

令和 2 年 6 月 24 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2016～2019

課題番号：16K08788

研究課題名（和文）敗血症治療ターゲットとしての炎症制御分子の翻訳後修飾

研究課題名（英文）Analysis of translational modifications of proteins involved in inflammatory signaling in sepsis

研究代表者

村上 泰介（Murakami, Taisuke）

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：40384135

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,700,000円

研究成果の概要（和文）：近年、炎症・自然免疫に細胞内シグナル伝達は、メチル化、アセチル化といったタンパク質の翻訳後修飾がその活性を制御し、敗血症などの全身性炎症性疾患に関与することが示されている。本研究では、細菌感染などの際に放出される細菌成分により、翻訳後修飾に変調を来す従来知られていないタンパク質を同定することで、敗血症の新規治療標的を見出すことを目標として、アセチル化修飾タンパク質のプロテオーム解析を行った。そして289タンパク質が細菌成分刺激により減少、382タンパク質が刺激により増加する傾向を見出した。これらのタンパク質は、敗血症の新しい治療標的の候補となる可能性があるため、今後詳細な解析を検討している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

敗血症は感染によって起こる全身性炎症反応症候群であり、世界中で年間200万人以上が命を落とし、その致死率は30～50%とも言われている。しかしながら、現在のところその症状改善に劇的に奏功する治療法は無い。本研究では、敗血症の病態形成に関わる生体反応の中で、翻訳後修飾によりその機能を制御されるタンパク質を解析し、新たに複数の治療ターゲット候補たる分子を提示した。今後、詳細にその機能を分析することで、新たな治療法・治療薬の開発の土台となることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Modification of proteins such as methylation and acetylation is called post-translational modification, and is involved in regulation of the function of the protein. Recently, it has been found that inflammatory signaling in innate immunity is also regulated by post-translational modifications. The purpose of this study is to identify a novel therapeutic target for sepsis by identifying a previously unknown protein whose post-translational modification is changed by stimulation by components released during bacterial infection. In this study, we performed proteome analysis of acetylated modified proteins and found that 289 proteins tended to decrease and 382 proteins increased when stimulated by bacterial components. These proteins may be candidates for new therapeutic targets for sepsis, and are under consideration for further analysis.

研究分野：生化学・生体防御学

キーワード：敗血症 リポ多糖（LPS） 翻訳後修飾 PTM アセチル化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

敗血症は感染によって起こる全身性炎症反応症候群 (systemic inflammatory response syndrome, SIRS) であり、致命的な経過を辿ることの多い重篤な病態である。その病態形成には、マクロファージ、好中球といった自然免疫担当細胞が重要な役割を果たしている。これらの細胞が持つパターン認識受容体が、リポ多糖 (LPS) などの微生物由来の病原因子:PAMPs によって活性化されると細胞内へシグナルが伝わり、NF- κ B などの転写因子の活性化と、TNF- α をはじめとした多彩な炎症性メディエーターの産生が敗血症性ショックの引き金となることが知られている。近年、このような敗血症の病態形成に関わる分子の制御に、リン酸化だけではなく、メチル化、アセチル化、O-GlcNAc 修飾、ユビキチン化といった翻訳後修飾が大きな影響を及ぼしていることが注目されている。例えば、天敵因子 NF- κ B のメチル化はその活性を抑制し、アセチル化は増強することが示唆されている。また、NF- κ B や SP1 の O-GlcNAc 修飾が炎症を調節していることが報告されている。このように、転写因子などの修飾による機能調節は、炎症応答の強弱に関与する重要なファクターとなる。しかしながら、特に敗血症のような全身性炎症反応の病態において、これらの制御分子の翻訳後修飾をターゲットとした病態改善への試みは、これまでに十分になされていない。

2. 研究の目的

敗血症性ショックのメディエーターを制御して治療する試みは、世界的に精力的な研究が行われている。過去に実際に臨床的に使用されたものとしてヒト活性型プロテイン C (drotrecogin alfa, Xigris) があるが、その効果は弱く、重症敗血症・敗血症性ショック患者に対して有効な作用を示すことができなかったとして上市後に自発的撤退を余儀なくされている。従って、新たな創薬ターゲット分子の探索と、それらを応用した敗血症の新規治療法の開発が強く期待されている状況にある。我々は、前年度までヒストン脱アセチル化酵素ファミリーの一種であるサーチユインが、敗血症の病態形成に重要である炎症性サイトカインの制御に深く関わっていることを明らかとしている。また、炎症応答に深くかかわる転写因子 NF- κ B がメチル化、アセチル化修飾によってその活性を制御されることが既に知られているが、敗血症において NF- κ B 以外に翻訳後修飾によって制御される分子を新規に同定できれば、それは即ち新たな治療ターゲットとなる可能性がある。そこで、免疫担当細胞、特に炎症応答において重要なマクロファージ系細胞を細菌成分で刺激し、翻訳後修飾 (アセチル化) の変化を nanoLC と四重極質量分析計を組み合わせて解析し、新たな治療ターゲットとなるタンパク質を探索することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) グラム陰性菌感染による敗血症において、マクロファージは IL-6 や TNF- α といった主要な炎症性サイトカイン産生を担い、その病態形成に重要である。マクロファージが微生物由来の成分により刺激される過程で翻訳後修飾 (アセチル化) を受けるタンパク質を解析するために、マウスマクロファージ系細胞株 RAW264.7 細胞を大腸菌 E.coli 0111:B4 由来のリポ多糖 (Lipopolysaccharide; LPS) で刺激し、一定時間後に細胞を回収、溶解し、抗アセチル化リジン抗体を固定化したビーズを用いて免疫沈降を行い、アセチル化タンパク質を濃縮した。その後、SDS-PAGE/Western blotting により刺激時間、LPS 濃度の条件検討を行った。

(2) 細胞数、培養条件をスケールアップし、得られた条件で刺激した細胞より、同様に免疫沈降法でアセチル化タンパク質を濃縮した。サンプルを還元・アルキル化した後、Trypsin/Lys-C で消化し、nanoLC-MS/MS により分析を行った。得られたデータから MaxQuant 1.6.10.43 を用いてタンパク質同定と定量的重み付けを行い、Perseus 1.6.14.0 を使用して翻訳後修飾データの解析、統計解析などのインフォマティクス解析を、オンラインパスウェイデータベースである Reactome を利用してパスウェイ解析を行った。

4. 研究成果

(1) 大腸菌 LPS 刺激の一定時間後の RAW264.7 細胞ライセートより抗アセチル化リジン抗体によって免疫沈降したサンプルを、別の抗アセチル化リジン抗体により検出し、得られたバンドからアセチル化タンパク質の総量に変化があるか検討した。その結果、2 時間、6 時間後のサンプルに検出されたバンドで未刺激と比較してアセチル化タンパク質の総量が増加した。

(2) 上記 (1) の結果から、LPS により 2 時間刺激後の RAW264.7 細胞ライセートをスケールアップして調整し、未刺激細胞ライセートと共に抗アセチル化リジン抗体によりアセチル化タンパク質を濃縮した。そして nanoLC-MS/MS によるプロテオーム解析を行ったところ、およそ 700 余りのタンパク質が抗 Acetyl-Lys 抗体特異的に検出された。そのうち 289 タンパク質は LPS 刺激により減少、382 タンパク質は LPS 刺激により増加の傾向がみられた。オンラインパスウェイデータベースである Reactome を用いてパスウェイ解析を行ったところ、主に Metabolism、Metabolism of proteins、Immune System、Post-translational protein modification、Signal Transduction に関与する分子であった。ボルケーノプロットから未刺激、LPS 刺激間で特に大きな差がみられたタンパク質を選別したところ、Histone H4、HAT EP300、KAT7 と言った、アセチ

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
研究分担者	射場 敏明 (Iba Toshiaki) (40193635)	順天堂大学・医学部・教授 (32620)	
研究分担者	長岡 功 (Nagaoka Isao) (60164399)	順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・教授 (32620)	