

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K11659

研究課題名(和文) ストレスによる脂質酸化酵素の細胞内局在変化メカニズムと活性制御機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of stress-induced changes in subcellular localization of lipid oxidase and regulation of its activity

研究代表者

七里 元督 (Shichiri, Mototada)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・研究グループ長

研究者番号：20434780

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：マウスにストレスを負荷すると12-リポキシゲナーゼ代謝産物(12-HETE)が産生される。12-HETEはストレスに伴う行動変化に関与しているが、12-リポキシゲナーゼの活性化機構が不明であった。GFP融合12-リポキシゲナーゼをHEK293細胞に発現させたところ、TGF β 添加によって12-HETEが増加することから、活性化メカニズムの一端が解明された。また、ファミリー酵素である5-リポキシゲナーゼの活性化がインフルエンザウイルス増殖を抑制することについても検討を進めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ストレスは様々な疾患に関与しているが、客観的評価法や治療法が確立されていない。研究代表者の見出した12-HETEはストレスの客観的評価指標となる可能性があるだけでなく、すでに見出している12-リポキシゲナーゼ阻害化合物はストレスの治療にも活用できる可能性がある。本研究成果で解明された12-リポキシゲナーゼ活性化機構は12-HETE産生のメカニズムを明らかとすることでストレスマネジメントに寄与できるものである。

研究成果の概要(英文)：Stress increases 12-lipoxygenase metabolite (12-HETE) in mouse blood. 12-HETE is involved in stress-induced behavioral changes (escape behavior), but the activation mechanism of 12-lipoxygenase remains unclear. In HEK293 cells transfected with GFP-fused 12-lipoxygenase, TGF β administration increased 12-HETE production. This result provided a partial explanation of the activation mechanism of 12-lipoxygenase. We also investigated activation of 5-lipoxygenase, a family enzyme of 12-lipoxygenase, suppresses influenza virus replication in MDCK cell.

研究分野：酸化ストレス学、小児科学、小児科領域の神経疾患、ビタミン学、ウイルス学

キーワード：ストレス リポキシゲナーゼ 脂質酸化物 アラキドン酸 トコトリエノール

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

研究代表者はマウスにストレス(水浸拘束)を負荷するとアラキドン酸酸化物 12-hydroxyeicosatetraenoic acid (12-HETE) (図1) が血中で著増することを見出していた(図2)。また、脂質酸化酵素 12-lipoxygenase (12-LOX) の欠損マウスに対する同ストレス負荷では 12-HETE 増加が抑制されることを確認した(図2)。以上より、ストレスによる 12-HETE の増加は 12-LOX による酵素的酸化反応が触媒することを突き止め、12-HETE によるストレス・疲労の客観的評価法を特許登録した(特許第 6112510 号 H29 年 3 月 24 日登録)。

さらに尾懸垂試験にてストレス環境からの逃避行動を評価したところ、ストレス負荷後に野生型マウスでは逃避行動を呈する時間が増加したが、12-LOX 欠損マウスでは増加しなかった(図3)。また、12-LOX 欠損マウスにストレス負荷後に 12-HETE を投与すると逃避行動時間が増加することがわかった(図3)。さらに、12-HETE が脳内ノルアドレナリンの放出を増加することを明らかにした(科研費挑戦的萌芽研究 H28 年~29 年度 16K15197 の成果)。この結果はストレス環境からの逃避行動の惹起に 12-HETE が関与することを示唆する。

ストレスによる 12-HETE 産生に關与する 12-LOX はマクロファージに多く存在する。マウスからマクロファージを採取し、特異抗体を用いて 12-LOX 蛋白を解析したところ、ストレス非負荷状態では細胞質に多く存在するのに対し、ストレス負荷により膜分画に移行することを見出した(図4)。この 12-LOX の膜への局在移行は 12-HETE 産生亢進のトリガーになっているものと考えられるが、12-LOX の膜移行メカニズムの詳細は未解明のままであった。

