

## クリプタイトの発見と新しい生体情報伝達機構

向井 秀仁<sup>1)</sup>, 木曾 良明<sup>1)</sup>, 若松 馨<sup>2)</sup>

生合成されたタンパク質はその役割を終えると分解され、最終的にアミノ酸として再利用される。分解の過程で生じるペプチド断片は単なるゴミであると従来考えられ、注意を集めることはなかったが、元のタンパク質とは全く異なる機能を有する場合のあることが近年わかってきた。これらの機能性ペプチドはタンパク質の中に隠れているので、クリプティック機能ペプチド、クリプタイト (cryptide) と我々は名付けている。クリプタイトの中には単独でも低濃度で機能できるものもあるが、一次構造の異なる複数のペプチドが同一のターゲットに相加的に作用して (単独では効果が弱い) 機能すると考えられるものもある。本項ではミトコンドリアタンパク質に隠されたクリプタイト (マイトクリプタイト, mitocryptide) による好中球活性化の発見について概説するとともに、クリプタイトによる新たな生体調節機能の可能性について言及したい。

## 1. 好中球を活性化する新しい内在性因子の存在

細菌の感染や壊死組織片によって組織の傷害が起こると、好中球が血流から炎症部位に浸潤し、活性酸素や炎症性サイトカインを分泌するとともに、ファゴサイトーシスで不要物を除去する<sup>1,2)</sup>。炎症部位ではインターロイキン8をはじめとしたケモカインが産生されそれが好中球を遊走させると一般的に考えられている。しかし、インターロイキン8<sup>3)</sup>のようなケモカインタンパク質は炎症刺激の後で転写・翻訳されて生合成されるので、心筋梗塞の後の虚血再還流時に起こる非常に速やかな好中球の組織浸潤<sup>4-6)</sup>においては機能していない可能性が高い。実際に好中球の活性化をケモカインのアンタゴニストや抗体で完全

に阻害することはできないことが知られている<sup>7,8)</sup>。組織障害の極初期に観察される好中球の遊走や活性化には組織内に予め貯蔵されている物質 (特にミトコンドリアのタンパク質) が関わっている可能性が指摘されていたが<sup>9)</sup>、同定には至っていなかった。そのような物質が同定できれば、新しい生体調節機能が発見できるだけでなく、虚血再灌流障害や劇症肝炎などにおける好中球の組織への大量の浸潤を防止する医薬品の開発にもつながると期待された。そこで、好中球活性化ペプチドをブタ心臓から単離するプロジェクトを我々は開始した<sup>10,11)</sup>。

## 2. 好中球活性化ペプチドの配列決定

新鮮な心臓を沸騰水で処理し、プロテアーゼを失活させた後、酢酸抽出、アセトン沈殿、各種クロマトグラフィー (ゲル濾過, イオン交換 HPLC, 逆相 HPLC) で分画した (図1)。活性は分化させた HL-60 細胞 (好中球のモデル細胞, 後述) からの  $\beta$ ヘキソサミニダーゼ (注1) の分泌でモニターした。活性は非常に多くのフラクションに散在

<sup>1)</sup>京都薬科大学創薬科学系薬品化学分野 (〒607-8412 京都府京都市山科区御陵四丁野町 1)

<sup>2)</sup>群馬大学大学院工学研究科応用化学・生物化学専攻 (〒376-8515 群馬県桐生市天神町 1-5-1)

Discovery of cryptides and their novel signaling pathways  
Hidehito Mukai<sup>1)</sup>, Yoshiaki Kiso<sup>1)</sup> and Kaori Wakamatsu<sup>2)</sup>  
(<sup>1)</sup>Department of Medicinal Chemistry, Kyoto Pharmaceutical University, 1 Shichono-cho, Misasagi, Yamashina, Kyoto 607-8412, Japan; <sup>2)</sup>Graduate School of Engineering, Gunma University, 1-5-1 Tenjin-cho, Kiryu, Gunma 376-8515, Japan)

注1:  $\beta$ ヘキソサミニダーゼはファゴサイトーシスのマーカー酵素である。補体成分やホルミルペプチドなどの好中球活性化因子は、分化した HL-60 細胞からサイトカラシン B の存在下で、 $\beta$ ヘキソサミニダーゼを分泌させる。

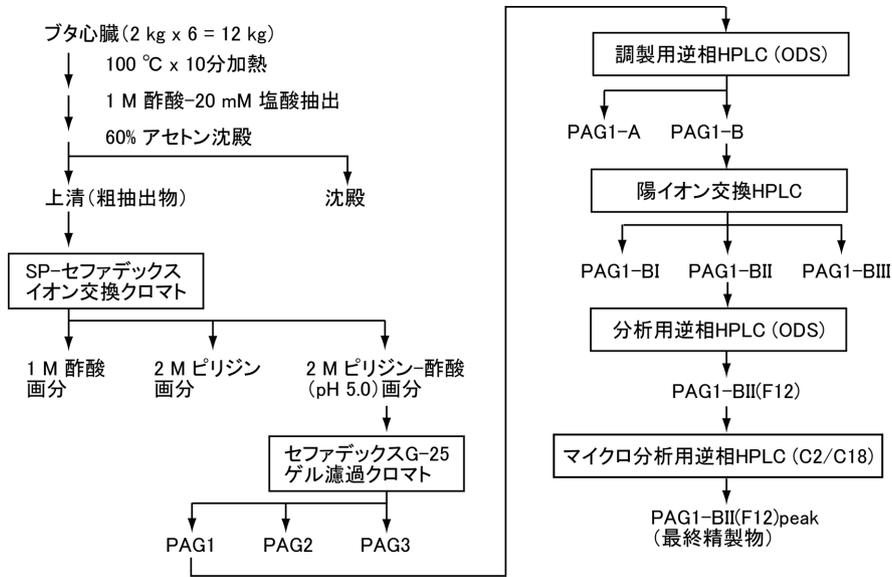


図1 プタ心臓から好中球活性化ペプチドを精製したステップ (MCT-1 の例)

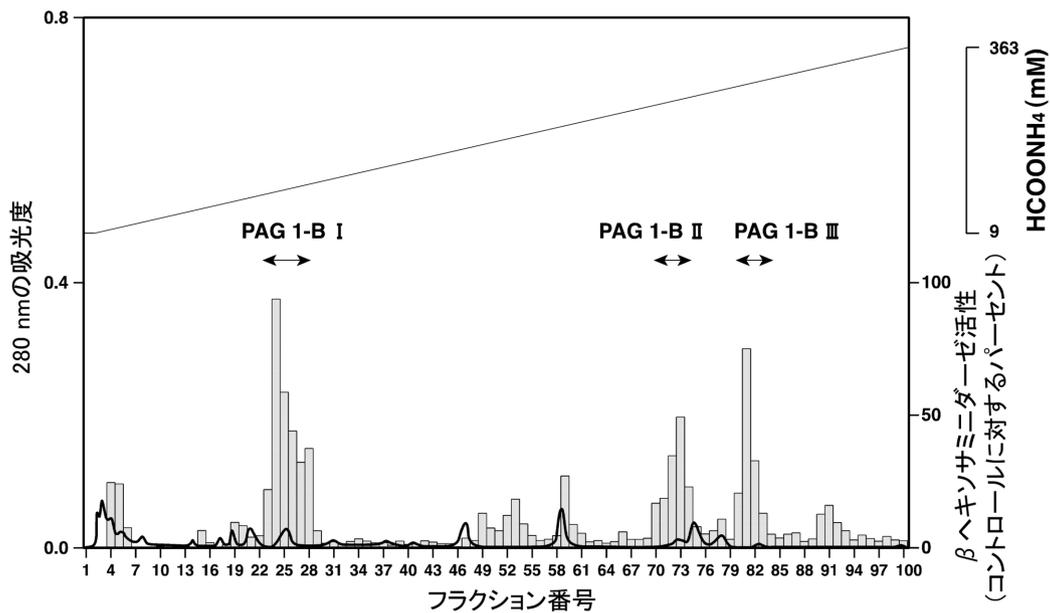


図2 MCT-1の精製過程 (第4段階のイオン交換クロマトグラフィー)

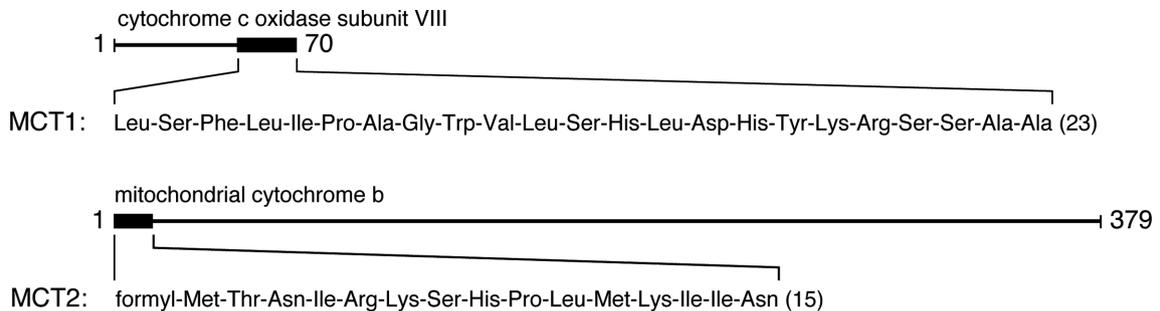


図3 プタ心臓から単離・同定した好中球活性化ペプチドのアミノ酸配列

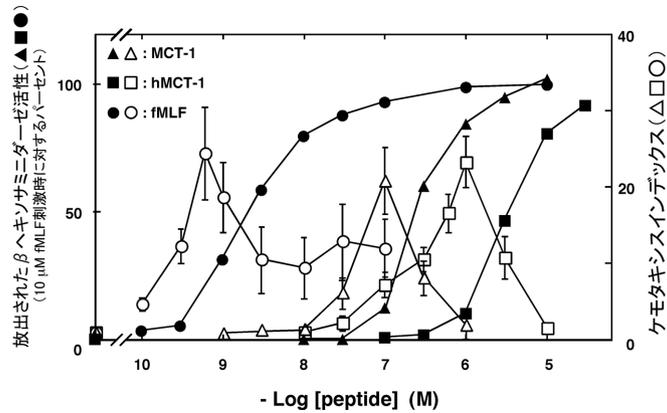


図4 プタおよびヒトのMCT-1による分化HL-60細胞の活性化

し、4段階目のクロマトグラフィーでも主に三つのピークが観測された(図2)。6~7回ものクロマトグラフィー操作により最終的に2種類のペプチドが単品に精製され、質量分析とエドマン法によってアミノ酸配列が決定された。いずれのペプチドもミトコンドリア(の内膜)に存在するタンパク質(注2)の断片であったので、それぞれマイトクリプタイド(MCT)-1, -2と命名した(図3)<sup>10,11)</sup>。また、そのペプチドを化学合成し、逆相HPLCによる分析と活性から構造を確認した。

### 3. マイトクリプタイドの活性

MCT-1, -2およびそのヒトホモログ(hMCT-1, -2)は $\beta$ ヘキソサミニダーゼを分泌させただけでなく、分化したHL-60細胞を遊走させる活性も示した(図4)。ペプチドの濃度上昇とともに、まず遊走活性が最大に達し、遊走活性が完全に脱感作されてから分泌活性が上昇する。高濃度のペプチドにより遊走活性が抑制されれば、傷害部位に遊走した好中球が他の部位に移動しないので、このような挙動は合目的的であると考えられる。

HL-60細胞は前骨髄性白血病患者由来の培養細胞で dibutyryl cyclic-AMP で処理されると好中球・顆粒球様細胞に分化する<sup>12)</sup>。好中球の刺激物質として有名なfMLF(formylmethionyl-leucyl-phenylalanine)は分化したHL-60でないと細胞内 $Ca^{2+}$ 濃度を上昇させないが、MCT-1もfMLFと同様に分化したHL-60のみ活性化した(図5)。そこで、MCT-1はfMLFに近い作用機序を有していると考えられる。なお、MCT-2と異なり、fMLFによる遊走活性は高濃度でも活性が残っている(図4)。このことは、MCT-2とfMLFとは情報伝達経路や生理的・病的意義が異なることを示唆しているように思える。

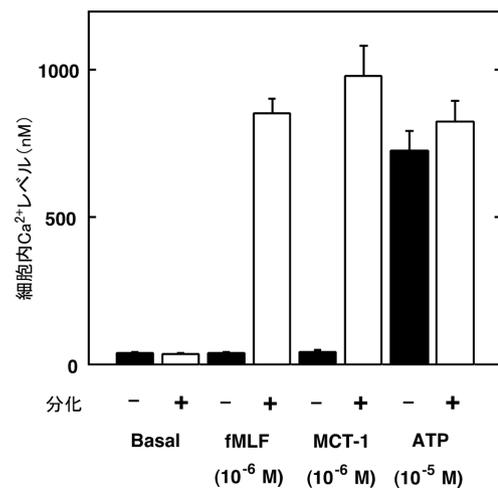


図5 MCT-1が未分化および分化HL-60細胞の細胞内 $Ca^{2+}$ 濃度に及ぼす効果

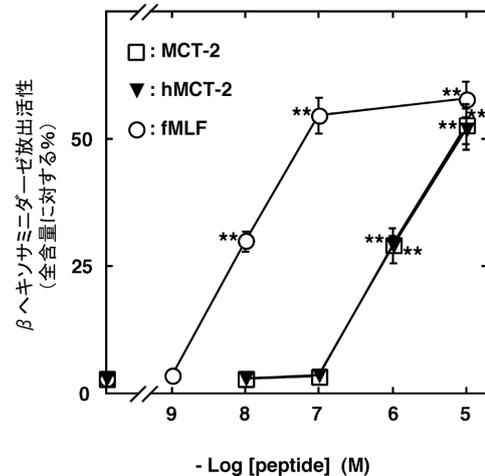


図6 MCT-2による分化HL-60細胞からの $\beta$ ヘキソサミニダーゼ活性の放出

また、MCT-1, -2はfMLFよりpotencyは低いものの、ヒトの末梢血中の好中球も活性化した(MCT-2について図6に示す)。そこで、MCTは生理的・病的に好中球を

注2: シトクロムcオキシダーゼのサブユニット8(UniProtKB/TrEMBL accession code: A1XQT4)とミトコンドリアコードのシトクロムb(Q9T566)。

活性化する可能性が高いと考えられる。なお、MCT-1、-2は細胞質のマーカー酵素である乳酸脱水素酵素の漏出は起こさないで、βヘキソサミニダーゼの分泌は細胞の単なる溶解によるものではない。

4. マイトクリプタイトの自然免疫における意義

ミトコンドリアの内膜に緩く結合しているシトクロムcが、DNA損傷などのストレスによりミトコンドリアから漏出し、アポトーシスを促進することはよく知られている<sup>13)</sup>。しかし、サブユニット8もシトクロムbも内膜の膜貫通タンパク質であり、MCTの生成には切断反応が必要である(特にMCT-1の生成にはサブユニット8が膜の中央部で切断される必要がある)。

組織障害のストレスがミトコンドリアタンパク質のかなり特異的な限定分解を誘導し、生成したマイトクリプタイトが細胞外に漏出して好中球を遊走させると考えられる。この場合でも、サイトカインとは異なりタンパク質が新たに合成される必要がないので、迅速な反応が可能である。

5. マイトクリプタイトによって活性化される経路

MCT-1、-2による好中球の活性化はfMLFと同様に

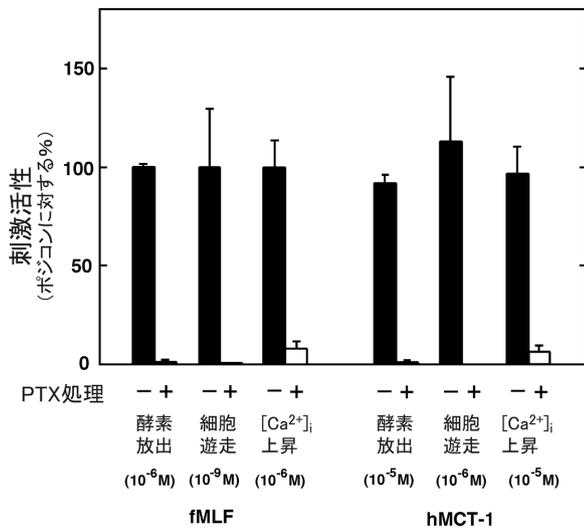


図7 ヒトMCT-1による分化HL-60細胞の活性化に及ぼすPTX前処理の効果

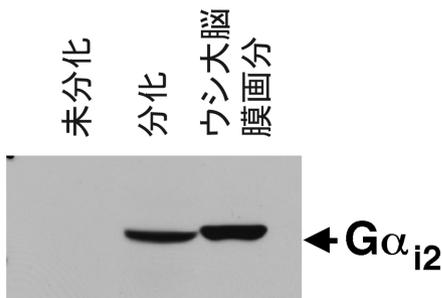


図8 Gα<sub>i2</sub>のHL-60細胞での発現の分化依存性

G<sub>i</sub>/G<sub>o</sub>系のGタンパク質を介していた、というのはG<sub>i</sub>/G<sub>o</sub>のC末端から4残基目のシステインの側鎖をADPリボシル化する百日咳毒素(PTX)で細胞を予め処理しておく<sup>14)</sup>、βヘキソサミニダーゼの放出、ケモタキシス、細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度の上昇の全てがブロックされるからである(図7)。なお、未分化のHL-60細胞にはGα<sub>i2</sub>が発現していないが、分化した細胞には発現している(図8)。そのため、マイトクリプタイトによる活性化は、G<sub>i</sub>/G<sub>o</sub>のサブファミリーの中でもG<sub>i2</sub>を介していると思われる。

Gタンパク質は通常Gタンパク質共役受容体(GPCR)で活性化され、fMLFの受容体(formyl-peptide receptor,

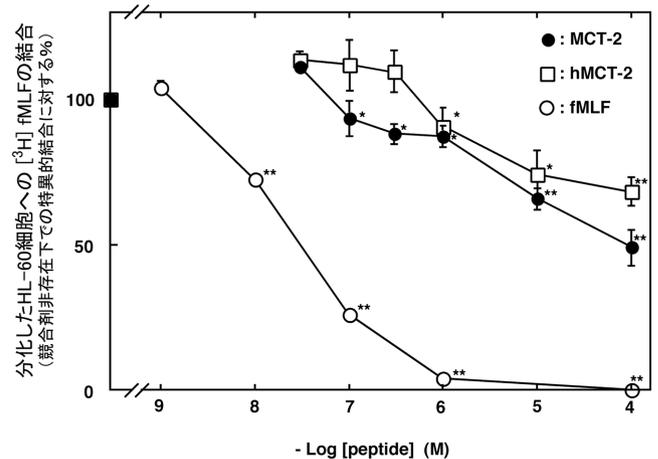


図9 分化HL-60細胞への[<sup>3</sup>H]fMLF結合のMCT-2による阻害

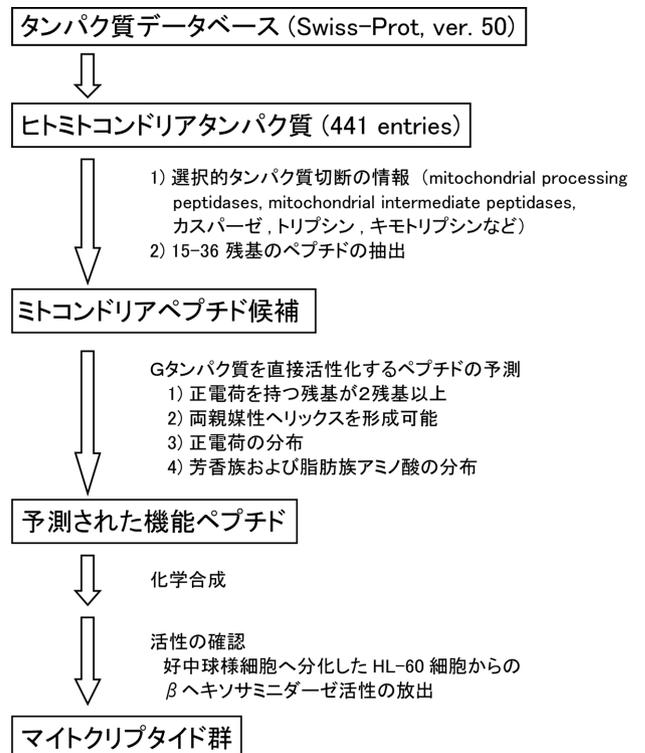


図10 マイトクリプタイトの網羅的探索手順

MCT-CYC1: NPKKY IPGTK MIFVG I  
 MCT-CYC2: NPKKY IPGTK MIFVG IKKK  
 MCT-6A2: MALPL RPLTR GLASA AKGGH GGA  
 MCT-SDHB: MAAVV ALSLR RRLPA TTLGG ACLQA SRG  
 MCT-MDH2: MLSAL ARPVS AALRR SFSTS AQNN  
 MCT-CYP1: MALRA KAEVC MAVPW LSLQR AQAL  
 MCT-CS1: MALLT AAARL LGTKN ASCLV LAARH AS

図11 バイオインフォマティクスのアプローチによって得られたマイトクリプタイトのアミノ酸配列

FPR)もGPCRの一種である。MCT-2はN末端にホルミル基を有するので、FPRに結合してシグナルを伝えている可能性がある。実際に、高濃度のMCT-2は分化したHL-60細胞への放射性fMLFの結合をブロックした(図9)。しかし、そのpotencyはfMLFより3桁も弱いので、他のGPCRを介している可能性も残る。好中球様細胞にはFPRだけでなくFPRに高いホモロジーを持つFPR-like 1 (FPRL1)も発現している<sup>15)</sup>。MCT-2がどちらのレセプターと相互作用するのかを現在解析中である。

もう一つの可能性はGPCRを介さないマイトクリプタイトによるGタンパク質の直接的な活性化である。Gタンパク質を直接活性化するペプチドとしてはマストパランが有名であるが<sup>16)</sup>、MCT-1はマストパランと同様に、塩基性および疎水性のアミノ酸残基を有し、両親媒性ヘリックスを形成することができる。実際にMCT-1はリン脂質ベシクルに再構成したG<sub>β</sub>を弱いながらも活性化した(未発表)。

## 6. バイオインフォマティクスによるマイトクリプタイトの網羅的探索

ブタ心臓の抽出液の多くのフラクションに好中球活性化能が散在していることから、数多くの活性ペプチドが存在していると考えられる(図2参照)。我々が完全な配列決定に成功したのはMCT-1とMCT-2の2種だけであるが、部分的にアミノ酸配列を決定できたペプチドは多く、殆どがミトコンドリアタンパク質の部分配列を有していた。マイトクリプタイトによる好中球活性化の全貌を明らかにするためには、数多く存在すると思われるマイトクリプタイトを網羅的に同定する必要があるが、MCT-1とMCT-2の同定だけでも、6年という長期を要し、同じストラテジーではとうてい達成不可能である。

そこで発想を転換し、MCT-1のように直接Gタンパク質を活性化する可能性のあるペプチドをタンパク質のデータベースから検索することにした<sup>17)</sup>。すなわち、ミトコンドリアに存在するであろうペプチドをミトコンドリアのプロテアーゼの特異性から予測した。検索のフローチャートを図10に示すが、まず、Swiss-Protデータベースからヒトのミトコンドリアタンパク質を441個抽出した。次に、ミトコンドリアのプロテアーゼやカスパーゼなど、ある程

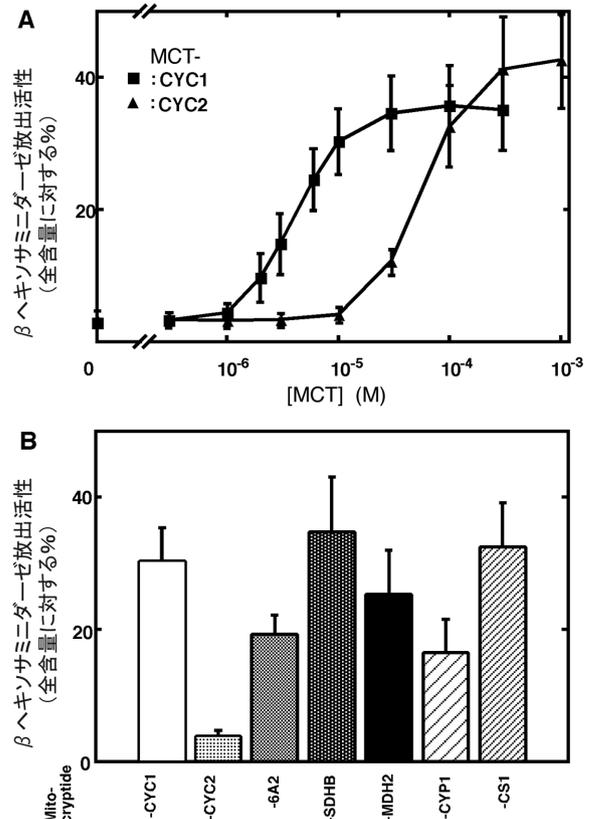


図12 マイトクリプタイト(MCT)による分化HL-60細胞からのβヘキソサミニダーゼ活性の放出

A. MCT-CYC-1, -2の濃度依存性, B. 各種MCT(10 μM)の活性。

度特異性の高いプロテアーゼでこれらのタンパク質を仮想的に切断し、その中から15~36残基のペプチドを選んだ。更に、「塩基性残基を2残基以上有する、両親媒性ヘリックスを形成できる」などの条件でペプチドを絞り込んだ。最後に、これらのペプチドを実際に化学合成し、分化したHL-60細胞を実際に活性化できるかを確認した。

その結果、一次構造に類似性がない50種以上の配列を同定することに成功した。その一部のアミノ酸配列とβヘキソサミニダーゼ放出活性を図11と図12に示す。なお、これらのペプチドはケモタキシス活性も示した。MCT-CYC1とMCT-CYC2が同じシトクロムcに由来する以外は、これらのペプチドの由来に相同性はない。また

MCT-CYC2はMCT-CYC1のC末端にリシン残基が三つ延長されただけであるが、MCT-1に較べてpontencyが1/10であることが興味深い。これはミトクリプタイドレセプターの特異性を反映していると思われる。

### 7. Accumulative Signaling

4段階目のクロマトグラムでも3種類の活性が観測されることから(図2)、ブタの心臓には数多くの好中球活性化因子が存在していることがわかる(少なくとも見積もって100)。通常のレセプターはアミノ酸配列を認識し、個々の配列に対応した別々のレセプターが存在するが、レセプターも100種類存在するのであろうか。レセプターを介した刺激にはリガンド濃度に閾値が存在し、閾値濃度以下のリガンドはシグナルを発生しない。リガンド毎にレセプターが異なる場合、種々のリガンドをそれぞれ閾値以下の濃度で作用させても、シグナルは発生しないはずである。しかし、分化した好中球に閾値濃度以下のミトクリプタイドを10種類同時に作用させると $\beta$ ヘキソサミニダーゼが強く放出した(未発表)。この結果は、一次構造に類似性のない別々のペプチドが、それぞれ単独では作用しない低濃度でも複数種「蓄積」することにより細胞応答を示すという、全く新しい生体情報伝達系が存在している可能性を示している。我々は、このような新しい情報伝達系を「accumulative signaling」と名付けた(図13)。この系におけるレセプターはアミノ酸配列を認識する従来のレセプターとは異なり、種々のミトクリプタイドの「共通の物理化学的特徴」を認識するのではないかと我々は考えており、その同定を急いでいる。

組織の損傷によりミトコンドリアの多くのタンパク質が分解し、種々のペプチドが生成する。これらのペプチドを一つの「レセプター」が一括して認識し、好中球をリクルートするシグナルをアウトプットするaccumulative signalingは非常に効率がよく、合目的的である。

ところで、組織に障害が起きた時に、ミトクリプタイドは好中球の遊走を惹起できるだけの濃度に達することができるだろうか。成人男性の心臓では湿重量1グラム当たり136  $\mu\text{g}$ のシトクロムcが含まれているという報告がある<sup>18)</sup>。すると、このタンパク質の心組織中の濃度は約12  $\mu\text{M}$ と計算される。シトクロムcオキシダーゼのサブユニット8の濃度もほぼ同程度と考えてよいだろうから、組織障害によりその百分の一が分解しMCT-1ができると、120 nMになる。ミトクリプタイドは少なくとも見積もっても100種類は存在するので、それらがaccumulativeに働くと、有意なシグナルを産み出すのに十分な濃度に達すると考えられる(図4参照)。

### 8. ペプチドの生成過程

内因性機能ペプチドは前駆体タンパク質が特異的な切断を受けることによって生成されるが、一つの前駆体タンパク質から複数の活性ペプチドが生成されることが多い(図14A左)。例えば副腎皮質刺激ホルモン(ACTH)<sup>19)</sup>と $\beta$ リポトロピン<sup>20)</sup>はプロオピオメラノコルチン<sup>21-23)</sup>から産生される(図14B)。しかし、これらの機能ペプチドが同じ前駆体から産生されていることがわかったのは、それぞれが独立して単離・精製された後、その前駆体が解析されてからである。機能ペプチド前駆体から産生されるペプチド断片のうち、その生理作用が同定されているものは全体としてはごくわずかであり、未同定の内因性機能ペプチドが多数存在している可能性は高いと考えられる。なお、 $\beta$ リポトロピンが更に切断されて $\gamma$ リポトロピン<sup>24)</sup>と $\beta$ エンドルフィン<sup>20)</sup>ができるように、一つの機能性ペプチドが更にプロセッシングを受けて、別の機能性ペプチドに変換されることもある。

一方、機能性タンパク質も前駆体がプロセッシングを受けて生成するが、いつかは、分解によりペプチド断片を生ずる。この分解の過程で元のタンパク質の機能からは予想できない活性を有するペプチドが生成しても不思議ではない(図14A右)。20残基程度のマイクロRNAが数多くの遺伝子の発現を調節していることがわかってきたように<sup>25)</sup>、タンパク質の短い断片も従来予想されていなかった機能を有している可能性がある。

クリプタイドについてしばしば提起される疑問の一つに、「組織から抽出・精製する過程でプロテアーゼによって生じたアーティファクトではないか?」がある。我々は新鮮な組織をただちに沸騰水中で10分間加熱することによってプロテアーゼを失活させてから、抽出している<sup>26)</sup>。この操作を採用した精製法で心房性ナトリウム利尿ペプチドなど多くの生理的ペプチドが単離・同定されているので<sup>27)</sup>、我々が同定したペプチドが単なるアーティファクトである可能性は低いと考えている。

### 9. クリプタイドを介した新しい生体制御の可能性

タンパク質のペプチド断片が何らかの生理・病理作用を示す時、その作用が(1)元のタンパク質の機能を反映する場合と、(2)元のタンパク質の機能からは容易に想像できない場合がある。(1)の例については本特集に「細胞接着分子のペプチド科学」と題して片桐・野水による詳しい解説があるので、参照していただきたい。(2)については、ブタ視床下部抽出液に見いだされた成長ホルモン放出刺激活性が $\beta$ グロビンのN末端10残基のペプチドに由来するという報告がある<sup>28)</sup>。同じ活性を示す他の4~16残基のペプチドも $\alpha$ および $\beta$ グロビンの断片であり、何れも作用

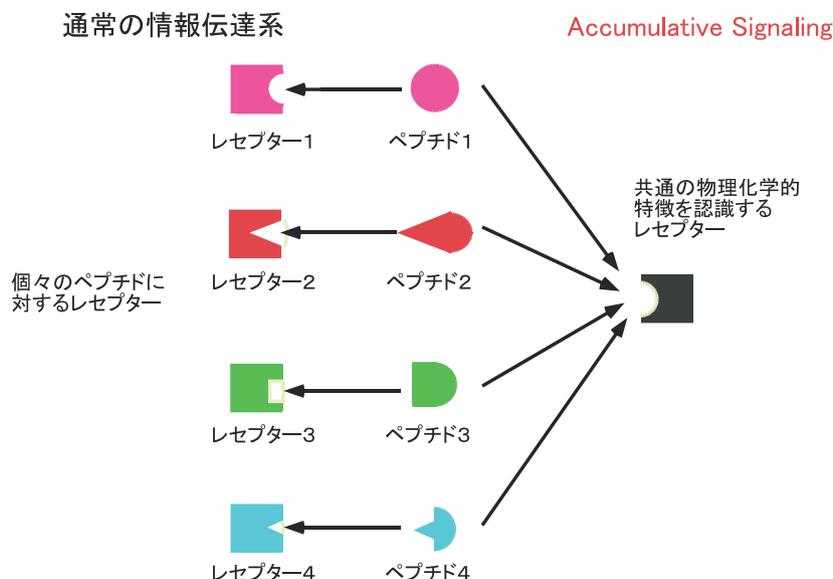


図13 Accumulative Signaling の概念

に高濃度を要したので、それらは単なるアーティファクトではないかと考えられた。

しかし、ペプチドームを活用した網羅的アプローチにより、タンパク質の断片でも低濃度で作用するものが見つかってきている。例えばCB1カンナビノイドレセプターの内在性アンタゴニストである $\alpha$ ヘモプレシンはサブnMという低濃度で効くが、 $\alpha$ グロビンの9残基の部分ペプチドだった<sup>29,30</sup>。このように、低濃度で効果を発揮する断片が見つかったので、生体内で産生されるタンパク質の断片が実際に生理的作用を担っている可能性が徐々に認知されてきた。また、Ivanovらはヘモグロビンから生ずる多くのペプチド断片が生理的役割を果たしている可能性が高いことを示してきた<sup>31,32</sup>。一方、(単独で)効果を発揮するのに必要な $\mu$ Mの濃度に組織中では達することがないと思われるペプチドも、複数の種類が同時に作用すれば充分有効な効果を発揮する accumulative signaling が上記のように見つかった。

以上のように、 $\mu$ Mオーダーで作用するペプチド断片であっても実際に機能している可能性が出てきた。「タンパク質の生合成や代謝過程で生じる断片ペプチドはほとんどが機能を持たず、意味のない『ごみ』である」というこれまでの概念を捨て、すべての断片ペプチドが機能を持つ可能性を受け入れれば、マイトプリプタイドによる好中球の活性化以外にも新たなシグナル系が次々と見いだされると期待される。

