

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：32713

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790563

研究課題名(和文) 翻訳後修飾アセチル化に着目した「新規関節リウマチ検査」の確立

研究課題名(英文) The establishment of 'novel clinical examination for rheumatoid arthritis' by focusing on acetylation of proteins

研究代表者

有戸 光美 (Arito, Mitsumi)

聖マリアンナ医科大学・医学部・助教

研究者番号：00509911

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：関節リウマチ(RA)診断では、検査項目を補完するような新規検査項目が必要とされている。申請者は、RA患者の末梢血において特定の蛋白質のアセチル(Ac)化が亢進していることを突き止め、RAでAc化が亢進している蛋白質として、alpha-enolase(ENO1)などを同定した。次に、AcENO1の診断指標としての有用性を評価するのに必要なAcENO1抗体を作製するために、RA特異的に亢進しているENO1のAc化部位の特定を試みたが、特定まで至らず、今後の検討課題となった。また、ENO1のアセチル化による抗原性への影響を検証したところ、Ac化依存的に抗原性の変化は認められなかった。

研究成果の概要(英文)：Post-translational modifications (PTMs) are often critical for diagnosis of diseases. Thereby, we here tried to elucidate alteration of PTMs in RA, focusing on acetylation in this study. We applied acetyl-proteomics to peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) to elucidate PTM difference between patients with RA and healthy. Multiple proteins in PBMCs were highly acetylated in the RA groups. One of the proteins predominantly acetylated in the RA group was identified to be ENO1. Next, we tried to identify acetylated lysine residues, but we could not detect RA-specific acetylated peptides of ENO1. This would be technical limitation of mass spectrometric analysis at present. In the future, it would be needed to establish more effective methods to identify acetylated lysine residues. Next, we examined whether acetylation affect the antigenicity of ENO1 in patients with RA. As a result, the reactivity was not different between the acetylated ENO1 and the non-acetylated ENO1.

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：プロテオミクス 翻訳後修飾 アセチル化 関節リウマチ 臨床検査

1. 研究開始当初の背景

(1) 関節リウマチ診断における臨床血液検査の例

関節リウマチ診断のための臨床血液検査では、血清中の抗シトルリン化ペプチド抗体・リウマチ因子の検出などが採用されているが、十分とは言えない。従って、従来の検査項目を補完するような新規検査項目が必要とされている。

(2) なぜ関節リウマチでアセチル化を指標とするか。

関節リウマチでは、病変部におけるシトルリン化蛋白質の増加や IgG の糖鎖異常など一部の翻訳後修飾の異常が報告されており、その他の翻訳後修飾にも異常のある可能性がある。最近、関節リウマチ患者で脱アセチル化酵素の発現・活性の低下が報告された (Huber et. al. (2007) Arthritis Rheum, 56, 1087-1093)。これはとりもなおさず、関節リウマチで蛋白質のアセチル化が亢進している可能性を示しており、アセチル化蛋白質探索の必要性を示唆している。さらに、このアセチル化亢進蛋白質もしくはそれに対する自己抗体が見つければ、検査項目の対象候補となりうる。

(3) 申請者らのこれまでの研究

申請者らは、これまでにリン酸化やシトルリン化などの特定の翻訳後修飾に着目して、蛋白質の網羅的探索を展開し、病態関連分子を同定するなどの成果をあげている (Matsuo & Arito et. al (2011). Ann Rheum Dis, 70, 1489-1495, Matsuo et. al. (2006) Arthritis Res Ther, 8, R175-188)。また、申請者らは、これまで網羅的解析の対象とされていなかったアセチル化を指標として蛋白質網羅的解析を確立した (日本プロテオミクス学会 (2010) および WHUPO (2010) にて発表)。実際に、関節リウマチ患者および健常者の血液より分離した末梢血リンパ球を用いて、アセチル化プロテオミクスを行ったところ、関節リウマチ患者でアセチル化が亢進している蛋白質が複数見出された。

このアセチル化亢進蛋白質もしくはそれに対する自己抗体は、臨床診断の対象候補となりうる。

2. 研究の目的

本研究では、蛋白質のアセチル化の測定法を確立し、アセチル化測定が関節リウマチの診断的意義を明らかにし、臨床検査としての有用性を検証することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 関節リウマチにおけるアセチル化亢進蛋白質の同定

健常者と比較し、関節リウマチ患者末梢血リンパ球でアセチル化が増強しているタンパク質を回収し、トリプシンで消化後、

MALDI-TOF/TOF 型質量分析器を用いて同定する。

(2) 同定アセチル化蛋白質の診断指標としての有用性の評価

同定アセチル化蛋白質の「アセチル化を受けているリジン残基とその周辺のアミノ酸配列」を認識する抗体の作製

アセチル化同定蛋白質の検出の特異度・感度をより高くするために、抗アセチル化ペプチド抗体を作製する。

流れ[1] 同定蛋白質のアセチル化部位 (リジン残基) を特定する。

測定時、修飾を保持したままペプチドの断片化が可能な ETD モード (Froelich JM et al. (2009) Comb Chem High Throughput Screen., 12, 175-184.) を搭載した LC/MS を駆使して、同定蛋白質のアセチル化部位を特定する。

[2] [1] をもとに、「アセチル化を受けているリジン残基とその周辺のアミノ酸配列」を含むペプチドを合成し、アセチル化ペプチド抗体を作製する。

抗アセチル化ペプチド抗体の有用性の評価

抗アセチル化ペプチド抗体が、関節リウマチ検体にもみ反応するかについて調べるために、関節リウマチ患者由来の末梢血リンパ球の細胞溶解液をサンプルとし、アセチル化抗体を用いて、ウエスタンブロッティングもしくは ELISA を行う。

(3) 同定アセチル化蛋白質に対する自己抗体の診断指標としての有用性の評価

同定アセチル化蛋白質が、関節リウマチ特異的な自己抗体の抗原となりうるかについて調べるために、同定アセチル化蛋白質をサンプルとし、関節リウマチ患者血清を用いて、ウエスタンブロッティングもしくは ELISA を行う。同定アセチル化蛋白質は、すでに確立している In vitro acetylation の系により、準備する。リコンビナントで作製した同定蛋白質に、In vitro でアセチル化酵素およびアセチル CoA を作用させ、リコンビナント同定蛋白質を効率的にアセチル化させる。

4. 研究成果

(1) 関節リウマチにおけるアセチル化亢進蛋白質の同定

申請者グループは、関節リウマチ患者の末梢血において特定の蛋白質のアセチル化が亢進していることを突き止めた。まず、関節リウマチ患者末梢血リンパ球で、アセチル化が亢進している蛋白質を回収し、トリプシンで消化後、MALDI-TOF/TOF 型質量分析器を用いて同定した。その結果、関節リウマチでアセチル化が亢進している蛋白質として、 α -enolase (ENO1) とイソクエン酸デヒドロゲ

ナーゼ (IDH1) が同定された。

(2) 同定アセチル化蛋白質 EN01 の診断指標としての有用性の評価

同定アセチル化蛋白質 EN01 の診断指標としての有用性を評価する目的で、EN01 の「アセチル化を受けているリジン残基とその周辺のアミノ酸配列」を認識する抗体を作製するために、関節リウマチ特異的に亢進している EN01 のアセチル化部位 (リジン残基) の特定を試みた。まず、LC-MS を用いて、健常者末梢血リンパ球で EN01 のアセチル化部位の特定を試みた結果、120 番目と 126 番目のリジン残基がアセチル化されたペプチドと 256 番目のリジン残基がアセチル化されたペプチドが検出され、健常において EN01 は、120、126、256 番目のリジン残基でアセチル化されていることが明らかとなった。

次に、関節リウマチ患者末梢血リンパ球を用いて、同様の検討を試みたが、現時点で、関節リウマチ特異的にアセチル化されたペプチドの検出には至っていない。被験試料である EN01 の調製法 (EN01 量やプロテアーゼの種類など) や質量分析の条件等を複数検討し、関節リウマチ由来末梢血リンパ球由来 EN01 のアセチル化部位の特定を試みたが、関節リウマチ特異的なアセチル化ペプチドの検出は困難であった。

