

博士論文

論文題目

TGF $\alpha$  切断を用いた G タンパク質共役型受容体の  
活性化検出系の開発とその応用

氏名

井上 飛鳥

# 目次

略語、略記号一覧	.....	p. 2
第一章	序論	..... p. 4
	図表	..... p. 8
第二章	実験材料と実験手法	..... p. 21
	第一節	TGF $\alpha$ 切断アッセイの原理 ..... p. 21
	第二節	TGF $\alpha$ 切断アッセイの実験材料 ..... p. 21
	第三節	TGF $\alpha$ 切断アッセイの実験手法 ..... p. 25
	第四節	その他の実験材料・実験手法 ..... p. 30
	第五節	容量反応曲線とパラメーターの理論的背景 ..... p. 37
	図表	..... p. 41
第三章	TGF $\alpha$ 切断アッセイの検証	..... p. 52
	第一節	検出可能な G タンパク質シグナル ..... p. 52
	第二節	G $\alpha$ サブユニット共発現による拡張 ..... p. 53
	第三節	アッセイ系の最適化 ..... p. 55
	第四節	アッセイ系の検証 (堅牢性・再現性) ..... p. 58
	第五節	検出可能な GPCR の検証 ..... p. 59
	図表	..... p. 61
第四章	TGF $\alpha$ 切断アッセイの応用	..... p. 96
	第一節	アンタゴニスト評価 ..... p. 96
	第二節	インバースアゴニスト評価 ..... p. 97
	第三節	オーファン GPCR のリガンド同定 ..... p. 98
	第四節	共役する G $\alpha$ サブユニットの解析 ..... p. 98
	第五節	Biased ligand 評価 ..... p. 99
	図表	..... p. 100
第五章	考察および今後の展望	..... p. 113
	図表	..... p. 122
文献	.....	p. 130

## 略語、略記号一覧

7TM	Seven transmembrane protein
ACh	Acetylcholine
ADAM	A disintegrin and metalloproteinase
AREG	Amphiregulin (a member of the EGF family)
Complete DMEM	DMEM supplemented with 10% FCS, penicillin, streptomycin and glutamine
CRE	cAMP-response element
D2R	Dopamine D2 receptor (encoded by the <i>DRD2</i> gene)
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EGF	Epidermal growth factor
EGFR	Epidermal growth factor receptor
ER	Endoplasmic Reticulum
FCS	Fetal calf serum
EGFP	Enhanced green fluorescent protein
FRET	Förster resonance energy transfer or Fluorescence resonance energy transfer
G $\alpha$	Galpha subunit of heterotrimeric G protein
G $\beta\gamma$	Gbeta and Ggamma subunit of heterotrimeric G protein
G protein	GTPase
GLIDA	GPCR-Ligand Database (Database)
GPCR	G protein-coupled receptor
GRAC	Guide to Receptors and Channels (Database)
FLAG	FLAG® epitope tag (sequence: DYKDDDDK)
H1R	Histamine H1 receptor (encoded by the <i>HRH1</i> gene)
HB-EGF	Heparin-binding EGF-like growth factor
HBSS	Hank's balanced salt solution
ICL	Intracellular loop of GPCRs
IRES	Internal ribosome entry site
IUPHAR	International Union of Basic and Clinical Pharmacology (Database)
LFA	LipofectAMINE®
LPA	Lysophosphatidic acid

LysoPS	Lysosphosphatidylserine
MCS	Multi-cloning site
NCBI	National Center for Biotechnology Information (Database)
NE	Norepinephrine
OD	Optical density
ORF	Open reading frame
P2Y5	Purinergic receptor type 5 (its ligand is lysophosphatidic acid) also known as LPA <sub>6</sub>
PA-PLA <sub>1α</sub>	Phosphatidic acid-preferring phospholipase A <sub>1</sub> -alpha (encoded by the <i>LIPH</i> gene)
PBS	Dulbecco's phosphate buffered saline
PLC	Phospholipase C
PKC	Protein kinase C
<i>p</i> -NP	Para-nitrophenol
<i>p</i> -NPP	Para-nitrophenylphosphate
PSG	Penicillin, streptomycin and L-glutamine
PTX	Pertussis toxin
RAi	Intrinsic relative activity
RGS	Regulator of G protein signaling
ROCK	Rho-associated kinase (also known as Rho-associated, coiled-coil-containing protein kinase)
S1P	Sphingosine-1-phosphate
S/B	Signal-to-background ratio
SRE	Serum-response element
TACE	Tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (also known as ADAM17)
T/E	Trypsin/EDTA (for cell detachment)
TGF $\alpha$	Transforming growth factor-alpha
TM	Transmembrane domain
TNF $\alpha$	Tumor necrosis factor-alpha
TPA	12- <i>O</i> -tetradecanoylphorbol-13-acetate (also known as phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA))
WB	Western blot
$\beta$ 2 AR	Beta-2 adrenergic receptor (encoded by the <i>ADRB2</i> gene)

# 第一章 序論

細胞が生存し、その機能を維持するには、外界の情報を適切に受け取り、細胞内に伝える必要がある。細胞外の情報は多様であり、例えば、サイズ（プロトン、タンパク質）や物性（水溶性、脂溶性）だけでも大きく異なる。これら多くの細胞外の情報伝達分子・イオンは脂質二重膜からなる細胞膜を通過できないため、細胞は膜上の受容体を配置させることでその存在量を検知する。これら膜型受容体の主要なグループとして G タンパク質共役型受容体 (G protein-coupled receptor, GPCR)、イオンチャネル型受容体、チロシンキナーゼ型受容体が存在する。この中で GPCR は最も多くのメンバーが存在し、多様な分子群を認識でき、生体内のほとんどの生理現象に関与する。GPCR は創薬の標的としても重要であり、これまでに開発されてきた医薬品の約 30% が GPCR に作用することが知られる。

GPCR の役割は、細胞外の結合分子 (Ligand, リガンド) の濃度変化を細胞内のシグナル伝達タンパク質の構造変化へと情報を変換することである。古典的な Ternary complex model (三者複合モデル) と呼ばれる機構では、GPCR の細胞内外側にそれぞれ G タンパク質とリガンドが結合する。この G タンパク質とリガンドの結合はアロステリック効果によりお互いの親和性を増大させるとともに、活性化型の G タンパク質へと構造変化を誘導する。

GPCR は 7 個の膜貫通  $\alpha$  ヘリックスを有するという構造的な特徴から、7 回膜貫通型受容体 (Seven transmembrane receptor, 7TM receptor) とも呼ばれる。ヒトゲノムの解読の結果、7TM の特徴を持つ遺伝子は約 900 種類存在することが判明している (Fig. 1-1)。GPCR はその配列と機能から、6 種類のファミリー (Class A, B, C, D E, F)<sup>1</sup> もしくは 5 種類のファミリー (Glutamate, Rhodopsin, Adhesion, Frizzled and Secretin; GRAFS classification system)<sup>2</sup> に分類される (Class A が Rhodopsin ファミリーと同一である)。このうち、Class A (Rhodopsin) ファミリーが古典的な GPCR であり、短い細胞外 N 末端配列を有し、種々の分子群を認識する。データベース (International Union of Basic and Clinical Pharmacology (IUPHAR) Database (<http://www.iuphar-db.org/>); GPCR-Ligand Database (GLIDA) (<http://pharminfo.pharm.kyoto-u.ac.jp/services/glida/index.php>)) によると、277 種類の GPCR がロドプシン型ファミリーに属する。ロドプシン型ファミリーは、さらに  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  の 4 種類に分類されることもある。

多くの場合、リガンドは膜貫通  $\alpha$  ヘリックスで形成される受容体の内側のリガンドポケットで認識される (詳細は、結晶構造を基盤とした最近の総説<sup>3,4</sup>を参照)。リガンドポケットの大きさや構成するアミノ酸残基が GPCR ごとに多様であることが、様々なリガンドを特異的に認識できる構造的な基盤となっている。

GPCR がシグナルを伝達する G タンパク質は三量体 G タンパク質 (Heterotrimeric G protein) である。三量体 G タンパク質は  $G\alpha$ ,  $G\beta$ ,  $G\gamma$  の 3 つのサブユニットから構成され、 $G\alpha$  サブユニットが GTPase 活性を有する (Fig. 1-2, 1-3)。 $G\alpha$  サブユニットは GDP 結合型の非活性型と GTP 結合型の活性型をとり、シグナル伝達のオンオフを担う。一方、 $G\beta$  サブユニットと  $G\gamma$  サブユニットは非乖離型の複合体 ( $G\beta\gamma$  サブユニット) を形成し、 $G\alpha$  サブユニットと結合した状態では非活性型、乖離した状態で活性化型となる。リガ

ンド結合により活性化型へと構造変化した GPCR は三量体 G タンパク質の構造変化を誘導し、G $\alpha$  サブユニットの GDP 遊離と GTP 結合を促進する。GTP 結合型 G $\alpha$  サブユニットは G $\beta\gamma$  サブユニットから乖離し、それぞれが独自にエフェクター分子を介してシグナル伝達を担う。GTP を結合した活性化 G $\alpha$  サブユニットは自身の持つ GTPase 活性により GDP へと分解し、G $\beta\gamma$  サブユニットと三量体を形成する。

三量体 G タンパク質は下流シグナルの特異性から、4 種類のサブファミリー (G $_s$ , G $_i$ , G $_{q/11}$ , G $_{12/13}$ ) に分類される (Fig. 1-4)。例えば、G $_s$  は Adenylate cyclase の活性化を介した cAMP 産生、G $_i$  は Adenylate cyclase の阻害による cAMP 産生抑制、G $_{q/11}$  は Phospholipase C- $\beta$  を介したイノシトール 3 リン酸 (IP $_3$ ) 産生とその下流の細胞内 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いる。上記のサブファミリーは、含まれる G $\alpha$  サブユニットの違いで説明される。すなわち、G $_s$ , G $_i$ , G $_{q/11}$ , G $_{12/13}$  の三量体 G タンパク質には、それぞれ G $\alpha_s$ , G $\alpha_i$ , G $\alpha_{q/11}$ , G $\alpha_{12/13}$  に分類される G $\alpha$  サブユニットが含まれる。G $\alpha$  サブファミリーに含まれるメンバー (遺伝子) の数は、G $\alpha_s$ , G $\alpha_i$ , G $\alpha_{q/11}$ , G $\alpha_{12/13}$  がそれぞれ 2, 8, 4, 2 種類である (Fig. 1-5, 1-6)。なお、スプライシングバリエントが存在する G $\alpha$  サブユニットも存在する (例えばヒト G $\alpha_s$  は 7 種類のスプライシングバリエントが知られている)。G $\alpha$  サブユニットは GPCR と直接結合し、エフェクタータンパク質の活性化を誘導することから、三量体 G タンパク質の中で最も重要なサブユニットであると言える。

GPCR の活性化を評価する古典的手法の一つは、摘出臓器の反応を薬理的に評価することである。この場合、臓器に内在性に発現する GPCR が対象となる。例えば、小腸のムスカリン性アセチルコリン受容体を介した収縮反応、アドレナリン  $\alpha$  受容体を介した血管平滑筋収縮反応とアドレナリン  $\beta$  受容体を介した心機能亢進作用、成長ホルモン分泌促進因子受容体 (GHSR) を介した下垂体からの増殖ホルモン (GS) の分泌がその例である。このような反応を薬理的に評価する場合、目的の GPCR 以外に作用する可能性 (下流のシグナル経路、異なるシグナル経路) を考慮する必要がある。

遺伝子クローニング技術の発展以降、クローニングした GPCR を強制発現させた培養細胞を用いて GPCR の活性化を評価することが一般的である。通常、GPCR の活性化 (リガンドのアゴニスト活性) は、GPCR の活性化で引き起こされる三量体 G タンパク質依存的な現象 (下流タンパク質の活性化や細胞内シグナルイベント) を検出することで評価される。このとき、引き起こされるシグナルは三量体 G タンパク質によって異なるため、検出系を使い分ける必要がある。

GPCR の活性化により三量体 G タンパク質を介して引き起こされるイベントとして、G $\alpha$  サブユニットへの標識 GTP アナログ ( $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ 、ユーロピウムイオン (Eu $^{3+}$ ) 結合 GTP $\gamma\text{S}$ ) の取込み、cAMP 増減、イノシトール 3 リン酸 (IP $_3$ ) 増加、細胞内カルシウムイオン (Ca $^{2+}$ ) 流入、低分子 G タンパク質 (Rho, Rac) の GTP 結合型の検出、転写因子活性化によるレポーター遺伝子発現、アクチンストレスファイバー形成等が存在する (Fig. 1-4)。GPCR へのリガンドの結合は、標識リガンド (放射性同位体、ビオチン標識等) を用いて測定することも可能である。最近、異なる原理に基づいた手法も開発されている。例えば、 $\beta$  アレスチンと GPCR の会合や細胞接着面のインピーダンス変化がその例である。これら検出系の利点と欠点を Table 1-1 にまとめた。

既存の GPCR 活性化検出法は問題点が多数存在する。例えば、1 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<sub>12/13</sub> シグナルを高精度・高感度に測定する手法が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、定量性が乏しい）、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）が必要であることである。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。多数のオーファン GPCR からリガンドを同定することを試みる場合、望ましいアッセイ系の性質として、(1) 一過性発現に対応（多数の GPCR 安定発現細胞株を維持するのは煩雑）、(2) 多数のシグナルを検出できる（一般にオーファン GPCR はどの三量体 G タンパク質と共役するか不明）、(3) スループット性が高い、(4) 同一のアッセイフォーマットで検出可能であることが挙げられる。また、測定精度が高いことやランニングコストが安いことがあれば、より望ましい。

上皮成長因子受容体（Epidermal growth factor receptor, EGFR）は 1 型膜タンパク質（N 末端側が細胞外の配向）のチロシンキナーゼ型受容体である。EGFR は細胞外領域へのリガンドの結合により二量体を形成し（細胞外領域と膜貫通領域の両者が二量体化を促進すること、二量体化により細胞内キナーゼドメイン形成が誘導されることが知られる）、細胞内のチロシンキナーゼドメインを介して C 末端 Tail の複数のチロシン残基がリン酸化を受ける。このリン酸化 EGFR はアダプタータンパク質を介してシグナル伝達を引き起こす。EGFR のリガンドには、EGF の他に Transforming growth factor- $\alpha$  (TGF $\alpha$ )、Heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF)、Amphiregulin (AREG) が知られ、いずれも EGF ファミリーに属する。いずれの EGFR リガンドも単量体であり、受容体と 1:1 のモル比で結合する (Fig. 1-9 参照)。

EGFR と GPCR は構造的に全く異なる膜型受容体であるが、互いにシグナルを制御し合うことが知られる。特に、GPCR により EGFR が活性化される現象を EGFR トランス活性化 (Transactivation) と呼ぶ<sup>5</sup>。EGFR transactivation のメカニズムとして、EGFR リガンドのエクトドメイン切断を介する経路が存在することが示されている<sup>6</sup>。この EGFR transactivation は培養細胞で最初に見出されたシグナル経路である。個体レベルにおける EGFR transactivation については、外来的に GPCR アゴニストを過剰量投与した際の現象は複数報告があるが、内在的に産生される GPCR リガンドによる役割はほとんど明らかになっていない (Table 1-2)。後者の数少ない例として、アンジオテンシン II 受容体が EGFR transactivation を介して腎不全悪化に寄与すること<sup>7</sup>と後述するリゾホスファチジン酸 (LPA) 受容体が EGFR transactivation を介して毛髪形成を促進すること<sup>8</sup>が挙げられる。

EGF ファミリーのタンパク質は膜型前駆体（1 型膜タンパク質）として合成される<sup>9,10</sup>。この膜型前駆体は、主に形質膜 (Plasma membrane) 上でプロテアーゼにより細胞外部位の切断（エクトドメイン切断）を受け、成熟型として細胞外へ遊離される。遊離の増殖因子は EGFR と結合し、活性化を引き起こす。EGF ファミリーのエクトドメイン切断の重要性は、エクトドメイン切断を受けない変異型 HB-EGF Knockin マウスが重篤な異常を示すことからわかる<sup>11</sup>。

EGF ファミリーのエクトドメイン切断に関与するプロテアーゼとして、A disintegrin and metalloproteinase (ADAM) ファミリーが知られている。ヒトに存在する 21 種類の ADAM ファミリーメ

ンバーの中で、主として ADAM10, ADAM12, ADAM17 (別名 Tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )-converting enzyme, TACE) が EGF ファミリーを基質とする<sup>12,13</sup>。ADAM ファミリーは基質特異性が低く、EGF ファミリー以外にも様々な膜タンパク質を切断することが知られる<sup>12,13</sup>。ADAM ファミリーが無秩序に膜タンパク質を切断することは生体にとって危険なため、実際には ADAM の酵素活性や基質選択性は厳密に制御されているものと想定されている。しかし、その分子機構はほとんど明らかになっていない。

筆者は、リゾホスファチジン酸 (LPA) の産生および受容体 (Fig. 1-7) を研究する過程で、LPA と TGF $\alpha$  のエクストドメイン切断に密接な関連があることを見出してきた<sup>8</sup>。筆者は、大学院修士課程においてリゾホスファチジン酸産生酵素の候補であったホスファチジン酸選択的ホスホリパーゼ A $_{1\alpha}$ <sup>14</sup> の遺伝子ノックアウト (KO) マウスを作製し、このマウスが縮毛の体毛形成異常を示すことに気づき、博士課程においてそのメカニズムを解析してきた。その過程で、PA-PLA $_{1\alpha}$  KO マウスの体毛形成異常の表現型 (最初の毛周期での顕著な縮毛、正常な上皮構造) が、TACE, TGF $\alpha$ , EGFR の欠損マウスや突然変異マウス (それぞれ *woe*, *wa-1*, *wa-2* として知られるマウス系統) の表現型<sup>15-21</sup> と類似することに気付いた (Fig. 1-8)。これら 3 種類のタンパク質の関係は、上述したように TACE が TGF $\alpha$  のエクストドメイン切断 (すなわち成熟型へのプロセッシング) を担う膜型切断酵素、TGF $\alpha$  は EGFR のリガンドである。種々の解析から、毛包の上皮組織で PA-PLA $_{1\alpha}$  が LPA 産生し、LPA 受容体の 1 つである LPA $_6$  を介して TACE-TGF $\alpha$ -EGFR 経路を活性化して、毛包の形成を担うことを見出した (Fig. 1-9)。また、PA-PLA $_{1\alpha}$ -LPA-LPA $_6$  経路や TACE-TGF $\alpha$ -EGFR 経路に関与する遺伝子の先天性欠損患者が存在し、これら患者では全身性に毛髪の縮毛や脱落が見られることが報告されている<sup>22-26</sup> (Fig. 1-10)。従って、PA-PLA $_{1\alpha}$ -LPA-LPA $_6$  経路と TACE-TGF $\alpha$ -EGFR 経路はマウスとヒトで進化的に保存された体毛・毛髪形成の重要なシグナル経路であることがわかる。

筆者は LPA による体毛形成を研究する過程で、TGF $\alpha$  エクストドメイン切断を培養細胞で再構成することに至った (Fig. 1-11)。HEK293 細胞にアルカリホスファターゼ融合 TGF $\alpha$  (AP-TGF $\alpha$ ) と LPA $_6$  を共発現させ LPA で刺激すると、細胞膜に発現した AP-TGF $\alpha$  のエクストドメイン切断が誘導されることがわかった。興味深いことに、LPA $_6$  受容体は既存の GPCR 活性化検出系では LPA による活性化はほとんど検出されないが、AP-TGF $\alpha$  のエクストドメイン切断を指標とすることで LPA への応答性を初めて検出することができた。筆者は AP-TGF $\alpha$  のエクストドメイン切断はなぜ LPA $_6$  受容体の活性化を感度良く捉えられるのかに興味を持つとともに、AP-TGF $\alpha$  のエクストドメイン切断が他の GPCR の活性化の検出に応用できるのではないかと想定した。

筆者は本研究において、AP-TGF $\alpha$  切断を利用した GPCR の活性化評価系を構築し、TGF $\alpha$  切断アッセイと名付けた。TGF $\alpha$  切断のシグナル機構を解析することで、検出可能な GPCR を拡張するとともに、GPCR の共役する G タンパク質の機能解析にも応用可能であることがわかった。TGF $\alpha$  切断アッセイは、既存の GPCR 評価系の問題点を解決できる非常に有用な手法であることもわかった。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位置づけられることが期待される。



