科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成　２６　年　　６　月　２０　日現在

機関番号：３４４１９
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2012～2013
課題番号：２４７９０５６４

研究課題名（和文）自己抗原蛋白質Ｕ１－６８ｋの脱リン酸化を指標とした膠原病の早期診断マーカーの開発

研究課題名（英文）Establishment of maker for early diagnosis of systemic autoimmune diseases based on de-phosphorylation of autoimmogen U1-68k

研究代表者
永井　宏平（NAGAI, Kouhei）

近畿大学・生物理工学部・講師

研究者番号：７０５００５７８

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,400,000円、（間接経費）　　1,020,000円

研究成果の概要（和文）：全身性エリトマトーデス（SLE）や混合性結合組織病（MCTD)などの自己免疫疾患の患者の末梢血単核球で増加する脱リン酸化U1-68kの簡便な検出法の確立を試みた。（1）免疫学的方法、(2) phos-tag電気泳動法、（3）等電点ウエスタンブロット法の3種類を検討した結果、（3）の等電点ウエスタンブロット法が適していることが判明した。また、核分画の代わりにSDSを含む抽出液で調整した全細胞抽出液が使用できることが判明した。全細胞抽出液と等電点ウエスタンブロット法を組み合わせることで、検出に必要な時間を5日から2.5日に削減することができ、臨床の現場で使用できる簡便な検出法の開発に成功した。

研究成果の概要（英文）：In this study, we tried to establish an useful method for detecting a de-phosphorilated form of U1-68k autoimmunogen, which was found to be increased in peripheral blood mononuclear cells of patients of systemic lupus erythematosus or Mixed connective tissue diseases. As a substitution of a conventional 2D-western blot method, we examined three methods; (1) an immunological method, (2) a phos-tag electrophorsis, and (3)an isoelectric focusing electrophoresis-western blot. As a result, we found that the isoelectric focusing electrophoresis-western blot method is most suitable for the detection of the de-phosphorilated form of U1-68k. Moreover, we found that whole cell extract prepared by cell lysis buffer containing SDS can be used for detecting U1-68k. In conclusion, combination of isoelectric focusing electrophoresis-western blot and whole cell extract by SDS-containing cell lysis buffer can shorten analsys time from 5 days to 2.5 days.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：自己免疫疾患　翻訳後修飾　診断マーカー　自己抗体

１．研究開始当初の背景

近年、全身性エリテマトーデス(SLE)、混合性結合組織病(MCTD)等の膠原病の治療法は格段の進歩を見せており、適切な治療を施すことで、患者の予後やQuality of lifeを格段に向上させることができるようになった。そのため、膠原病の発症初期に、他の炎症性疾患と鑑別して速やかに治療を開始することが、これまで以上に重要な意味を持ってきている。現在、血清中の自己抗体が膠原病の診断マーカーとして利用されているが、これらは膠原病発症の最初期から生産されるとは限らず、発症初期には疾患名を確定できない場合も多い。そこで、膠原病発症初期においても検出可能な診断マーカーの開発が求められている。

SLEやMCTD患者で検出される＜抗RNP抗体＞の対応自己抗原であるU1-68kは、mRNAのスプライシングに関わるU1-RNP分子の構成成分である。本蛋白質はC末端領域に高度にリン酸化されたArginine serine rich-domain(RSドメイン)を有し、本ドメインのリン酸化の制御がU1-RNP分子のmRNAスプライシング活性に重要であることが知られている。

研究代表者は、ごく最近、二次元westrtn blot法やリン酸化RSドメインに対する抗体を用い、MCTDやSLE患者の末梢血リンパ球において、RSドメインのリン酸化レベルの低い脱リン酸化U1-68kの量が増加していることを明らかにした。このU1-68kの異常な脱リン酸化は、U1-68kの抗原性を変化させて抗RNP抗体の産生に関わる一方で、mRNAのスプライシング異常を通じて、白血球の機能異常を起こし、両疾患の病態形成に関わっている可能性が考えられる。研究代表者は、このU1-68kの脱リン酸化が自己抗体産生よりも上流の現象であると考えられることから、抗原病を発症初期に診断するためのバイオマーカーとして利用できる可能性があると考えた。

