

学位論文

「血漿ペプチドミクスにて同定した新規ヒト生理活性
ペプチドの受容体・結合蛋白探索研究」

DM 17011 佐々木 紗也加

北里大学大学院医療系研究科医学専攻博士課程
臨床医科学群 内分泌代謝内科学
指導教授 七里 眞義

著者の宣言

本学位論文は、著者の責任において実験を遂行し、得られた真実の結果に基づいて正確に作成したものに相違ないことをここに宣言する。

論文要旨

【背景と目的】

ヒト血漿中の強力な生理活性因子の多くは低分子量蛋白やペプチドであるがその血中濃度はきわめて低いことが知られている。すなわち血液中には未知の生理活性ペプチドや疾患バイオマーカーはごくわずかしかな存在しないため、過去約 20 年間に発見された新規因子や脱オーファン化された G 蛋白共役型受容体はきわめて少数にとどまっている。その中で著者所属研究室および北里大学理学部プロテオミクスセンターの共同研究では血漿中の低分子量ネイティブペプチドを網羅的に多数同定することに成功しつつある。1 万を超える同定された新規ネイティブペプチドのデータベースの中から今回アンジオテンシノーゲン由来ペプチドに着目し、生理活性を有するペプチドを探索した。

新たに作成された血漿ペプチドームデータベースを用いると新規生理活性ペプチドの同定が容易になることが予想される一方で、依然としてペプチドホルモンの細胞表面受容体を同定することは容易ではない。

強力な生理活性ペプチドの受容体探索は、シグナル伝達研究および創薬シーズ探索の重要なターゲットとされており、多くの方法論が検討されてきた。今回、低分子量生理活性ペプチドの細胞表面受容体を分離するための簡単な方法を開発することを目的とし、ペプチド性リガンドと細胞表面受容体を化学架橋させ、リガンド-受容体の複合体の単離と検出を試みた。アンジオテンシン II を用いて、ヒト大動脈平滑筋細胞に発現するアンジオテンシン II タイプ 1 (AT1) 受容体を単離することを試みた。

【方法】

ヒト大動脈平滑筋細胞に AT1 受容体が発現し、細胞内シグナルを惹起することを確認するために、アンジオテンシン II 添加後の細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化を測定し、蛍光標識アンジオテンシン II の細胞表面 AT1 受容体への結合を共焦点顕微鏡での二重染色により確認した。そのうえでビオチン化アンジオテンシン II を培養ヒト大動脈平滑筋細胞表面受容体に結合させた上で架橋剤を添加し、回収した細胞分画からストレプトアビジンビーズを用いて架橋されたペプチドリガンド-細胞表面受容体の複合体を抽出し、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行ったのちにストレプトアビジンおよび抗 AT1 受容体抗体を用いてイムノブロットした。

また、ヒト血漿ペプチドームにて同定されたペプチドライブラリーの中からペプチド同定偽発見率 (FDR) 1% 以下の精度で構造決定されたネイティブペプチドをインシリコ解析してアンジオテンシノーゲン由来ペプチドを探索し、化学合成した。これらの合成ペプチドが生理活性を有するかを検討するため、ヒト培養細胞における細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇す

るかどうかを検討し、さらに蛍光標識ペプチドを用いて培養細胞への結合を共焦点顕微鏡で評価した。

【結果】

ヒト大動脈平滑筋細胞は AT1 受容体を発現し、細胞内 Ca^{2+} 濃度はアンジオテンシン II に応答して増加した。免疫細胞染色では細胞表面の AT1 受容体発現部位に一致して蛍光アンジオテンシン II が認められた。AT1 受容体とビオチン化アンジオテンシン II を細胞培養下にて化学架橋したうえ、抽出した細胞成分をウエスタン解析したところ、両者の共在が確認され、リガンドと受容体蛋白が結合した状態で電気泳動にて分離できたことが示された。

新規ネイティブペプチドデータベースに登録したペプチドライブラリーの中から、FDR 1%以下の精度で同定されたアンジオテンシノーゲン由来ペプチド配列をインシリコ解析で探索したところ 17 個同定され、うち、16 個はユニークペプチドであった。これらの中でアミノ酸配列 448 から始まる C 末端側の配列に、ヒト単球性白血病細胞由来マクロファージで細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇活性を示すものがあり、蛍光標識ペプチドを添加して共焦点顕微鏡にて観察すると時間依存的に細胞表面の蛍光シグナル強度を増加させたことから、細胞表面受容体の存在が示唆された。

【結論】

培養下のリガンド・受容体を化学架橋することにより、アンジオテンシン II の細胞表面受容体である AT1 受容体を検出できた。今回考案した手法は新たな細胞膜受容体・結合蛋白同定法として用いられる可能性が示された。また、アンジオテンシノーゲン由来ペプチドの中に、アミノ酸配列 448 以降の C 末端側のペプチドにおいて生理活性を有する新規因子が存在する可能性が示唆された。

