

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月17日現在

機関番号：84404

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09818

研究課題名(和文) Rhoキナーゼを基軸とした新規食欲・脂肪蓄積制御因子の探索と機能解析

研究課題名(英文) Search for New Appetite and Fat Accumulation Regulators and Functional Analysis Based on Rho Kinase

研究代表者

吉田 守克 (Yoshida, Morikatsu)

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・上級研究員

研究者番号：70393212

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、摂食、エネルギー代謝や糖脂質代謝を制御する未知の生理活性ペプチドを同定するために、Gタンパク質共役型受容体(GPCR)によるRhoキナーゼ(ROCK)活性化経路に着目し、GPCRリガンドとしての新たなROCK活性化因子を探索した。新規ペプチドを同定できなかったが、GPCR-Yに対する強いアゴニスト活性の検出に成功した。また、細胞内シグナル経路が明確でなかったGPCR-Xの機能解析を進めた。GPCR-Xはアゴニスト結合によって、G $\alpha$ qを介した細胞内カルシウム上昇活性だけでなく、G $\alpha$ 13およびROCK活性化を介して血清応答因子の転写活性も有することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年の肥満症や糖尿病、摂食障害患者の急増に伴い、摂食及び代謝調節ペプチドを中心とした内分泌学・代謝学研究は世界中の研究グループにより精力的に進められている。また、医薬品の作用標的の多くはGPCRであり、リガンド不明なGPCRに対する内因性リガンド探索は新たな作用機序を有する医薬品(作動薬、拮抗薬)の開発において重要である。本研究のようなGPCRのクロストークによる、インスリン及びレプチン抵抗性の解除を目指した治療戦略は、肥満症や糖尿病、摂食障害等に対する新薬開発の新しいアプローチに繋がるものとして期待できる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we focused on the activation pathway of Rho-kinase (ROCK) by G protein-coupled receptors (GPCR) to identify unknown bioactive peptides that regulate food intake, energy metabolism, and glycolipid metabolism, and searched for novel ROCK activators as GPCR ligands. Although no new peptides were identified, strong agonist activity against GPCR-Y was successfully detected. In addition, functional analysis of GPCR-X, whose intracellular signaling pathway was not clear, was advanced. GPCR-X was shown to have, by agonist binding, not only intracellular calcium increasing activity via G $\alpha$ q, but also transcriptional activity of serum response factors via G $\alpha$ 13 and ROCK activation.

研究分野：内分泌

キーワード：生理活性ペプチド Rhoキナーゼ オーフアンGPCR 摂食・エネルギー代謝

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

これまで申請者の所属する研究室では、細胞間情報伝達物質としての生理活性ペプチドに注目し、多くの新規ペプチドの単離・同定を行ってきた。近年では、グレリンの発見やニューロメジン U (NMU)、ニューロメジン S (NMS) の同定に成功している (Kojima et al. Nature 1999, Kojima et al. BBRC 2000, Mori et al. EMBO J 2005)。グレリンは摂食亢進作用を有しており、現在は治療応用へと研究が展開されている。また、NMU と NMS は摂食抑制物質であり、エネルギー消費の亢進をもたらす異化シグナルとして機能する。

過食と消費エネルギー低下により生じる肥満は、インスリン抵抗性や糖尿病、脂質異常症、高血圧等の生活習慣病を発症する主要な危険因子であり、これらの集積が動脈硬化疾患の発症・進展に大きく寄与する。近年、低分子量 GTP 結合タンパク質 Rho のエフェクター分子である Rho キナーゼ (ROCK) がインスリン及びレプチンシグナルを制御することにより、心血管疾患を含めた生活習慣病において重要な役割を果たすことが相次いで報告されている (Furukawa et al. Cell Metab 2005, Noguchi et al. JBC 2007, Lee et al. JBC 2009, Huang et al. Nat Neurosci 2012)。骨格筋における ROCK1 活性低下はインスリン抵抗性を引き起こし、肥満者や 2 型糖尿病患者ではインスリン刺激による ROCK1 活性が障害されている。脂肪組織においても ROCK1 はインスリン刺激によるグルコース取り込み促進に寄与し、ROCK2 活性の抑制は脂肪細胞分化を促進する。また、レプチンによる摂食抑制作用において、視床下部での ROCK1 活性化が寄与することが明らかにされている。これらの報告より、肥満に伴うインスリン及びレプチン抵抗性を解除可能な分子標的として、ROCK が非常に重要であると考えられる。