また、アラキドン酸の酸化抑制を目的に、抗酸化物質ビタミン E 類である α -トコフェロール(α T)および γ -トコトリエノール(γ T3)、 α -トコトリエノール(α T3)を経口投与(1週間)した上でストレスを負荷した。図5に示すように、ストレス負荷後の血中 12-HETE の増加は抑制された。さらに尾懸垂試験では、血中 12-HETE 生成抑制効果に比例し、逃避行動時間の増加も抑制された。以上の結果は、 γ -トコトリエノール(γ T3)がストレスによる行動異常を緩和する作用を有しており、新しい抗ストレス治療戦略に繋がる可能性を持つことを示す(特許第 6732223 号 登録日 2020 年 7 月 10 日)。 α -トコトリエノールのストレスにおける行動異常を緩和する作用を臨床で活用するためには α -トコトリエノールが 12-LOX の酵素活性を阻害する機序を解明する必要がある。

2. 研究の目的

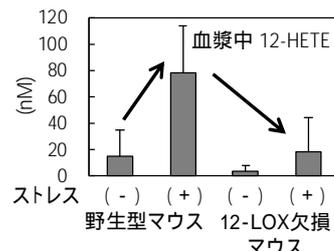
本研究計画では、12-HETE 生成のトリガーとなる 12-LOX 活性化メカニズムの解明を目的とした。特に、12-LOX の細胞内局在変化の分子機構の解明を試みた。その上で、 γ -トコトリエノールの 12-LOX 活性抑制の作用機構を明らかにする。

また、マウスに発現している 12-LOX(12/15-LOX)は活性化メカニズムが解明されていない。一方、12-LOX と同様にアラキドン酸の酸化を触媒する酵素でありアレルギー疾患との関連性もある 5-lipoxygenase (5-LOX) はその活性化因子が明らかとされているため、12-LOX 活性化機構解明の足掛かりを得るため、5-LOX の活性化機構に関して研究を進めることとした。

