

学位論文要旨

氏名 田口 朋



論文題目

「ヒト血漿ペプチドームにて同定した新規NF- κ B誘導因子と摂食抑制性因子」

指導教授承認印

七里真教



ヒト血漿ペプチドームにて同定した

新規 NF- κ B 誘導因子と摂食抑制性因子

氏名 田口 朋

(以下要旨本文)

【背景と目的】

これまで血中のペプチドホルモンの同定にはインスリンに代表される内分泌臓器等からの単離精製する方法、オレキシンに代表される受容体から遡ってリガンドを同定する逆薬理学的手法が用いられてきた。またバイオインフォマティクスを利用して、サリューシン α 、サリューシン β が同定された。しかしそれ以後、新規生理活性ペプチドの同定は非常に少ない。ヒト血漿中の蛋白成分の大部分を構成しているアルブミンや免疫グロブリンなどに比べて、組織・臓器由来成分の濃度はおよそ10万分の1以下と少なく、強力な活性を有する生理活性ペプチドやサイトカインを含む超微量成分は1億分の1程度のもも多く、これら微量成分のなかから強力な生理活性ペプチドを同定することはきわめて困難である。北里大学理学部プロテオミクスセンターでは、血漿中の大分子量タンパクを除去したのち、低分子量ペプチド分画をきわめて高効率に濃縮・精製する技術 (Differential solubilization 法) を開発し、液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析 (LC-MS/MS) によって、PEAKS データベースから血中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た。その中から、(1) アミノ酸 39 残基以下、(2) 翻訳後修飾・アミノ酸置換がない、(3) 同定確度 FDR=0% で配列が決定されている、(4) 単一の分泌タンパク由来ペプチドの 4 点を満たす 95 個のペプチドを化学合成し、これら合成ペプチドを用いて生理活性の有無を探索した。

【方法】

ラット大動脈血管平滑筋 (A10), ヒト大動脈血管平滑筋細胞 (HAoSMC) に対して Ca^{2+} を蛍光標識する Fluo4-AM を用いて、全合成ペプチドを添加し、細胞内応答を示すペプチドを探索した。また C57BL/6J Mice に全合成ペプチドを腹腔内投与し、摂食・飲水・行動量測定装置 (ACTIMO-100M/MFD-100) を用いて暗期自由行動下マウスにおける摂食・飲水・行動量を制御するものがないかどうか解析した。これらの網羅的な検討により強力な生物学的応答を示した因子について、N 末端を 5-carboxyfluorescein (FAM) 標識したペプチドによる培養細胞表面への結合実験、細胞増殖、抗アポトーシス効果の評価目的に生細胞数の cell counting、cell viability、ヌクレオソームラダーの検討、TUNEL 染色を行った。それらペプチドが培養細胞からサイトカイン分泌への影響を検討するために、培養細胞上清中のサイトカイン発現プロファイルを測定する抗体アレイキットを用いて解析した。Real-time PCR を用いた培養細胞における遺伝子発現を誘導活性の検討、免疫細胞染色による NF- κ B の nuclear translocation の評価、Western Blotting による細胞内 I κ B- α の経時的な崩壊の解析をおこなった。十分な生理活性が確認されたペプチド

について、安定同位体標識ペプチドを用いた血中濃度測定、網羅的抗細胞表面抗体作成法を用いて作成した特異的抗ペプチドポリクローナル抗体を用いて、それぞれのペプチドの産生臓器を明らかにするため、ヒト各種組織アレイ標本と各種培養細胞を用いて主要臓器でのペプチド発現を評価した。

【結果】

① 合成ペプチドの生理活性の有無をスクリーニング評価

95 個の合成ペプチドを網羅的に培養細胞に添加し、 Ca^{2+} を蛍光標識する Fluo4-AM を用いて細胞内 Ca^{2+} 濃度変化を観察することで生理活性の有無をスクリーニングした。ヒト大動脈血管平滑筋細胞 (HAoSMC), ラット大動脈血管平滑筋細胞 (A10)においてヒトスプラバシン蛋白由来の 2 つの小分子量ペプチドに細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇がみられた。13 アミノ酸からなる GQGIHHAAGQVGK {SBSN_HUMAN[225-237] or suprabasin(225-237), monoisotopic mass 1259.6603} と 17 アミノ酸からなる GQGAHHAAGQAGNEAGR {SBSN_HUMAN[243-259] or suprabasin(243-259), monoisotopic mass 1588.7323} が LC-MS/MS に伴う Peaks Studio Database 解析によって FDR=0% の確度で同定された。SBSN_HUMAN[243-259]は SBSN_HUMAN[225-237]より大きな細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇が見られ、かつCaチャンネルブロッカーであるニカルジピンでCaチャンネルを阻害することで、その反応は減弱することを確認した。同様に 95 個の合成ペプチドを C57BL/6J Mice に腹腔内投与し、暗期自由行動下マウスにおける摂食・飲水・行動量を観察することでスクリーニングした。スプラバシン蛋白由来の 17 個のアミノ酸からなる GQGVHHTAGQVGKEAEK {SBSN_HUMAN[279-295] or suprabasin(279-295), monoisotopic mass 1732.8725}において極めて低濃度(10pM)で摂食、飲水行動の有意な抑制を認め、運動量には有意な変化は認めなかった。

② 細胞増殖、抗アポトーシス効果の有無評価

SBSN_HUMAN[225-237]と SBSN_HUMAN[243-259]は Ca^{2+} シグナルを亢進することが確認され、それは MAP kinase との関与を考えた。そのためこれらペプチドが細胞増殖活性、抗アポトーシス効果があるかを評価した。これらペプチドを A10 に添加し、細胞数の経時的な変化を、さらに HAoSMC に添加後、Cell counting Kit-8 (CCK-8)で cell viability の経時的な変化を評価した。vehicle と比較し、両方のペプチドにおいて、細胞数、cell viability の相対的な増加が見られた。また抗アポトーシス効果を評価するため、HAoSMC、A10 にこれらペプチドを添加後の DNA ラダーと TUNEL 染色で核の断片化を評価し、抗アポトーシス効果を有していた。さらに A10、HAoSMC で増殖系の mRNA の発現を評価し、初期応答因子である *c-Myc* と *Egr1* の発現亢進がみられた。

③ 受容体結合の評価

SBSN_HUMAN[225-237], SBSN_HUMAN[243-259], SBSN_HUMAN[279-295]がそれぞれ血管平滑筋細胞に結合するかを評価した。それぞれのペプチドの N 末端を 5-carboxyfluorescein (FAM)標識し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて評価した。A10, HAoSMC とともに細胞表面に SBSN_HUMAN[225-237], SBSN_HUMAN[243-259]が結合していた。この結果は細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇を示したことと一致する。また SBSN_HUMAN[279-295]はそれら細胞表面に蛍光が確認できなかった。次にプレート

リーダーを用いて、A10、HAoSMCにおける SBSN_HUMAN[225-237], SBSN_HUMAN[243-259]の結合の強度を評価した。それぞれペプチド添加後 15 分程度で蛍光が見られ、約 50 分程度で蛍光強度はプラトーに達した。また濃度別にペプチドを添加し 1 時間後の蛍光強度を測定した。濃度依存性に蛍光強度が強くなることが確認できた。

④ 炎症惹起性の評価

SBSN_HUMAN[225-237]と SBSN_HUMAN[243-259]を HAoSMC に添加後の培養上清のサイトカイン、ケモカインの分泌を評価した。SBSN_HUMAN[225-237]は vascular endothelial growth factor (VEGF), dickkopf-related protein 1 (DKK1), endoglin (ENG), urokinase plasminogen activator receptor (uPAR), cystatin C の蛋白分泌亢進がみられた。一方、SBSN_HUMAN[243-259]は hepatocyte growth factor (HGF), VEGF, DKK1, osteopontin (OPN), interleukin (IL)6 の分泌亢進がみられた。次にこれら分泌亢進が見られた蛋白の遺伝子発現が培養細胞中で亢進しているかを Real time PCR で評価した。VEGF, DKK1, ENG, PLAUR, CST3, HGF, OPN, IL6 の mRNA の発現亢進が見られた。さらにヒト皮膚線維芽細胞 (NHDF) で同様の検討を行い、それぞれ ENG, MCP1 の分泌亢進が見られた。これらサイトカインの誘導に NF- κ B シグナルが関与しているか検討した。HAoSMC へペプチド添加後の、Western blotting で ikB α の崩壊が見られた。さらに p65 の核内移行も確認された。NF- κ B シグナルの阻害剤であるプロテアーゼインヒビターの MG-132 で HAoSMC を前処置後、VEGF の発現を評価し、発現の抑制が見られたことから、SBSN_HUMAN[225-237], SBSN_HUMAN[243-259]は NF κ B シグナルを介して、炎症性サイトカインを誘導していることが示唆された。

⑤ Suprabasin 由来ペプチドの各組織、培養細胞の発現評価

安定同位体標識を行った各種ペプチドを用いて、健常成人血漿中の濃度を測定した。SBSN_HUMAN[225-237], SBSN_HUMAN[243-259], SBSN_HUMAN[279-295] の濃度はそれぞれ、0.34nM, 1.0nM, 1.5nM であった。次に各組織でのペプチドの発現を評価し、SBSN_HUMAN[225-237]と SBSN_HUMAN[279-295]は同じ局在を示し、各主要臓器(中枢神経系、胃、肝臓、肺、心臓、腎臓、副腎)に広く存在した。SBSN_HUMAN[243-259]は肝臓と膵臓に局在していた。培養細胞では HAoSMC、ヒト単球細胞 (THP1)、ヒトマクロファージ、ヒトケラチノサイト (HaCaT)、ヒト肝細胞癌 (HepG2) で suprabasin 由来ペプチドは存在していた。

【考察】

本研究ではヒト末梢血中に循環する多くのネイティブペプチドを同定し、それらネイティブペプチドライブラリーから合成したペプチドを用いて、生理活性を有する 3 つのペプチド、SBSN_HUMAN[225-237], SBSN_HUMAN[243-259], SBSN_HUMAN[279-295]を同定することに成功した。スプラバシンはヒトやマウスの分化ケラチノサイトで発現している遺伝子として同定され、上皮の分化マーカーであり、重層扁平上皮特異的に分泌される蛋白である。スプラバシン遺伝子は proto-oncogene としての役割がしばしば報告され、悪性腫瘍の治療抵抗性、予後, cell survival に SBSN の発現が上昇しているという報告がある。今回我々はスプラバシン由来ペプチドに生理

活性を有することを発見した。SBSN_HUMAN[225-237], SBSN_HUMAN[243-259]は血管平滑筋において細胞増殖と NF- κ B シグナルを介した炎症惹起作用があることから、動脈硬化や腫瘍の進展等に関与している可能性がある。これら 2 つのペプチドはスプラバシンそのものの腫瘍への効果と類似する部分もあるため、スプラバシンの病態的意義とも関係するかもしれない。また SBSN_HUMAN[279-295]は摂食、飲水抑制効果がみられた。従来の摂食抑制ペプチド (Glucagon-like peptide 1, レプチン、コレシストキニンなど) は 10^{-6} ~ 10^{-8} M でその摂食抑制効果が見られたのに対し、SBSN_HUMAN[279-295]は 10^{-11} M とはるかに低濃度でその作用が見られた。血中には 1.5×10^{-9} M とそれより高濃度で存在していることから、SBSN_HUMAN[279-295]は摂食、飲水の調節に大きく関わっていることが推測される。我々の新規ペプチド探索法により NF κ B 誘導、細胞増殖、抗アポトーシス効果、さらには摂食抑制作用をもつスプラバシン関連ペプチドの同定に成功した。

【結論】

血管平滑筋細胞に対して NF- κ B 活性化を介した各種炎症性サイトカイン惹起性、増殖促進性、抗アポトーシス性、末梢性摂食・飲水抑制作用を有し、いずれも同一の前駆体タンパクから生合成される合計 3 つの新規生理活性ペプチドを同定した。ヒト血漿ペプチドームにより同定されたペプチドライブラリーは新規生理活性因子の同定に有用であると考えられた。