

平成22年 6月 1日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20790666
 研究課題名 (和文) 新規生理活性ペプチドの同定と機能解析による
 新しい生体調節機構の解明
 研究課題名 (英文) Research for novel regulatory mechanisms
 by functional analysis of newly identified bioactive peptide
 研究代表者
 森 健二 (MORI KENJI)
 国立循環器病センター研究所・生化学部・室長
 研究者番号：00416223

研究成果の概要 (和文)：生体の調節・維持において数多くの生理活性ペプチドが重要な役割を果たしている。本研究では、新たな生体調節機構の解明を目的として、新規生理活性ペプチドの探索を試みた。この結果、翻訳後修飾により 33 もしくは 36 アミノ酸残基にて産生される新規ペプチドの同定に成功した。また、ラット脳室内への投与実験により新規ペプチドのプロラクチン分泌促進活性を示し、このペプチドが関与する新しい生体調節機構の存在を示唆することができた。

研究成果の概要 (英文)：The discovery of bioactive peptides, such as neuropeptides, results in an increased understanding of novel regulatory mechanisms of certain physiological phenomena. In this study, a novel peptide, which consists of 33 or 36 amino-acid residues, was identified. Intracerebroventricular administration of synthesized peptide to rats potently induced increase in plasma prolactin level. These data suggest that newly identified peptide may play a role in the regulation of prolactin release from lactotroph.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：生化学、ペプチド化学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内分泌学

キーワード：オーファン GPCR、内因性リガンド、生理活性ペプチド、内分泌

1. 研究開始当初の背景

生体機能の調節・維持において、組織間もしくは細胞間での情報交換が非常に重要な役割を果たしており、これらの情報伝達には数多くの生理活性ペプチドが関与している。研究代表者の所属する研究室では、これまで

ナトリウム利尿ペプチドファミリー (ANP、BNP、CNP) とアドレノメデュリンの発見により新たな循環調節機構を、グレリンの発見により新しい摂食・エネルギー代謝調節機構を明らかにしてきた。このように、新規生理活性ペプチドの発見により、これまで未知で

あった生体調節機構を明らかにすることが可能である。

古くから、新しい生理活性ペプチドの探索・同定には、ペプチド自身が有する特定の生理機能が指標として用いられてきた。しかしながら、動物個体を用いて生理機能を再現性よく評価することは困難であるため、現在では幾つかの代替法が開発されている。多くの生理活性ペプチドは、特有の生理機能に加え様々な薬理スペクトルを示すことが知られている。このため、平滑筋の収縮・弛緩活性や培養細胞への反応性を指標としてペプチドを系統的に精製・構造解析する手段が用いられている。また近年では、遺伝子配列解析により、機能未知の受容体（オーファン受容体）が多数発見され、それらを用いた新規生理活性ペプチド探索が行われている。さらに、生理活性ペプチドの生合成過程の研究からも、新たなペプチドの存在が予見できるようになっている。

2. 研究の目的

新規生理活性ペプチドの発見により、その関与する新たな生体調節機構の存在が明らかになる。また、現在使用されている医薬品の約4割は受容体を標的としていることから、本研究にて発見される新規生理活性ペプチドとその受容体は先端的創薬の重要な標的になりうる。加えて、各種疾患における病態生理学的意義を確立すれば新薬開発に加え新しい診断法開発などの臨床応用研究への展開も期待できる。

そこで本研究では、内分泌・神経内分泌領域の基礎研究から将来的な応用研究への発展を目指し、新たな生理活性ペプチドの探索・同定を行い、その機能解析を通して新しい生体調節機構を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 多くの生理活性ペプチドは、Gタンパク質共役型受容体（GPCR）を介して情報を伝達する。GPCRは基本構造である7回膜貫通領域を有するため、遺伝子配列情報よりその存在を容易に推測することができ、ヒトゲノム解析によって約600種類のGPCRが存在することが示された。そのうち約200種類は機能未知、すなわちリガンドの不明なオーファンGPCRであり、それらが関与する未知の生体調節機構の存在が示唆されている。GPCRのリガンドはペプチドだけでなく、脂質、生体アミン、アミノ酸・核酸とその代謝物など多岐にわたるが、既知生理活性ペプチドの受容体との一次構造比較により、ペプチドをリガンドとするオーファンGPCRを推測することが可能である。そこで、オーファンGPCRの内因性リガンドを、動物組織から抽出したペプチド画分より精製・構造解析す

