

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月21日現在

機関番号：17601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2009～2011

課題番号：21659203

研究課題名（和文） 新たなアッセイによる循環系オーファン受容体の新規リガンド探索と機能解析

研究課題名（英文） Exploring for new bioactive peptides using our novel methods

研究代表者

桑迫 健二 (KUWASAKO KENJI)

宮崎大学・フロンティア科学実験総合センター・准教授

研究者番号：20381098

研究成果の概要（和文）：

複雑かつ精巧な循環調節機構をより明確にするためには、未知の生理活性物質を同定することが重要である。我々は強力な降圧ペプチド（アドレノメデュリンとその関連ペプチド2種）と昇圧ペプチド（proangiotensin-12）を発見してきた。しかも、Gタンパク質共役型受容体（GPCR）とGPCR活性調節タンパク質（RAMP）の1：1複合体（降圧系）のシグナル伝達機構や細胞内輸送機構、病態生理学的役割を明らかにしてきた。本研究では、オーファン受容体のリガンド探索の分野では報告例のないアッセイ法（リガンド刺激後のオーファン受容体の立体構造の変化・リン酸化・細胞内移行を各々標的にしたアッセイ法）を用いて、循環系に高発現しているヒトのオーファン受容体の新規生理活性ペプチドの探索を試みた。新たなアッセイ法をさらに見出したが、当初の目標である新規生理活性ペプチドの同定には至らなかった。

研究成果の概要（英文）：

The discovery of unknown bioactive peptides can help to clarify the complexity of the circulatory system. In the past 20 years, we have discovered several potent hypotensive and vasopressor peptides (e.g., adrenomedullin, its related peptides and proangiotensin-12). Furthermore, we have clarified the mechanisms of the signaling, trafficking and pathophysiological roles of the RAMP¹-based G protein-coupled receptors (GPCRs). In this study, we have attempted to identify novel bioactive peptides that may be able to bind to the human orphan GPCRs in the circulatory system. We used our three novel assays targeting the agonist-induced conformational change, phosphorylation and internalization of many GPCRs. Furthermore, we found a new strategy for the identification of novel peptides during this research. Nevertheless, we were unable to identify any bioactive peptides for the intended purpose.

¹The acronym RAMP represents receptor activity-modifying protein.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,200,000	0	1,200,000
2010年度	1,000,000	0	1,000,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	270,000	3,370,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：オーファン受容体、安定発現株、FACS解析、FRET解析、新規リガンド

1. 研究開始当初の背景

ゲノムシーケンスが解明された今日でも、グレリンのように修飾基（脂肪酸など）を有する生理活性ペプチドは、我々のように地道に精製して、その構造を決定しなければならない。

オーファンGPCR（リガンドが同定されていないGPCRの総称）のリガンド探索法のうち、オーファンGPCRを培養細胞に発現させて天然の組織抽出物からリガンドを探索する方法及びオーファンGPCRと既知物質（GPCR不明）を組み合わせてリガンドを同定する方法が成功を収めてきた（ここ10年で50種類以上のリガンドが決定された）。現在、臨床薬として使用されている薬物の中で、GPCRのリガンド関連薬物が45%も占めている。従って、残る150種類以上のオーファンGPCRの内在性リガンド探索は大手製薬会社や大学・研究所において新薬開発のための世界的な熾烈な競争的標的となっている。

オーファンGPCRのリガンドのほとんどが、細胞内のセカンドメッセンジャー（cyclic AMP や Ca^{2+} ）を指標に同定されてきた。しかしながら、哺乳類における脱オーファン化は最近停滞気味である。その理由として、主に次の3つが考えられる。

- ① 非オーファンGPCRとの異種2量体の形成
- ② 受容体活性調節タンパク質のような1回膜貫通型の修飾タンパク質の関与
- ③ 繁用されてきたアッセイ法の限界

そこで、これらの要因を考慮した、未知の循環調節ペプチドの探索法を思い立った。

2. 研究の目的

本研究の目的は、これまでに成功例のない3種の探索法（リガンド結合後のオーファン受容体の立体構造の変化、プロテインキナー

ゼとの相互作用、細胞内移行をそれぞれ独自のアッセイ法にて定量）を用いて、循環系に高発現しているヒトのオーファンGPCRの未知の生理活性ペプチドを網羅的に同定することである。

3. 研究の方法

(1) ヒトオーファン受容体の選定と安定発現株の樹立：

RT-PCR で循環系に高発現していることが確認されたオーファン受容体を選定し、PCRによるクローニングを行う。

HEK-293 細胞に遺伝子導入したオーファン受容体が完全な形で細胞膜に発現したことを蛍光顕微鏡と FACS 解析で確認するために、各遺伝子の 5' 端と 3' 端にそれぞれ V5 タグとクラゲの蛍光タンパク質（ECFP, EGFP, EYFP）の遺伝子を融合させる。

オーファン受容体のタグ融合遺伝子を HEK-293 細胞に導入し、薬剤選別後に安定発現株（モノクローン）を獲得する。FACS 解析で受容体の発現の低いクローンを以下のアッセイに用いる。

(2) 選定したヒトオーファン受容体のリガンドの探索：

循環系の内因性ペプチドが豊富に内在するヒトの褐色細胞腫もしくはブタの心房・心室・肺・腎臓・副腎を大量に抽出する。

各々の組織抽出物をゲルろ過、イオン交換クロマトグラフィー、各種逆相 HPLC などに適宜展開して、各分画を下記のアッセイ（3種）で定量し、精製を順次進める。当教室のプロテインシーケンサーと質量解析装置を用いて、最終精製物質の構造を決定する。

*本研究で並行して行うアッセイの手順：

①オーファン受容体のリン酸化を利用したアッセイ法：専用のソフトで、PKAとPKCの

リン酸化想定部位が存在するオーファン受容体を選定する。これらの受容体の3' 端にECFPを融合した遺伝子とPKA, PKC α の3' 端にEYFPを融合した遺伝子をHEK-293細胞に導入して、二重安定発現株を作製する。FRET解析でこれらの酵素との相互作用を認めた分画を順次精製する。

②オーファン受容体の細胞内移行を利用したアッセイ法：3' 端にEGFPを融合させたオーファン受容体の安定発現株に各組織抽出物を添加し、EGFPの細胞内移行の有無を当教室の蛍光顕微鏡で観察する。陽性を呈した分画については受容体の5' 端に付加したV5 タグを特異的に認識するローダミン標識抗体を加えてFACS解析で定量し、細胞表面の受容体数が減少した分画の精製を進める。

③オーファン受容体の立体構造の変化を利用したアッセイ法：オーファン受容体の3' 端にEYFPを、第3ループの様々な部位にECFPを融合させた遺伝子をHEK-293細胞に発現させる。その48時間後に各組織抽出液を添加して、FRET解析でECFPからEYFPに蛍光共鳴エネルギー転移がみられた分画の精製を進める。

4. 研究成果

(1) ヒトオーファン受容体の選定と安定発現株の樹立：

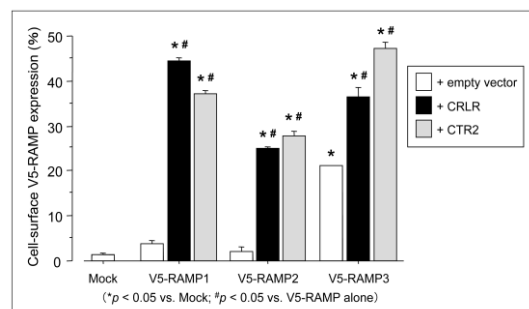
独自のRT-PCRで循環系の臓器に高発現しているオーファン受容体を選定し、PCRによるクローニングを行った。PCRで獲得しにくい遺伝子(一部)は市販のものを購入した。これらの遺伝子の5' 端と3' 端にそれぞれV5 タグとクラゲの各蛍光タンパク質の遺伝子を融合させた。各々のオーファン受容体のタグ融合遺伝子をHEK-293細胞に導入し、薬剤選別後にそれぞれ複数のクローンを獲得した。FACS解析で、蛍光輝度の低いモノクロ

