

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26750376

研究課題名(和文) レドックス・プロファイリングによる細胞内レドックス維持機構の定量解析手法の開発

研究課題名(英文) Quantitative proteomics of cellular protein-thiol redox homeostasis

研究代表者

新木 和孝 (Araki, Kazutaka)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・創薬分子プロファイリング研究センター・研究員

研究者番号：60514255

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：酸化ストレスとも総称される、細胞内の酸化還元状態の変化が、がん、動脈硬化、神経変性疾患など数多くの疾患に関与していることが知られている。酸化ストレスに対して、アミノ酸残基の中でも、システイン残基のチオール基の反応性が高いことが知られている。このため、酸化ストレスの惹起時に、チオール基に可逆的・不可逆的翻訳後修飾が生じることが多い。本研究では、このようなシステイン残基の酸化状態というプロファイル情報を基軸に、細胞内の恒常性状態を評価する系の構築を試みた。プロテオミクス技術を中心とする、複数のシステイン残基の同時定量を行い、システイン残基の酸化状態の網羅的定量化方の構築に成功した。

研究成果の概要(英文)：The protein cysteine residue is one of the amino acids most susceptible to oxidative modifications, frequently caused by oxidative stress. Several applications have enabled cysteine-targeted proteomics analysis with simultaneous detection and quantitation, like ICAT method. In this study, we employed a quantitative approach using a set of iodoacetyl-based cysteine reactive isobaric tags (iodoTMT) and evaluated the transient cellular oxidation ratio of free and reversibly modified cysteine thiols under DTT and hydrogen peroxide (H₂O₂) treatments. DTT treatment (1 mM for 5 min) reduced most cysteine thiols, irrespective of their cellular localizations. Modest H₂O₂ treatment (50 μM for 5 min) did not cause global oxidations but, instead, had apparently reductive effects. Moreover, with H₂O₂, significant oxidative shifts were observed only in redox active proteins. Overall, we could succeed to yield quantitative data, illustrating both H₂O₂- and reduction-mediated cellular responses.

研究分野：生物化学

キーワード：質量分析測定 タンパク質 酸化還元

1. 研究開始当初の背景

酸化ストレスは加齢、糖尿病、がん、動脈硬化などといった数多くの疾患メカニズムと関連していることが知られている。ROS(Reactive Oxygen Species)と総称される酸化ストレスに対して、タンパク質アミノ酸残基の中でも、システイン残基のチオール基の反応性が高いことが知られている。このため、酸化ストレスの惹起時に、チオール基に可逆的・不可逆的翻訳後修飾が生じることが多い。例えば、可逆的酸化修飾として、ポリサルファー化(S_m)、シスチニル化(Cys)、S-ニトロソ化(SNO)、グルタチオン化(GSH)やスルフェニル化(SOH)、不可逆的酸化修飾としては、スルフィニル化(SO₂H)、スルフォニル化(SO₃H)などが知られている。システイン残基はタンパク質の機能的にも重要な活性部位に存在していることも多く、酸化修飾によりタンパク質の機能阻害や機能変化、それに伴う局在場所の変化や相互作用因子の変化が起きることが知られている。しかしながら、このようなシステイン残基の酸化還元状態を網羅的に定量化する技術は、いまだ確固としたものが構築されている状況ではない。

2. 研究の目的

そこで本研究では、システイン残基の酸化状態というプロファイル情報を基軸に、細胞内の恒常性状態を評価する系の構築を主目的とした。ここでは我々の得意とするプロテオミクス技術を主軸にした、網羅的な定量化技術を構築することを重要課題とした。

3. 研究の方法

システイン残基を含むペプチドは、チオール基がフリーの状態のままでは、経験的にイオン化しにくい傾向にあり、システイン残基を含まないペプチドとの共存下においては、質量分析測定により同定しにくいことが分かっている。そのため、システイン残基を含むペプチドのみを効率的に回収し、質量分析測定を行うことが必要となる。本研究ではシステイン残基の同時定量が可能な isobaric labeling 法(Fig. 1)を採用し、システイン残基の酸化状態の網羅的定量化の構築と一連の最適化を行った。特に、システイン残基ペプチドのみを回収するためのバッファー条件の最適化に注力した。これらの最適化の後、一連の実験系の構築を行った(Fig. 2)。

続いて培養細胞を用いた検証実験を行った。未処理細胞と同時に、還元剤(1 mM DTT)と酸化剤(50 μM H₂O₂)といった酸化還元試薬を添加した細胞を調整し、添加 5min 後の細胞内システイン残基の酸化状態の定量測

定を行った。再現性検証のため計 12 測定を行った。一例としてチオレドキシンの活性中心の酸化還元状態の定量結果を Fig. 3 に示した。

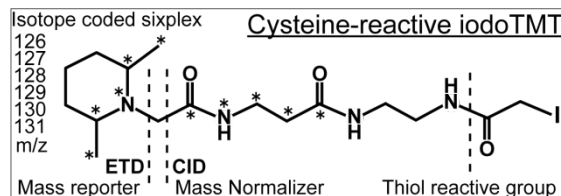


Fig 1. システイン残基のラベリング試薬 iodoTMT™。6 種類の同位体型レポーターが用意されているため、一度に 6 条件のサンプルを定量解析可能である。

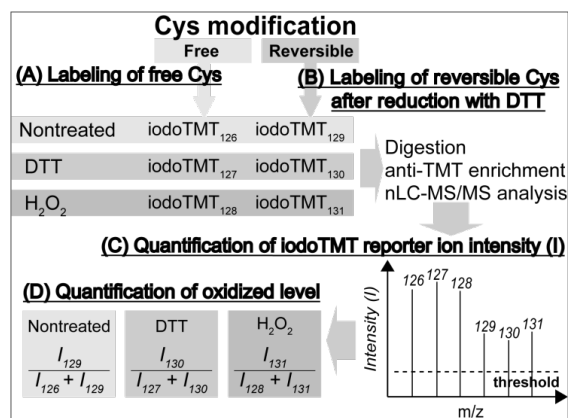


Fig. 2 iodoTMT を用いたフリーのシステイン残基・酸化型のシステイン残基のラベリング方法。ラベル化したタンパク質を(A, B)、酵素消化・システイン残基を含むペプチドの回収・質量分析測定を通して、最終的にレポーターの強度(I)を定量し(C)、フリーのシステイン残基の強度と酸化型のシステイン残基の強度の比から(D)、システイン残基の酸化状態の定量化が可能である。

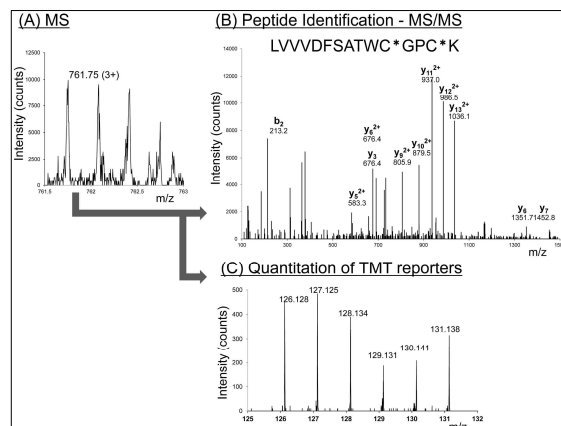


Fig. 3 iodoTMT を用いたチオレドキシンの活性中心の酸化還元状態の定量結果。レポーターの強度比を定量することで、DTT や H₂O₂ によるレドックス変化に伴う、チオレ

ドキシンの活性中心の酸化還元状態変化が追跡可能になった。

4. 研究成果

300 µg 程度の培養細胞由来タンパク質からシステイン含有ペプチドを抽出し、最終的に計 1700 程度を同定した。そのうち、定量化(n=3)に利用できたペプチドは 540 ほどであった。これらのシステイン残基の酸化状態を検証した。未処理細胞においては平均 24.4%(中央値 23.1%)が酸化状態にあった。同定できたシステイン残基の細胞内局在分布を観察したところ、サイトゾルでは 23%、分泌経路では 58%、ミトコンドリアでは 24%の酸化状態であった。分泌経路がサイトゾルと比較して酸化状態にあることが知られており、この結果は、本研究手法の有意性を示すものと考えられる。また、DTT 添加 5min 後では平均 20.4%(中央値 19.6%)、H₂O₂ 添加 5min 後では平均 22.9%(中央値 21.8%)の酸化状態を示していた。この結果からも観察されている通り、DTT 処理によって、システイン残基の多くは、還元的な状態に移行していた。一方、興味深いことに H₂O₂ 処理においては、有意差を伴って酸化状態に移行したペプチドが極めて少なく、H₂O₂ 特異的ともいえるレドックス反応性の高いタンパク質群が酸化状態に移行していた。具体的には、チオレドキシシンやペルオキシレドキシシンといった抗酸化酵素群が特にその傾向を示していた。細胞内の酸化還元環境を安定に保つ上でも要となるこれらの因子が、細胞内の環境変化を瞬時に認識し、抗酸化酵素としての機能を発揮するものと予想される。また、H₂O₂ は細胞内シグナル伝達としても利用されており、細胞内システイン残基のかなでも極めて特異的な反応を示すことが見出された。

本研究手法は、細胞内の酸化状態を観察する上でも、有用性の高いツールになることが確認された。今後は、本手法をさらに発展させ、細胞内の酸化プロファイル状態を基礎とした、疾患メカニズム解析や創薬への基礎技術として活用していく予定である。

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)

新木和孝：プロテオミクスによる細胞内システイン残基の酸化還元状態定量解析
神戸ポートアイランド(兵庫県)：第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会 合同大会：2015/12/3

新木和孝：プロテオミクスによる細胞内システイン残基の酸化状態定量解析
つくば医工連携フォーラム 2016：産業技術総合研究所つくばセンター(茨城県)：2016/1/22

新木和孝：プロテオミクスによる細胞内システイン残基の酸化状態定量解析
第 15 回 LS-BT 合同研究発表会：産業技術総合研究所つくばセンター(茨城県)：2015/2/3

〔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
<http://www.molprof.jp/~araki/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

新木 和孝 (ARAKI, Kazutaka)
国立研究開発法人産業技術総合研究所・創薬分子プロファイリング研究センター・研究員

研究者番号：60514255

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし