

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：32511

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2015

課題番号：24791518

研究課題名(和文) 成長ホルモン分泌に関わる分子間相互作用を標的とした創薬へのアプローチ

研究課題名(英文) Towards drug development based on molecular interactions involving growth hormone

研究代表者

水谷 晃子 (MIZUTANI, Akiko)

帝京平成大学・健康メディカル学部・講師

研究者番号：80465252

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：改良型酵母ツーハイブリッド法により同定した成長ホルモン(GH)の新規相互作用因子「Protein X」に注目し、Protein XがGH分泌に重要であること、その93アミノ酸領域がGHに結合することを見出した。Protein Xは他のホルモンとも結合するが、GHとの結合とは様式が異なることを観察しており、我々の結果は、GHに特異的な結合阻害ペプチドや化合物デザインへの基盤となり得ると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We identified dozens of novel interactor candidates of human growth hormone (GH) using our improved yeast two-hybrid method, and focused our efforts on the analyses of one of them, referred to here as “protein X”. We first confirmed that protein X is important for GH secretion in cells. We further found that protein X, expressed in *E. coli*, can interact with GH in vitro. The region containing the GH interaction surface of protein X was delineated within a 93-aa region. It has been reported that protein X can also interact with other hormones than GH, but our mutational analyses have revealed that the structure of protein-X interaction surface for GH is different from those for other hormones. The results therefore could provide a basis for designing inhibitor peptides that specifically deteriorate the GH-protein X interaction.

研究分野：分子生物学

キーワード：相互作用 成長ホルモン 分泌 細胞内局在

1. 研究開始当初の背景

ヒト成長ホルモン (GH) をはじめとするペプチドホルモンは、粗面小胞体での合成の後、調節性分泌経路への選別 (sorting)、輸送を経て、各種分泌刺激に応じて開口放出される。分泌細胞における細胞内輸送の分子機構については、低分子 G タンパク質 Rab ファミリー等が細胞膜への融合過程に重要な役割を果たしていることが明らかにされている一方、膜融合の前段階である”調節性分泌経路へのペプチドホルモン選別輸送機構”については不明な点が多かった。

申請者が所属する研究室では、タンパク質間相互作用因子の検出ツールの 1 つである Yeast Two Hybrid 法の改良型が構築されており、GH の合成から分泌に至る過程における新規相互作用候補因子の同定に成功していた (2009 年~2010 年)。同定された相互作用因子の多くは、細胞内輸送への関与が示唆される分子であり、これらの分子が成長ホルモンの調節性分泌経路への輸送、ホルモン凝集過程に関与する可能性が推測された。これらの因子中、先行して研究を開始した新規相互作用因子 Protein X については、(1) AtT-20 細胞における GH との特異的な相互作用、(2) 同細胞における Protein X の細胞内局在、(3) GH の一過性過剰発現条件下における Protein X の発現抑制が GH 分泌に及ぼす効果について予備の実験結果が得られていたので、それらを基盤として本計画を実施した。

2. 研究の目的

改良型 Yeast Two Hybrid 法により GH との相互作用候補因子の 1 つとして同定された Protein X に焦点をあて、(1) GH と Protein X の相互作用表面の、各種変異体を用いての解析、(2) 独自法による、外来性 GH の安定的発現細胞株の樹立に基づく、GH の構成性、調節性分泌における Protein X の役割の解明、の 2 点を中心として、Protein X の GH 分泌における役割を解明すると同時に、「相互作用阻害ペプチド」を創出することにより、機能性下垂体腫瘍の新たな分子標的治療への創薬シーズを確立することを目的とした。

3. 研究の方法

改良型 Yeast Two Hybrid 法により同定された新規 GH 相互作用因子 Protein X と GH の相互作用面を同定するために、Protein X の各種変異体を作成し、GH との相互作用に必須の領域の絞込みを行う。構築するコンストラクトは GH、Protein X とともに Strep-TagII、triple Flag tag または HA tag の融合タンパク質として大腸菌で発現し、Strep-TagII を利用したアフィニティ精製を行う。精製タンパク質を用いた、免疫沈降、ウェスタンブロット法によって、両者の相互作用解析を行い、相互作用に必要な領域を同定する。続いて、変異体解析の結果特定される相互作用表面を対象としたアミノ酸置換変異解析を行い、

低分子化合物への展開が可能になるよう、相互作用に特に重要なアミノ酸残基の絞り込みを行う。また、外来性 GH を安定的に発現する細胞株の樹立については、従来法に比較してより簡便な独自法を開発するとともに、樹立した GH 発現細胞株を用いて、Protein X の GH の分泌刺激に対する効果を検証する。

