

平成21年 6月 3日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19591091

研究課題名（和文） 生活習慣病に関わる新規生理活性ペプチドの探索と機能解析

研究課題名（英文） Search and functional analysis for novel bioactive peptides related with lifestyle-related disease

研究代表者

宮里 幹也（MIYAZATO MIKIYA）

国立循環器病センター研究所・生化学部・部長

研究者番号：50291183

研究成果の概要:生活習慣病に関連する新規生理活性ペプチドの探索と機能解析を目的として、生活習慣病に関わる組織で発現しているオーファン受容体の安定発現細胞株を作製するとともに、リガンドの探索ための新たな方法の開発を行い、新規生活習慣病関連ペプチドの探索を進めた。また、摂食促進ペプチド；グレリンの消化管における分泌調節と機能解析、グレリン受容体の発現調節機構を明らかにした。さらに、新規神経ペプチド；ニューロメジンSの神経内分泌的調節作用について明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内分泌学

キーワード：ペプチド、生活習慣病、摂食調節、グレリン、ニューロメジン

1. 研究開始当初の背景

肥満は、高血圧・心血管障害・糖尿病などの生活習慣病を頻発させ、その治療と予防は医学的・社会的に大きな課題である。2005年に設定された我が国のメタボリックシンドロームの診断基準においても、腹腔内臓脂肪蓄積が重要な役割を担っている。摂食・エネルギー代謝調節の分子レベルでの病態の解明は、近年急速に進んでいる分野であり、肥満のみならずそれに起因する生活習慣病の病態解明および総合的に治療する新しい治療法の開発につながるものと期待される。

当研究室においては、これまでの系統的な

生理活性ペプチドの探索およびリガンドの未知なオーファン受容体の発現細胞系を用いたアッセイ系によるリガンドスクリーニングにより、近年では、グレリンの発見やニューロメジンU (NMU) およびニューロメジンS (NMS) の同定に成功した。さらに、これらのペプチドの機能解析により、グレリンは成長ホルモン分泌促進のみならず、摂食・エネルギー代謝調節、循環調節など多彩な作用を有することが明らかにし、NMUはノックアウトマウスの解析により、その欠損が肥満、耐糖能異常、高脂血症など生活習慣病のモデルとなることを示した。2005年に単離したNMS

も、摂食抑制ホルモンとして機能している可能性を呈示し、当研究室におけるペプチド探索が、生活習慣病およびその基盤となる肥満・エネルギー代謝調節に関わる因子の同定に繋がっている。

2. 研究の目的

本研究では、研究代表者らのこれまでの実績と経験を背景として、生活習慣病に関わる新規生理活性ペプチドの探索・同定とその機能解析、既に生理作用の解析を進めているグレリン、ニューロメジンUおよびニューロメジンSについて、生活習慣病との関連を中心にさらに機能解析を進展させることを目的とする。本研究の遂行により、内分泌調節、摂食調節やエネルギー代謝調節機構の再構築ならびにそれらを基盤とした生活習慣病との関連性の解明へ貢献することを期待し、さらに肥満ならびに関連疾患の予防・治療薬開発につながる臨床応用への研究も見据えて研究を展開する。

3. 研究の方法

(1) 生活習慣病に関連する新規生理活性ペプチドの探索

① 生活習慣病への関連が推定されるオーファン受容体の安定発現細胞株の作製

生活習慣病に深く関わると考えられる脳視床下部、心臓・血管組織もしくは脂肪組織で発現しているリガンドが未知な受容体（オーファン受容体）を選別し、内因性リガンドがペプチドであると推定されるものについて全長 cDNA をクローニングした後、哺乳動物細胞へ導入し、オーファン受容体安定発現細胞株を得る。オーファン受容体の発現分布は、ラット cDNA パネルを用いて RT-PCR を用いて解析する。

② オーファン受容体発現系を用いた新規ペプチドの探索

樹立したオーファン受容体安定発現細胞株に、ラットおよびブタ組織抽出物を添加し、細胞内シグナル変化を指標として、オーファン受容体の内因性リガンドの探索を行う。

組織は、煮沸して内因性プロテアーゼを失活させ、酢酸抽出して得た可溶性ペプチド画分を、逆相 C18 カラムを用いて脱塩・濃縮する。さらに、SP-Sephadex 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し、G-50 ゲル濾過を行う。各ゲル濾過フラクションの一部を樹立したオーファン受容体発現細胞株に加え、培養細胞内カルシウム上昇を FLIPR System (Molecular Devices 社) で、細胞内 cAMP 変動を Fusion α (Perkin Elmer 社) あるいはルシフェラーゼレポーター遺伝子を利用した高感度のアッセイ系を用いて測定する。活

性の認められるフラクションを、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。

また、リガンド探索で重要なことは、鋭敏且つ高感度で再現性の高い活性検出法の確立であり、上記の細胞内カルシウム上昇、細胞内 cAMP 変動を指標としたアッセイ法に加え、新たなオーファン受容体アッセイ法を確立する。

