

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 14 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22501035

研究課題名（和文） チオール基の酸化還元を指標にした診断バイオマーカー蛋白質の
同定と検証研究課題名（英文） Identification and validation of biomarker proteins based on
their thiol redox states

研究代表者

川上 隆雄（KAWAKAMI TAKAO）

東京医科大学・医学部・客員准教授

研究者番号：40366117

研究成果の概要（和文）：細胞内の酸化還元反応は、おもに蛋白質システイン残基のチオール基によって調節されている。本研究では、チオール基の酸化度を測定するため、還元型チオール基に特異的に結合する蛍光色素を用いて定量的な化学修飾の反応条件を確立した。また、非還元／還元二次元電気泳動法は、発現蛋白質群の酸化還元状態を包括的に解析するために有用である。この方法の分離再現性を高める工夫として、プラスチックフィルムを裏打ちしたポリアクリルアミドゲルを一次元目に導入した。さらに、公共の配列データベースから特定の翻訳後修飾を含むペプチド断片の情報を抽出するプログラムを開発した。

研究成果の概要（英文）：Cellular reduction-oxidation (redox) states are regulated mainly by the cysteine thiol groups in protein molecules. Using a fluorescent chemical probe specific with reductive thiol groups, we established reaction conditions for quantitative thiol modifications. Non-reduction/reduction two-dimensional electrophoresis is a promising choice towards comprehensive redox state analysis. Polyacrylamide gel strip backing with a plastic film enabled higher reproducibility of the first dimensional separation. In addition, we made a program of extracting peptide information containing selected post-translational modification(s) from public sequence databases.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍診断学

キーワード：酸化還元、プロテオーム、化学修飾、質量分析、翻訳後修飾、配列データベース

1. 研究開始当初の背景

レドックス（Redox）とは還元（Reduction）と酸化（Oxidation）との合成

語であり、レドックス制御という場合には、酸化還元反応を介した細胞機能の制御を意味する。蛋白質を構成するアミノ酸残基のな

かで、システイン残基のチオール基はレドックス制御の中心にあってさまざまな修飾をうけることにより蛋白質の機能調節に関わっている。レドックス制御は、以前は酸化ストレス応答などに限定されていると考えられていたが、それ以外にも発生・分化あるいは発癌などにも関与することが明らかにされつつある。さらに、レドックス状態が細胞の悪性化に伴って量的・質的な変動を起こしていることを示す研究例が近年になって増加している。

本課題の連携研究者は、古くから知られていた非還元/還元対角線二次元電気泳動と、蛍光色素モノプロモビマン (mBBr) によるチオール基特異的な化学修飾 (図 1) を組み合わせ、蛋白質分子中のジスルフィド結合 (S-S 結合) とフリーのチオール基の動態を追跡する方法を開発した。

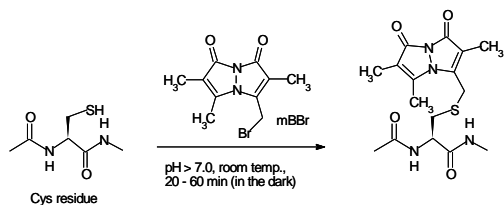


図 1. mBBr によるチオール基の蛍光修飾反応

mBBr は還元型のチオール基に選択的に反応し、S-S 結合をはじめとする酸化型には作用しないことが知られている。研究代表者は、反応した mBBr の蛍光強度と反応性を有しない酸化型チオール基 (おもに S-S 結合) の量との間の逆相関関係を利用し、各チオール基の酸化度を測定する方法を想定した。以上の解析手法を改良・最適化することによって、より定量的なレドックスの測定法を構築することが可能であると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、レドックス反応の中心となっているシステイン残基の酸化還元修飾を包括的に解析する技術を開発する。その特長は、システインの還元型チオール基に特異的に結合する蛍光色素を用いることである。結合色素の蛍光強度と反応性を有しない酸化チオール基の量が逆相関の関係にあることを利用し、各チオール基の酸化度を測定する。

