

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590327

研究課題名(和文)ヘテロマーGPCR受容体を指向したアロステリックリガンドによる機能変化の応用研究

研究課題名(英文)Research and application of allosteric ligands directed to G-protein coupled receptor heteromers

研究代表者

奥水 崇鏡(Koshimizu, Taka-aki)

自治医科大学・医学部・准教授

研究者番号：20392491

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：医薬品全体の30%以上が標的とするGタンパク質共役型受容体ファミリーは、二量体または多量体で機能する。ヘテロマー受容体複合体は、ホモ受容体を形成した際には見られない、全く新たな受容体機能を獲得する例が明らかになりつつある。本研究では、受容体複合体を機能単位として捕らえ、この働きを制御する手法を開発することを目的とした。具体的な応用例として、オピオイド受容体と複合体を形成するGタンパク質共役型受容体について、各種のスクリーニング系を開発して検索し、オピオイドの鎮痛効果を増強する或は副作用を軽減する新たな方法について、基礎的知見を得ることに成功した。

研究成果の概要(英文)：Members of G-protein coupled receptor family proteins have been drug targets of more than 30% of medicines currently used in clinics. It has been turned out that G-protein coupled receptors (GPCRs) exist as dimers or oligomers, in which homomeric as well as heteromeric receptor complex can be formed. There is no method to control GPCR heteromer function allosterically. We searched for new heteromer opioid receptor by developing new evaluation method. Our data indicated that opioid efficacy and side effects could be modulated through heteromer receptors.

研究分野：薬理学

キーワード：薬物受容体 ヘテロマー複合体

1. 研究開始当初の背景

G タンパク質共役型受容体(GPCR)は創薬の標的分子ファミリーとして重要な位置を占め、上市されている医薬品の30%以上がGPCRファミリーに属する受容体を標的とする。GPCR分子の構造が解明され機能の理解が進みつつあるが、このGPCRファミリーは二量体または多量体で機能する際の詳細は未だ不明な点多い。さらに、同種受容体同士が二量体を形成するホモマー複合体受容体に加え、互いに異なる受容体モノマー同士が一つのヘテロマー複合体受容体を形成し、構成要素となる受容体モノマーがそれぞれホモ受容体を形成した際には見られない、全く新たな受容体機能を獲得する例が明らかになりつつある。本研究は、GPCR複合体を機能単位として捕らえ、この働きをモニターし、制御する化合物や方法を見出すことを目的とした。

2. 研究の目的

本研究では、ヘテロマーG タンパク質共役型受容体を積極的に活用し、アロステリックな働きを持つ新薬を開発する方法を提示する。具体的には、オピオイド受容体を含む新規ヘテロマー受容体の機能解析から、麻薬性鎮痛薬の鎮痛効果をより高め、有害作用の発現を防ぐことのできる非オピオイドリガンドを見出す。予備実験では、薬物依存や鎮痛耐性といった現在は説明が十分でない有害作用をアロステリックな薬物でコントロールできる可能性が示唆されるため、活性化受容体の相互作用が及ぼす効果について、オピオイドによる情報伝達様式に変化を及ぼすリガンドの作用機序の解析と、個体レベルでの有用性について検討する。

3. 研究の方法

ヘテロマー受容体を指向した新薬の初期探索を実施し、新規オピオイド受容体ヘテロマ

ーを例に麻薬鎮痛薬の効果増強、有害作用抑制に関わる新しい化合物を検索する。

3-1. 遺伝子改変動物; V1a 遺伝子、V1b 遺伝子改変マウスは以前の報告のごとく維持繁殖した。このマウスの遺伝背景は 129/SV と Black/6J を両方持つため、同系の野生型マウスをコントロールに用いた。

3-2. 細胞培養; CHO 細胞は、10% Fetal bovine serum (FBS)入り F-12 培地中 37 で培養した。マウス V1a、V1b、V2 受容体およびマウスオキシトシン受容体安定発現 CHO 細胞を樹立した。

3-3. 受容体結合実験 膜分画を用いた受容体結合実験では、96-well plate に非放射性リガンド 50 μ L、放射性リガンド 50 μ L、膜分画 100 μ L を入れ、室温で1時間インキュベーションした。液体シンチレーションカウンタ Ultra Gold MV を 50 μ l/well で加えて TopCount NXT(Perkin Elmer)で計測した。

3-4. 細胞内カルシウム反応測定

カルシウム蛍光プローブである Fluo-4(最終濃度 4 μ M)を用いた。共焦点レーザー顕微鏡(FV300、オリンパス社製)を用いて1秒毎に連続撮影を行なった。

