

令和元年6月20日現在

機関番号：82508

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K18360

研究課題名(和文) 炎症性サイトカイン受容体を用いた血中炎症誘導・抑制タンパク質の網羅的分析法の開発

研究課題名(英文) Development of analysis method of inflammation-related proteins in serum using inflammatory cytokine receptors

研究代表者

川島 祐介 (Kawashima, Yusuke)

公益財団法人かずさDNA研究所・ゲノム事業推進部・研究員

研究者番号：30588124

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：血清プロテオーム解析では血中のタンパク質濃度のダイナミックレンジが非常に広い
ため、超微量なサイトカインなどのタンパク質を観測することが難しく、炎症関連タンパク質の網羅的な分析は
現状のプロテオーム解析法では困難を極める。そこで、本研究では炎症性サイトカイン受容体を用いて受容体に
結合する炎症関連タンパク質を濃縮して高感度な液体クロマトグラフィー質量分析計システムで分析する系の構
築をした。この分析系をCRP抗体陽性血清に応用し、既知の炎症関連タンパク質を検出するとともに炎症と関連
する可能性のある新たなタンパク質を発見することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生活習慣病や癌など様々な疾患と慢性炎症の関連が着目されている。また、炎症メカニズムは複雑で未だに原因
不明な炎症疾患が存在する。そのため、炎症に関連したタンパク質を包括的に解析する技術、さらには未知の炎
症関連タンパク質を探索できる技術が求められている。そこで、本研究では炎症受容体を用いて血中から炎症関
連タンパク質を分析できるシステムを新たに構築した。その分析系を用いることによって、包括的に炎症関連タ
ンパク質だけでなく、新たな炎症関連タンパク質候補を見出すことに成功した。

研究成果の概要(英文)：Serum proteome analysis is difficult to observe low concentrations of
inflammation related proteins such as cytokines due to the very wide dynamic range of protein
concentrations. In this study, I constructed a system to enrich inflammation-related proteins that
bind to inflammatory cytokine receptors and analyze them using a highly sensitive liquid
chromatography-mass spectrometry. Anti-CRP positive sera were applied to this analysis system and
succeeded in discovering novel protein candidates related to inflammation.

研究分野：プロテオミクス

キーワード：血清 バイオマーカー 炎症 プロテオーム解析

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

血液(血清)は人体のあらゆる臓器を巡り、細胞に不可欠な分子を輸送し、代謝の副産物を回収する。回収される物質の中には代謝の副産物以外に、疾患の診断マーカーとなるタンパク質も存在し、各臓器に起こったイベントを反映している。また、血清試料は、倫理面に配慮が必要であるが、採取時の苦痛が小さく比較的容易に採取できる。したがって、血清を対象とした診断マーカーの探索は理にかなったことであり、かつ、疾患の早期診断には必要不可欠であることは明確である。しかしながら、血清は数千種類のタンパク質が含まれる中に約 20 種類の高存在量タンパク質が総タンパク量の 99% を占めており、タンパク濃度のダイナミックレンジは $10^{10} \sim 10^{11}$ と非常に幅広い。そのため、血清はプロテオーム解析が最も難しい試料と考えられている。実際に、特殊な前処理・分画を行わず、細胞、組織試料をプロテオーム解析すると約 3000 種類のタンパク質が観測されるのに対して、血清では約 200 種類程度のタンパク質しか観測できない。これまでにこの問題の解決を目指して、血清中の微量タンパク質・ペプチドを高精度に比較分析するための方法の開発を行ってきたが、網羅的なタンパク質分析手法では血中濃度が数 pg/mL レベルの超微量なタンパク質は未だに観測することができていない。この超微量レンジにはサイトカイン・ペプチドホルモンなどの生理的に重要なものや既知の診断マーカーも存在するため、超微量レンジの網羅的なタンパク質分析によって新たな生理活性物質や診断マーカーの発見が期待されている。

2. 研究の目的

生活習慣病や癌など様々な疾患と慢性炎症の関連が着目されている。また、炎症メカニズムは複雑で未だに原因不明な炎症疾患が存在する。そのため、幅広い血中のダイナミックレンジの中から超微量な炎症誘導・抑制タンパク質のみを効率よく濃縮して、そのタンパク質を高感度に分析することが求められる。そこで、本研究では分析困難な血中に超微量にしか存在しない炎症性サイトカインなどを含む炎症誘導・抑制タンパク質を対象とした網羅的分析法を開発することを目的としている。