目次

	頁
1. 序論	1
2. 方法	
2-1. 培養細胞および材料	2
2-2. アンジオテンシノーゲン由来ペプチドの探索	3
2-3. Real-time RT-PCR	3
2-4. 細胞内遊離 Ca^{2+} 濃度の測定	3
2-5. 共焦点顕微鏡	4
2-6. 細胞膜結合蛋白の探索	
2-6-1. 化学架橋	4
2-6-2. SDS-PAGE と Western Blotting	4
3. 結果	
3-1. ヒト大動脈平滑筋細胞における AT1 受容体の発現	5
3-2. AT1 受容体の単離と同定	5
3-3. アンジオテンシノーゲン由来ペプチドの同定と細胞応答反応	6
4. 考察	6
5. 総括	7
6. 今後の課題	8
7. 謝辞	8
8. 引用文献	8
9. 業績目録	10
10. 図表	11

1. 序論

ヒト血漿中の蛋白成分のほとんどはアルブミンや免疫グロブリンなどの限られた高分子量・高存在量蛋白で構成されている。一方、強力な生理活性因子の多くは低分子量蛋白やペプチドであるがその血中濃度ははるかに低く、この大きな濃度較差が血漿蛋白の分析を非常に困難にしている¹⁾²⁾。すなわち血液中には大量の未知の生理活性ペプチドや疾患バイオマーカーが存在していても、それらの分子量は少ない上にきわめて低濃度しか存在しないため、過去約 20 年間に発見された新規因子や脱オーファン化された G 蛋白共役型受容体はきわめて少数にとどまっている。

これまで発見された新規生理活性因子の多くは質量分析でも同定されており、質量分析法は生物学研究において有効な技術であり³⁾、個々の血漿蛋白の翻訳後修飾などの特徴も分析されている。例えば著者らは、質量分析法を用いて安定的に再現性よくアルブミンのメチオニン酸化を検出し、さらにこれらを正確に定量化することにも成功し、2 型糖尿病の病態で有意に亢進していたことで、新規酸化ストレスマーカーとして有用である可能性を示した⁴⁾。

共同研究を行っている北里大学理学部プロテオミクスセンターでは、血漿中の大分子量蛋白を除去したのち、残存蛋白から低分子量ペプチド成分を高効率に抽出する技術を開発し⁵⁾⁶⁾、液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析法 (LC-MS/MS) により血漿中の低分子量ネイティブペプチドを網羅的に多数同定することに成功しつつある⁷⁾。これまでに同定された 1 万を超えるネイティブペプチドは ProteomeXchange Consortium via the PRIDE⁸⁾を介して、初めて作成されたデータベースとして登録されたが、今回、その中からアンジオテンシノーゲン由来ペプチドに着目し、生理活性を有するペプチドを同定することを究極の目標として細胞系を用いた探索研究を企画するに至った。

このネイティブペプチドライブラリーのデータベースを用いることにより、今後、新たな生理活性ペプチドの同定が容易になることが予想される一方で、依然としてペプチドホルモンの細胞表面受容体を同定することは容易ではない。受容体同定研究は創薬シーズ研究の重要なターゲットであるものの、これまでの生理活性ペプチドの受容体探索法は、生体試料から活性を指標に濃縮・精製を繰り返して受容体を同定する古典的な手法に始まり、ヒトゲノムが明らかにされて以降は G 蛋白共役型受容体を用いて細胞内シグナルを指標としてリガンドを同定する逆内分泌学的手法などが行われ、最近までにペプチドリガンド・受容体相互作用の単離や精製のため多くの方法論が開発されてきた⁹⁾¹⁰⁾。化学架橋剤は、一過性の不安定なペプチドリガンド・受容体の相互作用を安定化させることができ、受

容体蛋白のさまざまな細胞内相互作用を解明するために使用されている¹¹⁾。化学架橋を行うことで、精製した試料においてペプチドと標的結合蛋白の複合体と非特異的な蛋白結合を区別しやすくし¹²⁾、これまで特定のリガンド-受容体複合体の抽出をはじめ、重要な細胞内情報伝達機構蛋白の同定とその機能解明にも大きく寄与してきた¹³⁾。本研究では、低分子量生理活性ペプチドの細胞表面結合蛋白を分離するための簡単な方法を開発することを目的とし、生理活性ペプチドと細胞表面受容体を化学架橋させ、ペプチドリガンド-受容体の複合体の単離と検出を試みた。アンジオテンシンII ペプチドをリガンドとして使用し、アンジオテンシンII タイプ1 (AT1) 受容体を発現するヒト大動脈平滑筋細胞を使用した。

2. 方法

2-1. 培養細胞および材料

ヒト大動脈平滑筋細胞は、Promocell 社から購入し、5% ウシ胎児血清、上皮成長因子 0.5 ng/mL、線維芽細胞増殖因子 2 ng/ml、およびインスリン 5μg/mL を添加した付属培地を使用した。ヒト単球性白血病細胞は理化学研究所から購入し、10%のウシ胎児血清を含んだ RPMI 1640 培地を使用し、Phorbol 12-myristate 13-acetate (AdipoGen Life Sciences 社) により 3-4 日かけてマクロファージに分化させた。

