

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24年5月15日現在

機関番号：34204

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21603014

研究課題名（和文） タンパク質構造に隠された生体機能ペプチド「クリプタイド」による生体調節機序の解明

研究課題名（英文） Cryptides: elucidation of regulatory mechanisms by functional peptides hidden in protein structures

研究代表者

向井 秀仁 (MUKAI HIDEHITO)

長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部・准教授

研究者番号：20251027

研究成果の概要（和文）：タンパク質や生理活性ペプチドが生合成され、また代謝・分解される段階では、同時に多数の断片ペプチドが生成されるが長い間これらは機能を持たない代謝産物であると考えられてきた。本研究では先行研究により発見されていた好中球活性化ペプチド、マイトクリプタイド-1に加えて、新たにマイトクリプタイド-2およびマイトクリプタイド-3をブタ心臓から単離・同定し、それらがミトコンドリアタンパク質由来の新規好中球活性化ペプチドであることを明らかにするとともに、これらマイトクリプタイドの受容体およびその細胞内情報伝達機構を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Here, we discovered that many fragmented peptides simultaneously produced during maturation and degradation processes of functional proteins and bioactive peptides have efficient physiological activities although these fragmented peptides have long been thought that they had no biological significance. We purified and identified novel functional peptides hidden in mitochondrial proteins mitocryptide-2 and -3 that activated neutrophils at nanomolar concentrations from porcine hearts. The receptor molecules and the intracellular signal mechanisms for these mitocryptides were also elucidated.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：ペプチド科学、細胞生物化学

科研費の分科・細目：ケミカルバイオロジー

キーワード：クリプタイド、マイトクリプタイド、生理活性ペプチド、Gタンパク質、Gタンパク質共役受容体、好中球、バイオインフォマティクス、自然免疫

1. 研究開始当初の背景

生体は、構成する組織、細胞間で互いに多くの情報をやりとりすることにより、その“いのち”を維持している。これら情報のやりとりは、神経伝達物質、ホルモン、サイト

カインなどの多くの化学物質が関与していることが知られている。それらには、インスリンやグルカゴン、サブスタンスP、グレリンなど多数のペプチド性因子が存在し、生体から抽出・構造決定され、生体機能が明らか

にされている。

これらペプチド性のホルモンや神経伝達物質は、まず活性を持たない前駆体タンパク質として生合成された後、特異的タンパク質分解酵素により切断され、活性を持つ成熟体となる。この際、それ以外にも多数のペプチドが前駆体タンパク質から生成される。しかしこれらペプチドは、生理活性ペプチドを生成するために生じる断片ペプチドで機能を持たないと考えられていた。ところがこれら断片ペプチドが生理活性を持つ例が報告されており、未だ同定されていない内因性生理活性ペプチドが多数存在することはほぼ間違いない。またタンパク質も生理活性ペプチドと同様に、その生合成ならびに代謝過程で様々な断片ペプチドが生じるが、産生される多種の断片ペプチドは、単なる代謝産物として考えられており、その機能を解明する研究は全く行われていない。

2. 研究の目的

本研究は、最近我々が生体から単離・精製することにより多数存在することを明らかにした、タンパク質構造に隠された新しい内因性生理活性ペプチド、「クリプタイド」を系統的、網羅的に同定する方法論を確立し同定するとともに、クリプタイドが関与する生体情報伝達機構を明らかにするため、それらの受容体タンパク質を同定、細胞内情報伝達系を解析し、クリプタイドの生理的存在意義を明らかにすることを目的とした。本研究はまた、これらの研究を通じて全く新しい概念の創薬リード化合物ならびに受容体を提供するとともに、原因が不明である疾病の発症原因を明らかにすることも目的とした。

3. 研究の方法

(1) 活性ペプチドの単離・精製および同定

本研究では、まず新規好中球活性化ペプチドを同定するため、様々なカラムクロマトグラフィーを用いて、健康なブタ心臓から活性ペプチドの単離・精製を試みた。

(2) 活性ペプチドの予測

本研究ではまた、我々の先行研究により好中球活性化能を持つクリプタイドを同定しているミトコンドリアタンパク質由来ペプチドについて、その生合成から代謝・分解過程で産生されるペプチドを予測・同定する方法論を確立することを試みた。我々が既に同定している好中球を活性化する能力を持つ

クリプタイド、マイトクリプタイド-1は、Gタンパク質を直接活性化する能力を持つこと、Gタンパク質を活性化するペプチドは、一次構造の類似性はないものの、二次構造上に相同性が認められることが明らかになっている (Biopolymers, **88**, 190, 2007; J. Biol. Chem., **283**, 30596, 2008)。そこで本研究では、我々が得ているGタンパク質活性化ペプチド (Gタンパク質アクチベーター) の構造情報を整理、解析することで、タンパク質の配列よりGタンパク質アクチベーターとなりうるクリプタイドを予測し、それらを化学合成した (担当: 研究分担者・木曾)。

(3) 予測ペプチドの活性評価

好中球に対し活性を持つと予測したペプチドは直ちに化学合成し、それらが実際に活性を持つかどうかを評価した。活性評価は a) 好中球細胞からの β -ヘキソサミニダーゼ分泌能、b) 好中球細胞遊走能を指標に、すでに我々がヒト前骨髄球性白血病細胞であるHL-60をジブチリック cAMP で好中球様に分化した細胞で確立している、ハイスループット β -ヘキソサミニダーゼ分泌能測定法および遊走能測定法を用いた。

(4) 同定した活性ペプチドの受容体および情報伝達機構の解析

本研究で同定した好中球活性化クリプタイドは、好中球様に分化したHL-60細胞に作用しその遊走ならびに活性化を起こすが、未分化の細胞には作用しないことから、好中球様に分化した細胞には、特異的にこれらクリプタイドの受容体が存在すると考えられる。そこで本研究では、これらの受容体分子を同定するため、オーファン受容体の発現クローニングおよびアビジン-ビオチン法 (A B法: Hofmann and Kiso, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **73**, 3516, 1976) を用いた化学架橋法により同定を試みた。すなわち、活性ペプチドにタグとしてビオチンを結合した誘導体を化学合成、これを細胞に存在する受容体と架橋し、ストレプトアビジン-蛍光体をプローブとして可視化した。また架橋後細胞を可溶化し、ストレプトアビジンビーズを用いて受容体を精製、つづいて、それらを電気泳動し、目的とするタンパク質のバンドをエドマン分解によるアミノ酸配列解析あるいは質量分析計を用いた構造解析を行うことでその同定を試みた。

4. 研究成果

本研究は、我々が多数存在することを示唆した、タンパク質構造に隠された新しい内因性生理活性ペプチド、「クリプタイド」を系統的、網羅的に同定するとともに、クリプタ

イドが関与する生体情報伝達機構を明らかにするため、それらの受容体タンパク質を同定、細胞内情報伝達系を解析し、クリプタイトの生理的存在意義を明らかにすることを目的とし研究を遂行した結果、以下の成果が得られた。

(1) 新規活性ペプチドの単離・精製および同定

本研究では、まず新規好中球活性化ペプチドを同定するため、陽イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、調製用逆相高速液体クロマトグラフィー、陽イオン交換樹脂を用いた高速液体クロマトグラフィーならびに微量逆相高速液体クロマトグラフィーを用い、好中球に分化した HL-60 細胞からの β -ヘキソサミニダーゼ分泌を指標にして健康なブタ心臓から活性ペプチドの単離・精製を試みた。その結果、新しい好中球活性化ペプチド、マイトクリプタイト-2 (MCT-2) およびマイトクリプタイト-CYC (MCT-CYC) の単離、構造決定に成功した (MCT-2, *J. Immunol.*, **182**, 5072, 2009; *Prot. Pept. Lett.*, **19**, 680, 2012)。

(2) 活性ペプチドの予測・同定

G タンパク質活性化ペプチドの構造情報を整理、解析することで、タンパク質の配列より G タンパク質活性化ペプチドとなりうる、異なる配列を持つペプチド (クリプタイト) 20 種を予測、化学合成し好中球活性化能を検討した。その結果、選択した活性クリプタイトを予測するための物理学的パラメーターを満たす 15 種は好中球を活性化したが、条件を満たさないものは活性化しないことが示された。

(3) 同定した活性ペプチドの受容体および情報伝達機構の解析

まず、新たに同定した活性ペプチドにより好中球様細胞で惹起される細胞内情報伝達機構の解析を行った結果、全てのペプチドによる細胞内情報伝達機構に G_{i2} タイプ G タンパク質が関わっていることが明らかとなった。

次に新たに同定した MCT-2 について、その受容体を解析したところ、G タンパク質共役型受容体 FPR または FPRL1 のどちらか一方に特異的に結合し、その活性を発現することが示唆された。そこで MCT-2 の受容体分子の同定と細胞内情報伝達機構の解析をさらに行った結果、アミノ末端がホルミル化されたペプチドである MCT-2 が、G タンパク質共役受容体であるホルミルペプチド受容体 FPRL1 に特異的に結合・活性化するが、そのホモログである FPR や FPRL2 には結合しないこと (図 1)、MCT-2 による刺激は、FPRL1 の活性化を

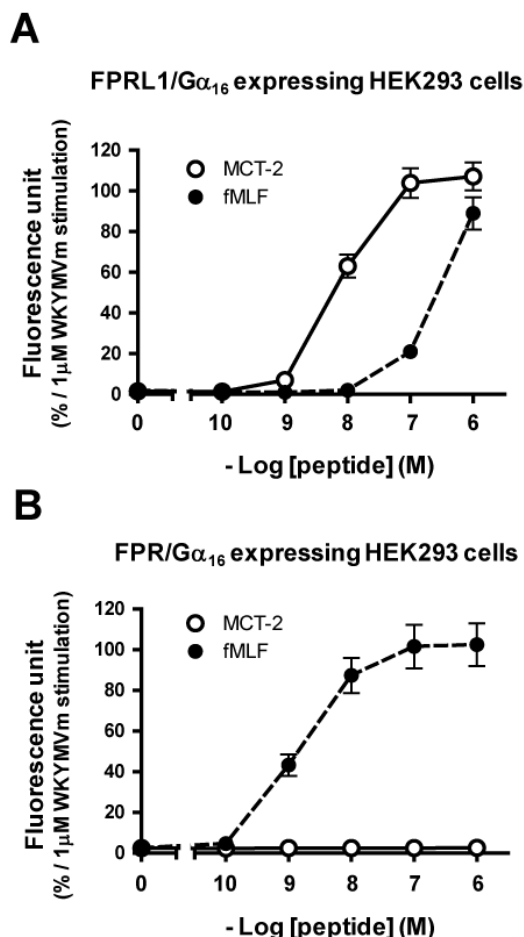


図 1. MCT-2 による FPRL1 受容体分子の特異的活性化

経て細胞内カルシウム濃度上昇や MAP キナーゼの活性化を起こすことで、好中球機能である β -ヘキソサミニダーゼ分泌や遊走を惹起することが明らかとなった (図 2: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **404**, 482, 2011)。

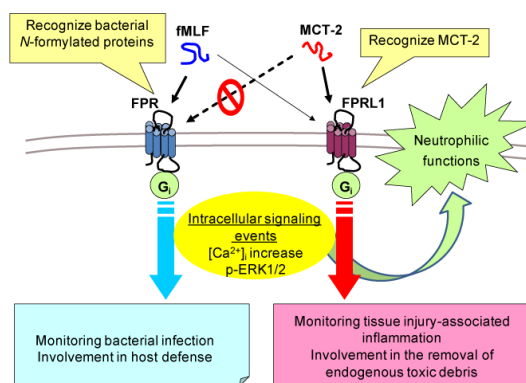


図 2. FPR ファミリーGPCR の機能分担

また、Gタンパク質活性化を予測することにより同定したミトコンドリアタンパク質由来の新たな好中球活性化ペプチドは、アミノ酸配列に類似性はないものの、疎水性側鎖や正電荷側鎖の配置など、その物理化学的特徴に類似性がある。本研究では、これら同様の特徴を持つペプチドの蓄積作用を好中球様細胞で検討したところ、閾値以下の活性ペプチドの蓄積が顕著な細胞活性化を惹起することを発見し、この新しい情報伝達機構を **accumulative signaling** と命名した (図3)。

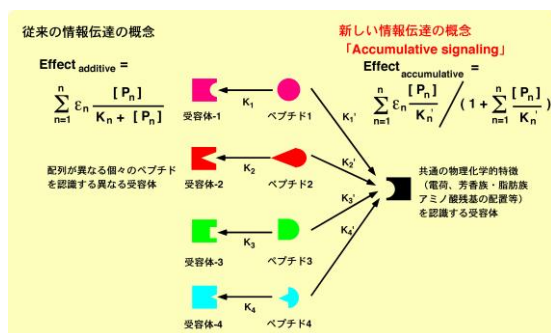


図3. 新しい生体情報伝達機構「accumulative signaling」

このような情報伝達は、リュウマチや劇症肝炎、虚血傷害など、多くの病態の原因となっていることも考えられ、現在その作用機序の解析および同定したクリプタイドを用いた創薬の検討を開始している。

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25件)

- ① 向井秀仁、木曾良明、クリプタイド：タンパク質に隠された新しい生理活性ペプチド-その発見と存在意義および効率的スクリーニング-、遺伝子医学 MOOK、Vol. 21, 298-304, (2012), 査読有
- ② Hokari, Y., Seki, T., Nakano, H., Matsuo, Y., Fukamizu, A., Munekata, E., Kiso, Y., and Mukai, H., Isolation and identification of novel neutrophil-activating cryptides hidden in mitochondrial cytochrome c, *Protein and Peptide Letters*, Vol. 19, 680-687, (2012), (<http://www.benthamdirect.org/pages/content.php?PPL/2012/00000019/00000006/0015E.SGM>) 査読有
- ③ Hokari, Y., Seki, T., Nakano, H., Fukamizu, A., Munekata, E., Kiso, Y., and Mukai, H., Novel neutrophil-activating cryptides hidden in mitochondrial cytochrome c: identification and structure-activity studies, *Peptide Science*, Vol. 2011, 61-62, (2012), 査読有
- ④ Mukai, H. and Kiso, Y., Cryptides and their

accumulative signaling: a novel regulatory mechanism by functional peptides hidden in protein structures, *Peptides*, Vol. 2011, 314-315, (2011), 査読有

- ⑤ Wang, H., Sohma, Y., Taniguchi, A., Hirayama, Y., Kakizawa, T., Mukai, H., and Kiso, Y., Click peptide: application to E22Δ-type mutant of amyloid β peptide, *Peptide Science*, Vol. 2010, 221, (2011), 査読有
- ⑥ Yamazaki, M., Sohma, Y., Taniguchi, A., Hirayama, Y., Furuya, M., Mukai, H., and Kiso, Y., Click peptide: *In situ* production of pyroGlu-Abeta from the O-acyl isopeptide, *Peptide Science*, Vol. 2010, 210, (2011), 査読有
- ⑦ Sohma, Y., Taniguchi, A., Hirayama, Y., Wang, H., Yamazaki, M., Mukai, H., and Kiso, Y., Use of O-acyl isopeptides to identify new functions of amyloid β peptides, *Peptide Science*, Vol. 2010, 54, (2011), 査読有
- ⑧ Mukai, H., Seki, T., Hokari, Y., Fukamizu, A., and Kiso, Y., Cryptides: non-classical bioactive peptides hidden in protein structures, *Peptide Science*, Vol. 2010, 29, (2011), 査読有
- ⑨ Sohma, Y., Wang, H., Taniguchi, A., Hirayama, Y., Kakizawa, T., Yamazaki, M., Mukai, H., and Kiso, Y., Self-assembly pathways of E22Δ-type amyloid β peptide mutants generated from non-aggregative O-acyl isopeptide precursors, *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, Vol. 19, 3787-3792, (2011), (doi:10.1016/j.bmc.2011.04.056) 査読有
- ⑩ Sohma, Y., Hirayama, Y., Taniguchi, A., Mukai, H., and Kiso, Y., 'Click peptide' using production of monomer Aβ from the O-acyl isopeptide: Application to assay system of aggregation inhibitors and cellular cytotoxicity, *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, Vol. 19, 1729-1733, (2011), (doi:10.1016/j.bmc.2011.01.021) 査読有
- ⑪ Seki, T., Fukamizu, A., Kiso, Y., and Mukai, H., Mitocryptide-2, a neutrophil-activating cryptide, is a specific endogenous agonist for formyl-peptide receptor-like 1, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol. 404, 482-487, (2011), (doi:10.1016/j.bbrc.2010.12.007) 査読有
- ⑫ 向井秀仁、木曾良明、若松馨、クリプタイドの発見と新しい生体情報伝達機構、*生化学*、Vol. 82, 524-532, (2010), (<http://www.soc.nii.ac.jp/jbiochem/magazine/82-06-09.pdf>) 査読有
- ⑬ Mukai, H., Seki, T., Hokari, Y., Fukamizu, A., and Kiso, Y., Cryptides: receptors and signaling mechanisms for novel neutrophil-activating peptides hidden in mitochondrial proteins, *Peptides*, Vol. 2010, 36-37, (2010), 査読有
- ⑭ Hirayama, Y., Taniguchi, A., Sohma, Y.,

Mukai, H., Kimura, T., Hayashi, Y., Matsuzaki, K., and Kiso, Y., Click peptide: Water-soluble precursor producing monomer amyloid β peptide *in situ*, *Peptide Science*, Vol. 2009, 371–372, (2010), 査読有

⑮ Wang, H., Kakizawa, T., Taniguchi, A., Mizuguchi, T., Sohma, Y., Mukai, H., Kimura, T., and Kiso, Y., Investigation of A β 1–42 mutants based on *O*-acyl isopeptide method; Synthesis of *O*-acyl isopeptides and *in situ* production of their native forms, *Peptide Science*, Vol. 2009, 367–368, (2010), 査読有

⑯ Mukai, H., Seki, T., Hokari, Y., Fukamizu, A., and Kiso, Y., Characterization of receptors and signaling mechanisms for mitocryptide-2, a novel cryptide that activates neutrophils, *Peptide Science*, Vol. 2009, 97–98, (2010), 査読有

⑰ Mukai, H., Seki, T., Munekata, E., and Kiso, Y., Cryptides: Discovery of functional cryptic peptides hidden in protein structures and identification of their signaling mechanisms, *Peptides*, Vol. 2009, 203–204, (2010). 査読有

⑱ Taniguchi, A., Sohma, Y., Skwarczynski, M., Hirayama, Y., Okada, T., Ikeda, K., Prakash, H., Mukai, H., Kimura, T., Hayashi, Y., Hirota, S., Matsuzaki, K., and Kiso, Y., "Click peptide" based on "*O*-acyl isopeptide method": *In situ* production of monomer amyloid β Peptide from water-soluble precursor analogues, *Peptides*, Vol. 2009, 195–196, (2010), 査読有

⑲ Wakamatsu, K., Takei, A., Inaoka, Y., Xian, L., Kobori, K., Kato, S., Mukai, H., Kohno, T., and Nameki, N., Prevention of peptide aggregation by non-detergent sulfobetaines (NDSBs), *Peptide Science*, Vol. 2008, 397–400, (2009), 査読有

⑳ Mukai, H., Ueki, N., Someya, K., Kawanami, M., Matsuo, Y., Kiyama, M., Kamijo, R., Kikichi, M., Fukuhara, S., Munekata, E., and Kiso, Y., Cryptide signaling and exocytotic mechanisms induced by amphiphilic peptides, *Peptide Science*, Vol. 2008, 307–310, (2009), 査読有

㉑ Taniguchi, A., Sohma, Y., Skwarczynski, M., Okada, T., Ikeda, K., Prakash, H., Mukai, H., Kimura, T., Hayashi, Y., Hirota, S., Matsuzaki, K., and Kiso, Y., Click peptide by use of the *O*-acyl isopeptide method: production of amyloid β peptide from water-soluble analogue, *Peptide Science*, Vol. 2008, 121–122, (2009), 査読有

㉒ Mukai, H., Ueki, N., Wakamatsu, K., and Kiso, Y., Cryptide signal: a novel signaling mechanisms involving cryptides, *Peptides*, Vol. 2008, 570–571, (2009), 査読有

㉓ Taniguchi, A., Sohma, Y., Skwarczynski, M., Nagano, T., Okada, T., Ikeda, K., Prakash, H., Mukai, H., Hayashi, Y., Kimura, T., Hirota, S., Matsuzaki, K., and Kiso, Y., Development of

water-soluble click peptides by use of the *O*-acyl isopeptide method: *In situ* production of Alzheimer's amyloid β peptide, *Peptides*, Vol. 2008, 32–33, (2009), 査読有

㉔ Mukai, H., Seki, T., Nakano, H., Hokari, Y., Takao, T., Kawanami, M., Tsukagoshi, H., Kimura, H., Kiso, Y., Shimonishi, Y., Nishi, Y., and Munekata, E., Mitocryptide-2: purification, identification and characterization of a novel cryptide that activates neutrophils, *Journal of Immunology*, Vol. 182, 5072–5080, (2009), (doi/10.4049/jimmunol.0802965) 査読有

㉕ Taniguchi, A., Sohma, Y., Hirayama, Y., Mukai, H., Kimura, T., Hayashi, Y., Matsuzaki, K., and Kiso, Y., "Click peptide": pH-triggered *in situ* production and aggregation of monomer A β 1–42, *ChemBioChem*, Vol. 10, 710–715, (2009), (DOI: 10.1002/cbic.200800765) 査読有

〔学会発表〕 (計 20 件)

① 向井秀仁, クリプタイド (Cryptides) : その存在意義と産業的応用, 第 15 回ペプチドフォーラム, 2012 年 3 月 16 日, 長浜, 招待講演

② 向井秀仁, クリプタイド (Cryptides) : タンパク質に隠された新しいタイプの生理活性ペプチド, 第 2 回滋賀県ライフサイエンスセミナー, 2012 年 1 月 30 日, 大津, 招待講演

③ Hidehito Mukai, Mitocryptides: functional cryptic peptides hidden in mitochondrial protein structures and their possible applications, 14th Peptide Forum, 2011 年 12 月 16 日, 鹿児島, 招待講演

④ Hidehito Mukai, Cryptides: Functional peptides hidden in protein structures and their possible applications, 9th Australian Peptide Conference, 2011 年 10 月 18 日, Hamilton Island, Australia, 招待講演

⑤ Hidehito Mukai, Novel neutrophil-activating cryptides hidden in mitochondrial cytochrome *c* : identification and structure-activity studies, 第 48 回ペプチド討論会, 2011 年 9 月 27 日, 札幌

⑥ 向井秀仁, ミトコンドリアチトクローム *c* に隠された新規好中球活性化クリプタイドの単離・同定, 第 84 回日本生化学会大会, 2011 年 9 月 23 日, 京都

