

機関番号：13901

研究種目：新学術領域研究

研究期間：2008～2012

課題番号：20117007

研究課題名（和文）

活性酸素リガンド・レセプター反応制御のケミカルバイオロジー

研究課題名（英文）Chemical Biology of Reactive Oxygen Species Ligand Receptor Regulation

研究代表者

内田 浩二 (UCHIDA KOJI)

名古屋大学・大学院生命農学研究科・教授

研究者番号：40203533

研究分野：生化学

科研費の分科・細目：生物分子科学・ケミカルバイオロジー

キーワード：脂溶性リガンド、センサー分子、分子プローブ、受容体

1. 研究計画の概要

生物は様々な脂溶性化合物に曝されており、これらの化合物は健康や寿命に大きく影響しているものと考えられる。こうした化合物には、環境中の様々な有機化合物だけでなく、ポリフェノールやイソチオシアネート化合物などの機能性食品成分、酸化ストレスにおいて生成される酸化脂肪酸なども含まれる。こうした脂溶性化合物は細胞膜あるいは細胞内受容体に作用し、受容体刺激による適応応答の誘導に関与することが明らかとなってきた。例えば、核内受容体の天然リガンドとして様々なアラキドン酸代謝産物が同定されているが、これらのリガンドは脂肪細胞分化やマクロファージ泡沫化抑制などの活性を示す。本研究では、食品成分を含めた内因性および外因性の脂溶性物質に関し、増殖因子などによる受容体シグナリングに与える影響を解析する。特に、脂溶性活性種の中に受容体刺激とともに活性酸素産生を活性化するものを見いだしており、センサータンパク質への直接的相互作用を介したシグナリング機構を解析する。

2. 研究の進捗状況

本課題では、酸化ストレスなどに関連して生成する親電子性リガンドについて、それらを検知するケミカルセンサー（レドックスセンサー）あるいはレセプタータンパク質、さらにはレドックス感知機構に連動して惹起されるシグナル伝達の分子制御機構に関する研究を行い、これまでに以下の成果を得た。

(1) PGD₂代謝物のリガンド作用

PGD₂の異性化により生成される D¹²-PGJ₂ が血清アルブミンのリガンドとして高い親和性を示すことを見いだした。Biacore 及び

LC/MS/MS などを用いた詳細な D¹²-PGJ₂-アルブミン複合体の化学構造解析を行い、D¹²-PGJ₂ の結合サイト、及び標的部位 (His-146) における特異的な付加体形成を初めて明らかにした。さらに、D¹²-PGJ₂ がアルブミンのリガンドであるだけでなく、D¹²-PGJ₂-アルブミン複合体もまたリガンドとして炎症応答を亢進することを見いだしており、遺伝子発現誘導機構の解析を進めた結果、これまでに自然免疫に関連した受容体の関与を示唆するデータを得ている。

(2) 酸化 LDL 受容体リガンドの解析

過酸化脂質修飾アルブミンのレクチン様酸化 LDL 受容体 (lectin-like oxidized LDL receptor-1, LOX-1) に対するリガンド作用に着目し、リガンド (酸化脂質-アミノ酸付加体) 構造の同定から、酸化 LDL 中におけるリガンド生成部位の同定、さらにはリガンドを用いた LOX-1 シグナリング活性化に至る研究を行った。血清アルブミンとの反応で LOX-1 リガンド活性を示した過酸化脂質のうち、4-ヒドロキシ-2-ノネナール (HNE) に着目し、リガンド構造の解析を行った結果、リガンド候補として HNE-ヒスチジン付加体を同定した。HNE-ヒスチジン付加体は LOX-1 への結合能を有し、さらに LOX-1 下流のシグナル伝達経路を活性化することなどを明らかにした。

