

TOHOKU
UNIVERSITY

東北大学

TOHOKU UNIVERSITY

Press Release

2024年5月24日

報道機関 各位

国立大学法人東北大学

細胞内シグナルを操る人工受容体タンパク質の開発

- $G_{\alpha_{12/13}}$ シグナル経路を標的とした創薬開発の効率化に貢献 -

【発表のポイント】

- $G_{\alpha_{12}}$ シグナルと $G_{\alpha_{13}}$ シグナル^(注1) (総称して $G_{\alpha_{12/13}}$ シグナル) は G タンパク質共役受容体 (GPCR)^(注2) の情報伝達経路であり、これら进行操作する技術は限られていました。
- 本研究において、 $G_{\alpha_{12/13}}$ シグナルを薬剤により誘導できるデザイナー受容体を開発しました。
- 今後、このデザイナー受容体を遺伝子導入した動物を用いることで、 $G_{\alpha_{12/13}}$ シグナル作動薬の薬理作用を効率的に探索・検証することができま

【概要】

G タンパク質共役受容体 (GPCR) は細胞外の特定の代謝物の結合し、細胞内に情報伝達 (シグナル) を誘起します。この作用により、環境変化を感じて細胞の振る舞いを環境に適応させることができます。GPCR は多様な生命現象に関わることから、創薬開発の重要な標的でもあり、現在使用されている薬の約 30% は GPCR に直接作用して薬効を発揮します。

東北大学大学院薬学研究科の辰己葉菜絵大学院生 (当時)、井上飛鳥教授らの研究グループは、人工的にデザインされた GPCR であるデザイナー受容体 (以下、DREADD^(注3)) に改変を加えることで、 $G_{\alpha_{12}}$ シグナル選択型から $G_{\alpha_{12}}$ と $G_{\alpha_{13}}$ の双方を誘導する $G_{\alpha_{12/13}}$ シグナル型の DREADD を開発しました。 $G_{\alpha_{13}}$ シグナルは血管形成や免疫応答において重要な機能が知られており、 $G_{\alpha_{13}}$ シグナルを阻害または誘導することで、これらの現象が関与する疾患の治療につながる可能性があります。今後、本研究で開発した $G_{\alpha_{12/13}}$ シグナル型の DREADD を細胞やマウスに遺伝子導入し、デザイナーリガンド^(注4) を投与することで誘導される $G_{\alpha_{12/13}}$ シグナルによる細胞応答や薬理効果を調べることで、 $G_{\alpha_{12/13}}$ シグナルの疾患治療効果を判定することに役立ちます。

本研究の成果は、2024年5月15日に科学誌 Scientific Reports に掲載されました。

研究

【詳細な説明】

研究の背景

G タンパク質共役受容体 (GPCR) は、細胞表面に存在する膜タンパク質であり、細胞外の特定の代謝物 (細胞外情報伝達物質) を感知して細胞内に情報伝達 (シグナル) を行う役割を担います。GPCR は、細胞外のリガンド^(注5)との結合によって活性型へと構造変化し、細胞内に存在するヘテロ三量体 G タンパク質^(注6)を介して、細胞内にシグナルを伝達します。GPCR はヒトにおいて約 800 種存在し、様々な生理現象に関与しています。また、GPCR は創薬開発における最も重要な標的タンパク質の一群です。

ヘテロ三量体 G タンパク質のうち、 G_{α} サブユニットは GPCR と直接相互作用し、活性型へと構造変化することで、細胞内シグナル伝達を担います。ヒトには、それぞれ独自のシグナルを伝達する 16 種の G_{α} サブユニットが存在し、これらは 4 つのファミリー (G_s 、 G_i 、 G_q 、 G_{12}) に分類されます。これまでの創薬研究は G_s 、 G_i 、 G_q の 3 種類のファミリーに対して精力的に実施されてきました。一方で、 G_{12} ファミリーのシグナル伝達を解析するツールに乏しいことから、このシグナル経路を標的とした創薬研究は遅れています。 G_{12} ファミリーには、 $G_{\alpha_{12}}$ サブユニットと $G_{\alpha_{13}}$ サブユニットの 2 種類が属しています (以下、「サブユニット」を省略し $G_{\alpha_{12}}$ と $G_{\alpha_{13}}$ と表記)。 $G_{\alpha_{12}}$ と $G_{\alpha_{13}}$ は、Rho-ROCK 経路^(注7)を活性化することが知られていますが、その他にも様々な経路を活性化します。 $G_{\alpha_{12}}$ と $G_{\alpha_{13}}$ のシグナル経路の異常は、免疫疾患やがんなど、多くの疾患に関与することが報告されており、 $G_{\alpha_{12}}$ と $G_{\alpha_{13}}$ の活性制御を司る GPCR は新薬の標的となる可能性を秘めています。

