

機関番号：84404

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790901

研究課題名 (和文) 新規受容体の同定によるデスアシルグレリンの

作用機序及び生理的意義の解明

研究課題名 (英文) Research for physiological role of desacyl ghrelin by functional analysis of its receptor endogenously expressed in cultured cells

研究代表者

森 美和 (MORI MIWA)

独立行政法人国立循環器病研究センター・生化学部・流動研究員

研究者番号：50363148

研究成果の概要 (和文)：デスアシルグレリンは、摂食亢進ホルモンであるグレリンのアシル化修飾の無い分子型であり、げっ歯類への脳室内投与によりグレリン受容体非依存的に摂食を亢進する。しかしながら、受容体が同定されていないため、デスアシルグレリンの生理的役割は未だ確立されていない。そこで、本研究では受容体を発現している培養細胞を検索し、ラット心臓由来細胞 H9c2 とマウス筋芽細胞 C2C12 においてデスアシルグレリンは cAMP 産生を誘導することを見出した。

研究成果の概要 (英文)：The orexigenic hormone ghrelin has two major molecular forms: acylated ghrelin and desacyl ghrelin. Intracerebroventricularly administered desacyl ghrelin induces food intake in rodent by a mechanism independent of receptor for acylated ghrelin. However, desacyl ghrelin receptor is not yet identified. In this study, the cell lines endogenously expressing receptor for desacyl ghrelin were investigated. Desacyl ghrelin induced cAMP production in H9c2 and C2C12 cells in dose-dependent manner, suggesting that desacyl ghrelin receptor may be expressed in these cell lines.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：生化学、ペプチド化学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内分泌学

キーワード：グレリン、デスアシルグレリン、受容体、内分泌

1. 研究開始当初の背景

グレリンは、オーファンGタンパク質共役型受容体 (GPCR) であった成長ホルモン分泌促進因子受容体の内因性リガンドとして、研究代表者の所属する研究室によって胃から発見されたペプチドホルモンであり (Kojima *et al.*, Nature, 1999)、成長ホルモン分泌促進作用に加えて摂食亢進作用を有する。特に、グレリンは、末梢からの空腹シグナルを

中枢へ伝達する唯一のホルモンであり、その作用は摂食抑制ホルモンのレプチンと拮抗する。ヒト・グレリンは、28アミノ酸残基からなるペプチドであり、3番目のセリン残基の側鎖が脂肪酸であるオクタン酸によってアシル化修飾された、特徴的な構造を有する。このアシル化修飾は、哺乳類から魚類などの下等生物にいたるまで保存されており、グレリンの生理作用の発現、すなわち受容体であ

る成長ホルモン分泌促進因子受容体の活性化に必須である。

一方、アシル化修飾を受けていないグレリンの分子型であるデスアシルグレリン (desacyl ghrelin: アシル化の無いグレリンという意味) が、胃組織や血中にかなりの量で存在している。例えば、血中では総グレリンのうち、2~20%がグレリンとして、残りがデスアシルグレリンとして存在している。グレリンの発見当初、デスアシルグレリンは下垂体からの成長ホルモン分泌を促進しないこと、グレリンの受容体である成長ホルモン分泌促進因子受容体を活性化しないことから、グレリンの不活性型と考えられていたため、その役割は長らく不明であった。

研究代表者の所属する研究グループと共同研究者らは、グレリンの摂食亢進作用をラットへの脳室内投与によって証明した (Nakazato *et al.*, Nature, 2001)。そこで、同様にデスアシルグレリンを中枢投与したところ、有意な摂食亢進作用が観察された (Toshinai *et al.*, Endocrinology, 2006)。この摂食亢進作用に加えて、現在では、デスアシルグレリンによる心筋細胞のアポトーシス抑制作用、前立腺癌細胞の増殖抑制作用、脂肪細胞からのグリセロール放出抑制作用など、幾つかの作用が報告されている。

2. 研究の目的

これまでの研究によりデスアシルグレリンの興味深い機能が示されているが、生理的意義は未だ確立されていない。デスアシルグレリンの生理的意義を確立するためには、生理作用に加えて作用機序の解明が極めて重要であり、それには受容体の同定が必要不可欠である。

グレリンは、視床下部の弓状核に存在するニューロペプチドY神経細胞を介して摂食活動を亢進するが、デスアシルグレリンの中枢投与ではそれらの神経細胞は活性化されず、摂食亢進ペプチド・オレキシンを産生する外側野の神経細胞が活性化される。また、抗ニューロペプチドY抗体を前処置したラットにデスアシルグレリンを中枢投与すると、摂食亢進作用は観察されたが、抗オレキシン抗体での前処置によりその作用は消失した。更に、グレリン受容体である成長ホルモン分泌促進因子受容体のノックアウトマウスへの中枢投与実験では、グレリンによる摂食亢進は認められないが、デスアシルグレリンの投与では摂食活動が亢進した。これらの結果は、デスアシルグレリンがグレリンと異なる経路で作用しており、グレリン受容体とは異なる未知の受容体を介して生理作用を発揮していることを強く示唆している。

そこで、本研究ではデスアシルグレリンの生理的意義を確立する一環として、デスアシ

ルグレリンの受容体を探索した。

3. 研究の方法

(1) 内在性デスアシルグレリン受容体発現細胞の探索

これまで、デスアシルグレリンは心筋細胞に作用してアポトーシスを抑制することが報告されている。そこで、ラット心臓由来細胞 H9c2、マウス筋芽細胞 C2C12 を用いる。また、インスリノーマからのインスリン分泌亢進活性も報告されていることから、MIN6 と HIT-T15 も用いる。これらの細胞株において、デスアシルグレリンによってどのような細胞内シグナル伝達系が作動しているかを検討することにより、考えられる受容体のタイプを推測する。特に、これまでの報告により、デスアシルグレリン受容体が GPCR である可能性が強く示唆されているため、セカンドメッセンジャーである細胞内 Ca^{2+} や cAMP の変動を詳細に解析する。

(2) オープン GPCR とのマッチングによるデスアシルグレリン受容体の探索

多くの生理活性ペプチドは、GPCR を介して情報を伝達する。GPCR は基本構造である 7 回膜貫通領域を有するため、遺伝子配列情報よりその存在を容易に推測することができ、ヒトゲノム解析によって約 600 種類の GPCR が存在することが示された。そのうち約 200 種類は機能未知、すなわちリガンドの不明なオープン GPCR であり、生理活性ペプチドがリガンドであると推測されるものも多数存在する。そこで、オープン GPCR の中からデスアシルグレリン受容体を探索する。

4. 研究成果

(1) 主な研究成果

① 内在性デスアシルグレリン受容体発現細胞の探索

今回、デスアシルグレリン受容体を発現している可能性の高い 4 種類の培養細胞株を実験に用いた。これらの細胞株にデスアシルグレリンを反応させ、細胞内シグナル情報伝達系を観察することにより内在的に受容体を発現している細胞の探索を試みた。

はじめに、デスアシルグレリンによりどのような細胞内シグナル伝達系が作動しているかをリガンド添加前後の細胞形態変化を測定し、受容体応答やシグナル伝達を解析する CellKey システム (モレキュラーデバイス社) を用いて検討した。このシステムは多検体処理が可能で、一度のアッセイで GPCR やチロシンキナーゼ型受容体など様々な受容体の活性化を同時に測定することができ、尚且つ活性検出パターンによりシグナル伝達経路の推測が可能である。このシステムでのデスアシルグレリン受容体発現細胞の探索

を試みたところ、微弱な反応を示す細胞株もあったが、再現性が乏しいため受容体発現細胞の同定には至らなかった。

これまでの報告により、デスアシルグレリン受容体が GPCR である可能性が強く示唆されているため、次はデスアシルグレリンを反応させたときに、GPCR の主要なセカンドメッセンジャーである細胞内 Ca^{2+} や cAMP の変動をそれぞれ FLIPR システム (モレキュラーデバイス社) とアルファースクリーン (パーキンエルマー社) にて測定した。FLIPR システムを用いた細胞内 Ca^{2+} 濃度変動の測定では、いずれの細胞株でもデスアシルグレリンへの応答は観察されなかった。次に細胞内 cAMP の変動を観察したところ、H9c2 細胞と C2C12 細胞でデスアシルグレリンに依存した cAMP の産生が観察された。これらは、H9c2 細胞と C2C12 細胞でデスアシルグレリン受容体細胞が発現しており、Gs に共役した GPCR である可能性を示唆している。同様の実験を Gs に共役している GPCR を受容体とする PACAP を用いて試みたところデスアシルグレリンと同じく PACAP に依存して cAMP の産生が誘導された。しかし、その cAMP 産生能力はデスアシルグレリンよりも 5 倍程度強いものであった。デスアシルグレリンによる cAMP 産生が PACAP に比して何故弱いかは今後の詳細なメカニズムの検討が必要である。

② オーフアン GPCR とのマッチングによるデスアシルグレリン受容体の探索

グレリン受容体である成長ホルモン分泌促進因子受容体は GPCR である。また、グレリン (デスアシルグレリンと同じ) のアミノ酸配列と部分的に相同性を有する生理活性ペプチド“モチリン”の受容体 GPR38 も GPCR であり、これら 2 つの受容体は最も高い相同性を有している。このことから、デスアシルグレリンの受容体は GPCR である可能性が高く、しかも成長ホルモン分泌促進因子受容体や GPR38 と一次構造の相同性が高いと推測される。現在、成長ホルモン分泌促進因子受容体および GPR38 と相同性の高いオーファン GPCR として、GPR39 と他 3 種存在する。そこで、これらのオーファン GPCR を HEK293 細胞と CHO 細胞で恒常的に発現させ、デスアシルグレリンとの反応性を検討した。細胞内 Ca^{2+} と cAMP の変動を観察したが、いずれのシグナル系でもデスアシルグレリンへの応答は観察できなかった。

カルシトニン遺伝子関連ペプチドやアドレノメデュリンの受容体の本体である CRLR も GPCR であるが、CRLR 単独では受容体として機能せず、RAMP というアクセサリタンパク質と会合することにより受容体としての機能を獲得する (McLatchie *et al.*, Nature, 1998)。この例のように、デスアシルグレリ

ン受容体も本体となる GPCR 以外に、特異的なアクセサリタンパク質を必要とする可能性も考えられる。そこで、McLatchie らの方法にならい、今後はアクセサリタンパク質も考慮してオーファン GPCR の活性測定を試みなくてはならない。この仮説が正しければ GPR39 と他 3 種もまだデスアシルグレリン受容体本体として有力な候補であるので今後の検討が興味深い。

(2) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

グレリンの発見 (1999 年) 以降、わずか 12 年の間に 3000 報以上の原著論文が発表されるなど、グレリンに関する研究は世界中で注目されており、現在でも非常に激しい競争が繰り広げられている。その中で、デスアシルグレリンに関する研究報告は、約 80 報程度にとどまっている。グレリンに比べて、デスアシルグレリンの研究が立ち遅れている一番の要因として、作用機序が不明なことが挙げられる。このため、デスアシルグレリン受容体の同定は、グレリンに関する様々な研究の中でも、特に重要な研究テーマである。一方、生理活性ペプチド受容体の探索研究の歴史は長く、古くはエンドセリン受容体 (Arai *et al.*, Nature, 1990; Sakurai *et al.*, Nature, 1990) やオピオイド受容体 (Evance *et al.*, Science, 1992) の同定など、その成果はいずれも注目を集めている。最近でも、オーファン GPCR を用いた逆薬理学的手法によって、メラノコルチン凝集ホルモン (Saito *et al.*, Nature, 1999)、ウロテンシン II (Ames *et al.*, Nature, 1999)、ニューロメジン U (Howard *et al.*, Nature, 2000) などの受容体が同定され、いずれも国際的に非常に高く評価されている。このため、本研究の成果を元にデスアシルグレリン受容体分子の同定に成功すれば、その成果は注目を集め、高く評価されると推測される。

(3) 今後の展望

本研究により、ラット心臓由来細胞 H9c2 とマウス筋芽細胞 C2C12 にて、デスアシルグレリンを反応させるとそれに応答して細胞内 cAMP の産生が上昇することを見出した。このことは、これらの細胞でデスアシルグレリンが発現していることを示唆しており、それは Gs に共役した GPCR と推測された。今後、受容体への結合実験など更なる薬理的な受容体の性状解析が必要であるが、今回の成果を元にデスアシルグレリン受容体分子の同定が期待できる。

一般に、生理活性ペプチドが新しく発見されても、受容体が明らかにされなければ、特に興味深い生理作用を示さないかぎり、さほど注目されない。上述したメラノコルチン凝

集ホルモン、ウロテンシンⅡ、ニューロメジンUも同様であったが、受容体の同定を契機として、メラノコルチン凝集ホルモンとニューロメジンUのエネルギー代謝調節機能、ウロテンシンⅡの強力な血管収縮活性など、興味深い生理作用が次々と明らかになり、現在ではそれぞれの研究が活発に進められている。これらの前例と同じく、デスアシルグレリン受容体の同定により、デスアシルグレリンに関する研究の爆発的な進展が見込まれる。特に、受容体分布の解明により、デスアシルグレリンの新たな生理作用を検討することが可能になる。また、現在使用されている医薬品の多くは、受容体のスーパーアゴニストもしくはアンタゴニストであることから、新たに見出される受容体も先端的創薬の重要な標的となる可能性を秘めている。一方、グレリンは基礎研究が大幅に進展し、現在では臨床応用へ向けてトランスレーショナル・リサーチが進められている。生体内では、グレリンに付加されているアシル基が酵素的反応により解離しやすく、投与されたグレリンの一部はデスアシルグレリンへと容易に変換されることが推定される。したがって、グレリンの臨床応用を成功させるためにも、デスアシルグレリンの生理的意義を明らかにしておくことが重要である。

今回の研究では、デスアシルグレリンの受容体分子の同定までは至らなかったが、デスアシルグレリンの生理的意義を確立するために、そして上述したようにグレリンの臨床応用をより確実にするためにも、今後もデスアシルグレリンの作用機構の解明を目的として受容体分子の同定は興味深い研究対象である。

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0件)

〔学会発表〕(計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森 美和 (MORI MIWA)

独立行政法人国立循環器病研究センター・生化学部・流動研究員

研究者番号：50363148

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし