



平成24年9月13日

報道機関 各位

東北大学大学院薬学研究科  
東京大学大学院薬学系研究科  
愛媛大学プロテオ医学研究センター  
独立行政法人科学技術振興機構

## Gタンパク質共役型受容体の活性化を

網羅的に検出する手法を確立

～新しいくすりの開発に貢献～

### 【ポイント】

- ・ くすり開発の重要な標的分子である G タンパク質共役型受容体に関して、新しい活性化検出法を開発
- ・ 既存の手法を大幅に上回る検出効率であることを実証
- ・ 3種類の G タンパク質共役型受容体について、活性化分子を初めて同定
- ・ 新しいくすり開発の効率化へ期待

### 【概要】

くすりの大半はGタンパク質共役型受容体(GPCR)<sup>\*用語解説</sup>に作用して効果を発揮します。そのため、GPCRの活性化を効率的に測定することは、新たなくすりの開発への近道となります。今回、東北大学大学院薬学研究科の青木淳賢教授、井上飛鳥助手、巻出久美子助教、東京大学大学院薬学系研究科の新井洋由教授、大和田智彦教授、愛媛大学プロテオ医学研究センターの東山繁樹教授は、GPCRの活性化を検出する新規手法を共同で開発しました。本手法を用いると116種のリガンド既知のGPCRのうち104種類(約90%、検出率として世界最高値)の活性化を測定可能でした。さらに、開発した手法を用いて、生理活性脂質リゾホスファチジルセリン<sup>\*用語解説</sup>に対する3つの受容体 P2Y10、GPR174、A630033H20の発見に成功しました。本研究成果は、創薬開発の効率化に貢献するとともに、生理活性脂質リゾホスファチジルセリンの機能に関する研究の発展を確約するものとして注目されます。本研究成果は、米国の学術雑誌 Nature Methods の10月号に掲載されます。

## 【研究内容】

### 背景

細胞は外界との情報の受け渡しを様々な分子を介して行います。細胞外からの情報を受け取るタンパク質は受容体と呼ばれ、その中でも GPCR と呼ばれる一群の受容体が最も重要な役割を担うことがわかっています。GPCR は全タンパク質の中で最大の遺伝子ファミリーを形成しており、ヒトゲノム中には 800 種類以上もの GPCR が存在しています。GPCR は細胞膜上に存在し、細胞外から運ばれてくるホルモンや成長因子などと結合し、細胞内へ信号（シグナル）を伝えています。また、GPCR の機能の異常は多くの疾患を引き起こすことがわかっています。病態時の GPCR の機能異常を正すことは、病気の治療につながります。実際、GPCR を標的としたくすりは数多く開発が成功しており、現在市販されているくすりの半数近くにもものぼります。従って、GPCR の機能を理解することは、創薬開発の近道であると言えます。

GPCR の役割は細胞外の結合分子（リガンド）の量を検知して、細胞内へシグナルを伝えることです。GPCR はリガンドと結合すると構造変化（活性化）を起こし、三量体 G タンパク質<sup>\*用語解説</sup>と呼ばれる細胞内タンパク質を呼び寄せ、様々な下流のシグナルを誘導します。三量体 G タンパク質は  $G_s$ 、 $G_i$ 、 $G_q$ 、 $G_{12/13}$  の 4 種類に大別され、それぞれの下流では、サイクリック AMP 濃度の変動 ( $G_s$ 、 $G_i$ )、細胞内カルシウム濃度の変動 ( $G_q$ )、低分子量 G タンパク質 Rho への GTP 結合 ( $G_{12/13}$ ) が起こります。このような細胞内イベントを検出することで、GPCR の活性化を測定することができます。しかし、GPCR は通常 1 種類か 2 種類の三量体 G タンパク質としか結合（共役とも呼ばれます）しないことから、特定の細胞内イベントを観察するだけでは、多くても半数程度の GPCR の活性化しか検出することができません。そこで、多くの GPCR の活性化を同一の方法で検出できるような新規 GPCR 活性化測定法が期待されていました。特に、 $G_{12/13}$  の下流での細胞内シグナルを定量的に検出する手法の開発は遅れており、 $G_{12/13}$  と結合する GPCR の機能を解明する上で大きな障害となっていました。

