

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：84404

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670442

研究課題名(和文) 脂肪酸修飾ペプチドファミリーと受容体による新しい生体調節機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of new biological regulatory mechanism with fatty acid-modified peptide family and receptors

研究代表者

宮里 幹也 (Miyazato, Mikiya)

独立行政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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では脂肪酸修飾を有する新規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、新たな生体調節機構を明らかにすることを目的とした。ラット脳よりペプチド画分を作製し、脂肪酸修飾構造を認識する抗体によるアフィニティ精製を実施した。精製サンプルに対し、質量分析計によるペプチドーム解析を実施したが、新規ペプチドは同定できなかった。同じ精製サンプルにおいて、グレリン免疫活性測定を実施したところ、脂肪酸修飾は有するものの、グレリンとは異なる免疫活性を有するペプチドの単離に成功した。現在、構造解析に向けて精製を進めている。

研究成果の概要(英文)：To elucidate new biological regulatory mechanism, we performed a search for newly fatty acid -modified peptides from rat brain. The peptide fraction enriched acyl peptides was prepared from rat brain extract by affinity purification with a antibody which recognize acyl -ghrelin. For identifying newly fatty acid -modified peptides, the eluted peptides were analyzed by mass spectroscopy combined with liquid chromatography. Using this method, we could not identify new peptides. However, we detected the immunoreactivity different from acyl-ghrelin in this fraction using ghrelin radioimmunoassay. We are now proceeding to identify the active peptide from this extract by detecting the ghrelin immunoreactivity combined with liquid chromatography.

研究分野：内分泌

キーワード：内分泌 グレリン 脂肪酸修飾ペプチド 脂肪酸転移酵素 摂食・エネルギー代謝調節

1. 研究開始当初の背景

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、成長ホルモン分泌促進因子受容体 (GHS-R) の内因性リガンドとして、グレリンをラット胃より発見し、その構造決定に成功している (引用文献)。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。

グレリンの3番目のアミノ酸であるセリン残基は、中鎖脂肪酸であるオクタン酸修飾を受けている。この修飾基はグレリンの活性発現に必須であり、グレリン α -アシルトランスフェラーゼ (GOAT) により修飾される (引用文献)。GOAT は、膜結合型脂肪酸転移酵素と呼ばれる16種類のファミリー分子の一つとして同定された酵素である。現在、脂肪酸修飾を受けたペプチドは、グレリンしか報告されていないことを考慮すると、GOAT や他の脂肪酸転移酵素の基質となる未知のペプチドの存在が示唆される。

グレリンの脂肪酸修飾と同様に、受容体活性化に必須な翻訳後修飾としてペプチドのC末端アミド化修飾が存在する。例えばニューロペプチド Y (NPY) はC末端アミド構造を有しており、相同性の高い隣ポリペプチド及びペプチド YY と共にファミリーを形成し、4種類の受容体を介して摂食調節に関与している。C末端アミド化ペプチドの多くがファミリーを形成するのに対し、脂肪酸修飾ペプチドはグレリンしか報告されていない事を考慮すると、新たな脂肪酸修飾ペプチドファミリーが存在する可能性がある。

GHS-R は G タンパク質共役型受容体 (GPCR) であり、グレリンが結合することにより細胞内 Ca^{2+} 上昇活性を有する。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。リガンドの物性が同じ受容体間におけるアミノ酸配列の相同性は高く、GHS-R に相同性の高いオーファン GPCR は現在3種類 (GPR39, PGR2, PGR3) 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。

以上より、新たな脂肪酸修飾ペプチドの一部は、GHS-R に相同性の高いオーファン GPCR の内因性リガンドであることが予想される。また、新規ペプチドとグレリンがファミリーを形成し、GHS-R と複数の受容体を介した新しい生体調節機構を提示することも期待できる。

2. 研究の目的

上記の研究背景をもとに、本研究では脂肪酸修飾を有する新規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、新たな生体調節機構を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

ラット組織抽出物に対し、脂肪酸修飾構造を認識する抗体によるアフィニティ精製を実施した。本方法により、脂肪酸修飾されたペプチドのみを選択的に濃縮した画分が作製可能となる。具体的には以下に示す方法を活用し、未知の脂肪酸修飾ペプチド探索を実施した。

