

平成12年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究

若手研究者奨励研究報告書

目 次

課題番号

第1分野

20000	13001	アドレノメデュリン投与による重症心不全治療の臨床評価	永谷 憲歳	……	1
1009A	13002	子宮体癌に対するヒト型モノクローナル抗体の作製	福地 剛	……	5
1008A	13003	新しい変異導入法の開発による神経疾患モデルマウスの樹立	笹岡 俊邦	……	10
1010A	13004	病原細菌のコミュニケーションシステムを標的とした医薬品の開発	阿部 章夫	……	15
1006A	13005	糖部立体配座を固定した人工核酸によるアンチセンス医薬品の開発	小比賀 聡	……	20
1007A					

第2分野

1011A	23001	慢性C型肝炎に対するインターフェロン治療効果に関与する宿主因子の解析と医療への応用	土方美奈子	……	29
1012A	23002	ゲノム情報に基づいた移植免疫機構の解明と免疫抑制療法	梨井 康	……	35
1016A	23003	ヒトヘルペスウイルス8による悪性腫瘍発症機構の解明と医療への応用	片野 晴隆	……	42
1013A	23004	血管内造血機構の解明と臍腸間膜動脈より新規造血幹細胞因子の単離	高倉 伸幸	……	47
1014A	23005	BRS-3安定発現細胞系を用いた新規摂食調節ペプチドの同定と病態生理学的意義の解明	宮里 幹也	……	52
1015A	23006	ATP受容体を介した痛み情報伝達機序の解明と医療への応用	小泉 修一	……	57
1018A	23007	トリプトファンによる細胞性免疫の制御	五條 理志	……	61
1019A	23008	気管支喘息における気道リモデリングの制御についての検討	中尾 篤人	……	66
1017A	23009	顔面神経再生に際して発現制御を受ける遺伝子データベースの構築	赤澤 智宏	……	69

第3分野

1020A	33001	循環器病治療薬開発に不可欠な小動物における循環動態テレメトリシステムの開発	佐藤 隆幸	……	73
1022A	33002	有機アニオントランスポーターを介した小腸および腎臓における排出・分泌機構	崔 吉道	……	77
1021A	33003	組換えヒトP450酵素の代謝反応を利用した医薬品等の評価方法の開発	山崎 浩史	……	81

第4分野

1025A	43001	腹膜透析の重篤な合併症である硬化性被嚢性腹膜炎 (Sclerosing Encapsulating Peritonitis) の診断と治療に関する研究	平原 一郎	……	89
1023A	43002	多発性硬化症における病原性T細胞特異的抑制方法の検討	三宅 幸子	……	98
1024A	43003	熱帯病に対する新たな治療薬の開発に関する研究	小出 達夫	……	103

20000	第5分野		
1026A	53001	カルボシラン dendリマーを基本骨格としたペロ毒素中和剤の開発	西川喜代孝 …… 109
1027A	53002	新規抗酸化酵素ペルオキシレドキシンを標的とする抗マラリア薬の開発に関する研究	河津信一郎 …… 113
1028A	53003	Non-typable Haemophilus influenzae 由来リポオリゴ糖抗原に対するペプチドミミックのワクチン応用についての研究	橋本 雅仁 …… 119
1029A	53004	RNAヘリカーゼを標的とする抗ウイルス剤の開発	清水 博之 …… 124
1030A	53005	薬用植物の分子エンジニアリングによる抗酸化物質生産の改良	山崎 真巳 …… 132
	第6分野		
1031A	63001	分子間相互作用制御による高度安定型タンパク質製剤の設計	伊豆津健一 …… 137
1032A	63002	生分解性を有する新規な化学合成ハイドロゲルの開発と組織再建スキャホールドへの応用	山岡 哲二 …… 140
1033A	第7分野		
	73001	ヒト破骨細胞と骨芽細胞培養系を用いた薬物の有効性と安全性に関する検討	和田 誠基 …… 151

BRS-3安定発現細胞系を用いた新規摂食調節ペプチドの同定と病態生理学的意義の解明

所属 国立循環器病センター研究所 生化学部
研究者 宮里 幹也

要旨

BRS-3 安定発現細胞系を用いて、新規摂食調節因子の同定を試みた。ラット脳と小腸から3種類の活性ペプチドを単離したが、いずれも既知のペプチドで比活性も低く、BRS-3 への交差反応あるいは発現細胞の内在性受容体に反応したものであると判断した。

1. 研究目的

肥満は高血圧・心血管障害・糖尿病などの疾患を頻発させ、その治療と予防は医学的・社会的に大きな課題であり、分子レベルでの病態の解明が、近年急速に進んでいる。本研究は、新たな摂食調節因子である BRS-3 (ボンベシン受容体サブタイプ3, bombesin receptor subtype-3)受容体の内在性リガンドを同定し、その病態生理学的意義を解明することを目的とする。

