

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：12608

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24657047

研究課題名(和文) ヒトデ卵成熟誘起ホルモン受容体候補として新規同定した複合体タンパクの解析

研究課題名(英文) Analysis of a candidate protein complex for the receptor of the maturation-inducing hormone of starfish oocytes

研究代表者

奥村 英一 (Okumura, Eiichi)

東京工業大学・生命理工学研究科・助教

研究者番号：00323808

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトデ卵成熟誘起ホルモンのシグナル経路の全容解明を目指し、特にシグナル経路の最上流にあって、今なお分子実体が不明であるホルモン受容体の実体解明を目的として、新規材料であるナノアフィニティービーズを用いて受容体の単離・同定に挑戦した。結合蛋白として同定した3つの受容体候補蛋白はrendezvin遺伝子産物であり、翻訳後にfurinによるプロセッシングを受け生成することを解明し、また、rendezvin自身はG蛋白共役型受容体(GPCR)ではなく新規のヒトデGPCRと結合して働く可能性を示した。受容体は、これまでに報告のないユニークな構造を持つ新規GPCR複合体と予測される。

研究成果の概要(英文)：Maturation-inducing hormone (MIH) induces maturation of animal oocytes arrested at pro-phase of first meiosis. Starfish MIH is 1-methyladenine (1-MeAde), which is first identified MIH in a ll animal. Even though there are attempts on identification of the receptor of 1-MeAde, it is only revealed as a G-protein coupled receptor (GPCR) and its molecule is still unclear. I tried the receptor identification using a novel material, high-performance affinity beads (FG-beads or Handa beads). Three proteins are identified as binding proteins. These proteins are coded by a cDNA homologous to the rendezvin gene. Starfish rendezvin has two furin protease sites and furin can process them. Since starfish rendezvin has no 7 transmembrane domain of GPCR, it might bind to some GPCR. A candidate GPCR is cloned for the binding partner of starfish rendezvin. A partial fragment of it binds to rendezvin. I propose 1-methyladenine receptor as a unique protein complex of rendezvin and a novel GPCR.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学、形態・構造

キーワード：ヒトデ 卵成熟 ホルモン 受容体 GPCR ナノアフィニティービーズ 1-メチルアデニン シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

卵成熟誘起ホルモンは卵子形成の最終過程である卵成熟の開始を制御する。卵成熟研究は、マウスやカエル、魚など多くの生物種で研究されているが、卵成熟誘起ホルモンの分子の実体は、海産無脊椎動物であるヒトデで初めて 1-methyladenine(1-MeAde) として解明され (Kanatani H. et al., Nature 1969)、続いて脊椎動物でも異なる構造を持つホルモン分子が国内外で複数報告された。その後、こうしたホルモンの細胞内シグナル伝達の研究が主に進展し、ようやく近年、ホルモン受容体が魚や (Zhu Y. et al., ProNAS USA. 2003)、アフリカツメガエルで (Liat JB et al., J. Mol. Endocrinol. 2007) 報告された。しかし、ヒトデについては、以前より G 蛋白共役型受容体 (GPCR) と予測され (Shilling et al., Dev. Biol., 1989)、上記 2 報と同様の遺伝子クローニングからの受容体同定の試み等があるものの、研究開始当初において、また現在もなお、実体は不明である。卵成熟誘起ホルモンのシグナル経路の解明については、ヒトデが最も進展している。ヒトデ卵成熟ホルモンの細胞内シグナル伝達の主要経路は分子レベルで解明されており、応募者はそのシグナル因子の解析に関わってきた。その全容解明には、シグナル経路の最上流にあって、今なお不明であるヒトデ卵成熟誘起ホルモン受容体の解明が最重要課題である。

2. 研究の目的

申請者は全体構想として、ヒトデ卵成熟誘起ホルモンのシグナル経路の全容解明を目指し、これまでホルモンシグナルの細胞内ターゲットである Cdc2 キナーゼに至るシグナル因子の解析を進めてきた。本研究は、このシグナル経路の最上流にあって、今なお不明であるヒトデ卵成熟誘起ホルモン受容体を、新規材料であるナノアフィニティービーズを用いることで分子的に解明すること

を目的とした。このビーズは、サリドマイドの薬剤ターゲットを明らかにした新素材として知られるナノアフィニティービーズであり、本研究では、このビーズが薬剤ターゲットだけでなく天然ホルモンの受容体同定にも応用できる新たな方法論であることを提示することもねらった。これまで受容体候補として得られている分子は、これまでにないユニークな構造的特色を持つため、ホルモン受容体構造に新規概念を提示する研究の芽生えとなると期待された。

本研究に先立つ予備的実験により、1-MeAde 誘導体を架橋したナノアフィニティービーズに結合する 3 種の受容体候補蛋白質を見出ししていた。さらに、内部アミノ酸配列を複数決定し、その部分配列情報をもとにプライマーを設計し、これらをコードする遺伝子をクローニングした。その結果 3 種の蛋白質は 1 つの遺伝子産物からプロセシングにより生成すると予想された。そこでより具体的な目的としては、それぞれの末端部分の配列を決定することで、切断部位と 3 つの受容体候補蛋白質の一次構造決定を目指した。また、一次構造をもとに蛋白質を発現させ、ホルモンとの結合性や結合に必要な部位を明らかにし、さらに、受容体候補蛋白質の機能解析として、作製抗体を用いて、ウエスタン解析や免疫染色により、蛋白質の存在量や局在様式を明らかにしようとした。また、得られた抗体の 1 つを用いた予備的実験では卵成熟が阻害されたため、受容体候補が真の受容体である可能性が示唆され、特にこの点を研究期間中に確かなものにしようとした。

3. 研究の方法

本研究の手法は、サリドマイドの薬剤ターゲットを明らかにした新素材として知られるナノアフィニティービーズを用いた点に特徴があり、これを用いて上記目的を達成するために以下の方法で研究を実施した。

(1) 受容体候補蛋白質の一次構造の決定

ホルモン誘導体を架橋したナノアフィニティービーズに対する結合蛋白質として同定した3つの受容体候補は、1つの長い遺伝子産物から切断などプロセッシングをうけ生成すると予測された。そこで切断部位解明のため、大量精製を行った。まず、卵成熟誘起ホルモン(1-methyladenine)に活性反応基を付加した誘導体を磁性体封入ラテックスナノビーズに固定化した、アフィニティービーズを調製し、また、受容体を含む卵膜可溶化画分もヒトデ卵から調製し、これらを用いてアフィニティー精製を行った。

精製蛋白質を電気泳動し、3つのビーズ結合蛋白質のN末端アミノ酸配列の解析を外注した。末端配列の情報ならびに遺伝子配列情報からプロセッシングに関わる酵素として furin が予測された。そこで、実際に *in vitro* 切断出来るかを共発現により検討した。

(2) 受容体候補蛋白質の機能解析

3つの蛋白質に対する特異抗体を作成し、複合体として単離されたこれら蛋白質の存在量比や局在様式を確かめた。抗体作成は、全長蛋白質や、N末およびC末端部位を抗原とし、学内生物実験センターにて実施した。得られた抗体を精製・濃縮し、顕微注射装置を用いて、卵成熟開始への影響を調べるために、ヒトデ卵内に顕微注射した。また、顕微注射だけでなくプロネース処理で卵膜を露出させて表層に作用させた。予備的実験で卵成熟を阻害した作成抗体の1つについては、再現性を確認するために抗体のアフィニティー精製等を再度行い機能阻害実験に用いた。

また、結合タンパク質のリコンビナントタンパク質を調製し混合することで、ホルモンへの結合能の解析や、結合に必要なドメインの解析を行った。

(3) 受容体の構成因子と予想される G 蛋白共役型受容体の解析

受容体候補蛋白質は、それ自身は G 蛋白共役型受容体(GPCR)ではなく、別の GPCR と共に働くことが推測された。そこで、受容体候補蛋白質に存在する CUB ドメインと結合が予測されるドメインを持つ GPCR をヒトデ卵 cDNA からクローニングした。GPCR の断片ペプチドが *in vitro* で受容体候補蛋白質と直接結合した。この GPCR が、受容体の構成因子の一つであるかを明らかにするため、GPCR の機能を抗体により阻害できるかを調べた。いくつかの抗原に対して複数の抗体を準備しており、精製抗体を卵表に作用させるか卵に微小注射することで卵成熟の阻害を試みた。

4. 研究成果

本研究は、ヒトデ卵成熟誘起ホルモンのシグナル経路の最上流にあって、今なお不明であるホルモン受容体の分子的实际体を解明することを目的とし、新規材料であるナノアフィニティービーズを用いることでホルモン結合蛋白質を単離精製して構造を決め、さらにその受容体候補蛋白質の解析を行い、以下のような成果を得た。

(1) 受容体候補として単離した3つのビーズ結合蛋白質は、ウニの rendezvin 遺伝子ホモログである一つの遺伝子産物であり、それがプロセッシングにより切断されたと予測された。それらの一次構造を決定するためラージスケールで再精製を行い、N末端アミノ酸配列を分析した。3つのうち2つは、N末端が修飾された、いわゆるブロックされた状態のため、解析不能だった。し

かし、1 つは furin というプロテアーゼのターゲット配列であることが判明した。全長 rendezvin には 2 カ所の furin 切断部位候補が存在し、実際に in vitro で furin 処理すると分子量がほぼ一致する 3 つの蛋白質が生成した。受容体候補蛋白質は、rendezvin 遺伝子産物が、furin によるプロセシングを受け 3 つとなり、2 つの断片については、N 末に何らかの修飾を受ける可能性が示された。

(2) rendezvin に対する特異抗体を作成し、その機能解析を行った。卵表面に精製抗体を作用させる阻害実験により、当初、rendezvin が卵成熟ホルモンシグナルに関わることが示唆されたが、データを確かなものにするため何度か追試を行ったところ、ネガティブな結果もあり、現在も解析を続けている。

(3) furin によるプロセシングで生成すると考えられる 3 つの断片のリコンビナント蛋白質を調製し、1-MeAde ビーズへの結合性を確認したところ、p92 と p97 が単体でも結合能を有することが示唆された。現在、さらにドメインを絞り込む解析を続けている。

(4) rendezvin が受容体として十分かを調べるために、rendezvin mRNA を微小注射し蛋白質高発現により卵成熟が誘起されるか試みたところ、全長の rendezvin 蛋白質は発現したものの、3 つの断片へのプロセシングが起こらず、機能的な構造でないためか卵成熟が誘起されなかった。十分性を示すためには機能的複合体形成が課題といえ、今後、furin mRNA を同時に注射するなどの対策を図りたい。

(5) rendezvin は膜貫通ドメインを有しないため、これが受容体として機能するには、別の G 蛋白共役型受容体(GPCR)である分子と協同的に働くことが予測された。rendezvin の CUB ドメインとアフィニティーを持つ GPCR のスクリーニングから、

rendezvin と結合する新規の GPCR 候補を見出した。そこで、その解析を優先的に行い、結合が予測された部位を持つ GPCR の断片は、in vitro での解析で実際に rendezvin と直接結合できた。現在、この GPCR に対する抗体をいくつか作製している。

(6) 新規 GPCR に対する抗体を用いて卵成熟阻害を試み、予備的結果ではあるが、細胞内ドメインに対する抗体で阻害の兆候が見られ、卵成熟への関与が示唆された。現在、この結果を確かなものにするため、追試を行っている。

(7) rendezvin ならびに新規 GPCR に対して作製した受容体候補蛋白質に対する抗体を使用して、間接蛍光抗体染色を行ったところ、どちらも細胞膜上に存在した。1-MeAde 受容体は以前より膜表層にあると予測されており、その予測と一致した。

以上の結果から、まだ確証とまではいかないまでも、ヒトデ rendezvin が新規 GPCR とともに 1-MeAde 受容体として働く可能性が示されており、ヒトデ卵成熟誘起ホルモン受容体の実体解明に近づきつつある。この受容体は、これまでに報告のないユニークな新規構造を持つ受容体であることが予測される。

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 1 件)

Okumura, E., Morita, A., Wakai, M., Mochida, S., Hara, M. & Kishimoto, T. Cyclin B-Cdk1 inhibits protein phosphatase PP2A-B55 via a Greatwall kinase-independent mechanism. *The Journal of cell biology* **204**, 881-889 (2014).

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 1 件)

Okumura, E., Hara, M. &
Kishimoto, T. Antibody inhibition of
protein activity in starfish oocytes.
Methods in Mol. Biol. **1128**, 311–330
(2014).

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

奥村 英一 (Okumura, Eiichi)
東京工業大学・生命理工学研究科・助教
研究者番号：00323808

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：