

受容体 - G α 融合タンパク質を用いたリガンド検索

群馬大学工学部生物化学工学科生物機能工学講座
武田茂樹

1. GPCR とハイスループットスクリーニングの背景

Gタンパク質共役受容体 (GPCR) は三量体Gタンパク質と共役して働き、現在使用されている臨床薬の約5割以上がGPCRをターゲットにしていると言われて¹⁾。GPCRのリガンド検索は公的研究機関だけでなく、創薬をめざす製薬会社やベンチャー企業などが盛んに行っているが、その活性測定法のほとんどは動物培養細胞を対象とするGPCRを発現させ、リガンド候補となる物質を作用させたときに起こる細胞の変化を観測することを基本にしている。多くの方法が開発された中で、最も成果を上げ、広く用いられている方法は、アゴニスト GPCR Gタンパク質 (特にG $_q$ 系)

PLC (ホスホリパーゼC) IP $_3$ 細胞内カルシウム濃度上昇という一連の変化で起こる変化を、細胞に導入したFura-2やFluo-3などの蛍光の変化で観測する方法である。今日ではG $_i$ などに共役したGPCRに対する感度を上げるため、G $_{16}$ タンパク質やG $_{q/11}$ キメラタンパク質をGPCRと共発現させた細胞を用いることが多いが²⁾、この方法の問題点も指摘されている³⁾。また受容体発現細胞にもともと存在する内在性受容体の効果が、活性測定の結果を混乱させるもととなる。

我々は既存のスクリーニング系の問題点を克服すべく、従来とは異なる方法でGPCRリガンドのハイスループットスクリーニングが可能になる方法を模索した。特にG $_{16}$ は脳での発現が強いにもかかわらず、それと共役したGPCRの活性測定は、上記の方法を含めた既存の方法が比較的苦手とするので、G $_{16}$ に共役したGPCRに重点をおいたリガンド検索系の構築をめざした。

2. 受容体 - G 融合タンパク質によるリガンド検索の実際

さまざまな検討の結果、我々は受容体とGタンパク質 α サブユニットとの融合タンパク質を昆虫細胞で調製し、その膜画分を用いてアゴニスト依存性 [35 S]GTP γ S結合活性を測定する系を利用することとした。受容体 - G α の融合タンパク質の作製と解析はStrosbergらのグループによって最初に報告され、近年ではMilliganやSeifertのグループによって、よく研究されている⁴⁾。融合タンパク質を含む膜画分にアゴニストを加えると、受容体に続いてGタンパク質 α サブユニット部分が活性化されるが、G α にはGTPase活性があるので、活性化に際してG α サブユニットからのGDPの解離が促進されGTPが結合する。我々の系ではGTPのかわりに [35 S]GTP γ Sを用い、この取り込まれた [35 S]GTP γ Sの量をシンチレーションカウンターで測定し、定量化する。

対象とするGPCRの配列が得られたら、PCRを用いて受容体 - G α 融合遺伝子を作成する (Fig.1)。これまでの学会発表などで質問の多かったのは、融合タンパク質の受容体とG α タンパク質のジャンクション部分の設計についてである。受容体遺伝子とG α 遺伝子の間に制限酵素認識配列をおけば、PCRで増やした受容体遺伝子をカセット式に組み込むことができ多数の受容体 - G α 融合遺伝子を作成する場合は便利であろうと思われるが、図のように我々はこの方法は用いていない。理由は制限酵素認識配列に由来する数アミノ酸の挿入が受容体 - G α 融合タンパク質の性質におよぼす影響が予想できないからである。G α 遺伝子部分には開始コドンのメチオニンも含まれている。GPCRのC末端細胞内配列はその長さが多様であり、融合タンパク質とした場合には、G α タンパク質との相対的位置関係が気になる。しかしながら、C末端側配列が短すぎたり長すぎることが原因で [35 S]GTP γ Sの取り込みが起らないと思われる例は、まだ経験がない。

Sf9細胞への融合遺伝子の導入には組み換え体バキュロウイルスを用いるが、この作製にはキット化されているBac-to-Bac systemを用いるのが簡便である。融合

Receptor-G α Fusion Protein as a Tool for Ligand Screening

Shigeki TAKEDA

Department of Biological and Chemical Engineering, Faculty of Engineering, Gunma University

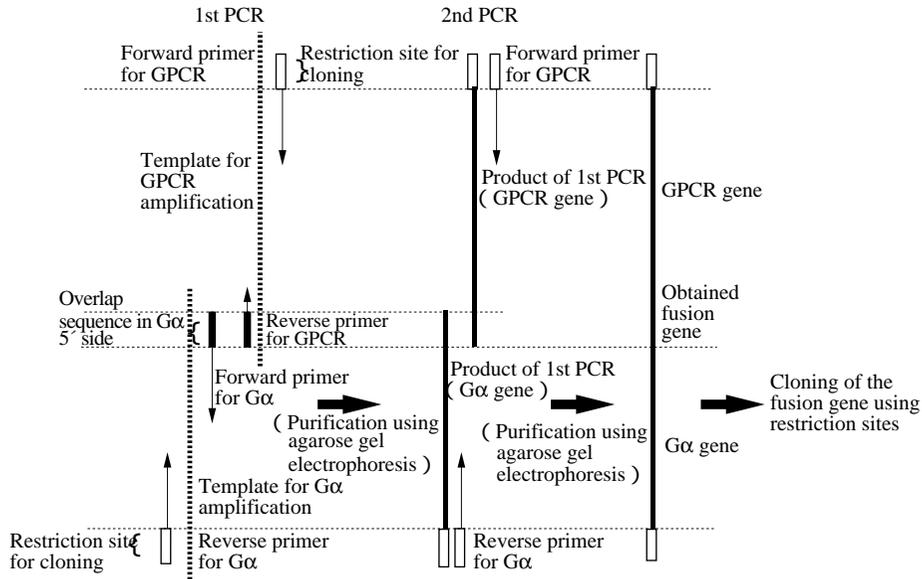


Fig.1 Schematic diagram for the construction of receptor- Gα fusion gene.

タンパク質の発現には組み換え体ウイルスを multiplicity of infection (m.o.i.) = 10 で感染させ、感染後 24 ~ 60 時間程度でハーベストし膜画分を調製する。膜画分は凍結融解の繰り返しを避けるため小分けにして保存する。

実際のリガンドスクリーニングは96穴プレートを用いて次のように反応試薬を混合する。10倍濃度反応緩衝液 (200 mM HEPES pH8.0, 100 mM MgCl₂, 1.6 M NaCl, 10 mM EDTA, 10 mM DTT) 10 μl および 1 mg/ml の膜標品 20 μl に [³⁵S]-GTPγS, GDP とリガンド候補画分を加えて全量 100 μl とする。[³⁵S]-GTPγS と GDP は最終濃度でそれぞれ 0.1 nM, 1 μM とする。最後に膜標品を加えるようにして 30 分で 30 分反応させる。その後セルハーベスターで受容体に結合した [³⁵S]-GTPγS をフィルター上に回収し、低温の 20 mM TrisHCl (pH8.0), 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂ で 3 回洗浄してから [³⁵S]-GTPγS 取り込み量を液体シンチレーションカウンターで測定する。パッカード社の「トップカウント」であれば96穴のフィルターのまま測定でき、1日に20枚から60枚程度測定できる(機種による)。手際よく準備しておけば全行程を1人で実験しても20枚のプレートの処理が(測定を除き)2時間以内に終了できる。

3. スクリーニング系の評価

この活性測定法のモデル実験としてノシセプチン受容体と G₁₂α の融合タンパク質を用いた例を紹介する。

融合タンパク質にノシセプチンを添加することにより融合タンパク質への [³⁵S]-GTPγS 結合活性は最大5倍程度上昇し、EC₅₀ 値 (最大活性の半分を示すのに必要なリガンド濃度) は 2 nM であった。この値は [³H]-ノシセプチンの解離定数 (K_d = 1.5 nM) とほぼ一致した。アゴニストの結合により、GDP に対する親和性が低下するので、リガンド添加の効果は GDP 存在下で顕著であった (Fig.2) [³⁵S]-GTPγS の結合を GDP で阻害する実験から GDP に対する親和性を算出すると、フルアゴニスト添加時に最も低く、パーシャルアゴニスト添加、アンタゴニスト添加の順に増加した。このことから、融合タンパク質を利用すれば [³⁵S]-GTPγS 結合活性を指標にフルアゴニストとパーシャルアゴニストを区別したリガンドの解析が可能であることがわかった。

同様の実験からブタ脳抽出物にも内在性ノシセプチン活性を検出することができ、活性の検出には約 1 g 湿組織相当の抽出物で十分であることがわかった。さらにこの活性は、ゲルろ過および逆相系 HPLC を用いた分析において、合成ノシセプチンとまったく同様の挙動を示すことが確認できたので、この融合タンパク質の [³⁵S]-GTPγS 結合活性だけを指標にしてノシセプチンの精製が可能であることが示された。これらのことから融合タンパク質を利用した活性測定が、機能未知の受容体に対する内在性リガンドの同定に応用できることがわかった。

我々の方法の長所は、まず、単純な binding assay をす

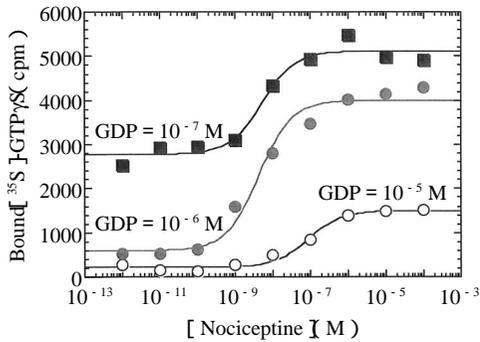


Fig.2 Ligand dependent stimulation of [^{35}S]-GTP γ S binding to nociceptin receptor-G $_{i2}\alpha$.

