

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 20 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25440171

研究課題名(和文) 新しいサンプル抽出法を用いた新規生理活性ペプチドの同定と生理機能解明

研究課題名(英文) Attempt of identification and characterization of novel bioactive peptides using the new extraction method

研究代表者

岩越 栄子 (Iwakoshi, Eiko)

広島大学・総合科学研究科・研究員

研究者番号：50311296

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)：これまで、新規生理活性ペプチドの探索には、組織を熱水処理した後、酸を加える水抽出法が用いられてきた。研究代表者は新規生理活性物質を発見すべく、ジメチルスルホキシド(DMSO)を用いた新たな抽出法を見出し、探索を行った。その結果、新規生理活性ペプチドの発見には至らなかったが、疎水性の高い既知物質が同定できたことから、本抽出法は、疎水性の高い物質の抽出に適していることがわかった。

研究成果の概要(英文)：For the extraction of novel bioactive peptides, ordinary and routine methods using water-extraction combined with acid have been established and employed so far on animal tissues. In the present study, I sought novel bioactive substances in avian and mammalian tissues and tested several organic solvents for the efficient extraction. It was revealed that some bioactive peptides with hydrophobic properties which have been known in the previous studies were identified using dimethyl sulfoxide (DMSO), although I could not find a novel bioactive substance. I found that a novel extraction method using DMSO is suitable for the identification of highly hydrophobic substances.

研究分野：比較生理生化学

キーワード：生理活性ペプチド

1. 研究開始当初の背景

新規生理活性ペプチドの発見における過去の日本人研究者達の突出した研究成果は、言うまでもないが、2001年頃をピークにして、新規物質の報告が激減している。ところが、ヒトゲノムプロジェクト完了後、リガンドが不明な受容体(オーファン受容体)の数は約100程度あるとされていることから、生体内には機能不明の因子として発見が待たれる未同定の生理活性物質が存在すると思われる。そこで、新規の生理活性物質の探索には新しいストラテジーによる方法の確立が必要であると考えた。

最近、研究代表者のグループにおいて、エネルギーホメオスタシスに関与していると推測される遺伝子を発見している。本遺伝子は、広く脊椎動物に保存されており、分泌性小タンパク質をコードしていることがわかっている(NPGLと命名)。生体内に存在するNPGLを同定する実験を行っていたところ、興味深いことを発見した。

これまでの主な生理活性ペプチドの抽出は、数多くの生理活性ペプチドを発見されてきた松尾・寒川らの開発した方法に基づいている。その方法とは、組織を熱水処理することにより内因性のペプチダーゼ阻害を行い、酸性条件下でペプチドを抽出し、以後、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)にて精製していくものである。しかしながら、NPGLは、この定法では抽出できなかった。NPGLはアミノ酸80残基からなる非常に疎水性の高い物質であることから、水に難溶であるが、ジメチルスルホキシド(DMSO)には容易に溶解する。そこで、熱水抽出を行った組織からDMSOにより抽出を行ったところ、ウエスタンブロット法による検出が可能となった。この結果から、NPGLの抽出法と同様の方法を用いれば、疎水性が高く長鎖の新規生理活性ペプチドが同定できるのではないかと考えた。予備実験的に、ニワトリの脳と消化管から生理活性ペプチド画分を抽出し、従来の水抽出法による生理活性ペプチド画分とともに腸管収縮アッセイ法により活性を比較したところ、明らかに両者の活性パターンに明確な違いがみられた。このことから、NPGLの抽出法によりこれまで未同定であった全く新しい生理活性ペプチドが見つかる可能性が高い。

2. 研究の目的

本研究では、NPGLの抽出法を基に考案した新規抽出法を用いて、新規生理活性ペプチドの発見を目指した。出発材料としては、現在研究対象としている鳥類ニワトリヒナと哺乳類ラットの組織を用いた。具体的には、ニワトリヒナの消化管からの抽出においては、十二指腸の収縮を活性指標に精製を行い、探索を行った。一方、哺乳類ラットについては、近年、内分泌器官として注目されている白色脂肪細胞から探索を行った。白色脂肪細胞は、分泌性タンパク質であるアディポサイトカインのほか、アンジオテンシンIIなど様々な物質を分泌していることが示されているが、生理活性物質の探索ターゲットとしての歴史はまだ浅い。そこで、HPLCにて精製した分画を網羅的に質量分析にかけ、得られた情報を基にデータベース検索を行い、分泌シグナルを持つ物質を探索した。

3. 研究の方法

(1) ニワトリヒナ組織からの同定

抽出

ニワトリヒナ500羽から胃と腸を摘出し、それぞれを液体窒素中で粉砕した。粉砕した組織を10分間熱処理し、室温まで温度を下げた後、5%になるよう酢酸を加えた。ホモジナイズし、遠心後、沈殿物をジエチルエーテルにて脱脂し、DMSOを添加した。30分間の転倒混和により、DMSO抽出液を得た。次に、DMSO抽出液に2倍量の0.1%トリクロロ酢酸水を加え、DMSO濃度を下げた後に、Sep-Pack C18カートリッジに附し、アセトニトリル:メタノール=4:1の割合で混合した溶出液にて、50%溶出画分および70%溶出画分を得た。

精製

50%溶出画分および70%溶出画分を逆相クロマトグラフィー、陰イオン交換クロマトグラフィーを用いて精製を行った。各精製段階において、ニワトリヒナ十二指腸の収縮に及ぼす変化を指標とした。構造決定は、高性能ハイブリッド型質量分析システム(Thermo Fisher Scientific製LTQ Orbitrap XL)を用いた。

(2) ラット脂肪細胞からの同定

水抽出

オスのラット (wistar、8 weeks) の精巢上体白色脂肪組織 (内臓脂肪) 2 g をカミソリでミンスした後、20 ml の熱水で 10 間熱処理し、室温まで温度を下げた後、5% になるよう酢酸を加えた。ホモジナイズした後、抽出液を Sep-Pack C18 カートリッジに附し、60% メタノールで溶出し、水抽出 60% 溶出画分を得た。その後、逆相 HPLC に附し、得られたピークを高性能ハイブリッド型質量分析システムを用いて構造解析を行った。

DMSO 抽出

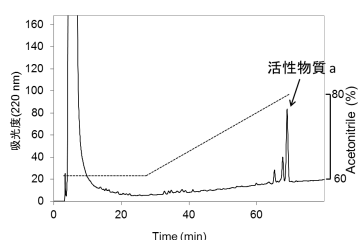
オスのラット (wistar、8 weeks) の精巢上体白色脂肪組織 (内臓脂肪) 2 g をカミソリでミンスした後、10 ml DMSO を加え、ホモジナイズ後、30 分間転倒混和して抽出を行った。抽出液に 4 倍量の 0.1% トリフロロ酢酸水を加え、DMSO 濃度を下げた後に、Sep-Pack C18 カートリッジに附し、アセトニトリル：メタノール = 4:1 の割合で混合した溶出液にて、30% 溶出画分および 70% 溶出画分を得た。それぞれの画分を逆相 HPLC にかき、得られたピークを高性能ハイブリッド型質量分析システムを用いて構造解析を行った。

4. 研究成果

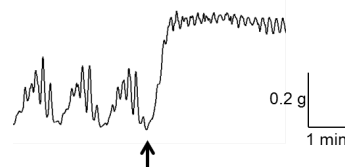
(1) ニワトリヒナ胃からの同定

DMSO 抽出 50% 溶出画分からは、グルカゴン様ペプチド-1 (GLP-1) が同定できたが、新規物質は同定できなかった。

DMSO 抽出 70% 溶出画分からは、ニワトリヒナ十二指腸に対して非常に強い収縮増強作用を示す物質の単離に成功した (活性物質 a)。しかしながら、分子量測定がうまくいかず、トリプシン消化しても活性が失われなかったことから、非ペプチド性の物質である可能性が高いことが考えられた。そこで、NMR にて測定を行ったが、分析に必要な量が得られず、構造決定には至らなかった。



【図 1】ニワトリ胃の 70% 溶出画分から精製した活性物質 a のクロマトグラム



【図 2】活性物質 a (1/20 量) をニワトリヒナ十二指腸に矢印の時点で作用させたところ、強い収縮惹起がみられた。

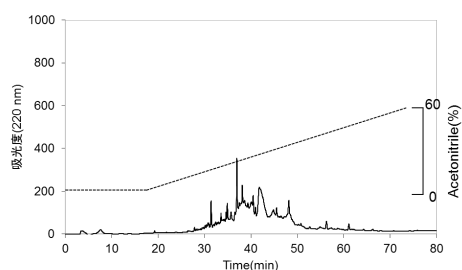
(2) ニワトリヒナ腸からの同定

50% 溶出画分からは、グルカゴン様ペプチド-1 および-2 (GLP-1, GLP-2)、ニューロテンシンが同定できた。その他、HPLC で分画した多くのフラクションに収縮惹起あるいは抑制効果がみられたが、単一物質まで精製ができず、いずれも構造決定には至らなかった。

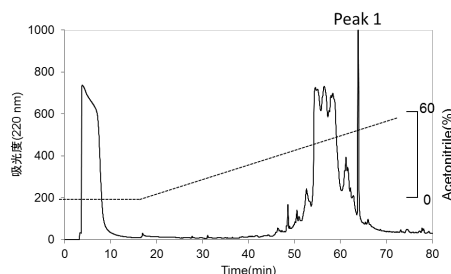
70% 溶出画分を HPLC にて分画したが、精製が進むにつれて活性が消失した。このことから、本画分に含まれるニワトリヒナ十二指腸に作用する物質の多くが、失活しやすい非ペプチド性のものであったと推測される。

(3) ラット脂肪細胞からの同定

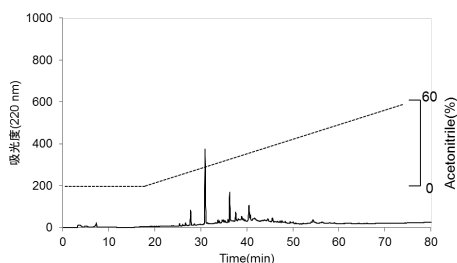
ラット精巢上体白色脂肪組織 2 g から抽出した水抽出 60% 溶出画分、DMSO 抽出 30% 溶出画分、および 70% 溶出画分をそれぞれ、同条件にて HPLC に附したところ、以下の示す通り、全く異なるパターンのクロマトグラムが得られた。



【図 3】水抽出 60% 溶出画分



【図 4】DMSO 抽出 70% 溶出画分



【図5】DMSO抽出30%溶出画分

DMSO抽出70%溶出画分のPeak 1を質量分析にかけたところ、分子量615の非ペプチド性物質であることがわかった。現在、構造解析を進めている。その他のピークについても解析を進めている。

本研究により、新規生理活性ペプチドの発見には至らなかったが、DMSOを用いた新規抽出法は、疎水性の高い物質の抽出に向いていることがわかった。特に、逆相HPLCのクロマトグラムから、脂肪細胞からの抽出に適している可能性が示唆された。しかしながら、非ペプチド性物質も多く含まれるため、純化の手順、構造決定方法に多くの課題が残った。

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8件)

1. Masuda K, Furumitsu M, Ooyama H, Iwakoshi-Ukena E, Ukena K. Synthesis of neurosecretory protein GM composed of 88 amino acid residues by native chemical ligation. *Tetrahedron Lett.* 査読有 57:804-807 (2016)
2. Ukena K, Iwakoshi-Ukena E, Osugi T, Tsutsui K. Identification and localization of gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH) orthologs in the hypothalamus of the red-eared slider turtle, *Trachemys scripta elegans*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 査読有 227:69-76 (2016)
3. Masuda K, Furumitsu M, Taniuchi S, Iwakoshi-Ukena E, Ukena K. Production and characterization of neurosecretory protein GM using

Escherichia coli and Chinese Hamster Ovary cells. *FEBS Open Bio* 査読有 5:844-851 (2015)

4. Masuda K, Iwakoshi-Ukena E, Tachibana T, Ukena K. Effects of neurotensin and LANT-6 on food intake in chicks. *Am. J. Life Sci.* 査読有 3:17-23 (2015)
5. Masuda K, Ooyama H, Shikano K, Kondo K, Furumitsu M, Iwakoshi-Ukena E, Ukena K. Microwave-assisted solid-phase peptide synthesis of neurosecretory protein GL composed of 80 amino acid residues. *J. Pept. Sci.* 査読有 21: 454-460 (2015)
6. Bessho Y, Iwakoshi-Ukena E, Tachibana T, Maejima S, Taniuchi S, Masuda K, Shikano K, Kondo K, Furumitsu M, Ukena K. Characterization of an avian histidine decarboxylase and localization of histaminergic neurons in the chicken brain. *Neurosci. Lett.* 査読有 578:106-110 (2014)
7. Masuda K, Iwakoshi-Ukena E, Bessho Y, Taniuchi S, Maejima S, Shikano K, Kondo K, Furumitsu M, Ukena K. Identification of neurotensin and LANT-6 and localization of mRNA encoding their precursor in the chicken brain. *Zool. Sci.* 査読有 31:353-359 (2014)
8. Ukena K, Iwakoshi-Ukena E, Taniuchi S, Bessho Y, Maejima S, Masuda K, Shikano K, Kondo K, Furumitsu M, Tachibana T. Identification of a cDNA encoding a novel small secretory protein, neurosecretory protein GL, in the chicken hypothalamic infundibulum. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 査読有 446:298-303 (2014)

[その他]

ホームページ等

<http://home.hiroshima-u.ac.jp/ukena/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

岩越 栄子 (EIKO IWAKOSHI)

広島大学・総合科学研究科・研究員
研究者番号：50311296