

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：13901

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2008～2013

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・生命農学研究科・教授

研究者番号：40203533

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 90,100,000円、(間接経費) 27,030,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、脂質などに由来した親電子性アルデヒドによる新しいタンパク質付加反応を見いだすとともに、モノクローナル抗体を用いた免疫組織化学やLC/MS/MSなどの高感度検出系を用いた付加体の定量法を開発した。タンパク質付加体のdanger signalとしての機能に注目し、自然免疫受容体やスカベンジャー受容体などのパターン認識受容体に対するリガンド機能を明らかにした。親電子化合物のタンパク質付加体を抗原リガンドとして認識する自然抗体に関する研究を行い、アポトーシス細胞除去などの生体防御に關与する自然抗体の多重交差性の分子メカニズムを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We established some new protein adductions of proteins by lipid-derived electrophilic aldehydes. To verify the presence of the protein-bound ligands in vivo, we raised a monoclonal antibody against the ligands, characterized the epitopes, and immunohistochemically demonstrated the presence of the ligands in vivo. In addition, we developed high performance liquid chromatography with on-line electro spray ionization tandem mass spectrometry (LC/ESI/MS/MS)-based quantification methods and showed evidence that the ligands are indeed accumulated in vivo. We also established the danger signal function of these ligands. Furthermore, we characterized the multi-specificity mechanism of innate antibodies that recognize the modified proteins as antigenic ligands and established that they contribute to the removal of apoptotic cells and biological defense.

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 プロテオミクス センサー分子 分子プローブ 受容体

1. 研究開始当初の背景

酸化ストレス条件下において、酸化に対して脆弱な多価不飽和脂肪酸は、脂質過酸化反応の結果、生体分子に対して高い反応性を有するアルデヒドを生じる。アルデヒドとタンパク質及び DNA は共有結合的に反応して修飾付加体を生成する。このような修飾付加体が粥状動脈硬化症や神経変性疾患などのさまざまな疾病の病変部位から検出されていることから、疾病の発症や進行における酸化ストレスの寄与が疑われている。そのため、酸化ストレスが亢進された際に生成される修飾付加体を酸化ストレスマーカーとし、それらを指標として疾病と酸化ストレスの関連性について議論がなされてきた。しかしながら多くの報告がなされているにもかかわらず、脂質アルデヒドと疾病との関連性について、分子レベルでの解明はほとんどなされていない。酸化ストレス環境下においては、脂質アルデヒドのみならず ROS をはじめとする多数の活性種が存在するものと推測される。そのため、酸化ストレス環境下にある細胞及び組織は、さまざまな活性種により複雑な反応にさらされている可能性がある (図 1)。また、最近の研究により、ROS のシグナリング分子としての機能や、さらには ROS やその他の反応性分子 (アルデヒドなど) がタンパク質に作用した際に生成される修飾付加体構造が、新たなリガンドとして細胞膜受容体などに認識されることなどが明らかになってきている。しかし、これらのリガンド構造についてはその化学構造を含めて詳細が明らかになっていない。

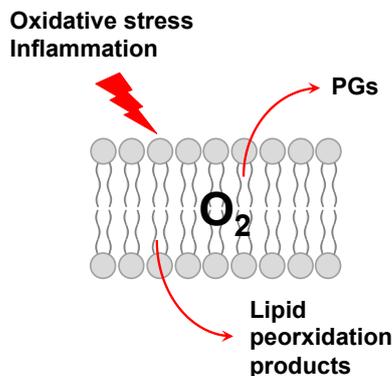


図1. 酸化ストレス・炎症における反応性因子の生成

2. 研究の目的

タンパク質との反応において、これまでに数々のアルデヒド付加体が報告されているが、アルデヒドとタンパク質の反応が複雑であることに加え、多種多様の脂質アルデヒドが生成されるために、報告されていない修飾付加体が未だ数多く存在するものと予想される。疾病と酸化ストレスの関係性を理解するためには、これまでに報告されている付加体以外にも、酸化ストレス状態において生成される未知の修飾付加体を網羅的に検出し、

