

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：84404

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461400

研究課題名(和文) 三量体Gタンパク質G12/13を活性化する新規生理活性ペプチドの同定と機能解析

研究課題名(英文) The search for the novel bioactive peptide that activates G protein-coupled receptor coupled to G12/13 proteins

研究代表者

森 美和 (MORI, Miwa)

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・特任研究員

研究者番号：50363148

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)：三量体Gタンパク質G12/13に共役するGタンパク質共役型受容体を介して機能する生理活性ペプチドが存在するが、これまでG12/13シグナル伝達系の活性化に着目した新規生理活性ペプチドの探索は困難であった。そこで本研究では、レポーター遺伝子を駆使した簡便かつ高感度なG12/13シグナル伝達系のハイスループット活性測定法が、動物組織抽出物からの生理活性ペプチドの探索に適することを確認した。この活性測定法を導入することにより、いくつかのオーファンGタンパク質共役型受容体について内因性リガンドとなりうる新規生理活性ペプチドの探索を実施している。

研究成果の概要(英文)：There are some G protein-coupled receptors (GPCR) coupled to G12/13 protein, such as endothelin B receptor and angiotensin 1 receptor. However, the search of novel bioactive peptide based on the activation of G12/13 signaling pathway has not been successful so far, because it has been difficult to easily detect such activation.

The SRF-RE luciferase reporter is activated in response to activation of GPCR coupled to G12/13 protein. In this study, it was demonstrated that this reporter gene assay is suitable to search novel bioactive peptide that activates G12/13 signaling pathway through GPCR. This assay was detected that endothelin-1 induced dose-dependent, robust increase in SRF-RE reporter activity in HEK293 cells expressing endothelin B receptor with EC50 of 0.3nM, indicating that the sensitivity of this assay is sufficient for searching the novel bioactive peptide. Therefore, we are searching the novel bioactive peptide as endogenous ligand for orphan GPCRs by using this assay.

研究分野：生化学、ペプチド化学

キーワード：内分泌 生理活性ペプチド 受容体

1. 研究開始当初の背景

生理活性ペプチドは、細胞間の情報伝達を担う主要な分子であり、ホルモンとしての内分泌的調節に加え、神経ペプチドとして摂食、飲水、性行動及び睡眠覚醒などの本能行動や、生体の恒常性を維持するための自律機能を調節するなど、生体機能の調節において広範かつ重要な役割を果たしているため、新規生理活性ペプチドの発見とそれに続く機能解析により、新しい生体調節機構を明らかにすることができる。さらには、新規生理活性ペプチドの病態生理的意義を確立することにより、臨床応用へと展開することも可能である。

生理活性ペプチドの探索研究の歴史は長く、非常に激しい競争が世界中で繰り広げられており、現在では様々な手法による多面的なアプローチにより探索が試みられている。しかしながら、生理活性ペプチドの主要な探索法は、ホルモン様活性やオーファン G タンパク質共役型受容体の活性化など“ペプチド自身が有する活性”を指標とした精製と構造解析による探索である。この手法によって、オレキシン(引用文献)やグレリン(引用文献)も発見されており、それぞれが関与する睡眠覚醒や摂食・エネルギー代謝の新しい調節機構が解明されてきた。またこれらの例のように、生理活性ペプチドの探索研究の成果は、国際的にも非常に高く評価されている。

研究代表者の所属する研究室では、生理活性ペプチドの活性を検出するアッセイ法を新たに開発・導入することによって、数多くの新規生理活性ペプチドを継続的に発見してきた。具体的には、1980年代前半の平滑筋の弛緩・収縮アッセイの開発によりナトリウム利尿ペプチドファミリー(ANP、BNP、CNP)と6種類のニューロメジンを、1990年代のcAMPのラジオイムノアッセイの導入によりアドレノメデュリンを、1990年代後半から2000年代にかけてのオーファン G タンパク質共役型受容体の内因性リガンド探索によりグレリンとニューロメジンSを発見してきた。これらの事実から、新しい活性測定法の導入が、新規生理活性ペプチドを発見するための契機となっていることが理解できる。一方で、哺乳類において、ペプチドそのものの活性を指標とした新規生理活性ペプチドの発見は、国際的にも2005年のニューロメジンSの発見(引用文献)が最後であるため、現在では新規生理活性ペプチドを発見するための新しい活性測定法の開発が期待されている。そこで本研究では、エンドセリンB受容体やアンジオテンシン1型受容体のように三量体Gタンパク質G12/13に共役したGタンパク質共役型受容体が存在するにもかかわらず、G12/13シグナル伝達系が新規生理活性ペプチドの探索に活用されていないことに着目した。

2. 研究の目的

多くの生理活性ペプチド受容体は、Gタンパク質共役型受容体に分類される。Gタンパク質共役型受容体が活性化された際の主要な指標は、三量体Gタンパク質であるGqを介した細胞内カルシウムイオン濃度上昇と、Gs及びGiを介した細胞内cAMP濃度の変動であり、これまでにGタンパク質共役型受容体の活性化をもとに発見された生理活性ペプチドは、どちらかを指標として単離・同定されてきた。一方、G12/13シグナル伝達系の活性化検出には、ウエスタンブロット法による下流因子のリン酸化の検出が必要であるために、定量的かつ効率的な測定が困難であった。このため、G12/13シグナル伝達系に着目した新規生理活性ペプチドの探索は未だ試みられていない。そこで、G12/13シグナル伝達系の活性化により、血清応答因子応答配列(SRF-RE)が特異的に活性化されることを応用し、この配列をプロモーター領域に導入したレポーター遺伝子を用いることにより、G12/13シグナル伝達系のハイスループット活性測定法を開発するとともに、このアッセイ法を活用したオーファン G タンパク質共役型受容体の内因性リガンド探索を開始した。

3. 研究の方法

(1)新しいG12/13シグナル伝達系の活性化測定法の開発

G12/13シグナル伝達系を活性化するGタンパク質共役型受容体として、ラットのエンドセリンB受容体のcDNAをクローニングしたのち、哺乳動物細胞発現ベクターpcDNA3へ挿入することにより、コントロール実験用の発現プラスミドを得た。この受容体発現プラスミドとともにSRF-REをプロモーター領域に導入したレポーター遺伝子を含むプラスミド(レポータープラスミド)を1:1でHEK293細胞へトランスフェクションした。30時間後には受容体刺激の準備として、細胞を96wellプレートに播種(40,000細胞/well)した。さらに17時間経過後に、培地をアゴニストであるエンドセリン-1を含むDMEMへと交換することによりアッセイを開始した。アッセイ開始から3~4時間後、細胞を溶解した後に細胞溶解液に含まれるルシフェラーゼ活性を測定することにより受容体の活性化を確認した。

(2)新しいG12/13シグナル伝達系の活性化測定法を活用したオーファンGタンパク質共役型受容体の内因性リガンドとなる新規生理活性ペプチドの探索

内因性リガンドを探索するオーファンGタンパク質共役型受容体については、ラット組織におけるmRNA発現量をリアルタイムPCRにて測定した。受容体発現量の多い組織から抽出した粗ペプチドを受容体発現細胞に反応させ、受容体を活性化するアゴニスト

を探索した。

4. 研究成果

(1)新しい G12/13 シグナル伝達系の活性化測定法の開発

G12/13 に共役する G タンパク質共役型受容体が存在するが、これまでその活性化の定量的かつ効率的な検出は困難であったため、G12/13 シグナル伝達系の下流で特異的に応答する SRF-RE をプロモーター領域に挿入したレポーター遺伝子を利用して、G12/13 シグナル伝達系の活性化を簡便に検出するアッセイ法を開発した。エンドセリン B 受容体遺伝子と SRF-RE レポーター遺伝子を共に導入した HEK293 細胞にエンドセリン-1 を反応させたところ、リガンド濃度依存的な受容体の活性化がレポーター活性として観察され、検出感度 (EC_{50} 約 $3 \times 10^{-10} M$) はリガンド探索に十分であった。本法は、簡便であり、またアッセイ時に 96well プレートを使った多検体処理が可能であるため、リガンド活性のスクリーニングに適している。また、強制発現した G タンパク質共役型受容体の活性化だけでなく、レポーター遺伝子を導入できる細胞であれば、内因性受容体の活性化をも検出できると思われる。以上により、G12/13 シグナル伝達系を指標とした生理活性ペプチドの探索が可能になった。近年、G タンパク質共役型受容体の強制発現と TGF

切断を用いた G12/13 活性化検出法 (TGF shedding assay) が報告された (引用文献)。TGF shedding assay と本法を比較すると、実験手順がより単純化されており、内因性と強制発現 G タンパク質共役型受容体の両方の活性化検出に対応できる点が、本法の利点であると考えられる。

(2)新しい G12/13 シグナル伝達系の活性化測定法を活用したオーファン G タンパク質共役型受容体の内因性リガンドとなる新規生理活性ペプチドの探索

これまでに、エンドセリン B 受容体やアンジオテンシン 1 型受容体が三量体 G タンパク質 G12/13 に共役する G タンパク質共役型受容体として知られている。そこで、上記二つの受容体のどちらかに相同性を有するオーファン G タンパク質共役型受容体である GPR-X1~3 の 3 種類について、本研究で開発した G12/13 シグナル伝達系の活性化測定法を適用し、内因性リガンドとなる新規生理活性ペプチドを探索している。

オーファン G タンパク質共役型受容体の内因性リガンドの探索では、対象となる受容体の組織分布からリガンドが含まれる組織を推定することが重要である。そこで、はじめに 3 種の受容体について、mRNA 発現量をリアルタイム PCR で測定することにより、組織分布を検討した。

GPR-X1 mRNA の強い発現は、脳および脊髄、肺、小腸、大腸、副腎、精巣にて観察さ

れた。また、脳内では大脳皮質で最も強い発現が認められ、次いで視床下部と脳幹での発現レベルが高値であった。このため、GPR-X1 の内因性リガンドは、脳や脊髄、腸管を中心に探索している。

GPR-X2 の mRNA の発現は、幅広い組織で認められたが、脳を含む中枢神経系と下垂体にて特に強い発現が観察された。このため、ラット脳から抽出した粗ペプチドを対象としたリガンド探索を実施している。下垂体については、ラットでの臓器サイズが小さいため、豚など大動物の下垂体を大量に入手してのリガンド探索を計画している。

GPR-X3 については、精巣にて突出した mRNA の強い発現が観察された。このほか、脳と大腸で発現が認められた。脳内では、視床下部と脳幹にて強く発現している。この結果より、精巣と脳から抽出した粗ペプチドを対象として GPR-X3 の内因性リガンド探索を実施している。

これまで、上記 3 種類のオーファン G タンパク質共役型受容体について内因性リガンド探索を実施しているが、現在のところ明らかな特異的活性を見出すことができていない。この原因として、内因性リガンドが極めて少量しか存在しないことや、強制発現した受容体タンパク質が細胞膜表面まで正常に輸送されていないなどの可能性が考えられる。そこで、今後は 1 回のアッセイに供する組織抽出物を増量することや、強制発現させたオーファン G タンパク質共役型受容体が細胞膜表面まで輸送されていることをタグ標識などを活用して確認することが必要であると考えられる。

一方、オーファン G タンパク質共役型受容体が恒常的に活性化されている現象が確認され、リガンド非依存的な基礎活性を有することが示された。近年では、G タンパク質共役型受容体である嗅覚受容体の基礎活性とその生理的意義が解明され、生体調節における基礎活性の重要性が示されたが、この報告は、G タンパク質共役型受容体の基礎活性を抑制するインバースアゴニストが生体調節に寄与する可能性をも示唆していると考えられる。実際に、摂食調節に関与するアグーチ関連タンパク質は、インバースアゴニストとして G タンパク質共役型受容体である 4 型メラノコルチン受容体の基礎活性を抑制することも報告されている。これらのことから、オーファン G タンパク質共役型受容体の内因性リガンド探索を推進するにあたり、アゴニスト活性に加えてインバースアゴニスト活性も考慮して観察しなければならないと考えられる。

<引用文献>

Sakurai T, *et al.* Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding

behavior. *Cell*, 92, 1998, 573-585
Kojima M, *et al.* Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature*, 402, 1999, 656-660

Mori K, *et al.* Identification of neuromedin S and its possible role in the circadian oscillator system. *EMBO J*, 24, 2005, 325-335

Inoue A, *et al.* TGFβ shedding assay: an accurate and versatile method for detecting GPCR activation. *Nat Methods*, 9, 2012, 1021-1029

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4件)

Nakahara K, Akagi A, Shimizu S, Tateno S, Qattali AW, Mori K, Miyazato M, Kangawa K, Murakami N. Involvement of endogenous neuromedin U and neuromedin S in thermoregulation. *Biochem Biophys Res Commun*, 査読有, 470, 2016, 930-935, DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.01.155

Takayama K, Mori K, Sohma Y, Taketa K, Taguchi A, Yakushiji F, Minamino N, Miyazato M, Kangawa K, Hayashi Y. Discovery of potent hexapeptide agonists to human neuromedin U receptor 1 and identification of their serum metabolites. *ACS Med Chem Lett*, 査読有, 6, 2015, 302-307, DOI: 10.1021/ml500494j

Takayama K, Mori K, Taketa K, Taguchi A, Yakushiji F, Minamino N, Miyazato M, Kangawa K, Hayashi Y. Discovery of selective hexapeptide agonists to human neuromedin U receptors types 1 and 2. *J Med Chem*, 査読有, 57, 2014, 6583-6593, DOI: 10.1021/jm500599s

森健二、宮里幹也、寒川賢治、児島将康、視床下部ホルモン8)ニューロメジン、内分泌・糖尿病・代謝内科、査読無、第36巻、2013、127-133

[学会発表](計6件)

Mori K, Miyazato M, Kangawa K. Possible role of neuromedin S in the central regulation of feeding. CREST International Symposium 2015, Investigation of Energy Metabolism and Immune System based on the Association with Autonomic Nerve and Peptides, December 26, 2015, Okazaki, Aichi, Japan.

森健二、宮里幹也、寒川賢治、ラット脳で産生される新規生理活性ペプチド候補の検出、第42回日本神経内分泌学会・第23回日本行動神経内分泌研究会合同学術集会、2015年9月18日、仙台市戦災復興記念館(宮城県仙台市)

Mori K, Miyazato M, Kangawa K. Neuromedin S and its possible role in the central regulation of feeding. The Conference on Bioactive Peptides for Cell-Cell Communication 2014, September 12, 2014, Kyoto, Japan.

森健二、森美和、村上昇、宮里幹也、寒川賢治、ニューロメジンSの脳内分布と循環調節における役割、第17回日本心血管内分泌代謝学会学術総会、2013年11月23日、千里ライフサイエンスセンター(大阪府豊中市)

森美和、森健二、宮里幹也、寒川賢治、摂食抑制作用を持つニューロメジンSのラットにおける脳内分布、日本肥満学会第18回アディポサイエンス・シンポジウム、2013年8月24日、千里ライフサイエンスセンター(大阪府豊中市)

森健二、森美和、宮里幹也、寒川賢治、「ニューロメジンSの発見」のその後、第31回内分泌代謝学サマーセミナー、2013年7月12日、ゆふいん山水館(大分県由布市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森美和 (MORI, Miwa)

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・特任研究員
研究者番号: 50363148

(2) 研究分担者

森健二 (MORI, Kenji)

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・室長
研究者番号: 00416223

(3) 連携研究者

なし