

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：32713

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15200

研究課題名(和文)疾患特異的に糖鎖修飾異常を受けた蛋白質に対する自己抗体の新たな検出法

研究課題名(英文)Detection of autoantibodies to proteins with disease-specific aberrant glycosylation

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、関節リウマチ(RA)が認識する、N型糖鎖が脱糖鎖された末梢血単核球(PBMC)由来蛋白質の同定を試みた。まず、蛋白質を転写した膜上で脱糖鎖を試みたが、膜上での脱糖鎖は困難であった。そこで液相でのPBMC蛋白質の脱糖鎖の後にRA患者血清を用いてwestern blottingを行い、RA特異的な糖鎖異常を示す蛋白質に対する自己抗体の検出により、RAで糖鎖異常を示す蛋白質の同定を目指した。脱糖鎖PBMC蛋白質に対しRA患者血清を反応させ自己抗体の検出を試みたが、自己抗体は検出されなかった。今後は血清蛋白質を脱糖鎖し、RAで糖鎖異常を示す蛋白質の同定を行う。

研究成果の概要(英文)：In this study, we tried to identify aberrantly glycosylated proteins through detection of autoantibodies to the proteins. For this aim, we targeted the autoantibodies against proteins derived from peripheral blood mononuclear cells (PBMC) in rheumatoid arthritis (RA). We first tried to deglycosylate PBMC proteins from healthy donors, which were transferred to the membranes after SDS polyacrylamide gel electrophoresis. However, it was difficult to deglycosylate proteins on the membranes. Next, we tried to deglycosylate the PBMC proteins in vitro. The proteins were deglycosylated by peptide-N-glycosidase F. Sera from RA patients were applied to the deglycosylated PBMC proteins. However, the aimed autoantibodies were unfortunately not detected. In near future, serum proteins that contains more glycoproteins will be deglycosylated, and RA sera will be applied to the deglycosylated proteins. We will try to identify the RA-serum-reacted proteins as RA-specific aberrant glycosylated proteins.

研究分野：糖鎖工学、糖工学

キーワード：脱糖鎖 N型糖鎖 自己抗体 関節リウマチ

1. 研究開始当初の背景

全身性エリテマトーデス、強皮症などの全身性自己免疫疾患では、患者血清中に自己の細胞成分と反応する自己抗体が検出される。自己抗体の多くは特定の臨床像と関連することから、自己抗体産生機序と病態形成機序は関連すると考えられる。近年、自己抗体発症機序は自己抗原となる蛋白質の翻訳後修飾の異常であると提唱されている。従って、疾患の病態に関わる標的分子の同定には、発現量だけでなく、その基となる分子の糖鎖異常やリン酸化などの翻訳後修飾を調べる必要がある。

蛋白質は翻訳後修飾を受けて機能を発揮する。すなわち、セントラルドグマにより「遺伝子→RNA→蛋白質」と記載されるが、正しくは「遺伝子→RNA→蛋白質→翻訳後修飾」である。数百種類ある翻訳後修飾のひとつが糖鎖修飾である。糖鎖は「第三の生命鎖」と呼ばれ、細胞接着など生命活動に関わる分子で、蛋白質の約50%は糖鎖の付加された「糖蛋白質」である。筋ジストロフィーの原因遺伝子産物であるジストロフィンと結合する糖蛋白質 α -ジストログリカンに付加される1分子のマンノースが欠損すると、Muscle-eye-brain 病をひき起こす (Biochem. Biophys. Res. Commun., 2002: 291: 1283-1286)。このように、糖蛋白質に対して疾患特異的に糖鎖の構造異常を来たすことが病態に関与することが明らかにされてきた。しかし、その解析系や臨床検体への応用法は確立されていない。

2. 研究の目的

上述1.で述べた背景から、次世代の臨床材料解析手段として、質的变化である翻訳後修飾の解析が主軸となることは明らかである。本研究では、翻訳後修飾のひとつである糖鎖修飾に着目し、疾患特異的な糖鎖修飾変化により産生された自己抗体の汎用的な検出法を確立する。

3. 研究の方法

本研究の概略は以下の通りである。

- 1) 健常者の血液サンプルから蛋白質を抽出。
- 2) 蛋白質の二次元電気泳動および膜へ転写。
- 3) 2)の膜に糖加水分解酵素を作用させ、膜上での糖蛋白質の脱糖鎖を行う。
- 4) 疾患患者由来の血清を一次抗体として、3)の膜を用いてウェスタンブロットを行う。
- 5) 4)で陽性を示した蛋白質スポットに関してMALDI-TOF型質量分析で蛋白質を同定する。
- 6) 疾患患者由来の蛋白質を抗原として、疾患特異的な異常糖鎖修飾を検定する。
- 7) 他の自己免疫疾患における、同定蛋白質の糖鎖異常を検定する。

