

## プロラクチン分泌促進活性を持つ新たな生理活性ペプチドの発見

森 健二

### 1. はじめに

ペプチドホルモンや神経ペプチドなどの生理活性ペプチドは、細胞間情報伝達を担う分子の一種であり、内分泌系や神経内分泌系だけでなく、摂食および飲水、性行動、睡眠覚醒などの本能行動や、生体の恒常性を維持するための自律機能を調節する。また近年では、神経系による免疫系の制御にも関与することが明らかにされた。このように生理活性ペプチドは、さまざまな生体機能の調節に直接的に関わるため、新しい生理活性ペプチドの発見によっていまだ知られていなかった生体調節機構を示すことができる。また、その成果は基礎研究にとどまらず、創薬をはじめとした応用研究へと発展する可能性を秘めているため、生理活性ペプチドの探索研究は非常に魅力的な研究テーマであるといえる。本稿では、生理活性ペプチドの探索研究について概説したのち、筆者が最近発見した生理活性ペプチドである neuromedin U precursor-related peptide (NURP) について紹介する。

### 2. 未知の生理活性ペプチドの探索研究

生理活性ペプチドの探索研究の歴史は長く、現在では多面的なアプローチにより探索が実施されている。その手法は以下の三つに大別できる。

#### 1) 生理活性ペプチドの有する“活性”を指標とした探索

セクレチンが1902年に発見されて以来、生理活性ペプチドの大半は、それら自身が有する活性を指標として精製・構造解析されることにより同定されているため、この

手法は生理活性ペプチド探索の王道である。効率よくペプチドを探索するためには、活性を検出するアッセイ系は、再現性がよく簡便で多検体処理できることが望ましい。ペプチドの生理機能を指標として探索できれば理想的だが、これはアッセイ手法が煩雑であったり測定結果が不安定であることが多く、効率的なペプチドの同定は難しい。そこで、古くは多くの生理活性ペプチドが、平滑筋や血圧などに対する非特異的な薬理作用を持つことに着目した平滑筋の収縮・弛緩アッセイが探索に用いられた<sup>1)</sup>。また、多くの生理活性ペプチドの受容体がGタンパク質共役型受容体 (G protein-coupled receptor: GPCR) であることから、そのセカンドメッセンジャーであるcAMPやCa<sup>2+</sup>の測定系も探索に適している<sup>2)</sup>。1990年代中ごろからはリガンドが不明なオーファンGPCRを標的として、哺乳類で10数種類もの新規生理活性ペプチドが短期間に発見されており、筆者の所属する研究室でもグレリンとニューロメジンS (neuromedin S: NMS) を同定した<sup>3)</sup>。新しい生理活性ペプチドが発見されてもその受容体の同定が困難なことが多いが、オーファンGPCRを標的とした場合はリガンドである生理活性ペプチドと受容体を同時に同定できるので、非常に効果的な探索が可能になった。

#### 2) 生理活性ペプチドおよびその前駆体の構造的特徴を利用した探索

ほとんどの生理活性ペプチドは、前駆体として翻訳された後にプロセシングプロテアーゼによる限定切断を受けて、活性を有する成熟型へと変換される<sup>4)</sup>。前駆体のアミノ酸配列を観察すると、生理活性ペプチドに相当する配列の末端にはLys-ArgやArg-Argといった塩基性アミノ酸対が存在することが多い。また、このような塩基性アミノ酸対のC末端側を特異的に限定切断するプロセシングプロテアーゼとして、PC1/3やPC2を含むsubtilisin様プロテアーゼファミリーが存在することから、塩基性アミノ酸対は生理活性ペプチドを産生するための重要なシグナルであることがわかる<sup>4)</sup>。このため、核酸やタンパク質の配列情報から塩基性アミノ酸対を探し出すことにより、生理活性ペプチドの存在を予測することが可能であり、これまでにRFアミドペプチドファミリーやproadrenomedullin N-terminal 20 peptideなどが同定された<sup>5,6)</sup>。

また、C末端アミド化は生理活性ペプチドの特徴的な修

国立循環器病研究センター研究所生化学部 (〒564-8565 大阪府吹田市岸部新町6-1)

Identification of a novel neuropeptide with prolactin-releasing activity

Kenji Mori (Department of Biochemistry, National Cerebral and Cardiovascular Center Research Institute, 6-1 Kishibe Shinmachi, Suita, Osaka 564-8565, Japan)

