

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670288

研究課題名(和文) ゲノムに潜む鎮痛ペプチド・エンドモルフィンは酸化ストレスのRNA編集で誕生する

研究課題名(英文) An analgesic neuropeptide endomorphin may be produced by RNA editing induced by oxidative stress

研究代表者

松島 綾美 (Matsushima, Ayami)

九州大学・理学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：60404050

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)： エンドモルフィンは、アミノ酸4つからなる神経ペプチドである。モルヒネを凌ぐ強力な鎮痛作用があり、痒みとの関連も非常に注目されている。しかし、未だにエンドモルフィン遺伝子は不明のままなのである。近年では、ゲノムから短いペプチドを見出す難しさが認識され、ペプチドを網羅的に質量分析するペプチドーム解析にも注目が集まりつつある。こうしたなか、次世代シーケンサーを用いた網羅的解析とRNA編集を考慮した情報処理技術の両面からの探索を試みた。結果としてエンドモルフィン遺伝子単離には至らなかった。しかし、エンドモルフィン様ペプチド遺伝子を見出し、これに基づいた合成ペプチドはオピオイド受容体と弱く結合した。

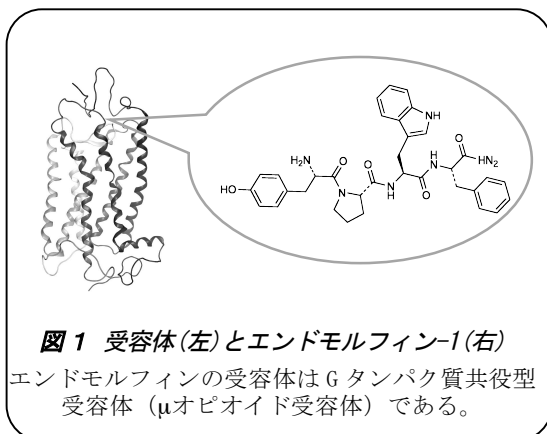
研究成果の概要(英文)： Endomorphin-1 and -2 are neuropeptides consisting of only 4 amino acid residues. Various biological functions of these peptides are known, for instance analgesic activity that is stronger than that of morphine and a relation with itching. However, to date a precursor protein of these peptides has never been uncovered. Many scientists today consider that the limited information from short peptide sequence makes it difficult to find peptide genes by in silico genomic searches. In the present study, we intended to perform RNA-seq determinations combined with an in silico genomic search for the peptide precursor protein. We succeeded in finding an endomorphin-like peptide, although this was not exactly the same as endomorphins. The synthetic peptide corresponding to the endomorphin-like amino acid sequence has a weak binding affinity for opioid receptors.

研究分野：生物化学

キーワード：遺伝子 ゲノム 生体分子 脳・神経 生理活性 ペプチド 疼痛 鎮痛

1. 研究開始当初の背景

エンドモルフィンとは、わずかアミノ酸4つからなる神経ペプチドである[図1]。YPWF-NH₂ (アミノ酸1文字表記)のアミノ酸配列を持つエンドモルフィン-1と、3番目のアミノ酸が異なる YPFF-NH₂ のエンドモルフィン-2が知られている。これら両方とも1997年に仔ウシ脳から単離され、その後ヒトでも存在が確認された^[1,2]。しかも、モルヒネを凌ぐ強力な鎮痛作用を発揮する。最近では、アトピー患者を苦しめる痒(かゆ)みとの関連も非常に注目されている。2003年のヒトゲノムプロジェクトの終結により、エンドモルフィン前駆体遺伝子の発見も時間の問題と思われた。しかし、意外なことに、未だにエンドモルフィン遺伝子は不明のままなのである。エンドモルフィンは短い。そのため、ゲノム解析のための情報が限定される。このようなゲノムから神経ペプチドを見出す難しさが認識され、近年では組織中のペプチドを網羅的に質量分析で解析するペプチドーム解析などにも注目が集まりつつある。



[1] Zadina J.E. *et al.*, *Nature*, **386**, 499-502 (1997). [2] Hackler L. *et al.*, *Peptides*, **18**, 1635-1639 (1997).

2. 研究の目的

本申請研究の目的は、未だに見つかっていないエンドモルフィン遺伝子を見出すことである。エンドモルフィンのようなペプチドは前駆体として転写翻訳される[図2]。そしてそのタンパク質ハ酵素処理により短い活性型のペプチドへと切断されることにより生じる。申請者は最近、エンドモルフィン類似の前駆体遺伝子の存在に気がついた。これより「ゲノム中に遺伝子が見つからないのは、酸化ストレスなど特殊条件の下で、mRNAが転写後の修飾、すなわちRNA編集を受けてエンドモルフィン遺伝子が完成するからだ」と思い至った。そこでこの証明に挑戦する。さらに、神経ペプチド遺伝子の特徴として未同定の神経ペプチドも同時にコードされる可能性が非常に高く、本研究の新規鎮痛薬および

抗痒薬開発に対する影響は計り知れない。

3. 研究の方法

本研究では、アミノ酸配列が分かっているにも関わらず、今なお不明のままのエンドモルフィン前駆体遺伝子の探索に挑戦する。前駆体が見つからないのは、エンドモルフィンは特殊条件下でRNA編集を受け発現するからだと考えた。そこで、次世代シーケンサーを用いた最新の網羅的塩基配列解析実験とRNA編集を考慮した情報処理技術によるゲノム解析の両面から探索を実施した。これらの結果を双方でフィードバックすることにより、エンドモルフィン前駆体遺伝子を見出し、さらに、これらを通じて、短いペプチド遺伝子を的確に予測する、新規プログラムの開発を期待した。本研究の遂行にあたり、行った実験研究方法は次の通りである。

(1) マウス脳からの mRNA 抽出

マウス脳を顕微鏡下で解剖し、脳を液体窒素で凍結した。凍結した脳試料は、-80°Cで保存した。こうして得られた脳試料を用いて、mRNAを抽出した。RNA抽出には、promega社 SV Total RNA Isolation Systemを用いた。実験はプロトコールに従い行った。

(2) データベース検索

データベース検索は、ヒトESTデータベースについて、エンドモルフィンペプチドと期待される全てのペプチド(KYPFFG、KYPWFG、RYPFFG、RYPWFG、RYPFFG、RYPWFG)に相当する全ての塩基配列(AARUAYCCNUYUUYGG、AARUAYCCNUGGUUYGG、AGRUAYCCNUYUUYGG、AGRUAYCCNUGGUUYGG、CGNUAYCCNUYUUYGG、CGNUAYCCNUGGUUYGG)について検索することにより実施した。

(3) cDNA クローニング

得られたRNAは、ゲノム支援による次世代シーケンサーによる網羅的解析に用いた。エンドモルフィン前駆体遺伝子のcDNAクローニングには、ヒトデータベース検索による結果であったため、Invitrogen社より購入したhuman kidney cDNAs, human adult brain cDNA library, and human embryo brain cDNA libraryの3種を用いた。これを鋳型として、データベース検索により得られた断片の塩基配列を元にPCRを行った。さらに、これにより得られたcDNA配列の全長を明らかにするためRACE法を実施した。

(4) ペプチド合成

cDNAクローニングにより明らかになったペプチドを合成した。化学合成には、手動

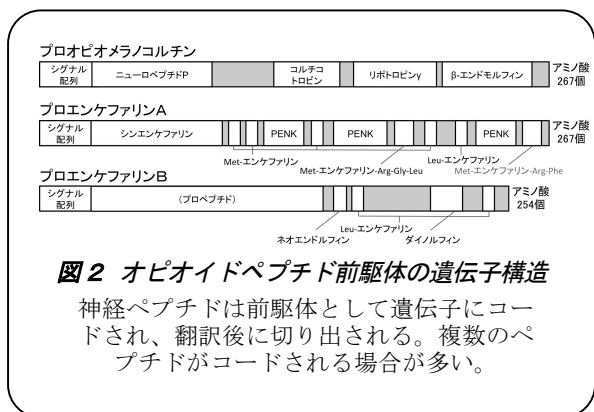
Fmoc 固相ペプチド合成法を用い、樹脂に結合したペプチドのアミノ基を HBTU/HOBt で活性エステルとし、Fmoc 基でアミノ末端を保護した Fmoc アミノ酸をカップリングさせることでペプチド鎖の伸長を行った。合成したペプチドの樹脂から切断には、常法に従い Reagent K を用いた。

(5) 飽和結合試験

合成ペプチドのオピオイド受容体に対する結合活性を確認するため、細胞で発現した μ オピオイド受容体を用いた。[^3H]DAMGO を用いた飽和結合試験を実施した。アラニンスキャン点変異受容体と各濃度の放射標識された [^3H]DAMGO を binding buffer 中で混合し、25°C で 1.5 時間インキュベートした。非特異的な結合は過剰量のエンドモルフィンを [^3H]DAMGO と併に加えることにより調べた。その後、遊離の [^3H]DAMGO はセルハースターを用いてグラスフィルターに受容体を結合させることにより取り除いた。

(6) 競合結合試験

合成したペプチドリガンドの [^3H]DAMGO の受容体結合を阻害する能力で合成ペプチドリガンドの受容体への結合性を評価した。まず、合成ペプチドリガンドを [^3H]DAMGO と共に binding buffer 中で混合し、インキュベートした。その後、遊離の [^3H]DAMGO セルハースターを用いてグラスフィルターに受容体を結合させることにより取り除いた。化学物質の IC_{50} 値 ([^3H]DAMGO の受容体結合を 50% 阻害する値) はプログラム Prism により算定した。



4. 研究成果

(1) 次世代シーケンサーを用いた最新の網羅的塩基配列解析実験

エンドモルフィンが高発現している脳中枢神経系の RNA を網羅的に解読する RNA シークエン্স解析 (RNA-seq) した。そのために「ゲ

ノム支援」の「大規模ゲノム情報生産及び研究リソース構築支援活動」に応募した。これは、文部科学省科学研究費新学術領域研究 (研究領域提案型) 『生命科学系3分野支援活動』が終了後、科学技術学術審議会で継続した活動が認められている研究支援活動で、平成 26 年度の公募は 4 月に行われた。なお、この応募には科研費の採択決定が条件になっている。応募の結果、無事に採択された。なお、RNA のソースとしては、実際にペプチドが単離されたウシを福岡県食肉センターから購入することも検討した。しかし BSE による影響で脳の焼却処理が義務づけられており難しい。そこで、手に入れやすく、既存データベースとの比較が容易なマウスを用いた。脳の部位としては、生まれただけの新生仔の脳を用いた。これまで、脳の各部位でのエンドモルフィンの免疫応答が報告されている。しかし、いずれからもマウスでは現時点では遺伝子およびペプチドの単離が報告されていないため、脳の全部位を用いることとした。こうした実験は、次世代シーケンサーによる網羅的シーケンシングにより可能であった。

(2) 塩基配列解析結果のゲノム上へのマッピング

上記 (2) の解析結果をゲノム配列上にマッピングし、シーケンシング結果との一致、不一致を詳細に解析した。なお、この解析も「ゲノム支援」による「大規模ゲノム情報生産及び研究リソース構築支援活動」で実施した。多数の遺伝子の RNA があつたが、目的とするエンドモルフィンに 100% 一致する配列は検出されなかった。

(3) 既存データベースからのエンドモルフィン遺伝子探索

既存のヒト EST データベースより、エンドモルフィン前駆体遺伝子の探索を行った。検索した塩基配列は、研究方法で述べた通り全ての可能性を網羅した。当然ながら多数の配列がヒットした。それらを詳細に解析し、ペプチド前駆体遺伝子として転写されている可能性がある遺伝子、すなわち、塩基性アミノ酸領域とアミド化配列を複数持つと配列が見つかった。この配列にはシグナル配列様の翻訳領域もあり、発現している可能性が高いと考えられた。

(4) RT-PCR および RACE 法によるエンドモルフィン前駆体遺伝子の cDNA クローニング

上述の (3) で見つかった配列の塩基配列断片および全長塩基配列を取得するため PCR と RACE 法を行った。まず、得られた配列を元にプライマーを設定し、断片配列を取得した。その結果、データベース解析で得られた配列

そのものではなく、類似の配列が複数取得された。しかし、エンドモルフィンそのものの配列を持つ配列は無く、データベース検索で見つかったエンドモルフィン塩基配列と一塩基異なる配列が取得された。その結果、アミノ酸配列がエンドモルフィンと一アミノ酸異なることが判明した。しかし、得られた配列にはシグナル配列が存在し、生体内でペプチド遺伝子前駆体として分泌されている可能性が非常に高いと考えられた。そこで、このペプチド配列を化学合成し、オピオイド受容体に対する結合試験を実施した。

(5) 合成ペプチドのオピオイド受容体に対する放射リガンド競合結合試験

ペプチド合成は、Fmoc 手動固相合成で実施した。ペプチドを HPLC で精製し、結合試験に用いた。その結果、 μ オピオイド受容体に結合するものの、その結合能は非常に弱いことが判明した。しかし、このペプチドが生体内で発現している可能性は高いと考えられ、今後の検討が必要であると考えられた。

