

機関番号：17601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21780268

研究課題名(和文) 新規生理活性ペプチドの発見と哺乳類への応用

研究課題名(英文) Discover of novel bioactive peptide and application to mammal

研究代表者

井田 隆徳 (IDA TAKANORI)

宮崎大学・IR 推進機構・助教

研究者番号：00381088

研究成果の概要(和文): リガンドが不明なオーファン受容体に対する新規生理活性ペプチドを発見することは、新たな生理機能の解明や創薬の観点から非常に重要である。しかし、近年その発見は減少している。私は対象をモデル生物に変え、その情報を元に哺乳類での発見につなげようと考えた。その結果、ショウジョウバエにおいて新規生理活性ペプチドを発見し、解析した。

研究成果の概要(英文): It is very important to discover a novel bioactive peptide to the orphan receptor. However, the number of novel bioactive peptides in mammals that have been discovered has recently been tapering off. To change through this situation, I have selected drosophila, a useful model organism, as a subject to search for and hopefully discover novel bioactive peptides. As a result, a new bioactive peptide was discovered, and analyzed in the drosophila.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学 基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：新規生理活性ペプチド、オーファン GPCR、ショウジョウバエ

1. 研究開始当初の背景

私はこれまでグレリン、ニューロメジン U,S などの生理活性ペプチドについて、ラットへの投与実験やノックアウトマウスを用いた生理作用の解明を行ってきた。その過程で、新しい生理活性ペプチドを発見して、その機能解明を行う研究は、新しい研究分野の開拓に繋がり、将来大きな展開が期待される研究だと思った。しかし、哺乳類では最近、

新規生理活性ペプチドは発見されていない。そこで私は視点を換え、ペプチドの抽出材料としてショウジョウバエを用い、哺乳類のオーファン受容体(リガンド不明)にホモロジーの高いショウジョウバエ・オーファン受容体のリガンド探索を行うことにした。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ショウジョウバエなどの

モデル生物において新規生理活性ペプチドを発見し、その情報を元に、ホ乳類での探索に応用すること、また、機能解析を行うことにより、生理作用の解明、病態モデル動物の作出を目指すことである。

3. 研究の方法

(1) ターゲットとなる受容体の選択

ショウジョウバエではオーファン受容体のうち、リガンドが生理活性ペプチドであると考えられるものは約 50~100 種類は存在すると推測されている。これらの生理活性ペプチド受容体と推測されるものをターゲット受容体として選択する。

(2) 受容体発現細胞を使ったアッセイ系の構築
ターゲットとしたオーファン受容体の cDNA を発現ベクターに組み込み、培養細胞にトランスフェクトし、受容体の安定発現細胞株を得る。この発現細胞株にショウジョウバエから抽出したペプチド・サンプルを添加し、セカンド・メッセンジャーの変化を測定するアッセイ系を構築する。具体的には細胞内のカルシウム濃度、cAMP 濃度、cGMP 濃度、アラキドン酸代謝物、膜ポテンシャル、細胞内 pH などの変化を測定する

(3) 内因性リガンドの同定、機能解析

ショウジョウバエからペプチド画分を抽出し、各種クロマトグラフィーにて展開する各フラクションのサンプルを、(2)で構築したオーファン受容体発現細胞株に反応させ、細胞内セカンドメッセンジャーの変化を測定する。これらのアッセイ法を指標として内因性リガンドを精製し、構造決定する。また、発見したペプチドについての過剰発現系やノックダウン系を用い、機能解析を行う。

4. 研究成果

(1) ショウジョウバエオーファン受容体発現細胞株を 20 種類樹立。

(2) 線虫オーファン受容体発現細胞株を 15 種類樹立。

(3) サンプルとしてのショウジョウバエ、2 kg 回収後、ゲル濾過抽出完了。

(4) サンプルとしての線虫、200 g 回収後、ゲル濾過抽出完了。

(5) ショウジョウバエにおいて 4 個の新規生理活性ペプチドを発見。

(6) 作用するショウジョウバエ受容体に類似するホ乳類受容体発現細胞株を 12 種類樹立。

(7) マウス 1000 頭分、脳、心臓、小腸、肺、精巣回収後、ゲル濾過抽出完了。

(8) ショウジョウバエ受容体に反応する、マウス由来生理活性ペプチド 2 個、同定。

(9) ショウジョウバエ新規生理活性ペプチドに対する特異抗体、4 種類作成。

(10) 免疫染色により、発現分布、同定。

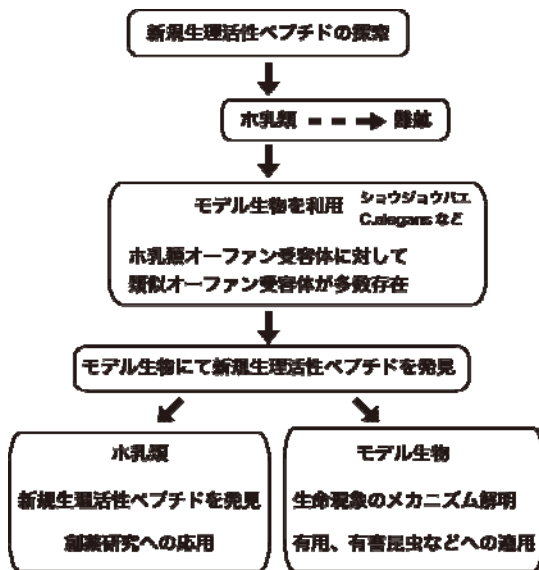
(11) 発見したショウジョウバエ新規生理活性ペプチド、受容体に対する遺伝子欠損、RNAi、過剰発現系を作成。

(12) そのうちの一つのペプチドについて、過剰発現系、RNAi 系統ではラジオイムノアッセイによって遺伝子レベルのみならずペプチドレベルでも増減していることを確認した。さらにそれら系統でのマイクロアレイ、行動解析によって発育異常、脂肪代謝異常を見いだした。

(13) 発見したショウジョウバエ新規生理活性ペプチドをクロキンバエ (Bowl fly) に投与した結果、一つでは強力な摂食抑制作用、一つでは摂食更新作用を示すことを発見した。またその効果は、受容器での感受性の変化ではなく、中枢性に調節されていること、昆虫での食欲をコントロールするのにおいに影響を受けないことを見いだした。

(14) 昆虫において摂食行動を抑制するペプチドについて、マウスに投与して検討した結果、マウスにおいても摂食行動、また腸管運動を抑制することを見いだした。現在、ホ乳類のどの受容体に作用するのか、その結果、どのような作用機序でホ乳類に影響

を与えるのか解析中である。



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)

英語論文は全て査読有り

Sato T, Nakashima Y, Nakamura Y, Ida T, Kojima M

Continuous Antagonism of the Ghrelin Receptor Results in Early Induction of Salt-Sensitive Hypertension.

J Mol Neurosci, 43(2):193-9;2011

Nakahara K, Katayama T, Ida T, Mori K, Miyazato M, Kangawa K, Murakami N

Comparison of feeding suppression by the anorexigenic hormones neuromedin U and neuromedin S in rats

J. Endocrinology, 207(2):185-93; 2010

Ida T, Miyazato M, Lin XZ, Kaiya H, Sato T, Nakahara K, Murakami N, Kangawa K, Kojima M

Purification and characterization of caprine ghrelin and its effect on growth hormone release

J Mol Neurosci. 42(1):99-105;2010

Nakashima Y, Ida T, Sato T, Nakamura Y, Takahashi T, Mori K, Miyazato M, Kangawa K, Kusukawa J, Kojima M

Neuromedin U is necessary for normal gastrointestinal motility and is regulated by serotonin

Ann N Y Acad Sci.1200:104-11;2010

Takahashi T, Ida T, Sato T, Nakashima Y, Nakamura Y, Tsuji A, Kojima M.

Production of n-octanoyl-modified ghrelin in cultured cells requires prohormone processing protease and ghrelin O-acyltransferase, as well as n-octanoic acid.

J Biochem. 146(5):675-82;2009

Ohgusu H, Shirouzu K, Nakamura Y, Nakashima Y, Ida T, Sato T, Kojima M.

Ghrelin O-acyltransferase (GOAT) has a preference for n-hexanoyl-CoA over n-octanoyl-CoA as an acyl donor.

Biochem Biophys Res Commun. 386(1):153-158;2009

査読無し

井田隆徳、**児島将康**

ニューロメジン U、ニューロメジン S

日本臨床 肥満症第 2 版 68:83-86;2010

[学会発表](計 5 件)

井田隆徳、**糸和彦**、**佐藤貴弘**、**児島将康**

モデル生物を利用した新規生理活性ペプチドの探索

第 150 回日本獣医学会学術集会

2010 年 9 月 16 日 帯広畜産大学

井田隆徳、**糸和彦**、**佐藤貴弘**、**児島将康**、

ショウジョウバエオーファン受容体に対する新規生理活性ペプチドの探索と解析

第 7 回 GPCR 研究会。

2010 年 5 月 7 日 東京

Ida T, Sato T, Kojima M

Identification of novel peptides for orphan GPCRs in *Drosophila*

14th International Congress of Endocrinology
March 29, 2010 Kyoto, Japan

井田隆徳、高橋知子、中島義基、中村祐輔、
佐藤貴弘、児島将康。
ショウジョウバエオーファン受容体に対するリガンド探索。
日本内分泌学会第 27 回内分泌代謝学サマー
セミナー。
2009 年 7 月 16 日， 福井

井田隆徳、高橋知子、佐藤貴弘、児島将康。
Deorphanized drosophila GPCRs。
第 6 回 GPCR 研究会。
2009 年 5 月 8 日， 東京

〔産業財産権〕

出願状況（計 1 件）

名称：ショウジョウバエ由来生理活性ペプチド
発明者：**井田隆徳** 児島将康 桑和彦
権利者：久留米大学 熊本大学
種類：特許権
番号：特願：2010-045816
出願年月日：平成 22 年 3 月 2 日
国内外の別：国内

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
[http://www.cc.miyazaki-u.ac.jp/a0d203u/
index.html](http://www.cc.miyazaki-u.ac.jp/a0d203u/index.html)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

井田 隆徳 (IDA TAKANORI)
宮崎大学・IR 推進機構・助教
研究者番号：00381088

(2)研究分担者

研究者番号：

(3)連携研究者

研究者番号：

(4)研究協力者

村上 昇 (MURAKAMI NOBORU)
宮崎大学・農学部・獣医学科・教授

桑 和彦 (KUME KAZUHIKO)
熊本大学・発生医学研究所・准教授

佐野 浩子 (SANO HIROKO)
お茶の水女子大学・お茶大アカデミック
プロダクション・特任助教

富永 初美 (TOMINAGA HATSUMI)
宮崎大学・技術職員