アンジオテンシノーゲン由来ペプチドや N 末端を 5-carboxyfluorescein にて蛍光標識したアンジオテンシノーゲン由来ペプチド、ビオチン標識したアンジオテンシノーゲン由来ペプチドはスクラム株式会社にて化学合成した。N 末端に 5-carboxyfluorescein にて蛍光標識した angiotensin II とビオチン標識したアンジオテンシンII は AnaSpec 社から購入した。RT-PCR プライマーはユーロフィンジェノミクス株式会社で合成された。First-strand cDNA synthesis kit は Cytiva 社、KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix は Kapa Biosystems 社、Midori Green Direct DNA Stain は日本ジェネティクス株式会社、Fluo-4 acetoxymethylester は同仁化学研究所、Blocking One はナカライテスク社、bis (sulfosuccinimidyl) suberate と dithiobis (succinimidyl propionate) は Thermo Fisher Scientific 社、Dynabeads™ M280 streptavidin は Invitrogen 社、5-20% gradient gel と SDS Running Buffer は DRC、Precision Plus Protein™ Dual Color Standards と Trans-Blot® Turbo™ Mini PVDF Transfer Packs は Bio-Rad 社、Amersham ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagent は GE Healthcare 社、抗 AT1 受容体抗体は Abcam 社、HRP 標識ストレプトアビジンは SeraCare 社、Alexa Fluor® 594 goat anti-rabbit IgG[H+L]は life technologies 社、DAPI Fluoromount-G®は SouthernBiotech 社の

製品を用いた。

2-2. アンジオテンシノーゲン由来ペプチドの探索

北里大学理学部プロテオミクスセンターとの共同研究にて同定されたネイティブペプチドのアミノ酸配列⁷⁾は ProteomeXchange Consortium via the PRIDE⁸⁾を介して構築されたネイティブペプチドデータベースに登録されているが、これを用いてインシリコ解析を行い、ペプチド同定偽発見率 (FDR) 1%以下の精度で同定できたアンジオテンシノーゲン由来アミノ酸配列を探索して、得られたペプチド配列を順次、化学合成した。合成されたペプチドは LC-MS/MS により不純物が少なく高度に精製されていることと、高い溶解性を有していることを確認した⁷⁾。また確認できたアンジオテンシノーゲン由来ペプチドの N 末端に蛍光 (5-carboxyfluorescein) 標識したペプチドを合成し、以下の実験に用いた。

2-3. Real-time RT-PCR

ヒト大動脈平滑筋細胞を 6 穴プレートで培養し、リン酸緩衝食塩水 (PBS) で 2 回洗い、TRIzol 試薬に溶解して total RNA を抽出した。Total RNA は、first-strand cDNA synthesis kit を使用して cDNA に逆転写した¹⁴⁾。KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix を用いて調製し、CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad 社) にて検出および定量化した⁷⁾。また増幅産物のサイズを確認するため、RT-PCR 産物を 2% アガロースゲルで電気泳動した。ヒト AT1 受容体 (Forward 5'-TGCCATCCCAGAAAGTCGG-3' と Reverse 5'-CAGCTTTGGGACAATCATCTTGG-3') とヒト AT2 受容体 (Forward 5'-GGCACTAAGCTGATTTATGA-3' と Reverse 5'-ACAAGCCCGAAGTGAAGACC-3') のそれぞれのプライマーを使用した。

2-4. 細胞内遊離 Ca^{2+} 濃度の測定

ヒト大動脈平滑筋細胞を 96 穴黒プレートで培養し、無血清培地に置換して 16 時間後に Fluo-4 acetoxymethylester を含む Hank's 平衡塩溶液 (HBSS) を 37°C、30 分インキュベートした。その後 HBSS で 3 回洗い、アンジオテンシン II を添加し蛍光強度の変化を POWERSCAN HT マイクロプレートリーダー (BioTek 社) で測定した¹⁵⁾¹⁶⁾。またヒト単球性白血病細胞由来マクロファージに対してはアンジオテンシノーゲン由来ペプチドを用いて Ca^{2+} 濃度を測定した。

2-5. 共焦点顕微鏡

ガラスカバーに播種されたヒト大動脈平滑筋細胞は無血清培地に置換して 16 時間後、蛍光標識 angiotensin II 10^{-6} M を 60 分反応させた。PBS で 3 回洗い、4%パラホルムアルデヒドで 15 分固定し、抗 AT1 受容体抗体 (1:1000)を 60 分反応させた。PBS で 3 回洗った後 Alexa Fluor® 594 goat anti-rabbit IgG[H+L] (1:3000)を 30 分反応させた。DAPI Fluoromount-G® で封入し、LSM710 confocal microscope (Carl Zeiss)で評価した¹⁶⁾。

ガラスカバーに播種したヒト単球性白血病細胞由来マクロファージも同様に蛍光標識したアンジオテンシノーゲン由来ペプチド 10^{-6} M を 0 分、45 分、60 分、90 分反応させた。

2-6. 細胞膜結合蛋白の探索

2-6-1. 化学架橋

ヒト大動脈平滑筋細胞を無血清培地に置換して 16 時間後、PBS (pH 8)で洗浄後、終濃度 10^{-6} M のビオチン標識アンジオテンシンIIを添加し、4℃で 60 分反応させた。その後、化学架橋剤である bis(sulfosuccinimidyl)suberate を 5 mM 添加し、室温で 30 分反応させた。さらに 20mM Tris-HCL (pH7.4)を添加し、室温で 15 分反応させ、細胞を剥離したのち、4℃, 20000g にて 60 分遠心し、沈殿物を PBS で溶解し、再度 4℃, 20000g で 60 分遠心した。沈殿物を 300 uL の RIPA バッファー(50 mM Tris-HCl, pH 7.6/ 150 mM NaCl/ 1% Nonidet P-40/ 0.1% SDS)で溶解し、10 分間の混合と 10 分間のソニケーション後、4℃で 60 分転倒混和した。4℃, 20000g で 15 分遠心し、上清を回収した。ビオチン標識アンジオテンシンIIと細胞表面受容体の複合体を含む上清は、ストレプトアビジンが結合した磁性粒子ビーズ (Dynabeads™ M280 streptavidin)を用いて添付文書に沿って濃縮・溶出した。PBS 1mL にビーズを 15 uL 添加し、30 秒以上混合させ、マグネットセパレーターに 1 分置き、上清を破棄した。ヒト大動脈平滑筋細胞より抽出した試料を添加し、室温で 30 分転倒混和し、上清を破棄した。300uL の RIPA バッファーを添加し 100 回 転倒混和して洗い、上清を破棄した。計 5 回繰り返した後、300uL の RIPA バッファーを添加し、室温で 60 分転倒混和した。試料を別のチューブに移し替え上清を破棄した。0.1% SDS を 60 uL 添加し、95℃で 5 分反応させ、ビーズに吸着したビオチン標識ペプチドと細胞表面受容体の複合体を溶出した。

2-6-2. SDS-PAGE と Western Blotting

溶出した試料 10 μ L を 5-20% 濃度勾配ゲルを用いて 200V、30 分電気泳動した。

PVDF 膜および Trans-Blot® Turbo™ Transfer System (Bio Rad 社) を用いて 25V、30 分転写した。PVDF 膜は Blocking One でブロッキングし、2% BSA/TBS 含有 0.05% (w/v) Tween® 20 で 3 回洗った。ストレプトアビジン (室温、1 時間、1:10000) や抗 AT1 受容体抗体 (4°C、overnight、1:1000) を反応させ、ImageQuant™ LAS 4000 (GE Healthcare 社) で撮影、ImageJ software で解析した。

3. 結果

3-1. ヒト大動脈平滑筋細胞における AT1 受容体の発現

Real-time RT-PCR ではヒト大動脈平滑筋細胞由来 cDNA を用いた AT1 受容体プライマーによる増幅が 28 サイクル付近から認められ、Melting curve 解析により特異性が確認された。さらにアガロースゲル電気泳動により、136 bp に一致する増幅産物が認められたことからヒト大動脈平滑筋細胞にて AT1 受容体 mRNA の発現が認められた(図 1)。しかし、今回合成したプライマーでは AT2 受容体は確認できなかった。次に 10^{-7} M のアンジオテンシン II をヒト大動脈平滑筋細胞に添加することで、細胞内 Ca^{2+} 濃度の増加が認められた(図 2a)。細胞表面に存在する AT1 受容体へのアンジオテンシン II の結合は、共焦点顕微鏡にて細胞表面に結合した蛍光標識アンジオテンシン II と AT1 受容体が共局在することで確認した(図 3)。これらによりヒト大動脈平滑筋細胞の細胞表面に機能的な AT1 受容体が存在することを示した。

3-2. AT1 受容体の単離と検出

ヒト大動脈平滑筋細胞とアンジオテンシン II を化学架橋することで、細胞膜内に存在する AT1 受容体蛋白の単離および検出が可能か検討した。培養中のヒト大動脈平滑筋細胞にビオチン標識したアンジオテンシン II を結合させ、水溶性で膜透過性のない架橋剤をさらに添加した。ビオチン標識アンジオテンシン II に結合した細胞膜蛋白の複合体を抽出したのちストレプトアビジン磁気ビーズにより免疫沈降し、溶出液をストレプトアビジンおよび抗 AT1 受容体抗体を使用してイムノブロットした。ストレプトアビジンでイムノブロットしたメンブレンでは、ビオチン標識アンジオテンシン II および架橋剤を添加した溶出液のみ特異的なバンド(図 4a、レーン 1)が認められた。ビオチン標識アンジオテンシン II を含まない試料(レーン 2 と 3)や架橋剤を含まない試料(レーン 3)ではバンドが認められなかった。次に同じ溶出液を抗 AT1 受容体抗体を用いてイムノブロットしたところ、ストレプトアビジンで認められたバンドと同じ位置に泳動されていた。シグナル強度はアンジオテ

ンシンⅡと架橋剤を使用して得られた溶出液の方がネガティブコントロールよりも大きかった。

3-3. アンジオテンシノーゲン由来ペプチドの同定と細胞応答反応

データベースに登録されている1万を超えるネイティブペプチドの中で、FDR 1%以下のアンジオテンシノーゲン由来ペプチドは17個同定された(表1)。アンジオテンシノーゲンを前駆体とするアンジオテンシン1-7やアンジオテンシン1はN末端側に存在しているが、今回C末端側の配列がいくつも同定された。そこでこれらペプチドの生理活性を確認するため、細胞内 Ca^{2+} 上昇作用があるか確認した。 10^{-5} M および 10^{-6} M のアミノ酸配列448から始まるアンジオテンシノーゲン由来ペプチドをヒト単球性白血病細胞由来マクロファージに添加したところ、細胞内 Ca^{2+} の上昇が認められた。(図2b)。次にペプチドが細胞表面に結合することを確認するため、細胞内 Ca^{2+} の上昇が認められたアミノ酸配列448から始まるアンジオテンシノーゲン由来ペプチドのN末端に蛍光標識し、蛍光標識アンジオテンシノーゲン由来ペプチドをヒト単球性白血病細胞由来マクロファージに反応させ、共焦点顕微鏡で評価した。アンジオテンシノーゲン由来ペプチドは時間依存的にヒト単球性白血病細胞由来マクロファージ表面の蛍光シグナル強度を増加させた(図5)。以上よりアンジオテンシノーゲンのC末端側、とくにアミノ酸配列448以降に生理活性を有する新規因子が存在する可能性が示唆された。

4. 考察

本研究では、低分子量生理活性ペプチドであるアンジオテンシンⅡと細胞表面受容体であるAT1受容体を化学架橋することで、ペプチドリガンド-受容体複合体を単離し検出することができた。AT1受容体はG蛋白共役型受容体であり、細胞の原形質膜に埋め込まれた受容体である。まずヒト大動脈平滑筋細胞におけるAT1受容体の遺伝子レベルでの発現を確認し、細胞内 Ca^{2+} の増加によりAT1受容体下流の細胞内シグナルを確認した。次にヒト大動脈平滑筋細胞にビオチン標識したアンジオテンシンⅡを反応させたのち化学架橋剤を添加したうえで、剥離した細胞からの抽出物をストレプトアビジン磁気ビーズと反応させて、アンジオテンシンⅡ-細胞表面受容体複合体を免疫沈降し、ストレプトアビジンおよび抗AT1受容体抗体によりウェスタンブロット分析した。アンジオテンシンⅡおよびAT1受容体が同じ位置に泳動されたことが確認でき、今回用いた化学架橋剤はAT1受容体の単離に役立つことが示唆された。

今回用いた細胞膜非透過性化学架橋剤に対して、細胞膜透過性化学架橋剤として使われる dithiobis(succinimidyl propionate)は受容体のインターナリゼーションの過程において、受容体および関連する蛋白の相互作用の解明に利用されてきた¹⁷⁾。一方、細胞膜非透過性化学架橋剤は抽出された細胞膜分画や直接培養細胞に反応させることで受容体と相互作用のある蛋白を架橋することに使用されている¹⁸⁾。予備実験にて細胞膜透過性の dithiobis(succinimidyl propionate)を用いて細胞表面蛋白の抽出を試みたところ、受容体を検出することができなかった。一方で、細胞膜非透過性で不可逆的な架橋剤である bis(sulfosuccinimidyl)suberate を用いて受容体を検出できたことから、この架橋剤はペプチドおよび標的細胞表面蛋白の分析に有用であることが示された。

G 蛋白共役型受容体は細胞外刺激により活性化される膜貫通型蛋白であり、さまざまな生理学的応答を媒介して細胞内シグナル伝達を引き起こす。そのため G 蛋白共役型受容体は重要な創薬シーズであり、分子生物学の進歩や逆薬理学的手法により多くの G 蛋白共役型受容体の同定は進んだが¹⁹⁾、未だリガンドや機能が不明なものが多数存在している。これらはオーファン G 蛋白共役型受容体とも呼称され、より効率的なリガンド-受容体の探索方法の開発が求められている。筆者所属研究室ではすでにヒト血漿中からいくつかの低分子量ネイティブペプチドを新たに同定しつつあり、受容体がまだ同定されていない未知の生理活性ペプチドの細胞表面の標的蛋白を容易に同定するための過程として、今回の方法論を検討した。今回の方法で回収されたペプチドリガンド・細胞表面蛋白の架橋された複合体を質量分析することで、新たな生理活性因子の細胞表面結合蛋白を同定できる可能性が示唆される。

また、新規ネイティブペプチドであるアンジオテンシノーゲン由来ペプチドのうち、細胞内 Ca^{2+} の増加や共焦点顕微鏡にてヒト培養細胞表面へのペプチドの結合を評価することで、C 末端側に内因性生理活性因子が存在する可能性が示された。今後は正確な内因性生理活性因子の構造ならびに機能を明らかにし、今回検討した化学架橋を用いて細胞表面結合蛋白の検索を行っていく。

5. 総括

本研究では、低分子量生理活性ペプチドの細胞表面受容体を分離するための方法として、ペプチドリガンドと細胞表面受容体を化学架橋させ、ペプチドリガンド-受容体複合体の単離と検出を試みた。ビオチン標識アンジオテンシン II と細胞表面受容体を化学架橋させてアンジオテンシン II 受容体である AT1 受容体を検出することができた。今回考案した

