

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：84404

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09445

研究課題名(和文) 新たな活性検出法を用いた新規生理活性ペプチドの同定による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 processes by newly identified bioactive peptide

研究代表者

森 健二 (MORI, Kenji)

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：00416223

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：イノシトール1リン酸の測定系を導入して、オーファンGタンパク質共役型受容体(GPCR)の内因性リガンドとなる新規生理活性ペプチドの探索を試みた。これにより、複数のオーファンGPCRが顕著な基礎活性を有することが明らかになり、内因性リガンドがインバースアゴニストとして機能する可能性を新たに示した。一方、神経ペプチドであるneuromedin Uの前駆体から産生される新規ペプチドneuromedin U precursor-related peptideが、ラット脳ではアミノ酸鎖長の異なる2種類の分子型で存在することを示すと共に、脳内ドーパミン系を介してプロラクチン分泌を促進することを示した。

研究成果の概要(英文)：To search for novel bioactive peptide as endogenous ligand for orphan G protein-coupled receptor (GPCR), the novel assay system was introduced. This assay detected the activation of Gq protein-coupled receptor by quantifying inositol monophosphate which is a downstream metabolite of inositol triphosphate, and revealed the constitutive activities of several orphan GPCRs. These data suggest that the inverse agonists, in addition to agonists, may exist as endogenous ligand for these GPCRs.

To determine the molecular form of newly identified neuropeptide neuromedin U precursor-related peptide (NURP), immunoaffinity chromatography of tissue extracts was performed. In rat brain and small intestine, NURP was present as two mature peptides of 33 and 36 residues. Intracerebroventricularly administered NURP induced increase in plasma prolactin concentration by acting indirectly on the pituitary. Dopamine from the hypothalamus may be involved in this activity of NURP.

研究分野：生化学、内分泌学

キーワード：生理活性ペプチド 神経ペプチド Gタンパク質共役型受容体

## 1. 研究開始当初の背景

生理活性ペプチドは、細胞間の情報伝達を担う主要な分子であり、ホルモンとしての内分泌的調節に加え、神経ペプチドとして摂食及び飲水、性行動、睡眠覚醒などの本能行動や、生体の恒常性を維持するための自律機能を調節するなど、生体機能の調節において広範かつ重要な役割を果たしている。このため、新規生理活性ペプチドの発見とそれに続く機能解析により、新しい生体調節機構を明らかにすることができる。

研究代表者の所属する研究室では、生理活性ペプチドの活性を検出するためのアッセイ法を新たに開発・導入することによって、数多くの新規生理活性ペプチドを継続的に発見してきた。具体的には、1980年代前半の平滑筋の弛緩・収縮アッセイの開発によりナトリウム利尿ペプチドファミリー (ANP、BNP、CNP) と6種類のニューロメジンを、1990年代のcAMPのラジオリジオアッセイの導入によりアドレノメデュリンを、近年ではオーファン G タンパク質共役型受容体 (GPCR) の内因性リガンド探索によりグレリンとニューロメジン S を発見してきた。これらより、新しい活性測定法の導入が新規生理活性ペプチド発見の契機となっていることがわかる。

## 2. 研究の目的

これまで、オーファン GPCR の内因性リガンド探索により十数種類の新規生理活性ペプチドが同定されている。その一方で、現在でも内因性リガンドがペプチドであると推測されるオーファン GPCR が数十種類存在するが、それらを利用した新たな生理活性ペプチドの発見は、2005年の研究代表者によるニューロメジン S の発見以来、長らく途絶えている。これは、これまでの探索に用いてきた GPCR 活性化測定法 (細胞内  $Ca^{2+}$  濃度もしくは cAMP 濃度の変動測定) ではリガンドが同定できないことを暗示しており、このような現状を打破するための新しい活性測定法の必要性を示唆している。そこで本研究では、これまで用いていない活性測定法を導入して新規生理活性ペプチドの発見を目指す。

また、これまでの研究にて免疫学的に同定している Neuromedin U precursor-related peptide (NURP) について、精製と構造解析によりその存在を証明するとともに、本ペプチドの機能解析を試みる。

## 3. 研究の方法

### (1) 新しく導入する GPCR 活性化測定法

Gq タンパク質に共役する GPCR は、リガンド刺激によって活性化されるフォスホリパーゼ C によるイノシトール 3 リン酸 (IP<sub>3</sub>) の産生を促し、この IP<sub>3</sub> が小胞体から  $Ca^{2+}$  を放出させる。このため、IP<sub>3</sub> や  $Ca^{2+}$  の細胞内濃度変化を GPCR 活性化の指標と

することができる。しかしながら、細胞内の IP<sub>3</sub> は速やかに分解されるためにリガンド刺激によって産生される IP<sub>3</sub> を正確に定量することが困難だったため、これまでは多くの場合で細胞内  $Ca^{2+}$  濃度上昇が Gq 共役型 GPCR の活性化の指標として用いられてきた。一方で、細胞内  $Ca^{2+}$  濃度変化の検出系は、Gq タンパク質非依存的な細胞外からの  $Ca^{2+}$  流入も検出するため、Gq 共役型 GPCR 活性化による小胞体からの  $Ca^{2+}$  放出を特異的に検出できない場合がある。そこで本研究では、IP<sub>3</sub> の代謝産物であるイノシトール 1 リン酸 (IP<sub>1</sub>) を測定することによって Gq 共役型 GPCR の活性化をより特異的に検出できる新たなアッセイ系を導入した。なお、細胞内 IP<sub>1</sub> の定量は IP One Tb キット (cisbio 社) と EnVision (パーキンエルマー社) を用いて実施した。

### (2) 新規生理活性ペプチド NURP の同定と機能解析

摂食及びエネルギー代謝調節に關与する神経ペプチドであるニューロメジン U (NMU) の前駆体タンパク質のアミノ酸配列解析により、この前駆体タンパク質には翻訳後修飾による限定切断を受けうる部位が4ヶ所存在することを見出した。このことから、この前駆体タンパク質から NMU に加えてもう一つの新規生理活性ペプチド候補が産生されることを予測し、逆相 HPLC とラジオリジオアッセイを組み合わせてこのペプチドがラット脳で産生されている可能性を強く示唆した (若手研究 (B) 課題番号 22790892 にてペプチド X として報告)。そこで、この新規生理活性ペプチド候補を Neuromedin U precursor-related peptide (NURP) と命名したが、本ペプチドが生体内でどのような分子型で存在しているかなどの実体は未だ不明であった。そこで、本研究ではラットから本ペプチドを精製した後、その分子構造を決定した。また、ラットへの投与による機能解析により NURP が神経ペプチドとして機能することを検証した。

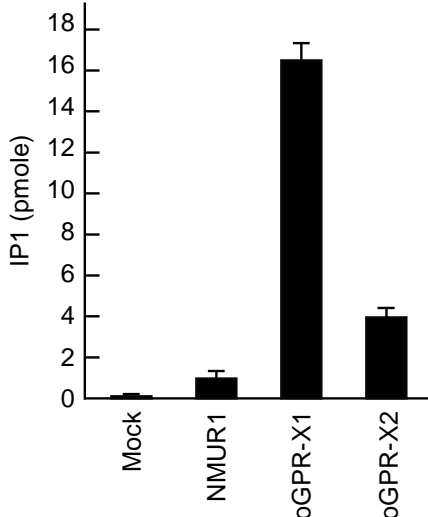
## 4. 研究成果

### (1) 新しく導入する GPCR 活性化測定法

はじめに、Gq タンパク質に共役する GPCR である NMU 受容体 1 型 (NMUR1) を用いてリガンド刺激による細胞内 IP<sub>1</sub> 産生を定量した結果、リガンド濃度依存的な IP<sub>1</sub> 産生量の増加を確認でき、本測定系が Gq 共役型 GPCR の活性化を検出できることを確認した。HEK293 細胞で発現させた Gq 共役型 GPCR を用いて組織抽出物に含まれるアゴニスト活性を細胞内  $Ca^{2+}$  濃度変化で評価・探索する場合、細胞外からの  $Ca^{2+}$  流入により Gq 共役型 GPCR 活性化による小胞体からの  $Ca^{2+}$  放出を特異的に検出できない。しかしながら、IP<sub>1</sub> 測定ではこのような非特異的反応が認められず、Gq 共役型 GPCR の活性化をより特異的に検出できることが判明し

た。

つぎに、いくつかの Gq 共役型 GPCR と オーフアン GPCR をそれぞれ HEK293 細胞で一過的に発現させたのちにリガンド非存在下で IP1 量を測定した結果、Mock 細胞と比較して GPCR 発現細胞では IP1 量の増加が認められた(図 1)。これはリガンド非依存的な IP1 産生の増加を示しており、これらの GPCR が恒常的に活性化された基礎活性を持つことを示している。このような Gq 共役型 GPCR の基礎活性は、細胞内  $Ca^{2+}$  濃度変化では検出できなかったため非常に興味深い。GPCR である嗅覚受容体の基礎活性とその生理的意義が解明され(引用文献)、生体調節における GPCR 基礎活性の重要性が示されているため、これらの受容体の生理的役割を検討する際にはリガンド非依存的な機能も考慮する必要があると思われる。また、摂食調節に關与するアグーチ関連タンパク質が、インバースアゴニストとして GPCR である 4 型メラノコルチン受容体の基礎活性を抑制することが報告され(引用文献)、GPCR の基礎活性を抑制するインバースアゴニストが生体調節に寄与することが示されている。よって、いくつかの Gq 共役型オーフアン GPCR が基礎活性を有することは、これらのオーフアン GPCR の内因性リガンドを探索する際に、アゴニスト活性に加えてインバースアゴニスト活性にも着目しなくてはならないことを示している。



【図1】GPCRの基礎活性。リガンド非存在下にて90分で蓄積されるIP1量を測定した。NMUR1やオーフアンGPCRであるoGPR-X1、-X2を発現させたHEK293細胞ではIP1産生量が増加している。

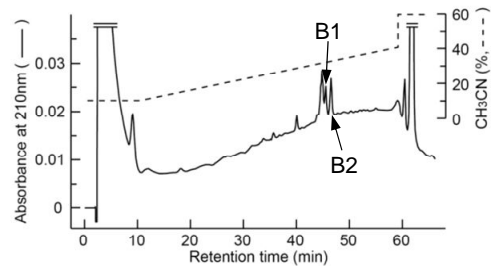
また、今回導入した IP1 測定による Gq 共役型 GPCR の活性化検出法はリガンド刺激時間が 90 分であるため、反応時間が 4 分程度と短い細胞内  $Ca^{2+}$  濃度変化の測定では検出することのできない slow acting compound によるアゴニスト活性を検出することも可能である。

これらのことから、IP1 測定法はオーフ

ン GPCR の内因性リガンド探索において、従来法では検出できなかったリガンド活性を検出できる可能性を秘めていると考えられる。

## (2)新規生理活性ペプチドNURPの同定と機能解析

ラットにおいて NMU mRNA は中枢神経系及び下垂体、小腸で強く発現しているため、ラット脳からの NURP の精製を試みた。514g のラット脳から抽出した粗ペプチドを、抗 NURP 抗体を用いた免疫アフィニティークロマトグラフィーに供し、吸着物を逆相 HPLC にて分離した結果、NURP に由来する 2 種類のペプチドを単離することができた(図 2、B1 及び B2)。N 末端アミノ酸配列解析の結果、2 つのペプチドは同一の N 末端配列を有しており、それは予想された NURP の N 末端配列と一致していたが、質量分析により B1 と B2 が異なる分子量(それぞれ 4,201.2 と 3,758.8)を持つことが明らかになった。これらのデータは、ラット脳では NURP は C 末端側の異なる位置でプロセシングされることにより、36 及び 33 残基の 2 つの分子型で産生されていることを示している。これら 2 つのペプチドはラット小腸からも同様に単離された。(発表論文)



【図2】ラット脳からのNURPの精製。ラット脳から得たペプチド抽出物を抗体アフィニティークラムにより精製し、その溶出物を逆相HPLC( $\mu$ -Bondasphere C18)により分離した。

これまでに、NURP をラットへ脳室内投与すると血漿プロラクチン濃度が特異的に上昇することを示すとともに、NURP は分散培養した下垂体前葉細胞からのプロラクチン分泌を促進しないことを示し、脳室内投与した NURP は下垂体に間接的に作用してプロラクチン分泌を促進していることを示唆していた。下垂体からのプロラクチン分泌は視床下部からのドーパミンによって抑制されているため、NURP のプロラクチン分泌促進活性とドーパミン系の関係を検討した。ドーパミン受容体アゴニストを前投与したラットでは、NURP のプロラクチン分泌促進活性は完全に抑制された。また、ドーパミン受容体アンタゴニストを投与することによりドーパミンによるプロラクチン分泌抑制を解除したラットへ NURP を脳室内投与した場合でも、本ペプチドによるプロラクチン分泌促進が認められなかった。これは、NURP がドーパミン非依存的なプロラクチン分泌促進活性を持たないことを示している。このこ

とから、NURP は視床下部ドーパミンを介してプロラクチンの分泌を促進していると考えられた。(発表論文)

このほか、NURP をラット脳室内投与すると心拍数の増加や背部表面体温の上昇、エネルギー代謝の亢進、自発運動の増加などが観察されている(発表論文)。

#### <引用文献>

Nakashima A, *et al.* Agonist-independent GPCR activity regulates anterior-posterior targeting of olfactory sensory neurons. *Cell*, 154, 2013, 1314-1325

Nijenhuis WA, *et al.* AgRP(83-132) acts as an inverse agonist on the human-melanocortin-4 receptor. *Mol Endocrinol*, 15, 2001, 164-171

#### 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)

Teranishi H, Hayashi M, Higa R, Mori K, Miyazawa T, Hino J, Amano Y, Tozawa R, Ida T, Hanada T, Miyazato M, Hanada R, Kangawa K, Nakao K. Role of neuromedin U in accelerating of non-alcoholic steatohepatitis in mice. *Peptides*, 査読有, 99, 2018, 134-141, DOI: 10.1016/j.peptides.2017.09.011

Zhang W, Sakoda H, Miura A, Shimizu K, Mori K, Miyazato M, Takayama K, Hayashi Y, Nakazato M. Neuromedin U suppresses glucose-stimulated insulin secretion in pancreatic  $\beta$  cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 査読有, 493, 2017, 677-683, DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.08.132

Ensho T, Maruyama K, Mori K, Miyazato M, Kangawa K, Nakahara K, Murakami N. Neuromedin U precursor-related peptide (NURP) exerts neuromedin U-like sympathetic nerve action in the rat. *Biochem Biophys Res Commun*, 査読有, 492, 2017, 412-418, DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.08.084

Mori K, Ida T, Fudetani M, Mori M, Kaiya H, Hino J, Nakahara K, Murakami N, Miyazato M, Kangawa K. Identification of neuromedin U precursor-related peptide and its possible role in the regulation of prolactin release. *Sci Rep*, 査読有, 7, 2017, 10468, DOI: 10.1038/s41598-017-10319-9

Takayama K, Mori K, Tanaka A, Nomura E, Sohma Y, Mori M, Taguchi

A, Taniguchi A, Sakane T, Yamamoto A, Minamino N, Miyazato M, Kangawa K, Hayashi Y. Discovery of a human neuromedin U receptor 1-selective hexapeptide agonist with enhanced serum stability. *J Med Chem*, 査読有, 60, 2017, 5228-5234, DOI: 10.1021/acs.jmedchem.7b00694

Kono T, Ida T, Kawahara N, Watanabe F, Biswas G, Sato T, Mori K, Miyazato M. Identification and immunoregulatory function of neuromedin U (Nmu) in the Japanese pufferfish *Takifugu rubripes*. *Dev Comp Immunol*, 査読有, 73, 2017, 246-256, DOI: 10.1016/j.dci.2017.03.007

Mekata T, Kono T, Satoh J, Yoshida M, Mori K, Sato T, Miyazato M, Ida T. Purification and characterization of bioactive peptides in the kuruma shrimp *Marsupenaeus*. *Gen Comp Endocrinol*, 査読有, 246, 2017, 321-330, DOI: 10.1016/j.ygcen.2017.01.008

Nakahara K, Akagi A, Shimizu S, Tateno S, Qattali AW, Mori K, Miyazato M, Kangawa K, Murakami N. Involvement of endogenous neuromedin U and neuromedin S in thermoregulation. *Biochem Biophys Res Commun*, 査読有, 470, 2016, 930-935, DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.01.155

#### [学会発表](計4件)

Mori K, Miyazato M, Kangawa K. Neuromedin U precursor-related peptide: a newly identified neuropeptide with prolactin-releasing activity. 第95回日本生理学会大会, 2018年

森健二、井田隆徳、中原桂子、村上昇、宮里幹也、寒川賢治、プロラクチン分泌促進活性を有する新規生理活性ペプチド neuromedin U precursor-related peptide の発見、2017年度生命科学系学会合同年次大会、2017年

Mori K, Miyazato M, Kangawa K. Possible role of neuromedin S in the central regulation of feeding. CREST International Symposium 2015, Investigation of Energy Metabolism and Immune System based on the Association with Autonomic Nerve and Peptides, 2015年

森健二、宮里幹也、寒川賢治、ラット脳で産生される新規生理活性ペプチド候補の検出、第42回日本神経内分泌学会・第23回日本行動神経内分泌研究会合同学術

集会、2015年

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森 健二 (MORI, Kenji)

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：00416223

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

花田 礼子 (HANADA, Reiko)

大分大学・医学部・教授

研究者番号：00343707

(4) 研究協力者

なし