

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 16 日現在

機関番号：16301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659280

研究課題名(和文) 膜蛋白質 shedding の絶対定量解析基盤技術の確立と慢性炎症反応モニタリング

研究課題名(英文) Absolute Quantification of Transmembrane Protein Shedding and Its Application to the Monitoring of Chronic Inflammation

研究代表者

東山 繁樹 (Higashiyama, Shigeki)

愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・教授

研究者番号：60202272

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000 円、(間接経費) 900,000 円

研究成果の概要(和文)：炎症反応の進行を的確に把握する技術開発を目的として、炎症によって誘導される細胞膜タンパク質のsheddingをフェムトモルレベルで高精度にモニタリングする系の開発を試みた。無細胞合成系を用いてリコンビナント炎症関連膜タンパク質を合成し、これを内部標準として、タンパク質絶対定量を可能とする高感度MRM質量分析系を確立した。この系を用いて各種膜タンパク質を定量し、10ヘムトモルレベルで検出可能である事を確認した。

研究成果の概要(英文)：Ectodomain shedding of transmembrane proteins is induced by inflammatory factors such as chemokines and cytokines. In order to monitor the progress of chronic inflammation, we attempted to establish a monitoring system of the ectodomain shedding using the combination of an originally synthesized internal standard protein mixture and MRM by mass spectrometry. Then, we successfully accomplished the absolute measurement of transmembrane protein contents in mouse tissues at f-mol levels.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：臨床検査システム shedding タンパク質絶対定量 プロテオーム解析

1. 研究開始当初の背景

様々な機能を持つ細胞膜タンパク質は、細胞の内と外の情報交通を制御し、その破綻は細胞の異常な増殖や死を招き、発生異常や疾患発症に直結する。細胞膜タンパク質の発現量は、遺伝子転写のレベルのみならず、翻訳後修飾の一つであり、細胞膜表面で受ける限定的切断(これを Shedding という)により制御を受けることから、Shedding 反応は膜タンパク質を量的かつ機能的に制御するステップとして考えられている。申請者は、世界に先駆けて、細胞膜タンパク質 EGF ファミリーの Shedding が、個体発生や成体維持において極めて厳密に制御されており、Shedding 破綻は、発生異常だけでなく、癌、心疾患や炎症など様々な病態と深く関連することを明らかにしてきた。また、EGF ファミリーの Shedding 酵素を同定し、これを標的分子とした阻害剤開発にも結びつけている。しかし、生体における細胞膜タンパク質の Shedding の実態解明には定量的解析が必須であり、その技術開発はほとんど皆無である。申請者は、これらの課題を解決するために、任意のタンパク質を合成できる、コムギ胚芽による無細胞タンパク質合成システムと、高感度 Multiple Reaction Monitoring (MRM) 質量分析法をリンクさせ、微量タンパク質の絶対定量解析システムを立ち上げた。

近年、MRM 法と呼ばれる質量分析法が、プロテオミクス研究領域において新たな定量分析技術として注目されている。MRM 法は、測定試料中から解析したい標的分子を、その質量情報に基づいて選択的に検出する質量分析法であり、高感度(アトモルからフェムトグラムレベル)で、かつ検出のダイナミックレンジも $10^5\sim 10^6$ と広い。一度の測定で最大 1,000 分子の検出も可能であることから、従来法での検出・定量が困難であった標的タンパク質の正確な定量解析も可能となる。

2. 研究の目的

細胞膜タンパク質の shedding は、様々な炎症メディエーターで誘導され、細胞機能を制御する重要な生体反応である。この事は裏返せば、shedding のモニタリングは、炎症反応のモニタリングに成り得る事を強く示唆している。しかし現在、in vivo における細胞膜タンパク質の shedding の実態を把握するすべがない。よって新たな shedding の定量的測定技術の確立なくしては、慢性炎症のモニタリングへの応用はあり得ない。また膜タンパク質絶対定量技術の開発に加えて、質量分析計の検出感度とダイナミックレンジの

向上は、プロテオーム解析において極めて重要な課題である。従来の質量分析システムでは、複雑なプロテオームの全体像を捉えることはできず、そのため検出感度と検出範囲に優れた解析技術の導入が、本研究の推進には必要不可欠である。

申請者は、連携研究者の武森らとともに、従来法では困難であった膜貫通型タンパク質を中心とする炎症関連タンパク質に特化した安定同位体標識タンパク質ライブラリーの構築を進めている。本研究では、これを内部標準に用いた独自の高感度 MRM 質量分析システムによる絶対定量プロテオミクスの解析基盤を確立する。また、連携研究者の宮崎らは、Fas 欠損変異下で、関節炎、糸球体腎炎、血管炎、唾液腺炎等、種々の膠原病を、個別にあるいは種々の組み合わせで自然発症する組換え近交系マウス群 (MXH/lpr 系統) を、膠原病好発系 MRL/lpr と嫌発系 C3H/lpr マウス間の兄妹交配により樹立してきた。この膠原病モデルマウス群の臓器、組織特異的慢性炎症に関わる炎症関連タンパク質の時空間的発現動態と、炎症関連膜タンパク質 shedding の動的変動を尿及び血液を用いて絶対定量的にモニタリングする。これにより、炎症の慢性化に潜む炎症関連タンパク質の in vivo 動態を明らかにし、新たな慢性炎症反応のモニタリングシステムの構築を目指す。

3. 研究の方法

(1) 安定同位体標識炎症関連リコンビナントタンパク質の作製と絶対定量化への応用:

当大学のコムギ胚芽を用いた無細胞タンパク質合成技術により、タンパク質の安定同位体標識とハイスループット合成システムは、既に確立しており(Proc Natl Acad Sci USA 99,14652, 2002)、本法を用いて行う。また、プロテオリボソーム存在下で合成を行うことにより、従来困難であった複数回膜貫通型タンパク質の合成技術も確立しており(Nat Protoc 5, 227, 2010)、この技術を用いて、定量解析用の安定同位体標識膜タンパク質を合成する。さらに申請者らは、タンパク質合成の際に、N末端に独自に開発したTIPs (Tandem Internal standard Peptides) タグを付加し、TIPs タグを内部標準に用いて、合成タンパク質の絶対量を質量分析計で定量する方法を新たに確立した (Takemori et al., 論文投稿中)。これにより、測定時に使用する内部標準の絶対量を同時定量する。

(2) タンパク質絶対定量技術基盤の確立:

トリプル四重極型質量分析計 (AB-SCIEX QTRAP5500) を用いた MRM 解析システムを導

入し、上記の安定同位体標識内部標準タンパク質と MRM 質量分析法を組み合わせ、マウス組織の定量メンブレンプロテオーム解析システムを確立する。さらに大規模かつハイスルーブットな定量解析の実現に向けて、試料調整法の最適化、MRM データの統計解析ソフトウェアの導入を進める。

4. 研究の成果

(1) 安定同位体標識内部標準タンパク質の作製:

膜型マトリックスメタロプロテアーゼ ADAM ファミリー7種、受容体型チロシンキナーゼ 23種、TNF ファミリー4種、TNF 受容体ファミリー8種、GPCR139種、等を含む263種のマウスタンパク質を小麦胚芽無細胞タンパク質合成系で合成した。また、安定同位体標識アミノ酸として、 $[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}]$ -Lys, $[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}]$ -Arg を用いて標識した。これらの同位体標識アミノ酸の取り込みを MS 解析した結果、図-1 に示す様に ADAM9 で 97.4%、TRPM1 で 97.7%、TNFSF9 で 97.2%であった。以上の結果より、97%以上の効率で、 $[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}]$ -Lys, $[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}]$ -Arg がリコンビナントタンパク質に取り込まれていることを確認した。以後、 $[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}]$ -Lys, $[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}]$ -Arg 標識リコンビナントタンパク質を内部標準タンパク質として用いる事とした。

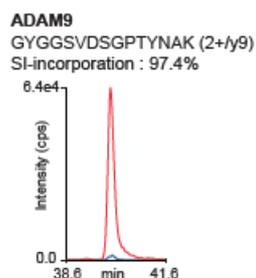


図-1: $[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}]$ -Lys 標識 ADAM9 ペプチド (赤) と、 $[^{12}\text{C}, ^{14}\text{N}]$ -Lys 標識 ADAM9 ペプチド (青) の MS ピーク。両者のピーク比から同位体標識

効率が 97%以上と見積もられた。

(2) 各リコンビナントタンパク質の MS 解析によるプロテオタイプックペプチドの選定:

上記で合成した263種のリコンビナントタンパク質を、SDS-gel 電気泳動&染色後、切り出し、トリプシン分解の後、ペプチドを抽出し、トリプル四重極型質量分析計 (AB-SCIEX QTRAP5500) を用いて MS 解析を行った。その結果、3,039 ペプチドを検出した。一方、キモトリプシン分解の後、ペプチドを抽出し、同様に MS 解析を行った結果、2,134 ペプチドを検出した。トリプシン分解ペプチドでの検出可能なアミノ酸配列は 15%前後であったのに対し、両者の組み合わせにより、検出可能なアミノ酸配列は 20%以

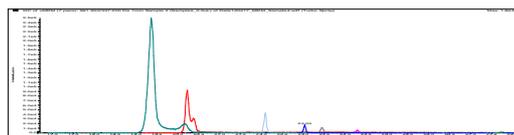
上に達した。特に膜タンパク質の検出には、両者の組み合わせが有効である事が示された。

(3) MRM チャンネルの選定:

上述した 3,039 トリプシン分解ペプチドおよび 2,134 キモトリプシン分解ペプチド情報を基盤とし、各プロテオタイプックペプチドの MRM チャンネルを設定した。そのチャンネル数はトリプシン分解ペプチドで 6324 チャンネル、キモトリプシン分解ペプチドで 4870 のチャンネルの設定が可能であった。

(4) MRM 解析用内部標準タンパク質 QCONCAT の合成と応用

1つの資料から複数のタンパク質を同時に絶対定量するためには、それぞれの同位体標識内部標準タンパク質を測定対象資料に添加し、処理する事が必要となり、測定対象タンパク質が多ければ多いほど、内部標準タンパク質の添加が煩雑となり、定量性を損ないかねない。そこで、上記の解析から得られた、各タンパク質の MRM 測定用のプロテオタイプックペプチドをタンデムに並べた人工タンパク質 QCONCAT をデザインし、これをコードする cDNA を合成した後、上記と同様に N 末端に TIPs タグを付加した形で合成し、測定に用いた。その一例を図-2 に示す。



Color	Seaquence	Q1 (m/z)	Q3 (m/z)
—	AHQYTEAIEYYEAAQK	961.9	337.2
—	YFHHVQQAQAAVGLK	569.3	136.1
—	TGEGFLLVFVSVDTR	775.9	833.4
—	DSEDVPMVLVGNK	705.8	865.4
—	ALEVYDEAYR	619.8	826.3
—	VEDAFYTLVR	611.8	994.4
—	GYSFTTAEK	556.8	136.1

図-2: K-RAS・H-RAS・TTC21A の QCONCAT の MRM 解析

K-RAS・H-RAS・TTC21A の QCONCAT をトリプシン分解後、AB-SCIEX QTRAP5500 を用いて、再度、質量分析をナノフローで行い、高感度&ハイスルーブット性を検討した。その結果、各プロテオタイプックペプチドのシグナル強度に違いは観られるものの、検出レンジ内でシグナルを得ることができた。しかし、ナノフローの不安定性により再現性に乏しい結果となった。そこで、高感度&ハイスルーブット性に劣るが、安定性のあるマイクロ

フローを採用し、再度検討した。その結果、図-2 に示すように、10 フェムトモルオーダーでの感度を再現できる良好な結果を得た。

これを基に条件設定を行い、培養細胞系や個体組織を用いた炎症関連マーカータンパク質の MRM 解析を現在進めている。

(5) マウス個体由来組織を用いた膜タンパク質 MRM 解析の実践。

本研究において作製した安定同位体標識内部標準タンパク質を用いたタンパク質絶対定量 MRM 解析が、生体材料を対象とした解析にどれほど有用であるかを検証する目的で、マウス胎児脳組織 6 領域を用いて、15 種類の神経伝達物質受容体 (Glutamate 受容体 5 種、GABA 受容体 10 種) を定量解析した。その結果、各領域において特徴的な発現パターンを観測した。またその絶対量は、数 fmol~30 fmol/ug total protein であった。この測定値は、既存の因子において従来報告のある数値とほぼ一致する値であった。以上の事から、TIPs タグ付加安定同位体標識内部標準タンパク質を用いた絶対量 MRM 解析は、これまで極めて困難であった膜タンパク質の絶対定量化に極めて有用であると判断した。これにより、膜タンパク質が細胞表面から切り出される shedding 反応のモニタリングが可能となることから、これを慢性炎症のモニタリングに応用できると考えている。

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. Shirato A, Kikugawa T, Miura N, Tanji N, Takemori N, Higashiyama S, Yokoyama M. Cisplatin resistance by induction of aldo-keto reductase family 1 member C2 in human bladder cancer cells. *Oncol Lett.* 7:674-678. 2014 (査読 有)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24527071>
2. Tsukamoto H, Tanida S, Ozeki K, Ebi M, Mizoshita T, Shimura T, Mori Y, Kataoka H, Kamiya T, Fukuda S, Higashiyama S, Joh T. Annexin A2 regulates a disintegrin and metalloproteinase 17-mediated ectodomain shedding of pro-tumor necrosis factor- α in monocytes and colon epithelial cells. *Inflamm Bowel Dis.* 2013 Jun;19(7):1365-73. doi: 10.1097/MIB.0b013e318281f43a. (査読 有)
3. Inoue H, Sakaue T, Ozawa T, Higashiyama S. Spatiotemporal visualization of proHB-EGF ectodomain shedding in living cells. *J Biochem.* 154:67-76. 2013. doi: 10.1093/jb/mvt030. (査読 有)
4. Díaz B, Yuen A, Iizuka S, Higashiyama S, Courtneidge SA. Notch increases the shedding of HB-EGF by ADAM12 to potentiate invadopodia formation in hypoxia. *J Cell Biol.* 201:279-292, 2013. doi: 10.1083/jcb.201209151. (査読 有)
5. Kurokawa M, Ise N, Omi K, Goishi K, Higashiyama S. Cisplatin influences acquisition of resistance to molecular-targeted agents through epithelial-mesenchymal transition-like changes. *Cancer Sci.* 104:904-911, 2013. doi: 10.1111/cas.12171. (査読 有)
6. Ozeki K, Tanida S, Morimoto C, Inoue Y, Mizoshita T, Tsukamoto H, Shimura T, Kataoka H, Kamiya T, Nishiwaki E, Ishiguro H, Higashiyama S, Joh T. Telmisartan inhibits cell proliferation by blocking nuclear translocation of ProHB-EGF C-terminal fragment in colon cancer cells. *PLoS One.* 8:e56770, 2013. doi: 10.1371/journal.pone.0056770. (査読 有)
7. Nakayama H, Fukuda S, Matsushita N, Nishida-Fukuda H, Inoue H, Shirakata Y, Hashimoto K, Higashiyama S. Human antigen R-mediated mRNA stabilization is required for ultraviolet B-induced autoinduction of amphiregulin in keratinocytes. *J Biol Chem.* 288:10338-10348, 2013. doi: 10.1074/jbc.M112.417527. (査読 有)
8. Inoue A, Ishiguro J, Kitamura H, Arima N, Okutani M, Shuto A, Higashiyama S, Ohwada T, Arai H, Makide K, Aoki J. TGF α shedding assay: an accurate and versatile method for detecting GPCR activation. *Nat Methods.* 9:1021-1029, 2012 doi: 10.1038/nmeth.2172. (査読 有)
9. Nakayama H, Fukuda S, Inoue H, Nishida-Fukuda H, Shirakata Y, Hashimoto K, Higashiyama S. Cell surface annexins regulate ADAM-mediated ectodomain shedding of proamphiregulin. *Mol Biol Cell.* 23:1964-1975, 2012. doi: 10.1091/mbc.E11-08-0683. (査読 有)

10. Gooz P, Dang Y, Higashiyama S, Twal WO, Haycraft CJ, Gooz M. A disintegrin and metalloenzyme (ADAM) 17 activation is regulated by $\alpha 5\beta 1$ integrin in kidney mesangial cells. PLoS One. 7:e33350, 2012 doi: 10.1371/journal.pone.0033350. (査読有)

〔学会発表〕(計4件)

1. 東山繁樹、福田信二、 Ectodomain shedding制御とEGFR/Ligandシグナル、第18回 日本病態プロテアーゼ学会 2013年8月16~17日、大阪
2. Takemori N, Takemori A, Higashiyama S. Absolute Quantitative Analysis of Urinary Proteome Alterations Using Wheat Germ Cell Free Protein Synthesis and MRM Mass Spectrometry. HUPO 11th Annual World Congress, Sep. 9~13, 2013, Boston, MA, USA
3. 武森信暁、武森文子、森下了、青島理人、澤崎達也、東山繁樹、コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系を用いた絶対定量プロテオーム解析技術の開発、第65回日本細胞生物学会大会、2013年6月19~21日、愛知
4. Higashiyama S. Ectodomain shedding in EGFR/ligand signaling; regulation, functional implication and imaging. Matrix Metalloproteinases, Gordon Research Conference, May 19~24, 2013, Lucca, Italy

〔その他〕

ホームページ等

http://www.m.ehime-u.ac.jp/data/course/list_detail.php?id=201100000053

6. 研究組織

(1)研究代表者

東山 繁樹 (HIGASHIYAMA SHIGEKI)

愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・教授

研究者番号：60202272

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者

宮崎龍彦 (MIYAZAKI TATSUHIKO)

岐阜大学医学部附属病院病理部・臨床教授

研究者番号：80239384

武森 信暁 (TAKEMORI NOBUAKI)

愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・講師

研究者番号：40533047