3-5. 既知のGPCRの分子系統樹探索

親和性のある複数の GPCR に共通する特徴を抽出するため、アミノ酸配列データベース(International Union of Basic and Clinical Pharmacology database、IUPHAR-DB)からリガンドが既知の 225 種類のヒト GPCR についてアミノ酸配列を取得し、ClustalX (Version 2.1)を用いて配列比較を行なって Treeview (Version 1.6.6)を使用して無根系統樹(unrooted tree)を作成した。ソフトウェアパッケージの変数は全てデフォルト値を用いた。

3-6.倫理面への配慮 当研究はヒトの検体を取り扱わなかった。実験動物を用いた実験においては大学に設置する動物実験倫理委員会と遺伝子組換え実験の承認を受け実施した。

4. 研究成果

4-1. 新規神経ペプチド類似拮抗薬の発見；アロステリックリガンドを検索する過程において、オピオイド受容体に親和性を示す可能性のある、新規合成ペプチドを発見した。

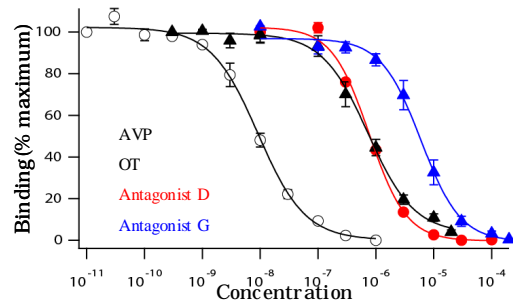
GPCR と生体内の生理活性物質との相互作用においては、お互いの立体構造を基盤とした高い特異性によって、ホルモンや神経伝達物質による特異的な制御が可能となっている。しかし近年、受容体とリガンドの間の高い特異性を乗り越えて、複数の異なる受容体に親和性を有するサブスタンス P (SP) 由来の合成ペプチドが発見され、オピオイド受容体への関与の可能性が示唆された。

我々は、SP 合成ペプチドの広域な親和性について、AVP と OT を入口として解析を行った。

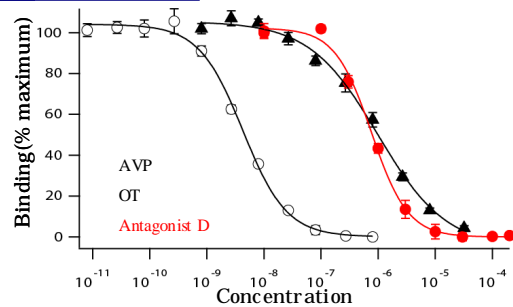
そこで、複数の受容体に親和性を示すことが報告された合成 SP 拮抗薬 Antagonist-D 及び Antagonist-G (Ant-D 及び Ant-G) の、バゾプレッシン受容体ファミリー (V_{1b} 、 V_2 バゾプレッシン、OT オキシトシン受容体) に対する親和性を明らかにした。バゾプレッシン受容体やオキシトシン受容体はこれまでにリガンド結合部位の詳細な検討がされているため、過去の報告と比較検討することでより多くの情報を得られる可能性が示唆された。また、合成 SP 拮抗薬に感受性を示す複数の GPCR に共通する性質を見出し、薬物-受容体相互作用やドラッグデザインに関する新たな知見を得ることに成功した。

図 1 に、SP 合成ペプチド Antagonist D (AntD) Antagonist G (AntG) による、 $[^3H]$ AVP または $[^3H]$ OT の競合結合実験の結果を示す。

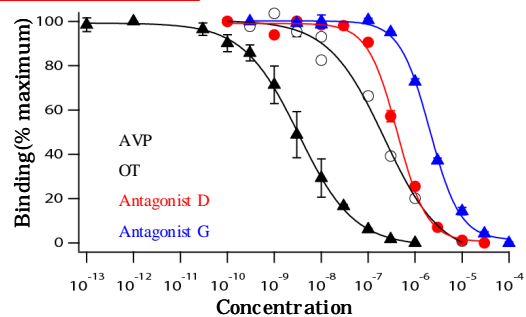
V_{1b} receptor



V_2 receptor



OT receptor



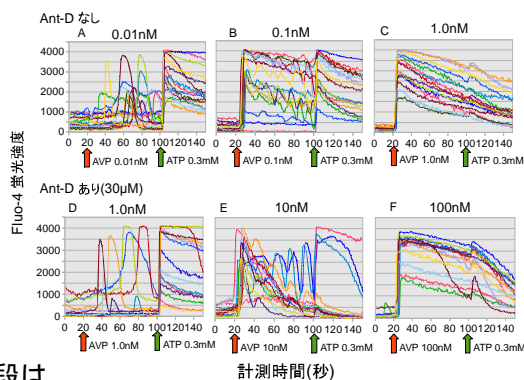
合成 SP 拮抗薬は、バゾプレッシン受容体ファミリーとオキシトシン受容体に対し競合的拮抗作用を示した。CHO 細胞に安定発現させた V_{1b} 及び V_2 受容体に対して $[^3H]$ AVP を、オキシトシン受容体に対し $[^3H]$ OT を 1 nM で用い、合成 SP 拮抗薬 (Antagonist D (赤)、Antagonist G (青))、AVP (白丸)、OT (黒三角) を表記の濃度範囲にて用いて受容体結合実験を行った。合成 SP 拮抗薬は各受容体へのリガンドの結合を競合的に阻害した。各受容体に対する阻害曲線と Ki_{50} 値を明らかにした。

4-2. 合成 SP 拮抗薬が V_{1b} 、 V_2 、OT 受容体に対して AVP や OT の結合を阻害することより、我々は次の実験として、合成 SP 拮抗薬が、

アゴニスト活性を持つか否か、また AVP 刺激による細胞の反応を阻害するか否かについて明らかにすることを試みた。そのため、V1b 受容体によって惹起される細胞内 Ca²⁺シグナルを指標として解析した。

合成 SP 拮抗薬 Ant-D を 30 microM まで単独で使用した場合、それ自体ではアゴニスト活性を示さなかった。この場合、CHO 細胞に内在する P2Y タイプの ATP 受容体を刺激すると細胞内 Ca²⁺濃度の上昇が観察されたことより、細胞の反応性は保たれていると判断した。興味深いことに、マウス由来 V1b 受容体を発現させた CHO 細胞を 10 pM の AVP によって刺激した際に、細胞内 Ca²⁺濃度の周期的上昇と下降（カルシウムオシレーション）が観察された（図 2）。計測の結果、AVP 濃度が約 0.1 nM を下回る濃度で刺激された場合に、V1b 発現 CHO 細胞では Ca²⁺オシレーションが発生することが判明した。

図 2 Ant-D は V1b 受容体による Ca²⁺シグナルを抑制する。V1b 受容体を安定発現した CHO 細胞をカルシウム蛍光指示薬 Fluo-4 にてロードした後、個々の細胞に起こる経時変化を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。図中に示す濃度の AVP または ATP で刺激し、蛍光強度の変化を縦軸に、時間を横軸に表示した。下



段は

30 mM Antagonist-D を Fluo-4 のロード後に 5 分間処置し、引き続き細胞外液に同濃度の Antagonist-D が存在する条件下で記録した

蛍光強度の変化を示す。色分けしている各グラフ曲線は其々単一細胞による Ca²⁺反応を示す。

4-3. アミノ酸配列に基づく分子系統樹の解析

合成 SP 拮抗薬が、バゾプレシン受容体を含む複数の異なる GPCR に作用することが示唆されるため、合成 SP 拮抗薬に感受性のある受容体の特徴について解析を行った。意外なことに、合成 SP 拮抗薬に感受性のある受容体は、分子系統樹において、お互いに非常に近い位置にあること、すなわちアミノ酸配列の類似性が高いことが明らかとなった。

また、合成 SP 拮抗薬は GnRH 受容体に対して Ca²⁺反応を阻害し、alpha1B アドレナリン受容体に対しては阻害効果を示さないことが判明した。以上より、合成 SP 拮抗薬は分子系統図上でバゾプレシン受容体に近い受容体に結合し得ることが明らかとなった。

[結論] オピオイド受容体を含む受容体複合体について、新規に発見した組み合わせを含めて機能解析を行った。その結果、複合体を形成するそれぞれのリガンドを同時投与すると、これまでには予想できない反応が得られる例が明らかとなった。その場合は、お互いがアロステリック効果を示すと考えられた。解析の過程において、広範囲に親和性を持つ特異なペプチドを発見した。

5. 主な発表論文等

[雑誌、論文] (計 9 件)

1. Arai, K., Kashiwazaki, A., Fujiwara, Y., Tsuchiya, H., Sakai, N., Shibata, K., Koshimizu, T.A., 2015. Pharmacological lineage analysis revealed the binding affinity of broad-spectrum substance P antagonists to receptors for gonadotropin-releasing peptide. *Eur. J. Pharmacol.* 749, 98-106.
2. Kumazaki, M., Ando, H., Kakei, M., Ushijima, K., Taniguchi, Y., Yoshida, M., Yamato, S., Washino, S., Koshimizu, T.A., Fujimura, A., 2013.

alpha-Lipoic acid protects against arsenic trioxide-induced acute QT prolongation in anesthetized guinea pigs. *Eur. J. Pharmacol.* 705, 1-10.

3. Masuki, S., Sumiyoshi, E., Koshimizu, T.A., Qian, J., Higuchi, K., Tsujimoto, G., Nose, H., 2013. Voluntary locomotion linked with cerebral activation is mediated by vasopressin V1a receptors in free-moving mice. *J. Physiol.* 591, 3651-3665.

4. Tamaki, Y., Iwanaga, Y., Niizuma, S., Kawashima, T., Kato, T., Inuzuka, Y., Horie, T., Morooka, H., Takase, T., Akahashi, Y., Kobuke, K., Ono, K., Shioi, T., Sheikh, S.P., Ambartsumian, N., Lukanidin, E., Koshimizu, T.A., Miyazaki, S., Kimura, T., 2013. Metastasis-associated protein, S100A4 mediates cardiac fibrosis potentially through the modulation of p53 in cardiac fibroblasts. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 57, 72-81.

5. Tsuchiya, H., Sato, J., Tsuda, H., Fujiwara, Y., Yamada, T., Fujimura, A., Koshimizu, T.A., 2013. Serum amyloid A upsurge precedes standard biomarkers of hepatotoxicity in ritodrine-injected mice. *Toxicology* 305, 79-88.

6. Fujiwara, Y., Tanoue, A., Tsujimoto, G., Koshimizu, T.A., 2012. The roles of V1a vasopressin receptors in blood pressure homeostasis: a review of studies on V1a receptor knockout mice. *Clin. and Exp. Nephrol.* 16, 30-34.

7. Ichimura, A., Hirasawa, A., Poulain-Godefroy, O., Bonnefond, A., Hara, T., Yengo, L., Kimura, I., Leloire, A., Liu, N., Iida, K., Choquet, H., Besnard, P., Lecoq, C., Vivequin, S., Ayukawa, K., Takeuchi, M., Ozawa, K., Tauber, M., Maffei, C., Morandi, A., Buzzetti, R., Elliott, P., Pouta, A., Jarvelin, M.R., Korner, A., Kiess, W., Pigeyre, M., Caiazzo, R., Van, H.W., Van, G.L., Horber, F., Balkau, B., Levy-Marchal, C., Rouskas, K., Kouvatzi, A., Hebebrand, J., Hinney, A., Scherag, A., Pattou, F., Meyre, D., Koshimizu, T.A., Wolowczuk, I., Tsujimoto, G., Froguel, P., 2012. Dysfunction of lipid sensor GPR120 leads to obesity in both mouse and human. *Nature* 483, 350-354.

8. Koshimizu, T.A., Nakamura, K., Egashira, N., Hiroyama, M., Nonoguchi, H., Tanoue, A., 2012. Vasopressin V1a and V1b receptors: from molecules to physiological systems. *Physiol. Rev.* 92, 1813-1864.

9. Tsuchiya, H., Ushijima, K., Fujiwara, Y., Fujimura, A., Koshimizu, T.A., 2012. Chronic ritodrine treatment induces refractoriness of glucose-lowering beta2 adrenoceptor signal in female mice. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 62, 561-567.

[学会発表] (計6件)

1. Tsuchiya, H., Fujiwara, Y., Fujimura, A., Koshimizu, T.A. Prostaglandin D2 promotes the neurite retraction in mouse hypothalamic cell line. 第89回日本薬理学会 2015.3.18. 名古屋

2. Fujiwara, Y., Tsuchiya, H., Fujimura, A., Koshimizu, T.A. Extensively glycosylated Lipocalin 2 in urine as a marker for peritoneal inflammation and ureteral obstruction. 第89回日本薬理学会 2015.3.19. 名古屋

3. 奥水崇鏡、本多健治、高野行夫 V1b バゾプレッシン受容体複合体の機能解析 第25回バゾプレッシン研究会 2015.1.10. 東京

4. 奥水崇鏡、下垂体後葉ホルモンによるアデニレートサイクラーゼシグナルの調節機構 第24回バゾプレッシン研究会 2015.1.10. 東京

5. 奥水崇鏡、本多健治、高野行夫 オピオイド鎮痛におけるバゾプレッシンの役割について 第23回バゾプレッシン研究会 2014.1.7. 東京

6. 荒井和音、奥水崇鏡 合成サブスタンスPアンタゴニストの広域性とシグナル制御機構 第126回日本薬理学会関東部会 2012.7.14. 東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

奥水崇鏡 (KOSHIMIZU TAKA-AKI)

自治医科大学・医学部・准教授

研究者番号：20392491