ることにより、新規生理活性ペプチドの探索を行う。

(2) 研究代表者らがオーファンGPCRの内因性リガンドとして発見した神経ペプチドであるニューロメジンS（NMS）について、ラットへの脳室内投与による影響を観察し、NMSの新たな機能の解明を行う。

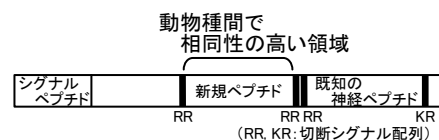
4. 研究成果

(1) 主な研究成果

① 新規生理活性ペプチドの探索

特定のオーファンGPCRを恒常的に発現するCHO細胞を樹立し、この細胞にラットの各組織から抽出した強塩基性ペプチド画分を反応させることによって起こる細胞内セカンドメッセンジャーの変動を測定した。この結果、オーファンGPCRの発現に依存して細胞内Ca²⁺濃度を上昇させる活性をラット脳に見出し、この受容体の内因性リガンド活性を同定できた。この活性を、ゲルろ過クロマト、イオン交換クロマト、3段階の逆相HPLCにて単一に精製したのち、プロテインシーケンサーと質量分析計にて構造解析を試みたところ、この活性は既知の神経ペプチドであった。

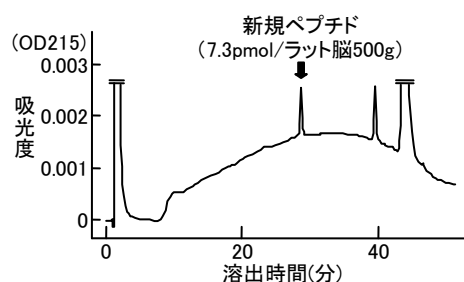
この神経ペプチドの前駆体タンパク質のアミノ酸配列を解析したところ、翻訳後修飾過程でサチライシン様プロセッシングプロテアーゼによる限定切断を受けるための典型的なシグナル配列である塩基性アミノ酸対が4つ存在していた（図1）。そのうち2つは同定した神経ペプチドの産生に関与するが、他の2つは新たなペプチドを産生するためのシグナルと推測できた。後者2つのシグナルは哺乳類から魚類などの下等動物にいたるまで完全に保存されている。また、このシグナル間のアミノ酸配列は、既知神経ペプチド領域や他の領域よりも各種動物間で非常に高度に保存されている。以上のことは、この神経ペプチド前駆体から生理機能を有するもう一つの新しい生理活性ペプチドが産生される可能性を強く示している（図1）。



【図1】 既知の神経ペプチド前駆体タンパク質の構造

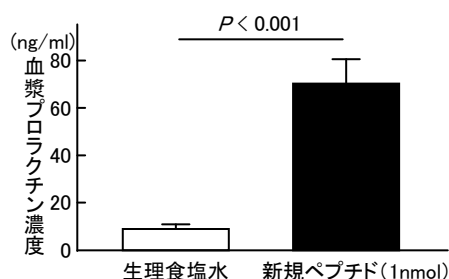
既知神経ペプチド前駆体タンパク質のmRNAは視床下部及び小腸にて強く発現している。そこで、それぞれの組織より抽出したペプチド画分から特異抗体を用いたアフィニティークロマトと逆相HPLCにより新規ペプチド候補の精製を試みた。精製できたペプチドの構造解析の結果、ラット脳及び小

腸の両方から推測どおりの新規ペプチドを同定できた(図2)。また、切断シグナルの使い分けにより、33残基と36残基のアミノ酸から成る2種類の分子種が存在していた。



【図2】ラット脳から新規ペプチドの最終精製

新規ペプチドと同一の前駆体から産生させる既知神経ペプチドは、ラットへの脳室内投与によって様々な生理作用を示すことが知られている。そこで、新規ペプチドについても脳室内投与実験により機能解析を試みた。化学合成した1ナノモルの新規ペプチドをラット脳室内へ投与し、20分後の血漿ホルモン濃度を測定したところ、プロラクチン濃度の顕著な上昇が観察され(図3)、新規ペプチドがプロラクチン分泌促進活性を有することが示された。以上の結果は、本研究によって発見できた新規ペプチドの関与する新しい生体調節機構が存在することを強く示唆している。



【図3】脳室内投与した新規ペプチドのプロラクチン分泌促進活性

②NMSの新たな機能解析

オーファン GPCR の内因性リガンドとして発見したNMSの新たな機能解析を試みた。脳室内投与により、NMSは視床下部室傍核と視索上核のオキシトシン産生ニューロンを活性化し、さらには用量依存的にオキシトシン分泌を亢進させた。また、NMS中和抗体の投与により授乳刺激による乳汁分泌量が低下した。これらの結果より、NMSはオキシトシンを介して乳汁分泌の調節に関与していることが示唆された。

(2) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

本研究では上述のように、新たな生理活性ペプチドを同定してその生物活性を示すことにより、このペプチドの関与する新たな生体調節機構の存在を示唆することができた。また、NMSの機能解析により、乳汁分泌調節における新たな役割を示した。

生理活性ペプチドの探索研究の歴史は長く、多くの研究室による非常に激しい競争が繰り広げられている。それらの成果として近年だけでも、ノシセプチン (Meunier et al., Nature, 1995)、オレキシン (Sakurai et al., Cell, 1998)、グレリン (Kojima et al., Nature, 1999)、メタスチン (Ohtaki et al., Nature, 2001) が報告され、研究代表者もNMSを発見した (Mori et al., EMBO J., 2005)。このように、生理活性ペプチドの探索研究の成果は国際的にも非常に高く評価されている。これらと同様に、本研究によって発見した新規生理活性ペプチドの生理的意義を明らかにして新しい生体調節機構を確立すれば、その成果はインパクトが大きく注目を集め、高く評価されると推測される。

また、研究代表者が独自に発見したNMSについては、発見者としての優位性を生かして独創的に研究を推進でき、常に新しい知見を世界に向け発信できている。

(3) 今後の展望

本研究により、プロラクチン分泌促進活性を有する新しい生理活性ペプチドを同定した。今後は、プロラクチン分泌制御機構における役割の詳細な検討が必要である。具体的には、下垂体ラクトロフへの直接作用、もしくはプロラクチン分泌を抑制的に制御している視床下部弓状核ドーパミン産生ニューロンを介した間接作用かを検討する。また、脳内に存在するこのペプチドとプロラクチン分泌制御系との係わりを免疫組織化学的手法を用いて解析する。最終的には、遺伝子改変動物を用いて生理的意義や病態生理学的意義を明らかにすることにより、新規生理活性ペプチドによる新しい生体調節機構を確立できる。

また、NMSについては今後、遺伝子改変動物を用いた解析を進める。

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)

- ① 森健二、宮里幹也、寒川賢治、摂食抑制ペプチドとしてのニューロメジンUとニューロメジンS、循環器病研究の進歩、第30巻、47-52、2009、査読無
- ② 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

〔学会発表〕（計2件）

- ① Miyazawa T, Miyazato M, Yoshida M, Sawai K, Mori K, Kangawa K. Identification of bioactive peptides associated with the metabolic syndrome. 14th International Congress of Endocrinology, March 30, 2009, Kyoto, Japan.
- ② 森健二、宮里幹也、寒川賢治、新しい生理活性ペプチドを求めて、第35回日本神経内分泌学会・第23回日本下垂体研究会合同学術集会、2008年8月、東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森 健二 (MORI KENJI)

国立循環器病センター研究所・生化学部・室長

研究者番号：00416223

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし