

## 生理活性ペプチドの機能解明に向けた生物有機化学的研究



産業技術総合研究所 創薬基盤研究部門 岡谷(永井)千晶

### はじめに

生体は、組織や細胞間で情報伝達を行うことによりその恒常性を維持している。その情報伝達を担う物質として最も重要な生体分子群のひとつが生理活性ペプチドである。ホルモンや神経伝達物質に代表される内在性の生理活性ペプチドは、不活性型の前駆体タンパク質から特異的酵素による切断や翻訳後修飾などのプロセシングを経て活性型となり、受容体との相互作用を介して多様な機能を発揮する。本研究において筆者は、節足動物の甲殻類血糖上昇ホルモン(CHH)族ペプチドおよび哺乳類のナトリウム利尿ペプチドを対象として、そのシグナル伝達機構やプロセシング機構の分子基盤の解明に取り組んだ。

### 1. CHH族ペプチドによる内分泌制御機構の解明を目指した受容体の同定

節足動物の一種である甲殻類において、CHH族ペプチドは、神経内分泌系の中核として、血糖値の調節、脱皮の制御、雌の卵巣成熟の制御、ストレス応答など、重要な生体制御を担う。CHH族ペプチドでは、一個体に遺伝子重複により多様化したペプチドが複数存在し、それらの生物活性も多様で重複していることが多い。このようなCHH族ペプチドの「構造類似性」と「多機能性」から、その生体制御の全容を理解するためには、各ペプチドが生体内でどのように識別されているかを明らかにする必要がある。ホルモンの識別には受容体が重要な役割を担うことから、筆者は、日本において水産業上重要な甲殻類であるクルマエビに着目し、CHH受容体の同定を目指した。

CHHの機能解析および受容体の生化学的解析のため、筆者は、天然と同一のアミノ酸配列および立体構造を有する組換えCHHの簡便な大量調製法を確立した<sup>1)</sup>。その後、組換えCHHを用いて、血糖上昇作用におけるグリコーゲン合成酵素・分解酵素の転写制御の検討<sup>2)</sup>、シグナル伝達経路におけるセカンドメッセンジャーの同定<sup>3)</sup>、標的組織の同定<sup>4)</sup>、受容体の生化学的解析<sup>5)</sup>を進めた。これらの解析から、Gタンパク質共役型受容体(GPCR)がCHH族ペプチドの受容体として機能する可能性が考えられた。クルマエビのゲノム配列が明らかになっていたなかったため、ゲノムのドラフト配列が明らかとなっていたカイコ(節足動物門昆虫類)に着目し、34種のカイコオーファン

GPCRsに対する2種類のカイコCHH族ペプチド(ITP, ITPL)の応答を解析した。その結果、3種のGPCRs(BNGR-A2, -A24, -A34)をITPおよびITPLの受容体として同定することに成功した<sup>6)</sup>。さらに、ITPL受容体として同定したBNGR-A24は、カイコの内在タキキニン関連ペプチド(TRPs)の受容体としても機能すること、また、BNGR-A24に対するTRPsとITPLの結合が競争的であることを実証した(図1)<sup>7)</sup>。

このように、CHH族ペプチドの受容体を世界に先駆けて分子同定したことにより、混沌としたCHH族ペプチドによる生体制御機構を分子レベルで理解するための大きな足掛かりができた。クルマエビなどのエビ類では、人工養殖が盛んに行われている現在でも親エビをほぼ天然に依存しているのが現状であり、人工催熟技術の確立が求められている。CHH族ペプチドは生育制御や卵黄形成制御に重要なホルモンであるため、本成果は養殖技術の発展に大きく寄与すると期待できる。また、昆虫におけるCHH族ペプチドの生理機能は限定的にしか分かっていないことから、受容体の同定により、その機能解明が飛躍的に進むと期待できる。

### 2. 心房性ナトリウム利尿ペプチド(ANP)3分子型の臨床的意義の解明を目指した個別定量系の構築

ANPは、ナトリウム利尿作用・降圧作用により心保護作用を示す循環調節ホルモンであり、心臓の心筋細胞で產生された後、血中に分泌される。ヒトANPには活性型 $\alpha$ -ANP、二量体型 $\beta$ -ANP、前駆体型proANPの3種類の分子型があり(図2)<sup>8)</sup>、通常、心筋細胞にはproANP、血中には $\alpha$ -ANPのみが存在する。しかし、心不全の発症・重症化により、心筋細胞では $\alpha$ -ANPと $\beta$ -ANPが、血中では $\beta$ -ANPとproANPが検出されるようになる。そのため、各分子型の血中濃度を定量できれば、心不全の状態把握および予後予知に役立つと期待できる。しかし、既存のANP測定系ではこれら3分子型の総和として測定しており、分子型の個別定量にはゲル濾過クロマトグラフィーなどの分離法と組み合わせる必要があった。そこで筆者は、より簡便なANP3分子型の個別定量系の構築を目指した。