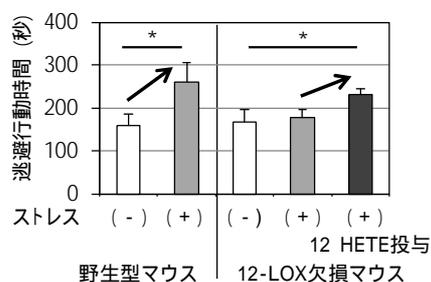


12-HETE; 12-hydroxyeicosatetraenoic acid

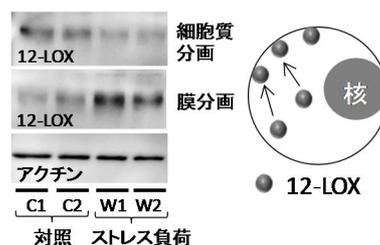
【図1】 12-HETEの構造



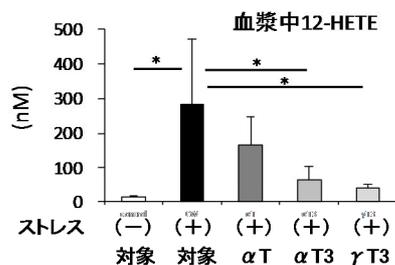
【図2】 ストレス負荷と血漿中12-HETEの変化



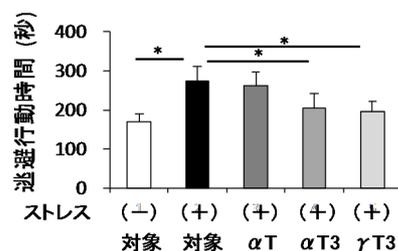
【図3】 ストレス負荷後の尾懸垂試験



【図4】 ストレス負荷によって12-LOXは細胞質から膜へ局在変化する



【図5】 ストレスによる12-HETE生成へのトコトリエノール(T3)の効果



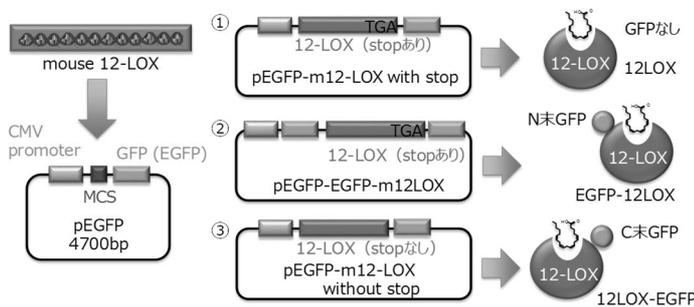
【図6】 ストレスによる逃避行動へのトコトリエノール(T3)の効果

3. 研究の方法

【研究項目1】 12-LOX 過剰発現細胞の作成と 12-LOX 細胞内局在変化メカニズム解明

これまでマウスでの動物実験を行ってきたが、本研究計画では細胞実験で 12-LOX 活性化メカニズムの解明を試みた。

まず、図7に示す通り、12-LOX 単独で発現するプラスミド、12-LOX のN末端にEGFPが融合したEGFP-12LOX を発現するプラスミド、12-LOX のC末端にEGFPが融合した12LOX - EGFP を発現するプラスミドの3種類を作成した。



【図7】 mouse 12-LOX発現プラスミド

このプラスミドを HEK293 細胞に Lipofectamine 2000 もしくは Lipofectamine 300 を用いて遺伝子導入を行った。細胞内の 12-HETE 産生量は質量分析装置 (LC-MS/MS) を用いて測定し、12-LOX の細胞内局在は GFP の傾向を蛍光顕微鏡で観察した。

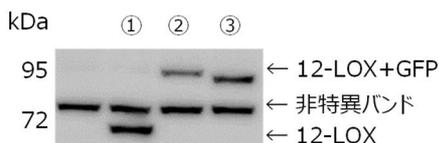
【研究項目2】 ダイゼイン (大豆イソフラボン) による 5-LOX の活性化とインフルエンザウイルス増殖抑制機構の解明

武庫川女子大学生生活環境学部食物栄養学科(伊勢川裕二教授)で大豆イソフラボンの一成分のダイゼイン(Dz)がインフルエンザウイルス増殖抑制効果を持つことを見出していた。イソフラボンである Dz はポリフェノールとして抗酸化活性を持つため、Dz のウイルス増殖阻害効果のメカニズムに抗酸化作用が関与すると仮説を立て検証したところ、抗酸化活性との関連は見られなかったが、Dz によって細胞内で 5-LOX によって産生される 5-HETE が顕著に増加することを発見した。5-LOX は活性化メカニズムの詳細が解明されていることから 12-LOX の活性機構を解明する足掛かりを得るために Dz による 5-LOX 活性化メカニズム・抗インフルエンザ効果の機構の解明を行った。

4. 研究成果

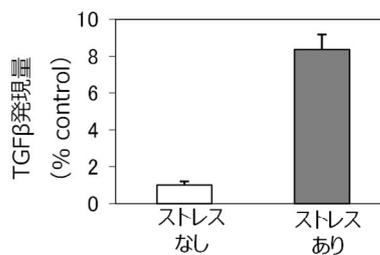
【研究項目1】

図7で示したプラスミドを HEK293 細胞に遺伝子導入を行い、蛍光顕微鏡観察を行ったところ、GFP を融合した 12-LOX を遺伝子導入した細胞では GFP の蛍光を確認した。また、プラスミドを遺伝子導入した HEK293 細胞から蛋白質を抽出し SDS-PAGE にて電気泳動し mouse 12-LOX に対する特異抗体を用いたウエスタンブロッティングを行ったところ、想定通りの分子量の蛋白(12-LOX、12-LOX-EGFP、EGFP-12-LOX)が発現していることを確認している(図8)。



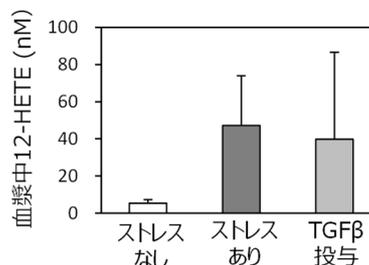
【図8】 GFP融合12-LOXの発現

生体に負荷されるストレスを細胞実験で再現する上で重要となるのは、12-LOX 局在変化を誘導する因子である。マウスへのストレス負荷による TGF の上昇 (mRNA レベル) を確認し(図9)、TGF の腹腔投与にて血中 12-HETE が増加することを見出していた(図10)。そこで、本研究計画では TGF をストレス誘導因子の候補分子として使用した。



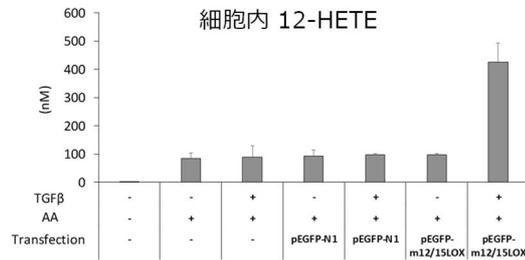
【図9】 ストレス負荷後の肝臓での TGFβ発現量の変動

上述のプラスミドを HEK293 細胞に遺伝子導入し 24 時間後にアラキドン酸(AA)を 120 μM 添加し、さらに 24 時間後に培地を回収し LC-MS/MS を用いて 12-HETE を測定した。この結果、12-LOX の発現した細胞に対し TGF で刺激することで顕著に 12-HETE の産生が増加する事を確認できた(次頁 図11)。



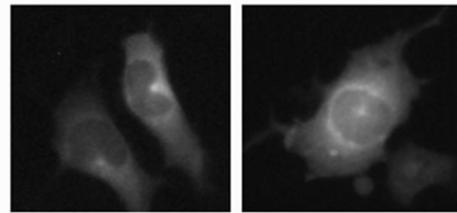
【図10】 TGFβ投与による血漿中12-HETEの増加

12-LOX を発現させた HEK293 細胞において、TGF 刺激によって 12-LOX の細胞内局在変化を蛍光顕微鏡で観察した。EGFP-12LOX は細胞質に多く存在していたが、TGF を添加した 24 時間後に、EGFP-12LOX は核膜（核周囲）に局在が変化する傾向がみられた（図 12）。この結果から TGF の刺激によって 12-LOX は核膜に局在化することで活性化し、12-HETE の産生が増加することが明らかとなった。



【図11】 12-LOXの発現と12-HETE産生

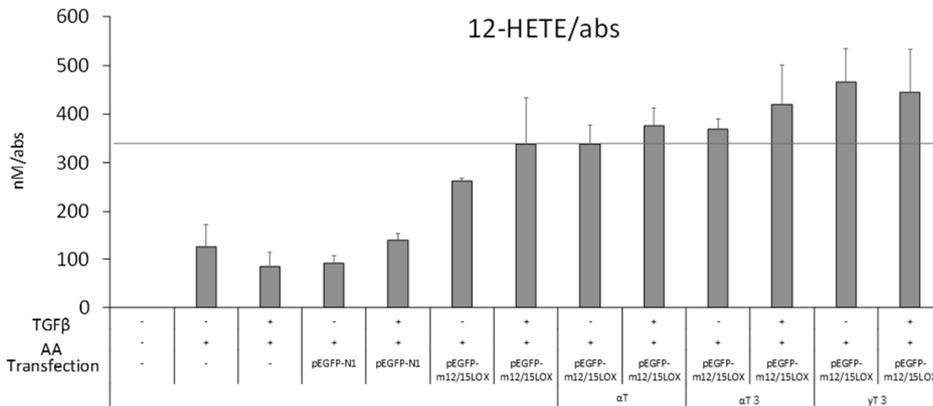
次に、TGF によって増加する 12-HETE の産生を α -トコフェロール (T)、 α -トコトリエノール (T3)、 γ -トコトリエノール (T3) が抑制するかを検討した。しかし残念ながら T3、T3 では 12-HETE の産生の低下は確認できなかった（図 13）。



12-LOX発現細胞 TGFβ (-) 12-LOX発現細胞 TGFβ (+)