(2) グレリン、ニューロメジンUおよびニューロメジンSの生活習慣病における機能の解明

① グレリンの機能解明

グレリンの生理機能制御機構を明らかにするため、その受容体である GHS-R の発現調節機序について、ラット迷走神経節における発現変動を、摂食状態、迷走神経切断、消化管ペプチド投与等により検討する。また、グレリンの分泌調節および消化管における生理作用を明らかにするため、消化管ホルモンであるガストリンによる分泌調節と胃酸分泌作用について評価した。

② ニューロメジンUおよびニューロメジンSの機能解明

ラット脳において視床下部に特異的に発現しているニューロメジンSについて、新たな生理機能明らかにするため、中枢投与（脳室内投与）による作用部位とそれに基づく神経内分泌学的作用について検討する。

4. 研究成果

(1) 生活習慣病に関連する新規生理活性ペプチドの探索

① オーファン受容体の安定発現細胞株の作製

新たな生活習慣病に関連するペプチドの探索を目的として、脳、消化管および脂肪組織に主に発現するオーファン受容体の cDNA クローニングを行い、発現ベクターに組み込み、哺乳動物細胞 (CHO 細胞、HEK293 細胞) に導入し、25 種類のオーファン受容体安定発現細胞株を作製した。

② オーファン受容体発現系を用いた新規ペプチドの探索

新規ペプチドの探索のための材料としての組織抽出物として、ブタの視床下部、脳幹、嗅球、脊髄、下垂体、肝臓および胎盤、ラットの脳、小脳、心房、心室、胃、小腸、腎臓、肝臓、骨格筋、内臓脂肪および精巣をそれぞれ酢酸抽出し、逆相 C18 カラムを用いて脱塩・濃縮後、イオン交換、ゲル濾過クロマトグラフィーにて分画したペプチド・ライブラリーを作製した。

オーファン受容体を用いた新規内因性リ

ガンド探索のための新たな活性検出法として、従来より用いている培養細胞内カルシウム上昇や細胞内 cAMP 変動を測定する系に加えて、受容体インターナリゼーションを指標とするアッセイ法を、IN Cell Analyzer (GEヘルスケアバイオサイエンス社)を用いて確立した。本アッセイ法は、オーファン受容体のN末端部にタグを付け、そのタグを認識する抗体に pH 感受性蛍光色素を標識したものをを用いるアッセイ法であり、受容体が共役する G タンパク質のサブタイプに依存せず、リガンドと受容体の結合を検出でき、細胞内二次シグナルが不明なオーファン受容体におけるリガンド探索への応用も可能である。さらに、発現させたオーファン受容体の細胞膜移行の検出が可能であり、オーファン受容体タンパク質の細胞での発現の確認に有用である。

これらのアッセイ系を用いて、オーファン受容体に対する新規リガンド探索を、ラットおよびブタ組織を材料として進めた結果、ブタ視床下部において肥満やエネルギー代謝調節に関与する一つのオーファン受容体に対するアゴニスト活性を、既知ペプチドとは明らかに異なる分画に検出した。現在、本活性物質の単離・構造決定へ向けての精製を進めている。

さらに、培養脂肪細胞を用い、循環器疾患の基盤となるメタボリックシンドロームの病態に関わる脂肪細胞機能を制御する内在性因子の探索法も確立し、新規生理活性因子のスクリーニングを進めている。

(2) グレリン、ニューロメジンUおよびニューロメジンSの生活習慣病における機能の解明

① グレリンの機能解明

オーファン受容体のリガンドとして当研究室で発見された摂食促進ペプチド；グレリンの受容体である GHS-R の迷走神経節における発現調節について検討した結果、GHS-R 発現は日内変動を有し、さらに、摂食状態や迷走神経切断、消化管ペプチド（コレシストキニン、ガストリン）投与により調節を受けており、GHS-R の生合成は中枢性および末梢性に制御されていることが判明した。リガンドのみならず、受容体の発現調節によってもグレリンの生理作用が制御されている可能性が示唆された。

また、グレリンは、消化管ペプチドであるガストリンにより胃からの分泌が促進し、さらに、グレリンとガストリンは、胃酸分泌刺激に対して相乗効果を有していることが判明した。

② ニューロメジンUおよびニューロメジンSの機能解明

研究代表者らは、2005年にオーファン受容体発現細胞系を用いたアッセイ系によるリガンドスクリーニングにより、ニューロメジンS (NMS) と命名した新規の生理活性ペプチドをラットの脳より単離した。本ペプチドはその生理作用の一つとして、摂食抑制作用を有することを既に報告していた。今回、NMS のラットへの中枢投与（脳室内投与）により、視床下部室傍核および視索上核のバゾプレッシン産生細胞に作用し、用量依存的に血中バゾプレッシン濃度を増加させ、尿量を減少させることを明らかにした。この作用は、ファミリーペプチドであるニューロメジンUと比較して、約10倍強力であった。内因性のNMSはバゾプレッシンを介して、体液量を調節していることが示唆された。

さらにNMSは、視床下部室傍核および視索上核のオキシトシン産生細胞にも作用し、用量依存的に血中オキシトシン濃度を増加させ、乳中分泌促進作用を示すことを明らかにした。NMS抗体投与により授乳ラットの乳汁分泌が抑制されたことより、NMSは内因性のオキシトシン分泌調節因子であることが示唆された。

以上のように、NMSは内因性の神経内分泌調節因子であることを明らかにした。

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16件)

- ① Kaiya H, Riley L, Janzen W, Hirano T, Grau EG, Miyazato M, Kangawa K. Identification and genomic sequence of ghrelin receptor (GHS-R)-like receptor in the Mozambique Tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Zool Sci*, (in press) 査読有
- ② Konno N, Hyodo S, Yamaguchi Y, Kaiya H, Miyazato M, Matsuda K, Uchiyama M. African lungfish, *Protopterus annectens*, possess an arginine vasotocin receptor homologous to the tetrapod V2-type receptor. *J Exp Biol*, (in press) 査読有
- ③ Kaiya H, Furuse M, Miyazato M, Kangawa K. Current knowledge of the roles of ghrelin in regulating food intake and energy balance in birds. *Gen Comp Endocrinol*, (in press) 査読有
- ④ Kaiya H, Mori T, Miyazato M, Kangawa K. Ghrelin receptor (GHS-R)-like receptor and its genomic organisation in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 153: 438-450, 2009. 査読有

- ⑤ Miura T, Maruyama K, Kaiya H, Miyazato M, Kangawa K, Uchiyama M, Shioda S, Matsuda K. Purification and properties of ghrelin from the intestine of the goldfish, *Carassius auratus*. *Peptides*, 30: 758-765, 2009. 査読有
- ⑥ Sakamoto T, Mori K, Miyazato M, Kangawa K, Sameshima H, Nakahara K, Murakami N. Involvement of neuromedin S in the oxytocin release response to suckling stimulus. *Biochem Biophys Res Commun*, 375: 49-53, 2008. 査読有
- ⑦ Fukumoto K, Nakahara K, Katayama T, Miyazato M, Kangawa K, Murakami N. Synergistic action of gastrin and ghrelin on gastric acid secretion in rats. *Biochem Biophys Res Commun*, 374: 60-63, 2008. 査読有
- ⑧ Yamamoto I, Kaiya H, Tsutsui C, Sakai Y, Sukada A, Miyazato M, Tanaka M. Primary structure, tissue distribution and biological activity of chicken motilin receptor. *Gen Comp Endocrinol*, 156: 509-514, 2008. 査読有
- ⑨ Tokudome T, Kishimoto I, Horio T, Arai A, Schwenke DO, Hino J, Okano I, Kawano Y, Kohno M, Miyazato M, Nakao K, Kangawa K. Regulator of G-protein signaling subtype 4 mediates antihypertrophic effect of locally secreted natriuretic peptides in the heart. *Circulation*, 117: 2329-2339, 2008. 査読有
- ⑩ Mori K, Miyazato M, Kangawa K. Neuromedin S: Discovery and Functions. *Results Probl Cell Differ*, 46: 201-212, 2008. 査読有
- ⑪ 宮里幹也, 寒川賢治. 食欲とホルモン-グレリンとニューロメジンUおよびSについて. *総合臨牀*, 57: 433-436, 2008. 査読無
- ⑫ Miyazato M, Mori K, Ida T, Kojima M, Murakami N, Kangawa K. Identification and functional analysis of a novel ligand for G protein-coupled receptor, Neuromedin S. *Regu. Pept*, 145: 37-41, 2008. 査読有
- ⑬ Kaiya H, Miyazato M, Kangawa K, Peter RE, Unniappan S. Ghrelin: A multifunctional hormone in non-mammalian vertebrates. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 149: 109-128, 2008. 査読有
- ⑭ Sakamoto T, Mori K, Nakahara K, Miyazato M, Kangawa K, Samejima H, Murakami N. Neuromedin S exerts an antidiuretic action in rats. *Biochem Biophys Res Commun*, 361: 457-461, 2007.

査読有

- ⑮ Sato M, Nakahara K, Miyazato M, Kangawa K, Murakami N. Regulation of GH secretagogue receptor gene expression in the rat nodose ganglion. *J Endocrinol*, 194: 41-46, 2007. 査読有
- ⑯ Kawakoshi A, Kaiya H, Riley LG, Hirano T, Grau EG, Miyazato M, Hosoda H, Kangawa K. Identification of a ghrelin-like peptide in two species of shark, *Sphyrna lewini* and *Carcharhinus melanopterus*. *Gen Comp Endocrinol*, 151: 259-268, 2007. 査読有

[学会発表] (計 1件)

- ① 宮里幹也. グレリンの翻訳後修飾. 大阪大学タンパク質研究所セミナー. 2008年1月11日. 大阪

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮里 幹也 (MIYAZATO MIKIYA)

国立循環器病センター研究所生化学部・部長

研究者番号 : 50291183

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

寒川 賢治 (KANGAWA KENJI)

国立循環器病センター研究所・所長

研究者番号 : 00112417

伊達 紫 (DATE YUKARI)

宮崎大学フロンティア科学実験総合センター・教授

研究者番号 : 70381100