

研究種目：	基盤研究(C)
研究期間：	2008 ～ 2010
課題番号：	20510192
研究課題名(和文)	メタボリックシンドロームにおける低酸素応答による酸化プロテオミクス
研究課題名(英文)	Proteomic analysis of oxidative stress-responsive proteins in metabolic syndrome
研究代表者	
境 晶子	(Sakai Akiko)
大阪医科大学・医学部・助教	
研究者番号：	30225750

研究成果の概要(和文)：改良型等電点二次元電気泳動法を用いたプロテオミクスの手法によって、低酸素ストレスに応答するタンパク質とその翻訳後修飾の変動を探索した。マウス丸ごとの低酸素ストレス及び酸化ストレスを誘発する糖尿病マウスを用いて、肝臓および心臓で発現が変動するタンパク質を見出した。また、その研究過程で二次元ウエスタンブロット法の陽性スポットを効率よく同定する方法を試みた。

研究成果の概要(英文)：To determine the effects of oxidative stress on metabolic syndrome in vivo, a proteomic analysis was performed in diabetes and control mouse using two-dimensional electrophoresis and MALDI-TOF-TOF-MS. The results showed that differentially expressed proteins with important functions in cellular response to hypoxia were identified compared with normoxia condition. These findings provided new insights into the molecular mechanisms in mediating cellular response to hypoxia.

#### 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生化学・分子生物学

科研費の分科・細目：ゲノム科学・応用ゲノム科学

キーワード：低酸素ストレス、プロテオミクス、等電点二次元電気泳動法

#### 1. 研究開始当初の背景

近年、我が国でも食生活の欧米化と運動不足を背景とする肥満の急激な増加によって、メタボリックシンドロームをはじめとする全身的な代謝異常が増加し、動脈硬化症の重大なリスク要因として注目を集めている。我が国のメタボリックシンドローム該当者は男女合わせて約 1000 万人と推計され、特に男性では 40～74 歳の男性の 1/4 が該当する。メタボリックシンドロームの各疾病は単独

でも生体の酸化ストレスを増大させ、標的臓器では実際に酸化ストレスが増大することが確認されている。さらに最近、酸化ストレスが発症のトリガーとなっていることも示されている。

タンパク質は、リン酸化、アセチル化、グリコシル化などの酵素的な翻訳後修飾を受け、タンパク質の機能、局在、安定性、タンパク質間相互作用などが調節されている。こ

れに加え、ストレスに伴うタンパク質のカルボニル化や脂質過酸化アルデヒド付加などの非酵素的修飾がおこるが、これはタンパク質の異常化を反映し生活習慣病や老化などの病態と密接に関係している。この翻訳後修飾こそゲノム情報からは明らかにならない情報であり、これを網羅的に解析できるのがプロテオミクスである。その解析手段としては大きく分けて二つの手法があり、二次元電気泳動(2-DE)法によってまずタンパク質を分離する方法と、タンパク質の分離は行わずにトリプシン消化混合物を液体クロマトグラフィーで分離し直接質量分析(MS)で同定する方法がある。それぞれ長所・短所があるが、後者は翻訳後修飾が変動した場合、その情報を得にくい。それに比べ前者は、ゲル上のスポット位置の変化として修飾タンパク質を分離できる。さらに、2-DE法として汎用される固定化pH勾配(IPG)法は再現性の低さが問題であるが、我々はこの問題を克服した方法を確立している。

## 2. 研究の目的

メタボリックシンドロームとは、内臓脂肪型肥満によってインスリン抵抗性、糖尿病、高脂血症、高血圧などの代謝異常が起こった状態である。また、これらの疾患には睡眠時無呼吸症候群の合併が多く、低酸素で誘導される酸化ストレスと虚血性心疾患・心不全との関連性が強く示唆されている。本研究の目的は、メタボリックシンドロームにおいて低酸素障害が起こったとき、各臓器のタンパク質発現にどのような量的及び質的(翻訳後修飾)変動が起こるのかを網羅的に解析することである。プロテオーム解析を行う組織としては、標的組織である心臓、インスリン抵抗性に寄与する肝臓をターゲットとし、改良型IPG法を用いて解析する。

## 3. 研究の方法

### (1) 低酸素負荷

窒素と酸素にて濃度を自由に調節でき、さらに短時間・間歇的に低酸素状態にできるアクリルチェンバーを考案し製作した(分担者・林)。常時10%酸素濃度にした低酸素長期曝露と、分単位で低酸素曝露しこれを毎日8時間繰り返した間歇的低酸素曝露状態をつくりマウスを飼育した。

### (2) 改良型 IPG 法

現在汎用される IPG 法は、翻訳後修飾以外の人為的な理由でスポットが分裂すること、再現性の低さ、添加できる蛋白量が少ない(通常ミニゲルで 50  $\mu$ g)などの理由のため MS での同定率が低いという問題点がある。代表者境は神戸学院大学尾谷博士の指導のもと、

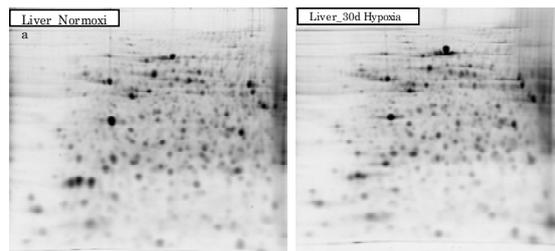
試料の添加方法及び泳動条件を詳細に検討し上記問題点を解決した改良型 IPG 法を習得している。この方法により、タンパク質添加量を 10 倍にすることができ、またクマジーブルー(CBB)染色できるため MS による同定率が飛躍的に増加した(同定率ほぼ 100%)。また、従来の IPG 法では二枚のゲルパターンを定量的に比較する場合、2D-DIGE 法(2~3種類のタンパク質試料を異なる蛍光色素で標識した後混合し、一枚のゲル泳動することでそれらの相対的タンパク質量を比較する)を用いる必要があるが、改良法ではその再現性の良さから直接ゲルをデンストメーターで比較することで解析可能である。しかも、ミニゲルを使用するため一度に多くの試料を解析できる。

(3) 発現変動したタンパク質の同定  
発現変動は Prodigy SameSpots の解析ソフトを用いた。同定は MALDI-TOF /TOF 質量分析(Bruker 社)を用い、ゲル内消化した試料のペプチドマスフィンガープリントとタンデムマス(MS/MS)の両方でタンパク質を同定した。

## 4. 研究成果

### (1) 肝臓における発現変動

①改良型IPG法によるタンパク質プロファイリングシステムを完成させることを目的として、C57BL/6Jマウスを用いて解析を行った。通常酸素濃度及び低酸素で飼育したマウスの肝臓を改良型IPG法で展開し、総タンパク質をCBB染色で検出した。7cmゲルで約500のスポットを検出でき、低酸素によって発現量が有意に変動したスポットは35程度あった。



その内訳は、熱応答、酸化ストレス応答、代謝系酵素、細胞死に関連するタンパク質があった。特に興味深いものとして、GRP78, Apolipoprotein precursor, ATP synthase, Peroxiredoxin, Cytokeratinなどがありそれぞれ翻訳後修飾を示すスポットも発現量が変動していた。

### ②ACE 阻害剤による変動

イミダプリルはアンジオテンシン変換酵素阻害剤で、特に高血圧症と糖尿病に伴う糖尿病性腎症に用いられる薬剤である。低酸素

曝露に応答するタンパク質の発現変動に本薬剤がどのような影響を与えるかをみた。その結果、低酸素曝露によって発現が増加もしくは減少した ATP synthase, Peroxiredoxin, GRP78, Major urinary protein などが本薬剤投与により通常酸素濃度レベルに戻った。

### ③酸化ストレスによる翻訳後修飾の解析

カルボニル化に注目し Western Blot 法による解析を試みた。活性酸素によってアミノ酸側鎖にできたカルボニル基を DNP 修飾しそれを検出したが顕著な差は見られなかった。

一方、糖尿病など多くの疾病で異常がみられる GlcNAc 化/リン酸化について Western blot 法及び Replica blotting 法 (後述) を用いて検討した。GlcNAc 化されたタンパク質の中には、リン酸化は全くうけないスポット、リン酸化と競合するスポット、タンパク質の発現量は変わらず修飾だけが変化するスポットがあり、そのいくつかは HSP タンパク質であった。

### (2) 心臓における発現変動

心臓全体の Lysate では低酸素による発現量の変化がほとんど見られなかった。これは、アクチン、ミオシンなど細胞骨格系のタンパク質の含量が多いためと考えられ、分画が必要と考え、細胞分画を行った。糖尿病は細胞への酸化ストレスを増強させこれが病態の進行にも関与することが分かっている。酸化ストレスを反映するであろうミトコンドリア/ミクロソーム画分を検討した。

糖尿病 db/db マウス、wild マウス、ヘテロマウスの心臓ミトコンドリア/ミクロソーム画分を改良型 IPG 法で展開しタンパク質を染色した。その結果、3 群で 50 スポットが有意に変動し、その内訳は、① db/db マウスで発現量が増加したスポットが 19 個、② db/db マウスで減少したスポットが 17 個、③ ヘテロで増加したが db/db マウスでコントロールレベルに戻ったスポットが 11 個、検出できた。興味深い変動を示したのものとして、ATP synthase があり、本来の分子量及び等電点を示すスポットに加え、翻訳後修飾を示すスポットの発現量も変動していた。翻訳後修飾に関して、詳細な解析を行う予定である。

### (3) Replica blotting 法

2 次元 Western blot 法によって GlcNAc 化修飾を検出できたが、問題点としてタンパク質染色スポットと Western blot の陽性スポットの照合が困難ということがあった。すなわち、お互い濃く染まるスポットが異なるため全く違うパターンとなり、スポットが密集

