

4. ペプチドーム解析の現状と展望

佐々木 一樹, 磯山正治, 南野直人

生体に内在するペプチドは前駆体タンパク質から固有の切断や修飾を受けて生成する。プロテオーム解析でこのようなペプチドも分析可能であると考えられがちであるが、ペプチドに特化した取扱や操作を行わないとその実像はみえてこない。内在性ペプチドを対象とするペプチドーム解析は、生理活性ペプチドや疾患マーカーの探索、タンパク質の分解過程の解明に直結するもので、独自に実施しなければならない課題である。ペプチドーム解析への取り組みで少しずつ明らかになりつつある生体内ペプチドの実像と今後の展望について概説する。

はじめに

ヒトゲノム配列のうち、28.5億塩基対が99.999%の精度で決定され、遺伝子数は予想を下回る21,787程度と推定された。実在するタンパク質の総数はもとより、タンパク質から特異的切断・修飾を受けて生み出されるペプチドの総数は推測の域を超えている。その中で生理活性ペプチドの数は限定的と考えられる。哺乳類の生理活性ペプチドの3割以上がわが国の研究者の発見になることはほとんど知られていないが、生体に実在するペプチドの全貌、すなわちペプチドームの解析法確立とデータベース化はこのペプチド研究を大きく推進すると期待される。1999年度よりブタ脳ペプチドを対象にはじめたわれわれのペプチドーム解析は、マウスおよびヒトに枠を広げつつある。これまでに蓄積された情報から少しずつみえはじめた生体内ペプチドの実像と今後の可能性について概説する。

【キーワード】

ペプチドーム解析, ファクトデータベース, 内在性ペプチド, 質量分析, 二次元クロマトグラフィ

■ ペプチドとペプチドーム解析

ペプチドとタンパク質の両者を明確に区別する定義はないが、一般的にはアミノ酸が2個以上つながった分子量1万以下の物質をペプチドとよぶことが多い。ホルモン、循環調節因子、神経伝達・調節物質などとして作用する物質の多くはペプチドである。これらの生理活性ペプチドは、前駆体タンパク質へと翻訳された後にプロセッシングや修飾を受けてはじめて機能を発揮する。例えば、甲状腺ホルモン放出ホルモン (TRH: thyrotropin-releasing hormone) はわずか3つのアミノ酸で構成され、分子の両端に翻訳後修飾を受けている。このほかに、タンパク質の限定分解や代謝的分解の結果、生理活性ペプチドを圧倒する多種多量のペプチドが細胞の内外に存在する。限定分解で生じるペプチドとしてはフィブリノペプチド、プロテアーゼ活性化時のプロペプチドなどがよく知られている。生体内に存在するペプチドの全貌、すなわちペプチドームの実態はこれまで不明であった。実験結果や測定値などを構造化して収納し、効率的な検索を可能としたデータベースはファクトデータベースとよばれ、

Peptidomics — status quo and perspectives

Kazuki Sasaki¹⁾/Masaharu Isoyama²⁾/Naoto Minamino¹⁾: Department of Pharmacology, National Cardiovascular Center Research Institute¹⁾/Information Department, Protein Research Foundation²⁾ (国立循環器病センター研究所薬理部¹⁾/蛋白質研究奨励会情報管理室²⁾)

高精度なデータを入手できればその価値は将来も減少せず、情報基盤としての波及効果は非常に大きい。プロテオーム解析では、発現解析から相互作用、立体構造までを含めた研究が推進されているが、ペプチドーム解析では「実在するペプチド分子型のありさま」を記述し、生理活性ペプチドの発見の効率化や、タンパク質の代謝分解過程の情報収集が当面の課題である。

② ペプチドーム解析は可能か？

ペプチドはタンパク質と同様に取扱・分析できると考えられやすいが、現在のプロテオーム解析法はペプチドーム解析には適していない。第1に、ペプチドはプロテオーム解析で繁用されるゲル電気泳動では分離が困難であること、第2に、多くの生理活性ペプチドは分子内に塩基性アミノ酸を含むため、通常のプロテオーム解析で実施される酵素消化によって同定が不可能になること、第3に、生理活性ペプチドの組織濃度や含量がタンパク質と比較して圧倒的に少ない（重量比でペプチドはタンパク質の0.1%以下）ことがあげられる。また、分析上の問題点として、試料の抽出操作時にタンパク質分解が起きる結果、多数の分解ペプチドが生じ、内在性のペプチドと判別不能になるからである。このため、ペプチドーム解析は非現実的とみなされ、限定的な試みしか行われていなかった¹⁾。われわれはこれらの問題点を克服しつつ、生体内に存在するペプチド情報を網羅的に収集するファクトデータベースの構築を1999年度より開始した^{2)~4)}。近年発見されたグレリンにおけるセリン残基のオクタノイル化修飾のように、生理活性ペプチドの活性発現には翻訳後修飾が必須である場合が多い⁵⁾。このような翻訳後修飾はゲノム構造からは決して予測しえず、生体内に存在するペプチドの構造情報を包括的に獲得するアプローチの価値は減弱しない。哺乳類では分解ペプチドが多量に存在するため、ペプチドーム解析による新規生理活性ペプチドの発見は困難が予想されたが、解析法の改良に伴って具体的成果が得られはじめている。

③ ペプチドームのプロファイリング法

われわれはタンパク質分解酵素を熱処理で失活させた後にペプチドの抽出を行うことにより、多くの活性ペプチドを内在する形で精製してきた^{6) 7)}。抽出操作の後、逆相および陽イオン交換樹脂を利用してタンパ

ク質、塩、糖、核酸、アミン類を効率的に除去し、ペプチド画分を短時間で回収している。この「粗ペプチド画分」に残存するタンパク質をゲル濾過で除去し、得られる分子量6,000以下の画分を現在の解析対象としている。

ペプチドのプロファイリングには、一次元目に陽イオン交換HPLC (70画分)、二次元目に逆相HPLC (75画分)を用いる二次元クロマトを行い、全体を約5,000画分に分割している(図1)。各画分の一部をマトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型(MALDI-TOF)質量分析計で分析する。ペプチドの構造解析は、エレクトロスプレーイオン化四重極飛行時間型(ESI-Q-TOF)^{*1}とMALDI-TOF-TOF^{*2, 3}のタンデム質量分析計で行う。ゲノム情報が蓄積されている生物種では、親イオンの質量と構造情報取得に十分なフラグメントイオンが得られれば同定はさほど困難ではない。しかし、糖ペプチドのように修飾構造を含む場合は構造決定のために分析試料を増やし、追

※1 Q-TOF (Quadrupole time-of-flight mass spectrometer : 四重極飛行時間型質量分析計)

分析部に四重極と飛行管を垂直に連結した質量分析計。イオン化した試料を四重極質量分析計で分離した後、ペプチド鎖を開裂させ、飛行管型質量分析計で詳細な構造解析が実施できるタンデム質量分析装置である。後述のMALDI-TOF-TOFと並びプロテオミクス研究で用いられる代表的な質量分析計である。

※2 MALDI-TOF (Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometer : マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析計)

イオン源にはマトリックス支援レーザー脱離イオン化法を採用し、分析部に飛行時間型質量分析計を搭載した装置。本イオン化法は飛行時間型質量分析計との適合性がよく感度が高いため初期から実用化され、操作も比較的容易であることから質量測定に繁用される。反射電場を備えた装置では構造解析も可能であるが、詳細な構造解析は困難である。

※3 MALDI-TOF-TOF (Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight/time-of-flight mass spectrometer : マトリックス支援レーザー脱離イオン化二重連結型飛行時間型質量分析計)

イオン化にはMALDI法(マトリックス支援レーザー脱離イオン化法)を用い、分析部には飛行時間型質量分析計をタンデムに2つ連結した装置。1つの質量分析計で分離後ペプチド鎖を開裂させ、2段階目の質量分析計で構造を詳細に解析する。MALDI法による従来の構造情報解析法では困難であった分解能と質量精度の達成が可能になり、ハイスループットな構造解析に適している。

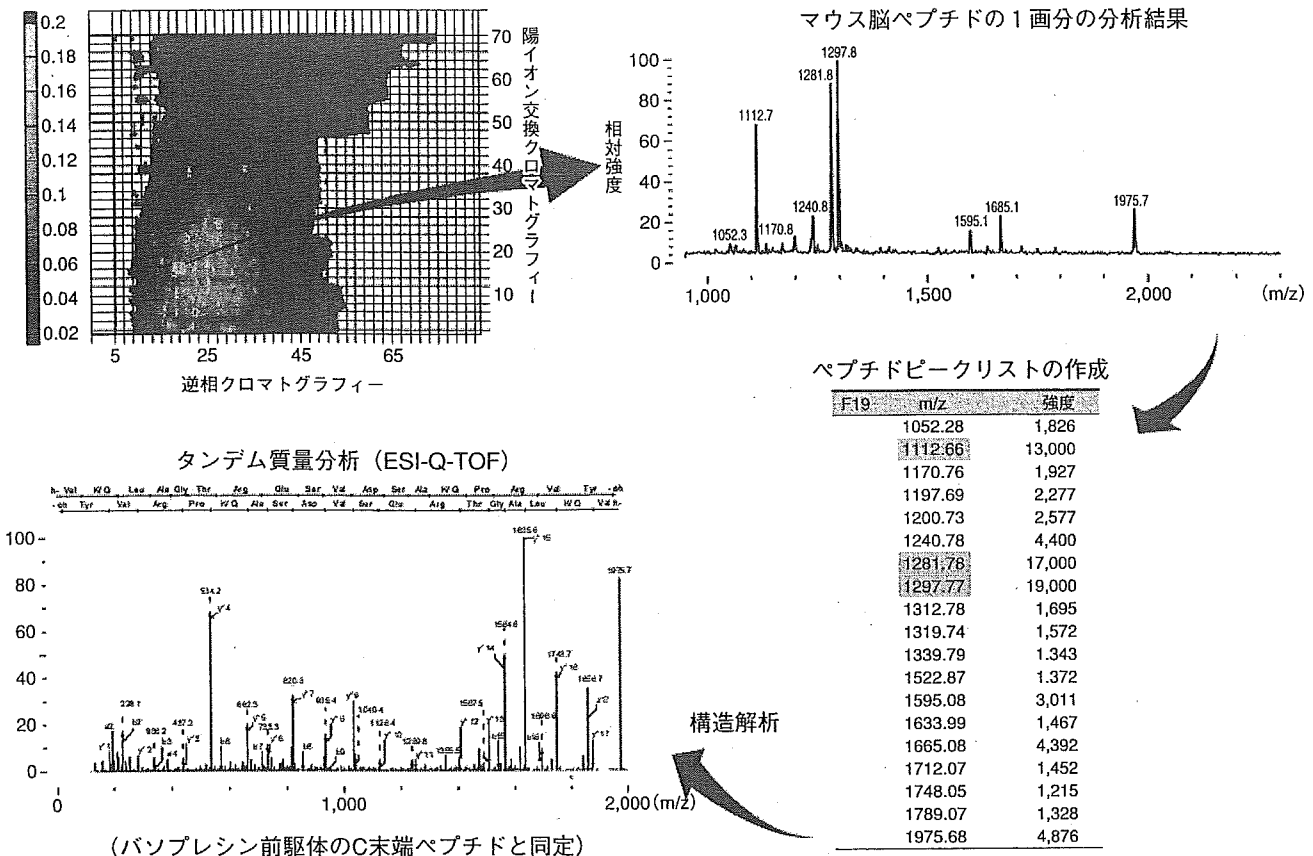


図1 ペプチドームのプロファイリング方法

二次元HPLCにより約5,000に分けられた画分(左上)は、質量分析によってペプチドの数と分子量が測定され(右)、次にタンデム質量分析により構造が決定され(左下)、データベースに登録される(文献18より引用改変)

加の生化学的操作が必要である。ただし、いったんデータベースが構築されると、物性と分子量の情報から標的ペプチドの大部分は容易に同定できる。

この方法は二次元HPLCを用いるため、溶媒、カラム、流速などについて条件を決め、機器や溶媒ごとに得られたデータの補正、標準化が必要である。われわれはイオン交換HPLC、逆相HPLCについて標準ペプチドが溶出される塩濃度、アセトニトリル濃度を基準として補正、標準化を行っている。分析条件が標準化されると、基本的には研究室間でもデータの比較検討が可能となる。質量分析法による構造解析アルゴリズムの改良、実験情報管理システム(LIMS: laboratory information management system)の開発も共同研究によって実施している^{8) 9)}。

4 ペプチドーム解析の現状と可能性

われわれはブタおよびマウス脳組織についてペプチドーム解析を開始したが、これはこれまでに多数の生

理活性ペプチドをブタ脳組織より発見したため、またマウスについてはゲノム情報が蓄積されていたためである³⁾。二次元HPLCは分子量6,000までのペプチド分離に適するよう条件を設定しており、既知の生理活性ペプチドは全体に広く溶出する(図2)。図1は、マウス脳の分子量3,000以下のペプチドを示したもので、二次元HPLC上の電荷や疎水性の低い部分に多くのペプチドが溶出している。分離した5,000画分の1つのMALDI-TOF質量分析計による分析結果を図1右上に示すが、ここで観測されるピークについて、そのm/z値と強度(イオンカウント)を整理するとピークリストが作成できる。順次、タンデム質量分析を行い、データベース検索より構造を推定する。このような結果を5,000画分についてまとめ、分子量、疎水性、電荷を座標軸とする仮想的な三次元空間に表示すると、図3のようにペプチドを視覚的に把握できる。各点はペプチドを、大きさは質量分析でのイオンカウントを示し、後者はペプチド量と大まかに相関する。こ

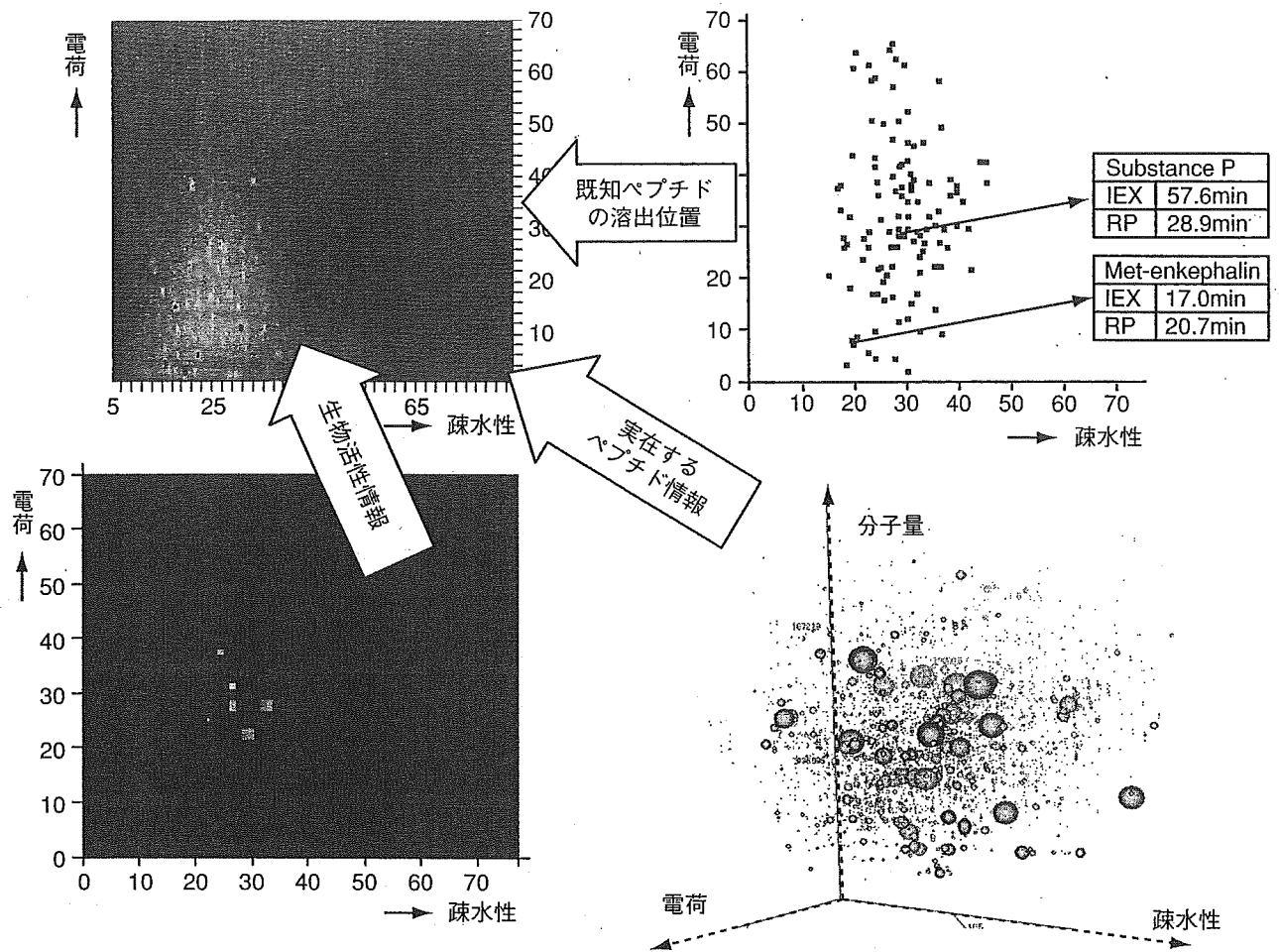


図2 ペプチドーム・データベースにおける各種情報の集積

ペプチドーム・データベースでは規格化された二次元HPLCで分離されたペプチド試料を以後の分析に使用するため、この二次元HPLCを共通のプラットフォームとしてすべての情報を集積でき、比較、検索だけでなく、研究グループ間での情報の交換も可能である。この図は、生物活性情報、実在するペプチドの情報、既知生理活性ペプチドの溶出位置情報が集積され、新規活性ペプチド探索に利用可能なことを示す（文献18より引用改変）

この図はマウス脳に存在する分子量3,000以下のペプチドを量の多い順に4,000個表示したものと見える。公開を開始したweb上では、各点をクリックすると分子量、疎水性、電荷のほか、アミノ酸配列、前駆体名やペプチドの位置、活性の有無、分類、作用、受容体、分布、局在などの情報が表示され、他のデータベースや文献情報へのリンクが可能となる（現在は一部のみ可能）。

物性と分子量情報の収集には、約50mgの組織より抽出したペプチドを使用している。使用する質量分析計の感度を考えると、組織濃度1 pmol/g程度のペプチドまで検出されると見積もられる。タンデム質量分析による構造情報の取得では数百fmol以上のペプチドを使用するため、組織濃度1 pmol/gとして1g程度の組織が必要である。脳ペプチドの解析より、実際

に1~2gの組織で10,000~20,000ペプチドの検出、3,000~5,000ペプチドの構造情報が入手できると推定している。

図4にこれまでに同定されたマウス脳ペプチドについて、その由来タンパク質の内訳を示した。同定されたペプチドの約8%は、ホルモンや生理活性ペプチドの前駆体由来であった。また、約7%は神経や内分泌細胞の分泌顆粒中に多く含まれるタンパク質由来で、約8%は分泌タンパク質由来であった。これら以外の約75%は細胞内や細胞膜に多量に含まれる構造タンパク質やエネルギー代謝系酵素類由来のペプチドである。これらを細胞内の局在に従って分類すると、細胞質由来タンパク質が約35%、細胞膜、ミトコンドリア、細胞内情報伝達、核のタンパク質がそれぞれ6~8%、神経細胞特異的なタンパク質が4%、

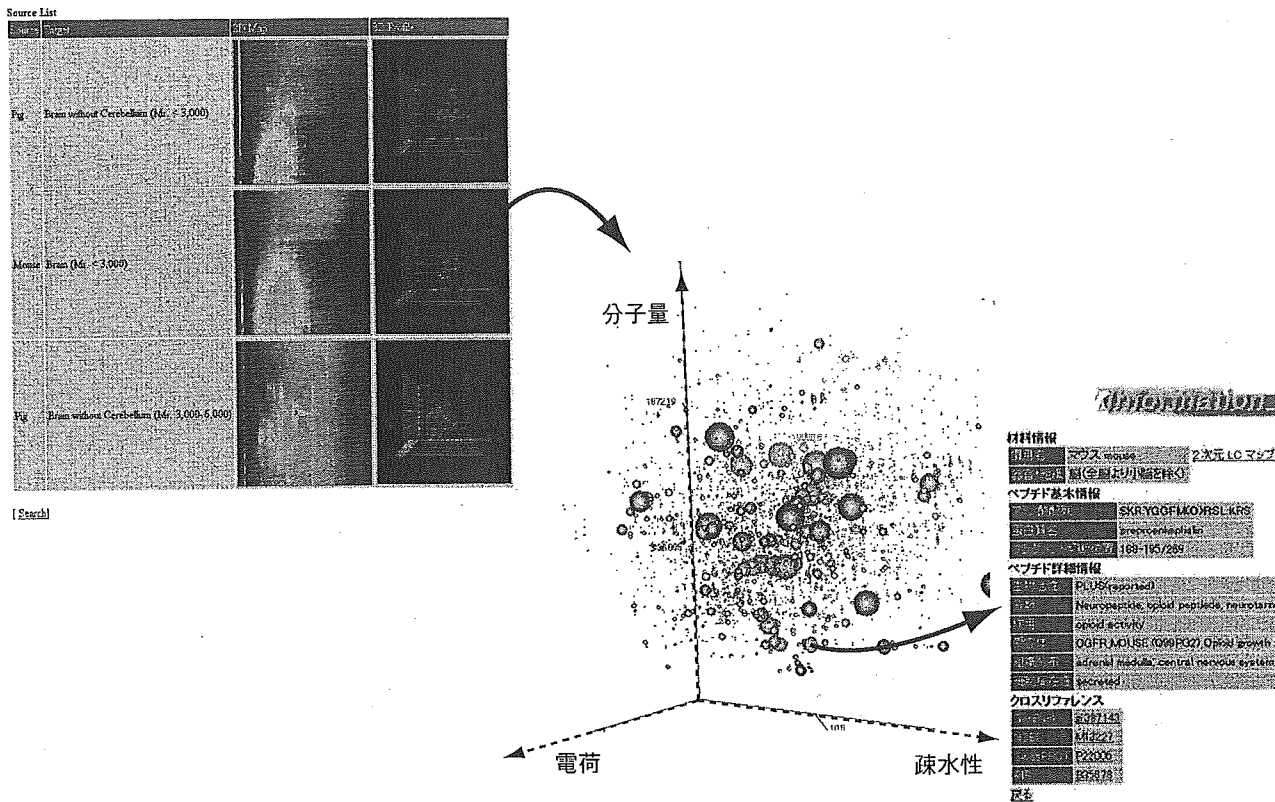
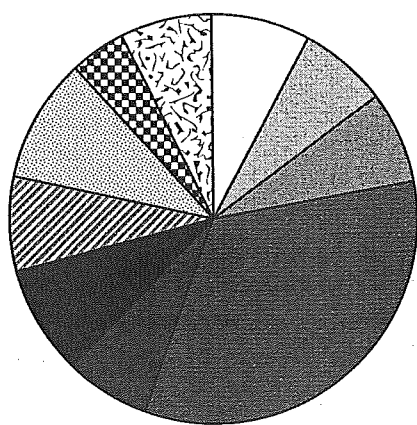


図3 仮想的三次元空間（疎水性，電荷，分子量）に表示した約4,000個のマウス脳ペプチド。各点がペプチドを示し，その大きさはイオンカウントを示し存在量とほぼ相関する。各点をクリックするとそのペプチドに関する情報が表示される。この図は分子量3,000以下のペプチドデータで，これに分子量3,000～6,000までのデータを加えると，マウス脳内ペプチド全体が概観できる（文献18より引用改変）（表紙参照）



<input type="checkbox"/>	ホルモン・生理活性ペプチド前駆体
<input checked="" type="checkbox"/>	分泌顆粒含有タンパク質
<input checked="" type="checkbox"/>	分泌タンパク質
<input checked="" type="checkbox"/>	細胞質タンパク質
<input checked="" type="checkbox"/>	細胞膜タンパク質
<input checked="" type="checkbox"/>	ミトコンドリアタンパク質
<input checked="" type="checkbox"/>	情報伝達系タンパク質
<input checked="" type="checkbox"/>	核タンパク質
<input checked="" type="checkbox"/>	脳・神経特異的タンパク質
<input checked="" type="checkbox"/>	その他

図4 マウス脳で同定されたペプチドの由来するタンパク質の内訳。分子量3,000以下のペプチド画分の解析結果に基づく。

ヘモグロビンなどが残りの7%となっている。細胞内にはタンパク質の代謝的分解に由来するペプチドが多数含まれることから，これらの数値はほぼ妥当なものと考えている。図5に示すように，ペプチドホルモン

前駆体由来するペプチドの大部分は，プロホルモン変換酵素（PC：prohormone convertase）やFurinにより塩基性アミノ酸対で切断を受け生成していた。しかし，単一アルギニン残基C末端側での切断もかな

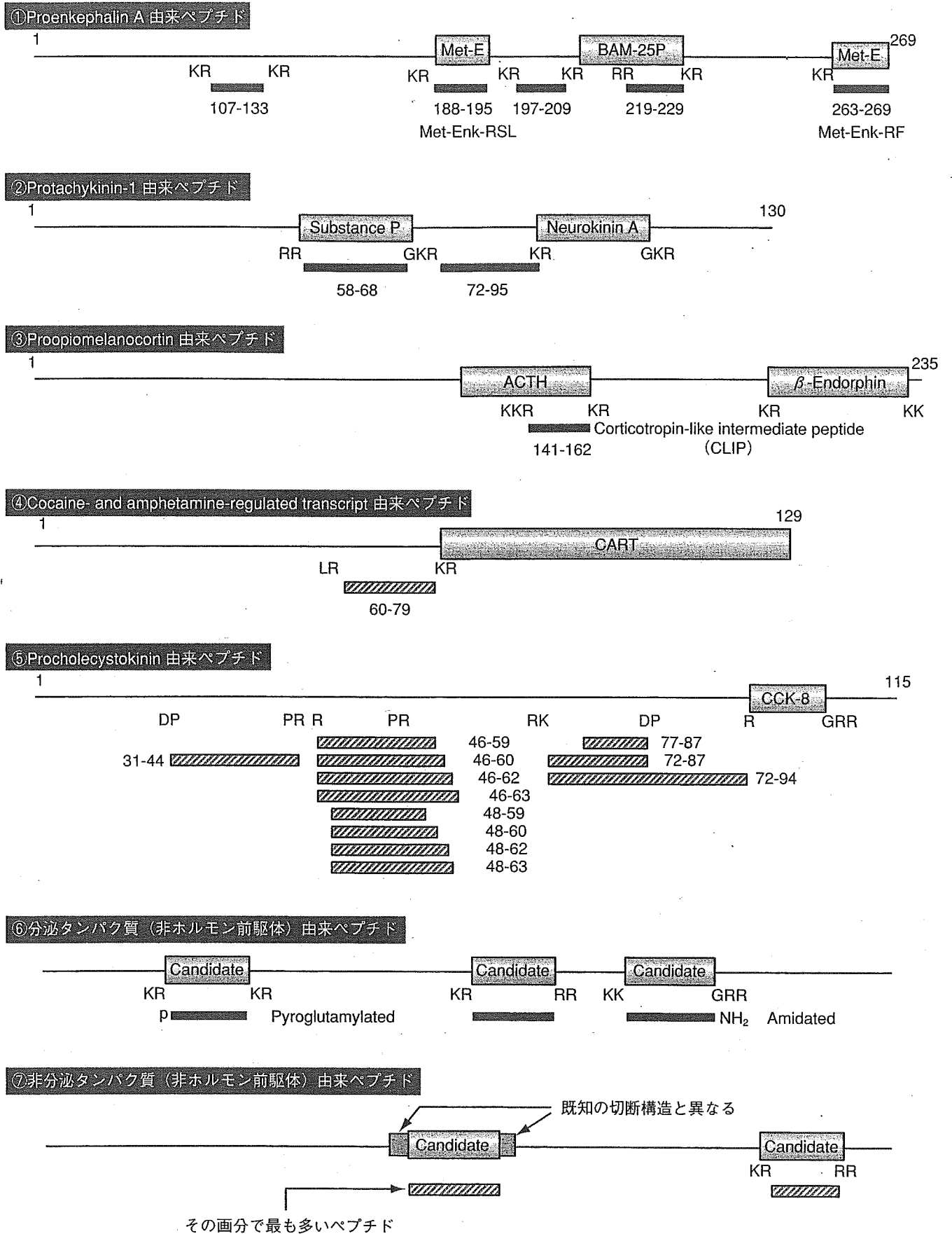


図5 マウス脳で同定されたペプチドと前駆体タンパク質との関係
 ①～⑤はホルモン前駆体由来するペプチドの実例、⑥と⑦は解析結果に基づき作成した非ホルモン前駆体の分泌タンパク質と非分泌タンパク質の仮想的プロセッシング例を示す。前駆体の下側の棒は同定したペプチドを示し、**■**は典型的なプロセッシング、**▨**は非典型的なプロセッシングにより生成すると考えられる

りの頻度で観測されている。また、ホルモン前駆体とは想定されていないタンパク質でも、PCや他のプロセシング酵素により切断を受けたと考えられるペプチドが検出されている。これらの一部は能動的に生成され未知の機能を担う可能性があるため、抗体などを用いた選択的切断と内在性の確認、合成ペプチドを用いた生物活性の同定が次の関門である。ペプチドーム解析で見出された非ホルモン前駆体タンパク質由来ペプチドにある程度の頻度で生理活性が検出できれば、ホルモン前駆体に対する概念の再考も必要となりうる。将来的には本データベースにプロセシング酵素（タンパク質分解酵素）情報なども収録し、より利用価値を高めていきたい。

データベース構築の主要な目的は、ペプチド情報を総合的に収集し新規活性ペプチドの発見を促進することである。ブタ脳については、二次元HPLCで分離した各画分について生物活性情報も収集している。図2には、神経芽腫細胞株の細胞内Ca²⁺濃度上昇活性と、既知の活性ペプチドの溶出位置（座標）を示した。二次元HPLC上で観測された生物活性陽性の画分と既知の生理活性ペプチド溶出位置の比較より、生物活性と既知ペプチドの関連をかなり明確に推測できる。図2の細胞内Ca²⁺濃度上昇活性の場合、5つの活性はサブスタンスPとN末端2残基が欠如したペプチド、それらのメチオニン酸化物とニューロテンシンに由来していた。カルシトニン受容体刺激ペプチド（CRSP：calcitonin receptor-stimulating peptide）も、類似の二次元クロマト上で既知ペプチドに一致しない活性画分より精製に成功したものである¹⁰。オーファン受容体の検出系と組み合わせたリガンド探索も可能で、モデル実験としてノシセプチンを同定した¹¹。

厄介者の分解ペプチドも有効利用できる道がある。分泌ペプチドで安定な分子は、疾患マーカーとして利用できる可能性がある¹²。また、データベースから1つのタンパク質に由来するペプチドを整理すると、そのタンパク質の代謝分解経路がわかる可能性が高い。ホルモン前駆体の場合、塩基性アミノ酸対の両側で切断される事例が多いが、非典型的な切断部位はゲノム構造からは予測できない。例えば、ヒト試料の解析データより特異的変換酵素によるエンドセリンの切断部位も浮かび上がってくる。ペプチドホルモンは一般に血中半減期が短い、分解酵素が同定されれば阻害剤

の投与により活性ペプチドの濃度を維持することができ。例えば、ナトリウム利尿ペプチド、ブラジキニンなどは、細胞膜結合型タンパク質分解酵素のNEP（neutral endopeptidase）で主に分解される¹³。NEP阻害剤を投与すると、これらの降圧性ペプチドの血中半減期が延長し、血圧を低下させることが可能となる。残念ながらNEP阻害剤は治験段階で副作用が見出されたが、タンパク質分解経路の推定も本データベースの利用法の1つである。

5 世界のペプチド解析の流れ

プロテオーム解析は世界各国でいっせいに開始されているが、ペプチドーム解析を行っている施設は非常に少ない。データベース化を視野に入れて実際のデータ収集を行っているのはドイツのバイオビジョン社である。キャピラリー逆相HPLCとMALDI-TOF質量分析計を活用し、再現性の高く高感度なシステムを構築しており、ヒト体液中の分子量2万までのペプチドと低分子量タンパク質の解析を進めている¹⁴。疾患マーカーの探索、薬剤によるペプチド変動、モデル動物のペプチド解析などを実施しており、先日開催された大阪大学蛋白質研究所国際シンポジウムでは糖負荷によって血中インスリンが検出可能となることを報告している。

ウプサラ大学のアンドレンらは、神経変性疾患モデルマウスにおける脳内ペプチドの解析を行っている。ラットやマウス脳を局所的にマイクロウェーブで急速に温度上昇させてタンパク質分解酵素を瞬時に不活性化し、1mgの視床下部より550ペプチドを検出している¹⁵。ペプチドの表示は、アマシャム社とプロテオームの表示法を改良し、逆相HPLCの保持時間を横軸、質量を縦軸とする二次元表示法、イオンカウントを加えた三次元表示法などを作成し、視覚的な認識を可能としている。そのほかに非哺乳類のペプチドーム解析の事例として、国立遺伝学研究所のヒドラ¹⁶、欧州での昆虫の側心体の解析¹⁷などが知られている。2004年1月には、ペプチドームに関する国際シンポジウムがわが国ではじめて開催された⁴。今後は、ペプチドーム解析で得られた新規生理活性ペプチドの機能解析を進めるとともに、ペプチドーム用情報収集、解析システムを広く提供して、ペプチドームの概念を世界標準へと成長させたいと考えている。

おわりに

本プロジェクトは科学技術振興調整費知的基盤研究により実施してきたもので、共同して提案・実施してきた大阪大学蛋白質研究所・高尾敏文教授に厚くお礼を申し上げます。データベース (<http://www.peptidome.org>) のホームページでは、マウス、ブタ脳の情報を掲示しているが、情報が限られており、今後その質、量の向上に努めたい。幅広い研究に利用可能なデータベースとするため、ご意見、ご批判を頂ければ幸いである。

文献

- 1) Seiler, P. et al.: J. Chromatogr. A, 852 : 273-283, 1999
- 2) 南野直人: 蛋白質核酸酵素, 46 : 1510-1517, 2001
- 3) Minamino, N. et al.: J. Chromatogr. B, 792 : 33-48, 2003
- 4) <http://www.peptidome.org>
- 5) Kojima, M. et al.: Nature, 402 : 656-660, 1999
- 6) Sudoh, T. et al.: Nature, 332 : 78-81, 1988
- 7) 南野直人 他: 『シグナル伝達実験法』(宇井理生/編), pp.23-34, 羊土社, 1996
- 8) Fernandez-de-Cossio, J. et al.: Nucleic Acids Res., 32 (Web Server issue) : W674-W678, 2004
- 9) Fernandez-de-Cossio, J. et al.: Rapid Commun. Mass Spectrom., 18 : 2465-2472, 2004
- 10) Katafuchi, T. et al.: J. Biol. Chem., 278 : 12046-12054, 2003
- 11) Takeda, S. et al.: J. Biochem. (Tokyo), 135 : 597-604, 2004
- 12) Sasaki, K. et al.: Cancer Res., 62 : 4894-4898, 2002
- 13) Kubota, E. et al.: Essays Biochem., 38 : 129-139, 2002
- 14) Schulz-Knappe, P. et al.: Comb. Chem. High Throu. Screen, 4 : 207-217, 2001
- 15) Svensson, M. et al.: J. Proteome Res., 2 : 213-219, 2003
- 16) <http://www.nig.ac.jp/labs/OntoGen/PEPTIDE.html>
- 17) Schoofs, L. et al.: Brief Funct. Genomic Proteomic., 2 : 114-120, 2003
- 18) 南野直人: ファルマシア, 39 (12) : 1157-1162, 2003

<著者プロフィール>

佐々木 一樹: 1990年東京大学医学部医学科卒業。'97年国立がんセンター研究所細胞増殖因子研究部室長。2004年より国立循環器病センター研究所薬理部室長。

E-mail : ksasaki@ri.ncvc.go.jp

磯山正治: 1984年大阪大学理学部生物学科卒業。'89年より蛋白質研究奨励会情報室勤務。'94年より情報管理室長。

E-mail : isoyama@prf.or.jp

南野直人: 1976年大阪大学理学部化学科卒業。長崎大学医学部、宮崎医科大学助手を経て'89年より国立循環器病センター研究所室長。2002年より現職。松尾壽之先生の指導の下、ペプチド探索研究を開始。最近はペプチドーム・データベースの構築研究を推進。

E-mail : minamino@ri.ncvc.go.jp

分子心血管病

別刷

発行：株式会社 先端医学社
〒103-0007 東京都中央区日本橋浜町 2-17-8 浜町花長ビル

循環器病学におけるペプチドミクス

佐々木一樹*, 南野直人*

SASAKI Kazuki, MINAMINO Naoto

*国立循環器病センター研究所薬理部

SUMMARY

生理活性ペプチドは循環器疾患の創薬、診断法のシーズとしての有用性が認識されている。ゲノム配列が明らかになった現在も未知の生理活性ペプチドの発見が期待されている。ペプチドミクスは生理活性ペプチドをはじめとした生体に内在するペプチドを包括的に理解するための新しい領域で、現状では発現解析法の確立に主眼が置かれている。新規生理活性ペプチドを発見するためには内在ペプチドの同定が必須であり、それはプロテオミクスでは現実的には不可能である。新規ペプチド発見の新しいアプローチとしてペプチドミクスが市民権を得る時代が到来しようとしている。

POINTS

- 循環器疾患の診断・治療法開発のうえでペプチドは今後も有望である。
- ペプチドミクスは、生理活性ペプチド等の生体内に存在するペプチドを対象にする。
- プロテオミクスの手法ではこのようなペプチドは分析できない。
- ペプチドミクスは新規生理活性ペプチド探索の新しいアプローチを提供する。

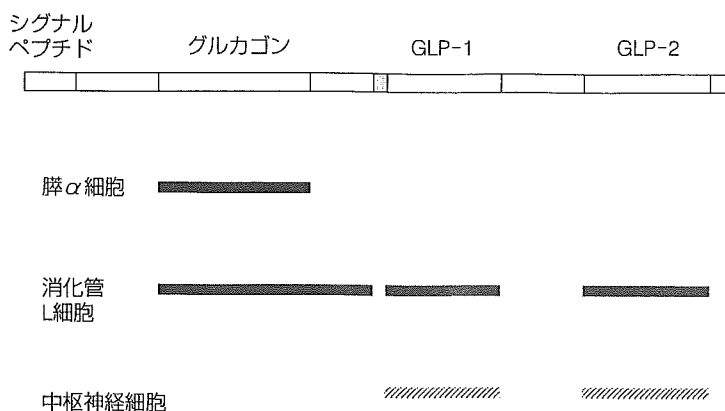
KEY WORDS

ペプチドミクス, 発現解析, 生理活性ペプチド, 疾患マーカー

はじめに

循環器系の調節因子として、アンジオテンシン、ナトリウム利尿ペプチド類、エンドセリン、アドレノメデュリン (AM) などを標的にした診断・治療法が開発されている。これらは分子量 1 万以下の小さな蛋白質、すなわちペプチドとよばれる。ペプチドミクスは、生理活性ペプチドをはじめとした生体に内在するペプチドの体系的な解析に関する技術の総称で、循環器病の領域では新規

生理活性ペプチドの探索に貢献しうる。内在ペプチドの解析はプロテオミクスでは盲点になっており、本稿ではプロテオミクスとの差異について言及しながら、発現解析のツールとしてのペプチドミクスについて解説するとともに、低分子量蛋白質・ペプチド性の疾患マーカー探索の試みについても紹介する。



図① 生理活性ペプチドのプロセッシングの多様性
 グルカゴンの事例, GLP: Glucagon-like peptide
 (筆者作成)

本稿で用いる言葉の定義

ペプチドと蛋白質を区別する明解な定義はないが、一般にはゲル電気泳動で分離、検出されにくい分子量1万以下のアミノ酸のポリマーをペプチドと称する。ペプチドミクスは生体に内在するペプチドの体系的な解析に関する技術で、発現プロテオミクスが対象にしている蛋白質の酵素消化に由来するペプチドは除外される。また、ある系に存在する蛋白質全体をプロテオームと称し、それに対応してペプチド全体をペプチドームと称する。

生体内にどんなペプチドが存在するか

筆者ら^{1)~3)}は1999年よりブタ脳を対象にペプチドーム解析を開始した。その結果から推定すると、体内に存在するペプチドの大部分は蛋白質の代謝過程で生じる分解ペプチドであると予想される。そのなかに、「積極的な存在意義」をもったペプチドが微量ながら存在している。医学の立場からは後者、すなわち、特定のアミノ酸配列を認識するプロテアーゼによる切断（プロセッシング）に伴って生成するペプチドに興味もたれる。たとえば、酵素前駆体が活性型に変換される際に随伴して切り出されるプロペプチドや、ペプチドホルモンなどとして知られる生理活性ペプチド、あるいは免疫系細胞のプロテアソームで分解されて主要組織適合性抗原と複合体を形成し抗原提示される10残基程度からなるペプチドなどで

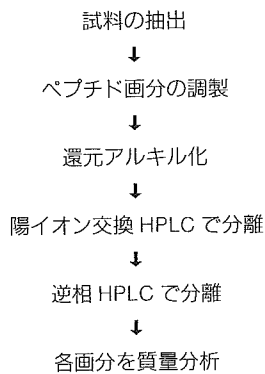
ある。

なかでも、ナトリウム利尿ペプチドやエンドセリンなどの生理活性ペプチドは循環器病の領域で注目される。生理活性ペプチドは、前駆体蛋白質から翻訳された後に、特定のアミノ酸配列を認識するプロテアーゼで切り出されて生じる。そして、特有の翻訳後修飾を伴うことが多く、ほとんどの事例で、その翻訳後修飾が生理活性の発現に必須である。たとえば、強力な摂食亢進作用以外に、重症心不全に対する心機能改善効果を有するグレリンはそのセリン残基がオクタン酸エステル化されており、血管拡張作用や心筋梗塞後の組織保護作用を示すAMは分子内環状構造とアミド化構造を有する。ゲノム情報のみではこのような翻訳後修飾や、組織ごとに異なるプロセッシングパターン（図①）は予測できず、構造解析も含めた発現解析の重要性を示している。したがって、ヒトでゲノム構造がほぼ明らかになったとはいえ、未知の生理活性ペプチドが今後も多数発見されると予想される。

ペプチドミクスとは

ペプチドミクスについて説明する前に、プロテオミクスについて簡単に言及する。これは蛋白質の個別研究ではなく、特定の系に存在する全蛋白質を対象にした発現解析や、構造と機能の相関を体系的に解析するための諸技術を示す言葉である。

一方で、ペプチドミクスは言葉自体が新しく、プロテ



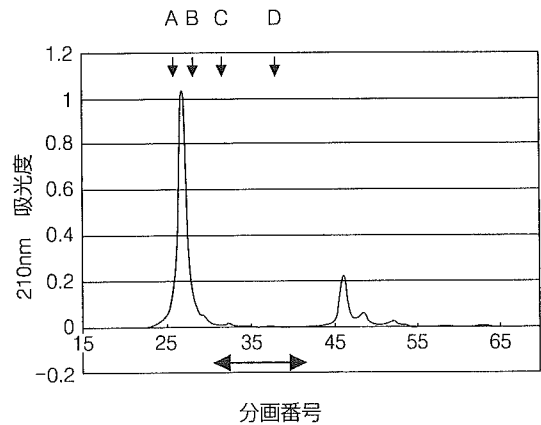
図② ペプチドミクスを用いる発現解析の流れ
(筆者作成)

オミクスと同一視されやすい。現在は内在ペプチドの発現解析がペプチドミクスの最も大きな課題であり、生理活性ペプチドの新しい探索法として今後が期待されている。発現解析の流れを図②に示す。試料ペプチドを高速液体クロマトグラフィ (high performance liquid chromatography: HPLC) で分離し、各分画の質量分析をおこない、含有されるペプチドの一次構造決定はタンデム質量分析とよばれる手法で進めていく。質量分析計および周辺技術の発展がペプチドミクスの中核をなしている。

ペプチドミクスとプロテオミクスの相違点

発現解析の領域に限定すると、プロテオミクスとペプチドミクスの端的な違いは、ペプチドミクスでは①分析試料から蛋白質成分を分離除去する、②分析試料は酵素消化を実施しない、の2点にある。

まず、①の背景について述べる。生物試料に含まれるペプチド総量は、蛋白質総量にくらべて非常に少ない。ブタ脳組織を対象とした筆者らの解析では、ペプチド画分の総重量は蛋白質画分の0.1%程度であった。ほかの生物試料でも状況は同様である。図③は、細胞の培養上清の事例で、ペプチドは蛋白質にくらべて少ないことが実感される。質量分析法で検出する場合、共存成分との相対的存在量比によって、当該分子の検出は大きく左右される。したがって発現解析に際してペプチド試料への蛋白質の混入はできうるかぎり排除する必要がある。蛋



図③ 培養細胞の上清を逆相系樹脂で処理した試料のゲル濾過
両矢印の領域がペプチド画分に相当する。左側のピークは蛋白質、右側は低分子物質。縦矢印は、分子量マーカーの位置：A, 血清アルブミン (約 66,000)；B, RNase A (約 13,500)；C, 神経ペプチド Y (4,271)；D, ニューロテンシン (1,673)
(筆者作成)

白質とペプチドの分離は、ゲル濾過、電気泳動ゲルからの electroelution、限外濾過などの方法がある。

つぎに②について説明する前に、プロテオミクスで酵素消化をおこなう理由を述べる。現在の質量分析計では、分子量の制約により、蛋白質自体をタンデム質量分析できないため、酵素消化が実施される。酵素消化にはトリプシンや LysC のように塩基性アミノ酸の C 末端側で切断する酵素が用いられるが、それによって構造解析 (タンデム質量分析) 時のデータ解釈が多少容易となる。ペプチドミクスはこのような酵素消化を加えることができない。生理活性ペプチドは塩基性アミノ酸を配列中に含むため、このような酵素で切断すると、ペプチド全体の構造を同定できなくなるからである (図④)。

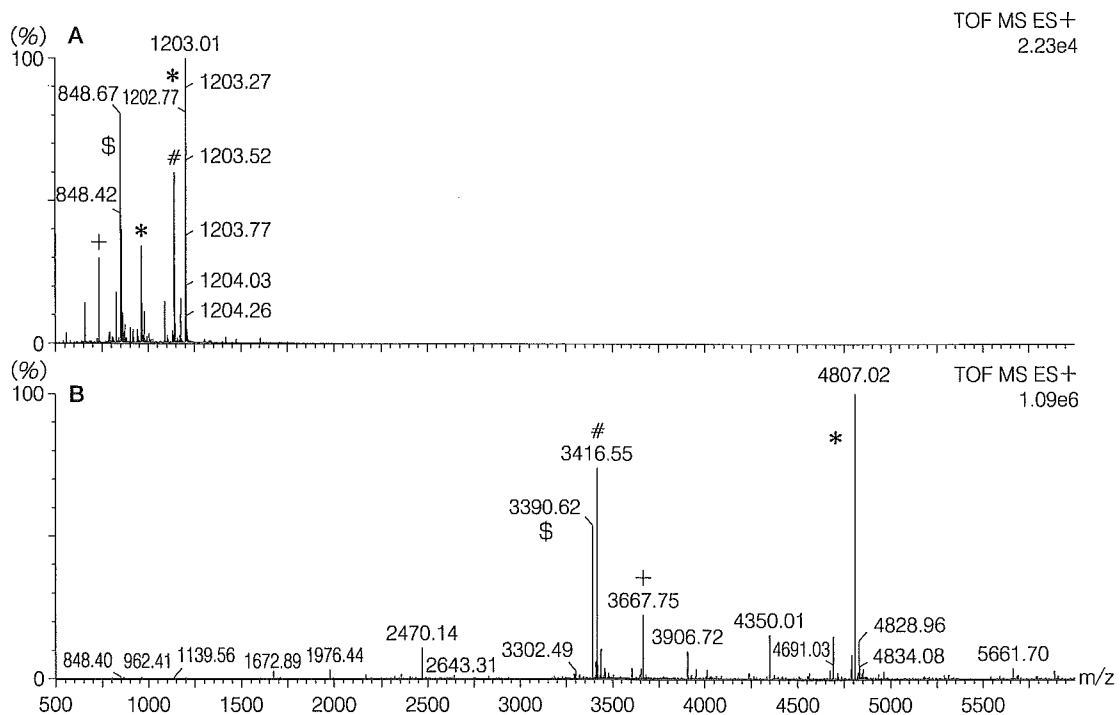
検出

前述のように、HPLC で分離された試料の質量分析がペプチドの発現解析の主要な作業を占めている。質量分析は高感度でペプチドを検出でき、ペプチドによっては 10 fmol という微量で検出可能である。しかし、これは実際の試料では実現しにくい状況である。たとえば、目的ペプチドを単一状態で 10 fmol 含む試料で良好な s/n で

[MKSIYFVAGLFVMLVQGSWQ] QDTEEKSRSLRSFSASQADPLSDPDQMNE DKRHSQGTFTSDYSKYLDSRR
 AQDFVQWLMNTRNRNNI AKRHDEFERHAEGTFTSDVSSYLEGQA AKEFI AWLVKGRRRDFPEEVAIVEEL
 GRRHADGSFSDEMNTILDNLAARDFINWLIQTKITDRK

図④ 生理活性ペプチド前駆体のアミノ酸配列

グルカゴンの事例。太文字は生理活性ペプチドとして切り出される領域。括弧内はシグナルペプチド。プロテオミクスの手法では、酵素消化が必須のため、図中の R および K の C 末端側で切断されてしまう。
 (筆者作成)



図⑤ ESI によるマスペクトルの実際

A：測定で得られるスペクトル。B：A で観測されるピークを 1 価に換算したスペクトル。たとえば、B の * 印で示したペプチドは実際に検出されるわけではなく、実際には A でみられるように 4 価、5 価イオンのみが観測されている。同様に、B で # 印で示したペプチドは 3 価イオンのみが観測されている。
 (筆者作成)

ピークが観測されたとしても、数十 pmol で別のペプチドが共存すると、目的ペプチドの検出強度が顕著に低下する。この現象はイオン抑制とよばれる。イオン抑制効果を最小限にするためには、HPLC を用いてさまざまなパラメータでペプチドを分離する必要がある。

イオン化法は、マトリックス支援レーザー脱離イオン化 (matrix assisted laser desorption/ionization: MALDI) と、エレクトロスプレーイオン化 (electrospray ionization: ESI) の 2 種類を併用すると、検出ペプチド数を増加できる。質量分析ではマスペクトルのかたち

でデータが得られ、横軸は質量電荷比 (m/z)、縦軸は相対強度を示す。一般に MALDI では 1 価のイオンが強く観察されるために、スペクトル中にどんなペプチドが検出されているか理解しやすい。一方で、ESI では多価イオンを生じるため、スペクトルは複雑になるのが難点である (図⑤)。

同定

検出されたペプチドは逐次同定していく。質量分析計

を用いる一次構造決定法がいくつかあるなかで、タンデム質量分析法が最も実用的である。タンデム質量分析法とは、目的分子をさまざまな方法で断片化させ、生成するイオン（フラグメントイオン）を質量分析して、本来の分子の構造を明らかにする方法である。ヒトのようにゲノム構造がほぼ明らかになった生物種では、タンデム質量分析法による一次構造の決定は、Edman分解およびそれに引きつづくcDNAクローニングに依存していた従来とは比較にならないほど簡便になった。たとえば、図⑥では、タンデムマススペクトル上に現れた5つのアミノ酸残基に由来するピークの質量の値、アミノ酸配列、目的ペプチドの質量の情報のみで一意的に同定されている。

タンデム質量分析による同定の実用面での最大の長所は、目的ピークが単一に精製されている必要がないことである。たとえば、図⑦の試料中には38種類のペプチドが含まれているが、生化学的な分離操作を加えずに30種類が同定された。Edman分解で問題になるN末端のブロックなどの影響も受けない。ただし、タンデム質量分析法は一種の「破壊分析」であり、目的分子が断片化しない場合や、断片化で生じるフラグメントイオンの情報が不十分な場合は同定不可能である。

ペプチドミクスによる発現解析の実際

発現解析に際しては、試料調製の成否が解析結果の質を左右する。生物試料にはプロテアーゼが多量に含まれ、抽出の過程でペプチドは分解されやすい。また、抽出の過程で蛋白質が分解すると、本来存在していた内在性ペプチドと区別が不可能になる。そこで、これらを抑制するために、組織の場合は迅速な加熱処理、凍結不可避の場合は粉末化後の煮沸、液体試料の場合は迅速な酸処理や蛋白質との分離などで、プロテアーゼを失活、除去させる。また、ジスルフィド結合で環状化した内側のアミノ酸配列情報をタンデム質量分析で得るためには、システイン残基の還元アルキル化が必須である。また、生体試料に含まれる塩類や、化学反応に用いる試薬はペプチドよりイオン化しやすく、ペプチドの検出を妨げるので質量分析前に除去する。

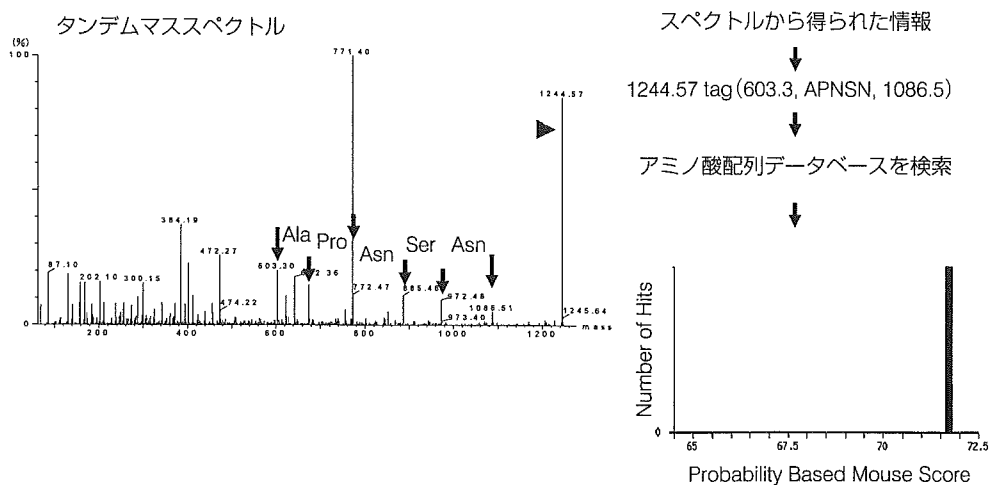
このように調製した試料中には、種類、含有量ともに

多種多様なペプチドが混合状態で存在している。これらを可能なかぎり数多く同定することが、発現解析の重要な課題となる。そのためには、原理の異なる液体クロマトグラフィを組み合わせて試料を分離する。1分画に、ある程度の高いs/nをもつペプチドが数種類のみ再現性よく分離できれば理想的であるが、ペプチドによって存在量はさまざま、その開きは優に10の6乗を超えるため、存在量が多いペプチドは複数の分画に分散する。相対的に存在量が少ないペプチドを同定するためには、もう一段階のHPLC操作を加える。現実的には、ゲル濾過で得られたペプチド画分をまとめて還元アルキル化処理をおこなった試料を引きつづきイオン交換HPLCで分離する。イオン交換HPLCの各分画を逆相HPLCで約50~100分画に分離する。

このように、原理の異なる2つのクロマトグラフィで分離することを、二次元クロマトグラフィと称する。筆者らは、マウス脳のペプチドーム解析では、脳組織0.8gより出発して、一次元目に陽イオン交換HPLC(70分画)、二次元目に逆相HPLC(75分画)、すなわち全体を約5,000分画に分割している。このときに約8,000個のペプチドを検出し、構造決定に至ったのは約1,000個だった。このようにHPLC操作を1つ加えると、解析すべき試料数は飛躍的に増加するため、現実的には、スクリーニングの「網目」をどの程度の細かさ・粗さにするかを試料ごとに検討する必要がある。

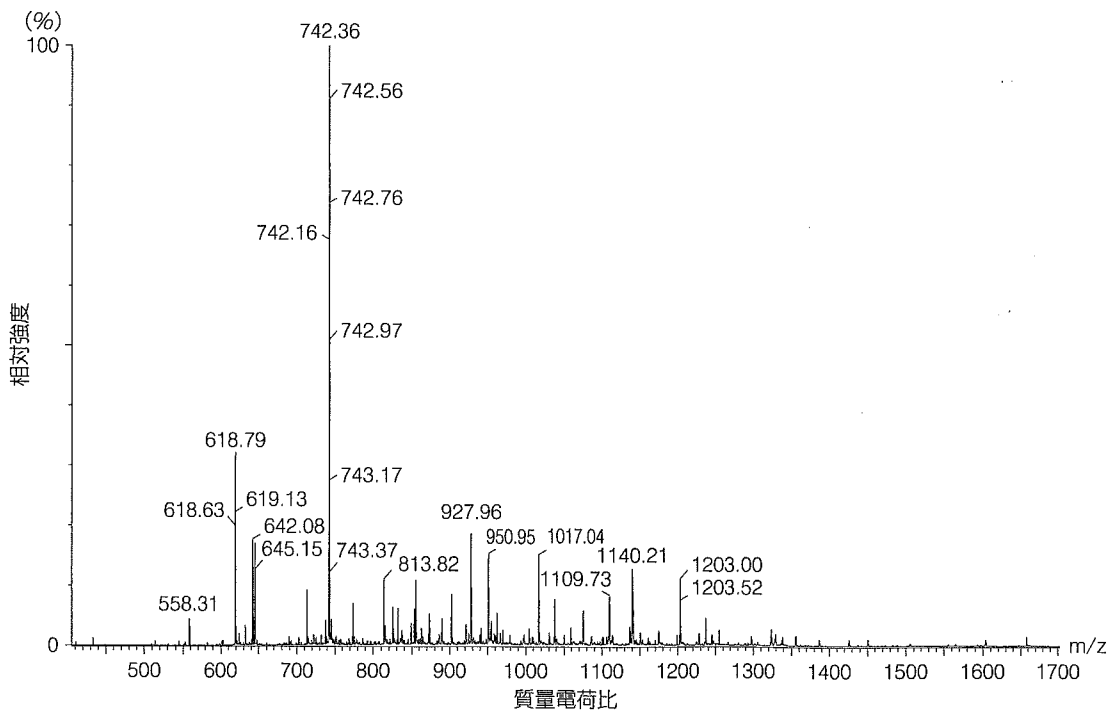
候補ペプチドの選択

同定されたペプチドのなかから、生理活性ペプチドに特徴的な翻訳後修飾、同定ペプチドに隣接するアミノ酸配列(切断酵素の認識配列)、ジスルフィド結合、アミノ酸組成をもとに、候補ペプチドを選択する。翻訳後修飾を有する候補分子の場合は、修飾構造選択的な抗体を作製する。免疫染色で当該ペプチドの分布、産生細胞を把握し、さらにそのペプチドが組織中に実在することを、放射免疫測定法(radioimmunoassay:RIA)、および組織抽出物からの免疫沈降物の質量分析で確認する。RIAは高感度で定量性にすぐれている。後者はそれらの点では劣っているが、「免疫活性」の実体を理解できる点です



1. [gi|4507243](#) Mass : 12727 Total score : 72 Peptides matched : 1
 somatostatin[Homo sapiens]
 Observed Mr (expt) Mr (calc) Delta Score Peptide
 1 1244.57 1243.56 1243.56 0.00 72 SANSNPAMAPRE

図⑥ m/z 1244.57 (矢頭) のタンデム質量分析による同定
 スペクトル上から連続した5つのアミノ酸配列を読み取り、質量の情報とともにデータベースを検索した。太文字の配列を含むペプチドとして一意的に同定された。
 (筆者作成)



図⑦ ペプチドミクスで実際に解析する試料の測定例
 質量が測定できた38種類のペプチドのうち30個はこの試料からタンデム質量分析で同定された。
 (筆者作成)

ぐれている⁴⁾。

実在を確認後に、どのような活性を有するかを検討する。特定の活性を指標に単離精製して発見されたペプチドとは異なり、この点は試行錯誤の要素が大きくなる。ただし、免疫染色で陽性となる細胞、組織の機能、あるいはその産物から、当該ペプチドの機能は推定も可能である。また、候補ペプチドについて、オーファン受容体のリガンドスクリーニングは受容体同定を考えるうえで望ましい。

上述の方法とは異なり、二次元に分離した各分画について、特定の生物活性で評価する方法も可能性はあるが、多量に存在する既知の生理活性ペプチドが複数の分画に分散すると、未知の生理活性ペプチドの活性はマスクされる可能性が強く、工夫を必要とする。候補ペプチドが循環器系に作用するか否かは、生理学的実験が必須であり、動物実験を経て、有用なペプチド候補を選択していく。

疾患マーカーの開発

最後に、低分子量蛋白質関連でとりわけ癌研究で活発に実施されている疾患マーカー探索開発について簡単に言及する。循環器疾患においても、とくに心疾患に関しては診断および治療方針の決定などに有用なマーカーの開発が望まれている。心不全の病態把握のマーカーとして血漿中BNP濃度の測定が保険適用になっており、生命予後の予知因子としても確立している。このようなマーカーがさらに発見され、複数のマーカーの測定によって個別な診断が可能になれば臨床的意義は大きい。究極的にはプアリスク群を選択可能なマーカーが発見されれば望ましい。心筋細胞から分泌あるいは逸脱してくる蛋白質やペプチドは循環血中で希釈されるため、数百 μ lの血液検体からこのようなマーカーのプロテオミクス、ペプチドミクスによる探索は現実的には困難である。

これに対して、癌の領域で提唱されたアプローチであるが、血中に多量に存在する蛋白質の数種類の特異的断片のセットが、診断に利用可能であるという成績が多数報告されている⁵⁾⁶⁾。これは、癌では早期から凝固、線溶系に異常をきたす場合が多いので、血中に多量に存在す

る蛋白質にも二次的に影響を与えた結果、スペクトルに変化が現れるのではないかと推定されている。このようなセットを選択するためにはバイオインフォマティクスのソフトウェアの支援が必要になる。循環器疾患の病態に適用可能か否かは今後の課題になるが、その検討には、表面改良型レーザー脱離イオン化質量分析法⁹⁾(surface-enhanced laser desorption/ionization: SELDI) やアルブミンに非共有結合的に付着している低分子蛋白質を分析するアプローチが欧米では実施されている⁷⁾。血清は凝固の過程で多数のプロテアーゼが活性化されており、多数のペプチド性ピークが観測されたとしても、真の病態を反映しているか、採血以後の体外で生じたアーティファクトなのかについて、試料の採取を含めた厳格な管理が必須となる⁸⁾。

おわりに

本稿ではプロテオミクスと混同されやすいペプチドミクスについて、総論的な解説を中心にすえながら、運用面での注意点についても言及した。ペプチドミクスが循環器病領域で期待される役割として現在のところ中心になっているのは、新規生理活性ペプチドの探索と疾患マーカー開発である。本稿がその現状について理解するための一助になれば幸いである。



文献

- 1) 南野直人：ペプチドーム—生体内ペプチドのファクトデータベース化—。蛋白質核酸酵素 46 (suppl 11) : S 1510-S 1517, 2001
- 2) Minamino N *et al* : Determination of endogenous peptides in the porcine brain : possible construction of peptidome, a fact database for endogenous peptides. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 792 : 33-48, 2003
- 3) 佐々木一樹ほか：ペプチドーム解析の現状と展望。実験医学増刊 23 : 133-140, 2005
- 4) Sasaki K *et al* : Peptidomics-based approach reveals the

- secretion of the 29-residue COOH-terminal fragment of the putative tumor suppressor protein DMBT1 from pancreatic adenocarcinoma cell lines. *Cancer Res* 62 : 4894-4898, 2002
- 5) Li J *et al* : Proteomics and bioinformatics approaches for identification of serum biomarkers to detect breast cancer. *Clin Chem* 48 : 1296-1304, 2002
- 6) 佐々木一樹 : SELDI-TOF-MS による腫瘍マーカー探索とがん診断の試み. 化学フロンティア 10, 化学同人, 京都, 2003, pp.181-190
- 7) Stanley BA *et al* : Heart disease, clinical proteomics and mass spectrometry. *Dis Markers* 20 : 167-178, 2004
- 8) Tammen H *et al* : Peptidomic analysis of human blood specimens : comparison between plasma specimens and serum by differential peptide display. *Proteomics* 5 : 3414-3422, 2005

SASAKI Kazuki

ささき・かずき

北海道生まれ. 東京大学医学部医学科卒, 国立がんセンター研究所を経て, 2004 年より国立循環器病センター研究所. 研究テーマ: 質量分析法による新規生理活性ペプチドの探索.

趣味: 音楽・庭園鑑賞.

E-mail : ksasaki@ri.ncvc.go.jp
