

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2005-291742

(P2005-291742A)

(43) 公開日 平成17年10月20日(2005. 10. 20)

(51) Int. Cl.⁷

GO 1 N 33/53

GO 1 N 33/543

F I

GO 1 N 33/53

D

GO 1 N 33/543 5 9 5

テーマコード (参考)

審査請求 未請求 請求項の数 6 O L (全 12 頁)

(21) 出願番号 特願2004-103089 (P2004-103089)

(22) 出願日 平成16年3月31日 (2004. 3. 31)

(71) 出願人 500386563

株式会社ファルマデザイン

東京都中央区八丁堀2丁目19番8号 長

谷工八丁堀ビル5階

(71) 出願人 504128530

松本 治

滋賀県大津市中庄1-17-14-302

(71) 出願人 504080607

辻本 豪三

東京都世田谷区中町1-14-18

(72) 発明者 松本 治

滋賀県大津市中庄1-17-14-302

(72) 発明者 辻本 豪三

東京都世田谷区中町1-14-18

(72) 発明者 亀甲 達彦

京都府京田辺市花住坂2-11-10

(54) 【発明の名称】 オーフアンGPCRと共役するGタンパク質のサブタイプの予測方法

(57) 【要約】

【課題】本発明は、オーファンGPCRのGタンパク質活性化部位の予測方法を提供すると共に、相互作用するGタンパク質のサブタイプを予測する方法の提供を目的とする。

【解決手段】本発明は、オーファンGPCRの細胞内第3ループのアミノ酸配列を膜貫通領域予測プログラムを用いて予測し、Gタンパク質の活性化部位と考えられるアミノ酸配列から構成される部分ペプチドを作製し、該ペプチドと候補Gタンパク質の相互作用を検出することにより、前記オーファンGPCRと共役するGタンパク質のタイプを予測する方法を提供する。

【選択図】

なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

オーファン GPCR と共役する G タンパク質のサブタイプを予測する方法であって、
(a) 前記オーファン GPCR の細胞内第 3 ループのアミノ酸配列を、膜貫通領域予測プログラムを用いて予測する段階、
(b) 前記第 3 ループアミノ酸配列中に、式 (I) 又は (II) で示されるアミノ酸配列を含むアミノ酸配列部分を検索する段階、
(c) (b) の段階で検索される前記アミノ酸配列部分を含むペプチドを作製する段階、
(d) (c) の段階で作製したペプチドと G タンパク質の相互作用を検出する段階、
(e) (d) の段階で検出された検出結果に基づき、前記オーファン GPCR と共役する G タンパク質のサブタイプを予測する段階、
から成る方法。

10

- B 1 - B 2 - X 1 - X 2 - B 3 - (B (1 ~ 6) は塩基性アミノ酸、X は任意のアミノ酸) (I)

- B 4 - B 5 - X 3 - B 6 - (B (1 ~ 6) は塩基性アミノ酸、X は任意のアミノ酸) (II)

【請求項 2】

前記膜貫通領域予測プログラムが、3つの膜貫通領域予測プログラム、SOSUI、TopPred、TMHMM から選択されることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

20

請求項 1 に記載の式中、B 1、B 2、B 3、B 4、B 5、B 6 が、それぞれ、リジン、アルギニン、ヒスチジンから成るグループから選択されることを特徴とする請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 4】

上記 (d) の段階の検出が、表面プラズモン共鳴 (SPR) 法、または結合アッセイ法により行なわれることを特徴とする請求項 1 乃至 3 に記載の方法。

【請求項 5】

上記 (d) の段階で相互作用が検出された場合、前記オーファン GPCR と共役する G タンパク質は、上記 (d) の段階で用いた G タンパク質と同じサブタイプであると予測することを特徴とする、請求項 1 乃至 4 に記載の方法。

30

【請求項 6】

上記 (d) の段階の G タンパク質が G_i 又は G_s であることを特徴とする請求項 1 乃至 4 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、オーファン GPCR と共役する G タンパク質のサブタイプの予測方法に関する。

【背景技術】

【0002】

40

多くのサイトカイン、ホルモン及び神経伝達物質等の生理活性物質は、細胞膜に存在する特異的な受容体タンパク質を通じて生体中の機能を発揮している。これらの受容体タンパク質中の多くは、7つの膜貫通領域を有する共通した構造を有しており、GTP 結合タンパク質 (G タンパク質ともいう) の活性化を通じて、細胞内シグナル伝達を行なうことから G タンパク質共役型受容体タンパク質といわれる。G タンパク質共役型受容体タンパク質 (以下、GPCR と称する) に、生体中に存在するリガンド (例えば、前記生理活性物質) が結合すると、共役する G タンパク質を介してシグナルを細胞内に伝達し、このシグナルにより細胞増殖の活性化や抑制等の様々な生体内反応が惹起される。従って、生体内の各種細胞や臓器における複雑な機能を調節する物質と、その特異的な受容体タンパク質 (特に G タンパク質共役型受容体タンパク質) との関係を明らかにすることは、各種

50

生体の細胞や臓器の生理調節機能を解明し、それら機能と密接に関連した医薬品開発に非常に重要な手段を提供することとなる。

【0003】

GPCRを介したシグナルを細胞内に伝達する上で重要な役割を果たしているのがGタンパク質である。Gタンパク質の主なサブタイプとしてGs、Gi、Gq、Goなどが知られているが、これらGタンパク質はいずれも、 からなるサブユニット構造をとっており、その中で サブユニットがGTPase活性を有している。

Gsタンパク質は、共役するGPCRとの相互作用を介して、アデニル酸シクラーゼの活性化を引き起こし、一方、Giタンパク質は、アデニル酸シクラーゼの活性を逆に抑制することが知られている。両Gタンパク質は、作用メカニズムは異なるものの、細胞内メッセンジャーとして機能するcAMPの存在量を調節することで、細胞内に様々なシグナルを伝えている。

10

また、Gqタンパク質は、ホスホリパーゼCを活性化してホスファチジルイノシトール-4,5-二リン酸(PIP2)を分解し、イノシトール-1,4,5-三リン酸(IP3)とジアシルグリセロール(DAG)を産生する。産生されたIP3は小胞体からCa²⁺を細胞質内へ遊離させ、この遊離Ca²⁺がDAGとホスファチジルセリンと協同してプロテインキナーゼCを活性化させる。

【0004】

このように、GPCRと共役するGタンパク質はそのサブタイプによって、全く異なるシグナルを伝達していることから、機能未知であるオーファンGPCRの作用機序を解明する上では、どのタイプのGタンパク質と共役しているかを明らかにすることが非常に重要なこととなってくる。

20

また、医薬品の多くは、GPCRをターゲットにしており、その機能解明は創薬に重要であるといえる。オーファンGPCRのリガンドスクリーニング研究にはターゲットとなる受容体にG16を融合させ、カルシウム濃度を測定するなどの手法が行われているが、レセプターのもう一つの機能であるシグナル伝達機構を知ることはできない。つまり、GPCRに特異的なリガンドが不明のままカルシウム濃度の測定等を行なったとしても、GPCRが細胞内にもたらすシグナルのタイプを判別することが不可能であるため、シグナル伝達の詳細を明らかにすることはできない。従って、受容体が本来相互作用するGタンパク質を特定することもオーファンGPCRの研究を行う上で、非常に重要なことであり、さらにはリガンドスクリーニングにおいても有益であると考えられる。

30

【0005】

GPCRのGタンパク質を活性化する部位に関しては、Gタンパク質活性化作用を持つアドレナリンレセプターなどの細胞内第3ループの部分ペプチドが直接Gタンパク質を活性化することが既に見出されている(例えば、非特許文献1、2、3を参照のこと)。しかしながら、機能未知であり、リガンドも未だ同定されていないオーファンGPCRにおいては、相互作用するGタンパク質のサブタイプを予測する方法が現在のところ無いため、細胞内に伝達するシグナルの特定を困難な状態となっている。

40

【非特許文献1】Okudaら, Biochem Biophys Res Commun, 291: 1297-1301, 2002

【非特許文献2】Okamotoら, Cell, 62: 709-717, 1990

【非特許文献3】Okamotoら, Cell, 67: 723-730, 1991

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

そこで、本発明は、リガンドが同定されておらず、その機能も未だに解明されていないオーファンGPCRのGタンパク質活性化部位の予測方法を提供すると共に、相互作用するGタンパク質のサブタイプ(例えば、Gs、Gq、Goなど)を予測しオーファンGPCRの細胞内情報伝達機構を解明する方法の提供を目的とする。

【課題を解決するための手段】

50

【 0 0 0 7 】

本発明者等は、上記事情に鑑み、オーファン GPCR における G タンパク質活性化部位を同定すべく、鋭意研究を行った結果、オーファン GPCR の第 3 ループの特定のアミノ酸配列を有する部分ペプチドを用いることにより、活性化する G タンパク質のサブタイプを予測することが可能であることを見出した。

【 0 0 0 8 】

すなわち、上記課題は以下の (1) ~ (6) によって解決される。

(1) オーファン GPCR と共役する G タンパク質のサブタイプを予測する方法であって、

(a) 前記オーファン GPCR の細胞内第 3 ループのアミノ酸配列を、膜貫通領域予測プログラムを用いて予測する段階、 10

(b) 前記第 3 ループアミノ酸配列中に、式 (I) 又は (I I) で示されるアミノ酸配列を含むアミノ酸配列部分を検索する段階、

(c) (b) の段階で検索される前記アミノ酸配列部分を含むペプチドを作製する段階、

(d) (c) の段階で作製したペプチドと G タンパク質の相互作用を検出する段階、

(e) (d) の段階で検出された検出結果に基づき、前記オーファン GPCR と共役する G タンパク質のサブタイプを予測する段階、

から成る方法。

- B 1 - B 2 - X 1 - X 2 - B 3 - (B (1 ~ 6) は塩基性アミノ酸、X は任意のアミノ酸) (I) 20

- B 4 - B 5 - X 3 - B 6 - (B (1 ~ 6) は塩基性アミノ酸、X は任意のアミノ酸) (I I)

ここで、「GPCR の細胞内第 3 ループ」とは、GPCR のアミノ酸配列において N 末端側から 3 番目の細胞内ループのことである (図 1 を参照のこと) 。また、「膜貫通領域予測プログラム」は、当業者において選択可能なプログラムであれば如何なるものも使用可能であり、例えば、S O S U I、T o p P r e d、T M H M M などが使用可能である。

上記 (d) に記載の「相互作用を検出する」方法は、当業者における通常の知識及び技術常識に基づいて選択可能な方法であれば、如何なる方法であっても使用可能であり、例えば、表面プラズモン共鳴 (S P R)、G T P S を用いて結合アッセイなどが使用可能である。 30

(2) 前記膜貫通領域予測プログラムが、3 つの膜貫通領域予測プログラム、S O S U I、T o p P r e d、T M H M M から選択されることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

(3) 請求項 1 に記載の式中、B 1、B 2、B 3、B 4、B 5、B 6 が、それぞれ、リジン、アルギニン、ヒスチジンから成るグループから選択されることを特徴とする上記 (1) 又は (2) に記載の方法。

(4) 上記 (d) の段階の検出が、表面プラズモン共鳴 (S P R) 法、または結合アッセイ法により行なわれることを特徴とする上記 (1) 乃至 (3) に記載の方法。

(5) 上記 (d) の段階で相互作用が検出された場合、前記オーファン GPCR と共役する G タンパク質は、上記 (d) の段階で用いた G タンパク質と同じタイプであると予測することを特徴とする、上記 (1) 乃至 (4) に記載の方法。 40

(6) 上記 (d) の段階の G タンパク質が G i 又は G s であることを特徴とする請求項 1 乃至 4 に記載の方法。

ここで、「G タンパク質」とは、GPCR と共役し、GPCR のリガンドからの刺激に応答して機能するタンパク質のことである。G T P - G D P 交換反応により G T P が結合した状態が活性型 (活性型 G タンパク質) であり、結合した G T P を水解した後、G D P 結合型 (不活性型 G タンパク質) に変わる。活性型 G タンパク質はアデニレートシクラーゼなどのエフェクタータンパク質を活性化する。G タンパク質にはエフェクターに対する機能より、幾つかのサブタイプが知られているが、本発明における「G タンパク質」は、GPCR と共役する G タンパク質であれば、如何なるものも使用可能であり、例えば、G 50

s、G_i (G_{i1}、G_{i2}などを含む)、G_o、G_t、G_q、G_K、G_X、G₁₆、などが使用可能である。

【発明の効果】

【0009】

本発明により、オーファンGPCRのGタンパク質活性化部位の予測が可能となり、その結果、相互作用するGタンパク質のサブタイプの予測も可能となる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0010】

1. Gタンパク質を活性化する部分ペプチド

(1) 活性化部位の絞込み

オーファンGPCRの細胞内第3ループのアミノ酸配列を予測するために、膜貫通領域予測プログラム(例えば、SOSUI、TopPred、TMHMMなど)を使用して解析を行うことができる。これらのプログラムは、膜貫通領域を構成するアミノ酸の疎水性、両親媒性、電荷などに基づいて予測を行なうものである。

第3ループを構成するアミノ酸配列の予測を行なったのち、-B-B-X-X-B-又は-B-B-X-B-(Bは塩基性アミノ酸、Xは任意のアミノ酸)の特徴を持つアミノ酸配列を指標にしてさらに、活性化部位の絞込みを行なった。

【0011】

(2) 部分ペプチドの合成

上記のようにして予測された活性化部位のアミノ酸配列を持つ部分ペプチドを合成した。

本発明の部分ペプチドは、公知のペプチド合成法によって製造することができる。ペプチド合成法としては、例えば、固相合成法、液相合成法のいずれによってもよい。すなわち、アミノ酸同士を縮合させ、生成物が保護基を有する場合は保護基を脱離することにより目的のペプチドを製造することができる(例えば、Bodanszkyら, 1996; Schroederら, 1965を参照のこと)。合成反応後は通常の精製法、例えば、溶媒抽出、蒸留、カラムクロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー、再結晶などを組み合わせて本発明の部分ペプチドを単離精製することができる。

部分ペプチドの合成方法としては、当業者により選択可能な方法であれば如何なる方法でもよいが、例えば、Fmoc固相法などが好適に利用可能である。

【0012】

2. 本発明の部分ペプチドの生物材料を用いた合成法

(1) 本発明の部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドの取得

本発明の部分ペプチドは生物材料(例えば、大腸菌、酵母など)を用いて、組換え体の形態で製造してもよい。まず、該部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドをcDNAライブラリーなどから入手したのち、該部分ペプチドをコードする核酸領域を適切な制限酵素などで切断することにより得ることができる(Sambrookら, 1989)。

【0013】

(2) 組換えベクターの作製

本発明の部分ペプチドを製造するための組換えベクターは、適当なベクターに本発明の部分ペプチドをコードするDNAを連結することにより得ることができる。本発明の部分ペプチドをコードするDNA配列を挿入するためのベクターは、クローニング用に供される場合には、宿主中で複製可能なものであれば特に限定されない。また、本発明の部分ペプチドを発現するためのベクターとしては、宿主中で複製可能なものであって、該ポリペプチド又はその部分をコードするDNA断片を発現させることができるプロモーターを有するものが使用可能である。

使用可能なベクターとしては、例えば、プラスミドDNA、ファージDNA等が挙げられる。プラスミドDNAとしては、大腸菌由来のプラスミド(例えばpBR322、pBR325、pUC118、pUC119、pUC18、pUC19、pCBD-C等)、枯草菌由来のプラスミド(例えばpUB110、pTP5、pC194等)、酵母由来のプ

10

20

30

40

50

ラスミド（例えばYEp13、YEp24、YCP50、YIP30等）などが挙げられ、ファージDNAとしてはファージ等が挙げられる。さらに、レトロウイルス、ワクシニアウイルスなどの動物ウイルス、バキュロウイルス、トガウイルスなどの昆虫ウイルスベクターを用いることもできる。

【0014】

本発明で用いられるプロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に対応して適切なプロモーターであれば特に限定されない。

例えば、動物細胞を宿主として用いる場合は、SRプロモーター、CMVプロモーター、SV40プロモーター、LTRプロモーター、HSV-TKプロモーター等が挙げられる。

10

宿主が大腸菌である場合には、trpプロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、P_Lプロモーター、lppプロモーター等が、宿主が枯草菌である場合には、SPO1プロモーター、SPO2プロモーター、penPプロモーター等が挙げられる。

宿主が酵母である場合には、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーター等が挙げられる。宿主が昆虫細胞である場合は、ポリヘドリンプロモーター、P10プロモーターなどが好ましい。

【0015】

本発明で使用される組換えベクターには部分ペプチドのコード配列、プロモーター以外にも、エンハンサー、選択マーカー、ターミネーター、エンハンサー、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、リボソーム結合配列（SD配列）、SV40複製起点（SV40ori）などを連結することができる。

20

選択マーカーとしては、限定はしないが、ハイグロマイシン耐性マーカー（Hyg^r）、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子（dhfr）、アンピシリン耐性遺伝子（Amp^r）、カナマイシン耐性遺伝子（Kan^r）、ネオマイシン耐性遺伝子（Neo^r、G418）などが利用可能である。

【0016】

（3）形質転換体の作製

本発明の形質転換体は、本発明の組換え発現ベクターを、目的の部分ペプチドを発現し得るように宿主中に導入することにより得ることができる。ここで、宿主としては、本発明の部分ペプチド発現に使用できるものであれば特に限定されるものではない。例えば、大腸菌（*Escherichia coli*）等のエシェリヒア属、枯草菌（*Bacillus subtilis*）等のバチルス属、シュドモナス・プチダ（*Pseudomonas putida*）等のシュドモナス属、リゾビウム・メリロティ（*Rhizobium meliloti*）等のリゾビウム属に属する細菌、サッカロミセス・セレビシエ（*Saccharomyces cerevisiae*）、シゾサッカロミセス・ポンベ（*Schizosaccharomyces pombe*）、ピキア・パストリス（*Pichia pastoris*）等の酵母、サル細胞COS-7、Vero、チャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO細胞）、マウスL細胞、マウスAtT-20、ヒトGH3、ヒトFL細胞等の動物細胞、あるいはSf9、Sf21等の昆虫細胞が挙げられる。

30

40

【0017】

大腸菌への組換えベクターの導入方法としては、カルシウムイオンを用いる方法（Cohenら、1972）、エレクトロポレーション法（Shigekawa及びDower、1988）等が利用可能である。酵母への組換えベクターの導入方法としては、エレクトロポレーション法（Beckerら、1990）、スフェロプラスト法（Hinnenら、1978）、酢酸リチウム法（Itohら、1983）等が利用可能である。動物細胞又は動物細胞への組換えベクターの導入方法としては、エレクトロポレーション法、リン酸カルシウム法（Chen及びOkayama、1988）、カチオン性脂質による方法（Elroy-Stein及びMoss、1990）等が挙げられる。

【0018】

（4）本発明の部分ペプチドの製造

50

本発明の部分ペプチドは、上記において得られる形質転換体を培養し、その培養物から採取することにより製造することができる。「培養物」とは、培養上清、あるいは培養細胞若しくは培養菌体又は細胞若しくは菌体の破砕物のいずれをも意味するものである。本発明の形質転換体を培養する方法は、宿主の培養に用いられる通常の方法に従って行われる。

大腸菌や酵母菌等の微生物を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、微生物が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等を含有し、形質転換体の培養を効率的に行うことができる培地であれば、天然培地、合成培地のいずれを用いてもよい。炭素源としては、グルコース、フラクトース、スクロース、デンプン等の炭水化物、酢酸、プロピオン酸等の有機酸、エタノール、プロパノール等のアルコール類が用いられる。窒素源としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等の無機酸若しくは有機酸のアンモニウム塩又はその他の含窒素化合物のほか、ペプトン、肉エキス、コーンステープリカー等が用いられる。無機塩類としては、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅、炭酸カルシウム等が用いられる。

10

【0019】

培養は、宿主細胞に適した条件下で行う。

例えば、大腸菌を培養する際の培地としては、LB培地、M9培地等が好ましい。所望によりプロモーターを効率よく働かせるために、イソプロピル-1-チオ-D-ガラクトシド、3-インドリルアクリル酸のような薬剤を加えることができる。大腸菌の場合、培養は通常約15～37℃で約3～24時間行ない、必要により、通気や撹拌を加えることもできる。宿主が枯草菌の場合、培養は通常約30～40℃で約6～24時間行ない、必要により通気や撹拌を加えることもできる。

20

酵母培養するための培地としては、SD培地、YPD培地があげられる。培地のpHは約5～8に調整するのが好ましい。培養は通常約20～35℃で約24～72時間行ない、必要に応じて通気や撹拌を加える。宿主が昆虫細胞又は昆虫である形質転換体を培養する際、培地としては、ウシ血清を含むグレース昆虫培地等が挙げられる。培地のpHは約6.2～6.4に調整するのが好ましい。培養は通常約27℃で約3～5日間行ない、必要に応じて通気や撹拌を加える。

宿主が動物細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、約5～20%の胎児牛血清を含むMEM培地、DMEM培地、RPMI 1640培地等が用いられる。pHは約6～8であるのが好ましい。培養は通常約30～40℃で約15～60時間行ない、必要に応じて通気や撹拌を加える。以上のようにして、形質転換体の細胞膜等に本発明の部分ペプチドを生成させることができる。上記培養物から本発明の部分ペプチドを分離精製するには、例えば、下記の方法により行なうことができる。

30

【0020】

本発明の部分ペプチドを培養菌体あるいは細胞から抽出するに際しては、培養後、公知の方法で菌体あるいは細胞を集め、これを適当な緩衝液に懸濁し、超音波、リゾチーム及び/又は凍結融解などによって菌体あるいは細胞を破壊したのち、遠心分離やろ過により部分ペプチドの粗抽出液を得る方法などが適宜用いられる。緩衝液の中に尿素や塩酸グアニジン等のタンパク質変性剤や、トリトンX-100などの界面活性剤が含まれていてもよい。培養液中に部分ペプチドが分泌される場合には、培養終了後、それ自体公知の方法で菌体あるいは細胞と上清とを分離し、上清を集める。このようにして得られた培養上清又は抽出液中に含まれる部分ペプチドの精製は、公知の分離・精製法を適切に組み合わせで行なうことができる。これらの公知の分離、精製法としては、塩析や溶媒沈澱法などの溶解度を利用する方法、透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法、及びSDS-PAGE等の主として分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィーなどの荷電の差を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィーなどの特異的親和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動法などの等電点の差を利用する方法などが用いられる。

40

50

【0021】

3. 部分ペプチドとGタンパク質の相互作用の検出方法

本発明の部分ペプチドとGタンパク質の相互作用を検出する方法としては、当業者が選択可能な方法であれば如何なる方法も使用可能である。限定はしないが、例えば、表面プラズモン共鳴 (SPR) 法、又はGTP Sを用いた結合アッセイなどが使用可能である。表面プラズモン共鳴 (SPR) 法は、金属薄膜にp偏光の光を入射したとき、ある特定の角度

(共鳴角)でその反射光強度が減少することを利用した手法である。近年、生物学分野での応用や生体の特異的反応を利用したセンサーへの応用が多数行われている。本方法は、例えば、Biacore 1000 system (BIACORE社) などを利用して実施可能である。

10

また、GTP Sを用いた結合アッセイは、Gタンパク質に取り込まれた [35 S] GTP Sの放射能係数を測定する方法で、定法に従い適宜行い得る方法である。

【0022】

以下に実施例を示すが、本発明はこれに限定されるものではない。

【実施例1】

【0023】

APG1におけるGタンパク質活性化部位の予測

APG1は機能未知のオーファンGPCRであり、ショウジョウバエで発見されたmth遺伝子と相同性を持つ。mth遺伝子はノックアウトすると寿命が延びることが知られており、老化機構に関与している可能性が示唆されている。

20

Gタンパク質を活性化させると考えられている細胞内第3ループのアミノ酸配列を予測するため膜貫通領域予測プログラム、SOSUI、TopPred、TMHMMでの解析を行った(図1及び2、配列番号1~3)。

SOSUIは疎水性指標、両親媒性指標、電荷指標を元に膜貫通領域を予測、TopPredはアミノ酸の疎水性を元に膜貫通領域を予測、TMHMMは膜貫通部位の配列情報から法則を抽出しモデル化したものから膜貫通領域を予測するプログラムである。

Gタンパク質活性化作用を持つアドレナリン受容体等の細胞内第3ループのアミノ酸配列をもつペプチドを合成すると、それ自体がGタンパク質を活性化し、またヘリカル構造をとることが知られている(非特許文献1乃至3を参照のこと)。そのとき作る塩基性アミノ酸のクラスターがGタンパク質活性化に関与しているとも言われている。APG1の細胞内第3ループにおいてもアドレナリン受容体Gタンパク質活性化部位と同様な塩基性アミノ酸の配列が存在した(図2)。この配列が、ヘリカル構造をとり、塩基性アミノ酸のクラスターを形成すると仮定してRNGKRSNRTLREE(配列番号4)をGタンパク質活性化部位と考え、この配列から成るペプチドを合成した。

30

【実施例2】

【0024】

APG1受容体ペプチドとGタンパク質との分子間相互作用の測定

(1) 試料調製

APG1受容体ペプチド(配列番号4)はFmoc固相法により合成し、逆相HPLCにより精製し、マスマススペクトルにより分子量を確認した。G蛋白質はGi, Gsともにラットの組換え体サブユニットを用いた。

40

(2) 表面プラズモン共鳴 (SPR) による分子間相互作用の測定

アミンカップリング法により、G蛋白質 (Gi; 0.4 ng/mm^2 、Gs; 0.3 ng/mm^2) を共有結合させたデキストランを基盤としたセンサーチップ (CM5) を作成した。Tris-HCl (pH 7.5) (20 mM)、EDTA (1 mM)、DTT (1 mM)、MgCl₂ (1 mM) のバッファーにAPG1受容体ペプチドを溶解させた試料溶液を用意し、25℃、流速 $5 \mu\text{l/min}$ でGタンパク質に対して過剰な量 ($10 \mu\text{M}$, $260 \mu\text{L}$) を用い、APG受容体ペプチドをセンサーチップ上のGタンパク質と相互作用させた。Biacore 1000 system (BIACORE社) を使用してセンサーチ

50

ップ上の G タンパク質の質量変化を測定することにより、G タンパク質に A P G 1 受容体ペプチドが相互作用し、複合体を形成するかどうかを検討した。G i のポジティブコントロール及びネガティブコントロールとしてマストパラン（ナカライテスクより購入）、G A B A_B 細胞内第 2 ループペプチドを用い、G s にはプロスタグランジン細胞内第 3 ループペプチド（E P 3）、G A B A_B 細胞内第 2 ループペプチドを用いた。

【0025】

（3）結合アッセイ

T r i s - H C l（p H 7 . 5）（20 m M）、E D T A（1 m M）、D T T（1 m M）、M g C l₂（1 m M）、[³⁵S] G T P S（1 μ M）、G タンパク質（0 . 1 μ M）を含む試料溶液に A P G 1 受容体ペプチド（1 μ M、10 μ M、100 μ M）を加え、30 で30分間インキュベートした。反応終了後、その試料溶液をニトロセルロースフィルターで濾過し、そのフィルターを乾燥させた後、G たんぱく質に取り込まれた [³⁵S] G T P S の放射能係数を液体シンチレーションカウンターで測定した。A P G 1 受容体ペプチドを加えない試料溶液の測定値をコントロールとして計数比を求め、A P G 1 受容体ペプチドによる G タンパク質の活性化を検討した。ポジティブコントロール及びネガティブコントロールには S P R 実験と同じものを用いた。

【0026】

結果

（1）表面プラズモン共鳴法による結果

A P G 1 受容体ペプチドは G s との間に相互作用を示さなかったが（図 4 B）、G i を用いた場合には 391 . 4 R U 上昇が認められた（図 4 A）。この結果から A P G 1 受容体ペプチドがセンサーチップ上の G i と結合し、なんらかの複合体を形成していると考えられる。一方、G s を用いた場合 R U 値は上昇を示さなかった。このことから、A P G 1 受容体ペプチドの結合は G i 選択的であることがわかった。同様の実験を上述のコントロールを用いて行った結果、ポジティブコントロールでの R U 値の上昇は G i、G s で、各々、387 及び 262 であり、ネガティブコントロールの値は、各々、- 76 . 5 及び - 117 . 0 であった。

【0027】

（2）結合アッセイによる結果

A P G 1 受容体ペプチドの G i に対する活性化能は 0 . 86（1 μ M）、1 . 94（10 μ M）、1 . 59（100 μ M）であり A P G 1 受容体ペプチドの濃度が、10 μ M のとき最大であった。ポジティブコントロール及びネガティブコントロールの活性化能は、各々 2 . 39、1 . 03 であった（図 5）。

また、A P G 1 受容体ペプチドの G s に対する活性化能は、1 μ M、10 μ M、100 μ M で、各々、0 . 93、1 . 01、1 . 26 であり、いずれの濃度でも活性化能を示さなかった。ポジティブコントロール及びネガティブコントロールの活性化能は、各々 2 . 04、1 . 18 であった（図 6）。

【0028】

結合アッセイの結果より、G タンパク質の活性化に対して A P G 1 受容体ペプチドは G i 選択的に作用しているものと思われる。また A P G 1 受容体ペプチドの全アミノ酸数に対する塩基性アミノ酸の割合は 5 / 13（38 . 5 %）であり G A B A_B 細胞内第 2 ループペプチドは 7 / 21（33 . 3 %）でほぼ同じである。このことから単に塩基性アミノ酸の含有量の多さだけでは、そのペプチドが G 蛋白質を活性化するかどうかの判別はできない。おそらく、何らかの立体構造的な要因が必要と思われる。

【0029】

参考文献

- Bondanszkyら, Peptide Synthesis, Interscience Publishers, New York 1996
 Chen及びOkayama, BioTechniques. 6:632-638, 1988
 Cohenら, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 69:2110, 1972
 Elroy-Stein及びMoss, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:6743-6747, 1990

10

20

30

40

50

Hinnenら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75:1929, 1978

Itohら, J. Bacteriol., 153:163, 1983

Okamotoら, Cell

62:709-717, 1990

Okamotoら, Cell 67:723-730, 1991

Okudaら, Biochem Biophys Res Commun. 291:1297-1301, 2002

Sambrook, J. Molecular cloning: a

laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor. 1989

Schroederら, The peptide, Academic Press, New York 1965

Shigekawa及びDower BioTechniques. 6:742-751, 1988

10

【産業上の利用可能性】

【0030】

現在、オーファンレセプターのリガンドスクリーニングには、G16を用いた融合蛋白質を作成しカルシウム濃度の変化によりリガンドの結合を判定する方法などが用いられている。本発明の方法を用いることにより、オーファンGPCRと共役するGタンパク質を予め予測することができれば、従来のカルシウム濃度の変動を指標にする方法等とは異なるリガンドスクリーニングアッセイ系を構築できる可能性がある。これにより、創薬候補の迅速な特定が可能となり、医薬品開発の分野において、多大なる技術進歩をもたらすことが期待できる。

20

【図面の簡単な説明】

【0031】

【図1】図1は、GPCRの構造の一般的な模式図を示す。

【図2】図2は、膜貫通領域予測プログラム(SOSUI, TopPred, TMHMM)で予測された第3ループのアミノ酸配列を示す。

【図3】図3は、SPRの結果を示す。Gi, Gsを固定化したセンサーチップにAPG1受容体ペプチドを流したときのセンサーグラムである。

【図4】図3に示すインジェクト終了後のRU値の上昇から、バックグラウンドとしてGタンパク質を結合させないセンサーチップに同様の作業を行った測定値を引いた値をグラフ化したものが図4である。

30

【図5】図5は、Giの結合アッセイの結果を示す。

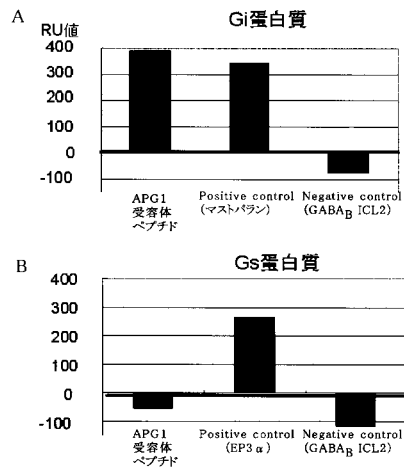
【図6】図6は、Gsの結合アッセイの結果を示す。

【図2】

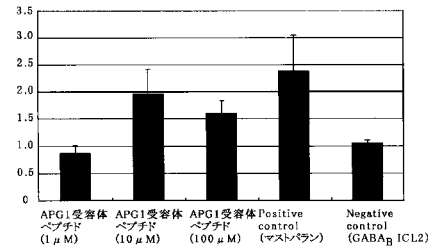
細胞内第3ループ

SOSUI MVQICGRNGKRSNRTLREEVLR
 TopPred CGRNGKRSNRTLREEVLRNLR
 TMHMM GRNGKRSNRTLREEVLRNLR

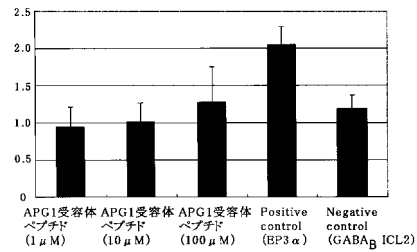
【図4】



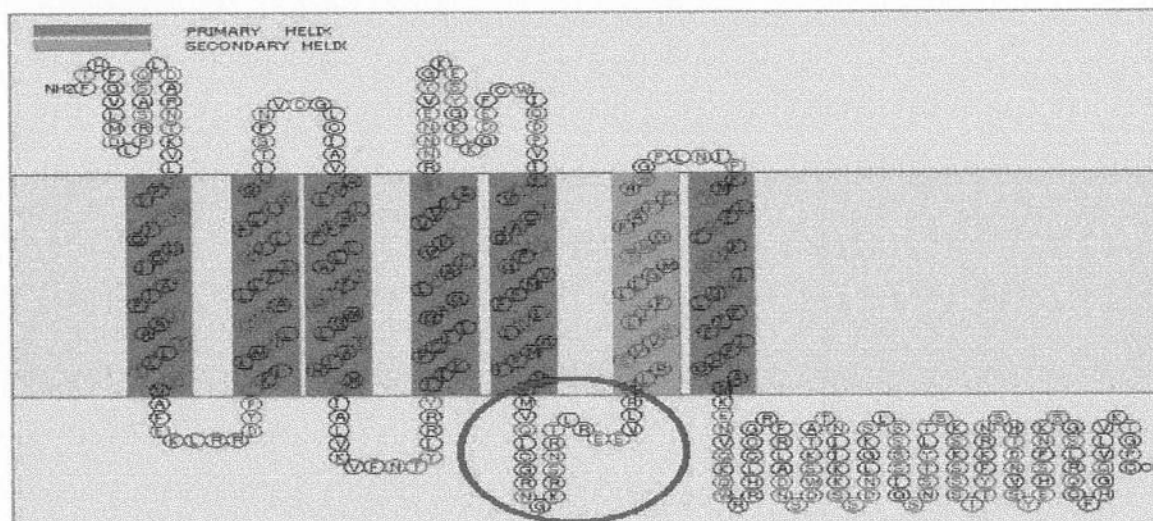
【図5】



【図6】

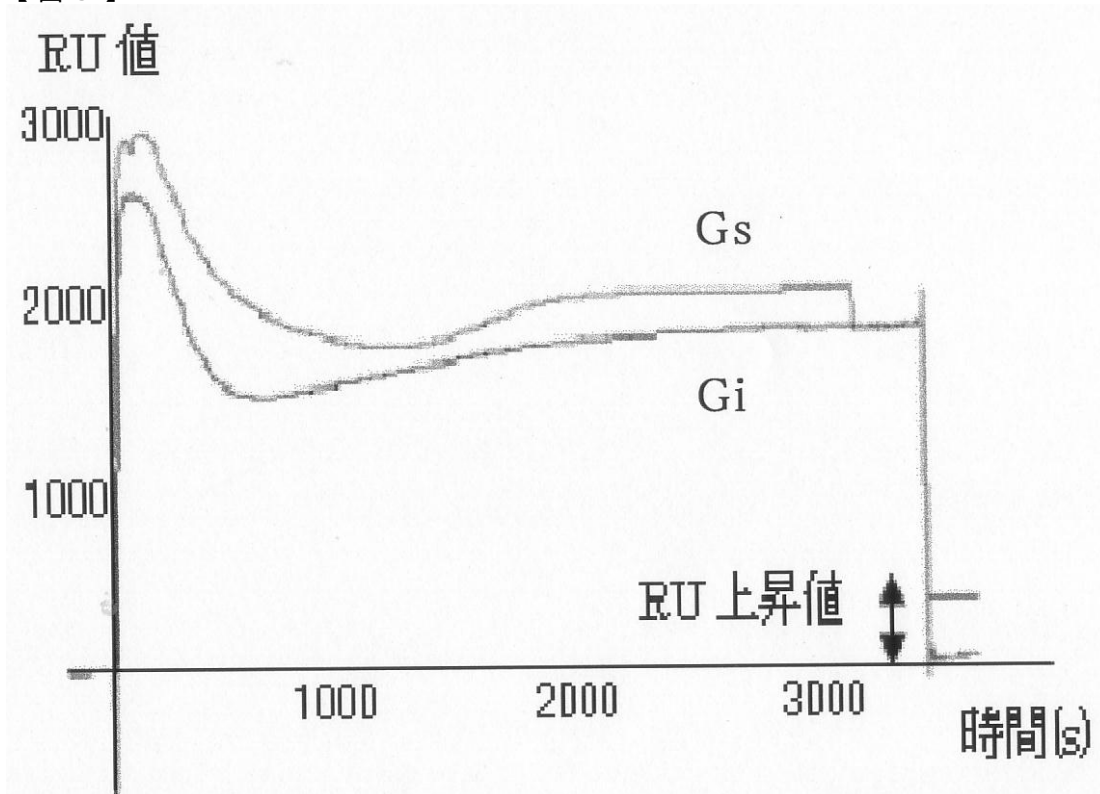


【図1】



(SOSUIによる結果)

【 図 3 】



【 配列表 】

2005291742000001.app