4. 研究成果

(1) GH-Protein X 間の直接的相互作用の解析

GH-Protein X の相互作用が直接的なものか否かを検討するために、野生型 GH、Protein X それぞれに Strep-TagII、3xFlag または HA タグの融合タンパク質を大腸菌 BL21 (DE3) 株で発現させた。抽出タンパク質をアフィニティ精製した後に、免疫沈降法、Western blot 法による相互作用解析を行った。その結果、大腸菌精製タンパク質間においても培養細胞と同様、GH-Protein X 間での相互作用が確認された。これより、GH-Protein X 間の相互作用は直接的なものであると結論された (図 1)。

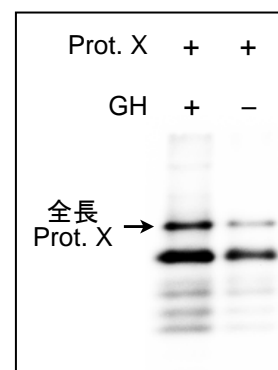


図 1. 大腸菌で発現した Protein X と GH タンパクの共免疫沈降

(2) Protein X の GH 分泌に対する役割の解明

これまでの実験により得られた細胞内 Protein X の一過性遺伝子発現抑制条件下における GH 分泌への効果を基にして、Protein X の GH 分泌への役割をより明確にするために、以下の方法で GH 安定発現細胞株を樹立、当該細胞株における Protein X の恒常的発現抑制時における GH 分泌への効果を検討した。

GH 安定発現細胞株の作製は、細胞内において染色体外遺伝因子として DNA 複製を可能にする染色体断片 Scaffold/Matrix Attachment region (S/MAR) を持つプラスミド (以下、episomal vector) を利用した。Episomal vector による AtT-20 細胞への遺伝子導入により、遺伝子挿入法に比べ短期間で安定発現細胞集団を得ることか可能になった (本実験の場合は、遺伝子導入から安定発現細胞集団の獲得まで約 12 日)。また、Episomal vector を利用した遺伝子安定発現系を用いることにより、一過性遺伝子発現系に比べて導入遺伝子の発現レベルに高い均一性を示す細胞集団を得ることに成功した (図 2)。また、分泌刺激への良好な応答性が認められるとともに、繰り返しの継代にも、安定的に遺伝子発現が認められ、通常の遺伝子挿入法による安定発現細胞株で誘発されがちな、継代に

よる遺伝子サイレンシング等は観察されなかった。

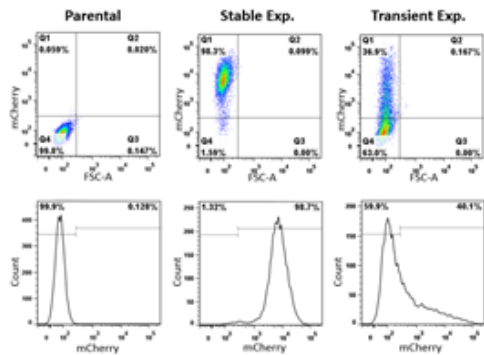


図2. 遺伝子導入法による発現レベルのばらつき

導入した GH 遺伝子は、蛍光タンパク質 (mCherry または mVenus) およびエピトープタグ (3xFlag または HA) の融合タンパク質として発現させ、IRES 配列を介して薬剤体制遺伝子を配置している。これにより、約2週間の薬剤選択により GH 発現細胞集団の選択が可能となり、導入 GH 遺伝子の細胞内局在は、細胞の突起部を中心に蛍光顆粒の集積で確認された (図3)。

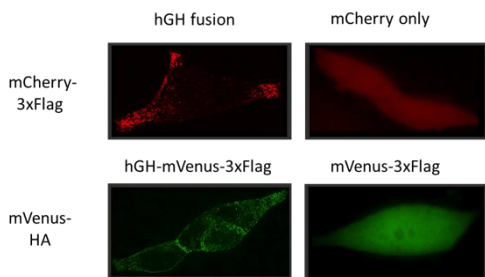


図3. 樹立細胞株における GH の局在

GH は、各種分泌刺激に応答し細胞外分泌を行う「調節性分泌経路」による分泌される一方、無刺激条件下においても細胞外へ分泌されることが確認されている (構成的分泌経路)。siRNA を用いて内在性 Protein X の発現を一過性に抑制した場合、GH の構成的分泌は顕著に抑制される一方、内在性 Protein X の恒常的抑制条件下においては、GH の構成的分泌に対する顕著な効果は見られなかった。これらの結果より、恒常的に細胞内 Protein X の発現を抑制した場合、何らかの補償経路が発動されている可能性が強く示唆される。

(3) ミニマル相互作用領域の同定と、アミノ酸置換の効果

GH-Protein X 間の相互作用の、ペプチド、或いは、小分子化合物による阻害実験への展開を念頭に、この相互作用に必要な Protein X の領域を、大腸菌発現タンパク質を用いた相互作用解析でマッピングした。図4に、欠損型 Protein X シリーズの SyproRuby 染色像を示したが、まず Protein X を N 末側と C 末

側に分離したところ、双方が GH と結合した。従って、Protein X は GH と少なくとも二つの領域で相互作用していると考えられる。Protein X の C 末領域は、Protein X が他のホルモンと相互作用する際に重要であることが知られている。しかし、アミノ酸置換 Protein X を用いた相互作用解析によって、Protein X と GH の相互作用は、他のホルモンとは異なっていることが明らかになった。さらなる欠損型タンパクを用いたマッピングの結果、この C 末領域を 93 アミノ酸領域まで限定することに成功している (図5)。従って、阻害ペプチドのデザイン等、将来的な創薬に向けた研究の展開が可能な段階にある。

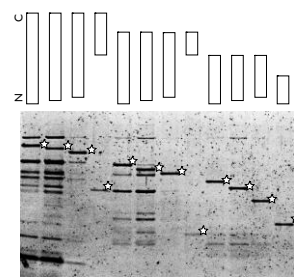


図4. 大腸菌で発現・部分精製した欠損変異型 Protein X

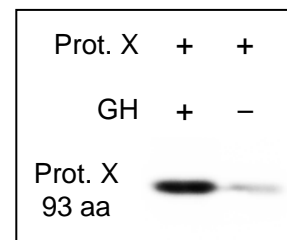


図5. Protein X 93 アミノ酸領域と GH タンパクの相互作用

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計3件)

1. Molecular status of pituitary carcinoma and atypical adenoma that contributes the effectiveness of temozolomide. Matsuno A, Murakami M, Hoya K, Yamada SM, Miyamoto S, Hirohata T, Mizutani A, Ishii Y, Tahara S, Teramoto A, Osamura RY, Med. Mol. Morphol., 査読有, Mar;47(1), pp1-7, 2014

2. Modified S/MAR episomal vectors stably expressing fluorescent protein-tagged transgenes with small cell-to-cell fluctuations. Mizutani A, Kikkawa E, Matsuno A, Shigenari A, Okinaga H, Murakami M, Ishida H, Tanaka M, and Inoko H, Anal. Biochem., 査読有, Dec. 1:443(1), pp113-116, 2013

3. Urinary growth hormone level and insulin-like growth factor-1 standard deviation score (IGF-SDS) can discriminate adult patients with severe growth hormone deficiency. Hirohata T, Saito N, Takano K, Yamada S, Son JH, Yamada SM, Nakaguchi H, Hoya K, Murakami M, Mizutani A, Okinaga H, Matsuno A, Endocr. J. 査読有, 60(3), pp369-373, 2013

〔学会発表〕（計4件）

1. 水谷晃子、猪子英俊、田中正史
外来性遺伝子の安定発現細胞株の確立に適したS/MARエピソームベクターの構築
第38回日本分子生物学会年回、第88回日本生化学会大会 合同大会、神戸ポートアイランド（兵庫県・神戸市）、2015年12月1日
2. 水谷晃子、松野彰、猪子英俊、田中正史
外来性遺伝子の安定発現細胞株の確立に適したS/MARエピソームベクターの構築
第87回日本生化学会大会、京都国際会議場、（京都府・京都市）2014年10月16日
3. 水谷晃子、松野彰、猪子英俊、田中正史
ヒト成長ホルモンの新規相互作用因子の機能解析
第85回日本生化学会大会、福岡国際会議場、マリンメッセ福岡（福岡県・福岡市）、2012年12月14日
4. Mizutani A., Matsuno A., Tanaka M. and Inoko H. Identification of a novel interactor of human growth hormone. 14th International congress of histochemistry and cytochemistry,（京都府・京都市）、2012年8月27日

〔図書〕（計1件）

1. 各論編 第2章 基礎知識D. 下垂体前葉疾患各論 35. 下垂体癌と異型性下垂体腺腫. 松野彰、村上峰子、水谷晃子、平田結喜緒、山田正三、成瀬光栄 編 下垂体疾患診療マニュアル 診断と治療 2012年、p216-218

〔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：なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

水谷 晃子 (MIZUTANI AKIKO)
帝京平成大学・健康メディカル学部・講師
研究者番号：80465252

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

松野 彰 (MATSUNO AKIRA)
帝京大学・医学部・教授
研究者番号：00242058