

研究報告書

「タンパク質分子上に形成されるアダクトーム解析法の確立」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成25年10月～平成29年3月

研究者: 柴田 貴広

1. 研究のねらい

生体内では、酸化ストレスや炎症反応などにより様々な代謝産物が生成されるが、その中には親電子性を有し、生体成分と高い反応性を示す活性種が存在している。例えば、アラキドン酸やリノール酸などの多価不飽和脂肪酸は、酵素的あるいは非酵素的な変換反応を経て、様々な酸化脂肪酸へと変換される。多くの酸化脂肪酸は、その高い親電子性ゆえに、タンパク質中の求核性アミノ酸残基に対して高い反応性を有する。このような代謝産物により、タンパク質分子上には様々な化学構造を有した修飾付加体が形成される。このような点から、タンパク質の修飾構造の種類や量比は、生体内における疾患状態を表しているものと予想される。これまでの研究では、それぞれ個別の修飾付加体に注目した研究がなされてきたが、実際の生体内においては、複雑多岐にわたる修飾付加体が形成しているものと想定されるため、その全体を解析する必要があると考えられる。このような背景から、本研究課題では酸化脂質を中心とした代謝産物による複雑なタンパク質修飾付加体を総体として理解する“アダクトーム”解析法を確立することを目的としている。さらにこの方法を利用し、疾患特異的マーカーや疾患発症に関与するタンパク質修飾の同定を行い、疾患の予防や治療、創薬につながる基盤的な研究を展開することを目指す。

本研究課題では、これまでに免疫化学的方法や化学試薬を用いた検出方法が主なものであった酸化脂質修飾タンパク質に対して、質量分析計を利用することにより、複雑多岐にわたるタンパク質修飾付加体の総体“アダクトーム”を、網羅的に解析する手法の確立を目指す。さらに、この手法を用いて、様々な疾患モデル動物あるいはヒト患者サンプルなどを用いて、ディファレンシャル解析を行い、疾患特異的なタンパク質修飾付加体を明らかにし、疾患バイオマーカーの創出を目指した研究を展開する。

2. 研究成果

(1) 概要

ヒト血清アルブミンをモデルタンパク質として、アダクトーム解析のためのタンパク質サンプル調製方法、および質量分析計による測定条件を決定し、アダクトーム解析法を確立した。また、各種酸化脂肪酸により形成される修飾付加体を解析し、既知の付加体(ヒスチジン修飾体 30 種類、リジン修飾体 62 種類)に関するアダクトームマップを作成した。これらを基に、*in vitro* で酸化させたヒト低密度リポタンパク質(LDL)のアダクトーム解析を行い、既知付加体のアダクトームマップとの比較を行った。その結果、酸化 LDL において生成される修飾付加体として、6 種類のヒスチジン修飾付加体および 7 種類のリジン修飾付加を同定した。しかしながら、最も主要なリジン修飾付加体は、既知の付加体とは一致せず、その化学構造は未知であった。そこで、各種機器分析を行い、この修飾付加体を *N*-(8-carboxyoctanyl)-Lys (COL) と

同定し、その生成経路を明らかにした。次に、安定同位体希釈法による COL 付加体の高感度検出・定量法を確立し、高脂血症モデルマウスである apoE 欠損マウスの血清サンプルにおける定量解析を行った。その結果、コントロールマウスと比較して、apoE 欠損マウスにおいて COL 付加体が有意に増加することを明らかにした。さらに、ヒト高脂血症患者血清サンプルにおける COL 付加体の定量を行った結果、健常者と比較して血清中の COL 付加体の有意な増加が認められた。この COL 付加体濃度は、血中の LDL 値とも正の相関を示しており、高脂血症におけるよいマーカーとなる可能性が示された。

