

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：20101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22906

研究課題名（和文）新規マイクロペプチドMKMP78のマクロファージにおける機能解析

研究課題名（英文）Functional characterization of a novel micropeptide MKMP78 in macrophage

研究代表者

神田 真聡（Kanda, Masatoshi）

札幌医科大学・医学部・講師

研究者番号：40796348

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、我々が独自に発見したヒト腎臓に特徴的に発現する小さなタンパク質の一つであるMKMP78が、免疫担当細胞の一つであるマクロファージでどのような働きを行っているかを調査することを目的としたものである。マクロファージにはいくつかの種類が知られており、各サブセットごとのMKMP78の発現を確認したところ、MKMP78は細胞種ごとに発現量が異なることがわかり、タンパクの存在量も細胞種ごとに異なることが分かった。MKMP78の分子機能を推定するためにMKMP78と結合するタンパク質のスクリーニングを行ったところ、RNA結合タンパク質などと結合することが予測された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々が独自に発見したMKMP78はヒト腎臓に特徴的に発現することが知られていたが、本研究により、それがマクロファージにも発現することおよび、マクロファージにおいてRNA結合タンパクと相互作用している可能性が示唆された。霊長類以降でしか見られないMKMP78の発現は霊長類特有の細胞機能や疾患との関連がある可能性が示唆され、今後のさらなる機能解析および疾患との関連の解析は、新たな病態理解や新規治療法の開発につながっていくことが予想される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated the function of MKMP78, a novel small protein characteristically expressed in the human kidney, in macrophages. There are several subsets of macrophages and the expression of MKMP78 in each subset was different. To investigate the molecular function of MKMP78, we performed screening for the interaction partner of MKMP78 and it was predicted that they would bind to RNA-binding proteins.

研究分野：免疫学

キーワード：マイクロプロテイン マクロファージ

## 1. 研究開始当初の背景

我々は先行研究で **Ribosome foot-printing sequencing (Ribo-Seq)** をヒト腎臓に応用することにより、現在は **long-noncoding RNA (lncRNA)** と分類されているある遺伝子上に約 **78** アミノ酸からなる新規マイクロペプチド(**MKMP78**[仮名])を発見した。mRNA レベルでは **MKMP78** は腎においては尿細管およびマクロファージに特徴的に発現しており、ループス腎炎でその発現が亢進していることが推察された。**MKMP78** カスタム抗体を用いて腎組織を染色すると遠位尿細管を中心に抗体陽性となり内在性発現も確認された。**MKMP78** の分子機能が不明のため、本研究では **MKMP78** がマクロファージにおいてどのような機能を担っているのかについて検討し、ループス腎炎への病態への関与について検討することを目的としている。

## 2. 研究の目的

**MKMP78** がマクロファージにおいてどのような機能を担っているのかについて検討する。

## 3. 研究の方法

**MKMP78** がマクロファージのどのサブタイプでより発現するかを検討し、マクロファージ細胞における細胞内分布の同定と共役分子の同定から **MKMP78** の分子機能を推定し、細胞における表現型(細胞増殖等への影響)を推定する。

(1) **MKMP78** の発現と細胞内分布の評価 **THP-1**(未分化モノサイト)から分化誘導(**M1/M2**)にしたマクロファージで **RT-qPCR** およびウェスタンブロッティングによる発現の評価を行う。さらに、蛍光免疫染色により細胞内分布を評価し、細胞内分布の特徴から分子機能を絞っていく。

(2) **MKMP78** と結合分子の同定 **MKMP78** はマイクロペプチドのため共役分子として働いてい可能性が高い。そこで、**MKMP78** 内在性発現細胞とその細胞の **MKMP78 KD** したもののライセートを **MKMP78** カスタム抗体で免疫沈降し、質量分析を行い結合タンパクを同定する。さらに、同定された結合パートナーに対して免疫沈降を行い **MKMP78** の結合が認められるかを確認する。この実験系の実現が難しい場合は、タグ付き強制発現系を用いて代用する。当初の予定は上記であったが、2の実験系はいずれもうまく機能しなかったため、代替案として **protein interaction screen on peptide matrices (PRISMA)** と呼ばれる **MKMP78** の合成ペプチドフラグメントを用いた共役分子の探索法 (**Dittmar G, et al. iScience 2019**)を行った。

#### 4 . 研究成果

**THP-1** 誘導マクロファージを用いて **MKMP78** の発現量を確認したところ、**RT-qPCR** では単球 < **M0** < **M1/M2** という発現量の違いが確認できたが、**MKMP78** のタンパク発現は **THP-1** よりも **M0** で亢進していたが、**M1/M2** ではほとんど確認できなかった (ウエスタンブロットング・フローサイトメトリ・蛍光免疫染色により評価)。RNA の発現パターンとタンパクの発現パターンとの乖離の原因は明らかにはなっていないが何らかの理由で **MKMP78** の分解亢進が起こっている可能性や **MKMP78** が予測分泌シグナルを有することから **M1/M2** では分泌が起こっている可能性が予想された。また、**MKMP78** の共役分子の探索のため免疫沈降-質量分析を予定していたが、免疫沈降後の純度に問題があり有益な情報が得られにくいと考え、代替案として **protein interaction screen on peptide matrices (PRISMA)** と呼ばれる合成ペプチドフラグメントを用いた共役分子の探索法 (**Dittmar G, et al. iScience 2019**) を行い、**MKMP78** は RNA の結合タンパクと多く結合する可能性が示唆された。**THP-1** マクロファージにおける細胞内分布の評価では主に核内 (および細胞質) に分布することからその予想される機能と細胞内分布に関連が見出された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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			
ドイツ	Max-DeIbruck-Center			