高感度かつ簡便な定量のため、測定方法は96ウェルプレートでのサンドイッチ型化学発光酵素免疫測定法(CLEIA)を探

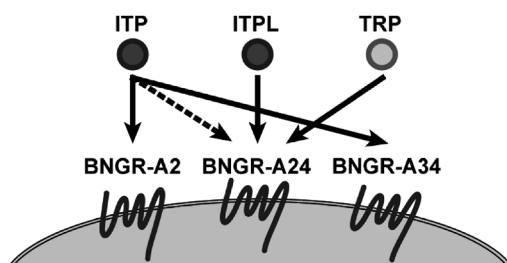


図1. カイコにおけるCHH族ペプチドの受容体の応答性

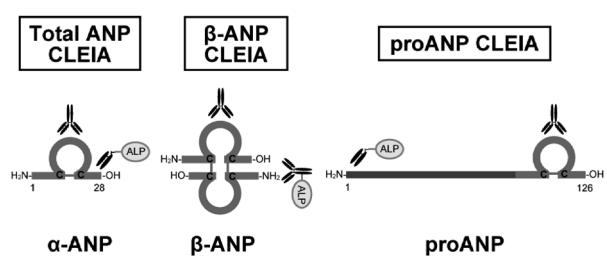


図2. ANP3分子型のCLEIAに用いたサンドイッチ抗体

用した。プロトコルの検討過程で、固相化IgG抗体のFc領域をポリエチレンギリコール鎖で修飾(PEG化)することが血液試料の直接測定に有用であることを見出し、ラット・マウスANP測定系の高感度化に役立つことを実証した<sup>9)</sup>。また、本定量系の構築にあたり、 $\beta$ -ANPおよびproANPに特異的な抗体の取得を試みた。前駆体proANPは、N末端ペプチドに特異的な抗体の使用により、活性型 $\alpha$ -ANPと容易に識別可能であった。一方、 $\beta$ -ANPは $\alpha$ -ANPの逆平行二量体であり同一のアミノ酸配列を有するため、 $\beta$ -ANP特異的抗体の作製には工夫が必要であった。そこで筆者らは、 $\alpha$ -ANPと $\beta$ -ANPの立体構造の違いに着目した。すなわち、 $\alpha$ -ANPは1対の分子内ジスルフィド結合によりペプチド主鎖が湾曲した立体構造を有する一方で、 $\beta$ -ANPは2本のペプチド鎖が分子間で架橋されており、 $\alpha$ -ANPよりも直線的でフレキシブルな構造を取り得る。この発想に基づき、非環状型ANPを抗原としたところ、 $\alpha$ -ANPと比較して $\beta$ -ANPに対し1000倍高い親和性を示すモノクローナル抗体が取得できた。以上の結果から、 $\beta$ -ANPおよびproANPが0.1pM(絶対量で5amol)まで正確に定量可能となり、総ANP( $\alpha$ -ANP+ $\beta$ -ANP+proANP)に対するCLEIAと組合せて使用することにより、ANP濃度も算出可能となった(図2)<sup>10)</sup>。

ANP各分子型の個別定量の有用性を検証するため、これら3種類のCLEIAを用いて急性非代償性心不全症例について治療経過における各ANP分子型の血漿中濃度を経時的に測定した。その結果、 $\beta$ -ANPおよびproANPは既存の心不全マーカーであるB型ナトリウム利尿ペプチド(BNP)とは異なる挙動を示し、新たな心不全マーカーとしての有用性が示唆された<sup>10)</sup>。また、ANP3分子型が定量可能となったことにより、各分子型の比活性に基づき、血中ANPの総活性量が算出可能となった。同様の手法によりBNP総活性量も併せて算出すれば、体内でのナトリウム利尿ペプチドによる心保護作用の程度を評価することが可能となり、これも重要な心不全マーカーとなると期待できる。さらに、 $\beta$ -ANPが特異的に定量できるようになったことは、ヒトでしか見られない $\beta$ -ANPの生成機序の解明に大きく寄与すると考えられる。

### 3. BNP分子型異常の分子基盤解明を目指した、不全心におけるタンパク質上糖鎖修飾変化の解析

心不全マーカーとして汎用されているBNPは、ANPと同様、心筋への圧負荷・容量負荷に応じて心筋細胞で発現し、血中に分泌され心保護作用を示す循環調節ホルモンである。この前駆体proBNPにシアル酸修飾されたムチン型O型糖鎖が付加すると、活性型へのプロセシングが阻害されることが示されている。また、慢性心不全患者ではproBNP上の糖鎖修飾が亢進し、重症化に寄与するというモデルが提唱されている。そこで筆者は、心不全モデル動物を用いて、不全心における糖鎖修飾変化の実態およびその分子基盤の解明を目指した。

