

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 6月 15日現在

機関番号：84404

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790892

研究課題名（和文） 新規生理活性ペプチドの機能解析と受容体の同定による
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 novel bioactive peptide and its receptor

研究代表者

森 健二（MORI KENJI）

独立行政法人国立循環器病研究センター・生化学部・室長

研究者番号：00416223

研究成果の概要（和文）：核酸やアミノ酸配列情報から生理活性ペプチド候補を探る *in silico* スクリーニングにより、既知神経ペプチドの前駆体タンパク質から産生される新しい生理活性ペプチドを発見した。このペプチドをラットへ脳室内投与すると、用量依存的に特定下垂体ホルモンの血漿濃度が上昇した。脳切片を使った結合実験により、このペプチドは脳の特定の領域に結合することが観察された。また、同一の前駆体タンパク質に含まれる既知神経ペプチドは正常に産生するが、新たに発見したペプチドのみを欠損するノックアウトマウスを作製した。

研究成果の概要（英文）：A novel bioactive peptide was identified by *in silico* screening. This peptide was produced from a precursor protein of known neuropeptide by differential proteolytic processing. Intracerebroventricular administration of peptide to rats induced increase in plasma concentration of specific pituitary hormone. A specific binding of radiolabeled peptide to a section of rat brain was observed. To elucidate the physiological role of a newly identified peptide, mice lacking only this peptide were generated.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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：内分泌、神経ペプチド、生理活性ペプチド、受容体

1. 研究開始当初の背景

生理活性ペプチドは、ホルモンとして内分泌的調節を担うだけでなく、神経ペプチドとして、本能行動（摂食、飲水、性行動など）や自律機能（恒常性維持）の調節因子として機能するなど、様々な生体機能の調節において幅広く重要な役割を果たしている。申請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）

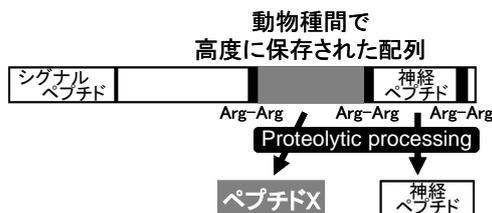
やアドレノメデュリンの発見により新たな循環調節機構を、グレリンの発見により新しい摂食・エネルギー代謝調節機構を明らかにしてきた。このように、新規生理活性ペプチドの発見によって、それが関与する新しい生体調節機構を明らかにすることが可能である。

生理活性ペプチドの探索研究の歴史は長く、非常に激しい競争が繰り返されており、

現在では多面的なアプローチにより探索が試みられている。古くから、多くの生理活性ペプチドは、自身が有するホルモン様活性やオーファン G タンパク質共役型受容体の活性化などを指標とした精製と構造解析により同定されてきた。この手法により近年だけでも、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) などが発見されている。また、研究代表者自身もニューロメジン S を発見した (Mori *et al.*, EMBO J., 2005)。一方では、核酸やアミノ酸配列情報から生理活性ペプチド候補を探る *in silico* スクリーニングも試みられ、RF アミド関連ペプチド (Hinuma *et al.*, Nat. Cell Biol., 2000) やサリューション (Shichiri *et al.*, Nat. Med., 2003) などが同定されている。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。

2. 研究の目的

多くの生理活性ペプチドは、分子量の大きな前駆体タンパク質として生合成された後、塩基性アミノ酸対 (Arg-Arg や Lys-Arg) を認識配列としてプロセシングプロテアーゼによって限定切断を受けることにより、活性型のペプチドとして産生される。このため、前駆体タンパク質の一次構造に含まれる塩基性アミノ酸対部位は、新しい生理活性ペプチドを発見するための目印となる。これまでの研究にて、塩基性アミノ酸対に着目して既知神経ペプチドの前駆体タンパク質の一次構造解析を試みたところ、ある神経ペプチドの前駆体タンパク質に、もう 1 つの新規ペプチド“ペプチド X”が含まれていることを見出した (図 1)。このペプチド X は、他の神経ペプチドに匹敵する量でラット脳に含まれていることは既に証明した。



【図1】既知神経ペプチドの前駆体タンパク質の構造と予測される翻訳後修飾

本研究では、このペプチド X の機能解析により、これが新規生理活性ペプチドであることを示し、さらにはペプチド X が関与する新たな生体調節機構の解明を目的とする。

