

機関番号：84404

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2006～2008

課題番号：18310138

研究課題名（和文） ペプチドーム解析に基づく組織特異的なプロセッシング予測法の開発

研究課題名（英文） Tissue-specific processing pathway of precursor proteins deduced from peptidome analysis

研究代表者

南野 直人（MINAMINO NAOTO）

国立循環器病センター研究所・薬理部・部長

研究者番号：50124839

研究成果の概要（和文）：タンパク質のあるものは、切断や修飾を受けてペプチドに変換され、ホルモンや神経ペプチドとして機能する。この変換反応はプロセッシングと呼ばれ、一連の酵素により組織特異的に誘導されるため、ゲノム解析やプロテオーム解析では予測はできない。本研究では、我々が開発したペプチドーム解析法を活用し、多数のペプチドを生体内の状態で同定することによりプロセッシングの実態を明らかにし、前駆体タンパク質より生成するペプチドを推測可能とする基本技術を構築した。

研究成果の概要（英文）：Some proteins are post-translationally converted to peptides, which in turn function as hormones and neuropeptides. This conversion reaction is called “processing”, and tissue-specifically performed by a set of processing enzymes. Peptides generated from the same precursor protein are often different in each tissue, and hard to predict from genome information. In this study, we prepared intact peptides from endocrine-type tissues and cells, and comprehensively identified them by a renovated peptidomic technology. Based on accumulated peptide data of these cells and tissues, we provide a principal approach to deduce a processing pathway of a particular precursor protein as well as peptides generated from the protein in target cells or tissues.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	5,400,000	1,620,000	7,020,000
2007年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
2008年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
年度			
年度			
総計	15,400,000	4,620,000	20,020,000

研究分野：生化学、ペプチドーム解析、生理活性ペプチド

科研費の分科・細目：ゲノム科学・応用ゲノム科学

キーワード：ペプチドーム、プロセッシング、質量分析、下垂体、甲状腺C細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) 生体はその恒常性を維持するため、多重かつ精密な細胞間、組織間の情報伝達・制御機構を構築している。ペプチドは神経系、内分泌系、神経内分泌系のみならず、循環器系、

免疫系、血球系などにおいても情報伝達・制御物質として機能し、生体調節で不可欠な物質である。しかし、哺乳類の細胞や組織に存在するペプチド濃度は極めて低く、例えば脳組織では、ペプチド総量としてタンパク質の

1/1000 以下しか存在しない。また、ペプチドはタンパク質分解酵素により容易に分解を受ける上に、タンパク質の代謝的分解により生ずる「分解ペプチド」が細胞内には多量に存在する。これらは、前駆体タンパク質より能動的に切断、修飾（両者をあわせてプロセッシングと呼ばれる）を受けて生成する「内在性ペプチド」と区別できないため、生体内におけるペプチドの実態は正確には把握できていなかった。

(2) 我々はオピオイドペプチド類、ニューロメジン類、ナトリウム利尿ペプチド類などの生理活性ペプチドの発見を通じて、組織に内在するペプチドやタンパク質の分解を抑制する抽出法、再現的なペプチド画分濃縮法などを開発してきた。この方法を基盤に、組織よりペプチドを抽出し、規格化した2次元高速液体クロマトグラフィーで分離し、タンデム質量分析計にて解析後、物理化学的性質を基準に情報を収録するデータベースの構築法を開発してきた。本法を脳組織に適用してデータを収集したが、同定ペプチドの大半は分解ペプチドと推定され、生体内ペプチドの実態の解明には程遠い状態であった。一部の前駆体タンパク質では、プロセッシング経路が組織毎に異なることが示されているが、これは主に抗体を用いた解析であり、前駆体タンパク質の抗体認識部位周辺に限られた情報であった。

(3) これらの問題点を解決する方法として、ペプチドーム（対象組織、細胞、体液などに存在するペプチド総体）解析が有用と考えられ、血液、脳脊髄液などに含まれるペプチド、昆虫や軟体動物などの神経節や特異的細胞群のペプチドの解析を、世界の研究グループが報告していた。しかし、その対象はペプチド含有濃度が極めて高い特異例などが大半で、哺乳類組織中のペプチドとは解析の困難度が大きく異なっていた。哺乳類組織のペプチドーム解析を実施しているのは我々とスウェーデンのグループのみで、後者は疾患への適用を中心課題とし、プロセッシング解析には積極的に取り組んでいなかった。

(4) 生体内の多数のタンパク質より生成するペプチド情報を正確に入手し、データベース化できれば、その情報を普遍化してタンパク質が各組織でどの様なプロセッシングを受けペプチドに変換されるかを予測でき、生理活性ペプチドの発見、構造と機能の関連や生理的意義の解明、ペプチド医薬品の開発などに極めて有用と期待されていた。

2. 研究の目的

本研究では、我々が開発してきたペプチド精製・構造決定、ペプチドーム解析技術などを、ペプチド類が豊富に存在、機能している下垂体、副腎、膵臓、胃、腸管、甲状腺、心

房などに適用し、各組織について 1000 ペプチド程度の構造解析を行い、組織に内在するペプチド基本情報を収集してカタログ化することを第一の目標とする。これらの内分泌系組織やペプチド産生組織の解析で、分解ペプチドが排除できず内在性ペプチドのと識別が困難である場合は、内分泌細胞系などに由来する細胞株、初代培養細胞を用いてペプチドーム解析を行い、標的組織や細胞が産生するペプチドを同定し、その実態を明らかにする。

次に性質の異なる組織や細胞を選択し、ペプチドホルモン前駆体、分泌顆粒含有タンパク質を対象に、精度、同定効率を上げたペプチドーム解析を行い、標的タンパク質に由来するペプチド同定数を増加させる方法を開発する。また、組織ごと、あるいは細胞ごとに得られたデータを整理し、各組織における内在性ペプチドの存在様式、プロセッシング経路の相違を明らかにする。これらの情報を総合し、一次構造に対する切断指向性をスコア化し、切断点の予測やその確率を評価するアルゴリズムの開発を行うことを最終的な目標とする。また、プロホルモン変換酵素以外による切断を検討し、共通した切断構造が見出せれば、抗体などを用いて切断、生成の確認を行う。一方、これらのペプチド情報は不可避免的に様々なタンパク質の分解ペプチドなどを含むため、タンパク質、ペプチドの分解経路や分解系酵素についても検討を加え、分解反応の共通点を見出す。以上の成果を活用し、各組織における前駆体タンパク質のプロセッシング経路を予測可能とし、内在性分子に基づくペプチドの生理機能の解明、新規生理活性ペプチドの発見、ペプチド分解の抑制を可能とし、ペプチド医薬品の開発などに貢献する。

3. 研究の方法

(1) ラット組織のペプチドーム解析

①組織灌流による血液・血球成分の除去：組織のペプチド総体（ペプチドーム）の解析では、ヘモグロビンなどの血液・血球成分に含まれるタンパク質由来ペプチドが多数観測される。生理的食塩水などを灌流し、血液・血球成分を除去する方法を検討した。

②組織ペプチドの抽出：灌流後、下垂体、副腎、膵臓、胃、腸管、甲状腺、心房を収集し、加熱処理によりタンパク質分解酵素を失活させた。確立した方法論に従い、各組織の抽出物を C18 逆相カラムで脱塩・濃縮し、ゲルろ過高速液体クロマト (HPLC, G2000SWXL, 東ソー) で分離し、対象とする分子量 6000 以下のペプチド画分を調製、凍結保存した。下垂体については、前葉と中後葉に分離した解析も行った。

③ペプチド画分の分離と構造解析：ゲルろ過

分離ペプチド画分の各画分、あるいは陽イオン交換液体クロマト (LC) (pH 3.8) での分離後の各画分について、逆相ナノ LC で分離し、Proteomics 4700 あるいは 4800, LTQ Orbitrap XL などのタンデム質量分析計による構造解析を行い、ペプチドを同定した。必ずしも陽イオン交換 LC を行わなかったため、本研究では電荷等のパラメーターを基本情報としなかった。LTQ Orbitrap XL で行った解析では、質量分析計の分解能は 15000 で設定し、Data-dependent モードで取得した MS/MS スペクトルは Mascot Distiller を用いて一価への換算を行い、適切なデータベースを用いて Mascot 検索をおこなった。構造推定されたペプチドの内、Identity threshold (>95%) を超えたペプチドについて、同定と判断した。

(2) 培養細胞上清のペプチドーム解析

①初代培養細胞培養上清の解析：副腎髄質について初代培養細胞を作成した。非接着細胞を除去し、十分洗浄後、一定時間 (3~6 時間) 静置し培養上清を回収した。逆相固相抽出後、ゲルろ過 HPLC で分離し、ペプチド画分について上述の構造解析を行った。

②神経内分泌系細胞株の分泌ペプチドーム解析：分泌顆粒を含む細胞株について検討を行った。コンフルエントになった細胞を十分に洗浄し、一定時間静置後の培養上清、各種刺激後の培養上清の回収した。ペプチドを逆相固相抽出後、ゲルろ過 HPLC にて分離し、分子量 1000-6000 のペプチド画分を回収した。逆相ナノ液体 LC にて分画後、ペプチドの構造解析を行った。特に、甲状腺髄様癌由来細胞株 TT (C 細胞由来) について集中的な解析を行った。

(3) 標的タンパク質に対するペプチドデータ収集効率の上昇

①多量に存在する前駆体タンパク質由来のペプチドが、微量ペプチドの同定を強く阻害する。そこで、微量ではあるが存在が確実なタンパク質のデータベースを構築し、ペプチド情報が十分に得られた前駆体タンパク質由来ペプチドについては質量分析より排除して、微量タンパク質由来ペプチドの同定数の増加を図った。

②存在が確実なタンパク質について、既知のプロセッシング酵素の切断コンセンサス配列を考慮して、分子量 1000~6000 で生成する可能性のあるペプチド配列をデータベース化した。このデータベースに対して質量分析データを検索し、同一タンパク質に対するペプチド同定数を増加させた。

(4) 同定ペプチドに基づく切断酵素の特異性の解析、プロセッシングの予測：

同定ペプチドによる前駆体タンパク質のカバー率が 50%以上のものについてプロセッシング機構の検討を行った。但し、一次切断の後、

エキソペプチダーゼ消化されたペプチド、抽出分離過程で希酸分解を受けたペプチドを排除した。収集したペプチド配列と前駆体タンパク質配列より、一次構造に基づく切断スコア、切断確率を算出するアルゴリズム作成の可否を検討した。

プロホルモン変換酵素では説明できない切断が見出されれば、切断構造を認識する抗体を作成し、組織や細胞レベルで実際に想定されるプロセッシングの有無を検討した。

(5) ペプチドの組織毎のプロセッシング機構の解析、生成ペプチドの推定：

組織レベルで有効なペプチドーム解析情報が収集できた組織は下垂体のみであった。下垂体は性質の異なる 3 種の組織で構成されるため、前葉と中後葉、更に中葉に分割して、ペプチドーム解析を実施した。下垂体に豊富に含有される前駆体について、組織毎に詳細なペプチドーム解析を実施し、各組織での切断や修飾の特異性を調べ、組織ごとのプロセッシング機序の違いを検討した。

一方、培養細胞上清の分離ペプチドーム解析より、C 末端がアミド化された 2 種のペプチドを同定した。これらの生物活性を、宮崎大学医学部の中里雅光教授らと共同して探索した。前駆体である VGF タンパク質は、TT 細胞のみならずラットやヒトの脳組織に高濃度で存在したので、切断部位特異的な抗体を作成し、TT 細胞とラット脳、下垂体、消化管、副腎におけるプロセッシング経路を、ペプチドーム解析や抗体を用いて検討した。

(6) タンパク質・ペプチドの分解機構解析：

組織ペプチド、分泌ペプチドの中で、通常のプロホルモン変換酵素類の切断コンセンサス配列に一致せず、かつ同一部位に由来する複数ペプチドが同定された配列を選択し、関連するペプチド群よりエキソペプチダーゼ消化や希酸分解の可能性のあるペプチドを排除した。特に前駆体タンパク質の一次配列への依存性を評価し、プロセッシング経路と分解経路の相違を検討した。

4. 研究成果

(1) ラット組織のペプチドーム解析

①氷冷したヘパリン含有生理的食塩水の左心室からの灌流により、中枢や体幹部では明確に血液成分が除去された。灌流を施した下垂体のペプチドーム解析では、従来は頻回に観測されたヘモグロビン由来ペプチドが観測されなくなった。以降の研究には灌流後の組織を使用した。副腎などの末梢組織は十分に灌流できなかった。

②組織ペプチドの抽出：下垂体、副腎、腸管、甲状腺、心房を収集後、氷冷下で細片化し、10 分間の加熱処理によりタンパク質分解酵素を失活させた。ホモジナイズ後、抽出物より分子量 6000 以下のペプチド画分を調製し、

分子量に従った画分をナノ LC で分離し、タンデム質量分析を行った。下垂体では総同定ペプチド数 1100 余の内、分泌タンパク質由来のペプチドが約 85% を占めた。前駆体タンパク質の局在については、分泌タンパク質が 40% 強、細胞内タンパク質が 40%、細胞膜タンパク質と局在不明のタンパク質が 15% 前後を占めた。他の組織においては、分泌タンパク質由来のペプチドは 20% 以下に過ぎず、細胞内タンパク質に由来するペプチドが大半を占めた。これらの特徴として、タンパク質の N 末端、C 末端の近傍や特定部分に由来し、切断部位に統一性のないペプチド群が多く観測された。心房では、心房性ナトリウム利尿ペプチド及び一部欠落したペプチドなどが観測されたが、大部分は筋や細胞骨格タンパク質、代謝系酵素などに由来するペプチドであった。この結果より、プロセッシング経路の解析可能な組織は下垂体のみと判断し、他の組織は解析を中止した。下垂体については、前葉と中後葉、更に中葉のみに分割してペプチドーム解析を実施した（結果後述）。

(2) 培養細胞上清のペプチドーム解析

①副腎髄質のクロム親和性細胞はオピオイドペプチドをはじめとしたペプチド含量が高いことが知られていた。ラット副腎より髄質を摘出し、酵素消化により初代培養細胞を作成した。播種後、12 時間放置し、非接着細胞を洗浄、除去し、一定時間（3~6 時間）後に培養上清を回収し、逆相固相抽出した。ゲルろ過 HPLC で分離した分子量 1000-6000 のペプチド画分についてナノ LC で分離し、タンデム質量分析を行ったが、細胞外マトリックスや細胞質タンパク質由来のペプチドが大半で、分泌タンパク質由来ペプチドの割合は増加しなかった。組織での解析が困難な場合に初代培養細胞系に移行する方法も、より詳細な検討が必要である。

②神経内分泌系細胞株の分泌ペプチドーム解析：分泌顆粒を含む神経内分泌腫瘍由来の細胞株を検討した。細胞がコンフルエントになり、無血清培地で十分洗浄後、3~6 時間静置して培養上清を回収した。上清を同様に処理してペプチド画分収集、解析した結果、ペプチドホルモン前駆体やグラニン類などに由来するペプチドが、高効率に観測されることが明らかとなった。但し、無血清条件下で viability が高い細胞株では良い結果が得られたが、脆弱な細胞では細胞内タンパク質に由来するペプチドが多く観測された。更に、これらの細胞が顆粒内の物質を刺激に应答して分泌することに着目し、培地洗浄後、carbachol と forskolin (各 10^{-5} M) で 2~15 分間刺激してから培養上清を回収した。同様に抽出処理を行い、分子量 1000-6000 のペプチド画分を回収後、逆相ナノ液体 LC にて画分してペプチドの構造解析を行った結果、TT

細胞の培養上清について極めて良好なデータが得られたため、この培養細胞株をモデルとして解析を行った。

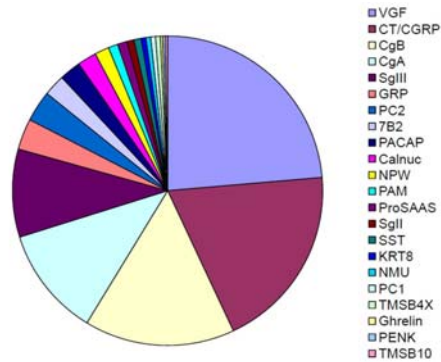


図1. TT細胞の分泌ペプチドーム解析で同定されたペプチド：前駆体による分類

図 1 に分泌刺激後 15 分間で回収したペプチド、約 400 種の解析結果を示した。これは同定ペプチドを前駆体タンパク質を基準に分類した結果であるが、サイモシン β 4 (TMSB4X)、サイモシン β 10 (TMSB10)、セラチン 8 (KRT8) 以外の 98% は、全てシグナルペプチドを有する分泌タンパク質に由来するペプチドで、TMSB4X、TMSB10 も分泌されるとの報告がある。さらに、同定された前駆体も、カルシトニン・カルシトニン遺伝子関連ペプチド (CT/GRP)、ガストリン放出ペプチド (GRP)、下垂体アデニル酸シクラーゼ刺激ポリペプチド (PACAP)、ソマトスタチン (SST) 等の生理活性ペプチド、プロホルモン変換酵素 (PC1, PC2)、アミド化酵素 (PAM) 等のプロセッシング酵素、クロモグラニン A、B 等 (CgA, CgB) のグラニン類であり、内分泌細胞の分泌顆粒に含まれるタンパク質に由来するペプチドが高率で同定され、極めて優れた結果が得られた。（発表論文④）

(3) 標的タンパク質に対するペプチドデータ収集効率の上昇

多量に存在するタンパク質由来ペプチドについて、排除リストを作成してタンデム質量分析を実施しない手法は、本申請後に質量分析計作成メーカーがソフトウェアを開発して十分な機能が得られたため、検討を中止した。

存在が確実なタンパク質のデータベースを作成し、それに対して検索を行うプライベートデータベース化法は、修飾構造を含まない条件下での同定数では大きな相違はなかったが、修飾構造を含む条件下での検索では、一定の同定効率の上昇が認められた。前駆体タンパク質由来のペプチドを推定、データベース化してペプチドの存在を確認する手法も、期待されるほどの効果は得られなかった。これらの課題については、ソフトウェア開発の専門家との共同が不可欠であることが強く認識された。

(4) 同定ペプチドに基づく切断酵素の特異性の解析、プロセッシングの予測

TT 細胞の分泌刺激後回収した培養上清のペプチドーム解析では、最終的に 800 余りのペプチドを同定した。この手法は当初計画には書かれていない独自のペプチド回収法で、分泌顆粒中のペプチドについて極めて質の高い情報を得ることができたので、開発した分担研究者の佐々木により、「分泌ペプチドーム (Secretopeptidome) 解析」と命名された。この方法は、佐々木が前任地の国立がんセンター研究所時代からの発案、研究成果に基づき確立したものである。

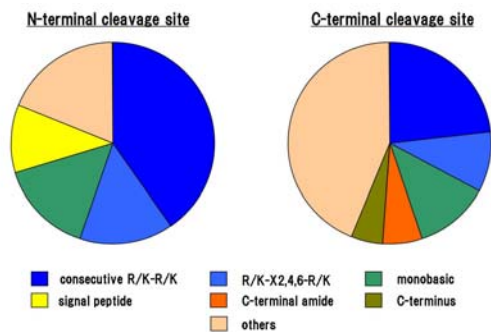


図2. 分泌ペプチドーム解析で同定されたペプチド群のN末端側、C末端側の切断配列

図 2 に TT 細胞の分泌ペプチドーム解析で同定されたペプチド群の切断部位の区分を示す。左側の N 末端側の切断部位では、青色系で示したプロホルモン変換酵素 (prohormone convertase, PC) の切断コンセンサス配列に一致する配列、すなわち連続した塩基性アミノ酸、偶数アミノ酸を隔てた塩基性アミノ酸を含む配列が 55% を占め、前駆体タンパク質の N 末端に存在するペプチドを含めると、70% が既存のルールに従っていた。一方、ベージュで示した部分の大半は、一次切断の後、更にエキソペプチダーゼによりアミノ酸が消化、除去されたペプチドであった。右側の C 末端側の切断部位では、青色系表示した PC の切断コンセンサス配列、C 末端アミド化、前駆体タンパク質の C 末端ペプチドを含めて、約 45% が既存ルールに従うと考えられた。ベージュ部の大半は、エキソペプチダーゼ消化を受けたペプチドであった。これらの結果より、一次切断後、エキソペプチダーゼによる消化、分解が速やかに起こることが明らかとなった。

図 3 に CGRP 前駆体タンパク質の模式図 (上段) と、TT 細胞の分泌ペプチドーム解析で同定されたペプチド (下段) を示した。模式図の黒棒は塩基性アミノ酸を、下段の灰色棒は同定されたペプチド、青棒は量的に多いペプチドを示す。同定されたペプチドは雑多な混合物であるが、前駆体配列を基準に整理すると、赤矢印部位で切断され CGRP と N 末端ペプチドが生成することが明確である。実際、

青棒で示す主ペプチドはこの切断に従うもので、CGRP の中央での切断ペプチドは CGRP に比して少ないため、2 次的な切断と推定された。質量分析におけるペプチドのイオン化はその分子量に依存し、分子量の大きいペプチドほどイオン化効率が著しく低下する点に留意し、結果を理解する必要がある。PC による切断に引き続くエキソペプチダーゼ消化が、プロセッシング経路を解明する上で大きな障害であることが明確となった。一方、N 末端側のシグナルペプチド部に由来するペプチドは全く観測されなかった。この結果は他の前駆体でも同様であり、生合成後直後にシグナルペプチドが迅速に分解されるという定説が確認された。

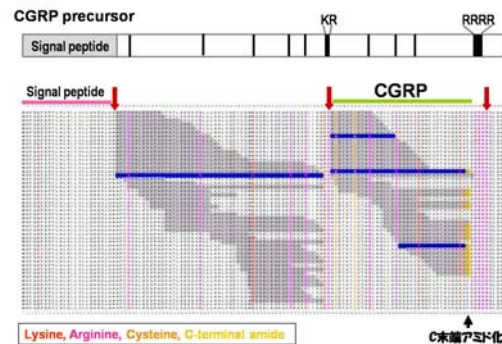


図3. CGRP前駆体構造と分泌ペプチドーム解析で同定されたペプチド群

TT 細胞の分泌ペプチドーム解析で最も多くのペプチドが同定された VGF タンパク質についても、図 3 と同様のペプチド配列と前駆体配列の比較により、主たる一次切断部位を予測することができた。この前駆体タンパク質は 617 残基よりなり、100-200 残基程度の通常のペプチドホルモン前駆体に比して極めて大きい。前駆体全体で 14 か所、その中でも 10 か所あまりの主要部位で切断を受けると推定され、実際 10 種程度のペプチドが非常に頻回に同定された。

当初の研究計画では、これらの切断部位の配列情報に基づき、切断部位周辺のアミノ酸残基の位置と種類により切断指向性を数値化し、プロセッシング構造を予測するアルゴリズムを検討する予定であった。しかし、図 3 や上記の説明からも分かるように、CGRP 前駆体の切断配列は 2 か所、VGF タンパク質では 14 か所程度であること、TT 細胞の解析より同定される前駆体タンパク質数が 30 弱であることを考えると、数値化や予測アルゴリズム作成にはデータ数が不足し、実施困難であると判断した。しかし、予測法の作成は、今後のペプチドーム解析の発展上、不可欠な課題である。本研究終了後も各種培養細胞の分泌ペプチドーム解析を継続実施し、データ収集を続けて近い将来に実現したい。

切断が明確に確認された配列の中で、PC の切断コンセンサス配列に一致しない例とし

ては、GRP があげられる。GRP の C 末端側から神経系ではニューロメジン C が優先的に生成するが、その N 端側にはアルギニン残基が存在するものの PC 切断コンセンサスとは一致しない。PC による例外的切断である可能性もあるが、今後の検討事項としたい。

(5) ペプチドの組織毎のプロセシング機構の解析、生成ペプチドの推定

①下垂体組織におけるプロセシング機構の解析と生成ペプチド：下垂体の組織ペプチドーム解析では、プロオピオメラノコルチン (POMC)、バソプレシン前駆体 (AVP-NPII)、オキシトシン前駆体 (Oxy-NPI)、グラニン類の CgB、CgC、CgA、セクレトグラニン III (SgIII)、Proprotein convertase subtilisin/kexin type 1 inhibitor (proSAAS)、ネオエンドルフィンダイノルフィン前駆体、VGF タンパク質、神経内分泌タンパク質 7B2 (7B2)、成長ホルモン (GH)、ニューロメジン U (NMU)、ニューロテンシン (NT)、プロセシング酵素類 (PAM, PC2 など)、プロエンケファリン (PENK) などの分泌性タンパク質に由来するペプチドが同定された。

POMC については、下垂体前葉では同定ペプチド数が予想を下回り、N 末端部、 α 色素胞刺激ホルモン (α MSH) 部をはじめ、ペプチドが同定されていない欠落部分がかなりあり、中後葉とは対照的であった。これはプロセシングが進んでいない中間体が主体で、現在の質量分析計では一部存在する低分子量ペプチドしか同定できなかったためと推定された。一方、中後葉では前駆体分子全体のペプチドが同定され、アセチル化、アミド化を受けた α MSH をはじめ、主要な切断部位での切断と修飾を受け、プロセシングが進行したペプチドが大半であった。更に中葉のみの解析から、中後葉で認められた POMC 由来ペプチドの大半が中葉に由来すると推定された。これらは前葉と中葉での PC1/3、PC2 の発現、特異性の相違と一致する結果であった。

AVP-NPII、Oxy-NPI は下垂体後葉に局在し、中後葉の解析でのみ認められた。前者が圧倒的に多く、プロセシングは両者とも進行していた。ただ、ニューロフィシン部分はジスルフィド結合で固定された立体構造を取るため、ペプチドとしては検出されなかった。

グラニン類の CgA、CgB、CgC、proSAAS などにおいては、前葉と中後葉で検出されるペプチドの部位と頻度は異なるが、POMC のような相違は認められなかった。GH 由来ペプチドは前葉のみで観測されたが、その切断部位は PC 類の切断コンセンサス配列とは一致せず、生成よりは寧ろ分解を観測していると推定された。

その他、中葉では、PC2、C 末端アミド化、N 末端アセチル化等のプロセシング酵素類が非常に高いレベルで発現しているが、実際に

POMC 由来ペプチドで見ると、切断、修飾ともに十分に進行していた。この結果より、下垂体中葉はプロセシングの解析には最も適した組織と考えられた。この組織に特徴的な分泌ペプチドの N 末端アセチル化は、 α MSH や β エンドルフィンだけではなく、多くの主要ペプチドでも認められ、非選択的にも修飾されると推定された。

上記の分析結果より、より迅速な処理、ペプチドの広範な分画、構造解析により、少なくともラット下垂体組織については、内在性ペプチドのデータベース化、プロセシング経路の推定を主要なペプチド前駆体について実施可能と推定された。但し、記載した結果は分泌性前駆体タンパク質由来ペプチドに限定したもので、細胞内タンパク質に由来するペプチドの存在、前駆体タンパク質由来ペプチドの大きな濃度差など、同定ペプチド数の増加には多くの解決すべき問題がある。

②VGF タンパク質由来ペプチドのプロセシング：TT 細胞の分泌ペプチドーム解析の初期の段階で、VGF タンパク質に由来する 2 種の C 末端アミド化ペプチドを見出し、Neuro Endocrine Regulatory Peptide (NERP)-1、NERP-2 と命名した。(図 5 参照、発表論文⑦) これらの C 末端の切断構造とアミド化構造を認識する抗体を調製した。更に、VGF タンパク質の C 末端構造を認識する抗体も調製した。NERP-1、NERP-2 は培養細胞株より見出され、正常組織での内在性が確認されていなかったため、ラット組織抽出物を用いて確認したところ、視床下部に高濃度存在し、消化管や副腎などの末梢組織にも存在することが確認された。そこで、脳、下垂体、消化管、副腎などについて抽出物を作成し、HPLC による解析、免疫沈降物の質量分析、western blot 解析などを行った。

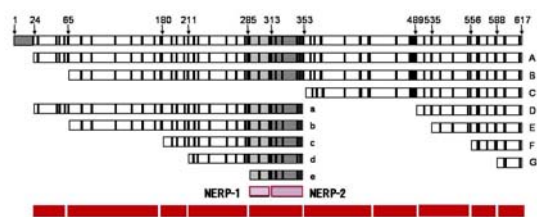


図4. Western blot解析で同定されたVGFタンパク質断片とプロセシング様式

図 4 に western blot 解析による結果をまとめた。最上段は前駆体の模式図、横棒は NERP-2 抗体、VGF タンパク質 C 末端抗体により同定された中間体などを示す。これらの結果を総合し、VGF タンパク質は最下段の赤棒に示すように一次切断を受け、NERP 類を含む約 10 種のペプチドに変換されることが確認され、この変換は基本的に TT 細胞と同様であった。一方ラットでは、神経系組織に主に存在し、脳、下垂体前葉・中後葉、消化管で

ほぼ同様のプロセッシング経路を取ることが示された。特に脳と消化管は類似すること、下垂体中後葉ではプロセッシングがより進んだ状態にあり、副腎では逆にプロセッシングが遅れ、前駆体タンパク質も存在することが明らかとなった。これらの解析結果に基づき、VGF タンパク質より生成するペプチド群が明確となり、今後の生理活性ペプチド探索の上で重要な知見が得られた。(発表論文①)

(6) タンパク質・ペプチドの分解機構の解析系

(4)に記載した通り、TT 細胞の分泌ペプチドーム解析で同定されたペプチド群の大部分の切断部位は、PC 類のコンセンサス配列に一致していた(図 2)。N 末端側においては 55%程度が、C 末端側においては 30%程度がこのコンセンサス配列による切断に従っていた。エキソペプチダーゼ消化を受けたと判定される配列は多く、これらを排除すると、PC 類以外のエンドペプチダーゼによる切断と推定される配列が非常に限定され、更にもっと中で分解機構を推定することは、現状では困難と考えられた。図 3 に示される CGRP 前駆体の例でも、一部で切断を受けたペプチドが 4 種程度まとまる例があるが、48-49 番目は希酸分解を受ける Asp-Pro 結合であり、抽出分離過程での人為的な分解と推定された。

ごく最近、循環器系組織由来初代培養細胞の培養上清の解析で、生理活性ペプチドの活性構造部の数か所で、選択的に切断されたペプチドが見出された。この例では、生理活性ペプチドの生成はプロセッシングであり、それ以降の切断は分解と定義できるため、これらの切断を分解系とすることが可能と考えられ、今後の解析対象とする予定である。

一方、下垂体組織のペプチドにおいては、PC 類の切断コンセンサス配列に一致するペプチド、それらがエキソペプチダーゼ消化を受けたペプチドの割合は高いが、TT 細胞の分泌ペプチドーム解析に比して、コンセンサス配列に一致しない切断に基づくペプチドの割合が高い。また、非分泌系の細胞内タンパク質由来ペプチドにおいては、塩基性アミノ酸を含んだ配列で切断を受ける割合が非常に低く、コンセンサス配列に一致するものはほとんど認められない。後者の切断の大半は分解系プロテアーゼによると推定されるが、現状では分解系と断定ができないため、研究対象とできていない。

(7) 同定された新規生理活性ペプチドの機能解析

NERP-1
Human **RPESALLGGSEAGERLLQQGLAQVEA-NH₂**
Rat/Mouse **LEGSFLGGSEAGERLLQQGLAQVEA-NH₂**

NERP-2
Human **<QAEATRQAAAQEEERLADLASDLLLQYLLQGGARQRGLG-NH₂**
Rat/Mouse **<QAEATRQAAAQEEERLADLASDLLLQYLLQGGARQRDLG-NH₂**

図5. 分泌ペプチドーム解析より同定された新規生理活性ペプチドの構造

TT 細胞の分泌ペプチドーム解析の初期段階において、19 種の C 末端がアミド化されたペプチドが見出された。既知の生理活性ペプチド約半数は C 末端がアミド化されており、立元らはこの構造的特徴を利用して多くの生理活性ペプチドを発見している。19 種ペプチドの内、15 種は既知であったが、残り 4 種は同一前駆体タンパク質の 2 箇所に由来し長さが異なる新規のアミド化ペプチドであり、ヒト、げっ歯類間で配列が良く保存されていた(図 5)。これらは一次切断ペプチドと考えられたので合成物を調製し、さらに(5)に記載した通り抗体も調製した。中里教授らと共同して検討した結果、これらのペプチドは脳内・視床下部の室傍核、視索上核に高濃度存在し、バソプレッシンと共存し、絶水などで遺伝子発現が上昇したため、水電解質代謝に関係すると推定された。そこで、電解質濃度や浸透圧との関連を調べたところ、高張食塩水やアンジオテンシンで誘導されるバソプレッシン分泌を抑制した。in vivo でも、高張食塩水やアンジオテンシンの脳室内投与により誘導される血中バソプレッシン濃度の上昇を抑制し、これらの活性発現には C 末端のアミド化が必須であった。更に、中和抗体により作用が消失することから、内在性のバソプレッシン分泌制御因子と考えられ、上述の通り NERP と命名した。25-26 残基のペプチドを NERP-1、38 残基のペプチドを NERP-2 と呼んでいる。これらのペプチドの視床下部領域での詳細な免疫組織化学的解析より、バソプレッシン分泌抑制以外にも多種の生理作用を有する可能性が示された。最近になり、NERP-2 が摂食行動を亢進することも明らかとなった。(発表論文①③⑦)

