

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 17 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460333

研究課題名(和文) -アレスチン偏向性オーファンGPCRに特化した次世代ペプチド性リガンド探索

研究課題名(英文) Screening for peptide ligands that activate beta-arrestin biased cell signaling of orphan GPCRs

研究代表者

熊谷 英敏 (Kumagai, Hidetoshi)

東京大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号：20281008

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：Gタンパク質共役型受容体のなかで残存するオーファン受容体(およそ90種類)の内因性リガンド探索研究の推進を目指し、受容体下流の独立した二つのシグナル伝達経路(Gタンパク質経路および-アレスチン経路)を用いて新規アッセイ系の開発を行った。-アレスチンシグナルを検出するアッセイ系は、酵素コンプリメンテーション法を用いて最適化し、網羅的スクリーニングに適応可能な独自のアッセイ系を確立した。Gタンパク質シグナルは、これまで検出が煩雑であった種々のGタンパク質サブユニットシグナルを簡便に検出する新規アッセイ系の樹立に成功した。両アッセイ系を併用して内因性リガンドのスクリーニングを進めている。

研究成果の概要(英文)：Our purpose of this study is to identify endogenous ligands for orphan GPCRs by newly developed screening systems. We utilized two intracellular signaling pathways, G-proteins and -arrestin for detection of GPCR activation. To detect -arrestin signaling, we monitored the ligand activated GPCR-mediated -arrestin recruitment by using enzymatic complementation of E. coli -galactosidase, alpha and omega fragments. In terms of detection of G-protein signaling, we generated a new technology that simply monitoring activities of any G-protein alpha subunits leading to minimization of experimental steps. We have optimized these assay systems suitable for high throughput screening and being conducting the screening.

研究分野：分子薬理学

キーワード：GPCR Gタンパク質 -アレスチン 生理活性ペプチド

1. 研究開始当初の背景

上市されている医薬品の約4割がGタンパク質共役型受容体(GPCR)を標的分子としていることから、ゲノム科学の進展により見出された無数のオーファンGPCR群は、革新的医薬品開発に繋がる宝庫と考えられた。それらのオーファン受容体の生理機能を明らかにする目的で、内因性リガンドの探索研究が1990年代中頃から盛んに行われるようになり、探索研究黎明期の5、6年の内に、生理活性ペプチド、脂質、代謝産物等を含む、多数の新規なりガンド-受容体ペアが報告され、実際に、新規医薬品開発に貢献しているものもある。その後、従来の方法論による新規リガンド-受容体ペアの同定は、2000年代前半にはもはや頭打ちとなり、ペプチド性リガンドについては2005年のNeuromedin S以降報告が無い。しかしながら、ロドプシン型GPCRに限定しても未だに90種類ほどのオーファン受容体が残されていることから、本研究分野の推進に新たな視点に基づく革新的研究手法が望まれていた。

2. 研究の目的

-アレスチンは、当初、リガンドにより活性化されたGPCRを脱感作する際に働く分子と考えられていた。しかし近年になって、-アレスチン依存的にMAPキナーゼの活性化が引き起こされることや、-アレスチン経路のみを選択的に活性化する人工リガンドや受容体が見出されたことから、-アレスチン経路は、むしろ、Gタンパク質非依存性GPCRシグナル伝達経路として積極的に生理的役割を担っている可能性が認識されている。

このような背景の下、申請者は、内因性リガンド探索研究で汎用されていたGタンパク質の活性化に依存したシグナル経路を指標とした従来のスクリーニング系に替えて、-アレスチン経路に特化したスクリーニング系を確立することに思い至った。そこで、GPCRと-アレスチンの相互作用を簡便に測定するアッセイ系を構築し、多数のオーファンGPCRを迅速に評価する大規模スクリーニング系を樹立した。そこで、「残存するオーファンGPCRの一部は-アレスチンバイアスド受容体である」との作業仮説のもと、残されている70種類ほどのロドプシン型オーファンGPCRに-アレスチン経路の活性化を特異的な指標としたスクリーニングを迅速かつ網羅的に行い、新たなリガンド-受容体ペアの同定を目指す。

3. 研究の方法

オーファンGPCRの内因性リガンド探索研究は、標的受容体の活性検出方法の樹立と検体とするペプチド画分の調製の二つに大別できる。残存する90種類ほどのロドプシン型オーファンGPCRの全てを標的受容体とするために、カセット化した遺伝子発現ベ

クターにオーファン受容体のopen reading frameを挿入し、GPCR- β -アレスチン複合体形成を定量するアッセイ系に供する受容体遺伝子ライブラリーを作製する。検体とするペプチド画分は各種生体臓器から抽出し、逆相系とイオン交換系を組み合わせた多次元高速液体クロマトグラフィーで分画、調製する。これらのペプチド画分を、作製したオーファン受容体ライブラリーを用いて系統的にスクリーニングし、リガンド-受容体ペアの同定を目指す。同定後は、ペプチド性リガンドと受容体遺伝子の生体内での時空間的発現及びその制御情報をin situハイブリダイゼーション法を用いて検討する。その後、発現部位特異的にLoss of function或はGain of functionの検討を行い、生理作用の同定を試みる。

4. 研究成果

オーファンGPCRのなかでロドプシン型に属する受容体は、90種類ほどが同定されている。このなかで、ヒトとマウスの間でオルソログ対応が困難なMAS related gene受容体ファミリー、Trace amine受容体ファミリーを除く70種類ほどを内因性リガンド探索研究の対象受容体として選定した。それらのオーファンGPCRを独自に開発した酵素コンプリメンテーション法に基づくGPCRと-アレスチンの相互作用を評価するアッセイ系に供するために、オーファンGPCRのオープンリーディングフレームをクローニングし、遺伝子発現ライブラリーを構築した。実際にリガンドスクリーニングを開始する前に、確立した-アレスチンアッセイ系の汎用性をリガンド既知のおよそ100種類のGPCRを用いて評価したところ、リガンド依存性の活性化を検出できた受容体はおよそ半数に留まったことから、Gタンパク質経路に対するアッセイ系の運用を検討した。

リガンドが未同定であるオーファンGPCRは、標的とする受容体の一次構造から活性化されるGタンパク質経路を予測することは困難であるため、これまではGタンパク質経路の評価は複数のアッセイ系を併行せざるを得なかった。そこで、スクリーニングにおいて問題となるこのような煩雑さを解決できる汎用性の高いアッセイ系の開発を試みた。新たに樹立したアッセイ系はマイクロプレートを用いてワンステップで施行できることから秀逸であることが明らかとなった。今後、両アッセイ系を運用してGPCRリガンドスクリーニングを継続していく予定である。

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)

[雑誌論文](計21件)