本論文の図版はモノクロ (冊子版) およびカラー (電子版) で掲載。

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2019.910697

© 2019 公益社団法人日本生化学会

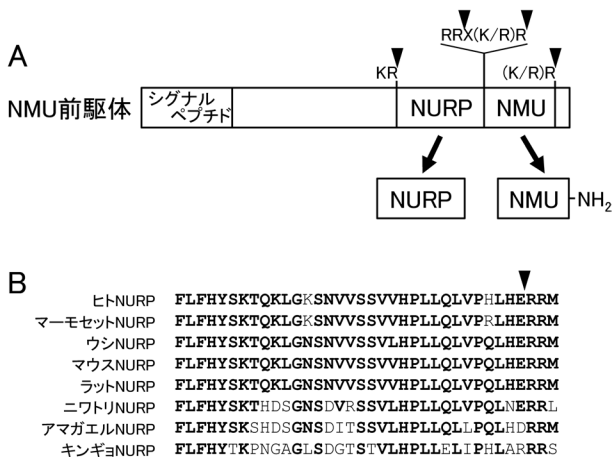


図1 NURPはNMU前駆体から産生される

(A) NMU前駆体のドメイン構造の模式図と翻訳後修飾によるペプチドの産生。NURPとNMUの産生に関わる各動物種で保存された塩基性アミノ酸対と四つの限定切断部位(矢頭)を示す。2番目と3番目の塩基性アミノ酸対は、1アミノ酸残基をはさんで近接している。-NH<sub>2</sub>: C末端アミド化。(B) NURP (36アミノ酸残基)のアミノ酸配列。半数以上の動物種で保存されているアミノ酸残基を太字で示す。矢頭は33アミノ酸残基のNURPのC末端を示す。

節の一つである。ペプチドYYや神経ペプチドYは、2次元薄層クロマトグラフィーを用いてαアミド化したペプチドを化学的に検出することにより同定された<sup>7)</sup>。

### 3) 質量分析によるペプチドの網羅的構造解析

現在では、質量分析によりペプチドの構造を決定することができる。そこで、内在性ペプチドの構造を質量分析にて網羅的に決定した後に、そのデータを前駆体配列にマッピングすることにより、生理活性ペプチドの産生を予測することが可能になった。この手法により、分泌顆粒を持つ内分泌細胞の培養上清から、neuroendocrine regulatory peptide (NERP)-1およびNERP-2などが同定されている<sup>8)</sup>。

ここまで、生理活性ペプチドのさまざまな探索法を概説した。これから紹介するNURPは、神経ペプチドであるニューロメジンU (neuromedin U: NMU)の前駆体配列より見いだされた新しい生理活性ペプチドである(図1)。

## 3. NMUとNMS

NMUは、子宮筋の収縮活性を指標として単離・同定された神経ペプチドで、ラットでは23アミノ酸残基からなる<sup>9)</sup>。各種動物間で構造を比較するとアミド化修飾されたC末端7アミノ酸残基が高度に保存されており、この部分は活性を保持するために重要である。NMUは特に下垂体と消化管に豊富に存在するが、中枢神経系でも産生されている。NMUの機能は、1985年に同定されながらも長い

間はっきりとしなかったが、2000年に2種類のオーファンGPCRが、それぞれ末梢型(1型)と中枢型(2型)のNMU受容体として同定されたことにより、その状況は一変した<sup>9)</sup>。現在では脳室内投与実験により、NMUは摂食を抑制して体重を減少させるなどさまざまな作用を有することが明らかになっている<sup>9)</sup>。また、摂食抑制と体重減少に関しては、げっ歯類への皮下投与でも観察されている。NMUとその受容体のノックアウトマウスを用いた研究では、脳室内投与実験の結果と一致して摂食・エネルギー代謝の調節に関与することなど、いくつかの機能が明らかにされている<sup>9)</sup>。特に近年では、NMUが2型自然リンパ球に作用して自然免疫を制御することが示されており、神経系と免疫系を橋渡しする重要な分子として注目されている<sup>10)</sup>。

NMSは、NMU受容体の新たな内因性リガンドとして筆者により発見された神経ペプチドで、ラットでは36アミノ酸残基からなる<sup>11)</sup>。NMSの構造をNMUと比較すると、活性に重要なアミド化修飾されたC末端7アミノ酸残基が完全に一致しており、両者は培養細胞で発現させたNMU受容体1型および2型をほぼ同じ強さで活性化する。NMSは、主に視床下部や脾臓、精巣で発現しており、ラット脳内ではサーカディアンリズムの調節をつかさどる視交叉上核で顕著に発現している。この発現部位に一致して、ラットへ脳室内投与したNMSがサーカディアンリズムの位相変位を誘導することは興味深い<sup>11)</sup>。NMSを脳室内投与すると、NMUを投与した場合とほぼ同じ作用が観察されるが、NMSは10分の1程度の低用量で各種作用を誘導する<sup>10)</sup>。つまり、中枢神経系においてはNMUと比較してNMSは約10倍強い活性を持つと考えられるが、受容体を発現させた細胞を用いたセルベースアッセイの結果と矛盾しており、その原因は現時点では不明である。NMSとNMUは同じ受容体に作用することから、同じ役割を果たしていると考えられることもできる。しかしながら、両者は別々の遺伝子にコードされた前駆体から産生され、独自に発現調節されているため、それぞれ異なる生理機能を有していると考えられる<sup>11)</sup>。

## 4. NURPの同定

1992年にラットNMU前駆体のcDNAがクローニングされ、この前駆体の配列にはNMUの産生に関わるものの他に複数の塩基性アミノ酸対が存在することが示された<sup>12)</sup>。また、これらはヒト前駆体でも保存されていたため、NMU前駆体から未知のペプチドが産生される可能性が示唆されたが、その存在が証明されることはなかった。一方、筆者がNMUと同一な活性部位を持つNMSの前駆体cDNAをクローニングして、NMSとNMUの前駆体

配列を比較したところ、上述した塩基性アミノ酸対部位が保存されていた<sup>11,13)</sup>。そこで、NMU前駆体の配列を詳細に解析したところ、①四つの塩基性アミノ酸対が哺乳類、鳥類、両生類、魚類で保存されている（そのうち二つはNMUの産生に関わる）（図1A）、②四つの塩基性アミノ酸対はNMS前駆体でも保存されている、③各種動物間において、1番目と2番目の塩基性アミノ酸対には含まれた配列は、3番目と4番目には含まれるNMUよりも高度に保存されている、④NMU前駆体の1番目と2番目の塩基性アミノ酸対には含まれた配列は、NMS前駆体の該当部分とも高度に保存されていることが明らかになった。このため、NMU前駆体からNMUの他に新規の生理活性ペプチドが産生されると判断し、それをNURPと命名した<sup>13)</sup>。

NMU前駆体の構造解析からNURPが産生されることを予測できたが、本ペプチドが生理活性ペプチドとして機能するか否かは、その存在を証明した後に機能解析が必要である。そこで、はじめにNMU mRNAが発現しているラット脳から内在性NURPの精製を試みた<sup>13)</sup>。400匹分のラット脳から抽出したペプチド画分を、抗NURP抗体を用いて作製したアフィニティーカラムによる精製に供した。吸着画分を再度同じカラムにてリクロマトした後、溶出物を逆相HPLCにて分離することにより、2種類のペプチドを単離することができた。プロテインシーケンサーと質量分析計でこれらのペプチドの構造を決定したところ、それぞれ33および36アミノ酸残基からなるNURPであった（図1B）。NURPがこれら2種類の分子種として産生されることは前駆体配列から予測できており、NURPのC末端側の近接した二つの塩基性アミノ酸対のC末端側でそれぞれ限定切断され、さらに末端の塩基性アミノ酸残基がカルボキシペプチダーゼによって除去されると、33および36アミノ酸残基のNURPが産生される（図1A）。また、同じ2種類の内在性NURPは、ラット小腸からも単離できた<sup>13)</sup>。さらには逆相HPLCとNURPのラジオイムノアッセイを組み合わせた実験により、化学合成したNURPと保持時間が一致する免疫活性をラット脳および小腸、下垂体にて検出している<sup>13)</sup>。以上により、NURPが生体内で産生されていることを示すことができた。

## 5. NURPによるプロラクチン分泌促進

NURP/NMU mRNAは、下垂体前葉からのホルモン分泌を調節する各種神経ペプチドを産生している視床下部弓状核で発現していることから、NURPの脳室内投与が下垂体前葉ホルモンの分泌に与える影響を検討した<sup>13)</sup>。本ペプチドをラット脳室内へ投与すると、20分後には投与量依存的な血漿プロラクチン濃度の上昇が観察された。また、この脳室内投与は他の下垂体前葉ホルモンの血漿濃度には

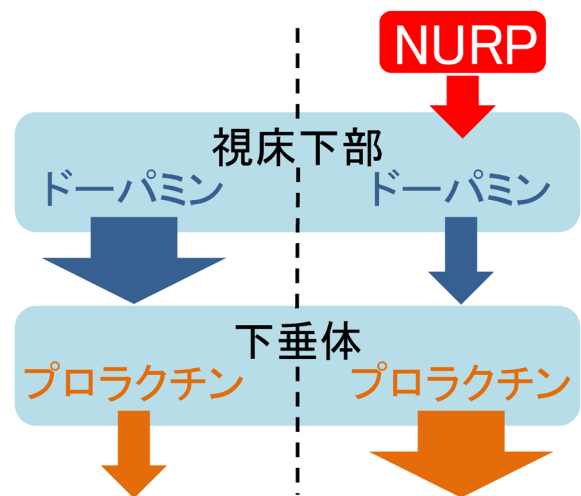


図2 脳室内投与したNURPによるプロラクチン分泌の促進  
下垂体からのプロラクチン分泌は、視床下部から放出されるドーパミンにより持続的に抑制されている(左)。脳室内投与したNURPは、視床下部からのドーパミン分泌を抑制することによって、下垂体からのドーパミン分泌を促進していると考えられる(右)。

影響しておらず、プロラクチンの分泌を特異的に促進していた。次に、分散培養したラット下垂体前葉細胞からのプロラクチン分泌に与える影響を検討したところ、NURPはその分泌を促進することができなかった。これは、NURPが下垂体前葉細胞に直接作用してプロラクチン分泌を促進できないことを示しており、脳室内投与したNURPは下垂体に間接的に作用してプロラクチン分泌を促進していると考えられた。下垂体からのプロラクチン分泌は、視床下部から放出されるドーパミンによって持続的に抑制されていることがよく知られている（図2）<sup>14)</sup>。そこで、NURPのプロラクチン分泌促進活性とドーパミンとの関連について検討した。その結果、ドーパミン受容体拮抗薬であるスルピリドを前投与することにより、ドーパミンによるプロラクチン分泌抑制を解除したラットでは、NURPの脳室内投与による血漿プロラクチン濃度の変化は認められず、これはNURPの分泌促進活性にはドーパミンが重要であることを示している。以上の結果から、脳室内投与したNURPは、視床下部に作用してドーパミン分泌を抑制することによって、下垂体からのプロラクチン分泌量を増加させていると考えられた（図2）。

## 6. 今後の展望

生理活性ペプチドの探索法を概説するとともに、新たに同定したNURPとそのプロラクチン分泌促進活性について述べた。脳室内投与したNURPは、この他にも自発運動やエネルギー消費、心拍数を増やし、体温を上昇させる<sup>15)</sup>。

このように、NURPは生理活性ペプチドとして機能することを示したが、その作用機序の解明には今後の受容体の同定が欠かせない。また、これらの機能がNURPの生理的役割であるか否かも不明である。このため、NURPとその受容体の細胞レベルでの発現分布やNURP欠損マウスの解析が待たれる。これらの一連の研究により、新たに同定したNURPの担ういまだ知られていない生体調節機構の解明が期待される。

## 謝辞

本研究は、寒川賢治博士、宮里幹也博士（国立循環器病研究センター）、村上昇特別教授、井田隆徳博士（宮崎大学）のご協力で得られた成果であり、深く感謝いたします。

## 文 献

- 1) 森健二, 宮里幹也, 寒川賢治, 児島将康 (2013) 視床下部ホルモン8) ニューロメジン. 内分泌・糖尿病・代謝内科, **36** (suppl), 127-133.
- 2) Eglen, R.M., Bosse, R., & Reisine, T. (2007) Emerging concepts of guanine nucleotide-binding protein-coupled receptor (GPCR) function and implications for high throughput screening. *Assay Drug Dev. Technol.*, **5**, 425-451.
- 3) Yoshida, M., Miyazato, M., & Kangawa, K. (2012) Orphan GPCRs and methods for identifying their ligands. *Methods Enzymol.*, **514**, 33-44.
- 4) Rouillé, Y., Duguay, S.J., Lund, K., Furuta, M., Gong, Q., Lipkind, G., Oliva, A.A. Jr., Chan, S.J., & Steiner, D.F. (1995) Proteolytic processing mechanisms in the biosynthesis of neuroendocrine peptides: the subtilisin-like proprotein convertases. *Front. Neuroendocrinol.*, **16**, 322-361.
- 5) Hinuma, S., Shintani, Y., Fukusumi, S., Iijima, N., Matsumoto, Y., Hosoya, M., Fujii, R., Watanabe, T., Kikuchi, K., Terao, Y., et al. (2000) New neuropeptides containing carboxy-terminal RFamide and their receptor in mammals. *Nat. Cell Biol.*, **2**, 703-708.
- 6) Washimine, H., Kitamura, K., Ichiki, Y., Yamamoto, Y., Kangawa, K., Matsuo, H., & Eto, T. (1994) Immunoreactive proadrenomedullin N-terminal 20 peptide in human tissue, plasma and urine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **202**, 1081-1087.
- 7) Tatemoto, K., Carlquist, M., & Mutt, V. (1982) Neuropeptide Y—a novel brain peptide with structural similarities to peptide YY and pancreatic polypeptide. *Nature*, **296**, 659-660.
- 8) Yamaguchi, H., Sasaki, K., Satomi, Y., Shimbara, T., Kageyama, H., Mondal, M.S., Toshinai, K., Date, Y., González, L.J., Shioda, S., et al. (2007) Peptidomic identification and biological validation of neuroendocrine regulatory peptide-1 and -2. *J. Biol. Chem.*, **282**, 26357-26360.
- 9) Mori, K. & Miyazato, M. (2016) in Handbook of Hormones Comparative Endocrinology for Basic and Clinical Research (Takei, Y., Ando, H., & Tsutsui, K. eds.), pp. 94-96, Academic Press, New York.
- 10) Löser, S. & Maizels, R.M. (2018) Immunology: The neuronal pathway to mucosal immunity. *Curr. Biol.*, **28**, R33-R36.
- 11) Mori, K., Miyazato, M., Ida, T., Murakami, N., Serino, R., Ueta, Y., Kojima, M., & Kangawa, K. (2005) Identification of neuromedin S and its possible role in the mammalian oscillator system. *EMBO J.*, **24**, 325-335.
- 12) Lo, G., Legon, S., Austin, C., Wallis, S., Wang, Z., & Bloom, S.R. (1992) Characterization of complementary DNA encoding the rat neuromedin U precursor. *Mol. Endocrinol.*, **6**, 1538-1544.
- 13) Mori, K., Ida, T., Fudetani, M., Mori, M., Kaiya, H., Hino, J., Nakahara, N., Murakami, N., Miyazato, M., & Kangawa, K. (2017) Identification of neuromedin U precursor-related peptide and its possible role in the regulation of prolactin release. *Sci. Rep.*, **7**, 10468.
- 14) Freeman, M.E., Kanyicska, B., Lerant, A., & Nagy, G. (2000) Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. *Physiol. Rev.*, **80**, 1523-1631.
- 15) Ensho, T., Maruyama, K., Mori, K., Miyazato, M., Kangawa, K., Nakahara, K., & Murakami, N. (2017) Neuromedin U precursor-related peptide (NURP) exerts neuromedin U-like sympathetic nerve action in the rat. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **492**, 412-418.

## 著者寸描

### ●森 健二 (もり けんじ)

国立循環器病研究センター研究所生化学部室長。博士 (工学)。

■略歴 1971年愛媛県に生る。94年徳島大学工学部卒業。96年同大学院工学研究科博士前期課程生物工学専攻修了。99年同大学院工学研究科博士後期課程物質工学専攻修了。国立循環器病センター流動研究員、同室員等を経て、2007年より現職。

■研究テーマと抱負 新規生理活性ペプチドの探索と機能解析。医療分野への応用可能な新しい生理活性ペプチドを発見したい。

■趣味 サッカー観戦。