したところでは Western 陽性のスポットがタンパク質染色のどのスポットに対応するのか判定不可能であった。これを解決するために、Replica blotting 法～泳動した一枚の二次元目ゲルを二枚の PVDF 膜に同時に blot し、一枚を染色しもう一枚を Western blot する～を改良した。原法は泳動後のゲルを 2 枚の PVDF 膜で挟み陽極・陰極を交互に変え blotting に要する時間が 7 時間半であった。blotting 効率や PVDF 膜の染色法を検討することで blotting 時間を短縮させた。それによって、CBB による蛋白染色のパターンとの変動比較が可能となり、またこの方法は様々な二次元 Western blot 法に適用できる。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 10 件)

- 1) Otani M, Taniguchi T, Sakai A, Seta J, Kadoyama K, Nakamura-Hirota T, Matsuyama S, Sano K, Takano M. Phosphoproteome Profiling Using a Fluorescent Phosphosensor Dye in Two-Dimensional Polyacrylamide Gel Electrophoresis. Appl. Biochem. Biotechnol. Mar 8. [Epub ahead of print] 2011 査読あり
- 2) Kimura K, Wada A, Ueta M, Ogata A, Tanaka S, Sakai A, Yoshida H, Fushitani H, Miyamoto A, Fukushima M, Uchiiumi T, Tanigawa N. Comparative proteomic analysis of the ribosomes in 5-fluorouracil resistance of a human colon cancer cell line using the radical-free and highly reducing method of two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. Int. J. Oncol., 37, 1271-1278, 2010 査読あり
- 3) Sawabe Y, Shimamoto C, Sakai A, Kuwabara H, Saad AH, Nakano T, Takitani K, Tamai H, Mori H, Marunaka Y, Nakahari T. Peroxisome proliferation activation receptor alpha modulation of Ca<sup>2+</sup>-regulated exocytosis via arachidonic acid in guinea-pig antral mucous cells. Exp Physiol. 95, 858-868. 2010 査読あり
- 4) Hayashi T, Takai S, Yamashita C. Impact of the renin-angiotensin-aldosterone-system on cardiovascular and renal

complications in diabetes mellitus. *Curr. Vasc. Pharmacol.*, 8, 189-197, 2010 査読あり

- 5) **境 晶子**, 薬剤耐性を獲得した大腸癌細胞株におけるプロテオーム解析, 大阪医科大学雑誌, 69, 39-40, 2010 査読なし
- 6) Takano M, Otani M, **Sakai A**, Kadoyama K, Matsuyama S, Matsumoto A, Takenokuchi M, Sumida M, Taniguchi T. Use of a phosphosensor dye in proteomic analysis of human mutant tau transgenic mice. *Molecular neuroscience*, 20, 1648-1653, 2009 査読あり
- 7) **Yoshida H**, Ueta M, Maki Y, **Sakai A**, Wada A. Activities of Escherichia coli ribosomes in IF3 and RMF change to prepare 100S ribosome formation on entering the stationary growth phase. *Genes to Cells*, 14, 271-280, 2009 査読あり
- 8) Matsumoto C, **Hayashi T**, Kitada K, Yamashita C, Miyamura M, Mori T, Ukimura A, Ohkita M, Jin D, Takai S, Miyazaki M, Okada Y, Kitaura Y, Matsumura Y. Chymase plays an important role in left ventricular remodeling induced by intermittent hypoxia in mice. *Hypertension*, 54, 164-171, 2009 査読あり
- 9) Tanaka S, **Sakai A**, Kimura K, Yoshida H, Fushitani H, Ogata A, Miyamoto A, Fukushima M, Wada A, Tanigawa N. Proteomic analysis of the basic proteins in 5-fluorouracil resistance of human colon cancer cell line using the radical-free and highly reducing method of two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Int. J. Oncol.*, 33, 361-370, 2008 査読あり
- 10) **Hayashi T**, Yamashita C, Matsumoto C, Kwak CJ, Fujii K, Hirata T, Miyamura M, Mori T, Ukimura A, Okada Y, Matsumura Y, Kitaura Y. Role of gp91phox-containing NADPH oxidase in left ventricular remodeling induced by intermittent hypoxic stress. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 294, H2197-2203, 2008 査読あり

[学会発表] (計 10 件)

**境 晶子**、薬剤耐性を獲得した大腸癌細胞におけるプロテオーム解析、第 32 回日本分子生物学会年会、2009 年 12 月 9 日、パシフィコ横浜

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

**境 晶子** (Sakai Akiko)  
大阪医科大学・医学部・助教  
研究者番号：30225750

### (2) 研究分担者

**林 哲也** (Hayashi Tetsuya)  
大阪医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：30257852

**吉田 秀司** (Yoshida Hideji)  
大阪医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：60288735