

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2023

課題番号：18K09593

研究課題名（和文）ユビキトーム解析による歯周疾患のバイオマーカー開発

研究課題名（英文）Development of periodontal disease biomarkers by ubiquitome analysis

研究代表者

土田 祥央 (TSUCHIDA, Sachio)

日本大学・医学部・助手

研究者番号：90410422

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）：タンパク質の翻訳後修飾は、その機能に多様性をもたせる手段として多くの種類が知られている。リン酸化、糖鎖付加、アセチル化、メチル化などが有名であるが、近年ではユビキチン化などの低分子量タンパク質の付加の重要性が認識されつつある。タンパク質分解機構の異常が様々な疾患につながる事が知られており、中でもユビキチン化タンパク質の網羅的な解析は癌をはじめとする疾患マーカー探索のターゲットとして注目されている。様々な疾患に起こりうる代表的な翻訳後修飾であるユビキチン化に焦点をあてて、歯周疾患におけるユビキチン化を網羅的探索により捉え、歯周疾患の早期診断および再発予測治療効果判定等に応用することを検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

第一の特色は同時に侵襲性歯周炎、慢性歯周炎などの歯周疾患のタイプや、歯周疾患が全身に与える影響を検査することになるため、より正確で全身の健康に寄与する歯周治療を確立するための基盤となる点である。更に、ユビキトーム解析を行い、GCF とHGFs を用いた診断への活路をさらに切り拓く点である。第二の特色は、近年目まぐるしく進歩した質量分析解析技術を用いて歯周疾患に伴う翻訳後修飾レベルの変化を利用して、プロテオミクスとユビキチン化プロテオミクスを融合した歯周疾患マーカー探索を行う点である。本研究成果は歯周疾患マーカーの探索、さらには歯周疾患の早期診断、再発予測に大きく貢献できる。

研究成果の概要（英文）：Many types of post-translational modifications of proteins are known as a means of adding diversity to their functions. Phosphorylation, glycosylation, acetylation, and methylation are well-known examples, but recently the importance of addition of low molecular weight proteins such as ubiquitination is becoming increasingly recognized. Abnormalities in proteolytic mechanisms are known to lead to various diseases, and among them, comprehensive analysis of ubiquitinated proteins is attracting attention as a target in the search for disease markers, including cancer. Focusing on ubiquitination, a typical post-translational modification that can occur in various diseases, we investigated the application of ubiquitination in periodontal diseases for early diagnosis and prediction of recurrence of periodontal diseases.

研究分野：歯周疾患のバイオマーカー開発

キーワード：歯周疾患 プロテオミクス ユビキトーム 質量分析

1. 研究開始当初の背景

1980年代からタンパク質やペプチドの質量分析装置が急速に発達してきた。最近では、翻訳後修飾されたペプチドを選択的に濃縮する技術が発達してきて量的に少ない翻訳後修飾ペプチドでもうまく質量分析装置によって解析できるようになった。ユビキチンを介したタンパク質分解は、多くの炎症やがんに関係があるとされている。ユビキチン・プロテアソームシステムはタンパク質分解システムのなかでも特定のタンパク質を特異的に分解するシステムとして特に注目を集めている。質量分析装置を用いて、異なる環境条件下に置かれた細胞において産生されるユビキチン化タンパク質の網羅的な解析を行うことにより、ユビキチン化の生理的意義の解明が進むものと期待されている。

細胞内分解系の果たす生理機能や作動メカニズムが次々と明らかになるにつれ、その破綻が数多くの疾患に結びついていることが明らかとなってきた。近年では、ユビキチン・プロテアソーム系やオートファジーが、神経変性疾患、がん、老化、代謝疾患など、ヒトの病態に密接にかかわっていることが解明されつつある。質量分析は翻訳後修飾の強力なツールとして現在大きな脚光を浴びている。タンパク質の修飾に伴う質量変化を質量分析技術によって検出し、修飾サイトを同定することができる。すでにリン酸化やアセチル化サイトを網羅的に同定する解析が報告されているが、これと並んでユビキチン化についても網羅的な解析がなされている。近年の技術革新により、タンパク質のユビキチン化を網羅的に探索することも可能になりつつあるが、歯周疾患の解明に応用するための方法論は確立されていない。

2. 研究の目的

(1)本研究ではユビキトーム解析を進展させ、様々な疾患に起こりうる代表的な翻訳後修飾であるユビキチン化に焦点をあてて、歯周疾患におけるユビキチン化を網羅的探索により捉え、歯周疾患の早期診断および再発予測治療効果判定等に応用することを目的としている。