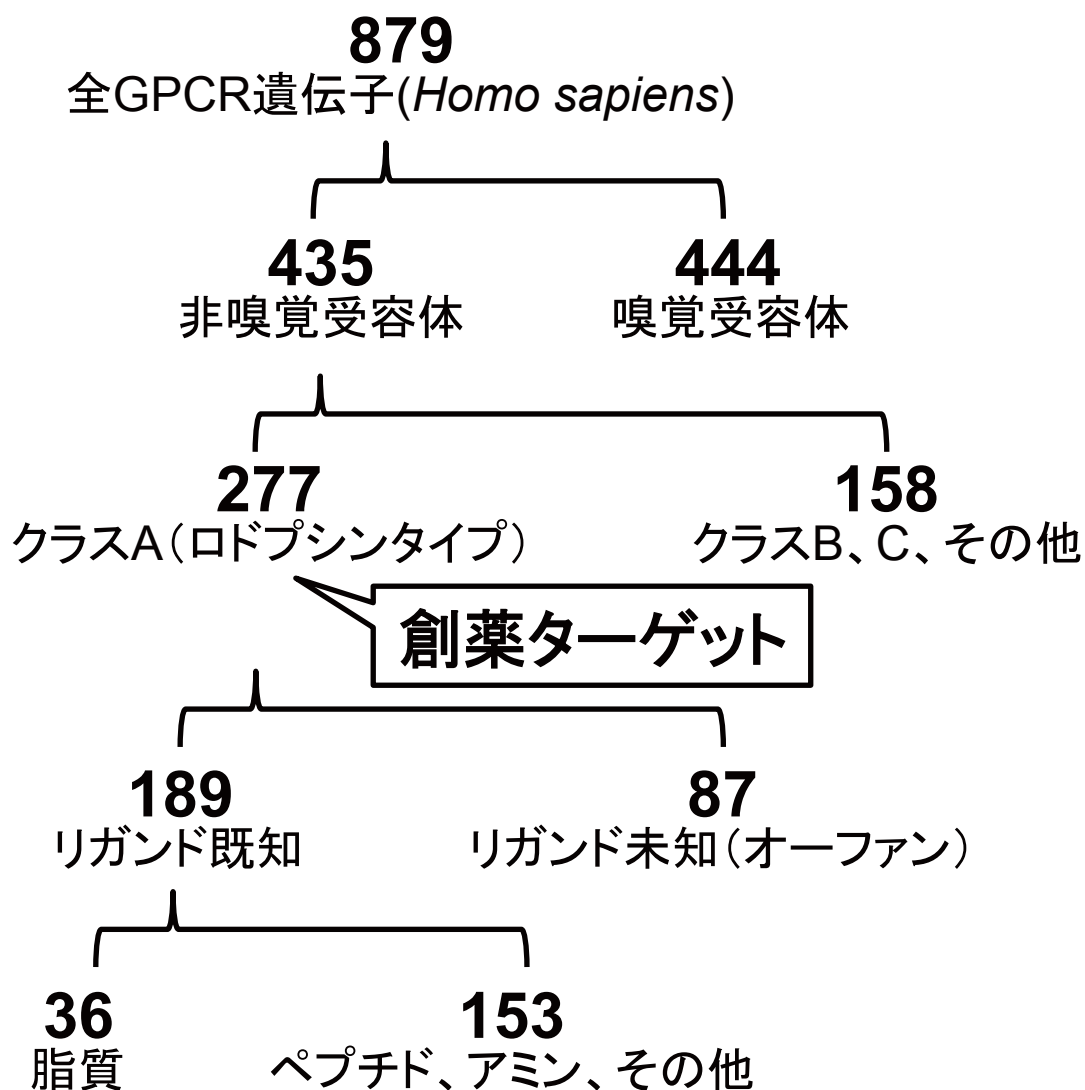


Fig.1-1 ヒトゲノム中の GPCR 遺伝子数とその分類

(International Union of Basic and Clinical Pharmacology (IUPHAR) Database

(<http://www.iuphar-db.org/>); GPCR-Ligand Database (GLIDA)

(<http://pharminfo.pharm.kyoto-u.ac.jp/services/glida/index.php>) を参考に改変。ロドプシン型ファミリーは既存の多くの薬剤の標的タンパク質である。

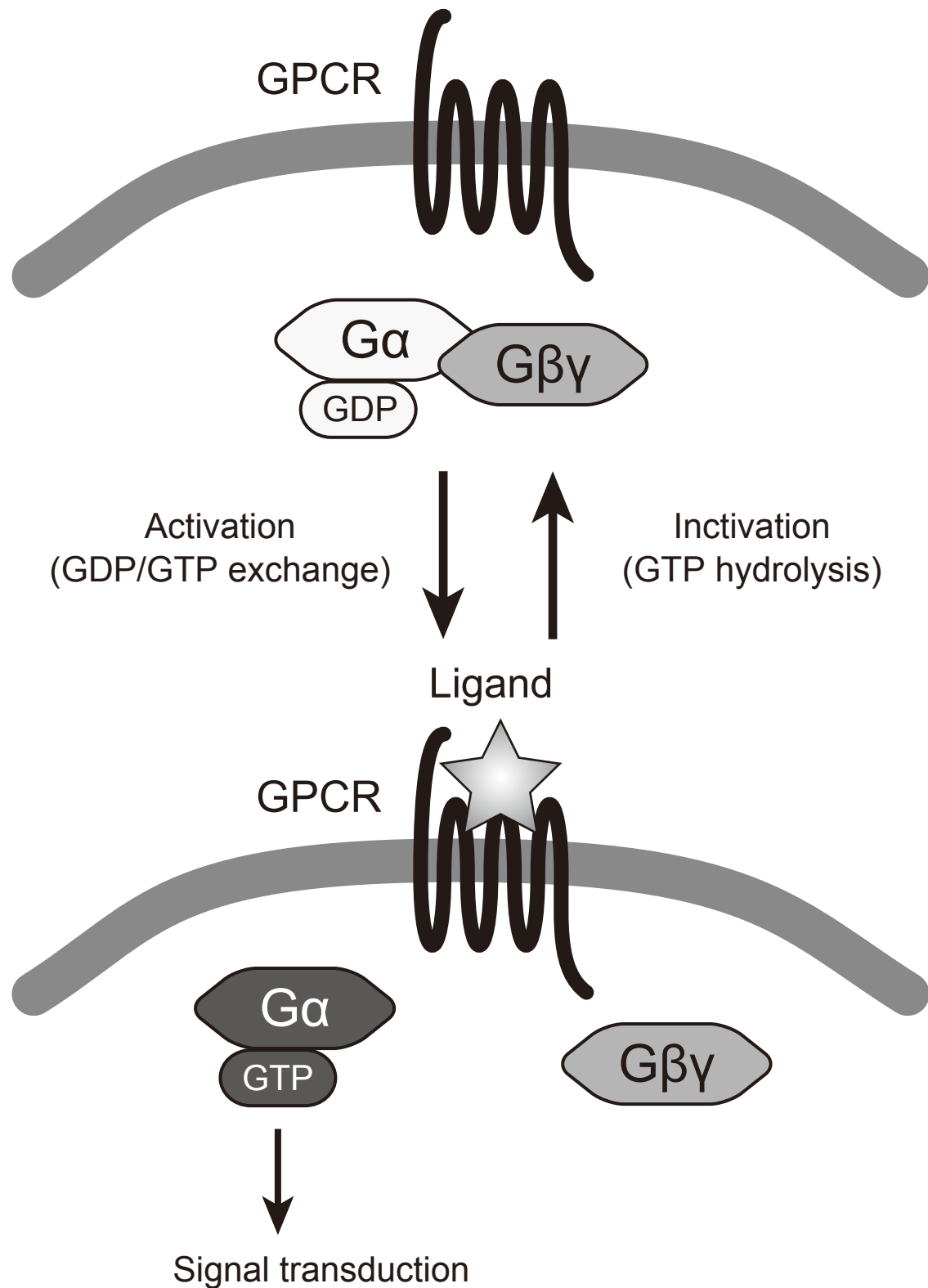


Fig. 1-2 GPCRと三量体Gタンパク質

GPCRはリガンドとの結合により構造変化を起こすと、三量体Gタンパク質の $G\alpha$ サブユニットをGDP結合型（不活性型）からGTP結合型（活性型）へと誘導する。GTP結合型 $G\alpha$ サブユニットは $G\beta\gamma$ サブユニットから乖離し、下流のエフェクタータンパク質を介したシグナル伝達を誘導する。 $G\alpha$ サブユニットは自身の持つGTPase活性によりGTPをGDPに分解してGDP結合型となり、 $G\beta\gamma$ サブユニットと結合する。

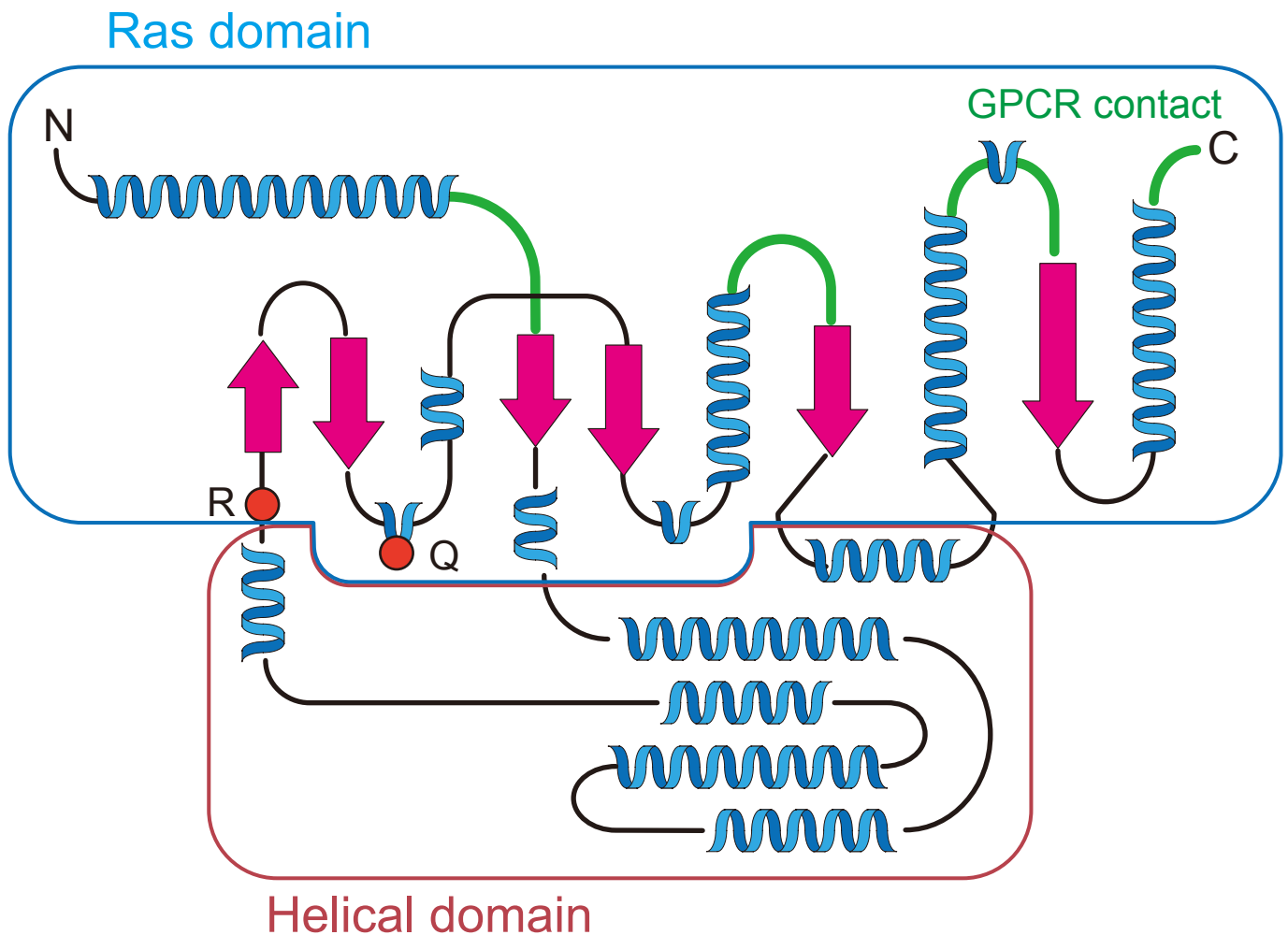


Fig. 1-3 Gαサブユニットのトポロジー

α-helix を青らせんで、β-sheet を赤矢印で示した。Gαサブユニットは Ras domain (青字) と Helical domain (赤字) から構成され、Helical domain が Ras domain の途中に挿入される構造を取る。緑線は GPCR と相互作用する部位を示す。R と Q (赤丸) は GTPase 活性に必須のアミノ酸残基を示す。アミノ酸配列との比較は Fig. 1-6 を参照。文献<sup>27</sup>の図を改変。

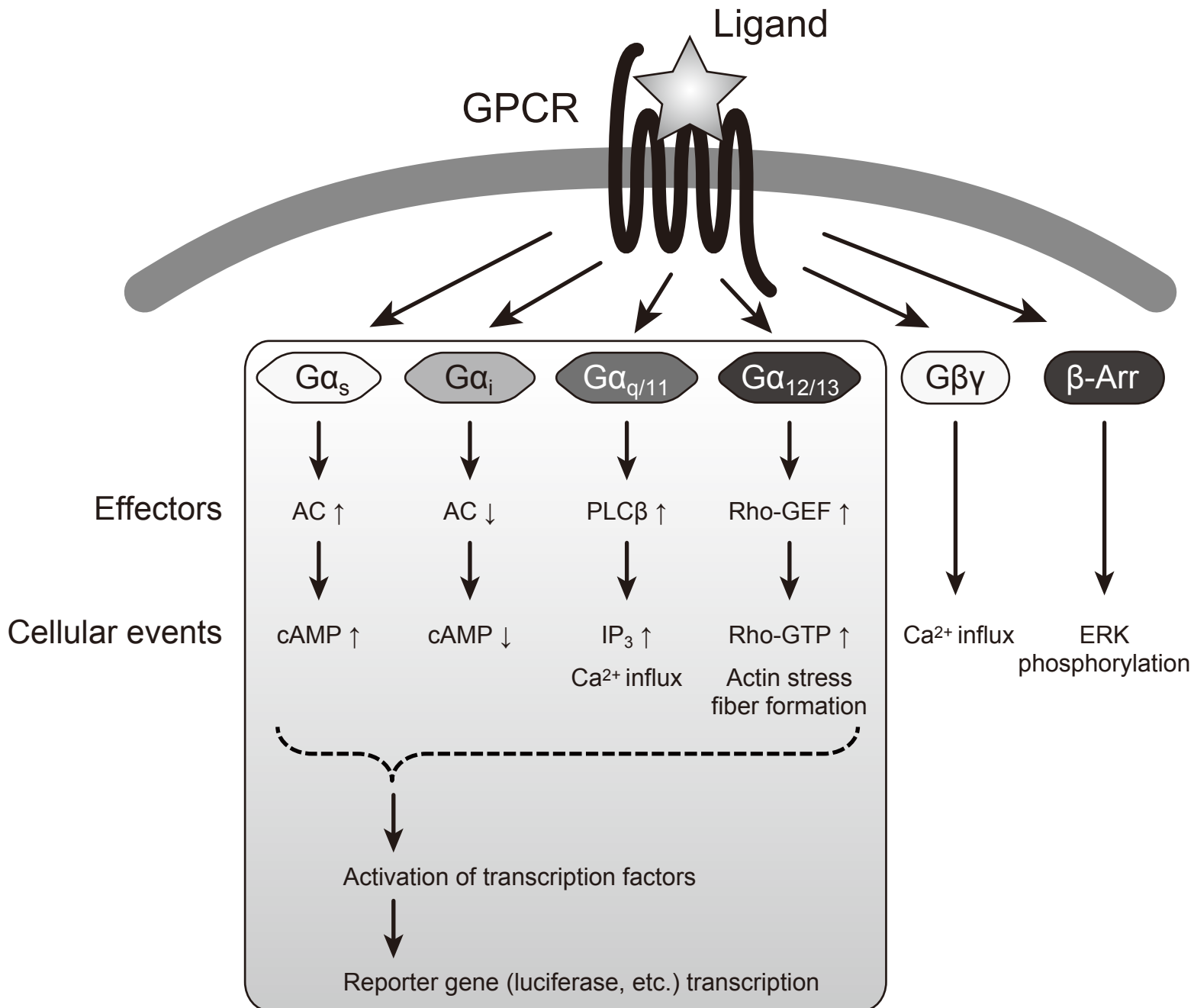


Fig.1-4 GPCR の主要なシグナル

GPCR はリガンドとの結合し活性化型に構造変化を起こすと、各種シグナルを伝達する。主要なシグナル伝達因子である  $G\alpha$  サブユニットは、関与するエフェクターの種類により 4 種類 ( $G\alpha_s$ ,  $G\alpha_i$ ,  $G\alpha_{q/11}$ ,  $G\alpha_{12/13}$ ) に分類される。  $G\beta\gamma$  サブユニットや  $\beta$ -Arrestin ( $\beta$ -Arr) を介したシグナルも誘導する。通常、細胞内シグナルイベントを検出することで、GPCR の活性化が評価される。GPCR は一部の  $G\alpha$  サブユニットとしか共役しないため、広範囲の GPCR の活性化を評価するには多数の細胞内シグナルイベント検出系を用意する必要がある。AC, Adenylate cyclase;  $PLC\beta$ , Phospholipase C-beta;  $IP_3$ , Inositol 1,4,5-triphosphate; Rho-GEF, Rho-Guanine nucleotide exchange factor; Rho-GTP, GTP-bound form of Rho.

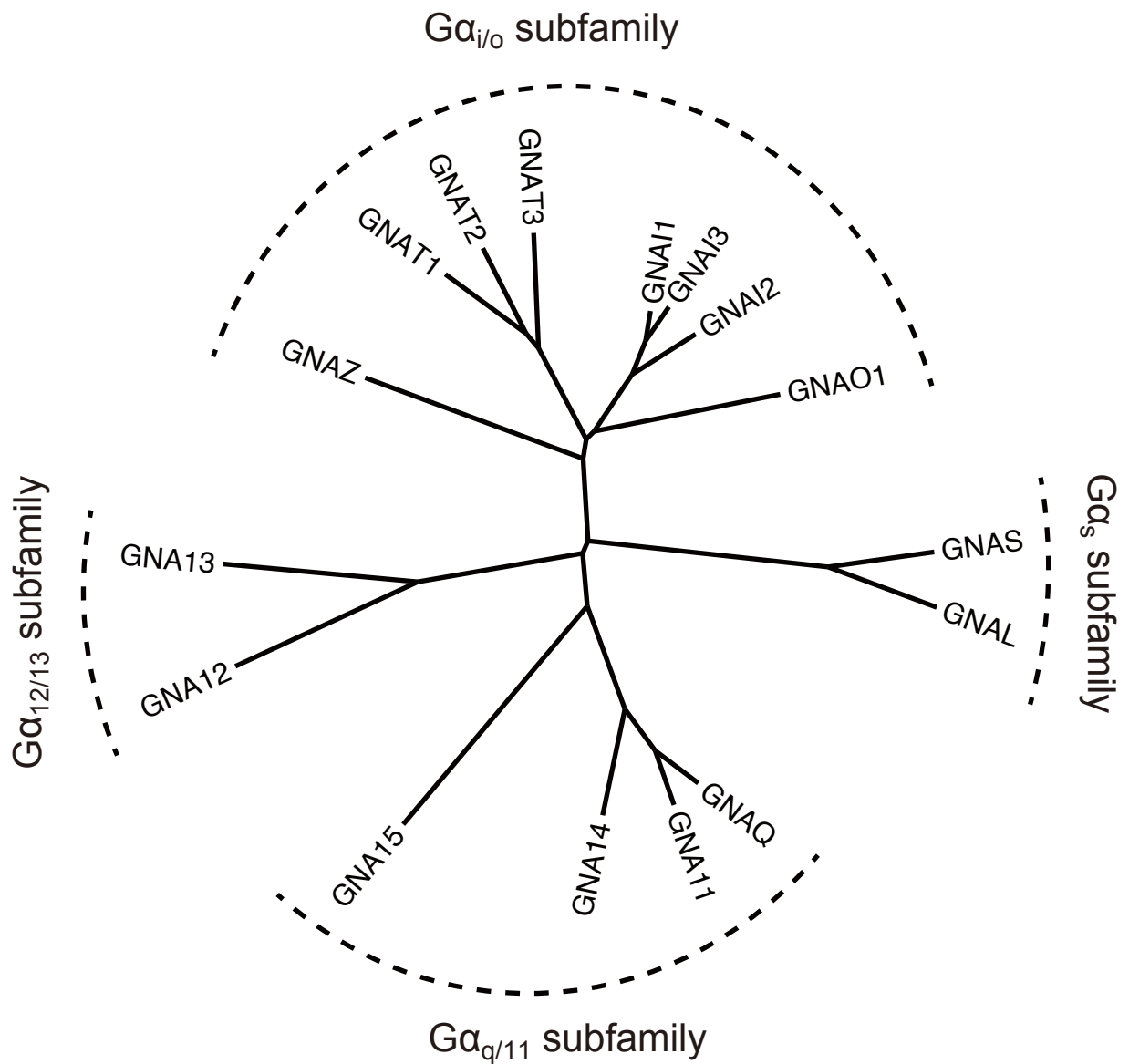


Fig. 1-5 Gαサブユニットの進化系統樹

ヒト Gαサブユニットの全メンバー 16 種類のアミノ酸配列を Clustal W および FigTree を用いて系統樹を作成した。アミノ酸配列を元に 4 種類のサブファミリーに分類できることがわかる。この 4 種類の分類は、Gαサブユニットのシグナル伝達の種類に一致する。複数のスプライスバリエントがある場合、代表的な 1 種類のみを表記した。

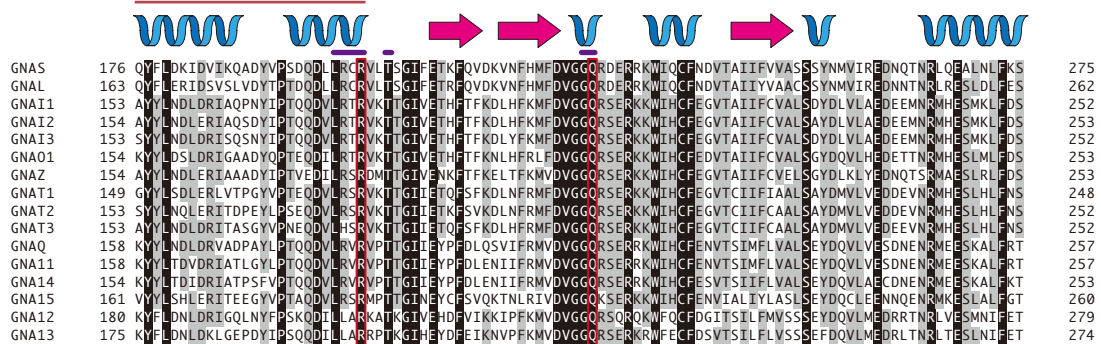
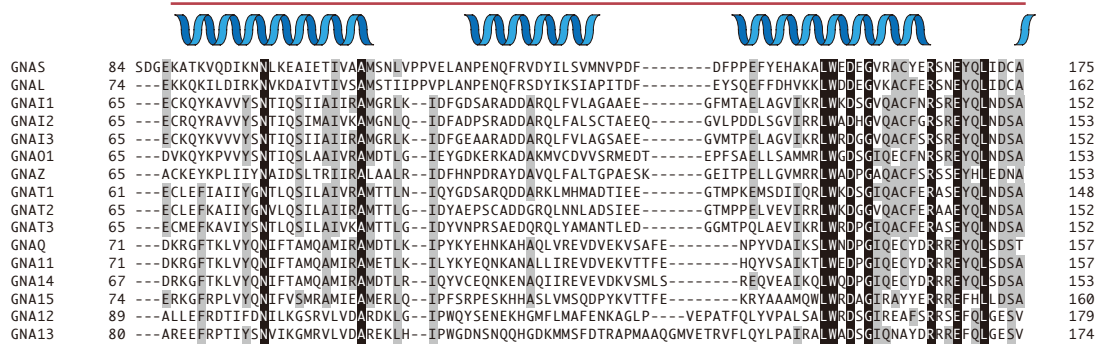
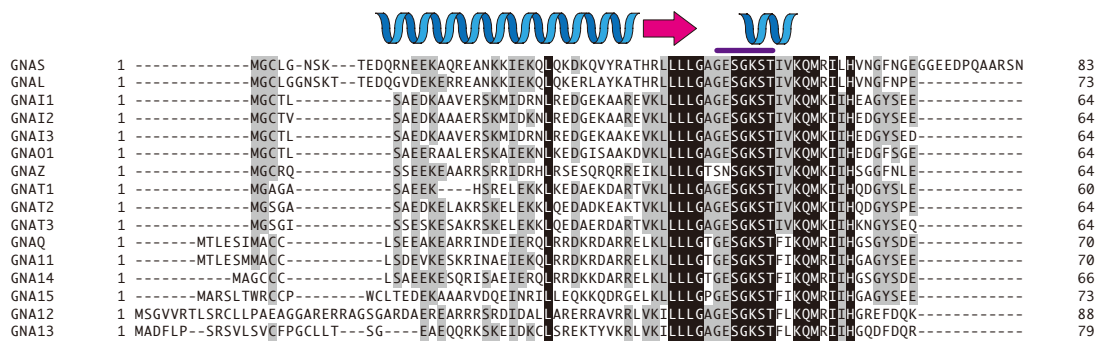


Fig. 1-6 Gaサブユニットのアライメント

ヒト Gaサブユニットの全遺伝子 (16 種類) のアミノ酸配列を Clustal W を用いてアライメントし、GenetyxMac で表示した。アミノ酸配列の上に、二次構造 ( $\alpha$ -helix: らせん、 $\beta$ -sheet: 赤矢印)、Helical domain (茶線)、GTP/GDP 結合アミノ酸 (紫線) を表示した。二次構造は総説<sup>28</sup> および X 線結晶構造 (PDB Code: 3SN6) を参考にした。オレンジ枠で囲ったアミノ酸 R と Q は GTPase 活性を担うアミノ酸残基であり、それぞれ Arg<sub>cat</sub> と Gln<sub>cat</sub> とも呼ばれる<sup>29</sup>。Arg<sub>cat</sub> は GTP の加水分解中間体を安定化する。Gln<sub>cat</sub> は Switch II region に位置し、水分子が GTP の  $\gamma$  リン酸基を攻撃することを促進する。複数のスプライスバリエーションがある場合、代表的な 1 種類のみを表記した。トポロジー図は Fig. 1-3 を参照。

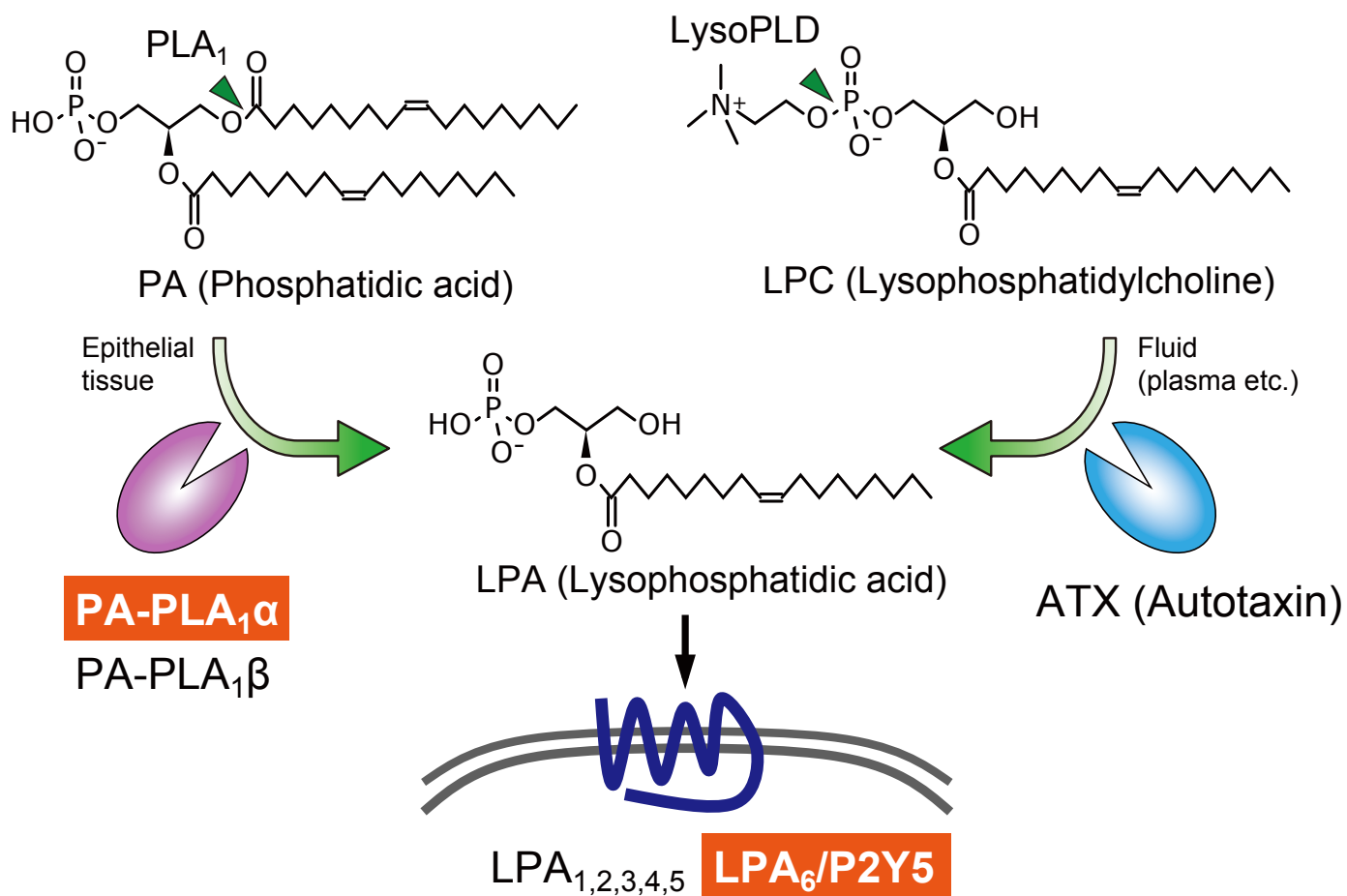


Fig. 1-7 細胞外 LPA 産生酵素と LPA 受容体

細胞外 LPA の産生酵素として、ホスファチジン酸 (PA) に対するホスホリパーゼ A<sub>1</sub> (PLA<sub>1</sub>) とリゾホスファチジルコリン (LPC) に対するリゾホスホリパーゼ D (LysoPLD) が同定されている。LPA 受容体はこれまでに 6 種類が同定されている。ヒトの先天性毛髪疾患患者の原因遺伝子として、PA-PLA<sub>1</sub>α と LPA<sub>6</sub> (当時の名称は P2Y5) が同定されたが、当時 PA-PLA<sub>1</sub>α の内在性の基質や P2Y5 のリガンドは不明であった。

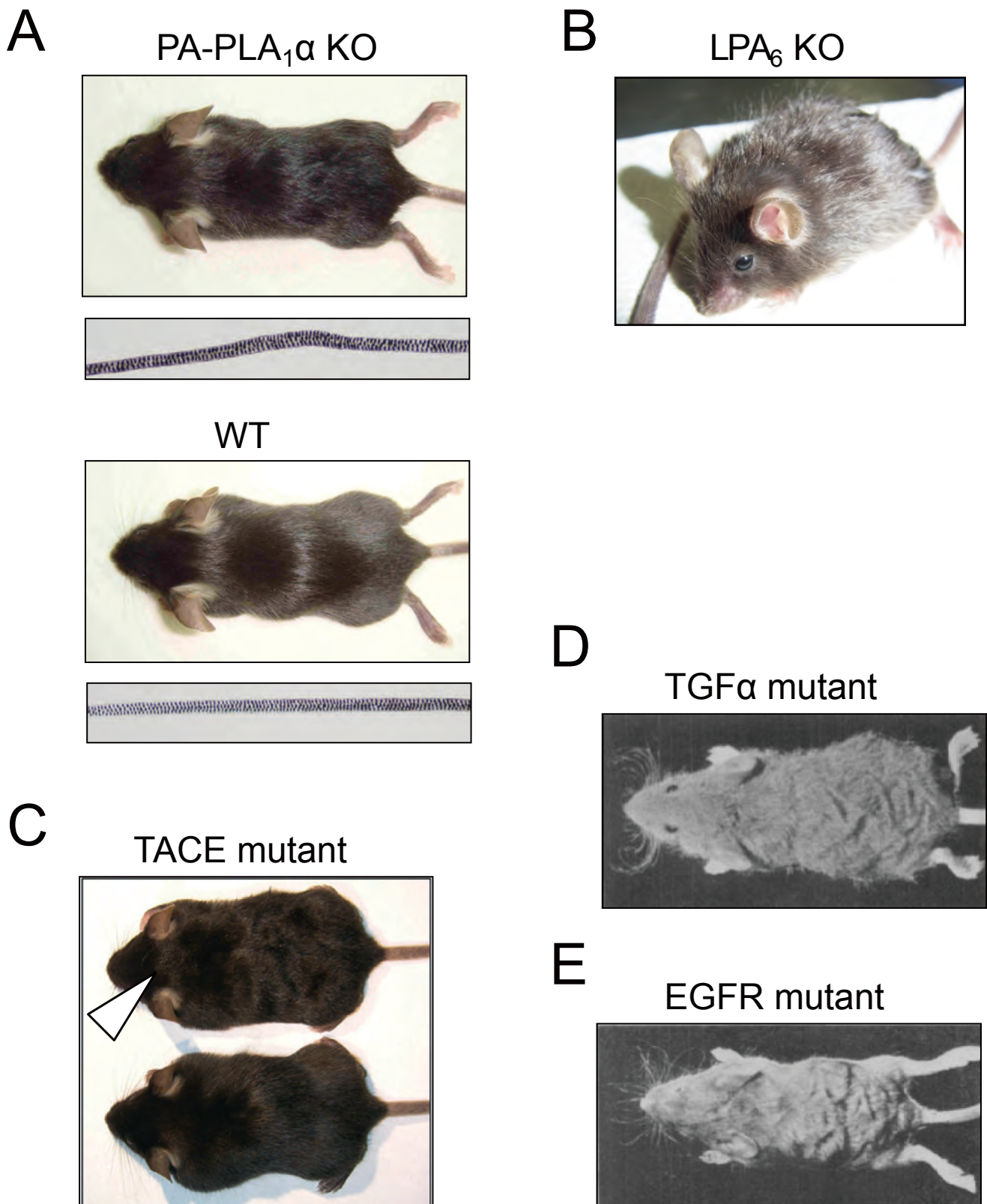


Fig.1-8 体毛異常を示すマウスとその原因遺伝子

(A) PA-PLA<sub>1</sub>α KO マウス<sup>8</sup>。PA-PLA<sub>1</sub>α KO マウス縮毛を示すものの、野生型マウスと比べて脱毛の亢進は見られない。第一毛周期（10日齢から4週齢）に顕著な縮毛が起こり、上皮組織はほぼ正常という特徴を持つ。(B) LPA<sub>6</sub> KO マウス（未発表）。(C) TACE 変異マウス<sup>20</sup>。自然発症劣性遺伝マウス woe (waved with open eyelids) (Arrowhead)。TACE KO マウスも体毛形成異常を示すが、生後間もなく致死となる<sup>18</sup>。(D) TGFα変異マウス<sup>15,16</sup>。自然発症劣性遺伝マウス wa-1 (waved-1) と TGFα KO マウスは同じ体毛形成異常を示す。(E) EGFR 変異マウス<sup>17</sup>。自然発症劣性遺伝マウス wa-2 (waved-2)。EGFR KO マウスは生後間もなく致死となる<sup>30,31</sup> と TGFα KO マウスは同じ体毛形成異常を示す。上皮特異的 EGFR KO マウスと wa-2 マウスはほぼ同じ体毛形成異常を示す<sup>19</sup>。(D) と (E) の画像は文献<sup>21</sup>より転載。



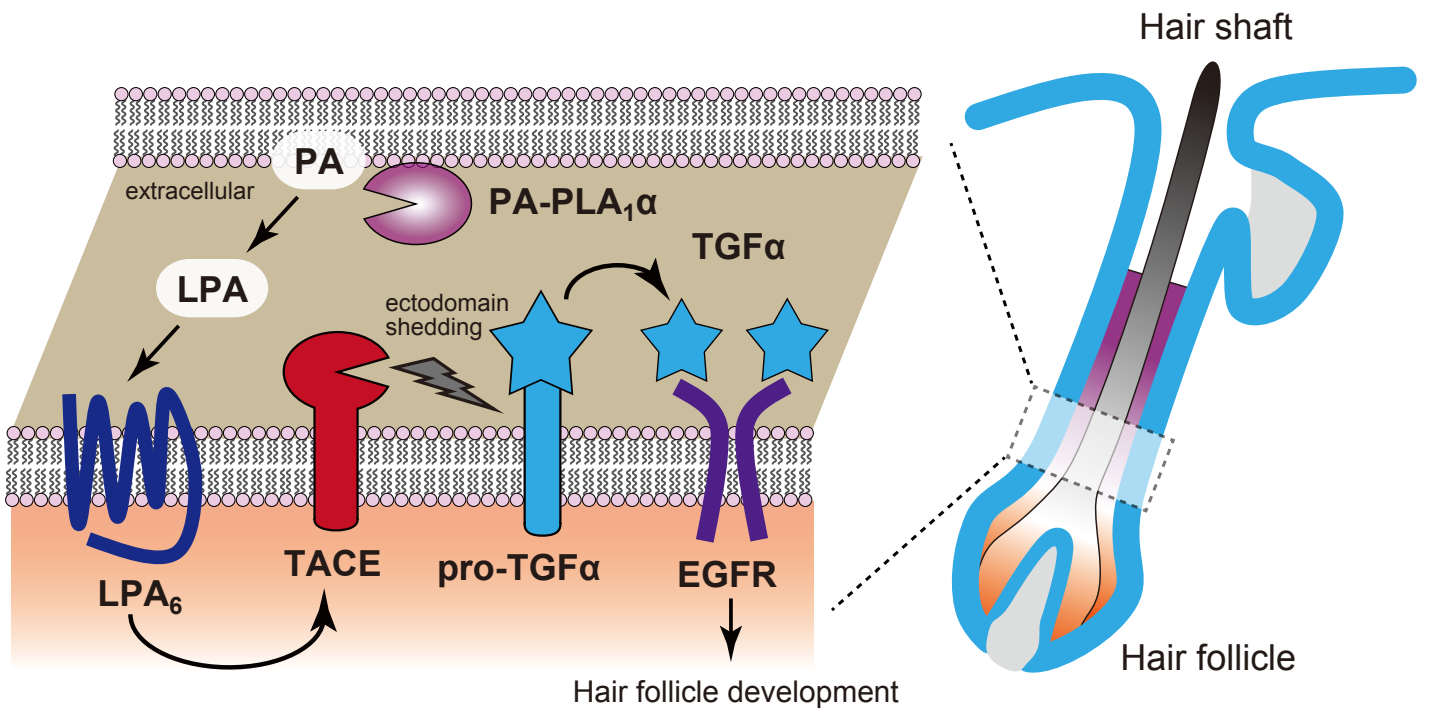


Fig.1-9 LPAによる体毛形成制御機構

毛包の内根鞘 (Inner root sheath, IRS) と呼ばれる上皮系細胞に発現する PA-PLA<sub>1</sub>α が LPA を産生し、LPA<sub>6</sub> を活性化する。LPA<sub>6</sub> の下流で、TACE による pro-TGFα のエクトドメイン切断が誘導される。切断された TGFα は EGFR を活性化し、体毛形成を促進する。この経路の不全は、ヒトとマウスにおいて縮毛や脱毛を引き起こす。文献<sup>8</sup>の図を改変。

## A PA-PLA<sub>1</sub>α deficiency



## B LPA<sub>6</sub> deficiency



## C TACE deficiency



## D EGFR inhibitor



Fig.1-10 ヒトの毛髪疾患

(A) PA-PLA<sub>1</sub>α(別名 LIPH) 欠損患者。2006 年に先天性貧毛症(乏毛症とも呼ばれる。患者は縮毛や脱毛などの毛髪異常を示す)の家系から原因遺伝子として同定された<sup>22</sup>。画像は文献<sup>22,32</sup>から転載。

(B) LPA<sub>6</sub>(別名 LPAR6, P2Y5) 欠損患者。2008 年に先天性貧毛症の家系から原因遺伝子として同定された<sup>23,24</sup>。同定された当時は、P2Y5 のリガンドは不明であった。画像は文献<sup>23,24</sup>から転載。

(C) TACE(別名 ADAM17) 欠損患者。2011 年に同定された<sup>25</sup>。画像は文献<sup>25</sup>から転載。

(D) EGFR 阻害剤投与による脱毛<sup>26</sup>。画像は文献<sup>26</sup>から転載。

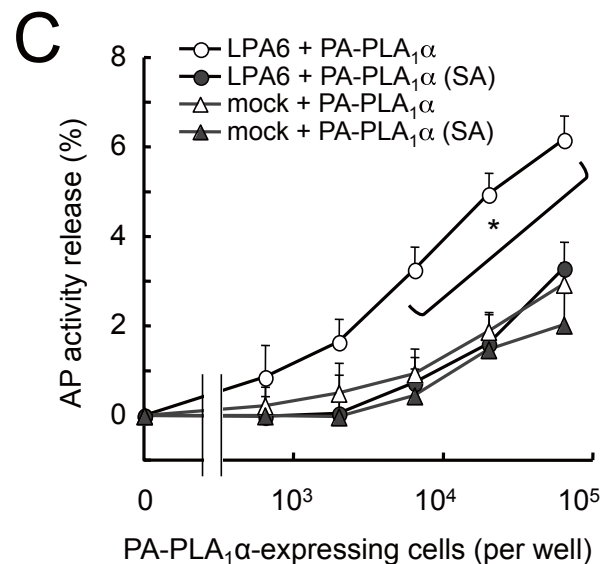
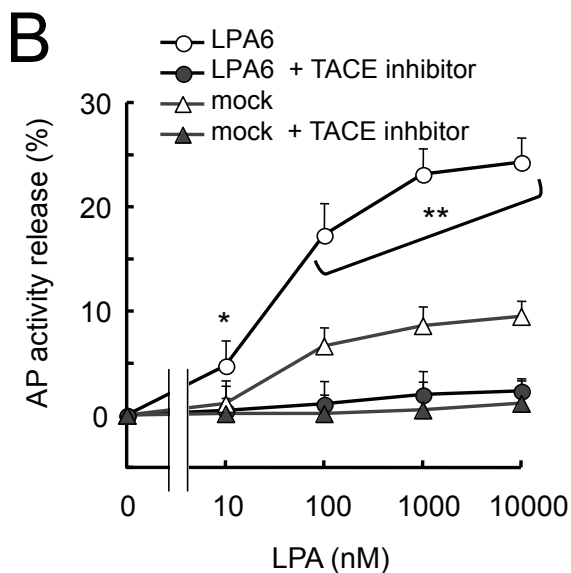
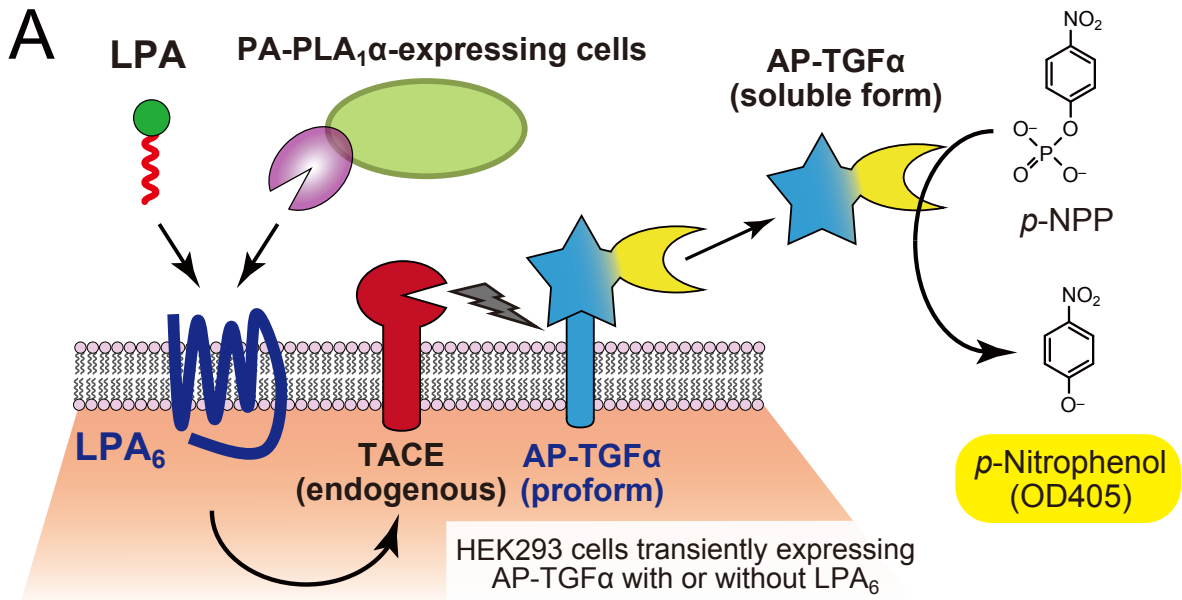


Fig.1-11 LPA および PA-PLA<sub>1</sub>α発現細胞は LPA<sub>6</sub> を活性化して TGFαエクドメイン切断を誘導する (A) HEK293 細胞を用いた LPA<sub>6</sub> による TGFαエクドメイン切断の再構成実験の模式図。LPA<sub>6</sub> とアルカリホスファターゼ (AP) 融合 TGFα (AP-TGFα) を HEK293 細胞に一過的に発現させ、LPA または PA-PLA<sub>1</sub>α発現細胞を混合した。HEK293 細胞には内在性に TACE が発現していた。(B) LPA<sub>6</sub> は LPA に応答し、TACE 依存的な AP-TGFαエクドメイン切断を引き起こす。Mock トランスフェクション細胞でも内在性に発現する LPA 受容体による AP-TGFαエクドメイン切断が観察される。TACE inhibitor, SDZ 242-484 (10 μM)。(C) LPA<sub>6</sub> は PA-PLA<sub>1</sub>αにより活性化される。PA-PLA<sub>1</sub>αは膜結合型の分泌型酵素であるので、酵素源として発現細胞を用いた。SA, catalytically inactive mutant (S154A)。(A-C) は文献<sup>8</sup>より改変。

手法	主な検出シグナル	主な検出法	利点	欠点	一過性発現系
標識GTPアナログの取込み	Gi	膜面分への <sup>35</sup> S]-GTPγSの取込み (液体シンチレーション)	GPCRの活性化の直下のイベント	操作が煩雑 放射性同位体の使用 S/B比が小さい	△
cAMP増減	Gs Gi/o (Forskolinとの併用)	RIA TR-FRET	汎用される手法 ホモジニアスアッセイ化が可能	高価 Gi/o評価の場合は、Forskolinの濃度設定が難しく、S/B比が小さい	△ Gi/oは不可
IP <sub>3</sub> 増加	Gq/11	RIA ( <sup>3</sup> Hイノシトール)	比較的特異性が高い	操作が煩雑 放射性同位体の使用	○
Ca <sup>2+</sup> 流入	Gq/11, (Gi/o)	Ca <sup>2+</sup> 結合蛍光色素のリアルタイム蛍光変化	汎用される手法 短時間 (数十秒) の反応	高価 化合物の蛍光や吸光の影響	○
Rho, RacのGTP結合	G12/13 (Rho) Gi/o (Rac)	GTP結合型認識タンパク質による沈降 (WB)	比較的特異性が高い	操作が煩雑かつ難しい 低スループット	○
転写因子活性化	Gs (CRE) Gq/11 (NFAT) G12/13 (SRE)	ルシフェラーゼによる発光など	汎用される手法 ホモジニアスアッセイ化が可能	高価 実験誤差が大きい	○
アクチンストレスファイバー形成	G12/13	ファロイジンによる染色 (蛍光顕微鏡)		低スループット 定量化が困難	○
標識リガンド結合		膜面分への <sup>3</sup> H, <sup>14</sup> Cの取込み (液体シンチレーション)	GPCRへの直接のリガンド結合を測定可能	放射性同位体リガンドの入手 脂質性リガンドは評価困難	△
βアレスチン会合	βアレスチン	FRET 分割補酵素ガラクトシダーゼによる発光	多数のGPCRに適用可能 ホモジニアスアッセイ化が可能	高価 特殊なコンストラクトの使用	△
インピーダンス変化	各種	電気抵抗値	複数のGPCRシグナルを検出可能	高価 データの解釈が困難	△

Table 1-1 汎用される GPCR アッセイの比較

A

GPCR	リガンド	EGFRリガンド	機能	文献
AT1	Angiotensin II	TGF $\alpha$ HB-EGF	腎不全 心肥大*	7,36,37
ETA, ETB	Endothelin	HB-EGF	血圧上昇*	38
$\beta$ 1 AR	Adrenaline	HB-EGF	心肥大*	39
LPA <sub>6</sub>	LPA	TGF $\alpha$	毛髪形成	8

B

機能	TACE KOマウスと類似の表現型を示すKOマウスの遺伝子	関与するGPCR	文献
瞼形成	ROCK, TACE, TGF $\alpha$ , EGFR SPNS2 (S1Pトランスポーター)	S1P受容体?	15-17, 40-42
血管形成・維持	G $\alpha$ <sub>13</sub> , ROCK, TACE ATX (分泌型LPA産生酵素)	LPA受容体?	43-47
骨形成 エネルギー代謝 リンパ球分化	-	?	

Table 1-2 GPCRによるTACE活性化、TGF $\alpha$ 切断、EGFR transactivationの生理的意義

(A) GPCRによるEGFファミリーのエクトドメイン切断を介したEGFR transactivationの意義。

AsteriskはGPCRアゴニストを薬理的に投与した際の現象であり、生体内で産生される内因性リガンドの意義は不明である。(B) TACE KOマウスの表現型<sup>18,33-35</sup>に類似する変異マウス。

## 第二章 実験材料と実験手法

### 第一節 TGF $\alpha$ 切断アッセイの原理

考案した基本的な原理を Fig. 2-1 に記載する。TGF $\alpha$  のエクドメイン切断を簡便に検出するために、TGF $\alpha$  の細胞外領域 (N 末端側) にアルカリホスファターゼ (Alkaline phosphatase, AP) を融合させたキメラタンパク質 (AP-TGF $\alpha$ )<sup>48</sup> を用いた (Fig. 2-2)。切断型と非切断型の AP-TGF $\alpha$  は、それぞれ培養上清中と細胞側の AP 活性を測定することで定量可能である。AP 活性の検出には、安価な基質であるパラニトロフェニルリン酸 (*p*-nitrophenylphosphate, *p*-NPP) を用い、産生物であるパラニトロフェノール (*p*-nitrophenol, *p*-NP ; *p*-NP の脱プロトン体 (pKa 値 7.16) が吸光を示す) の吸光 (吸光波長 405 nm、OD405) を測定した。

具体的な手順として、始めに AP-TGF $\alpha$  と GPCR を発現させた HEK293 細胞を血清不含培地に懸濁し、96 ウェルプレートに播種する (Fig. 2-1)。GPCR のリガンドを加えると細胞内シグナル伝達が誘導され、HEK293 細胞に内在性に発現する膜型プロテアーゼ TACE が活性化される。活性化した TACE は AP-TGF $\alpha$  のエクドメインの切断を起こし、切断された AP-TGF $\alpha$  は培養上清に遊離される。AP-TGF $\alpha$  の切断反応がプラトーに達するリガンド刺激後 1 時間に培養上清を回収し、上記の原理で切断型と非切断型の AP-TGF $\alpha$  量を測定する。

HEK293 細胞において、AP-TGF $\alpha$  切断は G<sub>q/11</sub> シグナルと G<sub>12/13</sub> シグナルの下流で誘導される (Fig. 2-3)。従って、G<sub>s</sub> や G<sub>i/o</sub> のみとしか共役しない GPCR の活性化を検出するために、G $\alpha_q$  サブユニットの C 末端ヘリックスを G $\alpha_s$  や G $\alpha_{i/o}$  由来に置換したキメラ G $\alpha$  サブユニット、もしくは非特異的に GPCR に共役することで知られる G $\alpha_{16}$  (別名 G $\alpha_{15}$ ) サブユニットを共発現させる。目的の GPCR がどの三量体 G タンパク質と共役するか不明の場合は、G $\alpha$  サブユニットのプラスミドベクターを混合して遺伝子導入してもよい。

### 第二節 TGF $\alpha$ 切断アッセイの実験材料

超純水 (Milli-Q water; Milli-Q Integral (Millipore 社製) により作製)

イオン交換水 (Elix (Millipore 社製) により作製)

#### Complete DMEM の調製

ダルベッコ変法イーグル培地 2 (DMEM、ニッスイ) 粉末 4.75g を Milli-Q water 500 mL に溶解し、オートクレーブ (121°C、15 分) 処理により滅菌し、次を加えた

10% (w/v) NaHCO<sub>3</sub> water solution (autoclaved) 7.5 mL

5 mL 100X penicillin, streptomycin, glutamine

50 mL heat-inactivated FCS (GIBCO)

ダルベッコリン酸緩衝液 (D-PBS、以下 PBS と記載)

20X PBS

KCl 2.0 g  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2.0 g  
NaCl 80 g  
Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 29 g  
Milli-Q water upto 500 mL

1X PBS

Milli-Q water 475 mL  
20X PBS 25 mL  
Autoclaved

Trypsin/EDTA の調製

100X Trypsin/EDTA (5% (w/v) Trypsin, 53 mM EDTA) を次の通り調製した。

Trypsin powder (GIBCO) 2.5 g  
1X PBS upto 40 mL  
Shake until dissolved  
1X PBS upto 48 mL  
0.5 M EDTA (pH 8.0) (cell culture grade, GIBCO) 2.12 mL  
Filtration (0.45 µm, MILLEX® HV (Millipore))  
Stock 1 mL in a 1.5 mL tube at -20°C

1X Trypsin/EDTA (0.05% (w/v) Trypsin, 0.53 mM EDTA) を次の通り調製した。

PBS 49.5 mL  
100X Trypsin/EDTA 0.5 mL

HEK293 細胞の継代

Complete DMEM を用いて HEK293 細胞を CO<sub>2</sub> インキュベーター (5% CO<sub>2</sub>, 37°C) 内で培養した。基本的に、100 mm dish あたり 2x10<sup>6</sup> cells/ 10 mL で播種、2 日後に継代、または 100 mm dish あたり 1x10<sup>6</sup> cells/ 10 mL で播種、3 日後に継代のサイクルを繰り返した。継代操作は、DMEM をアスピレート後、PBS 5 mL を加え再度アスピレート、Trypsin/EDTA 2 mL を加えた。室温で約 30 秒静止した後、ディッシュを叩いて細胞を浮かせ、Complete DMEM 2 mL を加えた。3 回程度サスペンドした後に、15 mL チューブに移し、セルカウント用に一部 (50 µL 程度) を取って遠心 (190 x g, 5 分) した。遠心後、上清をアスピレート後、チューブの底を一度強くタッピングして細胞ペレットを崩し、適量の Complete DMEM を加えた。必要量の細胞を継代用とアッセイ用に播種した。継代用のディッシュは、PBS で一度洗浄して再利用した。HEK293 細胞の保存には、セルバンカー 1 プラス (十慈フィールド社製) を用いた。

ハンクス緩衝液 (Hank's balanced salt solution (HBSS), with 5 mM HEPES (pH 7.4) and Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup> and without phenol red)

10 X HBSS (solution 1)

KCl 4 g

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.6 g

NaCl 80 g

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 12H<sub>2</sub>O 1.2 g

D-Glucose 10 g

Milli-Q water upto 1 L

オートクレーブ後、4°C 保存

10 X HBSS (solution 2)

CaCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O 1.85 g

MgCl<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O 1 g

MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 1 g

Milli-Q water upto 1 L

オートクレーブ後、4°C 保存

1 X HBSS

Milli-Q water 790 mL

0.5 M HEPES (pH 7.4) 10 mL

オートクレーブ後、10 X HBSS (solution 1, 2)を 100 mL ずつ加え 4°C 保存

(必要に応じて pH 7.4 (final)となるようにオートクレーブ前に酸または塩基を添加)

(注) Mg<sup>2+</sup>と Ca<sup>2+</sup>を含まない HBSS では、AP-TGFα 切断反応が低下する。

*p*-NPP 溶液 (40 mM Tris-HCl (pH 9.5), 40 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM *p*-NPP)

以下のようにストック溶液を調製し、使用前に希釈した。

1 M Tris-HCl (pH 9.5) 96 ウェル細胞プレート 1 枚あたり (以下、同) 0.64 mL

5 M NaCl 0.128 mL

1 M MgCl<sub>2</sub> 0.16 mL

1 M *p*-NPP (第二ナトリウム六水和物 (和光特級、和光純薬工業社製)、水に溶解させ小分けして-20°C 保存) 0.16 mL

イオン交換水 upto 16 mL

接着細胞用 96-well plate (クリア、フラットボトム) (Greiner Bio-one 社製、cat. #655180)



96-well plate (クリア、フラットボトム、低吸着タイプ) (Iwaki 社製、cat. #3881-096)

12 連電動マルチチャンネルピペット

最大容量 120  $\mu\text{L}$  (eLINE®、バイオヒットジャパン社製、cat. #730440)

最大容量 1200  $\mu\text{L}$  (eLINE®、バイオヒットジャパン社製、cat. #730490)

マイクロプレート対応吸光測定機 (VersaMax™, Molecular Devices 社製)

37°C ホットプレート (NISSHIN 社製、cat. #NHP-45N)

プレート対応遠心機 (PlateSpin®II, Kubota 社製)

TPA (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate)

1 mM となるように DMSO で溶解し、5  $\mu\text{L}$  ずつ小分けして -20°C 保存。HBSS 495  $\mu\text{L}$  を加え、10  $\mu\text{M}$  とする。さらに HBSS で 10 倍希釈し (1  $\mu\text{M}$ )、終濃度の 10 培溶液を作製した。溶解・希釈後は使いきりとした。

プロテインキナーゼ C の活性化剤であり、TACE の活性化による AP-TGF $\alpha$  切断を強力に誘導する<sup>12</sup>。AP-TGF $\alpha$  切断反応のポジティブコントロールとなる。

阻害剤

本論中に特に表記がない限り、下記に記載の濃度を使用した。

以下の阻害剤は 30 分前処理を行った (細胞を再播種した直後に添加)。

U-73122 (pan-PLC 阻害剤) 3  $\mu\text{M}$

なお、U-73122 は高濃度 (10  $\mu\text{M}$ ) で AP-TGF $\alpha$  切断応答を誘導するが、その原因は不明である。

U-73122 は *in vitro* で複数の PLC サブタイプ (PLC $\beta$ 2, PLC $\beta$ 3, PLC $\gamma$ 1) を活性化することが報告されている<sup>49</sup>。

Ro-31-8425 (pan-PKC 阻害剤) 10  $\mu\text{M}$

Y-27632 (ROCK 阻害剤) 10  $\mu\text{M}$

NF-449 (G $_s$  阻害剤) 10  $\mu\text{M}$

H89 (PKA 阻害剤) 10  $\mu\text{M}$

以下の阻害剤は 16 時間前処理を行った (トランスフェクション (阻害剤ありなし用に 2 ウェル分) 操作の約 8 時間後に添加)。細胞を再播種する際は、阻害剤は使用しなかった。

PTX (G $_{i/o}$  阻害剤) 100 ng/mL

G $\alpha$  サブユニットの C 末端側から 4 番目の Cys 残基を ADP リボシル化することで作用する。従って、G $\alpha_{i/o}$  サブファミリーのうち、この部位が Cys 残基でない G $\alpha_z$  サブユニットは非感受性である。

以下の阻害剤は 5 分前処理を行った（細胞を再播種し、約 25 分後に添加）。

SDZ 242-484（TACE 阻害剤） 10  $\mu$ M

Ki16425（LPA<sub>1</sub>, LPA<sub>2</sub>, LPA<sub>3</sub> 阻害剤） 10  $\mu$ M

### 第三節 TGF $\alpha$ 切断アッセイの実験手法

#### （1） HEK293 細胞へのプラスミドベクタートランスフェクション

HEK293 細胞を継代する際に、 $2 \times 10^5$ /mL の濃度で 12-well plate の 1 ウェルあたり 1 mL（以下、同。必要に応じてスケールアップする）ずつ播種し、培養した。24 時間後、Lipofectamine 2000 Reagent（Life Technologies 社製）を用いて、次の手順で AP-TGF $\alpha$  と目的の GPCR（必要に応じて G $\alpha$  サブユニットも加える）をコードするプラスミドベクターをトランスフェクションした（\* 1）。

\* 1 必要に応じて、トランスフェクション試薬の種類や量、プラスミドベクターの量を検討する。

1. 1.5 mL チューブに 125  $\mu$ L Opti-MEM に、250 ng AP-TGF $\alpha$  と 100 ng GPCR を加えた（\* 2）。G $\alpha$  サブユニットを使用する場合、50 ng（1 種類）もしくは 10 ng ずつ（6 種類の混合）追加する。

\* 2 GPCR ベクターのコントロールとして、空ベクター導入細胞も用意する。GPCR を導入した細胞では、空ベクター導入細胞と比べて AP 活性の低下がしばしば観察される。AP 活性が空ベクター導入細胞の半分以下になる場合は、AP-TGF $\alpha$  の発現量の違いによるアーティファクトの影響を考慮し、GPCR ベクターの量を減らすことを推奨する。なお、アッセイ系導入の初期検討の際は、細胞の内在性の AP 活性と AP-TGF $\alpha$  の発現を確認するため、AP-TGF $\alpha$  を加えないコントロールも設定する。

2. 別の 1.5 mL チューブに 125  $\mu$ L Opti-MEM と 1.25  $\mu$ L Lipofectamine 2000 Reagent を混合し、室温で 30 分静置した。

3. 1 と 2 を混合し、室温で 20 分静置した。

4. 混合液 250  $\mu$ L を細胞培養液に加え、穏やかに攪拌し、24 時間培養した。

#### （2） 細胞の再播種とリガンド刺激

以下の手順で HEK293 細胞を 96 ウェルプレートに再播種する。

1. 前日にプラスミドをトランスフェクションした HEK293 細胞の培養液を吸引し、PBS を穏やかに加えた。

2. PBS を吸引し、0.5 mL Trypsin/EDTA（予め室温に温めておく）を加えた。

3. プレートが強めに揺らして軽く剥がれた状態を確認して（通常、Trypsin/EDTA を加えて 30 秒以内）、1 mL Complete DMEM を加えた。5 mL マイクロピペッターで 2、3 回サスペンドして 15 mL チューブに移した。

4. 遠心（190 x g、5 分）後、上清を吸引し、3 mL PBS を加えた（\* 2）。

\* 2 PBS を加える直前にチューブの底を強くタッピングすると、細胞ペレットが崩れ、PBS を加え

ただで細胞が十分懸濁される。

5. 10分静置し（\*3）、遠心（190 x g、5分）し、上清を吸引した。4 mL HBSS（必要量に応じて3-8 mLの間で変えてもよい）を加え、5 mL マイクロピペッターで2、3回サスペンドした。

\*3 HEK293細胞を剥がす操作の刺激（フレッシュな培地の添加や物理的的刺激）でAP-TGF $\alpha$ 切断が起こる。PBS洗浄により細胞を剥がす際に切断されるAP-TGF $\alpha$ 切断を除くことができ、シグナルノイズ比が向上する。

6. 12連電動マルチチャンネルピペット（最大容量1200  $\mu$ L、吸引速度2、排出速度1に設定）を用いて、96-well plateに1ウェルあたり90  $\mu$ Lずつ播種した（\*4）。

7. 37°C CO<sub>2</sub>インキュベーターに入れ、30分培養した。

8. 12連電動マルチチャンネルピペット（最大容量120  $\mu$ L、吸引速度3、排出速度2に設定）を用いて、HBSSで希釈した化合物を1ウェルあたり10  $\mu$ Lずつ添加した（\*4、5）。

\*4 以下は再播種と化合物刺激の典型的な例である。24ウェル（グレー部分）に再播種し、化合物濃度を5点（C-G行）取る。無刺激時のAP-TGF $\alpha$ 切断量を精度良く求めるため、6ウェル分（A-B行）使用する。TPA（H行）はポジティブコントロールであり、GPCR非依存的なAP-TGF $\alpha$ 切断が起こる。

	化合物	濃度	1	2	3
A	なし				
B	(HBSS)				
C	リガンド	1 nM			
D		10 nM			
E		100 nM			
F		1 $\mu$ M			
G		10 $\mu$ M			
H	TPA	100 nM			

\*5 プラスチックへ吸着しやすい化合物（脂質、ペプチド等）の希釈を行う際は、0.01% (v/w) BSAを含むHBSSで行うとよい（BSAの終濃度は0.001%）。

9. 再度37°C CO<sub>2</sub>インキュベーターに入れ、1時間培養した。

### (3) AP-TGF $\alpha$ 切断量の測定

1. リガンド刺激1時間後のプレートを、遠心（190 x g、2分、室温）した（\*6）。

\*6 プレート対応遠心機がない場合、この操作を省略可能。ただし、培養上清を移す際に細胞の混入のリスクが高くなるため、実験誤差が大きくなる。

2. 12連電動マルチチャンネルピペット（最大容量120  $\mu$ L、吸引速度1、排出速度2に設定）を用い、1ウェルあたり培養上清80  $\mu$ Lを空の96ウェルプレートに移した（\*7）。

\*7 チップの先をウェルの側面の下部に軽く当てながらゆっくり吸うと細胞の混入を抑えられる。12連ピペットを用いてA行からH行の順に培養上清を移すと、1つのプレート内の操作ではチップの交

換や洗浄の必要はない（次のプレートの操作の前に水でチップを洗浄すれば十分）。

3. 12 連電動マルチチャンネルピペット（最大容量 1200  $\mu\text{L}$ 、吸引速度 6、排出速度 2 に設定）を用い、*p*-NPP 溶液（予め 37°C に加温）を、細胞プレートと培養上清プレートに 1 ウェルあたり 80  $\mu\text{L}$  ずつ加えた。

4. 37°C ホットプレートの上にプレートを載せ、約 5 分加温した（\* 8）。

\* 8 ホットプレートがない場合、37°C インキュベーターに入れ、約 5 分加温する。プレートを均一に温めることで、AP 活性を精度良く測定できる（プレートの温度が不均一だとプレートのエッジ効果が生じ、実験誤差が大きくなる）。

5. プレート対応吸光測定機で 1 回目の OD405 を測定した。

6. 測定後、直ちにプレートを 37°C インキュベーターに入れ、1 時間加温する。

7. プレート対応吸光測定機で 2 回目の OD405 を測定した（\* 9）。

\* 9 細胞と培養上清の OD 値の合計が 1 から 2 前後の時、最も測定精度が高い。発色が弱い場合、AP 反応 2 時間後または 3 時間後に再度測定を行う。

VersaMax のパラメーターは次の通りである。

Endpoint

Wavelengths

Lm1: 405 nm

Automix & Blanking

Before: 2 secs

Pre-Read Plate: Off

AutoCalibrate

Off

Strips

Read entire plate

Comun Wavelength Priority

Column Priority

AutoRead

Off

手法を変更する場合、次の通り条件を変更した。

#### アンタゴニストアッセイ

細胞を HBSS に再懸濁する際、8/9 倍容量（12-well plate を 1 ウェルあたり 3.6 mL）を用い、80  $\mu\text{L}$  ずつ 96-well plate に播種した。プレートを CO<sub>2</sub> インキュベーターに入れ、25 分間培養した。終濃度の 10 倍の濃度のアンタゴニストを 10  $\mu\text{L}$  加え、プレートを軽く揺すり溶液を混ぜ、5 分間静置した。さらに、終濃度の 10 倍の濃度のアゴニストを 10  $\mu\text{L}$  加え、プレートを軽く揺すり溶液を混ぜた後、プレートを CO<sub>2</sub> インキュベーターに入れ、1 時間培養した。以下、上記と同様に行った。

## RNAi

HEK293 細胞を  $1 \times 10^5/\text{mL}$  の濃度で 12-well plate の 1 ウェルあたり 1 mL ずつ播種し、培養した。24 時間後、Lipofectamine RNAiMAX Reagent (Life Technologies 社製) を用いて、次の手順で siRNA のトランスフェクションを行った。siRNA は Stealth siRNA (Life Technologies 社製) を使用した。1 遺伝子につき、設計済みの 3 種類のコンストラクトを購入し、発現抑制効果を比較した。発現抑制効果が高い 2 種類を選択した。標的配列は Table 2-1 に記載する。

1. 1.5 mL チューブに 100  $\mu\text{L}$  Opti-MEM (Life Technologies) に、0.6  $\mu\text{L}$  Stealth siRNA (ストック溶液は 20  $\mu\text{M}$  に調製。0.6  $\mu\text{L}$  は終濃度 10 nM 相当) 加えた。Control siRNA として Stealth RNAi™ siRNA Negative Control Med GC Duplex #3 (Life Technologies, cat. #12935-113) を用いた。siRNA を 1 種類以上を混ぜた時は次の通りとした。

G $\alpha_{q11}$ : 10 nM *GNAQ* siRNA and 10 nM *GNA11* siRNA

G $\alpha_{12/13}$ : 10 nM *GNA12* siRNA and 10 nM *GNA13* siRNA

G $\alpha_{q11}$  and G $\alpha_{12/13}$ : 5 nM *GNAQ* siRNA, 5 nM *GNA11* siRNA, 5 nM *GNA12* siRNA and 5 nM *GNA13* siRNA

- 別の 1.5 mL チューブに 100  $\mu\text{L}$  Opti-MEM と 1  $\mu\text{L}$  Lipofectamine RNAiMAX Reagent を混合し、室温で 5 分静置した。
- 1 と 2 を混合し、室温で 20 分静置した。
- 混合液 200  $\mu\text{L}$  を細胞培養液に加え、穏やかに攪拌し、24 時間培養した。
- 培養液をアスピレートし、37°C に温めた 1 mL Complete DMEM を加えた。
- 以下、前述した方法でプラスミドのトランスフェクション加え、24 時間培養した。

## 384-well plate フォーマット

### ・プレート

細胞播種用 384-well plate: 384 穴、TC プレート、付着細胞 (Greiner bio-one, cat. #781182)

培養上清移動用 384-well plate: 384 穴、NoBinding (Greiner bio-one, cat. #781901)

### ・細胞播種

12-well plate の 1 well あたり HBSS 5.3mL (1.5 倍量) に懸濁し、384-well plate の 1 well あたり 45  $\mu\text{L}$  ずつ播種した。リガンドは 10 倍濃度を 5  $\mu\text{L}$  ずつ添加した。培養上清 40  $\mu\text{L}$  を分注し、*p*-NPP 溶液 (96-well plate フォーマットと同じ濃度) を 40  $\mu\text{L}$  ずつ加えた。

なお、96-well plate と 384-well plate の well 底面積はそれぞれ、0.32  $\text{cm}^2$  と 0.10 $\text{cm}^2$  である。従って、底面積あたりの細胞数は変わらない。

### ・FlexStation3 のパラメーター

Endpoint

Read Mode

Absorbance  
Wavelengths  
Lm1: 405 nm  
PathCheck  
Off  
Assay Plate Type  
384 Well Standard clrbtm  
Wells To Read  
Read entire plate  
Compound Transfer before Read  
None  
Compound Source  
Triturate  
n/a  
Pipette Tips Layout  
Compound & Tip Columns  
Automix  
Before: 3 secs  
Pre-Read Plate: Off  
AutoCalibrate  
On  
Settling Time  
Off  
Column Wavelength Priority  
Column Priority  
AutoRead  
Off

(4) データ解析 (Fig. 2-4)

1. 細胞プレート (Cell) と培養上清プレート (CM) の各ウェルに対し、AP 反応後の OD405 の増加 ( $\Delta OD405$ ) を算出。(\* 1)

$$\Delta OD405_{\text{Cell}} = \Delta OD405_{\text{Cell}} (1\text{h}) - \Delta OD405_{\text{Cell}} (0\text{h})$$

$$\Delta OD405_{\text{CM}} = \Delta OD405_{\text{CM}} (1\text{h}) - \Delta OD405_{\text{CM}} (0\text{h})$$

\* 1 上記のプロトコール通り行った際に、AP 活性 ( $\Delta\text{OD}405_{\text{Cell}} + \Delta\text{OD}405_{\text{CM}}$ ) は通常 1 前後となる。AP 活性が低い場合は、トランスフェクション条件の検討が必要である。なお、GPCR を過剰発現させると AP 活性が減少することが多い。

2. 培養上清中の AP 活性の割合 ( $\text{AP}_{\text{CM}}$ 、パーセント表記) を算出。

$$\text{AP}_{\text{CM}} = \frac{\Delta\text{OD}405_{\text{CM}}}{\Delta\text{OD}405_{\text{CM}} + \Delta\text{OD}405_{\text{Cell}}} \times 100$$

3. 同一条件のウェルについて、培養上清中の AP 活性の平均値、標準偏差を計算。( \* 2 )

\* 2 標準偏差 (実験誤差) の値は通常 0.8%以内となる (CV 値だと約 4%)。この値が大きい場合、培養上清を移す操作の精度 (色素溶液を用いて検証可能)、細胞数のウェル間のばらつき (AP 活性が目安)、プレートのエッジ効果等を検討する。

4. 刺激群 (Stimulated) の培養上清中の AP 活性の値から、無刺激群 (Vehicle) の培養上清中の AP 活性の値を引き、AP-TGF $\alpha$  放出量を算出。( \* 3 )

$$\text{AP}_{\text{CM}} = \frac{\Delta\text{OD}405_{\text{CM}}}{\Delta\text{OD}405_{\text{CM}} + \Delta\text{OD}405_{\text{Cell}}} \times 100$$

$$\text{APTGF}\alpha \text{ release} = \text{AP}_{\text{CM}} (\text{Stimulated}) - \text{AP}_{\text{CM}} (\text{Vehicle})$$

\* 3  $\text{AP}_{\text{CM}} (\text{Vehicle})$  は通常 8-15%程度となる。この値が高い場合は、細胞の再播種の操作を検討する。

5. リガンド濃度 (x 軸) に対し、AP-TGF $\alpha$  放出量 (y 軸) をプロットし、Dose-response curve を作製した。

6. GraphPad Prism 5 (GraphPad 社製) を用いて、Dose-response curve を 4 パラメーターシグモイド曲線にフィッティングさせ、 $\text{EC}_{50}$  および  $\text{E}_{\text{max}}$  を求めた。

#### 第四節 その他の実験材料・手法

##### 遺伝子操作

発現プラスミドベクターとして pCAGGS ベクターを主に使用した。オリジナルの pCAGGS にマルチクローニングサイト (MCS) を組み込んだベクター (pCAGGS-MCS) と pCAGGS-MCS に FLAG epitope tag を組み込んだベクター (pCAGGS N-FLAG) を用いた。一部の発現ベクターには、pcDNA3, pcDNA3.1 (Life Technologies 社製)、pME-18S を用いた。

オリゴ DNA (プライマー、逆相カラム精製グレード) は Greiner Bio-One 社 (Fasmac 社) で合成した。開始メチオニンが「強い」Kozak 配列となるように、開始メチオニンの直前に GCCACC を付加した

(GCCACCATG、下線はメチオニン)。PCR 反応には PrimeSTAR (タカラバイオ社製; PCR 産物が平滑末端となる) を用いた。基本的に、nested PCR により PCR 産物を増幅させた。制限酵素は主にタカラバイオ

社から購入した。リガーゼ反応には DNA Ligation Kit <Mighty Mix> (タカラバイオ社製) を用いた。リガーゼ反応液をコンピテントセル SCS1 (Stratagene 社製、研究室で増やして再凍結) にトランスフォーメーションし、アンピシリン含有培地で薬剤選択後、大腸菌コロニーを LB 液体培地で増やした。大腸菌からのプラスミド精製 (トランスフェクショングレード) には NucleoBond® Mini (MACHEREY-NAGEL 社製; 得られるプラスミド量は最大 40 µg 程度)、NucleoBond® Midi Plus (1 mg 程度)、NucleoBond® Mega (3 mg 程度) を使用した。一部のプラスミドは、PureYield™ Plasmid Miniprep System (Promega 社製; 20 µg 程度)、HiSpeed Plasmid Midi Kit (QIAGEN 社製; 500 µg 程度)、QIAfilter Plasmid Midi Kit (500 µg 程度) で精製した。

クローニングのテンプレートは次の通りである。

ヒトゲノム DNA : ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC ; クラボウ社製) からゲノム DNA を抽出

ヒト cDNA : Total RNA (FirstChoice® Human Total RNA Survey Panel; Applied Biosystems 社製) から、オリゴ dT<sub>18</sub> プライマーを用いて逆転写反応 (High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits; Applied Biosystems 社製) した産物

マウスゲノム DNA : C57BL/6J マウス (日本クレア) の尻尾からゲノム DNA を抽出した

マウス cDNA : C57BL/6J マウスから Total RNA を抽出し (ISOGEN (ニッポンジーン) または Mammalian Total RNA Miniprep Kit (Sigma-Aldrich 製) を使用)、ヒト cDNA と同様に逆転写反応した産物した  
キメラ Gα サブユニットの作製は、(1) C 末端 7 アミノ酸 (+制限酵素 PvuII 認識サイト) を pCAGGS ベクターに導入、(2) このベクターを PvuII および KpnI で処理、(3) Gα サブユニット骨格 (N 末端から C 末端・8 番目まで) をポリメラーゼ PrimeSTAR (タカラバイオ社製) を用いて増幅し、KpnI で処理、(4) ベクターと Gα サブユニットをライゲーション反応という手順で行った (Fig. 2-5)。この手法を用いると、様々な Gα サブユニットの骨格と C 末端 7 アミノ酸の組み合わせを容易に調製することができる。PvuII の認識配列は CAG|CTG (|は切断部位、平滑末端を生じる) であり、PvuII 処理後に Gα サブユニットの C 末端・7 番目のアミノ酸 Leu のコドンを使用することができる。PrimeSTAR の PCR 断片は平滑末端であるので、PvuII の平滑末端と結合することができる。

GNAQ siRNA に耐性の Gα<sub>q</sub> サブユニットは、6 カ所にサイレント変異が導入するように設計し (Fig. 2-6)、overlap extension PCR 法<sup>50</sup> で作製した。

#### レトロウイルスを用いた安定発現細胞株の作成

レトロウイルスベクター作成用のトランスファーベクターには、pMXs-IG を用いた。このベクターは IRES-EGFP が組み込まれており、目的遺伝子を IRES-EGFP の 5' 側に挿入する。一部遺伝子については、pMX-IG が組み込まれた大腸菌の増えが極めて悪かった。トランスフォーメーション後の大腸菌を塗布した LB アガロース培地を室温 (通常は 37°C) で培養することで、改善が見られた。

作成したトランスファーベクターから、PLAT-E 細胞を用いてレトロウイルスを作成した<sup>51</sup>。このレトロウイルスはげっ歯類の細胞に感染し、ヒト細胞には感染しない。トランスファーベクターをトランスフェクションした PLAT-E 細胞の培養上清 (レトロウイルス含有) を回収した。レトロウイルス含有培養上清を、



ポリブレン法またはレトロネクチン法（タカラバイオ社製）によりマウスまたはラット由来細胞

（McA-RH7777, NIH-3T3, PC12）に感染させた。レトロウイルスが組み込まれた細胞は EGFP の蛍光顕微鏡画像で判断し、発現割合が少ない場合は再度レトロウイルスに感染させた。細胞はポリクローナル集団として扱った。

#### GPCR の膜発現（抗 FLAG® epitope tag 抗体染色によるフローサイトメトリー（FCM））

HEK293 細胞を  $2 \times 10^5/\text{mL}$  の濃度で 12-well plate の 1 well あたり 1 mL（以下、同。必要に応じてスケールアップする）ずつ播種し、培養した。24 時間後、Lipofectamine 2000 Reagent を用いて、次の手順で目的の GPCR（必要に応じて  $G\alpha$  サブユニットも加える）をコードするプラスミドベクターをトランスフェクションした。

1. 1.5 mL チューブに 125  $\mu\text{L}$  Opti-MEM に、500 ng N 末端に FLAG® epitope tag (DYKDDDDK) を有する GPCR (N-FLAG GPCR) 発現ベクターを加えた。 $G\alpha$  サブユニットを使用する場合、250 ng 追加した。
2. 別の 1.5 mL チューブに 125  $\mu\text{L}$  Opti-MEM と 1.25  $\mu\text{L}$  Lipofectamine 2000 Reagent を混合し、室温で 30 分静置した。
3. 1 と 2 を混合し、室温で 20 分静置した。
4. 混合液 250  $\mu\text{L}$  を細胞培養液に加え、穏やかに攪拌し、24 時間培養した。

次の手順で HEK293 細胞を培養プレートから剥がし、染色した。

1. 前日にプラスミドをトランスフェクションした HEK293 細胞の培養液を吸引し、PBS を穏やかに加えた。
2. PBS を吸引し、100  $\mu\text{L}$  Trypsin/EDTA（予め室温に温めておく）を加えた。
3. 200  $\mu\text{L}$  ピペッタープレートが強めに揺らして軽く剥がれた状態を確認して、100  $\mu\text{L}$  Complete DMEM を加えた。1000  $\mu\text{L}$  マイクロピペッターで 4、5 回サスペンドして、V-bottom 96-well plate に移した。
4. プレートをパラフィルムでシールし、プレート対応遠心機で遠心した（2,000 rpm, 1 min, Accel: slow, Decel: slow、以下同）。
5. 上清を捨て、200  $\mu\text{L}$  PBS を加え（1 well あたり、以下同）、再度遠心した。
6. 上清を捨て、パラフィルムでシールし、軽く Vortex を行い細胞ペレットを崩した。
7. 50  $\mu\text{L}$  FCM buffer を加え、軽くサスペンドし、パラフィルムでシールした後、on ice で 30 分間静置した。
8. 遠心後、FCM buffer を捨て、パラフィルムでシールし、軽く Vortex を行い細胞ペレットを崩した。anti-DYKDDDDK 抗体（10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  となるように FCM buffer で希釈; Clone 2H8, Transgenic, cat. #）を 25  $\mu\text{L}$  加え、軽くサスペンドし、パラフィルムでシールした後、シェーカーの上で 30 分間揺らした（室温）。
9. 200  $\mu\text{L}$  PBS を加え、遠心し、上清を捨て、再度 200  $\mu\text{L}$  PBS を加えた（洗浄）。
10. 遠心後、上清を捨て、パラフィルムでシールし、軽く Vortex を行い細胞ペレットを崩した。anti-mouse IgG conjugated with Alexa 488 抗体（10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  となるように FCM buffer で希釈; Molecular Probes 社

製, cat. #) を 25  $\mu$ L 加え、軽くサスペンドし、パラフィルムでシールした後、シェーカーの上で 15 分間揺らした (室温)。

11. 200  $\mu$ L PBS を加え、遠心し、上清を捨て、パラフィルムでシールし、軽く Vortex を行い細胞ペレットを崩した。再度 200  $\mu$ L PBS を加えた (洗浄)。

12 遠心後、上清を捨て、パラフィルムでシールし、軽く Vortex を行い細胞ペレットを崩した。再度 200  $\mu$ L PBS を加え、軽くサスペンドした。

13 FCM (Sony) で Alexa 488 の蛍光を測定した (20,000 細胞を測定)。

#### FCM buffer の組成

Milli-Q water	44 mL
10X PBS	5 mL
Goat Serum (0.45 $\mu$ m filterated)	1 mL (final 2% (w/v))
20% (w/v) NaN <sub>3</sub>	250 $\mu$ L (final 0.1%)

#### 定量 PCR

HEK293 細胞を 12-well plate に  $1 \times 10^5$ /well 播種し、24 時間後に siRNA をトランスフェクションし、48 時間後に Mammalian Total RNA Miniprep Kit (Sigma-Aldrich 製) を用いて total RNA を抽出した。抽出した RNA 量は 1 well (12-well plate) あたり 10-15  $\mu$ g であった。total RNA は Random プライマーを用いて逆転写 (High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits; Applied Biosystems 社製) した。逆転写産物は、MilliQ water で 10 倍に希釈した。定量 PCR の反応液の組成は、1 well (96-well plate) あたり、

SYBR® Premix Ex Taq™ (TakaraBio) 5  $\mu$ L

ROX Reference Dye (TakaraBio) 0.2  $\mu$ L

Primer mix (5  $\mu$ M each\*) 2  $\mu$ L

cDNA (1:10 dilution) 3  $\mu$ L

\* Primer stock forward (100  $\mu$ M) 5  $\mu$ L

Primer stock reverse (100  $\mu$ M) 5  $\mu$ L

MilliQ water 990  $\mu$ L

である。

PCR 反応は Applied Biosystems 7300 (Life Technologies 社製) を用い、以下の条件で行った。

Stage 1: Denature

Reps: 1

95°C 30 sec

Stage 2: PCR

Reps: 40

95°C 5 sec

60°C 31 sec

### Stage 3: Melt Curve

Reps: 1

95°C 15 sec

60°C 1 min

95°C 15 sec

定量 PCR 用プライマーは、オンラインプライマー設計アプリケーション **Primer3**

(<http://bioinfo.ut.ee/primer3/>) もしくは **Primer-BLAST**

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) を用いて設計した。プライマー配列は Table 2-1 にまとめた。

### 細胞内 Ca<sup>2+</sup>流入検出 (Ca<sup>2+</sup>アッセイ)

#### (1) HEK293 細胞へのプラスミドベクタートランスフェクション

HEK293 細胞を継代する際に、 $2 \times 10^5$ /mL の濃度で 60 mm dish あたり 4 mL (以下、同。必要に応じてスケールアップする) ずつ播種し、培養した。24 時間後、Lipofectamine 2000 Reagent を用いて、次の手順で目的の GPCR (必要に応じて G $\alpha$  サブユニットも加える) をコードするプラスミドベクターをトランスフェクションした。

