

ナノバイオ手法による創薬ターゲット GPCR の機能性リガンド探索のハイスループット化に成功

—ドロップレットマイクロ流体デバイスの活用—

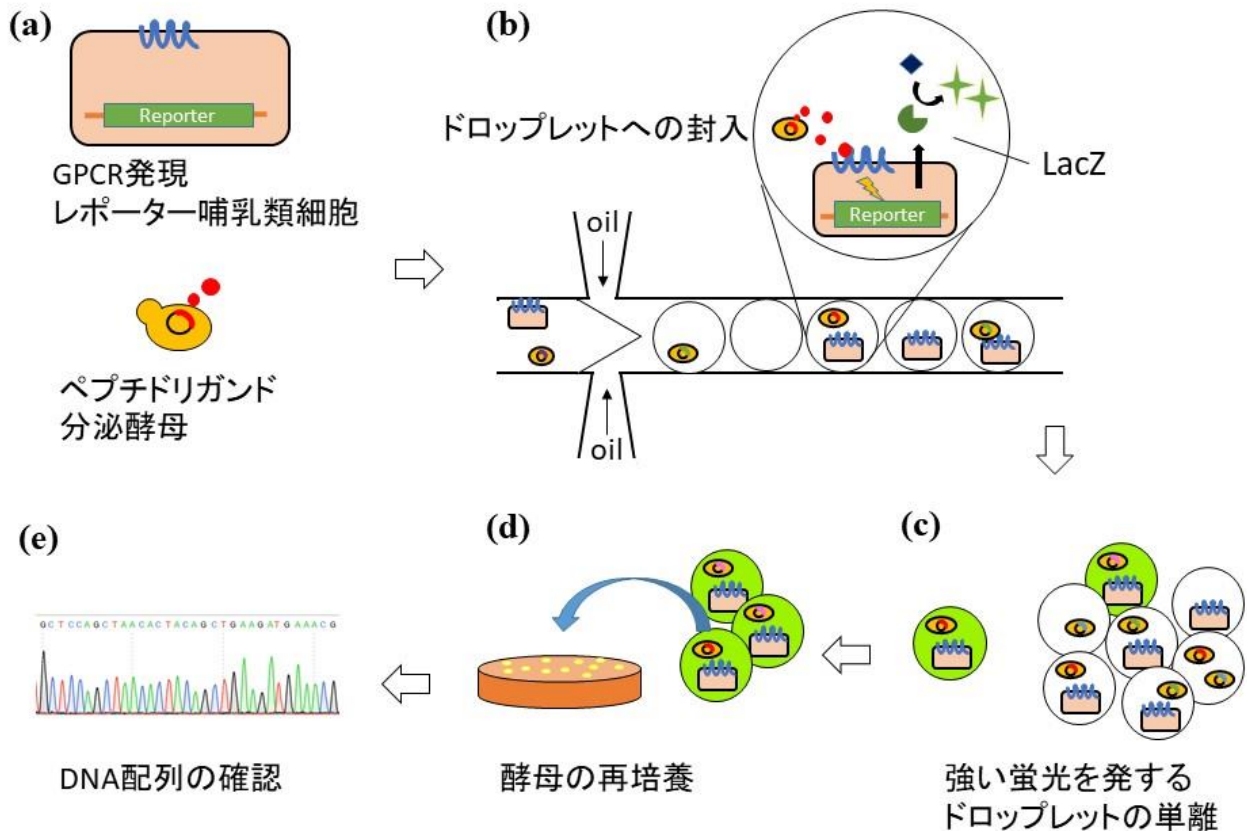
概要

京都大学大学院農学研究科応用生命科学専攻 植田充美 教授、青木航 同助教、柳沼謙志 農学部4回生（研究当時）ならびに早稲田大学との共同研究により、GPCR 発現ヒト培養細胞、ランダムペプチド分泌酵母、ドロップレットマイクロ流体デバイスを組み合わせることで、ハイスループットに新規アゴニスト（作動薬）を探索できる GPCR リガンドアッセイ系の構築に成功しました。

GPCR(Guanine nucleotide binding protein (G-protein) coupled receptor : G タンパク質共役受容体) は7回膜貫通型受容体ファミリーに属するタンパク質であり、重要な生理活性に関わるシグナル伝達を仲介しています。ヒト遺伝子の約3%が GPCR をコードしており、現在までに700~800種類のヒト GPCR が同定されています。これらの GPCR は、感覚、感情、認知、代謝、内外分泌、体循環、炎症、免疫などに深く関与しているため、GPCR の構造や機能を調べる基礎研究だけでなく、GPCR を薬のターゲットとして扱う応用研究も盛んに行われています。本研究で実現した GPCR の新規アゴニストをハイスループットに同定可能とするシステムは、GPCR の基礎的理解のみならず、臨床応用にも重要な役割を果たすと期待されます。