(3) 同定アセチル化蛋白質 EN01 に対する自己抗体の診断指標としての有用性の評価

EN01 が、関節リウマチ特異的な自己抗体の抗原となりうるかについて調べるために、EN01 およびアセチル化 EN01 を抗原とし (アセチル化 EN01 は、リコンビナントで作製した EN01 に、in vitro でアセチル化酵素およびアセチル CoA を作用させ、効率的にアセチル化させることで調製した。関節リウマチ患者血清を用いて、ウエスタンブロッティングを行ったところ、EN01 に反応する関節リウマチ血清がいくつか認められ、アセチル化依存的な反応強度の変化は認められなかった。

(4) 今後

本研究により、関節リウマチでアセチル化が亢進している蛋白質として、EN01 とイソクエン酸デヒドロゲナーゼが同定された。本研究では、様々な条件によって RA で亢進している EN01 のアセチル化部位の特定を試みたが、EN01 のアセチル化部位を特定するに至らなかった。今後、さらなる検討を重ね、EN01 のアセチル化部位もしくは本研究では行わなかった IDH1 のアセチル化部位を特定し、RA の診断マーカーとなるかについて検討する必要がある。

次に、本研究では、EN01 のアセチル化により、抗原性に変化がみられるかについて、検討したが、EN01 のアセチル化による、抗原性の変化は認められなかった。この点に関しても、本研究では行わなかった IDH1 について

同様の検討を行い、IDH1 のアセチル化が、抗原性を高めるかどうかについて検討したい。

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 11 件)

1. Kojima S, Koitabashi K, 他 10 名 5 番目 Proteomic analysis of whole glomeruli in patients with IgA nephropathy using micro-sieving. *American Journal of Nephrology* 2014; 39(1):36-45. doi: 10.1159/000357788. 査読有
2. Endo W, Arito M, 他 9 名 Effect of sulfasalazine and tofacitinib on the protein profile of articular chondrocytes. *Modern Rheum in press* 2013. doi: 10.3109/14397595.2013.86422 査読有
3. Onodera H, Arito M, Sato T, 他 7 名 Novel effects of edaravone on human brain microvascular endothelial cells revealed by a proteomic approach. *Brain Research* 2013;1534:87-94. doi: 10.1016/j.brainres 査読有
4. Noguchi M, Sato T, 他 10 名 6 番目 Roles of serum fibrinogen chain-derived peptides in Alzheimer's disease. *International Journal of Geriatric Psychiatry* 2013, in press. doi: 10.1002/gps.4047. 査読有
5. Yoshioka T, 他 15 名、6 番目 Protein profiles of peripheral blood mononuclear cells as a candidate biomarker for Behcet's disease. *Clin Exp Rheum* 2013, in press. <http://www.clinexprheumatol.org/abstract.asp?a=6904> 査読有
6. Uchida T, Nagai K, Sato T, 他 10 名 5 番目 Comparative proteomic analysis of neutrophils from patients with microscopic polyangiitis and granulomatosis with polyangiitis. *Journal of Proteomics* 2013;91C:259-69. doi: 10.1016/j.jprot.2013.07.021. 査読有
7. Ando T, Iizuka N, Sato T, 他 7 名 6 番目 Autoantigenicity of carbonic anhydrase 1 in patients with abdominal aortic aneurysm, revealed by proteomic surveillance. *Human Immunology* 2013;74:852-7. doi:10.1016/j.humimm.2013.02.009. 査読有
8. Mitsui H, Arito M, Sato T, 他 8 名 Novel anti-citrullinated peptide autoantibodies identified by proteomics with in vitro citrullinated proteins in patients with rheumatoid arthritis. *Inflamm & Regener*

2013;33:121-130
<http://www.jsir.gr.jp/journal/Vol33No2/pdf/121-130.pdf> 査読有

9. Noguchi Y, Kurokawa MS, 他 10 名 7 番目 Serum peptides, represented by complement 3f des-arginine, are useful for prediction of the response to pegylated interferon- α plus ribavirin in patients with chronic hepatitis C. *Hepatol Res* 2012;43:743-756 doi: 10.1111/hepr.12018. 査読有
10. Nagai K, Arito M, Takakuwa Y, 他 7 名 Altered posttranslational modification on U1 small nuclear ribonucleoprotein 68k in systemic autoimmune diseases detected by two-dimensional western blot. *Electrophoresis*.2012; 33:2028-2035. doi: 10.1002/elps. 査読有
11. Ooka S, Sato T, Arito M, 他 7 名 The effects of hinokitiol on human cells revealed by a proteomic approach. *Inflamm & Regener* 2012;32:137-43 <http://www.jsir.gr.jp/journal/Vol32No3/pdf/0137-0143.pdf> 査読有

[学会発表](計 37 件)

1. Kurokawa MS, 他 14 名 6 番目 Protein profiles of peripheral blood mononuclear cells as a biomarker for Behcet's Disease. American College of Rheumatology. Annual meeting 13, Oct 29, 2013. (San Diego, California USA)
2. Endo W, Arito M, 他 7 名 Investigation of effects of angiotensinII (ATII) on human articular chondrocytes by proteomic approach. HUPO2013, Sep 17, 2013. Kanagawa (Pacifco Yokohama)
3. Onodera H, Arito M, 他 7 名 Investigation of effects of edaravone on human brain microvascular endothelial cells. HUPO2013, Sep 17, 2013. Kanagawa (Pacifco Yokohama)
4. Ohyama K, 他 9 名 3 番目 A peptide profile of amniotic fluid in a fetal lamb model of gastroschisis. HUPO2013, Sep 17, 2013. Kanagawa (Pacifco Yokohama)
5. Kojima S, 他 11 名 6 番目 Proteomic analysis of whole glomeruli in patients with IgA nephropathy using micro-sieving. HUPO2013, Sep 17, 2013. Kanagawa (Pacifco Yokohama)
6. Suzuki I, 他 11 名 6 番目 Serum peptide profiles as a candidate biomarker for dementia with lewy bodies. HUPO2013, Sep 16, 2013. Kanagawa (Pacifco Yokohama)

7. Omoteyama K, Arito M, 他 6 名 2D-DIGE analysis of cell surface proteins reveals characteristic proteome profiles for effects of sulfasalazine in human synovial sarcoma cell line, SW982. HUPO2013, Sep 16, 2013. Kanagawa (Pacifco Yokohama)
8. Sato T, Arito M, 他 9 名 Comprehensive analysis of aberrantly glycosylated proteins in rheumatoid arthritis. HUPO2013, Sep 16, 2013. Kanagawa (Pacifco Yokohama)
9. Tsuno H, 他 8 名 4 番目 Proteomic analysis of effects of antirheumatic drugs on exosomes derived from synovial sarcoma cells. HUPO2013, Sep 16, 2013. Kanagawa (Pacifco Yokohama)
10. Yoshioka T, 他 14 名 6 番目 Protein profiles of peripheral blood mononuclear cells as a biomarker for Behcet's Disease. HUPO2013, Sep 16, 2013. Kanagawa (Pacifco Yokohama)
11. Uchida T, 他 12 名 5 番目 Comparative proteomic analysis of neutrophils from patients with microscopic polyangiitis and granulomatosis with polyangiitis. HUPO2013, Sep, 2013. Kanagawa (Pacifco Yokohama)
12. Noguchi Y, 他 11 名 7 番目 Serum peptides, represented by complement 3f des-arginine, are useful for prediction of the response to pegylated interferon- α plus ribavirin in patients with chronic hepatitis C. HUPO2013, Sep 15, 2013. Kanagawa (Pacifco Yokohama)
13. 佐藤利行, 他 8 名 5 番目 関節リウマチにおける糖蛋白質の糖鎖構造の変異 第 57 回日本リウマチ学会総会・学術集会 2013 年 4 月 19 日 京都府(国立京都国際会館)
14. 黒川真奈絵, 他 13 名 6 番目 ベーチェット病患者の末梢血単核球に発現している蛋白質の網羅的解析 第 57 回日本リウマチ学会総会・学術集会 2013 年 4 月 18 日 京都府(国立京都国際会館)
15. 永井宏平, 他 8 名 5 番目 ANCA 関連血管炎患者における好中球ミエロペルオキシダーゼの酸化修飾 第 57 回日本リウマチ学会総会・学術集会 2013 年 4 月 18 日 京都府(国立京都国際会館)
16. Arito M, 他 8 名 Altered acetylation of proteins in patients with rheumatoid arthritis, revealed by acetyl-proteomics 第 85 回日本生化学会 2012 年 12 月 15 日 福岡国際会議場・マリンメッセ福岡(福岡県福岡市)
17. 佐藤利行, 他 10 名 4 番目 Alternation