$G_{\alpha_{12}}$ と $G_{\alpha_{13}}$ を標的とした新薬を開発する上で、 $G_{\alpha_{12}}$ や $G_{\alpha_{13}}$ を活性化した際に、疾患に対してどのような治療効果が発揮されるのかを予測する必要があります。この予測には、DREADD と呼ばれる人工 GPCR が有用です。DREADD は、デザイナーリガンドのみに応答し、特異的な G_{α} サブユニットと結合 (共役) することで、細胞内に特定のシグナルを誘導します。このシグナル操作技術を利用して、DREADD を培養細胞や疾患モデルマウスに導入し、デザイナーリガンドを投与することによって、特定の G タンパク質シグナルの薬理効果を評価することができます (参考文献 1)。本研究グループの先行研究 (参考文献 2) によって、 $G_{\alpha_{12}}$ に特異的に結合し活性化する DREADD ($G_{12}D$) が開発されましたが、この $G_{12}D$ は $G_{\alpha_{13}}$ を活性化せず、 $G_{\alpha_{13}}$ の薬理効果を予測するのに不十分です。そのため、本研究では、 $G_{12}D$ を改変することで、 $G_{\alpha_{13}}$ に対して活性化可能な新しい DREADD の開発を目指しました。

今回の取り組み

始めに、なぜ $G_{12}D$ が $G_{\alpha 13}$ よりも $G_{\alpha 12}$ を好むのかを調べました。 $G_{\alpha 12}$ と $G_{\alpha 13}$ のアミノ酸配列を相互に入れ替えた変異 G_{α} タンパク質を作製し、これらと $G_{12}D$ との結合を TGF_{α} 切断アッセイ (参考文献 2) (注 8) を用いて評価しました。その結果、主に $G_{\alpha 12}$ と $G_{\alpha 13}$ の C 末端から 18 番目 (G.H5.17、「G.H + 数字」は G_{α} サブユニットの特定のアミノ酸残基 (注 9) の位置を示すナンバリング法) と 4 番目 (G.H5.23) のアミノ酸残基の違いが、 $G_{12}D$ に対する結合選択性に関わることがわかりました (図 1)。

次に、 $G_{\alpha 12}$ と $G_{\alpha 13}$ がどのように $G_{12}D$ に相互作用するのかを調べるために、 $G_{12}D$ と $G_{\alpha 12}$ または $G_{\alpha 13}$ の複合体構造をモデリング (注 10) し、分子動力学シミュレーション (注 11) を行いました。その結果、 $G_{\alpha 12}$ の G.H5.17 と G.H5.23 が $G_{12}D$ の複数のアミノ酸残基 (N103, S169, Y176, Q264、「一文字アミノ酸表記 + 数字」の数字部分は N 末端から数えたアミノ酸残基の位置) と相互作用していることがわかりました。一方で、これらのアミノ酸残基と $G_{\alpha 13}$ はうまく相互作用できておらず、これらのアミノ酸を変異させることで、 $G_{12}D$ と $G_{\alpha 13}$ の結合が可能になると予想されました (図 2)。

そこで、 $G_{12}D$ の N103、S169、Y176、Q264 の 4 カ所について、それぞれ 19 種類の他のアミノ酸残基に置換した $G_{12}D$ 変異体を総計 76 種類作製し、 $G_{\alpha 12}$ と $G_{\alpha 13}$ との相互作用を TGF_{α} 切断アッセイで評価しました。その結果、 $G_{\alpha 13}$ との結合が強まった $G_{12}D$ 変異体を選抜し、変異をさらに組み合わせることで、 $G_{12}D$ 由来の二重変異体 (Y176H/Q264R) を $G_{\alpha 12}$ および $G_{\alpha 13}$ に強力に結合可能な $G_{\alpha 12/13}$ シグナル型の DREADD としての開発に成功しました (図 3)。