生理活性ペプチドをリガンドとする受容体の多くは G タンパク質共役型受容体 (GPCR) であり、内因性リガンドの不明なオーファン GPCR 遺伝子が数多く存在する。リガンドが結合した GPCR は共役する G タンパク質 (Gas, Gai, Gaq, Gα12/13 に大別される) によって異なる細胞内シグナルを伝達する。Gα12/13 に共役する GPCR は Rho-ROCK 経路を活性化するが、高感度かつ効率的な活性検出は困難であった。そのため、GPCR を受容体とする ROCK 活性化因子や Gα12/13 シグナルから ROCK を介したインスリン・レプチンシグナルへのクロストーク、それに伴う肥満及び糖脂質代謝改善に対する検証は遅れている。

### 2. 研究の目的

本研究では、オーファン GPCR による ROCK 活性化経路に着目し、摂食やエネルギー代謝、糖脂質代謝の制御に関わる新規生理活性ペプチドを同定し、細胞や個体レベルでの機能解析を行い、新たな食欲・脂肪蓄積調節機構を解明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) ROCK の活性化を指標としたオーファン GPCR の内因性リガンド探索

標的とするオーファン GPCR を培養細胞に過剰発現させ、組織抽出画分を添加し、リガンド結合による特異的活性を検出する方法により、未知の生理活性ペプチドを探索した。標的 GPCR に特異的な活性を検出次第、活性を指標に精製を進めた。

#### (2) リガンド既知 GPCR における ROCK 活性の検証

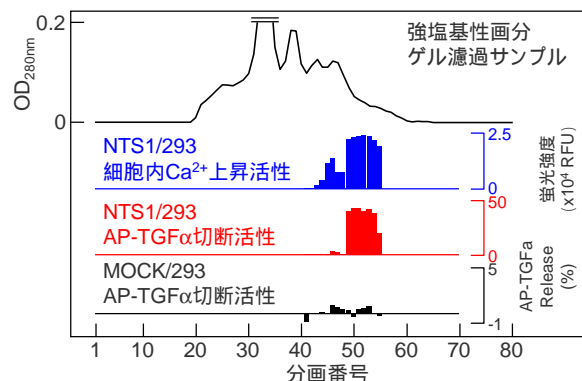
結合するリガンドは知られているものの、細胞内シグナル伝達経路が明確ではないため、生体における機能が不明な受容体 (GPCR-X) が存在する。本研究では、GPCR-X に対する Rho-ROCK 経路の寄与を検証することで、GPCR-X の細胞内シグナル解明を進めた。

### 4. 研究成果

#### (1) ROCK の活性化を指標としたオーファン GPCR の内因性リガンド探索

##### (1-1) 新たな ROCK 活性検出系の導入

TGFα の膜結合型前駆体からのエクドメインの切断を指標に、Gaq 及び Gα12/13 に共役する GPCR の活性化を高感度かつ高精度に検出する手法 (TGFα 切断アッセイ) が新たに開発されている (Inoue et al. Nat Methods 2012)。本研究では、ROCK 活性を検出するために、TGFα 切断アッセイをリガンド探索に導入した。はじめに、ニューロテンシン 1 型受容体 (NTS1) を用いて、従来の活性検出系と比較・検討を行った。ブタ視床下部抽出物において、本アッセイ系は他の系 (細胞内 Ca<sup>2+</sup> 上昇活性) に比べて検出感度が下がるものの、特

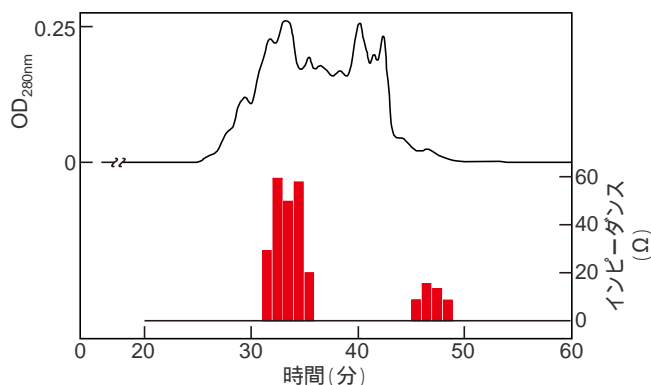


【図1】ブタ視床下部抽出物からの活性検出

異性の非常に高いアッセイ系であることを明らかにした(図1)。通常、オーファン GPCR のリガンド探索において組織抽出物を用いる場合、内因性受容体からのシグナルを除去するために、分離・精製したサンプルを用いて標的受容体に対する活性検出を行う。しかし、本アッセイ系は特異性が高いため、粗抽出画分からの活性検出が可能となった。そのため、リガンド探索における最初のスクリーニングに本アッセイ系は有用であることが明らかとなった。

### (1-2) リガンド探索

本研究では、摂食やエネルギー代謝、糖脂質代謝を制御する視床下部や骨格筋、肝臓、脂肪組織のいずれかに発現の高いオーファン GPCR を標的とした。HEK293、CHO 細胞に標的遺伝子を導入し、オーファン GPCR 発現細胞(一過性発現または安定発現)を作製した。また、リガンド探索の出発材料として、ブタ視床下部、脳幹、嗅球、脊髄、下垂体、脾臓、胎盤、ウシ胸腺、ラット脳、小脳、心房、心室、胃、十二指腸、小腸、腎臓、肝臓、骨格筋、内臓脂肪、精巣をそれぞれ酢酸抽出し、イオン交換、ゲル濾過クロマトグラフィーにて分画したものを使用した。作製した受容体

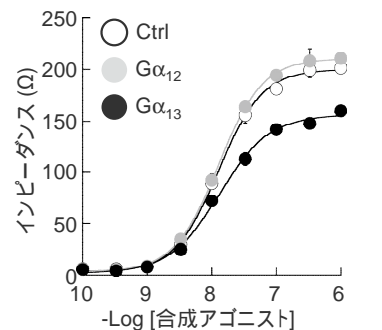


【図2】組織抽出物ゲル濾過サンプルからの活性検出

安定発現細胞に組織抽出画分を添加し、構築した ROCK 活性検出系( CellKey システム、TGF- $\alpha$  切断アッセイ)を駆使することにより、標的受容体の特異的な活性を探索した。その結果、GPCR-Y と命名した受容体発現細胞に対する強いインピーダンス変化を複数の組織抽出物より検出した(図2)。今後、活性画分を HPLC にて分離したサンプルについて、受容体発現細胞に添加し、標的受容体に対する特異性を検証する。

### (2) リガンド既知 GPCR における ROCK 活性の検証

リガンド刺激によって生じる細胞の微小形態変化についてインピーダンスを指標に検出する方法( CellKey システム)を用いて、GPCR-X 活性化機構を検証した。GPCR-X 発現細胞に対し、アゴニストを作用させた結果、強力なインピーダンス上昇活性を有することを明らかにした。各種 G タンパク質に対する siRNA および阻害剤を処理した GPCR-X 発現細胞において、アゴニストによるインピーダンス上昇活性への阻害効果を検証した。効果を有した G タンパク質の下流シグナルについて、アゴニスト刺激を行い活性測定した結果、GPCR-X は  $G\alpha_q$  を介した細胞内  $Ca^{2+}$  上昇活性、 $G\alpha_{13}$ -Rho-ROCK 経路を介した血清応答因子(SRF)による転写活性を有することが明らかとなった。



