

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月20日現在

機関番号：84404
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23791066
 研究課題名（和文） 摂食及びエネルギー代謝調節に関わる新規生理活性ペプチドの同定と機能解析
 研究課題名（英文） Identification and functional analysis of novel bioactive peptides that regulate energy metabolism and food intake
 研究代表者
 吉田 守克（YOSHIDA MORIKATSU）
 独立行政法人国立循環器病研究センター・研究所・研究員
 研究者番号：70393212

研究成果の概要（和文）：

摂食行動やエネルギー代謝を制御する視床下部において、リガンドが不明なため機能が知られていない受容体（オーファン受容体）に作用する未知の生理活性ペプチドの探索を実施した。細胞の微小形態変化を指標とした活性検出系（CellKey アッセイ）を新たに構築し、視床下部に発現の高い一つのオーファン受容体発現細胞において、ある組織抽出物のペプチド画分より明らかなインピーダンスの増加を検出した。この増加は標的受容体に特異的であり、この活性を指標に現在、精製を進めている。

研究成果の概要（英文）：

We performed a search for newly bioactive peptides acting on orphan receptors expressed in the hypothalamus which controls the energy metabolism and feeding behavior. For screening candidate ligands of these receptors, we developed novel activity detection system which is determined by microscopic morphological changes of cells (CellKey assay). Candidate ligands in tissue extracts were screened against cell lines expressing target orphan receptors by using this system. In cells expressing a certain orphan receptor, we detected the significant increase of impedance, which was the target receptor specific. We are now proceeding to purify the active peptide from this extract.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内分泌学

キーワード：生理活性ペプチド、オーファン受容体、摂食・エネルギー代謝調節

1. 研究開始当初の背景

摂食行動やエネルギー代謝調節は、中枢神経系によって複雑でかつ多くの補償系の下に制御されている。中でも視床下部には制御を担う重要な神経核が多数存在し、ニューロペプチド Y (NPY)、 α -メラノサイト刺激ホルモン (α -MSH)、副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン (CRH) 等、多くの生理活性ペプチドとその受容体が機能制御に関与することが明らかにされている。

生理活性ペプチドをリガンドとする受容体の多くは 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現在、内因性リガンドの不明なオーファン GPCR 遺伝子が数多く存在する。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を発見し、ニューロメジン U やニューロメジン S の同定

に成功している。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た。

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、9種類のオーファン GPCR にそれぞれ作用する生理活性ペプチドの探索を進めていた。

2. 研究の目的

上記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未知の生理活性ペプチドを同定し、機能解析することを目的とした。摂食・エネルギー代謝調節を担う視床下部に発現の高いオーファン GPCR を培養細胞に過剰発現させ、動物組織抽出物からの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）を検出する方法に改良を加えて探索を行った。具体的には以下に示す方法を活用し、従来の探索法の改善を図った。

- (1) 肥満動物からの組織抽出物をリガンド探索の出発材料とする。
- (2) 内因性受容体由来のシグナルの少ない細胞を用いてオーファン GPCR 発現細胞を作製する。
- (3) 細胞の微小形態変化を指標とした新しい活性検出系を構築する。

3. 研究の方法

標的とするオーファン GPCR を培養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、未知の生理活性ペプチドを探索する。本研究では予備的な研究データより考案した改善策を従来の探索法に導入し、探索を行った。

(1) 標的 GPCR の選定

内因性リガンドの不明なオーファン GPCR 遺伝子において、既に知られている生理活性ペプチドの受容体とアミノ酸配列の相同性が高い受容体を選別した。さらに、ラット cDNA パネルを用いて定量的 RT-PCR を行い、摂食・エネルギー代謝調節を担う視床下部に発現が高いオーファン GPCR を標的受容体とした。

(2) 組織抽出物の作製

肥満によって摂食やエネルギー代謝調節に関わる内分泌因子の組織含有量の変化が予想される。本研究では、通常食飼育ラットやブタに加え、高脂肪食ラットより組織を摘

出した。

組織は煮沸して内因性プロテアーゼを失活させ、酢酸抽出した画分を逆相 C18 カラムにて脱塩・濃縮した。さらに、SP-Sephadex イオン交換クロマトグラフィーを用いて、酸性画分、中性・弱塩基性画分、強塩基性画分に大別し、ゲルろ過クロマトグラフィーにて分画したペプチド画分を作製した。