臨床検体は、健常者由来の血清または血液細胞を用いる。近年、自己免疫疾患のひとつ

である関節リウマチ患者群と健常者群の血清蛋白質の糖鎖プロファイルと比較して、診断マーカーとしての糖鎖を模索する報告 (J. Chromatogr. B, 2007: 853: 133-137)があり、患者群で複数種の糖鎖構造の変化が認められた。少なくとも、関節リウマチでは複数の糖蛋白質の糖鎖構造変化が予想される。

本研究では、臨床検体から抽出した蛋白質を抗原とせず、少量の患者血清を用いて脱糖鎖された蛋白質に対する自己抗体の検出を行う。欠損させる糖の候補として、まずN型糖鎖 (図3を参照)の側鎖に付加されるフコースを考えている。前頁の図2に沿い自己抗体の検出および蛋白質の同定を行う。

検出された糖蛋白質の解析と疾患マーカーの利用検証に進む。検出した糖蛋白質を試料中から精製し、2次元電気泳動で同定蛋白質の抗体による検出を行い、2次元電気泳動から抽出した当該蛋白質も同定して、本法の有用性を検証する。さらに、ETD解析により修飾を受けたアミノ酸残基の決定、複数のレクチンを用いた糖鎖構造を決定する。また、他の自己免疫疾患における異常糖鎖修飾を受けた当該蛋白質に対する自己抗体がどの程度出現するかも検証する。

4. 研究成果

関節リウマチ (RA) 患者血清が認識する、N型糖鎖が脱糖鎖された末梢血単核球 (PBMC)由来蛋白質の検出・同定を試みた。まず簡便な検出法の確立のため、SDS-PAGE後に転写したPVDF膜上でPBMC蛋白質の脱糖鎖を試みたが、膜上での脱糖鎖は困難であった。そこで、PBMC蛋白質の脱糖鎖を液相で施行した後にRA患者血清を用いてウェスタンブロットングを行い、RA特異的な糖鎖異常が起きた蛋白質に対する自己抗体を検出することで、RAで糖鎖異常を示す蛋白質を新たに同定する系の構築を目指した。第一段階として、健常者のPBMC蛋白質をpeptide-N-glycosidase F (PNGase F)で処理し、N型糖鎖のマンノースを認識するレクチンを用いたブロットングにてPBMC蛋白質の脱糖鎖のプロファイルを解析した。脱糖されたPBMC蛋白質のバンドは、高分子側に数本検出された。第二段階として、脱糖鎖PBMC蛋白質に対しRA患者および健常者の血清を反応させ、脱糖鎖蛋白質に対する自己抗体の検出を試みたが、目的の自己抗体検出には至らなかった。今後は蛋白質源を、糖蛋白質を多く含むと考えられる血清蛋白質等に変更し、RAで糖鎖修飾異常を示す新たな蛋白質の同定を試みる。

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 4 件)