手法は新たな細胞膜受容体・結合蛋白同定法として応用できる可能性が示され、他の生理活性ペプチドへの応用も可能と考えられる。

また、1万を超える低分子量ネイティブペプチドより作られたデータベースの中で、今回着目したアンジオテンシノーゲン由来ペプチドの中に新たな生理活性を有する未知の因子が存在する可能性が示唆された。

6. 今後の課題

今回の手法を用いて他のペプチドリガンドでも同様に受容体が単離できるか検討する必要がある。ネイティブペプチドライブラリーの中から探索したアンジオテンシノーゲン由来C末端側ペプチドの中に存在する可能性がある新規生理活性ペプチドとその細胞表面受容体を探索し、同定することが今後の目標である。

7. 謝辞

本論文は筆者が北里大学大学院医療系研究科医学専攻博士課程臨床医科学群内分泌代謝内科学に在籍中の研究成果をまとめたものである。同専攻教授 七里眞義先生には指導教官として本研究の実施の機会を与えて戴き、その遂行にあたって終始、ご指導を戴きました。ここに深謝の意を表します。北里大学理学部物理学科物性物理学講座教授・疾患プロテオミクスセンター センター長 小寺義男先生にはプロテオミクス研究に関する研究の実施の機会を与えて戴き、その遂行にあたって終始、ご指導を戴きました。ここに深謝の意を表します。また技術員の加藤由起子さん、加藤利佳さん、大橋潤子さん、理学部物性物理学講座の学生方には多大なるご協力を頂きました。ここに深謝の意を表します。

8. 引用文献

1. Anderson NL, Anderson NG. The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects. *Mol Cell Proteomics* 2002; 1(11): 845-67.
2. Finoult I, Pinkse M, Dongen WV, Verhaert P. Sample preparation techniques for the untargeted LC-MS-based discovery of peptides in complex biological matrices. *J Biomed Biotechnol* 2011; 2011: 245291.
3. Geyer PE, Holdt LM, Teupser D, Mann M. Revisiting biomarker discovery by plasma proteomics. *Mol Syst Biol* 2017; 13(9): 942.

4. Momozono A, Kodera Y, Sasaki S, Nakagawa Y, Konno R, Shichiri M. Oxidised met147 of human serum albumin is a biomarker of oxidative stress, reflecting glycaemic fluctuations and hypoglycaemia in diabetes. *Scientific Reports* 2020;10(1):268.
5. Kawashima Y, Fukutomi T, Tomonaga T, Takahashi H, Nomura F, Maeda T, et al. High-yield peptide-extraction method for the discovery of subnanomolar biomarkers from small serum samples. *J Proteome Res* 2010; 9(4): 1694-705.
6. Saito T, Kawashima Y, Minamida S, Matsumoto M, Araki K, Matsui T, et al. Establishment and application of a high-quality comparative analysis strategy for the discovery and small-scale validation of low-abundance biomarker peptides in serum based on an optimized novel peptide extraction method. *Journal of Electrophoresis* 2013;57:1-9.
7. Taguchi T, Kodera Y, Oba K, Saito T, Nakagawa Y, Kawashima Y, et al. Suprabasin-derived bioactive peptides identified by plasma peptidomics. *Scientific Reports* 2021; in press
8. Vizcaino JA, Deutsch EW, Wang R, Csordas A, Reisinger F, Rios D, et al. ProteomeXchange provides globally coordinated proteomics data submission and dissemination. *Nat Biotechnol* 2014;32:223-6.
9. Thomas TC, McNamee MG. Purification of membrane proteins. *Methods Enzymol* 1990;182:499-520.
10. Shichiri M, Nonaka D, Lee LJ, Tanaka K. Identification of the salusin- β receptor using proteoliposomes embedded with endogenous membrane proteins. *Scientific Reports* 2018;8:17865.
10. Corgiat BA, Nordman JC, Kabbani N. Chemical crosslinkers enhance detection of receptor interactomes. *Front Pharmacol* 2014;4:171.
11. Kim KM, Yi EC, Kim Y. Mapping protein receptor-ligand interactions via in vivo chemical crosslinking, affinity purification, and differential mass spectrometry. *Methods* 2012;56:161-165.
12. Boudreau AC, Milovanovic M, Conrad KL, Nelson C, Ferrario CR, Wolf ME. A protein cross-linking assay for measuring cell surface expression of glutamate receptor subunits in the rodent brain after in vivo treatments. *Curr Protoc Neurosci* 2012;Chapter 5:Unit 5 30 31-19.
13. Fanger BO, Stephens JE, Staros JV. High-yield trapping of EGF-induced receptor dimers by chemical cross-linking. *FASEB J* 1989;3:71-75.
14. Tani Y, Yamada S, Inoshita N, Hirata Y, Shichiri M. Regulation of growth hormone secretion by (pro)renin receptor. *Sci Rep* 2015;5:10878.

