

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 25 日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23550194

研究課題名(和文)ヘテロ二量受容体が持つ二種類の結合部位から伝達される生理活性情報の識別

研究課題名(英文)Discrimination of Biological Signals from Dimeric Heteroreceptors

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) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：膜タンパク質の主要成分である7回膜貫通型受容体の二量体構造とシグナル伝達の解明は、受容体研究の重要な領域となっている。好中球に発現するホルミルペプチド受容体の多量体構築と細胞内情報伝達について理解する目的で、ホルミルペプチド受容体の2つのサブタイプに対し選択的なペプチドを二量化したペプチドを合成した。選択的アンタゴニスト処理した細胞や選択的アゴニストで脱感作した細胞上で生物活性を評価した結果、ヘテロリガンドの2つのペプチドはそれぞれ異なる相手と相互作用し、活性を発現していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Many G-protein coupled receptors exist as homo-dimers and heterodimers, but also that their dimeric assembly could have important functional roles. To understand the structure and biological roles of dimeric states of formyl peptide receptors, dimeric peptides with subtype selective ligands were synthesized. From the results of biological assays, dimers play a role in binding to the two distinct binding sites.

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：シグナル伝達 生体分子 生理活性 活性酸素 ダイマー

1. 研究開始当初の背景

膜タンパク質の主要成分である7回膜貫通型受容体の二量体構造とシグナル伝達の解明は、受容体研究の重要な領域となっている。7回膜貫通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において、膜上で二量体を形成する7回膜貫通型受容体タンパク質の機能単位や、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の機能等はまだまだ不明なままである。これまで種々のペプチドにおいてリガンド二量体の化学合成と生理活性評価をおこなってきた。最近、白血球の主成分である好中球を活性化ホルミルペプチド受容体を題材に、受容体の多量体構築と細胞内情報伝達の機構について、二量体リガンドや受容体膜貫通ペプチドを用いて研究を行っている。

また、一般的に受容体は複数のタンパク質が会合して機能を調節していると考えられているが、作動薬・拮抗薬の結合とタンパク質会合の関連は明らかになっていない。我々はこの膜貫通部ペプチドを化学合成し、好中球活性化受容体の高度活性化を評価した。得られた膜ドメインをヒト好中球と相互作用(受容体タンパク質の会合)した後、アゴニストペプチドにより受容体を活性化させたところ、いくつかの膜貫通ドメインを投与した場合のみ、予め活性を発現しない薬物を投与することにより、次に投与する活性剤の作用を劇的に増強させるプライミング作用を示すことを見いだした。受容体会合が活性化に必須な場合、膜ドメインペプチドの添加は受容体会合を妨げると考えられるため、受容体の不活性化を引き起こされると予想していた。全く異なる結果を与えた今回の研究から、好中球活性化受容体は、会合することなしに活性を調整している、あるいは膜ドメインペプチドの添加が異なる受容体タンパク質会合を起こし、受容体活性を増強した、膜ドメインが偶然受容体のリガンド結合部位と相互作用し、シグナル伝達が受容体のアップレギュレーションを誘導したこと等が考えられた。

2. 研究の目的

好中球に発現するホルミルペプチド受容体の多量体構築と細胞内情報伝達について理解する目的で、ホルミルペプチド受容体サブタイプに対し、異なる選択制を持つ複数のペプチドを共有結合で架橋した二量体ペプチドの開発とこのペプチドが生体膜上でヘテロ二量化受容体と相互作用し、受容体の二種類のタンパク質会合体が伝達するシグナルを解析した。また、受容体の膜貫通領域のアミノ酸配列を持つペプチドと細胞上の受容体との相互作用を利用し、受容体をホモやヘテロに二量化させた状態を構築する目的で、受容体膜貫通領域由来ペプチドの構造機能相関研究を行った。本研究では、以下の3

つの実験、ヘテロ二量化受容体の情報伝達を区別するハイブリッド二量体の合成、ハイブリッド二量体によるヘテロ二量化受容体の情報伝達の解明、二量化膜貫通ペプチドによる二量化受容体の構築の可能性と機能解明をおこなった。

