

## 104. 生体リズムを基盤とした時間医薬科学の展開

土居 雅夫

京都大学 大学院薬学研究科 医薬創成情報科学専攻 システムバイオロジー分野

Key words : 体内時計, オーフアン G タンパク質共役受容体, 視交叉上核, *N* 型糖鎖修飾, 一塩基遺伝子多型

### 緒 言

生体リズムの異常で生じる睡眠障害やその他の病気を根本的に是正するためには、体内時計の最高位中枢器官である脳内の視交叉上核 (SCN) を標的とした創薬科学が重要である [1, 2]。私共は今回、この中枢時計の計時機能を制御する G タンパク質共役型受容体 (GPCR) についての研究成果を報告する [2, 3]。10 万人規模のゲノムワイド相関解析の中で *N* 型糖鎖修飾酵素 ALG10B の一塩基多型 (SNP) がヒトの朝型/夜型クロノタイプと有意な相関があることが報告され [4]、*N* 型糖鎖修飾の役割が注目される中、今回、私共は SCN に発現するオーフアン受容体 Gpr176 が *N* 型糖鎖修飾を受けることを見出した [3]。この受容体は 2016 年に私共が SCN において発現を見出したオーフアン受容体であり、ノックアウトマウスの解析からサーカディアンリズムの周期長調節への関与が認められるため、その生化学的特性の理解が待たれていた [5]。本研究では Gpr176 の *N* 型糖鎖修飾の役割を明らかにするとともに、ヒトの GPR176 *N* 型糖鎖修飾に影響を与える SNP の存在についても報告する [2, 3]。

### 方 法

Gpr176 欠損マウスは (Acc. No. CDB0672K : <http://www.cdb.riken.jp/arg/mutant%20mice%20list.html>) は RIKEN CDB (Kobe, Japan) において作製し使用した [5]。Gpr176 タンパク質の検出は視床下部 SCN あるいはヒト Flp-In TREx293 細胞 (Thermo Fisher Scientific) より抽出した細胞膜画分を *N* 型糖鎖消化酵素 PNGase F もしくは *O*-glycosidase (どちらも New England BioLabs) により処理した後 Gpr176 抗体 [5] を用いたウェスタンブロットにより行った。Gpr176 の細胞内局在は GFP タグを用いた蛍光顕微観察により行った。小胞体の位置は ER-Tracker Red (Thermo Fisher Scientific) を用いた染色により可視化した。プロテアソーム阻害薬には MG132 (Sigma) を用いた。細胞内 cAMP 濃度の測定は cAMP バイオセンサー (GloSensor, Promega) を発現する細胞株を用いて FDSS/ $\mu$  CELL plate reader (Hamamatsu Photonics) により行った。ヒトの *N* 型糖鎖修飾サイト SNP を有する GPR176 の発現コンストラクトは PCR を用いた点変異導入により作製した (dbSNP, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>) [5]。

### 結 果

Gpr176 には N 末端領域に進化的に保存される *N* 型糖鎖修飾モチーフがあり、SCN に発現する Gpr176 が実際に同修飾を受けることを *N* 型糖鎖消化酵素 PNGase F により同定した (図 1)。次いで、ヒト Flp-In TREx293 細胞を用いた異所発現系において同修飾が Gpr176 の細胞内の効率的なタンパク質発現に必須であり (図 2)、同修飾を欠くと細胞膜への移行ができず小胞体プロテアソーム系により分解されることを見出した (図 3)。Gpr176 はリガンド/アゴニスト非依存的に cAMP 合成を低下させる基礎活性をもつ (図 4a~d) [5]。糖鎖修飾の欠失はこの受容体固有の基礎活性には影響を与えないものの (図 5)、結果として生じるタンパク質発現量の減少に伴い細胞内 cAMP 抑制活性の有意な減少が認められた (図 4e~g)。同様の結果はヒトの GPR176 にもみられ (図 6a~f)、*N* 型糖鎖修飾部

