

研究成果報告書

事業名（補助金名）： 基盤的研究開発育成事業（若手研究補助金）
研究開発テーマ名： 免疫系細胞のシグナル関連分子の網羅的解析
研究代表者名： 畠山 鎮次 【 北海道大学大学院医学研究科分子生化学講座／教授 】
共同研究者名： 築山 忠維 【 北海道大学大学院医学研究科分子生化学講座／助手 】

背景・目的

ポストゲノム時代の到来により、トランスクリプトーム解析やプロテオーム解析に代表される網羅的解析法の発展が顕著である。マイクロアレイによるトランスクリプトーム解析は網羅性が非常に高いが、得られる情報は基本的には mRNA の発現量のみである。しかし、プロテオーム解析はタンパク質の発現量情報に加えて、さまざまな翻訳後修飾情報を与える。

我々が注目している方法論は各論的研究の一端ではなく、リン酸化やユビキチン化などを中心としたアフィニティークロマトグラフィーを利用した翻訳後修飾の網羅的解析法である。今回対象とした系は、免疫アレルギー疾患で中心となる免疫系細胞の抗原受容体を介したシグナル伝達系であり、特にリン酸化やユビキチン化に注目する。つまり、このシグナル系を利用して、下流に位置するシグナル伝達分子をタンパク質修飾という観点から網羅的に明らかにすることを目的とした。

これにより、全体として関連分子がどのような経時的変化をするのかが多角的に明らかとなり、さらに副産物としてこれまで同定されていなかった新たな関連分子が発見される可能性が高い。最終的にはこれらのデータベースの情報を基として、免疫アレルギー疾患の原因や発症に関係する現象と関連することを期待して解析した。

内容・方法

1. 免疫系細胞を用いたシグナル活性化系の樹立

T細胞抗原受容体 (TCR) を介した細胞内シグナル伝達に関与するチロシンリン酸化タンパク質およびそれと複合体を形成した結合タンパク質を網羅的に同定するための最適の培養細胞株及び活性化システムを検討した。また、もうひとつの抗原特異的受容体であるB細胞抗原受容体 (BCR) を介した細胞内シグナル伝達に関与するチロシンリン酸化タンパク質およびそれと複合体を形成する結合タンパク質を網羅的に同定するための系も検討した。従来の研究情報より細胞株として、TCRに関してはヒトT細胞性リンパ腫細胞株Jurkat細胞、BCRに関してはヒトB細胞性リンパ腫細胞株Namalwaを使用した。活性化方法としては、TCRに関しては抗TCR/CD3抗体、BCRに関しては抗IgM抗体による架橋刺激を使用した。

2. アフィニティークロマトグラフィーを使用した目的タンパク質濃縮法の樹立

1) リン酸化タンパク質プロテオーム：大量の細胞を使い、さまざまな抗体アフィニティークロマトグラフィー（抗リン酸化チロシン抗体）により、目的タンパク質を濃縮した。特にリン酸化チロシンに対する抗体は特異性および親和性が高い事に加えて、フェニルフォスフェートを用いて特異的に溶出できるため利用価値が高い。この際、結合タンパク質であるのか、リン酸化などの修飾を受けたタンパク質であるかを区別するために、変性下もしくは非変性下における精製を行った。最近では抗リン酸化セリン・抗リン酸化トレオニンに対する抗体を利用したアフィニティークロマトグラフィーを用いた解析例も報告されており、この方法が利用可能なレベルであるかを検討した。もう一つの方法は immobilized metal affinity chromatography (IMAC) と 2 次元電気泳動を組み合わせた方法である。リン酸化タンパク質が鉄やガリウムへのアフィニティを有するためこれらの金属を固定化したカラムを使用した。

2) ユビキチン関連プロテオーム：ユビキチン化は機能的に多くの細胞内現象にかかわり、細胞内シグナル伝達だけに関しても、TCR シグナル、BCR シグナル、FcR シグナルなどにユビキチン化が制御システムとしてリン酸化とともに重要なタンパク質修飾であることが明らかになっている。抗ユビキチン抗体アフィニティークロマトグラフィーを使い、ユビキチン化されたタンパク質を特異的に集めることにより、細胞活性化後、いかな

る分子がどのようにユビキチン化されるかを網羅的に明らかにした。抗ユビキチン抗体カラムを用いて細胞抽出液からユビキチン化タンパク質、およびユビキチン結合タンパク質の回収を試みた。精製したタンパク質を SDS-PAGE にて分離後、クーマシーブルーにて染色を行うと多くのタンパク質のバンドとゲル上部を中心に不均一な染色が見られる。通常、タンパク質に付加したユビキチン鎖は不均一であり 9kDa 単位でのラダー状の染色を示すことから、不均一な染色はポリユビキチン化したタンパク質を示していると考えられる。一方バンドとして観測されるタンパク質はユビキチン結合タンパク質や基質タンパク質の結合タンパク質、あるいはモノユビキチン化タンパク質等に相当すると考えられる。

3. SDS-PAGE を利用したタンパク質を分離及び精製

SDS-PAGE によりタンパク質を分離しバンドとして確認できるものは MALDI-TOF を使用してタンパク質を同定した。もしくは SDS-PAGE のバンドに関係なくゲルを数 10 に均等に切り出し、すべてを ESI-LC-MS/MS により解析した。最大の問題点としてはいかにして空気中や操作上生じるコンタミネーション（特にケラチン）を防ぐかということであり、電気泳動、ゲルからの切り出し、及びトリプシン消化等の作業をクリーンルーム内で行った。

4. 質量分析計を利用したタンパク質を同定

用途により MALDI-TOF 及び ESI-LC-MS/MS の使い分けて、タンパク質の同定を試みた。

上述のように、SDS-PAGE によりタンパク質がバンドとして確認できるものは MALDI-TOF を使用し、明瞭にバンドとして確認できないサンプルに対しては、SDS-PAGE のバンドに関係なくゲルを数 10 に均等に切り出し、すべてを ESI-LC-MS/MS により解析した。

5. 質量分析計によって検出されたデータの情報解析処理

質量分析により検出されたデータを Mascot 解析し、同定されたタンパク質を統計解析する。さらに後述の SILAC によって得られた情報に関しては定量情報を得た。

6. SILAC 法による定量及び情報解析処理

安定同位体ラベル法をアフィニティークロマトグラフィーと組み合わせることにより定量的意味を持つデータを得る（安定同位体を用いた定量プロテオミクス）。すなわち安定同位体を含むアミノ酸（例えば D3-Leu など）存在下および非存在下で細胞を培養する。どちらかに処理を加えてから混合後、細胞抽出液を調製しアフィニティークロマトグラフィーによって目的タンパク質を回収する（SILAC 法：stable isotope labeling by amino acids in cell culture）。その後、回収されたタンパク質を酵素消化後質量分析計による解析を通して同定するが、この際、安定同位体による質量差から各々のサンプル由来のペプチドが二つのピークとして得られ、定量情報を与える。この方法を用いればアフィニティークロマトグラフィーの回収率の問題や夾雑タンパク質の混入の問題が回避できた。このようにアフィニティークロマトグラフィーによる濃縮と安定同位体による定量を組み合わせることで興味あるタンパク質群（この場合翻訳後修飾を受けたタンパク質）およびその結合タンパク質の動態を効率よく解析することが可能であった。

結果・成果

1. アフィニティークロマトグラフィーによる目的タンパク質の濃縮（リン酸化タンパク質プロテオーム）

免疫系細胞で中心的な役割を果たしている T 細胞に対して、T 細胞抗原受容体 TCR を介してのチロシンリン酸化プロテオーム解析を行った。ヒト T 細胞リンパ腫細胞株 Jurkat を使用し、抗 CD3 抗体（OKT3）のクロスリンクにより、細胞内のチロシンがリン酸化されるタンパク質および、それらと複合体を形成しているタンパク質を抗リン酸化チロシン抗体アフィニティークラムにより精製した¹⁾（図 1）。その後、LC-イオントラップ型質量分析計および Mascot 解析により分析した。その結果、数百のシグナル関連タンパク質が同定された。さらには、これまで TCR のシグナルとの関係が示されていなかった新規の分子群及び、細胞内のシステムが見つかった。また、T 細胞と同様、B 細胞リンパ腫細胞株 Namalwa を使用し、抗 IgM 抗体刺激により、チロシンリン酸化プロテオームを解析したところ、やはり数百のシグナル関連タンパク質が同定できた。

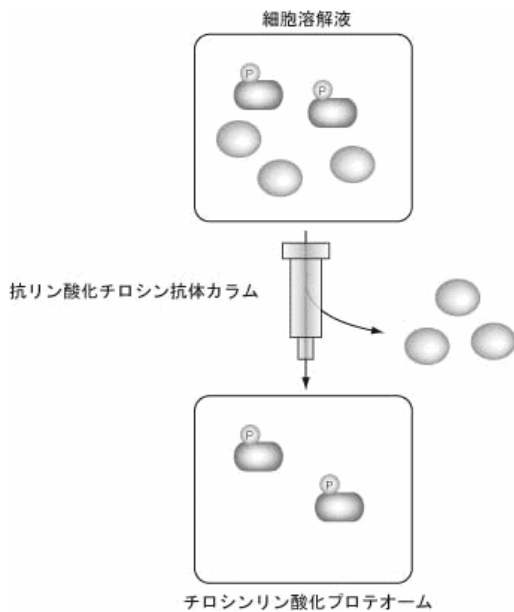


図 1. チロシンリン酸化プロテオームの分離及び濃縮法

抗チロシンリン酸化抗体を使用したアフィニティークロマトグラフィーにより、チロシンリン酸化修飾を受けたタンパク質のみが精製されることが考えられる。ユビキチンプロテオームも、抗ユビキチン抗体を使用する点で原理的には同じである。

2. アフィニティークロマトグラフィーによる目的タンパク質の濃縮（ユビキチン化関連プロテオーム）

ヒトの細胞におけるユビキチン化関連プロテオームを網羅的に解析するために HEK293T 細胞を使用した。我々は、抗ユビキチン抗体 (FK2) をセファロースビーズに共有結合させ、それを担体としてプロテアソーム阻害剤処理したヒト培養細胞の溶解液 (8M 尿素を含む、もしくは含まない) を試料としてアフィニティ精製を行った²⁻³⁾ (図 1)。尿素を含んだ条件ではユビキチン化されたタンパク質が、尿素を含まない条件ではユビキチン化されたタンパク質とユビキチン結合タンパク質が精製される。実際、200 mg のタンパク質量を含む細胞溶解液から約 10~20 µg のタンパク質が精製され、約 1000 倍程度の濃縮をすることができた。その後、SDS-PAGE での電気泳動後、ゲルを染色 (CBB 染色や銀染色) し、クリーンルームで短冊上に数十に切り出し、その後トリプシン処理後、LC-イオントラップ型質量分析計および Mascot 解析により分析した。結果として、変性条件下 (ユビキチン化タンパク質プロテオーム) では 345 のタンパク質が同定された。また非変性条件下では 517 のタンパク質が同定され、そのうち 325 のタンパク質が非変性条件下のみで同定され、これらはユビキチン結合タンパク質である可能性が高いことが示唆された。

今後の展開等

当研究分野 (免疫学、アレルギー学) は現在でも、科学的及び社会的に注目されている領域であり、これらに関連する疾患の発症機序の解明及び治療法の開発は非常に重要である。おそらく、本研究の進展により、免疫系細胞の活性化に重要となる情報および、免疫疾患の発症に関連する知見が明らかになることが期待できる。本研究における技術開発は、免疫系細胞の活性化シグナルという点にとどまらず、おそらくチロシンリン酸化が関与すると思われる他のシグナルおよび細胞機能の研究に関しても、今後重要な基本技術になると思われる。今回の定性的および定量的解析技術を兼ね備えた質量分析技術により、細胞内のシグナル伝達における新しい網羅的な情報はもちろんのこと、新規の関連タンパク質が多く同定された。今後、それらの分子の機能を活性化もしくは抑制することにより、自己免疫疾患やアレルギー性疾患に対して、創薬に結びつく情報を提供する可能性がある。また、この技術を使うことにより、シグナル伝達において既に開発された薬品がいかなる影響を細胞に及ぼすのかの網羅的な判定に役立つ情報を与えることが期待できる可能性が高い。

本研究を援助していただきましたノーステック財団に深謝申し上げます。

文 献

- 1) 畠山鎮次：免疫系に関与するプロテオミクス解析. *The Lung perspectives*, **13**: 69-74, 2005.
- 2) Hatakeyama, S., Matsumoto, M. & Nakayama, K-i.: Mapping of ubiquitination sites on target proteins. *Methods Enzymol.* **399**: 277-286, 2005.
- 3) Matsumoto, M., Hatakeyama, S., Oyamada, K., Oda, Y., Nishimura, T. & Nakayama, K-i.: Large-scale analysis of the human ubiquitin-related proteome. *Proteomics*, **5**: 4145-4151, 2005.