

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2009～2013

課題番号：21248016

研究課題名(和文) 脂溶性リガンド感知機構に関する基盤的研究

研究課題名(英文) Sensor mechanism of lipophilic ligands

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) 35,900,000円、(間接経費) 10,770,000円

研究成果の概要(和文)：イソチオシアネート化合物は、イソチオシアネート基(N=C=S)の炭素原子の電子不足からチオール化合物による抱合反応を受けやすく、刺激がマスクされた抱合体を形成する。しかし、抱合体は不安定であり、別のチオール化合物と交換反応が進行する(トランスチオカルバモイル化)。クリックケミストリーを用い、6-HITCのアルキン誘導体による細胞タンパク質のトランスチオカルバモイル化を調べたところ、複数のタンパク質に結合することが分かり、さらに標的タンパク質としてHsp90を同定した。さらに熱ショック応答につながる翻訳後修飾であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Electrophiles in food have been implicated in human health and disease. They react with proteins and generate specific adduct structures that could function as ligands. Isothiocyanates, membrane-permeable electrophiles that form adducts with thiols, have been suggested to have important medical benefits. To gain a chemical insight into the cellular response induced by isothiocyanates, we designed a novel probe, combining an isothiocyanate-reactive group and an alkyne functionality, and revealed that the thiocarbamylation of proteins occurred in the cells upon exposure to 6-HITC. The target of thiocarbamylation included heat shock protein 90b (Hsp90b), a chaperone ATPase of the Hsp90 family implicated in protein maturation and targeting. Further study on the thiocarbamylation of Hsp90b suggested that the formation of 6-HITC-Hsp90b conjugate might cause activation of heat shock factor-1, rapidly signaling a potential heat shock response.

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：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

親電子化合物は、文字通り電子不足な官能基を持つ化合物の総称であり、電子が豊富な官能基をもつ求核化合物と反応し付加体を形成する有機化学ではおなじみの化合物である。かなり縁遠い話に聞こえるかもしれないが、実は私たちを含めたほとんどの生物の生存に関わる極めて重要な物質である。親電子化合物には、酸化ストレスや炎症に際して生成される内因性のものだけでなく、環境や食品成分、あるいは様々な代謝産物の多くが含まれ、求核性化合物である DNA やタンパク質に対して反応するため、私たちの健康や寿命に大きな影響を及ぼしている。最も一般的なものでは、ブドウ糖も弱いながら親電子性をもち、タンパク質との反応は高血糖における糖尿病合併症との密接な関連性が明らかにされている。生物は親電子化合物を解毒・排出するなどして対処する一方、ある種の親電子化合物は健康の維持増進に役に立つ機能性分子であることが明らかになってきた。親電子化合物によるタンパク質の修飾は、他の翻訳後修飾のようなタンパク質の活性制御を伴うが、最近では修飾タンパク質がリガンドとなり、炎症などに関連した受容体シグナリングを活性化することも明らかになってきた。

2. 研究の目的

本研究では、親電子化合物としてアブラナ科植物に含まれる機能性因子イソチオシアネート化合物に着目した。イソチオシアネートによる細胞防御機構活性化の細胞内分子メカニズムを解明するにあたり、イソチオシアネートの標的タンパク質の探索を行うこととした。標的タンパク質を探索するうえで様々な方法が考えられた。例えば、ビオチン化したイソチオシアネートを細胞に投与後、細胞を回収し、ビオチン-アビジンアフィニティーを利用して標的タンパク質を精製する方法、イソチオシアネートカラムを作成後、細胞のライセートを流し、標的タンパク質を精製する方法などが考えられた。しかしこれらの方法は実験環境や使用できる試薬などにもよるが、実際のイソチオシアネートの構造や生細胞の状態などを考慮すると非特異的に捕まってくるものもありうると思われる。今回、ワサビに含まれるイソチオシアネートである 6-HITC のメチル側鎖にアルキンの付加したプローブ (Al-6-HITC) を用い、クリックケミストリー法 (図 1) による生細胞内の標的タンパク質の探索を試みた。アルキンはほぼ無極性で小さいことから生体内に導入しても生体分子を大きく変化させることがないと考えられている。実際に当研究室でも、6-HITC、Al-6-HITC とともに抗酸化酵素 HO-1 の発現を同程度誘導することが確認されている。クリックケミストリー法による標的タンパク質探索の利点はより "native" に近いイソチオシアネートと生細胞の状態を

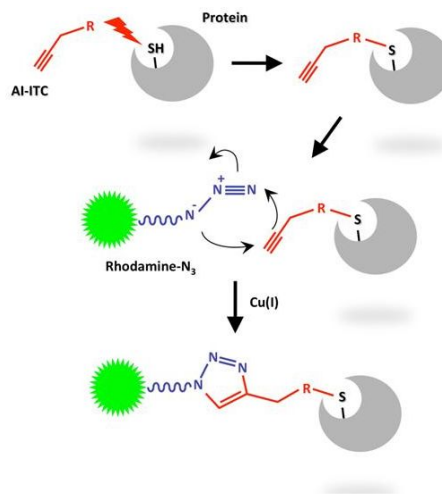


図 1. クリックケミストリー

保てること、また非常に操作が簡便で短時間で済むことがあげられる。本研究では、クリックケミストリー法を用いて 6-HITC の標的タンパク質の探索を行い、その標的タンパク質の下流シグナルへの影響、細胞内分子メカニズムの解明を行った。

3. 研究の方法

(1) クリックケミストリー: クリックケミストリーによる標的タンパク質同定

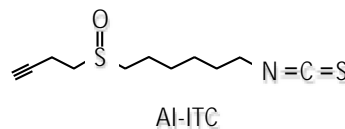


図 2. 6-HITC アナログ

には図 2 にあるアルキニル化プローブを用いた。Al-6-HITC を細胞に投与後、細胞を RIPA buffer で回収し、銅、アスコルビン酸、TBTA ([3+2]環化反応促進剤) 存在下でクリック反応により蛍光物質ローダミン-アジドを付加させる。その後電気泳動により、タンパク質を分離し、ゲルを固定後、Typhoon scanner により蛍光検出を行い、CBB 染色によって可視化を行う。蛍光のバンドで検出できたものをゲルから切り出し、酵素消化後、MALDI-TOF MS によって得られた MS、MS/MS データを Mascot データベース検索をし、タンパク質同定を行った。

(2) プルダウン: Al-6-HITC を細胞に投与後、細胞を RIPA buffer で回収後、アビジンビーズとプレインキュベーションすることで非特異的に結合するタンパク質を除き、その上清をクリック反応にてビオチンを付加し、アビジンビーズによるプルダウン後のサンプルをウェスタンブロットにより抗体特異的な検出を行った。

4. 研究成果

(1) 細胞内標的タンパク質の同定

モデルタンパク質 (グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ) を用いたクリック反応による、Al-プローブ特異的な蛍光バンド検出を確認できたことから、細胞内標的タンパ

ク質の探索を試みた。未分化の状態のヒト腸管上皮モデル細胞 Caco-2 に AI-6-HITC を投与し、細胞を RIPA buffer で回収後、クリック反応にてローダミンを付加し、蛍光検出を行った。その結果、AI-6-HITC を投与したレーンのみローダミンの蛍光で検出できるバンドがいくつか確認された(図3)。蛍光検出後のゲルを CBB 染色法によって可視化し、ローダミンの蛍光で検出されたバンドを切り出し、トリプシンによる酵素消化後 MALDI-TOF MS によるタンパク質同定を行った。その結果、解糖系(GAPDH、ピルビン酸キナーゼ)、細胞骨格系(ミオシン、チューブリン)、シャペロンタンパク質(HSP90、HSP70、HSP60)などが同定された。

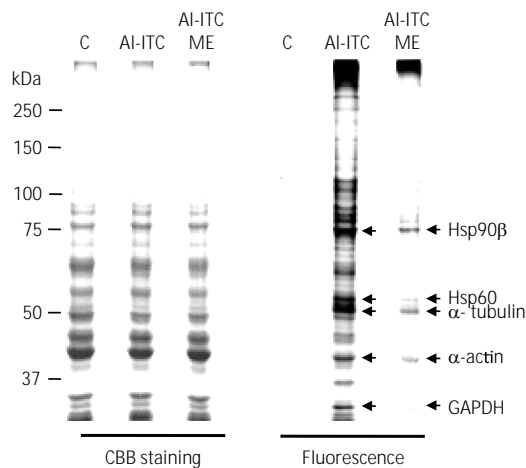


図3 .6-HITC 標的タンパク質の同定

### (2) Hsp90βの同定

クリックケミストリーを用いた細胞内標的タンパク質の1次スクリーニングの結果、6-HITC の主な標的タンパク質として Hsp90 が同定された。そこで、クリック反応によるビオチン付加後、アビジンによるプルダウンを行うことで細胞内標的タンパク質2次スクリーニングを試みた。その結果、AI-6-HITC 投与でタンパク質の発現は変化しないことが確認され、アビジンビーズによるプルダウン後のサンプルにおいて Hsp90βのみが検出された。細胞内標的タンパク質1次スクリーニングでは Hsp90α、Hsp90βの両方が同定されたが、今回の2次スクリーニングの結果、MS-ITC の標的はアミノ酸の相同性が 85% ある Hsp90α と Hsp90βのうち、Hsp90βを特異的に標的とすることが示唆された。

### (3) 熱ショック転写因子 HSF1 との相互作用

リガンドとして、HaloLink Resin (Halo Tag リガンドでコートしたセファロースレジン) を、N 末端に Halo Tag の付いた Hsp90β のベクターを Caco-2 細胞に一過性に遺伝子導入したのによって Hsp90β と HSF1 の相互作用を検討した(図4)。Caco-2 細胞に

Halo-Hsp90β ベクター、Halo タンパク質のみを発現する空ベクターをそれぞれ一過的に遺伝子導入し、細胞を回収し Halo Tag 付き Hsp90β の発現を確認した。免疫プロットにより Halo 抗体での検出を試みたところ、約 120kDa 付近に目的のタンパク質が検出された。同サンプルで Hsp90β 抗体での検出を試みたところ、90kDa (内因性)、120kDa (外因性; 遺伝子導入による) 付近に目的のタンパク質が検出された。これらから Halo Tag 付き Hsp90β のタンパク質が正常に発現していることを確認した。続いて遺伝子導入し 48h 後の Caco-2 細胞に 6-HITC を投与し、細胞回収後 HaloLink Resin とインキュベート後、サンプルバッファーにて溶出を行い Western blot 法によって HSF1 の検出を行った。Halo Tag プルダウンに供したサンプル間で HSF1 が同程度発現していることを確認した。また HSP90 はホモ二量体で存在するためプルダウン後の Hsp90β の検出を行い、同程度の Hsp90β が検出できたことからサンプル間でのプルダウンが等しく行われたと考えた。このサンプルにおいて、コントロールに比べ 6-HITC 投与をしたレーンの HSF1 の検出が減少したことから、6-HITC により Hsp90β と HSF1 複合体の相互作用が減少していることが示唆された。

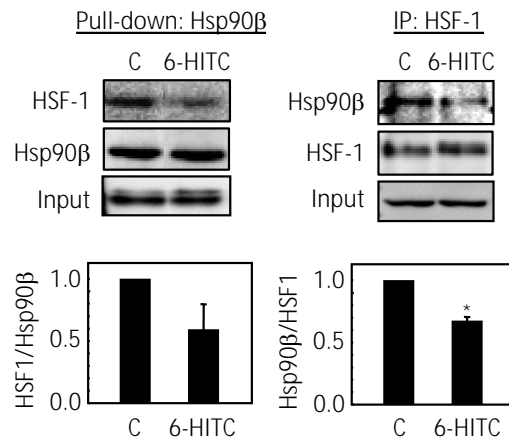


図4 .6-HITC による HSF-1 の活性化

### (4) 6-HITC による HSF1 活性化

これまでの検討により、6-HITC により HSF1 が活性化されていることが予想された。実際、HSP90 との解離 HSF1 ホモ三量体化 核移行 Ser 残基のリン酸化 HSE をもつ特定の遺伝子の発現調節(主に HSP70 の発現誘導)などが観察された。こうした実験結果から、最終的な分子機構を予想した(図5)。

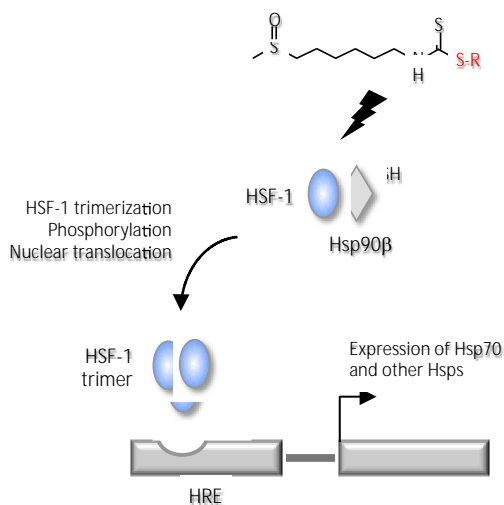


図5 .6-HITC による Hsp90 のチオカルバミール化を介した HSF-1 の制御機構

#### 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, 9943-19957. 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) D<sup>12</sup>-Prostaglandin J<sub>2</sub> 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32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・自然炎症に關与する機能性成分. 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：J<sub>2</sub>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

なし

##### (3) 連携研究者

なし