

令和元年6月18日現在

機関番号：17601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K15446

研究課題名(和文)ブタ心房組織に存在する新規循環調節ペプチドの系統的探索

研究課題名(英文)Systematic survey for novel cardiovascular peptides in porcine atrium

研究代表者

北村 和雄 (Kitamura, Kazuo)

宮崎大学・医学部・教授

研究者番号：50204912

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：ブタ心房1kgよりペプチド分画を調製し、我々が独自に確立した3つの検索法で新規心血管作動ペプチドの系統的探索を実施し、多くの内在性ペプチドを単離同定した。(1)血小板のcAMP増加作用を有するペプチドの検索：多くのペプチドを単離同定したが、VIPやCGRPに関連するものであった。(2)C末端アミド構造を有したペプチドの系統的検索：C末がアミド化された3つの新規構造を有したペプチドを単離できた。(3)アンジオテンシン関連ペプチドの系統的検索：アンジオテンシンIIをN末に有するペプチドが単離できたが、いずれも量が少なくアンジオテンシンの代謝物であることが推定された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

わが国ではナトリウム利尿ペプチドやエンドセリン(ET)、アドレノメデュリン(AM)、グレリン等が相次いで発見され、新たな生体内調節機構の存在が明らかにされてきた。複雑で精巧な生体のメカニズムやその異常により引き起こされる疾患の病態解明には、未だ同定されていない生理活性物質の存在を明らかにして構造を決定することが重要である。また、これらのペプチドのいくつかは診断薬や治療薬として臨床応用されており、医療の発展を通じて社会に貢献できている。本研究では、ブタ心房組織より新しい生理活性ペプチドの発見を目指す真に独創的で先駆的な研究であり、医療の発展にも貢献できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We searched for cardiovascular peptides in peptide extract from 1kg of porcine atrium using three assay systems established by us. (1) The assay that elevates platelet cAMP: We isolated several biologically active peptides which derived from vasoactive intestinal peptide (VIP) and calcitonin gene related peptide (CGRP). (2) Assay for the peptide with C-terminal amide structure: We discovered three novel endogenous peptides with C-terminal amide structure, but their biological activities are unknown. (3) Search for angiotensin related peptide: We isolated several angiotensin related peptides which are very little and considered to be metabolites of angiotensin.

研究分野：心血管内分泌代謝学

キーワード：生理活性ペプチド cAMP アミド化 アンジオテンシン バイオマーカー

1. 研究開始当初の背景

近年、ゲノムの解析が進み、遺伝子側からもいくつかの生理活性ペプチドの候補が明らかになってきた。しかし、生体から取り出された生理活性ペプチドは、多くのがアミド化やアシル化あるいは特異的プロテアーゼでの切断等の翻訳後の修飾を受けており、これらの修飾が生理活性の発現に重要である。これらの翻訳後修飾は遺伝子側からの解析では推定が困難である場合が多く、本研究で行うようなペプチド側からの検索が極めて重要である。本研究では、ブタ心房で産生される生理活性ペプチドに的を絞って、複数の検索法で生理活性ペプチドの網羅的かつ系統的検索を推進する他の施設では行われていない特色ある研究である。

我々は、副腎髄質由来のヒト褐色細胞腫組織のペプチド分画を血小板の cAMP 増加活性を指標に系統的に探索することで AM を発見した。この過程で、褐色細胞腫組織以外の様々な種の組織で検討したが、ブタ心房組織は入手しやすいことに加え、心房性ナトリウム利尿ペプチド以外にも未知の多くの生理活性ペプチドが産生されている可能性があり、ペプチド濃度が高く、精製が容易であることを知り得た。生理活性ペプチド発見のためには、ペプチドの精製や構造解析法とともに生理活性ペプチドを検出するアッセイ法が重要である。本研究では我々が独自に開発した次の3つの検索法で生理活性ペプチドの系統的検索を推進する。(1)血小板の cAMP 増加作用を有するペプチドの検索。(2)C末端アミド構造を有したペプチドの系統的検索。(3)アンジオテンシン関連ペプチドの系統的検索。

これらの検索法を用いることで、ブタ心房組織から新規生理活性ペプチド・循環調節因子を発見したい。

2. 研究の目的

本研究代表者等は 1993 年にヒト褐色細胞腫組織より、アドレノメデュリン(AM)を強力な降圧作用を有する新規生理活性ペプチドとして発見(Kitamura K. et al. *Biochem Biophys Res Commun.* 192, 553-560, 1993)した。さらに、AM 前駆体より Proadrenomedullin N-terminal 20 Peptide(PAMP)が降圧作用を有する新たな生理活性ペプチドとして生合成されることを明らかにした(Kitamura K. et al. *FEBS Lett.* 351: 35-37, 1994)。AM と PAMP はヒト副腎髄質由来の褐色細胞腫より発見されたものであるが、現在 AM と PAMP が重要な生理活性ペプチドとして生体内調節や各種病態で重要な役割を果たしていることが明らかにされてきた。また、最近ではアンジオテンシン (Ang)の N 末を認識するラジオイムノアッセイ(RIA)を用いて、ヒト尿中よりビッグアンジオテンシン-25(Bang-25)を内在性のペプチドとして発見(Nagata S. et al. *Biochem Biophys Res Commun.* 441, 757-62, 2013)し、レニンアンジオテンシン系の研究分野で大きな反響を得ている。このように未知の生理活性ペプチドを単離し、構造を明らかにする研究は医学・循環器病学の発展のために極めて重要である。本研究の目的は、我々が独自に開発した次の3つの検索法を駆使して、ブタ心房のペプチド分画より生理活性ペプチドの系統的かつ網羅的検索を行い、AM や心房性ナトリウム利尿ペプチドに続く新たな内在性の循環調節ペプチドを発見することにある。

- (1) ラット血小板の cAMP 増加作用を有するペプチドの検索。
- (2) C末端アミド構造を有したペプチドの系統的検索。
- (3) アンジオテンシン関連ペプチドの系統的検索。

3. 研究の方法

ブタ心房組織からのペプチド分画の調製法、精製・構造決定法に関しては、AM や PAMP をヒト褐色細胞腫組織から発見した時に用いた方法を用いた。ブタ心房組織よりペプチドを抽出後、除蛋白と脱塩操作でペプチド分画を調製し、このペプチド分画を本研究の出発材料とした。一方、新規生理活性ペプチドの発見を実現するためには、精製・構造解析法以外に生理活性ペプチド探索のためのアッセイ法が重要となる。本研究では、我々が独自に確立している次の3つの検索法で生理活性ペプチドの系統的かつ網羅的検索を推進した。(1) 血小板 cAMP 増加作用を有するペプチドの検索。(2) C 末端アミド構造を有したペプチドの系統的検索。(3) アンジオテンシン関連ペプチドの系統的検索。これらの検索法を用いることで、ブタ心房組織から AM や心房性ナトリウム利尿ペプチド (ANP) に続く、新たな生理活性ペプチド・循環調節因子の発見を目指した。

4. 研究成果

【平成 28 年度報告】

ブタ心房のペプチド分画の調製：

微量な生理活性ペプチドの単離・構造決定にはある程度の量が必要なため、1 kg のブタ心房組織を目標にペプチド分画を調製した。ペプチドの抽出法は、中性条件で煮沸後に抽出することでブタ心房組織中のペプチドを存在するままのかたちで取り出し、かつ安定化させることができる。脱塩・除蛋白後のペプチド分画を SP-Sephadex を用いて、弱塩基性ペプチド分画 (SP-II) と強塩基性ペプチド分画 (SP-III) に分け、平成 28 年度は主に SP-III 分画を次の 3 通りの方法で生理活性ペプチドの系統的検索を推進した。

(1) 血小板の cAMP 増加作用を有するペプチドの検索：

ラット血小板を用い、ブタ心房組織のペプチド分画における cAMP 増加活性を指標に系統的に精製し、構造解析を行った。数十種類のペプチドの単離を行い、現在質量分析で解析を進めた。

(2) C 末端アミド構造を有したペプチドの系統的検索：

現在までに発見されている生理活性ペプチドの半数以上の C 末端がアミド化されている。V8 プロテアーゼ (Asp と Glu の C 末側を特異的に切断) でペプチドを限定分解すると、C 末端にアミド構造を含むペプチド以外は、すべてカルボキシル基を有するペプチドになることを利用し、C 末端がアミド化されたペプチドのみを選択的に単離できる方法を確立した。この方法を用いて、ブタ心房組織のペプチド分画における系統的に精製し、構造解析を行った。

(3) アンジオテンシン関連ペプチドの系統的検索：

Ang の N 末に特異的なラジオイムノアッセイ (RIA) でブタ心房ペプチド分画より単離し、質量分析装置 (LC/MS/MS) とプロテインシークエンサーにて精製したペプチドのアミノ酸配列を決定を進めた。すでに数種類の新規化合物を精製しており、糖鎖部分の構造も含めて解析を進めた。

【平成 29 年度報告】

平成 28 年度に実施した研究を継続して推進した。ブタ心房のペプチド分画の調製：微量な生理活性ペプチドの単離・構造決定にはある程度の量が必要なため、1 kg のブタ心房組織を目標にペプチド分画を調製した。ペプチドの抽出法は、中性条件で煮沸後に抽出することでブタ心房組織中のペプチドを存在するままの分子型で取り出し、かつ安定化させることができる。脱塩・除蛋白後のペプチド分画を SP-Sephadex を用いて、弱塩基性ペプチド分画 (SP-II) と強塩基性ペ

プチド分画(SP-III)に分け、平成 29 年度は主に SP-II 分画を次の 3 通りの方法で生理活性ペプチドの系統的検索を推進した。(1)血小板の cAMP 増加作用を有するペプチドの検索：ラット血小板を用い、ブタ心房組織のペプチド分画における cAMP 増加活性を指標に系統的に精製し、構造解析を行った。数種類のペプチドの単離を行い構造を決定した。しかし、既知のものであり新規ペプチドは発見できなかった。(2)C 末端アミド構造を有したペプチドの系統的検索：現在までに発見されている生理活性ペプチドの半数以上の C 末端がアミド化されている。V8 プロテアーゼ(Asp)と Glu の C 末側を特異的に切断)でペプチドを限定分解すると、C 末端にアミド構造を含むペプチド以外は、すべてカルボキシル基を有するペプチドになることを利用し、C 末端がアミド化されたペプチドのみを選択的に単離できる方法を確立した。この方法を用いて、ブタ心房組織の弱塩基性ペプチド分画(SP-II)における系統的に精製し、構造解析を行った。(3)アンジオテンシン関連ペプチドの系統的検索:Ang の N 末に特異的な RIA でブタ心房ペプチド分画より単離し、質量分析装置とプロテインシーケンサーにて精製したペプチドのアミノ酸配列の決定を進めている。すでに数種類の新規化合物を精製しており、糖鎖部分の構造も含めて解析を進めている。

【平成 30 年度報告】

平成 29 年度～30 年度に実施した研究を引き続き推進した。ブタ心房 1kg よりペプチド分画を調製し、我々が独自に確立した 3 つの検索法で新規心血管作動ペプチドの系統的探索を実施し、多くの内在性ペプチドを単離同定した。(1)血小板の cAMP 増加作用を有するペプチドの検索：多くのペプチドを単離同定したが、VIP や CGRP に関連するものであった。(2)C 末端アミド構造を有したペプチドの系統的検索：C 末がアミド化された 3 つの新規構造を有したペプチドを単離できた。新たに発見したペプチドについて機能を明らかにする研究を推進している。(3)アンジオテンシン関連ペプチドの系統的検索:アンジオテンシン II を N 末に有するペプチドが単離できたが、いずれも量が少なくアンジオテンシンの代謝物であることが推定された。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

Nagata S, Yamasaki M, Kawano A, Kitamura K. Developments of human adrenomedullin-IgG1 Fc fusion proteins. J Biochem, 78(3-4), 129-134 (2019) DOI:10.1093/jb/mvz023. (査読有)

Tsuruda T, Kato J, Kuwasako K, Kitamura K. Adrenomedullin: Continuing to explore cardioprotection. Peptides, 111, 47-54 (2019) DOI:10.1016/j.peptides.2018.03.012 (査読有)

Nagata S, Yamasaki M, Kitamura K. Anti-Inflammatory Effects of PEGylated Human Adrenomedullin in a Mouse DSS-Induced Colitis Model. Drug development research, 78, 129-134 (2017) DOI:10.1002/ddr.21383. (査読有)

Jiang D, Kawagoe Y, Kuwasako K, Kitamura K, Kato J. Inhibitory effects of losartan and azelnidipine on augmentation of blood pressure variability induced by angiotensin II in rats. European journal of pharmacology, 806, 91-95 (2017) DOI:10.1016/j.ejphar.2017.04.018. (査読有)

Kuwasako K, Kitamura K, Nagata S, Sekiguchi T, Jiang D, Murakami M, Hattori Y, Kato

J. Corrigendum to "beta-arrestins negatively control human adrenomedullin type 1-receptor internalization" [Biochem. Biophys. Res. Commun. 487 (2) (2017) 438-443], Biochemical and biophysical research communications, 490, 1139 (2017) DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.06.006 (査読有)

北村和雄. アドレノメデュリンと関連ペプチドの疾患マーカーとしての意義. 生体の化学 67,434-435 (2016) (査読無)

〔学会発表〕(計 8 件)

北村和雄. アドレノメデュリンのトランスレーショナルリサーチ、第 39 回 日本循環制御医学会総会、特別講演 (宮崎) (2018 年 6 月 1 日)

Nagata S, Kitamura K. Big angiotensin-25: a novel component of the renin angiotensin system. Angiotensin Gordon Research Conference. (Ventura, CA, USA) (2018 年 2 月 19 日)

Nagata S, Yamasaki M, Kitamura K. Anti-inflammatory effects of PEGylated human adrenomedullin on DSS-induced colitis in mice. CGRP Family Peptides Conference 2018. (Santa Fe, NM, USA) (2018 年 2 月 13 日)

永田さやか, 山崎基生, 北村和雄. 持続性アドレノメデュリン誘導体の創製. 第 21 回日本心血管内分泌代謝学会学術総会. (大阪) (2017 年 12 月 8 日)

Kitamura K. The translational research of adrenomedullin: Adrenomedullin as a potential therapeutic agent for ulcerative colitis. The 2nd International Conference on Internal Medicine & Hospital Medicine. (Dallas, Texas, USA) (2017 年 9 月 13 日)

永田さやか, 北村和雄. 組織アンジオテンシン 生成における新規ペプチドの単離. 日本動物学会第 87 回沖縄大会 2016. (沖縄) (2016 年 11 月 17 日)

Tokashiki M, Kubo K, Kuwasako K, Nagata S, Kato J, Kitamura K. Biochemical properties of the N-terminally palmitoylated adrenomedullin. The 26th Scientific Meeting of the International Society of Hypertension. (Seoul, Korea) (2016 年 9 月 26 日)

Tsuruda T, Hao Y, Kurogi S, Nakamura M, Udagawa N, Chosa E, Asada Y, Kitamura K. Cardiac hypertrophy is exacerbated in aged mice lacking the osteoprotegerin gene. American College of Cardiology. Geriatric Cardiology Section Meeting. (Chicago, USA) (2016 年 4 月 2 日)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.miyazaki-u.ac.jp/home/medicin1/>

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。