

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592670

研究課題名(和文)細胞表面に局在する“細胞内タンパク質”の網羅的解析と組織障害・修復機能の解明

研究課題名(英文)Comprehensive analysis of intracellular proteins on the cell surface for elucidation of their roles in tissue damage and repair.

研究代表者

泉 友則 (Izumi, Tomonori)

山口大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：00261694

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：組織損傷時に様々な細胞内タンパク質が漏出するが、細胞外での機能的影響の多くは不明である。細胞外で機能し、細胞応答に影響を与える細胞内タンパク質を特徴づけるために、細胞表面標識と質量分析に基づく同定技術を用いて、細胞表面結合タンパク質を選択的に解析した。U937細胞表面から405種類の細胞内タンパク質を含む計454種類のタンパク質を同定した。これらのサブセットには、様々な高含量タンパク質に加えて、HMGB1などの臨床マーカーも含まれていた。405種類中、162種類については、損傷時にHEK293細胞から漏出することが明らかになり、特定のタンパク質については、シグナル伝達経路への影響も確認された。

研究成果の概要(英文)：Although various intracellular proteins are released from damaged tissues, functional impact of these proteins in the extracellular space remains largely unknown. To characterize intracellular proteins potentially functioning in the extracellular space and affecting cellular responses, cell surface-associated proteins were selectively identified using a combination of cell surface labeling and mass spectrometry-based protein identification technology. We identified 454 proteins, including 405 putative intracellular proteins, on the surface of U937 cells. Besides a variety of high-abundance proteins, the protein subset included some of clinical markers, such as HMGB1. Out of the 405 proteins, 162 proteins were also found to be released from damaged HEK293 cells. Furthermore, a certain protein was confirmed to affect a signal transduction pathway in U937 cells.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・救急医学

キーワード：機能プロテオーム解析 細胞表面標識 細胞質漏出 炎症メディエーター 疾患マーカー

1. 研究開始当初の背景

(1) 細胞内タンパク質の細胞外への漏出

タンパク質は細胞膜で外界と隔離された還元的環境の細胞質中で、あるいは、さらにコンパートメント化された核、小胞体、ゴルジ体、ミトコンドリアなどの細胞内小器官内で、時空間的制御のもと、活性を発現し細胞機能の調節を行っている。シグナル配列を持つ典型的な分泌タンパク質は小胞体-ゴルジ体を経由して積極的に細胞外へ輸送されるのに対して、細胞内に局在するタンパク質は細胞膜の損傷にともなう、あるいは新しいタイプの分泌機序により放出されると考えられる。

(2) 細胞外の“細胞内タンパク質”と病態

細胞内タンパク質の漏出は、様々な疾患において臓器障害の指標となる。例えば蘇生後脳症では neuron specific enolase (NSE) や glial fibrillary acidic protein (GFAP)、S-100B などは、いずれも中枢神経組織に特異的に発現する細胞内タンパク質で、体液中のこれらの濃度上昇は中枢神経組織障害の程度と相関し、バイオマーカーとして利用されている。一方、ハウスキーピング的なクロマチン構成タンパク質である high mobility group box-1 (HMGB1) は、広汎な発現分布とは対照的に、近年、敗血症などの急性期病態を悪化させる炎症メディエーターとして、機能的に注目されている。このような病態と相関し、放出されるタンパク質には、病態悪化の要因、あるいは逆に、侵襲に対抗する生理的な防御・修復反応に関連することが想定される。しかしながら、様々な組織障害で見られる大多数の異所性の細胞内タンパク質については、その分子機能の病態への影響は見過ごされている。

(3) 疾患プロテオーム解析研究からの示唆

申請者らは、これまで中枢神経障害を中心とした救急領域のバイオマーカー探索と病態機序解明を目指して、独自の高性能解析技術を利用した網羅的タンパク質解析を進めてきた。蘇生後脳症患者脳脊髄液より同定されたタンパク質のうち、3割以上を細胞内タンパク質が占め、それらの中には予後の悪化に伴い増加する一群のタンパク質が含まれていた。異所性タンパク質の増加は、組織障害の結果であると同時に、病態悪化の原因とも考えられる。申請者らが同定した新しい蘇生後脳症予後判定マーカーについても、単なるマーカーとして以上の、予後を左右する機能的な重要性が想定されている。

(4) 細胞内タンパク質の細胞外における機能を解き明かす方法論

申請者らのこれまでの疾患プロテオーム解析で同定した「組織障害にともない細胞外へ漏出す細胞内タンパク質」にはヒストンやリボソームタンパク質などの核タンパク質、

アクチンなどの構造タンパク質、各種代謝系酵素、プロテアーゼ・プロテアーゼインヒビターなどが含まれ、それらの活性は多岐にわたり、網羅的な機能解析は困難である。

申請者らの高性能大規模タンパク質解析システムは、マウス ES 細胞のプロテオーム解析に応用され、細胞全体から 1,700 種類、細胞膜画分から 300 種類以上の発現タンパク質を同定した。特に、申請者らが開発した細胞表面標識技術は、高性能解析システムとの組み合わせで、細胞膜受容体の高感度検出、およびアミノ酸配列と表面局在の同時決定が可能である。マウス ES 細胞受容体の網羅的解析では、典型的な細胞内タンパク質が多数、細胞表面に存在することを明らかにした。

以上のことから、本研究では、「異所性細胞内タンパク質の細胞影響は細胞表面への結合を介する」と仮定し、高性能プロテオーム解析技術を利用して、細胞表面に結合する細胞内タンパク質の網羅的動態解析を行うこととした。

2. 研究の目的

細胞外における細胞内タンパク質の機能的な意義を明らかにするためには「どのタンパク質が細胞外に放出され、いかにして細胞に作用し、どのような影響をあたえるか？」という問題を明らかにする必要がある。そこで、細胞表面に結合しうる細胞内タンパク質を網羅的、かつ選択的に同定し、細胞損傷にともなうこれらの動態（細胞外への漏出）を解析する。主要な細胞外機能分子候補について、増殖やアポトーシスにおける細胞影響を解析し、組織の損傷・修復という観点から新たな分子機能を提示する。

3. 研究の方法

(1) 細胞への細胞内タンパク質の結合と表面選択的標識

炎症関連細胞のモデルとしてヒト単球系細胞株 (U937 細胞など) を使用した。無血清培地中で U937 細胞にヒト線維芽細胞抽出タンパク質を添加し、一定時間インキュベートした後、細胞表面を生理食塩水 (PBS) にて洗浄し、細胞膜不透過性試薬 Sulfo-NHS-LC ビオチンによる標識、グリシンを含む PBS による反応停止、洗浄を行い、最終的に U937 表面に結合したタンパク質を溶出し、回収した。

(2) 細胞表面結合タンパク質の網羅的同定

表面結合タンパク質を濃縮後、常法に従って尿素変性、還元アルキル化、およびトリプシン消化を行い、アビジンカラムによりビオチン標識ペプチドを精製し、タンパク質同定試料とした。大規模同定はナノフロー液体クロマトグラフィー/四重極飛行時間型ハイブリッド質量分析装置 (ナノフロー LC-MS/MS) により行い、配列データベースに対して MASCOT 検索を行った。本実験では、ビオチン

標識を含有するペプチドのMS/MSスペクトルのみを使用し、表面タンパク質を選択的に同定した。さらに公開データベース上のアノテーション情報を収集し、細胞内局在や分子機能に関して分類し、同定タンパク質リストを作成した。

(3) 細胞損傷により漏出する細胞内タンパク質の動態解析

無血清条件下で培養したヒト線維芽細胞株 HEK293 細胞に過酸化水素を添加後、経時的に培地を回収した。死細胞、およびその断片を遠心除去後、培地中のタンパク質を定量し、組成を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で確認した。さらに常法に従って尿素変性、還元アルキル化、およびトリプシン消化を行い、ナノフロー LC-MS/MS によりタンパク質同定を行った。

(4) 細胞影響解析のための機能分子候補の選定

同定タンパク質リストから、以下の項目を考慮して、細胞影響解析を行う候補分子を選定した。細胞表面からのタンパク質同定実験におけるヒットペプチド数、無血清培地中からのタンパク質同定実験におけるヒットペプチド数、これまでの疾患プロテオーム解析において明らかになっている疾患や病態との関連性。

(5) 異所性細胞内タンパク質の細胞影響解析

細胞外へ漏出した細胞内タンパク質の炎症反応への影響として、U937 細胞の MAP キナーゼのリン酸化を解析した。U937 細胞をリポポリサッカライド (LPS) あるいは機能分子候補にて刺激し、経時的に細胞を回収した。キナーゼインヒビター、およびプロテアーゼインヒビターを含む緩衝液中で細胞を破碎し、ウエスタンブロットを行った。検出は、キナーゼのリン酸ペプチド配列に対する抗体にて行った。

4. 研究成果

(1) U937 細胞表面結合タンパク質の選択的調製

U937 細胞を線維芽細胞抽出タンパク質の存在下 (およびコントロール実験として非存在下) でインキュベーションし、洗浄後、SuIfo-NHS-LC ビオチンによる標識を行い、さらに洗浄後、細胞表面に結合したタンパク質を溶出した。SDS-PAGE による解析では、結合実験のみならず、コントロール実験においても溶出画分にタンパク質が回収された。一方、アビジン-ペルオキシダーゼを使用したウエスタンブロット解析では、ビオチン標識されたタンパク質は結合実験の溶出画分のみ検出されたことから、膜不透過性試薬 SuIfo-NHS-LC ビオチンによる細胞標識が細胞表面結合タンパク質の選択的調製に有効

であると考えられた。結合実験からの溶出物について、還元・アルキル化、トリプシン消化を行い、さらにビオチン標識を含むペプチド断片のみを精製し、網羅的タンパク質解析の試料とした。

(2) 細胞表面結合タンパク質のプロテオーム解析

アビジンカラムにて精製したペプチド混合物のナノフロー LC-MS/MS 分析により、ビオチン標識された 2,185 種類のペプチド配列を決定し、これらが帰属する 454 種類のタンパク質を同定した。TMHMM server によるシグナル配列 / 膜貫通領域予測の結果、同定タンパク質の 89 % (405 種類) はシグナル配列 / 膜貫通領域を含まない典型的な細胞内タンパク質に分類された。この結果は、分析試料が“細胞表面に結合する細胞内タンパク質”に関して、高い選択性を持って調製されていることを裏付けている。

U937 細胞表面から同定されたタンパク質には、ヒートショックタンパク質、細胞骨格タンパク質、ヒストン、各種代謝酵素など、細胞内に高濃度で存在するハウスキーピングタンパク質が含まれていた。さらに、細胞表面への結合が既に報告されている HMGB1 や診断マーカーとして利用されているいくつかの疾患関連タンパク質も含まれていた。一方、Gene Ontology に基づくバイオインフォマティクス解析では、核局在や核酸結合に関連するアノテーションが多く、細胞表面結合タンパク質の全体像は、核タンパク質を主要グループとするタンパク質サブセットであることが明らかになった。

(3) 細胞損傷にともなう細胞外への漏出

細胞内タンパク質の漏出動態を明らかにするために、過酸化水素処理によりヒト線維芽細胞から放出されるタンパク質を網羅的に解析した。ナノフロー LC-MS/MS 分析により、HEK293 細胞から無血清培地中へ放出された 580 種類のタンパク質を同定した。U937 細胞表面結合タンパク質の同定結果と合わせて、最終的に 162 種類のタンパク質を、“細胞損傷にともなう細胞外へ漏出し、他の細胞に結合する一群の潜在的機能分子”とした。

(4) 漏出タンパク質の細胞影響

漏出タンパク質の細胞影響を明らかにするために、解析候補を絞り込み、これら潜在的機能分子の細胞内シグナルに対する作用を検討した。リポポリサッカライド (LPS) で刺激した U937 細胞に対して潜在的機能分子を培地中に添加し、MAP キナーゼ (Erk1/2) のリン酸化に対する影響をウエスタンブロットングにより解析した。LPS 刺激後 60 分の U937 細胞においては、Erk1/2 のリン酸化は 2 倍に上昇し、特定の潜在的機能分子 (Protein X1) が共存した場合のみ、リン酸化の程度はさらに増強された。Protein X1

による Erk1/2 リン酸化の増強効果は、LPS 無刺激時にも観察されたことから、Protein X1 が U937 細胞の細胞内シグナル伝達に直接作用していることが明らかになった。すなわち、損傷細胞から漏出した Protein X1 は、近傍の単球表面に結合し、その細胞機能（炎症反応など）を積極的に制御している可能性がある。

(5) まとめ

本研究課題においては、細胞外における細胞内タンパク質の機能的な意義を明らかにするために、細胞表面に結合しうる細胞内タンパク質を網羅的、かつ選択的に同定し、細胞損傷にともなうこれらの漏出動態を解析した。主要な潜在的機能分子候補について、細胞内シグナル伝達への影響を解析し、それらが細胞外で実際に機能分子として作用することを示した。これまでの研究成果を踏まえ、「細胞結合能を有する細胞内タンパク質には、組織損傷時に細胞外へ漏出し、新たな機能を発現する分子が含まれる」と結論付けた。

本研究成果は、異所性（細胞外）の細胞内タンパク質の組織障害・修復過程における機能的意義の一端を明らかにした。既知の診断マーカーや疾患関連タンパク質の病態への関与が明らかになれば、さらなる研究の進展や、臨床応用への発展も期待できる。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

泉友則，横山勝巳，坂井田功: Selective analysis of cell surface-associated proteins: characterization of intracellular proteins that are released from damaged cells and interact with the surface of human monocytic cell line U937. 第 12 回 HUP0 ヒトプロテオーム国際会議, 2013 年 9 月 17 日, 横浜 (パシフィコ横浜).

泉友則，横山勝巳，坂井田功: 損傷細胞から放出されヒト単球細胞株 U937 細胞表面と相互作用する細胞内タンパク質のプロテオーム解析. 第 86 回日本生化学会総会, 2013 年 9 月 11 日, 横浜 (パシフィコ横浜).

泉友則，横山勝巳，坂井田功: パイロット研究: U937 細胞表面に結合する細胞内タンパク質の選択的同定. 日本ヒトプロテオーム学会 2012 年大会 (JHUP0 第 10 回大会), 2012 年 7 月 27 日, 東京 (日本科学未来館).

〔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:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

6. 研究組織

(1) 研究代表者

泉友則 (IZUMI, Tomonori)
山口大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号: 00261694