

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：32644

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K12364

研究課題名(和文) アルコール毒性の解明とその食品成分による予防

研究課題名(英文) Investigation of alcohol toxicity and its prevention by functional food

研究代表者

永井 竜児 (Nagai, Ryoji)

東海大学・農学部・教授

研究者番号：20315295

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：アルコール代謝中間体であるアセトアルデヒド(AA)はタンパク質を修飾・変性し毒性を示すことが報告されている。本研究課題で我々は、質量分析装置によりマウス体内で飲酒後に生成するアセトアルデヒド修飾アミノ酸を検出した。また、飲酒後のヒトの血清中においても同様の物質を検出した。本測定法は精密測定であるため飲酒との関連が報告されているアルツハイマー型認知症や虚血性心疾患との関連等を精査する際にも応用が期待できる。さらに、AA修飾タンパク質に対するモノクローナル抗体産生細胞も作製した。このことにより、今後アルコール摂取によるAA毒性の簡便な評価への応用が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Acetaldehyde (AA), which is a metabolic intermediate of alcohol, shows toxicity by modification and denaturation of protein. In this study, AA modified amino acid was detected by LC-MS/MS in mouse serum and human serum after administration of alcohol. As this method is precise, this would be effective method to look into the association of AA and alcohol related diseases such as Alzheimer's disease and ischemic heart disease. Furthermore, we obtained monoclonal antibody against AA-modified proteins and this antibody could be useful tool to assess toxicity of AA in the near future.

研究分野：食品機能学・生化学

キーワード：アセトアルデヒド 翻訳後修飾 飲酒マーカー

## 1. 研究開始当初の背景

適度なアルコールの摂取は、食欲増進や円滑な人間関係を築く上でも良い効果をもたらす。しかし過剰摂取はその代謝中間体であるアセトアルデヒド(AA)によって頭痛などの二日酔い症状や長期にわたる過度の摂取ではアルコール性肝硬変など負の側面も有する。また最近ではアルツハイマー型認知症の発症リスク・虚血性心疾患等との関連も報告されている。このように AA は様々なタンパク質を修飾・変性し毒性を示すことが報告されているが、その分子メカニズムは不明な点が多い。

また、現在、飲酒時のアルコール摂取量を推測するには、呼気中のアルコール濃度を検査する方法により行われており、測定前に水を多量摂取することによって正確な測定が行えなくなるケースがあり社会問題となっている。したがって、AA 修飾構造が検出できれば病態のリスク評価や、時間が経過してもアルコール摂取の有無を評価できる可能性が高い。AA で修飾を受けた蛋白は生体において高い毒性を示す可能性が既に指摘されているが(Takeuchi M, Saito T. Alcohol Clin Exp Res. 29(12suppl):220-224, 2005)、未だにその構造は明らかとなっていない。

## 2. 研究の目的

上記の通り、エタノールの代謝物である AA で修飾を受けたタンパク質は生体において高い毒性を示す可能性が指摘されているが、未だにその構造は不明である。AA 修飾アミノ酸の構造解析は大変チャレンジ性を有するが、研究代表者はこれまでに機器分析的手法を用いて GA-pyridine (Nagai R et al., J Biol Chem 277(50): 48905-48912, 2002)や、2SC (Nagai R et al., J Biol Chem. 282(47), 34219-34228, 2007)等の病態によって変化する新規な修飾アミノ酸構造の同定に成功している。そこで、研究代表者の技術を駆使し

AA 修飾アミノ酸の構造を同定し、抗体を製作することでイムノクロマト法など簡便な AA 修飾アミノ酸の測定を可能にし、最終的には詐称しづらい新規のマーカーとして利用できるようにすることを目的とする。また、この AA 修飾アミノ酸の生成抑制をする食材成分を見出すことで、飲酒による悪酔いの予防、肝障害、アルコール代謝との関与が指摘されているアルツハイマー病の予防を目指す。

## 3. 研究の方法

### AA 修飾タンパク質に対するモノクローナル抗体の作製:

AA と共にインキュベートしたタンパク質を Balb/c マウスに 4 回免疫し、脾臓リンパ細胞をミエローマ細胞と常法で細胞融合し、AA 修飾タンパク質とは反応するが、未修飾タンパク質とは反応しないモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを作製した。得られたハイブリドーマをマウスの腹腔に移植し、癌性腹水を得、ProteinG アフィニティーカラムで抗体を精製した。その後、AA とタンパク質とのインキュベート期間と抗体反応性が特に相関する数株を選び、HPLC および LC-MS/MS を用いてエピトープ解析を行なった。

### In vitro サンプルにおける AA 修飾構造体の検出:

ウシ血清アルブミン (BSA) を AA で修飾すると、主にリジンが修飾されていることがアミノ酸分析で確認されたことから、リジンが AA 修飾のターゲットであることが確認された。そこで、Cbz で  $\alpha$  位のアミノ基が保護されたリジンと AA を試験管内で反応させ、逆相カラムを備えた高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で分析した結果、数種の生成物が確認された。

**生体における AA 修飾構造体の検出:** アルコール摂取前後のマウス (倫理委員会承認済

み)及びヒト(倫理委員会承認済み)の血液を採取し、AA修飾構造体の検出をLC-MS/MS(TSQ Quantiva, Thermo Fisher)により行なった。

マウス:50%のアルコールを0.2 mL投与したマウスから6時間後及び12時間後に血液を採取し、遠心分離して血清を得た。血清を6N塩酸で100、18時間かけて塩酸加水分解し、塩酸を除去した後に陽イオン交換カラムで前処理した後、LC-MS/MSでAA由来構造を検出した。

ヒト:学内の教職員を対象に、アルコール摂取前後で採血を行いLC-MS/MSでAA由来構造を検出した。

#### 4. 研究成果

**AA修飾タンパク質に対するモノクローナル抗体の作製:** AA修飾 Keyhole limpet hemocyanin (KLH)を免疫したマウスの脾臓細胞とミエローマ細胞を融合し、AA修飾タンパク質に対するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマが得られた。本抗体はAA修飾BSAと反応することがELISAにより確認された。一度、熊本地震で本ハイブリドーマを失ったが、一年後、再度同様の手法で抗体作製を行った所、同様にモノクローナル抗体が得られた。本抗体のエピトープは現在解析中である。

#### **In vitro サンプルにおけるAA修飾構造体の**

**検出:** Cbz-リジンとAAの反応物をHPLCで分析すると、いくつかの生成物のピークが確認され、これらを分取し、精密質量分析装置で解析すると、数種のAA由来AGEs構造の精密質量が確認された。

#### **生体におけるAA修飾構造体の測定:**

LC-MS/MSを用いたマウス及びヒト血清の分析では、in vitro サンプル中で確認された数種のm/zと同様の物質が確認された。

しかし、数種のAA修飾構造体はアルコール未投与の血清でも検出されたため、アルコール代謝以外からの生成の可能性、あるいは腸内細菌によって若干はアルコールが産生され、AA修飾構造体が生成した可能性も考えられる。

#### **まとめ**

本計画によってAA修飾構造に対するモノクローナル抗体及び機器分析で検出できるようになった。熊本地震の影響で、ハイブリドーマを失い再度作製を行うなど、研究室の再建で計画より1年遅れたが、ほぼ計画通りに研究はすすんでいる。今後、アルコール摂取量、摂取後の時間など、様々な条件に変動を確認し、アルコール代謝によるタンパク質修飾のメカニズムがより明らかになると期待できる。数種のAA修飾構造体は機器分析でも検出できたことから、アルコール代謝異常との関連性が指摘されているアルツハイマー型認知症との関連性を、物質レベルでメカニズムを検討できると共に、モノクローナル抗体を用いて、アルコール摂取後の血中、あるいは尿中のAA修飾構造体の変動を、ペーパークロマトグラフィー等で迅速に評価できる可能性も現実的となった。

#### 5. 主な発表論文等

(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 0件)

〔学会発表〕(計 5件)

1. 永井竜児、大野礼一、畑野孝太、須川日加里、市丸健太、木下奨、白河潤一、永井美芽、AGEsの絶対定量で見えてくる生体蛋白の変性メカニズム、第10回糖化ストレス研究会、東京、2016年5月
2. 砂掛詩織、市丸健太、白河潤一、永井竜児、LC-MS/MSを用いたアセトアルデヒ

ドによるタンパク質修飾機構の解析．第  
27 回日本メイラード学会年会．埼玉，  
2017 年 11 月

(2)研究分担者  
無し

( )

3. 砂掛詩織，市丸健太，白河潤一，永井竜  
児．LC-MS/MS を用いたアセトアルデヒ  
ド修飾アミノ酸の探索・定量．第 41 回  
タンパク質質と酵素の構造と機能に関  
する九州シンポジウム．熊本，2017 年 8  
月

(3)連携研究者  
無し

( )

4. 永井竜児、AGEs測定の意義～生活習慣病  
とそれを防ぐ機能性食品、その評価方法  
～、ダイエット&ビューティーフェア、  
東京、2017年9月

(4)研究協力者  
無し

( )

5. 永井竜児、カルボニルによる翻訳後修  
飾：蛋白変性メカニズムの解析ツールお  
よび病態進展マーカーとしての利用性、  
東京都医学総合研究所、2017年2月

〔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〕

ホームページ等  
無し

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

永井竜児 (NAGAI Ryoji)

東海大学・農学部・教授

研究者番号：20315295