

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 24 日現在

機関番号：32636

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25350824

研究課題名(和文) プロテオームによる唾液中のストレスマーカータンパク質の探索

研究課題名(英文) Search for stress marker proteins in rat saliva by proteomic analysis

研究代表者

大城 聡 (Oshiro, Satoru)

大東文化大学・スポーツ健康科学部・教授

研究者番号：30160485

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は精神ストレスと肉体ストレスに特有な唾液マーカータンパク質を探索し、国民のQOLに役立てることである。初年度はラットの唾液タンパク質の採取法、2年目は精神ストレス、3年目は肉体ストレス負荷した唾液タンパク質のプロテオーム解析を実施した。精神的ストレスで増加する顎下腺タンパク質、分泌タンパク質、各種酵素等を同定した。肉体ストレス負荷では相対的な定量解析が可能なiTRAQプロテオーム解析によって2倍以上増加または減少する候補マーカータンパク質を見出した。以上の結果から精神ストレスと肉体ストレスに対して共通なタンパク質、或いは何れかに特有と思われるストレス候補タンパク質などを見出した。

研究成果の概要(英文)：Saliva is a useful sample non-invasively collected from body fluid. Our objective in the present study is to search for saliva biomarkers for the differentiation between physical and mental stress for quality of life. First, we examined rat saliva marker proteins for mental stress by proteome using a rat mental stress model. The increased proteins by mental stress were subjected to liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry. We detected the known enzymes and secretory proteins with MW of 20-70KDa in rat saliva proteins. Secondly, we analyzed the biomarkers for physical stress by proteome after treadmill running loading to rats. After the separation by the above same method, the increased and/or decreased proteins by physical stress were used for LC-MS/MS and a comprehensive proteomic analysis (isobaric Tags for Relative and Absolute Quantitation, iTRAQ). We might find candidate biomarkers for mental and/or physical stress.

研究分野：生化学、分子生物学、神経化学、健康科学、スポーツ科学

キーワード：ストレス 精神ストレス 肉体ストレス 唾液タンパク質 プロテオーム iTRAQ解析

1. 研究開始当初の背景

疲労とストレスは相互に関係が深く国民のQOLに直結する研究課題である^{1,8)}。我々は過去2年間(2011年度及び2012年度)に渡り肉体及び精神疲労マーカーを探索し定性・定量が可能か検討した²⁾。

疲労にはスポーツや労働による肉体疲労、心労やストレスによる精神疲労がある。国民就労人口の2/3が疲労しており(1999年厚労省疲労研究班)、疲労研究は国民のQOLや就労効率に貢献できる研究課題である。我々は肉体及び精神疲労に対する疲労マーカーを測定することで疲労が定性・定量が可能であるか、更に脳内のどの遺伝子の発現が疲労に関与するか網羅的遺伝子の発現の解析も実施した。実験動物(ラット)を用い、尿中疲労マーカー候補として過酸化水素(H₂O₂)と共に尿中還元物質(抗酸化物質)のそれぞれ異なる日内変動を観察した結果、尿中H₂O₂は肉体及び精神疲労のマーカーになり得る可能性が示唆された^{3,4)}。H₂O₂は抗酸化物質により消去されるので、抗酸化物質の影響を受けない酸化ストレスマーカーとしてDNA酸化物質8-OHdGの測定を試み、更に精神疲労マーカーとして間脳における早期発現遺伝子c-fos mRNAをRT-PCR法によって測定した結果、初回の試みでは有意な差は見いだせなかった⁴⁾が2012年度にc-fosプローブを再設計し、ラット間脳の遺伝子発現をreal time PCR法によって測定し、精神ストレスとして水浸負荷4~6日で7~13倍の発現の増加を観察した。これを踏まえて精神ストレスのマーカーとしてc-fos及びc-fos以外のマーカータンパク質を探索する目的で、ラット間脳のRNA品質の高いRNA標品を抽出して次世代シーケンサー(RNAseq)による網羅的な遺伝子発現の解析を試みた。先行研究として報告のあった小胞体ストレス関連遺伝子発現の有意な差は見出されなかった⁵⁾が、他の遺伝子の発現について検討を重ね、今後ヒトのストレスマーカーの探索にも役立てたいと考えている。本研究ではストレス研究を更に深化させるために、尿よりも採取が容易で効率よくサンプルとして使用可能な唾液を使用してストレスマーカータンパク質の探索を試みることにした。

2. 研究の目的

ストレスには肉体ストレス、精神ストレス、その他様々なストレスがあり、過度なストレスや慢性的なストレスは過労や生活習慣病など様々な疾患の発症に関与する。本研究では被験者や実験動物に苦痛を与えることなく容易に採取可能な(非侵襲的)な唾液を使用して唾液中の新たなストレスマーカータンパク質を見出し、疲労や生活習慣病の予防に役立てることを目的として、実験動物を用いて肉体及び精神ストレス負荷後に唾液を採取し、電気泳動で分離後に泳動パターンから増減するタンパク質を選定し、質量分析計によって解析後にプロテオミクスのデータベースによ

ってストレスマーカーの候補タンパク質を特定することを試みた。

3. 研究の方法

(1) 精神ストレス負荷後のラットの唾液タンパク質の分離と分子量解析

雄ウィスターラット(三協ラボサービス(株))、8週令を12時間明暗サイクル(9:00~21:00を暗期、21:00~9:00を明期)で、室温22±1、湿度55±5%の環境下で飼育し、1週間予備飼育して環境順応させ、餌と水は自由摂取とした。精神ストレスとして25、3日間、水浸拘束した。精神ストレス負荷群として9匹(M1~M9)、対照群として6匹(C1~C6)を用い、それぞれ3匹(M1, M2, M3, C1, C2, C3)の唾液が分析用に用いられた。

ラット唾液タンパク質の分離は10% SDS-PAGEで一次元電気泳動し、クーマシー染色したタンパク質を25kDa以下、25-75kDa、75kDa以上の3分画に分けて、ストレス負荷群と対照群を比較することにより増加するタンパク質のみをそれぞれゲルから抽出した。

ゲル中のタンパク質の分子量解析は国立大学法人東京医科歯科大学・難治疾患研究所・細胞プロテオーム解析室に依頼した。ゲル中のタンパク質を還元アルキル化後、トリプシンでゲル内消化した。消化したペプチド断片は、Magic C18AQ capillary column (150 mm length×100 µm i.d., 2 µm particle size, 200 Å pore diameter) を使用して5~35%アセトニトリルグラディエント、50分で溶出分離した。溶出したペプチドをmaxis-4G-CPR (Brukerdaltonics) で質量分析した。

(2) 肉体ストレス負荷後のラットの唾液タンパク質の分離と分子量解析

雄ウィスターラット(三協ラボサービス(株))を精神ストレスと同様な飼育条件下で実施し、肉体ストレスはトレッドミル25m/min、30分で運動負荷した。肉体ストレス負荷群として9匹、対照群として8匹が用いられた。

ラット唾液タンパク質の分離は10% SDS-PAGEで一次元電気泳動し、クーマシー染色したタンパク質を20kDa、75kDa、250kDaの3分画に分けて、ストレス負荷群と対照群を比較することにより増加するタンパク質のみをそれぞれゲルから抽出した。ゲル中のタンパク質の分子量解析及びiTRAQによる分子量及び相対的に増加するタンパク質の分子量の測定はBML(株) Oncomicsに依頼した。

・ゲル中のタンパク質の分子量解析

ゲル中アルキル化後、ゲル内トリプシン消化して、nano-LC液体クロマトグラフィを使用し、2~80%アセトニトリルで溶出分離し、特定の質量のみをもつタンパク質を質量分析計maxis-4G-CPR (Brukerdaltonics) mass spectrometer, a nano-ESI source (LC-MS/MS) で解析した。

・網羅的な比較定量解析法 iTRAQ (isobaric Tags for Relative and Absolute Quantitation)によるプロテオーム解析

3つの対照サンプルの混液(Control mix)

のタンパク質 60.0 µg、と運動負荷した唾液サンプル2種(38.1 µgと46.6 µg)を使用して、以下の手順 1~5)に従ってそれぞれ相対的に増加するタンパク質の解析が行われた。

- 1) 唾液サンプル溶液中のタンパク質をトリプシン消化
- 2) ペプチド断片を iTRAQ 試薬で標識
- 3) nanoLC 液体クロマトグラフィーによる分離
- 4) TOF MS/MS による質量分析
- 5) データベースによるタンパク質同定と比較定量分析

