

令和 2 年 5 月 22 日現在

機関番号：32425

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K18070

研究課題名(和文) ペプチドの新規な活性化機構を基にした活性ペプチドの探索

研究課題名(英文) Explore of bioactive peptides based on novel activation mechanism of neuropeptides

研究代表者

山本 博之 (Yamamoto, Hiroyuki)

日本薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：10433210

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本課題において、私たちが見出した「神経ペプチドの新しい活性化機序」に基づいて作られる新しい生理活性ペプチドを明らかにすることも目的にした。

紫外線の曝露によって起きる皮膚の炎症過程において角化細胞から生理活性ペプチドであるセクレチンの前駆体が分泌されることを明らかにした。また、放出されたままでは活性を持たないが、細胞の外で紫外線の曝露によって発現が増えるトリプシン様酵素によって活性型に変換してい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

生理活性ペプチドは活性のない前駆体で合成されて、酵素により活性化される。これまでに活性化酵素が異なることで、同じ前駆体から異なる活性ペプチドが生成されて、異なる機能を発揮することが報告されている。我々は、紫外線曝露によって皮膚にセクレチン前駆体の発現が亢進するとともにトリプシン様切断活性を有する酵素の発現が増加することを明らかにした。セクレチン前駆体が切断を受けて生成されるペプチドを推定すると古典的な経路で生成されるペプチドとは異なる新規ペプチドが生成されることが予想された。新規ペプチドは従来とは異なる生理作用を示すと考えられ、紫外線からの新しい皮膚防御機構の解明につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：In this work, we aimed to identify new bioactive peptides that can be made based on the "novel activation mechanism of neuropeptides" that we have found.

We show that the precursor of the bioactive peptide secretin is secreted by keratinocytes during the inflammatory process of the skin caused by exposure to UV light. They also found that although they are inactive when released, they are converted to the active form by trypsin-like enzymes whose expression is increased outside the cell by exposure to UV light.

研究分野：生理活性ペプチド

キーワード：生理活性ペプチド セクレチン セクレチン受容体 紫外線

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ペプチドホルモンは小胞体で前駆体が産生された後、ゴルジ体・分泌顆粒中でプロセッシングを受け、活性を有する成熟体に変換されて分泌される。このようなペプチドホルモンの成熟機構は、インスリンや α -MSH の前駆体であるプロオピオメラノコルチン (pro-opiomelanocortin, POMC) をモデルとして、詳細な解析がなされてきた。特に、POMC は下垂体の前葉および中葉のいずれにも発現しているが、活性化に關する酵素の違いにより、異なる生理活性ペプチドが生成する機序について詳細に解析された、由緒のある神経ペプチドである [Benjannet ら Proc Natl Acad Sci USA, 1991 など]。

POMC からプロセッシングにより生成する α -MSH は、皮膚の角化細胞に発現し、メラノサイトのメラニン産生を亢進する。角化細胞における α -MSH の生合成は、下垂体の機序と同様に、細胞内で POMC から α -MSH に活性化されると考えられてきた。ところが、申請者は、皮膚で生成される POMC は「細胞内で α -MSH に変換する」定説とは異なり、POMC が細胞外に分泌されたのち、活性型の α -MSH(1-8) を産生する、新規な「細胞外活性化機構」によって活性の調節を受けていることを明らかにし、世界に先駆けて報告した [Yamamoto ら Sci. Rep., 2015]。我々はこれまでに、POMC 以外にもプロセッシングを受けないまま細胞外に分泌されるペプチドが存在すると仮説を立て、角化細胞が産生する生理活性ペプチドを DNA マイクロアレイや免疫検出法により探索を行ない、これまでにガラニンやセクレチン、アドレノメデュリン、心房性ナトリウム利尿ペプチド (ANP) など複数の発現を見出している [未発表データ]。また、ウェスタンブロットにより、角化細胞抽出物中にガラニン前駆体やセクレチン前駆体が検出されており、角化細胞が産生する一部の生理活性ペプチドは、POMC と同様に、正常なプロセッシングを受けずに分泌されることが予想される。角化細胞における神経ペプチドの発現については、他の研究グループからもアドレノメデュリンやガラニンの発現が報告されている [Baumann ら Eur. J. Oral. Sci., 2006, Albertin ら Int. J. Mol. Med., 2003]。しかしながら、いずれのペプチドにおいても分子型に關する検討は行われていない。