ボンベシンは、カエルから単離された生理活性ペプチドで、脳と消化管に広く分布しており、摂食・行動調節、糖・脂質代謝調節、内外分泌調節等に関与している。哺乳動物におけるボンベシン様ペプチド受容体には、ニューロメジンB(NMB)に高親和性の NMB 受容体、ガストリン放出ペプチド(GRP)とその C 末フラグメントであるニューロメジンC(NMC)に高親和性の GRP 受容体、および内在性リガンドの不明 (いわゆるオーファン受容体) である BRS-3 の3種類が存在する。BRS-3 受容体は、脳の摂食中枢のある視床下部に局限して存在していることが報告されている。また、3種類のボンベシン受容体の各欠損マウスの解析の結果、BRS-3 欠損マウスのみが、摂食量の増加、肥満、糖・脂質代謝異常を呈することが報告され、BRS-3 の特異的リガンドが、肥満およびエネルギー代謝の分子機構に極めて重要な因子であると内外から注目されている。しかしながら、その内在性リガンドが未だ同定されていないため、基礎的研究が全く進展していない。今回、申請者が提起した研究計画は、BRS-3 シグナル伝達系とその生理機能に関する基本的問題の解決に重要であり、その遂行により肥満およびエネルギー代謝の分子機構の解明に大きく寄与するものと考えられる。また、BRS-3 の特異的かつ高親和性アゴニストの開発は、肥満ならびに関連疾患の予防・治療薬開発につながると予想され、臨床応用への研究など、さらに新たな研究分野への展開も期待される。

2. 研究方法

①BRS-3 安定発現細胞系の樹立

オーファン受容体である BRS-3 について、報告されているマウス、モルモット、ヒトについては、脳組織あるいはヒト肺癌培養細胞株から RNA を抽出し、RT-PCR により coding 領域の cDNA を増幅する。また、報告されていないラット BRS-3 cDNA については、マウス、

モルモット、ヒト BRS-3 のアミノ酸相同性をもとに作製した primer を用いて RT-PCR を行い部分塩基配列を決定し、さらに、5'-RACE および 3'-RACE にてラット BRS-3 cDNA 全長を決定する。得られた cDNA を真核細胞用の発現ベクターに (pcDNA3.1) に組み込み、哺乳動物培養細胞 (CHO 細胞) ヘリポゾーム法でトランスフェクトする。選択培地中で、コロニーを形成した細胞を単離し、ノーザンブロットおよび RT-PCR による mRNA 量の定量と、報告されている合成アゴニスト投与による発現細胞での細胞内 Ca 濃度変化から、受容体高発現細胞を選択する。

②ペプチド画分抽出、精製

ラット脳および小腸約 200g よりペプチド画分を抽出する。内因性プロテアーゼによるペプチドの分解を防ぐために、抽出した組織を沸騰水中でボイルしてプロテアーゼを失活させる。熱処理した組織は、氷冷後酢酸を 1 規定になるように添加し、ポリトロンによってホモジナイズ後、遠心し上清を得る。アセトン沈殿にてタンパク成分を除去し、逆相 C18 カラムで脱塩・濃縮して得られた粗ペプチド画分は、SP-イオン交換クロマトグラフィーにて酸性画分、中性・弱塩基性画分、強塩基性画分に大別する。さらに、セファデックス G-50 ゲル濾過を用いて分離する。

③安定発現細胞系を用いたアッセイおよびリガンドの精製・構造決定

①で樹立した BRS-3 安定発現細胞株を 96 穴プレートに培養し、蛍光色素 Fluo-4 で incubation した後、②で抽出・精製したサンプルを加え、FLIPR System (Molecular Devices 社)を用いて細胞内 Ca 変動を経時的に測定する。活性の認めるフラクションを、さらにイオン交換高速液体クロマトグラフィー(HPLC)、逆相 HPLC 等を用いてリガンド精製を進める。最終的に単一に精製したペプチドをプロテインシークエンサー、アミノ酸分析機、質量分析計を用いて構造決定する。

3. 研究成果

①BRS-3 cDNA クローニングおよび遺伝子発現

マウス、モルモット脳およびヒト肺小細胞癌細胞株(NCI-N417)から RNA を抽出し、データベース上に報告されている各 BRS-3 cDNA のシークエンスをもとに primer を作製し、RT-PCR にてマウス、モルモット、ヒト BRS-3 の coding 領域の cDNA を増幅した。さらに未報告のラット BRS-3 については、ラット視床下部から RNA を抽出し、他種属のシークエンスに基づいた primer での RT-PCR および RACE 法によりラット BRS-3 cDNA の塩基配列を決定した。cDNA より想定される open reading frame のラット BRS-3 は、他種属 BRS-3 と同様に 399 アミノ酸残基から構成され、マウス、モルモット、ヒトとそれぞれ 95.7%, 85.2%, 86.0% のアミノ酸相同性を有していた。