(8) まとめ

当初案では、内分泌系組織やペプチド含量の高い組織を標的としてペプチドーム解析を行い、内在性ペプチドを包括的に同定し、情報の統合的解析より前駆体タンパク質の組織特異的なプロセッシング経路を明らかにし、前駆体の切断部位を予測可能としようと計画した。しかし、組織からペプチドを intact な状態で取り出すことは非常に困難で、下垂体を除き組織内のプロセッシング経路を示すデータを得ることができなかった。方法論については多くの改良を試みたが、ペプチド回収方法に困難な問題が存在した。これを回避するため、内分泌系細胞を標的とするペプチドーム解析法を研究分担者の佐々木が開発し、新たな展開が可能となった。分泌ペプチドームと命名したこの方法にも限界もあるが、現段階では細胞が産生、分泌するペプチドを解析するには、世界的にも最も進んだ方法と考えられる。本研究は、TT 細胞を中心とした解析で終了するが、他の細胞の解析を継続、発展させており、今後の情報集

積・解析により細胞におけるプロセッシング経路予測が可能と考えられる。一方、組織のプロセッシング経路も細胞と類似、相関することを本研究で明らかにしたので、これらの研究の発展により、将来的には組織特異的なプロセッシング経路の推定、生成ペプチドの予測が可能となると考えられる。

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)

[雑誌論文] (計 18 件)

- ① E. Mishiro-Satoh, K. Sasaki, T. Matsuo, H. Kageyama, H. Yamaguchi, Y. Date, M. Matsubara, T. Ishizu, K. Yoshizawa-Kumagaye, Y. Satomi, T. Takao, S. Shioda, M. Nakazato, N. Minamino: *J. Neurochem.*, 114, 1097-1106 (2010). Distribution of neuroendocrine regulatory peptide-1 and -2, and proteolytic processing of their precursor VGF protein in the rat. (査読有)
- ② T. Matsuo, H. Yamaguchi, H. Kageyama, K. Sasaki, S. Shioda, N. Minamino, M. Nakazato: *Regul. Pept.*, 2010. May 13. [Epub ahead of print] Localization of neuroendocrine regulatory peptide-1 and -2 in human tissues. (査読有)
- ③ K. Toshinai, H. Yamaguchi, H. Kageyama, T. Matsuo, K. Koshinaka, K. Sasaki, S. Shioda, N. Minamino, M. Nakazato: *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2010 Jun 15. [Epub ahead of print] Neuroendocrine regulatory peptide-2 regulates feeding behavior via the orexin system in the hypothalamus. (査読有)
- ④ K. Sasaki, Y. Satomi, T. Takao, N. Minamino: *Mol. Cell. Proteomics*, 8, 1638-1647 (2009). Snapshot peptidomics of the regulated secretory pathway. (査読有)
- ⑤ C.J. Charles, T. Katafuchi, T.G. Yandle, N. Minamino: *J. Endocrinol.*, 198, 429-437 (2008). Identification and biological activity of ovine and caprine calcitonin receptor-stimulating peptides 1 and 2. (査読有)
- ⑥ T. Osaki, T. Katafuchi, N. Minamino: *J. Biochem.*, 144, 419-430 (2008). Genomic and expression analysis of canine calcitonin receptor-stimulating peptides and calcitonin/calcitonin gene-related peptide. (査読有)
- ⑦ H. Yamaguchi*, K. Sasaki*, Y. Satomi*, T. Shimbara, H. Kageyama, M.S. Mondal, K. Toshinai, Y. Date, L.J. Gonzalez, S. Shioda, T. Takao, M. Nakazato, N. Minamino: *J. Biol. Chem.*, 282, 26354-26360 (2007) Peptidomic identification and biological validation of neuroendocrine regulatory peptide-1 and -2.

*: equally contributed. (査読有)

- ⑧ T. Naka, E. Katsumata, K. Sasaki, N. Minamino, M. Yoshioka, Y. Takei: *Zool. Sci.*, 24, 577-587 (2007). Natriuretic peptides in Cetaceans: Identification, molecular characterization and changes in plasma concentration after landing. (査読有)

[学会発表] (計 33 件)

