

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 23 日現在

機関番号：84404

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591376

研究課題名(和文)ニューロメジンSと新規生理活性ペプチドが担う新しい生体調節機構の解明

研究課題名(英文)Studies on the regulatory mechanisms of physiological phenomena by neuromedin S and newly identified peptide

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・研究所・室長

研究者番号：00416223

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：生理活性ペプチドの発見や機能解析によって、これまで未知であった生体調節機構を明らかにできる。本研究では、神経ペプチドであるニューロメジンS(NMS)のペプチドレベルでの脳内分布を解析することにより、視床下部に存在するNMS産生ニューロンからの神経線維投射が脳幹に到達している可能性を示した。さらに、同部位での受容体の発現も明らかにした。また、既知ペプチド前駆体タンパク質の構造解析から新規生理活性ペプチド候補を見出し、これが生体内で産生されていることを証明した。

研究成果の概要(英文)：The identification and/or functional analysis of bioactive peptide provide novel insight into the regulatory mechanisms of physiological phenomena.

In this study, the regional distribution of a neuropeptide neuromedin S (NMS) in rat brain at the peptide level was determined by the radioimmunoassay. A high content of its peptide was found in the hypothalamus and brainstem, whereas NMS mRNA was abundantly expressed only in the hypothalamus. These data suggest that nerve fibers containing NMS peptide produced by hypothalamic neuron project into the brainstem. On the other hand, a novel bioactive peptide synthesized from a precursor protein of known neuropeptide was identified by in silico screening. A 37-residues novel peptide was isolated from AtT20 cells overexpressing the precursor protein, and was detected immunologically in the extract of rat brain. Intracerebroventricular administration of this peptide to rats induced increase in plasma concentration of specific pituitary hormone.

研究分野：生化学、ペプチド化学

キーワード：生理活性ペプチド 神経ペプチド ニューロメジン

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のに加えて、神経ペプチドとして恒常性の維持に関与するなど、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。このため、新しい生理活性ペプチドの発見とその機能解析によって、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。実際に、研究代表者の所属する研究室では、心房性ナトリウム利尿ペプチドの発見により心臓が血液循環を担うポンプとして機能するだけでなく、内分泌器官として体液量を調節していることを明らかにした。また、グレリンの発見により、その主要な産生部位である胃が摂食とエネルギー代謝の調節に密接に関与していることを示した。

一方、生理活性ペプチドそのものや、スーパーアゴニスト、アンタゴニスト、ペプチド血中濃度を制御するプロテアーゼの阻害剤が治療薬として活用されていることから明らかのように、その探索や機能解析に関する研究は常に臨床応用を見据えて推進されている。その結果として、心房性ナトリウム利尿ペプチドは、血管拡張作用及び利尿作用を有することから、心不全治療薬として既に臨床応用されている。また、グレリンについては、神経性食欲不振症や、慢性閉塞性肺疾患におけるカヘキシアの改善に関して国内外で治験が進められている。

以上のように、生理活性ペプチドの探索や機能解析に関する研究は、内分泌学及び神経内分泌学領域の基礎研究としてだけでなく、臨床応用を目的とした応用研究へと展開できる、非常に有益かつ意義のある研究課題である。

(1)NMS の機能解析に関する研究

研究代表者は、オーファン G タンパク質共役型受容体の内因性リガンドとして、ラットでは 36 アミノ酸残基からなる神経ペプチドであるニューロメジン S (NMS) を発見した(引用文献)。NMS の mRNA は、中枢神経系や脾臓、精巣で発現しており、視床下部で最も強く発現している。視床下部内では視交叉上核で強力な mRNA の発現が認められ、他に弓状核や室傍核、視索上核でも発現が観察される。また、ラットへの NMS の脳室内投与実験により、本ペプチドが概日リズムの調節機能や、摂食抑制機能、抗利尿機能、乳汁分泌促進機能を有することが示されている。これらの機能は全て視床下部に存在する神経核を介して発現していると示唆されるが、NMS 産生ニューロンが構築する脳内神経ネットワークが未だ不明なため、これらの機能を内因性 NMS が担っているかどうか、すなわち本ペプチドの生理的役割は未だ完全には確立できていない。

(2)新規生理活性ペプチドの探索と機能解析

生理活性ペプチドの探索研究の歴史は長く、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を指標とした精製と構造解析により同定されてきたが、大規模 cDNA 配列解析やゲノム構造解析が実施された現在では、これらの情報を活用して幾つもの新規生理活性ペプチドが同定されている。これには代表的な手法が 2 つあり、1 つがグレリンや NMS を同定したオーファン G タンパク質共役型受容体の内因性リガンド探索であり、もう 1 つが配列情報から直接的に新規ペプチド配列を見出す *in silico* スクリーニングである。一般的に生理活性ペプチドは、前駆体タンパク質として合成され、続いてプロセシングプロテアーゼによる塩基性アミノ酸対部位での限定切断を受けて成熟化する。後者の探索法では、前駆体タンパク質に含まれるシグナルペプチド配列や塩基性アミノ酸対を目印として、新規生理活性ペプチド候補を予測する。この手法により、RF アミド関連ペプチドやサリユーションなどが同定されているが、これまでに研究代表者も、既知神経ペプチド前駆体に含まれる新規神経ペプチド候補であるペプチド X (未発表) を同定している(若手研究(B)課題番号 22790892)。

2. 研究の目的

(1)NMS の機能解析に関する研究

ペプチドレベルでの NMS の脳内分布を明らかにすることを目的として、ラジオイムノアッセイによる解析を実施し、本ペプチドの生理機能を考察する。

(2)新規生理活性ペプチドの探索と機能解析

さらなる新規生理活性ペプチドの同定を目的として、既知生理活性ペプチド前駆体の構造分析を実施し、見出された新規ペプチド候補が生体内で産生されていることを証明し、その機能を探る。

3. 研究の方法

(1)NMS の機能解析に関する研究

ラジオイムノアッセイの構築

NMS の組織含有量を測定できるラジオイムノアッセイは、これまでに存在しなかったため、本研究にて新たにラット NMS に特異的な抗体を作製した後にラジオイムノアッセイを構築した。

NMS の脳内分布の解析

ラットの脳を 6 つの領域(大脳皮質、小脳、視床・海馬・線条体、視床下部、中脳、橋・延髄)に分割した後、粗ペプチドを抽出して、ラジオイムノアッセイにより NMS の組織含有量を決定した。また、リアルタイム PCR にて、同様に分割した脳組織での NMS mRNA 発現量も決定した。

受容体の脳内分布の解析

NMS の受容体は 2 種類存在するが、視床下部以外におけるそれらの発現は不明であ

るため、ラット脳の6つの領域における受容体遺伝子の発現量を、リアルタイム PCR にて測定した。

(2)新規生理活性ペプチドの探索と機能解析 新規ペプチド候補の精製と構造解析

見出した新規ペプチド候補に対する特異抗体を作製した後、アフィニティー精製のための抗体カラムを作製した。ラット脳組織から抽出した粗ペプチドは、SP-Sephadex を用いたイオン交換クロマトグラフィーにより強塩基性画分及び弱塩基性画分、未吸着画分に分離した後、強塩基性画分を抗体カラムによるアフィニティー精製に供した。

また、新規ペプチド候補を含む前駆体タンパク質を下垂体由来 AtT20 細胞で安定的に発現させた後、上述の方法により細胞から新規ペプチド候補を精製し構造を解析した。

ラット脳に含まれる新規ペプチドの検出

ラット脳から抽出した粗ペプチドを逆相クロマトグラフィーにて分離した後、ラジオイムノアッセイにより新規ペプチドを検出した。また、同じ条件での逆相クロマトグラフィーにて合成ペプチドを分析し、免疫活性の溶出位置と比較することにより、内因性ペプチドの分子型を推測した。

新規ペプチドの機能解析

化学合成した新規ペプチドをラットの脳室内へ投与した後、各種血中ホルモン濃度の測定を実施した。

4. 研究成果

(1)NMS の機能解析に関する研究

ラジオイムノアッセイの構築

NMS には、C 末端7アミノ酸残基の構造が同一な関連ペプチドであるニューロメジン U (NMU) が存在するので、NMU との交差反応を避けるために、NMS に特異的な N 末端側 20 アミノ酸残基の部分ペプチドを抗原とした。この結果、NMS に特異的な抗体の作製に成功した。この抗体を利用してラジオイムノアッセイの標準曲線を得たところ、中点が 6.2fmol/tube で最低検出感度が 0.25fmol/tube であり、非常に高感度なラジオイムノアッセイを構築することができた。また、ラット脳から抽出した粗ペプチドを逆相クロマトグラフィーにて分離した後、全ての分画をラジオイムノアッセイにて分析した結果、合成 NMS の溶出位置に相当する分画でのみ免疫活性が検出できた。これは、今回構築したラジオイムノアッセイの特異性が非常に優れていることを示している。

NMS の脳内分布の解析

6つの領域に分割したラット脳でのペプチド含有量を測定したところ、視床下部(196.2 ± 15.2fmol/g 湿重量)及び中脳(286.5 ± 26.6)、橋・延髄(208.8 ± 18.7)に NMS が存在

することが明らかになった。しかしながら、NMS mRNA の強い発現は既報と同じく視床下部のみで観察され、中脳や橋・延髄では発現量は低値を示した。

受容体の脳内分布の解析

NMS は、NMU と受容体を共有しており、主に末梢組織で発現している 1 型と中枢神経系で発現している 2 型が存在する。リアルタイム PCR にてラット脳でのそれぞれの発現量を測定したところ、1 型受容体は低レベル(約 0.8copies/ng total RNA)であるが全ての領域で検出された。一方、2 型受容体の強い発現が視床・海馬・線条体(3.72 ± 1.11copies/ng total RNA)及び視床下部(7.27 ± 0.81)、中脳(4.20 ± 0.16)、橋・延髄(4.76 ± 0.40)で検出された。

本研究にて、ラット脳での NMS ペプチドの分布が初めて明らかになった。視床下部では、NMS のペプチド含有量と遺伝子発現量は共に高レベルであったが、脳幹(中脳及び橋・延髄)では遺伝子発現が低レベルであるにも関わらず視床下部と同レベルのペプチド含有量が認められた。これは、視床下部に存在する NMS 産生ニューロンからの神経線維投射が脳幹へ到達している可能性を示唆している。また、視床下部と同様に、脳幹でも 2 型受容体の発現が認められたため、視床下部に由来する NMS ペプチドが脳幹で機能している可能性が考えられた。近年、他のグループとの共同研究にて、NMS が自律神経系を介して循環調節に関与することを示した(引用文献)。脳幹は、循環中枢でもあるため、今後は循環調節における NMS の役割を脳幹に着目して検討すべきだと考えられる。

(2)新規生理活性ペプチドの探索と機能解析

新規ペプチド候補の精製と構造解析

既知生理活性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結果、ある神経ペプチドの前駆体タンパク質にはプロセシングプロテアーゼによる典型的な切断配列が4つ存在し、これらは前駆体構造が明らかになっている全ての動物種で保存されていた。このうち、既知ペプチドの産生に関係のない2つの切断配列に挟まれたアミノ酸配列は、動物種間で他の領域よりも高度に保存されており、この部分が生理活性ペプチド“ペプチド X2”として産生されることが強く示唆された。また、切断部位のアミノ酸配列から、ペプチド X2 は 34 もしくは 37 アミノ酸残基より構成されることが推測された。そこで、このペプチド X2 の精製と構造解析により、ペプチドが生体内で産生されていることの証明を試みた。

予備的なラジオイムノアッセイにて、ラット脳におけるペプチド X2 の組織含有量は約 30fmol/g 湿重量と判明したため、脳組織から

本ペプチドを精製できると判断した。そこで、約 300g のラット脳から粗ペプチドを抽出後に抗体カラムを用いた精製を試みたが、新規ペプチド X2 を精製できなかつた。

次に、既知生理活性ペプチドとペプチド X2 を共に含む前駆体タンパク質を下垂体由来 AtT20 細胞で発現させ、この前駆体タンパク質からペプチド X2 が産生されるか否かを検討した。前駆体タンパク質を安定的に発現させた AtT20 細胞(約 1.1×10^9 個)から粗ペプチドを抽出してペプチド X2 をアフィニティー精製した結果、3 種類の最終精製物が得られた。全てを LC-MS/MS にて構造解析したところ、1 つは 37 アミノ酸残基からなるペプチド X2 であった。また、他の 2 つは 37 アミノ酸残基のペプチド X2 が酸化されたものであり、34 アミノ酸残基からなるペプチド X2 は精製できなかつた。

ラット脳に含まれる新規ペプチドの検出
合成した 34 残基と 37 残基のペプチド X2 を分離できる逆相クロマトグラフィーの条件で、ラット脳から抽出した粗ペプチドを分離した後、ラジオイムノアッセイによりペプチド X2 の免疫活性を測定した結果、37 残基の合成ペプチドの溶出位置と一致して免疫活性が検出された。また、34 残基の合成ペプチドの溶出位置には免疫活性を検出できなかった。これは、ラット脳では 37 アミノ酸残基からなるペプチド X2 が産生されていることを示唆している。

新規ペプチドの機能解析

化学合成したペプチド X2 をラットの脳室内へ投与した後、血中の下垂体ホルモン濃度を測定したところ、特定の下垂体ホルモンの分泌が亢進していた。

本研究では、既知ペプチドの前駆体タンパク質の配列解析によりペプチド X2 を新規生理活性ペプチド候補として見出すことができた。ラット脳からペプチド X2 の精製を試みたが、十分な含有量と想定されたにも関わらず、精製することができなかつた。その原因として、実験器具への吸着とペプチド自身が複雑に酸化されることによりクロマトグラフィーにて分散されることが考えられた。一方、前駆体タンパク質を AtT20 細胞にて発現させると、37 アミノ酸残基からなるペプチド X2 が産生されることを実証できた。また、逆相クロマトグラフィーとラジオイムノアッセイを組み合わせた分析でも、ラット脳でも 37 アミノ酸残基のペプチド X2 として産生されていることが示された。更に、脳室内投与実験にてペプチド X2 は特定の下垂体ホルモンの分泌を促進させる可能性が示された。以上の結果は、ペプチド X2 が生理活性ペプチドとして機能している可能性を強く示唆している。今後は、ペプチド X2 の作用機序を解明するために、受容体の探索が必要であ

ると考えられる。

<引用文献>

Mori K, *et al.* Identification of neuromedin S and its possible role in the circadian oscillator system. *EMBO J*, 24, 2005, 325-335

Sakamoto T, *et al.* Neuromedin S regulates cardiovascular function through the sympathetic nervous system in mice. *Peptides*, 32, 2011, 1020-1026

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 5 件)

Takayama K, Mori K, Sohma Y, Taketa K, Taguchi A, Yakushiji F, Minamino N, Miyazato M, Kangawa K, Hayashi Y. Discovery of potent hexapeptide agonists to human neuromedin U receptor 1 and identification of their serum metabolites. *ACS Med Chem Lett*, 査読有, 6, 2015, 302-307, DOI: 10.1021/ml500494j

Takayama K, Mori K, Taketa K, Taguchi A, Yakushiji F, Minamino N, Miyazato M, Kangawa K, Hayashi Y. Discovery of selective hexapeptide agonists to human neuromedin U receptors types 1 and 2. *J Med Chem*, 査読有, 57, 2014, 6583-6593, DOI: 10.1021/jm500599s

森健二、宮里幹也、寒川賢治、児島将康、視床下部ホルモン 8) ニューロメジン、内分泌・糖尿病・代謝内科、査読無、第 36 巻、2013、127-133

Ida T, Takahashi T, Tominaga H, Sato T, Sano H, Kume K, Ozaki M, Hiraguchi T, Shirotani 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 ligand for G-protein-coupled receptors. *Front Endocrin*, 査読有, 3, 2012, 177, DOI: 10.3389/fendo.2012.00177

*Mori M, *Mori K, Ida T, Sato T, Kojima M, Miyazato M, Kangawa K. Different distribution of neuromedin S and its mRNA in the rat brain: NMS peptide is present not only in the hypothalamus as the mRNA, but also in the brainstem. *Front Endocrin*, 査読有, 3, 2012, 152, (*Equal Contribution)

〔学会発表〕(計5件)

Mori K, Miyazato M, Kangawa K.
Neuromedin S and its possible role in
the central regulation of feeding. The
Conference on Bioactive Peptides for
Cell-Cell Communcation 2014,
September 12, 2014, Kyoto, Japan.

森健二、森美和、村上昇、宮里幹也、寒
川賢治、ニューロメジン S の脳内分布と
循環調節における役割、第 17 回日本心血
管内分泌代謝学会学術総会、2013 年 11
月 23 日、千里ライフサイエンスセンター
(大阪府豊中市)

森美和、森健二、宮里幹也、寒川賢治、
摂食抑制作用を持つニューロメジン S の
ラットにおける脳内分布、日本肥満学会
第 18 回アディポサイエンス・シンポジウ
ム、2013 年 8 月 24 日、千里ライフサイ
エンスセンター(大阪府豊中市)

森健二、森美和、宮里幹也、寒川賢治、
「ニューロメジン S の発見」のその後、
第 31 回内分泌代謝学サマーセミナー、
2013 年 7 月 12 日、ゆふいん山水館(大
分県由布市)

森健二、森美和、宮里幹也、寒川賢治、
ニューロメジン S の機能と脳内分布、第
85 回日本内分泌学会学術総会、2012 年 4
月 21 日、名古屋国際会議場(愛知県名古
屋市)

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・研究所・室長

研究者番号: 00416223

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

花田 礼子 (HANADA, Reiko)

京都大学・医学研究科・准教授

研究者番号: 00343707