位の非同義 SNP はヒトの GPR176 の細胞内タンパク質発現量と cAMP 抑制活性の低下をもたらした (図 6g~j)。つまり、*N* 型糖鎖は機能的な GPR176 のタンパク質発現に必須の翻訳後修飾であることがわかった。

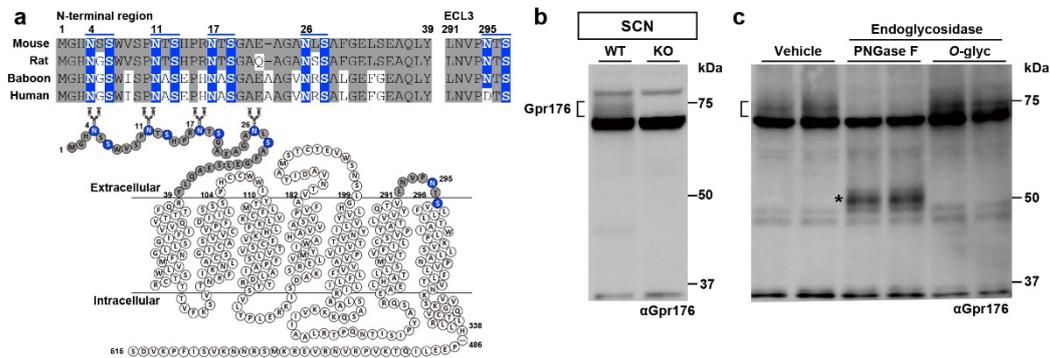


図 1. マウス視床下部 SCN において Gpr176 は *N* 型糖鎖修飾を受ける

- マウス、ラット、ヒビ、ヒトの Gpr176 の N 末端領域と第 3 細胞外ループ (ECL3) のアミノ酸配列比較とマウス Gpr176 のスネークプロット。赤色の背景で示すアミノ酸は種間で保存される *N* 型糖鎖修飾モチーフ (N-X-S/T, X≠P)。
- 野生型および *Gpr176* 欠損マウス視床下部 SCN に対する Gpr176 抗体をウェスタンブロット。Gpr176 は野生型で 75 kDa 付近にブロードなバンドとして検出される。
- 野生型 SCN ライセートを脱糖鎖酵素である PNGase F または *O*-glycosidase (*O*-glyc) もしくは Vehicle にて処置したサンプルのウェスタンブロット。PNGase F 処理により見かけの分子量が小さくなった Gpr176 (\*) が 50 kDa 付近に現れる。

