

新規マイクロプロテイン MKMP78 のマクロファージにおける機能解析

神田真聡

札幌医科大学 免疫・リウマチ内科学

【研究の背景】

ヒトゲノム計画によりヒトタンパク質は同定された尽くされたとおもわれていたが、近年の検討により、非 ATG から始まる open-reading frame (ORF) や 300 ヌクレオチド未満の短い ORF の中に、依然としてタンパク質をコードしているものが隠れていることがわかってきた。短い ORF から翻訳される 100 アミノ酸未満のタンパク質はマイクロプロテイン (MP) と呼ばれ、重要な働きをするものが同定されてきている。我々は、先行研究でヒト腎における Ribosome foot-printing sequencing (Ribo-Seq) を行い、100 個の ncRNA 上に翻訳が予測される ORF が同定された。その中の候補の一つに注目し、予測される MP へのカスタム抗体を作成し、腎組織を免疫染色したところ、その分布がシングルセル解析における RNA の分布と合致した。ノックアウト実験などにより抗体の特異性もほぼ確認され、この MP を MKMP78 と命名した。MKMP78 のアミノ酸配列は機知のモチーフとの類似性はなく、その機能は不明である。MKMP78 mRNA はシングルセル解析および公共データベースを用いた追加検討によりマクロファージ (M ϕ) において発現が亢進することが予想されたため、M ϕ において何らかの重要な働きを行っているという仮説を立てた。

【目 的】

MKMP78 の M ϕ における分子機能を解析すること

【方 法】

THP-1 (ヒト単球細胞株) に対して、PMA100nM で 72 時間刺激し、接着した細胞を M0 M ϕ とした。M0 M ϕ に対してさらに、lipopolysaccharide 100 ng/mL と interferon- γ 20 ng/mL を添加し 48 時間分化させたものを M1 M ϕ とし、M0 M ϕ に対して、interleukin-4 20 ng/mL および interleukin-13 20 ng/mL を添加し 48 時間分化培養させたものを M2 M ϕ とした。MKMP78 mRNA の検出に関しては、MKMP78 ORF における exon-junction をターゲットにしたプライマーを用いて SYBR Green を用いた realtime PCR を用いて評価した。MKMP78 タンパクの検出に関してはシグマ社に委託して作成した MKMP78 の予測配列の一部をターゲットにしたウサギポリクローナル抗体を用いて行い、ウエスタンブロッティングにより行った。protein interaction screen on peptide matrices (PRISMA) は MKMP78 のアミノ酸配列の一部をオーバーラップさせながらデザインし、合成した 12 個のペプチドフラグメントをろ紙にブロットさせ、HEK293T の細胞溶解液と反応させたのちに質量分析機を用いて測定し、MaxQuant を用いて検出されたタンパク質の解析を行った。

【結 果】

THP-1 (ヒト単球細胞株) を用いて、MKMP78 mRNA および MKMP78 タンパクおよびの発現変化を評価した。THP-1 誘導 M0、M1、M2 M ϕ ではいずれも未刺激 THP-1 と比較して MKMP78 の発現が亢進していた。しかし、MKMP78 タンパクの発現は THP-1 で高く M0 マクロファージではその発現が低下していた。PRISMA を用いた MKMP78 の共役分子のスクリーニングでは 335 のタンパク質の相互作用の可能性が示唆された (adjusted P value < 0.1)。

【考 察】

THP-1 誘導 M0 M ϕ における RNA とタンパク発現量の乖離の原因は明らかにできていない。M0 M ϕ において翻訳効率が大幅に低下するあるいはタンパクの分解速度が単球 THP-1 と比較して亢進しているなどの可能性が示唆されたが、これらは今後の検討課題である。またマイクロプロテイン研究に共通することだが、MKMP78 の発現量が少なく、予定していた研究手法がうまくワークしない点多かった。PRISMA を利用することにより結合分子のスクリーニングに成功したため今後さらに解析を進めていく。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

現時点での臨床的意義に関してはまだ不明なところは多いが内在性発現の認められる新たなタンパク質の発見から始まっている研究であり、今後の機能解析が進むことにより意義が明らかになっていくと考える。

【参考・引用文献】

van Heesch S, Witte F, Schneider-Lunitz V, Schulz JF, Adami E, Faber AB, Kirchner M, Maatz H, Blachut S, Sandmann CL, Kanda M, Worth CL, Schafer S, Calviello L, Merriott R, Patone G, Hummel O, Wyler E, Obermayer B, Mücke MB, Lindberg EL, Trnka F, Memczak S, Schilling M, Felkin LE, Barton PJR, Quaife NM, Vanezis K, Diecke S, Mukai M, Mah N, Oh SJ, Kurtz A, Schramm C, Schwinge D, Sebode M, Harakalova M, Asselbergs FW, Vink A, de Weger RA, Viswanathan S, Widjaja AA, Gärtner-Rommel A, Milting H, Dos Remedios C, Knosalla C, Mertins P, Landthaler M, Vingron M, Linke WA, Seidman JG, Seidman CE, Rajewsky N, Ohler U, Cook SA, Hubner N. The Translational Landscape of the Human Heart. *Cell*, 178(1):242-260 (2019)