本研究成果は、2019年7月29日に国際学術誌「Scientific Reports」のオンライン版に掲載されました。

図1



1. 背景

薬として開発される物質としては、低分子医薬品、抗体などの高分子医薬品、そしてペプチドなどの中分子医薬品が代表例としてあげられます。低分子医薬品は、一般的に 500 Da (ダルトン) 以下の分子量であり、低コストで、入手しやすく、細胞膜の通過性や安定性にも優れています。しかし、ターゲットの選択性と特異性が比較的 low、副作用が生じやすい問題があります。一方で、分子量 10 kDa を超えるような高分子のバイオ医薬品は、ターゲットの選択性には優れていますが、生産コストが高く、細胞膜を通過できず、生体内で不安定です。最近では、これらに加えて、ペプチド医薬品が注目を集めています。ペプチドは分子量的にこれら 2 つの間であり、両者の利点を得ることができると考えられます。

ペプチドをベースとした医薬品候補を探索する場合、ファージディスプレイなどを用いて、GPCR に対する結合性を指標としてスクリーニングする系がよく使われます。しかしこのような系では、受容体の下流の応答を調べることができないため、アゴニスト (作動薬: 容体に結合して生体内物質と同様の細胞内情報伝達系を作動させる薬物) やアンタゴニスト (拮抗薬: 作動薬と逆に細胞内情報伝達系の働きを阻害する薬物) の同定が行えません。ゆえに、GPCR をはじめとするシグナル伝達受容体の新規機能性リガンドの発見には、受容体の活性を検出する機能活性測定法を用いることが重要です。

我々は、ペプチド医薬の有用性を踏まえ、酵母を用いた GPCR ペプチドリガンドライブラリの構築および機能活性測定法による GPCR の活性評価法を報告してきました。この研究では、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* をペプチドリガンドの生産宿主として利用しています。*S. cerevisiae* は哺乳類細胞と同種のたんぱく質フォールディング機能とペプチド分泌機構を持ちます。また、遺伝子操作の簡便性や、ペプチド生産コストの低さなどから、巨大ライブラリの作製に有効です。我々は、このペプチド分泌酵母を、GPCR を発現する培養細胞と混ぜ合わせることで、簡便かつ低コストに GPCR の機能活性測定法が実現できることを示してきました。しかし、活性評価には 96 穴プレートを用いており、スループット性が低く、巨大ライブラリから新規機能性リガンドを発見することは困難でした。

2. 研究手法・成果

a. ドロップレットマイクロ流体デバイスを用いたハイスループット GPCR リガンドアッセイ系のデザイン

よりハイスループットに GPCR のリガンド活性測定を行うため、我々はドロップレットマイクロ流体デバイスに注目しました。ドロップレット流体デバイスとは、ナノバイオ手法で、直径がマイクロメートルオーダーの微小液滴をハイスループットに作製するものです。このドロップレット内で機能活性測定法を行うことができれば、感度やスループットの向上、試薬コストの削減などが可能であり、従来のプレートベースのアッセイよりも優れていると考えられます。また、ドロップレットを利用した、ハイスループットシングルセル解析や、ドロップレット内での微生物や培養細胞の一時的な培養も可能であることも報告されており、生細胞を用いたアッセイにも応用可能であることが分かっています。加えて、FACS (fluorescence-activated cell sorting: 蛍光活性化セルソーティング) を用いたソーティングも可能であるため、巨大ライブラリのスクリーニングにも有効な技術であると考えられます。

我々は、ドロップレットマイクロ流体デバイスを基盤技術とし、ランダムペプチド分泌酵母、機能的 GPCR レポーター細胞を組み合わせることで、代表的な GPCR の一つである glucagon-like peptide 1 receptor (GLP1R) の機能性リガンドをハイスループットに探索可能なシステムを構築しました。

