

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 1 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24780104

研究課題名(和文) マウスペプチド性フェロモン ESP1 GPCR クラス C 受容体の特異的認識機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of the specific interaction of a mouse peptide pheromone ESP1 and the class-C GPCR receptor

研究代表者

吉永 壮佐 (YOSHINAGA, Sosuke)

熊本大学・生命科学研究部・助教

研究者番号：00448515

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000 円、(間接経費) 1,080,000 円

研究成果の概要(和文)：多くの生物は、種を保存するため、異性を正確に認識する情報手段として「フェロモン」を用いる。共同研究者である東京大学の東原らは、オスマウスの涙に分泌され、メスマウスの性行動を誘発するペプチド性フェロモン ESP1 を同定した(Nature, 2005)。また、鼻腔下部の鋤鼻器官にある GPCR クラス C 受容体の V2Rp5 を介して機能することを明らかにした(Nature, 2010)。

本研究代表者らは、ESP1の立体構造を決定し、その情報をもとに受容体との結合様式を明らかにした(JBC, 2013)。本研究により、哺乳類のペプチド性フェロモンと受容体の構造的知見を初めて得た。

研究成果の概要(英文)：Animals communicate using "pheromones", which are tools for accurate recognition of the opposite sex, to preserve the species. Our collaborators, the Touhara group at the University of Tokyo, identified ESP1, which is a peptidic sex pheromone that is released in male mouse tear fluids and enhances female sexual receptive behavior (Nature, 2005). They also elucidated that ESP1 is selectively recognized by a specific class-C G-protein-coupled receptor (GPCR), V2Rp5, which is expressed in the vomeronasal organ that is located beneath the nasal septum (Nature, 2010).

We determined the three dimensional structure of ESP1, and revealed the binding mode between ESP1 and the receptor V2Rp5, based on these structures (JBC, 2013). To our knowledge, this is the first report of the structural information about the interaction between a mammalian peptide pheromone and its receptor.

研究分野：構造生物学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物化学

キーワード：情報伝達 フェロモン NMR 立体構造 相互作用 マウス GPCR ペプチド

1. 研究開始当初の背景

人間社会において、環境は、視覚・聴覚・嗅覚・味覚・触覚の五感で認識される。しかし、多くの生物には、子孫を残して種を保存するために、同種の異性を正確に認識する情報手段が、進化の過程で脱落せずに残されている。この第六の因子を「フェロモン」と呼ぶ。フェロモンを理解することは、生殖という生命活動の根源を理解することである。

マウスなどの齧歯類は、鼻腔下部にある鋤鼻器官においてフェロモンを感知する。国内外の研究において、鋤鼻器官を活性化させるフェロモン候補として尿由来の低分子有機化合物やペプチド性物質がいくつか単離されていたが、自由に行動している齧歯類の鋤鼻器官で感知されるという実証は無かった。

研究協力者の東原(東大院・農学生命)からは、オスマウスの涙腺からフェロモン活性物質を単離・精製した。その結果、分子量約7千のペプチド性の物質を同定し、exocrine gland-secreting peptide 1 (ESP1) と命名した(Kimoto *et al.*, *Nature*, 2005)。また、協力者らは、鋤鼻器官に発現する数百種類のGタンパク質共役受容体(GPCR)のうち、細胞外領域の長いクラスCタイプに属するvomeronasal type 2 receptor p5 (V2Rp5)によってESP1が選択的に受容されることを明らかにした(Haga *et al.*, *Pure Appl. Chem.*, 2007)。さらに、ESP1がメスマウスの性行動を誘発する性フェロモンであることを実証した(Haga *et al.*, *Nature*, 2010)。

ESP1は、リガンド~受容体~性行動という一連のシグナルの流れが明らかになった哺乳類において唯一のペプチド性フェロモンである。

研究代表者は、研究協力者らとの共同研究のもと、核磁気共鳴(NMR)法を用いて、初めてESP1の立体構造決定に成功した。

2. 研究の目的

本研究は、ESP1が、受容体であるV2Rp5に正確に認識される仕組みを、立体構造に基づいて理解することを目的とする。本研究の成果は、実験用マウスの作製の促進や野生マウスの繁殖抑制に有効であるアゴニスト・アンタゴニストの開発に有力な立体構造情報を提供する。

3. 研究の方法

- (1) ESP1 V2Rp5 間の結合強度を評価する実験系の確立

試料調製

・ESP1は、大腸菌発現系を用いて、ポリヒスチジンタグ融合蛋白質として発現させた。ニッケルアフィニティークロマトグラフィにて粗精製後、トロンピンプロテアーゼ

によりタグ部分と切り離し、イオン交換、ニッケルアフィニティ、逆相の各クロマトグラフィにより精製した。

・V2Rp5は、コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系(Takai *et al.*, *Nat. Protoc.*, 2010)を用いて、FLAGタグ融合蛋白質として発現させた。Venus flytrap module (VFTM) と cysteine-rich domain (CRD) から成る細胞外領域の全長、および、VFTMのみをそれぞれ調製した。

・研究協力者らは、ESP1遺伝子と相同な配列をもつ遺伝子がマウスに38種類あることを見出している(Kimoto *et al.*, *Curr. Biol.*, 2007)。ESP1と最も配列相同性の高いESP4について、ESP1と同様に大腸菌発現系を用いて調製し、ESP1とV2Rp5の結合が特異的であるか評価するために用いた。

結合強度を評価する実験系の確立

・分光学的にNMRを用いてESP1とV2Rp5の結合強度を評価するため、双方が沈澱を形成せず、かつ、NMR信号を観測できる溶液条件の検討を行った。条件検討のため、M9最少培地を用いて¹⁵N標識ESP1の調製を行った。

・プルダウン法を用いて結合強度を評価するため、ESP1をアミンカップリングにて樹脂に固定し、これに結合したFLAGタグ融合V2Rp5の量を抗FLAG抗体を利用したウェスタンブロット法にて評価した。

- (2) 立体構造に基づくESP1 V2Rp5 結合面の同定

変異体の調製

・立体構造が既知のクラスCタイプのGPCRのうち、V2Rp5と最も高い配列相同性をもつ代謝型グルタミン酸受容体(mGluR)の構造座標を利用して、V2Rp5のホモロジーモデルを作成した。このモデル構造に基づいて予想されたESP1結合部位へ変異を導入したV2Rp5の調製を行った。

変異体の結合強度の評価

・(1)で確立したESP1 V2Rp5間の結合強度を評価する実験系を用いて、V2Rp5変異体の結合能を評価した。その結果に基づいて、V2Rp5上のESP1結合面を同定した。

- (3) ESP1 V2Rp5 複合体モデルの構築と検証

ESP1 V2Rp5 複合体モデルの構築

・研究代表者の決定したESP1の立体構造に基づく変異体について、メスマウス鋤鼻神経の活性化能を調べることにより、ESP1上の受容体結合部位の情報を既に得てい

る。この情報と、本研究で得られた V2Rp5 の変異体解析に基づいて同定した V2Rp5 上の ESP1 結合面の電荷と形状が適合するように、ソフトウェア MOE にて複合体モデルを構築した。

総合解釈

・ESP1 V2Rp5 モデルの結合面に位置するアミノ酸残基について、ESP1 や ESP4 をはじめとする ESP ファミリータンパク質、および、V2Rp5 をはじめとする V2R ファミリータンパク質におけるアミノ酸残基の保存性に着目し、ESP1 が正確に受容体に認識される要因を明らかにする。

4. 研究成果

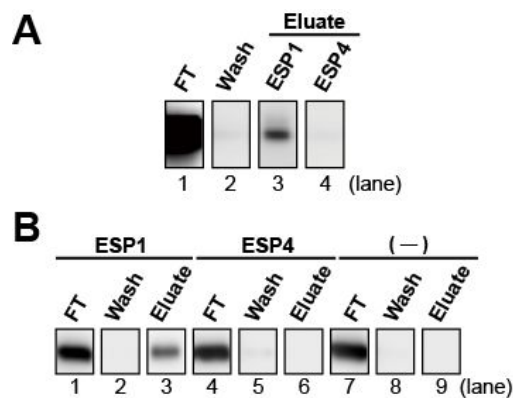
(1) ESP1 V2Rp5 間の結合強度を評価する実験系の確立

ESP1 と V2Rp5 細胞外領域について、研究方法に記した手法で調製法を確立し、論文報告した (Yoshinaga *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 2013)。

また、ESP1 と V2Rp5 の結合が特異的であるか評価するために用いた ESP1 と最も配列相同性の高い ESP4 について調製法を確立し、論文報告した (Hirakane *et al.*, *Protein Expr. Purif.*, 2014)。さらに、ESP4 について NMR 解析を行い、ESP1 と同様にヘリックスに富んだ立体構造をもつことを明らかにした (Taniguchi *et al.*, *Biomol. NMR Assign.*, 2014 & 未発表データ)。

