

# 論文の内容の要旨

## 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

#### 【序】

G タンパク質共役型受容体 (G protein-coupled receptor, GPCR) は 7 回の膜貫通  $\alpha$  ヘリックスを有するという特徴的な構造を持つ膜型受容体であり、ヒトゲノムにおいて約 900 種類からなる最大の遺伝子ファミリーを形成する。このうちロドプシンファミリーに分類される約 280 種類の GPCR は、主に水溶性のリガンドを介して体内で多様な生理機能・病理機能に関与する。GPCR は創薬開発の最も重要な標的分子であり、現在市販されている薬の約 30% は GPCR に直接作用すると見積もられている。従って、GPCR の機能を解明することは、創薬開発に密接に関わる重要な研究である。

GPCR のシグナル伝達は主に三量体 G タンパク質の  $G\alpha$  サブユニットにより担われ、この下流シグナルを測定することで GPCR の活性化状態が評価される。 $G\alpha$  は伝達するシグナル (結合するエフェクター分子) の種類を元に、4 種類のサブファミリー ( $G\alpha_s$ 、 $G\alpha_{i/o}$ 、 $G\alpha_{q/11}$ 、 $G\alpha_{12/13}$ ) に分類される。GPCR は通常 1 種類か 2 種類の  $G\alpha$  サブファミリーとしか共役しないため、特定の細胞内イベントを測定するだけでは、網羅的に GPCR の活性化を検出できない。さらに、 $G\alpha_{12/13}$  シグナルの検出系の開発は遅れており、 $G\alpha_{12/13}$  共役型受容体の機能を解明する上で大きな障壁となっている。

これまでに私は生理活性脂質リゾホスファチジン酸 (LPA) の産生酵素の遺伝子欠損マウ

スの解析から、LPAが毛髪形成に必須の役割を果たしていることを明らかにした(Inoue *et al.*, *EMBO J.* **30**, 4248 (2011))。この研究過程で、LPA受容体の1つであるLPA<sub>6</sub>がGα<sub>12/13</sub>を介して膜型プロテアーゼTACE (Tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme)を活性化し、増殖因子であるTGFα (Transforming growth factor-alpha)の膜結合前駆体からのエクストドメイン切断を引き起こしていることを見出した。この研究から、GPCRシグナルとTGFα切断を指標としたTACE活性という機構に着目するに至った。

本研究において、私はアルカリホスファターゼ (AP) 融合 TGFα (AP-TGFα) を用いて、TGFαの膜結合型前駆体からの切断を簡便に評価する手法 (TGFα切断アッセイ (TGFα shedding assay) と命名) を開発した (Inoue *et al.*, *Nat. Methods* **9**, 1021 (2012))。本手法はGα<sub>12/13</sub>シグナルに加えてGα<sub>q/11</sub>シグナルを精度良く検出すること、各種Gαタンパクとの共発現によりGα<sub>s</sub>共役型受容体やGα<sub>i/o</sub>共役型受容体を含めたGPCRを網羅的に検出可能なこと、GPCRリガンドの薬理学評価に応用できることを実証した。本研究で開発したTGFα切断アッセイはGPCR研究の極めて有用なツールとなるものと期待される。

## 【方法と結果】

### 1. TGFα切断アッセイの手法

HEK293細胞にGPCR発現プラスミドベクターとAP-TGFα発現プラスミドベクターをリポフェクション法で遺伝子導入した。必要に応じて (後述)、Gα発現プラスミドベクターを同時に遺伝子導入した。24時間後、細胞をトリプシン/EDTA処理により剥がし、血清不含培地 (HEPES, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>含有 Hank's Balanced Salt Solution) に懸濁し、96-wellプレートに90 μL (1 wellあたり、以下同) 播種した (細胞プレート)。37°Cで30分静置した後、試験化合物を10 μL添加し1時間培養した。その後、80 μLの培養上清を別の96-wellプレートに移した (培養上清プレート)。細胞プレートと培養上清プレートに、AP基質であるp-NPP (p-nitrophenylphosphate) 溶液を加えた。p-NPP添加直後および1時間後に両プレートの405 nmの吸光度 (OD<sub>405</sub>) をマクロプレートリーダーを用いて測定した。

AP-TGFαの切断量は次のように計算した。

$$\Delta OD_{405} = OD_{405} (\text{AP 反応 1 時間後}) - OD_{405} (\text{p-NPP 添加直後})$$

$$\text{培養上清中 AP-TGF}\alpha \text{ 量 (\%)} = \Delta OD_{405} (\text{培養上清プレート}) / (\Delta OD_{405} (\text{培養上清プレート}) + \Delta OD_{405} (\text{細胞プレート}))$$

$$\text{AP-TGF}\alpha \text{ 切断量 (\%)} = \text{培養上清中 AP-TGF}\alpha \text{ 量 (リガンド刺激)} - \text{培養上清中 AP-TGF}\alpha \text{ 量 (無刺激)}$$

各リガンド濃度に対してAP-TGFα切断量をプロットし、4パラメーターシグモイド曲線にフィッティングさせ、各種パラメーター (EC<sub>50</sub>, E<sub>max</sub>) を得た。

## 2. TGF $\alpha$ 切断アッセイの精度および再現性

ヒスタミン H1 受容体を用いて、TGF $\alpha$  切断アッセイの精度と再現性を検証した。その結果アッセイ精度の指標である Z' factor は 96-well プレートで 0.84 を示し、優れたアッセイ系であることが確認された。Z' factor は 384-well プレートでも 0.76 を示し、ハイスループットアッセイへの適用が可能であることがわかった。H1 受容体の容量反応曲線の再現性（日間測定誤差）を評価したところ、CV 値が 13% ( $E_{max}$ ) および 27% ( $EC_{50}$ ) と極めて安定した GPCR アッセイ法であることがわかった。

