

機関番号：82643

研究種目：若手 (B)

研究期間：2009 ~ 2010

課題番号：21791728

研究課題名 (和文) 加齢黄斑変性におけるユビキチン化の解析

研究課題名 (英文) Analysis of protein ubiquitination for age related macular degeneration.

研究代表者

岡本 はる (OKAMOTO HARU)

独立行政法人国立病院機構東京医療センター・(臨床研究センター)・分子細胞生物学研究部・研究員

研究者番号：40374160

研究成果の概要 (和文) : 加齢黄斑変性におけるタンパク質のユビキチン化について、ARPE-19 細胞を用いた解析及び、加齢黄斑変性患者由来の血漿のプロテオミクス解析から、以下の点を明らかにした。1) 酸化修飾を受けた脂質及びタンパク質を含む視細胞外節の、RPE 細胞における食食は、ユビキチン-プロテオソームシステムに影響を及ぼす。2) AMD 患者血漿中にユビキチンまたはユビキチン化タンパク質由来のペプチドが検出されたが、疾患特異的ではなかった。

研究成果の概要 (英文) : To examine the protein ubiquitination for age related macular degeneration, analysis of phagocytosis using ARPE-19 cells and proteomic analysis of plasma sample from patients with AMD were performed. These analyses reveal the following results 1) Phagocytosis of photoreceptor outer segment with oxidized lipids affects ubiquitin-proteasome system in RPE cells. 2) Peptides from ubiquitin / ubiquitinated proteins were detected in plasma samples from patients with AMD. But detection of ubiquitin was not specific for AMD.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：老化、ストレス、蛋白質、プロテオーム、細胞・組織

1. 研究開始当初の背景

加齢黄斑変性 (age related Macular Degeneration, AMD) の特徴は、網膜の中心部にある「黄斑」において、網膜色素上皮 (Retinal Pigment Epithelium, RPE) 細胞とブルッフ膜との間に、ドルーゼンと呼ばれる多形性物質が蓄積することである。

ドルーゼンの蓄積には、加齢に伴う RPE

細胞の機能低下が関与していると考えられている。視細胞の外節には、光を受容する膜性円板が規則的に並んでいるが、その先端では、古くなった円板を RPE 細胞が食食し、視細胞の恒常性の維持を担っている。しかし、食食の過程で一部が分解せず残り、結果として、リポフスチンと呼ばれる難溶性の物質が RPE 細胞内に蓄積することとなる。リポフス

チンは、主に酸化修飾を受けたタンパク質と脂質から成り、その主要成分である A2-E は、RPE 細胞の食食作用に重要なリソソームの機能低下を招くことが示されている (Finnemann et al. 2002 *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 99: 3842-3847.)。

細胞内でのタンパク質分解には、2 種類の機構に大別される。一方は、非選択的タンパク質分解を担うリソソームシステムである。細胞質画分を膜で囲み、膜胞がリソソームと融合して、タンパク質分解を行う。RPE 細胞が視細胞外節を食食する際も、この機構が働いている。そしてもう一方は、選択的タンパク質分解を担うユビキチン-プロテオソームシステムである。ユビキチンは、対象となるタンパク質に、複数のタンパク質を介して特異的に結合し、ポリユビキチン鎖を形成(ユビキチン化)する。ポリユビキチン鎖は分解認識のタグとして働き、プロテオソームに捕捉され、タンパク質の分解が行われる。

これまで、RPE 細胞におけるタンパク質分解の研究では、多くが視細胞外節の食食に関与する、リソソームシステムに関して行われてきた。しかし、タンパク質分解は、細胞の生存に必要不可欠な機構であり、両方の機構の正常な働きから成り立っている。実際、ヒト網膜色素上皮細胞株である ARPE-19 を用いた研究からは、酸化ストレスにより、タンパク質のユビキチン化の亢進が示されている (Zhang et al. 2008 *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 49: 3622-3630.)。また、神経変性疾患のアルツハイマー病 (Mori et al. 1987 *Science.* 235: 1641-1644.) やパーキンソン病 (Kuzuhara et al. 1988 *Acta Neuropathol.* 75: 345-353.) では、ユビキチン化し、不溶化したタンパク質が、細胞内封入体として見出されているが、AMD についても、免疫組織染色法により、ドルーゼンにおけるユビキチンの存在が示されている (Loeffler and Mangini 1997 *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 235:248-254.)。更に、本研究室の梅田らによって同定されたカニクイザル由来のドルーゼンには、ユビキチン配列を含むタンパク質も含まれていた (Umeda et al. 2005 *FASEB J.* 19:1683-1685.)。

2. 研究の目的

AMD の発症機序に関して、ユビキチン-プロテオソームシステムの関連を解析する。具体的には、酸化修飾を受けた脂質及びタンパク質の、RPE 細胞への影響について解析する。

また、本研究に先立ち行った、AMD 患者における血漿タンパク質の解析において、ユビキチン由来のペプチドが同定されたことから、本研究では、血漿解析についても更に解析を行った。

