

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：17601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659394

研究課題名(和文)新規探索法による新しい循環調節ペプチドの同定と機能解析

研究課題名(英文) Exploring for new bioactive peptides using our novel assays

## 研究代表者

桑迫 健二 (Kuwasaki, Kenji)

宮崎大学・フロンティア科学実験総合センター・准教授

研究者番号：20381098

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)：本研究では、オーファン受容体のリガンド探索の分野では報告例のないアッセイ法(オーファンGPCRがリガンド依存性に必ずcAMP産生し、かつ細胞内移行するストラテジーに基づく新たなアッセイ法)を用いて、循環系に高発現しているヒトのオーファン受容体の新規生理活性ペプチドの探索を試みた。改良型のアッセイ法をさらに見出したが、当初の目標である新規生理活性ペプチドの同定には至らなかった。

研究成果の概要(英文)： The discovery of unknown bioactive peptides can help to clarify the complexity of the circulatory system. In the past 23 years, we have discovered several potent hypotensive and vasopressor peptides (e.g., adrenomedullin, its related peptides and proangiotensin-12). Furthermore, we have clarified the mechanisms of the signaling, trafficking and pathophysiological roles of the receptor activity-modifying protein (RAMP)-interacting G protein-coupled receptors (GPCRs). In this study, we have attempted to identify novel bioactive peptides that may be able to bind to the human orphan GPCRs in the circulatory system. We uniquely constructed several chimeras in which some regions of target orphan GPCRs were replaced with the corresponding regions of some known GPCRs that can powerfully cause agonist-induced cAMP production and internalization. Unfortunately, we were unable to identify any bioactive peptides for the intended purpose.

研究分野：循環器内科学、薬理学

キーワード：新規生理活性ペプチド オーファン受容体 キメラ遺伝子 安定発現株 FACS解析 FRET解析

## 1. 研究開始当初の背景

ゲノムシーケンスが解明された今日でも、グレリンのように修飾基(脂肪酸など)を有する生理活性ペプチドは、我々のように地道に精製して、その構造を決定しなければならない。

オーファンGPCRタンパク質共役型受容体(オーファンGPCR:リガンドが同定されていないGPCRの総称)のリガンド探索法のうち、オーファンGPCRを培養細胞に発現させて天然の組織抽出物からリガンドを探索する方法及びオーファンGPCRと既知物質(GPCR不明)を組み合わせて、リガンドを同定する方法が成功を収めてきた(ここ10年で50種類以上のリガンドが決定された)。現在、臨床薬として使用されている薬物の中で、GPCRのリガンド関連薬物が45%も占めている。従って、残る150種類以上のオーファンGPCRの内在性リガンド探索は大手製薬会社や大学・研究所において新薬開発のための世界的な熾烈な競争的標的となっている。

オーファンGPCRのリガンドのほとんどが、細胞内のセカンドメッセンジャー(cyclic AMPやCa<sup>2+</sup>)を指標に同定されてきた。しかしながら、哺乳類における脱オーファン化は最近停滞気味である。その理由として、オーファンGPCRの細胞内シグナリングや細胞内輸送(細胞膜発現やinternalization)が予測しにくい、GPCRの機能を制御する膜蛋白との複合体形成、非オーファンGPCRとの複合体形成、繁用されてきたアッセイ法の限界などが考えられる。そこで、これらの要因を考慮した、未知の循環調節ペプチドの探索法を思い立った。

## 2. 研究の目的

複雑かつ精巧な循環調節機構をより明確にするためには、未知の生理活性ペプチドを同定することが重要であり、我々は強力な降圧ペプチド(アドレノメデュリンAM:北村ら、

Biochem Biophys Res Commun (BBRC) 1993; AMの関連ペプチド2種:桑迫ら, BBRC 1995; FEBS Letters 1997)と昇圧ペプチド(プロアンジオテンシン-12:永田ら, BBRC 2006)を発見してきた。しかも、循環系のGPCRの構造解析と機能解析で多くの実績がある(桑迫ら, J Biol Chem 2000, 2001, 2003, 2006; Mol Pharmacol 2004; BBRC 2008, 2009, 2010 他多数)。本研究の目的は、これまでに成功例のない探索法を用いて、循環系に高発現しているヒトのオーファンGPCRの未知の生理活性ペプチドを網羅的に同定することである。

## 3. 研究の方法

(1) ヒトオーファンGPCR(OR)の選定と安定発現株の樹立:

ORの選定とクローニング:

残存するORのうち、既知の循環ペプチド系GPCRの構造に限りなく類似し、循環系の臓器での高発現が確認(RT-PCR法)されたものを選定する。それらのGPCRの一部を入手し、残りをPCRでクローニングする。

ORのタグ付き遺伝子の構築:

標的遺伝子の5'端と3'端にそれぞれV5タグ(約10個のアミノ酸)とクラゲの蛍光蛋白(ECFP, EGFP, EYFP)の遺伝子を融合させる。具体的には、ORのある配列(特許の関係上非公開)をある既知のGPCR(特許の関係上非公開)の配列に組換えたキメラのタグ付き遺伝子を構築する。

ORのタグ付き遺伝子の安定発現株の作製:

ORのタグ融合遺伝子をHHEK-293細胞に導入する。その2日後より薬剤選別を開始し、約2週間後に安定発現株のクローン化を行う。FACS解析で蛍光輝度の低い(GPCRの蛋白発現の低い)クローンを下のアッセイに用いる。

(2) 選定したヒトオーファンGPCR(ヒトOR)のリガンド探索:

循環系の組織抽出物の獲得:

ヒトの褐色細胞腫（手術時に入手）もしくはブタの循環系の組織抽出物を大量に獲得する。抽出は当教室で確立した方法を用いる。

ペプチドの精製と構造決定：

各抽出液をゲルろ過、イオン交換クロマトグラフィー、各種逆相 HPLC などに適宜展開して、各分画を下記の方法で定量し、精製を進める。当教室のプロテインシークエンサーと質量分析装置を用いて、最終精製物質の構造を決定する。

未知のペプチドライブラリーの利用：

我々は、このペプチドライブラリーを保有している。ペプチド溶液の各々をオーファン GPCR の各安定発現系に添加して陽性所見を呈したペプチドの構造を決定する。

(3) 独自に発案した探索法の詳細な手順 ( ):

V5-キメラ-EGFP の細胞膜発現の定量及びその結果に基づく安定発現株の作製：

当該遺伝子を HEK-293 細胞に一過性に導入し、V5 タグを認識するローダミン標識抗体を用いて FACS 解析で定量する。十分に細胞膜発現すれば安定発現株を獲得する。細胞膜に発現しない場合、それらの OR を細胞膜に輸送させる修飾蛋白 (MP) もしくは非 OR (NOR) をそれぞれ FACS 解析と FRET 解析でスクリーニングする (下記参照)。OR との複合体形成を確認でき次第、V5-キメラ-EGFP と HA-MP (5' 端に HA タグを付加した MP) の二重安定発現株もしくは V5-キメラ-ECFP と NOR-EYFP の二重安定発現株を獲得する (二重安定発現株の作製法：桑迫ら, J Biol Chem 2000)。

オーファン GPCR (OR) と複合体を形成する修飾蛋白 (MP) と非 OR (NOR) の同定：

A. OR と複合体を形成する MP を同定するための簡易スクリーニング：

これまでに 7 種の 1 回膜貫通型 MP が存在する。例えば、GPCR 活性調節蛋白 (RAMP) は 8 種の GPCR に作用して GPCR の細胞膜輸送やリガンド特異性を制御する。我々は、GPCR に

作用すると MP が小胞体から細胞膜に移行することを FACS 解析で定量することに成功した (桑迫ら, BBRC 2009)。その方法を応用して、標的 OR に作用する既知の MP を全て特定する。

B. OR と複合体を形成する非 OR (NOR) を同定するための簡易スクリーニング：

GPCR 同士の異種 2 量体は、同じ Family 内で形成されることが多い。従って、同じ Family 内で、循環系の代表的な NOR (3' 端に EYFP を融合) と複合体を形成する OR (3' 端に ECFP を融合) を FRET 解析で特定する。

安定発現株でのアッセイ (組織抽出物もしくはペプチド溶液の添加後に施行)：

以下の 2 種のアッセイを並行して行い、陽性所見を呈した分画を順次精製する。

A. 細胞内の cAMP 産生量の測定：

我々が多用している ELISA を用いて測定する (桑迫ら, J Biol Chem 2000; 2006 他)。

B. Internalization (細胞内移行) の測定：

3' 端に EGFP もしくは ECFP を融合させた OR の安定発現株に各組織抽出物を添加し、これらの蛍光蛋白の細胞内移行の有無を蛍光顕微鏡で経時的に観察する。陽性の分画につき、OR の 5' 端に付加した V5 タグを特異的に認識するローダミン標識抗体を加えて FACS 解析で定量し、細胞膜の受容体数が減少した分画の精製を進める (桑迫ら, J Biol Chem 2006 他)。

(4) 構造解析後の生理活性検索：

未知のペプチド場合、体内分布と生理作用 (血圧や動脈硬化、酸化ストレス、心血管リモデリング、虚血時の血管新生などに及ぼす効果など) を明らかにする。既知の場合、GPCR の細胞内情報伝達や構造・活性相関を詳細に調べ、臨床応用を目指す。

#### 4. 研究成果

(1) ヒトオーファン GPCR (OR) の選定と安定発現株の樹立：

独自の RT-PCR で循環系の臓器に高発現しているオーファン GPCR を選定し、PCR によるクローニングを行った。PCR で獲得しにくい遺伝子（一部）は市販のものを購入した。これらの遺伝子の 5' 端と 3' 端にそれぞれ V5 タグとクラゲの各蛍光タンパク質（ECFP, EGFP, EYFP）の遺伝子を融合させた。各々のオーファン受容体のタグ融合遺伝子を HEK-293 細胞に導入し、薬剤選別後にそれぞれ複数のクローンを獲得した。FACS 解析で、蛍光輝度の低いモノクローン（受容体の internalization を惹起しやすいため）であることを確認した。

（2）選定したヒトオーファン GPCR（ヒト OR）のリガンド探索：

ヒトの褐色細胞腫およびブタの循環系の臓器（左心房・左心室・肺・腎臓・副腎）から組織抽出物を大量に獲得した。組織の抽出は、当教室で確立した方法を修飾して行った。これらの組織抽出物を上記の安定発現株に添加して、我々の新規のアッセイ（オーファン GPCR が、必ず cAMP 産生と細胞内移行を惹起するように工夫したアッセイ）を用いて、新規のリガンド探索を試みた。これらの探索法の条件検討を詳細に行ったが、現時点で、目的の新規生理活性ペプチドの発見には至らなかった。

<考察>

今回の新規のリガンド探索法は、リガンドが明らかな非オーファン GPCR では有効であるが、リガンドが同定されていないオーファン GPCR では、既知の低分子化合物（グレリンなど）のようなポジコンが存在すれば、本研究が飛躍的に進展することが期待される。しかし、多くの場合、オーファン GPCR では、そのポジコンがないのが実情である。しかも、非オーファン GPCR の中には、カルシトニン受容体のように高濃度のリガンドを加えて

も細胞内移行しないものも存在する（未発表）。リガンドによる受容体の活性化機構（立体構造の変化）も様々であり、その活性化に重要な部位にクラゲの蛍光タンパク質のような大きなタンパク質を導入すると、受容体の活性化に支障をきたす可能性がある。また、受容体に作用する 1 回膜貫通型の修飾タンパク質（7 種）がリガンドの特異性を規定していることが報告されている。しかも、オーファン GPCR と既知の GPCR が 2 量体を形成することが明らかになってきた。これらが、本研究の目的達成を困難にしている主因であると分析している。

