

令和 3 年 6 月 1 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K00568

研究課題名(和文)新規修飾型D-ドーパクロムトートメラゼ関与による傷害肝内ネットワークの解明

研究課題名(英文)Elucidation of network in damaged liver involved by novel modification form of D-dopachrome tautomerase

研究代表者

日吉 峰麗 (Hiyoshi, Mineyoshi)

島根大学・学術研究院医学・看護学系・助教

研究者番号：30363162

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：D-ドーパクロムトートメラゼ(DDT)に対する新規修飾物質の正体を、質量分析を用いて明らかにした。修飾物質の正体は、四塩化炭素の代謝産物と生体内低分子化合物が組み合わされたものであった。動物組織の中から初めて、質量分析を用いて明確に修飾を評価できた。ラット肝臓から抽出したすべてのタンパク質を対象に解析した結果、この物質はDDTおよびそのファミリータンパク質に対し、選択的に修飾していることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

日常的な曝露が懸念されるクロロホルムは、浄水処理過程の塩素処理により生じる有毒物質である。クロロホルムは四塩化炭素と同じ代謝過程を経て、同じ代謝産物を生じることから、DDTおよびそのファミリータンパク質に対し、同じ代謝産物を修飾すると考えられる。学術的には、両タンパク質への選択的な修飾が、毒性影響の中で見出されたことに意義があり、社会的には、両タンパク質への修飾レベルの解析がクロロホルム等の潜在的な曝露の評価に有用となる可能性がある点に意義がある。

研究成果の概要(英文)：The identity of the novel modification compound to D-dopachrome tautomerase (DDT) was clarified using mass spectrometry. It was a condensation compound of carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>) metabolite and intravital low molecular weight compound. For the first time in animal tissue, we could assess the modification using mass spectrometry clearly. Analysis of all proteins extracted from rat liver showed that this substance modified for DDT and its family protein, selectively.

Chloroform, which is of concern for daily exposure, is a toxic substance produced by chlorination in the water purification process. Since chloroform and CCl<sub>4</sub> pass the same metabolic process, same metabolites are produced. Thus, the same metabolite may be supposed to modify for DDT and its family proteins. It is significant that selective modifications to both proteins were found in the toxic effects, thus, analysis of modification level for both proteins may imply the potential exposure of chloroform and the like.

研究分野：生化学

キーワード：D-ドーパクロムトートメラゼ 四塩化炭素 肝傷害 プロテオミクス

## 1. 研究開始当初の背景

D-ドーパクロムトートメラゼ (DDT) は肝臓に豊富に存在するタンパク質であり、さまざまな刺激 (部分肝切除 (2005)、B型肝炎ウイルス (2008)、四塩化炭素 (CCl<sub>4</sub>) (2009)) による肝傷害で増加することが報告されている。

申請者がこれまで携わった CCl<sub>4</sub>による肝傷害で見出された変化をより詳細に解析する過程で、DDT タンパク質の単純な増加と考えていたこれまでの認識は、333 Da の質量増加を示す新規修飾型の増加であると改められることになった。

DDT は近年サイトカインとしての活性に注目が集まっており、様々な情報伝達経路を刺激することが報告されている。またこれまでの報告から、情報伝達の制御においては DDT と細胞内の特定のタンパク質との相互作用も示唆されている。即ち DDT が担う細胞の内と外での役割に、新規の修飾はどのような影響を与えることになるのか? この疑問の解明に着手することが、研究開始当初の背景である。

## 2. 研究の目的

(1) 本研究内で扱う DDT タンパク質への修飾物質は、これまでに報告の無い大きさの修飾であることから、この修飾の正体を明らかにする。

(2) DDT が有するサイトカインとしての機能に対し、この修飾がどのような影響をもたらすか、CCl<sub>4</sub> 傷害ラット肝からの DDT 精製標品を培養細胞に添加した後のタンパク質のリン酸化状態から解き明かしていく。

## 3. 研究の方法

### (1) 修飾型 DDT の精製

CCl<sub>4</sub> 傷害ラット肝からタンパク質を抽出した後、エタノール分画、陰イオン交換カラムクロマトグラフィー、疎水性相互作用カラムクロマトグラフィー、タンパク質を変性させずに分離できる電気泳動である Native-PAGE を組み合わせることで、精製標品の調整を行う。精製標品は修飾分子の解析や培養細胞への刺激に使用する。

### (2) 二次元電気泳動および質量分析

CCl<sub>4</sub> 傷害ラット肝からタンパク質を抽出した後、個々のタンパク質が有する等電点および分子量に基づいた分離手法である二次元電気泳動によってタンパク質を分離する。タンパク質分離後のゲルに含まれる、解析対象のタンパク質スポットを切り出し、タンパク質分解酵素であるトリプシンによる消化を行う。生じたペプチドを、マトリックス支援レーザー脱離イオン化-飛行時間型質量分析装置 (MALDI-TOF/TOF) にて分析する。分析手段の 1 つ目は、生じたペプチドの質量の組み合わせでタンパク質を同定するペプチドマスフィンガープリンティング、2 つ目は、生じたペプチドをさらに無作為に切断し、ペプチドのアミノ酸配列および修飾分子を解析するためのタンデムマス分析を行う。

### (3) ウェスタン・ブロッティング

ラット肝からの抽出タンパク質を、電気泳動 (SDS-PAGE および二次元電気泳動) により分離後、ポリフッ化ビニリデン (PVDF) 膜へと転写し、DDT、生体内低分子化合物 X、タンパク質 Y (後に DDT 以外で明らかになった修飾タンパク質) に対応する特異的な抗体を用いてそれぞれ検出する。低分子化合物 X は、『4. 研究成果』に記述するように新規修飾物質を構成する成分として明らかにできたことから、低分子化合物 X が検出される PVDF 膜上の位置は DDT およびタンパク質 Y が検出される PVDF 膜上の位置と、完全に一致する必要がある。そこで、低分子化合物 X を検出した後、膜上に結合している抗体をストリッピングバッファーではがし、改めて DDT およびタンパク質 Y の検出を行い、膜上の同じ位置で検出されるか確認する。

### (4) 精製 DDT 刺激によるリン酸化の解析

ラット正常肝および傷害肝それぞれから精製した DDT を培養細胞に添加した後、タンパク質のリン酸化レベルを、抗チロシンリン酸化抗体を用いたウェスタン・ブロッティングから評価を行う。

## 4. 研究成果

### (1) 高純度 DDT の精製

『3. 研究の方法』に示した様々な分画操作を行い、DDT が含まれる画分をウェスタン・ブロッティングにより確認し、次の精製手段へとつなげた。最終的に高純度の DDT 精製標品を獲得できた。

(2) 精製 DDT を用いた、新規修飾物質の質量分析による評価

$\text{CCl}_4$  によるラット傷害肝からの DDT 精製標品を、二次元電気泳動により修飾型と非修飾型へと完全に分離し、修飾型 DDT をタンパク質分解酵素であるトリプシンによって消化した。その後、修飾物質が結合したトリプシン消化ペプチドのタンデムマス分析を実施した。ペプチド結合や修飾物質に対する無作為な切断により生じたさまざまな断片の質量情報から、修飾物質は  $\text{CCl}_4$  の代謝産物と生体内低分子化合物 X が縮合したものである可能性を見いだした。

(3) 精製 DDT を用いた、低分子化合物 X に対するウエスタン・ブロッティング

ウエスタン・ブロッティングによる解析では、標的に対する特異的な抗体が、解析サンプルに含まれる多種多様な成分への非特異的な反応のために、解釈が複雑化することがある。そこで、精製 DDT を二次元電気泳動で修飾型と非修飾型の DDT へと完全に分離し、他のタンパク質が含まれないことから非特異的な反応による複雑な解釈を生じない、明瞭な評価条件を獲得した。この条件によるウエスタン・ブロッティングから、低分子化合物 X は修飾型のみから検出された。

(4) ラット肝抽出タンパク質を用いた、低分子化合物 X に対するウエスタン・ブロッティング

$\text{CCl}_4$  によるラット傷害肝から抽出したタンパク質をすべて二次元電気泳動に展開し、低分子化合物 X に対するウエスタン・ブロッティングを実施した。この結果、多種多様なタンパク質の中から、DDT を含めた 2 つのシグナルだけが転写後の PVDF 膜から検出された。2 つ目のシグナルが DDT に由来するものか確認するため、ストリッピングバッファーで抗体をはがした後、DDT に対するウエスタン・ブロッティングを実施したところ、2 つ目のシグナルは DDT に由来するものではないことが示された。この 2 つ目のシグナルの原因となったタンパク質を、タンパク質 Y と呼ぶ。

(5) タンパク質 Y の質量分析

$\text{CCl}_4$  によるラット傷害肝から抽出したタンパク質をすべて二次元電気泳動に展開した後、タンパク質 Y に対応するゲル部分を切り出し、トリプシンによる消化を行った。タンパク質 Y の存在量が少ないことから、確実な同定には至らなかったが、情報量の乏しいタンデムマス分析の結果を読み解くことで、新規修飾物質が結合した、DDT のファミリータンパク質である可能性を見いだした。

(6) DDT のファミリータンパク質に対するウエスタン・ブロッティング

$\text{CCl}_4$  によるラット傷害肝から抽出したタンパク質の中には DDT のファミリータンパク質が少ないことが、検出を困難にしているものと推察されたことから、ファミリータンパク質の部分精製を実施した後、多く含まれる画分を二次元電気泳動に展開した。その後、低分子化合物 X に対するウエスタン・ブロッティングを行い、新規修飾型（低分子化合物 X を含む）タンパク質 Y の検出位置を確認後、ストリッピングバッファーで抗体をはがした。改めてファミリータンパク質に対するウエスタン・ブロッティングを行ったところ、タンパク質 Y とファミリータンパク質の検出において PVDF 膜上の位置は完全に一致した。この結果は、タンパク質 Y が DDT のファミリータンパク質である可能性を強く裏付けている。

新規修飾物質が、多種多様なタンパク質の中から DDT とそのファミリータンパク質に対してのみ選択的に修飾する毒性学的な意味を明らかにすることが今後の課題である。

(7) 精製 DDT 刺激によるリン酸化の解析

条件設定に苦慮し、明瞭な解析結果の獲得に至らなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hara N, Osago H, Hiyoshi M, Kobayashi-Miura M, Tsuchiya M.	4. 巻 14
2. 論文標題 Quantitative analysis of the effects of nicotinamide phosphoribosyltransferase induction on the rates of NAD+ synthesis and breakdown in mammalian cells using stable isotope-labeling combined with mass spectrometry.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0214000
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0214000	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 Osago H, Kobayashi-Miura M, Hamasaki Y, Hara N, Hiyoshi M, Tsuchiya M.	4. 巻 548
2. 論文標題 Complete solubilization of cartilage using the heat-stable protease thermolysin for comprehensive GAG analysis.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Anal Biochem.	6. 最初と最後の頁 115-118
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ab.2018.02.028	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 -

〔学会発表〕 計17件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 三浦美樹子、長子晴美、宮地葵、日吉峰麗、原伸正、土屋美加子
2. 発表標題 ラット関節内の凸側と凹側の関節軟骨のグリコサミノグリカン（GAG）量の加齢に伴う減少
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会・第98回日本生理学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 三浦美樹子、長子晴美、日吉峰麗、原伸正、土屋美加子
2. 発表標題 ラット硝子軟骨の各関節部位によるコラーゲンとグリコサミノグリカン量の比較と加齢に伴う変化
3. 学会等名 第52回日本結合組織学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 日吉 峰麗 , 長子 晴美 , 三浦 美樹子 , 原 伸正 , 土屋 美加子
2. 発表標題 四塩化炭素障害ラット肝内で検出されたD - ドーパクロムトートメララーゼ上の修飾
3. 学会等名 第45回日本医用マスメクトル学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 長子晴美・河野通快・三浦美樹子・原伸正・日吉峰麗・内尾祐司・土屋美加子
2. 発表標題 肥厚黄色靱帯の局所的なコラーゲンとグリコサミノグリカン(GAG)量の変化
3. 学会等名 第93回日本生化学大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 原伸正・長子晴美・日吉峰麗・三浦美樹子・土屋美加子
2. 発表標題 Involvement of SARM1 in NAD+ breakdown in mammalian cells
3. 学会等名 第93回日本生化学大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 日吉峰麗・長子晴美・三浦美樹子
2. 発表標題 肝癌細胞株への新規修飾型D- ドーパクロムトートメララーゼ刺激によるリン酸化プロテオミクスの試み
3. 学会等名 第44回日本医用マスメクトル学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 長子晴美・河野通快・三浦美樹子・原伸正・日吉峰麗・内尾祐司・土屋美加子
2. 発表標題 黄色靭帯肥厚によるタンパク組成変化
3. 学会等名 第44回日本医用マスメクトル学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 原伸正・長子晴美・日吉峰麗・三浦美樹子・土屋美加子
2. 発表標題 Quantitative analysis of NAD+ metabolic flow in primary cultured mammalian cells. 哺乳動物初代培養細胞におけるNAD+代謝の解析
3. 学会等名 第92回日本生化学大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三浦美樹子・長子晴美・高野育子・日吉峰麗・原伸正・土屋美加子
2. 発表標題 The comparison of matrix component between female and male articular cartilage in rat femur of the knee joint. ラット雌雄間における膝関節大腿骨の関節軟骨のマトリックス成分の比較
3. 学会等名 第92回日本生化学大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 長子晴美・三浦美樹子・河野道快・原伸正・日吉峰麗・土屋美加子
2. 発表標題 Crosslinks of collagen and elastin in rat tissues ラット組織におけるコラーゲン、エラスチンのクロスリンク組成の比較
3. 学会等名 第92回日本生化学大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 原 伸正, 長子 晴美, 日吉 峰麗, 三浦 美樹子, 土屋 美加子
2. 発表標題 NAD+代謝におけるSIRT1の関与について
3. 学会等名 第91回日本生化学大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 三浦 美樹子, 長子 晴美, 高野 育子, 日吉 峰麗, 原 伸正, 土屋 美加子
2. 発表標題 新生仔から成獣におけるラット膝関節の大腿骨および脛骨関節軟骨のマトリックス構成成分の比較
3. 学会等名 第91回日本生化学大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 長子 晴美, 三浦 美樹子, 原 伸正, 日吉 峰麗, 土屋 美加子
2. 発表標題 関節軟骨におけるグリコサミノグリカン組成
3. 学会等名 第91回日本生化学大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 原 伸正, 長子 晴美, 日吉 峰麗, 三浦 美樹子, 土屋 美加子
2. 発表標題 NAD+代謝におけるpoly(ADP-ribose)polymerase-2の関与について
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 タンパク質アセチル化への細胞内NAD+濃度の影響
2. 発表標題 中村 健志、原 伸正、長子 晴美、日吉 峰麗、三浦 美樹子、土屋 美加子
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 ラット関節軟骨組織の成熟過程におけるコラーゲンクロスリンクとGAG組成の変化
2. 発表標題 長子 晴美、三浦 美樹子、濱崎 由文、高野 育子、日吉 峰麗、原 伸正、土屋 美加子
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 ラット関節軟骨組織の成熟過程におけるGAGとコラーゲンの定量的解析
2. 発表標題 三浦 美樹子、長子 晴美、日吉 峰麗、濱崎 由文、高野 育子、原 伸正、土屋 美加子
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017)
4. 発表年 2017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
---------	---------