

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：84404

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K22836

研究課題名（和文）エネルギー代謝を司る腸内細菌叢由来の新規ペプチド性因子の探索と機能解析

研究課題名（英文）Search for novel peptides that regulate energy metabolism from gut microbiota

研究代表者

宮里 幹也（Miyazato, Mikiya）

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

研究者番号：50291183

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：腸内細菌叢のバランス異常（dysbiosis）は肥満の病態や糖尿病の発症に直接的な役割を果たしているが、腸内細菌に由来したペプチド性因子を介した制御機構は知られていない。本研究課題では、腸内細菌叢より産生される新たなペプチド性因子を同定することを目的に研究を実施した。標的受容体へのリガンド結合に伴う細胞内シグナルを指標に、ラット糞便抽出物をスクリーニングした結果、2種類の因子の単離・同定に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腸内細菌叢を含む腸管管腔において、液性因子を介した宿主への生体調節機構の多くは未解明のままである。本研究における腸管管腔内に産生された新規ペプチド性因子と受容体を介した生体調節は、肥満症や糖尿病等に対する新薬開発の新しいアプローチを提示する可能性が高く、発展性のある研究テーマである。

研究成果の概要（英文）：Although dysbiosis plays a direct role in the pathogenesis of obesity and diabetes, the regulatory mechanism via peptidic factors derived from intestinal bacteria is unknown. In this research project, we aimed to identify new peptidergic factors produced by the intestinal microbiota. Using intracellular signals associated with ligand binding to target receptors, we screened rat fecal extracts and succeeded in identifying two types of peptidic factors.

研究分野：内分泌

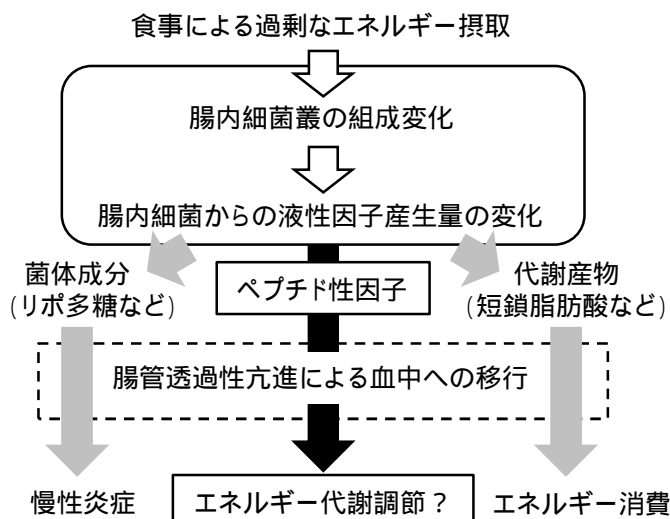
キーワード：生理活性ペプチド 腸内細菌 エネルギー代謝 GPCR

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

これまで申請者の研究室では、細胞間情報伝達物質として未知の生理活性ペプチドを数多く発見し、新たな生体調節機構を明らかにしてきた。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。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。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。

近年、腸内細菌叢組成の変化が生体のエネルギー代謝等に関与することにより、肥満の病態や糖尿病の発症に直接的な役割を果たすことが報告されている。肥満者や2型糖尿病患者では腸管透過性が亢進しており、菌体成分の血中移行により全身への慢性炎症が惹起され、インスリン抵抗性を増大させ、耐糖能異常を引き起こす。一方、腸内細菌より産生された短鎖脂肪酸は、特異的受容体を介し、腸管内分泌細胞からの摂食抑制ペプチドの分泌促進や交感神経系の活性化を介したエネルギー消費亢進作用を有する。これらより、肥満・糖尿病発症の上流に腸内細菌叢の異常が位置しており、腸内細菌は治療標的として非常に重要であると考えられる。



【図1】本研究構想の概略図

生理活性ペプチドの受容体の多くは G タンパク質共役型受容体 (GPCR) であり、リガンド不明なオーファン GPCR は数多く存在する。また、遺伝子欠損マウスの解析より、エネルギー代謝に関与し、ペプチド性リガンドと予測されるオーファン GPCR は多く報告されており、未知のエネルギー代謝調節ペプチドの存在が示唆されている。高脂肪食摂取、過食及び消費エネルギー低下は腸内細菌叢組成を変化させ、ペプチドに対する腸管透過性も亢進されると予想される。以上より、「一つの臓器」と考えられる腸内細菌叢よりペプチド性因子が産生され、肥満の病態や糖尿病の発症に伴う腸管透過性の亢進により、内分泌因子として様々な臓器に発現するオーファン GPCR だけでなくリガンド既知 GPCR にも作用し、エネルギー代謝を制御可能ではないかという構想を得た (図1)。

2. 研究の目的

本研究では、腸内細菌叢より産生される新たなペプチド性因子を同定し、細胞や個体レベルでの機能解析を行い、新しいエネルギー代謝調節機構を解明することを目的に研究を実施した。

3. 研究の方法

(1) 腸内細菌叢からのペプチド画分調製

通常食ラット糞便 (約 2kg) を煮沸して内因性プロテアーゼを失活させた後、ペプチド成分を酢酸にて抽出した。抽出物をイオン交換、ゲル濾過クロマトグラフィーの順に分画したサンプルを調製した。

(2) オーファン GPCR 及びリガンド既知 GPCR に対するリガンド探索

ペプチド性リガンドと予測されたオーファン GPCR である BRS3、GPR19、GPR37、GPR37L1、GPR39、GPR83、GPR101、GPR139、GPR142、GPR150、GPR151 を標的とした。また、既知の生理活性ペプチド受容体であり、摂食やエネルギー代謝、糖脂質代謝制御に関わる GHSR、NMBR、GRPR、NMUR1、NMUR2、PAC1、AT1、AT2、BK1、BK2、CCKA、CCKB、GCGR、GLP1R、KISS1R、NPSR、NTSR1、NTSR2、DOR、KOR、MOR、ORL1、Y1、Y2、Y4、Y5 も標的とした。HEK293 もしくは CHO 細胞に標的 GPCR 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) を作製した。ラット糞便より抽出したペプチド画分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+} 濃度上昇を FLIPR、細胞内 cAMP 濃度変化について EnVision (すべて現有設備) を用いてスクリーニングを実施した。抽出物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 (現有設備) を組み合わせて精製した。単離されたペプチドはペプチドシーケンサー及び質量分析計 (ともに現有設備) を用いて構造、分子量を決定した。

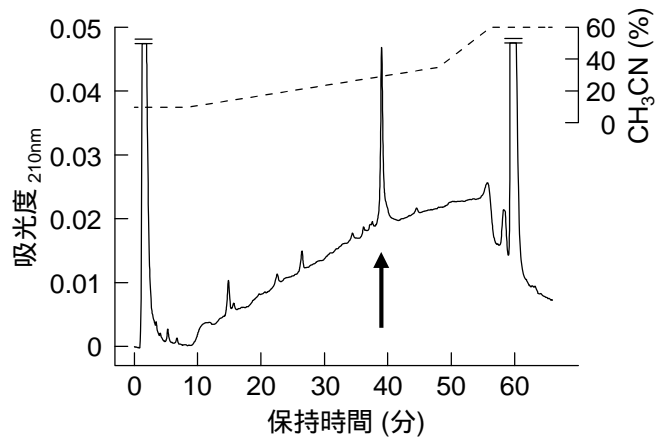
4. 研究成果

(1) オーフアン GPCR に対するリガンドの同定

摂食・エネルギー代謝調節に関与するが、結合するリガンドが不明な受容体 (GPCR-X と命名) 発現細胞において、ラット糞便抽出物より細胞内 Ca^{2+} 上昇活性の検出に成功した。活性を指標に精製を行い、最終的に活性物質を単離した。構造解析の結果、本物質はアミノ酸代謝物の一種であることを明らかにした (化合物 X と命名)。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。一方、HEK293 細胞に GPCR-X を発現させた系において、化合物 X による Ca^{2+} 上昇は検出されなかった。そのため、本活性は CHO 細胞に内在する受容体を介していることが示唆された。

(2) リガンド既知 GPCR に対するリガンドの同定

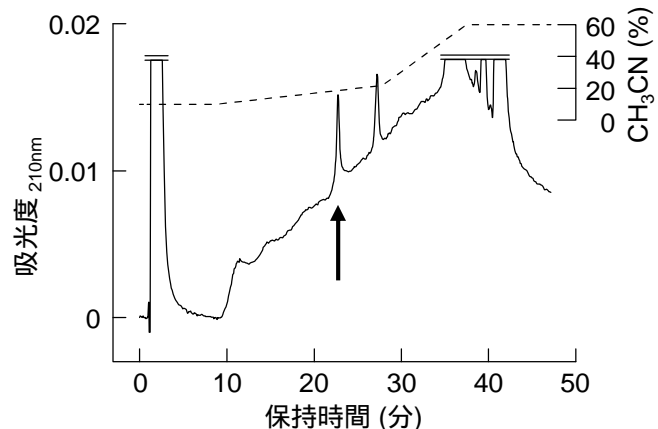
消化管より分泌され、栄養吸収を促進させる生理活性ペプチドの受容体 (GPCR-Y と命名) 発現細胞において、ラット糞便抽出物より受容体特異的は Ca^{2+} 上昇活性を検出した。活性を指標にイオン交換、逆相 HPLC を組み合わせて精製を行い、2 種類のペプチド性因子の単離に成功した (ペプチド Y1、ペプチド Y2 と命名、図 2 および図 3)。構造解析の結果、ペプチド Y1 はラットより産生され、腸管管腔内に分泌されるタンパク質に由来することが明らかとなった。また、ペプチド Y2 のアミノ酸配列の一部はペプチド Y1 と同一であった。しかし、ペプチド Y2 をコードする前駆体は帰属できなかった。



【図 2】ペプチド Y1 の精製 (矢印)

(3) ペプチド Y1 の生化学的性質

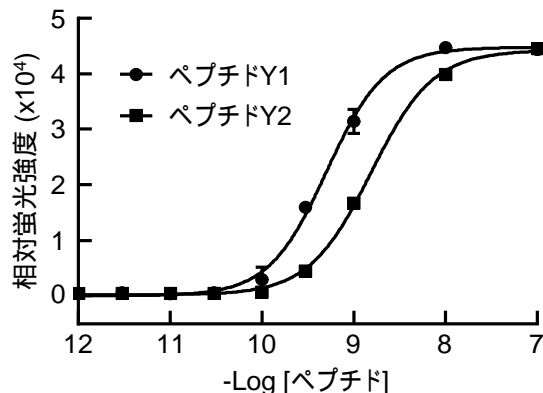
ペプチド Y1 は腸管管腔内に分泌されるタンパク質に由来したため、抽出する際の加熱処理により人工的に切断・産生された可能性を検討した。その結果、ラット糞便の加熱処理の有無に関係なく、ペプチド Y1 は検出された。そのため、前駆体より酵素的切断を受けて産生されたと考えられた。今後、ラット組織においてペプチド Y1 認識抗体によるラジオイムノアッセイや抗体アフィニティ精製を行い、ペプチド Y1 の産生・分泌機構及び分子型を明らかにする。



【図 3】ペプチド Y2 の精製 (矢印)

(4) ペプチド Y1 およびペプチド Y2 の薬理的性質

ペプチド Y1 およびペプチド Y2 を化学合成し、GPCR-Y にそれぞれ作用させた結果、容量依存的な細胞内 Ca^{2+} 上昇活性を示した (図 4)。いずれのペプチドも半数効果濃度 (EC_{50}) は低く、ペプチド Y1 は約 0.3nM、ペプチド Y2 は約 1nM であり、効力の強いペプチドであることが明らかとなった。また、これらの活性は GPCR-Y 選択的アンタゴニストにより競合的に阻害された。そのため、ペプチド Y1 およびペプチド Y2 は GPCR-Y 内因性リガンドと結合部位を共有することが考えられた。



【図 4】GPCR-Y 発現細胞におけるペプチド Y1 およびペプチド Y2 による Ca^{2+} 上昇活性

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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	吉田 守克 (Yoshida Morikatsu) (70393212)	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 (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