- of sugar-chains on glycoproteins in rheumatoid arthritis 第 85 回日本生化学会 2012 年 12 月 15 日 福岡国際会議場・マリンメッセ福岡 (福岡県福岡市)
18. Okamoto K, 他 8 名 5 番目 A Small Nuclear Acidic Protein as a New Anti-inflammatory Drug that Inhibits a Transcriptional Activity of NF- κ B 第 35 回日本分子生物学会 2012 年 12 月 13 日 福岡国際会議場・マリンメッセ福岡 (福岡県福岡市)
 19. Kurokawa MS, 他 8 名 5 番目 Comprehensive Analysis of Protein Expression in Peripheral Blood Mononuclear Cells from Patients with Behcet's Disease HUPO2012 2012 年 9 月 11 日 Boston
 20. Kato T, 他 8 名 3 番目 Adenosine Deaminase Identified as a Citrullination-Dependent Autoantigen in Rheumatoid Arthritis, by Proteomic Surveillance with in vitro Citrullination HUPO2012 2012 年 9 月 11 日 Boston
 21. Noguchi M, 他 9 名 6 番目 Comprehensive Analysis of Serum Peptides in Patients with Alzheimer's Disease HUPO2012 2012 年 9 月 11 日 Boston
 22. Sato T, 他 9 名 5 番目 Screening of glycoproteins with altered glycans in rheumatoid arthritis. HUPO2012 2012 年 9 月 11 日 Boston
 23. Arito M, 他 9 名 Altered Acetylation of Proteins in Patients with Rheumatoid Arthritis, Revealed by Acetyl-Proteomics HUPO2012 2012 年 9 月 10 日 Boston
 24. Uchida T, 他 8 名 5 番目 Comparative Proteomic Analysis of Neutrophils from Patients with Microscopic Polyangiitis and Granulomatosis with Polyangiitis HUPO2012 2012 年 9 月 10 日 Boston
 25. Nagai K, 他 9 名 5 番目 Oxidative Modification on Myeloperoxidase in Patients with Antineutrophil Cytoplasmic Antibody (ANCA)-Associated Vasculitides HUPO2012 2012 年 9 月 10 日 Boston
 26. 小島茂樹、他 11 名 5 番目 Micro-Sieving 法により単離した IgA 腎症患者腎系球体のプロテオミクス解析 日本プロテオーム学会 2012 年大会/日本ヒトプロテオーム機構 第 10 回大会 2012 年 7 月 27 日 日本科学未来館 (お台場)
 27. 内田貞輔、他 12 名 5 番目 好中球蛋白質プロファイルによる ANCA 関連血管炎の鑑別 Comparative proteomic analysis of neutrophils from patients with microscopic polyangiitis and granulomatosis with polyangiitis. 日本プロテオーム学会 2012 年大会/日本ヒトプロテオーム機構 第 10 回大会 2012 年 7 月 27 日 日本科学未来館 (お台場)
 28. 黒川真奈絵、他 13 名 5 番目 ベーチェット病の末梢血単核球における蛋白質プロファイルの解析 Comprehensive analysis of protein expression in peripheral blood mononuclear cells from patients with Behcet's disease. 日本プロテオーム学会 2012 年大会/日本ヒトプロテオーム機構 第 10 回大会 2012 年 7 月 27 日 日本科学未来館 (お台場)
 29. 永井宏平、他 9 名 5 番目 ANCA 関連血管炎患者における好中球ミエロペルオキシダーゼの翻訳後修飾の変化 Alteration of post-translational modification on myeloperoxidase in patients with antineutrophil cytoplasmic antibody (ANCA)-associated vasculitides. 日本プロテオーム学会 2012 年大会/日本ヒトプロテオーム機構 第 10 回大会 2012 年 7 月 27 日 日本科学未来館 (お台場)
 30. 佐藤利行、他 9 名 6 番目 関節リウマチにおける糖蛋白質の糖鎖異常 Altered glycosylation of proteins in patients with rheumatoid arthritis. 日本プロテオーム学会 2012 年大会/日本ヒトプロテオーム機構 第 10 回大会 2012 年 7 月 26 日 日本科学未来館 (お台場)
 31. Uchida T, Nagai K, 他 9 名 8 番目 Comparative proteomic analysis of neutrophils from patients with microscopic polyangiitis and granulomatosis with polyangiitis. 第 56 回日本リウマチ学会総会・学術集会 2012 年 4 月 28 日 グランドプリンス高輪 (品川)
 32. 吉岡拓也、他 12 名 9 番目 ベーチェット病患者末梢血単核球における発現蛋白質の網羅的検討 第 56 回日本リウマチ学会総会・学術集会 2012 年 4 月 28 日 グランドプリンス高輪 (品川)
 33. 有戸光美、他 8 名 翻訳後修飾プロテオミクスによる関節リウマチ特異的アセチル化蛋白質の解析 第 56 回日本リウマチ学会総会・学術集会 2012 年 4 月 27 日 グランドプリンス高輪 (品川)
 34. 黒川真奈絵、竹之内研二、他 7 名 5 番目 In vitro シトルリン化を用いた RA における新規シトルリン化抗原の同定 第 56 回日本リウマチ学会総会・学術集会 2012 年 4 月 26 日 グランドプリンス高輪 (品川)
 35. 三井寛之、岡本一起、黒川真奈絵、有戸光美、他 6 名 NF- κ B を直接阻害する新しい抗炎症薬の作用機序 第 56 回日本

- リウマチ学会総会・学術集会 2012 年 4 月 26 日グランドプリンス高輪 (品川)
36. 大岡正道、佐藤利行、有戸光美、他 5 名プロテオミクスによるヒノキチオール
のヒト細胞に対する影響の網羅的解析 第
56 回日本リウマチ学会総会・学術集会
2012 年 4 月 26 日グランドプリンス高輪
(品川)
37. 佐藤利行、高桑由希子、他 7 名 5 番目
関節リウマチにおける糖蛋白質の糖鎖構
造の変異 第 56 回日本リウマチ学会総
会・学術集会 2012 年 4 月 26 日グラン
ドプリンス高輪 (品川)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

有戸 光美 (ARITO, Mitsumi)
聖マリアンナ医科大学・医学部・助教
研究者番号：00509911

(2) 研究分担者 無し

(3) 連携研究者

永井 宏平 (NAGAI, Kouhei)
近畿大学・生物理工学部・講師
研究者番号：70500578

佐藤 利行 (SATO, Toshiyuki)
聖マリアンナ医科大学・医学部・助教
研究者番号：10350430

黒川 真奈絵 (KUROKAWA, Manae)
聖マリアンナ医科大学・医学部・准教授
研究者番号：90301598

岡本 一起 (OKAMOTO, Kazuki)
聖マリアンナ医科大学・医学部・准教授
研究者番号：40177085

加藤 智啓 (KATO, Tomohiro)
聖マリアンナ医科大学・医学部・教授
研究者番号：80233807