

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 23 日現在

機関番号：84404

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15357

研究課題名(和文) 脂肪酸修飾構造に基づく新規生理活性ペプチドの系統的探索と機能解析

研究課題名(英文) Search and functional analysis of novel bioactive peptides with fatty acid-modification

研究代表者

宮里 幹也 (Miyazato, Mikiya)

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・部長

研究者番号：50291183

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では脂肪酸修飾された新しい生理活性ペプチドを同定し、細胞や個体レベルでの機能解析することを目的とした。脂肪酸修飾ペプチドであるグレリンに対する免疫活性測定をラット脳にて実施し、脂肪酸修飾は有するものの、グレリンと異なる免疫活性を有するペプチドの単離に成功した。質量分析計を用いた解析より、オクタン酸修飾を示唆するデータを得ているが、構造決定に至っていない。ラット視床下部 cDNAより3'-RACE法を用いて未知のグレリン様遺伝子探索を実施した結果、新たな遺伝子は同定できなかった。また、グレリン受容体に相同性の高いオーファン受容体の内因性リガンド探索を実施したが、新規ペプチドを同定できなかった。

研究成果の概要(英文)：The present study aimed to identify novel bioactive peptides modified with fatty acids and to elucidate new biological regulatory mechanism. Radioimmunoassay (RIA) for ghrelin, which is a fatty acid modified peptide, was performed to screen for novel fatty acid-modified peptides from rat brain. We purified a peptide, which is detected only by the RIA for ghrelin N-terminus. Mass spectrometric analysis suggested that this peptide was contained octanoyl modification and that the observed monoisotopic m/z value of this peptide was distinct from that of preproghrelin-derived peptides. Amino acid sequence of this peptide still remains unknown because the yield for this peptide was very low. Moreover, we searched for ghrelin-like gene using 3'-RACE method from rat hypothalamic cDNA. However, no candidate gene could be identified. We searched for endogenous ligands for orphan receptors with high homology to ghrelin receptor. In this screening, we could not identify novel acylated peptides.

研究分野：内分泌学、ペプチド化学

キーワード：脂肪酸修飾ペプチド 脂肪酸転移酵素 グレリン 摂食・エネルギー代謝調節

1. 研究開始当初の背景

これまで申請者の所属する研究室では、細胞間情報伝達物質としての生理活性ペプチドに注目し、多くの新規生理活性ペプチドの単離・同定を行ってきた。近年では、成長ホルモン分泌促進因子受容体 (GHS-R) の内因性リガンドとして、グレリンをラット胃より発見し、その構造決定に成功している (引用文献)。グレリンは、成長ホルモン分泌促進作用だけでなく強力な摂食亢進作用を有することが明らかとなり、現在は治療応用へと研究を展開している。

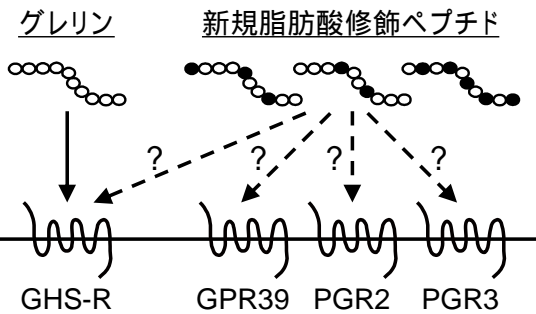
グレリンの3番目のアミノ酸であるセリン残基は、中鎖脂肪酸であるオクタン酸修飾を受けている。この修飾基はグレリンの活性発現に必須であり、グレリン O-アシルトランスフェラーゼ (GOAT) により修飾される (引用文献)。GOAT は、膜結合型脂肪酸転移酵素と呼ばれる16種類のファミリー分子の一つとして同定された酵素である。現在、脂肪酸修飾を受けたペプチドは、グレリンしか報告されていないことを考慮すると、GOAT や他の脂肪酸転移酵素の基質となる未知のペプチドの存在が示唆される。既に申請者は、脂肪酸修飾を有するものの、グレリンとは異なるペプチドをラット脳より単離しており、現在構造解析を進めている。以上の基礎的データより、解析中のペプチドの他にも新たな脂肪酸修飾ペプチドが存在するとの着想に至り、本研究では脂肪酸修飾を有する新規ペプチドの系統的探索を実施し、これまでの研究成果を発展させる。

グレリンの脂肪酸修飾と同様に、受容体活性化に必須な翻訳後修飾としてペプチドの C 末端アミド化修飾が存在する。例えばニューロペプチド Y (NPY) は C 末端アミド構造を有しており、相同性の高い隣ポリペプチド及びペプチド YY と共にファミリーを形成し、4種類の受容体を介して摂食調節に関与している。C 末端アミド化ペプチドの多くがファミリーを形成するのに対し、脂肪酸修飾ペプチドはグレリンしか報告されていない事を考慮すると、新たな脂肪酸修飾ペプチドファミリーが存在する可能性がある。

GHS-R は G タンパク質共役型受容体 (GPCR) であり、グレリンが結合することにより細胞内 Ca^{2+} 上昇活性を有する。ヒトゲノム解析が完了した現在、内因性リガンドの不明なオーファン GPCR 遺伝子が数多く存在する。リガンドの物性が同じ受容体間におけるアミノ酸配列の相同性は高く、GHS-R に相同性の高いオーファン GPCR は現在3種類 (GPR39, PGR2, PGR3) 存在し、未知の生理活性ペプチドの存在が示唆されている。

以上より、新たな脂肪酸修飾ペプチドの一部は、GHS-R に相同性の高いオーファン GPCR の内因性リガンドであることが予想される (図1)。また、新規ペプチドとグレリンがファミリーを形成し、GHS-R と複数の受容体を介した新しい生体調節機構を提示するこ

とも期待できる。



【図1】本研究にて解明する新たな脂肪酸修飾ペプチドファミリーと受容体との関係を示した模式図

2. 研究の目的

上記の研究背景をもとに、本研究では脂肪酸修飾された新しい生理活性ペプチドを同定し、細胞や個体レベルでの機能解析することを目的とした。具体的には以下に示す項目を実施した。

- (1) 単離に成功した新規脂肪酸修飾ペプチド候補の構造解析。
- (2) 新たな脂肪酸修飾ペプチドを同定するために、GHS-R に相同性の高い受容体に対する内因性リガンド探索。

3. 研究の方法

(1) 新規脂肪酸修飾ペプチド候補の精製

解析対象であるペプチドは、以下に示す方法にて精製し、単離した。ラット脳を煮沸して内因性プロテアーゼを失活させ、酢酸抽出した画分を逆相 C18 カラムにて脱塩・濃縮した。さらに、SP-Sephadex イオン交換クロマトグラフィーを用いて、酸性画分、中性・弱塩基性画分、強塩基性画分に大別したペプチド画分を作製した。

抽出したペプチド画分は、脂肪酸修飾ペプチドの不安定性を考慮して、抽出後直ちに抗体アフィニティ精製を進めた。使用した抗体の特徴として、3番目のセリン残基がオクタン酸やデカン酸修飾されたグレリンを認識し、未修飾グレリンを認識しない性質を有する。また、本抗体は3番目のスレオニン残基がオクタン酸修飾されたウシガエル・グレリンも認識可能である (引用文献)。作製した抗体アフィニティカラムに対象組織からのペプチド画分を作用させ非特異的吸着成分を除去した後、カラムからの溶出を行い、脂肪酸修飾ペプチドが濃縮された画分を作製した。

アフィニティ精製したサンプルについて、グレリン N 末端認識抗体及びグレリン C 末端認識抗体を用いたラジオイムノアッセイによる免疫活性を指標に、活性物質を HPLC (現有設備) にて精製・単離を行った。

(2) 質量分析計を用いた構造解析

単離したペプチドの一部を凍結乾燥した後、0.1%ギ酸水溶液に溶解し、LTQ Orbitrap

XL 質量分析計 (現有設備) にて構造解析を行った。

(3) cDNA クローニングによる新規ペプチド候補の構造解析

ラット視床下部より RNA 抽出後、mRNA を濃縮し、oligo-dT プライマーと逆転写酵素により cDNA ライブラリーを合成した。その後、抗体認識サイトと予想される、グレリン N 末端配列を基に 5' -プライマーを合成し、3' -RACE を実施した。増幅された核酸配列をサブクローン化し、DNA シーケンサーにて各クローンの配列を解析した。

(4) GHS-R に相同性の高い受容体に対する内因性リガンド探索

(対象となる組織): ラット視床下部、脳幹、脊髄、下垂体において、GOAT はグレリンに比べて mRNA 発現量が高い結果を得ている。これら組織をそれぞれ酢酸抽出し、イオン交換ゲル濾過クロマトグラフィーにて分画した組織抽出物を作製した。

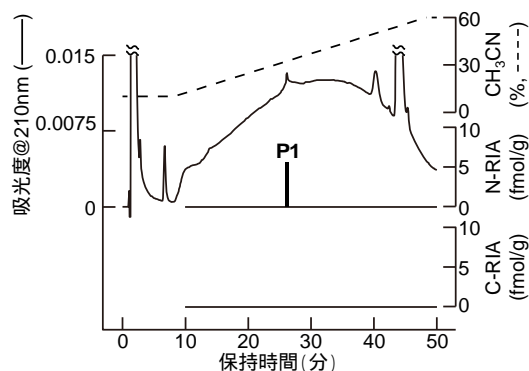
(標的受容体): GHS-R に相同性が高く、リガンド不明なオーファン GPCR である GPR39、PGR2、PGR3 を標的受容体とした。それぞれを HEK293 もしくは CHO 細胞に一過性または安定発現細胞株を構築した。

(活性検出系): オーファン GPCR 発現細胞に対し、ペプチド画分を作用させ、受容体特異的な生物活性 (細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇、細胞内 cAMP 濃度変化、受容体のインターナリゼーション及びインピーダンス変化) を指標に探索を実施した。

4. 研究成果

(1) 新規脂肪酸修飾ペプチド候補の精製

アフィニティ精製したサンプルについて、グレリン N 末端認識抗体 (N-RIA) 及びグレリン C 末端認識抗体 (C-RIA) を用いたラジオイムノアッセイでの免疫活性を指標に逆相 HPLC にて精製を行い、図 2 に示すペプチド (P1) の単離に成功した。しかし、得られた収量は非常に少量であったため、シーケンサーによるアミノ酸配列解析はできなかった。

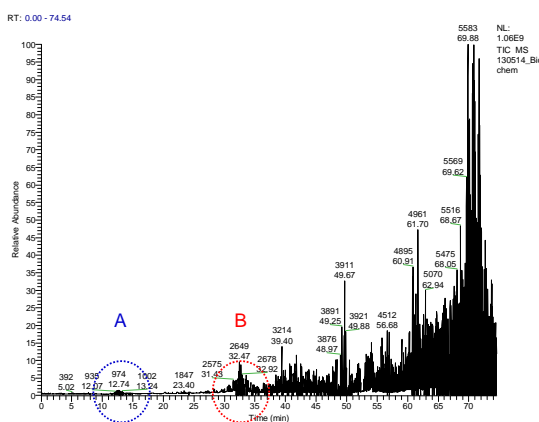


【図2】ラット脳-強塩基性画分をアフィニティ精製したサンプルからのグレリン免疫活性ペプチドの単離 アフィニティ精製後、

HPLC にて分取したサンプルについて、グレリン N 末端認識抗体 (N-RIA) 及びグレリン C 末端認識抗体 (C-RIA) を用いたラジオイムノアッセイでの免疫活性を指標に、ペプチド (P1) を単離した。

(2) 質量分析計を用いた構造解析

グレリン N 末端認識抗体 (N-RIA) 及びグレリン C 末端認識抗体 (C-RIA) を用いたラジオイムノアッセイにて単離したペプチド P1 について、LTQ Orbitrap XL 質量分析計 (現有設備) にて構造解析を実施した。その結果、図 3 に示す溶出位置 (A および B 画分) より、ペプチド A およびペプチド B が検出された (質量数は非公表)。ペプチド A と B のフラグメンテーションによるピークは一致するものが多く、関連物質である可能性が高い。また、質量数の差が 126 であったことから、ペプチド A と B はオクタン酸修飾の有無により溶出時間が異なると考えられた。しかし、収量が低かったため、解析に使用できたサンプル量が少量となり、質量分析計による構造決定ができなかった。



prolylcarboxypeptidase (Prpc)等が同定された。これまでの研究より、ラット脳におけるグレリンの存在は免疫組織化学的手法やラジオイムノアッセイでしか確認されておらず、組織含有量が非常に少ないため、その構造解析までは至っていない(引用文献)。今回の実験系において、視床下部よりグレリン遺伝子を多く単離できており、ある程度発現量の少ない遺伝子も検出可能な cDNA ライブラリーを調製できたと考えられる。しかしながら、未知のグレリン様遺伝子を単離できなかったため、ペプチド P1 はグレリンが化学修飾を受けた構造を有する可能性が考えられた。

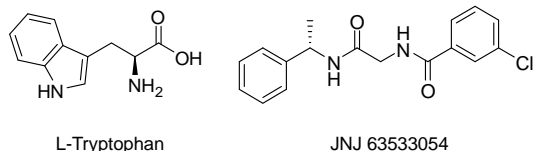
(4) GHS-R に相同性の高い受容体に対する内因性リガンド探索

新たな脂肪酸修飾ペプチドを同定するために、GHS-R に相同性の高いオーファン受容体である PGR2 及び PGR3 の内因性リガンド探索を実施した。

リガンド探索するために、PGR2 及び PGR3 安定発現細胞を作製した。これらの受容体は既に合成アゴニストが報告されている(図4)。安定発現細胞の選別方法として、細胞株ごとの RNA 発現量を定量・比較するだけでなく、合成アゴニストへの反応性を指標に高発現細胞を取得することができた。

PGR2 及び PGR3 高発現細胞に対し、組織(ラット視床下部、脳幹、脊髄、下垂体等)抽出物を添加し、受容体特異的な生物活性(細胞内 Ca²⁺濃度上昇、細胞内 cAMP 濃度変化、受容体のインターナリゼーション及びインピーダンス変化)を指標に探索を実施した。しかし、標的受容体に特異的な活性を検出できなかった。

PGR2 及び PGR3 高発現細胞に対し、合成品に対する反応性は十分得られている。内因性リガンドに対する活性を検出できなかった要因として、組織含有量の低さと活性ペプチドの不安定性が考えられる。今後、組織より抽出したペプチド画分は、脂肪酸修飾ペプチドの不安定性を考慮して、抽出・分画後直ちにアッセイを実施する。



【図4】PGR2 及び PGR3 に対する合成アゴニスト PGR2 に対しては L-トリプトファン、PGR3 に対しては JNJ 63533054 が高親和性アゴニストとして報告されている(引用文献)。

<引用文献>

Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature*,

402(6762): 656-60, 1999.

Yang J, Brown MS, Liang G, Grishin NV, Goldstein JL. Identification of the acyltransferase that octanoylates ghrelin, an appetite-stimulating peptide hormone. *Cell*, 132(3):387-96, 2008.

Kaiya H, Kojima M, Hosoda H, Koda A, Yamamoto K, Kitajima Y, Matsumoto M, Minamitake Y, Kikuyama S, Kangawa K. Bullfrog ghrelin is modified by n-octanoic acid at its third threonine residue. *J Biol Chem*, 276(44):40441-8, 2001.

Hosoda H, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K. Purification and characterization of rat des-Gln¹⁴-Ghrelin, a second endogenous ligand for the growth hormone secretagogue receptor. *J Biol Chem*, 275(29):21995-2000, 2000.

Sato T, Fukue Y, Teranishi H, Yoshida Y, Kojima M. Molecular forms of hypothalamic ghrelin and its regulation by fasting and 2-deoxy-d-glucose administration. *Endocrinology*, 146(6):2510-6, 2005.

Wang J, Carrillo JJ, Lin HV. GPR142 agonists stimulate glucose-dependent insulin secretion via Gq-dependent signaling. *PLoS One*, 11(4):e0154452, 2016.

Liu C, Bonaventure P, Lee G, Nepomuceno D, Kuei C, Wu J, Li Q, Joseph V, Sutton SW, Eckert W, Yao X, Yieh L, Dvorak C, Carruthers N, Coate H, Yun S, Dugovic C, Harrington A, Lovenberg TW. GPR139, an orphan receptor highly enriched in the habenula and septum, is activated by the essential amino acids L-tryptophan and L-phenylalanine. *Mol Pharmacol*, 88(5):911-25, 2015.

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 2件)

Satou M, Kaiya H, Nishi Y, Shinohara A, Kawada S, Miyazato M, Kangawa K, Sugimoto H. Mole ghrelin: cDNA cloning, gene expression, and diverse molecular forms in *Mogera imaizumii*. *Gen Comp Endocrinol*, 232:199-210, 2016.

doi:10.1016/j.ygcen.2016.04.014. 査読有

Kaiya H, Kangawa K, Miyazato M. Ghrelin receptor in Japanese fire belly newt, *Cynops pyrrhogaster*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*,

189:15-22, 2015. doi:
10.1016/j.cbpb.2015.07.001. 査読有

〔学会発表〕(計 0件)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)
該当なし

取得状況(計 0件)
該当なし

〔その他〕
ホームページ等

<http://www.ncvc.go.jp/res/divisions/biochemistry/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

宮里 幹也 (MIYAZATO, Mikiya)
国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・部長
研究者番号：50291183

(2)研究分担者

吉田 守克 (YOSHIDA, Morikatsu)
国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・研究員
研究者番号：70393212

(3)連携研究者
該当なし

(4)研究協力者
該当なし