

(6) 知的基盤整備

2. 知的基盤整備推進研究

①創薬及び生物研究情報基盤としての生体内ペプチドの多角的データベースに関する研究

(1) 概要ポンチ絵

「創薬及び生物研究情報基盤としての生体内ペプチドの多角的データベース化に関する研究」

(H11年度～H15年度)

平成13年度予算額 2.4億円

研究代表者：南野直人（国立循環器病センター研究所）他6機関

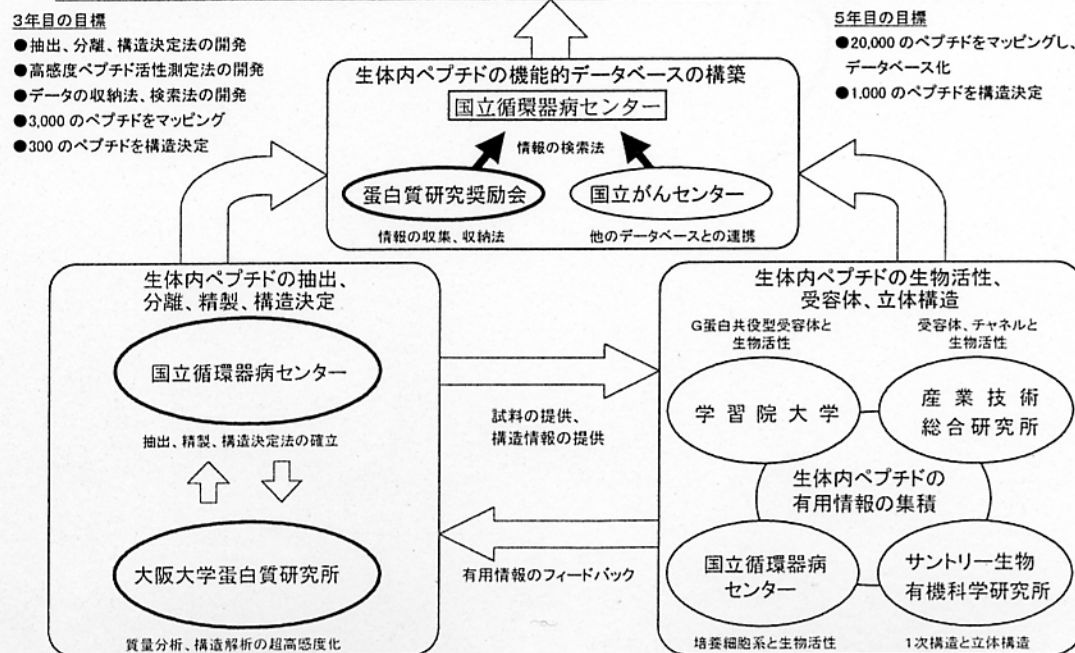
研究の概要・目標	諸外国等の現状	研究進展・成果がもたらす利点
<p>1. 何を目標しているのか</p> <p>生体内で多様な作用を有するペプチドを生体内に存在するままの形で微量なもので取り出し、分子量、電荷、疎水性などに基つきマッピングし、機能的で多様な検索が可能なデータベースの構築を目指す。</p> <p>3年後の目標： ●抽出、分離、構造決定法の開発 ●高感度ペプチド活性測定法の開発 ●データ収納法、検索法の開発 ●3,000ペプチドをマッピング、300のペプチドを構造決定</p> <p>5年後の目標 ●20,000のペプチドをマッピングし、データベース化 ●1,000のペプチドを構造決定</p> <p>2. 何を研究しているのか</p> <ul style="list-style-type: none"> 生体内ペプチドの抽出、分離、精製法の確立、構造決定法の超高感度化。 生体内ペプチドの生理活性の検討、受容体の同定、立体構造の推定。 生体内ペプチドの機能的データベース化。 <p>3. 何が新しいのか</p> <p>重要性は認識されていたが、取り扱いが困難であるため着手できなかった生体内ペプチドのデータベース化を生体内ペプチドの抽出法を確立しつつ、構築すること。</p> <p>ペプチド：アミノ酸が数個から百個程度直線状に並んだ分子。ホルモン、神経伝達、循環調節などに幅広く機能するのが、取り扱いが極めて困難。生体内には約2万種類のペプチドが比較的高濃度に存在すると推定される。</p>	<p>1. 現状</p> <p>DNA研究と連携して蛋白質のデータベース化は行われている。一方、生体機能の調節では蛋白質と同等あるいはそれ以上の重要性をもつペプチドは、DNA配列から構造や機能性を直接推測することが困難で、かつ取り扱いも確立していない。そのため、その重要性にも関わらずデータベース化は、世界的にも着手することができない状況。</p> <p>2. 我が国の水準</p> <p>存在量が0.1pmol/g(約0.1ng/g)程度のペプチドを解析できる技術(COE成果)を有しており、生理活性ペプチドの発見や構造研究で、我が国は世界をリードしている。(例：ナトリウム利尿ペプチド、エンドリンなど)。</p> <p>ナトリウム利尿ペプチド：心臓などから分泌され、血圧を下げ、尿の排出を促進するペプチド</p> <p>エンドセリン：血管内皮細胞が産生し、強力に血管を収縮させ血圧を上昇させるペプチド</p>	<p>1. 世界との水準の関係</p> <p>従来よりも一桁少ない存在量のペプチドまでも解析できる技術を開発し、生体内ペプチドの取り扱い法を確立することにより、生体内に存在するペプチドのファクトデータベースを世界に先駆けて整備できる。このデータベースの発展、活用により、ポストゲノム研究として急展開する可能性が高いペプチド分野において、日本がペプチド情報に関する世界の中心となることが可能となる。</p> <p>なお、本課題の成果は、知的所有権等による保護を図り、基盤固めを行っていく。</p> <p>2. 波及効果</p> <ul style="list-style-type: none"> 本研究で開発される超微量ペプチド解析技術により生体内に内在するペプチドを網羅的にカバーするデータベースが整備され、細胞と細胞、細胞と組織の間の情報伝達や生体全体の調節機構を解明する生物研究情報基盤として生物分野で幅広く応用可能となる。 特に医薬品、治療法、診断法の開発などに活用でき、この分野の研究・開発を大きく進展させることが可能となる。

(2) 体制ポンチ絵

「創薬及び生物研究情報基盤としての生体内ペプチドの多角的データベース化に関する研究」の第I期研究体制

中核機関：厚生労働省
国立循環器病センター研究所

微量ペプチドの解析方法を開発し(3年後)、高度な生体内ペプチドデータベースを構築する(5年後)



(3) 所用経費

第Ⅰ期研究における所用経費

「創薬および生物研究情報基盤としての生体内ペプチドの多角的データベース化に関する研究」

(単位:千円)

研究項目	担当機関等	研究担当者	所用経費
1. 生体内ペプチドの分離、精製、構造決定法に関する研究			
(1) 抽出、分離、精製、構造決定法に関する研究	国立循環器病センター研究所	南野 直人	253,244
(2) 質量分析法による生体内ペプチドの超微量構造解析に関する研究	大阪大学蛋白質研究所	高尾 敏文	80,485
2. 生体内ペプチドの生物活性、受容体と立体構造に関する研究			
(1) 培養細胞を用いた生物活性と機能検索に関する研究	国立循環器病センター研究所	寒川 賢治	103,111
(2) 機能蛋白発現系と分化発生系を用いた生体内ペプチドの生物活性と機能検索に関する研究	(独法)産業技術総合研究所	久保 泰	36,428
(3) G蛋白質共役型受容体を用いた生物活性と機能検索に関する研究	学習院大学理学部生命分子科学研究所	芳賀 達也	43,394
(4) 分子設計を用いた受容体との相互作用、立体構造に関する研究	(財)サントリー生物有機科学研究所	石黒 正路	29,278
3. 機能的データベースの構築に関する研究			
(1) 生体内ペプチドのデータベース構築に関する研究			
①多様な生体内ペプチド情報の効率的収納法とデータベース構築に関する研究	(財)蛋白質研究奨励会	磯山 正治	57,213
②発見的検索が可能な生体内ペプチド・ファクトデータベースの構築に関する研究	国立循環器病センター研究所	花井 荘太郎	33,955
(2) 他のデータベースとの連携に関する研究	国立がんセンター研究所	水島 洋	29,238
3 研究推進	国立循環器病センター研究所		1,578
合 計			667,924

(4) 研究成果の概要

課題名：創薬及び生物研究情報基盤としての生体内ペプチドの多角的データベース化に関する研究

研究代表者：南野直人（国立循環器病センター研究所）

第一期の主な研究成果は以下のとおりである：

(1) 生体内ペプチドの分離、精製、構造決定に関する研究

第1期の研究により、生体内ペプチドのデータ収集に必要な抽出法、分離法、構造解析方法の基本部分が予定に従い開発、設定されつつあり、データベース構築への必要条件がほぼ整った。これに従い情報の収集を開始し、3年次の数値目標の60%以上を達成できる見込みが立った。

- ・本データベース化に使用する抽出・分離、精製法を13年度末までに開発、設定できる見込みとなった。それに基づき大量のブタ脳組織(20kg)よりペプチド画分を抽出後、系統的に分離し、班員への供給やデータ収集を開始した。
- ・ブタ脳の分子量2,500以下のペプチド画分について粗いペプチドデータベース用の情報収集を開始した。一部の画分につき徹底した解析を行った結果、2gの組織から得られたペプチド混合物を2次元HPLCで分離した状態で、8,200のペプチドの基礎情報と1,300の配列情報が入手可能と推定された。当初の対象とする分子量5,000以下の全ペプチド画分に同様の分離、解析を行ったとすると、3,000ペプチドの構造同定、20,000ペプチドの情報収集が可能と推定される。これは、ブタ脳内に1 pmol/g以上の組織濃度で存在するペプチド数にほぼ相当すると考えられる。
- ・過去の研究経験から推察、記載した研究実施計画書の数値目標が、研究の実施結果よりかなり妥当な数字であったことが確認された。また、現在の方法論で脳より得られるペプチド混合物を網羅的に分析することにより、実際に20,000ペプチドの情報が入手可能であり、構造などを含めた詳細な情報を収録できれば、脳内ペプチドについて様々な検索や発見が可能な知的情報基盤が構築できる見込みが立ったといえる。
- ・ブタ脳抽出物より新規活性ペプチドを発見することができた。(未発表、特許準備中)
- ・試料の前処理法の改良、開裂様式情報の蓄積などによるアミノ酸配列解析用アルゴリズムの改良により、分子量1,500以下のペプチドの30%の配列情報の入手が可能となった。後者は、<http://www.protein.osaka-u.ac.jp/organic/>を通じて試験公開した。
- ・多検体の自動気相エドマン分解装置の開発とMALDI質量分析計の連携により、ピコモルレベルの試料に対して、最高3残基までより簡便な構造推定が可能となった。
- ・ペプチドの抽出時における2次的分解の評価方法をほぼ開発し、特許化の予定である。
- ・修飾アミノ酸を含むペプチドの質量分析、リン酸化SerやThr、メチオニンスルホキシド、ペプチド中の α -、 β -Asp残基の判別の可能性が示された。

(2) 生体内ペプチドの生物活性、受容体と立体構造に関する研究

収集した培養細胞と細胞反応の高感度測定法を組み合わせ、活性ペプチド検索に使用可能な生物活性測定法を数多く作成できた。今後、研究班内の連携により、新規活性ペプチドの発見を目指すとともに、生物活性情報の収集を実施する。立体構造や受容体との相互作用予測から、活性ペプチドを見出す新しい方法論の開発へも前進した。

- ・培養細胞の細胞内セカンドメッセンジャー(カルシウム、cAMPなど)濃度を高感度に測定し、活性ペプチドを高効率に検出できる検索方法を多数作成した。また、細胞外微小pH変化を指標とする活性ペプチド検索法も作成した。
- ・上記方法を下垂体前葉細胞などに適用し検索した結果、多数のタキキニン類、ボンベシン類、ニューロテンシン類やオレキシンBが精製され、方法の有効性が確認された。

- ・オーファン受容体、GHS-R の内因性リガンドとして、胃よりグレリンを発見した。グレリンは成長ホルモン分泌促進活性を有し、3番目のセリン残基が n -オクタン酸で修飾された構造が活性発現に必須で、これは遺伝子配列からは推定できない構造である。
- ・オーファン受容体、GPR66 (FM3) の内因性リガンドもニューロメジンUと同定された。
- ・イオンチャネルや受容体 15 種について機能蛋白発現系を培養細胞や卵母細胞で構築し、細胞内カルシウム濃度などの測定によるスクリーニング系を確立した。
- ・微量ペプチドを対象に平均化 cDNA ライブラリー作製とペプチド発現の技術開発を行った。毒産生組織等の cDNA ライブラリーから 18 の神経毒様ペプチド候補を同定。
- ・G 蛋白質共役型受容体と G 蛋白質 α サブユニットの融合蛋白質を作製したところ、G_i や G_s の共役受容体では高感度なリガンド検索が可能で、薬理的性質も識別できた。モデルとしたノシセプチン受容体では、数 g の脳組織でリガンド検出が可能であった。
- ・ヒトゲノムより新規 G 蛋白質共役型受容体遺伝子を推定し、ペプチド受容体候補 30 種の融合蛋白質を調製した。一部についてはブタ脳ペプチド画分を用いて検索を開始した。
- ・ANP 受容体とリガンドの結合様式を検討し、NMR と分子動力学による構造解析法を用いてペプチドの受容体結合構造を推定する一般化可能な方法を確立した。
- ・50 ペプチドについて、真空中の分子動力学法より低エネルギーの 20 配座、また蛋白質の立体構造相溶性検索から各 20 の立体構造を得てデータベースとした。
- ・ロドプシンの光活性化中間体モデルを完成し、アミン類については認識モードを確認し、これを基に多くのペプチドの受容体結合構造の発現が可能となる見込みが立った。

(3) 機能的データベース構築に関する研究

実験データが未収集の段階であるため、情報収納法や検索法、他のデータベースとの連携に関しては文献情報や関連情報等に利用して研究を進めた。一方、ペプチド修飾の表記法、コアテーブルの情報記載法などを決定し、文献などから情報導入を開始した。

- ・ペプチドのデータベース化に必要な構造、機能情報のコアテーブルを作成し、さらに文献情報よりデータ導入法を検討し、データ導入を開始した。
- ・拡張アミノ酸テーブルを作成し、修飾情報を表現した配列データベース (Expanded Amino Acids Sequence Database: PRF/EXSEQ) の作成ソフトウェアを開発した。修飾情報データベース (MODDB) も構築し、蛋白質研究奨励会データベースより情報導入を行った。これらは世界的にも初めての試みで、機能的な世界標準になると期待される。
- ・インターネットを介して研究者が成果を PRF/MODDB へ登録ができる機構の開発を開始した。同時に、PRF/SEQDB, PRF/MODDB, PRF/EXSEQ を利用・検索する仕組みを構築し、ユーザーを限定して試験運用をはじめた。
- ・構築経費、運用・維持の容易性、一般公開時の機能の互換性などから、ペプチドームデータベースシステム全体の機器の配置やネットワークシステムの構成を決定した。
- ・知的検索を実施するための基礎として、書誌情報とファクトデータの効率的関連づけをオントロジーに基づくシステムの開発・評価で実施した。
- ・有用なペプチド関連データベースを選択し、Web リンク機能により簡便に参照できるシステム構築原案を作成した。ペプチドのモデルとして、転写因子を利用した。
- ・データベースの統合に関して、SRS システムを検討した。遺伝子・蛋白質のデータベースと転写因子データベースの連携を検討し、<http://srsx.ncc.go.jp/> で試験公開した。
- ・ペプチド表現のバーチャルリアリティ化について、Force Feed Back 技術によりソフトウェアのプロトタイプを開発し、現実的な感覚で分子が見られることがわかった。

【研究成果発表等】

	原著論文による発表	左記以外の誌上発表	口頭発表	合計
国内	3(+1) 件	7 件	32 件	42(+1) 件
国外	7(+1) 件	0 件	12 件	19(+1) 件
合計	10(+2) 件	7 件	44 件	61(+2) 件

(注：既発表論文について記載し、投稿中の論文については括弧書きで記載)

【特許出願等】 (現在申請準備中 4 件)

【受賞等】 0 件 (国内 0件、国外 0件)

【主要雑誌への研究成果発表】

Journal	Impact	サブテーマ	サブテーマ	サブテーマ	合計
	Factor	1	2	3	
<i>J. Am. Chem. Soc.</i>	5.537		1		1
<i>J. Med. Chem.</i>	4.079		1		1
<i>Electrophoresis</i>	3.447	1			1
<i>Rapid Commun. Mass Spectrom.</i>	2.437	1			1
<i>Bioinformatics</i>	2.259			1	1
<i>Life Sci.</i>	1.774		1		1
主要雑誌小計	19.553	2	3	1	6
発表論文合計		3	3	6	12

【その他】 データの蓄積状況など

- ・文献からのペプチドデータ導入
ペプチド数 (全生物) 7,657 件
- ・コアテーブル 約 1,000 件
- ・修飾情報データベース 約 3,000 件
- ・補助テーブル
 - 拡張アミノ酸テーブル 177 件
 - 生物分類テーブル 10,610 件
- ・質量分析検索用ペプチド (100 残基以下) 配列データベースの作成
PRF/SEQ の全エントリー