

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月18日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21570128

研究課題名（和文）脂質受容体に働くペプチドリガンドの開発

研究課題名（英文）Identification of peptide ligands for lipid receptors

研究代表者

武田 茂樹（TAKEDA SHIGEKI）

群馬大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号：80282854

研究成果の概要（和文）：

ステロイドをリガンドとするGタンパク質共役受容体であるTGR5 に対するペプチドリガンドを開発するために、6量体からなるランダムペプチドライブラリーを調整した。そこから得られたAc-WLFLHV-NH<sub>2</sub>の配列からなるペプチドはわずかながらTGR5 を活性化するアゴニストとしての性質を示し、そのEC<sub>50</sub>は約630nMであった。また、Ac-WVFLIV-NH<sub>2</sub>の配列からなるペプチドはわずかながらTGR5 を不活性化するアンタゴニストとしての性質を示し、そのIC<sub>50</sub>は約15nMであった。結果、活性は低いながらTGR5 の新規リガンドとなる可能性のあるペプチドとして2種類の配列を得ることができた。

研究成果の概要（英文）：

A random hexapeptide library was screened to identify novel peptide ligands for a TGR5, which is a G-protein-coupled receptor for bioactive steroids. We successfully identified a weak agonist peptide (Ac-WLFLHV-NH<sub>2</sub>) with EC<sub>50</sub> of 630 nM, and a weak antagonist peptide (Ac-WVFLIV-NH<sub>2</sub>) with IC<sub>50</sub> of 15 nM.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：分子薬理学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：(1) Gタンパク質共役受容体 (2) TGR5 (3) GPCR-G $\alpha$ 融合タンパク質

(4)ランダムペプチドライブラリー

## 1. 研究開始当初の背景

Gタンパク質共役受容体（GPCR）は神経伝達物質やホルモンなどを受容体であり臨床薬の60%がターゲットになっているといわれているので、その特異的リガンドの開発がさかんに行われている。しかし化合物ライブラリーからの新規薬物スクリーニング

が必ずしも大きな成果を上げていない現在、戦略的な新規薬物候補の開発方針が模索されている。コンビナトリアルケミストリーによる多数の化合物の合成、あるいはそれによるライブラリーからの新規薬物開発は、一時期、過大な期待をもって薬物開発の戦略として話題となった。一方で、ライブラリーが設

計どおりに合成されているかどうかの検証が困難なこと、ライブラリーのスクリーニングに適した活性測定方法がなかったなどの理由により、現在はそれほど盛んには行われてはいない。ペプチドは合成方法がほぼ確立されており、自動合成機も普及しているのでコンビナトリアルケミストリーの適用対象として好ましい条件を備えている。しかしながら、ペプチドは生体内での分解が早いこと、生理活性を示す新規な配列を同定することが困難なことなどの理由から、一般の有機化合物ほどは薬物開発の対象とならないことが多い。その結果、ペプチドを用いた新規薬物開発は既知生理活性ペプチドとその誘導体を利用した例が一般的であり、生理活性ペプチドとは異なる配列をもつペプチドについては、新規薬物開発の対象としてはあまり見られていなかった。

## 2. 研究の目的

上記のような状況下であっても、我々はペプチドは体内で代謝によって有害成分に変化する可能性がなく安全であり、化学合成手法が確立して確実に合成することができるので、本来は薬の開発に利用できる優れた化合物であると考えている。そこで新規な配列をもつ生理活性ペプチドを戦略的に得る方法を確立することを目指した。原理的に6400万通りの配列をもつ6量体からなるランダムペプチドのライブラリーを合成した。また、このライブラリーのスクリーニングに適したGPCRの活性測定方法として、受容体とGタンパク質 $\alpha$ サブユニットとの融合タンパク質を用いた活性測定系を開発、整備した。

## 3. 研究の方法

ペプチドライブラリーとしては、Ac- $O_1O_2$ XXXX-NH<sub>2</sub>、Ac-XXO<sub>3</sub>O<sub>4</sub>XX-NH<sub>2</sub>、Ac-XXXXO<sub>5</sub>O<sub>6</sub>-NH<sub>2</sub>の配列をもつ1200種類のライブラリー(Xは20種類のアミノ酸の混合物、Oはある特定のアミノ酸)を用意した。この6量体ペプチドからなるペプチドライブラリー全体は原理的には6400万(=20<sup>6</sup>)通りの配列からなる。このライブラリーの活性測定をすることで、活性化が特定されたX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>、X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>、X<sub>5</sub>X<sub>6</sub>のアミノ酸配列を得て、それを組み合わせて二次スクリーニングのためのペプチドのアミノ酸配列を得た。これらの配列を持つペプチドを個別に合成して活性測定した。

活性測定はTGR5-Gs $\alpha$ 融合タンパク質へのアゴニスト依存的な<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S結合活性を測定し定量化することを行った。融合タンパク質を発現した細胞膜懸濁液を<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ Sやペプチドライブラリーと反応させた後、セルハーベスターで融合タンパク質に結合した

[<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ SをGF/Bフィルターに回収した。このGF/Bフィルターに残った<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ Sを液体シンチレーションカウンターで測定した。

## 4. 研究成果

一次スクリーニングでは、それぞれ400種類からなるAc- $O_1O_2$ XXXX-NH<sub>2</sub>、Ac-XXO<sub>3</sub>O<sub>4</sub>XX-NH<sub>2</sub>、Ac-XXXXO<sub>5</sub>O<sub>6</sub>-NH<sub>2</sub>のサブライブラリーをスクリーニングした。この結果をもとに、高い<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ Sの取り込み量が見られたペプチド、すなわちTGR5を活性化してGs $\alpha$ への<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S取り込みを促進させたと考えられるペプチドを選択した。最終的にAc- $O_1O_2$ XXXX-NH<sub>2</sub>の結果から $O_1O_2$ として適しているアミノ酸配列として3種類、Ac-XXO<sub>3</sub>O<sub>4</sub>XX-NH<sub>2</sub>の結果から $O_3O_4$ として適しているアミノ酸配列として2種類、Ac-XXXXO<sub>5</sub>O<sub>6</sub>-NH<sub>2</sub>の結果から $O_5O_6$ として適しているアミノ酸配列として3種類を候補として得た。これらのアミノ酸配列を組み合わせると3x2x3=18通りのペプチドが候補として考えられる。このうち、8種類を実際に合成して二次スクリーニングを行った。そのうち、Ac-WLFLHV-NH<sub>2</sub>の配列からなるペプチドはわずかながらTGR5を活性化するアゴニストとしての性質を示し、そのEC<sub>50</sub>は約630nMであった。また、Ac-WVFLIV-NH<sub>2</sub>の配列からなるペプチドはわずかながらTGR5を不活性化するアンタゴニストとしての性質を示し、そのIC<sub>50</sub>は約15nMであった。

今回の結果では、アゴニストのスクリーニングからアンタゴニストが得られたことが特徴的である。アゴニストのスクリーニングをした配列の組み合わせからアンタゴニストが得られたことは、アゴニスト結合の受容体構造とアンタゴニスト結合の受容体構造がかなり似ていることをしめしている。わずかのリガンドの構造の違いが、アゴニスト結合型の受容体により結合しやすい場合にはアゴニストとして働き、アンタゴニスト結合型の受容体に結合しやすい場合にはアンタゴニストとしてふるまうことになる。我々はこれまでにGPCRの活性化に伴う構造変化を考慮した新しい分子モデルを作成し、GPCRのリガンド認識機構を構造変化と関連させて解析してきた(N. Akuzawa, et al. *J. Biochem. (Tokyo)*, 141, 907-916 (2007))。これらの結果構造変化を考慮したモデルと今回の結果、あるいは変異受容体を作製や解析を総合して、より低濃度で効果を発揮でき、また高い効果を示すアゴニスト、アンタゴニストの設計を行っていく予定である。ペプチドは合成が比較的容易であり、D型アミノ酸や非天然型アミノ酸などの利用により多様な分子設計や合成が可能であるので、合成が容易なさまざまな分子設計を行うことができる。研究計画の最初の段階では、アゴ

ニストを得て抗肥満薬として開発していくことだけを考えていたが、アンタゴニストが得られたこと、またアンタゴニストは家畜の肥育に用いることが利用法として考えられることから、開発可能な新規生理活性物質の範囲は本研究によって大きく広がった。

また、本研究のもう一つの価値はこの方法があらゆるGPCRに対して一般的に応用可能であることが重要である。本研究によりGPCRに対するリガンド開発の一般的なプロトコールが準備可能となる。今後もさまざまなGPCRに本研究の手法を適用して多様な新規活性物質を戦略的に得られるようにしていきたい。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計9件)

- (1) R. Kogure, K. Toyama, S. Hiyamuta, I. Kojima, S. Takeda, 5-Hydroxy-eicosapentaenoic acid is an endogenous GPR119 agonist and enhances glucose-dependent insulin secretion., *Biochem. Biophys. Res. Commun. Biochem.*, **416**, 58 - 63 (2011). (査読有)
- (2) M. Tamakoshi, A. Murakami, M. Sugisawa, K. Tsuneizumi, S. Takeda, T. Saheki, T. Izumi, T. Akiba, K. Mitsuoka, H. Toh, A. Yamashita, F. Arisaka, M. Hattori, T. Oshima, A. Yamagishi, Genomic and proteomic characterization of the large Myoviridae bacteriophage  $\phi$ TMA of the extreme thermophile *Thermus thermophilus*, *Bacteriophage*, **67**, 837-841 (2011). (査読有)
- (3) E. Yamashita, A. Nakagawa, J. Takahashi, K. Tsunoda, S. Yamada, S. Takeda, The host-binding domain of the P2 phage tail spike reveals a trimeric iron-binding structure, *Acta Cryst. F*, **67**, 837-841 (2011).
- (4) H. Suzuki, S. Yamada, Y. Toyama, S. Takeda, The C-terminal domain is sufficient for host-binding activity of the Mu phage tail-spike protein, *Biochim Biophys Acta*, **1804** 1738-1742 (2010).
- (5) Y. Kageyama, M. Murayama, T. Onodera, S. Yamada, H. Fukada, M. Kudou, K. Tsumoto, Y. Toyama, S. Kado, K. Kubota, S. Takeda, Observation of the membrane binding activity and domain structure of

gpV, which comprises the tail spike of bacteriophage P2, *Biochemistry*, **48**, 10129 - 10135 (2009). (査読有)

- (6) M. Kajikawa, K. Sasaki, Y. Wakimoto, M. Toyooka, T. Motohashi, T. Shimojima, S. Takeda, Y. Park, K. Maenaka, Efficient Silkworm Expression of Human GPCR (Nociceptin Receptor) by a *Bombyx mori* Bacmid DNA System, *Biochem. Biophys. Res. Commun. Biochem.*, **385**, 375 - 379 (2009). (査読有)
- (7) M. Tateno, M. Toyooka, Y. Shikano, S. Takeda, N. Kuwabara, H. Sezutsu, T. Tamura, Production and characterization of the recombinant human  $\mu$ -opioid receptor from transgenic silkworms, *J. Biochem. (Tokyo)*, **145**, 37 - 42 (2009). (査読有)
- (8) M. Toyooka, T. Tsujii, S. Takeda, The N-terminal domain of GPR61, an orphan G protein-coupled receptor, is essential for its constitutive activity, *J. Neurosci. Res.*, **87**, 1329 - 1333 (2009). (査読有)

[学会発表] (計11件)

(1)

発表者: 上野 貴志, 外山 吉治, 武田 茂樹  
発表学会: 日本分子生物学会  
発表年月日: 2011年12月16日  
発表課題名: Purification and characterization of gp45, a baseplate subunit for bacteriophage Mu, and its mutants

(2)

発表者: 木暮 亮太, 遠山 和矢, 小島 至, 冷牟田 修一, 武田 茂樹  
発表学会: 日本分子生物学会  
発表年月日: 2011年12月16日  
発表課題名: Identification of a new insulin secretion inducer and determination of its receptor

(3)

発表者: 上野 貴志, 外山 吉治, 武田 茂樹  
発表学会: 日本化学会関東支部群馬地区地域懇談会

発表年月日: 2011年12月10日  
発表課題名: バクテリオファージ Mu 基盤サブユニット gp45 変異体の精製と解析

(4)

発表者: 木暮 亮太, 遠山 和矢, 小島 至, 冷牟田 修一, 武田 茂樹

発表学会：：日本化学会関東支部群馬地区地域懇談会

発表年月日：2011年12月10日

発表課題名：インスリン分泌を促進する化合物の探索と、それに関与する受容体の同定  
(5)

発表者：武田 茂樹

発表学会：ファイブプロバイオ工学セミナー

発表年月日：2011年2月18日

発表課題名：「カイコによるヒト・動物医薬品開発」の近況報告

(6)

発表者：大崎 真希, 武田 茂樹, 若松 馨

発表学会：分子生物学会

発表年月日：2010年12月8日

発表課題名：カイコ発現系を用いたオピオイド $\mu$ 受容体 T4L 融合タンパク質 (MOR-T4L) の発現と可溶化

(7)

発表者：金澤 悠子, 武田 茂樹, 津本 浩平

発表学会：分子生物学会

発表年月日：2010年12月8日

発表課題名：バクテリオファージ Mu 基盤タンパク質 gp46 の X 線結晶解析に向けた精製

(8)

発表者：小山 雄大, 武田 茂樹, 岡部 隆義

発表学会：分子生物学会

発表年月日：2010年12月7日

発表課題名：GPR84 の機能解析を目指したアゴニスト探索

(9)

発表者：武田 茂樹

発表学会：日本繊維機械学会関東支部

発表年月日：2010年11月24日

発表課題名：遺伝子改変カイコによるヒトオピオイド受容体の発現とその解析

(10)

発表者：武田 茂樹

発表学会：高分子学会関東支部 茨城・群馬・栃木地区合同活動講演会

発表年月日：2010年11月5日

発表課題名：生物内でのたんぱく質の超分子構造

(11)

発表者：武田 茂樹

発表学会：大阪大学蛋白質研究所セミナー

発表年月日：2010年9月9日

発表課題名：P2 フェージテイルスパイクタンパク質 gpV の解析

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://chem-bio.gunma-u.ac.jp/~stakeda-lab/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

武田 茂樹 (TAKEDA SHIGEKI)

群馬大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号：80282854