

研究課題名 ストレスシグナルのプロテオーム解析
所属研究機関名 独立行政法人 産業技術総合研究所
研究者氏名 絹見朋也

研究計画の概要

研究の趣旨・目的

ストレス応答研究は、様々なストレスに曝されることを余儀なくされている現代社会において、ストレスの生体に対する影響を正しく知るために極めて重要である。特にQOL(Quality of Life)向上のために社会的意義はきわめて高いと考えられる。本研究課題ではストレス応答を細胞や組織において分子レベルで解析し、ストレスを低減させる方法の開発を長期的な目標としている。

このため、様々な刺激(酸化剤、過酸化脂質など特に酸化ストレスに関わる刺激)によって誘導されるタンパク質(ストレス誘導性タンパク質)を網羅的に解析し、細胞や組織のストレス応答をタンパク質レベルで明らかにする。ストレス誘導性タンパク質を網羅的に解析する方法として、ポストゲノムの新領域であるプロテオーム解析を柱とした研究を展開する。プロテオーム解析システム(二次元電気泳動、質量分析計、データベースシステムなどの統合によるシステム化)の開発を重要な要素技術として位置付け、方法論の開発とストレス応答の生物学的解析を融合した新たな解析手法の開発を目指す。

これによって開発されたプロテオーム解析技術を駆使し、酸化ストレスに対する細胞内ストレスシグナルのカスケードを明らかにし、ストレス低減に結びつくマーカーおよびターゲットタンパク質探索を行なうことを目的としている。

研究計画の概要

前に述べた研究目的を達成するために、大きく3つの研究項目を設定した。平成13、14年度には主に実験系の立ち上げに重点をおき、研究基盤の確立を目指した。

1. 二次元電気泳動をベースとするプロテオーム解析システムの構築

プロテオーム解析システムの要となる二次元電気泳動によるタンパク質発現プロファイリング法を確立させる。さらに二次元電気泳動上のタンパク質スポットを同定するため、微量タンパク質の分離同定システムと質量分析装置を組み合わせたシステムを構築する。

2. 培養細胞、モデル動物に対するストレス刺激とその評価系の確立

細胞細胞や実験動物に対する様々な酸化ストレス刺激(酸化剤、光障害など)に対する実験系を構築する。ストレス応答の評価は、細胞生存率や既知のストレス感受性タンパク質の発現変動などにより評価する。これによりプロテオーム解析の対象とする生体に対するストレス負荷のモデル系を確立する。具体的には、酸化ストレスが発症に深く関わる動脈硬化症のモデルとして、血管内皮細胞に対する酸化剤、抗酸化剤の影響を検討する。

3. ストレス刺激のプロテオーム解析

上記2での系を含め、細胞、動物に対する酸化ストレス負荷後に細胞内小器官や組織等を調製し、上記1によって開発されたプロテオーム解析システムによってプロテオーム解析を行う。ストレス負荷により二次元電気泳動上で発現の消長、位置に変化の見られるスポット、ならびにランドマークとなるスポットを決定する。それらのスポットを1に挙げたシステムにより同定し、プロテオームマップを作成する。翻訳後修飾によって構造変化の生じたタンパク質についてはさらに微量構造解析を行い、ストレス刺激との相関を検討する。

研究計画の詳細報告

(単位:百万円)

研究項目	所要経費					
	13年度	14年度	15年度	16年度	17年度	合計
1. 二次元電気泳動をベースとするプロテオーム解析システムの構築	14.5	10.0	7.0			31.5
(1)二次元電気泳動システムの構築	← 5.5	→ 3.0				8.5
(2)タンパク質分離同定システムの構築	← 9.0	7.0	7.0		→	23.0
2. 培養細胞、モデル動物に対するストレス刺激とその評価系の確立	5.0	2.5	5.0			12.5
(1)ストレスアッセイ確立	← 5.0	2.5	5.0		→	12.5
3. ストレス刺激のプロテオーム解析		7.0	7.0			14.0
(1)ストレスアッセイによる細胞応答の検討		← 7.0	7.0		→	14.0
所要経費(合計) (間接経費を含む)	19.5	19.5	19.0			58

研究成果の概要

研究成果の概要

本研究課題を進める上で、最も重要な技術基盤であるプロテオーム解析システムを構築した。(平成 13, 14 年度)

(平成 13 年度には、主に二次元電気泳動によるタンパクのプロファイリングシステムを完成させた。これにより、培養細胞、組織から得られるタンパク質混合物から、約 1000 - 1500 種のタンパク質を一斉に分離することが可能となった。これらの分離されたタンパク質のスポットの濃度を定量し、発現量の差異に基づくディファレンシャルディスプレイを行えるようになった。平成 14 年には微量液体クロマトグラフィーとエレクトロスプレーイオン化型質量分析計により 50-100 fmol 程度の微量タンパク質の分離同定が行えるシステムがほぼ完成し、二次元電気泳動によるプロファイリングとスポットの同定を行えるプロテオーム解析システムを構築することができた。これは、銀染色によって検出されるスポットのタンパク同定が行えるレベルの感度である。

平成 14 年度以降、ヒトさい帯血管内皮細胞 (HUVEC) に過酸化水素を酸化剤として、抗酸化能をもつ抗動脈硬化剤を抗酸化剤として HUVEC に負荷し、プロテオーム解析による網羅的な細胞応答の解析を行った。過酸化水素はミトコンドリアの電子伝達系や炎症局所で発生し、細胞内外における酸化ストレスを誘発する。血管内皮への酸化障害が動脈硬化症の発症機序の 1 つと考えられており、そのモデルとして HUVEC に対する過酸化水素負荷実験を行った。その結果、酸化ストレス感受性のタンパク質として 4 種類のタンパク質が同定された。このうち、熱ショックタンパク質 27kDa (HSP27) は γ -H2A 酸化を受け、ペルオキシレドキシシン (Prx) はシステイン残基の酸化によりストレス応答を示すことがわかった。これらのタンパク質は過酸化水素負荷に対するストレスシグナルの上流 (Prx)、および下流 (HSP27) に位置し、細胞内の酸化ストレスのシグナルカスケードに重要な働きをしていることが示唆された。

波及効果、発展方向、改善点等

平成 13, 14 年の研究期間において、プロテオーム解析システム構築を第一の課題として研究基盤の整備に努めた。その結果、二次元電気泳動によるタンパク質発現プロファイルとそのタンパク質同定に関して、ほぼ予定通りの分解能と感度を得ることが出来た。このプロテオーム解析システムは細胞に限らず、組織、臓器なども解析の対象とすることができる。すなわち細胞の酸化ストレスに対する応答のみならず、さまざまなストレス応答を評価できる極めて一般性の高いシステムである。さらに、タンパク質の翻訳後修飾の微量構造解析が可能であり、タンパク質の γ -H2A 酸化や酸化による細胞内シグナル伝達解析への応用が期待される。今後、二次元電気泳動による分離が困難な高分子量、塩基性タンパク質のプロファイリングを行い、解析できる範囲を広げる必要がある。このため、イオン交換クロマトグラフィーと逆相クロマトグラフィーを組み合わせた多次元分離系の応用による分離効率改善を目指す。さらに、質量分析計の試料導入部の微小化によって高感度化を進め、現在のプロテオーム解析システムの解析適応範囲を拡大させる必要がある。これらの改良が進めばストレス解析はもとより、様々な疾患の病態解析にも応用できる汎用性の高いプロテオーム解析システムとしての利用が期待される。

プロテオーム解析システムの立ち上げをうけて HUVEC への過酸化水素負荷実験を行い、酸化ストレスマーカーの候補分子の同定とともに、酸化ストレスの細胞内シグナル伝達分子を同定した。HSP27 は γ -H2A 酸化のほかに等電点に変化をもたらす新奇な翻訳後修飾を受けることを見出した。その修飾構造を明らかにし、新たなストレス応答反応を示す必要がある。今後、プロテオーム解析システムの改良とともに、さらに多くの酸化ストレス応答分子群が同定されることが期待される。また、過酸化水素のほかに、血流中や細胞から発生し、様々な生理作用を及ぼす酸化ストレス物質 (ストレッサー) の負荷実験を行い、プロテオーム解析によりその応答の差を明らかにしてゆく。現在計画し、一部実験を開始しているものは、フリーラジカルを発生させるアゾ系ラジカル開始剤、活性酸化窒素種、過酸化脂質、様々な酸化状態の酸化 LDL (低密度リポタンパク) であり、HUVEC に負荷させプロテオーム解析により応答を解析してゆく。応答タンパク質の発現量の差のみでなく、酸化ストレスに重要な翻訳後修飾であるシステインの酸化、 γ -H2A 酸化に注目し、ストレッサー - 応答分子の発現量、構造の相関を明らかにする。これらの結果をもとに、ストレスシグナルの解明を目指す。