- ① 三城恵美、佐々木一樹、山口秀樹、里見佳典、石津雄太、熊谷久美子、高尾敏文、中里雅光、南野直人: 「新規生理活性ペプチドNERPのラットにおける生体内分布、内在性分子型と機能」、第81回日本生化学会大会・第31日本分子生物学会年会合同大会(2008年12月、神戸、ポスター)
- ② 佐々木一樹、里見佳典、山口秀樹、中里雅光、高尾敏文、南野直人: 「ペプチドミクスに基づく生理活性ペプチド探索」、日本プロテオーム機構第6回大会(2008年7月、大阪、シンポジウム、講演)
- ③ 三城恵美、佐々木一樹、山口秀樹、里見佳典、石津雄太、熊谷久美子、高尾敏文、中里雅光、南野直人: 「新規生理活性ペプチドNERPのラットにおける生体内分布と内在性分子型」、第81回日本内分泌学会学術総会(2008年5月、青森、口頭)
- ④ 佐々木一樹、里見佳典、山口秀樹、高尾敏文、中里雅光、南野直人: 「ペプチドミクスの手法を活用した新規生理活性ペプチドNERPの同定」、第81回日本内分泌学会学術総会(2008年5月、青森、口頭)
- ⑤ 佐々木一樹、山口秀樹、里見佳典、高尾敏文、中里雅光、南野直人: 「ペプチドミクスを活用した新規生理活性ペプチドの発見」、第80回日本生化学会大会、第30日本分子生物学会年会合同大会(2007年12月、横浜、口頭及びポスター)
- ⑥ 南野直人、佐々木一樹、里見佳典、山口秀樹、高尾敏文、中里雅光: 「ペプチドーム解析法を用いた新規生理活性ペプチドNERP-1とNERP-2の同定」、第44回ペプチド討論会(2007年11月、富山、口頭)
- ⑦ N. Minamino, K. Sasaki, T. Osaki, Y. Satomi, T. Takao: Peptidomic analysis for identification of endogenous peptides and precursor processing pathway. 4th International Peptide Symposium, 7th Australian Peptide Conference, and 2nd Asia-Pacific Peptide Symposium (2007年10月、ケアンズ、オーストラリア、講演)
- ⑧ N. Minamino: Peptidome database and identification of new bioactive peptides. The 7th International Symposium on Peptide and Proteinous Materials (2007年4月、光州、韓国、招待講演)
- ⑨ 佐々木一樹、南野直人: 「ペプチドミクス

を活用する生理活性ペプチド探索の新しいアプローチ」、第112回日本解剖学会総会・全国学術集会シンポジウム「新規神経ペプチドの生体システム調節」(2007年3月、大阪、講演)

- ⑩ 佐々木一樹、南野直人: 「ペプチドーム解析による新規ペプチド探索」、大阪大学蛋白質研究所セミナー「ペプチドの真価: 検出・探索から診断・創薬へ」(2007年1月、大阪、講演)
- ⑪ N. Minamino, H. Kuwahara, K. Sasaki, T. Osaki, T. Kihara, J. Isoyama-Tanaka, T. Katafuchi, T. Takao, M. Isoyama: PEPTIDOME Database and Identification of New Bioactive Peptides. International Conference: 43rd Japanese Peptide Symposium/4th Peptide Engineering Meeting (2006年11月、横浜、口頭)
- ⑫ N. Minamino, H. Kuwahara, K. Sasaki, T. Osaki, T. Katafuchi, T. Takao, M. Isoyama: Peptidome database and identification of new biologically active peptides. 9th Chinese International Peptide Symposium 2006 (2006年7月、上海、招待講演)

[図書] (計6件)

- ① 南野直人、佐々木一樹: ペプチドーム解析とNERPの発見、循環器科、64、476-485 (2008)
- ② 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研究、ペプチドと創薬(寒川賢治、南野直人編、Medical Do、2007) pp. 51-56.
- ③ 宮沢崇、宮里幹也、南野直人: 普遍的な薬理、細胞反応を用いた新規生理活性ペプチドの探索。ペプチドと創薬(寒川賢治、南野直人編、Medical Do、2007) pp. 30-35.
- ④ N. Minamino, T. Horio, T. Nishikimi: Natriuretic peptides in the cardiovascular system. in "Handbook of the Biologically Active Peptides" Ed. A.J. Kastin (Academic Press, San Diego, 2006) pp. 1199-1207.

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: 新規生理活性ペプチド
発明者: 南野直人、佐々木一樹、高尾敏文、里見佳典、山崎基生、高橋憲行
権利者: 協和発酵工業株式会社、国立循環器病センター、国立大学法人大阪大学
種類: 特許
番号: 特願 2007-14455
出願年月日: 2007年1月25日
国内外の別: 国内、国外 (US, EP)

[その他]

ホームページ等

<http://www.ncvc.go.jp/res/divisions/pharmacology/index.html>

<http://www.peptidome.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

南野 直人 (MINAMINO NAOTO)
国立循環器病センター研究所・薬理部・部長
研究者番号: 50124839

(2)研究分担者

佐々木 一樹 (SASAKI KAZUKI)
国立循環器病センター研究所・薬理部・部長
研究者番号: 80260313
尾崎 司 (OSAKI TSUKASA)
国立循環器病センター研究所・薬理部・室員
研究者番号: 60380565

謝辞: 本研究は文部科学省時科学研究費補助金として、国立循環器病センター研究所薬理部の南野直人、佐々木一樹、尾崎司に交付され、実施したものである。研究に不可欠な資金を提供頂いた文部科学省並びに日本学術振興会に深く感謝申し上げたい。

本研究は国立循環器病センター研究所薬理部を中心に実施したが、多くの研究者、協力者との共同により実施し、このような成果を得ることができた。ここに氏名を記し、感謝の意を表したい。

国立循環器病研究センター研究所

研究所長: 寒川賢治

薬理部: 片渕剛、桑原大幹、三城恵美、門之園哲哉、松原真佐子、中谷光子、朝治真澄、吉良真理子

大阪大学蛋白質研究所: 高尾敏文、里見佳典
宮崎大学医学部: 中里雅光、山口秀樹、十枝内厚次、松尾崇、伊達紫

昭和大学医学部: 塩田清二、影山晴秋

ペプチド研究所: 熊谷久美子、石津雄太

協和発酵キリン株式会社: 山崎基生