

バイオフィーマティクス解析を応用した新規ヒト生理活性ペプチドの同定

●七里 眞義

東京医科歯科大学医学部附属病院

<研究の目的と進め方>

これまで全長ヒト cDNA ライブラリーのデータベースからバイオフィーマティクス解析を行って、合成ペプチドの活性をスクリーニングする新たな手法を考案して、強力な新規生理活性ペプチドを発見してきたが、本法はオーファン受容体のリガンドを探索する従来の手法である「reverse pharmacology」によっても同定困難な新規リガンドを同定できる可能性があるものと認識されて「in silico ペプチド探索法」と呼称されるようになり、新たな新規生理活性ペプチド探索法と位置づけられつつある。とくに最近、G 蛋白共役型受容体 (GPCR) ではない重要な受容体が明らかにされるにつれ、従来の手法では同定できない因子が多数存在するであろうことが推測されている。本研究では、構造上分泌蛋白をコードする全長 cDNA を選択し、その中からヒト由来培養細胞系に発現させると生理活性を示すものについてヒト組織での発現を確認し、プロセッシングにより生合成される小分子量ペプチドを化学合成して培養細胞系における細胞内応答をスクリーニングし、その過程で種々の細胞内応答を示す新規配列の合成ペプチドを多数取得してきた。これまで解析してきた合成ペプチドライブラリーのうち各種生理活性因子候補であるペプチド性因子について、実験動物、摘出臓器、培養細胞などを用いて血管作動性因子、循環調節因子、ホルモン産生・分泌制御因子などとして強力な作用を示す新規因子を同定することを目的とし、現在、いくつかの有力な新規配列について、その特性、生理活性、ならびに生体内存在様式の最終的な解析を行っている。

<2007 年度の研究の当初計画>

- 1) 新規生理活性因子の生合成：2006 年度までのスクリーニングにより多くの新規生理活性候補ペプチド配列が得られているが、これらが実際に生体内で生合成されるかどうかを解析する。
- 2) 高純度ペプチドの合成と生理活性の確認：培養細胞系における活性のスクリーニング評価によって選択された因子について、高純度ペプチドを化学合成してそれらの生理活性を再確認する。
- 3) ポリクローナル抗体の作成とバイオアッセイ系の樹立：合成された高純度ペプチドがスクリーニングにおいて示された著明な生理活性を再現できるものについて、ポリクローナル抗体を作成すると同時に、バイオアッセイ系を樹立するべく検討を行う。
- 4) 細胞表面受容体の検討：¹²⁵I 標識ペプチドを作成して、培養細胞系における細胞表面受容体の存在が結合実験から示すことが可能かどうかを検討する。さらに、標識ペプチドの作成が困難なペプチドについては FITC 標識体、ビオチン標識体を作成し、共焦点顕微鏡やフローサイトメトリーによるリガンド

結合について観察する。

- 5) 種々の生理活性の検討：生体内における分子型による生理活性が確認された高純度ペプチドについては、in vitro および in vivo の種々の実験系において活性の検討を繰り返し、生体内での内因性因子としての様々な役割をできるだけ詳細に検討する。

<2007 年度の成果>

獲得したペプチドライブラリーを用いて培養細胞系・動物実験系における様々な生理活性を検討してきた。さらにこれらをコードする遺伝子配列を用いて、ヒト主要臓器やヒト由来培養細胞系における発現についても詳細な検討を施行してきた。内因性生理活性ペプチドである可能性が高いものについては高純度ペプチドを合成し、ヒト、ラットの血管内皮細胞、血管平滑筋細胞、ラット繊維芽細胞、ヒト、マウスの単球・マクロファージ、マウスの腎由来細胞を始めとする各種培養細胞系において、各種の細胞内情報伝達系の活性化作用を指標に細胞応答を検討してきた結果、生理活性が強力な因子を選択し、すでにいくつかの候補因子については詳細な機能や内在する分子様式を確認する段階にある。とくに、摘出環流心モデルにおいて心筋収縮抑制作用を示すペプチドをはじめとする数個については解析が進んでおり、ポリクローナル抗体の作成まで完了しているもの、アフィニティーカラムを用いて精製が終了した抗体によりヒトおよびラット主要臓器を用いて免疫組織染色を行い、ペプチドレベルでの発現分布解析が終了したものなどがある。抗血清を用いて高感度 radioimmunoassay 系を構築できたものについては、ヒト血漿抽出物のゲル濾過クロマトグラフィー、および逆相高速液体クロマトグラフィーの各分画の免疫活性を解析しており、ヒト体液中における分子存在様式の最終的な確認を進めている。さらに、いくつかについては、ペプチドそのものがペプチド医薬品となりうるだけの有用な生理活性と安全性を有する可能性が示されており、投与ルートとその生物活性、代謝の解析を開始している。

<国内外での成果の位置づけ>

研究代表者は過去に本研究の基本的な手法を考案する過程で強力な新規多機能性関連ペプチドのサリューションを発見した (Nature Medicine 2003;9:1166-72)。これまでオーファン受容体のリガンドを同定する手法により、重要な生理活性ペプチドを発見する研究が盛んに行われてきた経緯があるが、生体内で重要な機能を有するペプチド性リガンドは必ずしも GPCR を介するとは限らず、多くの非 GPCR 型細胞表面受容体が重要な役割を示すことが明らかになりつつある。こうした経過と併行するように、オーファン受容体のリガンド同定は最近、困難になりつつある。これまでバイオフィーマティクスを新規リガンドの発見に応用

する試みは、RF アミド構造のように機能が明らかとなっている配列を指標にしたデータベース検索によって中枢神経系の新規ペプチドが同定されたなどの例があるが (Nature Cell Biol. 2000;2:703-8)、本研究計画は特定のアミノ酸構造に限定してペプチドを探索するのではなく、広く多くの分泌性ペプチドのアミノ酸配列を構造解析して、選択しただけ多くの因子について機能解析を行うものであるが、そのスクリーニング過程を一段と効率化するもので、研究代表者が考案し開発した全くのオリジナルである。研究方法は提示したとおり容易で簡単に追跡が可能であるが、研究は現時点でも急展開を続けており常に先駆的といえる。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

高純度合成ペプチドが合成できたことが mass spectrometry 解析でも明らかとなっているにもかかわらず、実際に活性を測定したり、生体内分子型を確認しようとするプロセスで思いがけない困難さに遭遇するペプチドが、本研究を進める過程で、最近いくつも見出された。それらの中にはポリプロピレンやガラスに対して著明な吸着活性を示したり、生体内の蛋白質に強い結合を示す特性であったりするなど (Nature Med 2007;13:661-662)、これまで知られていなかったペプチドの物理化学的性状であるだけに、これまでの古典的なクロニングの手法では、決して発見できなかったであろうと考えられる。本手法においてもこれらの検討には多大な困難を伴ったものの、新たな治験としてこれまでにない特性の因子を同定するノウハウがさらに蓄積されているものと考えている。こうして、これまでの生理活性ペプチドの標準的な特性や常識的とされたアミノ酸配列とは大きく異なる重要な因子を順次報告してゆく予定である。

<今後の課題>

これまで本研究で見出してきた多くの未発表の新規生理活性ペプチド因子をどの段階でどのような形で報告するか、それぞれの因子毎によく検討しなければならない。すなわち、内因性因子としての重要性よりも、ペプチド医薬品としての応用がきわめて有望と考えられるものは、企業化による開発が必須となるが、その際は十分な権利化により開発企業のリスクを低減させる手段を講じておかなければ、提携企業は現れない。また、アゴニストとしての作用よりも、拮抗薬がきわめて有用な医薬品となりうると思われるものについては、受容体同定研究を先行して開始して、アンタゴニストの開発やその作用の検討を、提携企業との密接な連携のもとに行ってゆく必要がある。このような各因子の開発の方向性を明らかにしてゆくために、今後、さらに正確な活性の評価を継続させてゆく予定である。

<成果公表リスト>

1) 論文

1. 0612271149 Sato K, Koyama T, Tateno T, Hirata Y, Shichiri M: Presence of immunoreactive salusin-a in human serum and urine. *Peptides* 2006;27:2561-2566
2. 0710121854 Wang Z, Takahashi T, Saito Y, Nagasaki H, Ly NK; Nothacker HP, Reinscheid RK, Yang J, Chang JK, Shichiri M, Civelli O: Salusin-b is a surrogate ligand of the mas-like G protein-coupled receptor MrgA1. *Eur J Pharmacol* 2006;539:145-150

3. 0710121836 Shichiri M: Reply to 'Salusins; newly identified bioactive peptides with hemodynamic and mitogenic activities' *Nature Medicine* 2007;13:661-662
4. 0710121840 Hirono Y, Yoshimoto T, Suzuki N, Sugiyama T, Sakurada M, Takai S, Kobayashi N, Shichiri M, Hirata Y: Angiotensin II receptor type 1-mediated vascular oxidative stress and proinflammatory gene expression in aldosterone-induced hypertension: The possible role of local renin-angiotensin system. *Endocrinology* 2007;148:1688-1696.
5. 0710121844 Tsuchiya K, Sakai H, Suzuki N, Iwashima F, Yoshimoto T, Shichiri M, Hirata Y: Chronic blockade of nitric oxide synthesis reduces adiposity and improves insulin resistance in high-fat-induced obese mice *Endocrinology* 2007;148:4548-4556.
6. 0710121847 Suzuki N, Shichiri M, Akashi T, Sato K, Sakurada M, Hirono Y, Yoshimoto T, Koyama T, Hirata Y: Systemic distribution of salusin expression in the rat. *Hypertens Res* 2007;30:1255-1262
7. 0710121850 Watanabe T, Suguro T, Sato K, Koyama T, Nagashima M, Kodate S, Hirano T, Adachi M, Shichiri M, Miyazaki A: Serum salusin-a levels are decreased and correlated negatively with carotid atherosclerosis in essential hypertensive patients *Hypertens Res* 2008 in press

2) データベース/ソフトウェア
なし