

生命システムの解明を目指した線虫のペプチド大量シーケンスと機能解析

●河野 強

鳥取大学農学部

＜研究の目的と進め方＞

線虫 *Caenorhabditis elegans* は全ゲノム配列が決定された最初の多細胞生物であり、優れた生物モデルの1つである。生理活性ペプチドは増殖・分化から行動制御に至るまで様々な生命現象に深く関与しているが、塩基配列情報のみではその存在を正確に推定することは極めて困難である。本研究では、ペプチドをランダムに単離・配列決定し、RNA干渉法、さらにはペプチドおよび抗ペプチド抗体の顕微注入による機能解析を行うことなどを通じて、ペプチドの視点から線虫 *C. elegans* の生命システムの解明に迫ることを目的とする。

そこで本研究では、まず、①出発材料である線虫の大量調製、②有効なペプチド抽出法の確立、③ペプチド画分の粗精製、④ペプチドの単離・構造解析を行うことにした。

＜研究開始時の研究計画＞

【線虫の大量調製】出発材料として、100gの線虫を液体培養によって調製する。これは、ペプチドの単離・配列決定の十分量であると考えられる。

【ペプチド画分の調製】精製操作を簡略化するため、高分子タンパクを除いたペプチド画分を調製し、さらに、酸性区、中性区、塩基性区に細分化する。

【単離と配列決定】各画分を各種クロマトグラフィーによって精製し、アミノ酸配列分析・質量分析を行う。

【データベース検索】得られたアミノ酸配列について、生物全般のタンパクデータベースおよび *C. elegans* データベースを検索し、既存のペプチドとの相溶性、染色体上でのマッピング、塩基配列等の情報を得ると共に、既存の変異株およびcDNAクローンの有無を検討し、次年度の研究に生かす。

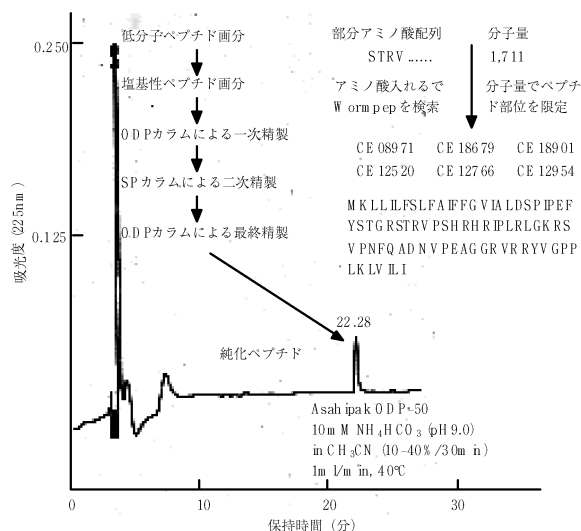
＜研究期間の成果＞

【線虫の大量調製】500mlスケールの液体培養を10回行い、約50gの線虫を得ることができ、これを出発材料とした。ペプチドの単離・配列決定には十分量であった。

【ペプチド画分の調製】エタノール抽出により高分子ペプチド画分・低分子ペプチド画分に大別し、さらに、イオン交換クロマトグラフィーにより、酸性区、中性区、塩基性区に細分化し、逆相HPLCによる分析を行った。

【単離と配列決定】クロマトグラムのピークパターンが最も単純であった低分子塩基性ペプチド画分より、比較的精製が容易であると思われるペプチドを単離し、器機分析を行った。

【データベース検索】得られたアミノ酸配列について、*C. elegans* データベースを検索し、分子量の一致する配列を抽出した。その結果、本ペプチドの構造を STRVPSHRHRIPRL-NH₂とした。他生物のデータベース上には本ペプチドとの類似配列は存在せず、線虫特異的なペプチドであると推察できる。



＜国内外での成果の位置づけ＞

当時、ブタ・マウスのペプチドーム解析が緒についたばかりであり、線虫のペプチドーム解析は極めて斬新なものであった。線虫からのペプチドの単離さえ行われていなかった。2005年に開催された第15回国際 *C. elegans* 会議において、国外の研究グループによりペプチドーム解析に関する報告があった。今後、ペプチドも含めたプロテオーム解析の進展が望まれる。

＜達成できなかったこと、予想外の困難、その理由＞

本研究では、迅速に多種多様なペプチドを単離・配列分析を行うことを目的としたが、期間内に単離・配列決定に至ったペプチドは1種であった。これは、タンパク分解物としてのペプチドが大量に存在しペプチドの精製を困難たらしめたことに因る、と考えられる。各ペプチド画分のHPLCプロファイルが複雑なピークパターンを示したことから、ペプチド単離の困難さを窺い知ることができる。

＜今後の課題＞

迅速なペプチド単離を行うには、イオン交換クロマトグラフィーによる精製度を上げる必要がある。さらに、ハイスループットなペプチドーム解析を行うためには、二次元HPLCならびにLC-MS-MSの導入が必須であると考えられる。

＜研究期間の全成果公表リスト＞

本研究に関連するものは未出である。