研究成果発表等の状況

(1) 研究発表件数

	原著論文による発表	左記以外の誌上発表	口頭発表	合計
国内	0件	1件	4件	5件
国際	1件	0件	1件	2件
合計	1件	1件	5件	7件

(2) 特許等出願件数

なし

(3) 受賞等

なし

(4) 主な原著論文による発表の内訳

* 発表者氏名；発表題目，文献名，巻(号)，頁，(掲載年)の順

国内誌 (国内英文誌を含む)

なし

国外誌

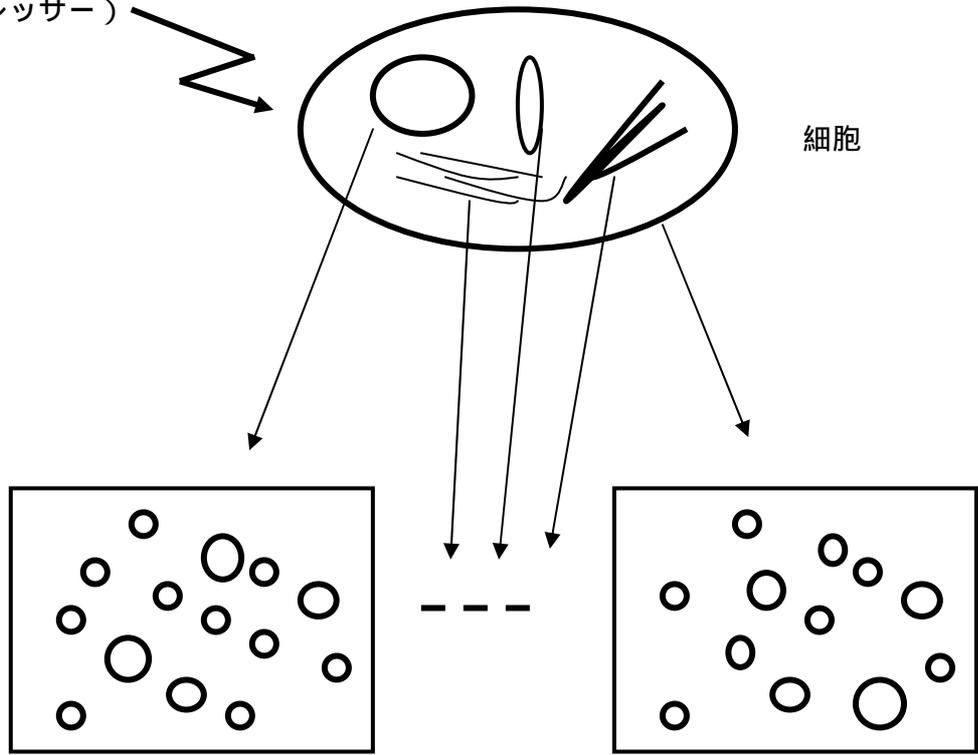
1. Aritomo H, Oishi T, Nishijima M and Kinumi T : Affinity of a vancomycin polymer with bacterial surface models ,Tetrahedron Lett, 42, 3347-3350, (2001)

(5) 主要雑誌への研究成果発表

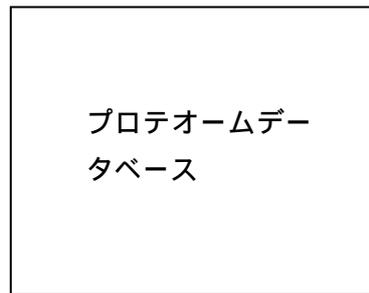
Journal	Impact Factor
Tetrahedron Letters	2.357

ストレスシグナルのプロテオーム解析

ストレス刺激
(ストレッサー)



二次元電気泳動によるストレス誘導タンパクの
網羅的プロファイリング



二次元電気泳動上のスポットのプロ
ファイリングとスポット同定、構造解

→ ストレスシグナル解明