

機関番号：84404

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21870055

研究課題名（和文） C末端アミド焦点化ペプチドーム解析に基づく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） Peptidome analysis focusing on C-terminal amidation: Identification  
and functional analysis of novel bioactive peptides.

研究代表者

若林 真樹 (WAKABAYASHI MASAKI)

独立行政法人国立循環器病研究センター・分子薬理部・研究員

研究者番号：70552024

研究成果の概要（和文）：生物は恒常性維持のために多様な調節機構を構築しており、それらの中には生理活性ペプチドによる制御を受けているものが多い。よって、新しい生理活性ペプチドを発見し機能を解明できれば、多くの生命現象の調節機構について理解を深めることができる。本研究では、既知の活性ペプチドの約半数が有する C 末端アミドという構造に基づいた選別法により、未知の生理活性ペプチドの探索を試みた。新規活性ペプチドの発見には至らなかったものの、C 末端アミド構造を持つペプチドの選択的精製方法に大幅な改善をもたらすことができた。

研究成果の概要（英文）：Bioactive peptides play crucial roles in complex homeostasis regulatory systems in living organisms. Thus, it is essential to identify novel bioactive peptides and analyze their physiological functions to elucidate the homeostasis regulatory systems. In this study, we tried to isolate new bioactive peptides using their frequently observed structural characteristic, C-terminal amidation, as a hallmark. We developed a method for condensation of C-terminally amidated peptides from naturally occurring peptide mixtures, though a novel bioactive peptide was not identified.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,110,000	333,000	1,443,000
2010 年度	1,010,000	303,000	1,313,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,120,000	636,000	2,756,000

研究分野：ペプチド科学・細胞生物学

科研費の分科・細目：生物学・機能生物化学

キーワード：生理活性ペプチド・ペプチドーム解析・C末端アミド化・抗体アフィニティーカラム

## 1. 研究開始当初の背景

生体内で前駆体タンパク質から特異的切断を受けて生成する生理活性ペプチドは、神経伝達、ホルモン、細胞増殖・分化因子など

多種多様な生理活性を示し、生体の恒常性維持において大きな役割を担っている。よって、新しい生理活性ペプチドを同定し、機能を網羅的に解析することにより、多くの生命現象

の調節機序について理解を深めることが可能となる。また、ナトリウム利尿ペプチド、エンドセリン、アドレノメデュリンなど様々な例から明らかのように、新規生理活性ペプチドの発見、生理・病態生理的意義の解明は、基礎および臨床研究の両面において極めて大きな意義を持ち、疾患の診断、治療、創薬など様々な形で応用しうる可能性を秘めている。

従来、生理活性ペプチドのほとんどは、特定の生物活性を指標に生化学的に単一に精製した後にアミノ酸配列の同定を行う、あるいは部分アミノ酸配列を取得し cDNA クローニングを行うことにより構造が同定されてきた。一方、ヒトをはじめとする各種哺乳類の全ゲノム配列が明らかになったことを受け、G タンパク質共役型受容体 (GPCR) をコードすることが推定される遺伝子に着目し、そのリガンドとなるペプチドを実際に生物試料から探索する方法や、ゲノム配列からペプチドの生成部位を予測し候補ペプチドを合成して活性の有無を検討する方法などがとられている。しかし、タンパク質と比べてペプチドの存在量は、比較的豊富に存在する脳組織においても 1/1,000 以下と極めて少なく、プロテアーゼにより容易に消化・分解を受け、タンパク質の分解物との識別ができないことなどがボトルネックとなり、新たな内在性生理活性ペプチドの単離・同定が期待されている程進まないのが現状である。また、通常の研究のように計画的に研究を進めることができなかった。

国立循環器病研究センター研究所薬理部では、多数の生理活性ペプチドを発見してきた実績に基づき、多次元クロマトグラフィーや質量分析機を活用し、組織・細胞が産生するペプチドを一度に多数解析する方法 (ペプチドーム解析法) を開発してきた。本法を用いれば、組織抽出物や培養上清などから単離・精製を行わずに多数のペプチドが同定可能である。実際にペプチドーム解析により同定されたペプチド群から、C 末端アミド構造を指標に新規生理活性ペプチド、NERP (NeuroEndocrine Regulatory Peptide) -1 と NERP-2 を発見している。しかし、現在の解析法では、量的に少ないペプチドのシグナルが埋没し同定不能となる問題点が克服できず、生理活性ペプチドのような微量ペプチドの同定効率を上げるには解析試料中の標的ペプチドの存在比率を高める方法が必要であり、これを実現することができれば、新規生理活性ペプチドの発見が加速できると期待される。

## 2. 研究の目的

本研究では、上述の問題点を解決するため、

新たな生理活性ペプチド同定法を提案する。多くの生理活性ペプチドは C 末端のアミド構造を有し、その活性発現にアミド構造を必要としている。この C 末端アミド構造と前側数残基の配列を特異的に認識する抗体を、固定化したアフィニティーカラムとして用いることで、生理活性を持つことが十分期待される内在性ペプチドのみを選択的に濃縮し、ペプチドーム解析により同定する。C 末端アミド構造を利用する生理活性ペプチド同定法は 1980 年に Tatemoto らにより報告され、実際、Neuropeptide Y, Peptide YY, Galanin などのペプチドが同定された。しかし検出感が低いため、同定されたのは対象組織における存在量が多いペプチドのみであった。本法では存在量の少ないペプチドでも非常に高い精度、確率で同定できると期待されるため、従来法では同定されなかった C 末端アミド化ペプチドを包括的に同定する。また、同定されたペプチドが生理活性ペプチドである可能性が飛躍的に高まるため、生理活性スクリーニングの対象を厳選し、長期間、幅広く、正確に実施し活性の有無を判定できる。

## 3. 研究の方法

(1) C 末端アミド構造認識抗体を用いたアフィニティーカラムの作製

当研究室でこれまでに集積してきたタキキニン類や CGRP をはじめとする様々な C 末端アミド構造認識抗体を用いてアフィニティーカラムを作製する。使用する抗体は、キャリアタンパク質などで吸収後、protein A により精製する。多くの抗体は C 末端アミド構造に加えて数残基 (~5 アミノ酸程度) の一次構造を特異的に認識する。しかし、アフィニティーカラムとして用いた場合には抗体が高密度に存在するため、配列認識スペクトルが広がり、抗原ペプチドとは多少異なる配列のペプチドも結合できる可能性が高い。そこで、作製した抗体カラムの濃縮率や認識特異性について類似構造を持つペプチドを用いて検証し、抗体アフィニティーカラムの基礎的なデータを収集する。同一構造認識抗体を複数保持する場合には、より広範なペプチドの濃縮が期待できる抗体を選択する。また、配列認識スペクトルは抗体密度の影響を受けるため、ペプチドの濃縮効率が悪い場合は、抗体の濃縮を行うか、同一抗原に対する異なる抗体カラムをタンデムに用いて抗体量を上昇させ、濃縮を可能とする。さらに、個別に調製した抗体カラム(ゲル)を 10 種程度混合し、多様なアミド化ペプチドを一度に濃縮できるシステムを構築する。抗原とは異なるアミド化ペプチド混合物をモデルとして用いて濃縮率などを確認し、多種の試料に適用可能とする。可能な限り多種の C 末端アミド化

ペプチドを濃縮、回収するため、上述の基礎データをもとに、様々な抗体密度や種類の異なる抗体を組み合わせた抗体カラムを作成する（図1）。

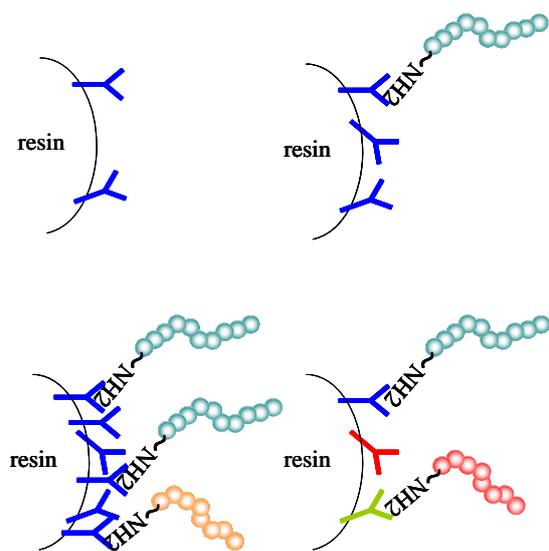


図1. 抗体密度、抗体種の変化に伴うC末端アミド化ペプチド濃縮効率の変化

#### (2) 組織抽出物・細胞培養上清からのペプチド画分の調製

各種組織の抽出物や種々の細胞の培養上清から、分解を極力排除してペプチド画分を調製する。C末端アミド化を触媒する酵素PAM (Peptidyl-glycine alpha-amidating mono-oxygenase) の生体内分布よりC末端アミド化ペプチドの分布を類推し、対象組織の選択を行う。具体的には、PAMは、脳下垂体、神経系組織・細胞、副腎髄質クロム親和性細胞、膵臓ランゲルハンス島細胞、甲状腺C細胞などに発現量が多く、未知のC末端アミド化ペプチドを産生することが期待されるため、第一対象とする。抽出した試料については、ペプチドーム解析法に従い逆相カートリッジカラムにより回収・脱塩後、ゲルろ過HPLCによりペプチド画分を調製する。

#### (3) ペプチドーム解析によるC末端アミド化ペプチドの包括的同定

(2)で調製したペプチド画分からC末端アミド化ペプチドを(1)の抗体カラムにより濃縮し、徹底したペプチドーム解析を行う。まず、濃縮したペプチド画分をナノ流速逆相LC (ナノLC) により高精度に分離し、質量分析計用プレートに直接スポット後、MALDI-TOF/TOF tandem MS (ABI4800) によりペプチドを包括的に解析・同定する。ナノLCで分離した試料はイオン化法の異なる

LTQ-Orbitrap XL-ETD (Thermo-Fischer) でも解析し、より高分子量のペプチドまで構造解析を可能とする。上記方法で未だペプチド量が多く微量ペプチドまで解析できない場合は、陽イオン交換LCを逆相LCの前に組み入れて5~10画分程度に分画後、ナノLCを行う。当該ペプチドの動物種を越えたC末端アミド化、アミノ酸配列、切断構造の保存を指標として活性ペプチド候補を選出する。

#### 4. 研究成果

当研究室で作製、集積してきた多種のC末端アミド構造認識抗体を用いて抗体アフィニティーカラムを作成し、抗原ペプチド（既知および新規生理活性ペプチドの部分ペプチド）や抗原に類似した構造をもつ既知のペプチドを用いて、濃縮率や抗原認識の特異性などに関する基礎データの収集を行った。同一ペプチドを認識するが、異なるアフィニティーや構造親和性をもつ抗体に関しても、個々に抗体アフィニティーカラムを作成し、そのカラム性能の確認、比較を行った。

ペプチドC末端のアミド化を触媒する酵素PAMの発現が見られる組織や、細胞を対象として、それぞれペプチドーム解析法に従って抽出、脱塩・濃縮、ゲルろ過を行いペプチド画分を調製した。ペプチド画分からC末端アミド化ペプチドを濃縮するため、調製した多種の抗体アフィニティーカラムに通した後、カラムに保持されたペプチドを溶出・回収し、ナノ流速逆相LCにより高精度に分離し、MALDI-TOF/TOFやLTQ-Orbitrapを用いて包括的に同定を行った。しかし、タンパク質分解物や試料中での存在比が非常に高いペプチドが、カラム樹脂や抗体に対して非特異的に吸着するために、溶出した試料中に存在する微量なペプチドの同定を妨げ、詳細な解析が行えなかった。

具体的には、ラット脳組織の抽出試料におけるミエリン塩基性タンパク質や、代謝酵素のように、非常に存在量が多いタンパク質の断片ペプチドが、どの抗体アフィニティーカラムを用いても幅広く顕著に観察された。これらは、存在比が高すぎるためにゲルろ過やイオン交換による分画を行っても改善はされなかった。また、Neuromedin K, Neuromedin Lといったタキキニン系の抗体を用いた際には、抗原ペプチドだけでなく、同じタキキニン系で類似配列を持ち、比較的存在量の多いSubstance Pが同定できたものの、やはり上述したようなタンパク質分解物や、存在量の多いペプチドにマスクされることで、微量なペプチドの検出ができなかった。このような結果を改善するため、非特異的吸着物の除去方法の検討を行うこととした。

まず、これらのペプチドに対する抗体アフ

イニテーターカラムや、カラム樹脂のみに試料を通すことで、非特異的に吸着するペプチドの除去を行った。また、試料をカラムへ結合・溶出させる際に、塩濃度や有機溶媒濃度を段階的に変化させ、分画して回収することで、測定試料中の非特異的吸着物の存在比を減少させることが可能となった。また、抗体密度を上げることにより、カラム樹脂以外に抗体タンパク質自身の共通構造に対する親和性で結合するペプチドも多いことが分かり、非アミド抗体を用いて作成した抗体アフィニティーカラムに試料を通すことで、非特異的吸着ペプチドを減少させた。これらにより、C 端アミド化ペプチドの濃縮率を大幅に向上できた。

結果として、C 末端アミド構造を持つ新規生理活性ペプチドの発見には至らなかったが、各種培養細胞株の培養上清から、これまでに報告されていない既知のC 末端アミド化ペプチドの分泌を確認できた。脳抽出物においても、低分子量ペプチド画分ではタキキニン類をはじめとする主要なペプチドが同定されている。以上の結果より、抗体アフィニティーカラムを用いたアミド化ペプチド濃縮効率の上昇は可能であることは証明されたと考えている。引き続き非特異的吸着を減少させる条件を検討、改良し、適切な細胞、組織のペプチド画分を組み合わせることにより、生体内で微量にしか存在しない新しいC 末端アミド化ペプチドを同定することが可能になると考えられる。

## 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)

[学会発表] (計 1 件)

① Masaki Wakabayashi, Kazuki Sasaki, Tsukasa Osaki, Yoshinori Satomi, Toshifumi Takao, and Naoto Minamino, Global Identification of peptide processing sites implicated in the regulated secretory pathway, 5th International Peptide Symposium, 2010 年 12 月 6 日, 京都

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

若林 真樹 (WAKABAYASHI MASAKI)

独立行政法人国立循環器病研究センター・分子薬理部・研究員

研究者番号：70552024