ESP1 と V2Rp5 の双方が沈澱を形成せず、かつ、NMR 信号を観測できる溶液条件の検討を行った。ESP1 は、酸性 pH の条件では、¹H-¹⁵N HSQC スペクトルにおいて信号の分散、強度ともに良好であった。しかしながら、中性 pH に近づくに従って、沈澱は生じないが信号が消失するため、可溶性のオリゴマーを形成することが分かった。円二色性測定により、酸性および中性 pH のどちらにおいてもヘリックス構造を保持していることが分かった。一方、V2Rp5 の溶液条件を検討した結果、ほとんどの溶液条件において沈澱を形成するが、界面活性剤ジギトニンが溶解度を高めることが分かった。これらの結果、分光学的に結合強度を評価する実験系の確立は困難であると判断した。

次に、ジギトニンが V2Rp5 の溶解度を高めることを利用して、樹脂に固定した ESP1 に対する V2Rp5 の結合量をウェスタンブロット法にて評価することに成功した (Yoshinaga *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 2013)。ESP1 と最も配列相同性の高く立体構造も似ている ESP4 は結合せず、ESP1 と V2Rp5 細胞外領域全長との特異的な結合を観測できた (図 1 A)。研究協力者らによる、ESP1 と ESP4 の受容体が異なるという知見 (Haga *et al.*, *Nature*, 2010) とも一致している。

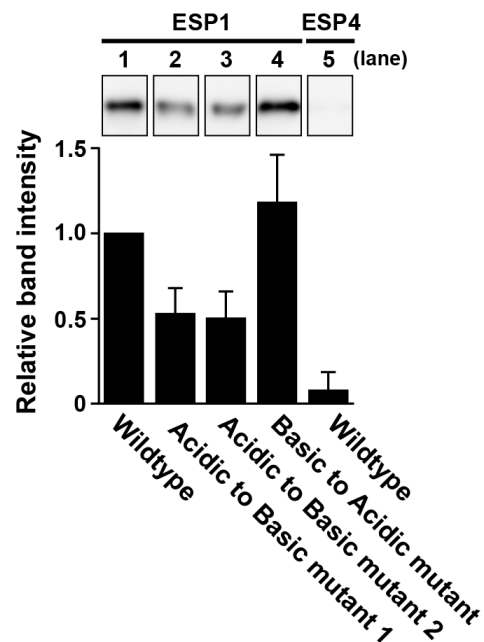


(図 1) ESP-V2Rp5 プルダウンアッセイ

さらに、ESP1 と結合した V2Rp5 は、高塩濃度で溶出されることから、これらの相互作用は、主に静電相互作用からなることが示された (図 1 B)。また、VFTM のみからなる V2Rp5 においても ESP1 との結合が見られたことから、結合領域を絞り込むことができたと考える (未発表データ)。

(2) 立体構造に基づく ESP1 V2Rp5 結合面の同定

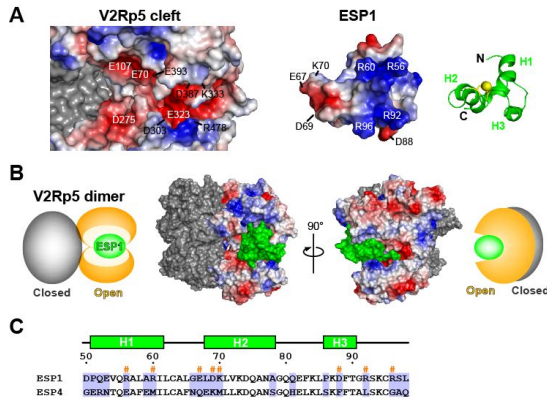
V2Rp5 の VFTM のホモロジーモデルを作成し、研究代表者の決定した ESP1 の立体構造から予想された ESP1 結合部位へ変異を導入した V2Rp5 を用いて (図 1) と同様に、プルダウンアッセイを行った (図 2) (未発表データ)。塩基性残基を酸性残基に変異した変異体において ESP1 結合能は低下しないが、酸性残基を塩基性残基に変異した 2 つの変異体において、ESP1 結合能が低下することが分かった。V2Rp5 上の酸性残基が ESP1 結合に重要であることを示している。ESP1 が塩基性残基に富むことから、静電相互作用が結合に必須であることが明らかになった。



(図 2) ESP-V2Rp5 変異体アッセイ

(3)ESP1 V2Rp5 複合体モデルの構築と検証

ESP1 の変異体について、メスマウス鋤鼻神経の活性化能を調べることにより、ESP1 上の受容体結合部位の情報を既に得ている。この情報と、(1)と(2)で得られた V2Rp5 上の ESP1 結合面の情報に基づいて、双方の電荷と形状が適合するように、ESP1 V2Rp5 (VFTM) 複合体モデルを構築した (図 3 A, B) (Yoshinaga *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 2013)。



