

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 28 日現在

機関番号：24402

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790258

研究課題名（和文） HSP70 インタラクトーム解析による心疾患発症・進展機序の解明

研究課題名（英文） A proteomic strategy to elucidate stress-damaged proteins in cardiovascular disease.

研究代表者

塩田 正之（SHIOTA MASAYUKI）

大阪市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：30381990

研究成果の概要（和文）：循環器疾患時にダメージを受けるタンパク質を明らかにするために熱ショックタンパク質（Hsp70）抗体を作製し、それを用いたアフィニティー精製と質量分析を組み合わせた新たな機能性プロテオミクスを開発した。ヒト大動脈血管平滑筋細胞を用いて Hsp70 結合分子の探索を試みた結果、アンジオテンシン II もしくは過酸化水素刺激に特異的に結合するタンパク質を見出した。これらのうちのいくつかは血管障害時に発現誘導されることが報告されており、本法が循環器疾患の発症進展に関わる分子の選抜に有用である示唆された。

研究成果の概要（英文）：Heat shock protein 70 (Hsp70), known as molecular chaperones, participates in the maintenance of cellular protein homeostasis. Hsp70 has essential roles in protecting cells from the large variety of environmental stresses. However, the mechanisms of damage avoidance in cardiovascular system remain elusive, mainly due to the technical limitation in identify damaged proteins selectively. Here, we established Hsp70 antibodies for interactome approach. We combined affinity purification against Hsp70 antibodies and mass spectrometry to comprehensively identify the Hsp70 binding proteins from the human aortic smooth muscle cell lysate. Using this method, we identified 152 proteins, of which 32 were depending on treatment of Angiotensin II or hydrogen peroxide. Some of them were in good agreement with previous report that it has showed significance in smooth muscle cell. This system provides an intensive tool as functional proteomics and will provide insights into the mechanisms in cardiovascular diseases.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,700,000	810,000	3,510,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：インタラクトーム、熱ショックタンパク質、ストレス

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

### 1. 研究開始当初の背景

心血管疾患発症には、多くの環境要因が複合的に絡み合っており、種々のストレスによって組織の恒常性が破綻することによる機能の低下がその一因である。一般にストレスに拮抗し、生体の恒常性を維持している分子群の一種に、熱ショックタンパク質 70 (HSP70) ファミリーがある。HSP70 は分子シャペロンとして異常タンパク質やダメージを受けたタンパク質、新たに合成されるタンパク質に会合する。そして必要なタンパク質を救助したり、修復不可能なタンパク質を分解すること、あるいは新生タンパク質の合成を促進することによって細胞を危機的状態から救助する。よって HSP70 会合分子を明らかにできれば、障害を受けているタンパク質を同定することができ、ひいては疾患発症に関わる分子を特定できると考えられる。

### 2. 研究の目的

ストレス負荷時の HSP70 会合分子を明らかにすることで障害を受ける分子、新生分子などの心・血管保護に関わる分子を同定し、循環器疾患発症のメカニズム解明に挑む。実際には HSP70 抗体を作製し、HSP70 インタクトーム解析によって HSP70 会合分子を明らかにする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 抗 HSP70 抗体の作製とアフィニティー精製の系の構築

GST-HSP70 を抗原としてラット腸骨リンパ節法にて HSP70 モノクローナル抗体を作製した。同様に相同性の高い HSC70 についても GST-HSC70 を作製し、ELISA により HSP70 にのみを認識するクローンを選抜した。選択クローンをを用いて免疫沈降を行い、沈降物を SDS-PAGE 後、銀染色することで、結合分子のパターン化を行い、結合分子のバンドパターンの異なるクローンを 9 つ選抜した。これらを大量培養後、カチオンカラムを用いた HPLC にて精製した。この 9 つのクローンを混合した後、NHS activated sepharose に共有結合したアフィニティー精製用ビーズを作製した。その後、精製の条件（反応時間、ビーズ用量、サンプルとの量比、洗浄・溶出のバッファの組成と方法）を順次、検討した。

#### (2) 平滑筋細胞を用いた HSP70 結合分子の同定

アンジオテンシン II (Ang II) もしくは過酸化水素にて刺激したヒト大動脈平滑筋細胞よりタンパク抽出液を調製し、HSP70 抗体ビーズにてアフィニティー精製を行った。HSP70

複合体を解離させ、トリプシンによるゲル内消化を行った。脱塩後のサンプルをハイブリッド型 LC/MS/MS (QSTAR elite System) にて解析し、結果 ProteinPilot にてデータベースと照合し、同定した。

### 4. 研究成果

#### (1) 抗 HSP70 抗体の作製とアフィニティー精製の系の構築

GST-HSP70 を抗原として腸骨リンパ節法にて HSP70 モノクローナル抗体を作製した。756 の独立クローンより ELISA によって選抜した 34 クローンから免疫沈降能を指標に 9 クローンの抗体産生細胞を選抜した。この際、Hsc70 と交叉するクローンは除外した。抗体をハイブドーマの培養上清よりカチオンカラムにて精製し、9 種類の HSP70 抗体のエピトープを決定した。サブクラスは IgG2a が 6 つ、IgG2b が 3 つであった。これら 9 種類を混合し、NHS activated sepharose に共有結合したアフィニティー精製用ビーズを作製し NHq と命名した。続いてこれを用いたバッチ精製の系の至適化を行った。交叉性を評価した結果、作出抗体はいずれもヒト、ブタ、サルとは交叉する一方で、マウスおよびラットと交叉しなかったため、当初予定していたマウスの病態モデルを使った解析は変更を余儀なくされた。ヒトの場合、心筋細胞入手が困難であること、病態モデルの作製が不可能であることより、解析対象をヒト平滑筋細胞を用いた実験系に大幅に変更した。一方で、本系は血清試料に対する解析を可能としており、血中に存在する Hsp72 を効率的に捕捉可能であることがわかった。この際には従来の血清プロテオームが必須としている煩雑な前処理を全く必要としない点で、血清プロテオームにおけるブレイクスルーになりうることが示唆された。そこで「分子シャペロン結合分子を標的とした血中タンパク質の高効率同定システム」として特許出願した。

(2) Ang II (100 nM) もしくは過酸化水素 (100  $\mu$ M) 存在下で 1、6 時間培養したヒト大動脈平滑筋細胞由来のタンパク質に対して NHq によるアフィニティー精製を行った後、質量分析によって同定した。全 152 種類のタンパク質を同定し、いずれかの刺激に特異的に結合するタンパク質として 32 種類を同定した。Go タームに基づいて機能分類し、刺激や時間の変化に応じた結合分子を検討した。Ang II 刺激 1 時間で糖代謝やエネルギー産生、核酸合成、6 時間でゲノムの再構成を含むエピゲノミックな変化に関わるタンパク質群の結合を見出した。また、AII 刺激でのみ複数のカルシウム結合タンパク質の会合を認

めた。一方で過酸化水素処理によってアポトーシスを含む細胞死関連タンパク質、細胞の分化に関わるタンパク質群の結合を認めた。さらに両刺激により共通して結合するタンパク質は5種類あった。同定したタンパク質にはシグナル分子や転写因子などが含まれる一方でミオシンやアクチンといった筋細胞の特質を反映した分子の比率が大きかった。同定分子のいくつかはこれまでに血管障害時のシグナル伝達や機能代償に関与していることが報告されており、本法は循環器疾患の発症進展における重要分子の選抜において有用な方法になりうることを示唆された。種を選ぶ点で実験方法に制約があるが、ヒト、ブタ、サルといった種由来の材料にとっては本システムは非常に有効であることが明らかとなった。

#### 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)

- ① Yamazaki T, Yamashita N, Izumi Y, Nakamura Y, Shiota M, Hanatani A, Shimada K, Muro T, Iwao H, Yoshiyama M. The antifibrotic agent pirfenidone inhibits angiotensin II-induced cardiac hypertrophy in mice. *Hypertens Res.* 2012;35:34-40
- ② Shiota M, Hikita Y, Kawamoto Y, Kusakabe H, Tanaka M, Izumi Y, Nakao T, Miura K, Funae Y, Iwao H. Pravastatin-induced proangiogenic effects depend upon extracellular FGF-2. *J Cell Mol Med.* doi: 10.1111/j.1582-4934.2011.01494.x.
- ③ Tanaka M, Shiota M, Okada S, Harada A, Odawara J, Mun S, Iwao H, Ohkawa Y. Generation of a rat monoclonal antibody specific for hsp72. *Hybridoma (Larchmt)*. 2011;30:397-400
- ④ Shiota M, Saiwai H, Mun S, Harada A, Okada S, Odawara J, Tanaka M, Iwao H, Ohkawa Y. Generation of a rat monoclonal antibody specific for heat shock cognate protein 70. *Hybridoma (Larchmt)*. 2010;29:453-456
- ⑤ Shiota M, Kusakabe H, Izumi Y, Hikita Y, Nakao T, Funae Y, Miura K, Iwao H. Heat shock cognate protein 70 is essential for akt signaling in endothelial function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010;30:491-497
- ⑥ 塩田正之、泉康雄、中尾隆文、岩尾洋 内皮機能における Heat shock cognate protein (Hsc70) の役割 血管 2010 33,

2, 49-54

[学会発表] (計5件)

- ① 塩田正之、田中昌子、岩尾洋  
HSP70s 結合分子を標的とした抗がん剤創薬戦略  
第85回日本薬理学会年会 2012年3月14-16日 京都
- ② 山口麻貴、塩田正之、田中昌子、岡真優子、泉康雄、三浦克之、大川恭行、岩尾洋  
細胞外 FGF-2 は内皮細胞の生存に重要である  
第85回日本薬理学会年会 2012年3月14-16日 京都
- ③ Shiota, M., Hikita, Y., Yukiko, K., Tanaka, M., Kusakabe, H., Izumi, Y., Nakao, T., Iwao, H.  
Pravastatin-induced angiogenesis depends upon FGF-2/FGFR activation.  
The 6th International Symposium 2011 Kyoto (2011.4.1-4.2)
- ④ 塩田正之、文沙耶、田中昌子、中尾隆文、泉康雄、三浦克之、岩尾洋  
Hsp70s インタラクトーム解析による障害タンパク質の高効率同定  
第84回日本薬理学会年会 2011年3月22-24日 横浜 (誌上開催)
- ⑤ 塩田正之、泉康雄、田中昌子、岩尾洋  
Heat Shock cognate protein 70 (Hsc70) is essential for Akt signaling in endothelial function.  
第33回日本分子生物学会 2010年12月7-10日 神戸

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: 分子シャペロン結合分子を標的とした血中タンパク質の高効率同定システム  
発明者: 塩田正之、岩尾洋  
権利者: 大阪市立大学  
種類: 特願  
番号: 2011-169552

出願年月日：2011年8月2日  
国内外の別：国内

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

塩田 正之 (SHIOTA MASAYUKI)  
大阪市立大学・大学院医学研究科・講師  
研究者番号：30381990

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし