

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 26 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25660103

研究課題名(和文)ミトコンドリアDNA付加体による炎症誘導活性評価

研究課題名(英文)Evaluation of inflammatory responses by mitochondrial DNA adducts

研究代表者

河合 慶親 (Kawai, Yoshichika)

名古屋大学・生命農学研究科・准教授

研究者番号：50380027

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではまずDNA付加体の網羅解析法の確立を試み、LC-MS/MSにより100種類を超える脂質-グアニン付加体の検出に成功し、そのうち2-オクテナル付加体を新規に同定した。一方、J774.1マクロファージにおける各種核酸塩基の炎症応答への作用について検討を進めた結果、P2X7受容体を介したATPによる炎症誘導機構と食品由来ポリフェノールによる阻害作用を明らかにした。また、低分子ヌクレオシド付加体による炎症誘導作用は認められなかったが、ミトコンドリア障害と炎症誘導の関連性が認められた。また、タンパク質分解系の阻害によって高分子核酸(DNAとRNA)が細胞外へ分泌されることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：First, we comprehensively analyzed deoxyguanosine adducts with lipid peroxidation products by LC-MS/MS and detected over 100 adducts. Among them, we identified a novel 2-octenal-dG adduct. We also examined the effects of various nucleotides and nucleosides on the inflammatory responses in J774.1 macrophages, and demonstrated the P2X7-mediated inflammatory signaling of ATP. In addition, we found that some dietary polyphenols inhibited the ATP-derived signaling. Furthermore, we found that the inhibition of proteasome and/or autophagy pathways leads to the extracellular secretion of high-molecular weight nucleic acids (DNA and RNA). In addition, we examined the molecular mechanism for the inflammatory responses upon mitochondrial respiratory inhibition. These results suggested that various nucleic acids, including low- and high-molecular weight nucleic acid derivatives, could induce inflammatory responses in macrophages.

研究分野：食品科学

キーワード：核酸 炎症 付加体 ミトコンドリア

1. 研究開始当初の背景

自然免疫細胞であるマクロファージは生体の様々な組織に局在し、病原体や異物を認識して炎症応答を引き起こす。炎症応答は適切に制御されることで生体防御や組織の恒常性に寄与するが、加齢やストレス、肥満などにより慢性化すると、動脈硬化症や糖尿病など様々な疾患に関わることが近年明らかになりつつある。マクロファージは病原体や異物を特異的な受容体により認識し、様々な炎症性のメディエーターを産生するほか、細胞死などに伴い分泌される自己由来の分子にも応答する。加齢や食生活などを要因とした肥満に代表されるような体内の代謝異常は、内因性因子の量的・質的变化を引き起こし、上記のような免疫応答を誘導する可能性が考えられる。よって、このような免疫応答を引き起こす内因性因子の作用を理解することは重要な課題と考えられる。

古細菌が共生したとされるミトコンドリアは細菌に類似した生化学的特徴を有しており、細胞内小器官にも関わらず免疫応答への関与が示唆されている。近年、炎症反応の細胞内センサーが見出され、細胞内に起因する炎症誘導機構の重要性が明らかとなってきたが、中でもミトコンドリア機能障害によって細胞質や細胞外へ放出されるダメージ関連分子パターン (DAMPs) は「ミトコンドリア DAMPs」と呼ばれ、炎症性リガンドとしての作用が相次いでトップジャーナルで報告されるなど慢性炎症の分子機構におけるミトコンドリアの重要な役割が示唆されている (*Nature*, 464, p104, 2010; *Nat. Immunol.*, 12, p220, 2011; *Nature*, 469, p221, 2011)。これまでにミトコンドリア DAMPs としては既にいくつかのリガンド-受容体ペアが同定されているが、活性酸素 (ROS) やその酸化修飾産物などの低分子リガンドなども含め、未解明の炎症性リガンド分子の存在も示唆される。最近になって酸化修飾を受けたミトコンドリア DNA の炎症誘導活性が示唆された (*Immunity*, 36, p401, 2012) もの、酸化 DNA 塩基の炎症性リガンド活性はほとんど報告例のない新規の生理活性であった。そこで、DNA の酸化修飾と炎症との関連性について新たな知見を得ることは、食品をはじめとする天然化合物による新たな抗炎症戦略の構築に有効であると考え、本研究を開始した。

