

免疫系細胞のシグナル関連分子の網羅的解析

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]

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。

申請者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。今回対象とする系は、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。

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: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、使用する。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する。
- 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:リン酸化タンパク質プロテオームとユビキチン関連プロテオーム: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および抗ユビキチン抗体)により、目的タンパク質を濃縮する。
- 3) 質量分析計を利用したタンパク質を同定MALDI-TOF及びESI-LC-MS/MSを使い分けて、タンパク質の同定を試みる。
- 4) 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。
- 5) 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て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)。

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。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。

- 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ークラム精製を行った。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、200mgのタンパク質量を含む細胞溶解液から約10~20μg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。

今後の展望

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同定される可能性が高い。そして、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と考えられる。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。