1. Takanashi M, Taira Y, Okazaki S,

- Takase S, Kimura T, Li CC, Xu PF, Noda A, Sakata I, Kumagai H, Ikeda Y, Iizuka Y, Yahagi N, Shimano H, Osuga JI, Ishibashi S, Kadowaki T, Okazaki H, Role of Hormone-sensitive Lipase in Leptin-Promoted Fat Loss and Glucose Lowering, *J Atheroscler Thromb*, 査読有、 In press、 2017、 doi: 10.5551/jat.39552
2. Nagata N, Iwanari H, Kumagai H, Kusano-Arai O, Ikeda Y, Aritake K, Hamakubo T, Urade Y, Generation and characterization of an antagonistic monoclonal antibody against an extracellular domain of mouse DP2 (CRTH2/GPR44) receptors for prostaglandin D2, *PLoS One*, 査読有、 12(4), 2017, e017542、 doi: 10.1371/journal.pone.0175452
 3. Kamo T, Akazawa H, Suda W, Saga-Kamo A, Shimizu Y, Yagi H, Liu Q, Nomura S, Naito AT, Takeda N, Harada M, Toko H, Kumagai H, Ikeda Y, Takimoto E, Suzuki JI, Honda K, Morita H, Hattori M, Komuro I, Dysbiosis and compositional alterations with aging in the gut microbiota of patients with heart failure, *PLoS One*, 査読有、 12(3), 2017, e0174099、 doi: 10.1371/journal.pone.0174099
 4. Watanabe R, Suzuki JI, Wakayama K, Maejima Y, Shimamura M, Koriyama H, Nakagami H, Kumagai H, Ikeda Y, Akazawa H, Morishita R, Komuro I, Isobe M, A peptide vaccine targeting angiotensin II attenuates the cardiac dysfunction induced by myocardial infarction, *Sci Rep*, 査読有、 7, 2017, 43920, doi: 10.1038/srep43920
 5. Suzuki JI, Sato H, Kaneko M, Yoshida A, Aoyama N, Akimoto S, Wakayama K, Kumagai H, Ikeda Y, Akazawa H, Izumi Y, Isobe M, Komuro I, Periodontitis and myocardial hypertrophy, *Hypertens Res*, 査読有、 40(4), 2017, 324-328、 doi: 10.1038/hr.2016.146
 6. Zempo H, Suzuki JI, Watanabe R, Wakayama K, Kumagai H, Ikeda Y, Akazawa H, Komuro I, Isobe M, Corrigendum: Cacao polyphenols ameliorate autoimmune myocarditis in mice, *Hypertens Res*, 査読有、 39(11), 2017, 828, doi: 10.1038/hr.2016.108
 7. Sato H, Suzuki JI, Aoyama N, Watanabe R, Kaneko M, Shiheido Y, Yoshida A, Wakayama K, Kumagai H, Ikeda Y, Akazawa H, Komuro I, Isobe M, Izumi Y, A Periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis* deteriorates Isoproterenol-Induced myocardial remodeling in mice, *Hypertens Res*, 査読有、 40(1), 2017, 35-40、 doi: 10.1038/hr.2016
 8. Suzuki J, Imai Y, Aoki M, Fujita D, Takeda N, Aoyama N, Wakayama K, Ikeda Y, Kumagai H, Akazawa H, Izumi Y, Isobe M, Komuro I, Hirata Y, Periodontitis May Deteriorate Sinus of Valsalva Dilatation in Marfan Syndrome Patients, *Int Heart J*, 査読有、 57(4), 2016, 456-60、 doi: 10.1536/ihj.15-395
 9. Kobayashi N, Suzuki JI, Aoyama N, Sato H, Akimoto S, Wakayama K, Kumagai H, Ikeda Y, Akazawa H, Komuro I, Izumi Y, Isobe M, Toll-like receptor 4 signaling has a critical role in *Porphyromonas gingivalis*-accelerated neointimal formation after arterial injury in mice, *Hypertens Res*, 査読有、 39(10), 2016, 717-722, doi: 10.1038/hr.2016.58
 10. Ikeda Y, Kumagai H, Motozawa Y, Suzuki J, Akazawa H, Komuro I, Understanding Vascular Diseases: Lessons From Premature Aging Syndromes, *Can J Cardiol*, 査読有、 32(5), 2016, 650-8、 doi: 10.1016/j.cjca.2015.12.003
 11. Ikeda Y, Kumagai H, Motozawa Y, Suzuki J, Growth Differentiation Factor 15 (GDF15) as a Reliable Biomarker for Cardiovascular Risk Assessment, *Int Heart J*, 査読有、 57(1), 2016, 1-2, doi: 10.1536/ihj.15-324
 12. Zempo H, Suzuki J, Watanabe R, Wakayama K, Kumagai H, Ikeda Y, Akazawa H, Komuro I, Isobe M, Cacao polyphenols ameliorate autoimmune myocarditis in mice, *Hypertens Res*, 査読有、 39(4), 2016, 203-9、 doi: 10.1038/hr.2015.136
 13. Watanabe R, Suzuki J, Wakayama K, Kumagai H, Ikeda Y, Akazawa H, Komuro I, Isobe M, Angiotensin II receptor blocker irbesartan attenuates cardiac dysfunction induced by myocardial infarction in the presence of renal failure, *Hypertens Res*, 査読有、 39(4), 2016, 237-44、 doi: 10.1038/hr.2015.141
 14. Suzuki J, Shimamura M, Suda H, Wakayama K, Kumagai H, Ikeda Y, Akazawa H, Isobe M, Komuro I, Morishita R, Current therapies and investigational drugs for peripheral arterial disease, *Hypertens Res*, 査読有、 39(4), 2016, 183-91、 doi:

- 10.1038/hr.2015.134
15. Ikeda Y, Kumagai H, Motozawa Y, Suzuki J, Komuro I, Next Generation ARBs. Going Beyond Modulation of the Renin-Angiotensin System, *Int Heart J*, 査読有、56(6), 2015, 585-6、doi: 10.1536/ihj.15-295
 16. Nagahara T, Saitoh T, Kutsumura N, Irukayama-Tomobe Y, Ogawa Y, Kuroda D, Gouda H, Kumagai H, Fujii H, Yanagisawa M, Nagase H, Design and Synthesis of Non-Peptide, Selective Orexin Receptor 2 Agonists, *J Med Chem*, 査読有、58(20), 2015, 7931-7、doi: 10.1021/acs.jmedchem.5b00988
 17. Nakayama A, Morita H, Nakao T, Yamaguchi T, Sumida T, Ikeda Y, Kumagai H, Motozawa Y, Takahashi T, Imaizumi A, Hashimoto T, Nagai R, Komuro I, A Food-Derived Flavonoid Luteolin Protects against Angiotensin II-Induced Cardiac Remodeling, *PLoS One*, 査読有、10(9), 2015, e0137106、doi: 10.1371/journal.pone.0137106
 18. Ikeda Y, Kumagai H, Motozawa Y, Suzuki J, Komuro I, Biased Agonism of the Angiotensin II Type I Receptor, *Int Heart J*, 査読有、56(5), 2015, 485-8、doi: 10.1536/ihj.15-256
 19. Motozawa Y, Uozumi H, Maemura S, Nakata R, Yamamoto K, Takizawa M, Kumagai H, Ikeda Y, Komuro I, Ikenouchi H: Acute Myocardial Infarction That Resulted From Poor Adherence to Medical Treatment for Giant Coronary Aneurysm. *Int Heart J*. 56(5): 551-4, 2015
 20. Ikeda Y, Kumagai H, Okazaki H, Fujishiro M, Motozawa Y, Nomura S, Takeda N, Toko H, Takimoto E, Akazawa H, Morita H, Suzuki J, Yamazaki T, Komuro I, Yanagisawa M, Monitoring α -arrestin recruitment via α -lactamase enzyme fragment complementation: purification of peptide E as a low-affinity ligand for mammalian bombesin receptors, *PLoS One*, 査読有、10(6), 2015, e0127445、doi: 10.1371/journal.pone.0127445
 21. Kumagai H, Ikeda Y, Motozawa Y, Fujishiro M, Okamura T, Fujio K, Okazaki H, Nomura S, Takeda N, Harada M, Toko H, Takimoto E, Akazawa H, Morita H, Suzuki J, Yamazaki T, Yamamoto K, Komuro I, Yanagisawa M、Quantitative Measurement of GPCR Endocytosis via Pulse-Chase Covalent Labeling, *PLoS One*, 査読有、10(5), 2015, e0129394、

doi: 10.1371/journal.pone.0129394

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔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
 熊谷 英敏 (KUMAGAI, Hidetoshi)
 東京大学・医学部附属病院・特任助教
 研究者番号：20281008

(2)研究分担者
 ()

研究者番号：

(3)連携研究者
 柳沢 正史 (YANAGISAWA, Masashi)
 国際統合睡眠医科学研究機構・教授
 研究者番号：20202369

(4)研究協力者
 ()