２．研究の目的

U1-68kの脱リン酸化を検出するための従来法（末梢血単核球の核分画の2次元ウエスタンブロット法）は、検体の採取から検出までに全体で5日かかる。そのため臨床の現場で使用できる簡便な検出法の開発が必要である。本研究では、①疾患特異的な脱リン酸化U1-68kを認識するモノクローナル抗体を用いた免疫学的方法、②phos-tag電気泳動法、および③等電点電気泳動ウエスタンブロット法の3種類の方法を検討した。更に、核分画ではなく、細胞の全抽出液を用いた検出法の開発も試みた。

３．研究の方法

(1) U1-68kの脱リン酸化部位の解析

ヒトT細胞由来株化細胞であるJurkat細胞の核分画を調整し、蛋白質を抽出した後に二次元電気泳動により分離した。疾患特異的脱リン酸化U1-68k亜型のスポットを切り出して、Trypsinで処理した。生じたペプチド断片を2種類の質量分析計（MALDI-TOF/TOF型およびLC-MS/MS型）で分析することで、U1-68kの翻訳後修飾の種類および位置の特定を試みた。

(2) phos-tag電気泳動法

Jurkat細胞核分画中のタンパク質を0.2 - 5μMphos-tagアクリルアミド入りのゲルを用いたSDS-PAGEによって分離した。ゲル中のタンパク質をPVDF膜に転写し、抗U1-68k抗体を用いて検出した。

(3) 等電点ウエスタンブロット法

Jurkat細胞核分画中のタンパク質をpH6-11の等電点電気泳動用strip gelに取り込ませ、常法に従って、等電点電気泳動を行った。得られたstrip gelのゲル面を膨潤化したPVDF

膜に接触させ、転写バッファーで湿らせたろ紙で挟み込んで 2 時間整置させることでタンパク質を転写させた。膜状の U1-68k を抗 U1-68k 抗体を用いて検出した。

(4) 細胞の全抽出液を用いた検出法の検討

Jurkat 細胞をタンパク質変性剤や界面活性剤の種類や含量の異なる 5 種類の抽出液中でホモジナイズし、細胞全抽出液を調整した。5 種類の抽出液に含まれる U1-68k の量を一次元ウエスタンブロット法で検出し、最も効率よく U1-68k を抽出できる方法を検討した。最も効率が良かった抽出液は 2 次元ウエスタンブロットに用い、U1-68k のリン酸化状態を解析できるかどうかを確認した。

４．研究成果

(1) 免疫学的方法の検討

疾患特異的脱リン酸化 U1-68k を特異的に認識するモノクローナル抗体の作製を最終目標として、質量分析計を用いた U1-68k の脱リン酸化部位の同定を試みた。二次元電気泳動法により U1-68k を分離し、疾患特異的脱リン酸化 U1-68k のスポットを切り出し、トリプシン消化した後に質量分析計で消化断片を解析することで翻訳後修飾の解析を試みた。その結果、最大で 43%の配列を検出することに成功したが、リン酸化が起こっていると思われる RS domain の配列は検出できず、脱リン酸化部位の同定はできなかった。本方法を進展させるためには RS domain に由来する peptide を検出する方法を工夫する必要があると考えられた。

(2) phos-tag 電気泳動法の検討

リン酸化状態の数によって移動度が異なる phos-tag 電気泳動を用いて疾患特異的脱リン酸化 U1-68k を分離・検出できるかどうかを検討した。Phos-tag アクリルアミドを 0.2 -5μM 含む SDS-PAGE ゲルを用いて Jurkat 細胞の核分画抽出タンパク質を分離し、PVDF 膜に転写し、抗 U1-68k 抗体を用いて U1-68k を検出した。その結果、phos-tag アクリルアミド非存在下では一本のバンドとして検出された U1-68k が phos-tag アクリルアミドの添加によって 3-4 個の太いバンドに分離され、U1-68k のリン酸化の違いを反映していることが示唆された。しかしながら、各バンドの境界は不明瞭であり、厳密な定量化は難しいことが判明した。また、二次元電気ウエスタンブロット法では U1-68k はリン酸化の異なる 20 個以上の亜型に分離されることを考えれば、phos-tag 電気泳動法の分離能は疾患特異的脱リン酸化 U1-68k の分離、定量をするには不十分であることが判明した。

(3) 等電点ウエスタンブロット法の検討

従来法である二次元ウエスタンブロット法から二時限目の電気泳動を省く（等電点ウエスタンブロット法）ことで、疾患特異的脱リン酸化 U1-68k の検出時間を短くできるかどうかを検討した。