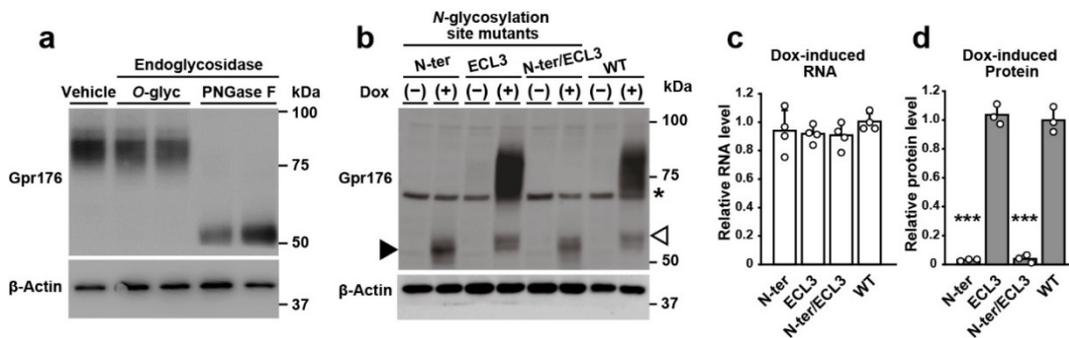


図 2. *N* 型糖鎖修飾は Gpr176 の細胞内の効率的なタンパク質発現に必要である

- Gpr176 は Flp-In TREx293 細胞においても *N* 型糖鎖修飾される。Gpr176 発現細胞を用いたウェスタンブロット。PNGase F 処置により Gpr176 の見かけサイズ減少。
- Dox 誘導型の正常および変異型 Gpr176 (N-ter、ECL3、N-ter/ECL3) 発現 Flp-In TREx293 細胞のウェスタンブロット。黒矢頭は 50 kDa 付近に現れる N-ter 変異体、白矢頭は野生型 Gpr176 の微量に検出される未成熟フォーム、\*は非特異的バンド。
- d) Dox により発現誘導した正常および変異型 Gpr176 の相対的 mRNA 量と相対的タンパク質発現量。mRNA 量は qRT-PCR により測定した (平均±標準偏差、n=4)。相対的タンパク質発現量はバンド強度から求めた (平均±標準偏差、n=3)。\*\*\* $P < 0.0001$  vs WT, one-way ANOVA with Bonferroni *post hoc* test。

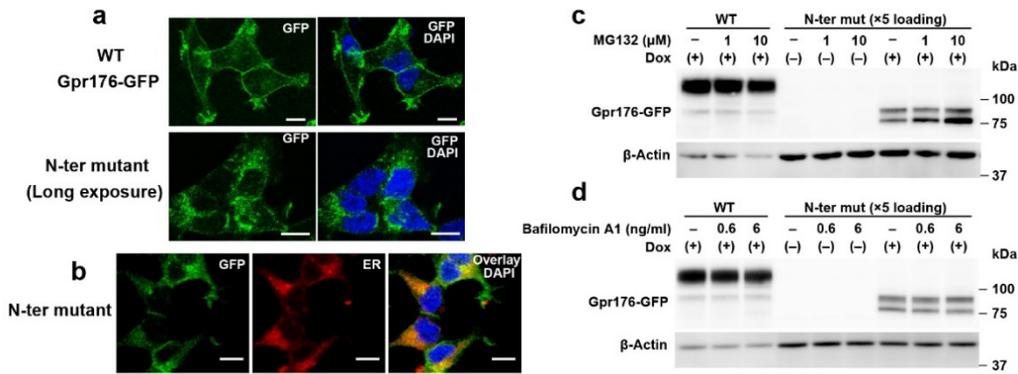


図 3. *N* 型糖鎖修飾サイトの変異は Gpr176 の細胞表面での発現を減少させる

- 野生型 Gpr176-GFP (上) および N-ter mut Gpr176-GFP (下) 発現細胞の共焦点顕微鏡像。マージは GFP (緑) と DAPI により染色した核 (青) を示す。N-ter mut Gpr176 は発現が低いため、蛍光観察条件を変えて撮像した。スケールバー：10  $\mu$ m。
- N-ter mut Gpr176-GFP が小胞体に蓄積することを示す共焦点顕微鏡像。小胞体は ER-Tracker (赤) にて染色した。スケールバー：10  $\mu$ m。
- 野生型 Gpr176-GFP および N-ter mut Gpr176-GFP のタンパク質発現に対する MG132 と bafilomycin A1 の効果を示すウェスタンブロット。図中に示した濃度の MG132 または bafilomycin A1 を細胞に 6 時間与えた。N-ter mut Gpr176-GFP は発現が低いため野生型の 5 倍量ロードした。MG132 処置した細胞でのみ N-ter mut Gpr176-GFP の発現の回復が認められた。