高血圧性心不全モデルDahl salt-sensitiveラットの高塩食群(心不全群)と低塩食群(対照群)の左心室組織について、糖転移酵素群の遺伝子発現およびタンパク質発現を比較解析した。その結果、心不全群ではムチン型O型糖鎖の一種であるdisialyl-T(Sia $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-3[Sia $\alpha$ 2-6GalNAc] $\alpha$ -Thr/Ser)の生合成に関与する糖転移酵素群の遺伝子発現が亢進していた。一方、その生合成中間体から他の糖鎖構造への変換を担う糖転移酵素群

の発現は抑制されていた。これらの結果と一致して、心不全群ではTn(GalNAc $\alpha$ -Thr/Ser)からT(Gal $\beta$ 1-3GalNAc $\alpha$ -Thr/Ser)への変換を担うT-synthaseの酵素活性が上昇していた。また、左心室組織中のタンパク質上の糖鎖修飾変化を検討するために、レクチンアレイにより左心室組織ライセートの糖鎖プロファイルを群間で比較解析したところ、心不全群ではAmaranthus caudatusレクチン(ACA)と結合する糖タンパク質が減少していた。一方、シアリダーゼ処理した左心室組織ライセートのACAプロット解析では、心不全群においてACA結合糖タンパク質は増加した。ACAがTおよびTnを認識するがdisialyl-Tは認識しないことを考慮すると、以上の結果から、心不全状態の左心室組織ではdisialyl-Tの生合成が亢進されるとともに、他の糖鎖構造への変換は抑制されていることが示された<sup>11)</sup>。

上記の結果は、proBNPの糖鎖修飾に関するこれまでの知見と一致しており、心不全におけるBNP分子型の異常発現に寄与する分子基盤の一端を明らかにすことができた。さらに、糖鎖生合成機構およびグライコプロテオームの両サイドから心不全状態の心組織における糖鎖修飾変化に特徴があることが実証され、心不全マーカー探索において疾患関連糖鎖に注目した戦略が有効であることが示唆された。

### おわりに

本研究によって、CHH族ペプチドによる多様な生体制御機構の分子基盤の解明、および、心不全病態と関連したナトリウム利尿ペプチド異常分子型の実態およびその产生機序の解明に貢献できたと考えている。今後は、ナトリウム利尿ペプチド研究から見出されてきた、心不全における糖鎖変化に注目し、バイオマーカーや治療標的への応用展開を見据えた、心臓恒常性の破綻における糖鎖修飾の実態や意義の解明を進めていきたい。

### (引用文献)

- 1) Nagai *et al.* Peptides 30(3): 507–517 (2009).
- 2) Nagai *et al.* Gen. Comp. Endocrinol. 172(2): 293–304 (2011).
- 3) Nagai *et al.* Ann. N. Y. Acad. Sci. 1163: 478–480 (2009).
- 4) 永井千晶ほか 書籍「脱皮・变态の生物学—昆虫と甲殻類のホルモン作用の謎を追う」東海大学出版会, pp. 419–438, (2011).
- 5) Nagai-Okatani *et al.* Gen. Comp. Endocrinol. 266: 157–165 (2018).
- 6) Nagai *et al.* J. Biol. Chem. 289(46): 32166–32177 (2014).
- 7) Nagai-Okatani *et al.* PLoS One 11(6): e0156501 (2016).
- 8) Nagai-Okatani *et al.* J. Pep. Sci. 23(7–8): 486–495 (2017).
- 9) Nagai *et al.* Anal. Biochem. 461: 10–16 (2014).
- 10) Nagai-Okatani *et al.* J. Appl. Lab. Med. 1(1): 47–59 (2016).
- 11) Nagai-Okatani *et al.* PLoS One 11(6): e0150210 (2016).

**謝 辞** 本研究は、東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命化学専攻生物有機化学研究室、および国立循環器病研究センター研究所分子薬理部にて行われたものです。本研究を行う機会をくださったとともに、多大なるご指導ご鞭撻を賜りました長澤寛道先生および南野直人先生に心より厚く御礼申し上げます。また、本研究の遂行にあたり、多大なるご指導を賜りました永田晋治先生、およびご助言を賜りました大平剛先生、筒井直昭先生、片山秀和先生、馬橋(浅妻)英章先生に深く感謝いたします。最後に、本賞にご推薦くださいました浅見忠男先生に心より御礼申し上げます。