

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2016

課題番号：16K14612

研究課題名(和文)次世代プロテオミクスを用いた低酸素代謝ネットワークの全体像の解明

研究課題名(英文)Elucidating the metabolic enzymes network in hypoxic cells using next-generation proteomics

研究代表者

押川 清孝(Oshikawa, Kiyotaka)

九州大学・生体防御医学研究所・学術研究員

研究者番号：50380051

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)：本研究課題では、我々が開発した『情報基盤多重モニタリング法』(特許第5468073号)による網羅的定量プロテオミクスシステムを駆使して、低酸素における各モデル細胞の代謝酵素の発現量情報を定量的に取得することで、低酸素応答の代謝システムの分子機構の解明を目的としている。研究期間内にモデル細胞〔増殖期・がん化・老化・静止期(G0期)〕をヒト正常線維芽細胞から樹立することができた。さらに低酸素または通常酸素濃度下におけるモデル細胞の約1,000種類の細胞内代謝酵素に関して情報基盤多重モニタリング法によるタンパク質絶対量計測を行った。その結果、低酸素特異的に変動する代謝酵素を同定することができた。

研究成果の概要(英文)：The metabolic network is specific changed in hypoxia conditions, but the precise expression pattern is poorly understood. By comparing hypoxic to normoxic metabolic enzyme levels in various cells, we established four cell lines (normal, cancer, senescent, and G0 cells) from normal diploid fibroblast (TIG-3). To quantify the metabolic enzyme levels (~1,000 enzymes) of hypoxic and normoxic conditions in four cell lines, we performed the in vitro proteome assisted MRM for protein absolute quantification (iMRM). We identified specific metabolic enzymes which were significantly changed in hypoxic conditions.

研究分野：細胞生物学

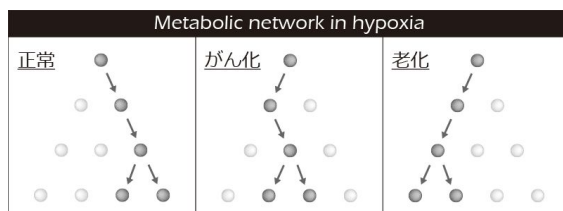
キーワード：プロテオミクス

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

好気性生物にとって酸素は必要不可欠な分子である。しかし、生体内に取り込まれた酸素は一部が過酸化水素や超酸化物イオンなどの活性酸素種(ROS)に変化し、生体に対して酸素毒性を示す。このように生体にとっては適切な酸素濃度の環境が必要であるが、ヒトの各組織内の酸素濃度は多様であり、骨髄の造血幹細胞などは低酸素濃度下で維持されるとされている。

一方、生命の維持に必要な代謝システムは複雑かつ厳密に制御されており、堅牢性と柔軟性を兼ね備えたシステムである。正常細胞では、外部の酸素濃度が低下すると、好氣的呼吸鎖から嫌氣的解糖系へのグルコース代謝シフトが起こる。がん化すると、酸素濃度に関わらず嫌氣的解糖系の亢進が維持される(ワールブルグ効果)。このように細胞状態の違いが、低酸素応答におけるグルコース代謝のみならず、代謝ネットワーク全体を変化させている可能性が考えられる(図1)。



(図1) 細胞状態の違いは低酸素応答の違いを生み出すのか?

異なる細胞状態(正常・がん化・老化など)における低酸素応答の微細な代謝システムの変動差異を検出するには精度の高いタンパク質定量技術が必要。

低酸素応答は環境変化への適応だけでなく、がんの生存戦略や幹細胞機能の維持などの多くの生命活動に重要な現象であることが近年明らかとなってきた。しかしそのメカニズムについては未だ個別分子の解析にとどまっている。つまり、がん化細胞など状態の異なる細胞の低酸素応答時における全代謝酵素の発現量を定量的・網羅的に計測

することで、代謝ネットワーク全体を俯瞰し、そこから低酸素応答のシステムの理解を深めることが必要であると考えられる。これによって低酸素のがん細胞特異的な代謝機構が明らかになれば、がん細胞特異的な代謝状態を標的とした治療薬開発に繋がることが十分に期待される。

2. 研究の目的

本申請課題では、われわれが最近開発した『情報基盤多重モニタリング法』(特許第5468073号)による網羅的定量プロテオミクスシステムを駆使して、低酸素における各モデル細胞の代謝酵素の発現量情報を定量的に取得する。同時に代謝物量や転写産物量情報も取得することで、低酸素応答の代謝システムの分子機構の解明に貢献することを目的とする。

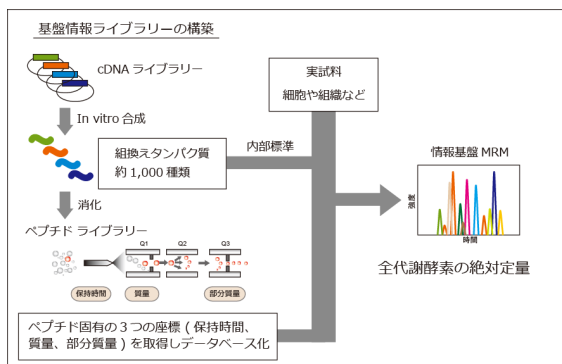
細胞内における代謝反応は1,000種類を超える多数の酵素によって触媒されている。すなわち、細胞内にはある代謝物から次の代謝物へつながる化学反応が酵素によって連結された酵素ネットワークが存在している。これまでの低酸素応答に関する研究では個々の代謝酵素の生化学的性質は詳細に解析されているが、これら代謝酵素のネットワークとしての挙動や性質はほとんど理解されていない。本研究では、特定の酵素の機能に着目するのではなく、細胞内の全代謝酵素の発現量を定量的・網羅的に計測することで、代謝経路のシステム変遷を俯瞰し、そこから低酸素応答のシステムの理解を終着点とすることが従来の研究と一線を画す。

3. 研究の方法

低酸素応答における代謝ネットワークを真に理解するために、まずは細胞内のすべての代謝酵素の変動量を網羅的かつ定量的に解析・統合して解釈することが求められ

る。そのためにはタンパク質の微細な変動を高感度・高精度に定量できる先進的技術が必要となる。

タンパク質の発現量のプロファイリングのためには、近年盛んに行われている質量分析計を基盤としたプロテオーム解析法が有効であるが、従来行われてきたプロテオーム解析法では発現量が多いタンパク質に関する発現データしか得ることができず、全代謝酵素関連タンパク質のプロファイリングを行う場合、低発現タンパク質の検出を逃してしまう可能性が極めて高い。そこで、われわれが独自に開発した『情報基盤多重モニタリング法』（特許第 5468073 号）を用いることで全代謝酵素のプロファイリングを行う。（図 2）。



(図 2) 情報基盤多重モニタリング法の原理

ヒト完全長 cDNA よりコムギ無細胞翻訳系を用いて組換えタンパク質を作製する。これらを酵素消化後、質量測定を行い、ペプチドデータベースを構築する。その情報を基にして Multiple Reaction Monitoring 法を用いた選択的定量法により実サンプルのタンパク質の存在量を測定することで絶対定量を行う。

情報基盤多重モニタリング法では、計測するタンパク質の組換えタンパク質を無細胞発現系で作製し、その消化物を用いて LC-MS/MS 解析によって感度良く検出されるペプチドの選定とその座標(LC 上の保持時間、質量、および部分質量)の決定を行う。これらの情報を基にして質量分析計を用いた選択的定量法である MRM (multiple

reaction monitoring) 法を実施すれば、標的タンパク質の絶対定量が可能となる。本方法は多数のタンパク質の絶対量を同時に測定する新技術である。

全代謝酵素関連タンパク質の組換えタンパク質を無細胞発現系で作製し、その消化物を用いて LC-MS/MS 解析によって感度良く検出されるペプチドの選定とその座標(LC 上の保持時間、質量、および部分質量)の決定を行う。これらの情報を基にして質量分析計を用いた選択的定量法である MRM (multiple reaction monitoring)法を実施すれば、大規模なタンパク質の絶対定量が可能となる。本研究では、全代謝酵素(約 1,000 種類)のペプチド情報の取得と定量のための最適化を行う。具体的には、以下の 4 つの課題を実施した。

(1) ヒト正常線維芽細胞からモデル細胞〔増殖期・がん化・老化・静止期(G0 期)〕の樹立

(2) 低酸素または通常酸素濃度下におけるモデル細胞の約 1,000 種類の細胞内代謝酵素に関して独自に開発した情報基盤多重モニタリング法によるタンパク質絶対量計測の実施

(3) 上記モデル細胞におけるメタボローム解析およびトランスクリプトーム解析の実施

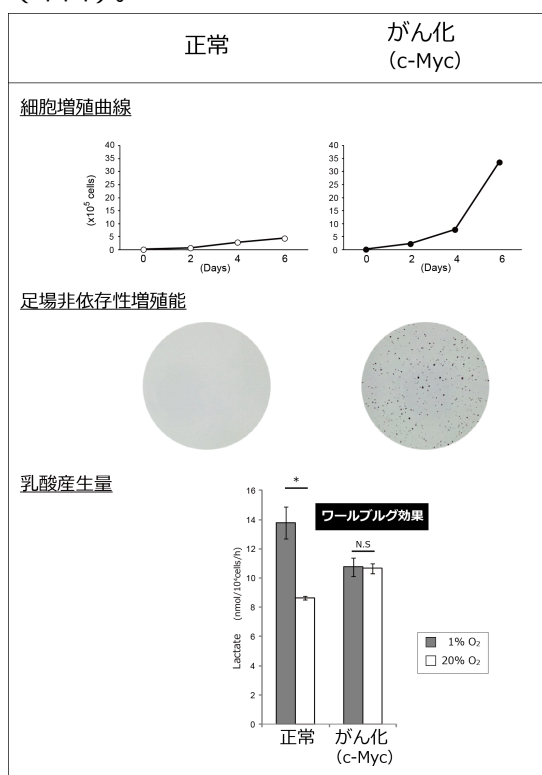
(4) 低酸素に依存して変化する代謝酵素、代謝物および転写産物の定量情報を統合し、バイオインフォマティクスによる知識発見や仮説形成を行い、これをもとに実証実験の遂行

4. 研究成果

(1) ヒト正常線維芽細胞からモデル細胞〔増殖期・がん化・老化・静止期(G0 期)〕の樹立

正常細胞であるヒト胎児肺由来線維芽細胞(TIG-3)に 2 種類のがん遺伝子〔SV40 T 抗原と c-Myc など〕を導入することでが

ん化細胞を樹立した。同じく TIG-3 にがん遺伝子 H-Ras (G12V)のみを導入してがん遺伝子誘発性の老化細胞も樹立した。なお老化細胞ではテトラサイクリン発現誘導系を用いた。今回行った同一細胞株から異なる状態の細胞の作出は、由来が同じであることから細胞間の誤差を払拭でき、解析結果の解釈を容易にするために必要となる。樹立した SV40 T 抗原と c-Myc でがん化させた細胞では、そのがん化能およびワールブルグ効果を確認することができた(下図)。



(2) 低酸素または通常酸素濃度下におけるモデル細胞の約 1,000 種類の細胞内代謝酵素に関して独自に開発した情報基盤多重モニタリング法によるタンパク質絶対量計測

情報基盤多重モニタリング法で必要となる、計測するタンパク質の組換えタンパク質を無細胞発現系で作製し、その消化物を用いて LC-MS/MS 解析によって感度良く検出されるペプチドの選定とその座標(LC 上の保持時間、質量、および部分質量)の決

定を行った。さらに、これらの情報を基にして質量分析計を用いた選択的定量法である MRM (multiple reaction monitoring) 法を実施し、全代謝酵素(約 1,000 種類)のペプチド情報の取得と定量のための最適化を完了させた。

次に、低酸素または通常酸素濃度下におけるモデル細胞の約 1,000 種類の細胞内代謝酵素に関して独自に開発した情報基盤多重モニタリング法によるタンパク質絶対量計測を行った。低酸素において特異的に変動する酵素群を抽出した。これまで知られていない解糖系酵素の上昇やこれまでに報告のない代謝酵素の変化を同定することができた。

(3) 上記モデル細胞におけるメタボローム解析およびトランスクリプトーム解析の実施

現在、上記モデル細胞におけるメタボローム解析およびトランスクリプトーム解析を行っているところであり、今後得られたタンパク質量と整合性がとれるかを検討する。

(4) 低酸素に依存して変化する代謝酵素、代謝物および転写産物の定量情報を統合し、バイオインフォマティクスによる知識発見や仮説形成を行い、これをもとに実証実験の遂行

現在、低酸素状態で特異的に変動している代謝酵素の過剰発現やノックダウン細胞株を樹立しており、これらの細胞株を用いて低酸素における代謝ネットワークに与える影響について検討する。

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 1 件)

Masaki Matsumoto, Fumiko Matsuzaki,
Kiyotaka Oshikawa, Naoki Goshima, Masatoshi
Mori, Yoshifumi Kawamura, Koji Ogawa,
Eriko Fukuda, Hirokazu Nakatsumi, Tohru
Natsume, Kazuhiko Fukui, Katsuhisa Horimoto,
Takeshi Nagashima, Ryo Funayama, Keiko
Nakayama & Keiichi I Nakayama

A large-scale targeted proteomics assay
resource based on an in vitro human proteome.

Nature Methods **14**, 251–258 (2017) 査読有
doi:10.1038/nmeth.4116

〔学会発表〕（計 2件）

1. 押川 清孝・松本 雅記・中山 敬一
SV40 small T antigen は oncogene-induced
senescence を効率的に回避するために必要
である
第 39 回日本分子生物学会年会
(2016 年 12 月 1 日・横浜)

2. 押川 清孝・松本 雅記・中山 敬一
情報基盤多重モニタリング法 (iMPAQT)
を用いた細胞老化代謝ネットワークの解析
日本プロテオーム学会 2016 年大会
(2016 年 7 月 28 日・東京)

〔図書〕（計 0件）
なし

〔産業財産権〕

出願状況（計 0件）
なし

取得状況（計 0件）
なし

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.bioreg.kyushu-u.ac.jp/saibou/index.html>

6. 研究組織
(1) 研究代表者
押川 清孝 (OSHIKAWA, Kiyotaka)
九州大学生体防御医学研究所・研究員

研究者番号：50380051

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者
中山 敬一 (NAKAYAMA, Keiichi)
九州大学生体防御医学研究所・主幹教授
研究者番号：80291508

松本 雅記 (Matsumoto, Masaki)
九州大学生体防御医学研究所・准教授
研究者番号：60380531

(4) 研究協力者
なし