それらの生物学的意義を明らかにしていく必要がある。そこで本研究では、タンパク質修飾付加体に焦点を絞り、新規脂質アルデヒド修飾付加体の探索および構造解析を行い、酸化ストレス条件下において、実際にそれらが生体内で生成されるかどうかを評価することで、酸化ストレスマーカーとしての有用性について検討した。さらに、それらの付加体のリガンド機能 (図 2) を開拓することを目的に、酸化 LDL 受容体として同定された lectin-like oxidized LDL receptor-1 (LOX-1) に対するリガンド活性の評価を行った。本成果報告では、2-ノネナルに関する研究成果を中心に詳述する。

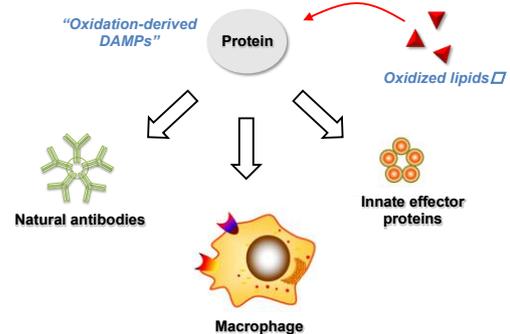


図2. タンパク質修飾によるリガンドの生成

3. 研究の方法

(1) タンパク質のアルデヒド修飾: 2-ノネナルなどの反応性アルデヒドと血清アルブミンをリン酸緩衝液中で、37°C、24 時間反応させることにより調整した。

(2) モノクローナル抗体の作成: Balb/c マウスを 2-ノネナル修飾ヘモシアニン (KLH) により免疫し、定法により特異的モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを作製した。

(3) モノクローナル抗体のエピトープ構造の解析: 37°C で 24 時間反応させた 2-ノネナル/リジン反応液を HPLC により分画し、競合 ELISA によるアッセイにより要請を示したピークについて大量調整し、最終的には、MS, NMR による構造解析を行った。

(4) LOX-1 結合活性: LOX-1 細胞外領域の全長、および変異を導入した細胞外領域を大腸菌を宿主として大量発現させ、封入体として得られたタンパク質をリフォールディングし、再構築 LOX-1 を調製した。再構築 LOX-1 の溶液状態での認識能、ビーズやプレートなどへの固定化後の認識能を蛍光標識酸化 LDL の結合を測定することにより評価した。基板上に固定化した再構築 LOX-1 の認識特性が細胞上での認識特性を反映しているか、生細胞における認識能の定量評価結果との相関解析を行った。本実験は、共同研究者 (町

田幸子博士)により測定が行われた。

(5) 安定同位体希釈法を用いた LC/MS/MS によるアルデヒド付加体の定量 : UPLC-ESI/MS/MS

Waters Acquity UPLC system (Waters Acquity TQD tandem quadrupole mass spectrometer)を用いた。

4. 研究成果

(1) 新規リガンド候補の同定

2-ノネナルは中年期以降のヒトにおいて、特徴的な体臭成分として同定されたことから、一般に加齢臭として知られている。2-ノネナル修飾タンパク質の検出を目的として、2-ノネナル修飾タンパク質に対するモノクローナル抗体 27Q4 を作製した。エピトープ構造解析の結果、新規付加体として N^{\square} -[3-(hept-1-enyl)-4-hexyl pyridinium] lysine (HHP-lysine) のトランス、シス異性体を同定した (図3) (文献1)。本研究課題では、このほかケトアミド型 4-オキシ-2-ノネナル-リジン付加体についてモノクローナル抗体を作成した (文献2)。4-ヒドロペルオキシ-2-ノネナルによるタンパク質修飾において、2種類の新規付加体を同定し、さらにモノクローナル抗体の作成に成功した (文献3)。

