

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：84404

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461403

研究課題名(和文)新規生理活性ペプチドの同定による新たな摂食及びエネルギー代謝調節機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of mechanism that regulate energy metabolism and food intake by the identification of new bioactive peptides

研究代表者

吉田 守克 (Yoshida, Morikatsu)

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

研究者番号：70393212

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

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を探索した。細胞の微小形態変化を指標とした活性検出系(CellKey)を用いて、オーファン受容体発現細胞に対し特異的なインピーダンス上昇活性を検出した。この活性を指標に精製を進めた結果、4種類のペプチドを同定した。これらは受容体特異的に細胞内Ca<sup>2+</sup>上昇活性を示したが、より高感度にインピーダンス増加活性を示した。同定したペプチドの組織含有量が低いため、CellKeyだけが活性検出に成功し、本システムが今後の新規因子探索に有用であると考えられた。

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). Using this system, four peptides that increase impedance change of the cells expressing a certain orphan receptor were isolated from tissue extracts. At a result of sequence analysis, these peptides are fragment from four different proteins. These peptides increased not only cellular impedance change but also intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration. Compared with intracellular Ca<sup>2+</sup> detection system, CellKey showed sensitive detection system. This system is useful for future screening strategy.

研究分野：内分泌

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)、 $\alpha$ -メラノサイト刺激ホルモン( $\alpha$ -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。

これまで申請者の所属する研究室では、細胞間情報伝達物質としての生理活性ペプチドに注目し、多くの新規生理活性ペプチドの単離・同定を行ってきた。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(Kojima et al. Nature 1999, Kojima et al. BBRC 2000, Mori et al. EMBO J. 2005)。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ことが明らかとなり、現在は治療応用へと研究を展開している。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ことが明らかとなった。

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やNMU、NMSを単離・同定している。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る。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、11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、細胞や個体レベルでの機能解析を行い、新たな摂食・エネルギー代謝調節機構を解明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) 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。
- (2) 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。
- (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抽出した。

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、細胞内  $Ca^{2+}$ 濃度上昇を FLIPR system、細胞内 cAMP 濃度変化を EnVision、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) オーフアン 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 ライブラリーを用いて定量的 RT-PCR を行い、視床下部に主に発現する 9 種類のオーフアン GPCR 遺伝子を選定した。標的オーフアン 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。

##### 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。これまでの研究より、VIP 及び PACAP-27 は jurkat 細胞対し容量依存的に細胞内  $Ca^{2+}$  上昇活性を有することを明らかにしている。HEK293 細胞や CHO 細胞に作用するその他の既知ペプチドが反応しなかったことから、jurkat 細胞に内在する既知ペプチド受容体の種類は少ないと考えられる。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。

本研究では、細胞内 cAMP 濃度変化を高感度に検出するために、CRE (cAMP response element) 及び CARE (cAMP autoregulatory element) の下流にルシフェラーゼ遺伝子をタンデムに結合したレポーターアッセイの系を構築した。エレクトロポレーション法により jurkat 細胞にレポーター遺伝子を導入した結果、フォルスコリンだけでなく VIP 刺激においても、容量依存的にルシフェラーゼ

活性を検出した。

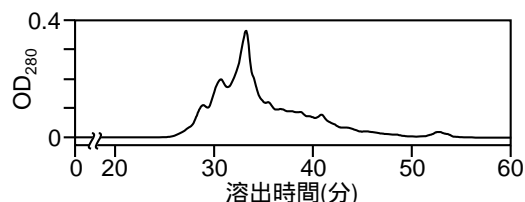
視床下部に主に発現する 9 種類のオーフアン GPCR 遺伝子と作製したレポーター遺伝子を jurkat 細胞に共発現させた系において、リガンド探索を実施した。現在、標的受容体特異的な活性の検出には至っていないが、検出次第、精製を進める。

##### (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。

##### 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 (図 1)。



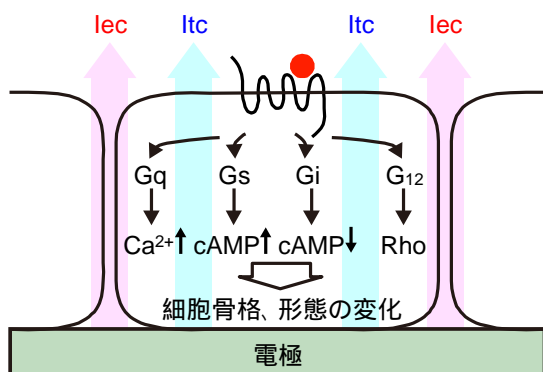
【図 1】肥満ラット脳抽出物 SP-III 画分のゲル濾過クロマトグラフィー 高脂肪食飼育ラット脳を加熱処理後、1N 酢酸にて抽出した。アセトン沈殿による高分子量タンパク質を除去、SepPak による脱塩処理後、陽イオン交換クロマトグラフィー (SP-Sephadex C-25) にて、弱塩基性 (SP-II 画分) と強塩基性画分 (SP-III 画分) に大別した。SP-III 画分について、ゲル濾過クロマトグラフィー (TSK-GEL G2000SWxL) にて展開・分画した。

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

##### 新しい活性検出系の構築

オーフアン 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 (図 2)。本アッセイ法の特徴として、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。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細胞やHEK293細胞に発現させた系において同様の波形を検出することが可能である。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り、従来のアッセイ系に比べスループットも飛躍的に向上した。



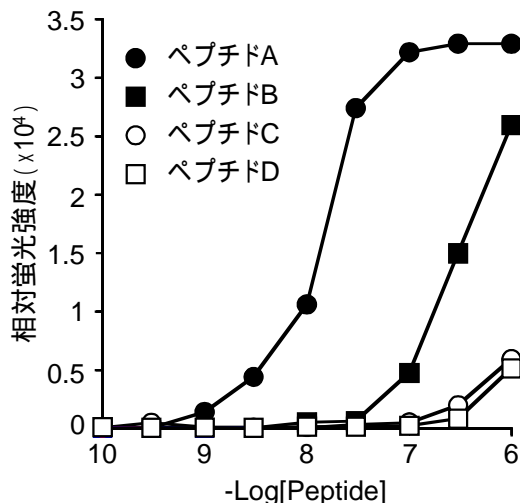
【図2】CellKey systemの概要 細胞へのリガンド及び薬剤刺激により、細胞骨格や形態、容積等の変化が生じる。一定電圧下において、細胞骨格や細胞の形態変化に伴い、微小な電流変化も生じる。この変化について、インピーダンス(Z)を指標に検出する。

CellKeyを用いたオーファンGPCRの内因性リガンド探索

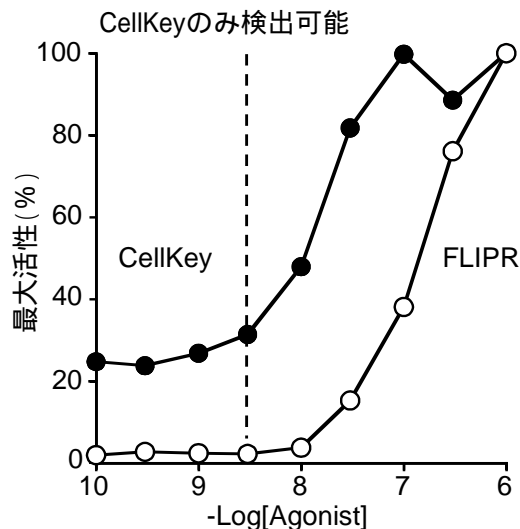
摂食及びエネルギー代謝調節に関わる新規生理活性ペプチド探索について、従来の方法に改良を加えて実施した。

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(GPCR-Xと命名)発現細胞において、高脂肪食ラット組織抽出物の添加により、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増加が検出された。この活性を指標に精製を進めた結果、4種類のペプチド(ペプチドA~Dと命名)を同定した。これらはGPCR-X特異的に作用し、細胞内Ca<sup>2+</sup>上昇活性を示したが、CellKey systemではFLIPR systemより感度の高いインピーダンス増加活性を示した(図3、4)。ペプチドA、B、C、Dの組織含有量が低いため、CellKey systemだけが活性検出できたと考えられる。これらのペプチドは、構造解析の結果、異なる4種類のタンパク質由来の断片ペプチドであったが、いずれもC末端は共通の構造を有していた。この構造はGPCR-Xの活性発現に必要であることが予想され、真のペプチド性リガンド探索に有用な情報が得ることができた。



【図3】GPCR-X発現細胞に対するペプチドA~Dの容量反応曲線 インピーダンス上昇活性を指標に同定したペプチドA~Dについて化学合成を行い、GPCR-Xを発現させたHEK293細胞に作用させ、容量依存的に細胞内Ca<sup>2+</sup>上昇活性を有することを明らかにした。



【図4】GPCR-X特異的活性を2種類の活性検出系にて比較 GPCR-Xを発現させたCHO細胞にペプチドAを作用させ、活性検出したところ、FLIPR systemに比べてCellKey systemでは検出感度が10倍近く高いことを明らかにした。組織抽出物では、点線(----)に示した濃度にて活性検出したために、従来の系(FLIPR system)では検出できなかったと考えられる。

#### 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 1件)

(1) Maeda T, Nakamura Y, Shiotani H, Hojo MK, Yoshii T, Ida T, Sato T, Yoshida M,

Miyazato M, Kojima M, Ozaki M.  
Suppressive effects of dRYamides on  
feeding behavior of the blowfly, *Phormia*  
*regina*. **Zool Lett.**, 1:35, 2015. 査読有

〔学会発表〕(計 2件)

- (1) 森本育美、滝澤祥恵、本郷翔子、井上飛鳥、青木淳賢、東山繁樹、吉田守克、宮里幹也、中田理恵子、井上裕康; TGF切断アッセイを用いた種々の脂肪酸によるGPR120活性化の検討. 第12回GPCR研究会、2015年5月15~16日、東京
- (2) 森本育美、滝澤祥恵、本郷翔子、井上飛鳥、青木淳賢、東山繁樹、吉田守克、宮里幹也、中田理恵子、井上裕康; GPR120活性化を指標とする新規食品機能評価系の検討. BMB2015、2015年12月1~4日、神戸

〔図書〕(計 1件)

- (1) 吉田守克、宮里幹也; 新しい生理活性ペプチドの探索法 ~ 迅速・正確にスクリーニングする技術 ~. **PHARMSTAGE**, 15, 19-23, 2015. 査読無

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)  
該当なし

取得状況(計 0件)  
該当なし

〔その他〕

(受賞)

- (1) 国立循環器病研究センター・H25年度若手研究奨励賞
- (2) 国立循環器病研究センター・H27年度若手研究奨励賞

(ホームページ等)

<http://www.ncvc.go.jp/res/divisions/biochemistry/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 守克 (YOSHIDA MORIKATSU)

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

研究者番号: 70393212

(2) 研究分担者

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

(3) 連携研究者

該当なし