るだけであり、反応や作業が簡単なことである。また、この方法ではほかの方法と異なり、大量の培養細胞を継代し続ける必要がない。Sf9は数リットルのスケールで浮遊培養可能で、調製した膜画分を凍結させておけば、いつでもまったく同じ比活性の膜画分をすぐに使用できる。一度1~3リットル程度の培養を行えば、その膜画分の量で毎日トップカウントの処理量いっぱいまでアッセイしたとしても、半年以上は十分に測定し続けることができる。培養細胞を使用する場合に細胞の継代や受容体の安定的な発現に気を使ったり、スクリーニングのスケジュールに合わせて細胞を増やししたりする煩雑さを考えると、この利点は現実的にはかなり意味が大きいし安心である。フルアゴニストとパーシャルアゴニストを区別したりリガンドの解析が可能であることは薬理学的には重要である。Sf9細胞の内在性受容体による活性測定上の副作用はこれまで報告されていない。

一方、短所は、G $_q$ と共役する受容体について測定がうまくいかないことである⁵⁾。しかし、動物培養細胞で受容体 - G $_q\alpha$ 融合タンパク質を発現させた場合には [^{35}S]-GTP γ Sの取り込み量の顕著な上昇が報告されている⁶⁾ので、今後Sf9でも条件を検討すればG $_q$ への適用が可能になると考えている。もう1つの短所は、細胞を使う場合のような受容体より下流のシグナル伝達カスケードによる信号の増幅が期待できないことである。したがって、アゴニストの検出下限濃度はリガンドと受容体の間のK $_d$ 値および [^{35}S]-GTP γ Sの比活性で規

定される。これは場合によっては既存の方法の10倍程度感度が悪いと評価することもできるが、培養細胞の場合は内在性受容体の効果を確認するために試料を費やすことなどを合わせて考え、我々は特に問題視していない。

我々は、GPCRが7回膜貫通という共通の構造をもつこと、およびGPCRの多くがそのopen reading frameにイントロンをもたない、という2つの事実を利用してヒトゲノムデータから候補遺伝子の検索を行った。その結果、味覚、嗅覚受容体以外に50種類の新規GPCRと考えられる配列を得た⁷⁾。これらのうちの約30種について系統的に受容体 - G α 融合タンパク質を作成し、現在リガンドの検索を続けている。

4. 最後に：筆者からのお願い

我々は新規リガンドの候補となる化合物、画分を募集しています。生理活性はあるのだが、その反応がどのような受容体を介しているのか不明で解析にお悩みの研究者の方は、ぜひ私どものorphan receptorや活性測定系をお試し下さい。よろしく申し上げます。

本稿の執筆にあたり貴重な御助言をいただきました学習院大学生命分子化学研究所の芳賀達也教授に感謝いたします。

文 献

- 1) Howard, A. D., McAllister, G., Feighner, S. D., Liu, Q., Nargund, R. P., Van der Ploeg, L. H. and Patchett, A. A. (2001) *Trends Pharmacol. Sci.* **22**, 32-40.
- 2) Milligan, G. and Rees, S. (1999) *Trends Pharmacol. Sci.* **20**, 118-124; Milligan, G., Marshall, F. and Rees, S. (1996) *Trends Pharmacol. Sci.* **17**, 235-237.
- 3) Kostenis, E. (2001) *Trends Pharmacol. Sci.* **22**, 560-564.
- 4) Bertin, B., Freissmuth, M., Jockers, R., Strosberg, A. D. and Marullo, S. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 8827-8831; Milligan, G. (2002) *Methods Enzymol.* **343**, 260-273; Seifert, R., Wenzel-Seifert, K. and Kobilka, B. K. (1999) *Trends Pharmacol. Sci.* **20**, 383-389.
- 5) Guo, Z. -D., Suga, H., Okamura, M., Takeda, S. and Haga, T. (2001) *Life Sciences* **68**, 2319-2327.
- 6) Stevens, P. A., Pediani, J., Carrillo, J. J. and Milligan, G. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 35883-35890.
- 7) Takeda, S., Kadowaki, S., Haga, T., Takaesu, H. and Mitaku, S. (2002) *FEBS Letters* **520**, 97-101.