また、ラット全身組織における BRS-3 の遺伝子発現を RT-PCR にて検討した結果、脳とともに末梢組織でも低レベルであるが BRS-3 が発現していることが判明した。脳においては視床下部に高発現であり、末梢組織では心臓、消化管、膵臓、腎臓、肺などに低レベルであるが発現を認め、精巣においては脳に匹敵する、あるいはそれ以上の発現を認めた。

②BRS-3 安定発現細胞系の樹立

①で得たヒト、モルモット、マウスおよびラット BRS-3 cDNA を真核細胞用の発現ベクターに (pcDNA3.1) に組み込み、CHO 細胞にリポゾーム法でトランスフェクト後、G418 を含む選択培地中で、コロニーを形成した細胞を単離した。ノーザンブロットによりヒト、モルモット、マウスおよびラット BRS-3 のそれぞれ高発現細胞を得たことを確認した。報告されている合成アゴニスト[D-Phe6, β Ala11, Phe13, Nle14]Bn-(6-14)投与による細胞内 Ca 変動測定の結果、ヒト BRS-3 発現細胞は 10^{-9} M から容量依存性に細胞内 Ca 濃度を上昇させるのに対し、モルモット、マウスおよびラット BRS-3 発現細胞は極めて低反応であり、合成アゴニストの BRS-3 に対する反応性は種属差があることが判明した。また、合成アゴニストに反応性の高いヒト BRS-3 発現細胞において、ノーザンブロットによる BRS-3 の遺伝子発現レベルの異なる細胞について細胞内 Ca 変動を測定した結果、合成アゴニスト投与による細胞内 Ca 濃度の上昇レベルと BRS-3 遺伝子発現レベルは、必ずしも相関しなかった。

③BRS-3 内在性リガンドの探索

ラットの脳と小腸それぞれ約 200g を出発材料として、煮沸後酸抽出し、遠心して得た上清を、逆相 C18 カラムで脱塩・濃縮して、SP-セファデックスにて酸性画分(SP-I)、中性・弱塩基性画分(SP-II)、強塩基性画分(SP-III)に大別した。各組織の SP-II, SP-III を G-50 ゲル濾過を用いて分離した。ゲル濾過の各フラクションの一部を BRS-3 安定発現細胞に加え、FLIPR System を用いて細胞内 Ca 変動を測定した結果、脳および小腸の SP-III のゲル濾過フラクションのそれぞれ分子量約 4,000 と約 1,000 のフラクションに Ca 上昇活性を認めた。活性の認めるフラクションを、さらに CM-HPLC で分離した結果、脳・小腸 SP-III の分子量約 4,000 のフラクションからは、それぞれ少なくとも2つの活性ピークを認め、分子量約 1,000 のフラクションからは1つの活性ピークを認めた。脳と小腸のそれぞれの活性ピークの CM-HPLC における溶出位置は完全に一致していたため、小腸の3つの活性のみ、さらに逆相 HPLC を用いて分離を進めた結果、それぞれ単一の活性ピークとして精製できた。最終的に単一に精製した3種類のペプチドをプロテインシークエンサーを用いてアミノ酸配列を解析した結果、分子量約 4,000 のフラクションから得られたペプチドは、

APVSTGAGGGTVLAKMYPRGSHWAVGHLM rat GRP(1-29)

VSTGAGGGTVLAKMYPRGSHWAVGHLM rat GRP(3-29)

また、分子量約 1,000 のフラクションから得られたペプチドは、

GSHWAVGHLM rat GRP(20-29)/NMC

いずれも、哺乳動物のボンベシン様ペプチドで GRP 受容体のリガンドであった。

4. 考察

①BRS-3 cDNA クローニングおよび遺伝子発現

報告されているマウス、モルモット、ヒト BRS-3 cDNA に加えて、未報告のラットの cDNA をラット視床下部 RNA を用いて、RT-PCR および RACE 法によりクローニングした。得られた cDNA より想定される受容体タンパクは、他種属 BRS-3 と同様に 399 アミノ酸残基から構成され、マウス BRS-3 と 95.7%のアミノ酸相同性を有し、また、ラット GRP 受容体および NMB 受容体とは明らかに異なっており、ラット BRS-3 cDNA と判断した。

ラット BRS-3 遺伝子発現は、RT-PCR レベルでは中枢神経系（特に視床下部）のみならず、末梢組織、特に精巣でも発現しており、BRS-3 シグナル系は、BRS-3 ノックアウトマウスで認められた摂食やエネルギー代謝調節機構への関与以外にも、末梢組織での生理的意義を有する可能性も示唆された。

②BRS-3 安定発現細胞系の樹立

CHO 細胞を用いてヒト、モルモット、マウスおよびラット BRS-3 安定発現細胞系を作製し、報告されている合成アゴニストで細胞内 Ca 上昇活性を検討した結果、ヒト BRS-3 発現細胞とモルモット、マウスおよびラット BRS-3 発現細胞では反応性に解離を認めた。本合成アゴニストの基本骨格はボンベシンであり、GRP 受容体や NMB 受容体にも結合し、細胞内 Ca を上昇させる。また、ヒト BRS-3 に対する反応性は、GRP 受容体、NMB 受容体に対する反応性よりむしろ低く、NMB 受容体安定発現細胞（CHO 細胞を用いて作製）では $10^{-10}\sim 10^{-11}\text{M}$ から容量依存性に細胞内 Ca 濃度を上昇させるのに対し、ヒト BRS-3 発現細胞は 10^{-9}M からであった。したがって、本アゴニストは BRS-3 に対しては低親和性のアゴニストと判断でき、BRS-3 の種属差に伴う僅かなアミノ酸配列の相違が、反応性の解離をもたらしていると考えた。

③BRS-3 内在性リガンドの探索

ラット脳、小腸ペプチド画分から、BRS-3 安定発現細胞を用いて細胞内 Ca 上昇活性を指標としてペプチド精製を進めた結果、3 種類のペプチドが単離できた。アミノ酸配列解析の結果、ラット GRP(1-29)とその N 末端 2 アミノ酸残基(Ala-Pro)が欠けた GRP(3-29)および GRP の C 末フラグメントであるニューロメジン C (NMC)であった。もう一種類の哺乳類のボンベシン様ペプチドであるニューロメジン B (NMB)においても、ブタでは 10 アミノ酸残基からなる NMB 以外に、32 残基の NMB-32 およびその N 末端 2 アミノ酸残基(Ala-Pro)が欠けた NMB-30 が存在しており、GRP についても同様の関係が存在していた。

GRP および NMC は GRP 受容体に対して高親和性に結合し、BRS-3 に対しては低親和性である。また、CHO 細胞自身は、内在性に GRP 受容体を有している。今回精製した 3 種類のペプチドは、おそらくは BRS-3 に対する交差反応、あるいは CHO 細胞の内在性の GRP 受容体に反応した結果単離されたペプチドであり、BRS-3 の真の内在性リガンドではないと判断するのが妥当であると考えた。

本研究で用いたペプチド精製法ならびにアッセイ法を用いて、ボンベシンペプチドファミリーを単離することが可能であることは確認できた。BRS-3 の発現レベルは、脳においても低レベルであり、その内在性リガンドの脳での量も非常に少量であると考えられ、BRS-3 の真の内在性リガンド探索のためには、より大量の組織材料からペプチド精製を進める必要があると考える。また、近年、G 蛋白質共役型受容体(GPCR)においても、他の GPCR とヘテロ複合体を形成した時のみ、あるいは特別な細胞内因子の存在下でのみリガンドが結合し、シグナルが伝達されることが報告されており、今後、BRS-3 においてもこのような可能性を念頭において、リガンドの検索を進めていく必要があると考える。

5. まとめ

報告されているマウス、モルモット、ヒト BRS-3 cDNA に加えて、未報告のラット BRS-3

cDNA のクローニングに成功し、これらの cDNA を用いて、BRS-3 安定発現細胞株を樹立した。また、ラット cDNA の塩基配列に基づき RT-PCR にて BRS-3 遺伝子発現を検討した結果、脳のみならず低レベルであるが末梢組織でも発現していることが判明した。

報告されている合成アゴニストの各種属の BRS-3 安定発現細胞に対する細胞内 Ca 上昇活性を検討した結果、ヒト BRS-3 に対しては 10^{-9} M から容量依存性に活性を示すのに対し、モルモット、マウスおよびラット BRS-3 は極めて低反応であり、合成アゴニストの BRS-3 に対する反応性は種属差を認めた。

ラット脳・小腸抽出物から BRS-3 安定発現細胞系を用いて細胞内 Ca 上昇活性を指標として、3 種類のペプチドを単離した。アミノ酸配列解析の結果、ラット GRP(1-29)、GRP(3-29)および NMC であった。3 種のペプチドは、BRS-3 と交差反応性を有し、また、CHO 細胞にも内在性に GRP 受容体を有しているため、これらに基づく活性に伴い単離されたペプチドであり、BRS-3 の真の内在性リガンドではないと判断した。

BRS-3 の内在性リガンド探索のためには、より大量の組織材料からの精製や、多様化する GPCR の作用機序も念頭におく必要があると考える。

6. 研究発表

該当なし

平成12年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究
若手研究者奨励研究報告書

平成13年11月30日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号

共同ビル（小伝馬町駅前）4F

電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社