

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：24506

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24658127

研究課題名(和文) 蛍光プローブを利用としたイソチオシアネート標的蛋白質の新規探索法

研究課題名(英文) Investigation of target proteins by isothiocyanate with fluorescent probe

研究代表者

加藤 陽二 (Kato, Yoji)

兵庫県立大学・環境人間学部・教授

研究者番号：30305693

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：ワサビなどの機能性食材に含まれるイソチオシアネートITC類は、抗ガンや抗菌作用を有するが、その生理機能の発現機序は未だ不明な点が多い。研究代表者らは、これまでの研究から生理条件下でITCがタンパク質のリジン残基と結合することを見出してきた。本研究ではITCを分子内に有する蛍光色素に着目した。まず蛍光ITC修飾タンパク質に対するモノクローナル抗体の作製・特異性解析を行い、蛍光染色などに応用した。蛍光顕微鏡による観察により、容易にITC付加反応が確認された。ITC標的タンパク質もゲルの直接蛍光撮影及び抗体を用いた手法により複数確認できたが、同定は今後の課題である。

研究成果の概要(英文)：Though isothiocyanates have some biological functions such as anti-cancer or anti-bacterial activities, the mechanisms has not been shown in detail. We found the covalent adduction of ITC with lysine in a protein at physiological conditions. In this study, we focused in fluorescent character of ITC by using FITC. A monoclonal antibody to fluorescent structure has been prepared and characterized and then applied to fluorescent staining of cells. The multiple ITC adducted proteins were then detected in a gel by fluorescent scanning or by specific antibody. The identification of ITC adducted proteins remains to be done.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：イソチオシアネート 蛍光 アミノ付加体

### 1. 研究開始当初の背景

イソチオシアネート (Isothiocyanate, ITC, R-N=C=S) は抗ガンや抗菌作用を有する。生体内のターゲットは反応性の高いチオール基 (SH 基) であるとされているが、一方でチオール基と ITC の結合物は不安定であり、ITC の生理作用の引き金になるターゲット分子の同定は未だ十分に検討されていない現状にある。

これまで、ITC 分子がチューブリンタンパク質に結合すること<sup>1)</sup>や KEAP1 の SH 基への付加修飾の可能性について示唆されている<sup>2)</sup>。また、ラジオアイソトープラベルした ITC 分子を用いた標的蛋白質同定も行われているが、二次元で分離したスポットをすべて同定しているだけで、本当に標的分子であるか不明である<sup>3)</sup>。2009 年には海外の複数のグループが ITC の標的分子の 1 つとして Macrophage migration factor (MIF) を同定している<sup>4-6)</sup>。日本でも、ITC 付加修飾物が特徴的な質量分析パターンを示すことに着目し、網羅的な付加体解析も進められている<sup>7)</sup>。しかしながら、「アミノ基への付加反応」を楔 (くさび) として機構解明を行っている例は代表者らをのぞいて認められない<sup>8)</sup>。安定な ITC-アミノ基付加体は優れた ITC のバイオマーカーにもなり得ると考えられている<sup>9-10)</sup>。

#### 引用文献

1) Mi L et al., JBC 2008, 2) Zhang DD et al., MCB 2004, 3) Mi L et al., CRT 2011, 4) Brown KK et al., JBC 2009, 5) Cross JV et al., BJ 2009, 6) Suertatani-Sakouhi H et al., Biochemistry 2009, 7) 三好ら、2011 年度日本農芸化学会要旨 3J15a13, 8) Nakamura T et al., CRT 2009, 9) 中村宜督 バイオメディア 2011, 10) Kumar A and Sabbioni G, CRT 2010.

### 2. 研究の目的

ワサビなどアブラナ科植物植物からイソチオシアネート (ITC) 類が生じ、消化器系の癌に予防効果があると言われているが、その機構は十分に明らかになっていない。申請者らは生理条件下で ITC が SH 基のみならずアミノ基とも反応することを見出し、研究を行ってきた。本研究では、FITC として知られている Fluorescein isothiocyanate を用いた簡便かつ特異性の高い ITC 標的蛋白質の検出法を考案したので、これを用いて抗ガンなどの作用機序について研究を進める。また、ITC によるタンパク質機能性に与える影響及びアミノリン脂質への付加についても検討を開始する。

### 3. 研究の方法

(1) 試薬類 : AITC、BITC、蛍光色素 FITC および Rhodamine B isothiocyanate は市販さ

れているものを用いた。

(2) ITC によるタンパク質機能性 (Tubulin 重合) に与える影響 : HTS-Tubulin Polymerization Assay Kit を購入して用いた。

(3) FITC 修飾タンパク質に対する抗体作製 : キャリアータンパク質として Keyhole limpet hemocyanin (KLH) を用い、これに FITC を 0.1 M ホウ酸緩衝液 (pH 9.0) 中で 37 °C、約 20 時間反応させ、PBS に対して 4 °C で 4 日間透析した。ELISA による抗体価確認及びキャラクタライズのため、FITC と Bovine serum albumin (BSA) を KLH と同様に反応させた。常法に基づきマウスへの免疫及び Polyethylene glycol 法による細胞融合を行い、陽性細胞を取得した。抗体を Protein G カラムにより精製して特異性解析を ELISA などにより実施した。

(4) 検出法の比較検討 : モデルタンパク質 Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) を用いて Fluorescein 骨格の蛍光を指標とした検出と、作製に成功した Fluorescein を認識する抗体を用いた免疫化学的手法の比較を行った。

(5) 細胞タンパク質への付加反応の解析 :

細胞 homogenate を用いた解析  
超音波でヒト骨髄性白血病細胞 HL60 あるいは k ヒト腸管上皮細胞様 Caco2 細胞を破壊後、FITC を 30 分処理し、泳動用試料を作成し、2D・1D 電気泳動及び抗 Fluorescein 抗体を用いた Blot 解析を行った。

生細胞への FITC 処理と観察  
HL60 細胞に FITC を最大 200 μM の濃度で 30 分処理し、蛍光顕微鏡による解析を行った。

生細胞への FITC 処理と細胞内タンパク質の修飾解析  
HL60 細胞に FITC を 30 分処理し、超音波で細胞を破壊後、泳動用試料を作成し、1D 電気泳動及び抗 Fluorescein 抗体を用いた Blot 解析を行った。

### 4. 研究成果

(1) ITC の機能性に与える影響

ITC の化学反応性が高いことはよく知られた事実であり、生体内ではタンパク質とも容

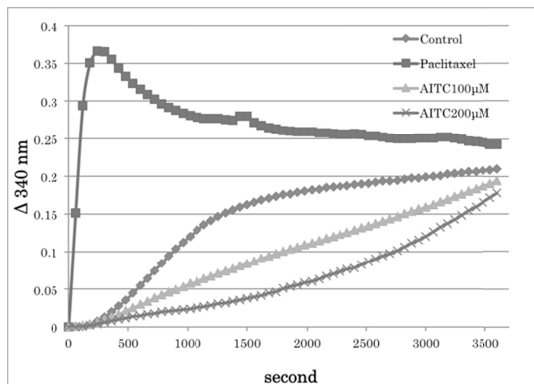


図 1 Tubulin 重合の阻害

易に反応すると考えられる。しかしながら、その反応がタンパク質の機能性に影響を与えるかどうか十分に明らかになっていない。本研究を開始するに当たり、ITC のタンパク質への付加反応が引き金となり何らかのシグナルを誘導することを間接的に示すため、チュープリンの付加反応について検討した。チュープリンは ITC のターゲット分子の一つとして報告 (前出 Mi L et al., JBC 2008) されている。ただし、ここでは蛍光を有する FITC を使わず、AITC (Allyl-isothiocyanate) を用いた。これは FITC が強い吸収を有しており、また疎水性も高く、チュープリン重合のアッセイ系への影響を避けるためである。検討の結果、100 $\mu$ M、200 $\mu$ M と ITC 濃度依存的なチュープリンの自己重合の抑制作用が認められた (図 1)。

### (2)抗体作製

蛍光 ITC による解析が標的タンパク質の探索に役立つのかを明らかにするため、まずは抗体作製を検討した。既に Fluorescein 骨格に対する抗体は市販されているものの、高価であり、将来的な免疫沈降法などへの応用が難しい。そこで、モノクローナル抗体を作製し、大量調整した。特異性解析の結果、Phenol Red (培養液の pH 指示薬として用いられる) を認識することも明らかになったが、交差性は低く、実用上は問題とならないことが明らかとなった。しかしながら培養細胞を用いた研究では注意する必要がある。

### (3)感度比較

取得した抗 Fluorescein モノクローナル抗体と Fluorescein に由来する蛍光そのものを測定する方法の比較を行った。タンパク質 GAPDH を種々の濃度の FITC で処理し、蛍光と免疫染色による感度を比較したところ、免疫化学的方法 (ウエスタン) は 1  $\mu$ M 以下の FITC 修飾から検出が可能であり、蛍光測定に比べて数倍は感度が高いことがわかった (図 2)。しかしながら検出機器の性能や増感法の併用などにより感度は変わるため、一概に蛍光の直接測定が感度が悪いとは言えない。また、簡便に測定できるという意味では蛍光測定は優れている。

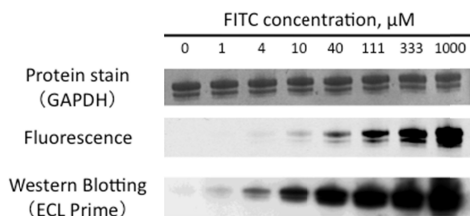


図 2 抗体と蛍光による感度比較

### (4)細胞タンパク質への付加反応

HL60 及び Caco2 細胞を超音波磨砕し、そこ

に FITC を 30 分処理し、SDS 電気泳動及び抗 Fluorescein 抗体を用いた Blot 解析を行った。その結果、FITC の濃度依存的な細胞タンパク質への取り込みが確認された。同様に 2D 電気泳動による解析を行ったところ、複数のタンパク質が FITC の標的になる事が示された (図 3)。蛍光と抗体 (ウエスタン) ではスポットの強弱など違いはあるものの、多くのスポットで重複していることがわかった。

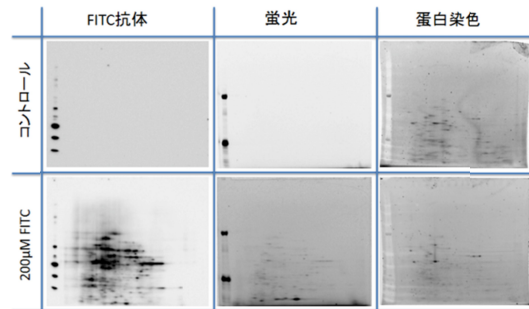


図 3 二次元電気泳動

生細胞への FITC 分子の導入について検討した。FITC は Fluorescein 骨格を有しており、強力な蛍光特性を有する。FITC 暴露後、細胞のみを遠心により取り出し、蛍光顕微鏡により細胞を観察したところ、濃度依存的な蛍光強度の増強が認められた。また、FITC による細胞毒性は低いことも明らかになり、続いて生細胞における FITC 処理とその細胞内付加体について検討することにした。

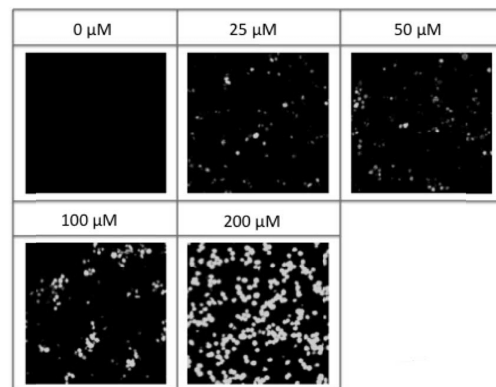


図 4 細胞の蛍光観察 (直接)

実際の生体を考えた場合、磨砕液ではなく、生きた細胞に ITC が作用する。そこで、生細胞を用いて検討を行った。FITC 処理後に SDS 電気泳動により解析したところ、FITC 濃度に依存して複数の細胞内タンパク質が修飾されることが明らかとなった (図 5)。なお、蛍光法では低分子部分に強いシグナルが認められたが、これは未反応の FITC 分子が電気泳動によりゲル内を流れ、これが蛍光を有するためである。

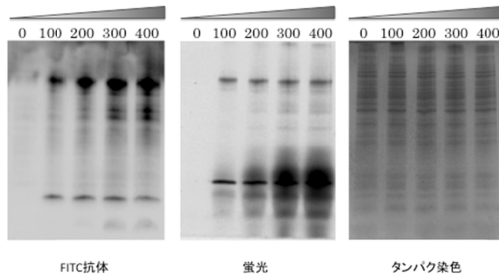


図 5 細胞蛋白への Fluorescein の導入

#### (5) 成果のまとめと今後の展開

以上をまとめると、ITC によるタンパク質修飾がその機能性を調節しうること、また、ITC の分子標的の解析のために蛍光を有する ITC が有用であることが示唆される結果を得た。ただし、結果は示していないが、ローダミン系の ITC 色素では水系への溶解度が低く、当初予定していた二重染色のような検討が出来なかった。また細胞磨砕液に ITC 分子を処理した際にはスポットが多数認められたが、生細胞に暴露したケースでは一次元の泳動結果しか得られておらず、二次元電気泳動やスポットの質量分析解析及びタンパク質同定は今後の課題である。この際、抗体の高感度という利点と、ゲルから直接スポットを切り出せる蛍光の利点をそれぞれ活用しながら研究を進める必要が有る。さらに研究を進め、ITC の機能性発現機序を明らかにしていきたい。

加えて、本研究の過程でリン脂質への ITC 付加反応を見出した。まだこの研究は緒に就いたばかりであるが、細胞内タンパク質のみならず、この生体膜・脂質分子におけるアミンへの ITC 付加修飾を見出したことから、この「萌芽」を生かし、脂質分子修飾と ITC 機能性発現との関連についても、現在、研究を進めている。

#### 5 . 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 1 件)

松本亮, 礒見みづき, 中村宜督, 北元憲利, 加藤陽二, 蛍光色素 FITC 修飾タンパク質に対する抗体の作製とその応用、日本農芸化学会、2013 年 3 月 26 日、東北大学(宮城県仙台市)

〔その他〕

ホームページ等:

<http://www.shse.u-hyogo.ac.jp/yojikato/bind/introduction/theme2.html>

#### 6 . 研究組織

##### (1) 研究代表者

加藤 陽二 (KATO, Yoji)

兵庫県立大学・環境人間学部・教授

研究者番号 : 30305693

##### (2) 研究分担者

中村 宜督 (YOSHIMASA, Nakamura)

岡山大学・環境生命科学研究科・准教授

研究者番号 : 60324381