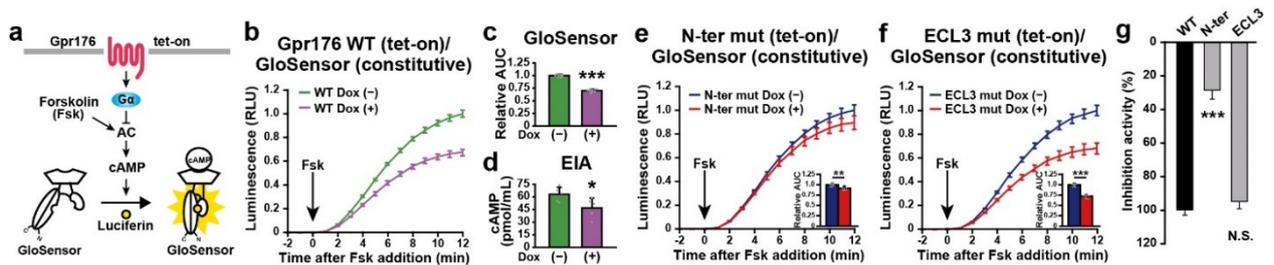


図 4. Gpr176 の *N* 型糖鎖修飾変異体はタンパク質の発現レベルの低下に伴い細胞内での基礎活性量も減弱する

- Flp-In TREx293細胞を用いたGloSensor-cAMPアッセイの実験モデル。
- Dox処置 (+) もしくは未処置 (-) のFlp-In TREx293-Gpr176 (tet-on) /GloSensor (constitutive) 細胞におけるフォルスコリン (Fsk) 投与後のGloSensorルシフェラーゼ活性の変化プロファイル (平均±標準偏差, n=9)。矢印はFskの投与点。
- b)のグラフの曲線下面積 (AUC) の相対値 (平均±標準偏差, n=9)。\*\*\* $P < 0.0005$ , two-tailed unpaired *t*-test。
- 酵素免疫測定法 (EIA) を用いて測定した同細胞のcAMP濃度 (平均±標準偏差, n=9)。\* $P < 0.05$ , two-tailed unpaired *t*-test。
- N-ter mutもしくはECL3 mutのFlp-In TREx293 Gpr176 (tet-on) /GloSensor (constitutive) 細胞の GloSensor 活性プロファイル (平均±標準偏差, n=9)。挿入図は相対AUC。\*\* $P < 0.001$ , \*\*\* $P < 0.0005$ , two-tailed unpaired *t*-test。
- 野生型Gpr176のcAMP抑制活性を100%とした時のN-ter mut Gpr176およびECL3 mutの抑制活性。\*\*\* $P < 0.0005$  vs WT, one-way ANOVA with Bonferroni *post hoc* test (N.S. : not significant)。

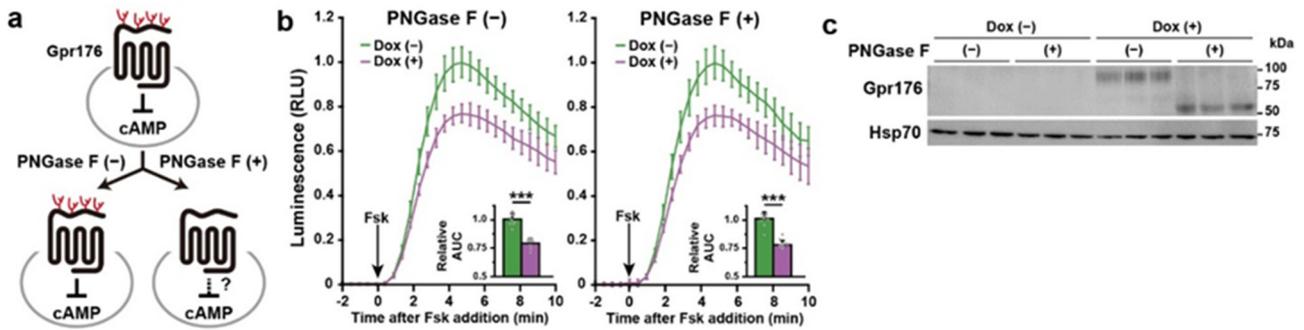


図5. PNGase Fによって糖鎖を酵素的に除去しても細胞に発現する Gpr176 の cAMP 抑制活性は保たれる

- 脱糖鎖処理を施した細胞懸濁液を用いたGloSensorアッセイの実験デザイン。Dox処置もしくは未処置の細胞をHBSSに懸濁し、PNGase Fの存在下もしくは非存在下で1時間インキュベートした後、GloSensorアッセイに供した。
- Dox処置 (+) と未処置 (-) のFlp-In TREx293-Gpr176 (tet-on) /GloSensor (constitutive) 細胞懸濁液におけるFsk投与後のGloSensor活性プロファイル (平均±標準偏差, n=9)。挿入図は相対AUC。  
\*\*\* $P < 0.0005$ , two-tailed unpaired  $t$ -test。
- b) で用いたPNGase F処置および未処置細胞におけるGpr176のウェスタンブロット像。Hsp70はローディングコントロール。

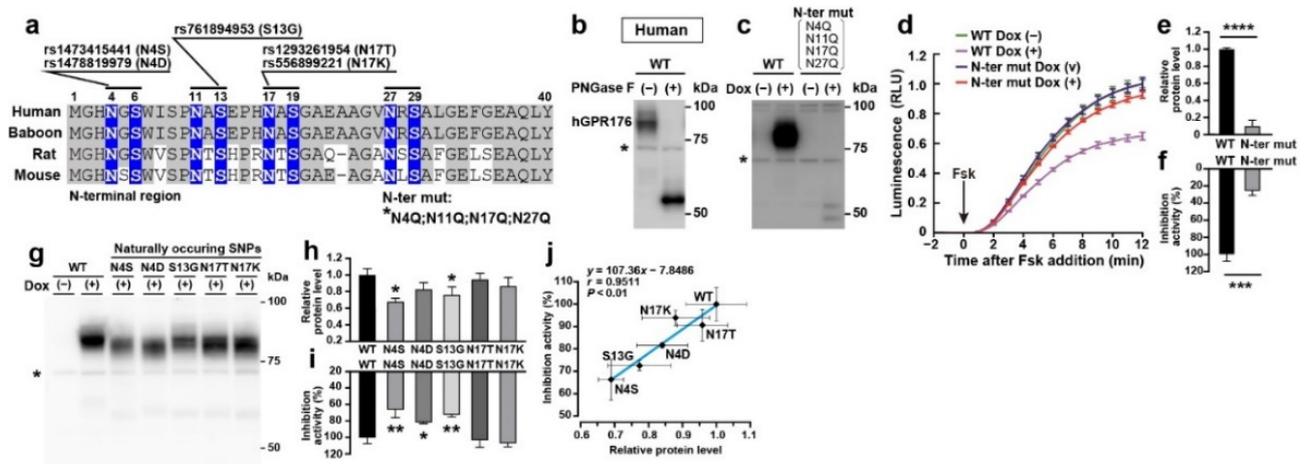


図6. ヒト GPR176 (hGPR176) の N 型糖鎖修飾に影響する非同義 SNP の同定

- hGPR176の糖鎖修飾モチーフ部位のSNP。N 型糖鎖修飾モチーフ : N-X-S。
- hGpr176発現Flp-In TREx293細胞を用いたウェスタンブロット。PNGase FによりhGpr176の見かけの分子サイズが減少。\*は非特異的バンド。
- Dox誘導型の正常およびN-ter mut (N4Q;N11Q;N17Q;N27Q) hGpr176発現Flp-In TREx293細胞のウェスタンブロット。N-ter mutではサイズと発現量が低下する。
- 野生型もしくは N-ter mut hGPR176をDox依存的に発現するFlp-In TREx293細胞におけるFsk投与後のGloSensorプロファイル (平均±標準偏差, n=3)。
- 野生型およびN-ter mut hGPR176の相対タンパク質発現量 (平均±標準偏差, n=3)。\*\*\*\* $P < 0.0001$ , unpaired  $t$ -test。
- 野生型に対するN-ter mut hGPR176のcAMP抑制活性の割合 (%、平均±標準偏差, n=3)。\*\*\* $P < 0.001$ , unpaired  $t$ -test。

