

食品因子／GPCRの相互作用評価系の開発

大阪府立大学大学院 生命環境科学研究科
原田 直樹

1. 研究の目的と背景

G protein-coupled receptor (GPCR) は、味、光、臭気、フェロモン、ホルモンや神経伝達物質など、多様な細胞外の化学刺激に応答してそのシグナルを細胞内へと伝達する細胞膜受容体ファミリーであり、ヒトでは約800種類のGPCRが存在する。GPCRを介したシグナルは様々な生命機能に関与していること、GPCRの発現分布およびリガンド／受容体の特異性を利用した選択的な調節が可能であるということから、広く創薬の標的となっている。さらに、医薬品に留まらず、食品成分の標的となることも明らかになりつつある。GPR40, GPR41, GPR43, GPR119やGPR120が脂肪酸受容体として鎖長選択的に脂肪酸をリガンドとすること¹、GPCR型エストロゲン受容体GPR30がイソフラボン類をリガンドとすること²、胆汁酸受容体TGR5が柑橘類成分のノミリンをリガンドとすること³が明らかとなっている。さらに、私どもの先行研究において、S-エクオールによって活性化されるGPCRの存在が示唆されたが⁴、同定には至っていない。これらの背景から、GPCRと食品因子リガンドの未同定の組み合わせが存在することが予想される。さらに、この組み合わせの発見は、機能性食品開発への応用へと展開することが期待される。しかしながら、食品因子／GPCRの組み合わせを探索する実験系が確立されていない。

GPCRは、7回膜貫通構造を有しており、細胞外や膜貫通ドメインに特異的なリガンドが結合すると、立体構造変化が引き起こされて活性化となる。活性化型GPCRは、ヘテロ三量体Gタンパク質のG α サブユニットに結合したGDPがGTPへ変換される反応を触媒する。G α の立体構造の変化によってヘテロ三量体Gタンパク質はG α とG β G γ に解離し、それぞれがシグナルを伝達する。G α サブユニットは下流のシグナルによりG α s, G α i, G α q, G α 12/13の4種類に大別される。G α sはアデニル酸シクラーゼを活性化することでcAMPの産生を促進し、G α iはアデニル酸シクラーゼを抑制する。G α qはホスホリパーゼCを活性化することで細胞内Ca²⁺濃度を上昇させ、G α 12/13は低分子タンパク質のRhoを活性化する。これらのシグナル伝達によって、cAMP応答配列(CRE)や血清応答配列(SRE)を介した転写が活性化される(図1)。

GPCRはリガンドの結合によって活性化後、GPCR kinase (GRK)によってC末端の細胞内領域でセリン／スレオニン残基がリン酸化を受け、Gタンパク質を介した

シグナル伝達が終結する。リン酸化されたGPCRに特異的に β -arrestinが結合し、エンドサイトーシスが引き起こされることでGPCRは細胞内へと取り込まれる。このプロセスは一般に脱感作と呼ばれる。GRKファミリーは、配列相同性に基づいて視覚GRKサブファミリー(GRK1とGRK7)、 β -アドレナリン受容体キナーゼサブファミリー(GRK2とGRK3)、GRK4サブファミリー(GRK4, GRK5, GRK6)の3つの主要グループに分けることができる。GRK2, 3, 5, 6は、哺乳動物組織において遍在的に発現されるのに対し、GRK1, 4, 7は網膜や精巣など特定の器官に限定される。

本研究では、食品因子／GPCRの組み合わせのスクリーニング系の構築を目的として、①GPCRとルシフェラーゼ応答ベクターを細胞に導入したエクスペクション・スクリーニング系、②GRKや β -arrestinとの相互作用を利用したプルダウン・スクリーニング系の2つの実験系の構築を試みた。

2. 研究の方法

2-1. 細胞培養法

ヒト胎児腎臓由来の培養細胞株であるHEK293FT細胞は10%ウシ胎児血清(FBS)、100 units/mL ペニシリンG、100 μ g/mL ストレプトマイシン硫酸塩を含むDulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)を用いた。培養は95% airと5% CO₂を含む37°Cのインキュベーター内で行った。

2-2. プラスミド作製

ヒトGPCR cDNAを組み込んだentry clone (258種類)は、産業技術総合研究所の五島直樹先生から分与いただいた⁵。Gatewayシステムを用いることで、GPCRをコードするcDNAをentry cloneからdestination vector (pcDNA3.2/V5-DEST)にサブクローニングした哺乳類GPCR発現ベクターを使用した。ルシフェラーゼレポーターベクターには、p4xCRE-TATA-Luc2P[4]、p3xSRE-TATA-Luc2Pまたはp4xCRE-3xSRE-TATA-Luc2P (p4xCRE-TATA-Luc2PベクターのCREサイトの下流にSREを3つタンデムに含む)を使用した。

pRK5-GRK2 (bovine) (Plasmid #14691), pcDNA3-GRK3 (bovine) (Plasmid #32689), pRK5-GRK5 (bovine) (Plasmid #14690), pRK5-GRK6 (human) (Plasmid #32693), pcDNA- β -arrestin-1-flag (rat)

(Plasmid #14687) は addgene より入手し、インサート cDNA は pGEX4T ベクターや pET30 ベクターにサブクローニングを行った。Flag タグ融合型ヒト $\beta 2$ アドレナリン受容体を発現するベクター (p3xFlag- $\beta 2$ -adrenergic receptor) を作製した。

2-3. ルシフェラーゼレポーターアッセイ

ルシフェラーゼレポーター活性の測定は、Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) を用いて行った。HEK293FT 細胞を、DMEM 培地 (2% FBS, 抗生物質不含) に懸濁し、48 well プレートに播種して 24 時間培養した。Opti-MEM に、GPCR 発現ベクター (0.075 $\mu\text{g}/\text{well}$) と firefly ルシフェラーゼレポーターベクター (0.075 $\mu\text{g}/\text{well}$) および *Renilla* ルシフェラーゼレポーターベクター pGL4.74 [*hRluc*/TK] (0.05 $\mu\text{g}/\text{well}$) を加えた DNA 混合液を調製し、polyethylenimine (PEI, 0.4 $\mu\text{l}/\text{well}$) を添加して混合した。この混合液を用いて 24 時間後トランスフェクションを行った後、クルクミンなどの食品因子を添加して、さらに 4 時間培養した。ルシフェラーゼ活性は、20/20ⁿ Luminometer (Promega) を用いて測定した。firefly ルシフェラーゼの値を *Renilla* ルシフェラーゼの値で割った値を相対比したものを relative light unites とし、グラフ化した (n=4, Mean \pm SD)。

2-4. GST タグ融合 GRK および β -arrestin-1 の発現誘導と精製

pGEX4T-GRK2, 3, 5, 6 および pGEX4T- β -arrestin-1 を形質転換した大腸菌 BL21 codon plus を前培養し、前培養液を 1/100 量植菌して培養した。OD₆₀₀ が 0.5 \pm 0.1 に達したところで isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG, 0.1 mM) を加え、さらに 16°C で 24 時間振盪培養した。尚、培養にはアンピシリンナトリウム (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を含む LB 培地を用いた。培養液を回収して可溶性バッファーを用いて懸濁し、超音波破碎後の遠心分離上清を SDS-PAGE 用のサンプルとして調製した。SDS-PAGE 後に、CBB 染色を行って組み換え体タンパク質の発現を調べた。

カラム内でバッファーを用いて平衡化した Glutathione Sepharose 4B 樹脂へ GEX4T- β -arrestin-1 を発現させた大腸菌破碎上清を加えて、4°C、一晚ローテーターを用いて混合し、樹脂へ GST 融合タンパク質を結合させた。バッファーで樹脂を洗浄後、GST 溶出バッファー (500 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 50 mM 還元型グルタチオン, 1 mM DTT, 0.1% TritonX-100) を加え、溶出を行った。その後、PBS を用いて透析を行った。

2-5. His タグ融合 β -arrestin-1 の発現誘導と精製

pET30- β -arrestin-1 を形質転換した大腸菌 BL21 codon plus を前培養し、前培養液を 1/100 量植菌して培養した。OD₆₀₀ が 0.5 \pm 0.1 に達したところで IPTG

(0.1 mM) を加え、18°C で 24 時間さらに振盪培養した。尚、培養にはカナマイシン硫酸塩 (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を含む LB 培地を用いた。培養液を回収して His 可溶性バッファー (20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 500 mM NaCl, 50 mM imidazole) を用いて懸濁し、超音波破碎後の遠心分離上清を SDS-PAGE 用のサンプルとして調製した。SDS-PAGE 後に、CBB 染色を行って組み換え体タンパク質の発現を調べた。

カラム内でバッファーを用いて平衡化した Ni-Sepharose 6 Fast Flow 樹脂と His- β -arrestin-1 を発現させた大腸菌破碎上清を、4°C、一晚ローテーターを用いて混合し、樹脂へ GST 融合タンパク質を結合させた。0.1% NP-40 を含む His 可溶性バッファーで樹脂を洗浄後、His 溶出バッファー (20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 500 mM imidazole, 0.1% NP-40, pH 7.4) を加え、溶出を行った。その後、PBS を用いて透析を行った。

2-6. 細胞分画法

HEK293FT 細胞を ϕ 100 mm dish 1 枚当たり、p3xFLAG- $\beta 2$ AR (4.8 μg) と PEI (16 μl) を Opti-MEM に混合した溶液を添加してトランスフェクションを行った。24 時間に培養した細胞を PBS で洗浄後、分画バッファー (20 mM HEPES-NaOH, 250 mM Sucrose, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ aprotinin, 1 mM PMSF, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ leupeptin) に懸濁してホモジナイザーで破碎を行った。1000 $\times g$ で 10 分間遠心分離後の上清を 40000 $\times g$ で 20 分間遠心し、沈殿を細胞膜画分として回収した。

2-7. リガンドの添加と架橋反応

2-6 で調製した 20 μg の細胞膜画分と 2-5 で作製した 3 μg の GST- β -arrestin-1 と終濃度 10 μM isoproterenol と DMSO で終濃度 2 mM の Dithiobis (succinimidyl propionate) (DSP) を計 100 μl になるように脱リン酸化阻害バッファー I (10 mM Na₂MoO₄, 10 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄) を含む PBS に混合した。架橋剤や細胞膜画分の有無、GST- β -arrestin-1 の代わりに GST などの条件を振って架橋反応を行った。氷上で 2 時間反応後、Glycine を終濃度 20 mM で加えて 15 分間常温で静置し、過剰な DSP を反応させた。超音波破碎後に 0.1% NP-40 を含む PBS で平衡化した Glutathione Sepharose 4B 樹脂と混合した。0.1% NP-40 を含む PBS で樹脂を洗浄後、SDS サンプルバッファーを加えて 98°C で 5 分間加熱し SDS-PAGE 用のサンプルとした。SDS-PAGE 後に CBB 染色および抗 Flag 抗体 (M2, Sigma) と HRP 結合 2 次抗体を用いたウエスタンブロットにより解析した。

2-8. 統計解析

統計解析には JMP statistical software version 8.0.1 (SAS Institute) を用いた。コントロール群との比較とし

て Dunnett 法を用いた。 $p < 0.05$ をもって統計学的有意とし、アスタリスクで示した。

3. 研究内容

本研究では、食品因子 / GPCR の組み合わせのスクリーニング系を構築することを目的とした。具体的には、① GPCR 発現ベクターとルシフェラーゼ応答ベクターを培養細胞に導入して、ルシフェラーゼ活性を指標に評価を行うエクスペクション・スクリーニング (図 1)、②細胞膜を単離し、リガンドに依存した GPCR の GRK や β -arrestin と結合を利用し、アフィニティータグを融合した GRK や β -arrestin を用いてプルダウン後、ともにプルダウンされた GPCR を質量分析器により同定するプルダウン・スクリーニング系 (図 2) の構築を試みた。さらに、①については実際に組み合わせの同定を検討した。

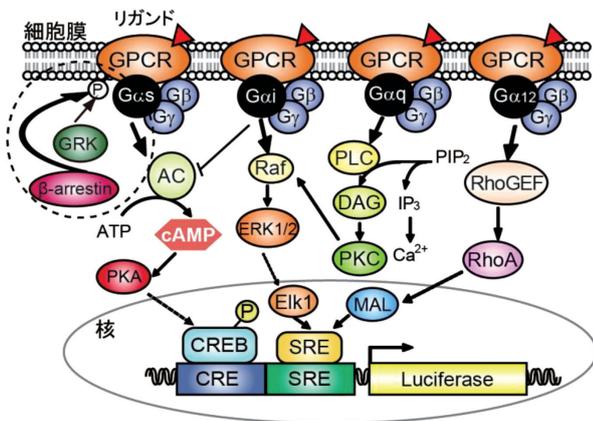


図 1 GPCR エクスペクション・スクリーニングシステム

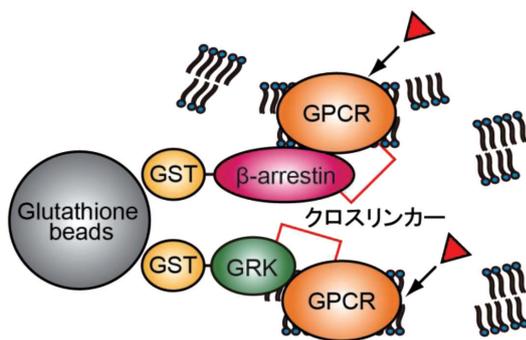


図 2 GPCR プルダウン・スクリーニングシステム

4. 研究の実施経過

4-1. GPCR エクスペクション・スクリーニング系による同定

図 1 に示すエクスペクション・スクリーニングシステムの構築を行った。具体的には、培養細胞に GPCR とルシフェラーゼ応答ベクターをトランスフェクション

し、食品因子による刺激をルシフェラーゼ活性として測定する実験系である。GPCR 発現ライブラリーとして、258 種のヒト GPCR cDNA から発現系を構築した。HEK293FT 細胞を用いて、GPCR 発現ベクターと CRE/SRE 応答ベクターをトランスフェクション後、食品因子を添加して培養し、ルシフェラーゼアッセイによって GPCR の活性化の有無を評価した。その結果、クルクミンが Adhesion GPCR の 1 つを活性化することが判明した。さらに、CRE あるいは SRE の一方のみを含む応答ベクターを用いて同様に評価した結果、クルクミンはこの Adhesion GPCR を活性化して SRE の活性を上昇させることが判明した (図 3)。

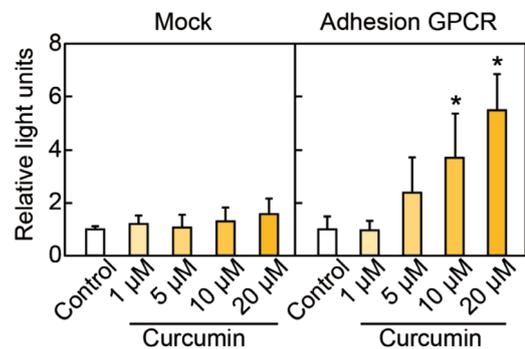


図 3 クルクミンによる Adhesion GPCR を介した SRE レポーター活性化

4-2. プルダウン系による同定

図 2 に示すプルダウン系を用いたスクリーニング系の構築に取り組んだ。これは目的細胞の細胞膜を単離後、食品因子 (リガンド) 刺激による細胞膜中の GPCR とタグを融合した β -arrestin や GRK との結合をクロスリンカーで強固にし、その後さらに、細胞膜の破碎、タグを用いたプルダウン後に脱クロスリンク、SDS-PAGE 後に LC-MS/MS を用いてプルダウンされた GPCR の同定を想定したものである。本研究では、まず既知の組み合わせである β 2-アドレナリン受容体とイソプロテレノールの結合を検出できるかを指標として構築することに取り組んだ。

GST- β -arrestin-1 と GST-GRK の発現ベクターを複製して組み換え体タンパク質の発現誘導を行った。その結果、GST-GSK2, 3, 5, 6 は全て不溶性画分でのみ認められ、可溶性画分には組み換え体タンパク質が得られなかった (data not shown)。一方で、GST- β -arrestin-1 は、16°C 培養時に可溶性画分に組み換え体タンパク質が検出されたため、引き続き Glutathione Sepharose 4B を用いて精製を行った (図 4)。

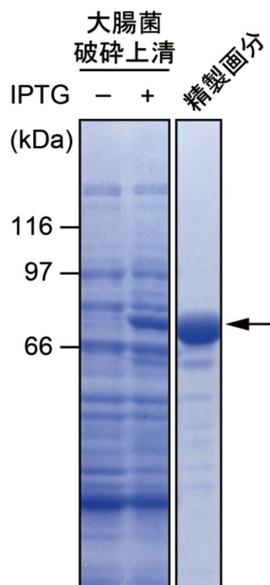


図4 GST-β-arrestin-1 の発現と精製

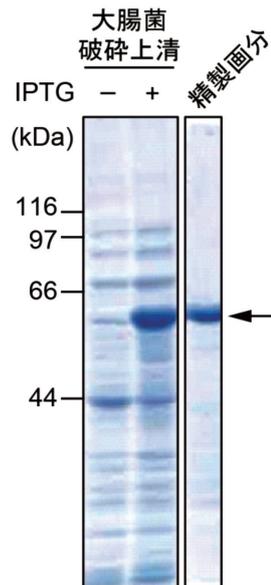


図5 His-β-arrestin-1 の発現と精製

FLAG-β2AR を形質導入した HEK293FT 細胞から分画した細胞膜画分と、精製した GST-β-arrestin-1 と isoproterenol を混合し、DSP を添加して架橋反応を行った。また、添加した GST-β-arrestin-1、細胞膜画分、isoproterenol、DSP の影響を観察するために、様々な条件で架橋反応を行った。サンプルを SDS-PAGE 後 CBB 染色やウエスタンブロットにより解析を行ったが、架橋剤を添加した際には GST がアフィニティープルダウン出来ないことが分かった (data not shown)。

そこで、GST タグを His タグに変更して His-β-arrestin-1 を大腸菌で発現精製し (図5)、Ni 樹脂を用いてプルダウンを行ったが、架橋剤 DSP 存在下では His-β-arrestin-1 もプルダウンできなかった (data not shown)。

5. 研究から得た結論・考察

オーファンリガンドを用いて標的 GPCR を探索するために2つの方法を考案した。①図1に示すエクスペリメンテーション・スクリーニング系を用いて、クルクミンと Adhesion GPCR の組み合わせを見出すことに成功した。②図2に示すプルダウン・スクリーニング系では、β-arrestin-1 が大腸菌を用いた可溶化組み換えタンパク質として得やすいことが判明した。GPCR が細胞膜タンパク質であるため、細胞膜破碎に伴う構造変化により β-arrestin-1 との解離が予想されるため、架橋剤の使用が必須と考えるが、架橋剤の使用により GST タグを用いたプルダウンに影響することが問題となった。架橋剤 DSP の両端に所有する NHS エステルがタンパク質のアミノ基 (第一級アミン) と反応し、二分子のタンパク質を結合させるが、His タグを用いた際にも同様にプルダウンできなかった。プルダウン・スクリーニングにおいては様々な段階での条件検討が必要であることが判明した。

6. 残された問題、今後の課題

①エクスペリメンテーション・スクリーニング系では、約 800 種存在する GPCR の発現ベクターライブラリーを充実させることが必要となる。②β-arrestin を用いたプルダウン・スクリーニングでは、架橋剤とプルダウンの方法についてさらなる検討が必要であり、特に抗体を用いて免疫沈降を行う方法についても検討すべきと考える。これらの問題が解決することで構築されたスクリーニング系により食品因子 / GPCR の組み合わせが明らかとなり、食品因子の機能メカニズムが解明されていくことが期待される。

7. 謝辞

本研究を遂行するに当たり、研究助成を賜りました公益財団法人東洋食品研究所ならびに関係の皆様へ厚く御礼を申し上げます。本研究で使用した entry clone plasmids は、産業技術総合研究所の五島直樹先生より、pRK5-GRK2 (Plasmid #14691)、pcDNA3-GRK3 (Plasmid #32689)、pRK5-GRK5 (Plasmid #14690)、pRK5-GRK6 (Plasmid #32693)、pcDNA-β-arrestin-1-flag (Plasmid #14687) は addgene より分与を受けたもので深謝いたします。また、ともに研究を遂行してくれた研究グループの山本小夏さんと荒堀有美さんに感謝いたします。

8. 参考文献

1 Husted, A. S., Trauelsen, M., Rudenko, O., Hjorth, S. A. & Schwartz, T. W., GPCR-Mediated Signaling of Metabolites., *Cell Metabolism*. **25**(4), 777-796 (2017)

- 2 Prossnitz, E. R. & Barton, M., The G-protein-coupled estrogen receptor GPER in health and disease., *Nature Reviews Endocrinology.*, **7**(12), 715-726 (2011)
- 3 Sasaki, T., Mita, M., Ikari, N., Kuboyama, A., Hashimoto, S., Kaneko, T. *et al.*, Identification of key amino acid residues in the hTGR5-nomilin interaction and construction of its binding model., *PLoS One.*, **12**(6), e0179226 (2017)
- 4 Horiuchi, H., Usami, A., Shirai, R., Harada, N., Ikushiro, S., Sakaki, T. *et al.*, S-Equol activates cAMP signaling at the plasma membrane of INS-1 pancreatic β -cells and protects against streptozotocin-induced hyperglycemia by increasing β -cell function in male mice., *J. Nutr.*, **147**(9), 1631-1639 (2017)
- 5 Goshima, N., Kawamura, Y., Fukumoto, A., Miura, A., Honma, R., Satoh, R. *et al.*, Human protein factory for converting the transcriptome into an *in vitro*-expressed proteome., *Nature Methods.*, **5**(12), 1011-1017 (2008)