

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：32203

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2012

課題番号：21770149

研究課題名（和文） 血液中のグレリン代謝経路の解明およびグレリン代謝酵素の精製と遺伝子クローニング

研究課題名（英文） Mechanisms involved in ghrelin degradation in circulation and identification of its processing enzymes.

研究代表者

佐藤 元康 (SATOU MOTOYASU)

獨協医科大学・医学部・助教

研究者番号：20418891

研究成果の概要（和文）：グレリンは成長ホルモンの分泌・食欲調節を含むエネルギー代謝の調節だけでなく、免疫機能などにも関わるペプチドホルモンである。本研究では、血中よりグレリンの脂肪酸修飾を加水分解する酵素として APT1 を、またペプチド鎖を切断する酵素として APC と TAFI をそれぞれ精製し、遺伝子クローニングをおこなった。さらに、これらの反応によって生じるグレリン分解産物の生物活性について、細胞分化能の亢進などの働きをもつことを突き止めた。

研究成果の概要（英文）：A peptide hormone ghrelin has diverse physiological actions including growth hormone release, appetite control and immunomodulation. In this study, the ghrelin deacylation enzyme (APT1) and two ghrelin peptidases (APC and TAFI) were purified from animal blood, and their cDNAs were isolated. The enzymatically processed forms showed synergistic or distinctive roles in ghrelin actions such as cell differentiation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010 年度	800,000	240,000	1,040,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
2012 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物化学・機能生物化学

キーワード：グレリン、酵素、ペプチドホルモン、酵素、脂質修飾、タンパク質精製

## 1. 研究開始当初の背景

グレリンの生理活性はエネルギー代謝の調節をはじめ広範に渡るが、その多様性を説明する分子機構については不明な点が多い。グレリンは他のペプチドホルモンにみられるようなサブタイプが存在せず、グレリン受容体は遺伝子としては2つのバリエーションが存

在するものの、その一つは偽遺伝子とされており機能しない。いっぽうで、血中グレリンは動物種により若干の違いはあるが数分以内に半減期を迎える。このような代謝機構についても責任酵素などの情報はほとんど明らかになっていなかった。

## 2. 研究の目的

グレリン機能の多様性を支える分子基盤の一つとして血中における分解産物に注目し、これらの生成機序の解明を目指す。また、これらグレリン分解産物による生体機能の調節について新規の作用点を見出し、分子機構を解明する。

## 3. 研究の方法

(1) 動物血液によるグレリン分解を質量分析計によりモニターしながら、その責任酵素の精製・遺伝子クローニングをおこなった。ウシ血清 (FBS)、ウマ血清 (HS)、ウシ血漿 (BP) のグレリン脱アシル化活性 (図1左) およびコリンエステラーゼ活性 (図1右) を示す。

(2) (1) により同定された酵素によるグレリン分解産物の生理活性について主に細胞レベルで評価をおこなった。

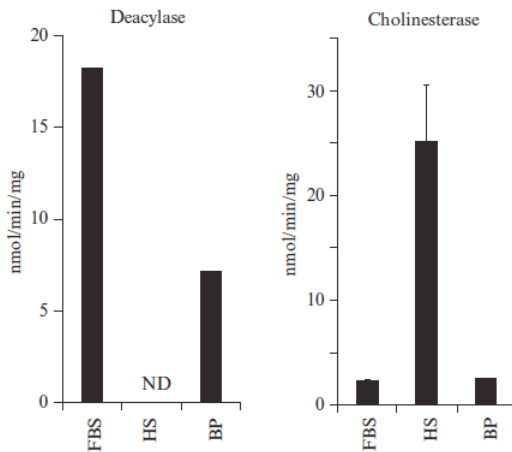


図1

## 4. 研究成果

### (1) グレリン分解酵素の精製と遺伝子クローニング

①グレリン脱アシル化酵素の同定と酵素学的な性質の解析：ウシ血清よりアシルプロテインチオエステラーゼ1 (APT1) を単離した。さらに、APT1 の cDNA を取得し、大腸菌を宿主としてリコンビナント APT1 を精製し、このタンパク質についてグレリン脱アシル化活性 (図2左) およびリゾホスホリパーゼ活性 (図2右) を確認した。②ウシ血漿より APT1 とは異なるグレリン脱アシル化活性を見出して精製を試みたが部分精製標品から単一の分子を同定することはできなかった。③グレリンエンドペプチダーゼの同定と酵素学的な性質の解析：ウシ血漿よりグレリンの15番目のアルギニンと16番目のリジン切断する活性を見出し、この反応が活性

化プロテインC (APC) によって触媒されることを発見した。

④グレリンカルボキシペプチダーゼの同定：ウシ血漿より APC によって生成する短縮型グレリン15のカルボキシル末端のアルギニンを消化する酵素トロンビン活性化フィブリン分解抑制タンパク質 (TAFI) を見出した。

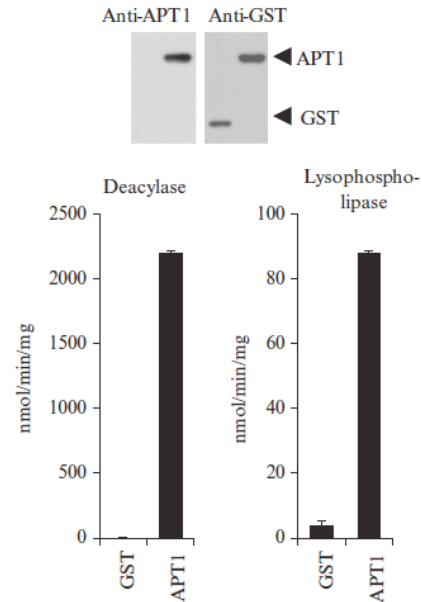


図2

### (2) グレリン分解酵素の機能解析

①APT1：マクロファージ様細胞 RAW264.7 ではリポポリサッカライド (LPS) 刺激によって APT1 の分泌が亢進した。炎症性の刺激により血中グレリン濃度が低下するメカニズムを説明するものと考えられる。また、APT1 はPC12の軸索伸長モデルを用いた解析から、神経分化に伴って発現量が低下することを明らかにした。これは cAMP 濃度の上昇に伴う APT1 遺伝子の発現低下によるものと考えられた。

②新規グレリン脱アシル化酵素：部分精製標品の解析から、APT1 とは異なり Triton-X100 により失活するマクログロブリン様モチーフをもつ100kDを越えるタンパク質分子であることが予想された。

③APC：in vitro ではアシル化グレリン、脱アシル化グレリンのいずれも基質であることを確認した。

### (3) グレリン分解産物の機能解析

①グレリン受容体依存性のシグナル伝達機構：PC12細胞を用いた EGR1 遺伝子の活性化を指標とするレポーター遺伝子アッセイを用いて評価をおこなった (図3)。脱アシル

化グレリンは既に報告されているとおりグレリン受容体 GHSR1a を活性化しないことを確認した。また、APC により切り出される短縮型グレリン 15 は全長型に準じる受容体活性化能を有していた。

②細胞分化能：筋芽細胞 C2C12 の筋分化に対する影響を検討した。脱アシル化グレリン、グレリン 15 とともに C2C12 の分化を亢進させた。この細胞株は GHSR1a を発現していないことから、新規のグレリン受容体の存在が示唆される。

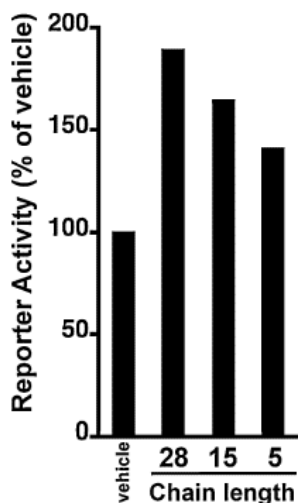


図 3

#### (4) 研究の位置づけ、インパクト

これまでグレリン遺伝子の発現制御機構やアシル化修飾酵素の解析は研究が進んでいた。いっぽうで、グレリン分解経路についてはほとんど不明であった。本研究により 4 つのグレリン分解酵素が同定され、血中代謝の動態について凝固・線溶系との関わりが深いことが世界に先駆けて明らかにされた。すなわち、血液中のグレリンは APT1 により脱アシル化を受ける。一方、28 残基のペプチドは APC と TAFI により N 末端側のグレリン 15 およびグレリン 14 を生じる。C 末端側ペプチドは血中で非常に不安定であるため、未同定のエステラーゼにより速やかに分解される (図 4)。

グレリンは食欲調節を正に調節するだけでなく、血糖値や脂質代謝にも影響を与えるとの報告がある。いわゆるメタボリック・シンドロームのような代謝異常は心血管系の慢性炎症であるという新しいスキームが国内外でホットなトピックスになっており、グレリンが心血管系の保護作用をもつことと、心血管イベントがしばしば凝固系を活性化することとの機能的な関連が予想される。今後はこれらについて個体レベルでの解析を進めていく予定である。

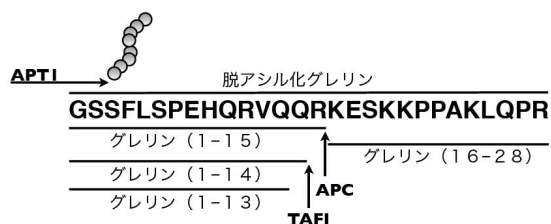


図 4

#### 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 6 件)

① Satou M, Sugimoto, H. The study of ghrelin deacylation enzymes. *Methods Enzymol.* 514:165-179, 2012.

査読あり

DOI 10.1016/B978-0-12-381272-8.00011-8

② Satou M, Nakamura Y, Ando H, Sugimoto H: Understanding the functional significance of ghrelin processing and degradation. *Peptides* 32: 2183-2190, 2011.

査読あり

DOI 10.1016/j.peptides.2011.06.029

③ Satou M, Nishi Y, Yoh J, Hattori, Y, Sugimoto H: Identification and characterization of Acyl-protein thioesterase1/lysophospholipase I as a ghrelin deacylation/lysophospholipid hydrolyzing enzyme in fetal bovine serum and conditioned medium. *Endocrinol* 151(10): 4765-4775, 2010.

査読あり

DOI 10.1210/en.2010-0412

[学会発表] (計 10 件)

① 「血中グレリン切断酵素の精製と分解産物の生理活性」

佐藤元康、西芳寛、杉本博之

第54回日本脂質生化学会、2012年6月8日、福岡

② 「PC12細胞の神経突起伸長におけるアシルプロテインチオエステラーゼ 1 の機能的役割」

佐藤元康、西芳寛、杉本博之

第84回日本生化学会、2011年9月24日、京都

③「グレリン受容体を介したEGR-1遺伝子の活性化に対するPI3K非依存的なLY294002の効果」

佐藤元康、西芳寛、杉本博之

第33回日本分子生物学会、2010年12月9日、神戸

④「活性型プロテインCによる短縮グレリン(1-15)の生成とその生理活性」

佐藤元康・西芳寛・杉本博之

第32回日本分子生物学会年会 2009年12月12日、横浜

〔図書〕(計0件)

論文等照会先

Read & Researchmap

<http://researchmap.jp/satoumdokkyomed/>

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

佐藤 元康 (SATOU MOTOYASU)

獨協医科大学・医学部・助教

研究者番号：20418891

### (2) 研究協力者

西 芳寛 (NISHI YOSHIHIRO)

久留米大学・医学部・講師

研究者番号：20352122