2. 研究の目的

核酸による炎症誘導機構を新たに明らかにし、そのリガンド-受容体感知機構を理解することは、抗炎症作用を有する天然化合物や食品の開発に有効であると考えられる。本研究ではミトコンドリア DNA やその他の内因性核酸中の酸化修飾付加体の網羅解析と核酸および核酸付加体による炎症誘導活性の評価を試みることとし、これらの検討から、食品成分による新規抗炎症活性評価法とし

て応用することを最終目標とした。

3. 研究の方法

(1) DNA 修飾付加体の網羅解析

本研究においては、まず酸化ストレスによる DNA 酸化修飾反応として、特に脂質過酸化産物による DNA 構成塩基への修飾に焦点を当てることにした。酸化ストレスにより生体膜脂質が酸化されると脂質ヒドロペルオキシドの分解を経て様々な反応性アルデヒドが生成し、生体成分を修飾することが知られている。しかし、DNA 修飾反応の全容は明らかになっていない。そこで、生体膜を構成する多価不飽和脂肪酸の中でも、脂質過酸化反応により多様な分解産物を生成すると考えられる AA に注目し、AA 酸化物と dG との反応について LC-MS/MS 解析を行った。dG のデオキシリボース部分が脱離した -116 のフラグメントイオンを幅広い分子量範囲でモニターすることにより、dG 付加体の網羅的かつ高感度検出を試みた。

(2) 核酸が関与する炎症誘導機構の解析

マウスマクロファージ細胞株 RAW264 あるいは J774.1 を用いて各種核酸類縁体による炎症誘導活性 (一酸化窒素 NO 産生) や、ミトコンドリア阻害剤による作用についてウェスタンブロット法や RT-PCR 法などを用いて評価を行なった。細胞からの核酸分泌については、培養液からフェノール-クロロホルム抽出により核酸を単離し、特異的蛍光試薬 (プロメガ社) により二本鎖 DNA および RNA を定量した。

4. 研究成果

(1) DNA 修飾付加体の網羅解析

AA 酸化物と dG との反応液を LC-MS/MS により網羅的解析したところ、100 種類を超える付加体ピークが検出された (図 1)。

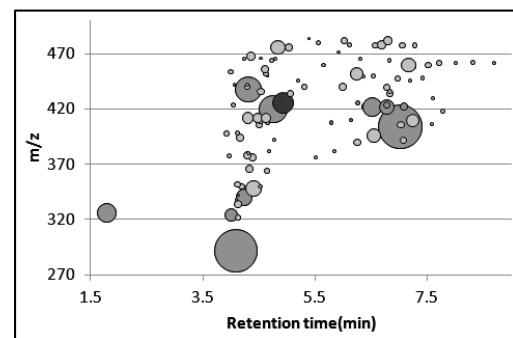


図 1 脂質-dG 付加体の網羅解析結果

このうち主要な付加体として 2-オクテナールに由来する付加体を予想した。そこで、2-オクテナールと dG とを反応させ分析したところ、新規の 4-オキソ型付加体 (OOE-dG) が主要に生成することが確認された。この付加体は、2-オクテナール修飾した仔ウシ胸腺

DNAの酵素消化物からLC-MS/MSにより検出され、その生成量は反応液中の遷移金属イオン濃度に依存して増加した。よって、金属触媒による2-アルケナールの4位の酸化を介して顕著なDNA修飾を引き起こすことが示唆された。鉄過剰モデルを用いた *in vivo* からの本付加体の検出・定量は今後の課題である。

(2) 核酸が関与する炎症誘導機構の解析

炎症応答における低分子核酸の作用について検討した。J774.1 マウスマクロファージに様々な低分子核酸の存在下でリポ多糖 (LPS) 刺激し、NO 産生量を検討したところ、アデノシン三リン酸 (ATP) やアデノシン (Ado) の添加により顕著な NO 産生量の増加が認められた。NO 産生増加のメカニズムとして、ATP と Ado はいずれも iNOS タンパク質および mRNA 発現を増加させることが明らかとなった (図2)。ATP は、iNOS の転写因子として知られる NF- κ B や AP-1、CREB の活性を増強させるほか、IFN- β 産生を増加させることで IFN- β による STAT-1 の活性化および IRF-1 の発現増加を介して iNOS 発現を増加させたと考えられる。また、siRNA によるノックダウン実験より、この作用は P2X7 受容体を介することが確認された。一方、Ado は検討したすべての転写因子の活性に影響せず、iNOS 発現に重要と考えられる IFN- β の発現も変化させなかった。各種アデノシン受容体に対するアゴニストやアンタゴニストを用いた検討から、Ado の作用においてアデノシン受容体の寄与は低いことが示唆された。今後、ヌクレオシドトランスポーターを介した経路などを検討する必要がある。図3に ATP および Ado の予想作用スキームを示した。



図2 ATP とアデノシンによる炎症促進作用

また、ケルセチンやゲニステインなど一部のポリフェノール類は、ATP によって誘導される ERK リン酸化を顕著に抑制したことから、これら食品由来成分による P2X7 を介した炎症シグナルの抑制作用も示唆された。現在、様々なポリフェノール化合物の作用について検討するとともに、P2X7 過剰発現細胞株を構築した簡便評価系の確立に取り組んでいる。

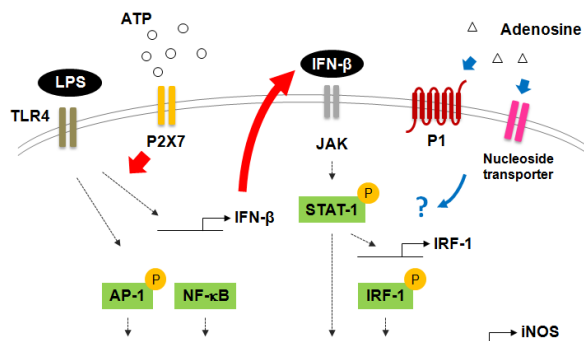


図3 ATP とアデノシンの予想作用機構

本研究では細胞からの高分子核酸の分泌についても検討を行なった。これまで ATP や高分子核酸は細胞死に伴う細胞膜の分解によって細胞内から細胞外へ放出される経路が知られていた。本研究では、J774.1 マクロファージやマウス胚性繊維芽細胞 (MEF)、ヒト子宮頸部癌由来上皮細胞 (HeLa) などの細胞種を用いて様々な条件における核酸分泌について検討した。これらの細胞に炎症誘導や栄養飢餓、様々な阻害剤を処理し、細胞外の二本鎖 DNA および RNA 量を検討したところ、J774.1 からの分泌量が最も顕著であった。また、J774.1 においては、LPS や ATP のような細胞死を誘導する処理のほか、栄養飢餓や細胞内タンパク質分解系の阻害 (プロテアソーム阻害剤 MG132、リソソーム分解阻害剤 Bafilomycin A1) によっても顕著な核酸分泌が認められた (図4)。特に MG132 処理による核酸分泌は顕著であり、Bafilomycin との共処理によりさらに増加した。また、分泌された RNA はアガロース電気泳動による分子サイズの推定から rRNA であることが示唆され、培地中へのリボソームタンパク質 S6 の分泌もウェスタンブロットによる確認された。よって、検出された RNA はリボソームとして細胞外へと分泌する可能性が示唆された。一方、細胞外に分泌された二本鎖 DNA はヌクレオソーム単位で断片化した DNA であることが示された。

以上の結果より、細胞内分解系の異常やタンパク質翻訳機構の異常により核酸が細胞外へ分泌することが示され、タンパク質翻訳装置であるリボソームや DNA の断片化との関係性が示唆された。プロテアソームやオートファジーなど細胞内分解機構と核酸分泌機構との関連や、分泌された核酸の修飾度合いなど構造的特徴および生理活性については今後の検討課題である。

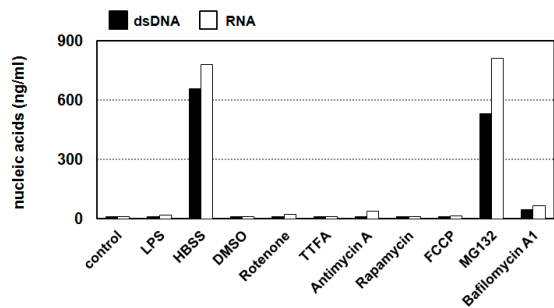


図4 J774.1からの核酸分泌

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 2 件)

- (1) 額恵理香、大西康太、河合慶親: 細胞外核酸のマクロファージ炎症応答への作用とその分子機構解析. 第 37 回日本分子生物学会年会 (横浜) 2014 年 11 月
- (2) Nuka, E., and Kawai, Y.: Formation of 2'-deoxyguanosine adducts with 2-octenal during oxidation of arachidonic acid. 17th SFRR1 2014 (Kyoto) 2014.3

〔図書〕(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.agr.nagoya-u.ac.jp/~food/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

河合慶親 (Kawai, Yoshichika)

名古屋大学大学院生命農学研究科・准教授

研究者番号: 50380027