

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：32202

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K15055

研究課題名(和文) 広範囲親和性と光振動エネルギーを利用した、見ながら探すりガンド探索法の開発

研究課題名(英文) Development of analysis method of receptors using peptide wide affinity and resonance energy transfer

研究代表者

奥水 崇鏡 (Taka-aki, Koshimizu)

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) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：受容体とリガンドの関係は、鍵と鍵穴の如く厳密で排他的な対応関係があると考えられてきた。本研究では、申請者らが同定に成功した、複数の異なる受容体ファミリーの垣根を越えて結合が可能な合成ペプチドを、機能が未知のオーファン受容体の解析に応用する方法を開発した。広域親和性を保持した蛍光ペプチドの作成に困難な点があったが、解析候補受容体の抽出、光振動エネルギー移動を利用した測定計の効率化、新たなヘテロ二量体の発見、受容体細胞内局在の新知見、並びに受容体内在化の新機構の発見に繋がった。本研究の研究成果は、今後の未だ解析が進んでいないオーファン並びにヘテロ受容体の機能解明に大きく寄与すると考えられた

研究成果の概要(英文)：Relationship between receptors and ligands has been considered as 'key and lock'. Such strict structural requirement is not seen in our finding of synthetic peptide. We attempted to use our peptide with high affinities to a wide range of G-protein coupled receptors for analysis of orphan receptors. We selected candidate orphan receptors by pharmacological lineage analysis, which was developed by us previously. Although synthesis of fluorescent peptide holding similar affinity was difficult, variety of assay systems were successfully developed. Moreover, new findings were obtained on a receptor localization in a cell, regulatory mechanism of receptor internalization, and previously uncharacterized heteromer receptors. Our findings in this study can help further analyze and understand orphan receptors and heteromer receptors.

研究分野：受容体薬理学

キーワード：広域親和性 受容体 光振動エネルギー移動 ヘテロ受容体

## 1. 研究開始当初の背景

結合する化合物や生理活性物質が未知であるオーファン受容体は、未だヒトゲノム上に数多く存在することが知られている。これらの受容体は、生体内での役割が不明である場合が多く、その働きを解明できた場合には新しい治療法の開発に繋がる大きな可能性が秘められる。これまでの知見では、受容体に結合する化合物(リガンド)と受容体の間には、鍵と鍵穴の如く立体的に決定される厳密な対応関係があると考えられてきた。このため、特定のリガンドは特定の受容体にのみ作用するとされてきた。しかし、最近申請者らは、既に特定されたりガンドや生理活性物質が作用する複数の異なる受容体ファミリーに対し、ファミリー間の垣根を越えて結合が可能な、特異な性質を持つ合成ペプチドの同定に成功した。この研究より、Gタンパク質共役型受容体ファミリーには、比較的良好に保存された構造が、本来のリガンド結合部位の近傍に存在することが示唆された。本研究では、この異なる受容体に対して広域に結合可能なペプチドを用いて未だ解析が進んでいないオーファン受容体の機能解明を試みることを目的とした。

新たなリガンド-受容体ペアの組み合わせを同定することは、基礎研究や、創薬の分野においては最もチャレンジングなステップと考えられる。達成された場合には、「新規の薬物標的」としてオーファン受容体を医薬品の開発に応用できる可能性が広がると考えられる。これまでは、オーファン受容体のリガンド探索方法として、細胞での受容体発現系において、多くの化合物をスクリーニングする中より活性のあるものを探し当てる方法が用いられてきた。しかし本研究では、天然リガンドと医薬品のリード化合物を、新たな手法で見出すことを試みることにした。すなわち、我々が見出したある合成ペプチドの広い結合能を、未知のオーファン受容体に対する新規のリガンド探索に利用できる可能性がある。

## 2. 研究の目的

ヒトゲノム上には未だ機能不明であるオーファン受容体が、100種類以上存在する。オーファン受容体に結合する最初の化合物を見出すことは、大きな困難が伴う。しかし、成功した場合は、薬物治療の限界を大きく押し広げることに繋がる。申請者らは、以前に機能が不明なオーファン受容体が、脂肪酸をリガンドとし、ヒトの遺伝的肥満体質に関わることを明らかにしている。

本研究では、最近我々が同定した広範囲の受容体に作用する合成ペプチドと質量顕微鏡を最大限利用し、オーファン受容体の最初のリガンドを系統的に明らかにする。鍵と鍵穴の法則による限界を超えた合成ペプチド(広範囲スペクトラムペプチド)を用いて、これまでの常識を全く覆したオーファン受

容体に対する新規のリガンド探索を行う。

## 3. 研究の方法

まず、約400種類のヒト全受容体について分子系統樹を作成し、実験対象とするオーファン受容体を絞り込む。次に、受容体を発光タンパク質と融合させて、蛍光標識ペプチドとの相互作用を指標にリード化合物、組織抽出液を絞り込む。最後に、受容体に結合した化合物を質量顕微鏡を用いて、受容体の活性に依存しない探索を行う事とした。

1) 解析対象オーファン受容体の抽出;最近、申請者らは広範囲の受容体に親和性を有する合成ペプチドを見出した。まず、このペプチドに親和性を有するオーファン受容体を、*in silico* の検索より抽出する。この際、独自の“Pharmacological lineage analysis”(薬理学的リネージ解析)を用いる。

2) 発光タンパク質融合受容体の構築と強制発現;これまでも申請者らは、蛍光あるいは発光タンパク質と受容体を融合させて細胞に強制発現し、機能の解析を行ってきた。細胞膜受容体のサブユニット相互作用を解析する際は、受容体カルボキシル基末端にGFPあるいはルシフェラーゼを付加したが、今回は異なり、新たに受容体アミノ基末端に付加する必要がある。

3) 光振動エネルギー移動の検出系構築;発光タンパク質受容体と蛍光ペプチドが結合した際にだけに起こる光振動エネルギー移動(BRET)を、高感度で検出する測定系を確立する。これまで申請者らは、ATPに対する細胞膜P2X受容体のサブユニット相互作用をBRETを用いて解析した経験がある(図8)。

4) 蛍光タンパク質の広範囲スペクトラム確認;蛍光標識によりプローブとするリガンド側の結合能が変化しないことを確認する。そのため、広範囲の受容体に親和性を示すことが判明した合成ペプチドの性質が、蛍光標識の有無により変化するか、受容体結合実験や薬理実験で検証する。

5) 発光タンパク質融合受容体と蛍光リガンドの相互作用検出;以上の各段階を確認した後、受容体-発光タンパク質と蛍光リガンドの相互作用を検出する。この系が機能していることを、まずV1b受容体-発光タンパク質と蛍光標識バズプレッシンとの間で確認し、続いてオーファン受容体に適用する。検出系のスケールを可能な限り小さく384または1536ウェルプレートで測定を効率化する。

オーファン受容体に結合する天然リガンドや化合物を、ハイスループット系で探索する。スクリーニング対象は、組織抽出液、培養分泌細胞上清、ペプチドや化合物のライブラリー、さらには各種天然物ライブラリーとする。これらリガンド候補を、各種オーファン受容体-発光タンパク質に対して検索する。具体的には、以下のステップを実施する。

1) 陽性コントロール実験の確立;既知のホ

ルモン-受容体間の相互作用が検出されるか、コントロール実験として実施する。そのため、視床下部細胞から放出されるバゾプレッシンと下垂体の V1b 受容体への結合を検出する。視床下部のバゾプレッシン産生細胞である室傍核や視索上核、あるいは下垂体後葉からペプチド分画を粗抽出し、蛍光標識バゾプレッシンと発光タンパク質融合 V1b 受容体の相互作用を競合阻害することを確認する。

#### 4. 研究成果

薬理学的リネージ解析；本解析により、分子系統上でバゾプレッシン受容体の近傍に位置する広域親和性ペプチドが、どの他の受容体に結合するかを予測した。探索には、リガンドが既知であるヒト 222 GPCR 受容を用い、この中より、これまでは知られていなかった GnRH 受容体が、広域親和性ペプチドに親和性を有することを予測した。次に、実際に放射性ラベルした GnRH を用いて実験的に証明を試みた。すると予想通りに広域親和性ペプチドは、放射性ラベルした GnRH が GnRH 受容体に結合するのを競合的に拮抗した。このことより、我々の薬理学的リネージ解析法がリガンドの予測に用いることが可能であると判明した。そこで、オーファン受容体を含むヒト GPCR 全体を、薬理学的リネージ解析で選別したところ、3 種類の候補となるオーファン受容体を見いだすことに成功した。そこで、直ちに PCR 法を用いてヒト由来の細胞ならびに組織より各受容体 cDNA を取得して塩基配列を確認した。

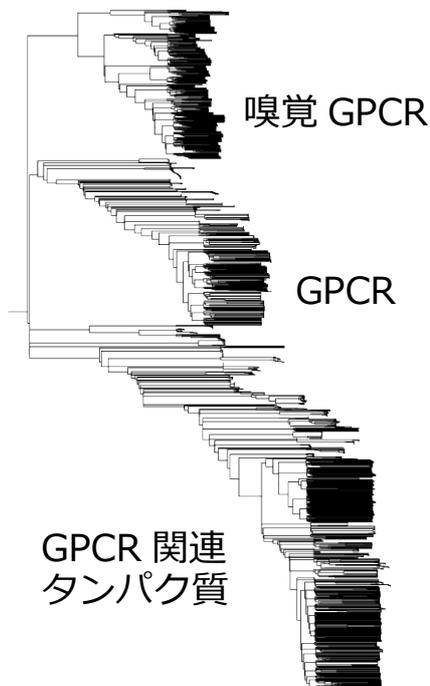


図1 ヒトゲノム上の GPCR および GPCR 関

連遺伝子を対象とした薬理的リネージ解析

蛍光タンパク質融合オーファン受容体の作成；GPCR の解析に蛍光タンパク質を用いる際は、カルボキシル基末端に融合させるのが通常である。しかし、今回は異なり、ペプチドのアクセス可能な細胞外に向けて蛍光タンパク質を付加する必要がある。まず、既に蛍光タンパク質がカルボキシル基末端に融合しても作用に影響が見られないバゾプレッシン V1b 受容体をコントロールとして実験をこなした。V1b 受容体のアミノ基末端に蛍光タンパク質 GFP を付加した。この変異体で細胞内カルシウムイオンの上昇を指標に受容体の機能を確認することを試みた。しかし、この変異体は活性を示すことができず、新たに受容体アミノ基末端に GFP を付加することは受容体の機能的な高次構造を損なうことが予想された。また、アミノ基末端に付加するレポータータンパク質を化学発光タンパク質のルシフェラーゼに変更したところ、やはり受容体の機能を損なうことが判明した。特に、発光タンパク質を付加した場合には、タンパク発現量が少なく問題であった。

よって別の方法でアミノ基末端のラベルを行う必要があると考えられた。そのため我々は、科学的に蛍光を発する修飾が可能な可能な HaloTag テクノロジーを用いることとし、V1a 並びに、V1b 受容体のアミノ基末端に Tag を付加した発現コンストラクトを作成した。受容体の機能を確認したところ、HaloTag は機能を損なわず、カルシウム反応も保持されることが判明した。

光振動エネルギー移動の検出系構築：受容体サブユニット間の相互作用に光振動エネルギー移動を利用する系を効率化することに成功した。特に、V1b 受容体の 2 量体検出には、ルシフェラーゼタンパク質と Venus 蛍光タンパク質を用いて測定系のコントロールとした。この時点で、意外な発見に繋がった。すなわち、発現料を確認するために細胞内局在を顕微鏡で観察したところ、V1b 受容体は刺激を受けずに細胞内に多く局在することが判明した。

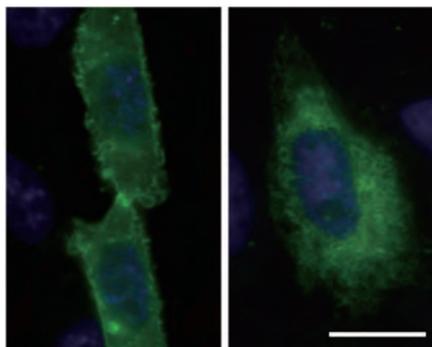


図2 受容体細胞内局在解析。パネル左は V1a サブタイプ受容体-GFP、パネル右は V1b サブタイプ受容体-GFP を示す。V1a-GFP は主に細胞膜に局在する典型的な GPCR であるのに対し、V1b-GFP は無刺激にも関わらず細胞内に多く局在することが判明した。白線は 20  $\mu\text{m}$  を示す。

すなわち、これまで基礎的情報の少なかった V1b バゾプレッシン受容体が、未刺激で細胞内に多く局在し、細胞外からの刺激を受けた細胞膜上の数少ない受容体は、細胞内局在を変化させた。我々はその機構の全体像を解明し、この受容体の効率的な医薬品開発に役立てる方法を見出すことに成功した。

さらに、光振動エネルギー移動の検出系を構築する過程でも新たな知見を得ることに成功した。すなわち、V1b バゾプレッシン受容体が  $\mu$ -オピオイド受容体と複合体を形成することを発見した。この相互作用を利用し、V1b 拮抗薬にはモルヒネの有害反応を防ぐアロステリック効果が期待され、今後この成果の大きな発展が期待された。またこの成果により、受容体のヘテロマーには、オーファン受容体に匹敵する可能性が秘められていることが判明した。

蛍光付加した広域親和性ペプチドについて、広域親和性が蛍光付加によって影響を受けるか否かを確認した。しかし、予想に反して蛍光修飾により水溶性の低下や親和性の大幅な低下が観察された。すなわち、広範囲スペクトラムを有するペプチドの構造に直接変化を及ぼす化学修飾は、広い種類の受容体に対し親和性を低下させることが判明した。つまり、蛍光を用いた相互作用の解析に限られた研究期間内に立ち上げることは困難が伴うことが判明した。変わって質量顕微鏡を用いたペプチド結合物の検出を試みた。質量顕微鏡の感度より、細胞表面に結合するペプチドよりも多くを必要とすることが判明し、受容体の精製や何らかの高密度化が必要であると考えられた。

光振動エネルギー移動の高感度ハイスループット検出系の構築に成功した。特に発光タンパク質を用いることでバックグラウンドの問題を解決することが可能であった。よって消光の長い錯体を用い時間分解蛍光と振動光エネルギー移動を観察することも今後の有力な方法であると考えられた。

まとめに、オーファン受容体のリガンド探索は、この 10 年間では、33 の新たなリガンドと受容体のペアが報告された。その解析方法は、活性のある化合物が先行したのが 19 例、一方で粗精製の試料から受容体を同定した場合が 14 例であった。これら全ての検索では、リガンドが活性化薬であることが必須であり、拮抗薬や、近年注目されるバイアスアゴニストは捉えられない弱点があった。我々が開発した広域親和性ペプチドを用い

た方法は、アゴニスト、アンタゴニストを問わずに検出可能である。ペプチドの修飾に時間を有すると思われるが、その他の課題は達成し、さらに発展させて、新たな受容体局在の解析とヘテロマー受容体の重要性が新規オーファン受容体に勝るとも劣らぬものであることを示した。今後、本研究で得られた成果を、リガンド-受容体間（オーファン受容体を含む）、あるいは異なる受容体間（ヘテロマー受容体）、受容体-相互タンパク質間の様々なレベルで応用することにより、広い相互作用の検出のためのプラットフォームとして発展する可能性が示された。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 8 件)

1. Koshimizu TA, *et al.* (2018) Complex formation between the vasopressin 1b receptor,  $\beta$ -arrestin-2, and the  $\mu$ -opioid receptor underlies morphine tolerance. *Nat. Neurosci.* 21(6):820-833.
2. Togashi K, *et al.* (2017) Lidocaine is a Novel Antispasmodic Agent during Colonoscopy. *Clin Investig (Lond)*. 7(1):65-66.
3. Nemoto D, *et al.* (2017) Topical lidocaine inhibits spasm during colonoscopy: a double-blind, randomized controlled trial (with video). *Endosc Int Open* 5(6):E402-E407.
4. Tsuchiya H, Hohjoh H, Fujiwara Y, Sugimoto Y, & Koshimizu TA (2016) Prostaglandin D2 elicits the reversible neurite retraction in hypothalamic cell line. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 470(4):804-810.
5. Koshimizu TA, Kashiwazaki A, & Taniguchi J (2016) Combined sodium ion sensitivity in agonist binding and internalization of vasopressin V1b receptors. *Sci. Rep.* 6:25327.
6. Fujiwara Y, *et al.* (2016) Lipopolysaccharide-induced

inflammation or unilateral ureteral obstruction yielded multiple types of glycosylated Lipocalin 2. *J Inflamm (Lond)* 13:7.

7. Sakai N, *et al.* (2015) Identification of protein arginine N-methyltransferase 5 (PRMT5) as a novel interacting protein with the tumor suppressor protein RASSF1A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 467(4):778-784.
8. Kashiwazaki A, *et al.* (2015) Subcellular localization and internalization of the vasopressin V receptor. *Eur. J. Pharmacol.* 765:291-299.

[学会発表] (計 20 件)  
(招待講演)

奥水崇鏡

バゾプレッシン受容体高次複合体の基礎と臨床  
第 20 回薬師寺腎セミナー 2018 年 3 月

奥水崇鏡, バゾプレッシン V1b 受容体の新知見と応用. 第 30 回日本下垂体研究会学術集会 2015 年 8 月 黒部市

奥水崇鏡

Receptive substance を求めて Dr.Thomas Renton Elliot (1877-1961) からの便り  
第 14 回 自治医科大学シンポジウム JMU シンポジウム講演 2015 年 9 月

(一般講演、ポスター)

奥水崇鏡, Nuttawadee Ngamlertwong, 藤原葉子, 土屋裕義, 谷口淳一  
痛みに関わる V1b バゾプレッシン受容体高次複合体の機能解析  
第 28 回バゾプレッシン研究会 2018 年 1 月 東京

奥水崇鏡

バゾプレッシン V1b 受容体の痛覚における新知見と応用  
氷川フォーラム 2017 年 11 月 大宮

T Giesecke, T Koshimizu, K Kawahara, N Himmerkus, J Isermann, M Bleich, A Smorodchenko, S Bachmann, K Mutig  
Comparative analysis of vasopressin V1a receptor distribution in rodent and human kidneys  
Kidney week 2017 年 11 月 米国 ニューオーリンズ

笹井隆太郎、宮崎葵、奥水崇鏡  
分子系統樹を用いた、オーファン G タンパク質共役型受容体の機能予測  
第 16 回 自治医科大学シンポジウム  
2017 年 9 月

T Koshimizu, K Honda, and Y Takano  
Regulation of morphine sensitivity and adenylate cyclase sensitization by carboxyl-terminus of V1b vasopressin receptors  
International Narcotics Research Conference 2017

A Kashiwazaki, T Koshimizu and M Tanaka  
Zwitterionic polymers for peptide hormone delivery to the intracellular G-protein coupled receptors  
BMI2017 2017 年 8 月 福岡

H Tsuchiya, S Fujimura, A Fujimura, Y Fujiwara, T Koshimizu  
V1a Vasopressin Receptor and Mouse Reproductive Function  
第 90 回日本薬理学会年会 2016 年 3 月 長崎

奥水崇鏡

CRISPR/CAS9 システムによる V1b バゾプレッシン受容体の分子修飾と機能解析  
第 27 回バゾプレッシン研究会 2017 年 1 月 東京

T. Giesecke1, T-A. Koshimizu, K. Kawahara, S. Bachmann, and K. Mutig  
Analysis of vasopressin V1a receptor distribution and function in the mammalian kidney  
Kidney week 2016 年 11 月 米国 シカゴ

H Tsuchiya, S Fujimura, A Fujimura, Y Fujiwara, T Koshimizu  
Deficits in Female Reproductive Function in V1a Vasopressin Receptor Knockout Mice  
第 89 回日本生化学会 2016 年 9 月 仙台

宮崎葵、奥水崇鏡

CRISPR/CAS9 システムを用いた、G タンパク質共役型受容体の分子修飾と機能解析  
第 15 回 自治医科大学シンポジウム  
2016 年 9 月

A Kashiwazaki, Y Fujiwara, H Tsuchiya, J Taniguchi and T Koshimizu  
Nobel strategies to reduce internalization of the V1b vasopressin receptor  
第 15 回 自治医科大学シンポジウム  
2016 年 9 月

Koshimizu TA, Kashiwazaki A, Fujiwara Y, Tsuchiya H, and Taniguchi J  
Extracellular sodium ion is essential for internalization of vasopressin V1B receptors. International Symposium on the Pituitary Gland and Related Systems (Hawaii, USA) 2016 年 8 月

興水崇鏡、柏崎重紀、谷口淳一  
Gタンパク質共役型受容体内在化における外液イオン感受性の新発見  
第134回日本薬理学会関東部会 2016年7月 栃木

宮崎葵、興水崇鏡  
Molecular tagging to G-protein coupled receptors using CRISPR/CAS9 mediated genome editing  
第89回日本薬理学会年会 2016年3月 横浜

T Koshimizu, A Kashiwazaki, Y Fujiwara, H Tsuchiya and J Taniguchi  
Cellular localization and sodium ion sensitivity of Vasopressin V1b receptors  
第89回日本薬理学会年会 2016年3月 横浜

T. Giesecke, T.-A. Koshimizu, K. Kawahara, M. Manning, S. Bachmann, and K. Mutig  
Comparative analysis of vasopressin V1a and V2 receptors distribution in the mammalian kidney American Society of Nephrology, San Diego, USA. 2015 11.7.

[その他]

ホームページ等

<http://www.jichi.ac.jp/molpharm/>

研究成果の報道

平成30年5月2日毎日新聞にて研究成果に関する記事が掲載された。

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

興水 崇鏡 (Taka-aki Koshimizu)

自治医科大学・医学部・准教授

研究者番号：20392491

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

### (4) 研究協力者

( )