<今後の研究の推進方策>

今回、必ず、cAMP 産生と細胞内移行を惹起する既知の GPCR とオーファン GPCR のキメラ遺伝子を独自に作製することで、オーファン GPCR のリガンドを一網打尽に同定することが出来るものと期待された。今回、標的にした既知の GPCR は、全構造の X 線構造解析はまだ行われていない。従って、その GPCR の構造とキメラの構造の差異がないか検討する必要がある。1999 年にグレリンが発見されて以来、新規生理活性ペプチドは同定されていない。これは、従来の方法では、オーファン GPCR のリガンド同定が困難であることを示唆している。今回、我々が発見した探索法は、1999 年以來の生理活性ペプチドの発見に必ずや寄与し得るものと期待される。そのためには、オーファン GPCR と既知の GPCR のキメラ遺伝子を作製するための連結部分をもう工夫する必要があると考えている。

今後、今回の探索法の改良を重ねて、久方ぶりに新たな循環調節ペプチドを同定していくつもりである。

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）

\* オープン受容体のリガンド探索法の改良・改善もしくはさらなる新規探索法に寄与し得る雑誌論文・学会発表のみ記載した。

〔雑誌論文〕(計 8 件)

1. Murakami M, Suzuki T, Wu TW, Kuwasako K, Takahashi E, Watanabe H, Murakami AM, Miyoshi I, Yanagisawa T, Sasano H, Oono K, Ohba T.: Modified autonomic regulation in mice mutated in the  $\beta 4$  subunit of the Ih/Ih calcium channel. *Biochem Biophys Res Commun* 461: 200-205, 2015. (査読有り)
2. Murakami M, Yoshikawa T, Nakamura T, Ohba T, Matsuzaki Y, Sawamura D, Kuwasako K, Yanagisawa T, Obo K, Nakaji S, Yanai K: Involvement of the histamine H1 receptor in the regulation of sympathetic nerve activity. *Biochem Biophys Res Commun* 458: 584-589, 2015. (査読有り)
3. Kawano S, Kawagoe Y, Kuwasako K, Shimamoto S, Igarashi K, Tokashiki M, Kitamura K, Kato J: Gender-related alterations in plasma adrenomedullin level and its correlation with body weight gain. *Endocr Connect* 4: 43-49, 2015. (査読有り)
4. Kubo K, Tokashiki M, Kuwasako K, Tamura M, Tsuda S, Kubo S, Yoshizawa-Kumagaye K, Kato J, Kitamura K: Boplogical properties of adrenomedullin conjugated with polyethylene glycol. *Peptides* 57: 118-121, 2014. (査読有り)
5. Kuwasako K: The RAMP-interacting Family B G protein-coupled receptors. *Curr Protein & Peptide Sci* 14: 243-245, 2013. (査読有り)
6. Kuwasako K, Hay DL, Nagata S, Murakami N, Kitamura K, Kato J: Functions of the extracellular loop and helix 8 of Family B GPCRs. *Curr Protein & Peptide Sci* 14: 416-428, 2013. (査読有り)
7. Kuwasako K, Kitamura K, Nagata S, Nozaki N, Kato J: Characterization of the single transmembrane domain of human receptor activity-modifying protein 3 in adrenomedullin receptor internalization. *Biochem Biochim Res Commun* 420: 582-587, 2012. (査読有り)

8. Kuwasako K, Hay DL, Nagata S, Hikosaka T, Kitamura K, Kato J: The third extracellular loop of the human calcitonin receptor-like receptor is crucial for the activation of adrenomedullin signalling. *Brit J Pharmacol* 166: 137-150, 2012. (査読有り)

〔学会発表〕(計 11 件)

