

3S4p01 ペプチドミクスによる生理活性ペプチドの探索

○南野 直人, 佐々木 一樹
(国立循環器病七研・薬理)

ペプチドは、ホルモン、循環調節因子、神経伝達物質等として生体の情報伝達・制御に不可欠であり、ペプチド総体 (Peptidome) を解析できれば、生命現象の理解、創薬や診断・治療法の開発に有用と考えられる。ペプチドはタンパク質と類似するため、プロテオーム解析法が適用可能と考えられがちであるが、1) 実在分子を同定するため酵素消化は使用できず、2) タンパク質に比して微量であり (1/1000 以下)、3) 抽出時の分解が不可避で、4) タンパク質の分解ペプチドが大半を占める、などの問題がある。このような実在ペプチドを包括的に解析する分野は、プロテオミクスと区別してペプチドミクスと呼ばれている。10 年前より、分解を抑制した抽出法、2 次元 LC と質量分析計によるプロファイリング法を作成し、マウス脳のペプチドーム解析等を行ったが、約 80% は細胞内タンパク質由来の分解ペプチドであった。残り 20% は分泌タンパク質に由来したが、大半は 2 次的分解を受け、内在性ペプチドはごく一部と推定された。問題点克服のため、我々はペプチドが主に細胞間で機能することに着目し、細胞培養上清を標的とした解析を開始した。内分泌系細胞培養上清のペプチド画分を還元アルキル化後、逆相 LC で分離、分析したところ、多数のペプチドを同定でき、ホルモン前駆体由来ペプチドが高率で観測された。機能未知のペプチド群より C 末端アミド化を基準に 2 種のペプチドを選択、合成し、抗体を調製した。免疫沈降物の質量分析等により脳での存在を確認した。宮崎大学中里教授との共同研究により、これらは視床下部パソプレッシン産生神経細胞に含まれ、薬理学的解析よりパソプレッシン分泌を抑制することを明らかにした。局在と作用に基づき NeuroEndocrine Regulatory Peptide (NERP) 1、2 と命名し、生理、病態生理機能の解析を進めている (1)。

さらに、内分泌細胞に短時間の分泌刺激を与えてペプチドを回収すると、分泌顆粒中に近い状態でペプチドを回収、解析できることを明らかにした (2)。同定ペプチド数の多いタンパク質ではプロセシングや生成ペプチドが予測可能と考えられ、今後ペプチドミクスに基づく生理活性ペプチド探索が一般的手法となると期待される。大部分のペプチドはプロホルモン変換酵素により切断されると考えられるが、切断特異性に一致しない例もあるため、正確な予測を行うにはデータ蓄積、解析が必要である。

ペプチドの標的として G タンパク質共役型受容体が注目されているが、NERP 受容体は見出せず、標的が他のタンパク質である可能性も想定される。また、ペプチドが生成する現象は生体内に数多くあり、細胞内でもペプチドが機能するという仮説もある。ペプチドミクスを用いた生理活性ペプチド探索はまだ緒に就いたばかりであるが、ペプチド回収法の確立、分解ペプチドの識別法などが開発できれば、生体内ペプチドの生成機序、機能も含めその世界はさらに広がるものと期待している。

1) Yamaguchi H, Sasaki K, et al. J Biol Chem, 282: 26354, 2007.
2) Sasaki K, Satomi Y, et al. Mol Cell Proteomics, on-line, March 31, 2009.

Peptidomics-based search for biologically active peptides

○Naoto MINAMINO, Kazuki SASAKI
(Natl. Cardiovascul. Ctr.)

Key words peptide, peptidomics, peptidome

3S4p02 メタボリックフィンガープリンティングの高解像度表現型解析への応用

○福岡 英一郎
(阪大院・工・生命先端)

メタボロミクスはゲノム配列情報が無くても運用可能であるため、ゲノム情報の乏しい実用植物や、実用工業微生物の解析手法として特に期待されている。その中でもメタボロームをフィンガープリント (指紋) に見立てて種々の表現型を分類・予測する手法であるメタボリックフィンガープリンティングは実用性の高い方法論として注目されている。本講演では、メタボリックフィンガープリンティングの高解像度表現型解析への応用について実例を示しながら議論したい。

まず、出芽酵母をモデルとして、高次表現型である「寿命」が、メタボロミクスにより予測できるか？として、寿命延長を指向した形質転換戦略立案にメタボロミクスが有用か？という命題を掲げた。寿命延長変異株ならびに、寿命短縮変異株のメタボローム解析を実施したところ、寿命の長さとは特定代謝物の間に強い相関を発見した。各変異株の代謝物量を説明変数として、OPLS (Orthogonal Projection of Latent Structure) 法により寿命を目的変数とした回帰分析を行ったところ、メタボロームデータをフィンガープリントとした寿命予測が可能であることを発見した。当該寿命予測モデルを用いて高寿命酵母のメタボロームを逆予想した。当該メタボロームを達成するための形質転換戦略に基づく形質転換体で寿命延長が認められた。これで、メタボロミクスの高次表現型解析手段としての新しい可能性が示された。

さて、メタボリックフィンガープリンティングは、遺伝型の差異を解析できるだけでなく、生体のダイナミックな変動の表現方法として期待できる。そこで、モデル実験魚類であるゼブラフィッシュ (*Danio rerio*) の初期胚発生をモデルとして、高等動物のダイナミックな変動をメタボロームで表現できるかどうかを検討した。受精後時間 1 時間～48 時間のゼブラフィッシュ受精卵を発生段階毎にサンプリングし、メタボロームを観測し、発生後各時間の代謝物名を説明変数として、発生後時間 (応答変数) を PLS 回帰により予測可能であることを示した。

一方、メタボリックフィンガープリンティングは、種々の醗酵生産プロセス改善にも強力なツールとして威力を発揮する。バイオ燃料生産微生物育種は、一見、容易に達成されるかに見えるが、代謝改変戦略は、多くの場合は、期待に反する。正確な理由は不明だが、おそらく、解糖系、ペントース・リン酸経路、TCA 回路等の最重要中心代謝に直接改変を加えるため、よほど巧妙に行わないとバランスが悪くなり、微生物の生育そのものに影響を及ぼすからだと考えられる。従って、現時点では、論理的な形質転換戦略に基づき作成した形質転換体のメタボローム解析を行い、不都合箇所を発見し、第 2 の形質転換戦略を立案するといった戦術サイクルを回すことが有効だと思われる。今回、C5 糖の質化能を有さない酵母に C5 糖質化能を付与するために遺伝子を導入した形質転換酵母のメタボローム解析を例示し、メタボロミクスが、実用形質転換戦略立案／実行のナビゲータとして有用であることを示したい。

(参考文献)

1) 福岡英一郎;「メタボロミクスの定量性とデータマイニング」; ぶんせき, 2008 年 10 号, 530 頁 - 535 頁 (2008)
2) 福岡英一郎;「メタボロミクスの基礎技術開発と応用」; 生産と技術, 60 巻, 2 号, 1 頁-3 頁 (2008)
3) 福岡英一郎;『メタボロミクスの先端技術と応用』(監修: 福岡英一郎), (株) シーエムシー出版 (2007)

An application of metabolic fingerprinting for high-resolution phenotype analysis.

○Eiichiro FUKUSAKI
(Dept. Mat. Life Sci., Osaka Univ.)

Key words metabolic engineering, metabolomics, metabolome, metabolic fingerprinting