尚、本実験計画は大東文化大学スポーツ・健康科学部及びスポーツ・健康科学研究科動物実験委員会での審査を経て承認された。

<引用文献>

- 1) 南谷晴之、疲労とストレス、バイオメカニズム学会誌、Vol.21, No.2, pp58-64, 1997
- 2) 大城 聡、プロテオームによる唾液中のストレスマーカータンパク質の探索、平成 25 年(2013 年)度実績報告書
- 3) 大城 聡、国際医学新聞 Medical Tribune, vol.43, No.42, p15, 2010 年 10 月 21 日
- 4) Oshiro S, Morioka MS, Iwasawa Y, Ueda Y, Ren J, Yanase S, Takayama S. Relation between Physical and Mental Fatigue in Urine Biomarker, Hydrogen Peroxide. 23rd Biennial Meeting, Athens, Greece, 2011
- 5) Oshiro S, Nishiyama N, Kadowaki S, Tanabe I, Sugawara T, Iwasawa Y, Morioka MS, Tanaka H, Kaburagi T, Proteomic analysis of rat saliva proteins for stress biomarkers after mental and physical stress loading. 第 58 回日本神経化学学会大会、2013
- 6) Inenaga K, Yamada N, Yuji R, Kawai M, Umeyama H, Ono K, Suzuki E, Trii K: Proteome analysis for rat saliva. J Med Invest 56, Suppl.: 224-227, 2009.
- 7) Robert CK, Amanda GC, Christina ML. Shared and unique proteins in human, mouse and rat saliva proteomes: Footprints of functional adaptation. Proteomes. 1(3):275-289. doi10.3390/proteomes 1030275, 2013.
- 8) 山口昌樹、唾液マーカーでストレスを測る。ストレスと生活、66-70
(www.banyu-zaidan.or.jp/banyu_oldsite/symp/about/info/pdf/3-2_066_070.pdf)

4. 研究成果

【結果】と【考察】

精神ストレス負荷群の M1 から 8 種類、M2 からは 16 種類、M3 からは 11 種類のタンパク質が同定された。また C1 からは 7 種類、C2 からは 6 種類のタンパク質が同定された。血清蛋白質、特にヘモグロビン(Hb)サブユニット

トが対象群(C1 と C2)、負荷群(M2 と M3)に認められた。

見かけ上、増加するタンパク質を含むゲル片分画から同定されたタンパク質は 6 種であった。一次元電気泳動は二次元電気泳動に比べて簡便ではあるが分離能に限界があるため、染色された一つのゲル片の中から数個のタンパク質が検出され、厳密にはどのタンパク質が増加したのか特定はできなかった。同定された数個のタンパク質中にストレスマーカータンパク質の存在が想定されるが、個々のタンパク質の抗体を作製するなどして免疫学的な手法(ELISA 法やウェスタンブロット法)などによる確認の精査が必要である。

尚、ラット固有の唾液タンパク質としては Chitinase, Deoxyribonuclease, Odorant binding protein, ovostatin, proline-rich lacrimal 1 protein, Kallikrein などがすでに報告⁷⁾されており、本研究でも候補ストレスマーカーと一部一致した。

肉体ストレスの負荷実験では、ストレスとしてトレッドミルによって運動負荷し、取分け c-Fos 遺伝子の発現が有意に増大するストレスを負荷して唾液を採取し、一次元 SDS 電気泳動後に増加するタンパク質を含むゲル片を切除し、ゲル片に含まれるタンパク質をプロテオーム解析した。更に並行して唾液タンパク質溶液から網羅的に比較定量解析が可能な iTRAQ 解析が行われた。

ゲル片解析では分子量 20、75、250KDa の分子量をもつタンパク質を 3 グループに分け 3 回(N1, N2, N3)実施された。

20KDa 分画ではラット由来タンパク質が N1 で 13 種類、N2 で 16 種類、N3 で 17 種類のタンパク質が同定された。3 回の実験結果と一致するタンパク質は 3 種類であった。75KDa 分画ではラット由来タンパク質が N1 では 19 種類、N2 では 10 種類、N3 では 19 種類のタンパク質が同定された。3 回の実験結果と一致するタンパク質は 6 種類であった。250KDa 分画ではラット由来タンパク質が N1 では 14 種類、N2 では 3 種類、N3 では 3 種類のタンパク質が同定された。3 回(N1~N3)の実験結果と一致するタンパク質は 3 種類であった。

iTRAQ 解析では、対照タンパク質に比較して 2 倍以上の増加率を示すタンパク質、2 倍以下の増加率を示すタンパク質、その他(変動が激しいタンパク質)、シグナルが低く raito が算出できないタンパク質、50%以上の減少率を示すタンパク質、50%以下の減少率を示すタンパク質等に実験解析上区別した。尚、実験解析上 159 種類のタンパク質が同定された。