青木淳賢教授と井上飛鳥助手は以前の研究成果（EMBO J. 30, 4248-4260 (2011)）において、毛の成長に生理活性脂質リゾホスファチジン酸とその受容体 ( $LPA_6$ 、GPCR の 1 種) が必須の役割を果たしていることを見出しました。 $LPA_6$  の下流の分子機構を詳細に調べたところ、毛根の上皮細胞において TACE<sup>\*用語解説</sup>と呼ばれる膜型タンパク質分解酵素が活性化し、トランスフォーミング増殖因子 $\alpha$  ( $TGF\alpha$ )<sup>\*用語解説</sup>の膜結合前駆体を切断し、細胞外へ放出するという現象がわかりました。そして、この  $LPA_6$ -TACE- $TGF\alpha$  の経路が、正常な毛根の成長に必須であることを発見しました。この研究過程から、TACE による  $TGF\alpha$  の切断という現象を培養細胞中で再現することで、ある種の GPCR の活性化が検出可能になるのではないかと想定しました。

### 今回の発見

青木淳賢教授と井上飛鳥助手は上述の背景を受け、TACE による  $TGF\alpha$  の切断が GPCR の下流で普遍的に起こる現象かどうか検討しました。まず、リガンドが既に知られている 116 種類の GPCR とそのリガンドの組み合わせで調べました。ヒト腎臓由

来の細胞株である HEK293 細胞に GPCR をコードする遺伝子とアルカリホスファターゼ融合 TGF $\alpha$  (AP-TGF $\alpha$ 、愛媛大学東山繁樹教授が確立) をコードする遺伝子をリポフェクション法<sup>\*用語解説</sup>で導入し、この細胞をそれぞれの GPCR のリガンドで刺激した後に、細胞外への AP-TGF $\alpha$ の放出量を評価しました。その結果、実に7割もの GPCR の活性化が本法 (TGF $\alpha$ 切断アッセイ、TGF $\alpha$  shedding assay (図1) と命名) で検出できることがわかりました。また、TGF $\alpha$ 切断を引き起こした GPCR の特徴を調べると、G $_q$ または G $_{12/13}$  と共役する GPCR であることがわかりました。そこで、G $_s$  や G $_i$  のシグナルをそれぞれ G $_q$  や G $_{12/13}$  のシグナルに変換することのできるキメラ G タンパク質<sup>\*用語解説</sup>を導入したところ、116 種類の GPCR のうち 104 種類の GPCR の活性化を検出することに成功しました。このように TGF $\alpha$ 切断アッセイは 90%以上の GPCR について活性化を検出し、この割合は既存の手法を大きく超えることから本法の有用性が示されました。また、本法は作動薬や遮断薬<sup>\*用語解説</sup>の反応を検出できるだけでなく、創薬に最も有効であると考えられている逆作動薬<sup>\*用語解説</sup>の検出にも有効でした。

また、本手法を用いリガンド未知のオーファン GPCR<sup>\*用語解説</sup>のリガンド探索を行いました。その結果、3つの GPCR (P2Y10、GPR174、A630033H20) が生理活性脂質のリゾホスファチジルセリンに応答することを発見しました (図2)。これらの受容体はいずれも G $_{12/13}$  に共役すること、リゾホスファチジルセリンの構造類似体 (東京大学の大和田智彦教授、新井洋由教授により有機合成) の反応性からリゾホスファチジルセリンの構造を厳密に認識する受容体であることが判明しました。リゾホスファチジルセリンは、リンパ球の増殖抑制やマスト細胞の活性化などの作用が知られており、これら 3つの GPCR の研究を通じて生体内の新たな生理活性物質の解明が進むことが期待されます。