今後の展開

本研究で作製された $G_{\alpha 12/13}$ シグナル型の新規 DREADD は、今後の創薬研究に役立つと期待されます。 $G_{\alpha 12}$ と $G_{\alpha 13}$ は免疫機能の制御や、腫瘍の形成などに関与することが知られています。マウス免疫細胞をはじめとする様々な細胞種や、がん細胞に新規 DREADD を発現させ、デザイナーリガンド投与による $G_{\alpha 12}$ および $G_{\alpha 13}$ の活性化によって、疾患が治癒するかを調べることができます (参考文献 1)。生体内には、少なくとも $G_{\alpha 12}$ や $G_{\alpha 13}$ に相互作用する GPCR が 38 種存在します。 $G_{\alpha 12/13}$ シグナル型 DREADD を利用した実験を行うことで、これらの GPCR に対する薬が疾患治療に有効であるかどうかを、あらかじめ予測することが可能になり、創薬開発の効率化に期待できます。

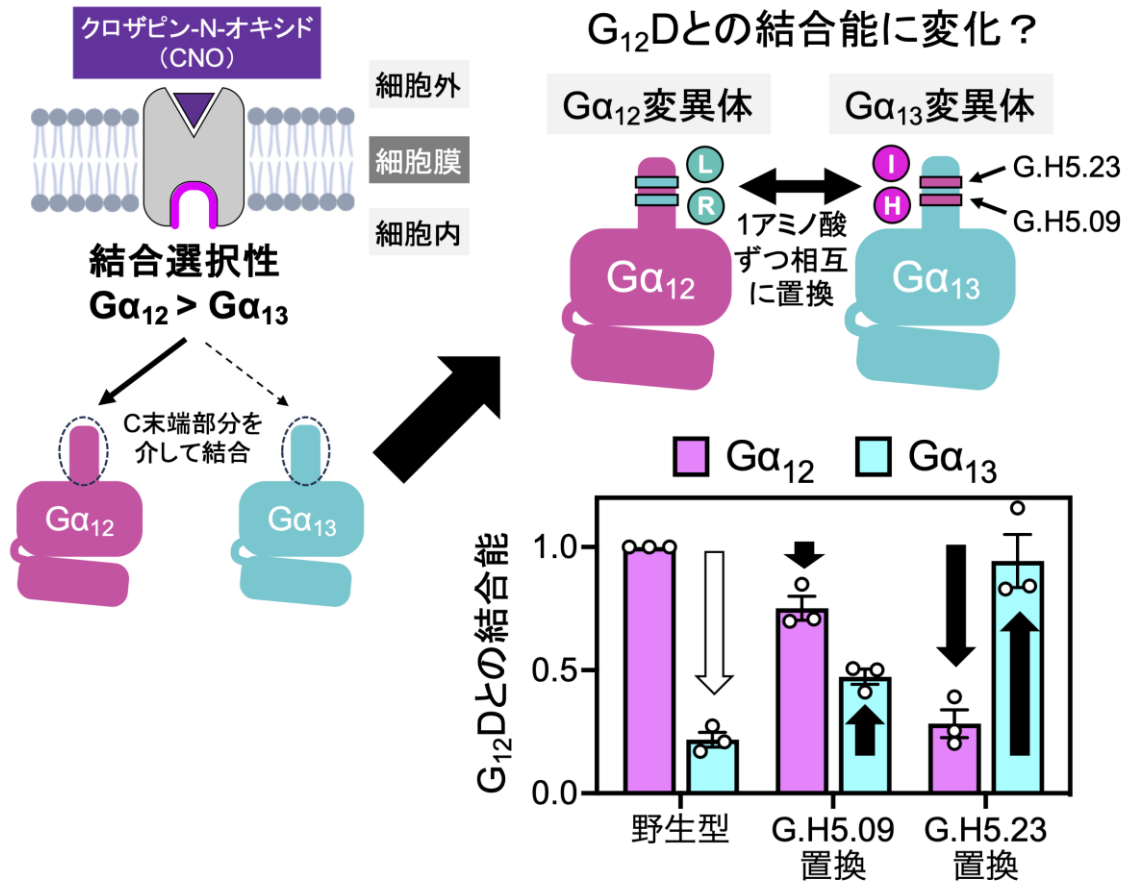


図 1. G₁₂D との結合に重要な Gα₁₂ のアミノ酸残基の同定

Gα₁₂-DREADD (G₁₂D) は、Gα₁₂ に強く結合する一方で、Gα₁₃ との結合は弱い。そこで、Gα₁₂ および Gα₁₃ の GPCR との主要な相互作用部位である C 末端部分 (通称 α5 ヘリックス、26 アミノ酸からなる) について相互置換の変異体を作製した。Gα₁₂ と Gα₁₃ の C 末端部位では異なるアミノ酸が 8 カ所あることから、計 16 種の変異体と G₁₂D の結合を TGFα 切断アッセイによって評価した。その結果、G.H5.09 のポジションを入れ替えた変異体 (Gα₁₂ ではヒスチジン (H) をアルギニン (R) に、Gα₁₃ ではその逆に置換させた) において、Gα₁₂ 変異体では G₁₂D との結合が減弱し、Gα₁₃ 変異体では G₁₂D との結合が増強した。さらに、G.H5.23 のポジションの変異体 (Gα₁₂ ではイソロイシン (I) をロイシン (L) に、Gα₁₃ ではその逆に置換させた) では、それぞれの変異体で G₁₂D との結合の強度が完全に入れ替わった。また、他の 6 カ所の変異体はこのようなパターンを示さなかった。この結果から、G₁₂D との結合の選択性に関わる Gα₁₂ と Gα₁₃ のアミノ酸残基の位置を同定することができた。

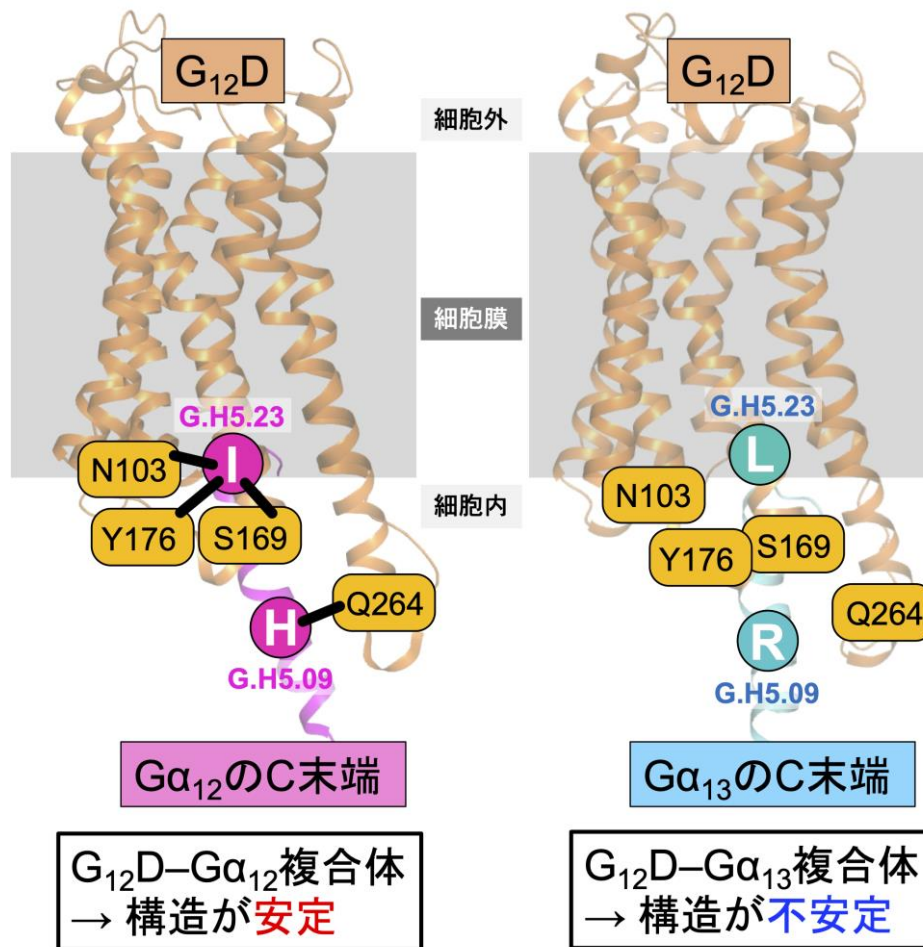


図 2. MD シミュレーションによる相互作用模式図

G₁₂D-Gα₁₂ 複合体と G₁₂D-Gα₁₃ 複合体をモデリングし、計 3.5 μs の MD シミュレーションとクラスタリング解析を実施した。最も安定な構造と予測された各複合体構造をタンパク質のリボンダイアグラムにて示した。簡略化のため、Gα₁₂ と Gα₁₃ は C 末端部分のみを表示し、脂質二重膜を灰色で表記した。G₁₂D-Gα₁₂ 複合体では、G.H5.09 のヒスチジン (H) が G₁₂D の Q264 と近接しており、また G.H5.23 のイソロイシン (I) が G₁₂D の N103、S169、Y176 で構成されるポケットに安定に收容されていた (相互作用の存在を黒線で示した)。一方で、G₁₂D-Gα₁₃ 複合体において、G.H5.09 のアルギニン (R) と G.H5.23 のロイシンは、G₁₂D-Gα₁₂ 複合体で観察されたこれらの相互作用を形成していなかった。この結果から、G₁₂D の 4 カ所のアミノ酸残基 (Q264、N103、S169、Y176) と Gα₁₂ の 2 カ所のアミノ酸残基 (G.H5.09 と G.H5.23) の間の相互作用が G₁₂D と Gα₁₂ の結合を安定化している一方で、G₁₂D と Gα₁₃ の結合においては、Gα₁₃ の G.H5.09 および G.H5.23 のアミノ酸を收容するために適したアミノ酸残基を G₁₂D が有していないため、結合が不安定になっていると考えられた。

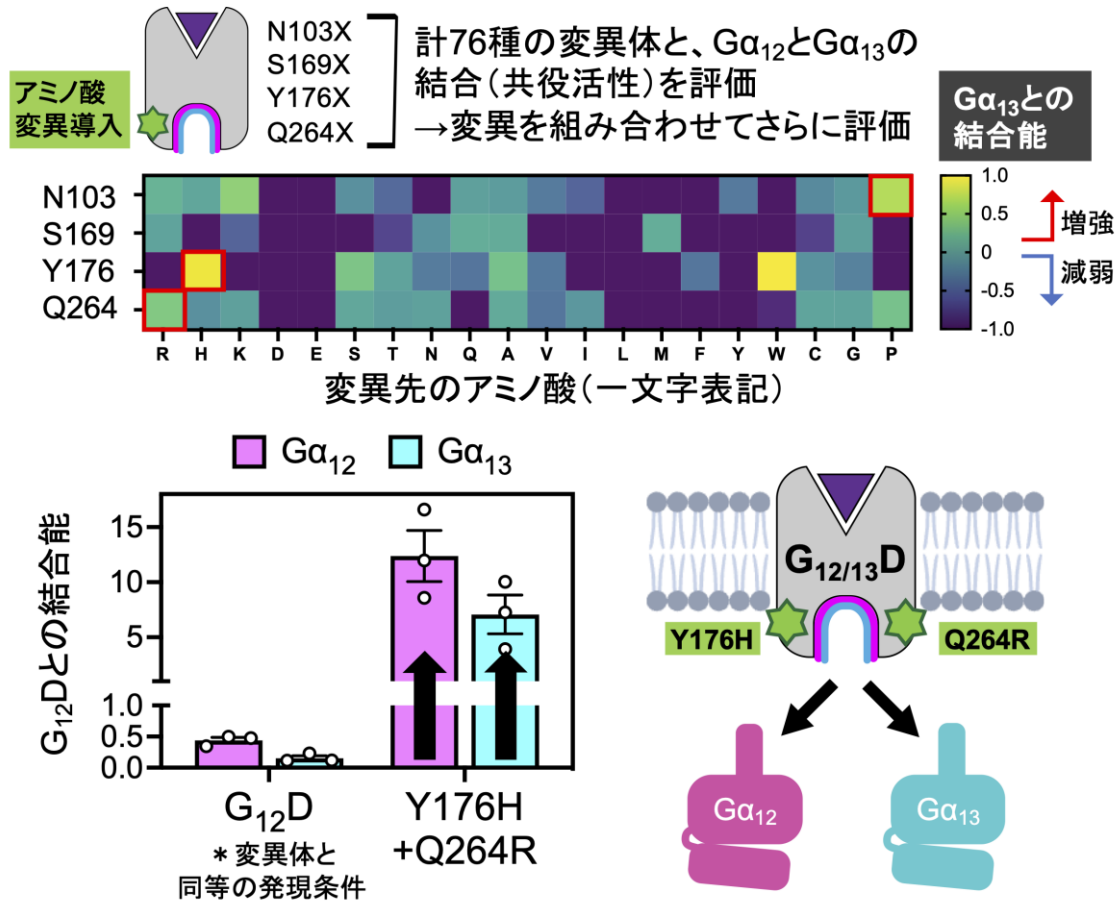


図 3. $G_{12}D$ 変異体スクリーニングと $G\alpha_{12/13}$ シグナル型の DREADD 開発
MD シミュレーションに見出した結合選択性に関わる $G_{12}D$ の 4 カ所のアミノ酸残基 (N103、S169、Y176、Q264) を他の 19 種のアミノ酸残基に置換した計 76 種の変異体を作製し、TGF α 切断アッセイによって、これらと $G\alpha_{12}$ および $G\alpha_{13}$ の結合を検証した。これらうち、 $G\alpha_{13}$ の結合を増強させた変異 (N103P、Y176H、Q264R) をさらに組み合わせさせた結果、Y176H と Q264R の二重変異を有する $G_{12}D$ 改変体が $G\alpha_{12}$ および $G\alpha_{13}$ と強力に結合し、シグナル伝達を誘導する新規 DREADD として見出した。

【謝辞】

本研究は、日本学術振興会 (JP21H04791, JP21H05113, JP22J10475, JPJSBP120213501, JPJSBP120218801)、科学技術振興機構 (JPMJFR215T, JPMJMS2023)、日本医療研究開発機構 (JP22ama121038, JP22zf0127007)、武田科学振興財団など、多くの支援を受けて実施されました。

【用語説明】

注1. $G_{\alpha 13}$ シグナル

GPCR と結合する G_{α} サブユニットのうち、 G_{12} ファミリーに属する $G_{\alpha 13}$ が介在する細胞内シグナル。Rho-ROCK 経路を活性化する他、多様なシグナル分子と結合することが知られている。ノックアウトマウスによる研究から、 $G_{\alpha 13}$ は血管形成や免疫応答に重要な役割を担うことがわかっており、さらに様々ながん細胞種において発現の増減がみられるなど、創薬標的となり得る。

注2. G タンパク質共役受容体 (G-protein-coupled receptor、GPCR)

細胞表面の細胞膜（形質膜）に発現する受容体であり、細胞膜を 7 回貫通する特徴的な構造を有する。ヒトには約 800 種の GPCR が存在し、それぞれが特定のホルモンや代謝物などと結合する。この結合により、GPCR が活性化型へと構造変化し、細胞内のシグナル分子（主にヘテロ三量体 G タンパク質のうちの G_{α} サブユニット）と結合することによって、さまざまな細胞応答を引き起こす。

注3. DREADD (Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs の略語)

リガンド結合部位にアミノ酸変異を導入し、特定の薬剤のみに応答するように改変した人工受容体（別名、デザイナーGPCR）。汎用されている DREADD はムスカリン性アセチルコリン受容体に由来し、内因性代謝物のアセチルコリンには応答せず、元来生物活性を有さない特定のデザイナー化合物により活性型となり、シグナル伝達を誘起する。

注4. デザイナーリガンド

DREADD を活性化させるリガンド分子。デザイナーリガンドは DREADD 以外のタンパク質には結合せず、生物活性を示さない。本研究では、ムスカリン性アセチルコリン受容体由来の DREADD に対するデザイナーリガンドとして汎用されるクロザピン N-オキシド (CNO) を使用した。

注5. リガンド

タンパク質に対して結合する分子。本研究内では GPCR を活性化する分子を指す。

注6. ヘテロ三量体 G タンパク質

G_{α} , G_{β} , G_{γ} の 3 つのサブユニットから構成されるタンパク質複合体。この中でも G_{α} サブユニットが GPCR と直接相互作用することで構造変化を起こし、核酸交換反応を経て GTP 結合型の活性化状態となり、 $G_{\beta\gamma}$ サブユニットと解離する。解離後の G_{α} サブユニットと、 $G_{\beta\gamma}$ サブユニットはそれぞれ下流のシグナル分子と結合することで、様々なシグナル応答を引き起こす。

注7. Rho-ROCK 経路 (ロー・ロック経路)

主に、細胞の骨格タンパク質に働きかけることで、細胞の形態の変化や、細胞遊走、細胞間接着などを制御する経路。GPCR によって活性化した $G_{\alpha 12}$ および $G_{\alpha 13}$ は、RhoGEF と呼ばれるタンパク質に結合し、これが低分子量 GTP 結合タンパク質 Rho を GTP 結合型の活性型に変化させる。Rho はリン酸化タンパク質である ROCK を直接活性化し、細胞骨格に関連するミオシン軽鎖などをリン酸化することにより、細胞骨格を変化させる。

注8. TGF α 切断アッセイ

膜タンパク質 Transforming Growth Factor-alpha (TGF α)の切断反応を利用した三量体 G タンパク質の活性化測定手法。G α_q の情報伝達の下流で膜型タンパク質分解酵素が活性化し、TGF α の細胞外部位を切断する。TGF α にアルカリホスファターゼ (AP) を融合した改変体タンパク質 (AP-TGF α) を用いることで、TGF α の切断量を細胞培養液の AP の比色反応として簡便に定量できる。本研究では、AP-TGF α 、G $_{12}D$ (またはその変異体)、G α_q の GPCR 相互作用部位を $G_{\alpha 12}$ または $G_{\alpha 13}$ の配列に置き換えたキメラ G タンパク質 (またはその変異体) をリポフェクション法により G タンパク質欠損 HEK293 細胞に発現させる。この細胞にデザイナーリガンドを添加し、培養上清に放出される AP-TGF α 量を GPCR と G α サブユニットの相互作用の強度として評価した。

注9. アミノ酸残基

タンパク質を構成しペプチド結合したアミノ酸。本研究ではアミノ酸残基の側鎖同士の相互作用に着目した。

注10. モデリング

すでに実験的に決定されているタンパク質の立体構造情報などを元に、任意のアミノ酸配列を有するタンパク質の立体構造を予測する手法。

注11. 分子動力学シミュレーション

計算機を用いたシミュレーションの一種。原子同士に働く相互作用力に基づき運動方程式を計算することで、原子位置の時間経過を算出し、タンパク質の構造変化を解析することができる。

【参考文献】

1. Ono *et al.*, Sig Trans Target Ther 2023
<https://www.tohoku.ac.jp/japanese/2023/08/press20230821-01-g12.html>
2. Inoue *et al.*, Cell 2019
<https://www.tohoku.ac.jp/japanese/2019/05/press20190531-01-genri.html>

【論文情報】

タイトル : Identification of $G_{\alpha 12}$ -vs- $G_{\alpha 13}$ -coupling determinants and development of a $G_{\alpha 12/13}$ -coupled designer GPCR

日本語タイトル : $G_{\alpha 12}$ と $G_{\alpha 13}$ の共役選択性を担う GPCR アミノ酸残基の同定と $G_{\alpha 12/13}$ 共役型デザイナー受容体の作出

著者 : Manae Tatsumi¹, Christian Cruz², Nozomi Kamakura¹, Riku Kuwabara¹, Gaku Nakamura¹, Tatsuya Ikuta¹, Ravinder Abrol², Asuka Inoue^{1*}

1 東北大学大学院 薬学研究科

2 カリフォルニア州立大学ノースリッジ校

*責任著者 : 東北大学 大学院薬学研究科 教授 (京都大学 大学院薬学研究科 教授 併任) 井上飛鳥

掲載誌 : Scientific Reports

DOI : <https://doi.org/10.1038/s41598-024-61506-4>

【問い合わせ先】

(研究に関すること)

東北大学大学院薬学研究科

教授 井上 飛鳥 (いのうえ あすか)

TEL: 022-795-6861

Email: iaska@tohoku.ac.jp

(報道に関すること)

東北大学大学院薬学研究科・薬学部 総務係

TEL: 022-795-6801

Email: ph-som@grp.tohoku.ac.jp