2 倍以上の増加率を示すタンパク質は下図に示すように 26 種類(16.4%)、2 倍以下の増加率を示すタンパク質は 29 種類(18.2%)、

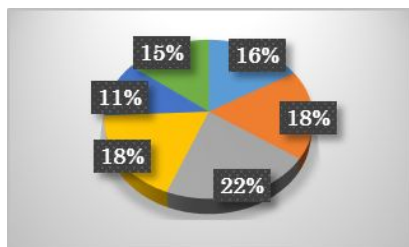
50%以上の減少率を示すタンパク質 18 種類(11.3%)、50%以下の減少率を示すタンパク質は 23 種類(14.5%)であった。候補となるストレスマーカータンパク質は と グループ

に含まれていると考えられ、ゲル片解析の結果と合わせてストレスマーカーの候補タンパク質について以下に考察する。

ゲル片解析の20KDa分画に存在し、iTRQ法で決定した増加するタンパク質と重なるタンパク質は2種類であった。ゲル片解析の75KDa分画では、iTRQ法で決定した増加するタンパク質と重なるタンパク質は2種類、ゲル片解析の250KDa分画では、iTRQ法によって決定した増加するタンパク質と重なるタンパク質は3種類であった。

精神ストレス負荷と肉体ストレス負荷に対して増加するタンパク質としては2種類、精神ストレス負荷では増加し肉体ストレス負荷に対して減少するタンパク質としては3種類、精神ストレス負荷では増加し肉体ストレス負荷では変化しないタンパク質として1種類があり、様々な候補タンパク質が存在する可能性が示唆された。

肉体ストレス負荷に対する唾液タンパク質の解析上の動態



- 2倍以上の増加率を示すタンパク質
- 2倍以下の増加率を示すタンパク質
- その他(増減の変動が大きいタンパク質)
- シグナルが低く raito が算出できないタンパク質
- 50%以上の減少率を示すタンパク質
- 50%以下の減少率を示すタンパク質

【結論】

ゲル中タンパク質分子量解析法によって精神ストレス或いは肉体ストレスに共通して増加するタンパク質、精神ストレス負荷では増加するが肉体ストレス負荷では減少する候補マーカータンパク質などが見出された。

iTRQ解析法とゲル片解析法の結果から合計10種類の唾液中の肉体ストレス候補マーカータンパク質が見いだされた。

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0件)

〔学会発表〕(計3件)

大城 聰、森岡勝樹、蕪木智子、田中博、菅澤威仁、岩沢勇也、西山信夫、門脇真

也、田邊いくみ、プロテオームによる精神的ストレス負荷後の唾液ストレスマーカーの探索

Search for salivary biomarkers after psychological stress in rat using proteome analysis

第57回日本神経化学学会大会・第36回日本生物学的精神医学会合同年会、2014年9月、奈良県文化会館

Oshiro S, Morioka MS, Nishiyama N, Kadowaki S, Tanabe I, Sugasawa T, Iwasawa Y, Tanaka H, Kaburagi T.

Proteomic analysis of rat saliva proteins for restraint stress biomarkers.

25TH Meeting of the International Society for Neurochemistry, 13TH Asian-Pacific Society for Neurochemistry and 35TH Australasian Neuroscience Society.

Cairns, Australia, Aug 23-27, 2015
大城 聰、蕪木智子、森岡勝樹、西山信夫、門脇真也

肉体ストレスに対する唾液マーカータンパク質のプロテオーム解析 Proteomic analysis of rat saliva proteins for stress biomarkers after physical stress loading

第89回日本生化学学会大会、宮城県仙台市(東北大学)、9月、2016(発表予定)

〔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：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大城 聡 (Oshiro, Satoru)
大東文化大学・スポーツ健康科学部・健康
科学科・教授
研究者番号：30160485

(2) 研究分担者

蕪木 智子 (Kaburagi, Tomoko)
大東文化大学・スポーツ健康科学部・健康
科学科・准教授
研究者番号：40339479