1. 桑迫健二, 北村和雄, 永田さやか, 加藤丈司: G 蛋白共役型受容体 (GPCR) の重要な細胞内シグナル分子、 $\beta$ -アレスチンの新規作用: 1 型アドレノメデュリン受容体 (AM1 受容体) の細胞内移行の負の制御. 第 88 回日本薬理学会年会、2015 年 3 月 18-20 日 (名古屋) [口頭発表]
2. Kuwasako K, Kitamura K, Nagata S, Kato J: Novel functions of two G protein-coupled receptor kinases: their marked inhibitory effect on adrenomedullin type 1 receptor signaling. The Conference on Bioactive Peptides for Cell-Cell Communication 2014, Kyoto, Sept. 10-12, 2014 [口頭発表] (招待講演)
3. 桑迫健二, 北村和雄, 永田さやか, 加藤丈司: 強力な降圧系 2 型アドレノメデュリン (AM) 受容体の再感作を促進するストラテジーの確立. 第 87 回日本薬理学会年会、2014 年 3 月 19-21 日 (仙台) [口頭発表]
4. 桑迫健二, 北村和雄, 永田さやか, 加藤丈司: 2 型アドレノメデュリン (AM) 受容体の再感作促進法の確立. 第 38 回日本分子生物学会年会、2013 年 12 月 1-4 日 (神戸) [ポスター発表]
5. 桑迫健二, 北村和雄, 永田さやか, 加藤丈司: 2 型アドレノメデュリン受容体の再感作を促進させる一手段. 第 66 回日本薬理学会西部会、2013 年 11 月 16 日 (福岡) [口頭発表]
6. 桑迫健二, 北村和雄, 永田さやか, 野崎尚美, 加藤丈司: G 蛋白共役型受容体 (GPCR) の重要な細胞内シグナル分子、 $\beta$ -アレスチンの新規作用: 1 型アドレノメデュリン (AM) 受容体の細胞内移行の負の制御. 第 36 回日本高血圧学会総会、2014 年 10 月 24-26 日 (大阪) [口頭発表] (高得点演題)
7. 桑迫健二, 北村和雄, 永田さやか, 加藤丈司: CGRP 受容体と 2 つのアドレノメデュリン (AM) 受容体の異なる活性化機構の同

定.

第 86 回日本薬理学会年会、2013 年 3 月  
21-23 日 (福岡) [口頭発表]

8. Kuwasako K, Kitamura K, Nagata S, Kato J:  
Novel functions of G protein-coupled receptor  
kinases: their marked inhibitory effect on  
adrenomedullin signaling.  
24th Scientific Meeting of the International  
Society of Hypertension, Sydney, 30 Sept-4  
Oct 2012 [ポスター発表]
9. Kuwasako K, Kitamura K, Nagata S, Kato J:  
The third extracellular loop of the human  
calcitonin receptor-like receptor (CLR) is  
crucial for the activation of adrenomedullin  
(AM), but not CGRP, signaling.  
第 35 回日本分子生物学会年会、2012 年 12  
月 11-14 日 (福岡) [ポスター発表]
10. 桑迫健二、北村和雄、永田さやか、野崎  
尚美、加藤文司: アドメノメデュリン (AM)  
受容体の再感作を促進するストラテジー.  
第 35 回日本高血圧学会総会、2012 年 9 月  
20-22 日 (名古屋) [口頭発表] (高得点演  
題)
11. 桑迫健二、北村和雄、永田さやか、加藤  
文司: G 蛋白共役型受容体キナーゼ (GRK)  
によるアドメノメデュリン (AM) シグナル  
抑制.  
第 85 回日本内分泌学会総会、2012 年 4 月  
19-21 日 (名古屋) [ポスター発表]

[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://www.med.miyazaki-u.ac.jp/peptides/katou/jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

桑迫 健二 (KUWASAKO KENJI)  
宮崎大学・フロンティア科学実験総合セン  
ター・准教授  
研究者番号: 20381098

### (2) 研究分担者

加藤 文司 (KATO JOHJI)  
宮崎大学・フロンティア科学実験総合セン  
ター・教授  
研究者番号: 20274780

北村 和雄 (KITAMURA KAZUO)  
宮崎大学・医学部・教授  
研究者番号: 50204912

永田 さやか (NAGATA SAYAKA)  
宮崎大学・医学部・特任助教  
研究者番号: 00452920

### (3) 連携研究者

なし