

平成28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名：(日本語) 革新的先端研究開発支援事業ソロタイプ「画期的医薬品等の創出をめざす
脂質の生理活性と機能の解明」研究開発領域

(英語) Advanced Research and Development Programs for Medical Innovation,
“Studies on Specific Activities and Functions of Lipid Molecules to
Develop Innovative Medical Technologies”

研究開発課題名：(日本語) リガンドが不要な革新的 GPCR ツールを用いた脂質関連オーファン受容体
の機能解明

(英語) Understanding lipid-related orphan G protein-coupled receptors using
activating GPCR mutations

研究開発担当者 (日本語) 東北大学大学院薬学研究科生命薬科学専攻 准教授 井上 飛鳥

所属 役職 氏名：(英語) Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Tohoku University. Associate
Professor. Asuka Inoue

実施期間：平成28年10月1日 ～ 平成29年3月31日

II. 成果の概要（総括研究報告）

・ 研究開発代表者による報告の場合

和文

結晶構造が既知の G タンパク質共役型受容体 (GPCR) を中心に 14 種類の日ト GPCR を選択し、Ballesteros-Weinstein (BW) 番号 3.43 のアミノ酸残基をグルタミン (Q) に置換したコンストラクトを作製した。タンパク質の発現解析を可能とするため、N 末端に FLAG エピトープタグを付加した。野生型コンストラクトと 3.43Q 変異型コンストラクトを HEK293 培養細胞に一過的に発現させ、TGF α 切断アッセイ (Gq シグナルおよび G12 シグナルを評価可能) と cAMP Glosensor アッセイ (Gs シグナルおよび Gi シグナル (ホルスコリン添加時) を評価可能) を用い、リガンド非添加時の GPCR の恒常活性を評価した。その結果、14 種類のいずれ GPCR において 3.43Q 変異体が恒常活性を示すことを見出した。例えば Gs 共役型の β 1 アドレナリン受容体、 β 2 アドレナリン受容体、アデノシン A2A 受容体、Gi 共役型の M2 アセチルコリン受容体、 μ オピオイド受容体、Gq 共役型の H1 ヒスタミン受容体、CysLT2 システニルロイコトリエン受容体において、3.43Q 変異体はその下流シグナルを誘導した。また、デザイナー受容体 (内因性リガンドには応答性せず合成リガンドのみによって活性化される人工受容体) の M3D と M3D- β 1 においても、L3.43Q 変異体の発現によりそれぞれ Gq シグナルと Gs シグナルの恒常的な活性化が誘導され、培養細胞に由来する内因性リガンドの影響を排除した状況でも 3.43Q 変異体は恒常活性を有することを確認した。TGF α 切断アッセイで恒常活性が検出された 3.43Q 変異型コンストラクトについて、Gq 欠損 HEK293 細胞、G12 欠損 HEK293 細胞、Gq/G12 欠損 HEK293 細胞を用いて、どの三量体 G タンパク質シグナルを流すか検証した。その結果、H1 と CysLT2 は Gq 選択的、AT1 アンジオテンシン II 受容体は Gq と G12 の両者に共役した TGF α 切断応答を示すことを確認した。同様に、cAMP Glosensor アッセイで cAMP 増加シグナルが検出された 3.43Q 変異型コンストラクトの一部について、Gs 欠損 HEK293 細胞を用いてそのシグナルが消失するかを評価し、 β 1 アドレナリン受容体、 β 2 アドレナリン受容体は cAMP Glosensor シグナルが完全に消失することを確認した。次に、リガンド刺激時の野生型コンストラクトの三量体 G タンパク質の活性化パターンを TGF α 切断アッセイおよび cAMP Glosensor を用いて評価し、3.43Q 変異型コンストラクトの恒常活性のシグナルパターンと比較した。その結果、3.43Q 変異型コンストラクトの恒常活性はリガンド刺激時の野生型コンストラクトとほぼ同様のシグナルパターンを示すことを見出した。また、三量体 G タンパク質の活性化を評価するにあたって、高輝度スプリットルシフェラーゼ NanoBiT システムを用いた三量体 G タンパク質活性化検出法を開発し、上記の野生型コンストラクトの三量体 G タンパク質の活性化パターンを検証した。抗 FLAG エピトープタグ抗体を用いたフローサイトメトリーにより、野生型コンストラクトと 3.43Q 変異型コンストラクトの膜表面発現を比較したところ、3.43Q 変異型コンストラクトは概ね野生型コンストラクトよりも発現量が低下していた。この発現量の低下が活性化 GPCR による内在化の亢進によるものと想定し、 β アレスチン欠損 HEK293 細胞を用いて膜表面発現解析を行ったところ、 β 2 アドレナリン受容体において野生型コンストラクトと 3.43Q 変異型コンストラクトの膜表面発現量はほぼ同程度になった。さらに、NanoBiT システムを用いて GPCR への恒常的な β アレスチンの会合を評価したところ、 β 2 アドレナリン受容体において野生型コンストラクトよりも 3.43Q 変異型コンストラクトの方で β アレスチンの会合量が増加していた。CysLT2

や M3D について 3.43Q 変異体のリガンド応答性を評価したところ、3.43Q 変異体は野生型コンストラクトと比べてその活性が約 10 倍向上 (EC50 値が約 10 分の 1) することを見出した。従って、3.43Q の変異導入は GPCR の活性型・不活性型の平衡を活性型に傾ける効果があり、リガンドポケットの構造は維持されることがわかった。

英文

Based on structural information (crystal structures) and ligand availability (high affinity agonists and inverse agonists), we selected 14 GPCRs and generated their point mutants by introducing a glutamine (Q) at the Ballesteros-Weinstein (BW) position 3.43 (3.43Q mutants). In order to be able to track protein expression and distribution using a tag antibody, we fused the FLAG epitope tag at the N-terminus. We transiently expressed the 3.43Q mutants and their wild-type constructs in HEK293 cells and measured activation of G protein signaling. We used a transforming growth factor- α (TGF α) shedding assay, which detects Gq and G12 signaling, and in-house modified cAMP Glosensor assay, which monitors Gs and Gi signaling (the latter with forskolin treatment). We found that all of the tested 3.43Q mutants induced constitutive G protein signaling as compared with their wild-type constructs. For example, Gs-coupled adrenergic β 1, β 2 and adenosine A2A receptors showed higher cAMP-derived luminescent signals; Gi-coupled muscarinic M2 and opioid μ receptors exhibited lower cAMP-derived luminescent signals in the presence of forskolin; Gq-coupled histaminergic H1 and cysteinyl leukotriene CysLT2 receptors induced TGF α shedding response. To exclude effects of endogenous ligands produced by cultured cells, we used designer GPCRs known as DREADDs, which are solely activated by a synthetic, biologically inert ligand. When we expressed the 3.43Q mutant of a Gq-coupled M3D or a Gs-coupled M3D- β 1 receptor, we detected constitutive signals in the TGF α shedding assay or the cAMP Glosensor assay, respectively. The result indicates that the apo form (GPCR without ligand in its orthosteric pocket) of the 3.43Q mutants is constitutively active. We further validated G protein signaling of the 3.43Q mutants by using a panel of recently generated G protein-deficient HEK293 (deletion of Gs, Gq, G12 or combinations). In the Gq-deficient cells, the mutant H1-induced TGF α shedding response as well as the mutant CysLT2-induced response were completely abolished, thus confirming selective activation of Gq pathway by the mutant GPCRs. In case of angiotensin II AT1 receptor, TGF α shedding response of 3.43Q-mutant AT1 remained in the Gq-deficient cells or the G12-deficient cells, but silenced in the Gq/G12-deficient cells, showing that the mutant AT1 induces both Gq and G12 signaling. In the cAMP Glosensor assay, the 3.43Q mutant-induced luminescent signals were completely missing. We next compared G protein signaling patterns of the 3.43Q mutants with those of ligand-induced wild-type GPCRs and confirmed that the coupling profile of the 3.43Q mutants resembles that of the wild-type constructs. By analyzing cell surface expression of the 3.43Q mutants using a flow cytometry, we found reduced expression level of the 3.43Q mutants (on average, 30% reduction). We assumed that the 3.43Q mutants constitutively recruits β -arrestins and is internalized. To this end, we used β -arrestin-deficient HEK293 cells and compared surface expression in the cells. We found that in

the $\beta 2$ adrenoceptor the 3.43Q-mutant and wild-type receptors showed similar expression levels. We further examined β -arrestin recruitment to GPCRs using a NanoBiT system and confirmed higher basal binding of β -arrestins to the 3.43Q mutants than wild-type constructs. Together, we concluded that the 3.43Q mutants showed constitutive G protein signaling and β -arrestin recruitment, both of which are indicative of active GPCR conformation.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0 件、国際誌 0 件）

該当なし

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. GPCR シグナルを基軸とした創薬基礎研究, 口頭, 井上飛鳥, 青木淳賢, 日本薬学会第 137 年会, 2017/3/25, 国内

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

該当なし

(4) 特許出願

該当なし