## 意義

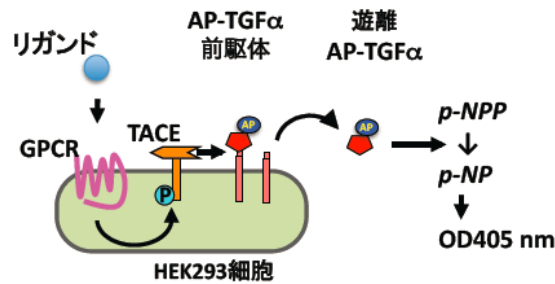
これまで、G $_{12/13}$  と共役する GPCR は活性化の検出が困難であり、作動薬、遮断薬の開発が遅れていました。本研究で開発された TGF $\alpha$ 切断アッセイを用いることで、これまで困難であった G $_{12/13}$  と共役する GPCR に対する創薬が一気に加速化されるものと期待されます。また、本手法はオーファン GPCR のリガンド同定や、リガンドの作用様式の評価に極めて有効であり、新規創薬への貢献が大いに期待されます。今回、リゾホスファチジルセリンに反応する GPCR を複数発見したことで、未解明な点が多く残るこの生理活性脂質の研究が加速することが期待されます。

なお、本研究は、独立行政法人科学技術振興機構 (JST) 戦略的創造研究推進事業チーム型研究 (CREST) : 「炎症の慢性化機構の解明と制御に向けた基盤技術の創出」研究領域 (研究総括: 宮坂昌之 大阪大学未来戦略機構 特任教授) における研究課題「慢性炎症による疾患発症機構の構造基盤」(研究代表者: 濡木理 東京大学 大学院理学系研究科 教授、研究期間: 2011 年度~2015 年度)、医薬基盤研究所「保健医療分野における基礎研究推進事業」、科学研究費補助金の外部資金支援を受けて行われたものです。

## 図1 新規GPCR活性化検出法

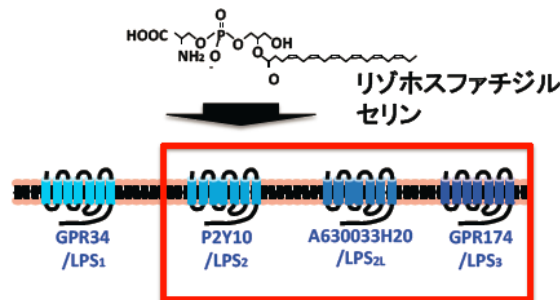
### TGF $\alpha$ shedding assayの原理

本法ではHEK293細胞にGPCR、アルカリリホスファターゼ (AP) 標識TGF $\alpha$ 前駆体、(+キメラGタンパク質)を発現させ、リガンド刺激後1時間中に細胞外に遊離したTGF $\alpha$ 量をAP活性を指標に検出する。



## 図2 同定された新規リゾホスファチジルセリン受容体

TGF $\alpha$  shedding assayを用い、リゾホスファチジルセリン応答性GPCRを探索し、P2Y10, A630033H20, GPR174の3つの新規GPCRを同定し、それぞれ、LPS<sub>2</sub>, LPS<sub>2L</sub>, LPS<sub>3</sub>と命名した。



### 【用語説明】

#### GPCR : G タンパク質共役型受容体 (G protein-coupled receptor)

細胞膜上に存在する受容体で、細胞膜を7回貫通する特徴的な構造を有しており、7回膜貫通型受容体とも呼ばれています。これまでに開発されたくすりの大半がGPCRと結合して作用を発揮することから、現在も創薬の重要標的分子として盛んに研究されています。ヒトにおいては800種類以上存在し、そのうち構造や発現部位から約280種類が創薬標的の候補と考えられています。

#### リゾホスファチジルセリン : 生理活性脂質の一種

リンパ球の増殖抑制、マスト細胞の活性化などの作用を持つ生理活性脂質です。いっどこで産生されて、どの受容体を介して機能しているかなど、未解明な点が多く残されていました。今回の3つの受容体の発見から、特に免疫系での機能が着目されます。

#### 三量体Gタンパク質 : G $\alpha$ 、G $\beta$ 、G $\gamma$ の3つのサブユニットタンパク質の複合体

三量体Gタンパク質は活性化GPCR(リガンド結合による構造変化)と結合し、GDP結合型からGTP結合型に変化する。GTP結合型の三量体Gタンパク質は活性化型と呼ばれ、各種の細胞内シグナルを誘導します。複合体のうち、G $\alpha$ が最も重要でGPCRとの結合や下流に伝えるシグナルの種類を決めます。伝えるシグナルの種類とアミノ酸配列の相同性から、三量体Gタンパク質はG<sub>s</sub>、G<sub>i</sub>、G<sub>q</sub>、G<sub>12/13</sub>の4種類に分類され、それぞれG $\alpha_s$ 、G $\alpha_i$ 、G $\alpha_q$ 、G $\alpha_{12/13}$ サブユニットを含みます。

### **TACE：腫瘍壊死因子変換酵素 (Tumor necrosis factor- $\alpha$ -converting enzyme)**

膜結合型のタンパク質分解酵素で、膜タンパク質の細胞外部分を切断します。様々なタンパク質が TACE により切断されることが知られていますが、そのうちの1つが TGF $\alpha$ です。

### **TGF $\alpha$ ：トランスフォーミング増殖因子 $\alpha$ (Transforming growth factor- $\alpha$ )**

上皮成長因子受容体 (EGFR) のリガンドの1つです。1回膜貫通型の前駆体タンパク質として産生されます。TACE により切断され、細胞外部分が放出されます。今回使用した AP-TGF $\alpha$ は細胞外領域にアルカリホスファターゼ (Alkaline Phosphatase) を融合するように設計した改変型 TGF $\alpha$ で、放出された TGF $\alpha$ はアルカリホスファターゼの活性を指標に簡便に測定することができます。

### **リポフェクション法：遺伝子導入の一手法**

リポソームと呼ばれる脂質と遺伝子が入ったプラスミドベクターとの混合液を細胞にかけると、目的の遺伝子を細胞に導入することができます。細胞内で遺伝子からタンパク質が作られます。今回の TGF $\alpha$ 切断アッセイでは、複数種類のプラスミドベクター (AP-TGF $\alpha$ 、GPCR、キメラ G タンパク質) を同時に細胞に導入します。

### **キメラ G タンパク質：G $\alpha$ サブユニットを改変した三量体 G タンパク質**

G $\alpha$ タンパク質のカルボキシル末端 (C 末) 側部分が GPCR との結合を担います。G $\alpha$ タンパク質の C 末側の6アミノ酸残基を他の G $\alpha$ タンパク質と交換することで、下流に伝えるシグナルは変えずに、GPCR との結合を変化させることができます。例えば、G $\alpha_q$ の骨格と G $\alpha_s$ の C 末を持つキメラ G タンパク質を用いると、通常は G $_s$ に共役している GPCR のシグナルを G $_q$ に変換することができます。

### **作動薬、遮断薬、逆作動薬：リガンドの作用形式の分類**

作動薬 (アゴニスト) は GPCR に対して活性化する薬剤です。遮断薬 (アンタゴニスト) と逆作動薬 (インバーサアゴニスト) は GPCR の活性化を抑えます。逆作動薬は GPCR を不活性型に構造変化させることができ、市販されている薬剤の多くは遮断薬ではなく逆作動薬であることが知られています。

### **オーファン GPCR：孤児 G タンパク質共役型受容体**

リガンドが不明な GPCR の総称で、現在約 80 種類存在します。リガンドを同定することが、生体内の役割を解明する第一歩となります。しかし、多くの場合どの三量体 G タンパク質と共役するか不明なため、GPCR 検出系を複数用意する必要があります。今回確立した TGF $\alpha$ 切断アッセイを用いることで、効率的にオーファン GPCR のリガンド同定が行うことができると期待されます。

【論文目録】

TGF $\alpha$  shedding assay: an accurate and versatile method for detecting GPCR activation

TGF $\alpha$ 切断を用いた正確かつ汎用性の高い GPCR 活性化測定法の確立

Nature Methods

掲載日時 電子版 : 2012 年 9 月 16 日 (現地時間)、冊子版 : 2012 年 10 月号

DOI: 10.1038/NMETH.2172

(問い合わせ先)

東北大学大学院薬学研究科

分子細胞生化学分野

教授 青木 淳賢

TEL 022-795-6860

E-mail jaoki@m.tohoku.ac.jp

助手 井上 飛鳥

TEL 022-795-6861

E-mail iaska@m.tohoku.ac.jp