2. 研究の目的

角化細胞は生理活性ペプチドを前駆体のまま分泌しており、細胞外で活性化されて皮膚の恒常性に関わると考えられる。そこで、「生理活性ペプチドの細胞外活性化機構」の生理的な役割を明らかにするために、活性ペプチドの単離・同定とその作用の解析を実施する。活性ペプチドは、活性体を単離・同定することが一般的である。しかし、活性ペプチドは短時間で分解を受けてしまい、組織中には微量でしか存在しない。また、他のタンパク質の分解物も多く、ペプチド同定の大きな障害となっている。そこで我々は、新規な活性化機構の特徴であるペプチド前駆体と活性化に關する酵素に着目し、生成するペプチド断片を予測することにより、活性ペプチドを探索することを目的に実施した。

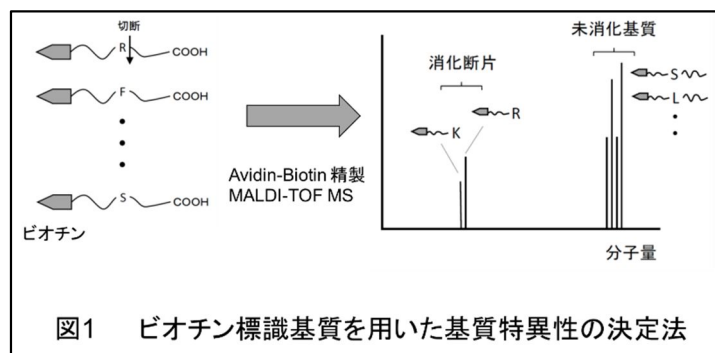
3. 研究の方法

(1) 培養細胞を用いたペプチド前駆体の探索

角化細胞に紫外線を曝露したのち、細胞からタンパク質を抽出し SDS-PAGE にて分離した。検出されたタンパク質のうち、発現変動の見られたタンパク質はペプチドマスフィンガープリンティング法にて同定を行った。また、同定されたタンパク質は RT-PCR 法やウェスタンブロット、免疫測定法により評価した。さらに、同定された受容体の発現について、RT-PCR 法により探索した。

(2) 組織中酵素群の切断特異性の決定

基質特異性の決定にはペプチド性基質を用いた (図 1)。ペプチド基質は、プロテアーゼにより切断されるとビオチンを有する N 端断片と C 端断片を生成する。N 端配列は、切断認識アミノ酸 X を除く配列が同一の構造を有しており、切断部位のアミノ酸 X の分子量の違いにより酵素の切断特異性を評価することができる。また、同じ分子量を持つロイシンとイソロイシンの評価を可能とするためにイソロイシンのグリシンスパースーの数を考えることで判別が可能である。合成基質をプロテアーゼにより消化した後、消化したビオチン標識ペプチドは、ストレプトアビジン-セファロースを用いてアフィニティ精製を行った。精製したビオチン標識ペプチドは、MALDI-TOF 質量分析により解析しプロテアーゼにより消化されたペプチド断片を探索した。つぎに、紫外線曝露した皮膚の抽出物中に存在するプロテアーゼの基質特異性について評価した。



(3) 皮膚組織中のセクレチン受容体の検出

紫外線曝露後の皮膚においてセクレチン前駆体やトリプシン様の基質特異性を持つプロテアーゼの発現が亢進していたことから、セクレチン前駆体がプロテアーゼにより消化されて図2の新規ペプチド(N端セクレチン)が生成すると考えられた。そこで、セクレチン前駆体が発現する皮膚組織においてセクレチン受容体が発現しているのかをRT-PCR法により検討した。

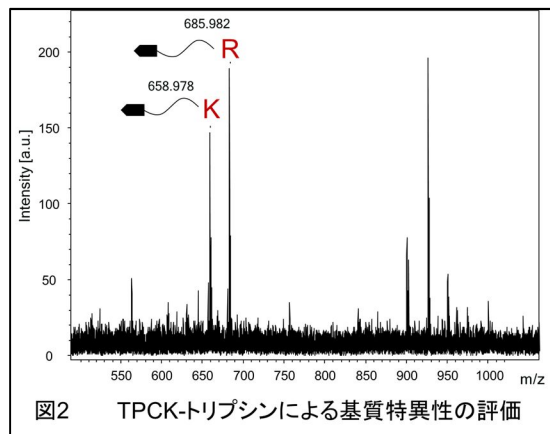
4. 研究成果

(1) 培養細胞を用いたペプチド前駆体の探索

紫外線を曝露した角化細胞に発現が亢進したタンパク質のうち、およそ15 kDaのタンパク質をペプチドマスフィンガープリンティング法により解析した結果、神経ペプチド、セクレチンの前駆体であることを明らかにした。そこで、セクレチン前駆体の発現変動についてmRNAの変化をリアルタイムPCR法にて、セクレチンタンパク質の発現変動をセクレチン特異エンザイムイムノアッセイ法にて評価した。その結果、紫外線の曝露によって、セクレチンmRNAおよびセクレチン様免疫活性成分の増加が認められた。つぎに、紫外線曝露によって発現が亢進したセクレチンの分子型をウエスタンブロットおよびゲルろ過法にて評価したところ、セクレチン前駆体のみが検出され、活性型のセクレチンは検出されなかった。

(2) 組織中酵素群の切断特異性の決定

合成基質により基質特異性の決定が可能であるかを、TPCK-トリプシンおよびV8プロテアーゼ、エラスターゼを用いて評価した。その結果、トリプシンでは、リジンおよびアルギニンのC端部位で切断を受けて生成した断片が検出された(図2)。また、V8プロテアーゼでは、グルタミン酸およびアスパラギン酸のC端部位で切断を受けて生成した断片が検出された。エラスターゼではアラニンとバリンのC末端で切断された断片が検出された。いずれもプロテアーゼの基質特異性と一致していた。一方、いずれのプロテアーゼもあらかじめ95℃で10分間加熱して失活させることにより、切断断片は検出されなかった。さらに、臭化シアンを用いた化学的切断においても、メチオニンのC末端部位で切断されたペプチド断片が検出された。以上の結果から、本決定法はプロテアーゼの基質特異性の決定が可能であることが示された。



つぎに紫外線曝露した皮膚抽出物中に発現するプロテアーゼの基質特異性について検討した。その結果、塩基性アミノ酸であるリジンおよびアルギニンのC端部位で切断するトリプシン様の切断特異性を有するプロテアーゼが検出された。そこで、トリプシン様切断活性を持つ酵素の検出試薬を用いて確認実験を行ったところ、紫外線曝露によってトリプシン様酵素活性は増加していた。

(3) 皮膚組織中のセクレチン受容体の検出

ラット皮膚組織からmRNAを調製し、セクレチン受容体mRNAの発現をRT-PCR法にて検討した。その結果、セクレチン受容体の発現量は部位により異なっており、光の曝露が少ない箇所ではセクレチン受容体mRNA発現が高い傾向が見られた。

以上の結果から、紫外線曝露後の皮膚においてセクレチン前駆体の産生が促進され、また、トリプシン様の基質特異性を持つプロテアーゼの発現が亢進していた。このことから、セクレチン前駆体がプロテアーゼにより消化されて生成するペプチドを推定すると、古典的な経路によって生成されるセクレチンよりも分子型が小さなペプチド(セクレチンN端部)が生成すると考えられた(図3)。現在、化学合成をしたセクレチンN端部を用いて、セクレチン受容体との結合活性および生理活性について評価を行っている。

ヒトセクレチン	HSDGTF ^T TSELSRLREGARLQ ^R LLQGLV-NH ₂
新規N端セクレチン	HSDGTF ^T TSELSR

図3 新規セクレチン関連ペプチド

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yamamoto Hiroyuki, Sawaguchi Yoshikazu, Kimura Michio	4. 巻 135
2. 論文標題 The Determination of Protease Specificity in Mouse Tissue Extracts by MALDI-TOF Mass Spectrometry: Manipulating PH to Cause Specificity Changes	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Visualized Experiments	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3791/57469	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yamamoto Hiroyuki, Saito Syota, Sawaguchi Yoshikazu, Kimura Michio	4. 巻 11
2. 論文標題 Identification of Protease Specificity Using Biotin-Labeled Substrates	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 The Open Biochemistry Journal	6. 最初と最後の頁 27～35
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2174/1874091X01711010027	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Hiroyuki Yamamoto, Naoyuki Wakamatsu, Ryota Yanagisawa, Kazuaki Iguchi	4. 巻 20
2. 論文標題 Expression of prosecretin in the keratinocyte after UV-irradiation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Cellular Archives	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山本博之、柳沢亮太、井口和明
2. 発表標題 角化細胞が産生するセクレチンの産生分泌機構の解析
3. 学会等名 第139年会日本薬学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山本博之、柳沢亮太、鹿村知令、板橋美奈、木村道夫
2. 発表標題 光線曝露は線維芽細胞のトリプシン-2発現を亢進する
3. 学会等名 第90回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山本博之、柳沢亮太、宮口裕美子、井口和明、木村道夫
2. 発表標題 紫外線曝露における角化細胞のセクレチン前駆体発現と分泌調節
3. 学会等名 第40回日本光医学・光生物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山本博之、柳沢亮太、鹿村知令、板橋美奈、木村道夫
2. 発表標題 光線曝露による線維芽細胞のトリプシン様プロテアーゼ活性の発現亢進
3. 学会等名 第40回日本分子生物学会年会・第90回日本生化学会大会生命科学系学会合同年次大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山本博之、柳沢亮太、宮口祐美佳、木村道夫、井口和明
2. 発表標題 紫外線曝露における角化細胞のセクレチン前駆体の発現誘導
3. 学会等名 日本薬学会第138年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----