

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590320
 研究課題名（和文） 疾患関連蛋白質の翻訳後修飾多重検出法による機能プロテオーム解析
 研究課題名（英文） Functional proteomics of disease-related proteins by simultaneous and multicolor detection of posttranslational modifications of the proteins
 研究代表者
 大石 正道（OH-ISHI MASAMICHI）
 北里大学・理学部・講師
 研究者番号：40233027

研究成果の概要：二次元電気泳動法とウェスタンブロットリング法、および量子ドット法を組み合わせて、複数の蛋白質翻訳後修飾を同時に検出する方法を開発し、蛋白発現量だけではわからなかった蛋白質の翻訳後修飾異常が糖尿病発症以前から生じていることが明らかになった。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医科学

キーワード：蛋白質、糖尿病、プロテオーム、翻訳後修飾、量子ドット、二次元電気泳動法、ウェスタンブロットリング法

1. 研究開始当初の背景

(1) 機能プロテオミクスの重要性

疾患プロテオミクスにおいては、病態に伴う個々の蛋白質の発現量の変化が疾患関連蛋白質の検出に利用されることが多い。ところが、蛋白量に変動が認められない場合でも、蛋白質のリン酸化・脱リン酸化、糖鎖の付加などの翻訳後修飾の違いによって蛋白質の機能に変化が生じ、それが直接病態に係る場合がある。すなわち、蛋白質の発現量に注目する「発現プロテオミクス」だけでなく、蛋白質の翻訳後修飾に伴う機能的変化に注目する「機能プロテオミクス」を行う必要がある。

(2) 蛋白質翻訳後修飾の網羅的解析

プロテオーム解析において蛋白質の翻訳後修飾を調べる方法は、主に質量分析計を用いる方法と、電気泳動法を用いる方法がある。そのうち、質量分析計を用いて修飾を調べる場合、同一蛋白質でも分子ごとに修飾の種類や部位がともに異なり、その種類は多種多様に及ぶため、未知の修飾を含むペプチド断片はなかなか検出できなかった。

一方、電気泳動法を用いる場合は、ゲル上にすべての蛋白質成分を展開させておいてから、修飾特異的プローブ（リン酸化抗体のような特異抗体など）で反応させるので、修飾をもつ蛋白質の検出は比較的容易である。し

かし、多種類の修飾を検出するためには種類ごとに別々のPVDF膜で検出しなければならず、修飾を網羅的に検出する方法としては適していなかった。そこで、複数の翻訳後修飾を同時に検出する方法の開発が必要になった。

(3) 翻訳後修飾検出用の量子ドット

量子ドットは、直径数ナノメートルの半導体素材からなるナノクリスタルで、粒径のサイズによって波長400-700nmの範囲で半値幅30nmの蛍光を発する。また、量子ドットは1つの光源ですべての量子ドットの励起が可能で発光波長の分布がシャープであるため、分光器と冷却CCDを組み合わせることで最大10種類程度の標識を同時に解析できる。しかも、量子ドットは蛍光色素と違い、退色が遅く長時間安定している。現在は2~3種類の蛍光色素を用いて蛋白質の発現解析(2D-DIGE)や組織の多重染色が行われていることが多いが、量子ドットは将来、蛍光色素に代わって多数の標識を同時に検出できる可能性を秘めている。

そこで、本研究では量子ドットを検出用プローブとして採用し、複数の修飾を同時に分析できるシステムづくりから取り組むことにした。

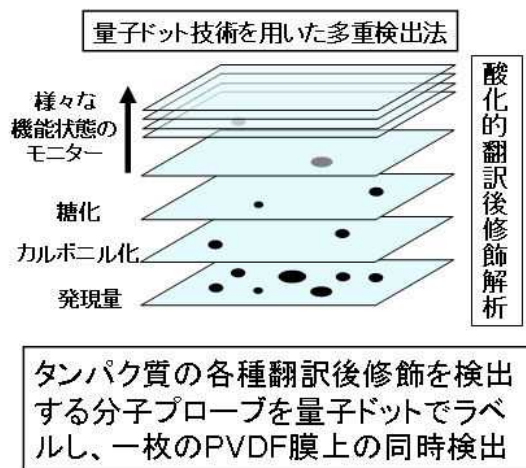


図1 蛋白質翻訳後修飾多重検出法の概略

2. 研究の目的

本研究では、蛋白量の増減に加えて、複数の翻訳後修飾を同時に検出できる「多重染色法」を開発し、糖尿病モデルラットの各臓器から、糖尿病診断用の新規マーカー候補を探索することを目的としている。

3. 研究の方法

(1) 新規手法開発のための基本技術

基本技術は、(1)蛋白成分の分離精製を目的としたアガロース二次元電気泳動(2-DE)法、(2)ゲルからPVDF膜に転写す

るウェスタンブロッティング(WB)法、(3)各種翻訳後修飾を特異的に認識する特異抗体標識量子ドット法、および(4)蛍光波長の異なる量子ドットを別々の画像として検出できる分光技術の4つである。

(2) 単一PVDF膜上における複数の翻訳後修飾同時多重検出法の開発

本研究で調べた翻訳後修飾は、リン酸化(Ser/Thrリン酸化、Tyrリン酸化)、カルボニル化(アルデヒド化)(酸化傷害の指標)、ニトロ化、ユビキチン化(蛋白質分解シグナル)、4-ヒドロキシ-2-ヘキサナール(HHE)化(糖化)、AGE-1化(糖化)、メチルグリオキサール(MG)化(糖化)の合計8種類である。

これらのうちカルボニル化(アルデヒド化)の場合、蛋白質上のカルボニル基をビオチンヒドラジド(BHZ)と反応させてヒドラゾンを形成させてから、蛋白質成分を2-DE法で分離、PVDF膜上にブロッティング後、ストレプトアビジン(Streptavidin)結合-量子ドットと反応させてその蛍光を検出した。

カルボニル化以外の修飾に関しては、各修飾に対する特異抗体を1次抗体として用いた。1次抗体の動物種を変えることで抗体に特異性を持たせ、2次抗体として抗マウスIgG、抗ラットIgG、抗ヤギIgGをそれぞれ結合した量子ドットを用いた。

本研究で用いた量子ドットの蛍光波長は、525nm, 565nm, 585nm, 605nm, 655nm, 705nm, 800nmの合計7種類であり、量子ドットからの蛍光を区別するために、各波長に合せたバンドパスフィルターを通した画像をデジカメで撮影した。

最初は、それぞれの翻訳後修飾に関して別々のPVDF膜上で量子ドットを反応させ、蛍光画像を観察した。次に2種類の量子ドットを同時に用いて、2種類の修飾の同時検出を行った。さらに、修飾の種類を増やし、最大で何種類の修飾を同時に検出できるかを調べた。

(3) 糖尿病特異的翻訳後修飾異常の検出

本研究の目的の一つに、糖尿病に特異的な翻訳後修飾異常の検出を掲げていたことから、糖尿病モデルラット Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty(OLETF: 大塚製薬徳島研究所から提供されたもの)の各臓器を用いて実験を行った。

4. 研究成果

(1) 翻訳後修飾の同時多重検出法の確立

糖尿病ラット OLETF の骨格筋を用いて調べたところ、カルボニル化、ユビキチン化、HHE化(糖化)、AGE-1化(糖化)、メチルグリオキサール(MG)化(糖化)の

検出に成功した。しかし、リン酸化とニトロ化においては量子ドットによる検出はできなかった。その理由としてリン酸化蛋白質やニトロ化蛋白質は微量成分であるため、2-DE で解析する前にこれらの蛋白質の濃縮が必要なためと考えられた。

複数の翻訳後修飾の同時検出に関しては、カルボニル化とユビキチン化、そして糖化(HHE 化、AGE-1 化、MG 化のいずれか 1 種)の 3 種類同時検出に成功した。糖化に対する抗体はいずれもマウスで作成したモノクローナル抗体であったことから、これらを同時に反応させることはできなかった。

(2) 糖尿病モデルラット Otsuka Long-Evans Tokushima Otsuka (OLETF) 骨格筋における翻訳後修飾異常の検出

糖尿病ラット OLETF とそのコントロールラット Long-Evans Tokushima Otsuka (LETO) とを比較した。その結果、糖尿病発症後の 40 週齢において、アクチンのカルボニル化および 3 種類の糖化(HHE 化、AGE-1 化、MG 化)が OLETF では LETO よりも亢進していた。しかし、アクチンのユビキチン化に関しては、OLETF と LETO いずれでも全く検出されなかった。クレアチンキナーゼ(CK)に関しては、カルボニル化、ユビキチン化、3 種類の糖化(HHE 化、AGE-1 化、MG 化)とも OLETF では LETO よりも亢進していた。

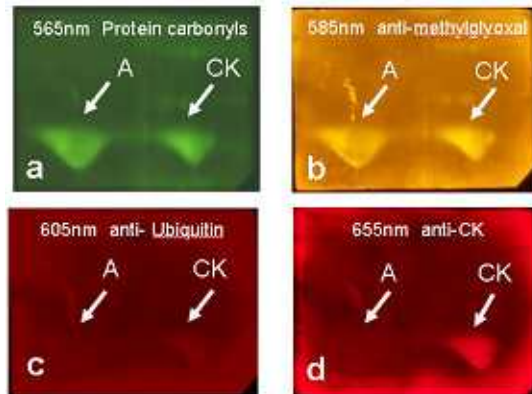


図2 糖尿病モデルラット OLETF (40 週齢) の骨格筋(ひ腹筋)における蛋白質翻訳後修飾多重染色。A: アクチン、CK: クレアチンキナーゼ。a) ビオチンヒドラジドでラベルしたカルボニル化をストレプトアビジン結合-蛍光波長 565nm 量子ドットで検出、b) メチルグリオキサール(MG)化をマウス抗 MG モノクローナル抗体と抗マウス IgG 結合-585nm 量子ドットで検出、c) ポリユビキチン化をウサギ抗ユビキチン化抗体と抗ウサギ IgG 抗体結合-605nm 量子ドットで検出、d) クレアチンキナーゼ(CK)をヤギ抗 CK 抗体と抗ヤギ抗 IgG 抗体結合-655nm 量子ドットで検出。各画像は、1 枚の PVDF 膜において、

それぞれの蛍光波長に対応したバンドパスフィルターを通して得られた。

次に、糖尿病発症前の 12 週齢と糖尿病発症後の 30 週齢とを比較した。その結果、アクチン、クレアチンキナーゼとも、12 週齢 OLETF ですでにカルボニル化と 3 種類の糖化が亢進していた。さらに MG 化、AGE-1 化についても調べてみたところ、同様な傾向が認められた。

アクチン、CK のスポットいずれにおいても、カルボニル化と糖化の染色の偏りが見られた。これは、1 個のスポット内でカルボニル化(または糖化)蛋白質の偏在を意味しているものと考えられ、たいへん興味深かった。また、CK においては、カルボニル化がスポットの酸性側を強く染めているのに対して、ユビキチン化がスポット全体にわたっていることも、重要な情報を提供してくれた。すなわち、カルボニル化された CK が蛋白質分解シグナルを優先的に受けるのではないことを示唆している。

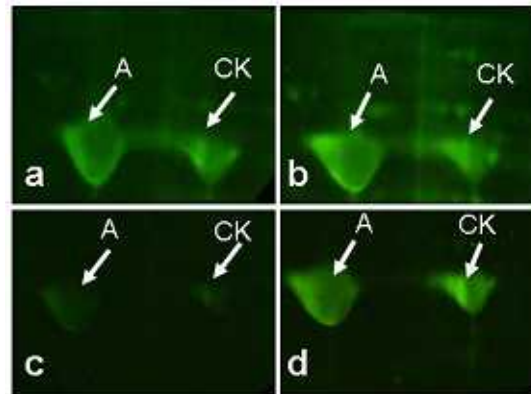


図3 カルボニル化の時系列変化。OLETF ラットでは LETO に比べて、糖尿病発症以前の 12 週齢からカルボニル化が亢進していた。A: アクチン、CK: クレアチンキナーゼ。a), b) 糖尿病 OLETF ラット。c), d) コントロール LETO ラット。a), c) 12 週齢。b), d) 30 週齢。

糖尿病発症以前の 12 週齢からカルボニル化、3 種類の糖化とも亢進していたことから、蛋白量の増減だけではわからなかった蛋白質異常が、これらの翻訳後修飾異常を調べることで明らかになった。

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 6 件)

Seimiya M, Tomonaga T, Matsushita K, Sunaga M, Oh-Ishi M, Koderu Y, Maeda T,

Takanao S, Togawa A, Yoshitomi H, Otsuka M, Yamamoto M, Nakano M, Miyazaki M, Nomura F. Identification of novel immunohistochemical tumor markers for primary hepatocellular carcinoma; clathrin heavy chain and formiminotransferase cyclodeaminase. *Hepatology* 48: 519-530 (2008) 査読有

Okusa H, Koder Y, Oh-Ishi M, Minamida Y, Tsuchida M, Kavoussi N, Matsumoto K, Sato T, Iwamura M, Maeda T, Baba S. Searching for new biomarkers of bladder cancer based on proteomic analysis. *Journal of Electrophoresis* 52: 19-24 (2008) 査読有

Sawada A, Ueno T, Kawashima Y, Haruta-Satoh E, Oh-Ishi M, Koder Y, Maeda T. Protein carbonyl detection by two-dimensional fluorescence difference gel electrophoresis. *Journal of Electrophoresis* 52: 9-17 (2008) 査読有

Oh-Ishi M, Koder Y, Furudate S, Maeda T. Disease proteomics of endocrine disorders revealed by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics Clinical Applications* 2: 327-337 (2008) 査読有