## 3. G $\alpha_{12/13}$ シグナルおよび G $\alpha_{q/11}$ シグナルにより TGF $\alpha$ 切断応答が引き起こされる

始めに、各 G $\alpha$  に共役する GPCR を用いて TGF $\alpha$  切断のシグナル経路を解析した。その結果、G $\alpha_{q/11}$  に共役することが知られている受容体と G $\alpha_{12/13}$  に共役することが知られている受容体の活性化により、TGF $\alpha$  切断が引き起こされた。一方、G $\alpha_s$  や G $\alpha_{i/o}$  のみに共役する受容体では TGF $\alpha$  切断は起こらなかった。従って、G $\alpha_{q/11}$  シグナルと G $\alpha_{12/13}$  シグナルが選択的に TGF $\alpha$  切断に関与することが強く示唆された。

次に、キメラ G $\alpha$  を用いて上記の結果を検証した。ドパミン D2 受容体と C 末端 6 アミノ酸に G $\alpha_{i1}$  由来配列に置換した各種 G $\alpha$  キメラを共発現し、TGF $\alpha$  切断量を測定したところ、G $\alpha_{q/11}$  シグナルや G $\alpha_{12/13}$  シグナルを誘導した際に反応性が増加し（ランクオーダーは G $\alpha_q = G\alpha_{11} > G\alpha_{13} > G\alpha_{12}$ ）、G $\alpha_s$  シグナルや G $\alpha_{i/o}$  シグナルを誘導した際に反応性は変化しなかった。以上から、G $\alpha_{q/11}$  シグナルと G $\alpha_{12/13}$  シグナルの下流で TGF $\alpha$  切断が誘導されることがわかった。

## 4. G $\alpha$ 共発現による GPCR 活性化検出系の拡張

TGF $\alpha$  切断アッセイがどの程度割合の GPCR の活性化を検出できるか、リガンドが既知の 116 種類のヒト GPCR を用いて検討した。その結果、75 種類（65%）の GPCR の活性化が TGF $\alpha$  切断アッセイで検出可能（ $E_{max}$  (AP-TGF $\alpha$  切断量)  $\geq 3\%$  と定義）であった。TGF $\alpha$  切断応答が低い GPCR の多くは G $\alpha_s$  共役型もしくは G $\alpha_{i/o}$  共役型であった。そこで、次にキメラ G $\alpha$  を用いて反応性の向上が起こるか検証した。

G $\alpha_s$  サブファミリーと G $\alpha_{i/o}$  サブファミリーの全ての C 末 6 アミノ酸残基を網羅するように、5 種類のキメラ G $\alpha$  (G $\alpha_{q/s}$ , G $\alpha_{q/i1}$ , G $\alpha_{q/i3}$ , G $\alpha_{q/o}$ , G $\alpha_{q/z}$ ) を作製した。G $\alpha_q$  サブファミリーに属し、非選択的に GPCR と共役することが知られている G $\alpha_{16}$  (G $\alpha_{15}$  としても知られる) を含めた 6 種類の G $\alpha$  を 116 種類の GPCR に共発現させ、再度 TGF $\alpha$  切断の反応性を検討した。その結果、ほとんどの G $\alpha_s$  や G $\alpha_{i/o}$  に共役する受容体で反応性が向上し、検出可能な GPCR は 104 種類（90%）にまで拡張できた。

## 5. G $\alpha_{12/13}$ 共役型 GPCR の同定

次に、G $\alpha_{12/13}$  シグナルを高感度・高精度に検出できるという TGF $\alpha$  切断アッセイの特性を利用し、G $\alpha_{12/13}$  に共役する新たな GPCR の探索を行った。リガンド既知の 116 種類の GPCR のうち、高い E $_{max}$  ( $\geq 10\%$ ) を示した 44 種類の GPCR について、G $\alpha_{12/13}$  経路の阻害 (G $\alpha_{12}$ , G $\alpha_{13}$ , RhoA RNAi) による抑制効果を検討した。その結果、25 種類の GPCR において、G $\alpha_{12/13}$  経路の阻害により TGF $\alpha$  切断応答が抑制 (relative E $_{max} < 0.67$ ) された。このうち 14 種類の GPCR は G $\alpha_{12/13}$  経路との関連は全く報告がなく、本研究が初めての知見となった。

最後に、リガンド未知 (オーファン) GPCR のリガンド探索への有用性を検証した。オーファン受容体と化合物ライブラリーを組み合わせてスクリーニングした結果、P2Y10、GPR174、A630033H20 が生理活性脂質リゾリン脂質として知られるリゾホスファチジルセリン (LysoPS) に特異的に応答することを見出した。これら 3 つの GPCR は G $\alpha_{12/13}$  共役型であった。LysoPS はマスト細胞への脱顆粒促進作用を始め、多様な活性が報告されているが、その産生機構や作用機構はほとんど明らかになっていない。今回同定した LysoPS 受容体を解析することで、LysoPS の生理的・病的機能が明らかになるものと期待される。

### 【まとめ】

本研究において、私は TGF $\alpha$  のエクドメイン切断という現象に着目し、高精度の GPCR 活性化検出系を確立することに成功した。G $\alpha$  の共発現を活用することで、90% の GPCR が検出可能であった。TGF $\alpha$  切断アッセイは、様々な GPCR の解析に応用可能であった。今後、本手法を用いることで、特に G $\alpha_{12/13}$  に共役する GPCR の理解が進むことが期待される。