

機関番号：31305

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20570140

研究課題名（和文） 個体の大きさに関与する G タンパク共役型受容体のリガンド探索とその作用

研究課題名（英文） Studies on orphan G protein-coupled receptors which are related to body size: ligand search and their functions

研究代表者

三苫 純也（MITOMA JUNYA）

東北薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：10281627

研究成果の概要（和文）：G タンパク共役型受容体 *Rigp2*<sup>-/-</sup> マウスは統計的に体が小さいことが判明した。ヘテロマウスの掛け合わせから生まれてくる *Rigp2*<sup>-/-</sup> マウスの数は *Rigp2*<sup>+/-</sup> や *+/+* マウスよりも少ないため、胎児期においても生存に不利な何らかの欠陥があることがわかった。また、このタンパク質の一つのアスパラギン残基のみが N 型糖鎖で修飾されることがわかった。当初の目標であるリガンドの同定には至らなかった。

研究成果の概要（英文）：We found that the mice deficient in G protein-coupled receptor *Rigp2* (*Rigp2*<sup>-/-</sup>) are significantly smaller than wild-type mice. Because the number of *Rigp2*<sup>-/-</sup> mice born from heterozygote mating is much smaller than that of *Rigp2*<sup>+/-</sup> and *+/+* mice, there may be some defect during development. We also found that the only one of Asp residues of this protein has N-linked glycans. We could not identify a ligand for this GPCR.

交付決定額

（金額単位：円）

|         | 直接経費      | 間接経費      | 合計        |
|---------|-----------|-----------|-----------|
| 2008 年度 | 2,300,000 | 690,000   | 2,990,000 |
| 2009 年度 | 700,000   | 210,000   | 910,000   |
| 2010 年度 | 800,000   | 240,000   | 1,040,000 |
| 年度      |           |           |           |
| 年度      |           |           |           |
| 総計      | 3,800,000 | 1,140,000 | 4,940,000 |

研究分野：糖鎖生物学

科研費の分科・細目：5805

キーワード：シグナル伝達、糖、糖尿病、GPCR、リガンド

## 1. 研究開始当初の背景

ショウジョウバエの *Rigp* のホモログである *boss* を欠損させると糖尿病様の病態を示し、体が一回り小さいことが分かっていた。マウスのホモログである *Rigp2* 欠損マウスが既に得られており、体が一回り小さいことが予備的にわかっていた。また、*Rigp2* はオーファン受容体であることから、リガンドが不明であった。

## 2. 研究の目的

*Rigp2* の生体内での機能を知るために、そのリガンドを探索すること。また、実際に *Rigp2*<sup>-/-</sup> マウスが有意に体が小さいかどうかを統計的に調べる。また、このタンパク質の翻訳後修飾については全く明らかにされていないので、その一端を探ることを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) リガンドの探索。CHO 細胞には *Rigp2* が発現していないことがわかったので、この

細胞に *Rigp2* を一時的あるいは安定的に発現させ、様々な化合物で処理し、細胞内 cAMP 濃度の変化、及び細胞内カルシウム濃度の変化を調べた。

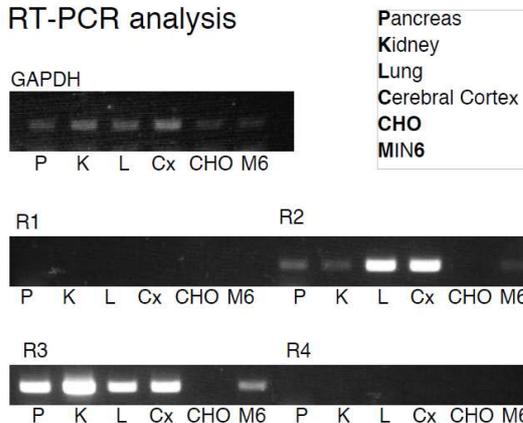
(2) マウスの体格の測定。マウスの成長を追って、遺伝子型別に体重を測定した。

(3) 糖鎖修飾の有無。CHO 細胞で一時的に *Rigp2* を発現させると複数のバンドが見られたため、いくつかのグリコシダーゼ (Endoglycosidase F と H) を用いて糖鎖付加があるかどうかを調べた。また、糖鎖付加の可能性があるアミノ酸を他のアミノ酸に置換した変異体を作成し、CHO 細胞で発現し、糖鎖付加の有無を調べた。

#### 4. 研究成果

(1) リガンドの探索。Rigp の臓器及び細胞特異的発現を RT-PCR で測定した (下図)。

##### RT-PCR analysis



その結果、*Rigp2* は肝臓 (L) や大脳皮質 (Cx) に多く発現しており、膵臓 (P) や腎臓 (K) には少ないことがわかった。また、培養細胞では CHO 細胞には全く発現していないが、MIN6 細胞にはわずかに発現していることがわかった。*Rigp2* のショウジョウバエホモログの *boss* がグルコースに反応するという報告があったので、ここでは様々な化合物 (糖、アミノ酸など) を、*Rigp* を強制発現させた CHO 細胞にかけ、cAMP あるいはカルシウム濃度変化を測定した。しかし、結果的にはリガンドの同定には至らなかった。リガンド探索はかなり網羅的にやる必要があると思われる。

##### (2) マウスの体格の測定。

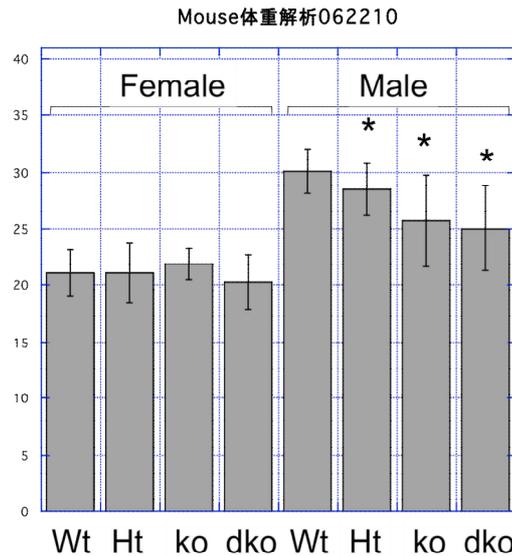
まず、遺伝子型別に生まれてきたマウスの数を集計した (下図)。その結果、メンデルの

|     | +/+ | +/- | -/- | all |
|-----|-----|-----|-----|-----|
| F   | 24  | 30  | 10  | 64  |
| M   | 22  | 34  | 9   | 65  |
| F+M | 46  | 64  | 19  | 129 |

法則に照らして、*Rigp2*<sup>-/-</sup> マウスの数がかなり少ないことがわかった。このことは *Rigp2* がマウスの発生

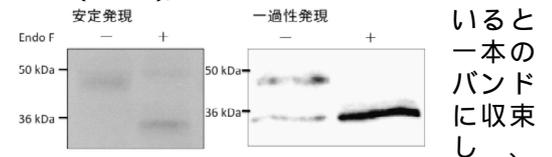
や生存に何らかの働きをしていることを示唆する。次にマウスの体重を発育の段階を追

■ 15w

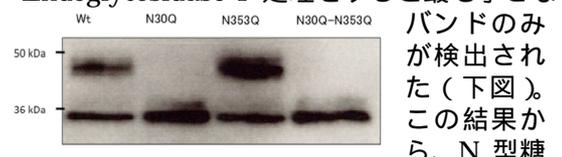


って測定した (右上図)。その結果、雄においては *Rigp2*<sup>-/-</sup> マウス (ko) 及び *Rigp2*<sup>-/-</sup>/*Rigp3*<sup>-/-</sup> ダブルノックアウトマウス (dko) のみならず、ヘテロ接合体 *Rigp*<sup>+/-</sup> (Ht) においても有意に小さいことが判明した。

(3) 糖鎖修飾の有無。CHO 細胞で *Rigp2* を一時的に発現させてウエスタンブロッティングで解析すると複数のバンドが検出された (下図)。このバンドは安定発現株を用



##### Endoglycosidase F 処理をすると最も小さな



バンドのみが検出された (下図)。この結果から、N 型糖鎖で修飾されていることがわかったので、分子中に 2 箇所ある N 型糖鎖付加のコンセンサス配列 (Asn-X-Ser/Thr) の Asn を Gln に変えた変異体を作ったところ、30 番目の Asn を置き換えたものだけが、大きいバンドが検出されなかったことから、この Asn のみが N 型糖鎖で修飾されていることがわかった。

#### 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 4 件)

Kobayashi M, Mitoma J, Hoshino H, Yu S-Y, Shimojo Y, Suzawa K, Khoo K-H, Fukuda M, Nakayama J. Prominent expression of sialyl Lewis X-capped core 2-branched O-glycans

on high endothelial venule-like vessels in gastric MALT lymphoma. J. Pathol. 224, 67-77 (2011)

Mitoma, J. and Fukuda, M. Core O-glycans required for lymphocyte homing: gene knockout mice of core 1 beta1,3-N-acetylglucosaminyltransferase and core 2 N-acetylglucosaminyltransferase. Methods Enzymol. (2010) 479, 257.

Mitoma, J., Miyazaki, T., Sutton-Smith, M., Suzuki, M., Saito, H., Yeh, J. C., Kawano, T., Hindsgaul, O., Seeberger, P. H., Panico, M., Haslam, S. M., Morris, H. R., Cummings, R. D., Dell, A., and Fukuda, M. The N-glycolyl form of mouse sialyl Lewis X is recognized by selectins but not by HECA-452 and FH6 antibodies that were raised against human cells. Glycoconj. J. (2009) 26(5), 511

Mitoma, J. Oligosaccharides in lymphocyte homing. [リンパ球ホーミングにおける修飾糖鎖] Tanpakushitu Kakusan Koso (2008) 53(12), 1598

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.tohoku-pharm.ac.jp/laboratory/seitaijo/JAPANESE/PUBLICATIONS-J.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

三苫 純也 (MITOMA JUNYA)  
東北薬科大学・薬学部・講師  
研究者番号：10281627

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：