(図 3) ESP-V2Rp5 複合体モデル

まず、活性型の mGluR 二量体の VFTM の立体構造を鋳型として、V2Rp5 の立体構造モデルを構築した。二量体のうち Open form に見られるくぼみのサイズ (約 5,800 Å³) は、ESP1 のサイズ (約 5,600 Å³) に適合するように見えた。一方、不活性型の mGluR 二量体の立体構造に基づく V2Rp5 モデルのくぼみのサイズは、ESP1 のサイズより小さかった。活性型の V2Rp5 は ESP1 を収容できるが、不活性型の V2Rp5 は収容できないことを示唆する。これらの知見に基づき、次に、活性型の V2Rp5 と ESP1 の複合体モデルを構築した (図 3 A, B)。この複合体モデルは、静電相互作用が ESP1 V2Rp5 の結合に関与するという実験結果を支持している。

ESP1 への変異導入により ESP1 V2Rp5 の結合強度を減弱させたアミノ酸残基 (図 3 C の #) は、ESP ファミリーに保存されておらず、ESP1 特有のものであった。また、(2)で示した *in vitro* のプルダウンアッセイにおいて、V2Rp5 への変異導入により結合強度を減弱させたアミノ酸残基についても、V2R ファミリーに保存されていない特有のものであった。これらの結果は、結合面における電荷分布が、個々の ESP と受容体間の結合の特異性を生じさせていることを示唆している。

以上、本研究により、哺乳類のペプチド性フェロモンと受容体の構造的知見を初めて得た。ESP1 の立体構造情報は、個々の ESP ファミリーと受容体の特異的認識機構を明らかにするための基盤となる。V2R ファミリーは、マウスで 121 個同定されており、齧歯類に加えて、両生類や魚類においても多く

見出されている。今回、我々の得た知見は、これらの他の V2R ファミリーのリガンドの同定に貢献できると考えられる。また、V2R ファミリーは、味覚受容体 T1R と相同性をもつため、味覚の受容機構の理解に貢献できる可能性をもつ。ESP1 と V2Rp5 の立体構造情報をもとに、V2Rp5 のアゴニストおよびアンタゴニストを作製することにより、ネズミの個体数の制御が可能となる。今後、遺伝子改変マウスの作製効率の向上や野生ネズミの異常増殖の抑制を通じて、医薬分野における研究開発、環境問題および食糧問題の解決に大いに貢献できると考えられる。

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 4 件)

Hirakane, M., Taniguchi, M., Yoshinaga, S., Misumi, S., and Terasawa, H.

Expression and purification of mouse peptide ESP4 in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification* **96**, 20-25 (2014), 査読有り
doi: 10.1016/j.pep.2014.01.010.

Taniguchi, M., Yoshinaga, S., Haga-Yamanaka, H., Touhara, K., and Terasawa, H.

Backbone and side-chain ¹H, ¹⁵N and ¹³C assignments of mouse peptide ESP4. *Biomolecular NMR Assignments* **8**, 7-9 (2014), 査読有り
doi: 10.1007/s12104-012-9441-7.

谷口雅浩, 吉永壮佐, 佐藤徹, はが紗智子, 東原和成, 寺沢宏明

マウスの性行動を制御するペプチド性フェロモン ESP1 の立体構造決定

クラス C タイプ GPCR によるリガンド認識機構の解析

化学と生物 **52**, 67-69 (2014), 査読有り

Yoshinaga, S., Sato, T., Hirakane, M., Esaki, K., Hamaguchi, T., Haga-Yamanaka, S., Tsunoda, M., Kimoto, H., Shimada, I., Touhara, K., and Terasawa, H.

Structure of the mouse sex peptide pheromone ESP1 reveals a molecular basis for specific binding to the class C G-protein-coupled vomeronasal receptor.

Journal of Biological Chemistry **288**, 16064-16072 (2013), 査読有り
doi: 10.1074/jbc.M112.436782.

〔その他〕
ホームページ等

研究成果の紹介「マウスの性行動を制御する
ペプチド性フェロモンの立体構造と受容体
相互作用機構を解明」

[http://www.a.u-tokyo.ac.jp/topics/2013/
20130509-4.html](http://www.a.u-tokyo.ac.jp/topics/2013/20130509-4.html)

6．研究組織

(1)研究代表者

吉永 壮佐 (YOSHINAGA SOSUKE)
熊本大学・大学院生命科学研究部・助教
研究者番号：00448515

(2)研究協力者

東原 和成 (TOUHARA KAZUSHIGE)
東京大学・大学院農学生命科学研究科・
教授
研究者番号：00280925