3. 研究の方法

ヘテロ二量化受容体の情報伝達を区別するハイブリッド二量体の合成する目的で、ホルミルペプチド受容体の各サブタイプに選択的なアゴニストとアンタ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。合成にあたり、架橋部位はペプチドの活性に影響しない部位でおこなった、架橋剤はペプチドや合成二量体の溶解度を考慮してシステイン残基のジスルフィド結合を選択した、架橋剤の鎖長は一般的に短い時に最大活性を発現するが、サブタイプの選択性に関し鎖長依存性が見られるため、Gly残基数残基持つペプチドを数種類合成した。ペプチドの合成は、迅速固相法で行った。目的の構造にあった固相樹脂上でアミノ酸を順に縮合した。目的のペプチド鎖まで伸長した後、脱保護、脱樹脂を行った。ペプチドの純度は高速液体クロマトグラフィ法、構造は飛行時間型質量分析法により行った。

生理活性は、ヒト好中球及び分化させたヒト急性骨髄性白血病細胞 HL-60 でのルミノール化学発光法による活性酸素生成、ポイデンチャンバーによる遊走活性、エラストーゼ放出、細胞内カルシウム濃度変化で評価した。

4. 研究成果

これまでモルヒネ様鎮痛ペプチドエンケファリンやモルヒセプチン、神経ペプチド、サブスタンスPとニューロキニン類、白血球遊走ホルミルペプチドの各ペプチドにおいて2つのペプチドリガンドを共有結合で二量したアナログの化学合成とそれらの生理活性評価を行う事で、GPCR二量体の構造機能研究を行った。

これらの研究を通してリガンド二量体の効果として、単量体リガンドを二量化する事により受容体親和性と生物活性が飛躍的に増強すること、合成された二量体ペプチドの受容体サブタイプ選択性に明確な架橋鎖長依存があること、2つのファルマコア間に至適鎖長の存在することを見いだした。さらに2つのペプチドを二量化することにより高活性化した二量体ペプチドの1つの活性発現構造を取り除いた新規アナログを合成し、二量体の生物活性と比較したところ、1つの活性中心を欠く事で、二量体化による親和性及び発現する生物活性増強効果が消失することを見いだした。この結果から、二量化ペプチドは、少なくとも受容体に二価的に相互作用することを明らかにした。さらに、2つのペプチドが2つのことなるプロトマと相互作用することを調べる目的で、2つの異なる

る選択制を有するペプチドの二量体を合成し、生物活性を評価したところ、選択的アンタゴニスト処理した細胞、及び選択的アゴニストで脱感作した細胞上で、ヘテロリガンドは、異なる挙動を示した。この結果、ヘテロリガンドの2つのペプチドはそれぞれ異なる相手と相互作用し、活性を発現していることが示唆された。これらの知見をもとに、さらに二価の受容体の機能研究を実施する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計10件)

1. R. Hayashi, M. Miyazaki, S. Osada, H. Kawasaki, I. Fujita, Y. Hamasaki, H. Kodama, A formyl peptide substituted with a conformationally constrained phenylalanine residue evokes a selective immune response in human neutrophils, *Bioorg. Med. Chem.*, **21**, 668-675 (2013) 査読付

2. T. Suga, S. Osada, H. Kodama, Ion channel formation by charged cyclic peptides, *Peptide Science* **2012**, 195-198 (2013)

3. R. Hayashi, R. Yamaguchi, Y. Koga, I. Fujita, S. Osada, Y. Hamasaki, H. Kodama, Structure-activity relationship of a transmembrane peptide derived from formyl peptide receptor 1, *Peptide Science* **2012**, 221-224 (2013)

4. T. Suga, S. Osada, H. Kodama, Formation of ion-selective channel using cyclic tetrapeptides, *Bioorg. Med. Chem.*, **20**, 42-46 (2012) 査読付

5. R. Hayashi, S. Miura, Y. Saito, S. Osada, T. Iyoda, F. Fukai, H. Kodama, The cell adhesion and proliferation activities of a peptide derived from human tenascin-C are dependent on two Ile residues, *Bioorg. Med. Chem.*, **20**, 4608-4613 (2012) 査読付

6. T. Suga, S. Osada, H. Kodama, Significance of Intermolecular Hydrogen-Bonding to Form Ion Channel by the Cyclic Tetrapeptide cyclo(D-Ala-Dap)₂, *Peptides: Building Bridges*, 156-157 (2011) 査読付

7. I. Maeda, Y. Fukumoto, T. Nose, Y. Shimohigashi, T. Nezu, Y. Terada, H. Kodama, K. Kaibara, K. Okamoto, Structural requirements essential for elastin coacervation: favorable spatial arrangements of valine ridges on the three-dimensional structure of elastin-derived polypeptide (VPGVG)_n, *J. Pept. Sci.*, **17**, 735-743 (2011) 査読付

8. R. Takabatake, S. Osada, R. Yamaguchi, H. Kodama, The elucidation of the conformational requirements for methionine side-chain interaction with FPR by using fluorinated fMLP

analogs, *Peptides Science* **2010**, 124 (2011) 査読付

9. T. Suga, J. Taira, S. Osada, H. Kodama, Contribution of hydrophobic side-chain in cyclic tetrapeptide forming ion channel, *Peptides Science* **2010**, 130 (2011) 査読付

10. J. Taira, Y. Kida, H. Yamaguchi, K. Kuwano, Y. Higashimoto, H. Kodama, Structural modification of 2-aminoisobutylic acid containing peptides toward an acquiring of antimicrobial activities against pathogenic bacteria, *Peptides Science* **2010**, 263 (2011) 査読付

〔学会発表〕(計19件)

1. 古賀脩一郎、林 良、長田聡史、兒玉浩明、FPR1 高親和性アゴニスト fMLP 二価リガンドの生物活性評価、平成 25 年度日本生化学会九州支部例会、2013 年 5 月 18-19 日、佐賀大学

2. 古賀裕也、林 良、長田聡史、藤田一郎、浜崎雄平、兒玉浩明、膜貫通ドメインペプチドによる FPR プライミング活性の構造活性相関、第 50 回化学関連支部合同九州大会、2013 年 7 月 6 日、北九州国際会議場

3. R. Hayashi, H. Mizuguchi, Y. Koga, S. Osada, I. Fujita, Y. Hamasaki, H. Kodama, Substitution of Phe Residues in a Formyl Peptide Receptor 1 Selective Antagonist Boc-FIFIF with Cyclohexylalanine Causes an Increase in the Inhibitory Activity, 4th Asia-Pacific International Peptide Symposium / 50th Japanese Peptide Symposium, 2013 年 11 月 6 日-8 日、Osaka

4. Y. Koga, T. Kitajima, R. Hayashi, S. Osada, I. Fujita, Y. Hamasaki, H. Kodama, Synthesis and Antagonist Activities of Formyl Peptide Receptor 1 Selective Antagonist Boc-FIFIF Analogs with Substitution in the First Phe Residue, 4th Asia-Pacific International Peptide Symposium / 50th Japanese Peptide Symposium, 2013 年 11 月 6 日-8 日、Osaka

5. 古賀裕也、林 良、長田聡史、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 FPR 膜貫通ドメインペプチドの構造活性相関、2013 年日本化学会中国四国支部大会、2013 年 11 月 16-17 日、広島大学

6. 古賀脩一郎、林 良、藤田一郎、浜崎雄平、長田聡史、兒玉浩明、GPCR 二量体の機能解明を目的とした fMLP 二量体の合成と受容体選択性、2013 年日本化学会中国四国支部大会、2013 年 11 月 16-17 日、広島大学

7. 山口 彩、古賀裕也、古賀脩一朗、林 良、藤田一郎、浜崎雄平、長田聰史、兒玉浩明、FPR1 選択的アゴニストの二量体ペプチドの合成と生物活性、2013 年日本化学会中国四国支部大会、2013 年 11 月 16-17 日、広島大学

8. 瀬戸知歩、古賀脩一朗、古賀裕也、林 良、藤田一郎、浜崎雄平、長田聰史、兒玉浩明、FPR1 選択的アゴニストの二量体ペプチドの合成と生物活性、2013 年日本化学会中国四国支部大会、2013 年 11 月 16-17 日、広島大学

9 片淵友加里、古賀脩一朗、古賀裕也、林 良、藤田一郎、浜崎雄平、長田聰史、兒玉浩明、2 つの FPR 選択的ヘテロペプチドの合成と生物活性、2013 年日本化学会中国四国支部大会、2013 年 11 月 16-17 日、広島大学

10. 古賀脩一朗、北島健貴、林 良、長田聰史、兒玉浩明、シスチンを架橋剤とした遊走ペプチド fMLP 二量体の合成と生物活性、第 49 回化学関連支部合同九州大会、2012 年 6 月 30 日、北九州国際会議場

11. 古賀裕也、山口 遼、林 良、長田聰史、藤田一郎、浜崎雄平、兒玉浩明、ホルミルペプチド受容体膜貫通ドメインに由来する高疎水性ペプチドの合成、第 49 回化学関連支部合同九州大会、2012 年 6 月 30 日、北九州国際会議場

12. 林 良、山口 遼、古賀裕也、藤田一郎、長田聰史、濱崎雄平、兒玉浩明、Structure-activity relationship of a transmembrane peptide derived from formyl peptide receptor 1、第 49 回ペプチド討論会、2012 年 11 月 7-9 日、かごしま県民交流センター

13. 北島健貴、藤本美樹、林 良、藤田一郎、浜崎雄平、長田聰史、兒玉浩明、ホルミルペプチド受容体アンタゴニスト Boc-FIFIF-OH の 1 位アミノ酸残基を置換したアナログの合成と生物活性、2012 年日本化学会西日本大会、2012 年 11 月 10-11 日、佐賀大学

14. 古賀脩一朗、北島健貴、林 良、藤田一郎、浜崎雄平、長田聰史、兒玉浩明、好中球走化性因子ホルミルペプチド fMLP の二量化におけるリンカー部位の影響、2012 年日本化学会西日本大会、2012 年 11 月 10-11 日、佐賀大学

15. 古賀裕也、林 良、藤田一郎、浜崎雄平、長田聰史、兒玉浩明、ホルミルペプチド受容体 FPR2 の膜貫通部分由来ペプチドの合成とヒト好中球の活性酸素放出能に与える影響、2012 年日本化学会西日本大会、2012 年 11 月

10-11 日、佐賀大学

16. 藤本美樹、北島健貴、林 良、藤田一郎、浜崎雄平、長田聰史、兒玉浩明、ホルミルペプチド受容体アンタゴニスト Boc-FIFIF-OH の 1 位 Bpa 残芳香環が阻害活性に与える影響、2012 年日本化学会西日本大会、2012 年 11 月 10-11 日、佐賀大学

17. 山口 遼、杉山大輔、長田聰史、藤田一郎、浜崎雄平、兒玉浩明、二量化アゴニストおよびアンタゴニストとホルミルペプチド受容体の相互作用、第 48 回化学関連支部合同九州大会、2011 年 7 月 9 日、北九州国際会議場

18. 内村恵梨子、北島健貴、山口 遼、長田聰史、藤田一郎、浜崎雄平、兒玉浩明、FPR2 選択的アンタゴニスト WKYMMV の二量化と好中球活性化の架橋鎖依存性、第 48 回化学関連支部合同九州大会、2011 年 7 月 9 日、北九州国際会議場

19. 古賀脩一朗、北島健貴、山口 遼、長田聰史、藤田一郎、浜崎雄平、兒玉浩明、ホルミルペプチド二量体の架橋構造の活性への影響、2011 年日本化学会西日本大会、2011 年 11 月 12-13 日、徳島大学

〔産業財産権〕
出願状況（計 2 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、宮崎大学
種類：特許
番号：14/004,196
出願年月日：2013 年 9 月 10 日
国内外の別： 国外

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、宮崎大学
種類：特許
番号：12758028
出願年月日：2013 年 10 月 8 日
国内外の別： 国外

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