15. Shichiri M, Hirata Y, Nakajima T, Ando K, Imai T, Yanagisawa M, et al. Endothelin-1 is an autocrine/paracrine growth factor for human cancer cell lines. *J Clin Invest* 1991;87:1867-71.
16. Shichiri M, Ishimaru S, Ota T, Nishikawa T, Isogai T, Hirata Y. Salusins: Newly identified bioactive peptides with hemodynamic and mitogenic activities. *Nat Med* 2003;9:1166-72.
17. Shenoy SK, Drake MT, Nelson CD, Houtz DA, Xiao K, Madabushi S, et al. β -arrestin-dependent, G protein-independent erk1/2 activation by the β 2 adrenergic receptor. *J Biol Chem* 2006;281:1261-73.
18. Aldecoa A, Gujer R, Fischer JA, Born W. Mammalian calcitonin receptor-like receptor/receptor activity modifying protein complexes define calcitonin gene-related peptide and adrenomedullin receptors in drosophila schneider 2 cells. *FEBS Lett* 2000;471:156-160.
19. Civelli O, Reinscheid RK, Zhang Y, Wang Z, Fredriksson R, Schioth HB. G protein-coupled receptor deorphanizations. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2013;53:127-146.

9. 業績目録

(I) 原著

1. Sasaki S, Taguchi T, Kodera Y, Shichiri M: Isolation and detection of cell surface angiotensin II receptor using chemical crosslinking. *The Kitasato Medical Journal* 2021; in press
2. Momozono A, Kodera Y, Sasaki S, Nakagawa Y, Konno R, Shichiri M: Oxidised met147 of human serum albumin is a biomarker of oxidative stress, reflecting glycaemic fluctuations and hypoglycaemia in diabetes. *Scientific Reports* 2020;10:1:268.
3. Momozono A, Kodera Y, Sasaki S, Nakagawa Y, Konno R, Shichiri M: Role of oxidized Met111 of human serum albumin for an oxidative stress biomarker in diabetes. *The Kitasato Medical Journal* 2020;50:80-5.
4. Hoshiyama A, Fujimoto K, Konno R, Sasaki S, Momozono A, Kodera Y, Shichiri M: Identification of plasma binding proteins for glucosedependent insulinotropic polypeptide. *Endocrine Journal* 2019;66:7:621-8.
5. Inoue M, Hayashi A, Taguchi T, Arai R, Sasaki S, Takano K, Inoue Y, Shichiri M: Effects of canagliflozin on body composition and hepatic fat content in type 2 diabetes patients with non-

alcoholic fatty liver disease. J Diabetes Investig 2019;10:4:1004-101.

(Ⅱ) 著 書

なし

(Ⅲ) 総説・講座

なし

(Ⅳ) 症例・臨床治験・その他

1. 井上光子、鎌田裕二、坂東慧、田口朋、村田秋穂、新井梨衣那、佐々木紗也加、林哲範、高野幸路、七里眞義：インフルエンザワクチン接種後に発症した急性発症1型糖尿病の1例. 糖尿病 2019;62:4:214-19.

10. 図表

アミノ酸配列	前駆体蛋白でのアミノ酸配列の位置	FDR
A(+127.06)DSQAQLL	197-204	1
AVYDQSATALHFLGRVANPLSTA	463-485	0
DRVYIHP	34-40	1
DRVYIHPFHL	34-43	0
GRVANPLSTA	476-485	1
KPEVLEVTLNRPFLF	448-462	0
KPEVLEVTLNRPFLFAVYDK(sub Q)SATALHFLGRVANPLSTA	448-485	0
KPEVLEVTLNRPFLFAVYDQ(+.98)SATALHFLGRVANPLSTA	448-485	0
KPEVLEVTLNRPFLFAVYDQSATALHFLGRVANPLSTA	448-485	0
KPEVLEVTLNRPFLFAVYDQSATALHFLGRVANPLSTA(-.98)	448-485	0
KTGCSLMGASVDST	262-275	0
Q(-17.03)LNKPEVLEVTLNRPFLFAVYDQSATALHFLGRVANPLSTA	445-485	0
RVANPLSTA	477-485	1
RVYIHPFHL	435-43	1
VLEVTLNRPFLFAVYDQSATALHFLGRVANPLSTA	451-485	0
VTLNRPFLFAVYDQSATALHFLGRVANPLSTA	454-485	0
WVDN(+15.99)STSVSV	301-310	1

表 1 同定されたアンジオテンシノーゲン由来ペプチドの配列

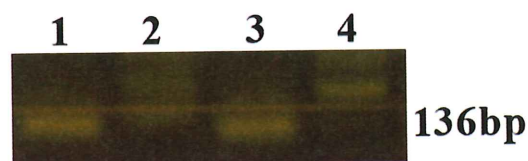


図1 RT-PCR産物の電気泳動

RT-PCRで生成された増幅産物を2%アガロースゲルで分離し、可視化した。

レーン1と3: AT1受容体増幅産物、レーン2と4: AT2受容体増幅産物

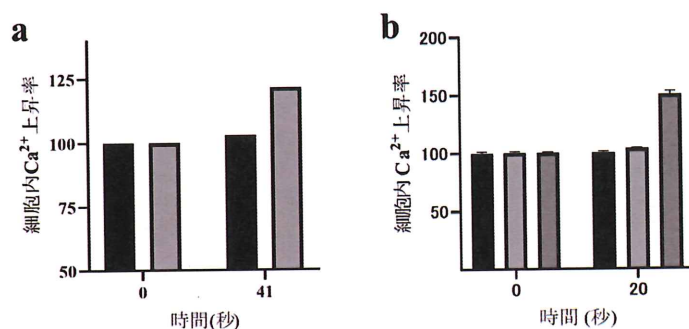


図2 生理活性ペプチド添加時の細胞内Ca²⁺の測定

a: 10⁻⁷MのアンジオテンシンIIで刺激し、蛍光強度を測定した。b: 10⁻⁶Mと10⁻⁵Mのアンジオテンシノーゲン由来ペプチドで刺激し、蛍光強度を測定した。黒い棒グラフはコントロールを表している。

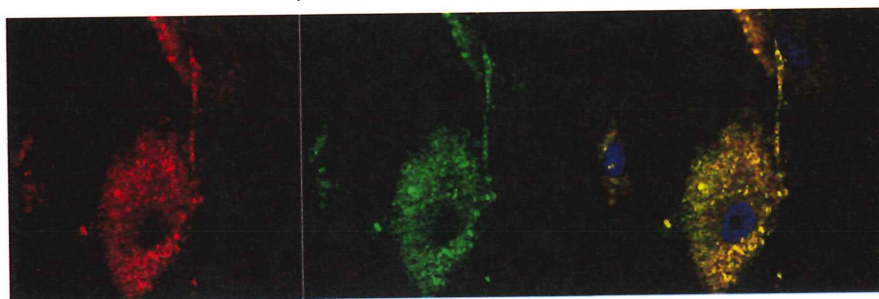


図3 アンジオテンシンIIとAT1受容体の細胞免疫染色

10⁻⁶Mの蛍光標識アンジオテンシンIIをヒト大動脈平滑筋細胞に60分反応させ、固定し、AT1受容体に対する特異的な抗体(1:1000)で染色した。核はDAPIにより染色した。緑の信号は蛍光標識アンジオテンシンIIの細胞表面結合部位を示し、赤い信号は

AT1 受容体の局在を示す。黄色い信号が共局在を示す。

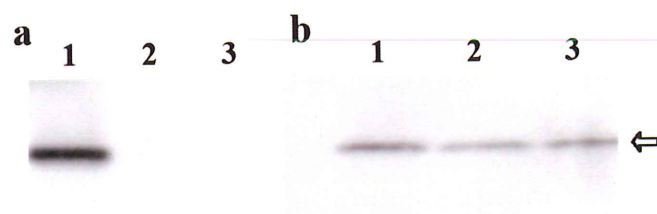


図 4 アンジオテンシンⅡと AT1 受容体間の相互作用の検出

無血清培地で置換して 16 時間後のヒト大動脈平滑筋細胞にビオチン標識アンジオテンシンⅡ(10^{-6} M)を反応させた細胞(レーン 1)と反応させていない細胞(レーン 2 と 3)に架橋剤を添加し 30 分反応させた細胞(レーン 1 と 2)と反応させていない細胞(レーン 3)を剥離した。得られた試料はストレプトアビジン磁気ビーズでアンジオテンシンⅡと細胞表面受容体の複合体を単離した。溶出液を SDS-PAGE し、ストレプトアビジン(a)または抗 AT1 抗体(b)を使用してイムノブロットした。矢印は biotin 標識ペプチドを含む試料に特異的に認められたバンドの位置を示している。

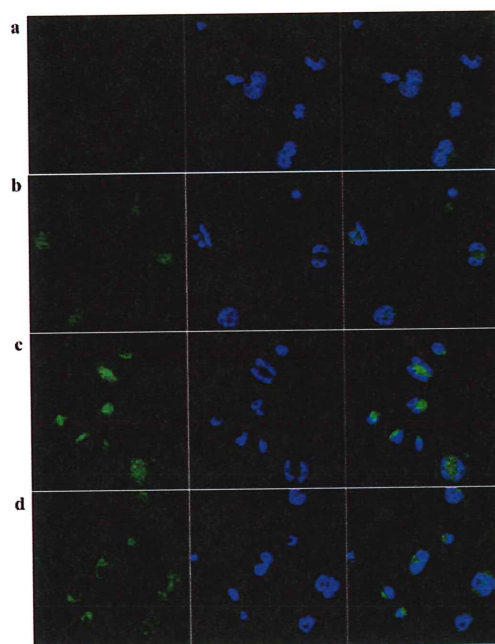


図 5 蛍光標識アンジオテンシノーゲン由来ペプチドのヒト単球性白血病細胞由来マクロファージへ結合

10⁻⁶M の蛍光標識アンジオテンシノーゲン由来ペプチドをヒト単球性白血病細胞由来マクロファージに 0 分(a)、45 分(b)、60 分(c)、90 分(d)反応させ、固定した。核は DAPI により染色した。緑の信号は蛍光標識アンジオテンシノーゲン由来ペプチドの細胞表面結合部位を示す。