

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月23日現在

機関番号：17601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2009～2011

課題番号：21659234

研究課題名（和文）ヒト褐色細胞組織に存在する新規生理活性ペプチドの系統的探索

研究課題名（英文）Systematic survey for biologically active peptides in human pheochromocytoma tissue.

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

研究成果の概要（和文）：

本研究では我々が独自に開発した検索法で生理活性ペプチドの系統的検索をヒト褐色細胞腫のペプチド分画で実施した。その結果、20以上のペプチドの単離・構造解析を行った。興味深い新規ペプチドに関しては合成を行い、機能解析研究を推進している。

研究成果の概要（英文）：

We have performed the systematic survey for biologically active peptides in human pheochromocytoma tissue, using assay systems which we had originally established. We have purified and determined more than 20 peptides from human human pheochromocytoma tissue. We chemically synthesized the novel peptide and are now investigating its function.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,200,000	0	1,200,000
2010 年度	800,000	0	800,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	2,900,000	270,000	3,170,000

研究分野：医師薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内分泌学

キーワード：褐色細胞腫、受容体、新規生理活性ペプチド、cAMP、アミド化、血管作動性物、アンジオテンシン、ラジオイムノアッセイ

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となってきた。しかし、生体から取り出された生理活性ペプチドは、多くのものがアミド化や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、ヒト褐色細胞腫で産生される生理活性ペプチドに的を絞り、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。

2. 研究の目的

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、アドレノメデュリン (AM) を発見した。この課程で、ヒト褐色細胞腫では、他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) 副腎髄質由来の培養細胞 (TGW) 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 (Ang) 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、ヒト褐色細胞腫組織から新規生理活性ペプチドを発見したい。

3. 研究の方法

ヒト褐色細胞腫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、アドレノメデュリンや PAMP を褐色細胞腫組織から発見した時に用いた方法を用いた。すでに、手術時に得られた褐色細胞腫より、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ており、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た次の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) 副腎髄質由来の培養細胞 (TGW) 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、ヒト褐色細胞腫組織からアドレノメデュリンと PAMP に続く、新たな生理活性ペプチドの発見を目指す。

4. 研究成果

アドレノメデュリンはラット血小板中の cAMP の増加活性を指標に発見できた。副腎髄質には未知の生理活性ペプチドが存在し、

その多くのものが副腎髄質に作用している可能性がある。我々は副腎髄質由来の培養細胞 (TGW) の cAMP 増加作用を有するペプチドの検索の cAMP 増加を指標にしたアッセイ法を確立し、新規生理活性ペプチドの探索をすすめた。20以上の生理活性ペプチドの単離・構造解析に成功したが、精製されたペプチドは VIP, CGRP 等のペプチドが修飾を受けた物であることが判明した。今後は、ラジオイムノアッセイや LC/MS を組み合わせることで既知の生理活性ペプチドを除外して新たな生理活性ペプチドの発見をめざしたい。

一方生理活性ペプチドの特徴の一つに、C末のアミド構造があげられる。我々は、ペプチドのC末がアミド化されていることを指標に、ペプチドの検索を行い、ブタ心房から amidicin を単離・構造決定した。amidicin は心臓、腎臓等の循環器組織の高濃度存在し、新たな循環調節因子としての可能性が示された。さらに、ヒトの褐色細胞腫にも amidicin が高濃度存在しちることを明らかにし、その精製をと構造解析をおこなった。さらに、ヒト amidicin のラジオイムノアッセイを確立し、血中にも循環していることを明らかにした。他の生理活性ペプチドの探索を進め、10以上のペプチドの精製を終了して構造解析をおこなったが、既知の生理活性ペプチドないし構造蛋白の一部がアミド化された物であった。新規の構造のペプチドに関しては合成品を調製し、血圧・血管に対する作用などを調べたが、意味のある活性は認められなかった。

Ang II のN末を認識するラジオイムノアッセイ (RIA) を用いて、2006年にラット小腸より、アンジオテンシン I(AngI)のC末に2個のアミノ酸が付加した AngI-Leu-Tyr を内在性の強力な昇圧ペプチドとして発見し、プロアンジオテンシン-12(proang-12)と命名した。proang-12は、ラット各組織において、AngI や Ang II より高濃度存在していることから、組織 Ang II 解明のカギとなるペプチド分子であることが示唆されている。本研究では Ang II のN末を認識する RIA を用いて、ヒト褐色細胞腫組織に存在するアンジオテンシン関連ペプチドを系統的に単離した。その結果、ラット proang-12 に当たるものはヒトにはほとんど存在せず、Ang II と別の分子型が主要なものであることが判明した。別の分子型の proang に関して構造決定を行い、現在合成品を調製中であり、今後機能解析を進めることで新たな展開が期待できる。

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 7 件)

- ① Nagata S, Kuwasako K, Kitamura K, et al.: Plasma and tissue concentrations of proangiotensin-12 in rats treated with inhibitors of the renin-angiotensin system. 査読有
Hypertens Res 2012; 35: 234-238
- ② Kuwasako K, Nagata S, Kitamura K, et al.: Effects of proangiotensin-12 infused continuously over 14days in conscious rats. 査読有
Eur J Pharmacol 2012; in press.
- ③ Kuwasako K, Nagata S, Kitamura K, et al.: Shared and separate functions of the RAMP-based adrenomedullin receptors. 査読有
Peptides 2011; 32: 1540-1550
- ④ Kuwasako K, Kitamura K, Nagata S, Hikosaka T, Kato J.: Function of the cytoplasmic tail of human calcitonin receptor-like receptor in complex with receptor activity-modifying protein 2. 査読有
Biochem Biophys Res Commun 2010; 392 380-385
- ⑤ Nagata S, Kato J, Kuwasako K, Kitamura K.: Plasma and tissue levels of proangiotensin-12 and components of the renin-angiotensin system (RAS) following low- or high-salt feeding in rats. 査読有
Peptides 2010; 31: 889-892
- ⑥ Kuwasako K, Kitamura K, Nagata S, Hikosaka T, Kato J.: Structure-function analysis of helix 8 of human calcitonin receptor-like receptor within the adrenomedullin 1 receptor. 査読有
Peptides 2010; 32: 144-149
- ⑦ Ferrario CM, Varagic J, et al.: Differential regulation of angiotensin-(1-12) in plasma and cardiac tissue in response to bilateral nephrectomy. 査読有

Am J Physiol Heart Circ Physiol 2009; 296: H1184-H1192

[学会発表] (計 4 件)

- ① Kitamura K.: Beneficial Biological Effects of Adrenomedullin and Possibility of Clinical Application. BIT's 5th Anniversary of Protein and Peptide Conference (PepCon-2012) 2012年3月23日 Beijing, China
- ② Kuwasako K, Kitamura K, Nagata S, Hikosaka T, Kato J.: Interaction between receptor activity-modifying proteins (RAMPs) and G-protein-coupled receptors and the function of the C-terminal tail of calcitonin receptor-like receptor in complex with RAMP2. 7th International Symposia on the CGRP Family; CGRP, Adrenomedullin, Amylin, Intermedin and Calcitonin 2010年8月31日 Queenstown, New Zealand
- ③ Kitamura K.: Possibility for clinical application of adrenomedullin and related peptides. 14th International Congress of Endocrinology(ICE2010) 2010年3月29日 京都
- ④ Kitamura K, Ashizuka S, et.al.: Adrenomedullin treatment reduces intestinal inflammation in mice administered dextran sulphate sodium. 14th International Congress of Endocrinology(ICE2010) 2010年3月30日 京都

[図書] (計 1 件)

- ① 鶴田敏博、畠山金太、他: 炎症と動脈硬化. 日本臨床社、マクロファージ・血管構築細胞群 2011、5ページ

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: マトリックスメタロプロテアーゼ活性抑制組成物

発明者: 鶴田敏博、北村和雄

権利者: 国立大学法人宮崎大学

種類：特許
番号：特願 2010-187078
出願年月日：2010年8月24日
国内外の別：国内

○取得状況（計0件）

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

桑迫 健二 (KUWASAKO KENJI)
宮崎大学・フロンティア科学実験総合センター・准教授
研究者番号：20381098

永田 さやか (NAGATA SAYAKA)
宮崎大学・医学部・助教
研究者番号：00452920

(3) 連携研究者