3. 研究の方法

本研究では炎症誘導・抑制タンパク質を濃縮する方法として複数の炎症性サイトカイン受容体を用いた系を開発する。血中の炎症誘導・抑制タンパク質は炎症性サイトカイン受容体と結合してシグナルを伝えるため、複数の炎症性サイトカイン受容体から結合したタンパク質を集めることで未知の炎症誘導・抑制タンパク質を含めた様々な炎症関連タンパク質を濃縮できると考えている。また、それと同時により微量なタンパク質を検出するために高感度な LC-MS システムを開発する。複数の炎症性サイトカイン受容体を用いた濃縮法と独自の高感度プロテオーム解析を組み合わせることで目的である血中の超微量な炎症関連タンパク質の網羅的分析が実現できると考えている。

4. 研究成果

(1) 血中の炎症関連タンパク質を集めるために、遺伝子組み換え技術を用いて IL1 受容体細胞外ドメインと IL6 細胞外ドメインそれぞれに Halo tag を融合した発現プラスミドを作製し(図 1)、動物細胞にトランスフェクションしてタンパク質合成を行った。次に、この合成した複数の Halo-tag 融合受容体と Halo-tag リガンドピーズを反応させ、受容体結合ピーズを作製した。さらに、この作製した受容体ピーズが機能しているかを確認するために、この受容体ピーズと血清を反応させ、LC-MS を用いて血清中の既知のインタラクターが濃縮されていることの確認に成功した。

(2) 高感度な LC-MS 分析を行うために、無孔子逆相カラムを用いた独自の LC-MS システムの構築を試みた。無孔子逆相カラムはタンパク質負荷量が少ないことが欠点であるが、分離能が高く、サンプルの損失が少ないため、微量サンプルの分析に適と考えた。実際に無孔子逆相担体をキャピラリーカラムにパックしてパフォーマンスをテストすると、一般的な多孔性逆相からより多くのタンパク質を検出することができ、微量サンプルになるとその差は大きくなった(図 2)。さらに 100 細胞と微量なサンプルからプロテオーム解析を行った場合でも 1407 タンパク質を検出することに成功した。

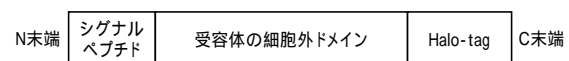


図1 合成した受容体タンパク質の構成

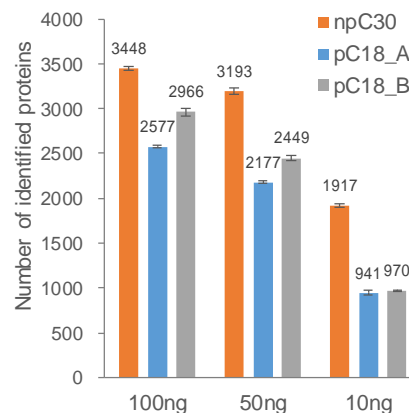


図2 無孔子逆相カラムと多孔性逆相カラムの比較
100ng, 50ng, 10ngのHEK293細胞消化物を無孔子逆相カラム(オレンジ)と多孔性逆相カラム(青色と灰色)それぞれで分析した。

(3) ここまでに開発した炎症性サイトカイン受容体を用いた濃縮法と独自の高感度プロテオーム解析を組み合せ、CRP 抗体陽性血清を用いて血中の炎症関連タンパク質分析を行った。また、ネガティブコントロールとして Halo tag のみをビースに結合させたプローブについても同様の分析を行い、炎症受容体特異的に増加するタンパク質を探索した。その結果、既知の IL1、IL6 以外の炎症受容体に結合するタンパク質を新たに 9 種類発見することに成功した(図 3)。今後はさらに多くの炎症関連受容体プローブを作成してより多くの炎症関連タンパク質を同時にアッセイできるようにしたいと考えている。

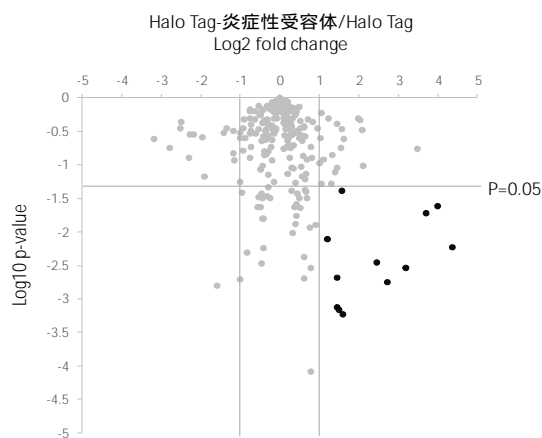


図3. 炎症関連タンパク質の探索
Halo Tag-炎症受容体とHalo tagのみに結合したタンパク質定量値をもとにvolcano plotを作成した。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Kawashima Y, Ohara O. Development of a NanoLC-MS/MS System Using a Nonporous Reverse Phase Column for Ultrasensitive Proteome Analysis. Anal Chem, 90(21), 2018, 12334-12338

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年：

国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

http://www.kazusa.or.jp/news/20181120_02/

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）:

(2)研究協力者

研究協力者氏名:

ローマ字氏名:

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。