「N 末端特異的蛍光ラベリングによる pH 応答性 GPCR の細胞内動態解析」、『日本化学会第 94 回春季年会』、名古屋、2014 年 3 月（口頭発表、査読なし）
- 2) 談 莫東・山口 哲志・蘭 婉君・山平 真也・山本 晃康・中村 元直・長棟 輝行、「GPCR 動態解析のためのイメージサイトメトリー技術の開発」、『細胞アッセイ研究会シンポジウム』、2015 年 1 月（ポスター発表、査読なし）
- 3) 談 莫東・山口 哲志・山平 真也・中村 元直・長棟 輝行、「一細胞アレイを用いた pH 応答性 GPCR の細胞内動態解析」、『第 67 回日本生物工学会大会』、2015 年 10 月 26 日（ポスター発表、査読なし）
- 4) Tan, Modong; Yamahira, Shinya; Yamaguchi, Satoshi; Nakamura, Motonao; Nagamune, Teruyuki 「Development of the image cytometry method to analyze G-protein coupled receptor kinetics in the cell」、『Pacifichem 2015』、Honolulu, Hawaii, USA, 2015 年 12 月 18 日（ポスター発表、査読なし）Bio/chemical Approaches for Single Cell Biosensing Technologies セッション内で開催された Poster Competition において、Student Poster Award を受賞
- 5) 平成 28 年 第 3 回 IT 創薬コンテスト 学生奨励賞受賞