

オーファン G タンパク質共役受容体 GPR56 の
活性化機構と生理機能の解析

太田 茂之

バイオサイエンス研究室 分子情報薬理学研究室
(指導教官 伊東 広)

目次

1. 序論	3
創薬のターゲットとしての G タンパク質共役受容体	
GPCR	
GPCR サブファミリー	
Adhesion GPCR	
GPR56 に関する報告	
抗体医薬の可能性	
2. 方法と材料	9
株化細胞の培養	
ウエスタンブロット	
ELISA	
Luciferase Assay	
ボイデンチャンバー法を用いた細胞遊走能の測定	
免疫染色法	
エンドサイトーシスの観察	
モノクローナル抗体の精製	
細胞内カルシウム応答の測定	
GPR56 ノックダウン	
グリコシダーゼ処理	
糖鎖修飾阻害剤	
GPR56 変異体の作成	
3. 抗体を用いた GPR56 活性化機構の解析	15
3.1 背景	
3.2 結果	
抗ヒト GPR56 モノクローナル抗体の ELISA による解析	
U87-MG 細胞遊走に対する効果による機能的スクリーニング	
細胞遊走抑制に対するアゴニスト様抗体の濃度依存性	
抗体による遊走抑制は GPR56 を介して起こっている	
アゴニスト様抗体は、Gq、Rho を介して細胞遊走を抑制する	
アゴニスト様抗体は Gq を活性化し細胞内カルシウム応答を引き起こす	
抗体の特性の検討とエピトープマッピング	

アゴニスト様抗体が細胞外ドメインと膜貫通領域の相互作用に与える影響の解析

抗体刺激によるエンドサイトーシス

GPR56 スプライシングバリエーションの影響

コラーゲンⅢの効果の検討

マウス **GPR56 Δ 94-143** に対するポリクローナル抗体の効果

3.3 考察

図

4. **GPR56** の点変異体を用いた細胞外ドメイン糖鎖修飾の役割の解析・・・50

4.1 背景

4.2 結果

糖鎖修飾部位の点変異体の活性

変異体の細胞膜表面移行の検討

変異体に対するポリクローナル抗体の効果の検討

糖鎖修飾阻害剤の効果

4.3 考察

図

参考文献・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 64

謝辞・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 70

1. 序論

創薬のターゲットとしての GPCR

生物は、自己の恒常性を維持するために細胞外の化学シグナルを受け取って情報の伝達を行っている。多くの化学シグナルは、細胞膜上の受容体に特異的に結合することにより細胞内に刺激を伝えている。こうして起こるシグナル伝達が自己の恒常性の維持に働いている。そのシグナル伝達の破綻が様々な病気を引き起こすことが知られており、シグナル伝達を制御する創薬の研究が行われている。現在は創薬研究をする際、分子標的医薬という考え方で研究開発が行われている。そのなかで現在使われている薬の少なくとも 3 分の 1 以上が膜受容体のなかで最も多い G タンパク質共役受容体 (G protein-coupled receptor: GPCR) をターゲットとしている。このことから新薬の開発という点において GPCR 研究は非常に重要である。GPCR はヒトでは約 800 種類あることが知られている。GPCR の中でも特にリガンドが分かっていないものをオーファン GPCR と呼んでいる。現在オーファン受容体は 100 種類以上あるといわれており、新薬のターゲット候補としてその研究が求められている。

GPCR

GPCRは、ホルモン、神経伝達物質、成長因子、匂いなど、数多くの細胞外環境に反応し、そのシグナルを細胞内へ伝える役割を担っている。構造的な特徴として、七回膜貫通構造を有し、細胞質側で α 、 β 、 γ からなる三量体GTP結合タンパク質 (Gタンパク質) と共役している。細胞外シグナル分子が受容体を活性化すると、 $G\alpha$ サブユニットに結合しているGDPがGTPに交換され $G\alpha$ 構造変化が起こり、三量体Gタンパク質は α と $\beta\gamma$ に解離し、各々が下流のエフェクター分子を活性化することが知られている。GPCRと共役する $G\alpha$ サブユニットは $G_{\alpha s}$ 、 $G_{\alpha i}$ 、 $G_{\alpha q}$ そして $G_{\alpha 12/13}$ のサブファミリーに分類されており、 $G_{\alpha s}$ はアデニル酸シクラーゼを活性化しcAMPの産生を促すこと、 $G_{\alpha i}$ はそれとは逆にアデニル酸シクラーゼの活性を抑制すること、 $G_{\alpha q}$ はホスホリパーゼCの活性化からカルシウム応答を引き起こすこと、そして $G_{\alpha 12/13}$ はRhoを活性化することが知られており、共役するGタンパク質によりそのシグナルの特異性が決まっている (Simon MI., *et al.*, 1991)。

また、GPCR は活性化を受けると GPCR リン酸化酵素(GPCR-kinase; GRK) によってリン酸化され、リン酸化された GPCR に特異的にアレスチンが結合する。アレスチンが結合した GPCR は細胞質内にエンドサイトーシスにより取り込まれ、過剰なあるいは持続的なシグナルに対して脱感作するメカニズムがあ

ることが分かっている (Collins S., *et al.*, 1992: Pitcher JA., *et al.*, 1998)。

GPCR は、細胞膜タンパク質であるために研究の進展は容易ではなかった。しかし近年では様々な研究手法が開発され、GPCR 研究は新展開を迎えてきた。GPCR の X 線結晶構造解析は膜受容体であり、その不安定性や結晶化の困難性から長い間進まなかったが、2000 年のロドプシン受容体の立体構造解析から少しずつその構造が解かれ始めている。そのなかでもコビルカからは GPCR と G タンパク質との複合体の結晶構造解析をナノディスクと呼ばれる特殊な脂肪膜を利用し、成功している (Rasmussen SE., *et al.*, 2011)。また、蛍光物質を利用した FRET (Fluorescence resonance energy transfer)、BRET (Bioluminescence resonance energy transfer) と呼ばれる手法を用いた解析から、GPCR の活性化メカニズムは複雑に制御されている可能性が示唆されてきた。例えば、血圧を制御することで知られているアンジオテンシンの受容体は同じく血圧制御に関わるブラジキニンの受容体とヘテロ二量体を形成することでそのシグナル伝達を亢進すると報告された (Abdalla S *et al.*, 2001)。このことから、GPCR の二量体や多量体の形成という新しい概念が受容体とシグナル伝達経路の理解において重要であることが示されている。

GPCR のサブファミリー

GPCR は GRAFS 法によると Rhodopsin ファミリー、Glutamate 受容体ファミリー、Frizzled ファミリー、Secretin 受容体ファミリー、Adhesion GPCR ファミリーの 5 つのサブファミリーに分類できる (図 1, Fredriksson R *et al.*, 2003)。この中で、Rhodopsin ファミリーが最もメンバーが多い。β アドレナリン受容体をはじめとする重要な働きをする受容体の多くが Rhodopsin ファミリーに属している。ついで Adhesion GPCR ファミリーの数が多い。進化の過程から見ると、最も古いのが Rhodopsin ファミリーで、その次が Adhesion GPCR ファミリーであることがわかっている。本研究のターゲット分子である GPR56 は Adhesion GPCR ファミリーに属している。Adhesion GPCR ファミリーは長い細胞外ドメイン (Extracellular domain: ECD) を持ち、ECD は GPCR proteolysis site (GPS) で切断を受けることが知られている。ECD 上には様々なドメイン構造や糖鎖修飾サイトを有することが多い (図 2, Simon Y, *et al.*, 2008)。この GPS の変異により切断が行われない受容体は、初期エンドソームでとどまって細胞の表面に移行しないということが報告されており (Lin HH *et al.*, 2010)、受容体の成熟の過程において GPS 切断は必須の過程であると考えられている。しかし、この切断を受けた ECD の役割はまだよくわかっていない。一般的に、切断された ECD は細胞膜表面で膜貫通領域と非共有結合により相互作用していると考えられている (Gray JX., *et al.*, 1996: Krasnoperov VG., *et*

al., 1997; Abe J., *et al.*, 2007)。しかし近年の報告で、ECD は細胞膜表面で単独でアンカーしていることや、この Adhesion ファミリーに属する Latrophilin 1 の細胞外ドメインは切断されたあと、細胞膜上で動き回り、ほかの受容体のシグナル伝達に関わっているという報告 (Volynski KE, *et al.*, 2004) など今までの概念とは異なる複雑なシグナル伝達が細胞膜上では起こっている可能性が示唆されている。GPR56 はこのファミリーの中で最も単純な構造をしており、その ECD 上には既知のドメインは検出されていない。また GPR56 を含む Adhesion GPCR ファミリーの多くはオーファン受容体であり、その生理機能はまだ未解明な部分が多い。オーファン受容体研究ではリガンド探索が大きなテーマの一つである。今までは、機能物質が発見されてから、その作用機序として受容体が同定されてきた経緯がある。現在ではヒトゲノムがすべて解析されて、受容体の存在が先にわかるようになり、受容体側から内在性のリガンドを発見するような試みが多く行われた。しかし、リガンド候補が低分子化合物、アミノ酸、ペプチド、タンパク質、脂肪酸など多岐にわたり、受容体側からのリガンド探索に成功した例はそれほど多くはない (Chung S, *et al.*, 2008; Tang XL, *et al.*, 2012)。

GPR56 の機能に関する報告

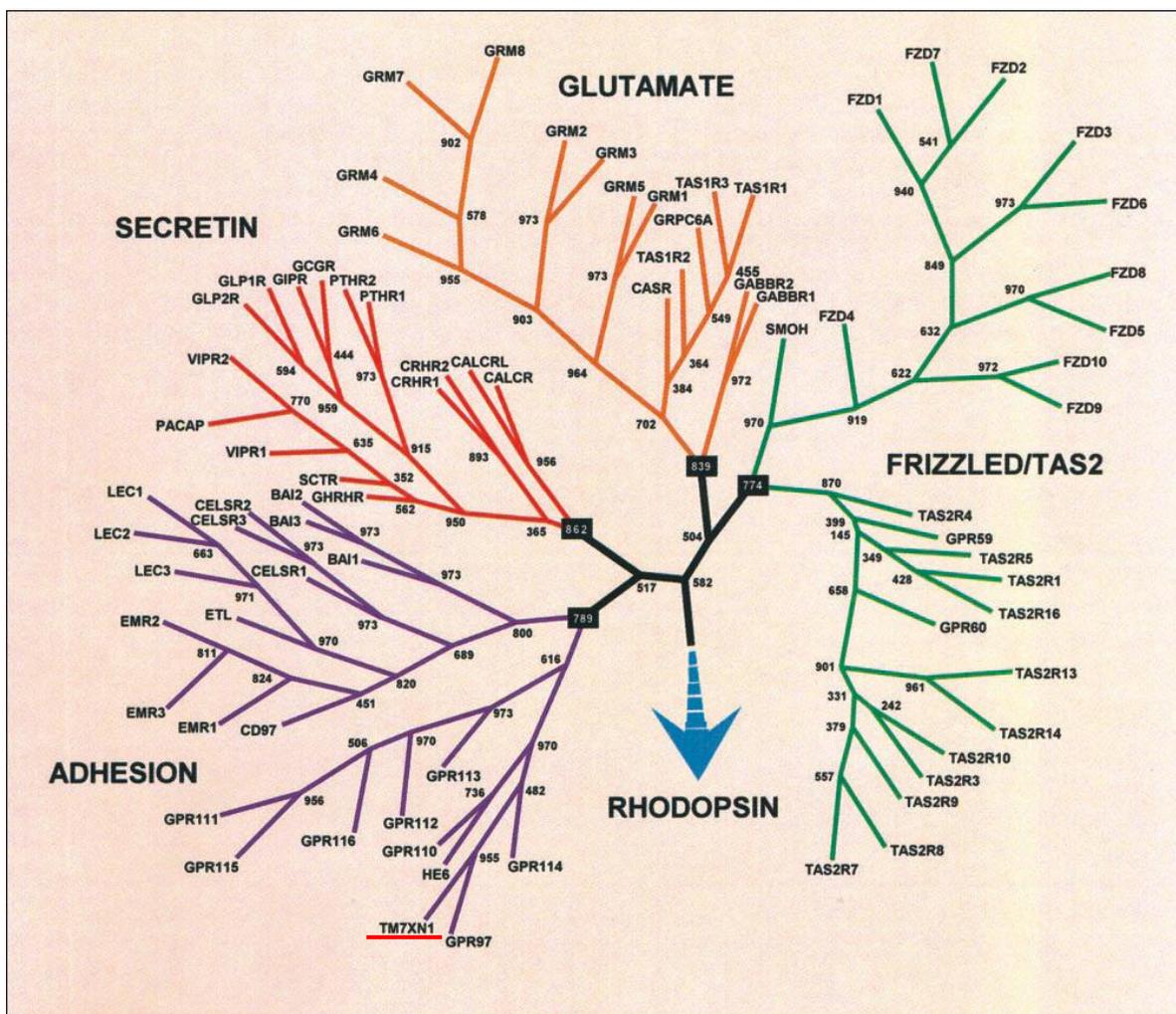
Piao らは GPR56 遺伝子上の変異が大脳皮質形成不全 (Bilateral frontoparietal polymicrogyria; BFPP)で見られること、また GPR56 ノックアウトマウスの解析の結果から脳の層形成時の過剰遊走、また小脳における層形成の異常を引き起こすことを報告しており、このことから GPR56 は発生時期における脳の細胞遊走に関与しているのではないかと考えられている (Piao, *et al.*, 2004)。また近年、GPR56 はある種のグリオーマで過剰に発現している (Shashidhar S, *et al.*, 2005)、GPR56 はメラノーマの成長と転移を阻害している (Xu L, *et al.*, 2006)、GPR56 が細胞接着に関与しガン化に関与している (Ne K, *et al.*, 2007) との報告がなされている。このことから、新規の抗ガン剤のターゲット候補として現在研究が進められている。これまでに GPR56 の結合分子として、Transglutaminase2 (Xu L *et al.*, 2007)、CD81 (Little *et al.*, 2004)、CollagenIII (Luo R, *et al.*, 2011) が報告されている。そのなかで CollagenIII はマウスの GPR56 において、リガンド様に働き、細胞遊走を抑制するという報告がされたが、当研究室においてマウス GPR56 を過剰発現させた HEK293T 細胞を使った SRE レポーターアッセイの結果ではリガンド様の作用は見られず、また細胞遊走のアッセイ系においてもその効果を確認することはできなかった。このことから、当研究室では CollagenIII の GPR56 に対するリガンド活性が見出せておらず、受容体の活性化は単一の分子ではいかな可能性も示唆されて

いる。そのことを含め、リガンド探索も重要なプロジェクトである。本研究ではオーファン受容体の新たな研究手法開発という意味も含め、**GPR56** に対する抗体に着目し研究を行った。

抗体医薬の可能性

抗体は抗原抗体反応により非常に高い抗原認識能をもち抗原に結合する。このことから、古くから抗体を利用する創薬研究が行われてきた。しかし、特定の抗体を効率よく作製し分離することは非常に難しかった。1984年にノーベル賞を受賞したケーラーとミルステインによってハイブリドーマを利用するモノクローナル抗体の作成技術が確立されてから、再び抗体医薬が注目されることになった。現在、さらに抗体を用いた分子標的医薬の開発が注目を集めている。抗体医薬で用いられる抗体の作用に関しては、細胞や病原体の効果を中和する抗体、ADCC 活性を持ちマクロファージを呼び寄せ目的の病原菌を殺傷する働きを持つ抗体、CDC 活性を持ち、補体を呼び寄せて標的細胞を殺傷する抗体というものが代表的な抗体医薬の作用機序であるが、本研究で使用したのはリガンド様抗体である。当研究室の先行研究から、マウス **GPR56** の細胞外ドメインに対するポリクローナル抗体は **GPR56** の活性化を介し、神経前駆細胞の細胞遊走を抑制するアゴニスト様の抗体であることがわかった(Iguchi T., *et al.*, 2008)。このことから、リガンド未知のオーファン受容体研究において、アゴニスト様抗体を使用した機能解析が可能であることが示唆された。

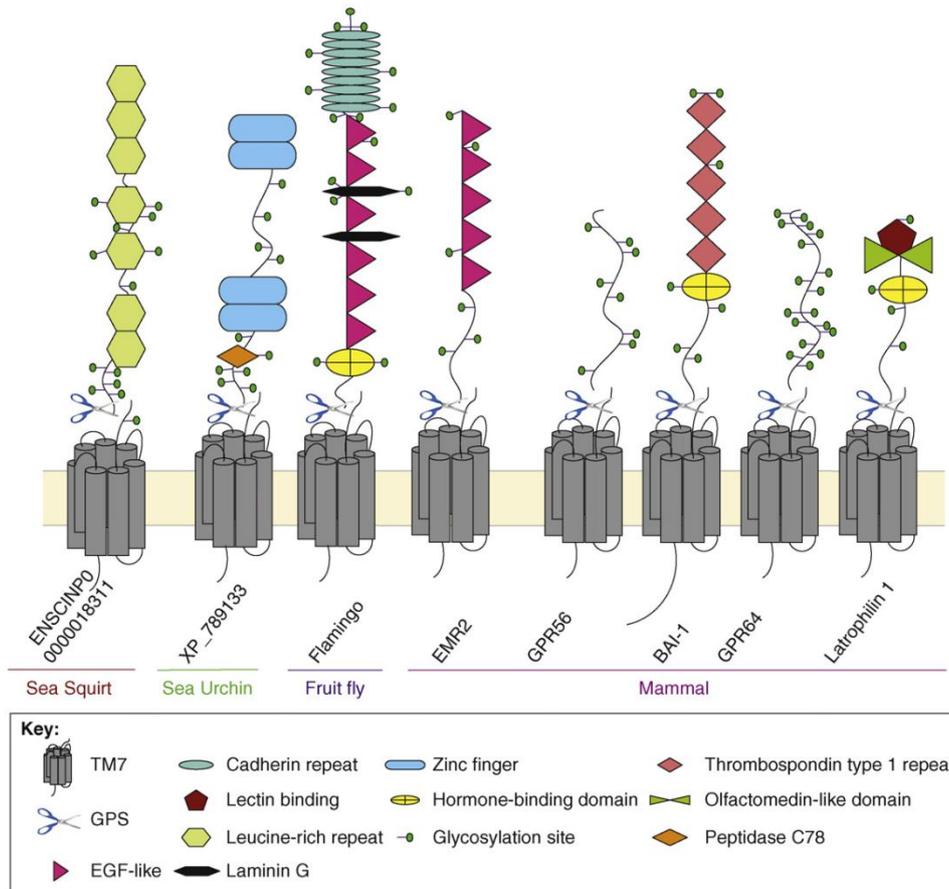
本研究では、抗体を用いた **GPR56** の活性化機構の解析と **GPR56** の点変異体を用いた細胞外ドメイン糖鎖修飾の役割の解析を行った。



(Fredriksson R., et al., Mol. Pharmacol., 2003)

図 1. GPCR のファミリー

GPCR はそのアミノ酸配列から 5 種類に分類される。最も大きな Rhodopsin ファミリー、Secretin、Glutamate、Frizzled/Tas2 そして Adhesion である。GPR56 (TM7XN1) は Adhesion ファミリーに属している。



(Yona S, et al., Trends Biochem Sci., 2008)

図2. Adhesion GPCR ファミリー

Adhesion GPCR ファミリーは長い細胞外ドメイン (Extracellular domain; ECD)をもち、この ECD は GPCR proteolysis site (GPS)で切断を受け、ECD と膜貫通領域に分かれる。ECD には多くのドメイン構造と糖鎖修飾サイトを持つ。GPR56 はこの中でも最も単純な構造をしている。

2. 材料と方法

株化細胞の培養

ヒト胎児腎臓由来である HEK293T 細胞およびヒトグリオーマ細胞腫由来である U87-MG 細胞は、10%ウシ胎児血清 (FBS; MP Biomedicals) 及びペニシリン (100 U/ml) /ストレプトマイシン (100 µg/ml) を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Sigma)中で、37°C、5% CO₂の条件下で培養した。これらの細胞は培養皿中でコンフルエントに達する前に 0.25%トリプシンで細胞をはがし、細胞を 10 倍希釈して新しい培養皿に継代した。

ウエスタンブロット

Cell Lysis バッファー (20 mM HEPES-NaOH (pH 7.5)、100 mM NaCl、3 mM MgCl₂、1 mM DTT、1% NP40、1 µg/ml Leupeptin 及び 1 mM PMSF)でサンプルを溶解させた後、に SDS サンプルバッファー (final: 50 mM Tris, 10%グリセロール、1mM DTT、BPB 0.02%、2%SDS) を加えた後、アクリルアミドゲルを用いて SDS-PAGE により分離を行った。その後 polyvinylidene difluoride membrane (PVDF; Millipore)に転写した。メンブレンをブロッキングバッファー(5 % w/v スキムミルク、1% w/v NaN₃を含む PBST : 137 mM NaCl, 8 mM Na₂HPO₄, 1.5 mM KH₂PO₄, 0.1% (w/v) Tween-20)に一時間浸し、ブロッキングを行った。このブロッキング液に一次抗体をそれぞれの倍率で希釈したのち、PVDF 巻くと接触させ、1 時間静置したのち、PBST で膜を 5 分間 3 回洗浄し、その後、PBST で希釈した HRP 標識二次抗体液に膜を浸し、30 分静置した。PBST で 10 分間 3 回洗浄を行った後、ECL 試薬 (GE Healthcare) を用いて検出を行った。なお、GPR56 の膜貫通領域を検出するときはサンプルをゲルにアプライする前に加熱処理を行わなかった。これは、加熱処理をすることにより、タンパク質が凝集し、SDS-PAGE による分離が不可能になることがわかっていたからである。

なお、用いた一次抗体と希釈倍率は次のとおりである。

Anti-mouse GPR56ECD polyclonal antibody (1 mg/ml) : 1/1000

Anti-mouse/human GPR56 transmembrane (C 末端 21 ペプチドを抗原) 1 mg/ml : 1/1000

Anti-human GPR56ECD monoclonal antibody (2F6) (1 mg/ml) : 1/1000

二次抗体の希釈倍率は次のとおりである。

HRP-conjugated anti-mouse-antibody IgM + IgG : 1/3000

HRP-conjugated anti-rabbit-antibody IgM + IgG : 1/3000

ELISA

ELISA プレート (Corning) への抗原の吸着のため、炭酸ナトリウムバッファ (50 mM CO₃²⁺, pH 9.6) を溶媒とした 1 µg/ml の hGPR56 ECD 溶液を 50 µl/well で分注し、4°Cで一晩静置した。タンパク質吸着後、ブロッキングバッファを 100 µl/well で分注し 30 分間室温で静置後、PBST で 4 回洗浄し測定に使用した。一次抗体反応のために、各抗体濃度を 1 ng/ml, 0.1 ng/ml に調整したものを 50 µl ずつ加え、1 時間 室温で静置し、PBST で 4 回洗浄した。次に、二次抗体反応として PBST で 2000 倍希釈した HRP-conjugated anti-mouse-antibody IgM + IgG を 50 µl/well 分注し攪拌した後、1 時間 室温で静置し、再び PBST で 4 回洗浄した。続いて ELISA POD 基質 TMB キット (nacalai tesque) を用いて発色反応及び発色反応停止を行ない、450 nm の吸光度を測定した。

Luciferase assay

HEK293T 細胞を使用したレポーターアッセイには Dual-Luciferase Reporter Assay (Promega) を使用した。遺伝子導入はリン酸カルシウム法により行い、24well プレートに培養した細胞へ pNF-κB ホタルルシフェラーゼベクター 1 µg、インターナルコントロール用 pEF-ウミシイタケルシフェラーゼベクター 50 ng、及び各サンプルのプラスミド 1 µg を含む混合液 1 ml を 50 µl/well で分注した。細胞抽出液の調製には Dual-Luciferase Reporter Assay (Promega) の Passive Lysis バッファを用いた。細胞培養液を取り除き PBS による洗浄後、1×Passive Lysis バッファ 100 µl を添加し、氷上で 30 分静置し細胞を完全に融解させた。発光の測定にはプレートリーダー ARVO MX (PerkinElmer) を使用し、次に示すプロトコルにより行った。96well プレートに分注した細胞抽出液 10 µl に対して、Luciferase Assay Reagent II を 50 µl/well 添加し、2 秒間の静置後 10 秒間ホタルルシフェラーゼ活性を測定した。Stop&Glo Reagent 50 µl/well 添加し、2 秒間の静置後、10 秒間ウミシイタケルシフェラーゼ活性を測定した。計測値から、ホタルルシフェラーゼ活性とウミシイタケルシフェラーゼ活性の比をとり、導入効率および細胞数による影響を補正した値を用いた。

ボイデンチャンバー法を用いた細胞遊走能の測定

U87-MG 細胞を 0.5 mM EDTA を含む PBS に浸し細胞をはがしたのち、 2×10^5 cells/ml になるように細胞懸濁液を調製した。これを 24 well にセットした Cell culture insert (8.0 μ m pore size, PET track-etched membrane 24 well format; BD FALCON)の上層に 300 μ l (5×10^4 cells/well)加えた。また 24 well には 400 μ l の DMEM を加え、トータル 700 μ l の量で実験を行った。4 時間後に 8 mm の穴を通してフィルターの下の方に移動した細胞をディフ・クイック (シスメックス) で染色し顕微鏡で観察した。