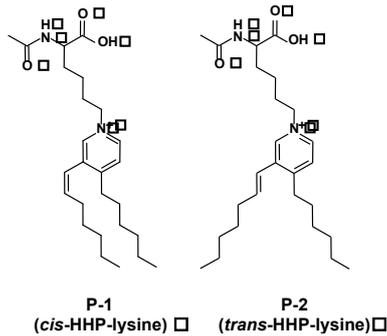


図3. 新規リガンド候補の同定

(2) モノクローナル抗体を用いたアルデヒド付加体の検出

生体内における 2-ノネナル修飾タンパク質の生成を検討するため、酸化ストレス誘発発癌モデル動物である Fe-NTA 投与ラット腎臓において、27Q4 抗体を用いた免疫組織化学染色を行った。その結果、投与後 1, 6, 24, 48 時間後の腎臓において抗体陽性物質の生成が確認された。このほか、ケトアミド型 4-オキシ-2-ノネナル-リジン付加体、および 4-ヒドロペルオキシ-2-ノネナル-リジン付加体に対する抗体を用いた免疫組織染色により、生体内におけるこれらの新たな修飾構造の生成が証明された (文献1-3)。

(3) LOX-1 リガンド活性の評価

LOX-1 は、血管内皮細胞における酸化 LDL の取り込みにおいて主に働く受容体として同定された。LOX-1 は血流内で生成されるアルデヒド修飾タンパク質の除去機構に寄与するものと考えられている。これまで

の研究により、4-ヒドロキシ-2-ノネナル-ヒスチジン付加体がリガンドとして LOX-1 に結合し、LOX-1 受容体下流のシグナル伝達を活性化することを見いだしている (文献4)。LOX-1 と種々のアルデヒド修飾 BSA の結合能について検討した結果、LOX-1 が 2-ノネナル修飾 BSA を認識することが明らかとなった。そこで、HHP-lysine が LOX-1 に認識される可能性について検討した。CFP conjugated LOX-1 (CFP/LOX-1) を強制発現させた CHO 細胞を用いて、アセチル化 LDL の取り込み

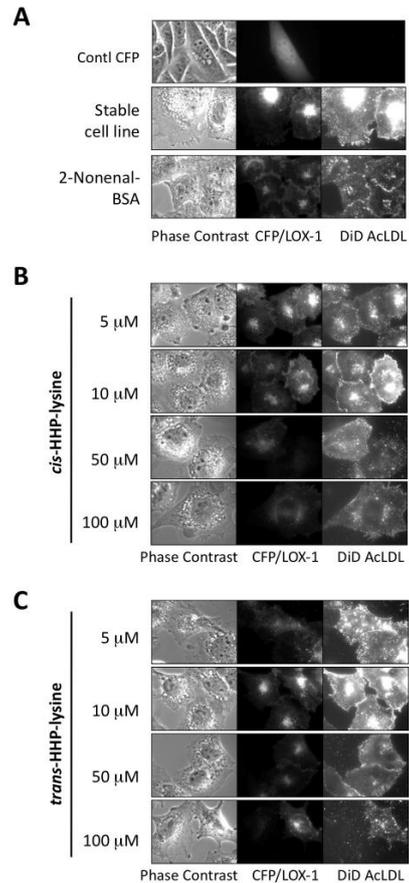


図4. 2-ノネナル付加体のLOX-1リガンド活性

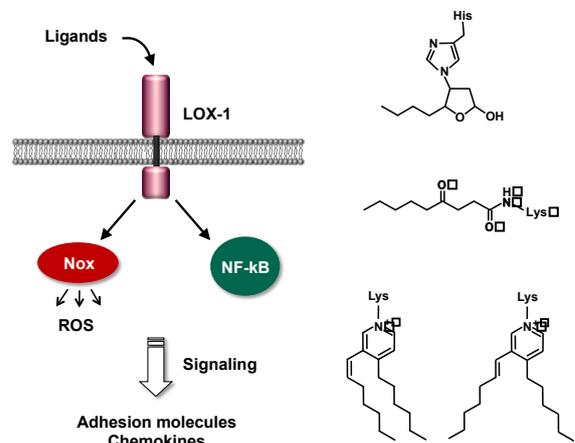


図5. 炎症応答を活性化するLOX-1リガンドの同定

能を利用した阻害実験により検討した。その結果、2-ノネナル修飾 BSA のみならず、*cis* および *trans*-HHP-lysine によっても アセチル化 LDL の取り込み阻害が起こることを明らかにした (図4)。本研究課題では、2-ノネナル-リジン付加体以外に、HNE-ヒスチジン付加体や ONE-リジン付加体などに LOX-1 リガンド活性を見いだしている (図5)。

本研究の成果は、血管内皮細胞に由来する動脈硬化進行に、脂質に起因したアルデヒドによるタンパク質の修飾反応が関与する可能性を示唆するものであり、LOX-1 を介した内皮細胞機能不全が動脈硬化に結びつくという仮説を分子レベルの知見を踏まえて支持する結果であるものと期待できる。今後、LOX-1-HHP-lysine 複合体の生化学的パラメータの解析、他の LOX-1 リガンドとの結合定数の比較、LOX-1-HHP-lysine 複合体の結晶構造解析などが行われることにより、認識機構の詳細な解明が期待される。

(4) LC/MS/MS を用いた LOX-1 リガンドの定量

本研究課題では、LOX-1 リガンド活性の見いだされた HNE-ヒスチジン付加体について、安定同位体希釈法を用いた LC/MS/MS による定量法を確立し、さらに生体組織中における絶対量の測定を試みた。フラグメント解析を行ったところ、プレカーサーイオンである m/z 314.2 に対して、 m/z 268.2、156.1、110.0 のプロダクトイオンが検出された。プロダクトイオンはそれぞれ HNE-ヒスチジン付加体のヒスチジン部分に由来するものであると考えられた。この方法を用い、Fe-NTA の腹腔内投与によるラット・マウスにおける腎発癌モデルでの HNE-ヒスチジン付加体の検出を試みた。その結果、Fe-NTA を投与したマウス腎臓において HNE-ヒスチジン付加体が検出された。このほか、LOX-1 リガンド活性が確認された 2-ノネナル-リジン付加体についても、Fe-NTA 投与ラットにおける検出に成功した (図6)。

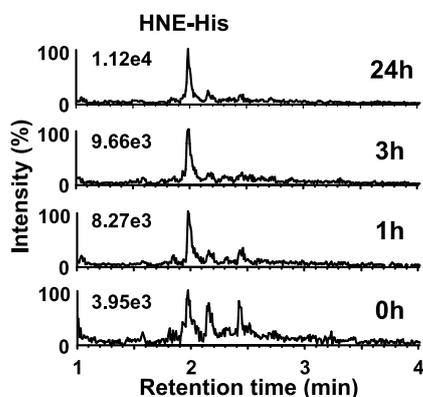


図6. LOX-1リガンドの検出

引用文献

1. Ishino, K., Wakita, C., Shibata, T., Toyokuni, S., Machida, S., Matsuda, S., Matsuda, T., and Uchida, K. (2010) Lipid peroxidation generates a body odor component trans-2-nonenal covalently bound to protein in vivo. *J. Biol. Chem.* 285, 15302-15313.
2. Shibata, T., Shimozu, Y., Wakita, C., Shibata, N., Kobayashi, M., Machida, S., Kato, R., Itabe, H., Zhu, X., Sayre, L. M., and Uchida, K. (2011) Lipid peroxidation modification of protein generates Ne-(4-oxononanoyl)lysine as a pro-inflammatory ligand. *J. Biol. Chem.* 286, 9943-19957.
3. Shimozu, Y., Hirano, K., Shibata, T., Shibata, N., and Uchida, K. (2011) 4-Hydroperoxy-2-nonenal is not just an intermediate, but a reactive molecule that covalently modifies proteins to generate unique intramolecular oxidation products. *J. Biol. Chem.* 286, 29313-29324.
4. Kumano-Kuramochi, M., Shimozu, Y., Wakita, C., Ohnishi-Kameyama, M., Shibata, T., Matsunaga, S., Takano-Ishikawa, Y., Watanabe, J., Goto, M., Xie, Q., Komba, S., Uchida, K., and Machida, S. (2012) Identification of 4-hydroxy-2-nonenal-histidine adducts that serve as ligands for human lectin-like oxidized LDL receptor-1. *Biochem. J.* 442, 171-180.

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10件)

1. Chikazawa, M., Otaki, N., Shibata, T., Yasueda, T., Matsuda, T., and Uchida, K. (2013) An apoptosis-associated mammary protein deficiency leads to enhanced production of IgM antibodies against multiple damage-associated molecules. *PLoS ONE* 8, e68468. 査読有 doi: 10.1371/journal.pone.0068468.
2. Chikazawa, M., Otaki, N., Shibata, T., Miyashita, H., Kawai, Y., Maruyama, S., Toyokuni, S., Kitaura, Y., Tsukasa Matsuda, and Uchida, K. (2013) Multi-specificity of IgM antibodies raised against advanced glycation end products: Involvement of electronegative potential of antigens. *J. Biol. Chem.* 288, 13204-13214. 査読有 doi: 10.1074/jbc.M113.452177
3. Kumano-Kuramochi, M., Shimozu, Y., Wakita, C., Ohnishi-Kameyama, M., Shibata, T., Matsunaga, S., Takano-Ishikawa, Y., Watanabe, J., Goto, M., Xie, Q., Komba, S., Uchida, K., and

- Machida, S. (2012) Identification of 4-hydroxy-2-nonenal-histidine adducts that serve as ligands for human lectin-like oxidized LDL receptor-1. *Biochem. J.* 442, 171-180. 査読有
doi: 10.1042/BJ20111029.
4. Shibata, T., Shimozu, Y., Wakita, C., Shibata, N., Kobayashi, M., Machida, S., Kato, R., Itabe, H., Zhu, X., Sayre, L. M., and Uchida, K. (2011) Lipid peroxidation modification of protein generates Ne-(4-oxononanoyl)lysine as a pro-inflammatory ligand. *J. Biol. Chem.* 286, 19943-19957. 査読有
doi: 10.1074/jbc.M110.187047.
 5. Shimozu, Y., Hirano, K., Shibata, T., Shibata, N., and Uchida, K. (2011) 4-Hydroperoxy-2-nonenal is not just an intermediate, but a reactive molecule that covalently modifies proteins to generate unique intramolecular oxidation products. *J. Biol. Chem.* 286, 29313-29324. 査読有
doi: 10.1074/jbc.M111.255737.
 6. Shibata, T., Kimura, Y., Mukai, A., Mori, H., Ito, S., Asaka, Y., Oe, S., Tanaka, H., Takahashi, T., and Uchida, K. (2011) Transthiocarbamylation of proteins by thiolated isothiocyanates. *J. Biol. Chem.* 286, 42150-42161. 査読有
doi: 10.1074/jbc.M111.308049
 7. Yamaguchi, S., Aldini, G., Ito, S., Morishita, N., Shibata, T., Vistoli, G., Carini, M., and Uchida, K. (2010) 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. 査読有
doi: 10.1021/ja908878n.
 8. Ishino, K., Wakita, C., Shibata, T., Toyokuni, S., Machida, S., Matsuda, S., Matsuda, T., and Uchida, K. (2010) Lipid peroxidation generates a body odor component trans-2-nonenal covalently bound to protein in vivo. *J. Biol. Chem.* 285, 15302-15313. 査読有
doi: 10.1074/jbc.M109.068023
 9. Otaki, N., Chikazawa, M., Nagae, R., Shimozu, Y., Shibata, T., Ito, S., Takasaki, Y., Fujii, J., and Uchida, K. (2010) Identification of a lipid peroxidation product as the source of oxidation-specific epitopes recognized by anti-DNA autoantibodies. *J. Biol. Chem.* 285, 33834-33842. 査読有
doi: 10.1074/jbc.M110.165175
 10. Wakita, C., Maeshima, T., Yamazaki, A., Shibata, T., Ito, S., Akagawa, M., Ojika, M., Yodoi, J., and Uchida, K. (2009) Stereochemical configuration of 4-hydroxy-2-nonenal-cysteine adducts and their stereoselective formation in a redox-regulated protein. *J. Biol. Chem.* 284, 28810-28822. 査読有
doi: 10.1074/jbc.M109.019927
- [学会発表] (計 3 2 件)
1. 内田浩二: 食の生体防御機能. 第 4 回 岐阜薬科大学機能性健康食品研究講演会 (岐阜) 2013 年 11 月 30 日
 2. Uchida, K.: Redox-derived damage-associated molecular patterns: Ligand function of lipid peroxidation adducts. SFRR-Europe 2013 Congress (Athens, Greece) 2013 年 9 月 24 日
 3. 内田浩二: 抗炎症プロスタグランジンの炎症促進作用. 第 86 回日本生化学会大会 (横浜) 2013 年 9 月 13 日
 4. 内田浩二: 自然抗体による生体防御. 第 24 回日本生体防御学会学術総会 (熊本) 2013 年 7 月 12 日
 5. 内田浩二: 生体における危機管理システムと食による制御. 第 67 回日本栄養食糧学会スポンサードセミナー (名古屋) 2013 年 5 月 26 日
 6. 内田浩二: レドックス制御を基盤にした食品の機能性評価. 日本農芸化学会 2013 年度大会 (仙台) 2013 年 3 月 27 日
 7. 内田浩二: 自然免疫・自然炎症に関する機能性成分. 九州大学食品機能デザイン研究センターシンポジウム (福岡) 2013 年 2 月 9 日
 8. 内田浩二: 炎症消散作用を示す機能性食品. 日本食品科学工学会 産官学交流シンポジウム (東京) 2012 年 12 月 18 日
 9. Uchida K.: Electrophilic ligands as a trigger of pro-inflammatory response. "International Symposium 2012 on Signaling Functions of Reactive Oxygen Species" (熊本) 2012 年 12 月 17 日
 10. Uchida K.: Oxidation-derived DAMPs targeted by autoantibodies. 第 33 回内藤コンファレンス (札幌) 2012 年 6 月 29 日
 11. 内田浩二: レドックス修飾タンパク質のリガンド機能. 日本薬学会第 132 年会シンポジウム (札幌) 2012 年 3 月 29 日
 12. 内田浩二: レドックス修飾タンパク質の構造と機能. 日本農芸化学会 2012 年度大会シンポジウム (京都) 2012 年 3 月 25 日
 13. Uchida, K.: Identification of lipid oxidation adducts and functional analysis as receptor ligand. The Society for Free Radical Biology and Medicine 18th Annual Meeting (Atlanta, USA) 2011 年 11 月 16-20 日
 14. Uchida, K.: Potential ligand function of oxidized lipid adducts. 12 International Conference on Bioactive Lipids in Cancer, Inflammation, and Related Diseases (Seattle, USA) 2011 年 9 月 18-22 日
 15. 内田浩二: 植物イソチオシアネートの

- 多彩な機能. 平成 23 年度日本農芸化学会西日本支部・中四国支部合同大会 (宮崎) 2011 年 9 月 16 日
16. 内田浩二: レドックス修飾タンパク質のリガンド機能. 九州大学生体防御医学研究所共同利用研究集会 (博多) 2011 年 7 月 22 日
 17. 内田浩二: 親電子修飾のケミカルバイオロジー. NO 学会 (東京) 2011 年 5 月 13 日
 18. 内田浩二: 酸化脂質リガンドによる受容体シグナリングの活性化. 日本農芸化学会 2011 年度大会 (京都) 2011 年 3 月 28 日
 19. 内田浩二: スカベンジャー受容体を活性化する内因性物質. 産総研セミナー (高松) 2010 年 12 月 20 日
 20. 内田浩二: レドックス制御のケミカルバイオロジー. 第 83 回日本生化学会大会 (神戸) 2010 年 12 月 8 日
 21. 内田浩二: 内因性スカベンジャー受容体活性化因子. 徳島大学大学院特別講義 (徳島) 2010 年 12 月 6 日
 22. Uchida, K.: Protein-bound HNE as a ligand of LOX-1. 17th meeting for Society of Free Radical Biology and Medicine (Orland, USA) 2010 年 11 月 16-20 日
 23. 内田浩二: 酸化特異的エピトープと自己抗体. 酸化ストレスシンポジウム (岩手) 2010 年 8 月 20 日
 24. 内田浩二: 過酸化脂質修飾タンパク質のリガンド作用. 日本ヒトプロテオーム機構第 8 回大会・第 6 回日本臨床プロテオーム研究会連合大会 (浦安) 2010 年 7 月 27 日
 25. Uchida, K.: Covalent modification of proteins by lipid peroxidation-derived volatile aldehydes. 5th International HNE club meeting (Turin, Italy) 2010 年 6 月 16-20 日
 26. 内田浩二: レドックス感受性小分子のケミカルバイオロジー. 東北大学グローバル COE Network Medicine 創生拠点大学院セミナー (仙台) 2010 年 5 月 28 日
 27. 内田浩二: J₂ 型 PG のリガンド機能. 大阪大学蛋白質研究所セミナー“活性酸素のシグナル伝達” (京都) 2009 年 11 月 27 日
 28. 内田浩二: 環境変異原 2-アルケナールによるタンパク質修飾とバイオマーカーとしての応用. 日本環境変異原学会第 38 回大会シンポジウム (京都) 2009 年 11 月 26 日
 29. 内田浩二: 活性酸素シグナル分子を介したユニークなタンパク質修飾機構. 第 82 回日本生化学会シンポジウム“活性酸素シグナル伝達の分子制御” (神戸) 2009 年 10 月 21-24 日
 30. Uchida, K.: Protein carbonyls as a biomarker of oxidative stress. 13th International

Meeting on Recent Developments in Pharmaceutical Analysis (RDPA 2009) (Milan, Italy) 2009 年 9 月 9 日

31. 内田浩二: 親電子性物質によるタンパク質 SH 修飾とシグナル伝達. 日本酸化ストレス学会シンポジウム“活性酸素と親電子シグナル: 活性酸素の光と陰の本態解明に向けて” (博多) 2009 年 6 月 11-12 日
32. Uchida, K.: Oxidized fatty acid metabolites that regulate COX-2 gene expression. 4th International Conference on Phospholipase A2 and Lipid Mediators (Tokyo) 2009 年 5 月 25-28 日

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: HODE に対する特異的抗体、酸化ストレスに起因する疾患の診断方法、キット、ハイブリドーマおよび免疫学的検出方法
 発明者: 七里 元督、萩原 義久、吉田 康一、内田浩二、柴田貴広
 権利者: 独立行政法人産業技術総合研究所、国立大学法人名古屋大学
 種類: 特許
 番号: 特開 2013-116862
 出願年月日: 平成 23 年 12 月 2 日
 国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

内田 浩二 (UCHIDA KOJI)
 名古屋大学・生命農学研究科・教授
 研究者番号: 40203533

(2) 研究分担者

柴田 貴広 (SHIBATA TAKAHIRO)
 名古屋大学・生命農学研究科・助教
 研究者番号: 80447838

(3) 連携研究者

なし