⑦ Hidehito Mukai, Cryptides and their accumulative signaling: a novel regulatory mechanism by functional peptides hidden in protein structures, 22nd American Peptide Symposium, 2011 年 6 月 26 日, San Diego, USA, 招待講演

⑧ 向井秀仁, タンパク質に隠された生理活性ペプチド「クリプタイド」が関わる新しい生体調節機構, 日本ケミカルバイオロジー学

会第6回年会, 2011年5月24日, 東京

⑨ 向井秀仁, タンパク質に隠された新しい生理活性ペプチド、「クリプタイド (Cryptide)」～同定と生理機能～, 大阪大学蛋白質研究所セミナー「ペプチド研究の新潮流: 発見から応用へ」, 2011年3月14日, 大阪, 招待講演

⑩ Hidehito Mukai, Cryptides: Non-classical bioactive peptides hidden in protein structures, 5th International Peptide Symposium, 2010年12月7日, 京都, 招待講演

⑪ Hidehito Mukai, Mitocryptides: novel neutrophil-activating cryptides hidden in mitochondrial proteins, The 13th Akabori Conference (German-Japanese Symposium on Peptide Science), 2010年9月13日, Leipzig, Germany, 招待講演

⑫ Hidehito Mukai, Cryptides: receptors and signaling mechanisms for novel neutrophil-activating peptides hidden in mitochondrial proteins, 31st European Peptide Symposium, 2010年9月9日, Copenhagen, Denmark, 招待講演

⑬ Hidehito Mukai, Mitocryptides: a novel family of neutrophil-activating peptides derived from mitochondrial proteins and their regulatory mechanisms, The 11th Chinese International Peptide Symposium, 2010年7月7日, Lanzhou, China, 招待講演

⑭ Hidehito Mukai, Clarification of signaling mechanisms for mitocryptides, novel neutrophil-activating peptides hidden in mitochondrial proteins, 12th Naples Workshop on Bioactive Peptides, 2010年6月6日, Naples, Italy, 招待講演

⑮ 向井秀仁, タンパク質に隠された生理活性ペプチド、「クリプタイド」を認識する受容体の同定および情報伝達機構の解析, 日本ケミカルバイオロジー学会第5回年会, 2010年5月19日, 横浜

⑯ Hidehito Mukai, Characterization of signaling mechanisms for mitocryptides, novel neutrophil-activating cryptides isolated from porcine heart, 第32回日本分子生物学会大会, 2009年12月12日, 横浜

⑰ Hidehito Mukai, Cryptides: functional peptides hidden in protein structures - Discovery and physiological significance, 3rd Asia-Pacific International Peptide Symposium, 2009年11月11日, Jeju, Korea, 招待講演

⑱ 向井秀仁, 新規好中球活性化ペプチド mitocryptide-2 の受容体と細胞内情報伝達機構の解析, 第46回ペプチド討論会, 2009年11月5日, 北九州

⑲ 向井秀仁, タンパク質構造に隠された生理活性ペプチド、「クリプタイド」とその情報伝達機構「accumulative signaling」, 第82回

日本生化学会大会シンポジウム「ペプチドの多様性と機能」, 2009年10月23日, 神戸, 招待講演

⑳ 向井秀仁, タンパク質に隠された生理活性ペプチド「クリプタイド」の発見とその情報伝達機構, 日本ケミカルバイオロジー学会第4回年会, 2009年5月18日, 神戸, シンポジウム講演

〔その他〕

ホームページ等

<https://bio.nikkeibp.co.jp/article/news/20120321/160158/>

本研究に関する内容が日経バイオテクの上記ホームページおよび日経バイオテク誌(4-9, 2012)で紹介された。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

向井 秀仁 (MUKAI HIDEHITO)

長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部・准教授

研究者番号: 20251027

(2) 研究分担者

木曾 良明 (KISO YOSHIAKI)

長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部・客員教授

研究者番号: 40089107