免疫染色法

直径 13 mm のカバーガラスに接着させた細胞にリポフェクタミン法により GPR56 およびその変異体を導入した。導入から 24 時間後に PBS で洗浄後、4% PFA に 15 分間浸して細胞を固定した。そののち PBS で洗浄し、ブロッキングバッファー (0.1% Triton-X100, 10%FBS を含む PBS) に浸し 1 時間静置した。次にブロッキングバッファーに希釈した一次抗体に 1 時間浸した。PBS で洗浄したのち、PBS に希釈した Alexa594 および 488 が結合した二次抗体に浸した。その後 PBS で洗浄したのち、マウント剤を用いて封入した。その後、蛍光顕微鏡 (Axio Observer; Carl Zeiss) および、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察を行った。

エンドサイトーシスの観察

U87-MG 細胞を直径 13mm のカバーガラスに接着させた後、培地中に各抗体を加え、4°C の条件で 30 分インキュベートした。細胞を PBS で洗い結合しなかった抗体を除いた後、4°C および 37°C の条件で培地中でさらに 30 分インキュベートした。そののち、4%PFA に 15 分間浸して細胞を固定し、免疫染色と同じ方法で GPR56ECD に結合した加えた抗体および Rab の局在の観察を行った。

モノクローナル抗体の精製

抗体精製に用いたバッファーは、結合バッファー (0.2 M リン酸バッファー (pH 7.0))、溶出バッファー (0.1 M グリシン-HCl バッファー (pH 2.5))、中和バッファー (2 M Tris-base)を用いた。1 ml Protein-G Sepharose 4FF (GE ヘルスケアバイオサイエンス)カラムで精製を行った。ハイブリドーマを無血清培地 (CD Hybridoma medium, Invitrogen)で 5 日間培養後、これら培養上清 200 ml を回収した。これを遠心分離して不溶物を取り除いた後、カラムにロードした。ロードした後、結合バッファーで洗浄し、溶出バッファーで溶出してきたもの

を中和バッファーで中和した。こうして得られた抗体液を透析膜に入れて、PBS に置換して使用した。

細胞内カルシウム応答の測定

細胞内カルシウム濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) は Ca 蛍光指示薬 Fura-2 acetoxymethyl ester (Fura-2/AM) を用いて測定した。10 cm ディッシュの U87-MG 細胞を 0.5 mM の EDTA を含む PBS で 5 分間インキュベートした後、細胞をピペッティングではがした。はがした細胞を Suspension バッファー (20 mM HEPES-NaOH (pH7.5), 140 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 1.8 mM $CaCl_2$, 0.8 mM $MgCl_2$, and 5.6 mM glucose) で洗浄し、最終的に 1 ml の Suspension バッファーに懸濁した。この懸濁液に 2 mM Fura-2/AM を加え、30°C で 20 分間インキュベーションすることで Fura-2/AM を細胞内に取り込ませた。その後、余分な Fura-2/AM を取り除くために Suspension バッファーで洗浄した。 $[Ca^{2+}]_i$ の蛍光測定は分光蛍光光度計 F-2000 (Hitachi) を用いて行った。1.5 x 10⁶ 個の細胞が入ったキュベットを 37°C に保持したセルホルダーにセットした。YM-254890 の処理は Fura-2 取り込みのときに同時に 1 μ M で加え、測定時と同濃度加えた。

糖鎖修飾阻害剤

糖鎖修飾の阻害剤は Sigma から購入した Castenospermine と Swainsonine、Tunicamycin を使用した。それぞれ DMSO に溶かしてストックした。

グリコシダーゼ反応

グリコシダーゼ処理は、PNGaseF (Bio Labs) を用いた。サンプルは無処理のライセート、Denature 処理したライセート、Denature および PNGaseF 処理したライセートを用意した。

まず各々のライセート 10 μ l に Glycoprotein Denaturing バッファー (10X) 1 μ l を添加し、100°C、10 min インキュベートしてタンパク質変性させた (Denature 処理)。変性後 PNGaseF (20 U/ μ l) 2 μ l および G7 Reaction バッファー (10X) を 1 μ l、NP-40 (10%) を 1 μ l 添加し、37°C で 4 時間インキュベートした。この時 Denature 処理のみしたものも同様に 37°C、4 時間インキュベートした。その後 5X sample バッファー 3.8 ml を加えた。

GPR56 変異体の作製

本研究で使用した cDNA 発現用プラスミドは、すべて CMV プロモーターの下流に cDNA を連結したものである。プラスミドは大腸菌 DH5 α 株に導入後、

Nucleobond AX (Macherey Nagel) を用いて精製したものを遺伝子導入用プラスミドとして使用した。

グリコシレーションサイト点変異体

各点変異体は QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) を用いて作製した。以下は使用したプライマーを示す。

N39A

Forward (F) 5'- gcttctgtggccagcgggcccagacccaacagagc-3'

Rivers (R) 5'- gctctgttgggtctgggcccgtggccacagaagc-3'

N148A

F) 5'-ggcagattccccaggccaccagcctgctgg-3'

R) 5'-ccaggcaggctggtggcctggggaatctgcc-3'

N171A

F) 5'-cacaaggtctcccacgcecatctgtggacatgtg-3'

R) 5'-cacatgtccacagatgcggcgtgggagaccttgtg-3'

N234A

F) 5'-ggaggaccgggtcgccgctacagtgtggaagc-3'

R) 5'-gcttccacactgtagcggcgaccggctcctctcc-3'

N303A

F) 5'-caagctttgttccaggacaaggcctctagccaagtctgggt-3'

R) 5'-accaggacttggttagaggccttgtcctggaacaaagcttg-3'

N324A

F) 5'-cagaacaccaaagtcaccgcctctcagatccggtg-3'

R) 5'-caccgatctgagagggcggtgactttggtgttctg-3'

N341A

F) 5'-ccagcctcagccaaaagcccgtgactctgcagtgc-3'

R) 5'-gcactgcagagtcacggcttttggtgaggctgg-3'

mGPR56Δ94-143

F) 5'-gactcgagtggagtcgccacact-3'

R) 5'-gtcgaccaggagctgacagag-3'

ヒト GPR56ECD 欠損変異体

hGPR56S1

F) 5'-ttgccgctacctctgctccaggaggaaacctcgggacta-3'

R) 5'-tagtcccacaccttctcctggagcagaggtaggcggcaa-3'

hGPR56ΔECD

F) 5'-accttgaccaggaagagca-3'

R) 5'-caaggacgggtgccg-3'

hGPR56ECD(100-400)

F) 5'-ttacatcttctctatggcaagcgt-3'

R) 5'-caaggacgggtgccg-3'

hGPR56ECD(200-400)

F) 5'-tcggctgccccg-3'

R) 5'-caaggacgggtgccg-3'

hGPR56ECD(300-400)

F) 5'-gacaagaattccagccaagtcc-3'

R) 5'-caaggacgggtgccg-3'

3. 抗体を用いた GPR56 の活性化機構の解析

3.1 背景

当研究室の先行研究はマウス GPR56 の細胞外ドメインに対するポリクローナル抗体が、共役する G12/13、Rho を活性化し SRE 転写因子の活性化を介して、神経前駆細胞の細胞遊走を抑制するリガンド様の機能抗体であることを示した (Iguchi T, *et al.*, 2008)。そこで抗体による活性化のメカニズムを詳細に解析するため、はじめにマウス GPR56 に対してリガンド様に働くモノクローナル抗体の作製を試みた。しかしながら、10 種類のモノクローナル抗体を精製し、SRE 転写活性をレポーターアッセイで測定したが、リガンド様に働く抗体は得られなかった。

一方、ヒト GPR56 は、Gq タンパク質と相互作用しているという報告があった (Little et al., 2004)。しかし、実際に Gq を活性化しているのかどうかは不明であった。そこで、ヒト GPR56 に対する機能抗体を調製し、その抗体を用いてどのようなメカニズムで GPR56 を活性化するかを詳細に解析するため実験を行った。実験に使用する細胞として、GPR56 を発現しているヒトグリオーマ細胞腫 U87-MG 細胞を用いた。ヒト GPR56 のモノクローナル抗体の作製は、先行研究者である坂口が 17CC を単離し、この抗体が HEK293T 細胞に GPR56 を過剰発現させたときに NF- κ -B を介する転写活性を上昇させること、また U87-MG 細胞の遊走を抑制するリガンド様の抗体であることを報告していた (坂口修士論文 2008)。また小林が 17CC のほかに再度ヒト GPR56ECD を抗原としたモノクローナル抗体の作成を行い、ELISA によるスクリーニングで特に強い抗原認識能を示した 9 種類のモノクローナル抗体を単離した。また、その機能を調べたが、17CC と同様の効果を示す機能抗体を見いだすことはできなかった (小林 2010)。しかしスクリーニングの条件検討などの不十分な点もあったため、これらの得られてきた抗体の再評価と、抗体による活性化の機構の解析を行った。

3.2 結果

抗ヒト GPR56 モノクローナル抗体の ELISA による解析

既存の抗体の抗原認識能を比較するため、抗体を用いたヒト GPR56 細胞外ドメインリコンビナントタンパク質を使用した ELISA を行った (図 3)。17CC を含む 10 種類の抗体を比較したところ、2F6 が最も親和性が高く、この結果は小

林の修士論文と同様の結果であった。

U87-MG 細胞遊走に対する効果による機能的スクリーニング

次に得られた抗体の機能を確認するため、U87-MG 細胞の細胞遊走に対する効果を検討した。小林の報告の時に用いた 10 μ g/ml は、作用させる抗体濃度が低いために効果が見られなかった可能性があったので、それぞれの抗体を 30 μ g/ml と高い濃度で作用させた (図 4)。結果から、以前確認されていたアゴニスト様抗体 17CC と同等に細胞遊走の抑制効果を示す抗体が 4C3、11E9 の二種類あることが判明した。また 6A9、8A2、10F3 も弱いながら抑制活性がみられた。

細胞遊走抑制に対するアゴニスト様抗体の濃度依存性

次に、得られたアゴニスト様抗体が濃度依存的に細胞遊走の抑制効果を示すか検討した。2F6 と 18F2 抗体は高濃度になっても細胞遊走抑制効果を示さなかったのに対し、17CC、4C3、11E9 は濃度依存的に細胞遊走抑制を示した (図 5)。17CC は最も強い遊走阻害活性を示した。

抗体による遊走抑制は GPR56 を介して起こっている

これらの抗体による遊走抑制効果が本当に GPR56 を介して行われているか検証するために二つの実験を行った。まず、抗原である GPR56 の細胞外ドメインを抗体と競合させたとき、抗体の効果がキャンセルされるか検討した。17CC を 10 μ g/ml、4C3 を 30 μ g/ml を加える条件で、抗原であるヒト GPR56 リコンビナントタンパク質を 10 μ g/ml 同時に加えた (図 6)。すると、二つの抗体の阻害効果に対し、抗原でキャンセルされることがわかった。

次に、GPR56 を siRNA でノックダウンしたときの抗体の作用を検討した。コントロールとして si-ルシフェラーゼ (si-Luc) を導入したものと比較した。その結果、hGPR56 に対する siRNA (si-h56) を導入した細胞では抗体の効果がなくなることがわかった (図 7A)。si-h56 により内在性の GPR56 が発現抑制されていることを、GPR56 抗体を用いて Western blot により確認した (図 7B)。以上のことから 17CC、4C3 の抗体は GPR56 に結合することにより、U87-MG 細胞の遊走を抑制していることが明らかになった。

アゴニスト様抗体は、Gq、Rho を介して細胞遊走を抑制する

ヒト GPR56 は Gq とタンパク質相互作用することが報告されていたが、実際に Gq を介するシグナルを活性化するかどうかは示されていなかった。そこで、Gq の特異的阻害剤である YM-254890 を用いて抗体の U87-MG 細胞の遊走抑制

に対する効果を検討した。1 μ M YM-254890 存在下、非存在下で、10 μ g/ml 17CC あるいは 30 μ g/ml 11E9 を作用させたときの U87-MG 細胞の遊走能を測定した。すると、両方の抗体による細胞遊走抑制効果を YM-254890 はキャンセルした (図 8)。また、Rho キナーゼの阻害剤である Y27632 を処理すると、YM-254890 と同様に 17CC 抗体による遊走抑制効果がキャンセルされた (図 9)。このことから、アゴニスト様抗体による遊走抑制効果は、Gq/Rho 経路を介していることが示唆された。

アゴニスト様抗体は Gq を活性化し、細胞内カルシウム応答を引き起こす

上記の結果より、ヒト GPR56 は Gq と機能的にも共役していることが示唆された。さらにそのことを検証するために、まず Gq の下流で応答する細胞内カルシウム濃度の測定を行った。その結果、U87-MG 細胞遊走において抑制活性を示した 17CC、4C3、11E9 によってポジティブコントロールである Endothelin と同様の細胞内カルシウム濃度の上昇が引き起こされた。一方、遊走抑制活性を示さなかった 2F6、18F2 ではその効果が見られなかった。また、抗体による細胞内カルシウム濃度上昇の応答は Gq 特異的な阻害剤である YM-254890 によって抑制された (図 10)。このことから、これらの抗体が GPR56 を介し、Gq を活性化し細胞内のカルシウム応答を引き起こすことが明らかになった。

抗体の特性の検討とエピトープマッピング

抗体の作用と認識部位との関係を調べるため、GPR56 細胞外ドメインの部分欠損変異体を作製し (図 11A)、HEK293T 細胞にそれぞれの変異体を発現させた後、免疫染色法を用いてエピトープマッピングを行った。C 末端側に His6 タグを付加させた変異体を作製したが、HEK293T 細胞に発現させたとき抗 His タグ抗体による検出はできなかった。2F6 抗体によるウェスタンブロットの結果、2F6 はすべての変異体を認識できたことから、300-400 アミノ酸の部位を 2F6 抗体が認識していることが明らかになった (図 11B)。一方、ヒト GPR56 を過剰発現させた 293 細胞のライセートやヒト GPR56 細胞外ドメインリコンビナントタンパク質を用いたウェスタンブロットでは 2F6、17CC、18F2 の 3 種類のみでしか検出できなかったため、すべての抗体のエピトープマッピングをウェスタンブロットによって行うことができなかった。そこで、免疫染色法を用いて行うことを検討した。得られている 10 種類の抗体のうち 7 種類の抗体が免疫染色で使用することができた (図 12、表 1)。その結果、遊走抑制効果を示す抗体では、17CC は 300-400 番目のアミノ酸部位を、それに対して 4C3 と 11E9 は 1-100 番目のアミノ酸部位を認識していることが示唆された。また非機能性抗体では 2F6 と 14B6 が 300-400 番目のアミノ酸部位を、6A9 と 18F2 は 1-100

番目のアミノ酸部位を認識していることが示唆された。このことから、得られたリガンド様抗体は結合する部位は異なるが、**GPR56** に結合した後、**Gq** シグナルを活性化する構造変化を引き起こすことにより **U87-MG** 細胞の遊走を抑制する可能性が判明した。

アゴニスト様抗体が細胞外ドメインと膜貫通領域の相互作用に与える影響の解析

Adhesion GPCR ファミリーにおいて切断を受けたあとの細胞外ドメインと膜貫通領域との相互作用は免疫沈降法によって示されてはいるものの、その意義や結合部位など不明な点が多い。ファミリーは異なるが **Rhodopsin** ファミリーに属する甲状腺ホルモンの受容体は **Adhesion GPCR** ファミリーと同様に切断を受け、細胞外ユニットと膜貫通ユニットがジスルフィド結合していること、細胞外ユニットの欠損変異体が活性型を示すことから、細胞外ユニットが抑制的に働いていること、そして細胞外ユニットはリガンドが結合することにより構造変化を受け、受容体を活性化するというモデルが既に示唆されている (**Schott M, et al., 2005**)。そこで、これと同様な活性化メカニズムが **GPR56** でも当てはまるのではないかという仮説を立てた。マウス **GPR56** の細胞外ドメインを欠損させた変異体 Δ **ECD** は野生型に比べ **Rho** の活性を上昇させ、ユビキチン化が促進されるということが報告されており (**Paavola KJ, et al., 2011**)、恒常活性化型である可能性が示唆されている。本研究においても **GPR56** の細胞外ドメインの役割を検討するため、 Δ **ECD** を作製しその活性を **SRE** レポーターアッセイで測定した。その結果、 Δ **ECD** 野生型に比べ高い転写活性化能を持つことが示された (図 13)。

次に、アゴニスト様抗体は **GPR56** 細胞外ドメインと膜貫通領域との相互を弱めるように構造変化させているのではないかということを検討するため、免疫沈降法によって相互作用に与える影響を解析した。まず細胞外ドメインから沈降させるため、単離してきた抗体が免疫沈降に使えるかを検討した。**18F2**、**11E9**、**4C3**、**17CC**、**2F6** に関して検討を行った結果 **18F2**、**11E9**、**4C3** に関しては細胞外ドメインさらに膜貫通領域が相互作用して沈降できたのに対し、**17CC**、**2F6** は沈降させることができなかった。そこでアゴニスト様抗体である **4C3**、**11E9** とアゴニスト様作用を持たない **18F2** 三種類の抗体により細胞外ドメインを免疫沈降させてきたときの共沈降してくる膜貫通領域のタンパク質量を比較した。すると、予想とは逆にアゴニスト様抗体である **4C3**、**11E9** では非機能性抗体である **18F2** に比べ有意に共沈降してくる膜貫通領域のタンパク質量が増加した (図 14B)。次に、**NHS**-レジンを用いて膜貫通領域を認識する抗体をレジジンにカップリングさせ、膜貫通領域を免疫沈降させたときそれぞれの抗体の存在下

で共沈降してくる細胞外ドメインのタンパク質量を比較した。その結果、アゴニスト作用を持たない 2F6、18F2 を加えた時に比べ、17CC、4C3、11E9 を加えたときは膜貫通領域と一緒に沈降してくる細胞外ドメインのタンパク質量が増加することがわかった (図 14C)。このことから、アゴニスト様抗体は細胞外ドメインと膜貫通領域の相互作用を強めるような構造変化を引き起こしているのではないかということが示唆された。

抗体刺激によるエンドサイトーシス

多くの細胞膜受容体はアゴニスト刺激を受けるとエンドサイトーシスにより細胞質に移動することが知られている。まず、各抗体による細胞表面の GPR56 の認識能を調べるために、4℃条件下で 30 分間抗体と U87-MG 細胞をインキュベートし、洗浄後に蛍光標識 2 次抗体を加え、フローサイトメトリーで、その認識能を評価した。その結果、4C3、18F2 では蛍光標識された細胞が認められたが、17CC、11E9、2F6 では、わずかな細胞が標識された (図 15)。次に、アゴニスト様抗体 4C3 と非機能性抗体 18F2 を用いて、4℃で抗体添加後、37℃にすることでエンドサイトーシスが誘導されるかどうかを共焦点レーザー顕微鏡により観察した。その結果、リガンド様の 4C3 抗体を作用させたときにエンドサイトーシスが観察されたのに対し、リガンド様の作用を持たない 18F2 では一部エンドサイトーシスが認められたが、多くは細胞膜にとどまっていた。また、4C3 によって引き起こされるエンドサイトーシスは YM-254890 を加えても変化はなかった (図 16)。また、様々なエンドソームのマーカールとして知られる Rab ファミリーと共染色したところ、Rab5, Rab7, Rab9 で重なりが見えた (図 17)。

GPR56 スプライシングバリエントの影響

ヒト GPR56 には細胞内第 1 ループにおいて 6 アミノ酸短いスプライシングバリエント (S1) が存在することが分かっている (図 18A)。そこで、スプライシングバリエントによって Gq を介したシグナル伝達さらに細胞遊走に差があるかを検討した。まず、U87-MG 細胞においてどのようなスプライシングバリエントが存在するかを確認するため、RT-PCR によりメッセンジャーRNA から DNA を合成し、アクリルアミドゲルでの電気泳動を行った (図 18B)。図のように二種類のスプライシングバリエントの存在が確認され、このバンドを切り出し、シークエンスを行ったところ、予想されるスプライシングバリエント由来の DNA であることがわかった。U87-MG 細胞には 2 種類の GPR56 が発現していることがわかったが、それぞれを別々に活性化させることはできない

め、恒常活性化型とされている Δ ECD をそれぞれのバリエーションで作製し (WT Δ ECD、S1 Δ ECD)、このプラスミドを過剰発現させることにより U87-MG 細胞の遊走に与える影響を検討した。すると、WT Δ ECD を過剰発現させた時のみ U87-MG 細胞の遊走を有意に抑制し、またこの遊走抑制は YM-254890 によりキャンセルされた(図 19)。この結果より U87-MG 細胞において、GPR56 は野生型と S1 の両方が発現するが、遊走抑制の機能においては野生型からのシグナルが作用することが示唆された。

コラーゲンIIIの効果の検討

Xiao らが GPR56 のリガンドとして報告したコラーゲン III の作用を検討した。報告の中で使用されている 80 nM の濃度においては U87-MG の細胞遊走には影響を与えなかった (図 20)。また、マウス GPR56 を HEK293T 細胞に過剰発現させたのち、コラーゲン III を添加した時の SRE を介する転写活性を測定した (図 21)。先行研究でマウス GPR56 細胞外ドメインに対するポリクローナル抗体をポジティブコントロールにして比較したところ、ポリクローナル抗体と同様な変化は見ることができなかった。

マウス GPR56 Δ 94-143 に対するポリクローナル抗体の効果

Piao らは Collagen III が GPR56 細胞外ドメインの 94-143 番目のアミノ酸部分に結合することを報告している (Luo R, *et al.*, 2011)。そこで、これらの部位を欠損させたマウス GPR56 Δ 94-143 変異体を作製した。この作製したプラスミドを HEK293T 細胞に導入し、リガンド様のポリクローナル抗体の効果を検討した。SRE の転写活性をルシフェラーゼアッセイで測定した結果、マウス GPR56 Wild Type ではポリクローナル抗体の作用が濃度依存的に見られるのに対し、マウス GPR56 Δ 94-143 変異体を導入した細胞ではその効果が見られなかった(図 22)。

3.3 考察

GPR56 に対する新規リガンド様抗体

GPCR に対するアゴニスト抗体の報告は、これまでにいくつか報告されている。β2 アドレナリン受容体に対する抗体が、受容体の活性化状態への安定性を高めることが報告されている (Lebesgue D, *et al.*, 1998)。また、自己抗体による疾患であるシャーガス病 (Chagas disease) において、この疾患の患者からは M2 ムスカリン性アセチルコリン受容体の細胞外第 2 ループに対する自己抗体が見つまっている (Medei EH, *et al.*, 2008)。甲状腺機能亢進症であるグレイヴズ病 (バセドウ病) は TSH (チロトロピン) 受容体に対する自己抗体が原因とされ、この自己抗体による受容体の活性化の研究がされている (Smith BR, *et al.*, 2007)。このように、GPCR に対する抗体が、アゴニストの代わりになり得るといふ例は少なくない。当研究室でも GPR56 に対する抗体がアゴニスト様に作用することを報告している (Iguchi T, *et al.*, 2008)。今まで得られたヒト GPR56 に対する抗体でリガンド様の機能が確認されていたのは 17CC だけであったが、今回新たに 4C3 と 11E9 という二つの抗体が 17CC と同様のリガンド様の機能を持つ抗体であることがわかった。先行研究者の小林の結果では、17CC 抗体が 10 μg/ml で効果を示したのに対し、他の抗体も等濃度で作用を確認していたため、その効果を見ることができなかった。本研究では、17CC よりも高濃度である 30 μg/ml で効果を検討した結果 U87-MG 細胞の遊走を阻害するような効果を見ることができた。このことから、今回得られた 4C3 と 11E9 は濃度依存性の実験から 17CC に比べて遊走抑制活性が低いことが示唆されたが、U87-MG 細胞の遊走を抑制するリガンド様の作用をもつことが明らかになった。

親和性の強さとリガンド様作用には相関関係がない

受容体に対する機能抗体として、チロシンキナーゼ型受容体に対する抗体や、Fas 抗体のように受容体を活性化する抗体の報告がある (Yonehara S, *et al.*, 1989)。また最近 GPCR においてもオリゴマー化することで活性化するという報告がある (Breitwieser GE, *et al.*, 2004)。GPR56 に対するリガンド用抗体は単に受容体のオリゴマー化を引き起こすだけなら、親和性の高い抗体ほど活性が強いことが予想される。しかし、ヒト GPR56ECD リコンビナントタンパク質を抗原とした ELISA と U87-MG 細胞の細胞遊走阻害の結果から、2F6 は得られた抗体の中でも抗原に対する親和性が非常に強いにもかかわらず細胞遊走阻害を示さなかった。このことから、親和性の強弱とリガンド様の機能には相関がないことがわかった。

リガンド様抗体は Gq を介し、Ca 応答を引き起こす

本研究において新たにリガンド様の抗体が 2 種類得られた。ヒト GPR56 は免疫沈降で Gq と相互作用するということは報告されていたが (Xu L *et al.*, 2007)、リガンドが見つかっていなかったため、実際 Gq を介したシグナル伝達経路の確認はされていなかった。本研究において、カルシウム応答と細胞遊走実験において Gq の特異的阻害剤である YM-254890 によって抗体の効果をキャンセルできたことにより、Gq を介したシグナル伝達が U87-MG 細胞の遊走を抑制するということが明らかになった。興味深いことに、Endothelin は細胞内カルシウム応答を引き起こすにもかかわらず、U87-MG 細胞の遊走抑制を示さなかった。このことから、カルシウムの上昇は細胞遊走の抑制効果に必須ではないことが示唆された。さらに、Endothelin あるいは、リガンド様抗体で引き起こされるカルシウム応答を比べてみると、Endothelin によって引き起こされる応答は一過性の上昇を見せるのに対し、抗体による応答、特に 17CC 抗体で刺激した時の応答は持続的なカルシウムの上昇を引き起こしている。細胞遊走の抑制はカルシウム応答と異なり長期的な応答であるので、カルシウムの持続的な上昇が細胞遊走を抑制する効果を示す可能性が示唆された。Gq を介した持続的な Ca 応答の報告はすでにあり、そのメカニズムは Gq が活性化すると、PLC の活性化によって産生される IP3 によって細胞内のカルシウムストアからカルシウムの流出がおり、これが一過性のカルシウム応答となる。一方、同じく PLC の活性化によって産生されるジアシルグリセロールや、それによって活性化される PKC が受容体作動性カルシウムチャンネルを活性化し、細胞外カルシウムの流入を引き起こす。さらにこの細胞内カルシウムストアのカルシウムが枯渇すると、ストア作動性カルシウムチャンネルが活性化され、細胞外からのカルシウム流入が起こる。このことが、持続的なカルシウム応答を引き起こすと考えられている (Horinouchi T, *et al.*, 2007)。また、造血幹細胞であるマスト細胞において持続的な応答が接着と遊走に関与するということが示されている (田中智之 2010)。17CC の活性がほかの二種類の抗体に比べ高いことも、持続的な応答を最も示していることと相関している。

また、Gq はホスホリパーゼ C を介してカルシウム応答を引き起こす経路とは別に、p63RhoGEF と結合し、Rho から Rho キナーゼを活性化することが知られている (Lutz S, *et al.*, 2005)。このシグナル伝達経路が細胞遊走にも関わることが報告されている。今回、Gq の GDP と GTP 交換反応を阻害する YM-254890 と Rho キナーゼの阻害剤である Y27632 を使った実験において、同じように抗体による細胞遊走抑制効果をキャンセルすることができた。このことは、抗体による作用が Gq から Rho キナーゼを介した経路を活性化し、細胞遊走の抑制を引き起こしていることがわかった。このことから、Gq を介した U87-MG の

遊走抑制は Rho 経路が関与している可能性が示唆された。

インターナリゼーションと Gq シグナルとの関係

4C3 は細胞膜表面に存在する GPR56 のエンドサイトーシスを誘導することがわかった。一方、18F2 抗体は 4C3 抗体に比べるとエンドサイトーシスの誘導効果が低いことがわかった。しかし、このエンドサイトーシスは Gq の阻害剤である YM-254890 で抑制されなかった。このことから、エンドサイトーシスには Gq の活性化が必須ではないことが明らかになった。一般に GPCR のアゴニストによる脱感作は、アゴニストを結合した GPCR が G-protein receptor kinase (GRK) を活性化し GPCR 自身のリン酸化がされることで起こる。GPCR のリン酸化は、G タンパク質の脱共役だけでなく、β アレスチンとの結合を引き起こし、エンドサイトーシスにより GPCR を減少させる。GRK は 7 種類が知られており、GRK1,7, GRK2,3, GRK4,5,6 の 3 つグループに分類される (芳賀, 2010)。GRK はリガンドが結合した GPCR が構造変化を起こし、露出した細胞内部分のペプチドが活性化する。また GRK2,3 は Gβγ との結合部位をもっており、Gβγ との結合により活性化される。このように GPCR はアゴニストによる GPCR の構造変化と G タンパク質活性化によってリン酸化され、アレスチン結合を伴うエンドサイトーシスが引き起こされる。しかし、オピオイド受容体においては、Gi の阻害剤である Pertussis toxin (PTX) を作用させても受容体のリン酸化やインターナリゼーションが起こるといふ、G タンパク質非依存的な経路も報告されている (Faye A. *et al.*, 2009)。Gq の活性化に依存しない GPR56 のエンドサイトーシスという今回の結果はこれと一致する。

抗体の認識部位と機能の関係

Piao らは、GPR56 の結合分子であるコラーゲンⅢは GPR56 細胞外ドメインの 94 番目から 143 番目のアミノ酸領域に結合するという事を報告している (Piao *et al.*, 2011)。今回使用した 18F2 抗体はこの 94-143 番目のアミノ酸領域を認識していることが先行研究の結果から分かっている (小林修士論文)。今回 CollagenⅢ 自体の効果を見ることはできなかったため、94-143 番目の領域に関しての重要性は明らかになっていない。また、17CC が 300-400 番目のアミノ酸を認識するリガンド様抗体なのに対し、4C3 と 11E9 は 1-100 番目のアミノ酸を認識するリガンド様抗体であることがわかった。このことから、アミノ酸の一次構造において、活性化に重要な領域は一箇所ではないということがわかった。しかし、1-100 番目と 300-400 番目の領域は実際のタンパク質立体構造ではどのような関係になっているかは不明である。より詳細な抗体による活性化のメカニズムの解明には、構造解析が必要と思われる。しかし、GPR56 細

胞外ドメインは高度に糖鎖修飾されていることから、X線を用いた結晶構造解析は困難であると考えられる。また、抗体の認識部位の同定のため、細胞外ドメインのN末端から100アミノ酸ずつ欠損させた変異体を用いて解析を行った。この実験では、得られてきた抗体がアミノ酸の一次構造を認識しているのか、GPR56の高次構造を認識しているのかは明らかにできていない。よって、さらなる抗体の認識様式の解析が必要であると考えられる。

今回、細胞外ドメイン全長のリコンビナントタンパク質を抗原として抗体作製を行ったが、100-200番目と200-300番目のアミノ酸領域を認識する抗体を得ることができなかった。このことから、200-300番目のアミノ酸領域は抗原性が低い可能性が示唆された。

抗体は細胞外ドメインと膜貫通領域の相互作用を強めるように働くことを示唆
リガンド様抗体である17CCと4C3は認識部位が異なるにもかかわらず、同じようにカルシウム応答とU87-MG細胞遊走の抑制効果を示した。また17CCと4C3、11E9は免疫沈降できない抗体であったため、細胞外ドメインからの沈降では比べるができなかった。しかし、膜貫通領域側からの沈降の際、リガンド様抗体を加えておくと、その沈降する細胞外ドメインのタンパク質の量が増えていたことから、リガンド様抗体は結合部位にかかわらず同じように膜貫通領域と細胞外ドメインの結合を強めるような構造変化を引き起こしたと考えられる。また、相互作用を強めるという結果は、以前報告された Δ ECDが恒常活性化型であるという報告と一見矛盾するようにも思うが、 Δ ECDによる実験は過剰発現だけの結果であり、 Δ ECDとECDをHEK293T細胞に共発現させてもSREルシフェラーゼの活性を抑制することができなかった(データ未掲載)。このことから、ECDがGPR56のシグナルを直接的に抑制しているという証明はできておらず、 Δ ECDは単独で活性が高くなるような構造をとっている可能性が考えられる。

興味深いことは、細胞外ドメインのC末端側を認識する抗体がともに免疫沈降に使用できなかったという点である。免疫染色では使用できることから、固定条件下で認識することは示されている。結合した状態が立体障害によりプロテインGと結合できなくなるためだとも考えられる。また、インターナリゼーションの観察時、2F6と17CCでは細胞膜表面のGPR56を十分に認識することができなかった。しかし、17CCがU87-MG細胞の遊走抑制効果を示すこと、またその効果が抗原によって阻害されることから、GPR56に結合して効果を示していると考えられる。17CCは持続的な応答が最も見られるということがカルシウム応答で見られることから、細胞表面のGPR56との親和性の低さが

逆に持続的なカルシウム応答を引き起こし、強い細胞遊走抑制効果を示しているのではないかと考えられる。

コラーゲンはリガンド様抗体と同様の作用は示さなかった

コラーゲンⅢは、リガンド抗体で見られるような U87-MG 細胞の遊走抑制効果は示さなかった。またマウス GPR56 を HEK293T 細胞に過剰発現させたレポーターアッセイの結果からも、リガンド作用を示さなかった。Piao らが報告しているのはマウスの神経幹細胞での実験であった。このことから、細胞種によって GPR56 との結合分子が異なるためであり、GPR56 の活性化にはリガンドとは別に、協調的に働くコレセプターのような結合分子が存在し、シグナル伝達に関与しているのかもしれない。GPR56 の結合分子の探索について、当研究室でも解析が行われている。岩崎は GPR56 の細胞外ドメインに結合する分子として、レプリカンとグリピカンを報告している (岩崎, 2009)。現在のところ、これらの分子の結合とリガンド作用との関連は明らかになっていない。レプリカンはプロリン水酸化酵素として機能することが知られており、コラーゲン中のプロリンを水酸化する反応を触媒することで、コラーゲンの構造を安定化させるという報告がある (Hatzimichael E *et al.*, 2012)。また GPR56 の結合分子として同定されたトランスグルタミナーゼ 2 (TG2) も、コラーゲンを架橋することで安定化に寄与する (Xu L *et al.*, 2007)。これらのことから、レプリカンや TG 2 とコラーゲンの複合体が GPR56 のリガンドとして作用する可能性もある。今後の解析で、これらの分子の関連が明らかになるかもしれない。

Gq の活性化は細胞内第一ループのアミノ酸が関与している

当研究室の先行研究でマウス GPR56 は G12/13 と共役するという結果に対し、本研究から U87-NG 細胞において、ヒト GPR56 は Gq と共役していることが明らかとなった。この共役 G タンパク質の違いに関して、U87-MG 細胞では、mRNA の解析からヒトの Wild Type (WT) の他に、マウスと同様の分子量であるスプライシングバリエント S1 が発現していることが明らかとなった。WT に比べ、S1 は細胞内第一ループのアミノ酸が 6 アミノ酸短い。マウス GPR56 はヒトの S1 と同じアミノ酸数である。このスプライシングバリエントを使ったレポーターアッセイの実験がすでに報告されており、HEK293T 細胞に過剰発現させたとき、S1の方が WT よりも SRE ルシフェラーゼ活性が高いという結果を示している (Kim JE, *et al.*, 2010)。当研究室でも、同じような実験を行ったが、SRE ルシフェラーゼ活性の上昇は見られなかった。しかし、恒常活性化型の Δ ECD を過剰発現させた実験から、ヒト WT Δ ECD を発現させたとき細胞の遊走抑制効果が示されたが、S1 Δ ECD を発現させたときはみられないことがわ

かった。またこの抑制効果は Gq 阻害剤である YM-254890 でキャンセルされたことから、 Δ ECD 過剰発現で引き起こされる細胞遊走抑制効果はリガンド様抗体と同様に Gq を介することが明らかとなった。これらの結果は、WT と S1 では機能とシグナル系が異なることを新たに示唆した。また、マウスとヒトでは発現している GPR56 は細胞内第一ループの 6 アミノ酸の部分異なり、この部位が Gq を活性化し、細胞遊走抑制効果に重要であることが考えられた。WT と S1 との作用の相違については、細胞内第一ループの 6 アミノ酸が実際 G タンパク質の認識に強く関わっている、もしくは細胞が異なるため、結合分子などの差により G タンパク質の認識に差が出ている可能性が考えられる。このことを明らかにするためには WT もしくは S1 の一方のみを発現させて検討する必要がある。

オーファン受容体の研究は、これまで生理活性に基づいた薬理学的手法や、GPCR 発現細胞系を用いシグナル伝達系の活性を指標に同定を進める逆薬理学的手法を用いたリガンド探索が行われているが、これらの戦略ですべてのリガンドを解明するには限界があり、新しいアプローチ必要と考えられる。また、G タンパク質共役受容体の活性化機構は、リガンドが結合することにより三量体 G タンパク質を GDP 結合型か GTP 結合型へと変換するスイッチの役割を果たすことが古くから知られているが、最近その活性化の様式は様々報告されており、受容体の多量体化、他の膜結合タンパク質との相互作用など受容体によっても異なり、不明な点は多い。本研究はオーファン GPCR を研究するために機能抗体を用いて、リガンド代用として結合することによる活性化のみならず、GPCR の新しい活性化機構を探る新規アプローチとなり得ると考えられる。またリガンド未知のままでもリガンドの代わりに抗体医薬として臨床的に応用することができる可能性があり、GPCR を標的とした疾患の治療に大いに活用できることが期待できる。

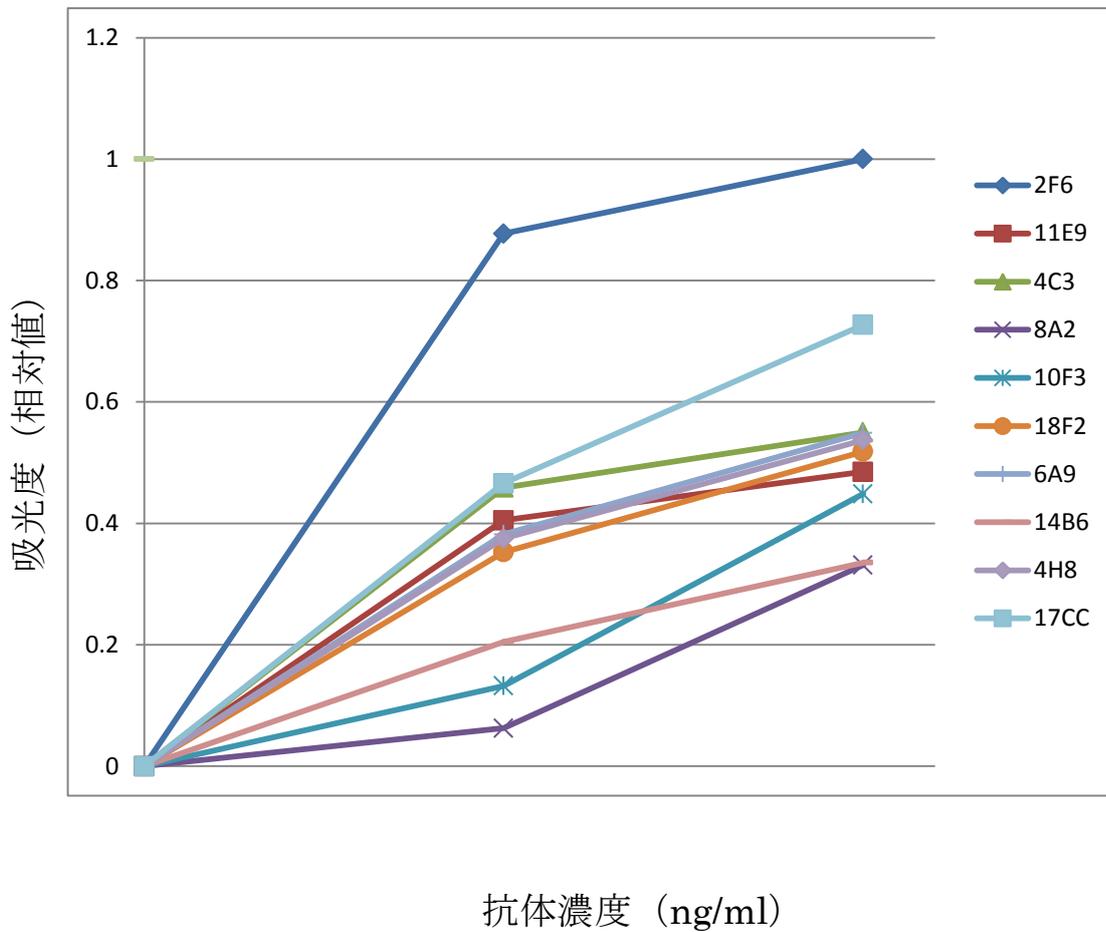


図 3. ヒト GPR56 に対するモノクローナル抗体の ELISA による解析
 抗体濃度をそれぞれ 0.1 ng/ml、1 ng/ml で ELISA を行った。それぞれの
 値は、2F6 の 1 ng/ml で測定した結果を 1 としたときの相対値で示す。

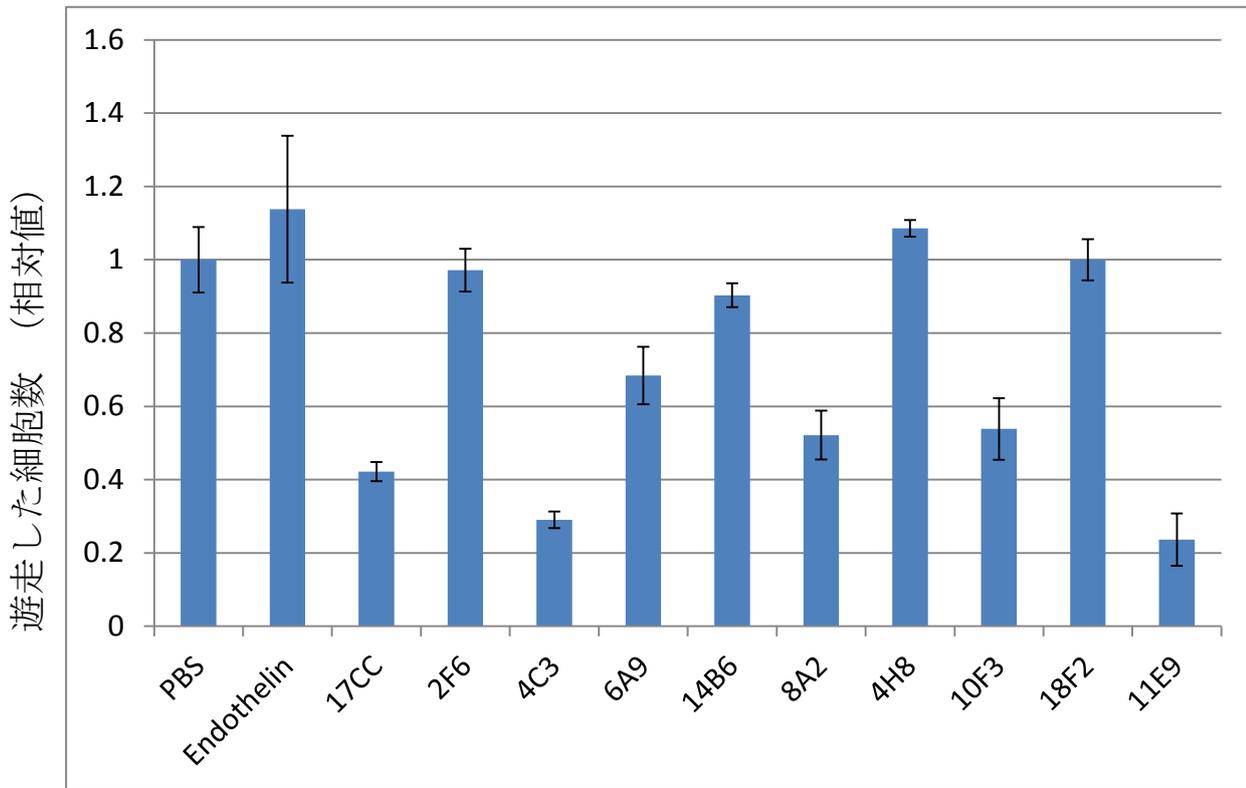


図 4. ヒト GPR56 抗体の U87-MG 細胞遊走に対する効果

U87-MG 細胞に各抗体の濃度は 30 $\mu\text{g/ml}$ で、17CC のみ 10 $\mu\text{g/ml}$ 、Endothelin は 2 μM で作用させた。細胞をチャンバーの上に乗せてから、4 時間後に回収し、移動した細胞数をカウントした。PBS を添加した時の移動した細胞数を 1 としたときの相対値を示している。3 回の実験の平均値を示し、エラーバーは標準偏差を示す。

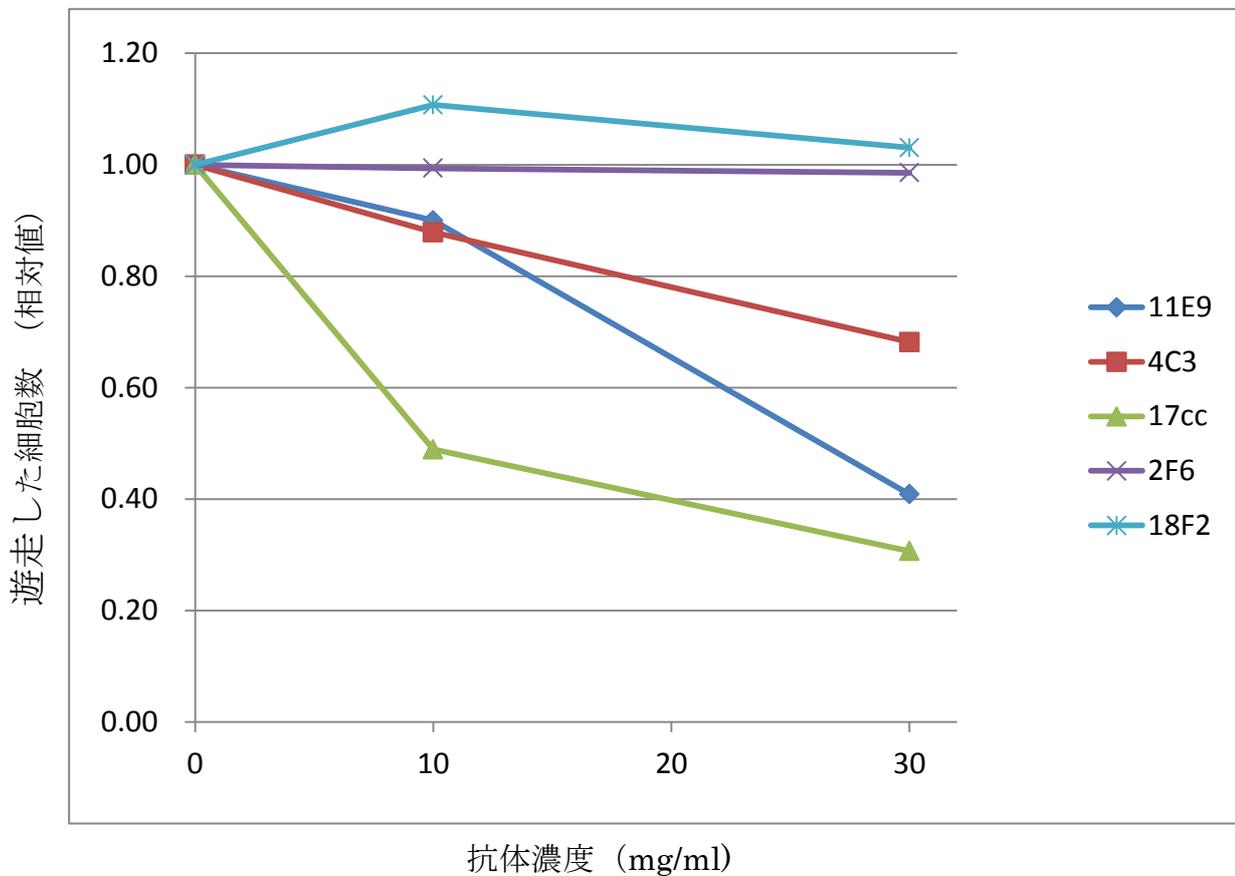
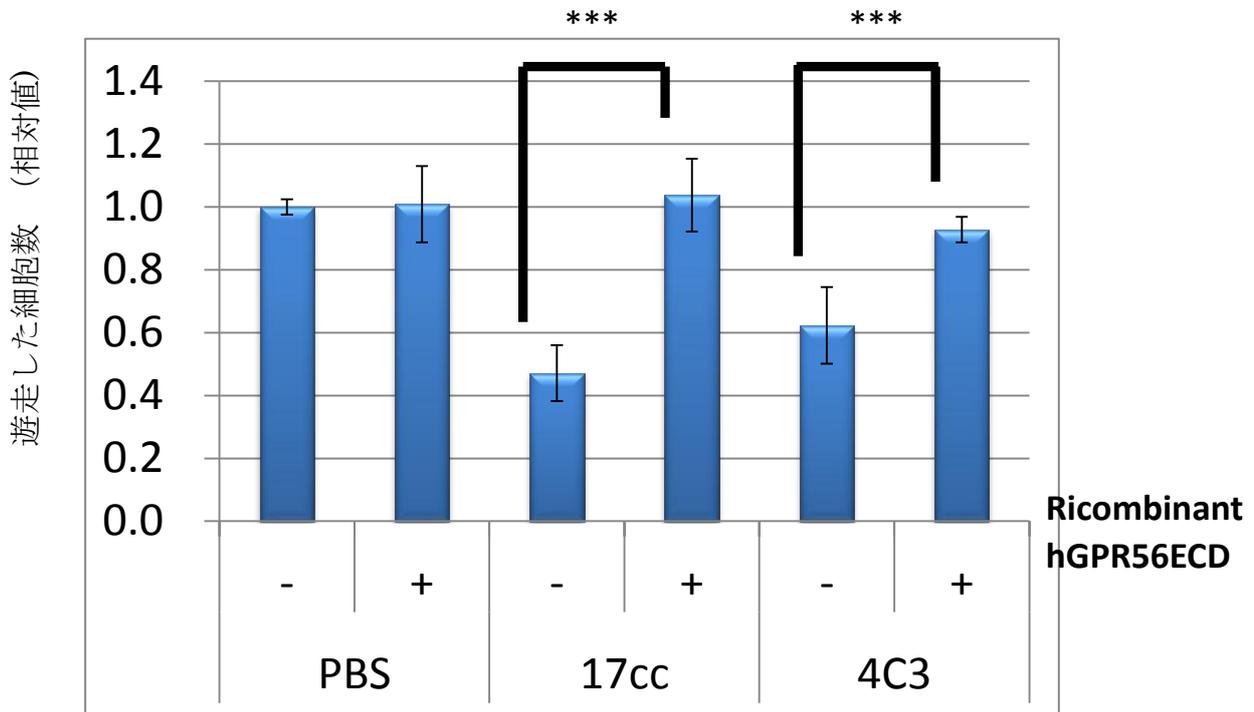


図 5. 細胞遊走抑制効果を示す抗体の濃度依存性

U87-MG 細胞の遊走に対する 11E9、4C3、17CC、2F6 および 18F2 の効果を 10 mg/ml、30 mg/ml の濃度で検討した。各抗体を加えて 4 時間後にチャンバーの下方に移動した細胞数をカウントした。PBS のみを加えたサンプルを 1 とした時の相対値として示す。二回の実験の平均値を示す。



*** p<0.01

図6 アゴニスト様抗体による遊走抑制効果に対する抗原タンパク質の競合阻害抗原である Ricombinant ヒト GPR56 細胞外ドメイン (hGPR56ECD)を競合させたときのリガンド様抗体である 17CC および 4C3 抗体の効果を検討した。

Ricombinant タンパク質は 10 µg/ml、17CC は 10 µg/ml、4C3 は 30 µg/ml で作用させた。Ricombinant タンパク質を加えないで PBS を加えたサンプルの細胞数を 1 とした時の相対値で示した。3 回の独立した実験の平均値をとり、エラーバーは標準偏差を示す。

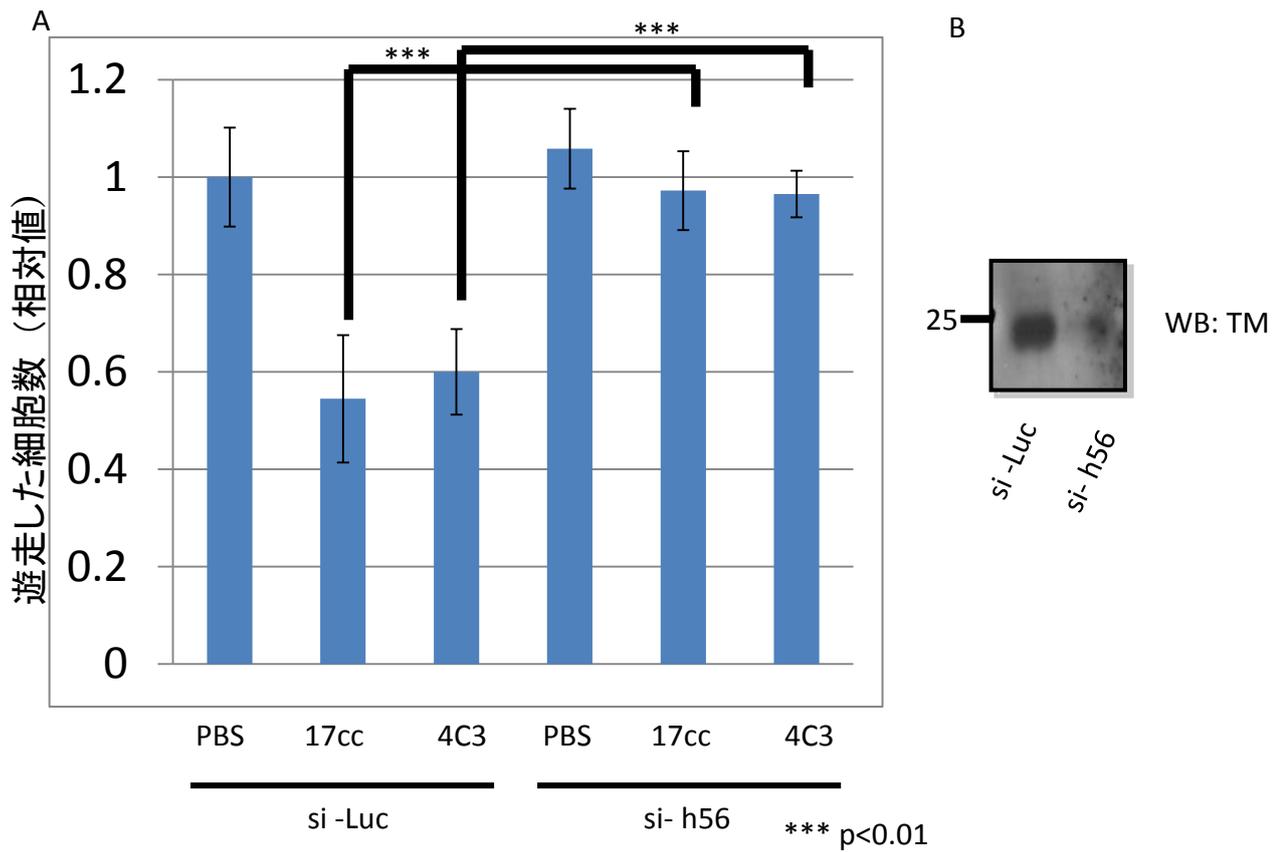


図7 GPR56をノックダウンさせたときの細胞遊走に対する抗体の効果

A. U87-MG細胞にリポフェクタミン法を用いてそれぞれのsiRNAを導入し、その後チャンバーに移して抗体を作用させたのち、4時間後に回収しチャンバーの下方に移動した細胞数をカウントした。抗体濃度は17CCが10 μ g/ml、4C3が30 μ g/mlで作用させた。コントロールはルシフェラーゼをターゲットとしたSi-Lucを使用した。グラフは、Si-Lucを導入して、PBS処理を行ったものを1とした相対値で示す。3回の実験の平均値標準偏差を示す。

B. ノックダウンが行われているのかをWestern Blotにより確認した。検出にはGPR56の膜貫通領域の抗体(TM)を使用した。

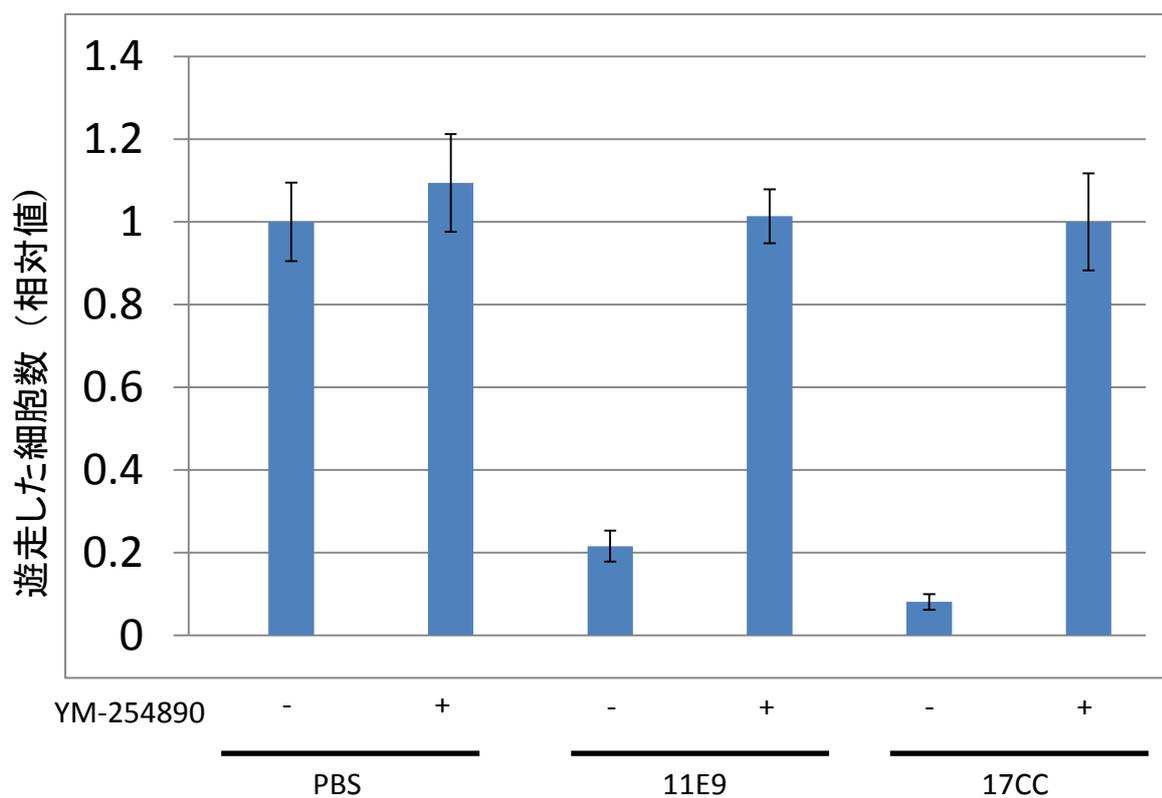


図 8 アゴニスト様抗体の作用に対する G_q 特異的阻害剤 YM-254890 の効果

17CC および、11E9 の抗体による U87-MG 細胞の遊走抑制効果に対する G_q 特異的阻害剤である YM-254890 の効果を検討した。17CC は 10 μg/ml、11E9 は 30 μg/ml、YM-254890 は 1 μM で作用させた。PBS のみを作用させた時を 100%とした時の相対値を示す。3 回の実験の平均値をだし、エラーバーは標準偏差を示す。

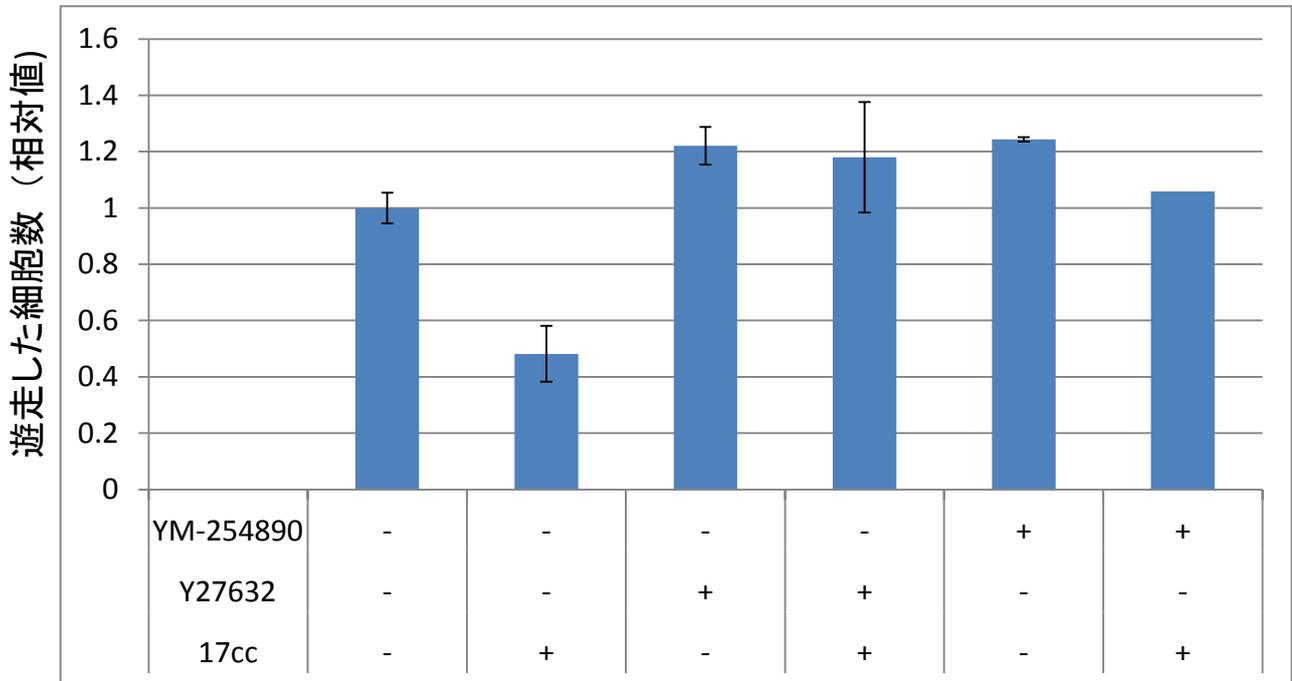


図.9 17CC の作用に対する Rho キナーゼ阻害剤 Y27632 の効果

17CC による U87-MG 細胞の遊走抑制効果に対する Gq 阻害剤 YM-254890 と Rho キナーゼの阻害剤 Y27632 の効果を検討した。17CC は 10 $\mu\text{g/ml}$ 、YM-254890 は 1 μM 、Y27632 は 1 μM で作用させた。作用させてから 4 時間後にチャンバーの下方に移動した細胞数をカウントし、コントロールとして PBS を用いた時の値を 1 とした相対値で示した。3 回の実験の平均値と、エラーバーはその標準偏差を示す。

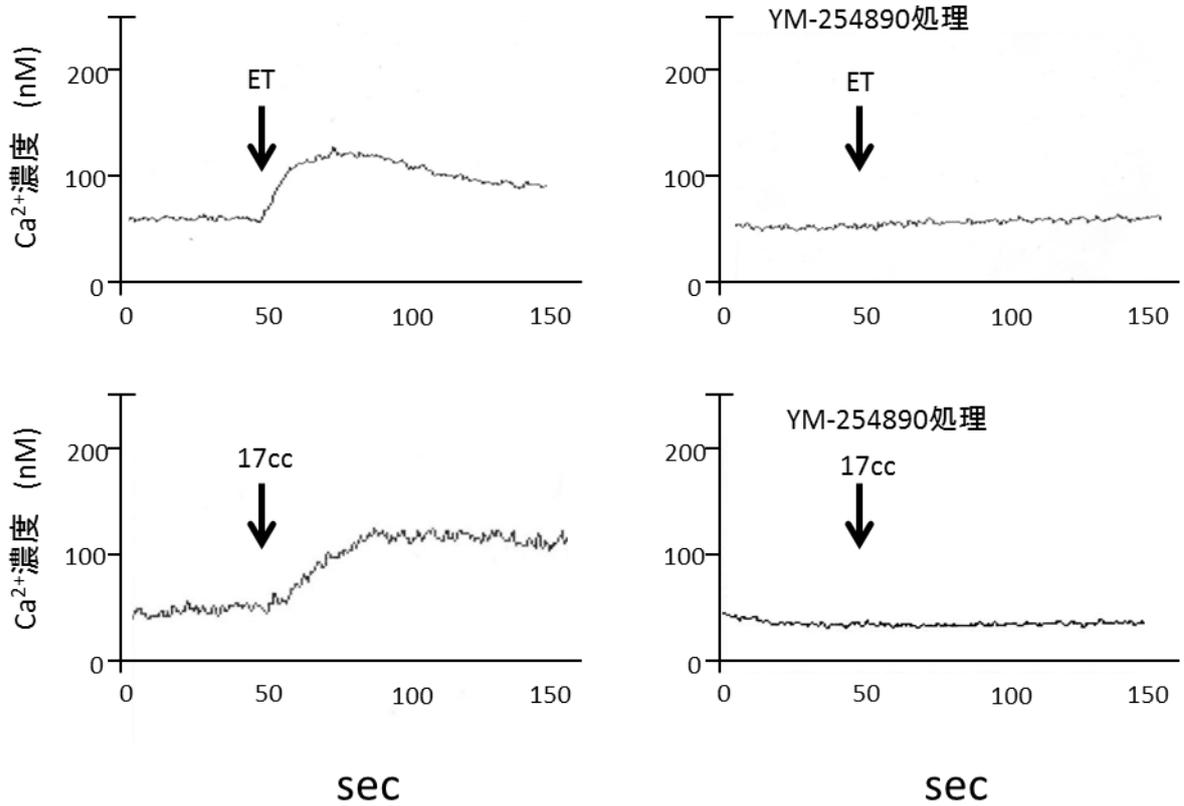
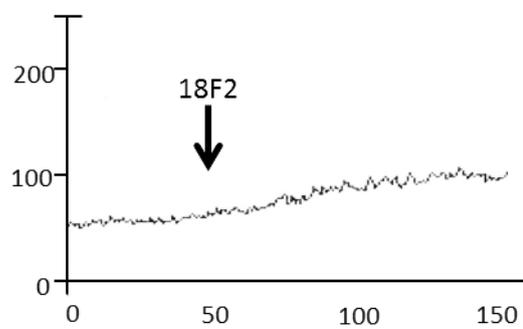
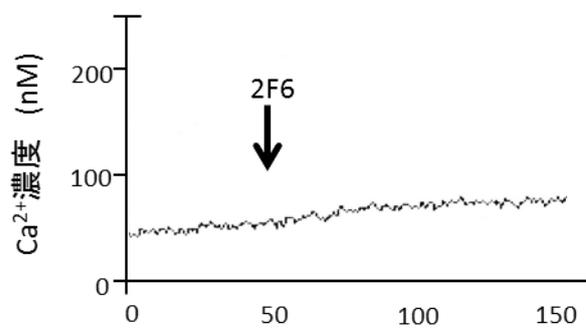
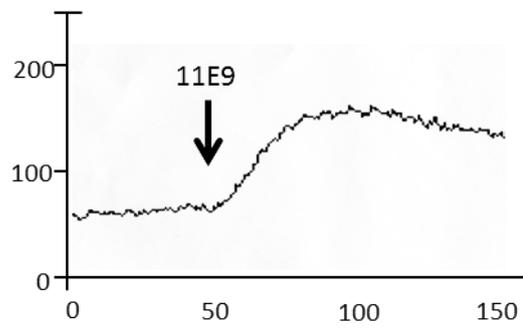
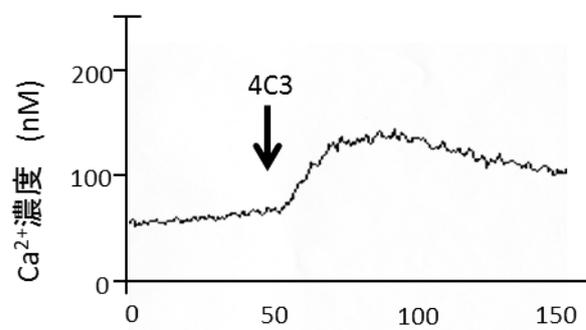


図 10 U87-MG 細胞でのアゴニスト様抗体による細胞内カルシウム応答の経時的測定
 各サンプルは U87-MG 細胞を 1.5×10^6 個の条件で行った。矢印のところで各抗体 ($10 \mu\text{g/ml}$) およびポジティブコントロールである Endothelin (ET) $2 \mu\text{M}$ を加えた。YM-254890 は $1 \mu\text{M}$ の条件で加えた。(次ページに続く)



sec

sec

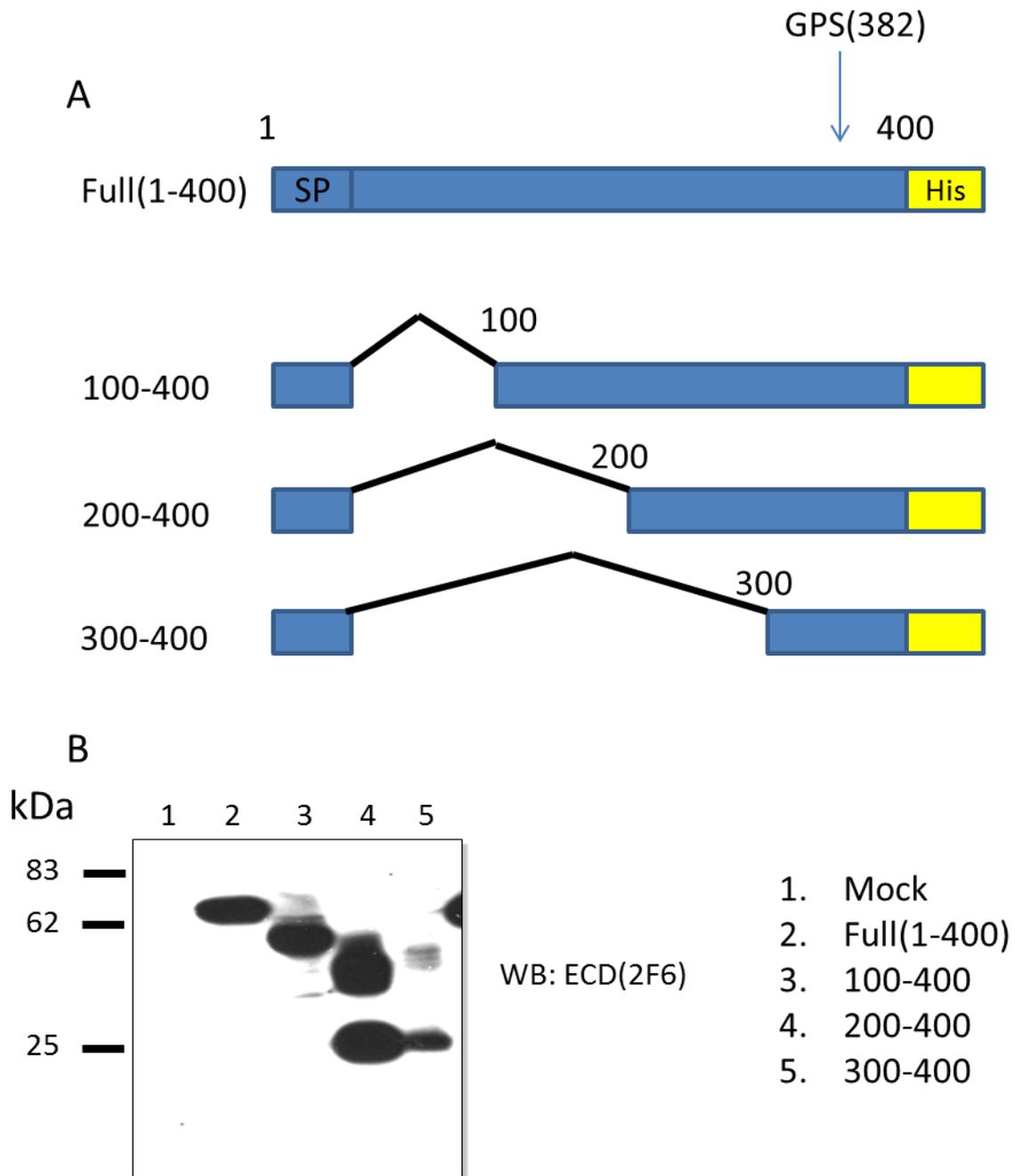


図 11 ヒト GPR56 細胞外ドメイン欠損変異体の作製

- A) ヒト GPR56ECD の欠損変異体を示す。N 末端にはシグナルペプチド (SP)を残し、C 末端側には His タグを付加させた。GPS での切断部位よりも C 末端側に 20 アミノ酸ほど長い。
- B) これらのコンストラクトを HEK293T 細胞に導入したときの発現を検出した。検出には 2F6 抗体を用いた。Lane4 の 200-400 の発現がダブルバンドになっているのは、下のバンドが分解産物であると考えられる。

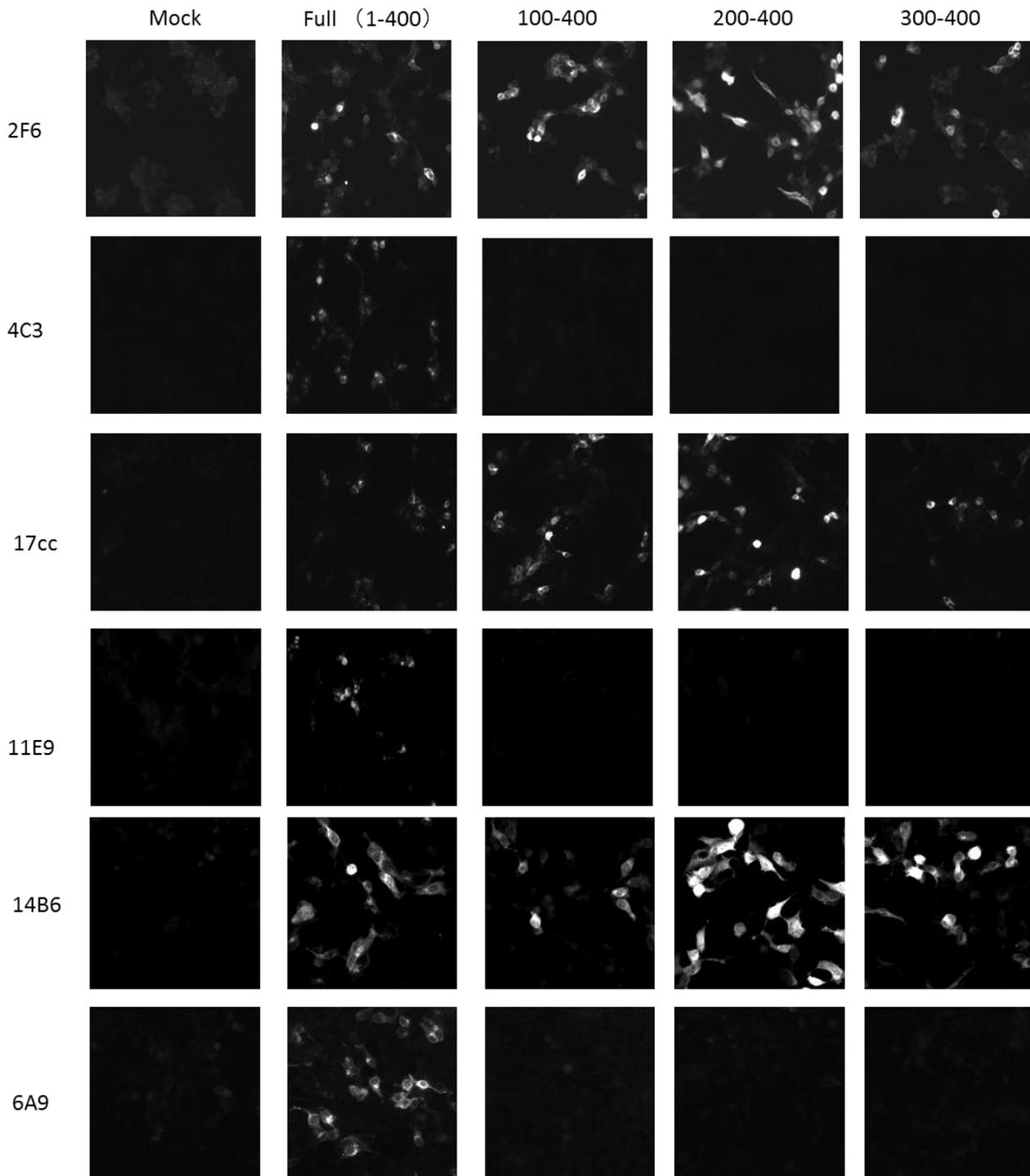


図 12. 免疫染色による抗体認識部位の同定

ベクターのみ (Mock)、ECD の全長 (Full)、GPR56ECD100-400、200-400、300-400 のコンストラクトを HEK293T 細胞に発現させ、そのときに各抗体を用いて免疫染色を行った。各抗体の濃度は 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で使用した。

	Elisa	Immuno blot	Immuno precipitation	Immuno stain	Inhibition of U87 migration	Epitope
17cc	○	+	×	○	+++	300-400
11E9	○	×	○	○	++	1-100
4C3	○	×	○	○	++	1-100
2F6	○	++++	×	○	-	300-400
18F2	○	+	○	○	-	94-144
14B6	○	×	ND	○	-	300-400
6A9	○	×	ND	○	+	1-100
4H8	○	×	ND	×	-	ND
10F3	○	×	ND	×	-	ND
8A2	○	×	ND	×	-	ND

表 1 各抗体の性質

エピトープの部分は免疫染色に使用できた抗体のみ決めることができた。この表は本研究で得られた結果と、小林修士論文で得た知見をまとめたものである。ND, Not determined

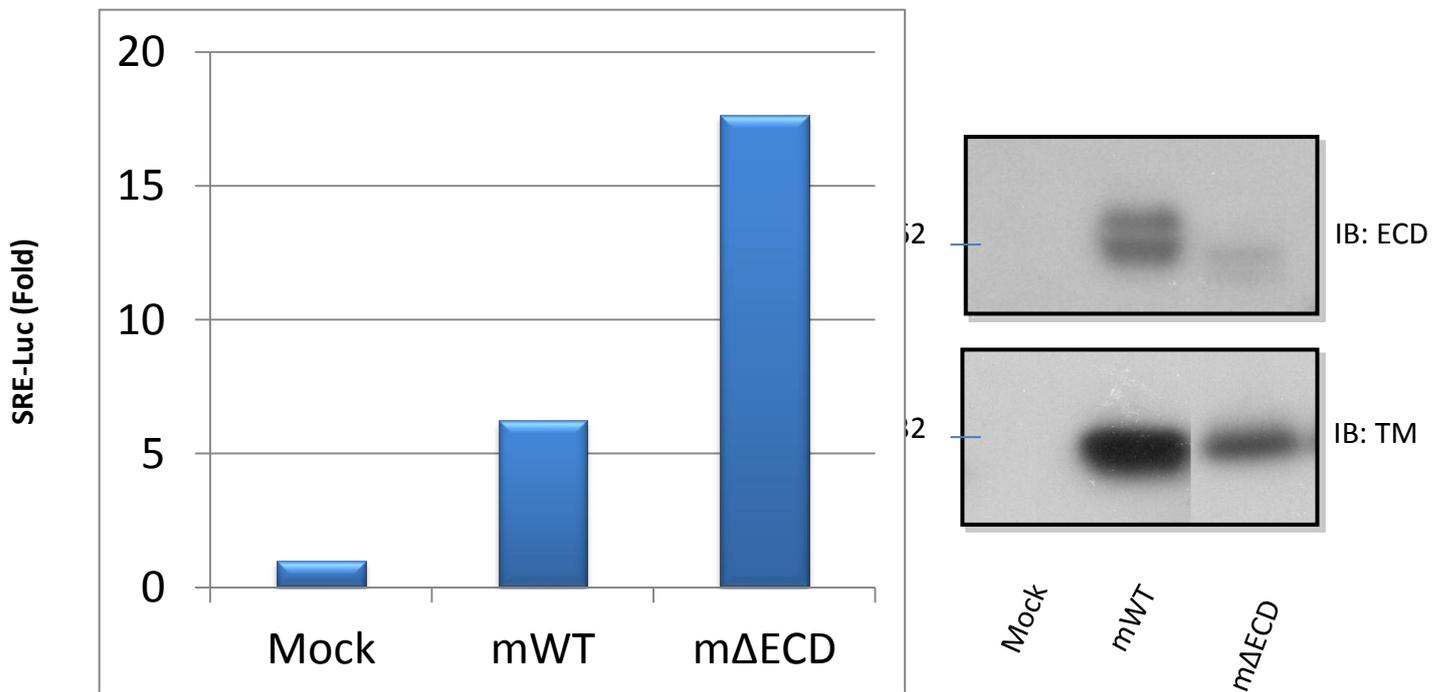
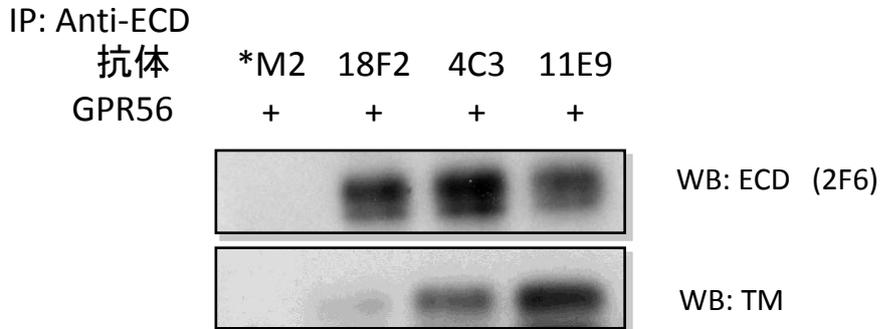


図 13. マウス GPR56 Δ ECD の SRE ルシフェラーゼ活性の測定

HEK293T 細胞にマウス GPR56 Wild Type(mWT)および、マウス GPR56 Δ ECD(m Δ ECD)を過剰発現させ、レポーターアッセイによって SRE ルシフェラーゼ活性の測定を行った。

その時のサンプルを細胞外ドメインの抗体 (ECD)と膜貫通領域の抗体 (TM)を使用して Western Blot により検出した。

A



*M2: コントロール抗体として用いた M2-Flag 抗体

B

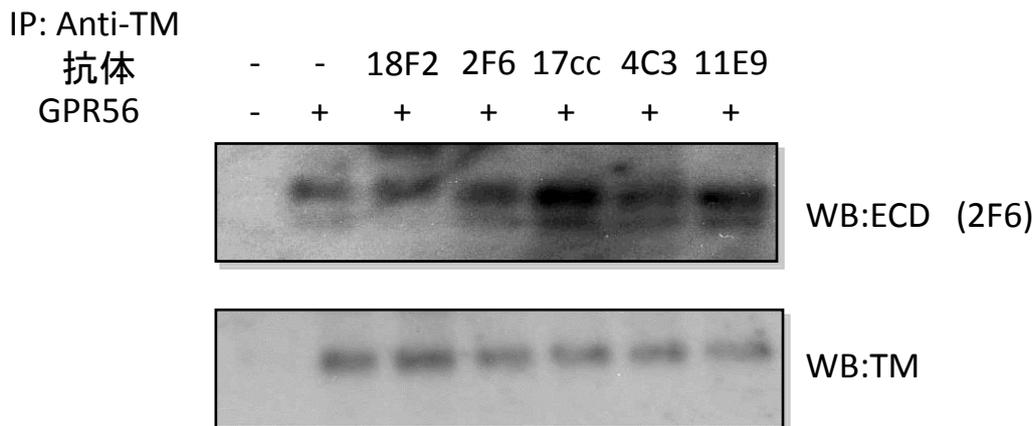


図 14. 免疫沈降による ECD と TM の相互作用の検討

- A) HEK293T 細胞にヒト GPR56 を発現させ、細胞抽出液を用いてそれぞれの抗体によって ECD 側から免疫沈降を行った。沈降した ECD (2F6)と TM をそれぞれの抗体で検出した。
- B) NHS-レジンに TM 抗体を架橋させたのち、TM 側から免疫沈降させた。免疫沈降させるときに、それぞれの抗体を 5 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で加えた。その時沈降してきた ECD と TM をそれぞれの抗体により検出した。

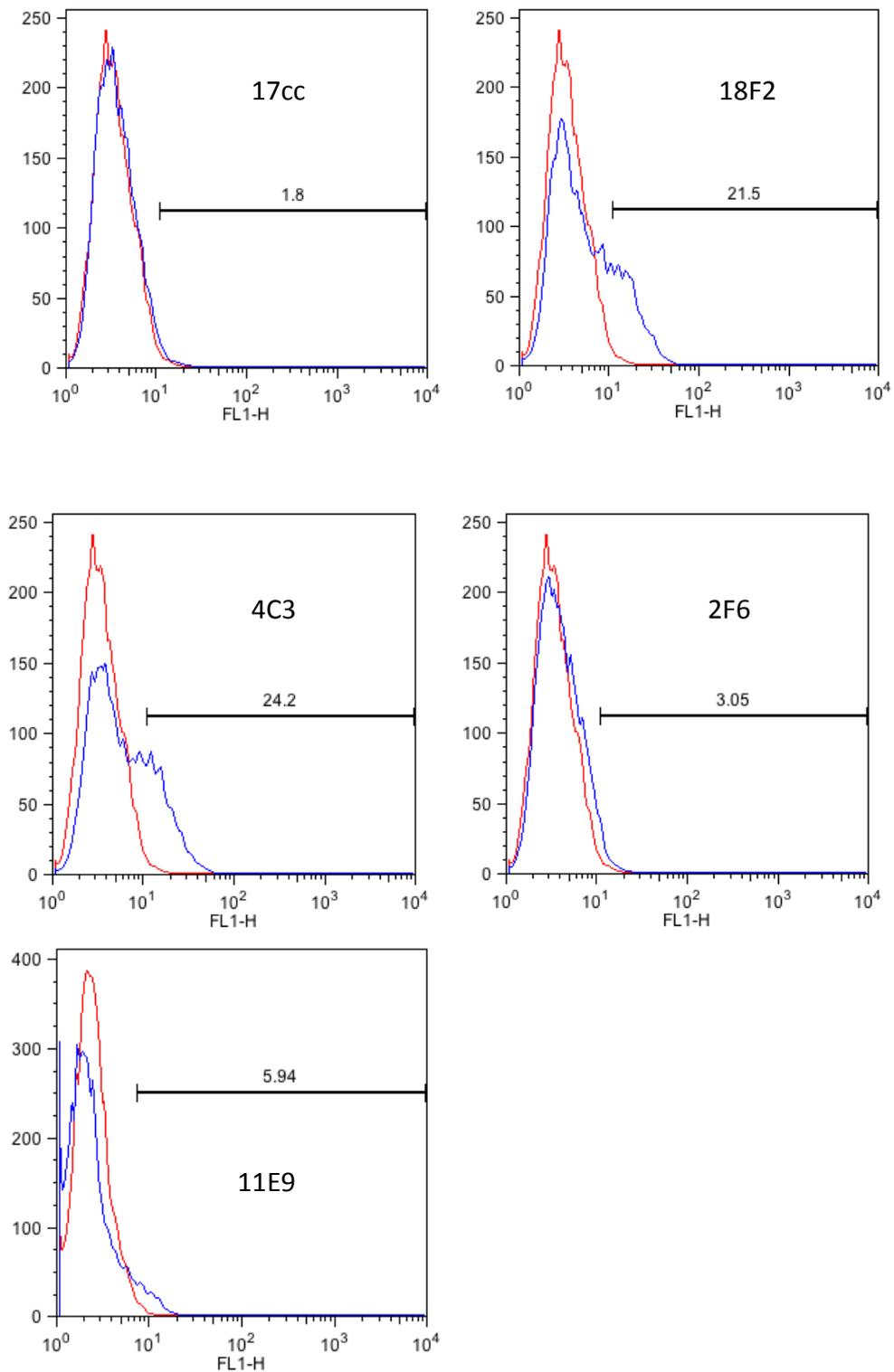


図 15. U87-MG 細胞膜表面の GPR56 に対する抗体の結合

U87-MG 細胞とそれぞれの抗体を 4°C の条件下で 1 時インキュベートした後、PBS で洗浄し、抗体の細胞膜表面に対する GPR56 の結合をフローサイトメトリーにより評価した。赤がコントロールで、青が各サンプルである。コントロールに比べ、ピークのシフトを%で表した。縦軸が細胞数、横軸が蛍光強度を示す。

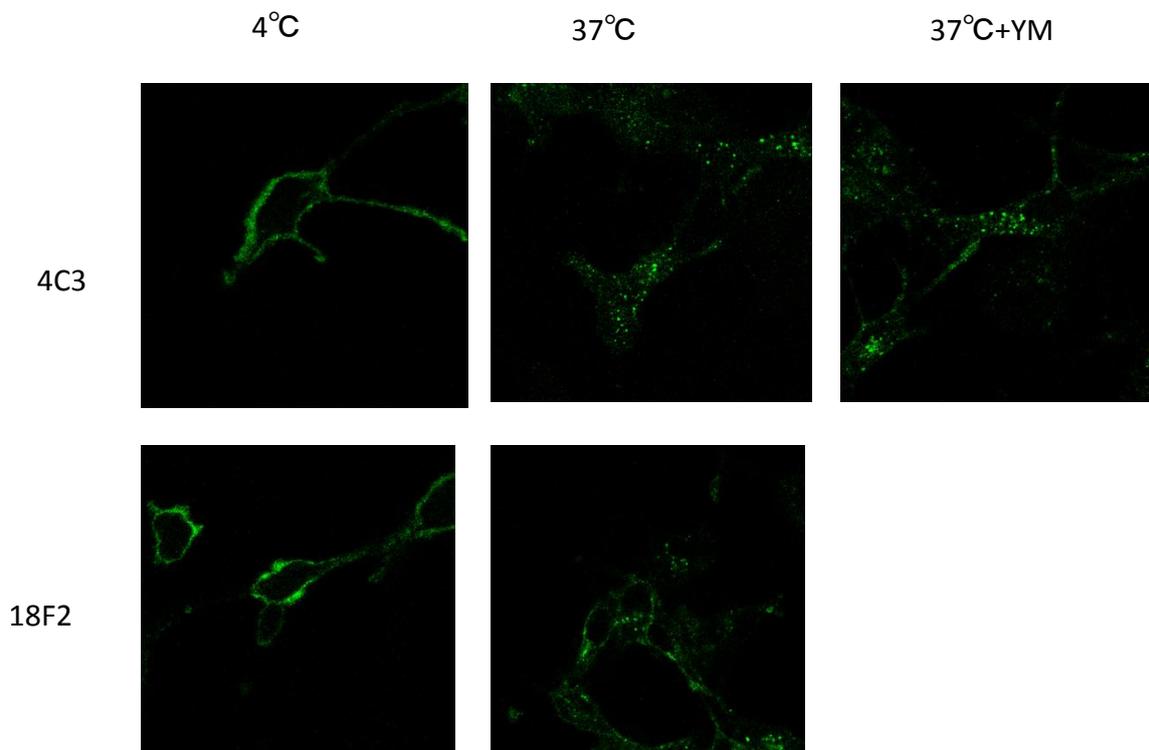


図 16. アゴニスト様抗体 4C3 による GPR56 のエンドサイトーシス

アゴニスト様抗体 4C3 および非機能性抗体 18F2 を用いて、GPR56 のエンドサイトーシスを観察した。4°C でそれぞれの抗体を 1 時間処理した後、PBS で洗い流し、4°C あるいは 37°C で 30 分間インキュベートした。その後、固定してから Alexa488 標識二次抗体で処理し、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。また、4C3 に関しては、YM-254890 (1 μ M) の効果も検討した。

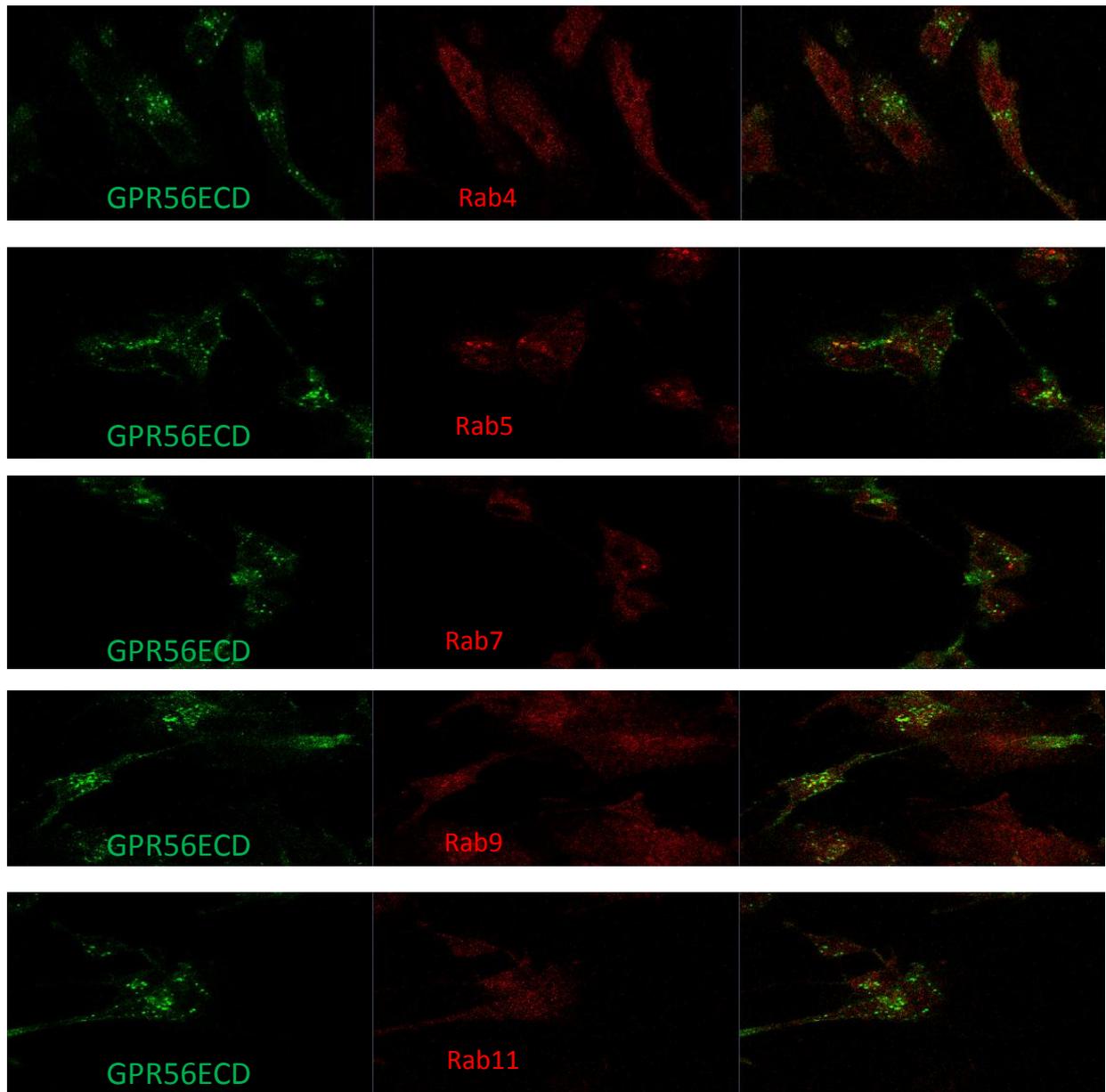
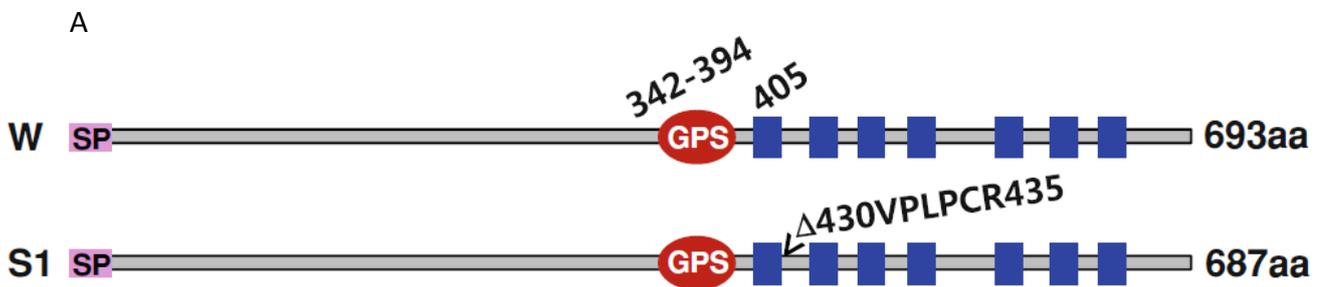


図 17. エンドサイトーシスした GPR56 と Rab ファミリーとの免疫染色

GPR56 の細胞外ドメインを緑、Rab ファミリーを赤で表示している。4C3 抗体を作用させてから、37°C で 30 分間エンドサイトーシスを誘導した後に固定、膜透過処理を施した後、Rab ファミリーと細胞外ドメインの染色を行った。Rab4 と 5 は初期エンドソーム、7 と 9 は後期エンドソーム、11 はリサイクリングエンドソームマーカーである。



B

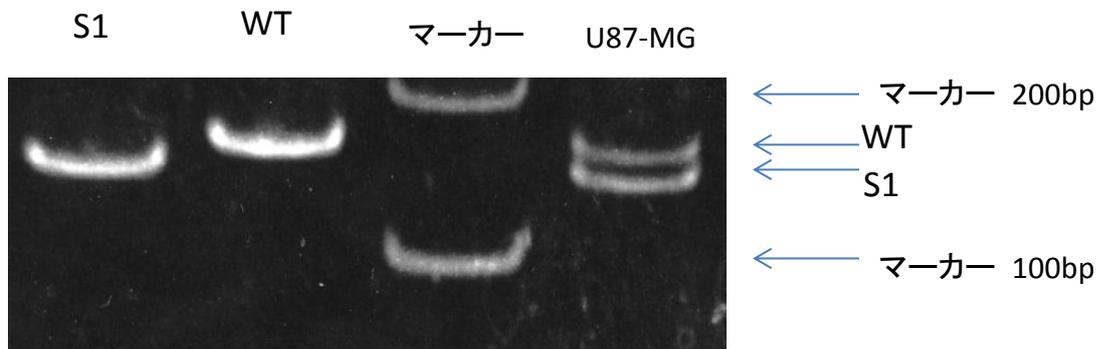


図 18. ヒト GPR56 のスプライシングバリエント

A) Wild Type (WT) とスプライシングバリエント 1 (S1) の比較。S1 は細胞内第一ループ 430 番目の Val から 435 番目の Arg までの 6 アミノ酸がない。

B) U87-MG 細胞に発現しているバリエントを mRNA から RT-PCR したものを電気泳動で検出した。WT は 180bp、S1 はそれより 18bp 短い 162bp である。それぞれのバンドはシーケンスの結果から WT と S1 であることを確認している。

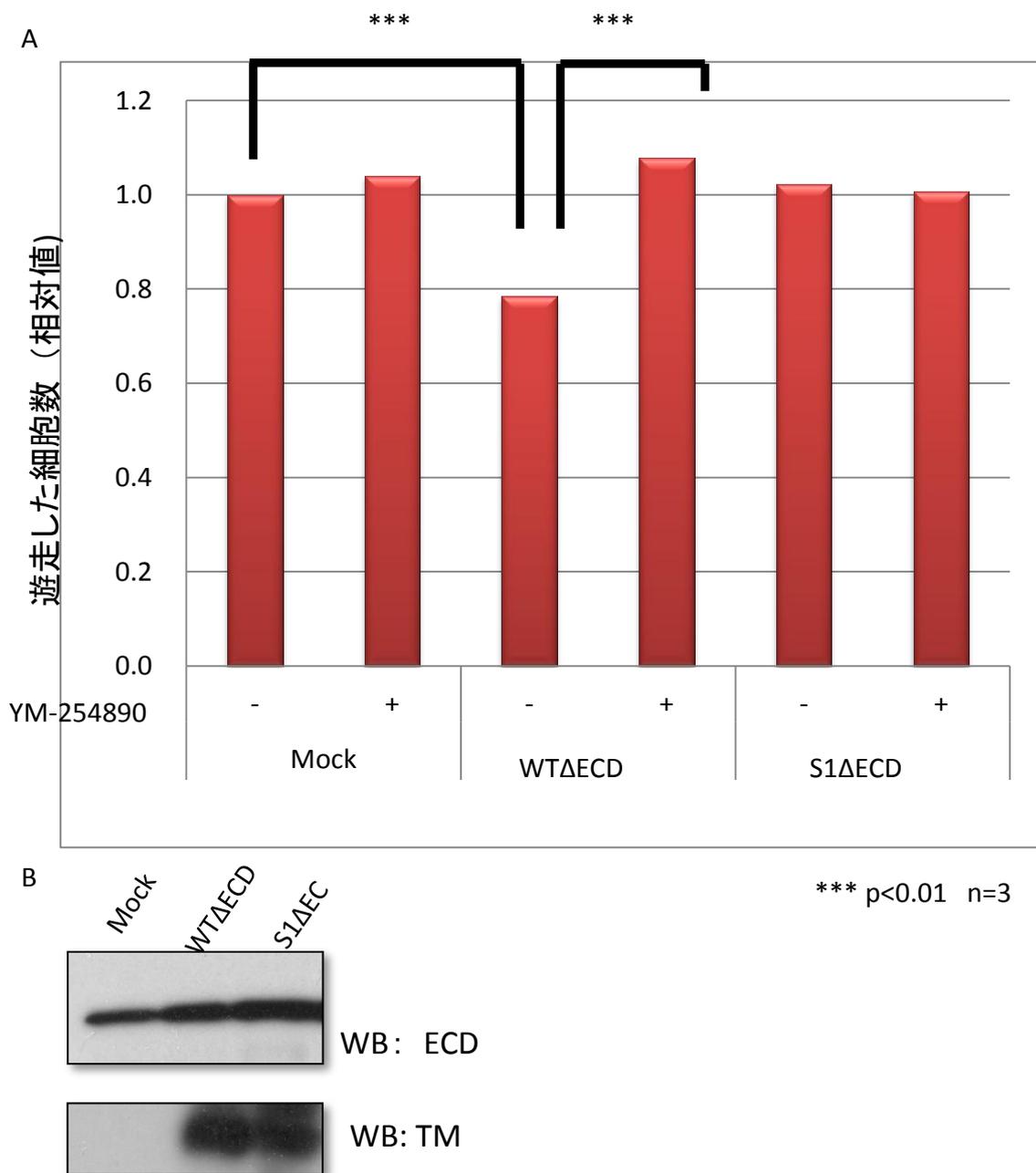


図 19. ヒト GPR56ΔECD の効果

- A) U87-MG 細胞にヒト GPR56WildType の ECD 欠損変異体 (WTΔECD) およびヒト GPR56 スプライシングバリエント1 の ECD 欠損変異体 (S1ΔECD) を過剰発現させて、細胞遊走アッセイを行った。また、Gq の特異的阻害剤である YM-254890 (1 μM) も同時に作用させた。遊走アッセイは細胞をチャンバーに入れたのち 4 時間で回収し、下方へ移動している細胞をカウントした。ベクターのみを過剰発現させて、YM 処理を行っていないものを 1 とした時の相対値を示す。
- B) それぞれのコンストラクトの発現を ECD の抗体である 2F6 および、膜貫通領域の抗体を用い Western Blot により検出した。

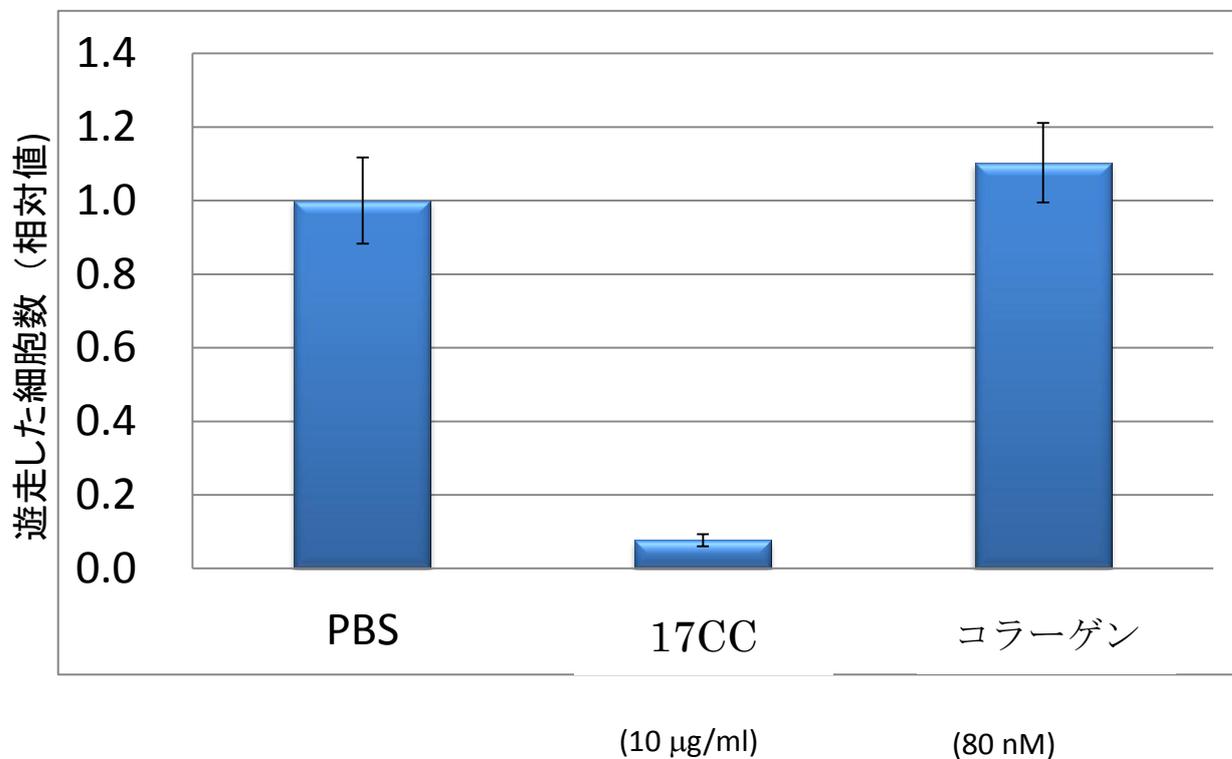


図 20. コラーゲンⅢの効果

U87-MG 細胞の遊走に対するコラーゲンⅢの効果を検討した。コラーゲンⅢは 80 nM、ポジティブコントロールに 17CC (10 µg/ml) を使用した。細胞遊走時に抗体とコラーゲンを加え 4 時間のちにチャンバーの下方に移動している細胞数をカウントし、PBS を作用した時を 1 とした時の相対値で示した。結果は 3 回の実験の平均と、エラーバーは標準偏差を示す。

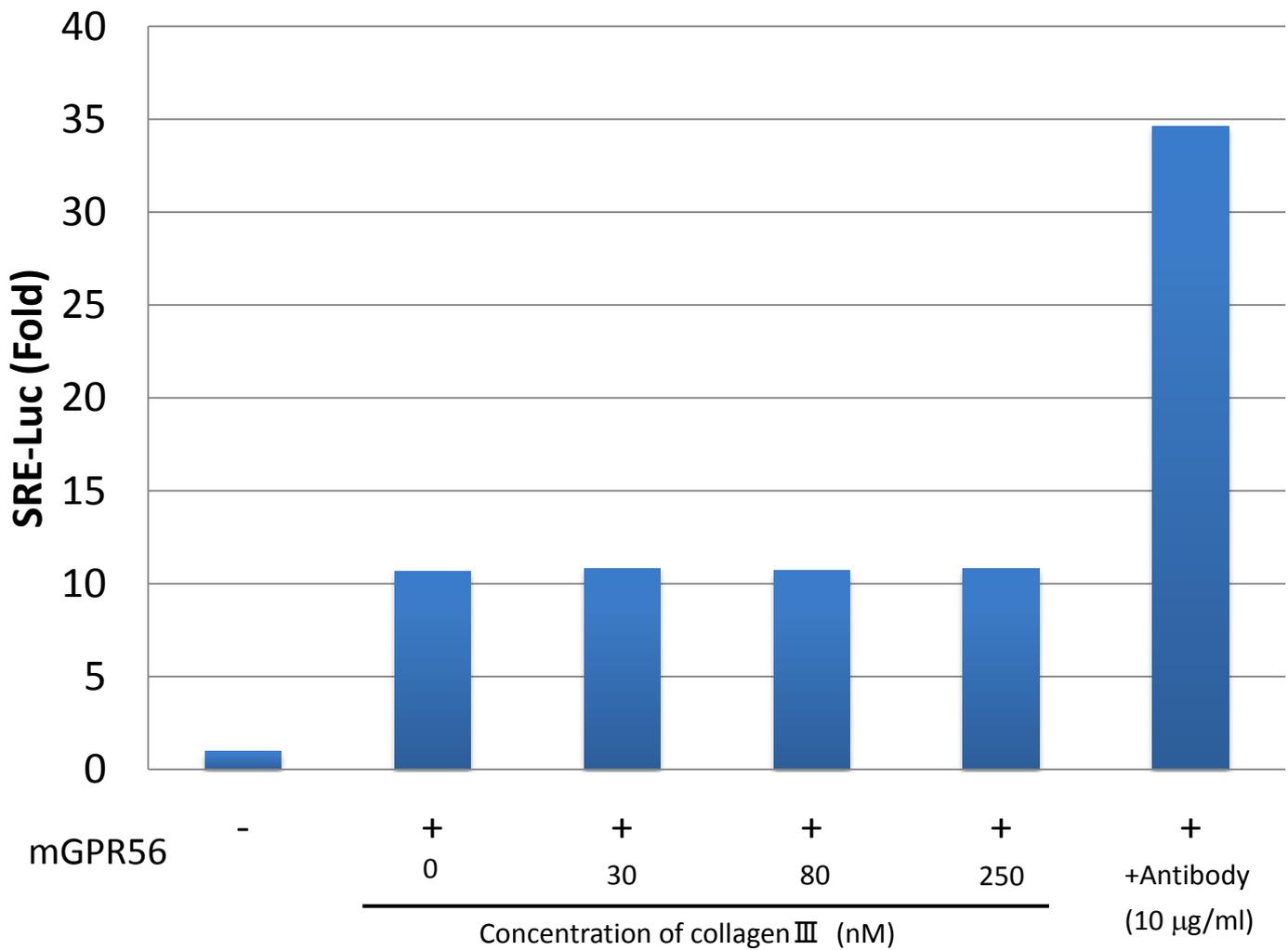


図 21. マウス GPR56 に対するコラーゲンの効果

HEK293T細胞にマウス GPR56 Wild Typeを発現させたのち、コラーゲン、およびマウス GPR56 細胞外ドメインに対するポリクローナル抗体の効果をも SRE ルシフェラーゼ活性を指標に比較検討した。コラーゲンは 30,80,250 nM で濃度依存性を調べた。値は、ベクターのみを導入した時を1とした相対値で示した。

m Δ 94-143 変異体

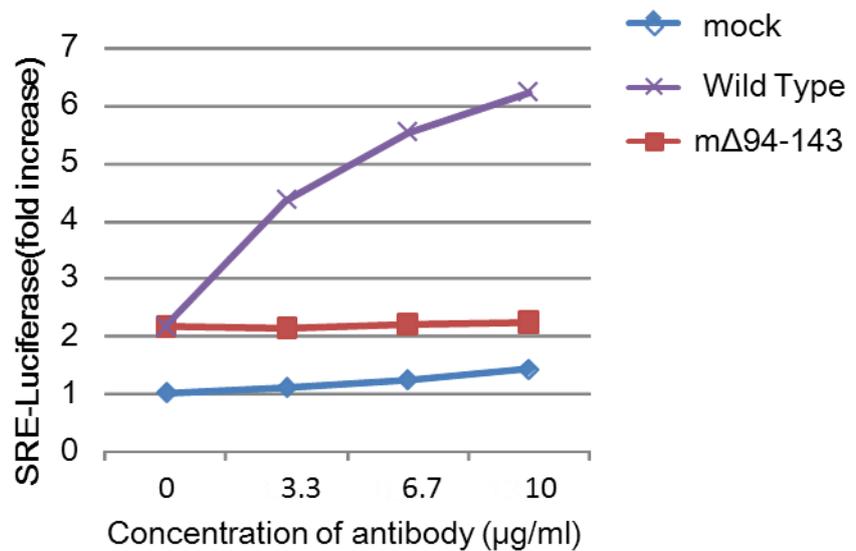
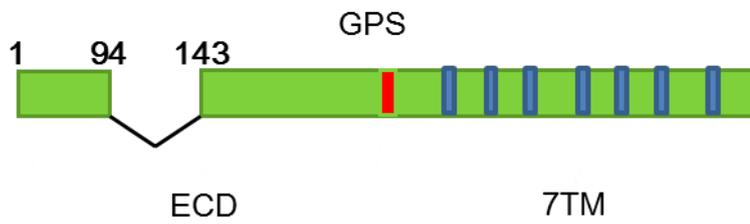


図 22. Δ 94-143 欠損変異体に対するポリクローナル抗体の作用

マウスの細胞外ドメインの 94-143 番目のアミノ酸を欠損させた変異体 (m Δ 94-143) および、マウス GPR56 Wild Type を HEK293T 細胞に過剰発現させたのち、ポリクローナル抗体を作用させて SRE ルシフェラーゼ活性を測定した。空ベクターのみを導入し、抗体処理を行っていないサンプルを 1 とした時の相対値で示す。

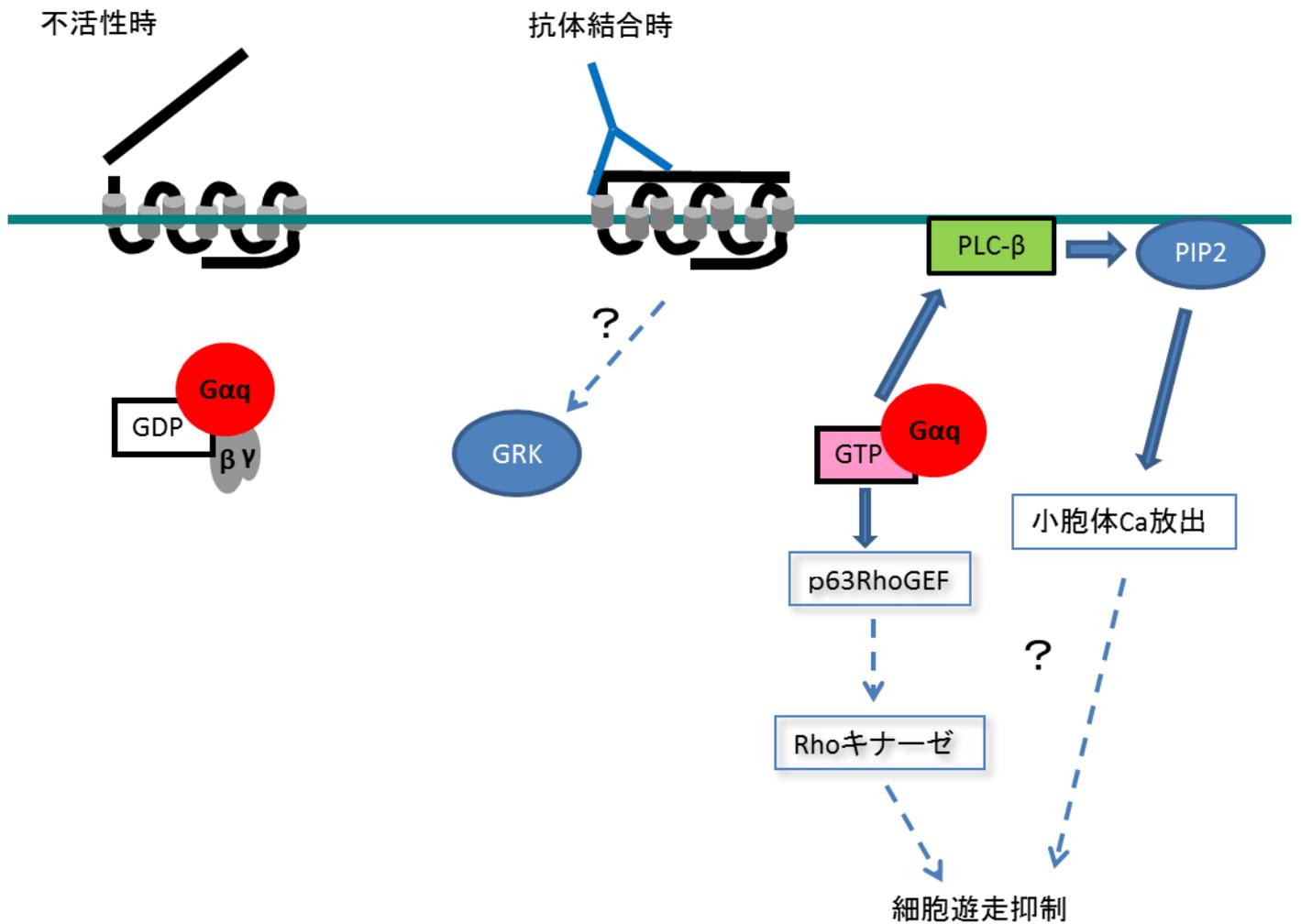


図 23. GPR56 活性化機構のモデル

GPR56 にリガンド様抗体が結合すると ECD と 7TM の親和性が高くなる。これにより、G_q の活性化が起こり、PLC-β から PIP2 の活性化を介して細胞内カルシウム応答が見られる。また、p63RhoGEF から、Rho、Rho キナーゼも活性化すると考えられ、これらの一連の活性化が U87-MG 細胞の遊走を抑制していると考えられる。カルシウム応答が細胞遊走に必須の応答であるかはまだ明らかになっていない。また、GPR56 の活性化に伴い G_q の活性化非依存的にエンドサイトーシスが引き起こされる。この経路は GPR56 が直接 GRK を介するアレクチン誘導をしているかもしれない。

4. GPR56 の点変異体を用いた細胞外ドメイン糖鎖修飾の役割の解析

4.1 背景

序論で示したとおり、GPR56 の細胞外ドメインには既知の機能ドメインはなく、糖鎖修飾サイトがいくつか存在する。糖鎖の役割はタンパク質の相互作用に関係しているという報告や、リガンド結。GPR56 と同じ Adhesion GPCR ファミリーに属する CD97 に関して、部位特異的な糖鎖修飾が GPS 切断に関与しているという報告がある (Hsiao C.C., *et al.*, 2009)。また大脳皮質形成不全 BFPP を引き起こす GPR56 の変異体では糖鎖修飾に異常をきたすことが報告されている (Piao, *et al.*, 2004, Chiang NY, *et al.*, 2011)。このことから、GPR56 においても糖鎖修飾は受容体の活性化に重要である合の親和性に関与する報告など様々であることが示唆されており、糖鎖と機能の関係を解明するため糖鎖修飾の点変異体と糖鎖修飾の阻害剤を用いて解析を行った。

4.2 結果

糖鎖修飾部位の点変異体の活性

GPR56 の糖鎖修飾予測サイトは 7 か所あり、すべて N 型の糖鎖修飾であることが示唆されている (図 24B)。そこで、まず、GPR56 を N 型糖鎖の切断酵素である PNGaseF で処理を行った。すると、バンドシフトが見られた (Fig.24A)。次に、それぞれのアスパラギンをアラニンに変えた変異体を作製した。これらの変異体を HEK293T 細胞に過剰発現させ、その発現をウエスタンブロットで検出し、またそれぞれの SRE レポーター活性を測定した (図 25A)。すると、一箇所の変異が機能に大きく影響することはなく、また発現も変わらなかった (図 25B)。次に、複数の糖鎖修飾部位に変異を入れた変異体を作成し解析を行った。1 から 3 番目の部位に変異を入れたもの (N1-3A) を Wild Type (WT) と比べると、活性に変化はなかった。一方、4-7 番目の部位に変異を入れたもの (N4-7A) は ECD の発現とレポーター活性が低下していた。また、ウエスタンブロットの結果 GPS で切断を受けないものが N1-3A、N4-7A で一部現れていた。1-7 番目すべての部位に変異を入れた変異体 (N1-7A) を作製し、同様の実験を行った。すると、SRE レポーター活性が大きく減り (図 26A)、GPS での切断が完全に阻害された (図 26B)。このことから、糖鎖修飾の成熟が GPS での切断に重要であることが示唆された。

変異体の細胞膜表面移行の検討

これらの変異体を HEK293T 細胞にリポフェクタミン法で過剰発現させ、フローサイトメトリーおよび、共焦点レーザー顕微鏡を用いて細胞膜表面移行が行われているかを検討した。フローサイトメトリーの結果 N1-3A, N4-7A を発現させたときは WT と同様に細胞膜表面への移行が見えるのに対し、N1-7A では細胞表面移行がみとめられなかった(図 27)。また、共焦点レーザー顕微鏡を用いた免疫染色では、N1-7 や GPS 切断サイトの変異体である C346S では、細胞表面での発現は見られず、細胞内でとどまっていることが観察された(図 28)。

変異体に対するポリクローナル抗体の効果の検討

糖鎖修飾がリガンドに対する親和性に対して、どのような影響を与えるかを検討するため、リガンド様に働くポリクローナル抗体を使用し検討を行った。HEK293T 細胞に各変異体を過剰発現させた後、ポリクローナル抗体を加えて SRE 転写活性をレポーターアッセイにより測定した。その結果、1-3 番目の糖鎖修飾部位を置換した変異体、および 4-7 番目の部位を置換した変異体の両方において、ポリクローナル抗体による増強作用が見られた(図 29)。

また、BFPP 患者でみられる変異体 (R38W, Y88C, C91S, C346S, R559W) を HEK293T 細胞に過剰発現させ、同様の検討を行った。これらの変異体は GPS の変異体である C346S を除き GPS での切断がみられ、発現も確認されたにもかかわらず、ポリクローナル抗体の作用が見られなくなった(図 30)。

糖鎖修飾阻害剤の効果

糖鎖修飾は複雑な過程で成熟することが知られている(図 31)。そこで、どの段階の糖鎖修飾が GPS 切断に影響を与えるかを検討するため、小胞体で働くグリコシダーゼ I の阻害剤である Castenospermine (Ca)、ゴルジで働くマンノシダーゼ II 阻害する Swainsonine (Sw)、糖タンパク質合成を阻害する Tunicamycin (Tn) を用いて検討を行った。Sw は 5 $\mu\text{g/ml}$ で、Ca は 10 $\mu\text{g/ml}$ で作用させた。すると、Tn では GPR56 のタンパク質発現そのものが阻害され、Sw、Ca を作用させると、WT と分子量が異なる位置に ECD のバンドがシフトした。また、それぞれの阻害剤を加えた時の SRE ルシフェラーゼ活性も測定した。その結果、Tn 処理したサンプルでは、SRE ルシフェラーゼ活性が Mock と同等になったのに対し、Sw や Ca を処理したものは大きな差は見られなかった(図 32)。

4.3 考察

Adhesion GPCR ファミリーの細胞外ドメインは高度に糖鎖修飾されていることが知られている。糖鎖修飾をはじめとする翻訳後修飾に関しては、近年様々な知見が得られ始めてきたが、糖鎖修飾の機能に関しては未だ未解明な部分が多い。BFPP の患者から見つかった変異体の解析は進んでいる。また、1章でも触れたが、コラーゲンⅢが **GPR56** に結合し、マウス神経幹細胞の細胞遊走を抑制的に働くことが示され、また変異体の機能不全に関しては、コラーゲンⅢとの結合がおこなわれなくなるからであるということが報告された (Luo R., 2011)。当初、BFPP の患者から見つかった細胞外ドメインの点変異体は、**GPR56** の膜移行が抑制されると報告されたが (Piao *et al.*, 2004)、後に膜移行するという報告もあり (Chiang NY, *et al.*, 2011) 局在に関しては不明な点が多い。また、BFPP 変異体すべてが **Wild Type** の **GPR56** に比べて、糖鎖修飾が異なっているということが報告されていた (Piao *et al.*, 2004; Luo R., *et al.*, 2011)。また、**GPR56** と同じ **Adhesion GPCR** ファミリーで、糖鎖修飾と **GPS** 切断の報告が示された **CD97** では、部位特異的な糖鎖修飾が **GPS** での切断に影響しているという報告がある (Hsiao C.C. *et al.* 2009)。そこで、**GPR56** においても部位特異的な糖鎖修飾が **GPCR** の機能、特にリガンド応答性と、膜表面移行に関してどのような関わりを持っているのかを解析するために実験を行った。

CD97 では、**GPS** までの細胞外ドメインに **Fc** タグを付加させ、**GPS** での切断という部分に関してのみ検討を行っており、シグナル伝達や、膜貫通領域を含めた解析は行っていなかった (Hsiao C.C. *et al.*, 2009)。今回は、膜貫通領域を含めたコンストラクトを用いて実験を行った。7箇所の一つのアスパラギンをアラニンに置換した変異体を過剰発現させたとき、そのすべての変異体が **GPS** で正常に切断され、**Wild Type** 同様に **SRE** ルシフェラーゼ活性を上昇させた。**CD97** の場合では5箇所の糖鎖修飾サイトのうち、453番目のアスパラギンに変異を導入したもののみで、**GPS** 切断が行われなくなったのに対して、**GPR56** では **CD97** で見られたような部位特異的な糖鎖が **GPS** 切断過程に影響を及ぼしていることはなかった。そこで、2箇所、3箇所、4箇所、そして7箇所すべての部位に変異を導入した変異体を用いて、解析を行った。前半3箇所、後半4箇所に変異を導入した変異体は **Wild Type** 同様に **SRE** ルシフェラーゼ活性を上昇させ、さらに、アゴニスト様の作用がある抗体を添加したところ、**Wild Type** 同様に **SRE** ルシフェラーゼ活性の亢進が見られた。このことから、**CD97** とは異なり、部位特異的にリガンド応答に関与している糖鎖はないということがわかった。また、Piao らがコラーゲンⅢは BFPP 変異体とは結合できないということを報告している。今回、BFPP 変異体を過剰発現させたとき、**Wild Type** はアゴニスト様ポリクローナル抗体による **SRE** 増強の作用があるのに対

し、すべての変異体では見られなかった (図 30)。このことから抗体による活性化は内在性リガンドによる活性化と同じような機構で働いている可能性を示唆している。

これらの変異体のウェスタンブロットの結果から、糖鎖修飾部位の変異の数に従い、GPS での切断される量が減ることが観察された。一方、C346S 変異体は GPS の部分に変異あり、GPS での切断が起こらないことが分かっている。最終的に 7箇所すべてに変異を導入した変異体 N1-7A では C346S 変異体と同様、完全に切断が起こらなくなっている。また、免疫染色やフローサイトメトリーを用いた実験からも、N1-7A 変異体は細膜表面へ移行しないことが確認できた。このことは、C346S 変異体で報告されていた GPS での切断を受けないと細胞膜表面へ移行しないという報告と一致している (Krasnoperov V., *et al.*, 2002)。さらにこの実験の結果から、GPR56 は翻訳後、糖鎖の修飾の過程を経て、GPS での切断を受け、細胞膜表面への移行することが明らかとなった。

今回の結果は、先の CD97 の例とは異なり、GPR56 に関しては部位特異的な糖鎖が機能に影響することはなかった。しかし、糖鎖が GPS での切断の過程に関わっているということは共通している。このことから、糖鎖修飾は一種のタンパク質の品質管理に関わっていることが示唆された。まだ Adhesion GPCR ファミリーにおいて共通のメカニズムで品質管理を受けているということはないが、今回の知見が Adhesion GPCR ファミリーの活性化メカニズム解明に関して貢献していると考えている。

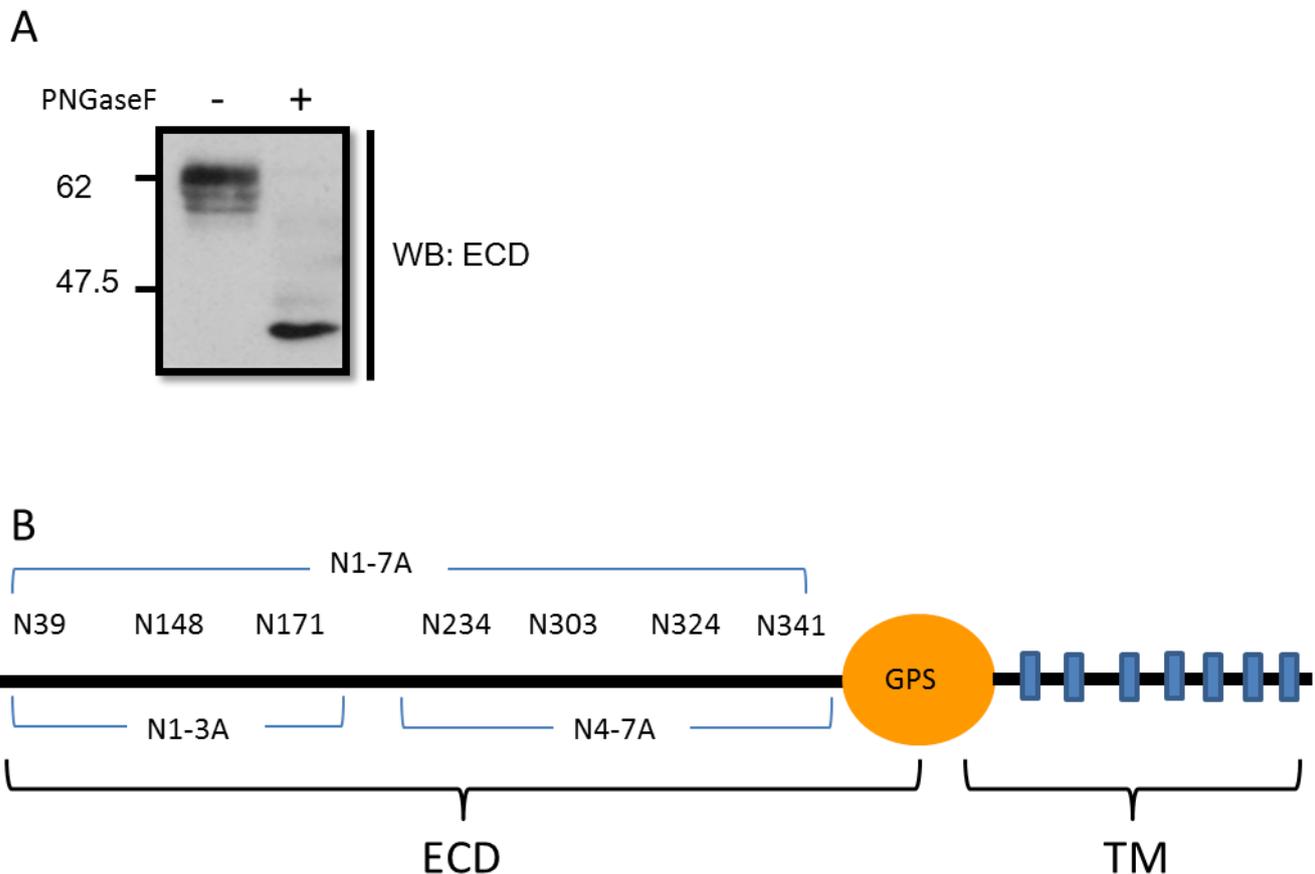


図 24.

A) N型糖鎖分解酵素 PNGaseF の作用。HEK293T 細胞にマウス GPR56Wild Type を過剰発現させた後、Cell Lysate を調製し、PNGaseF を 1%NP40 存在下で 37°C、1 時間作用させた。

B) GPR56 細胞ドメインに存在すると予測される糖鎖修飾サイト。すべて N 型糖鎖修飾で、最初の 3 箇所をアラニンに変異させたものを N1-3A、あとの 4 箇所をアラニンに変異させたものを N4-7A、すべてをアラニンに変異させたものを N1-7A と今後表記する。

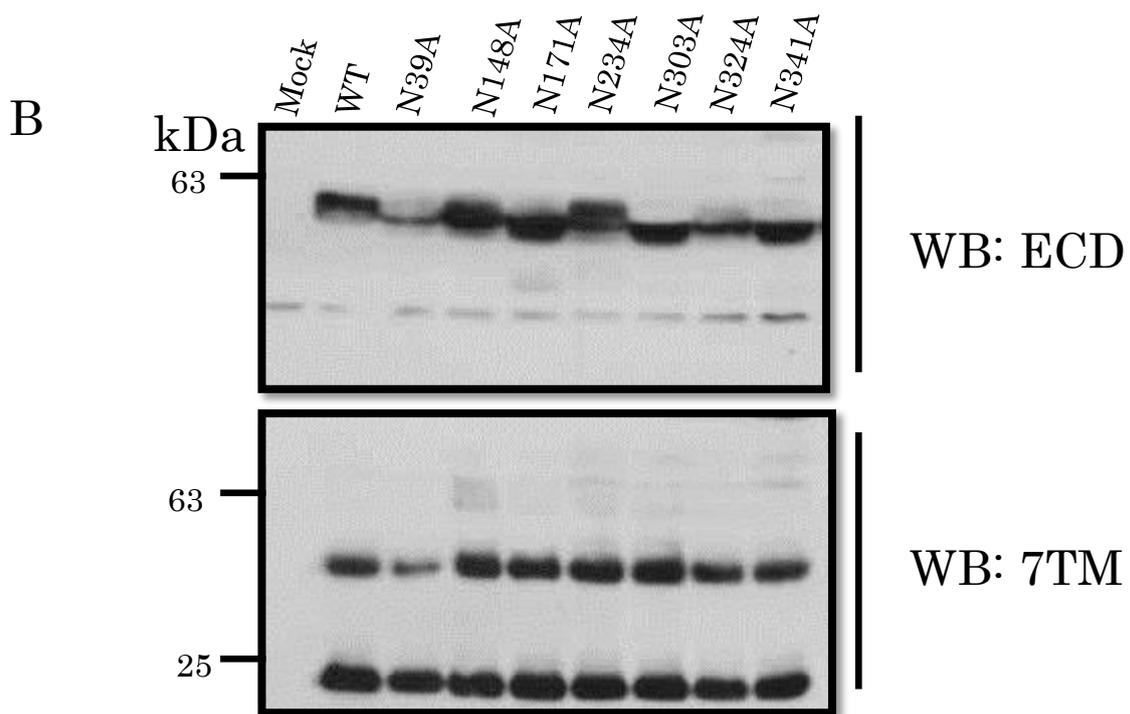
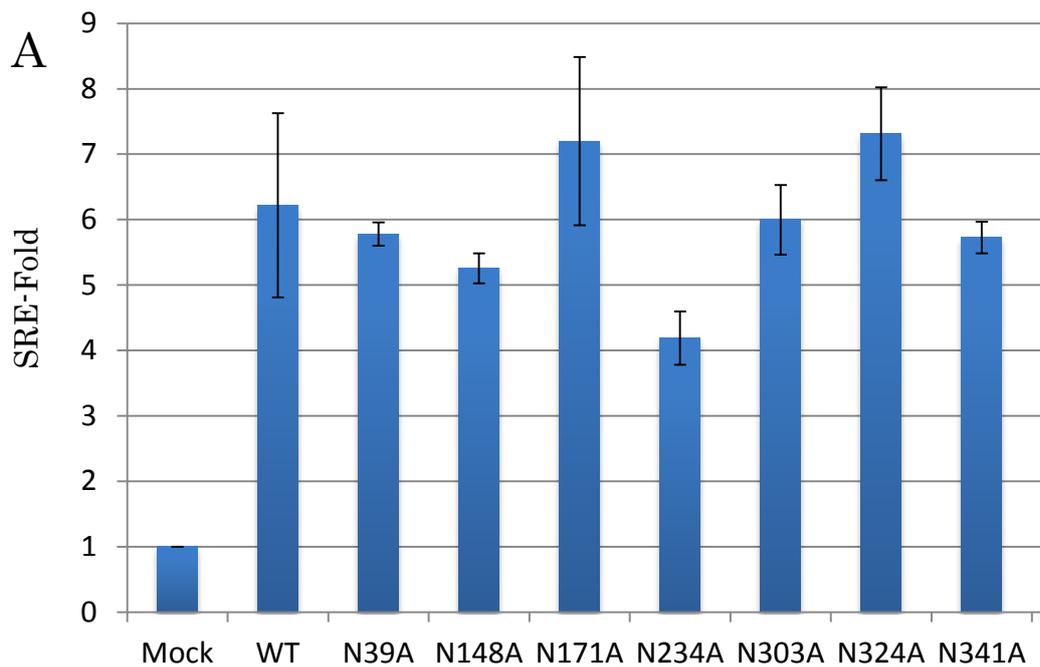


図 25. 糖鎖修飾部位変異体の機能と発現

A) 各糖鎖修飾部位をアラニンに置換した変異体を HEK293T 細胞に過剰発現させ、SRE ルシフェラーゼの活性を測定した。4 回の平均をとり、標準偏差をエラーバーとした。

B) 各コンストラクトの発現をウェスタンブロットにより検出した。検出には細胞外ドメイン (ECD) と 7 回膜貫通領域 (7 TM) に対する抗体によって検出した。

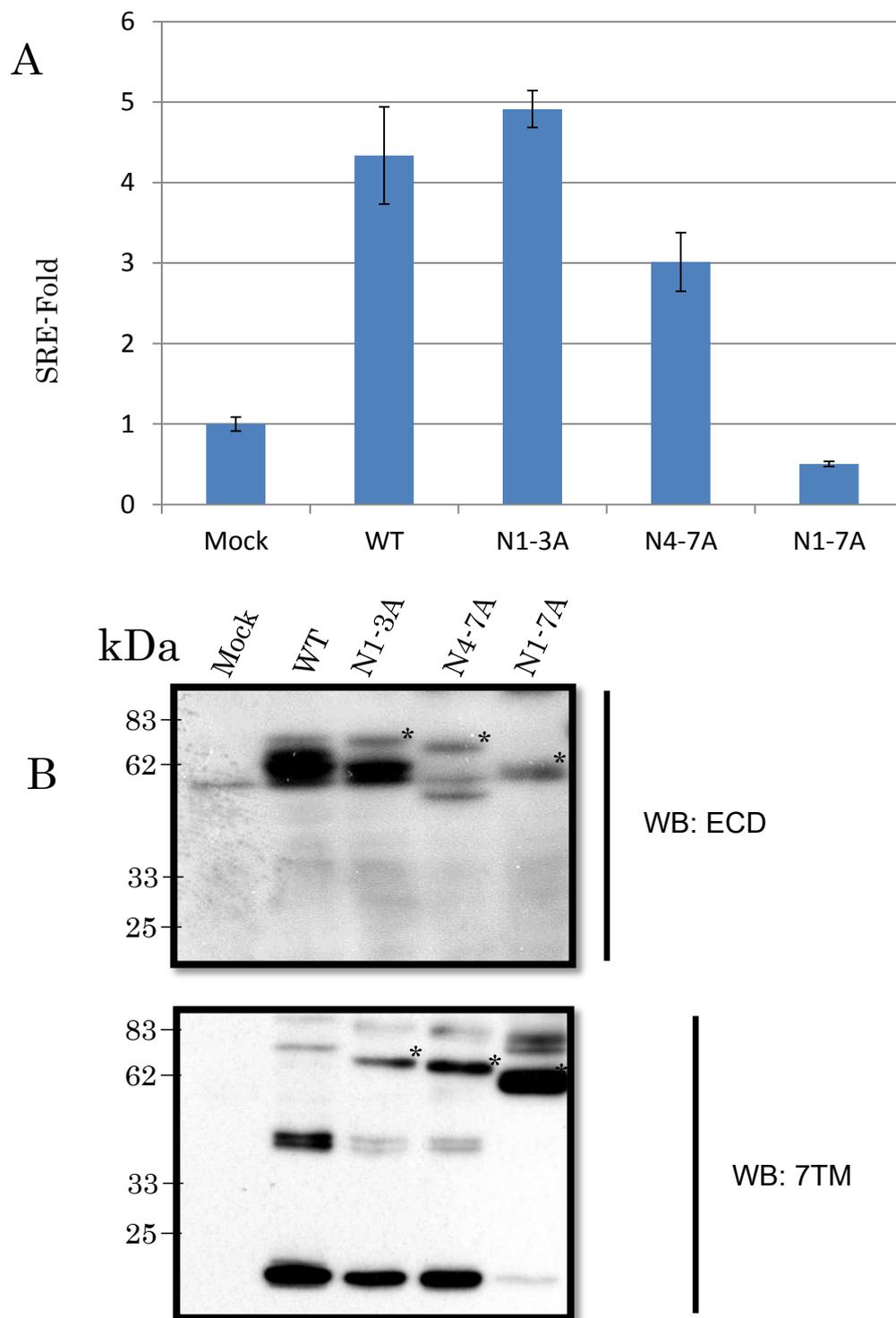


図 26. 糖鎖修飾部位変異体の SRE ルシフェラーゼ活性とそのタンパク質発現

- A) HEK293T 細胞に Wild Type および各変異体を過剰発現させた時の SRE ルシフェラーゼ活性を測定した。4 回の平均値をとり、エラーバーは標準偏差を示した。
- B) その時の各サンプルの発現をウエスタンブロットにより検出した。検出は ECD、7 TM に対する抗体で行った。アスタリスク*は FL は GPS における切断を受けていない全長のバンドを示す。

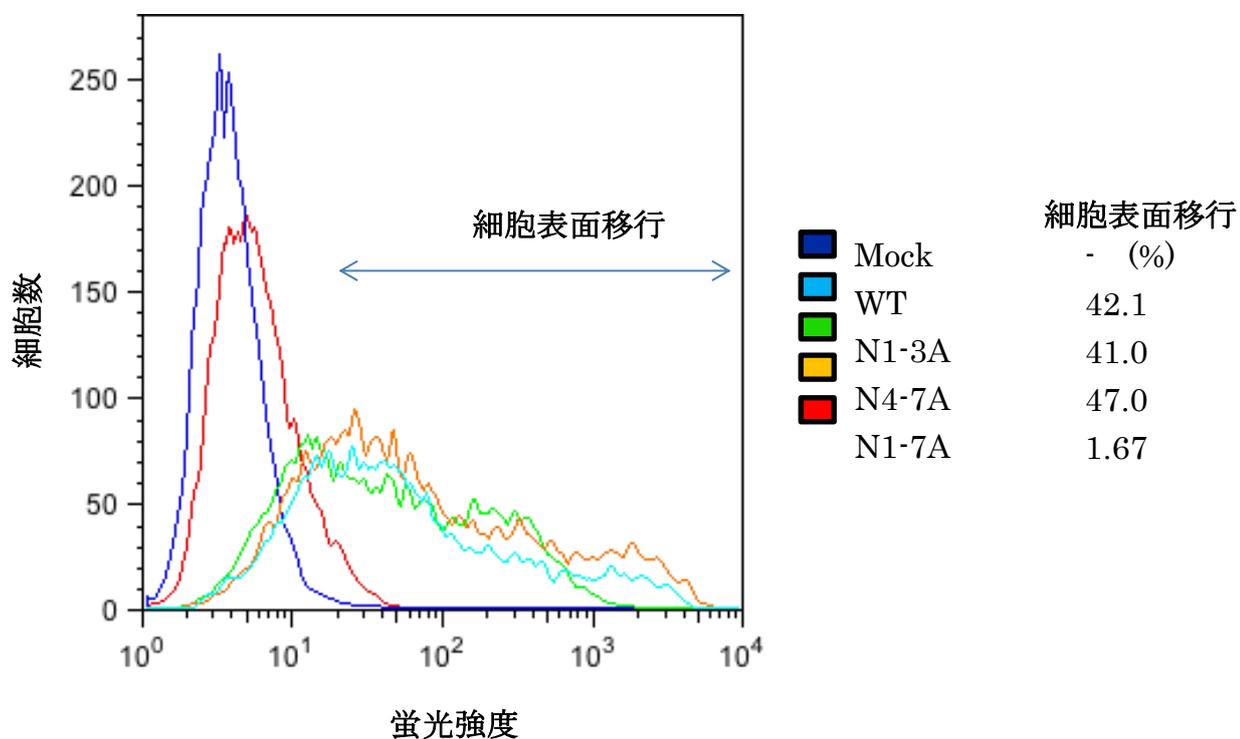


図 27. フローサイトメトリーによる糖鎖修飾部位変異体の細胞膜表面移行の解析。
 HEK293T 細胞に各コンストラクトを発現させたのち、4℃の条件下で、ECD の抗体を
 一次抗体として使用した。Mock のピークに対して、蛍光強度の上昇した細胞の割合を
 測定し、%で表した。

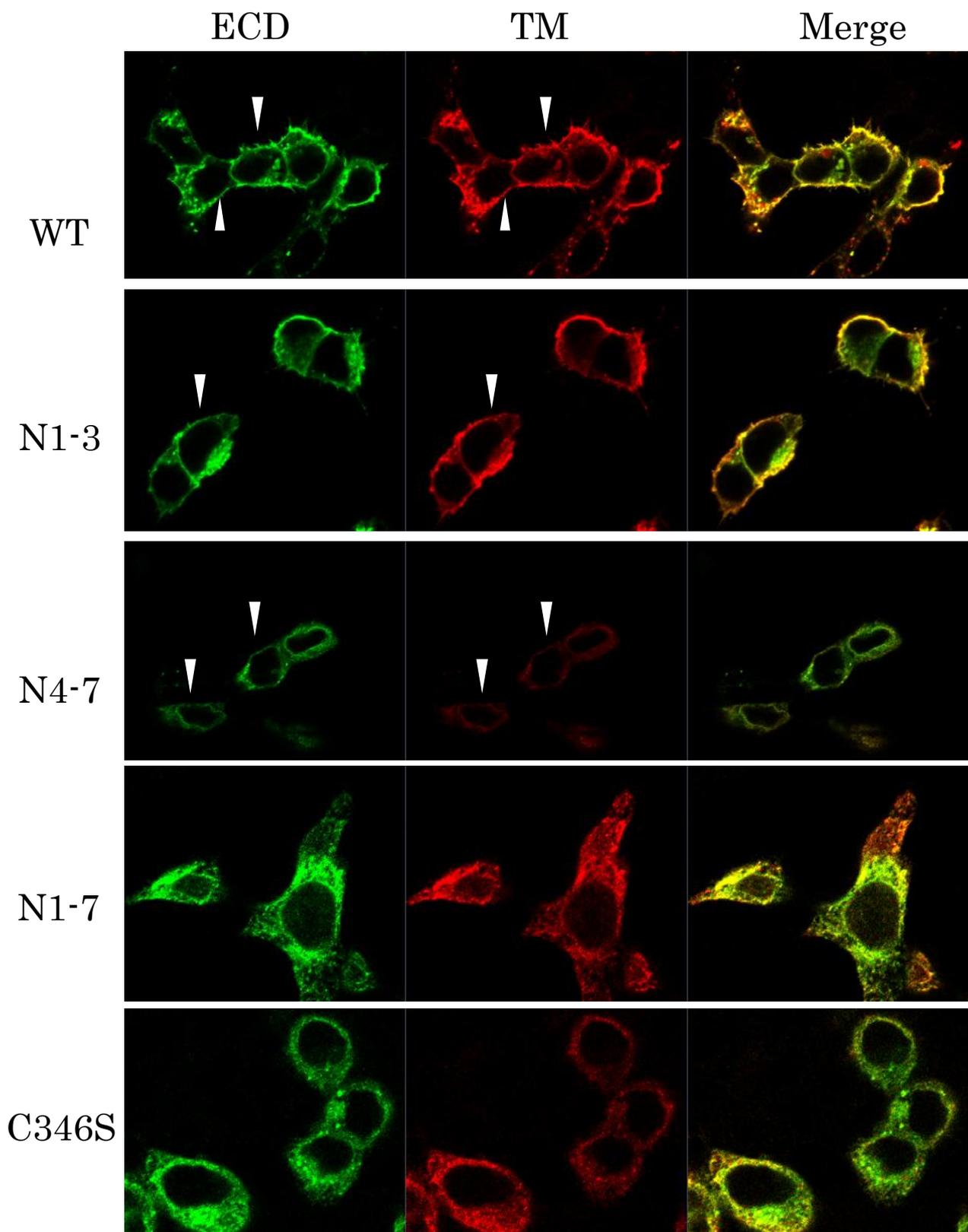


図 28. 免疫染色による糖鎖修飾部位変異体の細胞膜表面移行の解析
 共焦点レーザー顕微鏡による WildType (WT) および各変異体の細胞膜表面への移行の観察。
 HEK 2 9 3 T 細胞に各コンストラクトを過剰発現させた後、固定後、膜透過処理を行った。
 白矢頭は細胞膜表面に局在する GPR56 の ECD あるいは TM を示す。

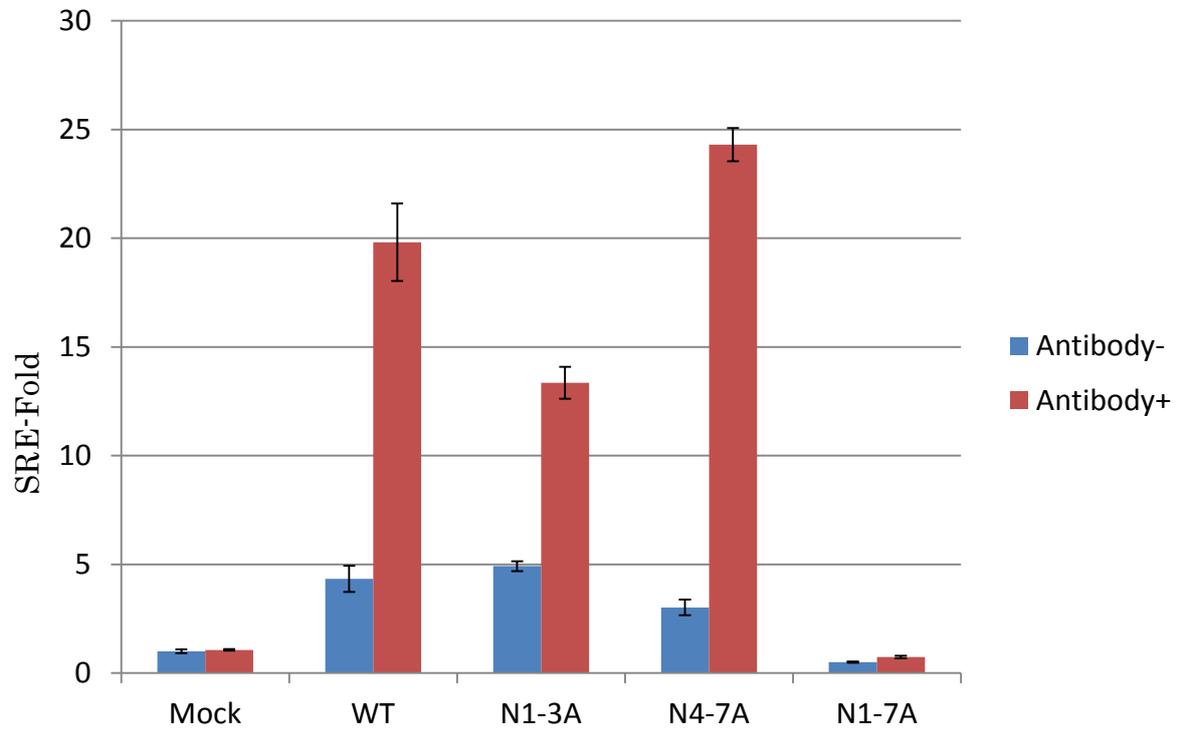


図 29. 糖鎖修飾部位変異体に対するリガンド様抗体の効果

HEK293T 細胞に Wild Type および各変異体を過剰発現させ、抗体(10 μ g/ml)で作用させた時の SRE ルシフェラーゼ活性を測定した。4回の実験の平均値で示し、エラーバーは標準偏差を示す。

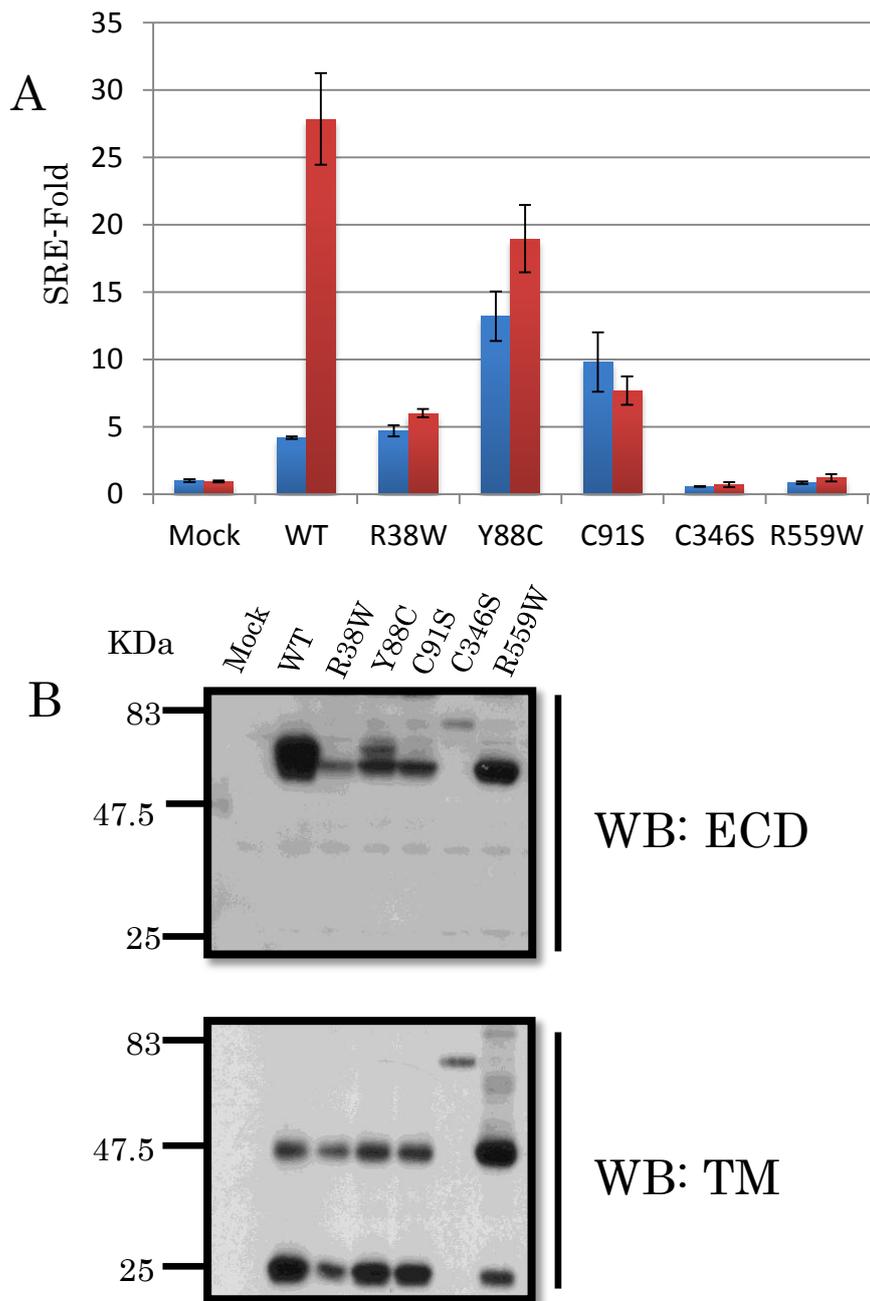
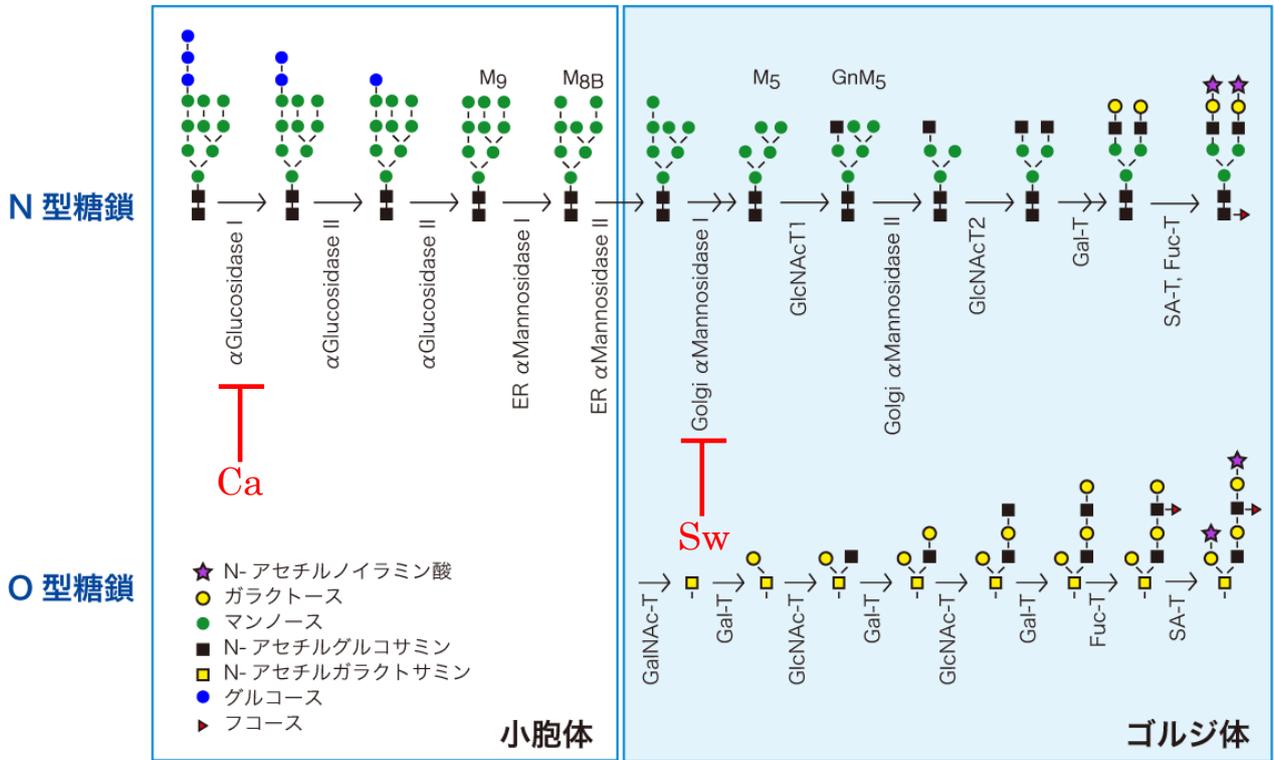


図 30. BFPP 疾患を引き起こす変異体の過剰発現と、アゴニスト様抗体の作用

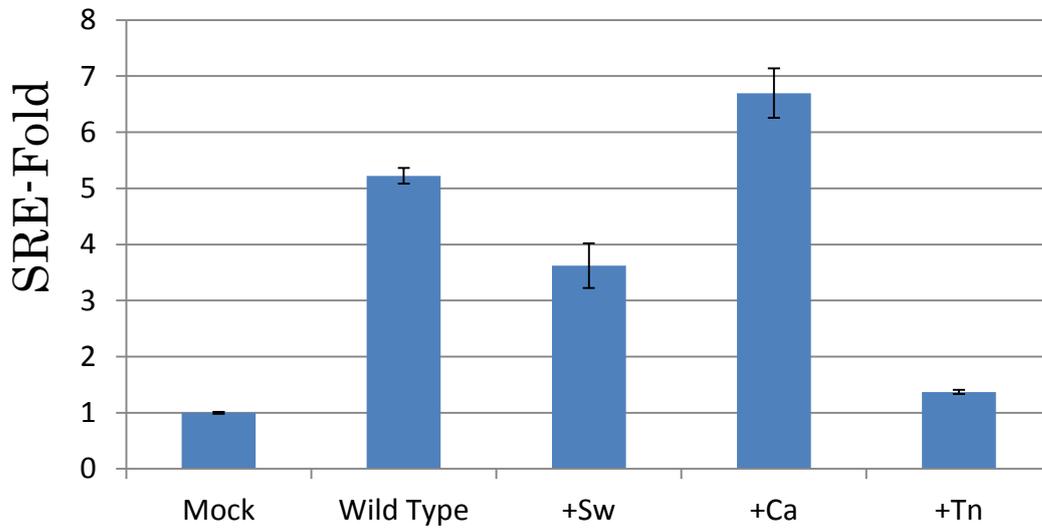
- A) HEK293T 細胞に各コンストラクトを過剰発現させ、アゴニスト様抗体を 10 $\mu\text{g/ml}$ で作用させた後、SRE ルシフェラーゼの活性を測定した。4 回の実験の平均値で示し、エラーバーは標準偏差を示す。
- B) 各コンストラクトの発現をウェスタンブロットにより検出した。検出には、細胞外ドメイン (ECD) と 7 回膜貫通領域 (TM) の抗体を使用した。



© JCGGDB & AIST

図 31. 糖鎖修飾の成熟過程と阻害剤の作用点を示す
 Castenospermine (Ca)は小胞体で働くグリコシダーゼ I の阻害し、
 Swainsonine (Sw) はゴルジで働くマンノシダーゼ II 阻害。

A



B

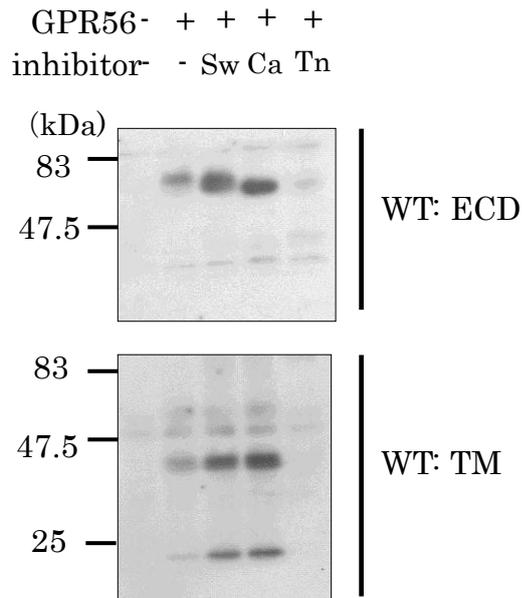


図 32. 糖鎖修飾阻害剤の検討

- A) HEK293T 細胞に Wild Type を過剰発現させ、Caspermine (Ca)、Swainsonine (Sw)、Tunicamisin (Tn) を添加した時の SRE ルシフェラーゼ活性を測定した。Swainsonine は 5 μ g/ml で、Caspermine は 10 μ g/ml、Tunicamisin は 100ng/ml で作用させた。
- B) この時のそれぞれの GPR56 のタンパク質を細胞外ドメイン (ECD) と膜貫通領域 (TM) の両方の抗体で検出した。

サンプル	細胞膜表面移行 (%)	SREレポーター活性	抗体応答性
Wild Type	42.1	↑	○
N39A	47.1	↑	ND
N148A	41.0	↑	ND
N171A	49.7	↑	Dn
N234A	47.3	↑	DN
N303A	56.6	↑	DN
N324A	53.3	↑	DN
N341A	49.5	↑	DN
N1-3A	31.8	↑	○
N4-7A	46.4	↑	○
N1-7A	1.7	×	×
C346S	4.0	×	×

表 2 変異体のフローサイトメトリー、レポーターアッセイの結果をまとめた
ND: not determind

参考文献

- Abdalla S, Lother H, el Massiery A, Quitterer U. Increased AT₁ receptor heterodimers in preeclampsia mediate enhanced angiotensin II responsiveness. *Nature Medicine*, 7:1003 – 1009, (2001)
- Abe J., Fukuzawa T., and Hirose S. Cleavage of Ig-Hepta at a “SER” module and at a conserved G protein-coupled receptor proteolytic site. *J. Biol. Chem.*, 277: 23391-23398, (2002)
- Bjarnadottir T. K., Fredriksson R., Hoglund, P. J., Gloriam, D. E., Lagerstrom M. C., and Schioth H. B. The human and mouse repertoire of the adhesion family of G-protein-coupled receptors. *Genomics*, 84:23-33, (2004)
- Chiang NY, Hsiao CC, Huang YS, Chen HY, Hsieh IJ, Chang GW, Lin HH. Disease-associated GPR56 mutations cause bilateral frontoparietal polymicrogyria via multiple mechanisms. *J Biol Chem*. 286:14215-25 (2011)
- Chung S., Funakoshi T., and Civelli O. Orphan GPCR research. *Br. J. Pharmacol.*, 153:339-346, (2008)
- Collins S., Caron M. G., and Lefkowitz R. J. From ligand binding to gene expression : new insights into the regulation of G protein-coupled receptors. *Trends Biochem. Sci.*, 17:37-39, (1992)
- Fredriksson R, Lagerström MC, Lundin LG, and Schiöth HB. The G-Protein-Coupled Receptors in the Human Genome Form Five Main Families. Phylogenetic Analysis, Paralogon Groups, and Fingerprints. *Mol Pharmacol.*, 63:1256–1272, (2003)
- Gray JX., Haino M., Roth M. J., Maguire J. E., Jensen P. N., Yarme A., Stetler-Stevenson M. A., Siebenlist U., and Kelly K. CD97 is a processed, seven-transmembrane, heterodimeric receptor associated with inflammation. *J. Immunol.*, 157: 5438-5447, (1996)

- Hatzimichael E., Lo Nigro C., Lattanzio L., Syed N., Shah R., Dasoula A., Janczar K., Vivenza D., Monteverde M., Merlano M., Papoudou-Bai A., Bai M., Schmid P., Stebbing J., Bower M., Dyer MJ., Karran LE., ElguetaKarstegl C., Farrell PJ., Thompson A., Briasoulis E., and Crook T. The collagen prolyl hydroxylases are novel transcriptionally silenced genes in lymphoma. *Br. J. Cancer.* 107:1423-1432, (2012)
- Horinouchi, T., Nishimoto, A., Nishiya, T., Lu, L., Kajita, E., and Miwa, S. Endothelin-1 decreases $[Ca^{2+}]_i$ via Na^+/Ca^{2+} exchanger in CHO cells stably expressing endothelin ETA receptor. *Eur. J. Pharmacol.*, 566:28-33, (2007).
- Hsiao C.C., Cheng K. F., Chen H. Y., Chou Y. H., Stacey M., Chang G. W., and Lin H.H. Site-specific N-glycosylation regulates the GPS auto-proteolysis of CD97. *FEBS Lett.*, 583:3285-3290, (2009)
- Huang, Y., Fan, J., Yang, J., and Zhu, G. Z. Characterization of GPR56 protein and its suppressed expression in human pancreatic cancer cell. *Mol. Cell. Biochem.*, 308:133-139, (2008)
- Iguchi, T., Sakata, K., Yoshizaki, K., Tago, K., Mizuno, N., and Itoh, H. Orphan G protein-coupled receptor GPR56 regulates neural progenitor cell migration via a G alpha 12/13 and Rho pathway. *J. Biol. Chem.* 283: 14469-14478, (2008)
- Jeong S. J., Li S., Luo R., Strokes N., Piao X. Loss of Col3a1, the gene for Ehlers-Danlos syndrome type IV, results in neocortical dyslamination. *PLoS One.* 7:e29767 (2012)
- Jin Z., Luo R., and Piao X. GPR56 and its related diseases. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.*, 89:1-13, (2009)
- Jin Z., Tietjen I., Bu L., Liu-Yesucevitz L., Gaur S.K., Walsh C.A., and Piao X. Disease-associated mutations affect GPR56 protein trafficking and cell surface expression. *Hum. Mol. Genet.*, 16:1972-1985 (2007)

- Jin Z., Tietjen I., Bu L., Liu-Yesucevitz L., Gaur, S. K., Walsh, C. A., and Piao, X. Disease-associated mutations affect GPR56 protein trafficking and cell surface expression. *Hum. Mol. Genet.*, 16:1972-1985, (2007)
- Ke N., Sundaram R., Liu G., Chionis J., Fan W., Rogers C., Awad T., Grifman M., Yu D., Wong-Staal F., and Li Q.X.; Orphan G protein-coupled receptor GPR56 plays a role in cell transformation and tumorigenesis involving the cell adhesion pathway. *Mol Cancer Ther.* 6:1840-1850, (2007)
- Kim JE, Han JM, Park CR, Shin KJ, Ahn C, Seong JY, Hwang JI. Splicing variants of the orphan G-protein-coupled receptor GPR56 regulate the activity of transcription factors associated with tumorigenesis. *J Cancer Res Clin Oncol.* (2010)
- Klabunde T. and Hessler G. Drug design strategies for targeting G-protein-coupled receptors. *ChemBiochem.*, 3:928-944, (2002).
- Krasnoperov V., Lu Y., Buryanovsky L., Neubert T.A., Ichtchenko K., and Petrenko A.G. Post-translational proteolytic processing of the calcium-independent receptor of alpha-latrotoxin (CIRL), a natural chimera of the cell adhesion protein and the G protein-coupled receptor. Role of the G protein-coupled receptor proteolysis site (GPS) motif. *J. Biol. Chem.* 277:46518-46526, (2002)
- Krasnoperov V.G., Bittner M.A., Beavis R., et al. Alpha-latrotoxin stimulates exocytosis by the interaction with a neuronal G-protein-coupled receptor. *Neuron*, 18:925-937, (1997)
- Lebesgue D., Wallukat G., Mijares A., Granier C., Argibay J., and Hoebcke J. An agonist-like monoclonal antibody against the human B2-adrenoceptor. *Eur J Pharmacol.*, 348:123-133, (1998)
- Lin H.H., Stacey M., Yona S., and Chang G.W. GPS proteolytic cleavage of adhesion-GPCRs. *Adv Exp Med Biol.*, 706:49-58, (2010)

- Little K.D., Hemler M.E., and Stipp C.S. Dynamic regulation of a GPCR-tetraspanin-G protein complex on intact cells: central role of CD81 in facilitating GPR56-Gαq/11 association. *Mol. Biol. Cell*, 15:2375-2387, (2004)
- Luo R., Jeong S.J., Jin Z., Strokes N., Li S., and Piao X. G protein-coupled receptor 56 and collagen III, a receptor-ligand pair, regulates cortical development and lamination. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 108:12925-12930, (2011)
- Lutz S., Freichel-Blomquist A., Yang Y., Rumenapp U., Jakobs K.H., Schmidt M., and Wieland T. The guanine nucleotide exchange factor p63RhoGEF, a specific link between Gq/11 coupled receptor signaling and RhoA. *J. Biol. Chem.* 280: 11134–11139, (2005)
- Medei E.H., Nascimento J.H., Pedrosa R.C., and Carvalho A.C. Role of autoantibodies in the physiopathology of Chagas' disease. *Arq. Bras. Cardiol.*, 91:257-262, 281-286, (2008)
- Paavola K.J., Stephenson J.R., Ritter S.L., Alter S.P., and Hall R.A. The N terminus of the adhesion G protein-coupled receptor GPR56 controls receptor signaling activity. *J. Biol. Chem.*, 286:28914-28921, (2011)
- Panetta R. and Greenwood M.T. Physiological relevance of GPCR oligomerization and its impact on drug discovery. *Drug Discov Today*, 13:1059-1066, (2008);
- Piao X., Hill R.S., Bodell A., Chang B.S., Basel-Vanagaite L., Strausberg R., Dobyans W.B., Qasrawi B., Winter R.M., Innes A.M., Voit T., Ross M.E., Michaud J.L., Descarie J.C., Barkovich A.J., and Walsh C.A., G protein-coupled receptor-dependent development of human frontal cortex. *Science*, 303:2033-2036, (2004)
- Pitcher J.A., Freedman N.J., and Lefkowitz R.J. G protein-coupled receptor kinases. *Annu. Rev. Biochem.*, 67:653-692, (1998)

- Rasmussen S.G., DeVree B.T., Zou Y., Kruse A.C., Chung K.Y., Kobilka T.S., Thian F.S., Chae P.S., Pardon E., Calinski D., Mathiesen J.M., Shah S.T., Lyons J.A., Caffrey M., Gellman S.H., Steyaert J., Skiniotis G., Weis W.I., Sunahara R.K., and Kobilka B.K. Crystal structure of the β_2 adrenergic receptor-Gs protein complex. *Nature*, **477:549-555**, (2011)
- Schott M, Scherbaum WA, Morgenthaler NG,. Thyrotropin receptor autoantibodies in Graves' disease. *Trends Endocrinol Metab.* **16:243-248**, (2005)
- Shashidhar S., Lorente G., Nagavarapu U., Nelson A., Kuo J., Cummins J., Nikolich K., Urfer R., and Foehr E.D. GPR56 is a GPCR that is overexpressed in gliomas and functions in tumor cell adhesion. *Oncogene*, **24: 1673–1682**, (2005)
- Simon M.I., Strathmann M.P., Gautam N. Diversity of G proteins in signal transduction. *Science*, **252: 802–808**, (1991)
- Smith B.R., Sanders J., and Furmaniak J. TSH receptor antibodies. *Thyroid.*, **17:923-938**, (2007)
- Tam B. M. and Moritz O. L. The Role of Rhodopsin Glycosylation in Protein Folding, Trafficking, and Light-Sensitive Retinal Degeneration *J. Neurosci.*, **29: 15145-15154**, (2009)
- Tang X.L., Wang Y., Li D.L., Luo J., Liu M.Y. Orphan G protein-coupled receptors (GPCRs) biological functions and potential drug targets. *Acta Pharmacol Sin.*, **33:363-371**, (2012)
- Volynski K.E., Silva J.P., Lelianova V.G., Atiqur R.M., Hopkins C., and Ushkaryov Y.A. Latrophilin fragments behave as independent proteins that associate and signal on binding of LTX ^{N4C}. *EMBO J.*, **23:4423-4433**, (2004)
- Xu L. and Hynes R.O. GPR56 and TG2: possible roles in suppression of tumor growth by the microenvironment. *Cell Cycle*, **15:6**, (2007)

- Xu L., Begum S., Hearn J. D., and Hynes R.O. GPR56, an atypical G protein-coupled receptor, binds tissue transglutaminase, TG2, and inhibits melanoma tumor growth and metastasis. *PNAS*, 10: 9023–9028, (2006)
- Yona S, Lin HH, Siu WO, Gordon S, Stacey M. Adhesion-GPCRs: emerging roles for novel receptors *Trends Biochem Sci.* 33: 491–500, (2008)
- Yonehara S., Ishii A., Yonehara M. A cell-killing monoclonal antibody (anti-Fas) to a cell surface antigen co-downregulated with the receptor of tumor necrosis factor. *J. Exp. Med.* 169:1747-1756. (1989)
- 岩崎剛 本学修士論文 (2009)
- 小林佑樹 本学修士論文 (2010)
- 坂口さや香 本学修士論文 (2008)
- 田中智之 マスト細胞の分化に伴う機能制御 *生化学*, 82(11):1021-1031, (2010)
- 芳賀 達也 G タンパク質共役受容体キナーゼ (GRK) , *Folia Pharmacol. Jpn.*, 136:215-218, (2010)

謝辞

本論文は筆者が、奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科メディカル生物学専攻。分子情報薬理学研究室在籍中の研究成果をまとめたものである。

同研究室の伊東広教授には指導教官として、5年間の長い期間にわたり、多大な迷惑をおかけしながらも、厳しく指導いただきました。深く感謝申し上げます。

また、副査として5年間ものあいだ助言いただいた塩坂貞夫教授、川市正史教授にもあつく感謝申し上げます。

同研究室では、水野憲一助教、小林哲夫助教、多胡憲治助教（現自治医科大学講師）には、研究のこと、生活のことを支えていただいたことに感謝致します。

多くの先輩、同級生、後輩には研究はもちろん、時には心を支えていただいたことを感謝致します。

最後に、研究に理解があり、生活を支えてくれた両親に感謝致します。