ーンであることを確認した。

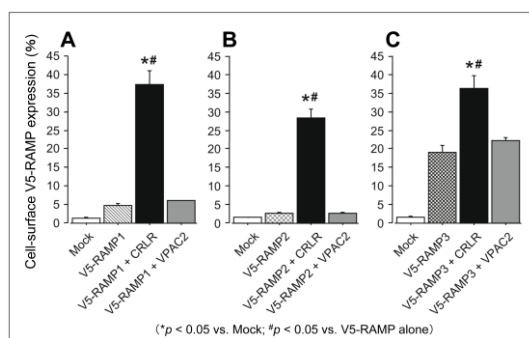
(2) 選定したヒトオーファン受容体のリガンドの探索：

ヒトの褐色細胞腫およびブタの左心房・左心室・肺・腎臓・副腎の抽出物を大量に獲得した。組織の抽出は、当教室で確立した方法を修飾して行った。これらの組織抽出物を上記の安定発現株に添加して、我々の3つのアッセイ(①オーファン受容体のリン酸化を利用したアッセイ法、②オーファン受容体の細胞内移行を利用したアッセイ法、③オーファン受容体の立体構造の変化を利用したアッセイ法)を用いて、新規のリガンド探索を試みた。これらの探索法の条件検討を詳細に行ったが、現時点で、目的の新規生理活性ペプチドの発見には至らなかった。

なお、受容体活性調節タンパク質(RAMP)のような1回膜貫通型のGPCR修飾タンパク質の細胞膜移行活性を指標に、GPCRとの相互作用を調べるための簡易スクリーニング法を確立した⁶。



CTR, calcitonin receptor; CRLR, CTR-like receptor; RAMP, receptor activity-modifying protein; V5-RAMP, N-terminally V5-tagged RAMP



CRLR, calcitonin receptor-like receptor; RAMP, receptor activity-modifying protein; VPC2, vasoactive intestinal peptide (VIP)/pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide type 2 receptor; V5-RAMP, N-terminally V5-tagged RAMP

この方法は、RAMP 以外の 1 回膜修飾タンパク質 (6 種) にも応用可能であり⁶、これらの修飾タンパク質が作用するオーファン受容体の同定に有用である。

<考察>

我々の新規のリガンド探索法 (3 種) は、リガンドが明らかな非オーファン受容体では有効であるが、リガンドが同定されていないオーファン受容体では、既知の低分子化合物 (グレリンなど) のようなポジコンが存在すれば、本研究が飛躍的に進展することが期待される。しかし、多くの場合、オーファン受容体では、そのポジコンがないのが実情である。しかも、非オーファン受容体の中には、カルシトニン受容体のように高濃度のリガンドを加えても細胞内移行しないものも存在する (未発表)。リガンドによる受容体の活性化機構 (立体構造の変化) も様々であり、その活性化に重要な部位にクラゲの蛍光タンパク質のような大きなタンパク質を導入すると、受容体の活性化に支障をきたす可能性がある¹。また、受容体に作用する 1 回膜貫通型の修飾タンパク質 (7 種)⁶ がリガンドの特異性を規定していることが報告されている^{3,4}。これらが、本研究の目的達成を困難にしている主因であると分析している。

<今後の研究の推進方策>

現時点で、非オーファン受容体のシグナル発現と細胞内移行を惹起するためのコンセンサスモチーフ (共通するアミノ酸配列) はない。その責任領域は、受容体の細胞内領域 (特に、細胞内 C 末端領域) であるが、同じファミリーでもアミノ酸配列の相同性はかなり低い。中には、高濃度のリガンドを添加しても細胞内移行しない受容体が存在する。従って、我々は、低濃度のリガンドでも cAMP

と Ca^{2+} の増加及び細胞内移行を強力に惹起する非オーファン受容体の細胞内 C 末端領域をターゲットのオーファン受容体の細胞内 C 末端領域と普遍的に組換えられる方法を模索していた。そして、ごく最近、その画期的な方法を見出し、今後の新規のリガンド探索に多大に寄与し得るものと期待している。今後、この方法をメインに、新たな循環調節ペプチドを同定していくつもりである。

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)

* オーファン受容体のリガンド探索法の改良・改善もしくはさらなる新規探索法に寄与し得る雑誌論文・学会発表のみ記載した。

[雑誌論文] (計 6 件)

1. Kuwasako K, Hay DL, Nagata S, Hikosaka T, Kitamura K, Kato J:
The third extracellular loop of the human calcitonin receptor-like receptor is crucial for the activation of adrenomedullin signalling.
Brit J Pharmacol 166: 137-150, 2012.
(査読有り)
2. Kuwasako K, Kitamura K, Nagata S, Hikosaka T, Kato J:
Structure-function analysis of helix 8 of human calcitonin receptor-like receptor within the adrenomedullin 1 receptor.
Peptides 32: 144-149, 2011.
(査読有り)
3. Kuwasako K, Kitamura K, Nagata S, Hikosaka T, Takei Y, Kato J:
Shared and separate functions of the RAMP-based adrenomedullin receptors.
Peptides 32: 1540-1550, 2011.
(査読有り)
4. Kuwasako K, Kitamura K, Nagata S, Nozaki N, Kato J:
Molecular basis of adrenomedullin 1 receptor function and its role in the cardiovascular system.
Curr Hypertens Rev 7: 207-216, 2011.
(査読有り)
5. Kuwasako K, Kitamura K, Nagata S, Hikosaka T, Kato J:

Function of the cytoplasmic tail of human calcitonin receptor-like receptor in complex with receptor activity-modifying protein 2. *Biochem Biophys Res Commun* 392: 380-385, 2010.

(査読有り)

6. Kuwasako K, Kitamura K, Nagata S, Kato J: Flow cytometric analysis of the calcitonin receptor-like receptor domains responsible for cell-surface translocation of receptor activity-modifying proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 384: 249-254, 2009.

(査読有り)

[学会発表] (計 6 件)

1. 桑迫健二、北村和雄、永田さやか、彦坂ともみ、野崎尚美、加藤丈司: 1型アドレノメデュリン受容体の細胞内ヘリックス8の役割. 第64回日本薬理学会西南部会、2011年11月20日(福岡) [口頭発表]
2. 桑迫健二、北村和雄、永田さやか、野崎尚美、加藤丈司: 2つのアドレノメデュリン (AM) 受容体の活性化を規定する責任領域の特定と特徴化: CGRP 受容体と異なる新たな活性化機構. 第34回日本高血圧学会総会、2011年10月20日(栃木) [口頭発表]
3. 桑迫健二、北村和雄、永田さやか、彦坂ともみ、加藤丈司: 降圧系1型アドレノメデュリン (AM₁) 受容体のヘリックス8はAM₁受容体の細胞内移行を負に制御し、G_s蛋白の結合に不可欠である. 第84回日本薬理学会年会、2011年3月23日(横浜) [口頭発表]
4. Kuwasako K, Kitamura K, Nagata S, Kato J: Effects of G protein-coupled receptor kinases on cellular trafficking of the human adrenomedullin receptor (CRLR/RAMP2). The 7th International Symposia on the CGRP Family; CGRP, Adrenomedullin, Amylin, Intermedin and Calcitonin, 2010-8-31 (Queenstown, New Zealand) [基調講演]
5. 桑迫健二、北村和雄、永田さやか、加藤丈司: 1回膜貫通型の受容体活性調節蛋白が作用するG蛋白共役型受容体を同定するための簡易スクリーニング法の確立および

応用解析.

第83回日本薬理学会年会、2010年3月18日(大阪) [口頭発表]

6. 桑迫健二、北村和雄、永田さやか、加藤丈司: 受容体活性調節蛋白 (RAMP) とG蛋白共役型受容体 (GPCR) の相互作用の解析: Flow cytometryの有用性. 日本分子生物学会第9回春季シンポジウム、2009年5月11日(宮崎) [ポスター発表]

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページアドレス

<http://www.med.miyazaki-u.ac.jp/peptides/katou/jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

桑迫 健二 (KUWASAKO KENJI)

宮崎大学・フロンティア科学実験総合センター・准教授

研究者番号: 20381098

(2) 研究分担者

加藤 丈司 (KATO JOHJI)

宮崎大学・フロンティア科学実験総合センター・教授

研究者番号: 20274780

北村 和雄 (KITAMURA KAZUO)

宮崎大学・医学部・教授

研究者番号: 50204912

永田 さやか (NAGATA SAYAKA)

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号: 00452920

(3) 連携研究者

なし