1. Matsuura T., Sato M., Nagai K., Sato T., Arito

- M., Omoteyama K., Suematsu N., Okamoto K., Kato T., Soma Y., Kurokawa MS. Serum peptides as putative modulators of inflammation in psoriasis. 査読有 J Dermatol Sci, in press. (2017). DOI: 10.1016/j.jdermsci.2017.03.014.
2. Kato M., Hamada-Tsutsumi S., Okuse C., Sakai A., Matsumoto N., Sato M., **Sato T.**, Arito M., Omoteyama K., Suematsu N., Okamoto K., Kato T., Itoh F., Sumazaki R., Tanaka Y., Yotsuyanagi H., Kato T., Kurokawa MS. Effects of vaccine-acquired polyclonal anti-HBs antibodies on the prevention of HBV infection of non-vaccine genotypes. 査読有 J Gastroenterol, in press. (2017). DOI: 10.1007/s00535-017-1316-3.
3. Furukawa H., Chikada M., Yokoyama MK., Arito M., Kurokawa MS., **Sato T.**, Sato M., Omoteyama K., Suematsu N., Kobayashi T., Sagane M., Suzuki H., Ando T., Kato T., Miyairi T. Characterization of small-leucine rich proteoglycans in aortic valves of patients with aortic valve stenosis. 査読有 Integr Mol Med, 4(5):796-801 (2016). DOI: 10.15761/IMM.1000248.
4. Okamoto K., Hirata-Tsuchiya S., Kitamura C., Omoteyama K., **Sato T.**, Arito M., Kurokawa MS., Suematsu N., Kato T. A small nuclear acidic protein (MTI-II, Zn²⁺-binding protein, parathymosin) that inhibits transcriptional activity of NF-κB and its potential application to anti-inflammatory drugs. 査読有 Endocrinology, 157(12):4973-4986 (2016). DOI: 10.1210/en.2016-1746.
- 〔学会発表〕(計 11 件)
1. Kurokawa MS, Nagai K., **Sato T.**, Sato M., Takakuwa Y., Ooka S., Arito M., Kato T. Oxidative modification of myeloperoxidase in anti-neutrophil cytoplasmic antibody (ANCA)-associated vasculitides. The 18th International Vasculitis and ANCA Workshop (Vasculitis 2017). 東京都文京区 東京大学伊藤国際学術研究センター, 2017年3月.
2. 有戸光美、安達崇之、末松直也、池森敦子、表山和樹、**佐藤利行**、黒川真奈絵、岡本一起、木村健二郎、柴垣有吾、加藤智啓. 腎尿細管上皮細胞のTNF-α誘導性上皮間葉移行に対するlayilinaの役割. 第89回日本生化学会大会、宮城県仙台市 仙台国際センター、2016年9月.
3. 岡本一起、佐藤政秋、表山和樹、**佐藤利行**、有戸光美、末松直也、黒川真奈絵、遊道和雄、加藤智啓. NF-κB コリプレッサー (MTI-II) の作用部位をさらに短くしたペプチド (6、12アミノ酸) 抗炎症薬の開発. 第89回日本生化学会大会、宮城県仙台市 仙台国際センター、2016年9月.
4. Kurokawa MS., Arito M., **Sato T.**, Suematsu N., Okamoto K., Kato T. Serum peptides as candidate biomarkers for dementia with Lewy bodies. 第89回日本生化学会大会、宮城県仙台市 仙台国際センター、2016年9月.
5. 長島義斉、**佐藤利行**、表山和樹、有戸光美、加藤智啓、黒川真奈絵. 再発性多発軟骨炎における血清ペプチドファイルの解析. 日本プロテオーム学会 2016年大会、東京都港区白金 北里大学薬学部、2016年7月.
6. 表山和樹、**佐藤利行**、佐藤政秋、有戸光美、岡本一起、末松直也、黒川真奈絵、加藤智啓. シェディングによって放出される細胞表面タンパク質の網羅的検出. 日本プロテオーム学会2016年大会、東京都港区白金 北里大学薬学部、2016年7月.
7. 岡本一起、佐藤政秋、表山和樹、**佐藤利行**、有戸光美、黒川真奈絵、末松直也、遊道和雄、磯橋文秀、加藤智啓. 炎症性転写因子NF-κB コリプレッサー MTI-IIを利用した短いペプチド抗炎症剤. 日本ビタミン学会第68回大会プログラム、富山県富山市 富山国際会議場、2016年6月.
8. 永井宏平、**佐藤利行**、佐藤政秋、高桑由希子、大岡正道、表山和樹、有戸光美、黒川真奈絵、加藤智啓. ANCA関連血管炎における好中球ミエロペルオキシダーゼの酸化修飾. 第60回日本リウマチ学会総会・学術学会、神奈川県横浜市 パシフィコ横浜、2016年4月.
9. 長島義斉、**佐藤利行**、佐藤政秋、表山和樹、有戸光美、加藤智啓、黒川真奈絵. 再発性多発軟骨炎における血清ペプチドファイルの解析. 第60回日本リウマチ学会総会・学術学会、神奈川県横浜市 パシフィコ横浜、2016年4月.
10. 津野宏隆、有戸光美、末松直也、**佐藤利行**、表山和樹、佐藤政秋、橋本篤、松井利浩、富岡重人、黒川真奈絵、加藤智啓. 関節リウマチ患者血清中のexosomeのプロテオーム解析. 第60回日本リウマチ学会総会・学術学会、神奈川県横浜市 パシフィコ横浜、2016年4月.
11. 表山和樹、佐藤政秋、**佐藤利行**、有戸光美、末松直也、黒川真奈絵、加藤智啓. シェディングに特化した新規分析方法の確立に関する研究.

第60回日本リウマチ学会総会・学会、
神奈川県横浜市 パシフィコ横浜、2016年4
月

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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