

学 位 論 文 要 旨

氏 名 佐々木 紗也加



論 文 題 目

「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」

指 導 教 授 承 認 印

七里 真義



(以下要旨本文)

【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で、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。