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 7 件)

- (1) Matsushima, A., Nishimura, H., Matsuyama, Y., Liu, X., Tommaso Costa, T., and Shimohigashi, Y.: Specific affinity-labeling of the nociceptin ORL1 receptor using a thiol-activated Cys(Npys)-containing peptide ligands. *Biopolymers Peptide Science*, in press, DOI:10.1002/bip.22792.
- (2) Motomatsu, Y., Nishimura, H., Matsuyama, Y., Liu, X., Matsushima, A., and Shimohigashi, Y.: ORL1 Nociceptin receptor response of opioid peptides derived from proenkephalin precursor protein. *Peptide Science* 2015, 181-182 (2016).
- (3) Takesue, Y., Nishimura, H., Liu, X., Matsushima, A., and Shimohigashi, Y.: Functional role of the Phe-Phe stacking microswitch in the ORL1 nociceptin receptor activation. *Peptide Science* 2015, 147-148 (2016).
- (4) Takesue, Y., Nishimura, H., Liu, X., Matsushima, A., and Shimohigashi, Y.: GPCR functional role of Phe-269 and Phe-221 in the molecular switching of ORL1 nociceptin receptor activation. *Peptide Science* 2014, 203-204 (2015).
- (5) Motomatsu, Y., Nishimura, H., Matsumoto, Y., Kuramitsu, Y., Inamine, S., Matsushima, A., and Shimohigashi, Y.: Receptor selectivity and specificity of a series of opioid peptides latent in the proenkephalin

precursor protein. *Peptide Science* 2014, 205-206 (2015).

- (6) Nishimura, H., Li, J., Isozaki, K., Takesue, Y., Liu, X., Shimohigashi, M., Inamine, S., Matsushima, A., and Shimohigashi, Y.: The molecular switching of ORL1 nociceptin receptor in activation/inactivation. *Peptide Science* 2014, 201-202 (2015).
- (7) Matsushima, A., Koyanagi, O.K., Nishimura, H., Inamine, S., Motomatsu, Y., and Shimohigashi, Y.: An *in silico* genomic search of endomorphin-like opioid peptides. *Peptide Science* 2014, 281-282 (2015).

[学会発表] (計 16 件)

- (1) 松山祐昂、西村裕一、劉 曉輝、松島綾美、下東康幸 : Comparative analyses of the ligand binding domain secondary structures of human nuclear receptors、第 52 回ペプチド討論会、平成 27 年 (2015 年) 11 月 16-18 日、平塚市中央公民館 (平塚市)。
- (2) 松島綾美、西村裕一、劉 曉輝、武末祐貴、松山祐昂、下東康幸 : Comprehensive structural analysis of the nociceptin ORL1 receptor by means of virtual and experimental Ala-scanning combined methods、第 52 回ペプチド討論会、平成 27 年 (2015 年) 11 月 16-18 日、平塚市中央公民館 (平塚市)。
- (3) 武末祐貴、西村裕一、劉 曉輝、松島綾美、下東康幸 : Functional Role of the Phe-Phe Stacking Microswitch in the ORL1 nociceptin receptor activation、第 52 回ペプチド討論会、平成 27 年 (2015 年) 11 月 16-18 日、平塚市中央公民館 (平塚市)。
- (4) 元松 雄大、西村 裕一、松本 結香、蔵満 由美、稲嶺 翔吾、劉 曉輝、松島 綾美、下東 康幸 : プロエンケファリン前駆体からプロセッシングされる全オピオイドペプチドの受容体サブタイプ特異性、BMB2015 (第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会 合同大会)、平成 27 年 (2015 年) 12 月 1-4 日、神戸ポートアイランド (神戸市)。
- (5) 武末祐貴、西村裕一、劉 曉輝、松島綾美、下東康幸 : ORL1 疼痛受容体活性化における新規な分子スイッチ、BMB2015 (第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会 合同大会)、平成 27 年 (2015 年) 12 月 1-4 日、神戸ポートアイランド (神戸市)。
- (6) 武末祐貴、西村裕一、劉 曉輝、松島綾美、下東康幸 : 痛み増強受容体 ORL1 の Phe269 は受容体活性化における新規な分子スイッチ、平成 27 年度日本生化学会九州支部例会、平成 27 年 (2015 年) 5 月 16-17 日、九州大学箱崎キャンパス (福岡市)。
- (7) 西村裕一、下東美樹、劉 曉輝、松島綾美、

- 松山祐昂、中川裕之、Tommaso Costa、下東康幸：先天的遺伝病、細胞膜受容体コンホメーション病：ミスフォールドした受容体タンパク質は小胞体膜にトラップ、貯留される，「統合分析、生物化学研究特区」公開講演会 ― メンブレンサイエンス研究の新潮流 ―，平成 27 年（2015 年）3 月 20 日，九州大学理学部化学第一講義室（福岡市）。
- (8) 元松雄大、西村裕一、松本結香、蔵満由美、稲嶺翔吾、劉 曉輝、松島綾美、下東康幸，プロエンケファリン前駆体タンパク質から産生されるオピオイドペプチドのオピオイド受容体サブタイプ選択性と活性化能，リスクサイエンス研究フォーラム 2014，平成 27 年（2015 年）3 月 9 日，福岡大学セミナーハウス（福岡市）。
- (9) 武末祐貴、西村裕一、劉 曉輝、松島綾美、下東康幸：GPCR ORL1、ノシセプチン受容体活性化の新規な分子スイッチ 269 位 Phe および 221 位 Phe の機能的役割，リスクサイエンス研究フォーラム 2014，平成 27 年（2015 年）3 月 9 日，福岡大学セミナーハウス（福岡市）。
- (10) 下東美樹、劉 曉輝、松島綾美、松山祐昂、中川裕之、西村裕一、下東康幸：アミノ酸一残基変異でミスフォールドしたノシセプチン ORL1 受容体は小胞体膜にトラップされる，リスクサイエンス研究フォーラム 2014，平成 27 年（2015 年）3 月 9 日，福岡大学セミナーハウス（福岡市）。
- (11) 元松雄大、西村裕一、松本結香、蔵満由美、稲嶺翔吾、松島綾美、下東康幸：Specific Role of Phe Residues in Opioid Peptide Met-enkephalin- Arg-Phe in Binding to All Three Opioid Receptors，第 51 回ペプチド討論会、平成 26 年（2014 年）10 月 22-24 日、徳島大学蔵本キャンパス 大塚講堂（徳島市）。
- (12) 武末祐貴、西村裕一、劉曉輝、松島綾美、下東康幸：GPCR functional role of Phe-269 and Phe-221 in the molecular switching of ORL1 nociceptin receptor activation，第 51 回ペプチド討論会、平成 26 年（2014 年）10 月 22-24 日、徳島大学蔵本キャンパス 大塚講堂（徳島市）。
- (13) 松島綾美、小柳香奈子、西村裕一、稲嶺翔吾、元松雄大、下東康幸：An in silico genomic serch of endomorphin-like opioid peptides，第 51 回ペプチド討論会、平成 26 年（2014 年）10 月 22-24 日、徳島大学蔵本キャンパス 大塚講堂（徳島市）。
- (14) 元松雄大、西村裕一、松本結香、稲嶺翔吾、蔵満由美、松島綾美、下東康幸：鎮痛ペプチド、Met-enkephalin-Arg-Phe のオピオイド受容体結合における 4 位および 7 位 Phe 残基の異なる相互作用性。平成 26 年度日本生化学会九州支部例会，平成 26 年（2014 年）5 月 17, 18 日，九州大学コラボレーション I（福岡市）。
- (15) 武末祐貴、西村裕一、劉 曉輝、松島綾美、下東康幸：ORL1、ノシセプチン受容体活性化における 221 位および 269 位 Phe の構造要因、第 51 回化学関連支部合同九州大会、平成 26 年（2014 年）6 月 28 日、北九州国際会議場（北九州市）
- (16) 元松雄大、西村裕一、松本結香、稲嶺翔吾、蔵満由美、松島綾美、下東康幸：Met-enkephalin-Arg-Phe の 4 位および 7 位 Phe-フェニル基の異なるオピオイド受容体相互作用性、第 51 回化学関連支部合同九州大会、平成 26 年（2014 年）6 月 28 日、北九州国際会議場（北九州市）。

〔図書〕（計 0 件）
該当なし

〔産業財産権〕（計 0 件）
該当なし

〔その他〕
ホームページ等

所属研究室のホームページで研究成果を公表している。
<http://lsfb.scc.kyushu-u.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松島 綾美 (MATSUSHIMA, AYAMI)
九州大学・大学院理学研究院・准教授
研究者番号：60404050

(2) 研究分担者

小柳 香奈子 (KOYANAGI, KANAKO)
北海道大学・情報科学研究科・准教授
研究者番号：20362840

(3) 連携研究者

該当なし