Jurkat 細胞核画分のタンパク質を通常条件で等電点電気泳動にかけた。泳動後の strip gel 中のタンパク質を PVDF 膜に転写する際に、①弱い電流をかけて行う方法と②gel と PVDF 膜を接触させ自然拡散で転写させる方法の 2 種類を検討した。その結果、②の方法が転写効率が良いことが分かった。また、転写時間は 2 時間で充分であることが判明した。この等電点ウエスタンブロットで分離された U1-68k のリン酸化の違いによる亜型の pI 分布は二次元ウエスタンブロット法の結果とほぼ一致することが分かった。したがって、本方法は二次元ウエスタンブロットに代わる簡便な脱リン酸化 U1-68k の検出法として利用できることが判明した。

(4) 全細胞抽出液を用いた検出法の検討

従来法（2 次元ウエスタンブロット法）で

は、患者から採取された末梢血単核球から核分画を調整した上で二次元ウエスタンブロットを行う必要があった。本過程は時間もかかるうえ、特別な技術が必要であり臨床現場で用いることは困難であると考えられる。そこで、細胞の全抽出液を用いた検出法の開発を試みた。まず、Jurkat 細胞をタンパク質変性剤と界面活性剤の種類と濃度が異なる 5 種類の抽出液中で破砕し、蛋白質を抽出した。ウエスタンブロットによって 5 種類の抽出液中に含まれる U1-68k の量を測定した結果、界面活性剤として SDS を含んだ抽出液が最も U1-68k の抽出効率が高いことが明らかとなった。

次に、SDS 含有抽出液で作成した全細胞抽出液を TCA 沈殿処理することで界面活性剤や塩類を取り除いた後に二次元ウエスタンブロットに供した。その結果、核分画を用いた場合に比べて、U1-68 k は酸性等電点側に検出されタンパク質に強固に結合している SDS が等電点電気泳動を阻害している可能性が示唆された。しかしながら、U1-68k は核分画を用いた場合と同様に複数のスポットとして検出され、U1-68k のリン酸化の違う亜型を分離できていることが示唆された。今後は、患者および健常者から採取された末梢血リンパ球の全細胞抽出液を用いて U1-68k を検出し、そのスポットパターンを患者―健常者間で比較することで、患者特異的脱リン酸化 U1-68k 亜型を検出できるか検討する必要がある。

(6)　結論

本研究で検討した手法の内、①等電点ウエスタンブロット法および②全細胞抽出液を使用することで患者特異的脱リン酸化 U1-68k の検出時間を大幅に削減できる可能性が示唆された。従来の核分画を用いた二次元ウエスタンブロット法では、患者からの末梢血単核球の採取と核画分の調整に 1 日、一次元目の電気泳動に 1 日、二次元目の電気泳動に 1 日、ウエスタンブロットに 2 日の計 5 日が必要である。等電点ウエスタンブロット法に変更することで、二次元目の電気泳動と転写に掛かる時間を削減することができ、必要な時間を 2 日間短くすることができるようになる。また、核画分を全細胞抽出液に変更することでサンプル調整に必要な時間を 1 日から半日に短縮することができる。以上のことから、5 日の測定時間を 2.5 日に半減することに成功した。

また、従来法では患者からの血液採取から核画分の調整までを同じ日に行う必要があった。全細胞抽出液を用いる方法では、患者から採取した細胞を冷凍保存しておくことが可能となる。複数の検体を冷凍保存しておき、検体数が十分量に達した時点でまとめて解析することで分析の効率化が図られる。

以上のことから、本研究によって、疾患特異的脱リン酸化 U1-68k の検出方法を臨床の現場で使用できる程度に簡便化することが可能となった。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計　1　件）

① K Nagai, M Arito, Y Takakuwa, S Ooka, T Sato, MS Kurokawa, K Okamoto, T Uchida, N Suematsu, T Kato.Alterd posttranslational modification on U1 small nuclear ribonucleoprotein 68k in systemic autoimmune disease detected by 2D Western blot. Electrophoresis. 査読有り 33, 2012, 2028-2035. DOI: 10.1002/elps20120058.

〔学会発表〕（0 件）

〔図書〕（0 件）

〔産業財産権〕
○出願状況（0 件）
○取得状況（0 件）

〔その他〕（0 件）

６．研究組織

(1)研究代表者

永井　宏平（NAGAI Kouhei）
近畿大学・生物理工学部・講師

研究者番号：70500578

(2)研究分担者　なし

(3)連携研究者　なし