

令和 6 年 5 月 13 日現在

機関番号：34406

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19544

研究課題名（和文）新技術の融合によるDAMPs・ヒストンの細胞内での分解に挑戦する

研究課題名（英文）Challenging the intracellular degradation of histones through the fusion of new technologies.

研究代表者

川原 幸一（Kawahara, Ko-ichi）

大阪工業大学・工学部・教授

研究者番号：10381170

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：敗血症の治療には、Damage-Associated Molecular Patterns（DAMPs）の機能抑制が必須である。代表的な分子・ヒストンは細胞外では、炎症性サイトカインとして振る舞う。これから免れるには、DAMPsの放出を抑制することである。よって、フェノールポリマー法とユビキチンリガーゼ・シノビオリンを用いてDAMPsの細胞質内での分解に挑戦した。ヒストンとシノビオリンと両方結合可能なキメラフェノールポリマーを見出した。なお、一部のヒストンはシノビオリンと直接結合し、ユビキチン化の可能性を示した。したがって、細胞傷害時のヒストンの封じ込めの可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

敗血症は世界のどこかで3秒に1人が亡くなる疾患である。敗血症の定義改定により、DAMPsが注目された。間接的な細胞外での制御は困難であることが示唆され、本研究の目的「細胞内での直接的なDAMPsの封じ込めの開発・確立」は敗血症の死亡率を下げることとなり、非常に意義がある。本申請では、それぞれの分野が一義的に追求してきた課題、すなわち、医学者は敗血症の新規治療法の開発、化学者は化学合成（フェノールポリマー技術）、獣医・生物学者は細胞内シグナル伝達（ユビキチンリガーゼ・シノビオリン）の解明の融合であり、非常に意義がある。

研究成果の概要（英文）：Treatment of sepsis requires the essential inhibition of Damage-Associated Molecular Patterns (DAMPs). Representative molecules such as histones behave as inflammatory cytokines in the extracellular environment. To avoid this, it is necessary to suppress the release of DAMPs. Therefore, we attempted to degrade DAMPs intracellularly using the phenol polymer method and the ubiquitin ligase, Synoviolin. We identified a chimeric phenol polymer capable of binding to both histones and Synoviolin. Additionally, some histones were found to directly bind to Synoviolin, indicating the possibility of ubiquitination. Thus, the potential for containment of histones during cellular damage was suggested.

研究分野：救急医学

キーワード：敗血症 DAMPs ユビキチンリガーゼ シノビオリン フェノールポリマー PROTAC

### 1. 研究開始当初の背景

臓器傷害、すなわち細胞傷害による Damage-Associated Molecular Patterns (DAMPs、ダンプス) の漏出は急性、慢性に関係なく病態の亢進を引き起こす。代表的な分子にヒストン、High mobility group box (HMGB)-1、ヌクレオフォスミン (NPM) 1がある。全て核内タンパク質であり、細胞内で最も多いタンパク質群である。細胞外では、炎症性サイトカインとして振る舞う (Thromb J. 2019, DAMPs and Alarmins 国際学会 (2019))。現在、DAMPs の制御には、受容体のアンタゴニストや分子標的薬が用いられているが、治療の予後に影響しなかった。よって、DAMPs を細胞外に移動する前に直接的かつ細胞内での制御が必須と示唆された。

### 2. 研究の目的

敗血症の治療の進展には、細胞の活性化・細胞死に伴い、細胞の核から細胞質へ移動し、その後細胞外へ放出する分子の機能抑制が必須である。これらを DAMPs という。具体的な分子にヒストン H2A、H2B、H3、H4 などがある。これらは細胞外では、炎症性サイトカイン産生能 (H2A、H2B)、血栓誘導や生体を致死 (H3、H4) に向かわせる。生体致死から免れるためには、これら DAMPs が細胞質内に留まっているうちに分解し、細胞外への放出を抑制することが最も有効な方法である。しかしながら、細胞質内での DAMPs の分解は、未だ試みられていない。

よって、本研究の目的は、新規の方法、プロテインノックダウン法 (proteolysis targeting chimera, PROTAC) と改良型分子インプリンティング、すなわちフェノールポリマー法の両方を用いて DAMPs・ヒストン分子の細胞質内での分解に挑戦することである (図 1)。

### 3. 研究の方法

- 1) 大腸菌発現系を用いたシノビオリンの単離 (参考 | EMBO J 2018)

BL21 株に pGEX6p に挿入したシノビオリンをトランスフェクション後、クローンの発現を確認した。次に、IPTG を用いて、GST シノビオリンを発現させ、Turbo3C (ナカライテスク社) にてシノビオリンのみを回収した。回収後は、10% SDS-PAGE とウェスタンブロットリング法 (1 次抗体に抗ヒシノビオリンウサギ抗体) にてシノビオリンの発現を確認した。

- 2) ヒストン特異的なフェノールポリマーの単離

BrCN 活性化 Sepharose (Cytiva 社) に Histones (Sigma 社) を固定化し、フェノールポリマーを添加した。添加後は、0.02M KCl-HCl buffer (pH2) にて溶出した。pH7 に溶出液を調整した。

- 3) ファーウェスタン法

タンパク質の相互作用を検証するために、ファーウェスタン法を用いた。プローブには、ヒストン H2A、H2B、H3、H4、そしてシノビオリンをそれぞれ用いた。

- 4) ユビキチン化アッセイ法

ヒストンを基質として、シノビオリンがユビキチン化を誘導するかを確認した。具体的には、シノビオリン、HA-ユビキチン、ATP を添加し、37°C、2 時間静置。その後、15% SDS-PAGE にて泳動後、ヒストン抗体または HA 抗体を用いてヒストンがユビキチン化されているかを検証した。

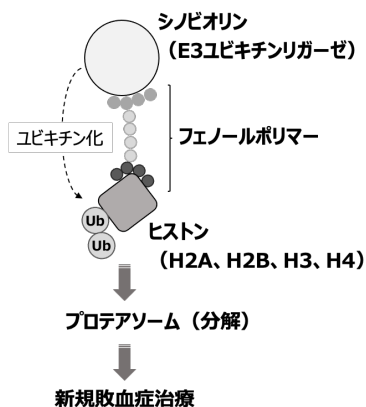
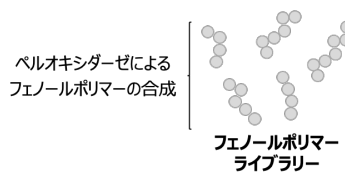


図 1. 目的 | PROTACとフェノールポリマー技術の融合によりDAMPs分子の分解を行う  
標的のDAMPsの分解にはユビキチンリガーゼのシノビオリンとDAMPsとのリガンドが必要。これらをフェノールポリマー技術を用いて作製する。その後、機能を検証する。

#### A. フェノールポリマー技術



#### B. アフィニティークロマトグラフィー

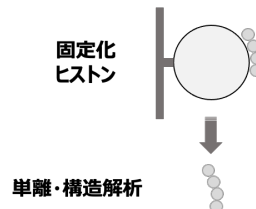


図 2. フェノールポリマー技術の概要

A. ペルオキシダーゼとフェノールモノマーによりフェノールポリマーの合成。B. アフィニティークロマトグラフィーによりヒストンのリガンドを単離する。

#### 4. 研究成果

##### ■フェノールポリマーによるライブラリーからのシノビオリンとヒストン群のリガンド探索

- 1) シノビオリンの単離(参考 | EMBO J 2018)  
大腸菌の発現系 (GST タグ)を用いて単離・分離を行った。
- 2) フェノールポリマー化合物の同定(図 2)  
フェノール類をペルオキシダーゼに反応(フェノールポリマーライブラリーの作製)させた(図 2 A)。次に、ヒストンタンパク質を BrCN 活性化 Sepharose (Cytiva 社)カラムに固定した。その後、フェノールポリマーライブラリーを加え、特異的なフェノールポリマーを単離した(図 2 B)。

##### ■ファーウェスタン法によるヒストンとシノビオリンとの結合の検証

- 1) シノビオリンをプローブとして、ヒストン(H2A、H2B、H3、H4、全て NEB 社)との結合を検証した。この時、①シノビオリンプローブのみ、②シノビオリンプローブとフェノールポリマーライブラリー、③シノビオリンプローブとヒストン特異的フェノールポリマーの 3 種類の実験を行った。その結果、①では、シノビオリンとヒストンすべてに結合が見られた。①と③との結合力を Image J にて定量を行うと、H2A、H3 ともに有意な差を持って抑制されていた。すなわち、ヒストン特異的なポリフェノールポリマーの存在が示唆された。②、③では、H4 のみが消失した。よって、シノビオリンとヒストンとの直接の結合が示唆された。
- 2) ヒストンをプローブとして、シノビオリンとの結合を検証した。この時、①ヒストンプローブのみ、②ヒストンプローブとフェノールポリマーライブラリー、③ヒストンプローブとヒストン特異的フェノールポリマーの 3 種類の実験を行った。その結果、①では、ヒストン全てとシノビオリンに結合が見られた。しかしながら、①と②、③とのそれぞれの比較において、統計的な有意な差は認められなかった。

##### ■シノビオリンによるヒストンタンパク質のユビキチン化の検証

ユビキチンアッセイの結果、ヒストン H2A のみがシノビオリンにより、ユビキチン化された。よってサイトカインの発現を誘導するヒストン H2A の封じ込めの可能性が示唆された。ヒストン H2B、H3、H4 は、シノビオリンによりユビキチン化されなかったためキメラ化合物を作製してシノビオリンのユビキチン化の可能性を示す必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Kasamo Yuki, Kikuchi Kiyoshi, Yamakuchi Munekazu, Otsuka Shotaro, Takada Seiya, Kambe Yuki, Ito Takashi, Kawahara Ko-ichi, Arita Kazunori, Yoshimoto Koji, Maruyama Ikuro	4. 巻 22
2. 論文標題 1,5-Anhydro-D-fructose Protects against Rotenone-Induced Neuronal Damage In Vitro through Mitochondrial Biogenesis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 9941 ~ 9941
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22189941	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 Kamada Hiroki, Emura Kousuke, Yamamoto Rikuto, Kawahara Koichi, Uto Sadahito, Minami Toshiaki, Ito Seiji, Matsumoto Ken-ichi, Okuda-Ashitaka Emiko	4. 巻 13
2. 論文標題 Hypersensitivity of myelinated A-fibers via toll-like receptor 5 promotes mechanical allodynia in tenascin-X-deficient mice associated with Ehlers-Danlos syndrome	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-023-45638-7	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 Hasan MD Nazmul, Rahman Md. Mahfuzur, Husna Al Asmaul, Arif Mohammad, Jasineviciute Indre, Kato Daiki, Nakagawa Takayuki, Miura Naoki	4. 巻 9
2. 論文標題 Upregulation and functional roles of miR-450b in canine oral melanoma	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Non-coding RNA Research	6. 最初と最後の頁 376 ~ 387
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ncrna.2024.01.017	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 該当する
1. 著者名 Hasan MD Nazmul, Rahman MD Mahfuzur, Husna Al Asmaul, Kato Daiki, Nakagawa Takayuki, Arif Mohammad, Miura Naoki	4. 巻 44
2. 論文標題 Hypoxia-related Y RNA fragments as a novel potential biomarker for distinguishing metastatic oral melanoma from non-metastatic oral melanoma in dogs	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Veterinary Quarterly	6. 最初と最後の頁 1 ~ 8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/01652176.2023.2300943	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 該当する

1. 著者名 Hasan MD Nazmul, Rahman Md. Mahfuzur, Husna Al Asmaul, Arif Mohammad, Iwanaga Tomoko, Tsukiyama Kohara Kyoko, Jasineviciute Indre, Kato Daiki, Nakagawa Takayuki, Miura Naoki	4. 巻 22
2. 論文標題 Elevated expression of <scp>miR</scp> 301a and its functional roles in canine oral melanoma	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Veterinary and Comparative Oncology	6. 最初と最後の頁 78 ~ 88
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/vco.12954	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 該当する

1. 著者名 YAMADA TOMONOBU, KAWAGUCHI HIROAKI, MATSUOKA AKI, AKIOKA KOHEI, MIURA NAOKI, IZUMI HIROYUKI, TANIMOTO AKIHIDE	4. 巻 38
2. 論文標題 Development of a Microminipig Model of Atherosclerosis for the Evaluation of a HMGR Inhibitor	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 In Vivo	6. 最初と最後の頁 98 ~ 106
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/invivo.13415	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 該当する

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 朝田成重, 山下侑子, 川原幸一, 西脇雅人
2. 発表標題 一過性の天然蜂蜜Xの摂取が動脈スティフネスに与える影響
3. 学会等名 第76回日本体力医学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大谷悠人, 上野光理, 横井春奈, 吉永一浩, 室屋賢康, 丸山征郎, 川原幸一
2. 発表標題 アスコピロンP : ERストレス時のCHOPの発現を抑制する
3. 学会等名 第96回日本生化学会
4. 発表年 2023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
研究分担者	三浦 直樹  (Miura Naoki)  (80508036)	鹿児島大学・農水産獣医学域獣医学系・教授   (17701)	
研究分担者	外波 弘之  (Tonami Hiroyuki)  (90420405)	大阪工業大学・工学部・准教授   (34406)	
研究分担者	伊藤 隆史  (Ito Takashi)  (20381171)	鹿児島大学・医歯学総合研究科・特任准教授   (17701)	
研究分担者	八木下 尚子  (Yagishita Naoko)  (40367389)	聖マリアンナ医科大学・医学研究科・講師   (32713)	
研究分担者	藤田 英俊  (Fujita Hidetoshi)  (90571802)	大阪工業大学・工学部・准教授   (34406)	

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
---------	---------