

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570094

研究課題名(和文) 翻訳後修飾において神経ペプチドのアミノ酸をD型化する酵素に関する研究

研究課題名(英文) Studies on the enzyme that catalyzes D/L-isomerization of an amino acid during the post-translational modification of neuropeptide precursor.

研究代表者

森下 文浩 (Morishita, Fumihiro)

広島大学・理学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：20210164

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、軟体動物アメフラシの神経ペプチド(NdWFa)のトリプトファンをD型化する酵素の同定を試みた。まず、サブトラクション法で、NdWFa発現ニューロン特異的cDNAを調製し、それらがコードする機能不明でシグナル配列をもつ4種の蛋白質をD型化酵素の候補とした。一方、その候補遺伝子を共発現させ、NdWFaの産生・分泌を確かめるため、NdWFa前駆体遺伝子を発現するCHO-K1細胞の作出を試みた。リポフェクション法によるNdWFa前駆体遺伝子の導入と発現には成功したが、NdWFaの細胞外への分泌は確認できなかった。今後は、NdWFa発現系を確立し、D型化酵素の候補遺伝子の機能解析を目指す。

研究成果の概要(英文)：NdWFamide (NdWFa) is a D-amino acid containing neuropeptide of the marine gastropod, *Aplysia kurodai*. In this study, we attempt to identify the peptidyl D/L-isomerase (PI) that catalyzes the D-/L-conversion of NdWFa in *Aplysia*. To this end, we prepared NdWFa-expressing neuron specific cDNAs by the subtraction method. When the cDNAs were cloned and sequenced, we found that several predicted proteins with N-terminal signal peptide could not be specified their functions by homology search on database. We currently assume that those proteins are candidates for the PI of *Aplysia*.

Then, we tried to establish NdWFa-expressing cell-line, because such cells could be used for the bioassay system for the candidate genes of the PI. Transformation of NdWFa-precursor gene to CHO-K1 cell seems to be successful. However, biosynthesis of the peptide could not be confirmed, so far. We may need fine-tuning of experimental conditions that leads to more effective expression of foreign gene.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・動物生理・行動

キーワード：神経科学 生理活性物質 細胞培養 遺伝子導入 アメフラシ

1. 研究開始当初の背景

生体の生理機能や恒常性の調節に関わる神経ペプチドやペプチドホルモンは、より大型の前駆体蛋白質の一部として生合成され、翻訳後修飾の過程でペプチド鎖の切断や種々の化学修飾を受けて活性型ペプチドとなる。

普通、生体内のペプチドや蛋白質は L 型アミノ酸でできているが、一部の神経ペプチドやペプチドホルモンでは、翻訳後修飾の過程で特定のアミノ酸残基が D 型アミノ酸に転換されるものがある。この転換反応は、ペプチド D/L-イソメラーゼによって触媒されると考えられている。実際、数種の動物組織抽出物中にペプチド D/L-イソメラーゼの酵素活性が認められているが、その実体を、蛋白質・遺伝子レベルで解析した報告は少なかった。

われわれは軟体動物アメフラシ (*Aplysia kurodai*) から D 型トリプトファンをもつ心拍動増強ペプチド、NdWFamide を同定し、生理作用や組織局在の解析、前駆体遺伝子の cDNA クローニングや遺伝子発現解析を行っていた。NdWFamide はアメフラシ腹部神経節の RUQ ニューロン群に強く発現することから、このニューロンにはペプチド D/L-イソメラーゼ遺伝子が発現すると考えられる。RUQ ニューロン群は実体顕微鏡下で識別できるので、RUQ ニューロンとその他のニューロンの間で cDNA のサブトラクションを行えば、ペプチド D/L-イソメラーゼ遺伝子を含む RUQ 特異的遺伝子を取得できると考えた。

2. 研究の目的

NdWFamide のトリプトファンを D 型化するペプチド D/L-イソメラーゼを、分子生物学的手法で同定し、その機能解析を通して、ペプチドの D 型化機構を解析することを当初の目的とした。

そのために、1) サブトラクション法により NdWFamide を発現する RUQ ニューロンに特異的に発現する cDNA を取得すること、2) NdWFamide 前駆体 cDNA を発現する樹立細胞系を作製し、L 型トリプトファンをもつ NdWFamide を産生させること、3) NdWFamide 前駆体発現細胞と RUQ 特異的 cDNA の 1 つを共発現させ、D 型トリプトファンをもつ NdWFamide の合成を確かめること、4) 同定した D 型化酵素の性質を解析すること、を目的とした。