(2)ユビキトーム解析をもとに、歯周疾患特異的に発現量の変動を受ける歯肉溝浸出液(GCF)ならびにヒト歯肉線維芽細胞(HGFs)中のユビキチン化タンパク質・ペプチドを探索し、同定する。更にポリユビキチン鎖の種類を同定する。質量分析技術により見出されたマーカー候補について、特異抗体を用いることなく質量分析計により直接定量可能なアッセイ系を確立する。また、歯周疾患患者で高発現しているユビキチン化タンパク質についてもユビキチン化部位を含むペプチドを合成してペプチドアレイを作製する。

3. 研究の方法

(1) GCF ならびに HGFs のタンパク質およびペプチドの抽出

限外濾過装置を併用した抽出法により GCF と HGFs からタンパク質を抽出する。

(2) ユビキチン化タンパク質の濃縮

抗ユビキチン抗体をカップリングしたカラムに GCF タンパク抽出液ならびに HGFs 細胞抽出液を添加する。抗ユビキチン抗体を用いた免疫沈降を行う。ユビキチン化タンパク質を濃縮する。

(3) 質量分析技術によるユビキチン化タンパク質の解析

精製したユビキチン化タンパク質をトリプシン消化後、質量分析装置を用いたショットガン解析を行う。

(4) 質量分析技術によるユビキチン鎖のトポロジー解析

各結合型に特有なシグネチャーペプチドの検出と MS/MS 解析によって結合型の特定、ショットガン解析で特定の標的タンパク質に結合したポリユビキチン鎖の種類を同定を行う。

(5) ユビキチンリガーゼの網羅的基質探索

SILAC (stable isotope labeling by amino acids in cell culture) 法によってユビキチンリガーゼの基質の探索。HGFs の健常群と疾患群を混合して結合タンパク質を用いた免疫沈降。SILAC 法にて同定と定量。

(6) 歯周疾患マーカー候補ユビキチン化タンパク質・ペプチドのバリディーション
歯周疾患のバイオマーカーユビキチン化タンパク質・ペプチド候補の妥当性を検討するため特異性抗体で標的タンパク質を免疫沈降後に、抗ユビキチン抗体を用いたウエスタンブロットを行う。ユビキチン化ペプチドを合成してアレイを作成する。

4. 研究成果

(1) GCF ならびに HGFs のタンパク質およびペプチドの抽出

代表者らは以前、限外濾過装置を併用した抽出法を新たに確立した (PROTEOMICS 2012)。本研究においても限外濾過装置を併用した抽出法により GCF と HGFs からタンパク質を抽出する。ペプチド成分の抽出において最も大きな問題点はキャリアプロテインの影響である。本研ではキャリアプロテインの影響を受けずに高効率で再現性が良い有機溶媒沈殿法を用いて GCF と HGFs からペプチドの抽出を試みた。

(2) ユビキチン化タンパク質の濃縮

抗ユビキチン抗体をカップリングしたカラムに GCF タンパク抽出液ならびに HGFs 細胞抽出液を添加する、もしくは抗ユビキチン抗体を用いた免疫沈降を行って、ユビキチン化タンパク質を濃縮した。

(3) 質量分析技術によるユビキチン化タンパク質の解析

トリプシン消化により、ユビキチンは C 末端 Arg-Gly-Gly 配列のアルギニン残基の C 末端で切離されて、標的タンパク質側には 2 残基のグリシンが残ると予想された。このためユビキチン化されたリシン残基を含むトリプシン消化ペプチドは未修飾のペプチドより 114Da 分子量の増加したピークとして検出されるので、このシグネチャーペプチド(ヒトプロテオームにおけるタンパク質の同定や、新規タンパク質の定量の際に内部標準として検討した、プロテオーム研究用ペプチドである。タグ付き/タグ無しペプチドを用いることで、新たに同定されたタンパク質の相対または絶対定量を行うことができる。) に対してさらに MS/MS 解析を行うことで、ユビキチン結合部位が同定できる。

(4) 質量分析技術によるユビキチン鎖のトポロジー解析

ポリユビキチン化タンパク質のトリプシン消化で生じるユビキチン由来の Lys-Gly-Gly を含むシグネチャーペプチドの配列はポリユビキチン鎖の結合型ごとに特有であることが予想された。各結合型に特有なシグネチャーペプチドの検出と MS/MS 解析によって結合型の特定と、ショットガン解析で特定の標的タンパク質に結合したポリユビキチン鎖の種類の同定を検討した。

(5) ユビキチンリガーゼの網羅的基質探索

SILAC (stable isotope labeling by amino acids in cell culture) 法によってユビキチンリガーゼの基質探索を試みた。細胞培養液中の必須アミノ酸を安定同位体標識したものに置き換えたサンプルを調整し、混合して質量分析計で測定した。非標識と標識を質量分析計で区別できるため、ペプチドの同定と同時に複数サンプルの比較定量が可能である。HGFs の健常群と疾患群を混合して結合タンパク質を用いた免疫沈降し、SILAC 法にて同定と同時に定量を行った。本研究ではユビキチンリガーゼアダプタータンパク質の調節器として作用する F-Box タンパク質を中心に網羅的な基質探索を行う予定であったが試薬の検討に時間がかかってしまい探索まではたどり着かなかった。

(6) 歯周疾患マーカー候補ユビキチン化タンパク質・ペプチドのバリディーション

歯周疾患のバイオマーカーユビキチン化タンパク質・ペプチド候補の妥当性を検討するため、健常者・軽度・中等度・重度歯周疾患患者各 50 症例を対象に行う。特定のタンパク質におけるユビキチン化を確認する場合には、特異性抗体で標的タンパク質を免疫沈降した後に、抗ユビキチン抗体を用いたウエスタンブロットを行いいくつかの候補タンパクを検出した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計16件（うち査読付論文 14件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 14件）

1. 著者名 Tsuchida Sachio, Nakayama Tomohiro	4. 巻 19
2. 論文標題 Periodontal Tissue Regeneration Therapy Using Stem Cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Stem Cell Reviews and Reports	6. 最初と最後の頁 825 ~ 826
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12015-022-10494-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tsuchida Sachio, Nakayama Tomohiro	4. 巻 11
2. 論文標題 Recent Clinical Treatment and Basic Research on the Alveolar Bone	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biomedicines	6. 最初と最後の頁 843
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biomedicines11030843	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tsuchida Sachio, Nakayama Tomohiro	4. 巻 22
2. 論文標題 Ubiquitination and Deubiquitination in Oral Disease	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 5488
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22115488	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tsuchida Sachio, Nakayama Tomohiro	4. 巻 17
2. 論文標題 Proteomic analysis of human immunodeficiency virus and periodontitis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Expert Review of Proteomics	6. 最初と最後の頁 793 ~ 795
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/14789450.2020.1879648	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tsuchida Sachio、Umemura Hiroshi、Nakayama Tomohiro	4. 巻 25
2. 論文標題 Current Status of Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) in Clinical Diagnostic Microbiology	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 4775
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/molecules25204775	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tsuchida Sachio	4. 巻 21
2. 論文標題 Proteome Analysis of Molecular Events in Oral Pathogenesis and Virus: A Review with a Particular Focus on Periodontitis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 5184
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21155184	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nomura Fumio、Tsuchida Sachio、Murata Syota、Sato Mamoru、Matsushita Kazuyuki	4. 巻 17
2. 論文標題 Mass spectrometry-based microbiological testing for blood stream infection	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clinical Proteomics	6. 最初と最後の頁 14
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12014-020-09278-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tsuchida Sachio、Murata Syota、Miyabe Akiko、Sato Mamoru、Takiwaki Masaki、Matsushita Kazuyuki、Nomura Fumio	4. 巻 26
2. 論文標題 An in-house centrifugation and membrane filtration technique for identifying microorganisms from positive blood culture bottles with high identification rates using matrix-assisted laser desorption ionization-Time-of-flight mass spectrometry: A preliminary report	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Infection and Chemotherapy	6. 最初と最後の頁 266 ~ 271
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jiac.2019.09.017	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 土田 祥央、村田 正太、野村 文夫	4. 巻 164
2. 論文標題 【究める!臨床検査 遺伝子解析技術の革新がもたらす臨床検査とは】病原体核酸検査 臨床微生物検査における質量分析技術 ~質量分析技術による細菌同定を中心に~	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 臨床病理レビュー	6. 最初と最後の頁 76~83
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yao Yue, Nishimura Motoi, Murayama Kei, Kuranobu Naomi, Tojo Satomi, Beppu Minako, Ishige Takayuki, Itoga Sakae, Tsuchida Sachio, Mori Masato, Takayanagi Masaki, Yokoyama Masataka, Yamagata Kazuyuki, Kishita Yoshihito, Okazaki Yasushi, Nomura Fumio, Matsushita Kazuyuki, Tanaka Tomoaki	4. 巻 9
2. 論文標題 A simple method for sequencing the whole human mitochondrial genome directly from samples and its application to genetic testing	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 17411
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-53449-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 土田 祥央	4. 巻 28
2. 論文標題 歯周疾患とプロテオミクス	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 炎症と免疫	6. 最初と最後の頁 21~25
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tsuchida S, Satoh M, Takiwaki M, Nomura F.	4. 巻 20
2. 論文標題 Current Status of Proteomic Technologies for Discovering and Identifying Gingival Crevicular Fluid Biomarkers for Periodontal Disease.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 86
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms20010086.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tsuchida Sachio, Murata Syota, Miyabe Akiko, Satoh Mamoru, Takiwaki Masaki, Ashizawa Kazuho, Terada Takashi, Ito Daisuke, Matsushita Kazuyuki, Nomura Fumio	4. 巻 152
2. 論文標題 Application of the biocopolymer preparation system, rapid BACpro II kit, for mass-spectrometry-based bacterial identification from positive blood culture bottles by the MALDI Biotyper system	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Microbiological Methods	6. 最初と最後の頁 86 ~ 91
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.mimet.2018.07.017	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tsuchida Sachio, Murata Syota, Miyabe Akiko, Satoh Mamoru, Takiwaki Masaki, Matsushita Kazuyuki, Nomura Fumio	4. 巻 148
2. 論文標題 An improved in-house lysis-filtration protocol for bacterial identification from positive blood culture bottles with high identification rates by MALDI-TOF MS	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Microbiological Methods	6. 最初と最後の頁 40 ~ 45
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.mimet.2018.03.014	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takeuchi Noriko, Segawa Shunsuke, Ishiwada Naruhiko, Ohkusu Misako, Tsuchida Sachio, Satoh Mamoru, Matsushita Kazuyuki, Nomura Fumio	4. 巻 24
2. 論文標題 Capsular serotyping of Haemophilus influenzae by using matrix-associated laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Infection and Chemotherapy	6. 最初と最後の頁 510 ~ 514
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jiac.2018.02.007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tsuchida Sachio, Satoh Mamoru, Umemura Hiroshi, Sogawa Kazuyuki, Takiwaki Masaki, Ishige Takayuki, Miyabayashi Yui, Iwasawa Yuuya, Kobayashi Sohei, Beppu Minako, Nishimura Motoi, Koderia Yoshio, Matsushita Kazuyuki, Nomura Fumio	4. 巻 12
2. 論文標題 Assessment by Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry of the Effects of Preanalytical Variables on Serum Peptidome Profiles Following Long Term Sample Storage	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PROTEOMICS-Clinical Applications	6. 最初と最後の頁 e1700047
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/prca.201700047	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 5件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 土田 祥央、 村田 正太、 野村 文夫、 中山 智祥
2. 発表標題 病院検査部で活躍する質量分析技術-現状と展望- 質量分析技術による血液培養陽性ボトルからの微生物直接同定の現状と課題
3. 学会等名 日本医療検査科学会第52回大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 土田 祥央、村田 正太、 宮部 安規子、佐藤 守、 滝脇 正貴、 松下一之、 野村 文夫
2. 発表標題 塩化アンモニウム溶血剤とメンブレンフィルターを用いたMALDI-TOF MSによる血液培養ボトルからの細菌迅速同定前処理法の開発
3. 学会等名 第44回日本医用マスペクトル学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 土田 祥央、村田 正太、松下一之、 野村 文夫
2. 発表標題 MALDI-TOF MSによる血液培養陽性ボトルからの細菌直接同定のための前処理法の現状と課題
3. 学会等名 第65回日本臨床検査医学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 土田 祥央、佐藤 守、梅村 啓史、曾川 一幸、滝脇 正貴、石毛 崇之、西村 基、小寺 義男、松下一之、野村 文夫
2. 発表標題 血清と血漿のプロテオミクス・ペプチドミクス、保存された臨床検体（血清）の質量分析による劣化の評価
3. 学会等名 第43回日本医用マスペクトル学会年会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 土田 祥央
2. 発表標題 保存検体・保存菌株が導く臨床応用、保存された臨床検体（血清）の質量分析による劣化の評価
3. 学会等名 第68回日本電気泳動学会シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 土田 祥央
2. 発表標題 保存された臨床検体（血清）の質量分析による劣化の評価.
3. 学会等名 日本質量分析学会・日本プロテオーム学会 2018年合同大会（招待講演）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	佐藤 守 (SATO H Mamoru) (20401002)	千葉大学・医学部附属病院・特任准教授 (12501)	
研究分担者	西村 基 (NISHIMURA Motoi) (80400969)	千葉大学・医学部附属病院・講師 (12501)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------