

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26410182

研究課題名(和文)単量体と二量体の動的平衡状態にあるGPCRが伝達する生物活性情報の特定

研究課題名(英文)Identification of biological activities mediated by GPCR in dynamic equilibrium state of monomer and dimer

研究代表者

兒玉 浩明 (KODAMA, HIROAKI)

佐賀大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：80205418

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：膜受容体の主要タンパク質である7回膜貫通型受容体が二量体構造として存在することについては、今では広く受け入れられているが、同じタンパク質同士や異なる2つのタンパク質が二量化した状態で存在するGPCR二量体の2つのプロトマーの機能を調べる目的で、好中球活性化受容体ホルミルペプチド受容体を取り上げ、2つのサブタイプ選択的リガンドを持つヘテロな二量体の2つのペプチドの新しい挙動を見出した。

研究成果の概要(英文)：Many GTP coupled receptors exists as homodetic and heterodetic dimeric forms on the biological membrane and the functions of two protomers of dimeric GPCR have not been elucidated. To understand the functions of protomers of formyl peptide receptors, heterodetic dimeric peptides of peptides with the high selectivities for two receptor subtypes were synthesized. From the results of biological assays, dimeric peptides interact with the two protomers.

研究分野：化学

キーワード：シグナル伝達 GPCR 二量体 ペプチド合成 活性酸素

1. 研究開始当初の背景

現在臨床で用いられている薬のおよそ半分は、細胞膜上に存在する GPCR を標的としている。この受容体は細胞膜を7回貫通する立体構造を持っているため7回膜貫通型受容体と呼ばれている。GPCR 型受容体が二量体構造として存在することについては、今では広く受け入れられているが、同じタンパク質同士や異なる2つのタンパク質が二量化した状態で存在する GPCR 二量体のシグナル伝達機構、特に GPCR 型受容体の膜貫通部の存在状態、特に受容体タンパク質の二量体構造構築とそのシグナル伝達の役割は明らかになっていない。

二量化 GPCR の構造・機能研究は数多く報告されている。最近では、細胞膜で2分子結合の定量計測が報告され、GPCR は細胞膜上で単量体と二量体が短い時間で行き来しながら存在する動的平衡状態にすることが報告された (Kasai ら, *J. Cell Biol.* 2011)。しかし、GPCR と結合するペプチドリガンド側の研究については、2つのアゴニストを二量化した研究はいくつか報告されているものの、二量体の受容体に、リガンドが二価的に相互作用することを明らかにした研究はない。特に、異なる受容体サブタイプ選択的リガンドをヘテロに二量化した誘導体に関しては、限られた数の報告のみである。選択性の異なる2つのアゴニストをハイブリッドに二量化した研究で、シグナル伝達を解析した例は無い。また、膜貫通ドメインで好中球プライミング作用を有するものは、我々の報告以外他に無く、膜貫通ドメインによる受容体タンパク質調節とプライミング性ペプチドを用いた細胞機能の研究は唯一と考えられる。

2. 研究の目的

我々はこれまでに、二量体を形成した2つの受容体タンパク質に存在する2つのリガンド結合部位は、それぞれ独立して機能するのか、それとも二量体を形成している場合は1つの受容体として振舞うのかについて、2つの同種の活性ファルマコホアペプチド2分子を共有結合により二量化したペプチド研究から明らかにした。

今回は、膜上で二量体を形成している GPCR 型受容体タンパク質の機能構造を解明する目的で、二量体一体型でのみ機能するのか、解離して単量体タンパク質としてリガンドと結合し、シグナル伝達を引き起こすことが可能かを調べた。今回の研究には、好中球活性化受容体ホルミルペプチド受容体を取り上げた。この受容体は、白血球の主成分である好中球を活性化し、遊走、活性酸素放出、タンパク質分解酵素放出などの生理活性発現に関与する。ひと好中球上には FPR1 と FPR2 と呼ばれる2種類のタンパク質のみが発現しており、さらに前述の Kasai らの報告から、受容体が二量体と単量体の平衡状

態で存在することが確かめられているため、本研究の条件に適している。好中球活性化ペプチドの2つのサブタイプにそれぞれ選択的なりガンドを共有結合でヘテロ二量体とし、生物活性評価から二量化受容体の働きを調べた。

3. 研究の方法

研究は、ペプチド化学、分子薬理学、有機合成の3グループが分担領域の研究を進めるだけでなく、各分野の情報共有を密にし、有機的な連携で目的達成に向けて協力していく研究体制で実施した。

ペプチドのデザインと合成：今回新規に開発するヘテロアゴニスト二量体として、ヒト好中球に存在する2種類の受容体サブタイプ FPR1 と FPR2 をそれぞれ選択できるアゴニストを組合せたペプチドを合成した。具体的に FPR1 サブタイプに選択的なアゴニスト Met-Met-Trp-Leu-Leu (MMWLL) と FPR2 サブタイプ選択的アゴニスト Trp-Lys-Tyr-Met-Val-Met-NH₂ (WKYMVM) を組み合わせた。これまでの二量体アナログの合成において、架橋剤として長鎖アルキル、アミノ酸、水溶性を考慮したエチレングリコールが用いられてきた。架橋剤の選択は生理活性だけでなく溶解度に大きな影響を与える。今回は活性測定のため水溶性を保持し、且つ二量体の生体膜との非特異的相互作用の架橋剤としてアミノ酸誘導体を用いた。また、これまでに報告された2つのペプチドの構造活性相関情報から、fMLP はそのC末端側、WKYMVM はN末端を架橋剤との反応点とした。ペプチドは、迅速ペプチド固相合成法により調製した。

生理活性は、ヒト好中球及び分化させたヒト白血病細胞 HL-60 での cytochrome C 法及びルミノール化学発光法による活性酸素生成、ボイデンチャンバーによる遊走活性、エラスターゼ放出、Fura-2 を用いた細胞内カルシウム濃度変化について評価した。得られた生物活性の結果から、より高いサブタイプ選択性を有するペプチド及び細胞実験に供しやすい水溶性などの化学的性質を考慮したペプチドを順次合成した。

4. 研究成果

ヒト好中球上に二量体として存在していると考えられているホルミルペプチド受容体の2つのプロトマーがそれぞれ個別に機能していることを評価する目的で、ホルミルペプチド受容体の2つのサブタイプに選択的な2種類のアゴニストを共有結合で架橋したハイブリッド二量体を合成した。これまでの研究から、架橋部位はペプチドの活性に影響しない部位を選択した。また、架橋剤は架橋するペプチドや合成二量体の溶解度を考慮し、二量体ペプチドをデザインとした。2つのペプチドにシステイン残基を導入し、ジスルフィド結合で架橋したアナログの他

に、ペプチド合成樹脂上で2種類のペプチドをグリシンや長鎖アルキルアミノ酸を用いたタンデムにつないだハイブリッド二量体も合わせて合成した。

合成は迅速固相合成法で行った。得られた化合物の純度と構造は、逆相 HPLC 及び MALDI-TOF MS で評価した。生理活性は、細胞内カルシウム濃度変化として評価した。測定の結果、ハイブリッド二量体は fMLP とほぼ同程度の最大活性を示した。また、二量体ペプチドの2つのペプチド fMLP と WKYMVM がそれぞれのサブタイプと相互作用しているかを調べる目的で、FPR1 と FPR2 のそれぞれに選択的なアンタゴニスト存在下で活性測定を行ったところ、いずれのアンタゴニスト存在下においても二量体ペプチドは高い活性を示した。その結果から、二量体ペプチドのそれぞれのペプチドは FPR の2つのサブタイプのいずれとも相互作用していることが示された。また、二量体ペプチドが二価的に受容体と相互作用していることの示唆を得る目的で、2つのサブタイプ特異的ペプチドを混合して生理活性を測定し、2つのペプチドが単量体として存在している環境での活性を測定し、二量体の活性と比較した。その結果、二量体ペプチドは単純に単量体を混合した系での測定と比較して、有効薬物濃度と最大活性の両方で有意に高い細胞内カルシウム濃度変化の値を示した。一般に、アゴニストは濃度に依存して活性が上昇するが、ペプチドが受容体と相互作用するのに十分な濃度以上では、更にペプチドの濃度を高めても一定の活性を示す。最大活性上昇が低濃度アゴニストの前投与によるブライミングに依存することを確認したが、ヘテロ二量体ペプチドは、分化 HL-60 細胞に対しブライミング活性は示さなかった。この結果から、ヘテロ二量体が単純に2つの単量体として振舞っているのではなく、1分子に2つの薬理学的コアが含まれる分子として、ペプチドが2種類の受容体サブタイプの結合サイトと二価的に相互作用結果していることが期待された。

次に、ヘテロ二量体の結合様式を評価する目的で、二量体の2つのペプチドをそれぞれ不活性化したアナログを新規に合成した。その結果、fMLP の活性発現因子であるホルミル基を除去したアナログはもう1つの活性コアである WKYMVM-NH₂ ペプチドの機能だけが発現され、二量体ペプチドとの差異が明確に判別された。一方、WKYMVM-NH₂ のアミド基の除去や6位を Gly に置換した WKYMVG-OH を持つアナログでは、二量体ペプチドと比較して、明確な活性の変化が観察されなかった。単量体の WKYMVM-OH や WKYMVG-OH は完全に不活性であるため、二量体の異常性が見出された。

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9件)

1. R. Kai, K. Kurihara, Y. Katafuchi, S. Koga, S. Osada, M. Jelokhani-Niaraki, H. Kodama, Syntheses and Biological Activities of Heterodimeric Formyl Peptides Cross-Linked with Amino Acid Residues, *Peptide Science* 2016, 109-110 (2017). 査読付

2. Y. Watanabe, A. Kawasetsu, S. Osada, M. Jelokhani-Niaraki, H. Kodama, Effect of Hinge Sequence on the Ion Channel Activity of Aib-Containing Synthetic Peptides, *Peptide Science* 2016, 111-112 (2017). 査読付

3. T. Iyoda, Y. Nagamine, Y. Nakane, Y. Tokita, S. Akari, K. Otsuka, M. Fujita, K. Itagaki, Y. Takizawa, H. Orita, T. Owaki, J. Taira, R. Hayashi, H. Kodama, F. Fukai, Coadministration of the FNIII14 peptide synergistically augments the anti-cancer activity of chemotherapeutic drugs by activating pro-apoptotic Bim, *PLoS One*, 11(9): e0162525 (2016). 査読付 doi:10.1371/journal.pone.0162525

4. H. Osako, J. Taira, Y. Higashimoto, H. Kodama, S. Osada, Peptide deformylase processable triazole-containing formyl peptide mimetics, *Peptide Science* 2015, 159-162 (2016). 査読付

5. T. Suga, S. Osada, T. Narita, Y. Oishi, H. Kodama, Promotion of cell adhesion by low-molecular-weight hydrogel by Lys based amphiphile. *Mater. Sci. Eng. C*, 47, 345-350 (2015). 査読付 doi: 10.1016/j.msec.2014.11.032

6. R. Hayashi, K. Nakatsui, D. Sugiyama, T. Kitajima, N. Oohara, M. Sugiya, S. Osada, H. Kodama, Antitumor activities of Au(I) complexed with bisphosphines in HL-60 cells, *J. Inorg. Biochem.*, 137, 109-114 (2014). 査読付 doi:10.1016/j.jinorgbio.2014.04.006

7. R. Tanaka, Y. Seki, Y. Saito, S. Kamiya, M. Fujita, H. Okutsu, T. Iyoda, T. Takai, T. Owaki, H. Yajima, J. Taira, R. Hayashi, H. Kodama, T. Matsunaga, F. Fukai, Tenascin-C-derived peptide TNIIIA2 highly enhances cell survival and Platelet-derived Growth Factor (PDGF)-dependent cell proliferation through potentiated and sustained activation of integrin $\alpha 5 \beta 1$, *J. Biol. Chem.*, 289, 17699-17708 (2014). 査読付

doi: 10.1074/jbc.M113.546622

8. H. Urago, T. Suga, T. Hirata, H. Kodama, M. Unno, Raman Optical Activity of a Cyclic Dipeptide Analyzed by Quantum Chemical Calculations Combined with Molecular Dynamics Simulations, *J. Phys. Chem. B*, 118, 6767-6774 (2014). 査読付

doi: 10.1021/jp503874z

9. R. Hayashi, T. Kitajima, H. Mizuguchi, M. Fujimoto, A. Yamaguchi, S. Koga, Y. Koga, S. Osada, H. Kodama, Development of Potent Antagonists for Formyl Peptide Receptor 1 Based on Boc-Phe-D-Leu-Phe-D-Leu-Phe-OH, *Bioorg. Med. Chem.*, 22, 3824-3828 (2014). 査読付

doi: 10.1016/j.bmc.2014.06.048

〔学会発表〕(計 31 件)

1. 渡邊裕大、長田聰史、兒玉浩明、環状テトラペプチドの持つ官能基とイオン選択性、2016年日本化学会中国・四国支部大会、2016年11月5日、香川大学

2. 甲斐涼太、兒玉浩明、ホルミルペプチドのヘテロ二量体化による機能性および生物活性の変化、2016年日本化学会中国・四国支部大会、2016年11月5日、香川大学)

3. R. Kai, K. Kurihara, Y. Katafuchi, S. Koga, S. Osada, M. Jelokhani-Niaraki, H. Kodama, Syntheses and Biological Activities of Heterodimeric Formyl Peptides Cross-Linked with Amino Acid Residues、第 53 回ペプチド討論会、2016 年 10 月 26-28 日、京都テルサ

4. Y. Watanabe, A. Kawasetsu, S. Osada, M. Jelokhani-Niaraki, H. Kodama, Effect of Hinge Sequence on the Ion Channel Activity of Aib-Containing Synthetic Peptides、第 53 回ペプチド討論会、2016 年 10 月 26-28 日、京都テルサ

5. 古川旺、平順一、兒玉浩明、長田聰史、トリアゾール含有 peptide deformylase 阻害剤の合成と評価、第 53 回化学関連支部合同九州大会、2016 年 7 月 2 日、北九州国際会議場

6. 兒玉美瑛、平順一、兒玉浩明、長田聰史、Peptide deformylase に認識されるトリアゾール含有擬ペプチド性基質の探索、第 53 回化学関連支部合同九州大会、2016 年 7 月 2 日、北九州国際会議場

7. 甲斐涼太、栗原滉季、長田聰史、兒玉浩明、ホルミルペプチドヘテロ二量体の生物活性における架橋残基の効果、第 53 回化学関

連支部合同九州大会、2016 年 7 月 2 日、北九州国際会議場、北九州市

8. 矢津田祐介、栗原滉季、兒玉浩明、長田聰史、光架橋アミノ酸を含む FPR2 アンタゴニストの構造活性相関、第 53 回化学関連支部合同九州大会、2016 年 7 月 2 日、北九州国際会議場

9. 渡邊裕大、長田聰史、兒玉浩明、両性イオンをもつ環状テトラペプチドの合成とイオンチャンネル活性、第 53 回化学関連支部合同九州大会、2016 年 7 月 2 日、北九州国際会議場

10. 甲斐涼太、長田聰史、兒玉浩明、Glu 残基で架橋したホルミルペプチドヘテロ二量体の合成と生物活性、平成 28 年度 日本化学会九州支部例会、2016 年 5 月 14 日、鹿児島大学、鹿児島市

11. 川節あかね、渡邊裕大、Jelokhani-Niaraki Masoud、長田聰史、兒玉浩明、折れ曲がり配列を持つ Aib ペプチドの合成とイオンチャンネル活性、日本化学会第 96 春季年会、2016 年 3 月 26 日、同志社大学

12. K. Arima, K. Kurihara, H. Kodama, S. Osada, Agonistic and Antagonistic properties of triazole-containing non-formyl peptides against formyl peptide receptor, 日本化学会 第 96 春季年会、2016 年 3 月 26 日、同志社大学

13. H. Osako, J. Taira, Y. Higashimoto, H. Kodama, S. Osada, Peptide deformylase processable triazole-containing formyl peptide mimetics、第 52 回日本ペプチド討論会、2015 年 11 月 16 日、平塚中央公民館

14. 川島季晋、兒玉浩明、長田聰史、Z 体選択的フルオロオレフィン合成のための新規 Julia 反応剤、第 52 回化学関連支部合同九州大会、2015 年 6 月 27 日、北九州国際会議場

15. 矢野孝行、兒玉浩明、長田聰史、S-リボシルホモシステインミミックの合成研究、第 52 回化学関連支部合同九州大会、2015 年 6 月 27 日、北九州国際会議場

16. 大迫拓輝、兒玉浩明、長田聰史、Peptide deformylase によって活性化される MetAP 阻害候補化合物、第 52 回化学関連支部合同九州大会、2015 年 6 月 27 日、北九州国際会議場

17. 渡邊裕大、川節あかね、長田聰史、兒玉浩明、環状オクタペプチドの側鎖構造とイオンチャンネル活性、第 52 回化学関連支部合同

九州大会、2015年6月27日、北九州国際会議場

18. 栗原滉季、片淵友加里、古賀裕也、長田聰史、兒玉浩明、異なる FPR サブタイプに選択性を持つペプチド二量体の鎖長依存性、第 52 回化学関連支部合同九州大会、2015 年 6 月 27 日、北九州国際会議場

19. 片淵友加里、古賀裕也、林良、長田聰史、藤田一郎、兒玉浩明、GPCR ヘテロマーを構成するプロトマーの機能検索、2014 年日本化学会中国四国支部大会、2014 年 11 月 8-9 日、山口大学

20. 川節あかね、林良、長田聰史、兒玉浩明、アラメチン型イオンチャンネル形成因子の検索、2014 年日本化学会中国四国支部大会、2014 年 11 月 8-9 日、山口大学

21. 山口彩、古賀裕也、林良、藤田一郎、長田聰史、兒玉浩明、ホルミルペプチドアンタゴニスト WRW4 の構造活性相関、2014 年日本化学会中国四国支部大会、2014 年 11 月 8-9 日、山口大学

22. 栗原滉季、片淵友加里、古賀裕也、長田聰史、兒玉浩明、2 つの FPR と相互作用するヘテロ二量体ペプチドの one-pot 合成、2014 年日本化学会中国四国支部大会、2014 年 11 月 8-9 日、山口大学

23. 渡邊裕大、川節あかね、小柳侑也、長田聰史、兒玉浩明、イオンチャンネルを形成する環状オクタペプチドの合成と性質、2014 年日本化学会中国四国支部大会、2014 年 11 月 8-9 日、山口大学

24. 川節あかね、林良、平順一、東元祐一郎、長田聰史、兒玉浩明、Pro 残基をもつ Aib モデルペプチドの合成とイオンチャンネル活性、第 87 回日本生化学会大会、2014 年 10 月 15 日-18 日、国立京都国際会館

25. 片淵友加里、古賀裕也、林良、長田聰史、藤田一郎、兒玉浩明、サブタイプ選択的ホルミルペプチドの二量体合成と生物活性、第 87 回日本生化学会大会、2014 年 10 月 15 日-18 日、国立京都国際会館

26. 古賀裕也、林良、長田聰史、藤田一郎、浜崎雄平、兒玉浩明、好中球プライミングを引き起こす FPR1 膜貫通ペプチドの活性発現構造の検索、第 51 回化学関連支部合同九州大会、2014 年 6 月 28 日、北九州国際会議場

27. 川節あかね、小柳侑也、林良、長田聰史、兒玉浩明、N 末端に Pro 残基をもつペプチドの合成とイオンチャンネル活性、第 51 回化学関連支部合同九州大会、2014 年 6 月 28 日、

北九州国際会議場

28. 片淵友加里、瀬戸知歩、古賀脩一郎、古賀裕也、林良、長田聰史、藤田一郎、浜崎雄平、兒玉浩明、FPR 選択的アゴニスト二量体の合成と生物活性、第 51 回化学関連支部合同九州大会、2014 年 6 月 28 日、北九州国際会議場

29. 山口彩、古賀裕也、古賀脩一郎、林良、藤田一郎、浜崎雄平、長田聰史、兒玉浩明、Boc-FIFIF の 5 位アミノ酸置換アナログの合成と生物活性、第 51 回化学関連支部合同九州大会(2014 年 6 月 28 日、北九州国際会議場、北九州市)

30. 田久保伸弥、林良、長田聰史、兒玉浩明、ジベンジル型 SAHA アナログの合成と生理活性評価、第 51 回化学関連支部合同九州大会、2014 年 6 月 28 日、北九州国際会議場

31. 大迫拓輝、林良、兒玉浩明、長田聰史、PDF で活性化される MetAP 阻害剤の探索、第 51 回化学関連支部合同九州大会、2014 年 6 月 28 日、北九州国際会議場

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称: DGF 依存性細胞増殖制御剤、PDGF 依存性細胞増殖の制御方法、細胞分散抑制剤、細胞分散の制御方法、テモゾロミド活性増強剤及び抗腫瘍剤

発明者: 深井文雄、山本哲哉、兒玉浩明
権利者: 東京理科大学、筑波大学、佐賀大学
種類: 特許

番号: PCT/JP2015/067651

出願年月日: 2015 年 6 月 18 日

国内外の別: 国外

取得状況(計 1 件)

名称: 抗癌剤の活性増強剤
発明者: 深井文雄、兒玉浩明、松永卓也
権利者: 東京理科大学、佐賀大学、香川大学
種類: 特許

番号: 9.327.013

出願年月日: 2016 年 5 月 3 日

国内外の別: 国外

〔その他〕

<http://research.dl.saga-u.ac.jp/profile/ja.384bd62cd3fad21d.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

兒玉 浩明 (KODAMA HIROAKI)

佐賀大学・工学系研究科・教授

研究者番号: 80205418

(2) 研究分担者

長田聰史 (OSADA SATOSHI)

佐賀大学・工学系研究科・准教授
研究者番号：50284609