3. 研究の方法

1) アメフラシの NdWFamide 発現ニューロン特異的 cDNA の調製

アメフラシから腹部神経節を摘出し、結合組織を切除したのち、実体顕微鏡下で NdWFamide を発現する RUQ ニューロン群を切除した。同時に、NdWFamide を発現していないニューロン (非 RUQ ニューロン) 群も

切除し、それぞれ、液体窒素中で保存した。各ニューロン群から、Total RNA 精製キット (NucleoSpin Extract RNA II, Macherey-Nagel 社) を用いて Total RNA を調製した。

調製した Total RNA を鋳型とし、SMARTer Pico cDNA 合成キット (Clontech 社) を用いて逆転写一本鎖 cDNA の合成、PCR 増幅を行った。次に、PCR-select cDNA subtraction kit を用いて、RUQ ニューロン特異的 cDNA と非 RUQ ニューロン特異的 cDNA をそれぞれ調製した。

2) デファレンシャルスクリーニング

サブトラクションで得られたニューロン特異的 cDNA には、まだ、非特異的な cDNA が多数、含まれていると思われたので、デファレンシャルスクリーニング (Clontech 社) を行った。この方法では、サブトラクション前の RUQ 由来、非 RUQ 由来の各 cDNA、およびサブトラクション後の RUQ および非 RUQ 特異的な cDNA の 4 種を DIG 標識してプローブ化した。

一方、改めて RUQ ニューロンから cDNA を調製し、これを pGEM-T easy vector にライゲーションして簡易のプラスミド cDNA ライブラリーを作成した。このライブラリーを用いて大腸菌を形質転換し、コロニーを回収してマスタープレートを作成した。これによって、各コロニーは RUQ ニューロン由来の cDNA のどれか 1 つをもつことになる。

次に各コロニーの一部をコロニーダイレクト PCR でプラスミドのインサート領域を増幅し、4 枚のニトロセルロース膜上に産物 1 μ l ずつを不動化、残りは電気泳動に掛けてインサートサイズを確認した。4 枚のニトロセルロース膜は、それぞれ、前述の 4 種の DIG 標識プローブとハイブリダイズさせて可視化した。そして、RUQ 特異的プローブと強く反応するコロニーを選別した。

3) RUQ 特異的 cDNA のクローニング

RUQ ニューロン特異的と判定したコロニーが持つインサート cDNA を順次、クローニングして塩基配列を解析した。得られた塩基配列、および配列から予想される蛋白質のアミノ酸配列を元に BLAST 検索し、遺伝子産物の同定を試みた。その結果、機能不明で、N 末端にシグナルペプチドを持つものを D 型化候補遺伝子としてピックアップした。

4) NdWFamide 前駆体発現細胞の作製

NdWFamide 前駆体 cDNA や RUQ 特異的 cDNA を培養細胞系に発現させるための哺乳動物細胞用発現ベクターとして pF5A-CMV-neo vector、または pFC14K-HT-CMV-neo vector (Promega 社) を用いた。まず、各 cDNA の両端にベクターとライゲーションするための制限酵素部位を持つ PCR 産物を調製した。これをマニュアルに従ってベクターに組み込んだ。その後、一旦、クロ

ーニングして塩基配列を確認した。その後、MidPrep 法 と カ ラ ム 精 製 キ ャ ッ ト (Endotoxin-free plasmid DNA purification, Macherey-Nagel 社) を用いて遺伝子導入用プラスミドを調製した。

培養細胞は、導入した神経ペプチド前駆体遺伝子を発現することが知られている CHO-K1 細胞を、JCRB 細胞バンク (独立行政法人 医薬基盤研究所) から購入した。遺伝子の導入は、リポフェクタミン LTX (Invitrogen 社) を用い、添付のマニュアルに従って NdWFamide 前駆体遺伝子を導入した。導入の可否は、培養液に抗生物質である G418 を添加して生育可能か否かを確認した。

5) 遺伝子発現の確認

NdWFamide 前駆体遺伝子が CHO-K1 細胞において他の分泌蛋白質と同様に翻訳後修飾を受ければ、最終的に L 型トリプトファンをもつ NWFamide が合成・分泌されると期待される。そこで、培養上清を採取し、5,000 x g、10 分遠心した上清に、0.1% になるようトリフルオロ酢酸を加えて 5 分間、加熱した。もう一度、遠心した上清を C18 Sep-Pak Plus カラムにかけ、10% メタノール/TFA でカラムを洗浄した後、50% メタノール/TFA で保持物質を溶出した。遠心エバポレーターでメタノール・TFA を除去した後、Cadenza CD-C18 カラム (150 x 4.6 mm, Imtakt 社) を接続した HPLC にかけた。保持物質は 20-40% アセトニトリル/20 分の直線濃度勾配で溶出した。同じ条件で、合成 NWFamide および NdWFamide もカラムにかけ、その保持時間を確認した。

4. 研究成果

1) RUQ 特異的 cDNA の調製

26 個体のアメフラシから、RUQ ニューロン群と非 RUQ ニューロン群を摘出し、total RNA を抽出した (図 1)。その後、方法に示し

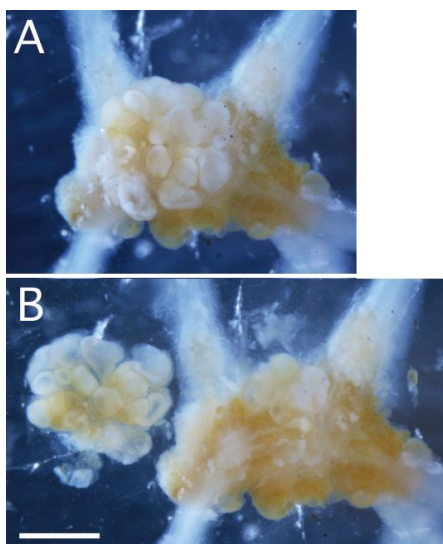


図 1 アメフラシの RUQ ニューロン
A, 腹部神経節腹面。B, 切除した RUQ ニューロン群

た手順でサブトラクションを行った。サブトラクション前後の cDNA の変化を、PCR・電気泳動で確かめたところ、RUQ 特異的 cDNA、非 RUQ ニューロン特異的 cDNA、それぞれの特異的 cDNA に濃縮効果が認められた。

得られた特異的 cDNA を DIG 標識してデファレンシャルスクリーニングを行い、960 コロニーをスクリーニングして、RUQ 特異的プローブにのみ強く反応し、かつインサートサイズが異なるインサートを持つ 44 種のコロニーを選別した。各コロニーがもつプラスミドを増幅・抽出して順次、塩基配列分析・GenBank 上で相同性検索を行った。その結果、20 種は既知のアメフラシ神経ペプチド前駆体 (Accession No. K01223.1) であり、その他の神経ペプチド前駆体遺伝子が、NdWFamide 前駆体遺伝子を含めて 5 種あった。この段階で、相同性の高いデータがヒットせず、機能不明とされたものが 13 種あったが、その多くは 5'-端を欠く断片であった。そこで、5'-RACE 法で全長クローニングを行い、そこにコードされている蛋白質のアミノ酸配列を予想した。そして、神経ペプチド前駆体のような分泌蛋白質に共通してみられる N 末端にシグナルペプチドをもつものを選別したところ、3 種が残った。

2) L7 特異的 cDNA の調製

RUQ 由来の cDNA は、既知のアメフラシ神経ペプチド前駆体 (Accession No. K01223.1) が多量に含まれており、PCR 増幅に依存したサブトラクション法では多量に含まれる cDNA の増幅のみが進み、微量な cDNA が増幅されにくい可能性がある。そこで、腹部神経節背面にある L7 ニューロンも NdWFamide 産生ニューロンであるので、このニューロンからも cDNA を調製し、同様の方法でサブトラクションを行い、L7 特異的 cDNA のクローニングも合わせて試みた。その結果、最終的に、機能不明で N 末端にシグナル配列を持つ蛋白質をコードすると思われる cDNA を 2 種得た。なお、L7 特異的 cDNA の中から、peptidyl-proline isomerase をクローニングすることができた。この isomerase がトリプトファンを D 型化することは知られていないが、NdWFamide を発現するニューロンからペプチドイソメラーゼがクローニングされたことは大変興味深い。なお、現在までにこのイソメラーゼは RUQ ニューロン特異的 cDNA の中からは見つかっていない。

3) 遺伝子導入

NdWFamide 前駆体遺伝子を発現する樹立細胞系を作出するため、NdWFamide 前駆体遺伝子を哺乳動物細胞発現ベクターに組み込んだ。これをリポフェクション法で CHO-K1 細胞に取り込ませ、形質転換させた。培養 3 日後から培養液に G418 を加え (0.5 mg/ml)、ベクターを取り込んで発現させている細胞を選別した。リポフェクションしていない細胞

は数日で死滅したが、リポフェクションした細胞はいずれもほぼ正常に増殖し、継代後も生育した。また、CHO-K1 細胞の一部を用い、RNA 抽出と逆転写 PCR 法により、導入したプラスミドから NdWFamide 前駆体 mRNA が転写されていることを確かめた。次に、これらの細胞培養上清を回収して粗ペプチド画分を調製し、逆相カラム HPLC で分析したところ、リポフェクションした細胞からは、リポフェクションしていない細胞には見られないピークが検出され、導入遺伝子由来する何らかのペプチドを分泌することがわかったが、逆相カラム HPLC 上の挙動が NdWFamide や NWFamide、あるいは NWFamide などの前駆体由来と思われるペプチドの挙動とは一致せず、分泌されるペプチドの同定はできなかった。

4) 総括

神経ペプチド・ペプチドホルモンのアミノ酸の D 型化は、生理活性やペプチドの分解速度に大きな影響を与える現象であるにもかかわらず、ポストゲノムの時代に質量分析とデータベース検索のみでハイスループットなペプチド検索を行う今日では見過ごされやすい現象である。それは、これらの方法ではアミノ酸の D 型化を容易に検出することができないからである。

その意味で、D 型化酵素を同定することは D 型アミノ酸含有ペプチドに注目を集めるよい機会になると期待される。本研究は、分子生物学的手法と発現細胞を用いたスクリーニングを併用する斬新で挑戦的な研究計画であったが、残念ながら、研究期間中に十分な成果を上げることができなかった。

反省すべき点は多々あるが、当初計画では予想できなかった一番の点は、サブトラクションとデファレンシャルスクリーニングで得られた NdWFamide 産生ニューロン特異的 cDNA に多くの 3'-側断片が含まれており、その全長クローニングに予想以上に時間を費やしたことである。本研究は発現クローニングに依存しているので、完全な open-reading frame を含んでいる必要がある。Total RNA の調製や逆転写 cDNA の作製により細心の注意が必要であろう。

また、NdWFamide 前駆体遺伝子を組み込んだ発現ベクターは、リポフェクション法で効率よく CHO-K1 細胞に取り込まれ、発現していることが確認できたが、NWFamide が細胞外へ分泌されることは確認できなかった。今後、遺伝子導入を繰り返すことで、NWFamide を合成・分泌する細胞が見つかる可能性はあるが、無脊椎動物のシグナルペプチドが哺乳動物細胞である CHO-K1 細胞では効率よく機能しない可能性も考えられる。今後は NdWFamide 前駆体蛋白質のシグナル配列の改変、または導入する細胞系の変更の検討が必要かも知れない。

研究助成期間は終了したが、これまでに得

た知見を有効に活用して今後も研究を続け、D 型化酵素の同定を目指したい。

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 3 件)

1. Morishita Fumihito, Furukawa Yasuo, Matsushima Osamu, Characterization of precursor genes encoding D-tryptophan containing neuropeptide NdWFamide of sea hare *Aplysia*, *Peptide Science* 2013, 査読あり、2014, p439-442

2. Morishita Fumihito, Furukawa Yasuo, Matsushima Osamu, Molecular cloning of two distinct precursor of NdWFamide, D-tryptophan-containing neuropeptide of the sea hare, *Aplysia kurodai*, *Peptides*, 査読あり、38, 2012, p291-301, <http://dx.doi.org/10.1016/j.peptides.2012.08.025>

3. 森下文浩, 古川康雄, 松島 治, アメフラシの D 型アミノ酸含有神経ペプチド、NdWFamide、比較生理生化学、査読無し(総説)、28、2011、p301—316

〔学会発表〕(計 3 件)

1. 森下文浩, 古川康雄, 松島 治, アメフラシの D 型トリプトファン含有神経ペプチド(NdWFamide)の前駆体遺伝子クローニングと発現、日本動物学会第 84 回岡山大会、2013 年 9 月 26~28 日、岡山市

2. Morishita Fumihito, Furukawa Yasuo, Matsushima Osamu, Expression of two precursor genes of NdWFamide, a D-tryptophan containing neuropeptide, in the central ganglia of *Aplysia kurodai* *Neuroscience* 2012, 13-17, Nov. 2012, New Orleans, U.S.A

3. 森下文浩, 軟体動物の神経ペプチドを D 型化する酵素の探索(予備的報告)、日本動物学会中国四国支部徳島大会、2012 年 5 月 12~13 日、徳島市

6. 研究組織

(1)研究代表者

森下 文浩 (Morishita Fumihito)
広島大学・大学院理学研究科・助教
研究者番号：20210164