

機関番号：32666

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20591288

研究課題名（和文）酸素感受性蛋白質の発見に向けて
－プロテオミクス解析からのアプローチ－

研究課題名（英文）Discovery of oxygen-sensitive protein -Proteomics approach-

研究代表者

勝部 康弘 (KATSUBE YASUHIRO)

日本医科大学・医学部・准教授

研究者番号：20246523

研究成果の概要（和文）：

プロテオミクス解析により、動脈管（DA）ならびに末梢肺動脈（PPA）を用いて酸素感受性蛋白質を発見することを目的とする。対象は胎仔家兎DAならびに新生仔家兎PPAである。蛋白質解析は①SELDI TOF-MS型質量解析装置と②QSTAR Elite Hybrid LC-MS/MS Systemで行った。SELDI TOF-MS型質量解析装置による解析では、PPAに比較してDAに高発現している蛋白質の存在が確認できた。iTRAQ 2D-LC-MS/MS法による解析でも未熟胎仔DAより成熟胎仔DAで高発現している蛋白質存在などが確認できた。

研究成果の概要（英文）：

The aims of this study is to discover oxygen sensitive-protein using ductus arteriosus (DA) and peripheral pulmonary arteries (PPA) by proteomics analysis. Fetus rabbit DA and newborn rabbit PPA are used. Protein analysis is performed by SELDI TOF-MS analyzer and QSTAR Elite Hybrid LC-MS/MS system. Proteins highly expressed in DA compared to PPA are observed by SELDI TOF-MS system. Similarly, proteins highly expressed in mature fetus DA compared to immature fetus DA are observed by QSTAR Elite Hybrid LC-MS/MS system.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：酸素感受性、蛋白質、プロテオミクス、プロテインチップ、動脈管

1. 研究開始当初の背景

(1) 動脈管は胎生期には胎児肺動脈の血液を大動脈にバイパスするという非常に重要な役割を果たしている組織である。出生後は新生児の血液中の酸素分圧の上昇に伴い収縮するという特異な反応をする組織でもある。動脈管の特異な反応である酸素分圧上昇による収縮性は発達により変化し、一般的にはより未熟な胎児ほど収縮性が悪くなる。未熟児の動脈管開存症がこれにあたる。一方、肺動脈特に血圧調節機能を有する末梢肺動脈は酸素により拡張する。動脈管と相反する反応を示す。

(2) 我々の研究グループではこれまで動脈管の酸素感受性に関する研究を行ってきました。この研究テーマに関連した研究に対し科学研究費助成金の交付を受け、動脈管の酸素による閉鎖機序として、ATP感受性Kチャンネル(K_{ATP} チャンネル)ならびに電位依存性Kチャンネル(K_v チャンネル)が重要な役割を果たしていることを電気生理学的手法(パッチクランプ法)により突き止めてきた。

2. 研究の目的

プロテオミクス解析により、酸素により収縮する血管の代表として動脈管血管組織を、酸素により拡張する血管の代表として末梢肺動脈血管組織を用いてそれぞれの血管特有の蛋白質の発現性を明らかにすることを目的とする。また、別の側面として、発達の面から検討を加える。具体的には特徴的と考えられる蛋白質の発現性が発達によりどのように変化するのかを妊娠週数を変え検討する。

3. 研究の方法

研究に当たり、日本医科大学動物倫理委員会から研究許可を得た(許可番号 H19-009)。使用する麻酔薬はネブタールを用い、耳静脈あるいは腹腔内へ投与し、十分な鎮静を得たのちに実験を開始した。

(1) **組織からの蛋白質の抽出**: 妊娠後期の妊娠家兎から胎児を帝王切開により取り出す。取り出した胎児から顕微鏡下に動脈管組織を切除する。切除した動脈管組織を試薬溶液の中でホモジェナイザーにより微細な組織にまで碎き、冷却遠心を行い、蛋白質溶液を作成

する。対象は未熟児として妊娠23日、成熟児として妊娠30日胎児から動脈管組織と、対象として、生後2日新生児から末梢肺動脈(第3分枝以降の細動脈)を用いた。

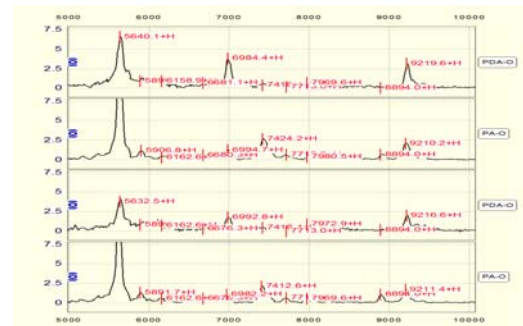
(2) **プロテインチップシステム (SELDI TOF-MS 型質量解析装置) による解析**: (1) で得られた目的とする蛋白質を含む溶液を用いてプロテインチップ作成マニュアルに従い金属修飾チップ(IMAC)を用いプロテインチップを作成した。作成したプロテインチップを SELDI TOF-MS 型質量解析装置で解析した。

(3) **iTRAQ 2D-LC-MS/MS 法による解析**: (2) と同様に(1)で得られた目的とする蛋白質を含む溶液を用いて質量分析装置(QSTAR Elite Hybrid LC-MS/MS System)を用い解析を行った。試薬は iTRAQ 試薬を用いた。

4. 研究成果

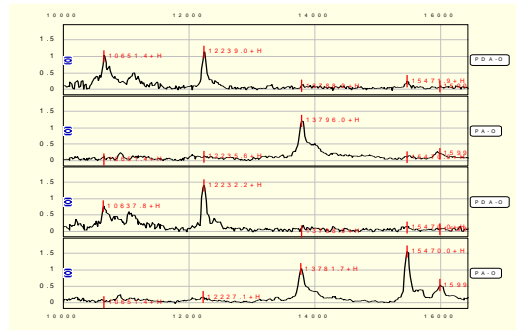
(1) **プロテインチップシステム (SELDI TOF-MS 型質量解析装置) による解析**: 動脈管より末梢肺動脈において高発現している蛋白質は 5640da、7242da、13781da 付近に認められた。逆に、末梢肺動脈より動脈管において高発現している蛋白質は 4268da、6984da、8185da、10635da、12153da、12339da 付近に認められた。一方、高酸素状態で多く発現し、低酸素状態で発現が抑制された蛋白質は末梢肺動脈ならびに動脈管とも 4268da 付近で認められた(図 I-1~I-6 参照)。

図 I-1



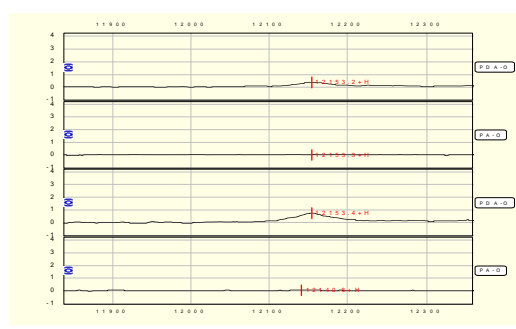
末梢肺動脈>動脈管: 5640da、7242da
動脈管>末梢肺動脈: 6984da

図 I-2



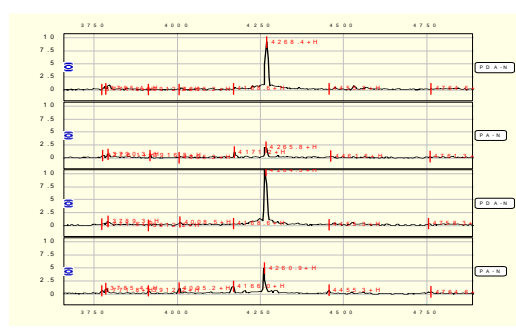
末梢肺動脈>動脈管 : 1378da
 動脈管>末梢肺動脈 : 10651da、12339da

図 I-3



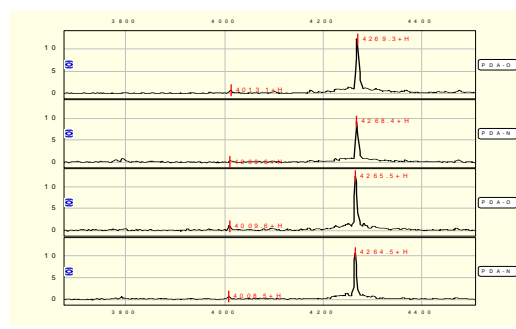
動脈管>末梢肺動脈 : 12153da

図 I-4



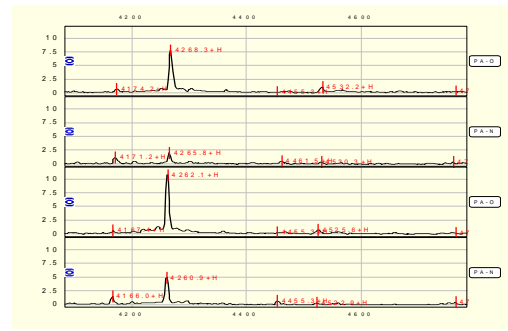
動脈管>末梢肺動脈 : 4268da

図 I-5 動脈管



高酸素>低酸素 : 4268da

図 I-6 末梢肺動脈



高酸素>低酸素 : 4268da

(2) iTRAQ 2D-LC-MS/MS 法による解析: 同定された蛋白質の総数は 202 種 (信頼度 99%以上 : 12 種, 信頼度 95%以上 : 22 種, 信頼度 66%以上 : 52 種) であった。

A: 胎児動脈管組織の発達によるたんぱく質発現の比較: 30 日胎仔 DA と 23 日胎仔 DA で蛋白質発現比が 2 以上あるいは 0.5 の蛋白質はそれぞれ、2 以上が 25 種、0.5 以下(A-II) が 43 種の蛋白質が同定された。

B: 成熟胎児動脈管組織と末梢肺動脈血管組織におけるタンパク質発現の比較: 2 日新生仔 PA と 30 日胎仔 DA で蛋白質発現比が 2 以上(B-I) が 34 種、0.5 以下(B-II) が 23 種の蛋白質が同定された。

C: 30 日胎仔 DA と 23 日胎仔 DA の比が 2 以上でかつ 2 日新生仔 PA と 30 日胎仔 DA の比が 0.5 以下(A-I×B-II)の蛋白質は 17 種同定された (図 II-1)。

D: 30 日胎仔 DA と 23 日胎仔 DA の比が 0.5 以下でかつ 2 日新生仔 PA と 30 日胎仔 DA の比が 2 以上(A-II×B-I)の蛋白質は 28 種同定された (図 II-2)。

図 II-1 30 日胎仔 DA と 23 日胎仔 DA の比が 2 以上でかつ 2 日新生仔 PA と 30 日胎仔 DA の比が 0.5 以下の蛋白質。17 種同定された。

数	Unused	Name
1	5.72	Endoplasmin (Heat shock protein 90 kDa beta member 1) (94 kDa glucose-regulated protein) (GRP94)
2	4.00	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)
3	2.01	LIM and SH3 protein 1
4	1.70	Histone H1.4
5	1.08	Na(+)/H(+) exchanger
6	0.77	pro alpha1 type II collagen
7	0.52	immunoglobulin heavy chain variable region
8	0.15	translation initiation factor eIF-2B-delta
9	0.13	ezrin
10	0.12	aquaporin 5
11	0.11	troponin T cardiac isoform
12	0.11	Keratin, type II cytoskeletal 3 (Cytokeratin-3) (CK-3) (Keratin-3) (K3)
13	0.11	antibody variable domain
14	0.10	CD1e molecule
15	0.06	lactase-phlorizin hydrolase
16	0.06	immunoglobulin kappa light chain variable region
17	0.06	histocompatibility antigen DM heterodimer heavy chain

図 II-2 30 日胎仔 DA と 23 日胎仔 DA の比が 0.5 以下でかつ 2 日新生仔 PA と 30 日胎仔 DA の比が 2 以上の蛋白質。28 種同定された

数	Unused	Name
1	2.54	urokinase-type plasminogen activator
2	1.40	solute carrier family 16 member 2
3	0.72	antibody variable domain
4	0.59	kallikrein 1
5	0.54	T-cell receptor precursor (V-J-C region)
6	0.51	immunoglobulin heavy chain V-D-J region
7	0.43	immunoglobulin kappa light chain VkJk region
8	0.38	protein kinase C, zeta
9	0.36	nuclear receptor subfamily 3, group C, member 1 (glucocorticoid receptor)
10	0.29	protein of unknown function
11	0.27	CD5 molecule
12	0.19	CD80 precursor
13	0.18	interleukin-10
14	0.15	lefty
15	0.14	eukaryotic translation initiation factor 4 gamma, 2
16	0.13	cytochrome c oxidase subunit I
17	0.12	Niemann-Pick disease, type C1
18	0.11	chondromodulin-I precursor
19	0.10	immunoglobulin heavy chain V-D-J region
20	0.08	Chloride channel protein 3 (ClC-3)
21	0.08	chaperonin containing TCP1, subunit 6B (zeta 2)
22	0.07	immunoglobulin heavy chain V-D-J region
23	0.07	Kir4.1
24	0.06	cathepsin W
25	0.06	immunoglobulin heavy chain variable region
26	0.05	RecName: Full=Nuclear autoantigenic sperm protein; Short=NASP
27	0.05	immunoglobulin heavy chain V-D-J region
28	0.05	Potassium voltage-gated channel subfamily D member 1 (Voltage-gated potassium channel subunit Kv4.1)

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 0 件)

[学会発表] (計 1 件)

勝部康弘、ほか孫芳、羽山恵美子、中西敏雄、小川俊一：家兔血管平滑筋における酸素感受性蛋白質－iTRAQ 2D-LC-MS/MS法による解析－第 4 5 回日本小児循環器学会学術集会、2009 年 7 月、神戸国際会議場。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

勝部 康弘 (KATSBUE YASUHIRO)
日本医科大学・医学部・准教授
研究者番号：20246523

(2) 研究分担者

小川 俊一 (OGAWA SYUNICHI)
日本医科大学・医学部・教授
研究者番号：50194436

浅野 健 (ASANO TAKESHI)
日本医科大学・医学部・准教授
研究者番号：70277490