1. 1.5 mL チューブに 500  $\mu$ L Opti-MEM に、2  $\mu$ g GPCR を加えた。G $\alpha$  サブユニットを使用する場合、0.4  $\mu$ g 追加した。
2. 別の 1.5 mL チューブに 500  $\mu$ L Opti-MEM と 5  $\mu$ L Lipofectamine 2000 Reagent を混合し、室温で 30 分静置した。
3. 1 と 2 を混合し、室温で 20 分静置した。
4. 混合液 1000  $\mu$ L を細胞培養液に加え、穏やかに攪拌し、24 時間培養した。

#### (2) 細胞の再播種とリガンド刺激

以下の手順で HEK293 細胞を 96-well plate (half-area, black, clear bottom; Greiner Bio-One, cat. # 675097) に再播種する。

1. 前日にプラスミドをトランスフェクションした HEK293 細胞の培養液を吸引し、PBS を穏やかに加えた。
2. PBS を吸引し、1 mL Trypsin/EDTA (予め室温に温めておく) を加えた。
3. プレートが強めに揺らして軽く剥がれた状態を確認して、2 mL Complete DMEM を加えた。5 mL マイクロピペッターで 2、3 回サスペンドして 15 mL チューブに移した。細胞懸濁液を一部 (~40  $\mu$ L) 取り、細胞数濃度をカウントした。
4. 遠心 (190 x g、5 分) 後、上清を吸引し、6 mL PBS を加えた。
5. 10 分静置し、遠心 (190 x g、5 分) し、上清を吸引した。6.3 x 10<sup>5</sup> cells/mL となるように HBSS を加

え、5 mL マイクロピペッターで2、3回サスペンドした。

6. 12連電動マルチチャンネルピペット(最大容量 1200  $\mu$ L、吸引速度 2、排出速度 1 に設定)を用いて、96-well plate に1 ウェルあたり 80  $\mu$ L ずつ播種した ( $5.0 \times 10^4$  cells/well)。

7. Calcium 5 (Molecular Devices 社製) 2 mL に 1 M Probenecid ( ) 100  $\mu$ L を混合した  $\text{Ca}^{2+}$  蛍光指示薬を1 ウェルあたり 20  $\mu$ L ずつ播種した。

8. 室温で10 分間静置し、細胞が底面に均一に沈むのを待って、37°C  $\text{CO}_2$  インキュベーターに入れ、15 分培養した。

9. 37°C に加温しておいたリキッドトランスファーシステム搭載リアルタイム蛍光測定器 FlexStation3 (Molecular Devices 社製) に設置し、5 分間静置した。

10. 5 倍濃度のリガンドプレートを設置し、リガンド 25  $\mu$ L を添加しながら蛍光を測定した。FlexStation3 のパラメーターは以下の通りである。

Flex

Read Mode

Fluorescence

Bottom read

Wavelengths

Lm1: Excitation 485 nm, Emission 525 nm, Cutoff Auto (515 nm)

Sensitivity

Reads: 6

PMT Sensitivity: Medium

Timing

Run Time: 60 secs

Interval: 1.52 secs

Assay Plate Type

96 Well Greiner blk/clrbtm

Wells To Read

Read entire plate

Compound Transfer

Initial Volume: 200  $\mu$ L

Transfers: 1

Pipette Height: 200  $\mu$ L

Volume: 25.0  $\mu$ L

Rate: 1 (~16  $\mu$ L/sec)

Time Point: 18 secs

Leave tips on between columns (on only if necessary)

## Compound Source

Costar 96 Ubtm clear .3 mL

## Triturate

Compound Source: On

Volume: 25  $\mu$ L

Cycles: 1

Assay Plate: Off

## Pipette Tips Layout

### Compound & Tip Columns

## Automix

Before: Off

## AutoCalibrate

On

## Settling Time

Off

## Column Wavelength Priority

Column Priority

## AutoRead

Off

アンタゴニストアッセイの場合、10倍濃度のアンタゴニスト 12.5  $\mu$ L を添加し、続けて10倍濃度のアゴニスト 12.5  $\mu$ L を添加した。FlexStation3のパラメーターは次の通りである（上記の変更部分のみ）。

## Timing

Run Time: 100 secs

Interval: 1.52 secs

## Compound Transfer

Initial Volume: 200  $\mu$ L

Transfers: 1

Pipette Height: 200  $\mu$ L

Volume: 12.5  $\mu$ L

Rate: 1 (~16  $\mu$ L/sec)

Time Point: 18 secs

Transfers: 2

Pipette Height: 230  $\mu$ L

Volume: 12.5  $\mu$ L

Rate: 1 (~16  $\mu$ L/sec)

Time Point: 54 secs

Leave tips on between columns: Off

### アクチンストレスファイバー形成

レトロウイルスにより P2Y10 (マウス由来) を安定発現させた McA-RH7777 細胞を Collagen Type I (新田ゼラチン社製) コートした 24-well plate に 1 well あたり  $2.5 \times 10^4$  細胞ずつ播種した。コントロール細胞として、空ベクター由来 (pMXs-IG) のレトロウイルスを感染させた細胞を用いた。培養 24 時間後、上清を除去し、接着した細胞を PBS で 1 度洗浄した。目的の化合物が入った DMEM (0.01% (v/w) BSA、血清不含有) を添加し、1 時間 37°C incubator で培養した。細胞を 3.7%ホルムアルデヒドで固定し、0.5% (w/w) Triton X-100-PBS で膜透過後、Alexa 594-conjugated phalloidin (Life Technologies 社製、1.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) と DAPI (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) を含有した 3% BSA-PBS で染色した。細胞を洗浄後、共焦点顕微鏡 (Zeiss LSM 7000, Carl Zeiss 社製) で蛍光画像を観察した。

### アライメントと系統樹作製

アミノ酸配列のアライメントは、オンラインアプリケーション Clustal W Version 2.1 (<http://clustalw.ddbj.nig.ac.jp/index.php?lang=ja>) を使用した。アミノ酸配列のアライメント表示には GenetyxMac version 13.1.6 を使用した。系統樹の作成には、フリーアプリケーション FigTree v1.3.1 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>) を使用した。

## 第五節 容量反応曲線とパラメーターの理論的背景

容量反応 (作用) 曲線の  $EC_{50}$  を比較するだけでは不十分であることが指摘されている<sup>52,53</sup>。最近、 $E_{\max}$  と  $EC_{50}$  の比 ( $E_{\max}/EC_{50}$ ) およびその相対値が、Intrinsic relative activity ( $RA_i$ ) を表す有用なパラメーターとして広く受け入れられつつある。ここでは、その理論背景と数値計算例 (Fig. 2-7, 2-8, 2-9, 2-10) を以下記載する。

Dose-response curve は 4 つのパラメーター ( $E_{\max}$ ,  $EC_{50}$ ,  $n$ ,  $P$ ) により決定される  $R = f(X)$  の関数である。すなわち

$$R = \frac{X^n \cdot E_{\max}}{X^n + EC_{50}^n} + P$$

パラメーター

$X$ : 化合物濃度、 $R$ : 作用 (AP-TGF $\alpha$  切断量)

$E_{\max}$ : 最大反応、 $EC_{50}$ : 50%効果濃度、 $n$ : Hill 係数、 $P$ : 定常値

TGF $\alpha$  切断アッセイにおいて、 $n \approx 1$ ,  $P \approx 0$  の値を示すことが多い。

一方、Operational model において (ここで定常値  $P = 0$  とする)、

$$S = \frac{X \cdot \varepsilon_X \cdot R_T}{X + K_X}$$

X : 化合物濃度、R<sub>T</sub> : 受容体濃度、K<sub>X</sub> : 解離定数 (dissociation constant)

ε<sub>X</sub> (epsilon) : 内因活性 (intrinsic activity)

$$R = \frac{S^m \cdot M_{\text{sys}}}{S^m + K_E^m}$$

M<sub>sys</sub> : 反応系の最大応答値、K<sub>E</sub> : 反応系の感度 (sensitivity of stimulus-response function)、m : 変換係数 (transducer slope factor、Hill 係数とは必ずしも一致しない)

$$R = \frac{X^m \cdot M_{\text{sys}}}{X^m + \frac{(X + K_X)^m}{\tau_X^m}} = \frac{M_{\text{sys}}}{1 + \left(1 + \frac{K_X}{X}\right)^m \tau_X}$$

$$\tau_X = \frac{\varepsilon_X \cdot R_T}{K_E}$$

パラメーター

X : 化合物濃度

τ<sub>X</sub> : 効率 (efficacy)、m : 変換係数 (transducer slope factor)

K<sub>X</sub> : 解離定数 (dissociation constant)、M<sub>sys</sub> : 反応系の最大応答値

従って、Operational model における R = g(X) の関数から、決定されるパラメーターは 3 種類 (τ<sub>X</sub>, m, M<sub>sys</sub>、このうち M<sub>sys</sub> は複数のアゴニストで共通) である。K<sub>X</sub> は競合阻害実験で推定可能であり、

$$K_X = \frac{I_X}{CR - 1}$$

パラメーター

I<sub>X</sub> : 競合阻害実験の化合物 X の濃度

CR : ラベル体リガンドの EC<sub>50</sub> (化合物 X 存在下) / ラベル体リガンドの EC<sub>50</sub> (化合物 X 非存在下)

RA<sub>i</sub> の定義

$$RA_i = \frac{\left(\frac{\varepsilon_X}{K_X}\right)}{\left(\frac{\varepsilon_{\text{std}}}{K_{\text{std}}}\right)}$$

パラメーター

ε<sub>X</sub>, ε<sub>std</sub> (epsilon) : 内因活性の観測値 (observed intrinsic activity)

K<sub>X</sub>, K<sub>std</sub> : 乖離定数の観測値 (observed dissociation constant)

同じ GPCR 発現細胞において、受容体発現量  $R_T$  と反応系感度  $K_E$  は共通であるので、

$$RA_i = \frac{\left(\frac{\tau_X}{K_X}\right)}{\left(\frac{\tau_{std}}{K_{std}}\right)}$$

変換係数  $m$  が 1 に等しい ( $m = 1$ ) 場合、Hill 係数が 1 となり ( $n = 1$ )、

$$RA_i = \frac{\left(\frac{E_{max}^X}{EC_{50}^X}\right)}{\left(\frac{E_{max}^{std}}{EC_{50}^{std}}\right)}$$

上記は、Hill 係数が 1 でない場合も、両者が等しく ( $n_X = n_{std}$ ) かつ  $E_{max}$  が等しければ ( $E_{max}^X = E_{max}^{std}$ ) 適応可能。

なお、この際、

$$E_{max} = \frac{\tau_X \cdot M_{sys}}{\tau_X + 1}$$

$$EC_{50} = \frac{K_X}{\tau_X + 1}$$

$$\frac{E_{max}^X}{EC_{50}^X} = \frac{\tau_X \cdot M_{sys}}{K_X}$$

$$\tau_X = \frac{K_X \cdot E_{max}^X}{M_{sys} \cdot EC_{50}^X}$$

次に、GPCR とキメラ  $G\alpha$  サブユニット ( $G\alpha_A$  と  $G\alpha_B$  を比較) を共発現させ、同一のアゴニスト  $X$  で刺激する場合を考える。解離定数  $K_X$  と内因活性  $\epsilon_X$  は共通であり、キメラ  $G\alpha$  サブユニットは GPCR の発現量はほとんど影響を与えない (結果に記載) く、受容体発現量  $R_T$  も一定であるので、

$$\frac{\tau_{XB}}{\tau_{XA}} = \frac{\left(\frac{\epsilon_{XB} \cdot R_{TB}}{K_{EB}}\right)}{\left(\frac{\epsilon_{XA} \cdot R_{TA}}{K_{EA}}\right)} = \frac{K_{EA}}{K_{EB}}$$

$E_{max}/EC_{50}$  の比を表すパラメーター  $RA_i'$  を

$$RA_i' = \frac{\left(\frac{E_{max}^B}{EC_{50}^B}\right)}{\left(\frac{E_{max}^A}{EC_{50}^A}\right)}$$



と定義する。

$$RA'_i = \frac{\left(\frac{\tau_{XB} \cdot M_{sysB}}{K_{XB}}\right)}{\left(\frac{\tau_{XA} \cdot M_{sysA}}{K_{XA}}\right)} = \frac{\left(\frac{M_{sysB}}{K_{EB}}\right)}{\left(\frac{M_{sysA}}{K_{EA}}\right)}$$

さらに

$$M_{sysA} = M_{sysB}$$

を仮定すると

$$RA'_i = \frac{K_{EA}}{K_{EB}}$$

すなわち、 $E_{max}$  と  $EC_{50}$  の比の相対値を求めることで、キメラ Gα サブユニット共発現による反応系感度  $K_E$  の相対値を求めることができる。

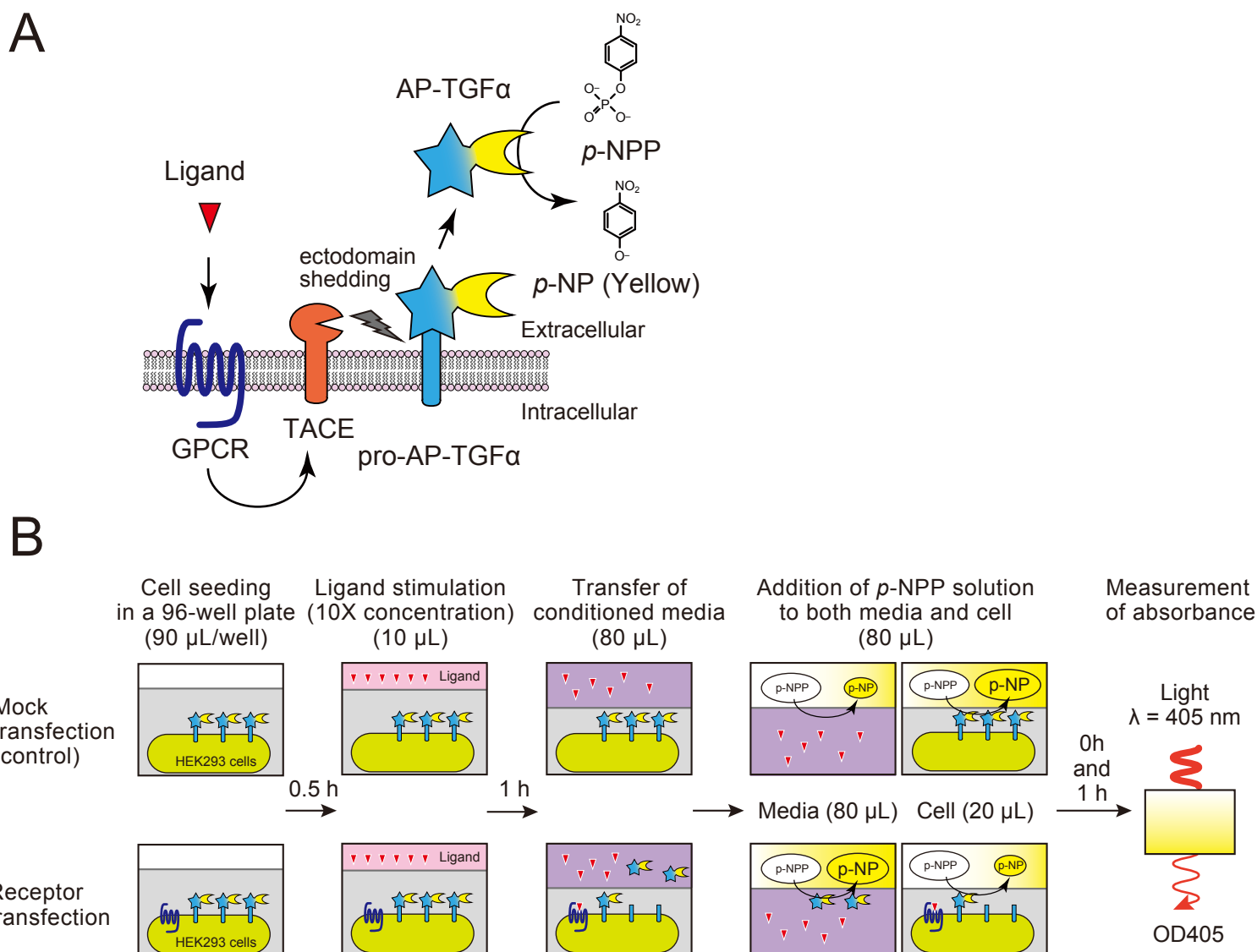


Fig.2-1 TGFα切断アッセイの原理と手法

(A) TGFα切断アッセイの原理。GPCR シグナルの下流で膜型プロテアーゼ TACE が活性化され、膜貫通前駆体 AP-TGFα(pro-AP-TGFα) のエクドメイン切断を引き起こす。遊離 AP-TGFα量 (すなわち AP-TGFα切断量) は、培養上清の AP 活性を p-NPP を基質とした呈色反応で定量される。(B) TGFα切断アッセイの手法。AP-TGFαのみを発現細胞させた細胞 (Mock) と AP-TGFαと GPCR を発現させた細胞 (Receptor) をそれぞれ調製し、96-well plate に播種し、30 分間培養する。リガンドを添加し、さらに1時間培養する。上清を別の 96-well plate に移し、p-NPP 溶液を加える。AP 反応 1 時間の前後にマイクロプレート対応吸光度計で OD405 を測定する。

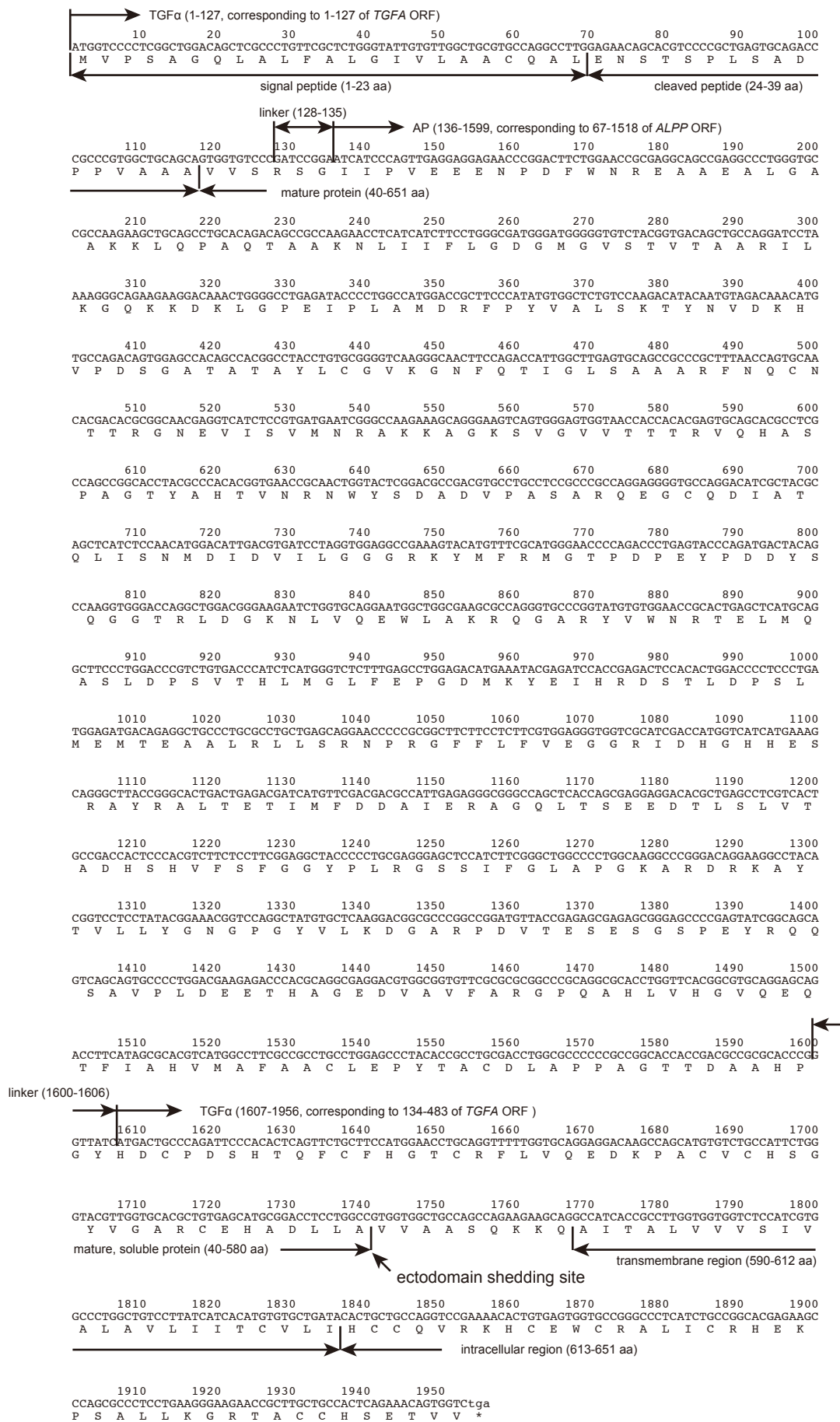
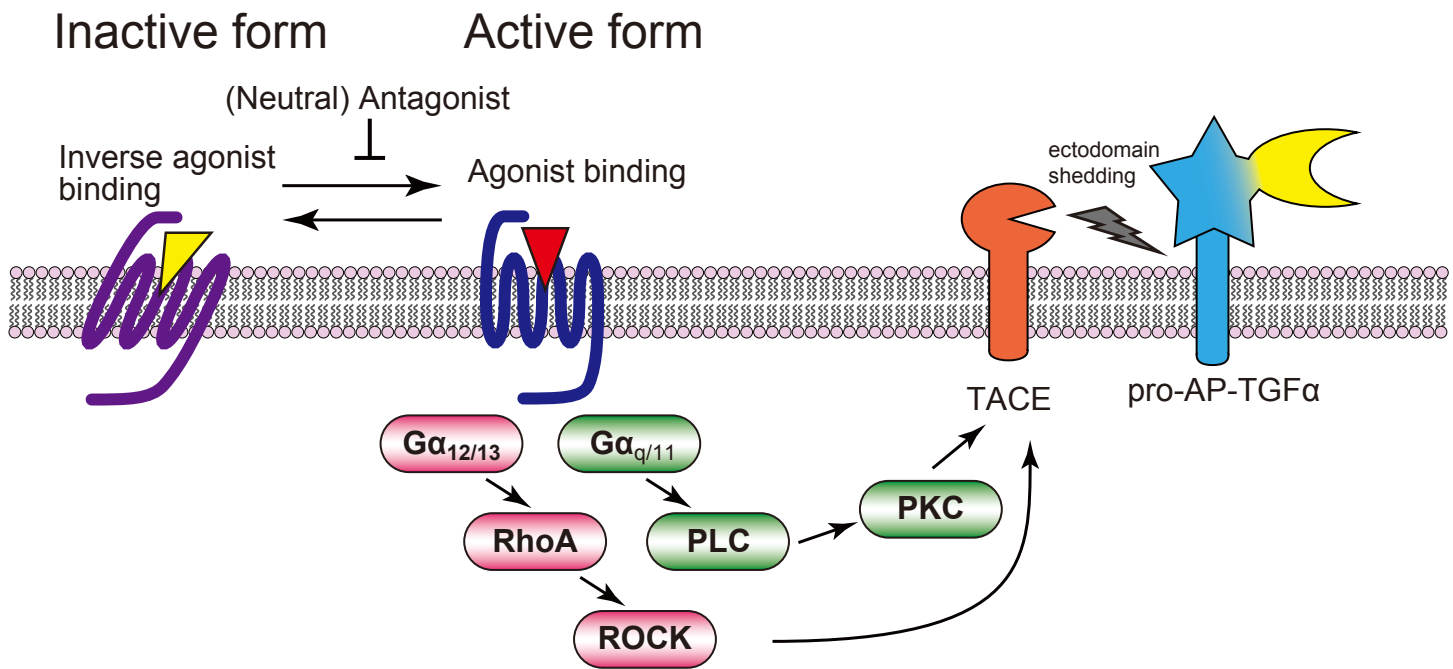


Fig.2-2 AP-TGFαの構造

本研究に用いた AP-TGFαコンストラクトは、最初に報告された<sup>48</sup> アルカリホスファターゼ融合 EGF ファミリーのコンストラクト (HB-EGF の N 末配列) と異なり、TGFαの N 末配列が使用されている。TGFαの N 末配列を持つコンストラクトの方が AP-TGFαの発現効率が低い (愛媛大・医・東山繁樹教授、私信)。細胞膜 (Plasma membrane) 上に輸送された AP-TGFαは 40-651 アミノ酸 (amino acids, aa) を持つ。TACE により切断された遊離型 AP-TGFαは 40-580 アミノ酸となる。

A



B

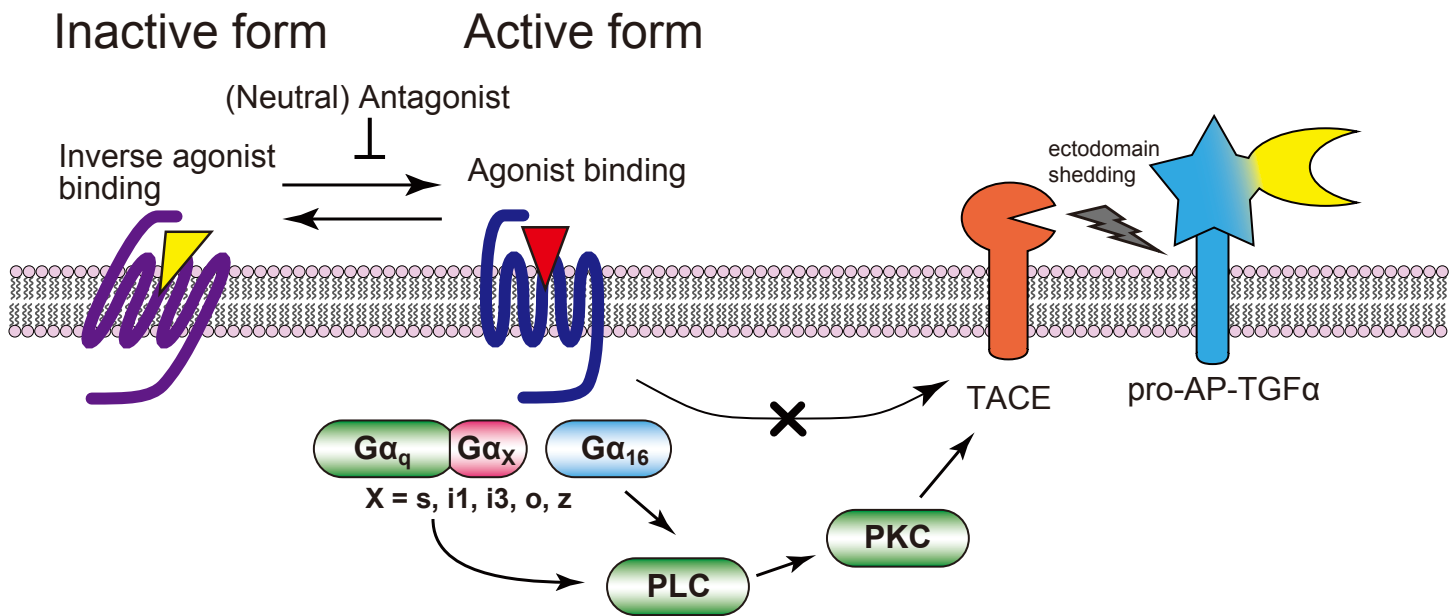


Fig.2-3 TGF $\alpha$ 切断アッセイのメカニズム

(A) G $\alpha_{q/11}$  共役型受容体および G $\alpha_{12/13}$  共役型受容体の場合。G $\alpha_{q/11}$  シグナルは PLC-PKC 経路を介して TACE の活性化と膜貫通前駆体 AP-TGF $\alpha$ (pro-AP-TGF $\alpha$ ) のエクドメイン切断を引き起こす。G $\alpha_{12/13}$  シグナルは RhoA-ROCK 経路を介して pro-AP-TGF $\alpha$ のエクドメイン切断を引き起こす。Inverse agonist は GPCR の平衡状態を不活性型に傾け、Neutral antagonist は平衡状態に影響を与えずリガンド結合を阻害する。(B) G $\alpha_s$  共役型受容体および G $\alpha_{i/o}$  共役型受容体の場合。共発現させた G $\alpha$ サブユニット (キメラまたは G $\alpha_{16}$ ) が GPCR により活性化されると、PLC-PKC 経路を介して pro-AP-TGF $\alpha$ のエクドメイン切断が誘導される。

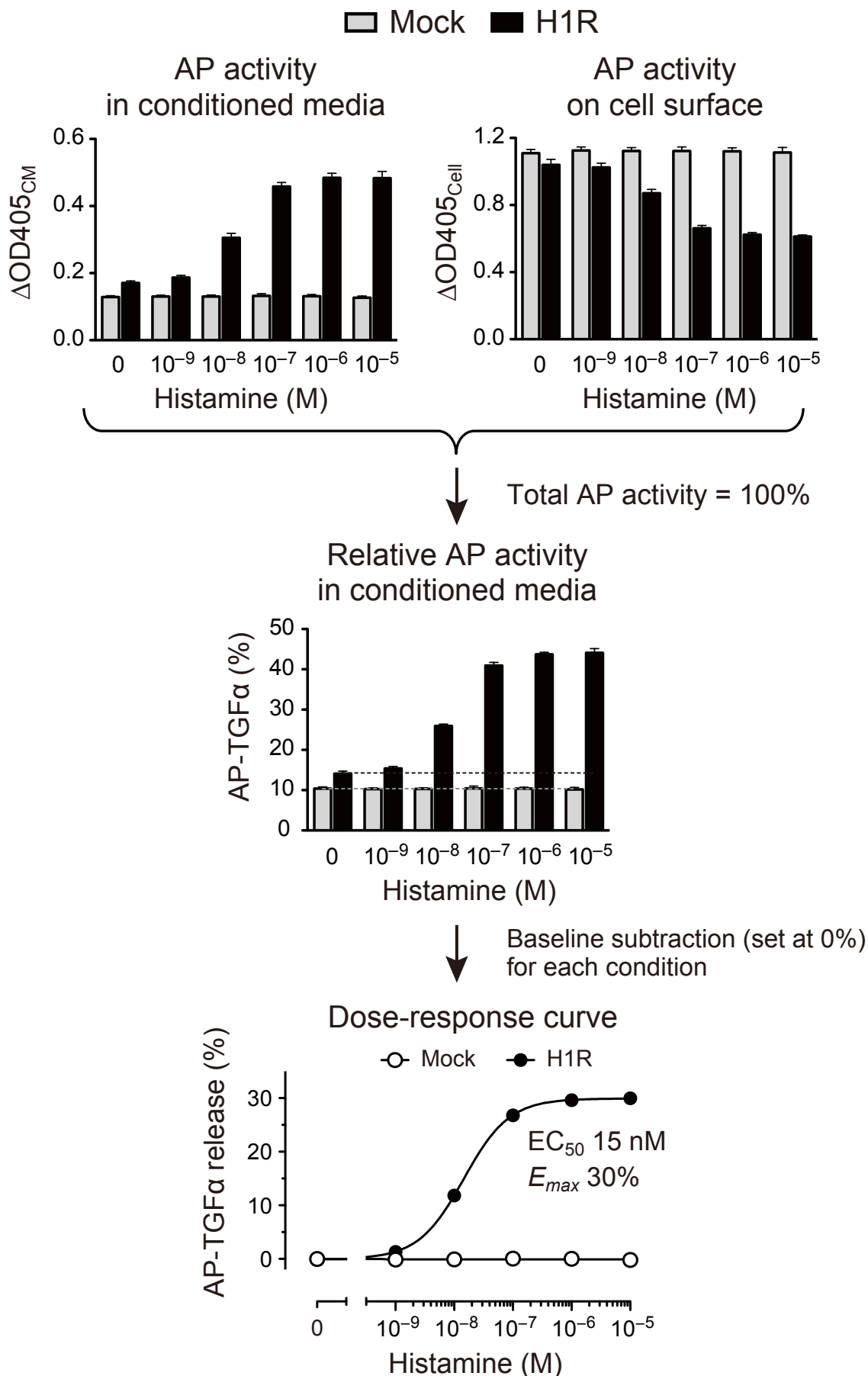


Fig.2-4 データ解析の手順

AP-TGF $\alpha$ のみを発現細胞させた細胞 (Mock) と AP-TGF $\alpha$ とヒスタミン H1R を発現させた細胞 (H1R) のデータ例。プロトコールに記載された手法で、培養上清プレート (AP activity in conditioned media) と細胞プレート (AP activity on cell surface) の吸光度を測定する。次に、培養上清の AP 活性の割合 (Relative AP activity in conditioned media) を算出する。Mock と H1R について、それぞれ無刺激群 (0 M Histamine) の値 (dotted lines) を引き算し、AP-TGF $\alpha$ 放出量を算出する。このプロットに対し、four-parameter sigmoid curve をフィットさせることで、容量反応曲線を得る (Dose-resopnse curve)。EC<sub>50</sub> と E<sub>max</sub> は four-parameter sigmoid curve から算出される。

## Procedure of pCAGGS/Gaq/s construction

1. Digestion of pCAGGS-MCS (A) with EcoRI and XhoI
2. Ligation with linker oligo nucleotides encoding 7 C-terminal amino acids (B, underlined)
3. Digestion of pCAGGS/Gas-C (B) with KpnI and PvuII  
(Note that PvuII (recognition sequence: CAG|CTG) produces a blunt end)
4. PCR amplification of the Gaq fragment (C) and digestion with KpnI  
(Note that we used PrimeStar™ polymerase, which does not add an adenine at the 3' end)
5. Ligation of the digested Gaq fragment with the digested pCAGGS/Gas-C (D)

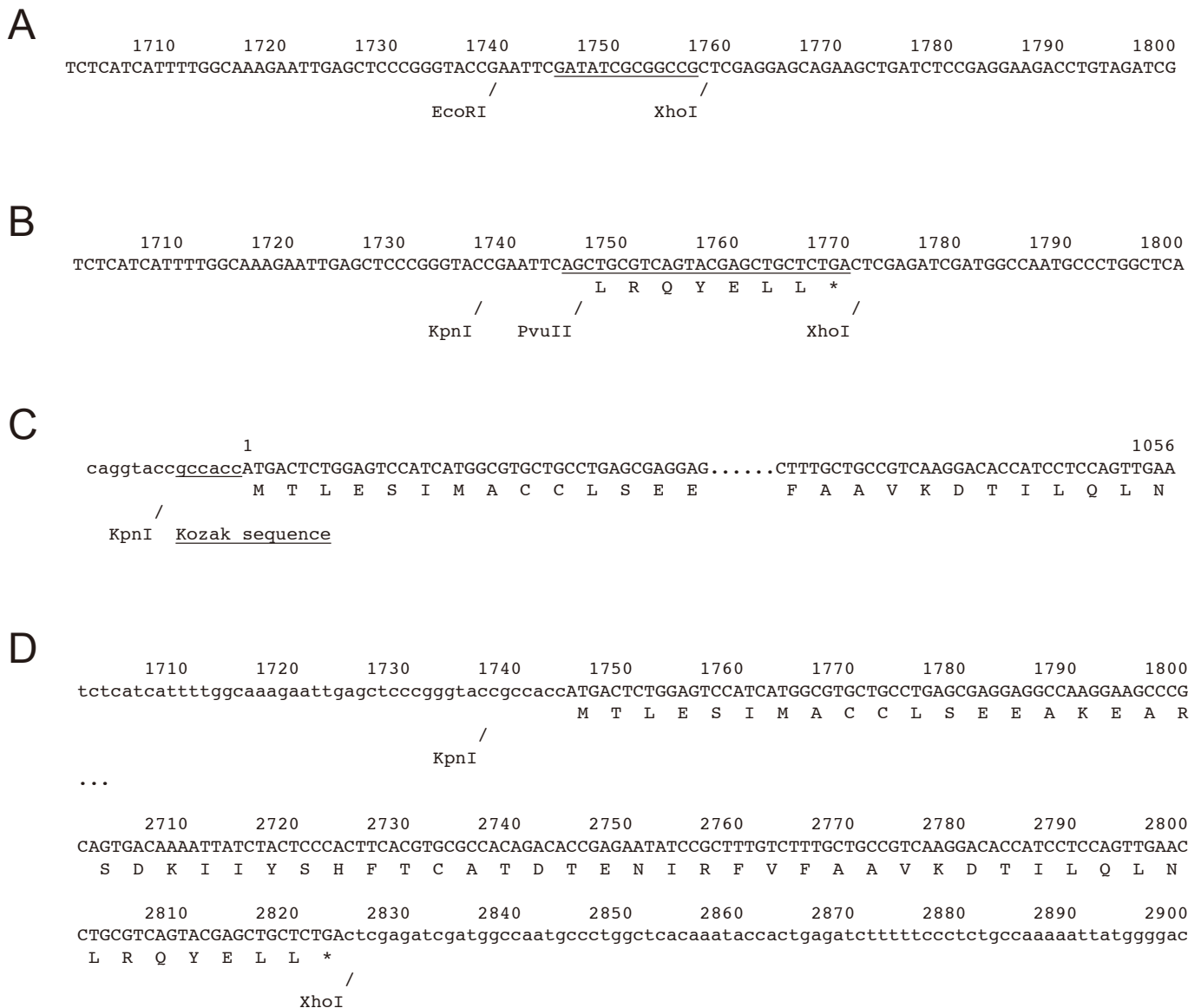


Fig.2-5 キメラ Gaサブユニットの作製手順

代表例として Ga<sub>q/s</sub> の作製手順を示す。他のキメラ Gaサブユニットも同様である。C 末端 7 アミノ酸配列を組み込んだ pCAGGS ベクターと Gaサブユニット骨格を組み合わせることで、任意のキメラ Gaサブユニットを作製可能である。

```

10      20      30      40      50      60      70      80      90      100
ATGACTCTGGAGTCCATCATGGCGTGTGCTGCTGAGCGAGGAGGGCCAAGGAAGCCCGCGGATCAACGACGAGATCGAGCGGAGCTCCGCAGGGACAAAGC
M T L E S I M A C C L S E E A K E A R R I N D E I E R Q L R R D K

110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
GGGACGCCCCCGGAGCTCAAGCTGCTGCTGCTCGGGACAGGAGAGAGTGGCAAGAGTACGTTTATCAAGCAGATGAGAATCATCCATGGGTCAGGATA
R D A R R E L K L L L L G T G E S G K S T F I K Q M R I I H G S G Y

210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
CTCTGATGAAGATAAAAGGGGCTTACCAAGCTGGTGTATCAGAACATCTTCACGGCCATGCAGGCCATGATCAGAGCCATGGACACACTCAAGATCCCA
S D E D K R G F T K L V Y Q N I F T A M Q A M I R A M D T L K I P

310     320     330     340     350     360     370     380     390     400
TACAAGTATGAGCACAATAAGGCTCATGCACAATTAGTTTCAGAGAAGTTGATGTGGAGAAGGTGCTGCTTTTGAGAAATCCATATGTAGATGCAATAAGA
Y K Y E H N K A H A Q L V R E V D V E K V S A F E N P Y V D A I K

410     420     430     440     450     460     470     480     490     500
GTTTATGGAATGATCCTGGAATCCAGGAATGCTATGATAGACGACGAGAATATCAATTATCTGACTCTACCAAATACTATCTTAATGACTTGGACCGCGT
S L W N D P G I Q E C Y D R R R E Y Q L S D S T K Y Y L N D L D R V

510     520     530     540     550     560     570     580     590     600
AGCTGACCCCTGCCTACCTGCTACGCAACAAGATGTGCTTAGAGTTCGAGTCCCCACCACAGGGATCATCGAATACCCCTTTGACTTACAAAGTGTCAAT
A D P A Y L P T Q Q D V L R V R V P T T G I I E Y P F D L Q S V I

610     620     630     640     650     660     670     680     690     700
TTCAGAATGGTCGATGTAGGGGGCCAAAGGTCAGAGAGAAGAAAATGGATACACTGCTTTGAAAATGTCACCTCTATCATGTTTCTAGTAGCGCTTAGTG
F R M V D V G G Q R S E R R K W I H C F E N V T S I M F L V A L S

710     720     730     740     750     760     770     780     790     800
AATATGATCAAGTTCTCGTGGAGTCAGACAATGAGAACCGAATGGAGGAAAGCAAGGCTCTCTTTAGAACAAATATCACATACCCCTGGTTCAGAACTC
E Y D Q V L V E S D N E N R M E E S K A L F R T I I T Y P W F Q N S

810     820     830     840     850     860     870     880     890     900
CTCGTTATCTGTCTTTAAACAAGAAAGATCTTCTAGAGGAGAAAATCATGTATCCCATCTAGTCGACTACTTCCCAGAATATGATGGACCCAGAGA
S V I L F L N K K D L L E E K I M Y S H L V D Y F P E Y D G P Q R

910     920     930     940     950     960     970     980     990     1000
GATGCCAGGCAGCCCGAGAATTCATTCTGAAGATGTTCTGTTGACCTGAACCCAGACAGTGACAAAATTATCTACTCCACTTCACGTGCGCCACAGACA
D A Q A A R E F I L K M F V D L N P D S D K I I Y S H F T C A T D

1010    1020    1030    1040    1050    1060    1070    1080
CCGAGAATATCCGCTTTGTCTTTGCTGCGCTCAAGGACACCATCTCCAGTTGAACCTGAAGGAGTACAATCTGGTCTAA
T E N I R F V F A A V K D T I L Q L N L K E Y N L V *

```

WT GNAQ (Original construct)

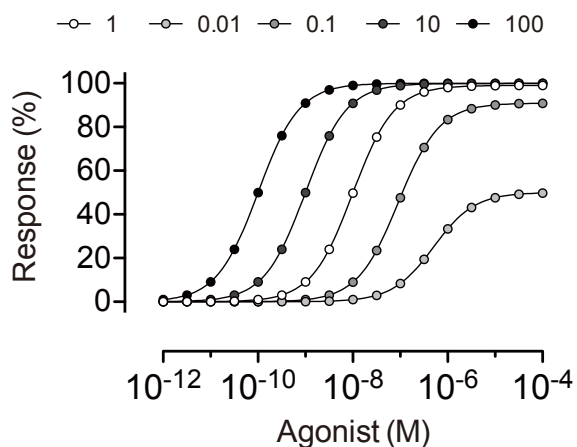
142 GGAGAGAGTGGCAAGAGTACGTTTA 166  
G E S G K S T F

Silent mutated GNAQ (Escape construct)

142 GGGGAGAGCGGAAAGAGCACCTTCA 166  
G E S G K S T F

Fig.2-6  $G\alpha_q$  サイレント変異 (GNAQ RNAi 耐性) コンストラクト

GNAQ siRNA (#1) 存在下、 $G\alpha_q$  (キメラ  $G\alpha$ サブユニット) を発現させる目的のコンストラクト。枠で囲った部分が GNAQ siRNA (#1) 標的配列である。6カ所にサイレント変異を導入した。



### Effects of $\epsilon$

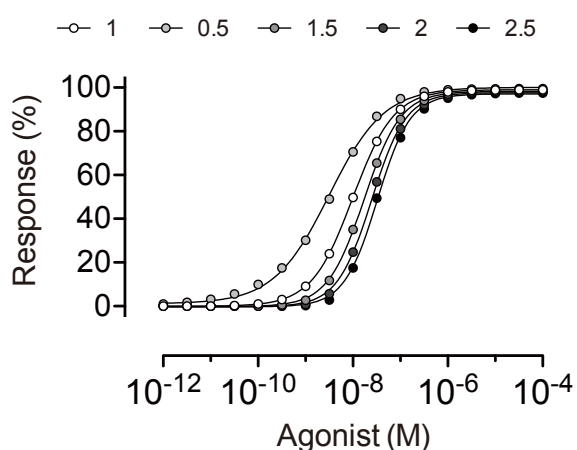
$$m = 1$$

$$K_X = 1 \mu\text{M}$$

$$K_E = 0.01$$

$$R_T = 1$$

$\epsilon$	$RA_i$	Relative $E_{max}/EC_{50}$	$EC_{50}$ (nM)	$E_{max}$ (%)	Hill
1	1	1	9.90	99.0	1.000
0.01	0.01	0.01	500	50.0	1.000
0.1	0.1	0.1	90.9	90.9	1.000
10	10	10	0.999	99.9	1.000
100	100	100	0.100	100	1.000



### Effects of $m$

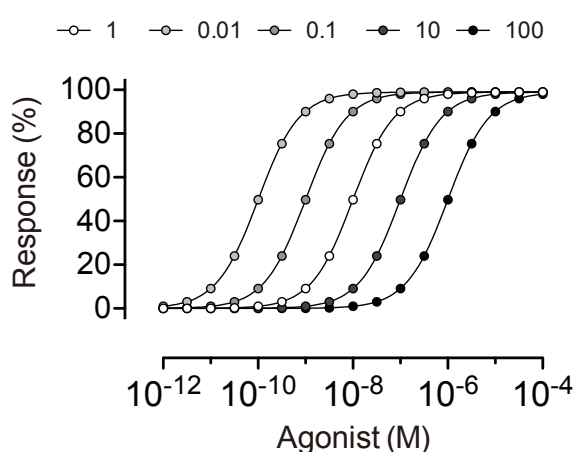
$$\epsilon = 1$$

$$K_X = 1 \mu\text{M}$$

$$K_E = 0.01$$

$$R_T = 1$$

$m$	$RA_i$	Relative $E_{max}/EC_{50}$	$EC_{50}$ (nM)	$E_{max}$ (%)	Hill
1	1	1	9.90	99.0	1.000
0.5	1	3.17	3.12	99.0	0.748
1.5	1	0.570	17.3	98.5	1.125
2.0	1	0.395	24.8	98.0	1.198
2.5	1	0.301	32.4	97.4	1.246



### Effects of $K_X$

$$\epsilon = 1$$

$$m = 1$$

$$K_E = 0.01$$

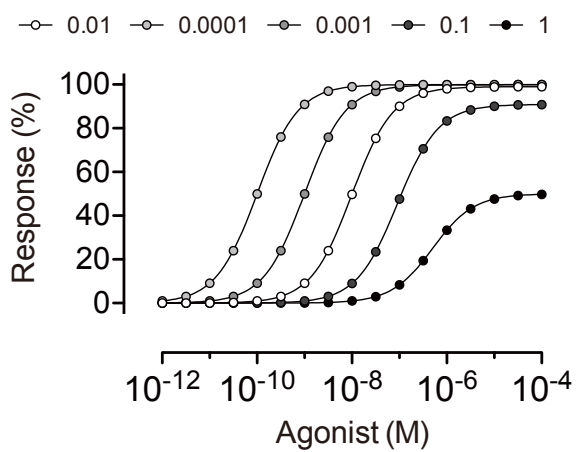
$$R_T = 1$$

$K_X$	$RA_i$	Relative $E_{max}/EC_{50}$	$EC_{50}$ (nM)	$E_{max}$ (%)	Hill
1	1	1	9.90	99.0	1.000
0.01	100	100	0.0990	99.0	1.000
0.1	10	10	0.990	99.0	1.000
10	0.1	0.1	99.0	99.0	1.000
100	0.01	0.01	990	99.0	1.000

Fig.2-7 Operational Model のパラメーター $\epsilon$ ,  $m$ ,  $K_X$  による影響 ( $K_E = 0.01$ )

シグナル増幅効率の高い ( $K_E = 0.01$ ) アッセイ系 (GPCR 活性から遠位のイベント) を想定。Operational Model のパラメーターのうち、(A)  $\epsilon$  (内因活性、intrinsic activity) (B)  $m$  (変換係数、transducer slope factor) (C)  $K_X$  (解離定数、dissociation constant) の値による容量反応曲線およびシグモイド曲線のパラメーターの変化。リガンドが異なる場合やリガンドは同じで GPCR とキメラ  $G\alpha$  サブユニットの共役能が異なる場合が想定条件である。 $RA_i$  (Intrinsic relative activity) と Relative  $E_{max}/EC_{50}$  は、 $\epsilon$  や  $K_X$  の値には依存せず完全に一致する。一方、 $RA_i$  と Relative  $E_{max}/EC_{50}$  は、 $m$  の値に依存する。 $m \neq 1$  の場合も、各リガンドの容量反応曲線の Hill slope が一定 ( $m$  の値が一定とほぼ同じ) かつ  $E_{max}$  が一定であれば、近似的に  $RA_i$  と Relative  $E_{max}/EC_{50}$  はほぼ一致する。





#### Effects of $K_E$

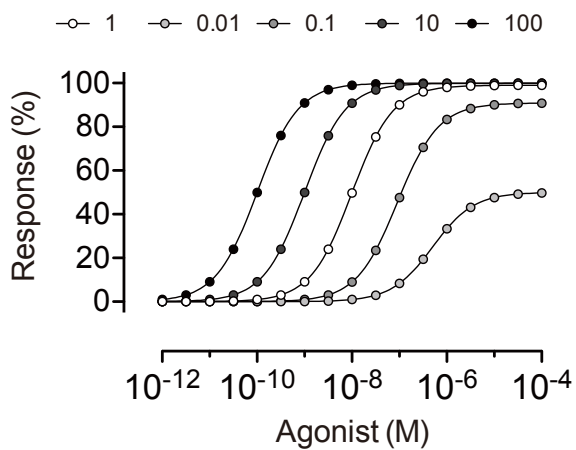
$$\varepsilon = 1$$

$$m = 1$$

$$K_X = 1 \mu\text{M}$$

$$R_T = 1$$

$K_E$	$RA_i$	Relative $E_{\max}/EC_{50}$	$EC_{50}$ (nM)	$E_{\max}$ (%)	Hill
0.01	1	1	9.90	99.0	1.000
0.0001	1	100	0.100	100	1.000
0.001	1	10	0.999	99.9	1.000
0.1	1	0.1	90.9	90.9	1.000
1	1	0.01	500	50.0	1.000



#### Effects of $R_T$

$$\varepsilon = 1$$

$$m = 1$$

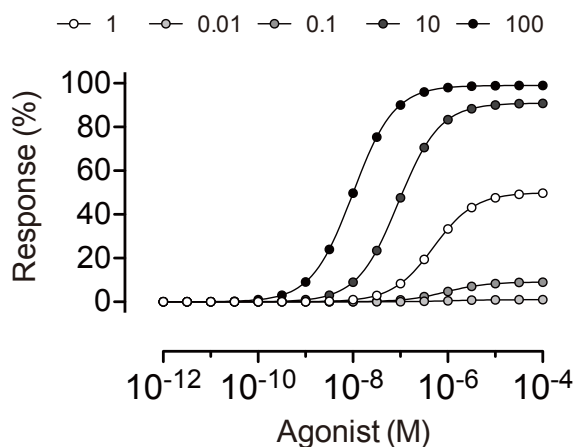
$$K_X = 1 \mu\text{M}$$

$$K_E = 0.01$$

$R_T$	$RA_i$	Relative $E_{\max}/EC_{50}$	$EC_{50}$ (nM)	$E_{\max}$ (%)	Hill
1	1	1	9.90	99.0	1.000
0.01	1	0.01	500	50.0	1.000
0.1	1	0.1	90.9	90.9	1.000
10	1	10	0.999	99.9	1.000
100	1	100	0.100	100	1.000

Fig.2-8 Operational Model のパラメーター  $K_E$ ,  $R_T$  による影響

Operational Model のパラメーターのうち、(A)  $K_E$  (反応系の感度、sensitivity of stimulus-response function) (B)  $R_T$  (受容体濃度、Total receptor) の値による容量反応曲線およびシグモイド曲線のパラメーターの変化。  $RA_i$  (Intrinsic relative activity) と Relative  $E_{\max}/EC_{50}$  は、 $K_E$  や  $R_T$  の値には依存せず完全に一致する。



### Effects of $\epsilon$

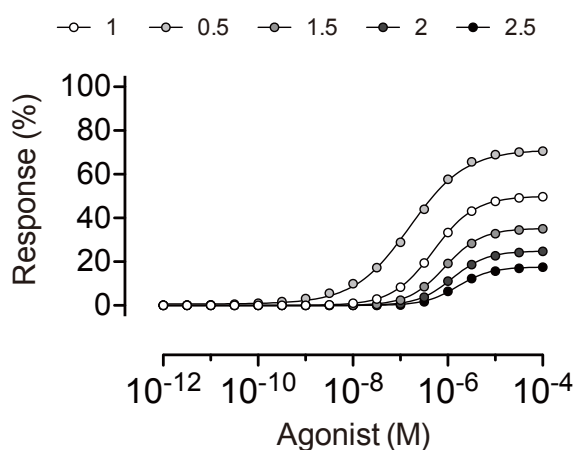
$$m = 1$$

$$K_X = 1 \mu\text{M}$$

$$K_E = 1$$

$$R_T = 1$$

$\epsilon$	$RA_i$	Relative $E_{max}/EC_{50}$	$EC_{50}$ (nM)	$E_{max}$ (%)	Hill
1	1	1	500	50.0	1.000
0.01	0.01	0.01	990	0.990	1.000
0.1	0.1	0.1	909	9.09	1.000
10	10	10	90.9	90.9	1.000
100	100	100	9.90	99.0	1.000



### Effects of $m$

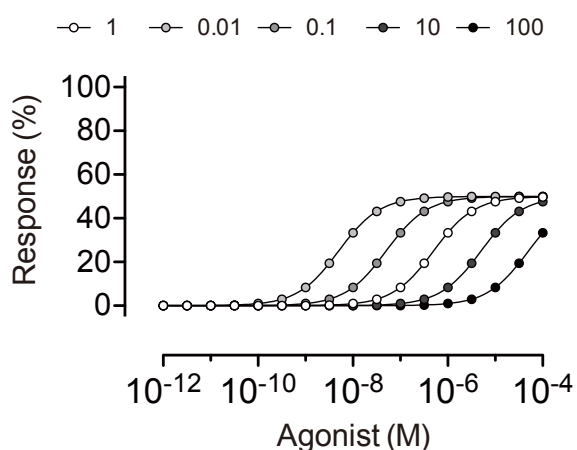
$$\epsilon = 1$$

$$K_X = 1 \mu\text{M}$$

$$K_E = 1$$

$$R_T = 1$$

$m$	$RA_i$	Relative $E_{max}/EC_{50}$	$EC_{50}$ (nM)	$E_{max}$ (%)	Hill
1	1	1	500	50.0	1.000
0.5	1	4.49	157	70.6	0.741
1.5	1	0.405	871	35.3	1.127
2.0	1	0.200	1250	25.0	1.201
2.5	1	0.108	1630	17.6	1.249



### Effects of $K_X$

$$\epsilon = 1$$

$$m = 1$$

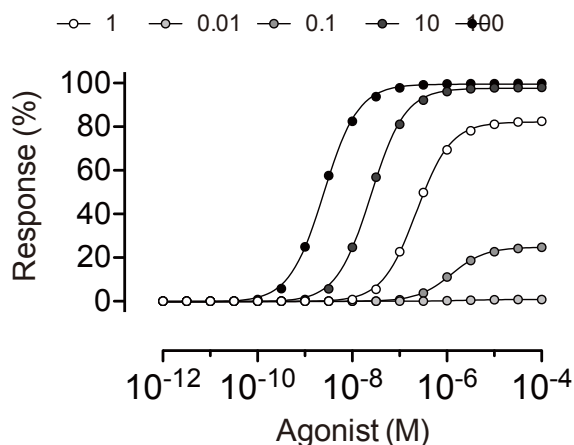
$$K_E = 1$$

$$R_T = 1$$

$K_X$	$RA_i$	Relative $E_{max}/EC_{50}$	$EC_{50}$ (nM)	$E_{max}$ (%)	Hill
1	1	1	500	50.0	1.000
0.01	100	100	5.00	50.0	1.000
0.1	10	10	50.0	50.0	1.000
10	0.1	0.1	5000	50.0	1.000
100	0.01	0.01	50000	50.0	1.000

Fig.2-9 Operational Model のパラメーター $\epsilon$ ,  $m$ ,  $K_X$  による影響 ( $K_E = 1$ )

シグナル増幅効率の低い ( $K_E = 1$ ) のアッセイ系 (GPCR の直下のイベント) を想定。Operational Model のパラメーターのうち、(A)  $\epsilon$  (内因活性、intrinsic activity) (B)  $m$  (変換係数、transducer slope factor) (C)  $K_X$  (解離定数、dissociation constant) の値による容量反応曲線およびシグモイド曲線のパラメーターの変化。リガンドが異なる場合やリガンドは同じで GPCR とキメラ G $\alpha$ サブユニットの共役能が異なる場合が想定条件である。 $RA_i$  (Intrinsic relative activity) と Relative  $E_{max}/EC_{50}$  は、 $\epsilon$  や  $K_X$  の値には依存せず完全に一致する。一方、 $RA_i$  と Relative  $E_{max}/EC_{50}$  は、 $m$  の値に依存する。 $m \neq 1$  の場合も、各リガンドの容量反応曲線の Hill slope が一定 ( $m$  の値が一定とほぼ同じ) かつ  $E_{max}$  が一定であれば、近似的に  $RA_i$  と Relative  $E_{max}/EC_{50}$  はほぼ一致する。



### Effects of $\epsilon$

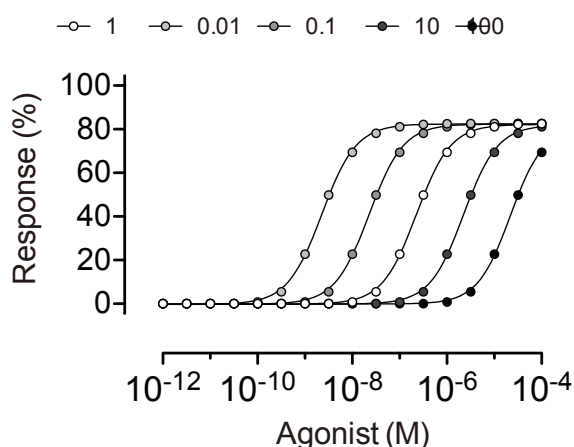
$$m = 2$$

$$K_X = 1 \mu\text{M}$$

$$K_E = 0.1$$

$$R_T = 1$$

$\epsilon$	$RA_i$	Relative $E_{max}/EC_{50}$	$EC_{50}$ (nM)	$E_{max}$ (%)	Hill
1	1	1	227	82.4	1.203
0.01	0.01	0.0010	2250	0.821	1.214
0.1	0.1	0.0552	1240	24.9	1.210
10	10	10.9	24.8	97.9	1.198
100	100	110	2.50	99.8	1.194



### Effects of $K_X$

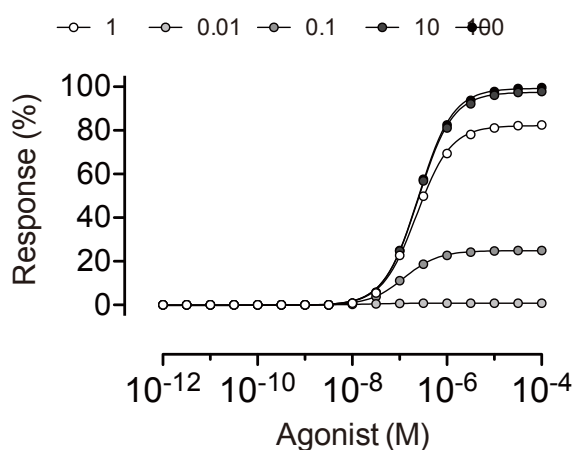
$$\epsilon = 1$$

$$m = 2$$

$$K_E = 0.1$$

$$R_T = 1$$

$K_X$	$RA_i$	Relative $E_{max}/EC_{50}$	$EC_{50}$ (nM)	$E_{max}$ (%)	Hill
1	1	1	227	82.4	1.203
0.01	100	100	2.28	82.7	1.194
0.1	10	9.99	22.8	82.6	1.198
10	0.1	0.100	2250	82.1	1.214
100	0.01	0.0102	22000	81.3	1.240



### Effects of $\epsilon$ and $K_X$

$$\epsilon/K_X = 1 (RA_i = 1)$$

$$m = 1$$

$$K_E = 0.01$$

$$R_T = 1$$

$\epsilon, K_X$	$RA_i$	Relative $E_{max}/EC_{50}$	$EC_{50}$ (nM)	$E_{max}$ (%)	Hill
1	1	1	227	82.4	1.203
0.01	1	0.0999	22.8	0.826	1.198
0.1	1	0.550	125	24.9	1.201
10	1	1.09	247	97.7	1.204
100	1	1.10	249	99.5	1.204

Fig.2-10 Operational Model のパラメーター $\epsilon$ ,  $K_X$  による影響

(A-B) シグナル増幅効率の中程度 ( $K_E = 0.1$ ) のアッセイ系を想定。Operational Model のパラメーターのうち、 $m$  (変換係数、transducer slope factor) = 2 に固定、(A)  $\epsilon$  (内因活性、intrinsic activity) (B)  $K_X$  (解離定数、dissociation constant) (C)  $\epsilon/K_E = 1$  の値による容量反応曲線およびシグモイド曲線のパラメーターの変化。リガンドが異なる場合やリガンドは同じで GPCR とキメラ  $G\alpha$  サブユニットの共役能が異なる場合が想定条件である。 $RA_i$  (Intrinsic relative activity) と Relative  $E_{max}/EC_{50}$  は、 $\epsilon$  や  $K_X$  の値には依存せず完全に一致する。 $m \neq 1$  の場合も、各リガンドの容量反応曲線の Hill slope が一定 ( $m$  の値が一定とほぼ同じ) かつ  $E_{max}$  が一定であれば、近似的に  $RA_i$  と Relative  $E_{max}/EC_{50}$  はほぼ一致する。

# A

Target gene	Gene symbol	siRNA construct	Target sequence	Catalog number
Gαq	GNAQ	GNAQ (#1)	5' -GGAGAGAGUGGCAAGAGUACGUUUA-3'	GNAQHSS104236
		GNAQ (#2)	5' -CCCUUUGACUUACAAAGUGUCAUUU-3'	GNAQHSS104237
Gα11	GNA11	GNA11 (#1)	5' -CCGGAUCAUCGAGUACCCUUUCGA-3'	GNA11HSS178464
		GNA11 (#2)	5' -GCAUCAGUACGUCAGUGCCAUCAAG-3'	GNA11HSS104213
Gα12	GNA12	GNA12 (#1)	5' -CCAAGGGAUUUGUGGAGCAUGACUU-3'	GNA12-HSS178466
		GNA12 (#2)	5' -CCAUCGUCAACAACAAGCUCUUCUU-3'	GNA12MSS204749
Gα13	GNA13	GNA13 (#1)	5' -CAGAAGCCCUUUAUACCACCACUUCA-3'	GNA13-HSS173827
		GNA13 (#2)	5' -GCAGCCCAAGGAAUGGUGGAAACAA-3'	GNA13-HSS116479
RhoA	RHOA		5' -CCUCUCCUACCCAGAUACCGAUGUU-3'	RHOA-VHS40471
TACE	ADAM17		5' -CAGAAUCGUGUUGACAGCAAAGAAA-3'	ADAM17-HSS186181

# B

Target gene	Gene symbol	Sequence	
		Forward primer	Reverse primer
Gαq	GNA12	5' -ACCGAATGGAGGAAAGCAAGG-3'	5' -CATCTCTCTGGGGTCCATCATATTC-3'
Gα11	GNA13	5' -CAGCGAATACGACCAAGTCC-3'	5' -ACCAGGGGTAGGTGATGATG-3'
Gα14	GNA13	5' -TCACCTACCCCTGGTTTCTG-3'	5' -GACATCCTGTTTCGGTCCTG-3'
Gα16	GNA15	5' -GCCAGAAGTCAGAGCGTAAG-3'	5' -TGACGGATGTGCTTTTGAAC-3'
Gα12	GNA12	5' -GAGGGATTCTGGCATCAGG-3'	5' -CGATCCGGTCCAAGTTGTC-3'
Gα13	GNA13	5' -CCTGGATAACTTGGATAAACTTGG-3'	5' -TTCATGGATGCCTTTGGTG-3'
RhoA	RHOA	5' -AGTCAAGCATTCTGTCCCAAC-3'	5' -CTCTGCCTTCTTCAGGTTTCAC-3'
β-actin	ACTB	5' -ATGAAGATCAAGATCATTGCTCCTC-3'	5' -ACATCTGCTGGAAGGTGGACA-3'
GAPDH	GAPDH	5' -GCCAAGGTCATCCATGACAAC-3'	5' -GAGGGCCATCCACAGTCTT-3'

Table 2-1 本研究で用いた siRNA の標的塩基配列および定量 PCR 用プライマーの塩基配列