12-LOX (12/15-LOX) は白血球系の細胞に主に発現することから HEK293 細胞ではマウスでみられた現象を再現できない可能性が示唆された。

【図12】 12-LOXの発現とTGFβの効果



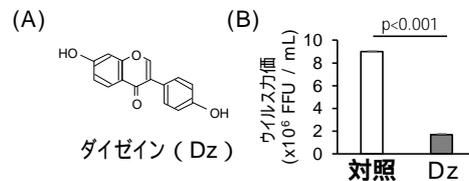
【図13】 12-HETE産生に対するトコトリエノールの効果

マウスにストレスを負荷することで 12-HETE が血中で増加するメカニズムと 12-HETE のストレスによる行動異常における生理的意義、トコトリエノールの 12-LOX 阻害効果に関して Free Red Bio Med 誌にて発表した。

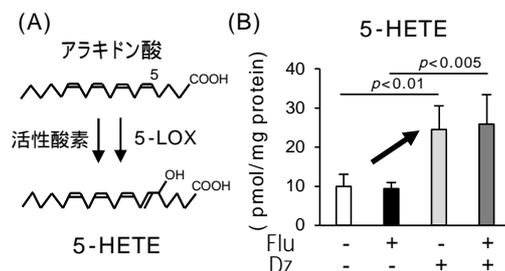
【研究項目 2】

研究代表者は研究分担者の武庫川女子大学生活環境学部食物栄養学科 伊勢川裕二教授との共同研究でダイゼイン (Dz) (図 14 (A)) がインフルエンザウイルス増殖抑制効果を持つこと (図 14 (B)) を報告した。

イソフラボンである Dz はポリフェノールとして抗酸化活性を持つため、Dz のウイルス増殖阻害効果のメカニズムに抗酸化作用が関与すると仮説を立て検証したところ、活性酸素によって生成されるリノール酸酸化物・コレステロール酸化物はウイルス感染で増加せず、また Dz 添加によって脂質酸化物が減少しなかったことから抗ウイルス効果に抗酸化作用は関連しないことが判明した (データ提示なし)。



【図14】 ダイゼインの構造 (A) と インフルエンザウイルス増殖抑制効果 (B)



【図15】 感染とDz添加による脂質酸化物の変動

一方、Dz 添加によって脂質酸化酵素 5-LOX を介して生成されるアラキドン酸酸化物 5-hydroxyeicstetraenoic acid (5-HETE) (前頁 図 15 (A)) が細胞内で著増することを発見した (前頁 図 15 (B))。この 5-HETE を細胞に添加するとインフルエンザウイルスの増殖が濃度依存的に抑えられた (図 16) ことから、5-HETE がインフルエンザウイルス増殖を抑制する因子であることが判明した。

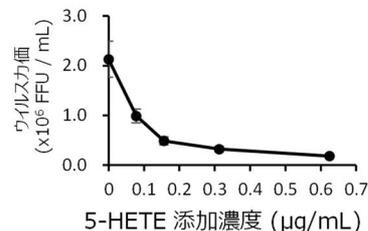
さらに 5-HETE 産生酵素である 5-LOX 蛋白をノックダウンすることで (図 17 (A)) Dz のウイルス増殖阻害効果が有意に減弱した (図 17 (B))。

以上の結果から「Dz は 5-LOX の酵素活性を昂進し 5-HETE を増加させることでウイルス増殖を抑制する」ことを明らかとして国際誌にて報告した (J. Clin. Biochem. Nutr. 2020; 66(1): 36-42)。

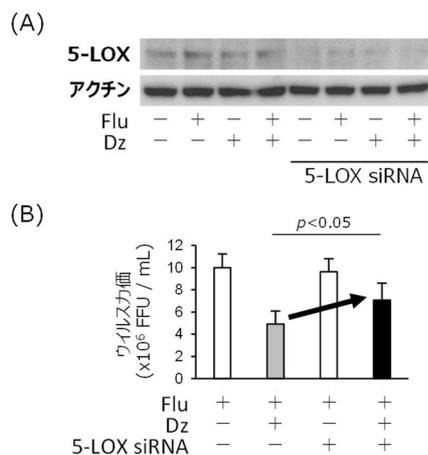
また、Dz によって活性化された 5-LOX を介して産生される 5-HETE がウイルス RNA 合成を阻害することを検証するために、in vitro ウイルス RNA ポリメラーゼ活性解析法を開発した。本手法は既存のウイルス RNA ポリメラーゼ活性測定法とは異なり、超遠心法を使用せずビーズによって短時間でウイルスを精製し、放射性同位元素を用いずに realtime PCR で測定する方法で、簡便・安全に各ウイルス RNA segment を個別にコピー数まで定量できることが特徴である (Virology 2021; 618(1): 177)。

本報告書作成段階では 5-HETE がインフルエンザウイルスの細胞内増殖を抑制するメカニズムの完全解明には至っていないが、開発した手法等を活用し、5-HETE の薬理作用の解明を進めていく。

Dz による 5-LOX 活性化メカニズムの解明も進めているが、この過程で 5-LOX の酵素活性の昂進には、細胞内 Ca 濃度、ATP 濃度、核膜への移行、核膜に存在する 5-LOX 足場蛋白 (FLAP) 5-LOX 蛋白のリン酸化が重要であることが分かった。12-LOX (12/15-LOX) には 5-LOX の足場蛋白の FLAP に相当する蛋白の存在は報告されていない。ストレス・TGF と 12-LOX の活性化の間をつなげるシグナル伝達経路は未解明であるが、5-LOX のファミリー酵素である 12-LOX は 5-LOX に近い活性化機構を持っている可能性は高い。



【図16】 5-HETE添加によるウイルス増殖阻害効果



【図17】 5-LOX siRNAによるDzのウイルス増殖抑制効果の減弱化

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Shichiri Mototada, Ishida Noriko, Aoki Yoshinori, Koike Taisuke, Hagihara Yoshihisa	4. 巻 175
2. 論文標題 Stress-activated leukocyte 12/15-lipoxygenase metabolite enhances struggle behaviour and tocotrienols relieve stress-induced behaviour alteration	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Free Radical Biology and Medicine	6. 最初と最後の頁 171 ~ 183
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.freeradbiomed.2021.08.236	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Horio Yuka, Shichiri Mototada, Isegawa Yuji	4. 巻 18
2. 論文標題 Development of a method for evaluating the mRNA transcription activity of influenza virus RNA-dependent RNA polymerase through real-time reverse transcription polymerase chain reaction	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Virology Journal	6. 最初と最後の頁 177-177
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12985-021-01644-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yuka Horio, Riho Sogabe, Mototada Shichiri, Noriko Ishida, Ryosuke Morimoto, Atsushi Ohshima, Yuji Isegawa	4. 巻 66
2. 論文標題 Induction of a 5-lipoxygenase product by daidzein is involved in the regulation of influenza virus replication	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition	6. 最初と最後の頁 36-42
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3164/jcfn.19-70	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 4件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 七里元督、堀尾侑加、伊勢川裕二
2. 発表標題 大豆イソフラボンは5-リポキシゲナーゼの活性化を介してインフルエンザウイルスの増殖を抑制する
3. 学会等名 第74回日本酸化ストレス学会・第21回日本N0学会合同学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 七里元督
2. 発表標題 生体膜を構成する脂肪酸の酸化と脂質酸化制御による疾患治療への応用展開
3. 学会等名 一般社団法人先端膜工学研究推進機構2020年度秋季講演会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 七里元督
2. 発表標題 ストレスによる脂質酸化酵素の活性化を介して増加する脂質酸化物とその生理的意義
3. 学会等名 日本農芸化学会「産学官若手交流会（さんわか）」（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 七里元督
2. 発表標題 ストレスによる脂質酸化酵素活性化を介して増加する脂質酸化物とその生理的意義
3. 学会等名 第 362 回 脂溶性ビタミン総合研究委員会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 七里元督
2. 発表標題 ストレスによる脂質酸化酵素活性化を介して増加する脂質酸化物とその生理的意義
3. 学会等名 フォーラム2019 衛生薬学・環境トキシコロジー（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------