

機関番号：12501
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20590248
 研究課題名（和文）新しいペプチド探索法：遺伝子情報からのアミド型生理活性ペプチドの予測
 研究課題名（英文）In silico searching for biologically active peptides with a C-terminal amide based on human genome DNA structure
 研究代表者
 木村 定雄（KIMURA SADA0）
 千葉大学・大学院医学研究院・教授
 研究者番号：40134225

研究成果の概要（和文）：

公開データベースの DNA 構造（33,119 個）を用いて、生理活性ペプチドの生合成の経験的規則を組み込んだ生理活性ペプチドを予測するプログラムソフトを開発した。分泌型前駆体蛋白質はシグナルペプチドを持ち、鎖長 50～300 残基、活性ペプチドが鎖長 6～60 残基で Cys 結合が 2 個以下の条件を満足し、切断部位に塩基性アミノ酸対をもつ C 末端アミド型生理活性ペプチド候補数は 352 個であった。そのうち約 200 個を化学合成し、オーファン G 蛋白質共役型受容体のリガンドの可能性を解析した。

研究成果の概要（英文）：

We have developed the computer program soft to predict the bioactive peptides based on the amino acid sequences of the precursor protein. The empirical biosynthetic rules of bioactive peptide from their precursor proteins were incorporated into the program, namely, precursor proteins contain a signal peptide and 50-300 amino acid residues, the lengths of the active peptides are 6-60 amino acid residues with 0 ~ 2 cystine (disulfide bond), and dibasic amino acid pairs at the cleavage sites. From the data bank of human genome structure (33,119 proteins), we predicted 352 candidates of bioactive peptides with a C-terminal amide. About 200 peptides of them were chemically synthesized and analyzed whether they are ligands to orphan G protein-coupled receptors or not.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010 年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：生理活性ペプチド、生合成経路、オーファン受容体、G 蛋白質共役型受容体、GPCR、in silico

1. 研究開始当初の背景

[背景] 現在の医薬品のほぼ半分(45%)が G 蛋白質共役型受容体(GPCR)関連であること

からも明らかのように、GPCR とそのリガンドは極めて重要な創薬標的である。天然リガンドが不明な GPCR (オーファン GPCR) のリガ

ンド探索は、新規な生体調節機構を明らかにでき、また拮抗薬などの創薬の標的ともなりうるため製薬企業や大学・研究所において世界的な研究対象になっている。現在主流となっている逆薬理的なオーファン受容体リガンド探索では、生体組織からの抽出物を用いている。しかし、組織中にごく微量しか存在しないペプチドや、極めて限局された場所にしか発現しないペプチドの場合、この方法では活性を検出できないことが多い。実際、申請者のオーファン受容体を発現させた細胞を用いての生体試料からのリガンド探索は困難を極めていた。これまでに存在量が多く活性の強いものは既に同定されていて、微量のもの、活性の弱いもの、特殊な活性のものが未知のまま残っているというのが現実であろう。未知リガンドの探索は、ここ 10 年で 50 個以上のリガンドが発見されているが、ヒトではリガンド既知 GPCR は 215 種類、オーファン GPCR は約 160 種類存在する（申請者文献 1）。リガンド既知の GPCR 数と活性ペプチドリガンドの比率は約 100 : 40 であることを考慮すると、まだ多数のペプチドリガンドが未発見と予想される（IUPHAR、GPCR データ、2007 年）。

本研究ではリガンド予測ソフトの改良をさらに行い、生理活性ペプチドが C 末端部にアミド構造を持つ物が多いこと（既知活性ペプチド 142 個のうち 68 個 = 47.9%、2007 年 10 月現在）に着目し、①既知のゲノム構造バンクより「C 末端部アミドをもつ生理活性ペプチド候補」をすべて網羅的に予測し、その合成ペプチドの活性をスクリーニングする計画を立てた。②スクリーニングするオーファン受容体として、特に、ロドプシン型受容体 β グループ（37 個の GPCR よりなる系統樹塊）を選択した。37 個のうち、9 個がオーファン GPCR であり、リガンド既知は 28 個である。28 個はすべて細胞内カルシウム応答を示す。そのうち 20 個はアミド型リガンド（タヒキニン、バソプレシン・オキシトシン、ガストリン、CCK、GnRH、オレキシン、NPY ファミリーなどを含む）である。そのアミド型リガンド GPCR にホモロジーが高い 9 個のオーファン GPCR に焦点を当て、上記予測したアミド型ペプチドリガンドとの組み合わせにより、新規リガンド探索（スクリーニング）を行う。

2. 研究の目的

生理活性ペプチドが C 末端部にアミド構造を持つ物が多いこと（既知活性ペプチド 142 個のうち 68 個 = 47.9%、2007 年 10 月現在）に着目し、本研究では、①既知のゲノム構造バンクより「C 末端部アミドをもつ生理活性ペプチド候補」をすべて網羅的に予測し、その合成ペプチドの活性をスクリーニングす

る事を目的とした

3. 研究の方法

(1) C 末端部アミド型生理活性ペプチド予測プログラムの開発：生理活性ペプチドには C 末端部アミドを持つ例が多いことに注目し、ゲノム構造 Bank に登録された DNA 構造を用いて、既知ペプチドホルモンの生合成機序の解析により明らかになったホルモン産性規則及び独自の抽出基準をコンピューターにプログラムし、独自の「検索ソフト」を開発して、ゲノム情報から網羅的に C 末端アミド型生理活性ペプチド候補を予測する。

(2) 活性ペプチド候補の化学的合成
それらの新規生理活性ペプチド候補約 200 個（リガンド候補ライブラリー）を網羅的に合成する。

(3) 種々の細胞を用いたスクリーニング
種々の 34 種類の細胞（平滑筋細胞、内皮細胞、ガン細胞、神経細胞、等）の内蔵性受容体を用いて細胞内カルシウム測定法によるスクリーニングを行う。

(4) オーファン受容体アッセイ法によるスクリーニング

ロドプシン型受容体 β グループに属するオーファン受容体遺伝子 9 個（アミド型受容体 6 種類；GPR19、GPR72、GPR75、GPR150、GPR176、BRS3、非アミド型受容体 3 種類；GPR37、GPR37L1、GPR39）を HEK293 細胞に安定発現させたものを作製し、新規リガンドのスクリーニングに使用した。

(5) 細胞内 Ca^{2+} 濃度変化を測定
スクリーニング系として、fura-2/AM を用いた細胞内 Ca^{2+} 濃度変化を追跡した。

4. 研究成果

(1) C 末端部アミド型生理活性ペプチド予測プログラムの開発：

①前駆体蛋白質の抽出
2006 年 2 月現在で公開された 3 種類のデータベースゲノム構造から蛋白質構造のデータは約 2450 万個の蛋白質の構造が入手できた。相当数の同じ蛋白質の配列構造が重複しているため、重複を除去すると約 20 万個の蛋白質数となり、次に、シグナルペプチドを N 末端にもつ分泌蛋白質の特徴で絞り込むと最終約 3 万個（33, 119 個）の前駆体蛋白質が候補となった。

②パターンマッチ法による生理活性ペプチド候補の抽出

33, 119 種類の前駆体蛋白質を出発として、活性ペプチドを予測する際に、生理活性ペプチドの前駆体中の 6 種類の存在様式（ペプチドの両末端部が塩基性アミノ酸対（dibasic pair）を含む）の条件に適合するペプチド数をパターンマッチング法により検索した。ペ

ペプチドを単純に計算すると、2,282,452個(同一ペプチド構造の重複含む)のペプチドとなり、あまりに膨大な数字であり、前駆体および生理活性ペプチドの特性による絞り込みが必須と思われた。前駆体残基数、活性ペプチド内部のCys残基数、N末端部の切断部がKK、KR、RK、RRであるという条件などで絞り込むと47,991個となった。さらに、活性ペプチド残基数(6~60個)でしぼると最終32,302個(同一ペプチドの重複を含む)となった。この段階の活性ペプチド候補は、アミド型3,136個と非アミド型29,168個である。

次に、前駆体をアミド型ペプチドに限定し、また、既知のモチーフ配列を含まない、DNA配列のmRNAの方向との一致するもの、同一ペプチドの重複なし、という絞り込み条件を加えるとstep3の配列数となった。つまり、公開ゲノム構造由来のアミド型ペプチドを含む分泌蛋白質で、鎖長50~300残基、Cys結合が2個以下の鎖長6~60残基の条件を満足する候補ペプチド数は、アミド型352個、同一分子内にある非アミド型ペプチドは565個であった。既知の活性ペプチドはアミド型32個および非アミド型8個が予測的中していた。

(2) 種々の細胞およびオーファン GPCR を安定に発現する細胞を用いたスクリーニング

ヒトゲノムデータベース等のBankに登録されたDNA配列(33,119個)の情報から、独自に開発したコンピューター検索ソフトにより、C末端部にアミドを持つ生理活性ペプチド候補(352個)を予測抽出し、そのうち約200個化学合成した物をアミド型活性ペプチド候補として用いた。その結果、EC50値が数10 μ M濃度の活性は検出したが、nM~数10nM濃度のペプチド性活性を持つ物を検出できなかった。

一方、ブタ脳抽出物から上記のオーファン受容体9個を発現するHEK293細胞および種々のガン細胞などの内在性の受容体を用いてスクリーニングを試みた。活性ペプチドとして、ニューロメジンB、ニューロメジンC、エンドセリン-3、複数のCCK関連ペプチド、ニューロテンシン、CGRP、サブスタンスP、ニューロキニンAとBなどを単離して構造決定したが、既知の生理活性ペプチドであった。

(3) 考察

比較的高活性をもつペプチドを再合成して活性の再確認を行い、濃度応答曲線を検討したところ、いずれも高濃度(10⁻⁶M以上)でのみ細胞に作用するペプチドであった。低濃度で活性が出ず、高濃度を用いると強い活性が見られた結果は、用いた細胞の内在受容体あるいは用いたオーファン受容

体に候補ペプチドがクロスしてシグナルを生じたと思われ、真のGPCRリガンドではないと推定された。将来展望として、ゲノム構造からの候補ペプチドのさらなる改良型の抽出ソフトの開発が必須であり、また、新規スクリーニング法の開発と多数のオーファン受容体を用いた探索ストラテジーとの組み合わせの研究も発見効率を上昇させるために必須と思われる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計6件)

1. Matsuzaki N, Nishiyama M, Song D, Moroi K, Kimura S: Potent and selective inhibition of angiotensin AT1 receptor signalling by RGS2: Roles of its N-terminal domain. *Cellular Signalling*, 23(6): 1041-1049, 2011. (査読あり)
2. Tokuhara N, Namiki K, Uesugi M, Miyamoto C, Ohgoh M, Ido K, Yoshinaga T, Yamauchi T, Kuromitsu J, Kimura S, Miyamoto N, Kasuya Y: N-type calcium channel in the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Biol. Chem.* 285(43): 33294-33306, 2010. (査読あり)
3. Miyamoto N, Namiki K, Tokuhara N, Uesugi M, Takahashi E, Kuromitsu J, Kasuya Y: The utilization of gene targeting models during in preclinical study of drug discovery process -Example of phenotypic and functional analysis of Cacna1b gene product- *Curr Pharmaceut Biotech*, 10(2): 261-267, 2009. (査読あり)
4. Yamagata K, Daitoku H, Takahashi Y, Namiki K, Hisatake K, Kako K, Mukai H, Kasuya Y, Fukamizu A: Arginine methylation of FOXO transcription factors inhibits their phosphorylation by Akt. *Mol. Cell*, 32(2): 221-231, 2008. (査読あり)
5. Asada S, Ikeda A, Nagao R, Hama H, Sudo T, Fukamizu A, Kasuya Y, Kishi T: Oxidative stress-induced ubiquitination of RCAN1 mediated by SCFbeta-TrCP ubiquitin ligase. *Int. J. Mol. Med*, 22(1): 95-104, 2008. (査読あり)
6. Furuya M, Ishida J, Inaba S, Kasuya Y, Kimura S, Nemori R, Fukamizu A: Impaired Placental Neovascularization in Mice with Pregnancy-Associated Hypertension. *Laboratory Investigation*, 88(4): 416-429, 2008. (査読あり)

[学会発表] (計 11 件)

1. 松崎直子・西山真理子・宋丹・諸井佳代子・木村定雄 RGS2 の選択的なアンジオテンシンAT1受容体シグナリング抑制効果におけるN末端サブドメインの役割 第84回日本薬理学会年会 2011年3月24日(横浜)
2. 並木香奈・松永博文・石田純治・徳原直紀・上杉麻衣・須藤龍彦・萩原昌彦・深水昭吉・木村定雄・粕谷善俊 EAEにおけるp38の関与様式 第84回日本薬理学会年会 2011年3月24日(横浜)
3. 小林健・田中健介・天野寛之・松永博文・萩原昌彦・木村定雄・巽浩一郎・粕谷善俊 肺繊維症の病態における蛋白質リン酸化のシグナル経路 第84回日本薬理学会年会 2011年3月23日(横浜)
4. 徳原直紀・並木香奈・上杉麻衣・宮本健優・大郷真・山内敏彦・黒光淳郎・木村定雄・宮本健優・粕谷善俊 実験的自己免疫性脳脊髄炎の病態進展におけるN型カルシウムチャンネルの関与 第84回日本薬理学会年会 2011年3月22日(横浜)
5. 田中健介・松永博文・天野寛之・小林健・石田純治・深水昭吉・萩原昌彦・木村定雄・巽浩一郎・粕谷善俊 COPD発症における介在分子の網羅的解析 第84回日本薬理学会年会 2011年3月22日(横浜)
6. 粕谷善俊・杉山文博・松尾祐志・並木香奈・石田純治・桑木共之・須藤龍彦・柴田さゆり・萩原昌彦・巽浩一郎・深水昭吉・木村定雄 ブレオマイシン誘導性間質性肺炎成立におけるp38MAPKの役割 第83回日本薬理学会年会 2010年3月17日(大阪)
7. 松崎直子・西山真理子・諸井佳代子・木村定雄 RGS2の選択的なAT1受容体シグナリング抑制効果-RGS2のN末端ドメインの役割- 第83回日本薬理学会年会 2010年3月16日(横浜)
8. 柴田さゆり・田中芳夫・高橋裕美・木村定雄・粕谷善俊 モルモット $\beta 1$ アドレナリン受容体の細胞内情報特性 第83回日本薬理学会年会 2010年3月16日(横浜)
9. 並木香奈・徳原直紀・上杉麻衣・須藤龍彦・高橋裕美・黒光淳郎・木村定雄・宮本憲優・粕谷善俊 EAEにおけるp38の役割 第82回日本薬理学会年会 2009年3月18日(横浜)
10. 高橋裕美・田中芳夫・木村定雄・小池勝夫・粕谷善俊 未知のモルモット $\beta 1$ -adrenergic receptor 遺伝子のクローニングとその機能解析 第82回日本薬理学会年会 2009年3月17日(横浜)
11. 高橋裕美・田中芳夫・木村定雄・小池勝夫・粕谷善俊 未知のモルモット $\beta 1$ -adrenergic receptor 遺伝子のクローニングとその機能解析 第118回日本薬理学会関東部会 2008年6月7日(東京)

[その他]

ホームページ等

<http://www.m.chiba-u.ac.jp/class/bunsiseitai/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木村 定雄 (KIMURA SADAŌ)
千葉大学・大学院医学研究院・教授
研究者番号: 40134225

(2) 研究分担者

粕谷 善俊 (KASUYA YOSHITOSHI)
千葉大学・大学院医学研究院・准教授
研究者番号: 70221877

西山 真理子 (NISHIYAMA MARIKO)
千葉大学・大学院医学研究院・助教
研究者番号: 00092081