

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 1 日現在

機関番号：17601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23780297

研究課題名（和文） 新規生理活性ペプチドの発見と応用—モデル生物を利用して—

研究課題名（英文） Discover of novel bioactive peptide and application—using model organism—

研究代表者

井田 隆徳 (IDA TAKANORI)

宮崎大学・IR 推進機構・助教

研究者番号：00381088

研究成果の概要（和文）：リガンドが不明なオーファン受容体に対する新規生理活性ペプチドを発見することは、新たな生理機能の解明や創薬の観点から非常に重要である。私はモデル生物として有用なショウジョウバエにおいて新規生理活性ペプチドを 5 個発見し、ホ乳類への展開さらに、昆虫、甲殻類への応用を試みた。その結果、dRYamide はマウスにおいて摂食、調節や循環器調節作用を有すること、また、クルマエビにおいて潜砂行動を誘発することを発見した。さらに CCHamide は昆虫において食欲を増進する作用を見出した。

研究成果の概要（英文）：It is very important to discover a novel bioactive peptide to the orphan receptor. I have discovered 5 novel bioactive peptides in Drosophila, a useful model organism. I tried application to mammal, insect and crustacean. Therefore, I observed that dRYamide modulate feeding behavior and cardiovascular system in mouse and promote hiding sand behavior. CCHamide stimulate feeding behavior in insect.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学 基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：新規生理活性ペプチド、オーファン GPCR、ショウジョウバエ

1. 研究開始当初の背景

私はこれまでグレリン、ニューロメジン U, S などの生理活性ペプチドについて、ラットへの投与実験やノックアウトマウスを用いた生理機能の解明を行ってきた。その過程で、新しい生理活性ペプチドを発見して、その機能解明を行う研究は、新しい研究分野の開拓につながり、将来大きな展開が期待される研究だと思った。しかしホ乳類では最近、新規生理活性ペプチドは発

見されていない。そこで申請者は視点を変えペプチドの抽出材料としてショウジョウバエを用い、ホ乳類のオーファン受容体（リガンド不明）にホモロジーの高いショウジョウバエ・オーファン受容体のリガンド探索を行うことにした。その結果、5 個のショウジョウバエ新規生理活性ペプチドを発見した。

2. 研究の目的

(1) ショウジョウバエにおいて発見した新規

生理活性ペプチドとその受容体の情報を元に、ホ乳類での新規生理活性ペプチドの発見を目指す。

(2) ショウジョウバエにおいて発見した新規生理活性ペプチドの生理機能をショウジョウバエにおいて解明する。

(3) ショウジョウバエにおいて発見した新規生理活性ペプチドを昆虫、甲殻類へ応用する。

(4) ショウジョウバエにおいて発見した新規生理活性ペプチドをホ乳類に応用する。

3. 研究の方法

(1) ホ乳類新規生理活性ペプチドの探索

① ホ乳類オーファン受容体安定発現細胞株を作成する。

② ホ乳類における様々な臓器をサンプリングし精製する。

③ ②のサンプルを①で作成した細胞を用いてアッセイを行う。

④ 活性が出ればペプチドの単離・同定を行う。

⑤ ホ乳類において新規生理活性ペプチドの生理作用を解明する。

(2) ショウジョウバエ新規生理活性ペプチドの生理機能の解明

① 遺伝子組換えショウジョウバエの解析。

② 各生理条件下での遺伝子の変動解析。

③ 作成した抗体を用いての発現分布解析。

(3) 昆虫、甲殻類への応用

① ショウジョウバエにおいて発見した新規生理活性ペプチドをクロキンバエに投与して生理機能の解明。

② ショウジョウバエにおいて発見した新規生理活性ペプチドのオーソログをクルマエビにて同定する。

③ ②で同定したペプチドをクルマエビに投与して生理機能を解析する。

(4) ショウジョウバエ新規生理活性ペプチドのホ乳類への応用

① ショウジョウバエにおいて発見した新規生理活性ペプチドをマウスやラットに投与して生理機能を解析する。

4. 研究成果

(1) ホ乳類新規生理活性ペプチドの探索

① 50種類のホ乳類オーファン受容体安定発現細胞株を作成した。

② マウス脳、心臓、胎盤、胎児、妊娠子宮、ブタ脊髄、骨髄。ウシ舌、妊娠子宮、胎盤。

ヒト胎盤。などを大量にサンプリングしゲル濾過抽出を行った。

③ ②のサンプルを①で作成した細胞を用いてカルシウムアッセイを随時行っている。

(2) ショウジョウバエ新規生理活性ペプチドの生理機能の解明

① 5種類の新規生理活性ペプチドの遺伝子組換えショウジョウバエを作成した。さらに、発現部位特異的な組換え系も作成し、解析中である。

② 絶食、飽食をはじめとする種々の条件下で遺伝子の変動解析し、dRYamide, CCHamideについては特にエネルギー状態によって遺伝子発現が変動することを見出した。

③ 作成した抗体を用いての発現分布解析し、遺伝情報からだけではわからない神経の投射先などを同定した。また、組換えバエにおいての免疫染色によって、抗体の特異性を確認した。

(3) 昆虫、甲殻類への応用

① ショウジョウバエにおいて発見した新規生理活性ペプチドをクロキンバエに投与したところ、摂食のモチベーション測定に有効である吻伸展反射実験において、CCHamideはモチベーション亢進、dRYamideは抑制した。それぞれの強度はこれまでに知られている物質に比べ非常に強力で、さらに反対の作用を持つ臭い物質の影響をも凌駕していた。

② クルマエビにおいてdRYamide-1, dRYamide-2, CCHamide-2を単離・同定した。

③ ②で同定したペプチドをクルマエビに投与したところ、CCHamide-2は摂食行動を誘発する可能性が、dRYamide-2は抑制する可能性を見出し、現在再現性実験中である。またdRYamide-2については、クルマエビの養殖上、大変重要である潜砂行動を誘発した。

(4) ショウジョウバエ新規生理活性ペプチドのホ乳類への応用

① dRYamideをマウスに投与したところ、摂食よくせこうかが見られ、さらにラットに投与したところ、容量依存的に血圧、心拍数を増加させることを明らかにした。しかし、胃迷走神経の発火頻度も同時に増加していたことから、現在、その作用機序について解明中である。

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6件)

(1) Ida T, Takahashi T, Tominaga H, Sato T,

Sano H, Kume K, Ozaki M, Hiraguchi T, Shiotani H, Terajima S, Nakamura Y, Mori K, Yoshida M, Kato J, Murakami N, Miyazato M, Kangawa K, Kojima M
Isolation of the bioactive peptides CCHamide-1 and CCHamide-2 from *Drosophila* and their putative role in appetite regulation as ligands for G-protein-coupled receptors
Frontiers in Endocrinol in press. 査読有
doi: 10.3389/fendo.2012.00177.

(2) Mori M, Mori K, **Ida T**, Sato T, Kojima M, Miyazato M, Kangawa K
Different distribution of neuromedin S (NMS) and its mRNA in the rat brain: NMS peptide is present not only in the hypothalamus as the mRNA, but also in the brainstem
Frontiers in Endocrinol in press. 査読有
doi: 10.3389/fendo.2012.00152.

(3) Kono T, Hamasuna S, Korenaga H, Iizasa T, Nagamine R, **Ida T**, Sakai M
The role of neuromedin U during inflammatory response in the common carp
Fish Shellfish Immunol, 32:151-160;2012
査読有 doi: 10.1016/j.fsi.2011.11.004.

(4) **Ida T**
Variety of Acyl Modifications in Mammalian Ghrelins
Methods in Enzymology. 514:63-73; 2012
査読無
doi: 10.1016/B978-0-12-381272-8.00004-0.

(5) **Ida T**, Takahashi T, Tominaga H, Sato T, Kume K, Kumiko Yoshizawa-Kumagaye, Hideki Nishio, Kato J, Murakami N, Miyazato M, Kangawa K, Kojima M
Identification of the endogenous cysteine-rich peptide trissin, ligand for an orphan G-protein-coupled receptor in *Drosophila*
Biochem Biophys Res Commun, 査読有
414(1):44-48;2011
doi:10.1016/j.bbrc.2011.09.018

(6) **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 bioactive peptides dRYamide-1 and dRYamide-2, ligands for a neuropeptide Y-like receptor in *Drosophila*
Biochem Biophys Res Commun, 査読有
410(4):872-7;2011
doi:10.1016/j.bbrc.2011.06.081

[学会発表] (計 5 件)

① **井田隆徳**、富永初美、岩元絵里、桑和彦、佐藤貴弘、佐野浩子、平口鉄太郎、尾崎まみこ、宮里幹也、寒川賢治、児島将康
ショウジョウバエ新規生理活性ペプチドの発見と応用
第 37 回日本比較内分泌学会大会
2012 年 11 月 30 日 福井

② 富永初美、岩元絵里、**井田隆徳**、保田昌宏、桑野睦敏、児島将康、宮里幹也、寒川賢治、加藤丈司
家畜グレリンの精製と応用
第 37 回日本比較内分泌学会大会
2012 年 11 月 30 日 福井

③ **井田隆徳**、佐藤貴弘、児島将康
モデル生物を利用した新規生理活性ペプチドの探索
第 151 回日本獣医学会学術集会
2011 年 9 月 20 日 大阪

④ **井田隆徳**
新規生理活性ペプチドの探索-モデル生物を利用して-
第 5 回トランスポーター研究会 九州部会
2011 年 9 月 17 日 宮崎

⑤ **井田隆徳**
ショウジョウバエ新規生理活性ペプチドの発見
第 4 回分子高次機能研究会
2011 年 8 月 28 日 熊本

[図書] (計 1 件)

(1) **井田隆徳**、児島将康、加藤丈司

シーエムシー出版 2012 年
ペプチド医薬の最前線
未知の生理活性ペプチドの探索および機能解
析の研究—モデル生物を利用して— 47-51。

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称：ショウジョウバエ由来生理活性ペプチ
ド d R Y a m i d e

発明者：井田隆徳 児島将康

権利者：宮崎大学 久留米大学

種類：特許権

番号：特願 2012-70356

出願年月日：2012 年 3 月 26 日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.cc.miyazaki-u.ac.jp/a0d203u/
index.html](http://www.cc.miyazaki-u.ac.jp/a0d203u/index.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井田 隆徳 (IDA TAKANORI)

宮崎大学・IR 推進機構・特任助教

研究者番号：00381088

(3) 連携研究者

村上 昇 (MURAKAMI NOBORU)

宮崎大学・農学部・獣医学科・教授

研究者番号：80150192

佐野 浩子 (SANO HIROKO)

お茶の水女子大学・お茶大アカデミック

プロダクション・特任助教

研究者番号：90506908

(4) 研究協力者

富永 初美 (TOMINAGA HATSUMI)

宮崎大学・IR 推進機構・技術職員