3. 研究の方法

(1) ペプチド X は脳内に存在しているが、前駆体タンパク質の遺伝子発現分布より、視

床下部に多く存在していることが推測される。そこで、化学合成したペプチド X をラットの脳室内へ投与し、ラットの行動や内分泌制御の変化を観察した。血中である下垂体ホルモン濃度が顕著に増加したため、その作用機構の解明も試みた。

(2) ペプチド X が機能するには、受容体を介していることが推測される。そこで、受容体を同定するための予備的検討として、放射性物質で標識したペプチド X の結合部位が脳に存在するかを検討した。

(3) ペプチド X の生理的役割を明らかにするには、遺伝子改変動物を用いた解析が必要である。そこで、前駆体タンパク質が同一な既知神経ペプチドは正常に産生するが、ペプチド X のみを欠損したノックアウトマウスの作出を試みた。

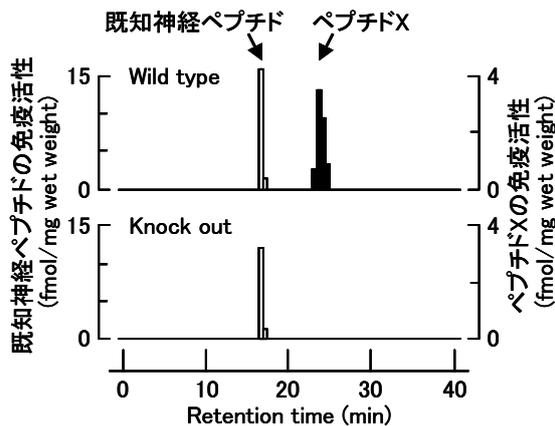
4. 研究成果

(1) 1 ナノモルのペプチド X をラットの脳室内へ投与したところ、行動の顕著な変化は観察されなかった。しかしながら、血漿中の各種ホルモン濃度を測定すると、特定の下垂体ホルモン濃度の上昇が認められた。この作用は、用量および時間依存的であり、その比活性は同一のホルモン分泌活性を有する神経ペプチドのそれとほぼ同一であった。次に、この下垂体ホルモン分泌促進活性が、下垂体への直接的もしくは間接的な作用かを明らかにするために、下垂体細胞の初代培養へペプチド X を添加し、ホルモン濃度の測定を試みた。しかしながら、対象の下垂体ホルモン濃度の上昇は観察されなかったため、視床下部弓状核に存在する特定の神経細胞を介した間接的な作用であることが示唆された。この神経細胞の機能を無効にする薬剤の前投与により、脳室内投与によるペプチド X の作用が消失することから、ペプチド X は特定の神経細胞の機能を介して特定の下垂体ホルモンの血中濃度を制御していることが示唆された。

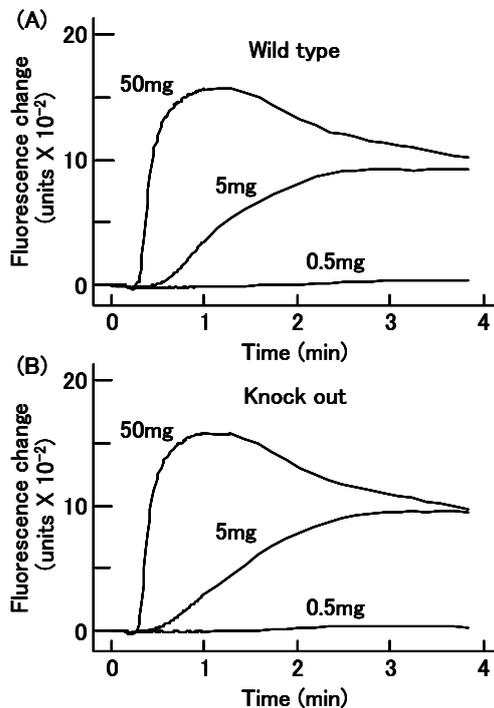
(2) ペプチド X の受容体の分布を明らかにすることを目的として、放射性物質で標識したペプチド X の脳切片への結合実験を試みた。その結果、幾つかの特定の領域で結合が観察されたが、意外にも海馬での結合が顕著であった。このことから、ペプチド X は下垂体ホルモン分泌促進活性のほかに何らかの機能を有していることが示唆された。

(3) ペプチド X の生理的役割の解明を目的として、ペプチド X のみを欠損したノックアウトマウスの作出を試みた。ペプチド X と既知神経ペプチドは同一の前駆体タンパク質

から産生される (図 1)。N 末側に位置するペプチド X に対応する遺伝子配列を欠損させると結果として C 末側の既知ペプチドも欠損されてしまう恐れがあるが、この前駆体タンパク質の遺伝子構造を解析した結果、理論的にはエクソン 5 とエクソン 6 の両方を欠損させることにより、ペプチド X だけが特異的に欠損されることが判明した。このとおりにノックアウトマウスを作製し、両ペプチドの産生をラジオイムノアッセイにて調べたところ、ノックアウトマウスではペプチド X が産



【図2】野生型およびノックアウトマウスの同一組織から調製した抽出物を逆相HPLCにて分離した後、ラジオイムノアッセイにてペプチドXと既知神経ペプチドを検出した。



【図3】Calcium-mobilization assayによる野生型(A)およびノックアウトマウス(B)で産生される既知神経ペプチドのアゴニスト活性の比較。既知神経ペプチドの受容体を発現している細胞に、それぞれのマウスの同一組織から調製した抽出物を添加し、アゴニストの比活性を比較した。

生されておらず、既知神経ペプチドは野生型マウスと同様に産生されていた (図 2)。また、ノックアウトマウスで産生される既知神経ペプチドの比活性は、野生型マウスと変わらないことを確認した (図 3)。これらの結果は、ノックアウトマウスではペプチド X のみが欠損しており、既知ペプチドは変わらず産生され機能していることを示している。

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 Ida T, Takahashi, T, Tominaga H, Sato T, Kume K, Ozaki M, Hiraguchi T, Maeda T, Shiotani H, Terajima S, Sano H, Mori K, Yoshida M, Miyazato M, Kato J, Murakami N, Kangawa K, Kojima M. Identification of the novel neuropeptides dRYamide-1 and dRYamide-2, ligands for a neuropeptide Y-like receptor in Drosophila. *Biochem Biophys Res Commun*, 査読有, 410, 2011, 872-877, DOI: 10.1016/j.bbrc.2011.06.081
- ② 森健二、森美和、宮里幹也、寒川賢治、ニューロメジン S とその多様な機能、比較内分泌、査読無、第 37 巻、2011、124-133、DOI: 10.5983/nl2008jsce.37.124
- ③ 森健二、児島将康、ニューロメジン U ノックアウトマウス、*The Lipid*、査読無、第 22 巻、2011、4-9
- ④ 森健二、宮里幹也、児島将康、寒川賢治、代謝制御と日内リズムをリンクするニューロメジン U とニューロメジン S、*実験医学増刊“代謝・内分泌ネットワークと医薬応用”*、査読無、第 29 巻、2011、60-66
- ⑤ Sakamoto T, Nakahara K, Maruyama K, Katayama T, Mori K, Miyazato M, Kangawa K, Murakami N. Neuromedin S regulates cardiovascular function through the sympathetic nervous system in mice. *Peptides*, 査読有, 32, 2011, 1020-1026, DOI: 10.1016/j.peptides.2011.02.015
- ⑥ 森健二、寒川賢治、児島将康、ニューロメジン U とニューロメジン S、*生体の科学*、査読無、第 62 巻、2011、51-56
- ⑦ Nakahara K, Katayama T, Maruyama M, Ida T, Mori K, Miyazato M, Kangawa K, Murakami N. Comparison of feeding suppression by the anorexigenic hormones neuromedin U and neuromedin S. *J Endocrinol*, 査読有, 207, 2010, 185-193, DOI: 10.1677/JOE-10-0081

〔学会発表〕（計2件）

- ① 森健二、宮里幹也、中原桂子、村上昇、寒川賢治、摂食調節におけるニューロメジン S とニューロメジン U、第 16 回アディポサイエンス研究会、2011 年 8 月 20 日、大阪（千里）
- ② Mori K, Miyazato M, Kangawa K. Purification of a peptide from rat brain. 5th International Peptide Symposium, December 6, 2010, Kyoto, Japan.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森 健二 (MORI KENJI)

独立行政法人国立循環器病研究センター・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