

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 22 日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2023

課題番号：19K07899

研究課題名（和文）ポリユビキチン鎖各型の定量に基づく加齢性疾患の病態解析

研究課題名（英文）Pathologic analysis of age-related diseases based on individual quantification of polyubiquitin chain forms

研究代表者

高田 耕司（Takada, Koji）

東京慈恵会医科大学・医学部・客員教授

研究者番号：30179452

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）：ポリユビキチン鎖を認識するFK2抗体を用いたsandwich ELISAは、K48鎖、K63鎖、M1鎖を検出し、それらの総量の測定に適していた。各鎖を特異的に認識する抗体を利用した測定系は、感度不足で実用に至らなかった。複製老化とプロテオスタシスの関係を検証するため、分裂遅延に至る細胞集団倍加数（PDL）70以上まで継代培養したヒト正常線維芽細胞TIG-1細胞を分析したところ、老化に伴うポリユビキチン鎖量の有意な変動は認められなかった。マウスの赤血球を用いた解析では、ポリユビキチン化反応の活性の存在が確認された。また、個体の老化や全身状態で赤血球のポリユビキチン量が変動する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ポリユビキチン鎖各型に特異的な測定系の構築においては、市販の抗体試薬の性能に関する問題点を明らかにした。FK2抗体を用いた既存のsandwich ELISAは、試薬と操作を全面的に見直すことで、より簡便で実用的なポリユビキチン鎖総量の測定系にブラッシュアップされた。この測定系と2種類の正常ヒト繊維芽細胞を用いた研究では、細胞老化に関する新たな知見として、細胞内タンパク質の恒常性が破綻する場合と破綻しない場合の2種類に分類できる可能性を見出した。病的老化の評価に向けた検討では、将来の展開に向けて、老齢および疾患モデルマウスの赤血球に存在するポリユビキチン鎖総量の情報を蓄積している。

研究成果の概要（英文）：Sandwich ELISA using FK2 antibody, which recognizes polyubiquitin chains, detected K48, K63, and M1 chains and was suitable for measuring their total amount. Measurement systems employing antibodies specific to each chain lacked the sensitivity required for practical use. Despite investigating the relationship between replicative aging and proteostasis, analysis of human normal fibroblast TIG-1 cells, cultured up to replicative senescence (PDL 70+), did not reveal significant changes in polyubiquitin levels with aging. Analysis using mouse erythrocytes confirmed the presence of polyubiquitination reaction activity. It was also suggested that levels of erythrocyte polyubiquitin might fluctuate depending on individual aging and systemic conditions.

研究分野：分子細胞生物学，病態生化学

キーワード：ポリユビキチン鎖 ユビキチン プロテオスタシス プロテアソーム ELISA 抗体 細胞老化 加齢性疾患

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、研究者個人に帰属します。

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒトを含む真核生物の細胞には、数千種類ものタンパク質が存在し、各々の働きによって、細胞の各種機能が発現する。多くの細胞内タンパク質には、様々な要因で規定される寿命があり、不必要な状態に至るとユビキチン-プロテアソーム系やオートファジー系によって選択的に分解される。この合目的なタンパク質分解の仕組みは、細胞内タンパク質の恒常性(プロテオスタシス)の維持に不可欠であり、生命現象を支える主要な機構に位置づけられる。近年、心血管疾患や神経変性疾患などの加齢性疾患の発症に関するリスク要因として、老化に伴うプロテアソームやオートファジーの活性低下が指摘され、プロテオスタシスの破綻が老化に関与するとの仮説が提案されている。そのため、血液などの検体の分析によって、体内の選択的タンパク質分解系の状態をモニターすることができれば、病的な老化や健康障害の予防・治療・予後管理に有用と推測される。しかし、実用的な分析法(検査法)は、未だ確立していない。そこで我々は、これらのタンパク質分解系の基質認識を担うシグナル分子「ポリユビキチン鎖」に着目した。一連の酵素(E1、E2、E3 リガーゼ)の働きによって、分解基質として選択されたタンパク質には、K48鎖を中心とするポリユビキチン鎖が付加される。そのため、細胞・組織中のポリユビキチン鎖量は、プロテアソームやオートファジーの活性低下によって増加すると予想される。このような背景から、本研究では、細胞および個体の新たな老化マーカーとしてのポリユビキチン鎖定量の意義解明を目指した。

2. 研究の目的

加齢に伴う疾患の医療に有用な老化の新規バイオマーカーを確立するため、本研究では生命現象を支える二大タンパク質分解系の状態をモニター可能なポリユビキチン鎖各型の定量系の構築を検討する。測定対象のK48型、K63型、M1型の各鎖は、それぞれ別個のE3リガーゼによって形成され、ユビキチン分子間の共有結合の部位が、K48型は48番目リジン側鎖、K63型は63番目リジン側鎖、M1型は1番目メチオニンN末端であるため、各々独自の立体構造を保持する。その結果、K48型はプロテアソームが認識するタンパク質分解シグナル、K63型はDNA修復等を誘導するシグナル、M1型は炎症反応等を誘導するシグナルといった固有の生物学的役割を担う。そのため、各型のポリユビキチン鎖を特異的に定量可能な測定系の確立が望まれる。現在、質量分析計を用いた解析によって、ポリユビキチン鎖各型の定量が可能であるが、高度な分析技術と高額な機器・設備を必要とするため、その適用は一部の研究施設での基礎研究に留まっている。本研究は、実用的なポリユビキチン鎖測定系を確立するため、ポリユビキチン鎖およびその各型(K48型鎖、K63型鎖)を認識する抗体を用いたsandwich ELISA系を検証する。また、この測定系を利用した分析を通じて、プロテオスタシスの状態を反映した老化マーカーとしてのポリユビキチン鎖定量の有用性を検討する。

3. 研究の方法

(1)ポリユビキチン鎖各型に対する測定系の構築

ポリユビキチン鎖を認識するモノクローナル抗体FK2を捕捉と検出に用いたsandwich ELISA(FK2-FK2 ELISA)は、既報(Takada et al. Eur J Biochem 233: 42-7, 1995)の方法の見直しを進め、検出抗体を直接Horseradish peroxidase (HRP)標識するとともに定量の基準となる標準物質にLinear ubiquitin 10量体(LUb10)を採用した。LUb10は、10分子のユビキチンからなるM1型(直鎖型)のポリユビキチン鎖(M1 Ub10鎖)と同等である。鎖型の識別が可能なELISAを構築するため、K48鎖特異的なモノクローナル抗体D9D5(CST)とK63鎖特異的なモノクローナル抗体D7A11(CST)を各々HRP標識し、検出抗体として用いた。ELISA評価のために使用したポリユビキチン鎖は、LUb10の他、ユビキチン8分子からなるK63型鎖、ユビキチン2~16分子が結合したK48型鎖などである。

(2)細胞老化とポリユビキチン鎖量

SETD8阻害による細胞老化

ヒストンH4K20メチル化酵素(SETD8)は、老化を防ぐ機能を有し、その阻害は細胞老化を誘導すると報告されている(Cell Rep 18: 2148-61, 2017)。ヒト表皮角化細胞由来HaCaT細胞を0~10 μMのSETD8阻害剤UNC0379存在下で6日間培養後に回収し、プローブ型の超音波破砕機を用いて1% Triton X-100含有緩衝液で可溶化した易溶性画分とTriton不溶成分を同様の超音波破砕と1% SDS含有緩衝液で抽出した難溶性画分を調製した。各画分のタンパク質はFolin-Lowry法、ポリユビキチン鎖はFK2-FK2 ELISAを用いて各々測定した。同じ条件で培養した細胞の一部は、Hepes含有緩衝液で抽出後、蛍光基質suc-Leu-Leu-Val-Tyr-MCAを用いたプロテアソームのキモトリプシン様活性の測定に供した。細胞老化の指標となるSA-β-gal活性は、X-galを基質としたβ-galactosidase染色によって検出した。

複製老化

細胞集団倍化数(PDL)20のヒト正常繊維芽細胞TIG-1(Exp Gerontol 15: 121-33, 1980)をJCRB細胞バンクのプロトコールに従って複製老化に至るまで継代培養を継続した。その過程

で継代時の細胞数を計測し、随時 PDL を算出した。その他、上掲の HaCaT 細胞の実験と同様の方法に準じて、細胞抽出液中のタンパク質およびポリユビキチン鎖の定量、プロテアソーム活性の測定、細胞老化の検出を行った。

(3) マウス赤血球のポリユビキチン鎖の定量解析

C57BL/6J マウス (20~80 週齢) および老化促進モデルマウス SAMP8 (20~40 週齢) とその対照となる SAMR1 マウスの各オスを維持飼育し、2 週間以上の間隔で後肢の伏在静脈から部分採血し、EDTA-2K で凝固阻害した血液 (0.1~0.2 mL) を得た。全血は PBS で 2 回以上洗浄し、白血球や血小板を除去後、実験に供した。老化赤血球は、幼若赤血球や成熟赤血球よりも高い密度をもつため、不連続 Percoll 密度勾配遠心法を用いて、老化段階が異なる赤血球を調製した。赤血球の抽出、ポリユビキチン鎖の定量には、培養細胞と同様の方法を用いた。

4. 研究成果

(1) ポリユビキチン鎖各型に対する測定系の構築

FK2-FK2 ELISA の交差性は、ポリユビキチン鎖の長さに依存し、ユビキチン 6 分子以上の長さで交差性が最大になることを報告している (Takada et al. Eur J Biochem 233: 42-47, 1995)。今回、10 量体の M1 鎖 (LUb10)、8 量体の K63 鎖 (K63 Ub8)、および 3 タイプの混合型の K48 鎖 (K48 Ub2-16, Ub3-7, Ub2-8) を用いて、各型ポリユビキチン鎖に対する交差性を分析した。その結果、K63 鎖の交差性が M1 鎖や K48 鎖よりも約 4 倍高いものの、3 種類すべてが十分な感度で検出された (図 1)。すなわち、FK2 抗体は、K48 鎖、K63 鎖、M1 鎖をほぼ区別なく認識し、それらの総量の測定に適すると判明した。

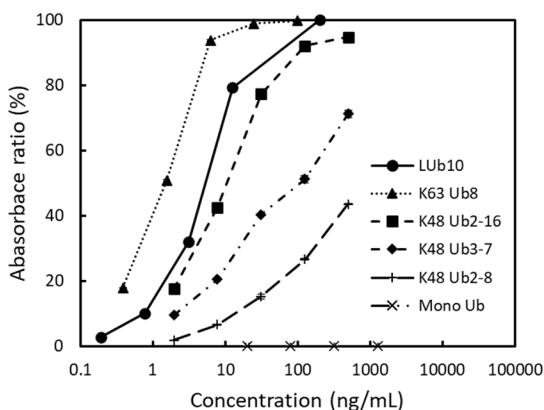


図 1 FK2-FK2 ELISA

鎖型特異的な ELISA を構築するため、捕捉抗体に FK2、検出抗体に HRP 標識した K48 鎖特異抗体 D9D5 または K63 鎖特異抗体 D7A11 を用いた 2 種類の ELISA 系を構築して評価したところ、両系とも抗原に対する結合性が低く、実用レベルの測定感度と精度を得られなかった。市販されているモノクローナル抗体の多くは、液相の抗原に対する高親和性の結合能を保証していない。今回検討した 2 種類の抗体も高感度 ELISA に必要な結合能をもたないと判断した。

(2) 細胞老化とポリユビキチン鎖量

SETD8 阻害による細胞老化

HaCaT 細胞の SA-β-gal 活性は、6 日間の SETD8 阻害剤曝露によって顕著に亢進し、細胞老化の誘導が確認された。また、その際、HaCaT 細胞内のポリユビキチン鎖量の増加 (図 2) とプロテアソーム活性の低下 (図 3) が各々認められた。これらの結果から、SETD8 阻害による細胞老化において、プロテオスタシスの攪乱が生じたものと推定される。

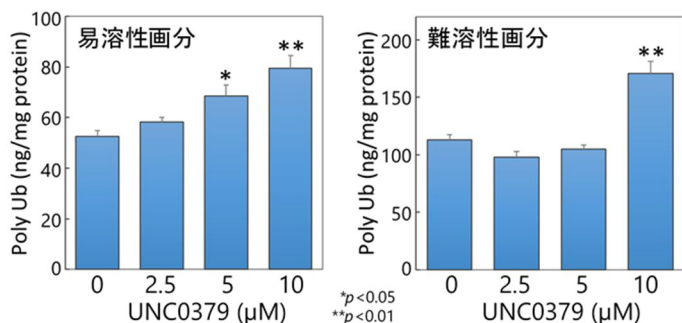


図 2 ポリユビキチン鎖量

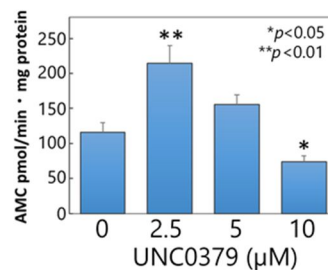


図 3 プロテアソーム活性

複製老化

TIG-1 細胞の継代培養を 70 日以上続けたところ、PDL 62 以降から倍加速度が徐々に遅延し、PDL 74 で分裂を停止した (図 4)。PDL 70 以後の細胞は、扁平な形状に変化し、SA-β-gal 活性が検出されたため、複製老化に至ったことが確認された。継代中の細胞の一部を回収し、細胞抽出液中のポリユビキチン鎖を定量し、若い細胞から老化細胞までの 3 群 (PDL 24~34, 43~56, 62~72, 各群 n=6) 間の測定値を比較したところ、予想に反して有意差を認めなかった (図 5)。TIG-1 細胞のプロテアソーム活性も同様であり、PDL の推移や複製老化に伴う活性の変化を認めなかった。

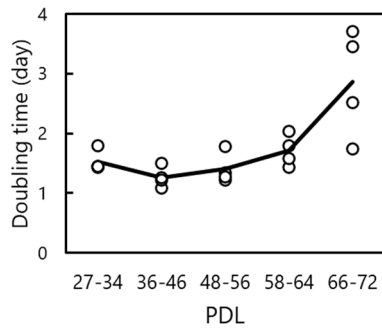


図4 PDLと倍加時間

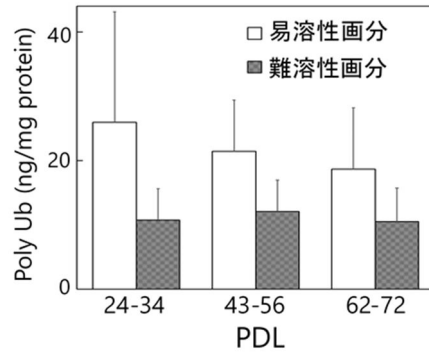


図5 PDLとポリユビキチン鎖量

(3) マウス赤血球のポリユビキチン鎖の定量解析

個体の健康状態を分析するための検体として、低侵襲で入手可能な赤血球を選択した。予備検討の結果、マウスおよびヒトの赤血球は、TIG-1細胞やHaCaT細胞とほぼ同レベルの量のポリユビキチン鎖を含有することと、それらの赤血球にも熱ストレス誘導性のポリユビキチン化反応が存在することが確認された。老齢マウスや加齢性疾患のモデルマウスから得た赤血球のポリユビキチン鎖量を分析したところ、生体内での赤血球の老化に伴う変化と加齢や健康状態に伴う変化の一端が明らかになった。

(4) まとめ

市販抗体を用いた今回の検討では、ポリユビキチン鎖各型に特異的な測定系を構築することができなかったため、今後、目的に適う特異性と結合性をもつモノクローナル抗体を作成したい。FK2-FK2 ELISAは、各種ストレスやプロテアソーム阻害によるポリユビキチン鎖の量的変動を的確に検出できるため、今後もポリユビキチン鎖総量の測定に活用する。正常ヒト繊維芽細胞 TIG-1細胞を用いた今回の実験結果は、同種のヒト細胞 WI38の知見 (J Biol Chem 278: 28026-37, 2003) と異なり、複製老化した細胞もプロテアソーム活性を保持し、細胞内ポリユビキチン鎖の含有量も若い細胞と変わらなかった。この結果から、現在、細胞老化の中には、プロテオスタシスの破綻を伴わないものがあるとの仮説の下、検証を進めている。個体レベルでのポリユビキチン鎖定量に関しては、赤血球の分析の例数を増やすとともに他の組織や体液を用いた検討を追加したい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小針佑介, 小俣和輝, 高田耕司, 加藤尚志
2. 発表標題 増殖性および非細胞の老化とプロテオスタシの関係
3. 学会等名 日本動物学会関東支部 第76回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小針佑介, 平河多恵, 加藤尚志, 高田耕司
2. 発表標題 ポリユビキチン鎖量に基づく脊椎動物細胞のプロテオスタシス評価系の検討.
3. 学会等名 日本動物学会 第93回 早稲田大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小針佑介, 平河多恵, 加藤尚志, 高田耕司
2. 発表標題 線維芽細胞の老化とポリユビキチン鎖の量との関係について.
3. 学会等名 第95回 日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小針 佑介, 平河 多恵, 加藤 尚志, 高田 耕司
2. 発表標題 動物細胞におけるポリユビキチン鎖量の変動と基準値
3. 学会等名 日本動物学会関東支部第74回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 清水秀将, 平河多恵, 松浦知和, 高田耕司
2. 発表標題 SETD8阻害によるHaCaT細胞の細胞老化様現象の解析
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高田耕司, 天沼諒太, 加藤尚志, 平河多恵
2. 発表標題 ポリユビキチン量を指標とした化学物質の細胞毒性評価
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019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	加藤 尚志 (Kato Takashi) (80350388)	早稲田大学・教育・総合科学学術院・教授 (32689)	
研究 分担者	松浦 知和 (Matsuura Tomokazu) (30199749)	東京慈恵会医科大学・医学部・客員教授 (32651)	

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
---------	---------