(3) 適応応答を誘導する植物性リガンドの標的タンパク質

植物に含まれる機能性リガンドとしてスルフォラファン誘導体 6-HITC を用い、抗酸化タンパク質ヘムオキシゲナーゼ 1 (HO-1) の発現誘導機構を解析した。クリックケミストリーを用いたプロテオーム解析法により、6-HITC の主要な標的タンパク質の一つとして Hsp90b を同定した。また、LC/MS/MS に

よる 6-HITC の標的アミノ酸を解析し、内在性 Hsp90b の標的システイン Cys-251 を同定した。この標的システインはリコンビナント Hsp90b を用いた実験でも同定された。Hsp90b への結合は、Hsp70 の遺伝子発現などのストレス応答を惹起するだけでなく、抗酸化応答 (HO₂[•] の発現) への関与を示唆するデータが得られている。

3. 現在までの達成度

①当初の計画以上に進展している。

(理由)

PGD2 代謝物の血清アルブミンに対するリガンド作用と炎症応答、酸化特異的エピトープをリガンドとして認識する自己抗体、酸化 LDL 受容体リガンドの解析、適応応答を誘導する植物性リガンドの標的タンパク質などについて、マスペクトロメトリーなどを使ったケミカルバイオロジーを駆使することにより、当初期待していた以上の研究の進展があった。

4. 今後の研究の推進方策

(1) 酸化脂肪酸代謝物のリガンド作用について、タンパク質が PGD2 代謝物などの酸化脂肪酸リガンドを結合した場合に新たに賦与される細胞生理作用を解析する。特に、マクロファージに対する血清アルブミン-酸化脂肪酸複合体の炎症性リガンド作用を明らかにする。

(2) 酸化特異的エピトープをリガンドとして認識する自己抗体について、酸化特異的エピトープの高次構造解析とともに、自己抗体の自己免疫疾患における生成・蓄積の意義を解明することを目的に、細胞死誘導作用について検討する。

(3) 酸化 LDL 受容体リガンドの解析では、リガンド候補として同定された酸化脂肪酸・アミノ酸付加体を用いた受容体シグナル伝達活性化機構の詳細を明らかにする。

(4) PGD2 代謝物による、NGF 受容体シグナル伝達活性化における、受容体活性化 TRP カルシウムチャネルの役割についてさらに検討を行う。

5. 代表的な研究成果

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 3 件)

① Otaki, N., Chikazawa, M., Nagae, R., Shimozu, Y., Shibata, T., Ito, S., Takasaki, Y., Fujii, J., and Uchida, K. Identification of a lipid peroxidation product as the source of oxidation-specific epitopes recognized by anti-DNA autoantibodies. **J. Biol. Chem.**

285, 33834-33842. (2010) 査読有

- ② Yamaguchi, S., Aldini, G., Ito, S., Morishita, N., Shibata, T., Vistoli, G., Carini, M., and Uchida, K. D¹²-Prostaglandin J₂ as a product and ligand of human serum albumin: Formation of an unusual covalent adduct at His146. **J. Am. Chem. Soc.** **132**, 824-832. (2010) 査読有
- ③ Wakita, C., Maeshima, T., Yamazaki, A., Shibata, T., Ito, S., Akagawa, M., Ojika, M., Yodoi, J., and Uchida, K. Stereochemical configuration of 4-hydroxy-2-nonenal-cysteine adducts and their stereoselective formation in a redox-regulated protein. **J. Biol. Chem.** **284**, 28810-28822. (2009) 査読有

[学会発表] (計 2 4 件)

- ① Uchida, K., Protein-bound HNE as a ligand of LOX-1. 17th meeting for Society of Free Radical Biology and Medicine, 2010. 11., Orland, USA.
- ② Uchida, K., Covalent modification of proteins by lipid peroxidation-derived volatile aldehydes. 5th International HNE club meeting, 2010. 6., Tulin, Italy.
- ③ Uchida, K., A lipid-derived synergist of COX-2 gene expression. Special Seminar, University of Colorado Denver, 2009.4., Denver, USA.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]