## 10. 終わりにあたって

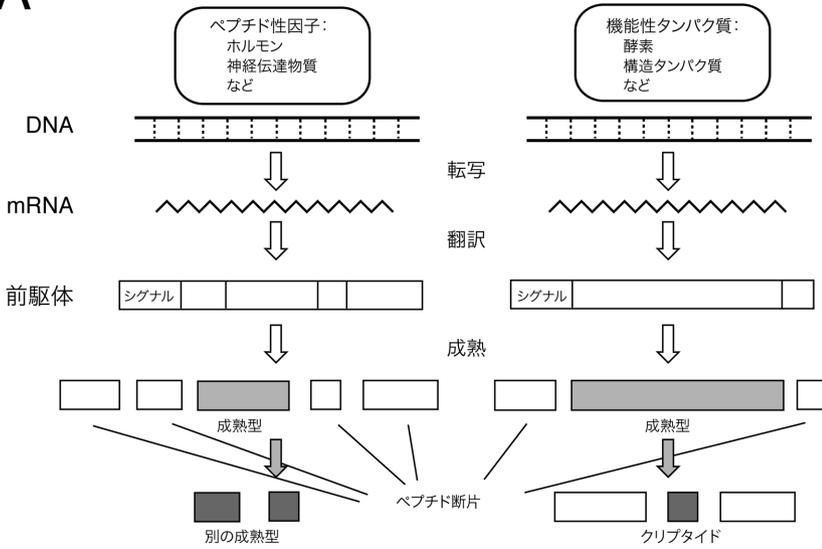
最近、ミトコンドリアDNAなどを含む damage-associated molecular patterns (DAMPs) がミトコンドリアから放出さ

れ、炎症発症に関与していることが病理学的に示された<sup>33</sup>。DAMPsには我々が同定してきたMCT-1やMCT-2をはじめとした好中球を活性化するミトコンドリアタンパク質由来クリプタイドが多数含まれていると考えられる。この点で15年来我々が提起してきた初期炎症機構(図15)<sup>34,35</sup>が検証されつつあると言え、長年本テーマを研究してきた我々にとって喜ばしいことである。虚血再灌流傷害やリウマチなど好中球が関わる炎症性疾患の発症機構の解明においては、DAMPsに含まれるタンパク質-ペプチド性の物質の同定が必須であり、今後我々のこれまでの研究が大きく貢献できるのではないかと期待している。

## 文 献

- 1) Springer, T. A. (1994) *Cell*, 76, 301-314.
- 2) Ley, K. (1996) *Cardiovasc. Res.*, 32, 733-742.
- 3) Baggiolini, M., Dewald, B., & Moser, B. (1994) *Adv. Immunol.*, 55, 97-179.
- 4) Romson, J. L., Hook, B. G., Kunkel, S. L., Abrams, G. D., Schork, M. A., & Lucchesi, B. R. (1983) *Circulation*, 67, 1016-1023.
- 5) Korthuis, R. J., Grisham, M. B., & Granger, D. N. (1988) *Am. J. Physiol.*, 254, H823-H827.
- 6) Vinten-Johansen, J. (2004) *Cardiovasc. Res.*, 61, 481-497.
- 7) Zagorski, J. & Wahl, S. M. (1997) *J. Immunol.*, 159, 1059-1062.
- 8) McColl, S. R. & Clark-Lewis, I. (1999) *J. Immunol.*, 163, 2829-2835.
- 9) Carp, H. (1982) *J. Exp. Med.*, 155, 264-275.
- 10) Mukai, H., Hokari, Y., Seki, T., Takao, T., Kubota, M., Matsuo, Y., Tsukagoshi, H., Kato, M., Kimura, H., Shimonishi, Y., Kiso, Y., Nishi, Y., Wakamatsu, K., & Munekata, E. (2008) *J. Biol. Chem.*, 283, 30596-30605.

A



B

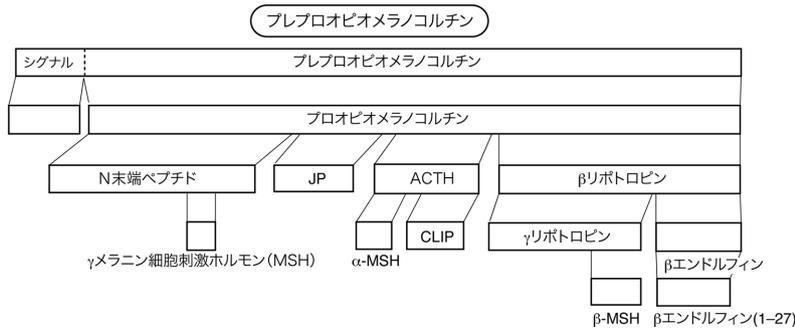


図 14 A. ペプチド因子と機能性タンパク質の生成・分解過程, B. プレプロオピオメラノコルチンからの各種活性ペプチドの産生

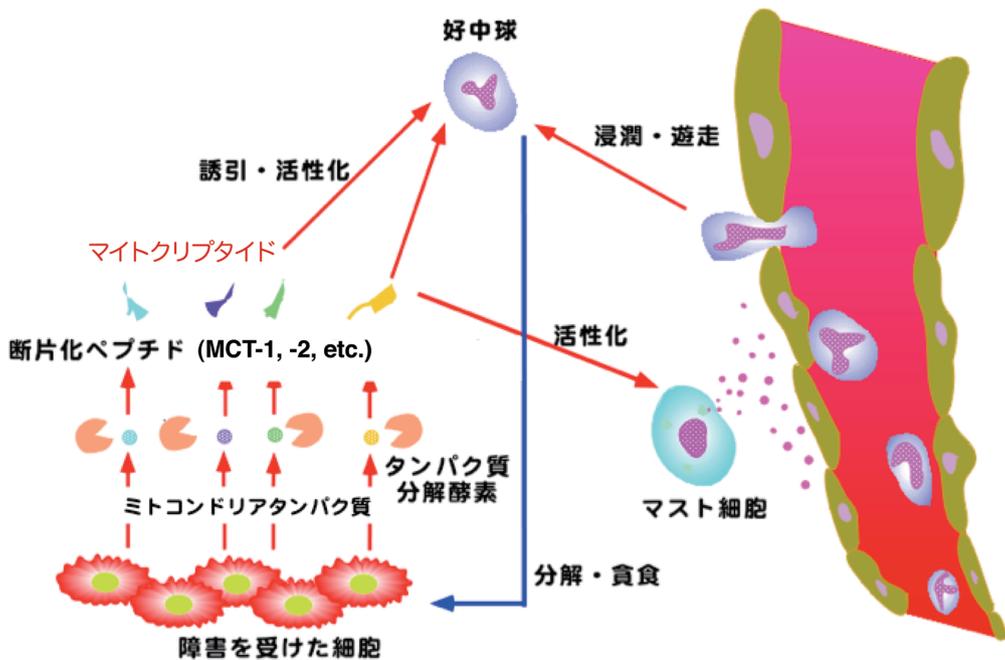


図 15 マイトクリプタイドによる新しい生体防御機構

- 11) Mukai, H., Seki, T., Nakano, H., Hokari, Y., Takao, T., Kawanami, M., Tsukagoshi, H., Kimura, H., Kiso, Y., Shimomishi, Y., Nishi, Y., & Munekata, E. (2009) *J. Immunol.*, **182**, 5072–5080.
- 12) Chaplinski, T. J. & Niedel, J. E. (1982) *J. Clin. Invest.*, **70**, 953–964.
- 13) Kroemer, G., Dallaporta, B., & Resche-Rigon, M. (1998) *Annu. Rev. Physiol.*, **60**, 619–642.
- 14) Oinuma, M., Katada, T., & Ui, M. (1987) *J. Biol. Chem.*, **262**, 8347–8353.
- 15) Le, Y., Murphy, P. M., & Wang, J. M. (2002) *Trends Immunol.*, **23**, 541–548.
- 16) Higashijima, T., Uzu, S., Nakajima, T., & Ross, E. M. (1988) *J. Biol. Chem.*, **263**, 6491–6494.
- 17) Ueki, N., Someya, K., Matsuo, Y., Wakamatsu, K., & Mukai, H. (2007) *Peptide Sci.*, **88**, 190–198.
- 18) Drabkin, D. L. (1950) *J. Biol. Chem.*, **182**, 317–334.
- 19) Graf, L., Bajusz, S., Patthy, A., Barat, E., & Cseh, G. (1971) *Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung.*, **6**, 415–418.
- 20) Sajgo, C., Graf, L., Barat, E., & Sajgo, M. (1971) *Biochim. Biophys. Acta*, **229**, 276–278.
- 21) Mains, R. E., Eipper, B. A., & Ling, N. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 3014–3018.
- 22) Nakanishi, S., Inoue, A., Kita, T., Nakamura, M., Chang, A. C., Cohen, S. N., & Numa, S. (1979) *Nature*, **278**, 423–427.
- 23) Raffin-Sanson, M. L., de Keyzer, Y., & Bertagna, X. (2003) *Eur. J. Endocrinol.*, **149**, 79–90.
- 24) Rudman, D., Chawla, R. K., Khatra, B. S., & Yodaiken, R. E. (1975) *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **248**, 324–335.
- 25) Bartel, D. P. (2004) *Cell*, **116**, 281–297.
- 26) Kangawa, K., Minamino, N., Fukuda, A., & Matsuo, H. (1983) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **114**, 533–540.
- 27) Kangawa, K., Tawaragi, Y., Oikawa, S., Mizuno, A., Sakuragawa, Y., Nakazato, H., Fukuda, A., Minamino, N., & Matsuo, H. (1984) *Nature*, **312**, 152–155.
- 28) Schally, A. V., Baba, Y., Nair, R. M., & Bennett, C. D. (1971) *J. Biol. Chem.*, **246**, 6647–6650.
- 29) Heimann, A. S., Gomes, I., Dale, C. S., Pagano, R. L., Gupta, A., de Souza, L. L., Luchessi, A. D., Castro, L. M., Giorgi, R., Rioli, V., Ferro, E. S., & Devi, L. A. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 20588–20593.
- 30) Gomes, I., Grushko, J. S., Golebiewska, U., Hoogendoorn, S., Gupta, A., Heimann, A. S., Ferro, E. S., Scarlata, S., Fricker, L. D., & Devi, L. A. (2009) *FASEB J.*, **23**, 3020–3029.
- 31) Ivanov, V. T., Karelin, A. A., Philippova, M. M., Nazimov, I. V., & Pletnev, V. Z. (1997) *Biopolymers*, **43**, 171–188.
- 32) Ivanov, V. T., Karelin, A. A., & Yatskin, O. N. (2005) *Biopolymers*, **80**, 332–346.
- 33) Zhang, Q., Raoof, M., Chen, Y., Sumi, Y., Sursal, T., Junger, W., Brohi, K., Itagaki, K., & Hauser, C. J. (2010) *Nature*, **464**, 104–107.
- 34) Mukai, H., Hokari, Y., Seki, T., Nakano, H., Takao, T., Shimomishi, Y., Nishi, Y., & Munekata, E. (2001) in *Peptides: The Wave of the Future* (Proceedings of the 2nd International and the 17th American Peptide Symposium) (Lebl, M. & Houghten, R. A., eds.), pp. 1014–1015, American Peptide Society.
- 35) Mukai, H., Matsuo, Y., Kamijo, R., & Wakamatsu, K. (2003) in *Peptide Revolution: Genomics, Proteomics & Therapeutics* (Proceedings of the 18th American Peptide Symposium) (Chorev, M. & Sawyer, T. K., eds.), pp. 553–555, American Peptide Society.