

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：84404

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K09039

研究課題名(和文) 飽食シグナルとして機能する新規生理活性物質の同定と作用機構の解明

研究課題名(英文) Search and identification of novel bioactive substances as satiety signals

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・オープンイノベーションセンター・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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：申請者は現在、摂食・エネルギー代謝調節に関与するが、オーファン受容体であるGPCR-Xの内因性リガンド候補の単離に成功し、構造解析を進めている。本研究ではGPCR-Xのリガンド候補を同定するため、大量精製可能な組織の探索および関連物質の探索を実施した。大量精製可能な組織を見出すことはできず、本活性物質は代謝産物もしくは中間代謝物であることが推測された。また、活性を指標に同定した物質はGPCR-X関連物質ではなく、CHO細胞に内在するセロトニン受容体に結合し、その細胞内シグナルがGPCR-Xを介してカルシウムシグナルに変換された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、摂食調節因子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、オーファン受容体の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。本研究で見出された、GPCR-Xとセロトニン受容体とのクロストークはこれまで報告されていない。GPCR-Xに限らず、受容体間のクロストークに関する生理学的意義の多くは不明のままであり、研究の発展が期待できる。

研究成果の概要(英文)：We have already isolated a candidate as an endogenous ligand for GPCR-X, which regulates feeding and energy metabolism. But its structure is still unknown. In this study, to identify a candidate ligand for GPCR-X, we searched for tissues containing large amounts of ligand and related substances. We could not find tissues abundant in the ligand, suggesting that the ligand candidate was a metabolite or an intermediate metabolite. Next, we purified a GPCR-X-ligand-related substance using the intracellular calcium-increasing activity. However, that was not related. The compound bound to the serotonin receptor endogenously expressed in CHO cells, and its intracellular signal was converted to a calcium signal by GPCR-X.

研究分野：内分泌

キーワード：生理活性物質 GPCR 摂食 エネルギー代謝

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脳視床下部には、摂食行動やエネルギー代謝調節を制御する重要な神経核が存在し、多くの生理活性物質とその受容体が機能制御に関与する。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ペプチド性因子に注目し、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)。グレリンは成長ホルモン分泌促進作用だけでなく強力な摂食亢進作用を有することが明らかとなり、現在は治療応用へと研究を展開している。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ことを明らかにしている。

これらのペプチドだけでなく、摂食・エネルギー代謝を制御する因子の受容体の多くは G タンパク質共役型受容体 (GPCR) であり、ヒトゲノム解析が完了した結果、内因性リガンドの不明なオーファン GPCR 遺伝子が未だ数多く存在する。標的とするオーファン GPCR を細胞に過剰発現させ、リガンド結合による特異的活性 (細胞内 Ca^{2+} 上昇、cAMP 濃度変化等) を検出する方法により、当研究室ではラット組織抽出物からグレリンや NMU、NMS を単離・同定している。リガンドの物性 (ペプチド・アミン・脂質) が同じ受容体間におけるアミノ酸配列の相同性は高く、ペプチド性リガンドと予測されるオーファン GPCR は多く存在し、未知の生理活性ペプチドの存在が示唆されている。既に申請者は、摂食行動やエネルギー代謝を制御する視床下部に発現が高く、ペプチド性リガンドと予測されるオーファン GPCR について、内因性リガンド探索を進めてきた。申請者は現在、摂食・エネルギー代謝調節に関与するが、オーファン受容体である GPCR-X の内因性リガンド候補の単離に成功している。GPCR-X 欠損マウスはエネルギー代謝の減少、摂食亢進を伴う肥満を呈することが報告され、GPCR-X 特異的な合成アゴニストは摂食行動を抑制し、エネルギー消費を亢進させる。そのため、本研究において同定される GPCR-X 内因性リガンドは、新たな摂食・エネルギー代謝調節機構を提示する可能性が極めて高いことが考えられている。

2. 研究の目的

以上の研究背景をもとに、本研究では摂食・エネルギー代謝を制御する GPCR-X の内因性リガンドについて構造を決定し、細胞や個体レベルでの機能解析を行い、新たな飽食制御機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) GPCR-X 内因性リガンド候補のスクリーニングおよび関連物質の精製

ブタおよびラット各組織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 (いずれも現有設備) にて分画した。分子量の違いにより分離された各フラクションについて、逆相 HPLC にてさらに展開したサンプルを調製した。HEK293 および CHO 細胞に GPCR-X 遺伝子を導入し、受容体発現細胞 (一過性発現または安定発現) をそれぞれ作製した。調製したサンプルを受容体発現細胞に作用させ、リガンド結合に伴う細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇について、FLIPR (現有設備) を用いたスクリーニングを実施した。

上記スクリーニングより検出された標的受容体特異的な活性画分について、活性を指標にイオン交換、逆相 HPLC を組み合わせることにより、さらに精製を進めた。単離された活性物質は質量分析計 (現有設備) を用いて構造決定した。

(2) GPCR-X 内因性リガンド関連物質の薬理的性質の検証

同定した化合物について合成品を購入し、GPCR-X 発現細胞に作用させ、リガンド結合に伴う細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇を FLIPR にて検出した。5-HT_{1B} 受容体選択的アンタゴニストとして、GR 127935 を使用した。アンタゴニスト処理方法として、GPCR-X 発現細胞に Ca^{2+} 指示薬を導入・洗浄後、アンタゴニストを室温にて 10 分間作用させた。その後、洗浄することなくアゴニストを添加、FLIPR にて細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇を検出した。また、 $G\alpha_i$ 阻害薬として、百日咳菌毒素 (Pertussis Toxin、以下 PTX と表記) を使用した。GPCR-X 発現細胞に PTX を 37 にて 16 時間作用させた後、 Ca^{2+} 指示薬を導入・洗浄を行い、アゴニスト添加による Ca^{2+} 濃度上昇を検出した。

4. 研究成果

(1) GPCR-X 内因性リガンド候補のスクリーニングおよび関連物質の精製

GPCR-X の内因性リガンド候補の組織含有量は非常に少なく、構造決定するために大量の活性物質が必要となる。本研究期間にて、含有量の高い組織の探索を進めたが、大量精製可能な組織を見出すことはできなかった。収量が微量であり、含有量が不安定であるため、本活性物質は代謝産物もしくは中間代謝物であることが推測された。

そこで、GPCR-X の内因性リガンド候補の生合成経路に関わる物質を特定できれば、大量精製しなくても活性物質を同定できると考え、関連物質の探索を実施した。その結果、GPCR-X リガンド候補とは異なる画分に Ca^{2+} 上昇活性を検出した。本活性は、一過性発現系にて GPCR-X 特異

的に検出され、GPCR-X アンタゴニスト処理により消失した。そのため、本活性は GPCR-X 特異的であり、GPCR-X リガンド候補の生合成経路に関わることが示唆された。活性を指標に精製・単離し、構造解析を進めた結果、この物質は既知の低分子有機化合物（以下、化合物 X と表記）であることを明らかにした。

（ 2 ） GPCR-X 内因性リガンド関連物質の薬理的性質の検証

GPCR-X を発現させた CHO 細胞に化合物 X を添加した結果、リガンド濃度に依存した細胞内 Ca^{2+} 上昇活性を検出することができた。本活性は、GPCR-X を発現させていない CHO 細胞では検出されなかった。また、HEK293 細胞に GPCR-X を発現させても本活性は検出できなかった。そのため、化合物 X は GPCR-X に結合し作用するのではなく、CHO 細胞に内在するタンパク質に結合し作用することにより、細胞内 Ca^{2+} 濃度を上昇させていることが示唆された。

化合物 X はセロトニンと構造的に類似しており、セロトニン受容体に作用している可能性が高いため、CHO 細胞に内在するセロトニン受容体の発現を RT-PCR 法にて検索した。その結果、CHO 細胞は主にセロトニン 1B 受容体（以下、5-HT_{1B} と表記）を発現していた。化合物 X による Ca^{2+} 上昇活性は、5-HT_{1B} 選択的アンタゴニストである GR 127935 によって競合的に阻害されたため、化合物 X は CHO 細胞に内在する 5-HT_{1B} に結合し、細胞内 Ca^{2+} 上昇を示すことが明らかとなった。先行研究より、5-HT_{1B} は G_i 共役型受容体であることが知られている。化合物 X による Ca^{2+} 上昇における G_i タンパク質の寄与を検証するため、GPCR-X 発現細胞に PTX 処理を行い、G_i と受容体との機能共役を阻害した。その結果、化合物 X による細胞内 Ca^{2+} 上昇活性は消失した。これまでの研究において、5-HT_{1B} 活性化により細胞内 Ca^{2+} 上昇活性を示す報告はない。また、本研究の精製過程において、GPCR-X アンタゴニスト処理により化合物 X による Ca^{2+} 上昇は消失した。そのため、5-HT_{1B} 活性化による細胞内 Ca^{2+} 上昇は、GPCR-X により制御されている可能性が考えられた。そこで、化合物 X による Ca^{2+} 上昇に対する GPCR-X の影響を検討した。GPCR-X に対する合成アゴニストを作用させた際、GPCR-X アンタゴニスト濃度の上昇に伴い、競合的拮抗が起こり、最大活性を下げることなく、容量反応曲線は高濃度側にシフトした。一方、化合物 X では、EC₅₀ を維持したまま最大活性だけが下がり、非競合的拮抗を受けていることが明らかとなった。以上より、今回同定した化合物 X は CHO 細胞に内在する 5-HT_{1B} 受容体に結合し、その細胞内シグナルが GPCR-X を介して Ca^{2+} シグナルに変換されたと考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yoshihara Fumiki, Hosoda Hiroshi, Doi Takahito, Yoshida Morikatsu, Kitamura Kazuo, Yamamoto Haruko, Asami Yasuhide, Ishibashi-Ueda Hatsue, Kishida Masatsugu, Arisato Tetsuya, Matsuo Miki, Miyazato Mikiya, Yasuda Satoshi	4. 巻 25
2. 論文標題 Combined evaluation of plasma B-type natriuretic peptide and urinary liver-type fatty acid-binding protein/creatinine ratio is related to worsening renal function in patients undergoing elective percutaneous coronary intervention	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Clinical and Experimental Nephrology	6. 最初と最後の頁 1319 ~ 1328
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10157-021-02113-9	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 -

1. 著者名 Sakai Naoko, Ohno Hayao, Yoshida Morikatsu, Iwamoto Eri, Kurogi Akito, Jiang Danfeng, Sato Takahiro, Miyazato Mikiya, Kojima Masayasu, Kato Johji, Ida Takanori	4. 巻 559
2. 論文標題 Characterization of putative tachykinin peptides in Caenorhabditis elegans	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 197 ~ 202
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2021.04.063	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 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	宮里 幹也 (Miyazato Mikiya) (50291183)	国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・部長 (84404)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------