- g) ヒトSNP変異体のウェスタンブロット。\*は非特異的バンド。
- h) 先祖型に対するSNP変異体の相対タンパク質発現量 (平均±標準偏差, n=3)。
- i) 先祖型に対するSNP変異体のcAMP抑制活性割合 (%、平均±標準偏差, n=3)。\*\* $P < 0.001$ 、\* $P < 0.01$ 、vs WT, one-way ANOVA with Bonferroni *post hoc* test。
- j) 先祖型およびSNP変異体のタンパク質発現量 (x軸) とcAMP抑制活性 (y軸) の相関図。相関係数 ( $r$ ) と  $P$ 値はピアソンの積率相関係数解析により求めた。

## 考 察

生体リズム調節薬の標的となりうるオーファン受容体 Gpr176 が *N* 型糖鎖修飾を受けること、さらにはこの修飾によって Gpr176 の細胞内における基礎活性が制御されることがマウス及びヒトの GPR176 に対して証明された [3]。リガンド未定のオーファン GPCR の糖鎖修飾はこれまで殆ど解析が進んでおらず、今回の Gpr176 の例によって初めて、オーファン受容体の基礎活性が翻訳後修飾によって巧妙に制御される可能性を示すことができたといえる [2, 3]。Gpr176 は、今回の朝型相関 SNP に関連する *N* 型糖鎖修飾のみならず、同様に朝型遺伝子として報告されている G タンパク質制御因子 RGS16 [4] やニューロペプチド VIP [4] が介するシグナル伝達系とも深く関与することを我々はこれまでに報告してきた [2, 5]。すなわち、ALG10B、RGS16、VIP に共通して関連する Gpr176 シグナルは、ヒトのクロノタイプの調節に向け、今後極めて有効なドラッグターゲットになる可能性があると考えられる。

## 謝 辞

本研究に助成のご支援を賜りました公益財団法人上原記念生命科学財団に心より御礼申し上げます。

## 文 献

- 1) Doi M, Shimatani H, Atobe Y, Murai I, Hayashi H, Takahashi Y, Fustin JM, Yamaguchi Y, Kiyonari H, Koike N, Yagita K, Lee C, Abe M, Sakimura K, Okamura H. Non-coding cis-element of Period2 is essential for maintaining organismal circadian behaviour and body temperature rhythmicity. *Nat Commun.* 2019 Jun 12;10(1):2563. PMID: 31189882 DOI: 10.1038/s41467-019-10532-2.
- 2) Nakagawa S, Nguyen Pham KT, Shao X, Doi M. Time-Restricted G-Protein Signaling Pathways via GPR176, Gz, and RGS16 Set the Pace of the Master Circadian Clock in the Suprachiasmatic Nucleus. *Int J Mol Sci.* 2020 Jul 17;21(14):5055. PMID: 32709014 DOI: 10.3390/ijms21145055
- 3) Wang T, Nakagawa S, Miyake T, Setsu G, Kunisue S, Goto K, Hirasawa A, Okamura H, Yamaguchi Y, Doi M. Identification and functional characterisation of N-linked glycosylation of the orphan G protein-coupled receptor Gpr176. *Sci Rep.* 2020 Mar 10;10(1):4429. PMID: 32157140 DOI: 10.1038/s41598-020-61370-y.
- 4) Hu Y, Shmygelska A, Tran D, Eriksson N, Tung JY, Hinds DA. GWAS of 89,283 individuals identifies genetic variants associated with self-reporting of being a morning person. *Nat Commun.* 2016 Feb 2;7:10448. PMID: 26835600 DOI: 10.1038/ncomms10448.
- 5) Doi M, Murai I, Kunisue S, Setsu G, Uchio N, Tanaka R, Kobayashi S, Shimatani H, Hayashi H, Chao HW, Nakagawa Y, Takahashi Y, Hotta Y, Yasunaga J, Matsuoka M, Hastings MH, Kiyonari H, Okamura H. *Nat Commun.* Gpr176 is a Gz-linked orphan G-protein-coupled receptor that sets the pace of circadian behaviour. 2016 Feb 17;7:10583. PMID: 26882873 DOI: 10.1038/ncomms10583