

- Chem.*, 348, 941-943.
- 12) Rizzo, W.B. (2007) *Mol. Genet. Metab.*, 90, 1-9.
- 13) Kelson, T.L., Secor McVoy, J.R., & Rizzo, W.B. (1997) *Biochim. Biophys. Acta*, 1335, 99-110.
- 14) Ikeda, M., Kihara, A., & Igarashi, Y. (2004) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 325, 338-343.
- 15) Ashibe, B., Hirai, T., Higashi, K., Sekimizu, K., & Motojima, K. (2007) *J. Biol. Chem.*, 282, 20763-20773.
- 16) Beauchamp, R.O., Jr., Andjelkovich, D.A., Kligerman, A.D., Morgan, K.T., & Heck, H.D. (1985) *Crit. Rev. Toxicol.*, 14, 309-380.
- 17) Catalá, A. (2009) *Chem. Phys. Lipids*, 157, 1-11.

木原 章雄

(北海道大学大学院薬学研究院生化学研究室)

Complete metabolic pathway of sphingosine 1-phosphate and its importance as a metabolic intermediate

Akio Kihara (Laboratory of Biochemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University, Kita 12-jo, Nishi 6-choume, Kita-ku, Sapporo 060-0812, Japan)

## グレリンシグナルの多様性を支える分子メカニズム

### 1. はじめに

グレリンは、下垂体からの成長ホルモン分泌を誘導する G タンパク質共役型受容体の内因性リガンドとして児島、寒川らにより胃から精製、同定されたペプチドホルモンである<sup>1)</sup>。グレリン発見に先立ち、1980年代は医薬サイドの要請から成長ホルモンの分泌を促す薬剤の開発が盛んになった。その中である種の短鎖ペプチド (GHRP-6 など) は、成長ホルモン放出ホルモン (GHRH) とは異なる経路を介して成長ホルモンの分泌を促していることがわかってきた。1996年になると GHRP-6 や非ペプチド性アゴニスト MK-0677 の受容体として下垂体の成長ホルモン放出細胞に発現する GHSR1a (growth hormone secretagogue receptor type 1a) がクローニングされた。そして1999年になり GHSR1a の内因性リガンドとしてようやくグレリンが同定された。今日のグレリン研究の隆盛にはグレリンが食欲刺激作用をはじめとするエネルギー代謝に深く関与している事実が多分に寄与している。95, 96年に相次いで GHRP-6 の脳室内投与によりラットの食餌量が増加することが報告されたことから、グレリンや GHSR1a が食欲に深く関与するであろうことは発見以前に既に想定されていたものと

思われる。その機序は GHRP-6 のオピオイド類との構造類似性や GHRH の食欲亢進作用から類推されており、いずれの場合も構造と機能に関わる洞察が契機になった。グレリンの発見とともに「道は拓けていた」ことに感じ入らずにおれない。今やグレリンによる中枢性の食欲制御は視床下部弓状核にある NPY/AGRP 神経系の修飾を介していることが明らかになっており、現在から当時に舞い戻ってもグレリンを精製、同定するのであれば脳や下垂体が第一選択と思われる。しかし、ここに大きな難関があった。グレリンの主要な産生臓器は脳ではなく胃なのである。成長ホルモン分泌を刺激するホルモンが、実は中枢で食欲を促進し、さらには胃の蠕動運動にも関わるかもしれない、とすればあるいは胃でも発現しているかもしれない、という類推の光は当時あまりにも微かであったに違いない。児島らによる発見の経緯は、生化学者であるならば深く頷首せざるをえない物語としてご自身により紹介されているので是非ともご参照願いたい (児島将康先生のホームページ [http://www.lsi.kurume-u.ac.jp/molecular\\_genetics/index.html](http://www.lsi.kurume-u.ac.jp/molecular_genetics/index.html))。

### 2. 機能多様性の担保

一般に分子が機能多様性を獲得するには二通りの方法が考えられる。一つは分子の構造を簡単な融通の利くものにして生体内の様々な現象に関わる方法である。これには例えば細胞内セカンドメッセンジャーである cAMP があり、あるいは最近では亜鉛イオンなど更にシンプルな分子による「特別な」役割も注目されるようになってきた<sup>2)</sup>。もう一つは少しずつ形の違った構造類似体を数多く用意して〇〇ファミリーのような体裁を整えることである。そこで、グレリンは後者の範疇に入ると想定した上で、グレリンの分子種多様性について考察する。

ペプチドホルモンのとりうる分子多様性は 1) アミノ酸配列、2) アミノ酸鎖長、これに加えてグレリンの場合は、3) 脂肪酸修飾の種類に依存する。これをまとめたものが図 1A である。グレリンのアミノ酸配列は種間で極めてよく保存されており、第 1 コアはカエル (GLTFLSP) などの一部の両生類を除いてほぼ全てのグレリン分子において同一である。また、アミノ末端から 14 番目のグルタミンや 28 番目のアルギニンの欠失がラットとヒトにおいて遺伝子配列上の変異体として報告されている。そもそもヒツジやウシなどでは 14 番目のグルタミンはグレリン遺伝子にコードされていない。第 2, 第 3 コアは哺乳類間での保存性は高いが、鳥類や魚類では第 3 コアに多様性が存在

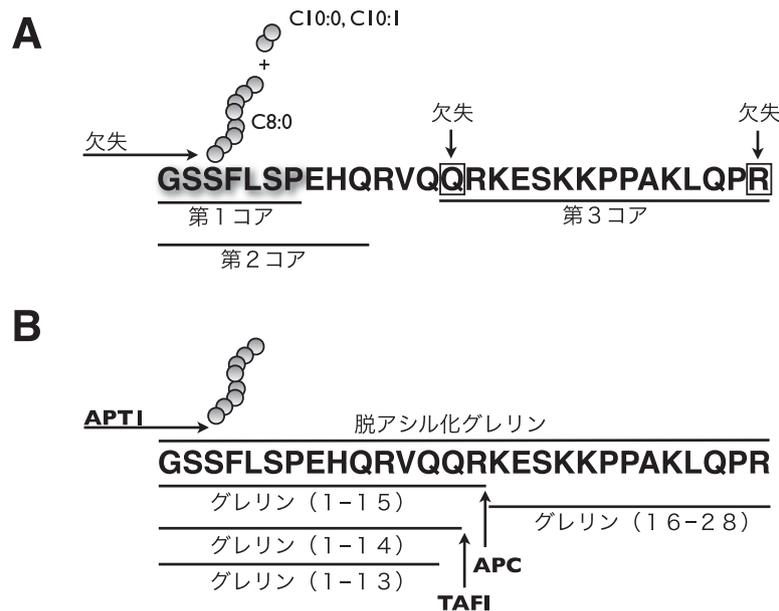


図1 グレリンの構造多様性

(A) グレリン (ヒト) の一次構造. 第1コア配列は脊椎動物間を通じてほぼ共通である. 第2, 3コアは哺乳類内で特に保存性が高い領域を示す.

(B) 血液中におけるグレリン分解様式の推定模式図. APT1: acylprotein thioesterase 1, TAFI: thrombin-activable fibrinolysis inhibitor, APC: activated protein C.

し, 概してペプチド鎖長が若干短いサイズになるのもこの領域の配列に依存している. なおグレリンの遺伝子構造について言が及びながら同遺伝子の前駆体ペプチドにコードされているオベスタチンに触れないのは不本意であるが, 紙幅に限りがあるため本稿では割愛させていただく.

脂肪酸修飾は3番目のセリン側鎖にエステル結合することにより行われるが, これにはオクタノイル基 (C8:0) のほかにデカノイル基 (C10:0あるいはC10:1) も天然型として存在することが確認されている<sup>3)</sup>. これらの脂肪酸修飾はグレリン産生細胞においてグレリン前駆体ペプチドの合成に並行して行われ, 成熟型グレリンはプロホルモン変換酵素 (PC1/3) により前駆体ペプチドから切り出された後に分泌される. 一方, 胃のグレリン産生細胞の中にはグレリン特異的アシル基転移酵素 (GOAT) を発現しないものも散見されることから, 脂肪酸修飾を受けずにそのまま分泌されるグレリンも一定量存在することが予想される. ヒトの場合, 脱アシル化型はアシル化型グレリンの10倍ほどの存在比で血中を循環している.

次に, グレリン分解産物について述べる. 成熟グレリンは血中に放出されると速やかに脱アシル化を受ける. 筆者らがウシ血清からグレリン脱アシル化活性を指標に責任酵

素の精製を行ったところ, 1996年に杉本らによりラット肝臓より精製・遺伝子クローニングされたリゾホスホリパーゼI (またはアシルプロテインチオエステラーゼ1, APT1) と同一の分子であることがわかった<sup>4,5)</sup> (図1B). 本酵素はリゾリン脂質を基質とし, 脂肪酸1分子とグリセロホスホリルコリンに加水分解する. ところがAPT1という別称が示す通り, 本酵素はその後Rasなどの低分子Gタンパク質のシステイン残基とパルミトイル基を加水分解するチオエステラーゼ活性も有する酵素であることが明らかにされた. さらにグレリンやWntなど脂肪酸修飾された分泌シグナル分子のアシル基を切除する活性も報告された. APT1以外にもグレリンの脱アシル化反応に関わる血中エステラーゼ類はいくつか報告されているが, 当研究室で再現性をみたところ *in vitro* ではグレリンに対する当該活性を確認することはできなかった<sup>6)</sup>.

一方, 脱アシル化酵素の精製過程において, グレリンのペプチド鎖はウシやマウス, ヒト血漿と反応させると一定のパターンで分解されることを見出した (図1B). 質量分析による解析から, グレリンはいったん15番目のアルギニンと16番目のリシンの間で切断された後に(1-14), (1-13), (1-12), (1-11)と, 漸次カルボキシル末端が消化さ

れていくことが推測された。最近になり、グレリン(1-15)を生じるエンドペプチダーゼは凝固第5, 第8因子を限定分解して凝固反応を停止させる活性化プロテインC (APC)であることを見いだした(投稿準備中)。さらにグレリン(1-15)からグルタミンを加水分解するカルボキシペプチダーゼの本体がTAFI (thrombin-activable fibrinolysis inhibitor)であることも見出した(未発表)。TAFIはこれ以降のカルボキシル末端の消化に関わることがないため、グレリン鎖短縮反応を更に進行させる未知の消化酵素について現在も同定を目指して研究を行っている。

ここで改めて図1のA, Bを比較したい。まず第3コアを大きく損なわないようにAPCによる切断が行われ、第1, 第2コア配列をなるべく保護するようにカルボキシル末端からの順次多段階の反応により分解を遅延させる仕組みがあるような印象を受ける。言い換えれば、保存性の低い領域を分解の標的としてコア領域を切り出しているようである。APCは配列特異性だけを考慮すればグレリン11番目のアルギニンのC末端側を切断することも期待できるが、実際は酵素標品を過剰量用いてグレリンを消化しても、生成するのはほとんどがグレリン(1-15)であり、グ

レリン(1-11)の生成はわずかである。以上のように、単一の遺伝子から切り出されるグレリンは、脂肪酸修飾やペプチド結合の限定分解などの組み合わせにより、数多くの構造類似体を生み出す可能性があることがうかがえる。

### 3. 構造と機能相関

ここまで紹介してきたグレリンの分子多様性は、それぞれがどのように振る舞い、細胞にどのように受け取られるのかの違いにより、機能的な多様性を獲得することが推測される。そこで、グレリンの構造と動態、生理活性の間どのような関係が成り立つのかについて考察する。古典的経路として示したが、GHSR1aへの結合には、グレリンの脂肪酸修飾が必須である(図2A)。脂肪酸の炭素鎖長についてはC8前後が最も受容体活性化に適合する長さであり、C2まで短くなってしまうと活性は失われ、逆にパルミチン酸のように炭素鎖を伸ばしていても受容体活性化能は低下する<sup>7)</sup>。また、我々の検討では天然に存在するデカノイルグレリン(C10)はAPT1による脂肪酸加水分解においてオクタノイルグレリン(C8)と同等の基質になり得るが、APCによるペプチド分解に対してC10はC8よ

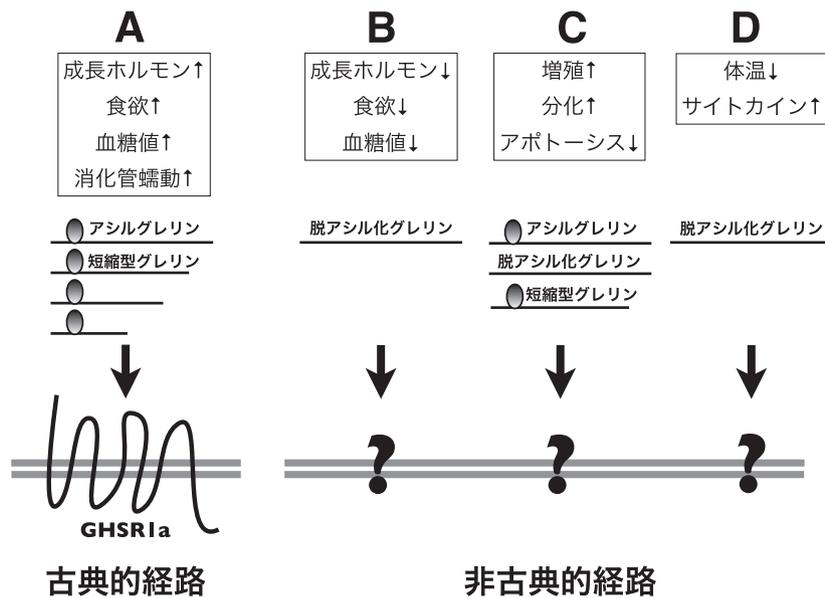


図2 生理機能から推測されるグレリンおよびその分解産物のシグナル伝達経路 (A) GHSR1aを介した古典的経路。(B), (C), (D) 受容体の実体が明らかでない機能について非古典的経路と位置づけ、文献情報をもとにモデルを策定した。(B) 脱アシル化グレリン特異的受容体。機能的には古典的経路に拮抗する作用をもつ。(C) 非特異的受容体。グレリンの脂肪酸修飾の有無やペプチドの鎖長に関わらず結合する許容性が高い受容体。増殖や分化など細胞の運命決定に関わる。(D) 脱アシル化グレリン特異的受容体であるが(B)とは異なり、古典的経路とは無関係である独自の生理作用を担う。

りも抵抗性を示した。また、血中においてはリポタンパク質などの相互作用<sup>8)</sup>への寄与も想定される。現在我々はオクタノイル化グレリン (1-15) の特異的な検出方法の確立を目指しているが、この分子は血液中では逆相 HPLC での展開が困難な、極めて疎水性の高いバルク画分に入ってしまうために難儀している。すなわち、脂肪酸修飾に関して受容体との相互作用に留まらず、血中動態への影響についても配慮が求められるだろう。

一方、脱アシル化グレリンについては対アシル化型の血中存在比率の高さから、この分解産物の意義に注目が集まったのは自然な流れであった。しかし、先にも述べたが脱アシル化グレリンは GHSR1a 軸においてグレリン作用を原理的に賦活しない。そこで、新しいグレリン受容体の存在が示唆されるが、残念ながらそのような受容体の存在はいまだ報告されていない (非古典的経路, 図 2)。ただし、GHSR1a のノックアウトマウスにおいてアシル化、脱アシル化グレリンのいずれも骨格筋萎縮に対する抵抗性作用が認められる<sup>9)</sup>など、第二の受容体を示唆する研究は枚挙にいとまがない。アシル化の有無における機能的な使い分けを意識するあまり、我々は拮抗・協調のいずれかでものを考えがちであるが (図 2B)、まだ見ぬ新規受容体の存在を示唆する例を含め、脂肪酸修飾は「特に考慮しない」ケースも目立つ (図 2C)。我々もグレリンがマウス筋原細胞株 C2C12 の筋への分化を促進することを確かめているが、この作用には脂肪酸付加も第 3 コア領域も必須条件ではなかった。脱アシル化グレリン独自の作用として体温調節<sup>10)</sup>やサイトカイン産生などグレリンの古典的作用からは大きく隔たりがある報告も見受けられる (図 2D)。いずれにしる、第二のグレリン受容体の存在は現時点で安易に否定されるべきではないだろう。

グレリンのペプチド鎖長と受容体活性化能にはシンプルな正の相関がある。28 残基の全長型が最も高い受容体結合能と活性化能を有しており、鎖長が短くなるにつれて活性は次第に低下する。最小活性部位はアミノ末端の 4 残基 (GSSF) とされている。最も配列保存性の高い第 1 コア領域がそのまま活性コアとして機能している (図 1A)。一方、第 3 コアに相当する (16-28) 領域についての生理作用に関する研究は筆者の知る限りほぼ手付かずのテーマとして残されているので、今後はぜひその生理活性を調べていきたい。

我々は、グレリン受容体を過剰発現させた PC12 細胞や HEK293 細胞の最初期遺伝子 EGR1 の活性化を指標にグレリン分解産物の生理活性を評価してきた<sup>11)</sup>。この系は

MAPK, cAMP 経路が優位に反映される印象をもっているが、やはりグレリン (1-15) は全長型グレリンの活性化に比較して活性は低くなるものの、グレリン (1-5) に比すると中程度にレポーター遺伝子を活性化することを確認した。ただし我々の研究を含め、これらの知見の多くが培養細胞株に GHSR1a を遺伝子導入した、いわゆる再構成系により得られた結果である点には十分留意する必要がある。より生理的な条件に近い実験系である、ラット胎仔の下垂体を用いた成長ホルモン分泌活性を指標とした研究報告では、短鎖グレリンによる成長ホルモン放出の亢進は確認されていない<sup>12)</sup>。リガンド・受容体相互作用にまつわる落とし穴があるとすればこの辺りにもあるかもしれない。すなわち下垂体においては GHSR1a と共役した  $G_{q/11}$  を介する細胞内  $Ca^{2+}$  上昇はグレリン受容体活性化の中心的な経路であることに間違いはない。しかし、膵  $\beta$  細胞におけるグレリンによるインスリン分泌の抑制効果については PTX 感受性の  $G_{\beta}$  経路を介しているようだ<sup>13)</sup>。これには GHSR1a とソマトスタチン受容体 SST5 のヘテロダイマー化が鍵を握っている可能性がある<sup>14)</sup>。GHSR1a は他にもドーパミン受容体 D1, セロトニン受容体 5-HT<sub>2c</sub> やメラノコルチン受容体 MC3 とヘテロダイマーを形成することが判明している。以上のような受容体相互作用はグレリンを含めたペプチド作用の強弱や下流シグナルの方向性を調節するものと考えられる。

#### 4. 展 望

意外なことにグレリンの遺伝子改変マウスはレプチンが変異した *ob/ob* マウスのような「劇的」な表現型を示さない。グレリン欠損あるいは過剰発現マウスが相次いで作製され、その後グレリン受容体欠損マウスの作成も報告された。しかし今のところ、グレリン関連遺伝子の改変による超肥満あるいは超痩身マウス作成の報告は聞かない。グレリンの単回投与はラットの覚醒レベルを向上させ、運動や摂食行動を亢進させる。ただし、慢性的に曝露してしまうと摂食だけが増加し、運動促進効果は消失してしまう。一方、インスリン高値は血中グレリン濃度を低下させることから、肥満や 2 型糖尿病ではグレリン濃度は慢性的な低値となり、BMI とは逆相関を示す。これらのことを考え合わせると個体レベルでのグレリンシグナルにおいては発現量や分泌量の多寡よりも、血中濃度のリズムあるいは変動性が大きな意味をもつ可能性が考えられる。

さきごろ、睡眠不足は血中レプチン濃度の低下を招き、逆にグレリン濃度は上昇して肥満になりやすいというコロ

ンビア大学の報告が話題になった。このような現象と、肥満でグレリンが低値を示すことは直観的には相容れず、整合性がとれない印象がある。ヒトの場合、血中アシル化グレリンは脱アシル化グレリンの1/10程度であるから、グレリン総量が低下しているならば主な原因は脱アシル化グレリンの「消失」であろうと考えられる。しかし、分泌量そのものが低下しているか、アシル化グレリンが血中に放出されかつ速やかに脱アシル化された分解産物をみているのか、アシル化されていないグレリンが血中に放出されるや否や分解を受けているのか、あるいはグレリンとは認識されない形に分解されているものなのか、現在のところ明快な説明はなされていない。血中グレリンの測定系に関しては早くから寒川らにより精力的に開発が行われており、既に洗練された方法が確立している。しかし、図1に示したような多分子種の存在を確かめるためにも、今後これらを分けて測定する工夫も必要となってくるだろう。事実、市販のELISAキットを含め我々が検討した限りでは、短縮型グレリンを認識できる抗体は非常に限られている。グレリンの血中濃度が低下している背景には、グレリンが限定分解を受けて短縮型が増加している可能性も否定できない。肥満やメタボリックシンドロームの病態は血管・循環器系の慢性炎症状態を引き起こし、並行して凝固系の活性化が誘導されていることが推測される。したがって短縮型グレリンが血中に増加している状況は、これらの生成機序から考えてさほど突飛な想定ではないと考える。あるいはこの辺にグレリン「消失」の意味を探る糸口も見えてくるのではないだろうか。

グレリンに関わる現象については実に様々な報告が蓄積しつつある一方で、グレリンの機能多様性を説明しうる分子的な実体や理論体系についてはまだ確立されていない部分も多い。本稿では詳しく触れることができなかったGHSR1aの下流シグナルや構成的活性化、食欲と深く結びついた嗅覚や学習行動など興味深い話題は拡がり、尽きず、気ばかりが急いでしまう。その時に、筆者はレニン・アンジオテンシン系の歴史を思い起こしている。今でこそアンジオテンシノーゲンから（本稿流の表現を許していただければ）アンジオテンシン（1-10）、（1-9）、（1-8）、（2-8）、（3-8）の分解産物が生じることや、それぞれに対する特異的受容体も明らかになってきた。レニン発見から今年で115年目である。グレリンについても短縮型のペプチドが同様の作用様式をもっているかについて現在のところ不明ではあるが、着実に実験データを積み上げていく必要があるだろう。

- 1) Kojima, M., Hosoda, H., Date, Y., Nakazato, M., Matsuo, H., & Kangawa, K. (1999) *Nature*, 402, 656-660.
- 2) Fukuda, T. & Kambe, T. (2011) *Metallomics*, 3, 662-674.
- 3) Nishi, Y., Mifune, H., & Kojima, M. (2012) *Methods Enzymol.*, 514, 303-315.
- 4) Sugimoto, H., Hayashi, H., & Yamashita, S. (1996) *J. Biol. Chem.*, 271, 7705-7711.
- 5) Satou, M., Nishi, Y., Yoh, J., Hattori, Y., & Sugimoto, H. (2010) *Endocrinology*, 10, 4765-4775.
- 6) Satou, M. & Sugimoto, H. (2012) *Methods Enzymol.*, 514, 165-179.
- 7) Heppner, K.M., Chaudhary, N., Müller, T.D., Kirchner, H., Habegger, K.M., Ottaway, N., Smiley, D.L., Dimarchi, R., Hofmann, S.M., Woods, S.C., Sivertsen, B., Holst, B., Pfluger, P. T., Perez-Tilve, D., & Tschöp, M.H. (2012) *Endocrinology*, 153, 4687-4695.
- 8) De Vriese, C., Haquebard, M., Gregoire, F., Carpentier, Y., & Delpoete, C. (2007) *Endocrinology*, 148, 2355-2362.
- 9) Porporato, P.E., Filigheddu, N., Reano, S., Ferrara, M., Angelino, E., Gnocchi, V.F., Prodham, F., Ronchi, G., Fagoonee, S., Fornaro, M., Chianale, F., Baldanzi, G., Surico, N., Sinigaglia, F., Perroteau, I., Smith, R.G., Sun, Y., Geuna, S., & Graziani, A. (2013) *J. Clin. Invest.*, in press.
- 10) Inoue, Y., Nakahara, K., Maruyama, K., Suzuki, Y., Hayashi, Y., Kangawa, K., & Murakami, N. (2012) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 430, 278-283.
- 11) Satou, M., Nakamura, Y., Ando, H., & Sugimoto, H. (2011) *Peptides*, 32, 2183-2190.
- 12) Torsello, A., Ghe', E., Catapano, F., Ghigo, E., Deghenghi, R., Locatelli, V., & Muccioli, G. (2002) *Endocrinology*, 143, 1968-1971.
- 13) Dezaki, K., Kakei, M., & Yada, T. (2007) *Diabetes*, 56, 2319-2327.
- 14) Park, S., Jiang, H., Zhang, H., & Smith, R.G. (2012) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 109, 19003-19008.

佐藤 元康

(獨協医科大学医学部生化学講座)

Molecular mechanisms involved in the diverse actions of ghrelin

Motoyasu Satou (Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Dokkyo Medical University, Kitakobayashi 880, Mibu, Shimotsuga-gun, Tochigi 321-0293, Japan)

## 痛みの受容機構と新規鎮痛薬創製の可能性

### 1. はじめに

痛みは、一次感覚神経のうち、主に有髄Aδ線維や無髄C線維の自由神経終末に存在する様々な感覚受容器（侵害