(1) 対象となる組織

脂肪酸修飾構造認識抗体によるアフィニティ精製を実施する組織を検討するために、ラット各組織における GOAT の発現量を定量的 RT-PCR (LightCycler[®]480 II、現有設備) にて検証した。グレリン mRNA 発現量も併せて定量し、GOAT と比較することにより、アフィニティ精製する組織を選別した。

(2) 組織抽出物からの抗体によるアフィニティ精製

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たペプチド画分を作製した。対象とする組織より抽出したペプチド画分は、脂肪酸修飾ペプチドの不安定性を考慮して、抽出後直ちに抗体アフィニティ精製を進めた。

本研究では脂肪酸修飾構造を認識する抗体を使用した。抗体の特徴として、3番目のセリン残基がオクタン酸やデカン酸修飾されたグレリンを認識し、未修飾グレリンを認識しない性質を有する。また、本抗体は3番目のスレオニン残基がオクタン酸修飾されたウシガエル・グレリンも認識可能である (引用文献)。作製した抗体アフィニティカラムに対象組織からのペプチド画分を作用させ非特異的吸着成分を除去した後、カラムからの溶出を行い、脂肪酸修飾ペプチドが濃縮された画分を作製した。

(3) ペプチドーム解析による脂肪酸修飾ペプチドの包括的同定

抗体アフィニティ精製後、溶出画分を逆相 HPLC (C18 カラム、現有設備) にて展開し、検出されたピークを分取した。分取したサンプルについて、質量分析計 (MALDI TOF/TOF 5800、現有設備) とゲノム情報を活用することにより、試料に含まれるペプチドの一次情報を包括的かつ多量に決定可能なペプチドーム解析を実施した。

(4) ラジオイムノアッセイによるアフィニティ精製サンプルにおけるグレリン免疫活性測定

アフィニティ精製したサンプルにおける脂肪酸修飾ペプチドの存在を確認するために、グレリンに対するラジオイムノアッセイ

を実施した。脂肪酸修飾されたグレリン N 末端（ラット・グレリンの 1-11 残基に相当）を認識する抗体及びグレリン C 末端（ラット・グレリンの 13-28 残基に相当）を認識する抗体を本アッセイに使用した（引用文献）。

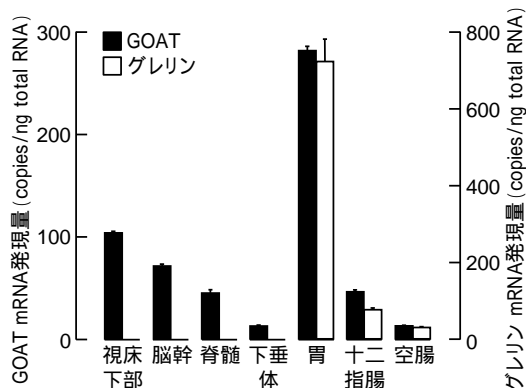
(5) アフィニティ精製サンプルからのグレリン免疫活性物質の精製・単離

アフィニティ精製したサンプルについて、グレリン N 末端認識抗体及びグレリン C 末端認識抗体を用いたラジオイムノアッセイによる免疫活性を指標に、活性物質を HPLC（現有設備）にて精製・単離を行った。

4. 研究成果

(1) 対象となる組織

脂肪酸修飾構造認識抗体によるアフィニティ精製を実施する組織を検討するために、ラット各組織における GOAT mRNA 発現量を定量的 RT-PCR にて検証した。その結果、胃に加えて、中枢神経系においても GOAT mRNA は高発現している結果が得られた（図 1）。視床下部、脳幹、脊髄、下垂体において、GOAT mRNA はグレリン mRNA に比べて発現量が高い結果を得た。これらの組織には、GOAT の基質となる未知の脂肪酸修飾ペプチドの存在が予想されるため、アフィニティ精製する組織として選定した。



【図 1】ラット各組織における GOAT 及びグレリン mRNA 発現量（一部抜粋）ラットより組織または部位（39 サンプル）を摘出し、cDNA ライブラリーを作製した。各組織における GOAT（黒）およびグレリン（白）mRNA 発現量を定量的 RT-PCR にて解析した。

(2) 組織抽出物からの抗体によるアフィニティ精製

作製した抗体アフィニティカラムは、3 番目のセリン残基がオクタン酸やデカン酸修飾されたグレリンを認識し、未修飾グレリンを認識しない性質を有する。アフィニティカラムの結合容量は、100 μ L 樹脂につき、約 500ng グレリンであった。

ラットにおける GOAT の組織分布解析より、

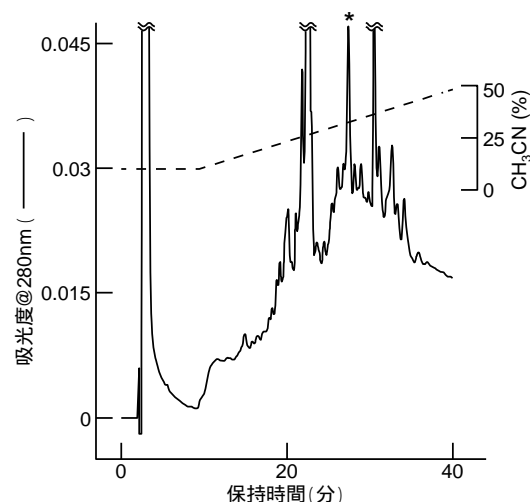
脳における未知の脂肪酸修飾ペプチド探索を実施した。

ラット脳（湿重量 314.6g）より強塩基性ペプチド画分（ペプチド重量 41.9mg）を作製し、アフィニティ精製を行った。精製後の溶出画分を HPLC に展開し（図 2）分離されたピークを分取した。

(3) ペプチドーム解析による脂肪酸修飾ペプチドの包括的特定

アフィニティ精製後、HPLC にて分取したサンプル（48 サンプル）について質量分析計を用いて解析した。48 サンプル中 6 サンプルについては、イオン強度の高いシグナルの検出に成功した。シグナルを検出できなかったサンプルは、量が少なかったためにイオン化できなかったこと、イオン化効率が低いことが考えられる。また、質量数を得られたサンプルについて、MSMS 解析を実施したものの、いずれも構造決定には至らなかった。要因として、MSMS 測定した際のフラグメンテーション効率が低いこと、ゲノム情報を帰属するために必要なピークリストを十分に得られなかったことが考えられる。

また、分取したサンプルの一つ（図 2、* 印）について、官能基の異なる逆相カラム（diphenyl 基）を用いて精製・単離した。ペプチドシーケンサー及び質量分析計（共に現有設備）を用いた構造解析の結果、H(+)-ATP synthase epsilon-subunit を同定した（分子量 5632.07）。この分子のアミノ酸配列の一部は、本研究に使用した抗体認識配列に似ているが、その相同性は低く、アフィニティ精製において、非特異的に吸着し、溶出されたものと考えられる。



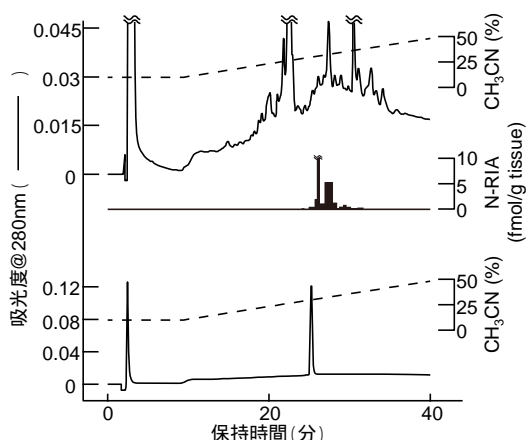
【図 2】ラット脳-強塩基性画分をアフィニティ精製したサンプルの HPLC による分離 アフィニティ精製後、溶出画分を逆相 HPLC（C18 カラム）にて展開し、検出されたピークを分取した。一部のピーク（*）は、官能基の異なるカラム（diphenyl 基）にて精製・単離を

行った。

(4) ラジオイムノアッセイによるアフィニティ精製サンプルにおけるグレリン免疫活性測定

脳におけるグレリンの組織含有量は非常に少なく、その存在は免疫組織化学的手法やラジオイムノアッセイにて報告されている(引用文献)。本研究における、脳抽出物からのアフィニティ精製が遂行できたか確認するために、グレリン N 末端認識抗体を用いたラジオイムノアッセイ (N-RIA) を実施した。

図3に示す通り、アフィニティ精製したサンプルにおいて、脂肪酸修飾されたグレリン特異的な免疫活性の検出に成功した。既報と同様、脳におけるグレリン様免疫活性は非常に少なかった。また、主要な免疫活性はグレリン自体との HPLC における溶出位置が異なった。さらに、N-RIA 陽性サンプルの多くは、グレリン C 末端認識抗体を用いたラジオイムノアッセイ (C-RIA) では陰性であった(データ非掲載)。以上より、本アフィニティ精製サンプルにおいて、グレリンとは異なる物性を有するペプチドを検出していることが示唆された。

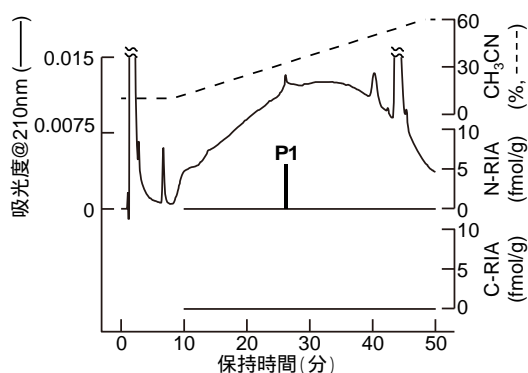


【図3】ラット脳-強塩基性画分をアフィニティ精製したサンプルにおけるグレリン様免疫活性の検出 アフィニティ精製後、HPLCにて分取したサンプル(チャート上段、48サンプル)について、グレリン N 末端認識抗体を用いたラジオイムノアッセイを実施した(N-RIA)。同条件にて、合成グレリン(チャート下段、1 μ g 相当)を展開し、グレリン様免疫活性との溶出位置を比較・検証した。

(5) アフィニティ精製サンプルからのグレリン免疫活性物質の精製・単離

アフィニティ精製したサンプルについて、グレリン N 末端認識抗体 (N-RIA) 及びグレリン C 末端認識抗体 (C-RIA) を用いたラジオイムノアッセイでの免疫活性を指標に逆相 HPLC にて精製を行い、図4に示すペプチド (P1) の単離に成功した。単離したペプチ

ドは、収量が非常に低く、今後、構造決定可能な収量を得るための精製を進めている。



【図4】ラット脳-強塩基性画分をアフィニティ精製したサンプルからのグレリン免疫活性ペプチドの単離 アフィニティ精製後、HPLCにて分取したサンプルについて、グレリン N 末端認識抗体 (N-RIA) 及びグレリン C 末端認識抗体 (C-RIA) を用いたラジオイムノアッセイでの免疫活性を指標に、ペプチド (P1) を単離した。

<引用文献>

Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature*, 402(6762): 656-60, 1999.

Yang J, Brown MS, Liang G, Grishin NV, Goldstein JL. Identification of the acyltransferase that octanoylates ghrelin, an appetite-stimulating peptide hormone. *Cell*, 132(3):387-96, 2008.

Kaiya H, Kojima M, Hosoda H, Koda A, Yamamoto K, Kitajima Y, Matsumoto M, Minamitake Y, Kikuyama S, Kangawa K. Bullfrog ghrelin is modified by n-octanoic acid at its third threonine residue. *J Biol Chem*, 276(44):40441-8, 2001.

Hosoda H, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin and des-acyl ghrelin: two major forms of rat ghrelin peptide in gastrointestinal tissue. *Biochem Biophys Res Commun*, 279(3):909-13, 2000.

Sato T, Fukue Y, Teranishi H, Yoshida Y, Kojima M. Molecular forms of hypothalamic ghrelin and its regulation by fasting and 2-deoxy-d-glucose administration. *Endocrinology*, 146(6):2510-6, 2005.

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)

Kaiya H, Konno N, Kangawa K, Uchiyama M, Miyazato M. Identification, tissue distribution and functional characterization of the ghrelin receptor in West African lungfish, *Protopterus annectens*. *Gen Comp Endocrinol*, 209: 106-17, 2014. doi: 10.1016/j.ygcen.2014.07.021. 査読有

Kaiya H, Kangawa K, Miyazato M. Molecular evolution of GPCRs: Ghrelin/ghrelin receptors. *J Mol Endocrinol*, 52: T87-100, 2014. doi: 10.1530/JME-13-0175. 査読有

Kaiya H, Andoh T, Ichikawa T, Amiya N, Matsuda K, Kangawa K, Miyazato M. Determination of ghrelin structure in the Barfin Flounder (*Verasper moseri*) and involvement of ingested fatty acids in ghrelin acylation. *Front Endocrinol*, 4:117, 2013. doi: 10.3389/fendo.2013.00117. 査読有

〔その他〕

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

宮里 幹也 (MIYAZATO, Mikiya)

独立行政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

(2)研究分担者

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