(3) 標的 GPCR 発現細胞の構築

HEK293、CHO 細胞に標的 GPCR 遺伝子を導入し、オーファン GPCR 発現細胞（一過性発現または安定発現）を作製し、抽出したペプチド画分を作用させた。

これまでオーファン GPCR の内因性リガンド探索を進めていく中で、標的 GPCR を発現させた細胞（HEK293 細胞、CHO 細胞）に内在する受容体に作用する種々の既知ペプチドを同定している（未発表）。本研究では、従来使用した培養細胞に加えて、内因性受容体由来のシグナルが少ないと報告された jurkat 細胞（Takayasu et al. PNAS 2006）を新たに導入し、オーファン GPCR 発現細胞を作製した。

(4) シグナル検出

標的 GPCR 発現細胞に組織抽出物を添加し、リガンド結合に伴う、①細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇を FLIPR system、②細胞内 cAMP 濃度変化を EnVision、③受容体のインターナリゼーションを INCell Analyzer（すべて現有設備）にて検出した。

さらに本研究では、現有する活性検出系に加えて、細胞の微小形態変化に伴うインピーダンス変化を CellKey system（Molecular Devices 社、現有設備）にて検出する系を新たに構築した。

本研究では、リガンド結合による標的 GPCR 発現細胞からの生物活性を検出するための一次スクリーニングとして主に CellKey を用いたアッセイを行い、特異的活性を確認するための二次スクリーニングにおいて従来の活性検出系を併用した。活性の認められる画分については、さらに逆相 C18 高速液体クロマトグラフィー（HPLC）、イオン交換 HPLC を用いて精製を進めた。

4. 研究成果

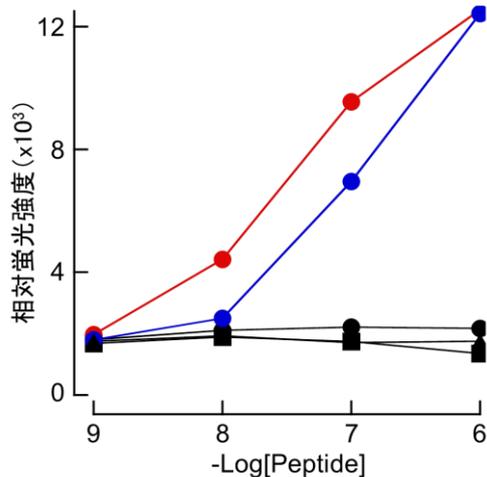
(1) オーファン GPCR 安定発現細胞株の作製

摂食・エネルギー代謝調節に関連する新規生理活性ペプチドの探索を目的として、ラット cDNA パネルを用いて定量的 RT-PCR を行い、視床下部に主に発現する 9 種類のオーファン GPCR 遺伝子を選定した。標的オーファン GPCR について cDNA クローニングを行い、発現ベクターに組み込み、従来の培養細胞（CHO 細胞、HEK293 細胞）に導入し、安定発現細胞

株を作製した。

① 内因性受容体由来のシグナルの少ない細胞の利用

生理活性ペプチドに作用する内因性受容体の少ない細胞として T 細胞由来の jurkat 細胞を使用した。実際に内因性受容体の発現を検証するために、既知の生理活性ペプチドを細胞に添加し、細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇を FLIPR system にて測定した。その結果、VIP と PACAP が容量依存的に jurkat 細胞に作用したが、HEK293 細胞や CHO 細胞に作用するその他の既知ペプチドは反応しなかった (図 1)。FLIPR system の系において、jurkat 細胞に内在する既知ペプチド受容体の種類は少ないことが確認できた。



【図 1】 jurkat 細胞に対する各種生理活性ペプチドの容量反応曲線 jurkat 細胞に対し、VIP (●)、PACAP-27 (●)、ニューロメジン C (●)、エンドセリン-1 (■)、CGRP (▲) を添加し、細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇を FLIPR system を用いて測定した。

また、既知の生理活性ペプチドを細胞に添加し、細胞内 cAMP 濃度変化を EnVision にて測定したが、いずれの既知ペプチドによる有意な細胞内 cAMP 上昇は検出できなかった。フォルスコリン添加による細胞内 cAMP 濃度上昇は検出できたものの、産生量が低かったことから、既知ペプチドによる細胞内 cAMP 産生量も低いと考えられる。現在、CRE (cAMP response element) の下流にルシフェラーゼ遺伝子を結合したレポーターアッセイの系の構築を進めており、複数の CRE を連結させることにより高感度のアッセイ系を目指している。

視床下部に主に発現する 9 種類のオーファン GPCR 遺伝子を発現ベクターに組み込み、jurkat 細胞に導入し、安定発現細胞株の作製を試みたが樹立できなかった。原因は不明であるが、本研究では標的 GPCR を jurkat 細胞に一過性発現させた系においてリガンド探

索を実施した。

(2) 組織抽出物の作製

新規生理活性ペプチド探索のための組織抽出物として、ブタ視床下部、脳幹、脊髄、下垂体、ラット脳、心房、胃、小腸、腎臓、内臓脂肪及び精巣をそれぞれ酢酸抽出し、逆相 C18 カラムにて脱塩・濃縮後、イオン交換、ゲルろ過クロマトグラフィーにて分画したペプチド・ライブラリーを作製した。

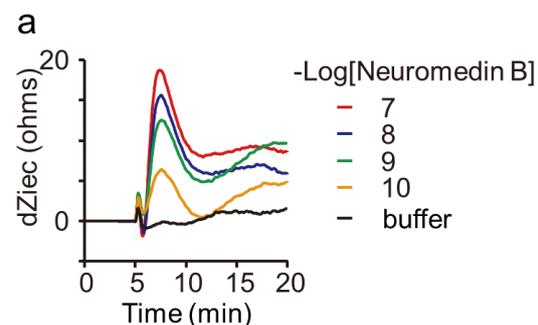
① 肥満動物からのペプチド抽出

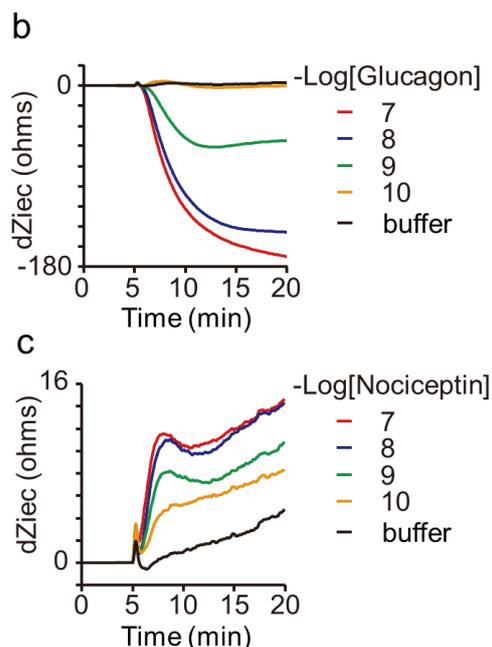
肥満によって摂食やエネルギー代謝調節に関わる内分泌因子の組織含有量の変化が予想される。そこで、高脂肪食飼育ラットを作製し、脳、肝臓、骨格筋、内臓脂肪、精巣周囲脂肪、皮下脂肪をそれぞれ酢酸抽出し、逆相 C18 カラムにて脱塩・濃縮後、イオン交換、ゲルろ過クロマトグラフィーにて分画したペプチド・ライブラリーを作製した。

(3) 視床下部に発現の高いオーファン GPCR に作用する未知のペプチド探索

① 新しい活性検出系の構築

オーファン GPCR の内因性リガンド探索のための新たな活性検出法として、従来のアッセイ系に加えて、細胞の微小形態変化を指標とするアッセイ法を CellKey system を用いて確立した。本アッセイ法は、細胞へのリガンド刺激によって生じる細胞骨格や細胞の形態変化についてインピーダンスを指標に検出する方法である。実際に、ニューロメジン B 受容体 ($G_{\alpha q}$ 共役型受容体)、グルカゴン受容体 ($G_{\alpha s}$ 共役型受容体)、ノシセプチン受容体 ($G_{\alpha i}$ 共役型受容体) をそれぞれ CHO 細胞に一過性発現させ、アゴニストを添加し、インピーダンスの変化を測定した (図 2)。いずれもリガンド濃度依存的にインピーダンスの変化を検出できた。本アッセイ法は特徴として、受容体が共役する G タンパク質のサブタイプに依存せず、リガンドと受容体の結合の検出が可能であることが示された。また、共役する G タンパク質によってそれぞれ特徴的な波形を有したインピーダンスの変化を示し、CHO 細胞に限らず、HEK293 細胞に





【図2】GPCR 発現細胞における CellKey system を用いたシグナル検出 CHO 細胞に (a)ニューロメジンB受容体 ($G\alpha_q$ 共役型受容体)、(b)グルカゴン受容体 ($G\alpha_s$ 共役型受容体)、(c)ノシセプチン受容体 ($G\alpha_i$ 共役型受容体)をそれぞれ一過性発現させ、アゴニスト刺激による細胞の微小形態変化をインピーダンスの変化として検出した。

一過性発現させた系においても同様の波形を検出できた。そのため、共役する G タンパク質のサブタイプや細胞内二次メッセンジャー分子が不明なオーファン GPCR の内因性リガンド探索への応用も可能であることが示された。

② CellKey を用いたオーファン GPCR の内因性リガンド探索

摂食及びエネルギー代謝調節に関わる新規生理活性ペプチド探索について、従来の方法に改良を加えて実施した。

視床下部での発現高い9種類のオーファン GPCR を種々の培養細胞 (jurkat, HEK293, CHO) に発現させ、ブタ、肥満及び正常ラット組織を材料とし、リガンド結合による標的 GPCR 発現細胞からの生物活性を検出するための一次スクリーニングとして CellKey system を用いたアッセイを実施した。その結果、視床下部に発現の高い一つのオーファン GPCR 発現細胞において、従来の活性検出系 (FLIPR system) では検出できないペプチド画分に、CellKey system では明らかなインピーダンスの上昇を検出した。この上昇活性について、共役する G タンパク質のサブタイプや細胞内二次メッセンジャー分子は不明で

はあるが、標的受容体に特異的な活性であることは確認できた。しかし、組織含有量が非常に低く、現在、本活性物質の単離・構造決定に向けて組織含有量の多い組織を探索している。今後、高収率な抽出法も構築しながら本活性物質の精製を遂行し、内因性リガンドとなる新規生理活性ペプチドを同定する。

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2件)

(1) Ida, T., Takahashi, T., Tominaga, H., Sato, T., Sano, H., Kume, K., Ozaki, M., Hiraguchi, T., Shiotani, H., Terajima, S., Nakamura, Y., Mori, K., Yoshida, M., Kato, J., Murakami, N., Miyazato, M., Kangawa, K., Kojima, M.

Isolation of the bioactive peptides CCHamide-1 and CCHamide-2 from *Drosophila* and their putative role in appetite regulation as ligands for G protein-coupled receptors.

Front Endocrinol (Lausanne). 3: 177, doi: 10.3389/fendo.2012.00177, 2012. (査読有り)

(2) Ida, T., Takahashi, T., Tominaga, H., Sato, T., Kume, K., Ozaki, M., Hiraguchi, T., Maeda, T., Shiotani, H., Terajima, S., Sano, H., Mori, K., Yoshida, M., Miyazato, M., Kato, J., Murakami, N., Kangawa, K., Kojima, M.

Identification of the novel bioactive peptides dRYamide-1 and dRYamide-2, ligands for a neuropeptide Y-like receptor in *Drosophila*.

Biochem. Biophys. Res. Commun., 410(4), 872-7, 2011. (査読有り)

〔図書〕(計1件)

(1) Yoshida, M., Miyazato, M., Kangawa, K.; Orphan GPCRs and methods for identifying their ligands. *Methods Enzymol.*, 514, 33-44, 2012.

〔その他〕

(招聘講義) 抗体の精製・抗体アフィニティの基礎から応用まで、宮崎大学 IR 推進機構テクニカルセミナー (2012.8.28~30 宮崎)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 守克 (YOSHIDA MORIKATSU)

独立行政法人国立循環器病研究センター・研究所・研究員

研究者番号：70393212

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし