

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：13802

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670091

研究課題名(和文) 翻訳後修飾の未標識ダイレクトイメージング

研究課題名(英文) Direct Imaging of Unlabeled Post-translational Modifications

研究代表者

池上 浩司 (Ikegami, Koji)

浜松医科大学・医学部・准教授

研究者番号：20399687

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：生物のからだを構成しているタンパク質の翻訳後修飾を標識せずに直接検出する方法の確立に挑戦した。脳などの神経系を構成するニューロンに豊富なタンパク質と翻訳後修飾を対象に、質量分析による直接検出に必要な諸条件を探索した。組織からのタンパク質抽出を経ない脳組織上での翻訳後修飾の直接検出は達成されなかったが、これまでにない簡便な方法により組織中の翻訳後修飾を直接検出する方法を確立できた。得られた成果は、世界中で発売される英文図書に掲載された。

研究成果の概要(英文)：We aimed to establish a novel technique to detect directly protein post-translational modifications, which occur on many proteins constituting living organisms, without labeling. To this end, we tried to seek out optimal conditions that achieve the direct detection of post-translational modifications by means of mass spectrometry, targeting proteins and post-translational modifications abundant in neurons of the nervous system. We succeeded in establishing a novel and simple method by which post-translational modifications in tissue samples are detected directly, though failing to establish the new technique for the direct detection of post-translational modifications on tissue specimens without extraction of proteins from tissues. Our achievement was published as a chapter of a book written in English, which will be released all over the world.

研究分野：細胞生物学、解剖学

キーワード：質量分析 翻訳後修飾 細胞骨格 微小管 チューブリン 中枢神経系

1. 研究開始当初の背景

- (1) 近年、数多くの生物種のゲノム情報が解読され、それぞれの生物を構成するタンパク質のカタログが次々と明らかになり、生命の理解が深まったと考えられていた。一方で、ゲノム上にコードされたタンパク質の数と、実際に生命体を構成するタンパク質の数には数倍の乖離があり、この乖離を生み出す翻訳後修飾の理解が、より一層重要な課題となっていた。
- (2) 翻訳後修飾の解析において最も一般的な手法として、修飾に対する特異的な抗体を用いた免疫化学的な検出法がある。抗体による翻訳後修飾の検出は、場合によっては抗体が市販されているなど、非常に多くの人々に利用されている。また、免疫組織化学的に組織や細胞内における翻訳後修飾の局在を解析することが可能であり、生化学の領域に留まらず形態学の領域でも大きな力を発揮してきた。
- (3) 一方で、抗体の特異性が低い場合は正確な情報しか得られない、特異性が高い場合でも分子一つずつの正確な翻訳後修飾状態が分かりにくいなど、少なからず欠点が存在していた。質量分析技術はこれらの問題を解決し、正確な修飾状態の解析を可能とした。しかし、質量分析では解析対象のタンパク質を抽出したり、検出したい翻訳後修飾部位を精製したりするなどの煩雑な処理が必要であり、限られた人にしか利用されていなかった。くわえて、従来の方法では組織や細胞内における翻訳後修飾の分布情報が失われてしまい、研究開始当初、翻訳後修飾の局在を直接解析した例はなかった。

2. 研究の目的

- (1) 本研究では、脳内に豊富に含まれ、且つ、特徴的な翻訳後修飾を受ける微小管を材料に、質量分析技術を駆使した翻訳後修飾の直接検出法の確立に向けた条件検討を第一の課題とした。
- (2) くわえて、質量分析を用いた翻訳後修飾の直接検出による解析の対象とする、新しい翻訳後修飾ターゲット、新しい翻訳後修飾、翻訳後修飾の異常が観察される臨床サンプルの探索を並行課題とした。

3. 研究の方法

- (1) 直接質量分析による翻訳後修飾検出の最適化

ブタ脳より調製した微小管を材料に、翻訳後修飾部位の選択的切断に適した消化

酵素を探索した。消化酵素の探索には試験管内における酵素消化を行った。

微小管消化物をイメージング用に酸化インジウムと酸化スズをコートしたスライドガラス (ITO スライドガラス) に載せた後、マトリクスを噴霧し、マトリクス支援レーザー脱離イオン化/飛行時間型質量分析計 (MALDI-TOF/MS) により解析した。異なる種類のマトリクスを試し、翻訳後修飾の検出に適したマトリクスを探索した。

で決定した消化酵素を用いて消化した微小管消化物を異なる量 ITO スライドガラスに載せ、で決定したマトリクスを噴霧し、MALDI-TOF/MS で解析し、翻訳後修飾の検出に必要なチューブリンの分子数を算出した。

- (2) 翻訳後修飾の直接検出に向けた微小管以上に豊富な新規翻訳後修飾ターゲットの同定

マウスの中枢神経からタンパク質を抽出し、微小管と同等以上に存在するタンパク質を精製した。

精製したタンパク質を試験管内で消化酵素 Asp-N により消化した。

タンパク質消化物を高速液体クロマトグラフ質量分析計 (LC-MS) により解析し、新規翻訳後修飾ターゲットタンパク質を同定した。

- (3) 翻訳後修飾の直接検出に向けた新しい翻訳後修飾の探索および局在解析

二次元電気泳動、質量分析の結果から存在が予想されている新しい微小管の翻訳後修飾を検出できる抗体を作成した。

組織内における存在比を定量するために、検量線作成に使用する合成タンパク質を設計し、精製した。

マウスの中枢神経からタンパク質を抽出し、で作成した抗体を用いて、で作成した合成タンパク質と一緒にウェスタンブロット解析を行い、中枢神経系における存在比を調べた。同時に、免疫組織学的解析により組織内で強く局在している領域を調べた。

- (4) 翻訳後修飾直接検出の臨床サンプルへの応用を目指したサンプル探索

開発した手法を臨床サンプルに応用することを目指し、学内の倫理委員会の承認を

得て、神経変性疾患の患者脳を準備した。

検出対象とする翻訳後修飾に対する特異的抗体を用い、免疫組織化学的に解析し、疾患脳で修飾が蓄積している部位を同定した。

4. 研究成果

(1) 直接質量分析による翻訳後修飾検出の最適化

ブタ脳の微小管に豊富なポリグルタミン酸化修飾の未標識直接質量分析を行った。検出に適している消化酵素はエンドプロテイナーゼ Asp-N であった。検出に最適なマトリクスは2,5-ジヒドロキシ安息香酸 (DHB) であった。この条件で、修飾部位の精製を行わず、またマトリクスの噴霧により、MALDI-TOF/MS を用いてポリグルタミン酸化修飾を直接検出することができた (図1)。

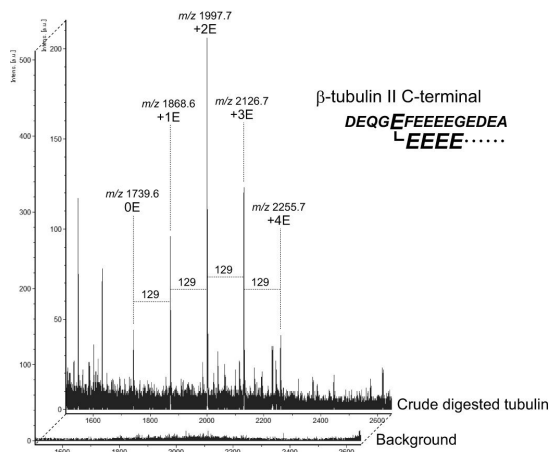


図1. マトリクス噴霧による微小管ポリグルタミン酸化修飾の直接検出

MALDI-TOF/MS によるポリグルタミン酸化修飾の直接検出に必要なチューブリンの分子数を算出した結果、使用するレーザー照射領域あたり 5~10 フェムトモルのチューブリン分子が必要であることが分かった。これはポリグルタミン酸化修飾が最も豊富な絨毛軸系の組織切片上におけるレーザー照射領域あたりのチューブリン存在量 0.2~0.5 フェムトモルから大きく乖離する値であった。

本研究により、微小管のポリグルタミン酸化を組織上で直接検出し、イメージングを行うためには、20~50 倍の検出感度が必要であることが分かった。挑戦の結果、現時点の技術では実現が非常に難しく、イオン化の効率化、検出器の感度向上が必要であることが分かった。

で達成した修飾部位の精製を経ない

MALDI-TOF/MS によるポリグルタミン酸化修飾の直接検出について、英文図書に発表した (図書)。

(2) 翻訳後修飾の直接検出に向けた微小管以上に豊富な新規翻訳後修飾ターゲットの同定

神経系で微小管・チューブリンよりも豊富に存在するタンパク質について、その翻訳後修飾を直接質量分析により検出する可能性を検証した結果、ポリグルタミン酸化修飾の新しいターゲットとして同定できた (図2)。

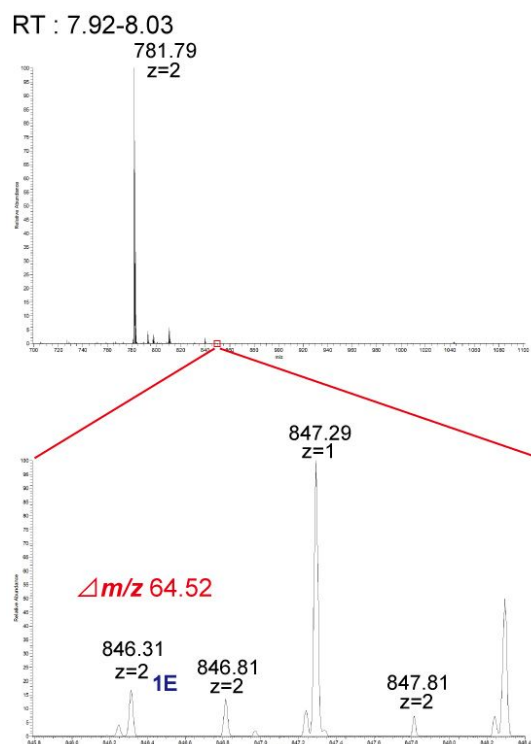


図2. ポリグルタミン酸化修飾の新規ターゲットタンパク質の同定

修飾の基質となりうるタンパク質自体は神経系に豊富である一方、質量分析により検出される修飾されたタンパク質が非常に微量であることが分かり、組織切片上で直接検出することは不可能であることが分かった。

で得られた新しい知見を、学会において発表した (学会発表)。

(3) 翻訳後修飾の直接検出に向けた新しい翻訳後修飾の探索および局在解析

ポリグルタミン酸化修飾以外に質量分析による直接検出の対象となりうる微小管の新しい翻訳後修飾を探索した結果、デルタ3化という新しい修飾の同定に成功した。

中枢神経系におけるデルタ3化修飾の存在比を定量した結果,全チューブリンの2%程度であることが分かった。

中枢神経系においてデルタ3化修飾が集中している領域や部位を探索した結果,神経突起,とりわけ軸索に集中していることが明らかとなった(図3)。

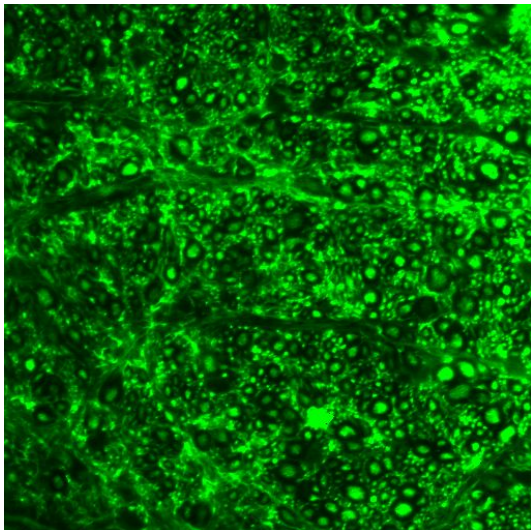


図3. 中枢神経系におけるデルタ3化修飾の局在

~ で得られた成果は,学会において発表した(学会発表)。

(4) 翻訳後修飾直接検出の臨床サンプルへの応用を目指したサンプル探索

翻訳後修飾の直接検出法を応用できる臨床サンプルを探索した結果,微小管の翻訳後修飾が劇的に増加する神経変性疾患を発見した(図4)。

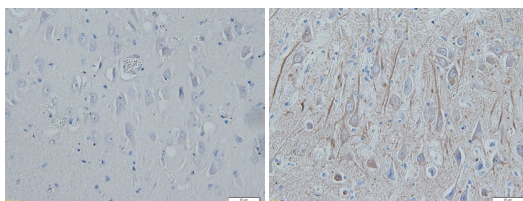


図4. 神経変性疾患における微小管翻訳後修飾状態の亢進(右)

の発見は,学会において発表した(学会発表)。

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0件)

[学会発表](計4件)

Vu Thi Hang, 池上浩司, 瀬藤光利. コ

ニークなモノクローナル抗体を用いたチューブリン翻訳後修飾の解析.第74回日本解剖学会中部支部学術集会,2014年10月11-12日,金沢.

森康子,池上浩司,瀬藤光利.ポリグルタミン酸化の新規ターゲット探索.MD研究者育成プログラム第4回全国合同リトリート,2014年8月22-23日,犬山.

森康子,池上浩司,瀬藤光利.ポリグルタミン酸化修飾の新規ターゲット探索.2015年度MD研究者育成プログラム全国リトリート,2015年3月21-22日,神戸.

池上浩司,Vu Thi Hang,瀬藤光利.新規微小管状態デルタ3化の局在解析.第75回日本解剖学会中部支部学術集会,2015年10月3-4日,福井.

[図書](計1件)

Mori Y ,Konno A ,Setou M ,Ikegami K . Analysis of Post-Translational Modifications and Proteolysis in Neuroscience (Neuromethods vol. 114) (Eds. Jennifer Elizabeth Grant, Hong Li) . Humana Press . 2015 . pp.1-11 .

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.hama-med.ac.jp/mt/setou/ja/laboratory/ikegami/>

<http://researchmap.jp/KojiIkegami/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

池上 浩司 (IKEGAMI KOJI)
浜松医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 20399687

(2) 研究分担者: なし

(3) 連携研究者

瀬藤 光利 (SETOU MITSUTOSHI)
浜松医科大学・医学部・教授
研究者番号: 20302664

杉浦 悠毅 (SUGIURA YUKI)
慶応大学・医学部・講師
研究者番号：30590202

(4) 研究協力者

紺野 在 (KONNO ALU)
日本学術振興会 特別研究員 PD

山崎 文義 (YAMAZAKI FUMIYOSHI)
浜松医科大学・特任助教

Vu Thi Hang (VU THI HANG)
浜松医科大学・大学院生

森 泰子 (MORI YASUKO)
浜松医科大学・JR リサーチアシスタント