Wu D, Tomonaga T, Sogawa K, Satoh M, Sunaga M, Nezu M, Oh-Ishi M, Koder Y, Maeda T, Ochiai T, Nomura F. Detection of biomarkers for alcoholism by two-dimensional differential gel electrophoresis. *Alcohol Clinical Experimental Research* 31: S67-71 (2007) 査読有

Oh-Ishi M, Maeda T. Disease proteomics of high-molecular-mass proteins by two-dimensional gel electrophoresis with agarose gels in the first dimension (Agarose 2-DE). *Journal of Chromatography B* 849: 211-222 (2007). 査読有

〔学会発表〕(計 13 件)

大石正道, 平田直之, 前田忠計 牛肉偽装問題へのプロテオーム解析によるアプローチ 第 59 回日本電気泳動学会総会 2008.11.16. 相模原市

大草洋, 松本和将, 小寺義男, 土田繭美, 南田諭, 大石正道, 前田忠計, 馬場志郎 アガロース二次元電気泳動法により発見された新規膀胱癌腫瘍マーカー 第 67 回日本癌学会学術総会 2008.10.29. 名古屋

清宮正徳, 朝長毅, 松下一之, 大石正道, 小寺義男, 前田忠計, 高野重紹, 吉富秀幸, 大塚将之, 山本雅一, 宮崎勝, 野村文夫 原発性肝細胞癌の新たな免疫組織化学マーカー: CHC および FTCD 第 67 回日本癌学会学術総会 2008.10.29. 名古屋

Oh-Ishi M, Koder Y, Maeda T. Multicolor detection of posttranslational modifications of proteins on a single 2-DE pattern by quantum dot

technology. 17th Meeting of Methods in Protein Structure Analysis (MPSA2008: 第 17 回タンパク質構造解析法会議) 2008.8.28. 札幌

野村文夫, 朝長毅, 清宮正徳, 木村明佐子, 曾川一幸, 大石正道, 小寺義男, 前田忠計 各種プロテオーム解析技術を組み合わせた原発性肝癌のバイオマーカー探索 日本ヒトプロテオーム機構(JHUP)第 6 回大会 2008.7.30. 大阪府茨木市

大石正道, 小寺義男, 前田忠計 量子ドット技術を用いた複数のタンパク質翻訳後修飾の同時検出 日本ヒトプロテオーム機構(JHUP)第 6 回大会 大阪府茨木市 2008.7.29.

大石正道 タンパク質翻訳後修飾の網羅的解析法による疾患プロテオーム解析 第 58 回日本電気泳動学会シンポジウム「基礎研究から様々な応用研究へ飛躍する最先端プロテオミクス」2008.6.13 東京

Oh-Ishi M, Koder Y, Maeda T, Tomonaga T, Nomura F. Disease proteomics of high-molecular-mass proteins (>100kDa) by agarose 2-DE and LC-MS/MS. PepCon-2008 (タンパク質・アミノ酸第 1 回国際会議) 2008.4.22. 中国・深圳

大石正道, 平田直之, 前田忠計 食肉偽装検出用ツール開発のためのプロテオーム解析 2SY03 シンポジウム: プロテオミクスから見た食と健康 日本農芸化学会 2009 年度大会 2008.3.28. 福岡

大石正道 一次元目にアガロース IEF ゲルを用いた二次元電気泳動(アガロース 2-DE)法を基盤とした疾患プロテオーム解析 2007.11.8. 山口県宇部市

Oh-Ishi M, Nii Y, Koder Y, Okusa H, Fujita T, Iwamura M, Baba S, Maeda T. High-molecular-mass proteomics of human renal cell carcinoma by 2-DE using agarose gels for IEF. HUPO 6th Annual World Congress, Seoul 2007.10.9. Seoul, Korea.

Oh-Ishi M, Koder Y, Maeda T. Disease proteomics of high-molecular-mass proteins by 2-DE with agarose gels in the first dimension (Agarose 2-DE) and LC-MS/MS. 10th International Congress on Amino Acids and Proteins. 2007.8.23. Kallithea, Chalkidiki, Greece.

大石正道 アガロース 2-DE を用いたヒト腎細胞癌プロテオミクスにおけるサンプル調製法改良の重要性 第 3 回日本臨床プロテオーム研究会 2007.4.28. 東京

〔図書〕(計 1 件)

大石正道 量子ドットの生命科学領域への応用 シーエムシー出版 (2007) 総ページ数 248 ページ

6 . 研究組織

(1)研究代表者

大石 正道 (OH-ISHI MASAMICHI)

北里大学・理学部・講師

研究者番号：40233027