

Bombesin receptor subtype-3 (BRS3) のリガンド予測

宮澤 元基, 遠藤 俊徳

北海道大学大学院 情報科学研究科 生命人間情報科学専攻 情報生物学研究室

1. 研究背景

Bombesin receptor subtype-3 (BRS-3) はリガンド未知の G protein-coupled receptor (GPCR) の一種で、視床下部・膝β細胞に発現している。この BRS-3 をノックアウトしたマウスはインスリン分泌障害を起こし肥満となることから、BRS-3 は摂食・代謝に深く関わっていると考えられている [1]。

2. 目的

BRS-3 の内在性リガンドを予測することを本研究の目的とした。

3. 研究方法

3.1 配列モチーフの作成

BRS-3 と同じファミリーに属する受容体のリガンド配列の類似性から、ボンベシン様ペプチド受容体ファミリーのリガンドに着目した。まず、ボンベシン様ペプチド受容体ファミリーに属する Neuromedin-b receptor (NMBR) 及び Gastrin releasing peptide receptor (GRPR) のリガンド配列を哺乳類以降の計 21 種から、また、カエルである Bombina Bombina, Bombina Orientalis, Xenopus laevis の持つ、アミノ酸長 14 のボンベシンペプチドの配列を NCBI より取得し、これらのペプチドの配列モチーフを、HMMER のプログラムである各位置におけるアミノ酸の出現確率を表わす hmmsearch を用いて作成した。

条件を緩和するため、これらの配列モチーフと、特許の BRS-3 リガンド配列 [2] のモチーフを組み合わせ、本研究における BRS-3 のリガンドの候補配列とした。なお、特許配列は以下となっている。

{KKRKY, YE, IINLE, LE}[AL]WA[CVFLPTMGS]G[SH][LS]M

3.2 配列モチーフの探索・シグナルペプチドの予測

まず視床下部 cDNA ライブラリから配列データを取得し、3.1 で得られた配列モチーフが、開始コドンであるメチオニンから終止コドンまでに含まれている配列を抽出した。

BRS-3 リガンドは分泌タンパク質であると期待されることから、シグナルペプチドの有無を Signal P 4.1 より予測した。

3.3 BRS-3 のホモロジーモデリングとドッキングシミュレーション

Swiss Model を用いてホモロジーモデルを構築し, Autodock vina によってリガンド候補とドッキングシミュレーションをおこなった。

4 解析結果

4.1 モチーフの作成

特許の配列モチーフを視床下部 cDNA ライブラリより検索したところ、表 1 の結果となった。

表 1 取得した配列 (特許)

		シグナルペプチド		総数
		あり	なし	
遺伝子	既知	13	18	31
	未知	2	8	10
総数		15	26	41

次に、HMMER より作成した配列モチーフを解析の対象とした。その配列モチーフを示す。

W[AS][VIT]GH[LIF]M

この配列モチーフを含むものを検索した結果を表 2 に示す。

表 2 取得した配列 (HMMER)

		シグナルペプチド		総数
		あり	なし	
遺伝子	既知	31	53	84
	未知	1	12	13
総数		32	65	97

さらに、遺伝子未知の配列パターンを探し出すため、条件を緩和し、両者を組み合わせた次の配列モチーフにあてはまる配列を検索した。

{KKRKY, YE, IINLE, LE}[AL]W[AS][CVFLPTMGS]G[SH][LIFS]M

結果を表 3 に示す。

表 3 取得した配列

		シグナルペプチド		総数
		あり	なし	
遺伝子	既知	7	16	23
	未知	0	8	8
総数		7	24	31

シグナルペプチドを持ち、他の遺伝子をコードしていなかったものを1種類抽出した。その配列を次に示す。

MTAVISSLLWTLFFHFLVCEQNLAYPLCAEEY**I**INLEAWAFGHFMG*

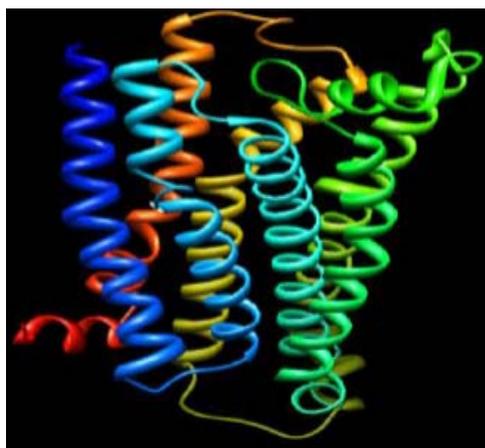
なお、シグナルペプチドは緑字、対象としたモチーフは赤字で示してある。

また NMB や GRP は、モチーフ C 末端側のメチオニンと、直後のグリシンのアミド結合がメブリン A によって切断され、メチオニンのカルボキシ基がアミド化されることから、上記配列も同様にアミド化が起こっていることが考えられる[3]。そこで、ペプチダーゼによるペプチド切断を考慮し、新規リガンドの候補として 11 の配列を選択した。

4.2 ホモロジーモデリングとドッキングシミュレーション

●ホモロジーモデリング

BRS-3 のホモロジーモデリングを行う際、鋳型には配列相同性の最も高い δ opioid receptor を用いた (図 1)。また、得られた構造を Ramachandran plot で評価すると、およそ 98% のアミノ酸が立体化学的に可能な領域に含まれていた。図 1 で、青色のストランドが N 末端側、赤色のストランドが C 末端側となっている。



(図 1) BRS-3 の立体構造

●ドッキング結果

構築された BRS-3 の立体構造と、抽出した 11 つのリガンド候補とのドッキングシミュレーションにより得られる相互作用エネルギー (kcal/mol) を評価するために、各ペプチドと、BRS-3 と同じファミリーの属する NMBR, GRPR との相互作用エネルギーも同時に求めた。また、相互作用エネルギー

は、その数値が低いほど安定度が高いものである。ドッキングシミュレーションの結果の一部を表 1 に示す。対象とした配列モチーフは赤字で示した。

表 1 ドッキングシミュレーション結果

配列(配列番号)	相互作用エネルギー(kcal/mol)		
	BRS-3	NMBR	GRPR
EEY I INLEAWAFGHFM (1)	-5.0	-5.2	-4.8
LEAWAFGHFM (2)	-6.8	-5.8	-5.2
WAFGHFM (3)	-7.1	-7.3	-7.2

配列番号 1 及び 3 は、各受容体に対して同じような結合力を示したことにに対し、配列番号 2 は BRS-3 に選択性を持っていると言える。

結論

配列番号 2 は 6 番染色体に位置し、既知遺伝子をコードしていなかった。またこの配列は、BRS-3 の発現が認められている視床下部の cDNA から抽出されたものであり、実際に視床下部において発現していると期待される。以上のことから、BRS-3 の新規リガンドは配列 LEAWAFGHFM である可能性が高いと考えている。

今後、組織特異性を確かめるため、このリガンド配列の上流配列に存在する制御配列の存在を検証する。

参考文献

- [1] Ohki-Hamazaki. *et al.*, 1997
- [2] 特許 P2007-215459A
- [3] Reeve JR. *et al.*, 1988