まず、GLP1R の活性に応答して LacZ を分泌する機能的レポーター細胞および GLP1R のペプチド分泌酵母

を構築します (図 1a)。次に、それらをドロップレットに同時に封入し、共培養を行います (図 1b)。酵母によって分泌されたペプチドが GLP1R を活性化すると、LacZ が細胞外に分泌され、その酵素活性によりドロップレット全体が強い蛍光を発します。その後、蛍光を発するドロップレットを単離します (図 1c)。次に、プレート培地でドロップレット中の酵母を再培養します (図 1d)。最後に、酵母のペプチド配列をシーケンシングし、リガンドの配列を調べます (図 1e)。この戦略により、従来の手法に比べてスループットおよび感度が高い、細胞膜受容体の新規機能性リガンドの発見法を構築できると期待されます。

b. LacZ 分泌レポーター細胞を用いた機能活性測定法

本研究で使用するレポーター細胞として、GLP1R を発現し、その活性化によって LacZ を分泌する HEK293 細胞を構築しました (GLP1R/LacZ-293)。また、GLP1R のアゴニストである Exendin-4 (Ex4) やランダム化ペプチドリガンドの分泌のために、酵母 *S. cerevisiae* BY4742 を用いました (図 2)。

機能活性測定法の評価を行うため、GLP1R/LacZ-293 に、標品 Ex4 (図 3a)、Ex4 分泌酵母 (Yeast-Ex4) の 12 時間培養後の培養上清 (図 3b)、Yeast-Ex4 を懸濁した DMEM 培地 (図 3c) を作用させました。LacZ の活性を蛍光で検出したところ、すべてのサンプルで GLP1R の活性化を確認できました。

特筆すべきは、レポーター細胞と分泌酵母の一時的な共培養によって GLP1R の活性測定が可能であったことです。この結果から、ドロップレット内での共培養による活性測定も可能であると予想されました。

c. ドロップレットマイクロ流体デバイスを用いた GLP1R の機能活性測定法

酵母を用いることによりペプチドライブラリの拡大は容易になりますが、プレートを用いたアッセイではスループット性が低いことが課題でした。一方で、ドロップレットマイクロ流体デバイスを用いたアッセイ系では、1 秒間に 1000 以上の液滴の生成が可能であり、リガンドアッセイを超並列的に評価することができます。我々は、1 つのドロップレット内にレポーター細胞と単一の酵母を封入することで、GLP1R の活性測定から、目的の酵母の単離・解析までをハイスループットに行えると考えました。

実際に行ったドロップレット内活性測定の評価結果を図 4 に示します。GLP1R/LacZ-293 を種々の培地に懸濁し、直径約 30 μm のドロップレットへ封入しました。培地には、DMEM 培地 (図 4a)、標品 Ex4 含有 DMEM 培地 (図 4b)、WT の *S. cerevisiae* (Yeast-WT) 懸濁 DMEM 培地 (図 4c)、Ex4 分泌 *S. cerevisiae* (Yeast-Ex4) 懸濁 DMEM 培地 (図 4d) を用いました。封入後、30°C で 6 時間インキュベートした結果、GLP1R/LacZ-293 と標品 Ex4 または Yeast-Ex4 を封入した場合において、強い蛍光を発するドロップレットが検出された。この結果から、ドロップレット内での共培養による GLP1R の活性測定が可能であることが分かりました。

また、ドロップレットを用いて目的の酵母細胞のみを単離できるかどうかを評価するために、Yeast-WT と Yeast-Ex4 を 100 対 1 の割合で混合・懸濁した DMEM 培地を用いて、ドロップレット内での活性測定を行いました (図 5a)。その後、得られたドロップレットの中から強い蛍光を発するものを単離しました (図 5b)。結果として、強い蛍光を発するドロップレットから、Yeast-Ex4 のみが単離され、本スクリーニング系が機能していることを確認することができました (図 5c)。

d. ランダム化 Ex4 ライブラリから機能性リガンドの同定

GLP1R の活性化機構には、ペプチドリガンドの N 末端 2 アミノ酸が大きく関与していることが知られてい

ます。我々は今回構築したドロップレット活性測定系を用いて、Ex4 の N 末端の 2 アミノ酸をランダム化したペプチドライブラリから、新規配列を含む機能性リガンドの同定を試みました。ランダム化 Ex4 分泌酵母を用いて、ドロップレット活性測定を行い、強い蛍光を発するドロップレットの中から 6 つを無作為に選び単離しました。その後、選ばれたドロップ内の酵母をそれぞれ別の YPD プレート培地で再培養しました。結果として、計 6 枚のプレート中、1 コロニー形成されたプレートが 2 枚、2 コロニー形成されたプレートが 1 枚、3 コロニー形成されたプレートが 1 枚、全くコロニーが形成されなかったプレートが 2 枚得られました。全くコロニーが形成されなかったプレートに関しては、ドロップレットの単離から YPD プレートにおける再培養までの過程で酵母をロスしたものと考えられます。

コロニーを形成した酵母については、GLP1R が活性化されると nanoLuc を分泌する細胞を用いて活性を再度測定するとともに、ペプチドの DNA 配列を調べました。結果として、Ex4 と同等の機能を持ち、かつ、異なる N 末端配列を持つペプチドリガンドを複数同定することができました (図 6)。この結果は、レポーター哺乳類細胞と分泌酵母の共培養によるドロップレット活性測定系により、ペプチドアゴニストをハイスループットに探索可能であることを示しています。

3. 波及効果、今後の予定

本研究は、シグナル伝達受容体の機能性リガンドをハイスループットに行うための新規方法を開発しました。具体的には、代表的な GPCR の一つである GLP1R の活性を検出できるレポーターヒト培養細胞と、GLP1R のペプチドリガンドを分泌する酵母をマイクロスケールのドロップレット内で共培養することで、機能性リガンドのスクリーニングを行える手法の構築に成功しました。本手法は、FACS を用いたハイスループットソーティングや Drop-seq と組み合わせることにより、より効率的な GPCR の新規リガンド発見が可能になると期待されます。

4. 研究プロジェクトについて

本研究プロジェクトは、国立研究開発法人 科学技術振興機構 (JST) の CREST (助成番号: JPMJCR16G2) の支援により推進されました。

<研究者からのコメント>

GPCR は 7 回膜貫通型の受容体であり、ヒトでは最大の膜タンパク質ファミリーです。GPCR は細胞膜に存在し、細胞外のシグナルを細胞内応答として伝達する役割を担っています。生体内での天然リガンドの種類は多岐にわたり、ペプチドやタンパク質ホルモン、核酸、脂質、光、イオンなどが同定されています。また、GPCR が細胞外シグナルを細胞内に伝達することで生じる応答も多岐にわたり、感覚、感情、認知、代謝、内外分泌、体循環、炎症、免疫などに関わるとさ



(左から) 青木助教、柳沼氏

れています。これらの応答はヒトの疾病とも深く関わっているため、GPCR をターゲットとした創薬の研究も進められています。実際、現在の市販薬の 50% が GPCR の関わるシグナル伝達系に作用しており、30% が GPCR に直接作用していると言われています。しかしながら、ヒトで同定されている 700~800 種類の GPCR

のうちすでに薬が開発されているものは約 100 種類しかありません。現在解明されている生理活性機能などから、薬剤ターゲットとなり得るヒト GPCR は約 400 種類と言われており、今後も GPCR をターゲットとした薬の開発の重要性は増していくと考えられるので、今回の成功は、その道筋にとって、支援手法となることが推測されます。

<論文タイトルと著者>

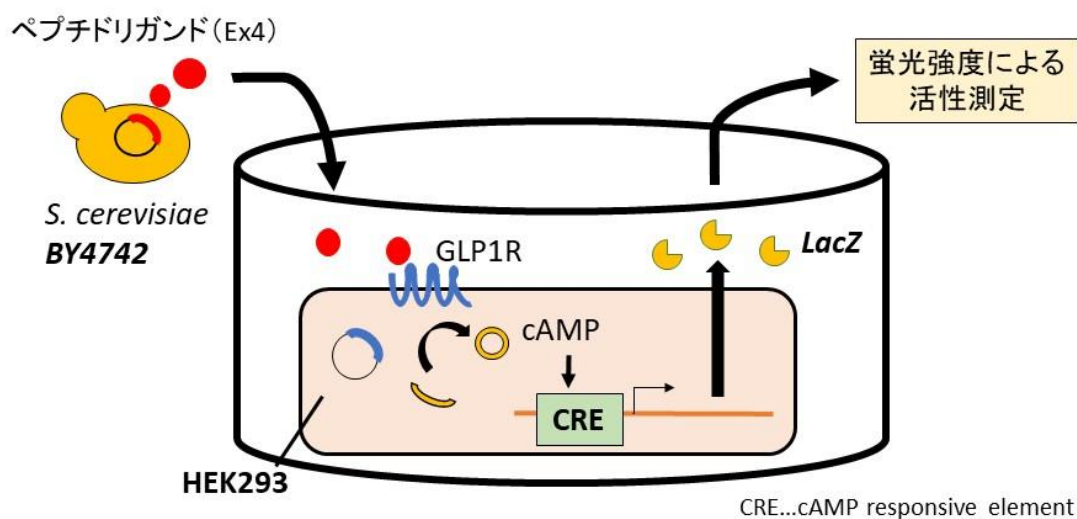
論文名: High-throughput identification of peptide agonists against GPCRs by co-culture of mammalian reporter cells and peptide-secreting yeast cells using droplet microfluidics

著者: Kenshi Yaginuma, Wataru Aoki, Natsuko Miura, Yuta Ohtani, Shunsuke Aburaya, Masato Kogawa, Yohei Nishikawa, Masahito Hosokawa, Haruko Takeyama, Mitsuyoshi Ueda

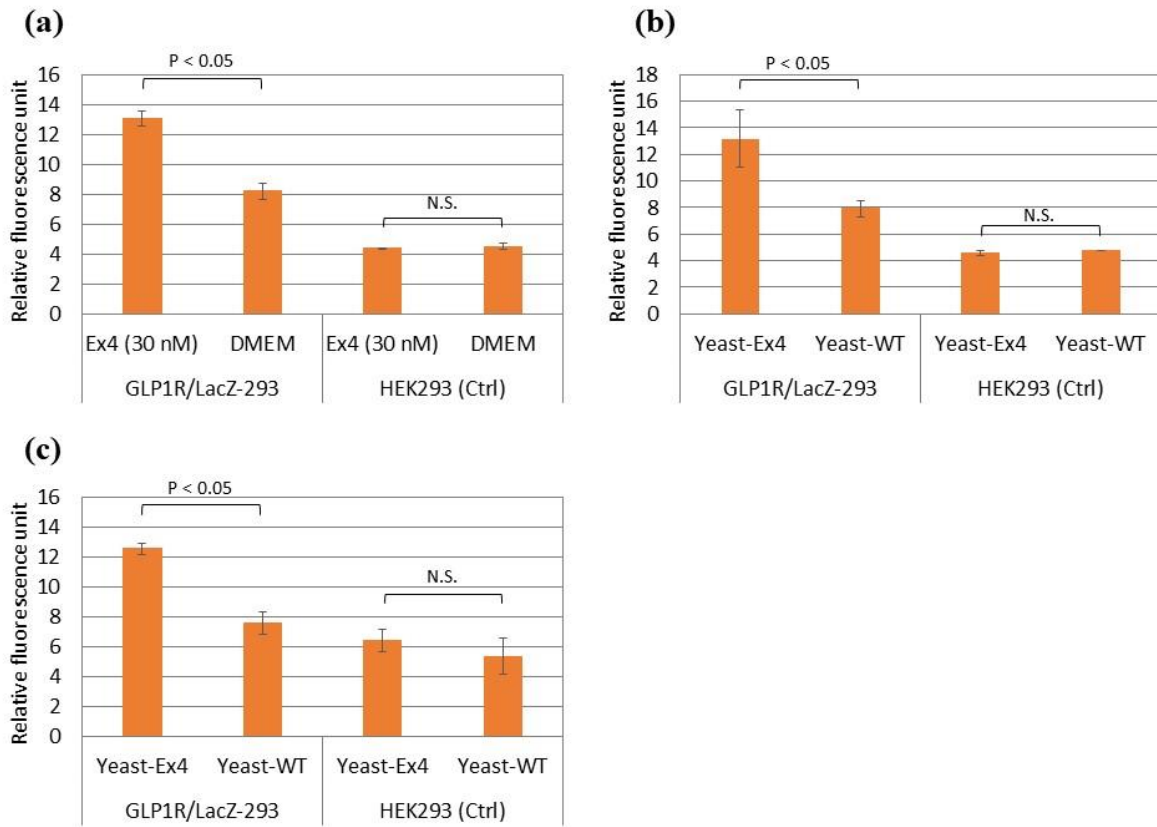
掲載誌: Scientific Reports DOI : 10.1038/s41598-019-47388-x

<参考図表>

図2

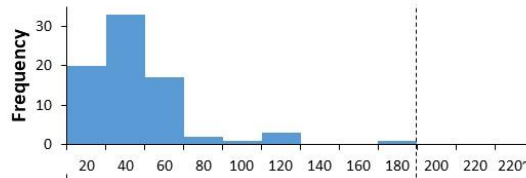
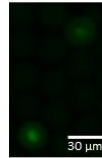
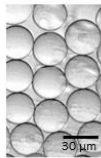


3



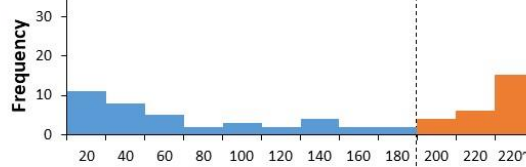
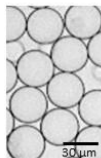
4(a)

No ligands



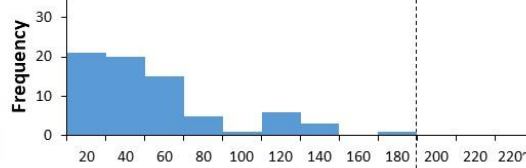
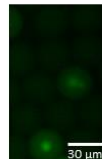
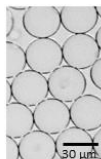
(b)

Ex4 (30 nM)



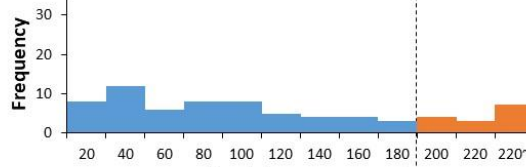
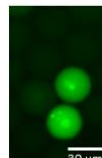
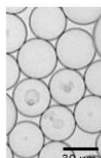
(c)

Yeast-WT



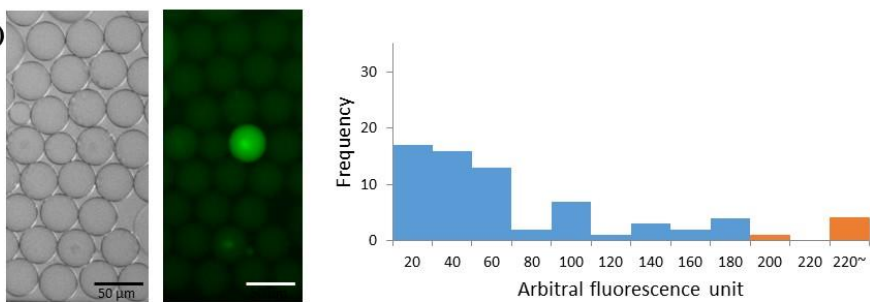
(d)

Yeast-Ex4

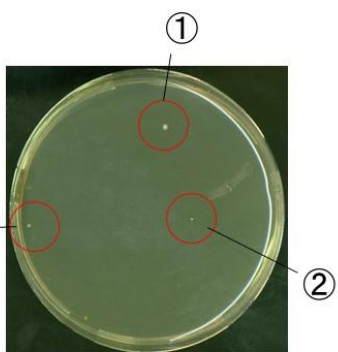


Arbitrary fluorescence unit

图5(a)



(b)



(c)

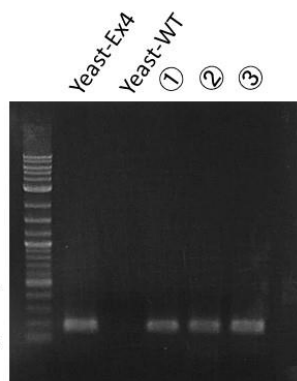
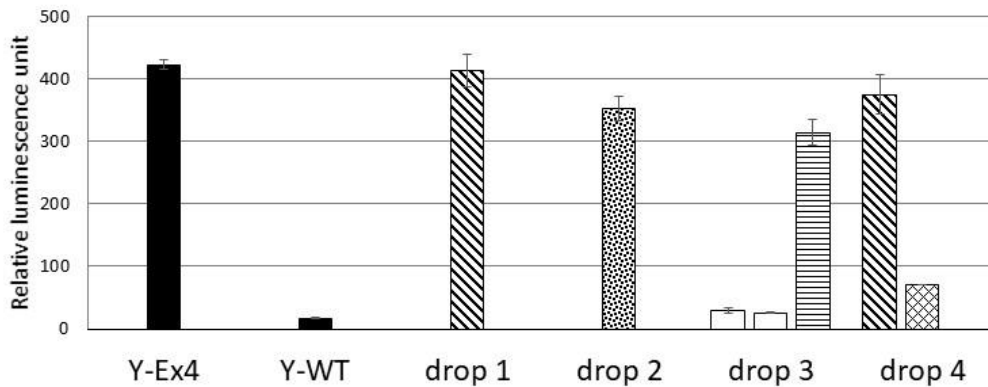


图6



Ex4 HGEFTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEW...

FSEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEW...

HAEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEW...

ALEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEW...

TGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEW...

SCEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEW...