

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：84404

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461402

研究課題名(和文) 生理活性ペプチド前駆体VGFの機能解明を目的とするペプチドミクス

研究課題名(英文) Peptidomics for studying biological functions of VGF

研究代表者

佐々木 一樹 (Sasaki, Kazuki)

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・室長

研究者番号：80260313

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：VGFは、ある種の内分泌細胞や神経細胞に発現する分泌性タンパク質である。配列内にホルモン類に特徴的なアミノ酸配列が存在するので、生理活性ペプチドの前駆体と想定されてきた。内分泌細胞の分泌顆粒に蓄えられる分泌ペプチドを質量分析で解析し、抗体に依存することなく新しいペプチドを同定する方法を我々はこれまで確立してきた。これらのペプチドは、ゲノム解析やプロテオーム解析では同定できない分子である。本研究でVGFは15セグメント以上にプロセッシングを受け、糖差付加やリン酸化を受けることを明らかにした。また、内因性のインスリン分泌抑制因子として機能することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：VGF represents a neurosecretory protein expressed in a subset of hypothalamic neurons and endocrine cells. It has been considered a precursor to some neuropeptides because of several pairs of basic amino acid residues. This complexity has defied conventional approaches to studying the whole picture of its processing, which would provide a clue to elucidating the biological function. Alternatively we have advocated a mass spectrometry-based peptide profiling method with an aim of inspecting peptides secreted by VGF-expressing endocrine cells. Our study has revealed that the precursor undergoes limited proteolysis to more than 15 processing products, with a diverse set of post-translational modifications. One of the processed peptides proved to be an endogenous suppressor of insulin secretion. Our peptidomics approach would be extended to different proteins without relying on antibodies.

研究分野：内分泌学

キーワード：ペプチド 質量分析 プロセッシング ペプチドミクス

1. 研究開始当初の背景

本研究者は、先行研究で生理活性ペプチドを発見するための新しいアプローチを提唱している。このアプローチでは、ペプチドホルモンのような生理活性ペプチドを分泌顆粒に蓄え、分泌刺激によって内容物を細胞外に放出する内分泌細胞の性質と近年の質量分析技術の発展に着目している。その過程で、ヒト甲状腺髄様癌株の培養上清から新規のC末端アミド化ペプチドを2種類同定することに成功している(Yamaguchi H, Sasaki K, et al. J. Biol. Chem., 2007)。これらのペプチドは、神経細胞・内分泌細胞に発現する分泌性タンパク質 VGF に由来し、ペプチドホルモンのプロセッシングを司る酵素の作用で生成してくると考えられる。機能解析の結果、利尿ホルモンの内因性分泌抑制因子および中枢性の摂食亢進因子であることを明らかにし、Neuroendocrine Regulatory Peptides (NERPs)と命名した。NERPsは、視床下部の特定の神経核および特定のホルモンを産生する末梢の内分泌細胞で発現している。

ペプチドの探索は、脳や内分泌組織を出発材料とすることが一般的であったが、この研究は、培養細胞も新しい生理活性ペプチド探索に有用であり、事前情報に依存しないプロファイリング研究からの探索には有効なことを示している。さらに重要なこととして、従来のゲノムやプロテオームの解析手法では、これらのペプチドは発見できないという点があげられる。

前駆体のVGFは、約600アミノ酸のポリペプチドをコードしており、ペプチドホルモンのプロセッシング酵素が認識するコンセンサス配列を有するが、実際のプロセッシングの実態は明らかではなかった。このような状況で、VGFの機能を明らかにするために、ペプチドミクス手法を用いた研究が有用であると考えるに至った。

2. 研究の目的

生理活性ペプチド前駆体はプロセッシングを受けて機能性ペプチドを生成する。VGFは既存の生理活性ペプチドと比較して分子量が大きく、そのプロセッシングは複雑な制御を受けており、配列だけではプロセッシングの実態は確かめられない。抗体を使う従来の方法には限界がある。本研究者は、ペプチドミクスのアプローチがプロセッシングを明らかにする上で有用であることが明らかにしている。したがって、VGFの生理作用を明らかにするために、ペプチドミクス手法によって翻訳後修飾と部位特異的切断を同定することを研究の目的とする。

3. 研究の方法

脱分極刺激を与えた内分泌系細胞株(甲状腺髄様癌、膵ソマトスタチン産生腫瘍、肺小細胞癌、細胞株)に短時間の脱分極刺激を与えて培養上清を回収した。分子量1万未満のペプチド分画をゲルろ過クロマトグラフィーによって単離の後に、微流速液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析法でペプチド配列を同定した。並行して、各種の翻訳後修飾についての精査を実施した。

4. 研究成果

1) VGF前駆体は、約15のペプチドにプロセッシングされ、そのうち5ペプチドは生理活性ペプチドであることを明らかにした。前駆体の切断部位の大半はプロホルモン変換酵素の認識配列に合致していたが、一部は合致しないことが明らかになった。そのプロセッシング部位は正常組織でも主要な部位として確認された。

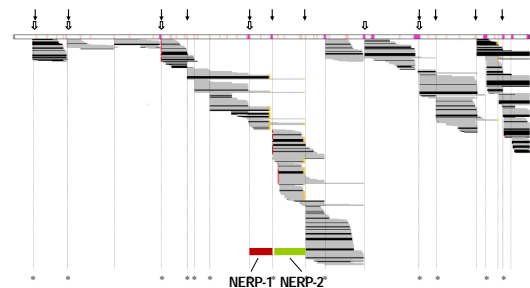


図. 培地中に放出されるペプチドの包括的な質量分析(ペプチドミクス)によりVGFのプロセッシングの概観がうかびあがる。先行研究で明らかにしたNERP-1、-2の位置を図中示す。

2) いくつかのプロセッシング産物については、型糖鎖が付加することが明らかとなった。また、特定のセリン残基がリン酸化を受けることを明らかにした。

3) 宮崎大学との共同研究により、ラット初代培養の膵島およびマウス細胞細胞株において10 nMのNERPsで3日間継続的に処理すると、グルコース誘導性のインスリン分泌が抑制され、インスリン分泌顆粒の数が減少することが明らかになった。細胞でNERPsは産生されており、autocrine的な機構の存在が示唆された。また、糖尿病の膵臓ではNERP-2の発現が亢進する所見も得られた。

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 6 件)

1: Tsuchiya T, Osaki T, Minamino N, Sasaki K. Peptidomics for Studying Limited Proteolysis. *J Proteome Res*. 2015 Nov 6;14(11):4921-31. (査読有)

2: Kim JW, Rhee M, Park JH, Yamaguchi H, Sasaki K, Minamino N, Nakazato M, Song DK, Yoon KH. Chronic effects of neuroendocrine regulatory peptide (NERP-1 and -2) on insulin secretion and gene expression in pancreatic β -cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015 Feb 6;457(2):148-53. (査読有)

3: Toshinai K, Saito T, Yamaguchi H, Sasaki K, Tsuchimochi W, Minamino N, Ueta Y, Nakazato M. Neuroendocrine regulatory peptide-1 and -2 (NERPs) inhibit the excitability of magnocellular neurosecretory cells in the hypothalamus. *Brain Res*. 2014 May 14;1563:52-60. (査読有)

4: Nonaka M, Kim R, Fukushima H, Sasaki K, Suzuki K, Okamura M, Ishii Y, Kawashima T, Kamijo S, Takemoto-Kimura S, Okuno H, Kida S, Bito H. Region-Specific Activation of CRTCL1-CREB Signaling Mediates Long-Term Fear Memory. *Neuron*. 2014 Oct 1;84(1):92-106. (査読有)

5: Tomiyama A, Uekita T, Kamata R, Sasaki K, Takita J, Ohira M, Nakagawara A, Kitanaka C, Mori K, Yamaguchi H, Sakai R. Flotillin-1 regulates oncogenic signaling in neuroblastoma cells by regulating ALK membrane association. *Cancer Res*. 2014 Jul 15;74(14):3790-801. (査読有)

6: Tokizane K, Konishi H, Yasui M, Ogawa T, Sasaki K, Minamino N, Kiyama H. Continuous stress promotes expression of VGF in melanotroph via suppression of dopamine. *Mol Cell Endocrinol*. 2013 Jun 15;372(1-2):49-56. (査読有)

〔学会発表〕(計 2 件)

1: Kazuki Sasaki, Tsukasa Osaki and Naoto Minamino. Utility of Electron Transfer Dissociation Mass Spectrometry in Global Analysis of Naturally Occurring Peptides. Asia Pacific International

Peptide Symposium, Nov 8, 2013.

2: Takashi Tsuchiya, Kazuki Sasaki, Tsukasa Osaki and Naoto Minamino. Peptidomic Survey of Peptides Found in Culture Supernatant of Cardiac Fibroblasts – an Expanded Application to “Common” Cells Having the Constitutive Secretory Pathway. Asia Pacific International Peptide Symposium, Nov 8, 2013.

〔図書〕(計 4 件)

1: Kazuki Sasaki and Naoto Minamino. Peptidomics strategy for discovering endogenous peptides. (Kastin A ed. in Handbook of Biologically Active Peptides 2nd ed.) Academic Press, pp. 1772-9, 2013.

2: Tsukasa Osaki, Kazuki Sasaki and Naoto Minamino. Mass Spectrometry-based Peptidomics for the Discovery of Antimicrobial Peptides. Microbiology Book Series #4 - Volume 2, pp.1145-53. Editor: A. Méndez-Vilas Formatex Research Center December 2013.

3: 佐々木 一樹、山口 秀樹、十枝内 厚次、南野 直人、中里 雅光: Neuroendocrine Regulatory Peptide (NERP)-1 および-2: 質量分析を用いた発見の経緯とペプチドに関する current knowledge 比較内分泌学 Vol. 40 (2014) No. 153, p.120-4

4: 佐々木 一樹: ペプチドミクス 内因性分泌ペプチドの一斉解析から新規生理活性ペプチドの発見へ 医学のあゆみ増刊 251 巻 10 号 2014 年 12 月 6 日 p.1017-21.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:

取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

<http://www.ncvc.go.jp/res/divisions/pharmacology/001/index.html#-a>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐々木 一樹 (Sasaki Kazuki)

国立研究開発法人国立循環器病研究センター
ー・研究所・室長

研究者番号：80260313

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：