

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年6月24日現在

機関番号：84404

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22591023

 研究課題名（和文）分泌顆粒内ペプチドのスナップショット解析による
新規生理活性ペプチド探索

研究課題名（英文）Snapshot peptidomics for bioactive peptide discovery

研究代表者

佐々木 一樹 (SASAKI KAZUKI)

独立行政法人国立循環器病研究センター・研究所・室長

研究者番号：80260313

研究成果の概要（和文）：質量分析法を活用して、生理活性ペプチド候補分子を同定する新しいアプローチを考案した。具体的には、ヒト内分泌腫瘍由来培養株の分泌顆粒内のペプチドを質量分析し、ペプチド群のN端およびC端配列を包括的に解析して、前駆体タンパク質からのペプチド生成部位（プロセッシング部位）を同定した。その情報から候補ペプチドの分子型を推定し、その活性を簡便にスクリーニングするために、細胞内カルシウム動員を *ex vivo* で評価する系を構築した。視床下部および下垂体を標的とする2種類のペプチドを同定し、NERP-3、-4と命名した。これらのペプチドはヒト・マウス・ラットで配列が共通である。視索上核には抗NERP-3反応性の利尿ホルモン（ADH）産生神経内分泌細胞が存在し、*in vitro* でNERP-3は視床下部から用量依存性にADH分泌を促進することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：A new strategy for discovering biologically active peptides has been developed. It involves mass spectrometry-based profiling of secretory peptides released from cells with secretory granules. Selected human cell lines of endocrine origin were analyzed for their secretory peptide profiles using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. A large set of secretory peptide sequences was used to identify processing sites of secretory proteins. Candidates for biologically active peptides were selected from the peptide processing maps and tested on selected bioassay systems. This approach has resulted in the identification of previously uncharacterized biologically active peptides, designated NERP-3 and NERP-4, which raise intracellular calcium levels in hypothalamus and pituitary tissues. Furthermore, it was found that NERP-3 stimulates vasopressin release from an *in vitro* preparation of the hypothalamic supraoptic nucleus, where vasopressin neurons reactive to NERP-3 were identified. This peptidomics approach has the potential to identify biologically active peptides that are beyond the reach of conventional strategies.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内分泌学

キーワード：質量分析、生理活性ペプチド

1. 研究開始当初の背景

ペプチドホルモン・神経ペプチドに代表される生理活性ペプチドが新たに発見されると、基礎研究から創薬への応用まで広範な波及効果が見込まれる。過去約20年は、Gタンパク質共役型受容体に対するリガンドとして、生化学的手法で生理活性ペプチド探索が内外で活発におこなわれてきた。しかし、近年は、新たに発見される生理活性ペプチドは激減してきている。この点を打破するためには、新しい探索法の開発が望まれる。

我々は先行研究で、ヒト甲状腺髄様癌培養株の培養上清中のペプチドを質量分析でプロファイリングし、新しいC末端 amid 化ペプチドを2種類同定した (Yamaguchi H, Sasaki K, et al. J Biol Chem, 2007)。機能解析の結果、これらのペプチドは、抗利尿ホルモン分泌を内因性に抑制する作用があることを明らかにした。この研究は、質量分析によるプロファイリングから開始して、新規生理活性ペプチドの発見に至った世界初の事例である。なお、この培養株は甲状腺C細胞由来であることを反映し、インタクトカルシトニンおよびその断片ペプチドが同定された。しかし、この細胞が分泌しているその他の既知のペプチドホルモン類は同定されなかった。

そこで、本研究では、生理活性ペプチドが内分泌細胞の分泌顆粒に局在し、エクソサイトシス刺激によって短時間のうちに分泌されることに着目した。上記の培養株に2分間の刺激を与えると、同定ペプチド数は500程度までに増加し、同定ペプチドの98%が分泌顆粒への局在が明らかなものであった。アミノ酸長で30を超える既知のペプチドホルモン類も既報通りの分子型で同定されるようになった。既知生理活性ペプチドが確実に同定できる条件が整ったことで、新しいペプチドの発見が可能な分析技術基盤が整ったと言える。

質量分析では得られる情報は、アミノ酸配列のみであり、これだけではどのペプチドが活性ペプチドであるか同定はできない。また、同定される3桁におよぶペプチド全てを活性検証用に合成できないことも明らかである。そこで、本研究では既知生理活性ペプチドの配列上の特徴を十分に考慮し、得られる膨大な配列情報の中から、20ペプチド程度に候補ペプチドを選択する方法を編み出した。

生理活性ペプチドは、プロテオーム解析の手法をそのまま適用しても同定することはできない。生理活性ペプチドは大きさの多様性もあり、2007年に高性能の質量分析計が登場して初めて質量分析で比較的容易に配列

決定ができるようになった。さらに、配列決定のための新しい開裂法が実際に応用可能となり、本研究ではその方法も採用して、質量分析による探索法の可能性を最大限に活用するべく様々な基礎検討もおこなうこととした。

2. 研究の目的

本研究では、新しいアプローチによる新規生理活性ペプチドの発見を目的とする。具体的には、内分泌系培養細胞の分泌顆粒内に存在するペプチドのアミノ酸配列を質量分析で決定し、集積した配列情報全体を解析して生理活性ペプチド候補分子を選定する。候補ペプチドを合成し、活性の有無を細胞レベルのアッセイ系で評価する。活性が認められた候補ペプチドは、発現組織・細胞を同定し、生理的意義の有無について検証する。臨床応用へのシーズとなりうる生理活性ペプチドの提案を最終目標とする。

3. 研究の方法

1) 分泌顆粒内ペプチドの効率的な配列取得法の確立

生物試料中に混合状態で含まれるペプチドの配列を効率よく同定できる唯一の手法が、液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析法である。新規生理活性ペプチド発見のためには、分泌ペプチドの配列を可能な限り多数取得することが必須である。同定数が多くなるほど、未知ペプチドが発見される確率も高まる。その為の諸般の条件検討を行う。

1-1) 分泌顆粒を有する内分泌系培養細胞株の選定

内分泌細胞初代培養系では、配列決定に十分な量の分泌ペプチドの確保は困難であるため、継代可能なヒト培養株を用いる。培養株は、本来の形質をそのまま維持しているわけではないものの、既知のペプチドホルモン類をはじめとする生理活性ペプチドが既報の分子型で分泌されていることを確認済みである (Sasaki K, et al. Mol Cell Proteomics, 2009)。また、生理活性ペプチドの生成に必要なプロセシング酵素類 (PC1/3, PC2, CPE, PAM) の発現も確認されている。分泌顆粒をもつ培養株の多くはこのような形質を維持している。下垂体、甲状腺、膵ラ氏島、肺などに由来する培養株を選定し

た。

1-2) 上記株からの分泌ペプチドの回収

各培養株毎に、効果的な分泌刺激は異なっているため、最適な刺激条件を検討した。主に、細胞内 cyclic AMP, Ca 濃度を上昇させる低分子薬剤が有効であった。分泌ペプチドと共にプロテアーゼ類も分泌されることを考慮し、刺激時間はおおむね 2 から 15 分以内とした。透過電顕で、分泌顆粒が開口分泌している状態を確認した。

刺激後に回収した無血清培養上清 (図 1) から、培地由来の塩類、糖類を除去するために固相抽出を行った。固相抽出では、分子量 1 万以上のタンパク質も混入してくるため、ゲルろ過高速液体クロマトグラフィーでタンパク質とペプチドを分離し、ペプチドが含まれる分子量が 500 から 1 万未満の画分を回収した。試料は凍結乾燥し、適宜、還元アルキル化処理を行い、脱塩後に質量分析用の試料とした。

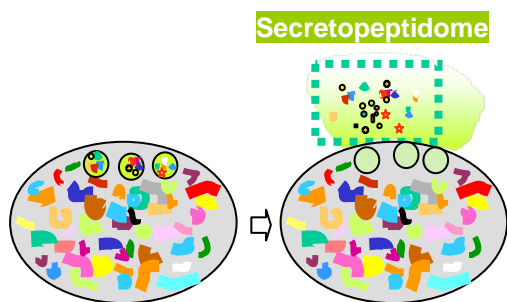


図 1. 分泌顆粒内ペプチドの回収

1-3) 単離したペプチド画分の物性による分離とタンデム質量分析によるアミノ酸配列の同定

単離したペプチド画分は、逆相担体が充填されたマイクロカラムを用いたナノ流速液体クロマトグラフィーで分離し、オンライン接続した質量分析計で、タンデム質量分析法 (LC-MS/MS) で配列を逐次同定した。同定数を増やすために、カラムの変更ならびに、事前の陽イオン交換クロマトグラフィーによる分離を適宜実施した。LC-MS/MS で取得された多数のスペクトルは、生理活性ペプチドに特徴的な翻訳後修飾である C 末端アミド化、N 末端アセチル化の有無を加味して、汎用型ソフトウェアを内在ペプチド用にカスタマイズし、ヒトデータベースに対して検索を実施した。これらに合致しないスペクトルは可能な限り目視的に配列読み取り作業をおこなった。