3. 研究の方法

(1) 非還元/還元二次元電気泳動

片面がプラスチックフィルムで裏打ちされたポリアクリルアミドゲルは、GE ヘルスケア社製のものを使用した (ゲル濃度 7.5%、厚さ 0.5 mm、泳動方向の長さ 110 mm)。このゲ

ルをおよそ 9 mm 幅の短冊状に切り取って二次元電気泳動の一次元目を使用した (図 2)。泳動終了後の一次元目ゲルには、50 mM ジチオトレイトール (DTT) を含む溶液で還元処理を施した。二次元目では、一次元目と同じ組成のゲルを切り取らずに平板のまま使用した。

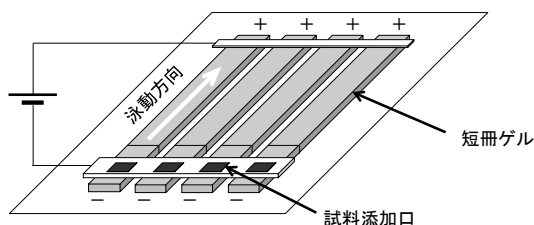


図 2. 水平・短冊型電気泳動の模式図 (一次元目の非還元電気泳動用)

(2) mBBr によるチオール基の化学修飾

標準蛋白質として次の 4 種類を使用した。ウシ血清アルブミン (分子当たり還元型システイン残基 1 個、S-S 結合 17 個)、卵白アルブミン (それぞれ 4 個と 1 個)、ウシカルボニックアンヒドラーゼ 2 (0 個、0 個)、および卵白リゾチーム (0 個、4 個)。各蛋白質 250 pmol を混合し、混合液に 100 nmol の mBBr を添加した。反応は室温かつ暗条件下で行った。

反応溶液のうち、各蛋白質 50 pmol 相当量を 12.5% ポリアクリルアミドゲルの SDS 電気泳動で分離展開した。ゲル上の mBBr 修飾蛋白質は次の条件で検出し、蛍光強度の画像情報を取得した。

- ・励起波長: 365 nm
- ・検出フィルター: 410 nm long pass

(3) mBBr 修飾ペプチドの LC-MS/MS

SDS 電気泳動ゲルの上で検出された mBBr 修飾蛋白質のバンドをゲルごと切り出し、トリプシンによる加水分解を行った。ゲルのマトリックスから抽出したペプチド混合物を液体クロマトグラフィー (LC)-タンデム質量分析 (MS/MS) に供した。LC-MS/MS には LTQ 質量分析計 (サーモフィッシャー社) を用いた。mBBr 修飾残基の同定は、マトリックスサイエンス社の Mascot 検索ソフトウェアを用いて行った。

4. 研究成果

(1) 非還元/還元電気泳動法の改良

非還元/還元二次元電気泳動では、分子内と分子間に S-S 結合をもつ蛋白質はそれぞれ対角線の上側と下側に泳動され、S-S 結合をもたない分子は対角線上に並ぶ。分離条件の

工夫として一次元目のポリアクリルアミドゲルをプラスチックフィルムで裏打ちした。この工夫によって一次元目ゲルの伸縮がなくなり、かつ二次元目への移行が容易になった。結果として分離の再現性が向上し、手技的な熟練に依存しない分離手順が実現した(図3)。

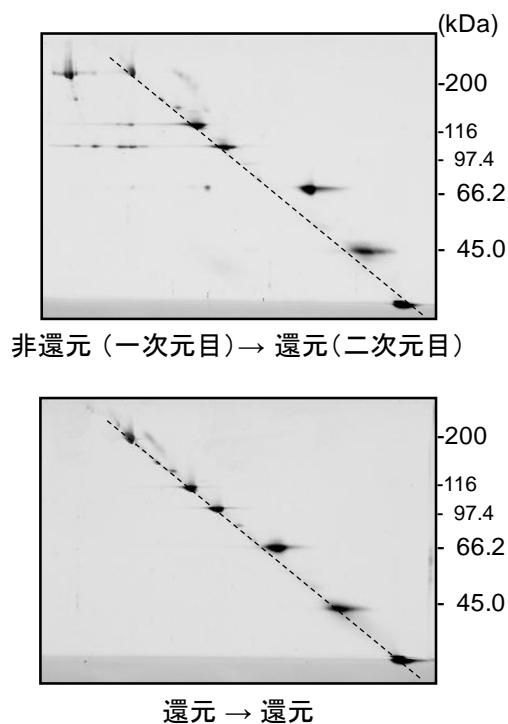


図3. 標準蛋白質の非還元/還元二次元電気泳動像

図3上の電気泳動像では、分子内にS-S結合をもつ2種類の蛋白質(66.2 kDaと45.0 kDa)が対角線の上側に位置している。なお、図3下には対照として両次元ともに還元条件で分離展開した泳動像を示した。

(2) mBBRによるチオール基の化学修飾の定量性

システイン残基の数がわかっている標準蛋白質を用いて、結合率が最大でかつ副反応が最小限にとどまる反応条件を設定した。変性剤を含む弱塩基性の溶液中で、蛋白質分子内の還元チオール基の数に応じた蛍光強度が得られた(図4)。この反応条件の確立によって、チオール基の酸化度を測定するための基本要件が整った。すなわち、反応した蛍光プローブの蛍光強度を測定することによって、反応性を有しない酸化型チオール基の量を見積もることが可能となった。

この化学修飾と上述の非還元/還元二次元電気泳動を組み合わせることにより、チオ

ールの酸化度に関してプロテオームレベルの定量的な差分解析が可能となる。

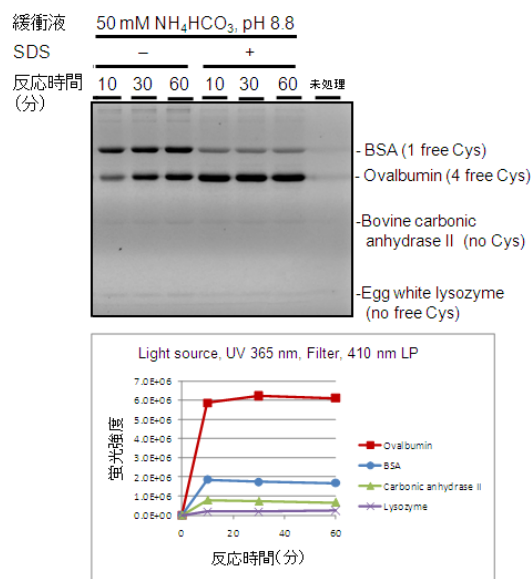


図4. mBBR修飾蛋白質の検出

(3) mBBR修飾システイン残基の同定

チオール基の酸化度の測定技術は、バイオマーカー探索をはじめとする包括的な研究に適用されうる。この場合は、当該蛋白質における修飾システイン残基の位置まで同定する必要がある。そこで、ゲル上に分離されたmBBR修飾蛋白質をトリプシンで加水分解し、生じたペプチド混合物をLC-MS/MSに供した。各ペプチドから取得されたMS/MSデータを配列データベースと照合したところ、還元型システイン残基を含むペプチド断片がmBBRシステインペプチドとして同定された(図5)。

これらのMS/MSデータからは、mBBRシステイン残基の位置まで読み取ることができた。一般の蛍光化合物は構造が大きくかつ複雑であり、MS/MSで開裂を起こしやすい結合を多く含む。一方、mBBRの発色基の構造は比較的単純である(図1)。今回の結果は、その開裂の度合いがペプチド結合に比べて著しく低いことを示唆している。この性質は、質量分析を用いるプロテオミクスにmBBR修飾を適用する上で極めて有利である。

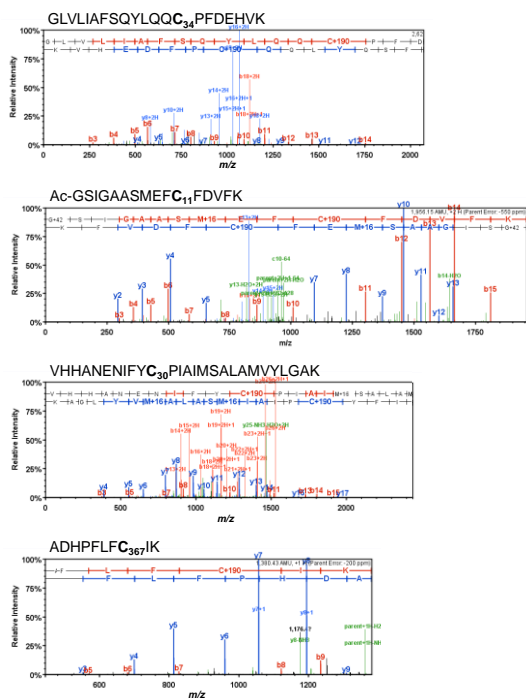


図 5. mBBR で修飾されたシステイン残基の
同定

(4) 配列データベースからの修飾ペプチド 情報の抽出

本研究のテーマであるレドックスや、細胞内シグナル伝達系におけるリン酸化など、蛋白質の翻訳後修飾は細胞状態の制御に重要な役割を担っている。その制御は当該アミノ酸残基における修飾率と関連があることが明らかになりつつある。修飾率の変動を求めるためには、上述の化学修飾と同じように MS/MS を用いて修飾基を含むペプチドを測定する方法が有力である。測定の対象となるペプチドを選択する方法の一つとして、配列データベースから必要な情報を抽出する手順がある。この抽出工程を効率的に進めるため、翻訳後修飾ペプチドの情報抽出プログラムを作成した。

プログラムの機能は次の 3 種類である。

- ①MS/MS データから同定された各ペプチドのアミノ酸配列をデータベース中の修飾注釈と照合し、ペプチド単位で修飾注釈を抽出する。
- ②指定した加水分解規則にしたがってデータベース登録配列を分割して得られたペプチドアミノ酸配列に修飾注釈を付与する。
- ③入力したコンセンサス配列および指定した修飾の種類と位置の情報に全て該当する部分配列をデータベースから抽出する。これらの機能による情報の抽出は、データベース中の全登録配列ばかりでなく、特定の蛋白質

エントリーを対象とすることもできる。また、配列分割の規則には不完全分解の指定機能を設け、現実のプロテアーゼの分解活性を反映させるようにした。

本プログラムを公共データベースの一つである Uniprot に適用した。配列注釈のモデルとして、システイン残基のスルフェン酸 (-SOH)、スルフィン酸 (-SO₂H)、スルホン酸 (-SO₃H)、およびセリン、トレオニン、チロシンの各残基のリン酸化 (-PO₃H) を用い、期待通りの出力が得られることを確認した。

この抽出プログラムは、レドックスのプロテオミクスはもちろんのこと、翻訳後修飾の解析に広く応用することができる。

本研究は翻訳後修飾に焦点を絞った技術開発である。リン酸化やグリコシル化の網羅的な解析が盛んに行われているが、酸化還元注目した解析はその重要性にもかかわらず研究例が少ない。チオール基の酸化還元修飾は蛋白質の構造と機能に密接に関連している。今回開発した方法論は、バイオマーカー探索をはじめとする実用分野にも有力な手段として応用されることが期待できる。

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 5 件)

(1) (査読有) Takao Kawakami and Hiroyuki Yano, Disulfide proteomics: Current status in thioredoxin biochemistry and industrial research, Japan Agricultural Research Quarterly 46(4):277-85, 2012. <http://www.jircas.affrc.go.jp/>

(2) (査読有) Lihua Shan, Shinobu Noritake, Masatoshi Fujiwara, Satoshi Asano, Chikako Yoshida-Noro, Nobuhiro Noro, Keizo Yamashita, and Takao Kawakami (Correspondence), Sec1413 is specifically expressed in mouse airway ciliated cell, Inflammation 35(2):702-12, 2012.

DOI: 10.1007/s10753-011-9363-z

(3) (査読有) Hideaki Kanamori, Takao Kawakami, Kathryn Effendi, Ken Yamazaki, Taisuke Mori, (以下 10 名), Identification by differential tissue proteome analysis of talin-1 as a novel molecular marker of progression of hepatocellular carcinoma, Oncology 80(5-6):406-15, 2011.

DOI: 10.1159/000330734

(4) (査読有) Ran Guo, Takashi Hirano, Takao Kawakami, Yunbo Gong, Masaharu

Nomura, Gaku Yamaguchi, Hisashi Saji, Masatoshi Kakihana, Tatsuo Ohira, and Norihiko Ikeda, Proteins secreted by lung adenocarcinoma cells: Identification of candidate diagnosis markers from culture supernatants of dissected tumor tissue, Japanese Journal of Lung Cancer 50:141-50, 2010.
<http://www.haigan.gr.jp/>
(5) (査読無) Takao Kawakami (Correspondence) and Atsushi Ogiwara, Proteomic biomarker discovery based on statistical analysis using liquid chromatography-tandem mass spectrometry, JSBMS Letters 35(1):4-12, 2010.
<http://www.jsbms.jp/>

[学会発表] (計5件)

- ①川上隆雄. 病態診断のためのプロテオームバイオマーカー: 探索、検証、および大規模スクリーニングへの適用. 第58回質量分析総合討論会、2010年6月16日~18日、つくば国際会議場、つくば.
- ②果然. 肺腺癌組織の培養上清に含まれる分泌蛋白質群からの診断バイオマーカー候補の同定. 日本ヒトプロテオーム機構第8回大会、2010年7月26日~27日、東京ベイホテル東急、東京.
- ③川上隆雄. 肝臓癌形成のプロテオミクス: 二次元液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析による差分解析と新規診断マーカーの同定. 日本ヒトプロテオーム機構第8回大会、2010年7月26日~27日、東京ベイホテル東急、東京.
- ④川上隆雄. プロテオミクスで捕まえる疾患バイオマーカー. 第35回医用マススペクトル学会年会. 2010年9月9日~10日、金城学院大学、名古屋.
- ⑤Takao Kawakami, Differential tissue proteome analysis in hepatocarcinogenesis using comparative two-dimensional liquid chromatography-tandem mass spectrometry, HUP0 9th Annual World Congress, 19-23 Sep. 2010, Sydney, Australia.

[図書] (計1件)

- ①平野久・大野茂雄、講談社、翻訳後修飾のプロテオミクス —質量分析装置を中心とした分析法の原理—、2011年、243ページ。(分担6項目)
- 2.3. 選択的反応モニタリング. 川上隆雄. 31-35.
- 2.4. データベース検索による翻訳後修飾の同定. 川上隆雄. 35-38.
- 3.3. 組織薄切片. 秋本和憲、永坂恵子、岡山明子、川上隆雄. 43-46.

- 4.9. 硫酸化. 川上隆雄. 154-155.
5. デファレンシャルディスプレイ解析. 川上隆雄. 179-187.
- 7.3 翻訳後修飾データベース. 川上隆雄. 219-223.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川上 隆雄 (KAWAKAMI TAKAO)
東京医科大学・医学部・客員准教授
研究者番号: 40366117

(2) 連携研究者

矢野 裕之 (YANO HIROYUKI)
独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・食品総合研究所・ユニット長
研究者番号: 20355580