【図3】siRNAによる $G\alpha_{12/13}$ 経路の検証

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 4件)

Shimizu K, Yonekawa T, Yoshida M, Miyazato M, Miura A, Sakoda H, Yamaguchi H, Nakazato M. Conformational Change in the Ligand-Binding Pocket via a KISS1R Mutation (P147L) Leads to Isolated Gonadotropin-Releasing Hormone Deficiency. J Endocr Soc. 1(10): 1259-1271. 2017. doi: 10.1210/js.2017-00277. 査読有

Ohno H, Yoshida M, Sato T, Kato J, Miyazato M, Kojima M, Ida T, Iino Y. Luqin-like RYamide peptides regulate food-evoked responses in *C. elegans*. Elife. 6. pii: e28877, 2017. doi: 10.7554/eLife.28877. 査読有

Takei D, Nishi M, Fukada S, Doi M, Okamura H, Uezumi A, Zhang L, Yoshida M, Miyazato M, Ichimura A, Takeshima H. Gm7325 is MyoD-dependently expressed in activated muscle satellite cells. Biomed Res. 38(3):215-219, 2017. doi: 10.2220/biomedres.38.215. 査読有

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

〔学会発表〕(計 7件)

吉田 守克、寒川 賢治、宮里 幹也、低親和性ニューロテンシン受容体の細胞内情報伝達機構の解析、第 91 回 日本内分泌学会学術総会、2018

井田 隆徳、大野 速雄、吉田 守克、佐藤 貴弘、宮里 幹也、児島 将康、飯野 雄一、新規生理活性ペプチド dRYamide, LURY-1 の発見、第 91 回 日本内分泌学会学術総会、2018

Hayao Ohno, Morikatsu Yoshida, Takahiro Sato, Johji Kato, Mikiya Miyazato, Masayasu Kojima, Takanori Ida & Yuichi Iino, CeRYamides, members of the conserved RYamide peptide family, mediate food responses after fasting in *C. elegans*, 16th TOKYO IGAKUKEN International Symposium, 2017

井田 隆徳、大野 速雄、吉田 守克、佐藤 貴弘、加藤 丈治、宮里 幹也、児島 将康、飯野 雄一、RYamide ペプチドの新展開、第 14 回 GPCR 研究会、2017

中里 祐毅、吉田 守克、井上 飛鳥、青木 淳賢、中里 雅光、宮里 幹也、新規生理活性ペプチドを探索するための新たな活性検出系の構築、第 7 回 ペプチド・ホルモン研究会、2016

清水 浩一郎、米川 忠人、迫田 秀之、吉田 守克、宮里 幹也、中里 雅光、新規 KISS1 受容体 (P147L) による性腺機能低下症の機能解析、第 13 回 GPCR 研究会、2016

山口 秀樹、米川 忠人、清水 浩一郎、迫田 秀之、吉田 守克、宮里 幹也、中里 雅光、新規キスペプチン受容体 (Pro147Leu) による思春期欠損症の機能解析、第 89 回 日本内分泌学会学術総会、2016

〔図書〕(計 1件)

吉田 守克、宮里 幹也、情報技術協会、ペプチド医薬品のスクリーニング・安定化・製剤化技術、2018

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0件)

なし

取得状況 (計 0件)

なし

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.ncvc.go.jp/res/divisions/biochemistry/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：宮里 幹也

ローマ字氏名：Miyazato Mikiya

所属研究機関名：国立循環器病研究センター

部局名：研究所

職名：部長

研究者番号 (8 桁)：50291183

### (2) 研究協力者

該当者なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。