2) 同定されたペプチド群からの生理活性ペプチド候補の選別

取得されたペプチド配列情報を総合し、生理活性ペプチド候補分子を選択するアプローチを構築した。

2-1) ペプチドプロセッシングマップの作成

同定されたペプチドは、前駆体毎に仕分けして前駆体のアミノ酸配列上にマッピングする。分泌ペプチドは、分解を司るプロテアーゼと共に分泌されるので、速やかに分解していく。しかし、上記のプロトコールで回収したペプチドのプロファイルを解析したところ、同定ペプチドの 7-8 割は、プロセッシングを受けた切断部位をそのまま保持していることが明らかになった (Sasaki K, et al. Mol Cell Proteomics, 2009)。図 2 は作成マップの一例である。太い矩形は前駆体配列、左端の灰色部分はシグナルペプチド、黒の縦線は塩基性アミノ酸、灰色の横線は同定ペプチドを示す。このように同定ペプチドから作成されたマップから、前駆体の主要な切断部位 (▽で示す) が浮かび上がり、主要なペプチドは▽で区切られた 3 つの分子であることがわかる。

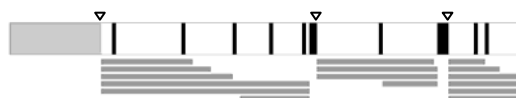


図 2. 同定ペプチドより作成したペプチドプロセッシングマップ

2-2) 活性ペプチド候補分子の選別

配列情報から生理活性ペプチドを確実に発見できる方法は存在しない。しかし、生理活性ペプチドは、①種間で配列が保存されている。②配列内に塩基性アミノ酸を含むことが多い。③N 末端および C 末端は塩基性アミノ酸に隣接していることが多い。④特定アミノ酸残基に修飾を受けていることが多い (例えば C 末端アミド化など) といった特徴を持っている。

上記の例のような場合は、3 つのペプチドがプロセッシング産物であると想定される。まず、種間で相同性の高い分子について上記の②から④の事項を検討する。塩基性アミノ酸を多く含むペプチドの同定確率を高めるために、陽イオン交換クロマトグラフィーで高塩濃度で溶出される画分について、近年登場した新しいタンデム質量分析法である電子転移開裂法 (ETD) を採用し、配列同定に用いた。

3) 候補ペプチドの活性の検証と正常組織での発現細胞の同定

選択した候補ペプチドを実際に合成し、以下のようなアッセイ系で活性のスクリーニングを実施した。

a) 初代培養の心筋、アストロサイト、線維芽細胞、血管内皮細胞、および各種の継代可能な培養株を用いた MAP kinase の活性化をリン酸化抗体を用いたウエスタンでスクリーニングした。

b) カルシウム感受性タンパク質エクオリン遺伝子を全身性に発現したトランスジェニックマウスの組織片を用いた。カルシウムアッセイ系。陽性コントロールとしては、ATP、bradykinin を用いた。

c) 抗菌活性の評価。AlamarBlue 法および通常のコロニーアッセイを用いた。陽性コントロールとして β -defensin-2、cathelicidin (LL-37) を用いた。

4. 研究成果

(1) ヒト臍ラ氏島由来培養株の分泌ペプチドのプロファイリング

上記株に脱分極刺激を与え、通常タンデム質量分析の開裂法である衝突誘起解離法 (CID) と電子転移解離法 (ETD) を併用し、前者で 795 ペプチド、後者で 569 ペプチドを同定した。両者で同定できたペプチドは 397 個であり、合計で約 950 ペプチドが同定された。うち、シグナルペプチドを持つ前駆体由来するペプチドは 96% であった。同定ペプチドの半分以上は 3000 Da を超える大きなペプチドであり、分泌ペプチドの同定に関して、質的・量的に世界で最も優れた結果が得られた。天然ペプチドは、配列内部に塩基性アミノ酸を多く含むが、ETD はそのような配列決定に威力を発揮することを明らかにした。質量分析の同定結果は、false positive が多いことが近年問題になっているが、本解析の結果は同定結果の判断基準が最も厳格な米国の学会誌に報告している (Sasaki K, et al. Mol Cell Proteomics, 2013)。

(2) VGF [554-577]-NH₂ の同定およびその作用

上記の ETD によって神経細胞・内分泌細胞に選択的に発現する分泌性タンパク質 VGF 由来の新しい C 末端アミド化ペプチドを同定した。配列内部に塩基性アミノ酸であるアルギニ

ンが 3 つ連続する特徴的な配列で、CID では同定することが不可能であった。ヒトの代表的な抗菌ペプチドである β -defensin-2、cathelicidin (LL-37) に匹敵する抗菌活性をもつことが判明した (Sasaki K, et al. Mol Cell Proteomics, 2013)。

(3) NERP-3, NERP-4 の同定およびその作用

ヒト神経内分泌腫瘍由来培養株の分泌ペプチドプロファイルの中から、生理活性ペプチドに特徴的な配列を選択した。アポエクオリンマウス組織を用いたカルシウムアッセイ系で、下垂体および視床下部組織で細胞内カルシウムを上昇させることのできる新規ペプチドを 2 種類同定し、NERP-3, NERP-4 と命名した (Sasaki K, et al. J Proteome Res, 2010)。NERP-3 は、産業医大第一生理学の上田陽一教授との共同研究により、視索上核の抗利尿ホルモン産生ニューロンに応答細胞があること、ならびに、in vitro で用量依存性に抗利尿ホルモンの分泌を促進させる作用があることを明らかにした (Fujihara H, et al. Endocrinology, 2012)。

(4) AMP-IBP5 の同定およびその作用

ヒト神経内分泌腫瘍由来培養株の分泌ペプチドのうち、塩基性画分のペプチド群をプロファイルすることによって、insulin-like growth factor-binding protein 5 (IGFBP-5) 由来で、分子内にジスルフィド結合を有する新しい C 末端アミド化ペプチドを同定し、AMP-IBP5 と命名した。このペプチドは、特定のグラム陰性あるいは陽性菌に対しては、ヒトの代表的な抗菌ペプチドである β -defensin-2、cathelicidin (LL-37) と同等以上の抗菌活性を有していることを明らかにした (Osaki T, et al. J Proteome Res, 2011)。このペプチドは、ゲノムの in silico 解析ならびに通常のプロテオーム解析では、決して同定されないペプチドであり、実在するペプチドをその分子型のままで同定する本研究 (ペプチドミクス研究) の有用性が明確に示された。また、IGFBP-5 から活性ペプチドが生成することはこれまでに全く想定されていなかった知見である。

(5) 新たに見出された NERP-2 の作用

以前に同定した NERP-2 (Yamaguchi H, Sasaki K, et al. J Biol Chem, 2007) には、宮崎大学医学部神経呼吸内分泌代謝学の中里雅光教授との共同研究により、活性は GLP-1 の数十分の 1 以下であるもののインクレチン様作用があることを見出した (Moin AS, et al. BBRC, 2012)。

(6) まとめ

本研究は、新規生理活性ペプチドの探索法の開発に主眼をおいた研究で、実際にヒト組織にも発現する生理活性ペプチドを同定することができた。いずれも、遺伝子解析やプロテオーム解析では同定できないペプチドであり、実在ペプチドをその翻訳後修飾を含めて同定していくアプローチの有効性が示された。抗菌活性を有する塩基性ペプチドは、抗菌作用以外の活性を有している可能性が高い。今後は、同定されたペプチドの機能解析、病態における変動を検討していく予定である。

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 12 件)

1. Sasaki K, Osaki T, Minamino N. Large-scale identification of endogenous secretory peptides using electron transfer dissociation mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics* 2013, 12: 700-9. (査読有)
2. Shimamura S, Sasaki K, Tanaka M. The src substrate SKAP2 regulates actin assembly by interacting with WAVE2 and cortactin proteins. *J Biol Chem*. 2013, 288: 1171-83. (査読有)
3. Tokizane K, Konishi H, Yasui M, Ogawa T, Sasaki K, Minamino N, Kiyama H. Continuous stress promotes expression of VGF in melanotroph via suppression of dopamine. *Mol Cell Endocrinol*. 2013, 372:49-56. (査読有)
4. Fujihara H, Sasaki K, Mishiro-Sato E, Ohbuchi T, Dayanithi G, Yamasaki M, Ueta Y, Minamino N. Molecular characterization and biological function of neuroendocrine regulatory peptide-3 in the rat. *Endocrinology* 2012, 153: 1377-86. (査読有)
5. Moin AS, Yamaguchi H, Rhee M, Kim JW, Toshinai K, Zaved Waise TM, Kaznin F, Matsuo T, Sasaki K, Minamino N, Yoon KH, Nakazato M. Neuroendocrine regulatory peptide-2 stimulates glucose-induced insulin secretion in vivo and in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*. (2012) 428: 512-7. (査読有)
6. Yagi R, Tanaka M, Sasaki K, Kamata R, Nakanishi Y, Kanai Y, Sakai R. ARAP3 inhibits peritoneal dissemination of scirrhous gastric carcinoma cells by regulating cell adhesion and invasion. *Oncogene* 2011, 30: 1413-21. (査読有)
7. Osaki T, Sasaki K, Minamino N. Peptidomics-based discovery of an anti-microbial peptide derived from insulin-like growth factor-binding protein 5. *J Proteome Res*. 2011, 10:

1870-80. (査読有)

8. Mishiro-Sato E, Sasaki K, Matsuo T, Kageyama H, Yamaguchi H, Date Y, Matsubara M, Ishizu T, Yoshizawa-Kumagaye K, Satomi Y, Takao T, Shioda S, Nakazato M, Minamino N. Distribution of neuroendocrine regulatory peptide-1 and -2, and proteolytic processing of their precursor VGF protein in the rat. *J Neurochem*. 2010, 114: 1097-106. (査読有)
9. Sasaki K, Takahashi N, Satoh M, Yamasaki M, Minamino N. A Peptidomics Strategy for discovering endogenous bioactive peptides. *J Proteome Res*. 2010, 9: 5047-52. (査読有)
10. Matsuo T, Yamaguchi H, Kageyama H, Sasaki K, Shioda S, Minamino N, Nakazato M. Localization of neuroendocrine regulatory peptide-1 and-2 in human tissues. *Regul Pept*. 2010 163: 43-8. (査読有)
11. Toshinai K, Yamaguchi H, Kageyama H, Matsuo T, Koshinaka K, Sasaki K, Shioda S, Minamino N, Nakazato M. Neuroendocrine regulatory peptide-2 regulates feeding behavior via the orexin system in the hypothalamus. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2010, 299: E394-401. (査読有)
12. Tominaga A, Sugawara H, Futagawa T, Inoue K, Sasaki K, Minamino N, Hatakeyama M, Handa H, Miyata A. Characterization of the testis-specific promoter region in the human pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) gene. *Genes Cells*. 2010 15: 595-606. (査読有)

[学会発表] (招待講演のみ 計 2 件)

- 佐々木一樹：ペプチドミックスのための質量分析。日本生化学会 2011年9月22日
- 佐々木一樹、質量分析を活用する分泌ペプチドーム解析と生理活性ペプチド探索。日本内分泌学会 第28回内分泌代謝学サマーセミナー 2010年7月9日

[図書] (計 6 件)

1. Sasaki K and Minamino N. Peptidomics strategy for discovering endogenous peptides. (Kastin A ed. in Handbook of Biologically Active Peptides 2nd ed.) Academic Press, pp. 1772-79, 2013年
2. 佐々木一樹、尾崎司、南野直人：ペプチドミックスを活用する生理活性ペプチドの探索。ファインケミカルシリーズ ペプチド医薬の最前線 (木曾良明、向井秀仁編) シーエムシー出版、108-11, 2012年
3. 佐々木一樹、山口秀樹、中里雅光、南野直人：セクレトペプチドーム解析で見えられた新しい摂食調節ペプチド NERP-2、実験医学増刊「代謝・内

分泌ネットワークと医薬応用」(児島将康、斎藤祐見子、中里雅光編), 羊土社, 98-103, 2011年

4. 佐々木一樹、山口秀樹、中里雅光、南野直人: 質量分析法を活用する生理活性ペプチドの探索 -Neuroendocrine Regulatory Peptides の発見、臨床化学 10 巻 2 号, 127-32, 2011 年.

5. 佐々木一樹、南野直人: 生理活性ペプチド探索のためのペプチドミクス、実験医学増刊「創薬・タンパク質研究のためのプロテオミクス解析」(小田吉哉、長野光司編), 羊土社, 162-7、2010年

6. Osaki T, Sasaki K, Minamino N. Secretopeptidome mining for novel bioactive peptides. Peptide Science, Vol. 2009, 143-4, 2010年

[産業財産権]

○取得状況 (計 2 件)

名称: 生理活性ペプチド及びその用途

発明者: 山崎基生、高橋憲行、南野直人、佐々木一樹

権利者: 協和発酵キリン株式会社、独立行政法人国立循環器病研究センター

種類: 特許

番号: 2012-75408

取得年月日: 2012年4月19日

国内外の別: 国内、国外

名称: ペプチド及びその用途

発明者: 南祇利実、南野直人、佐々木一樹、尾崎 司

権利者: 武田薬品工業株式会社、独立行政法人国立循環器病研究センター

種類: 特許

番号: 2012-167017

取得年月日: 2012年9月6日

国内外の別: 国内、国外

[その他]

ホームページ等

http://www.ncvc.go.jp/res/divisions/pharmacology/001/a_detail.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐々木 一樹 (Sasaki Kazuki)

独立行政法人 国立循環器病研究センター・研究所・室長

研究者番号: 80260313

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし