

令和元年6月5日現在

機関番号：13501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15996

研究課題名（和文）循環器病における蛋白質S-グルタチオン化の動態及び役割の解明

研究課題名（英文）Roles of protein S-glutathionylation in cardiovascular disease

研究代表者

渡辺 陽介（WATANABE, Yosuke）

山梨大学・大学院総合研究部・病院助教

研究者番号：90535551

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：障害細胞から分泌されるエクソソームやマイクロベシクルといった細胞外小胞は細胞質を内包するため血清そのものよりも鋭敏に細胞質内でのS-グルタチオン化の変化を検出できる可能性がある。本研究では患者の血清から分離した細胞外小胞を解析し、循環器病におけるS-グルタチオン化蛋白の動態および役割を解明すべく研究を推進した。研究の結果、急性心筋梗塞および拡張型心筋症患者ではエクソソーム中の蛋白質S-グルタチオン化のレベルが増加していることが確認でき、エクソソーム中の蛋白質S-グルタチオン化はこれらの疾患のマーカーとなりうる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究にて細胞外小胞におけるS-グルタチオン化蛋白は急性心筋梗塞や拡張型心筋症といった心血管病にて増加することが示唆され、これらの疾患のバイオマーカーとなりうる可能性を示すことができた。また新規のグルタチオン化蛋白のブルダウン法を開発に成功し、今後のS-グルタチオン化蛋白研究に寄与できる。

研究成果の概要（英文）：Extra cellular vesicles which like exosomes and microvesicles contain cytoplasm. Therefore there is a possibility that analysis of extra cellular vesicles can detect levels of S-glutathionylation high sensitivity compared with analysis of plasma. In this study, levels of S-glutathionylation in extra cellular vesicles in AMI and DCM patients are higher than control patients. This result indicate S-glutathionylation in extra cellular vesicles is a potential biomaker for cardio vascular diseases.

研究分野：循環器内科学

キーワード：S-グルタチオン化 酸化ストレス 細胞外小胞 エクソソーム マイクロベシクル

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

蛋白質は生合成された後、リン酸化やグリケーション等によって様々に翻訳後修飾され、これらの修飾によって機能や活性が調節されている。しかしながら、酸化的蛋白修飾である S-グルタチオン化の循環器疾患の病態における役割はほとんど不明である。

病的状態で増加する活性酸素は様々な蛋白質を酸化修飾しシグナル伝達に関わる

現在までに約 40 種類の蛋白質が S-グルタチオン化により制御されることが報告されている。マウスの心臓では約 1000 種類の蛋白質が潜在的に S-グルタチオン化を受けることが報告されているが、臨床レベルでは S-グルタチオン化の動態に関する知見は閉塞性動脈硬化症の患者血清で S-グルタチオン化蛋白の総量が上昇していることが報告された 1 報のみである。循環器病に関与する特定の S-グルタチオン化蛋白は未だに同定されておらず、その役割も不明なままである。

S-グルタチオン化の基質となるグルタチオンは細胞内には 0.5mM~2mM と高濃度に存在するが、細胞外ではその 100 分の 1 以下と低値であり S-グルタチオン化は主に細胞内で起こると考えられている。障害細胞から分泌されるエクソソームやマイクロベシクルといった細胞外小胞は細胞質を内包するため血清そのものよりも鋭敏に細胞質内での S-グルタチオン化の変化を検出できる可能性がある。本研究では患者の血清から分離した細胞外小胞を解析し、循環器病における S-グルタチオン化蛋白の動態および役割を解明する。

2. 研究の目的

本研究は循環器病における S-グルタチオン化の役割を臨床レベルで解明することが目的である。特に細胞外小胞の S-グルタチオン化蛋白について研究を推進する。

3. 研究の方法

(1) 循環器病患者血清中の細胞外小胞に含有される S-グルタチオン化蛋白の定量

循環器病の患者血清からエクソソーム(50-100um)およびマイクロベシクル(100-1000um)の 2 種類の細胞外小胞を超速心により抽出する。スクロースクッション法に引き続きゲル濾過組み合わせエクソソームおよびマイクロベシクルを抽出する。対象疾患は急性心筋梗塞および心不全患者およびコントロール群の血清からエクソソームおよびマイクロベシクルを抽出しウエスタンブロッティングにより S-グルタチオン化蛋白の総量を定量する。

(2) 細胞外小胞サンプルからの S-グルタチオン化蛋白の抽出

大腸菌を用いて His Myc GST 融合リコンビナント蛋白を誘導し His tag を用いて精製を行った。GST がグルタチオンに結合する性質を用いて細胞外小胞サンプルから S-グルタチオン化蛋白をプルダウンした。

(3) 細胞外小胞サンプルにおける質量解析

心筋梗塞患者から抽出した細胞外小胞サンプルを電気泳動し銀染色するとコントロール群にはないバンドが認められた。このバンドを切り出し脱染色を施行したのち、質量解析にて含有蛋白質を解析した。

4. 研究成果

(1) 循環器病患者血清中の細胞外小胞に含有される S-グルタチオン化蛋白の定量

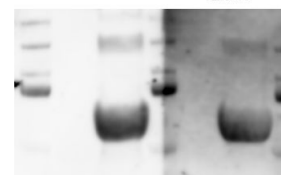
コントロール群、心筋梗塞群、拡張型心筋症群からエクソソームおよびマイクロベシクルを抽出した。抽出したエクソソームおよびマイクロベシクルをライセートしウエスタンブロッティングでマーカーである HSP70 および Integrin β が含まれていることを確認した。OxiSelect™ s-Glutathione Adduct Competitive ELISA Kit を用いて ELISA ベースで細胞外小胞サンプルの S-グルタチオン化のレベルの測定を試みるも測定感度以下であったため、ウエスタンブロッティングにて抗 GSH 抗体を用いて S-グルタチオン化のレベルを測定した。するとコントロール群と比較し、エクソソームおよびマイクロベシクルともに心筋梗塞群、拡張型心筋症群では S-グルタチオン化が亢進していることが判明した。

(2) 細胞外小胞サンプルからの S-グルタチオン化蛋白の抽出

大腸菌を用いて His Myc GST 融合リコンビナント蛋白を作成した。S-グルタチオン化させたアルブミンをウエスタンブロッティングし一時抗体の代わりに His Myc GST 融合リコンビナント蛋白を用いたところ抗グルタチオン化抗体と同様に抗グルタチオン化アルブミンと結合することが判明した(図 1)。この融合蛋白を用いて細胞外小胞サンプルから S-グルタチオン化蛋白のプルダウンを試みた。

質量解析にて S-グルタチオン化された蛋白を同定するた

図 1
抗グルタチオン化 His GST cmvc
抗体 リコンビナント
蛋白



コントロールアルブミン
グルタチオン化アルブミン

めには ng 単位の蛋白が必要で銀染色にて同定される必要があるが、ブルダウンした蛋白を電気泳動後に銀染色してもバンドは認められなかった。抗グルタチオン化抗体を用いてウエスタンブロッティングを行うとわずかにグルタチオン化されている蛋白が認められた。以上の結果から現在の実験方法で得られた細胞外小胞に含まれる S-グルタチオン化蛋白はわずかで質量解析での蛋白同定には不十分であることが判明した。現在スケールアップすべく実験方法を改良している。

(3) 細胞外小胞サンプルにおける質量解析

細胞外小胞サンプルから質量解析に十分な S-グルタチオン化蛋白のブルダウンはできないことが判明したため、方針を変更しまず心筋梗塞患者の細胞外小胞に含まれる蛋白質を質量解析にて同定し、既知の S-グルタチオン化される蛋白が含まれているかを解析した。銀染色にてエクソソームでは 56kd および 59kd の部分にコントロール患者群では見られないバンドが認められた、マイクロベジクルでは 10kd の部分にコントロール患者群では見られないバンドが認められた。これらのバンドを質量解析にて含有蛋白を検出した、代表的な蛋白を表 2 に示す。既知の S-グルタチオン化蛋白は検出されなかったため、現在これらの蛋白質がグルタチオン化されるのか解析を行っている。

表 2 心筋梗塞患者特異的蛋白バンドに含まれる蛋白

エクソソーム 56kd	エクソソーム 59kd	マイクロベジクル 10kd
Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain	L-lactate dehydrogenase A	Platelet factor 4
Adenosylhomocysteinase	Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase	Histone H4
3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type-2	Aromatic-L-amino-acid decarboxylase	Proteoglycan 4
Coagulation factor V	Alpha-enolase	CD5 antigen-like
Glutathione S-transferase A3	Fructose-bisphosphate aldolase B	Protein S100-A8
L-lactate dehydrogenase A	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	Dermcidin

5 . 主な発表論文等

なし

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

1. Yosuke Watanabe, S-glutathionylation as oxidative protein modification promotes angiogenesis in ischemia, The 1st JCS Council Forum on Basic CardioVascular Research, 2018/1/6
2. Yosuke Watanabe, S-glutathionylation, One of the Oxidative Protein Modification, Stimulate Adipogenesis and Obesity by Stabilizing C/EBP Beta, The 83rd Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, 2019/3/31
3. Yosuke Watanabe, S-Glutathionylation, One of the Oxidative Protein Modifications, Stimulates Adipogenesis and Obesity by Stabilizing C/EBP Beta Through Inhibition of SUMO E3 Ligase PIAS1 Interaction, American Heart Association Scientific Sessions, 2018/11/12

〔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：
国内外の別：

取得状況（計 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：
ローマ字氏名：
所属研究機関名：
部局名：
職名：
研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。