3. 研究の方法

①UV 照射ブタ視細胞外節による細胞への影響

ARPE-19 細胞における細胞培養ユビキチン化の解析を行った。

ブタ網膜から視細胞外節 (POS) を分離し、UV に 4 時間曝露した。UV 曝露後、POS には、pHrodo (succinimidyl ester) を添加した。これは、pH が酸性側に变化すると蛍光を示すマーカーであり、RPE 細胞の食食作用によって、POS がリソソームに取り込まれると、リソソーム内が酸性であることによって、蛍光を示し、食食されたことを観察することが可能となる。コントロールとして、UV 処理を施していない POS についても pHrodo (succinimidyl ester) の処理を行った。

ARPE-19 細胞の培養液にマーカーを付けた POS を添加した。コントロールとして、POS を添加しないウェル及び UV 未処理の POS を添加したウェルを用意した。また、ユビキチン化したタンパク質の量を明らかにするために、ユビキチン化タンパク質の分解を行う 20S proteasome に対する阻害剤の 1 つである「clasto-Lactacystin β -Lactone」を添加したウェルも、UV 処理、未処理の各々の POS について用意した。POS 添加後 18 時間において、細胞からタンパク質を回収し、タンパク質の濃度を測定した。抗ユビキチン抗体を用いて、ウエスタンブロッティングにより、細胞内のユビキチン化タンパク質の量を比較した。POS の細胞内への取り込みは、前述のマーカーの蛍光を、POS 添加後、顕微鏡下で観察し、確認した。

②AMD 患者血漿中のユビキチンの解析

本研究に先立ち行った質量分析による、AMD 患者の血漿解析では、コントロールに対し、AMD 患者 10 人分の血漿サンプルをまとめた検体にのみ、ユビキチンのペプチドが同定された。そこでユビキチン化タンパク質あるいはユビキチンが、AMD の疾患マーカーになるか調べるために、本研究では、複数の AMD 患者の血漿について、まとめず、個々に解析を行った。

血漿サンプルの質量分析においては、血漿に含まれるアルブミンをはじめとする数種類の高含有タンパク質が、低濃度タンパク質の検出を困難にしている。そこで本研究では、高含有高分子タンパク質を取り除くために、中空糸モジュールによるタンパク質の分画を試みた。

血漿 1ml を重炭酸アンモニウムバッファーで 4 倍に希釈した。その後、希釈サンプルは、中空糸 (50kDa-MWCO) に打ち込み、中空糸を透過した低分子画分を回収した。低分子画分に含まれるタンパク質は、エバポレ

ータ及び TCA/アセトン沈殿によって濃縮し、濃度を測定した。AMD は3検体、コントロールについては6検体用意した。これらの低分子画分は、SDS-PAGEによって、低分子タンパク質が濃縮されていることを確認した。泳動後、ゲルは、分子量によって8片に切り分け、各々トリプシンによってゲルからペプチドを回収した。ペプチドは、LC-MS/MSを用いて質量分析を行った。

質量分析の結果得られたデータの解析には、Bioworksを用い、タンパク質を同定した。データベースは、UniProtKB/Swiss-Protを使用した。

4. 研究成果

①UV 照射ブタ視細胞外節による細胞への影響

UV 曝露後の POS を添加した細胞では、UV 未処理に比べ、ユビキチン化タンパク質の量が減少していた。一方、プロテオソームの阻害剤を細胞に加え、ユビキチン化タンパク質の分解を阻害したウェルでは、ユビキチン化タンパク質の量は、UV 処理後の POS の添加と未処理の POS 間で、変化は認められなかった。この結果から、UV 処理された POS を添加した ARPE-19 細胞では、ユビキチン化タンパク質の分解が亢進され、ユビキチン化タンパク質が減少されたと考えられる。

酸化脂質の取り込みは、短時間ではプロテオソームの活性を増加することが示され、酸化脂質の RPE 細胞での取り込みは、リソソームシステムだけでなく、ユビキチン-プロテオソームシステムにも影響を与えるものであることが示唆された。

②AMD 患者血漿中のユビキチンの解析

血漿解析の結果 AMD3 検体のうち、2 検体からユビキチン由来のペプチドが同定された。しかし、コントロールの 1 検体においても、ユビキチン由来のペプチドが同定された。この結果から、ユビキチンあるいはユビキチン化タンパク質は、AMD の疾患特異的マーカーとならないことが示された。一方で、AMD 患者において、ユビキチン化タンパク質の分解がコントロールに比べ大幅に亢進されているとすれば、AMD 由来のサンプルでは、むしろユビキチン由来のペプチドの検出が低下、あるいは検出されない結果が予想され、今回の結果と矛盾する。AMD におけるユビキチン化タンパク質の蓄積については、更なる解析が必要である。また、ユビキチンとユビキチン化タンパク質のどちらが血漿中に含まれているのかを明らかにし、ユビキチン化タンパク質であった場合には、修飾を受けたタンパク質の同定も重要である。

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0件)

[学会発表] (計1件)

発表者：岡本はる

発表表題： ENRICHMENT AND ISOLATION OF LOW MOLECULAR WEIGHT PROTEIN IN PLASMA FROM PATIENTS WITH OCULAR DISEASES USING A PROTEIN SEPARATOR

学会名： International Society for Eye Research

発表年月日：2010年7月20日

発表場所：モントリオール、カナダ

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡本 はる (OKAMOTO HARU)

研究者番号：40374160

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：