また同じく高脂血症患者血清タンパク質の解析から、ヒト血清アルブミンにおいてホモシステインなどの低分子チオール化合物による S-チオール化が顕著に起こっていることがわかった。さらに、S-ホモシステイン化された血清アルブミンが、マクロファージ細胞における炎症誘導活性を示すことも明らかになった。以上の結果から、血清アルブミンのホモシステイン化修飾は高脂血症における重要なタンパク質化学修飾である可能性が示唆された。

(2) 詳細

研究テーマ A「モデルタンパク質を用いたアダクトーム解析方法の確立」

ヒト血清アルブミンをモデルタンパク質として、アダクトーム解析方法の確立を行った。アダクトームの中には、比較的不安定な化学構造を有するものも多いため、水素化ホウ素ナトリウム処理により付加体を安定化させる方法も合わせて検討した。また、通常、塩酸雰囲気下で加熱し加水分解をするが、酸条件下では不安定な付加体もあったため、アルカリ加水分解による検討も合わせて行い、サンプル調製方法を確立した。さらに、LC-ESI-MS/MS を用いて、リジン残基およびヒスチジン残基に対する付加体にそれぞれ特徴的なフラグメントパターンを利用した網羅的検出(SRM 解析)のための条件設定も完了し、この2種類のアミノ酸残基に対するアダクトーム解析方法を確立した。

研究テーマ B「各種酸化脂肪酸によるアダクトームマップの作成」

acrolein や 2-nonenal などの 2-alkenal 類や 4-hydroxy-2-nonenal などの酸化脂肪酸とヒト血清アルブミンとを in vitro で反応させた修飾タンパク質について、水素化ホウ素ナトリウム処理後、酸加水分解を行い、ヒスチジン残基およびリジン残基に対するアダクトーム解析を行った。その結果を、横軸を LC の保持時間、縦軸を m/z とし、また検出されたピーク面積を円の面積で表記したアダクトームマップを作成した。化学構造既知のヒスチジン修飾体 30 種類およびリジン修飾体 62 種類についてそれぞれ分析し、標品のアダクトームマップを完成した。

リノール酸、アラキドン酸などの多価不飽和脂肪酸(計 5 種類)を、モデルタンパク質であるヒト血清アルブミンの存在下において、鉄-アスコルビン酸により自動酸化を行った。24 時間後、水素化ホウ素ナトリウムにより還元処理を行った後、トリクロロ酢酸によりタンパク質を沈殿させ、酸加水分解を行った。それぞれのサンプルにおいて、アダクトームマップを作成した。リジンとヒスチジンに対する修飾を重点的に解析し、各脂肪酸に特徴的に生成される修飾リジン残基、および修飾ヒスチジン残基が認められた。

研究テーマ C「酸化 LDL におけるアダクトーム解析」

ヒト血清より単離した低密度リポタンパク質（LDL）を Cu^{2+} イオンにより *in vitro* で酸化させたものを酸化 LDL のモデルとして、アダクトーム解析を行った。その結果、未酸化の LDL と比較して、酸化 LDL において有意に増加する修飾付加体が多数検出された。構造既知の修飾付加体に関するアダクトームマップデータと比較したところ、ヒスチジン修飾付加体として 6 種類、またリジン修飾付加体として 7 種類を同定した。ヒスチジン修飾付加体のうち、最も主要なものは 4-hydroxy-2-nonenal（HNE）によるマイケル付加体であることがわかった。一方で、最も主要なリジン修飾付加体は既知付加体とは一致せず構造未知であったため、質量分析計や NMR など各種機器分析による詳細な解析を行い、最終的に、*N*-(8-carboxyoctanyl)-Lys（COL）であることを突き止めた（図 1）。このリジン修飾体は、リノール酸などの多価不飽和脂肪酸から酸化的開裂により生成される 9-oxononanoic acid のシッフ塩基付加体であることが判明した。安定同位体希釈法による COL 付加体の定量方法を確立し、酸化 LDL における COL 量を測定したところ、他の修飾付加体と比較してかなり多く（apoB タンパク質 1 分子あたり約 36 分子程度）含まれることが明らかとなった。

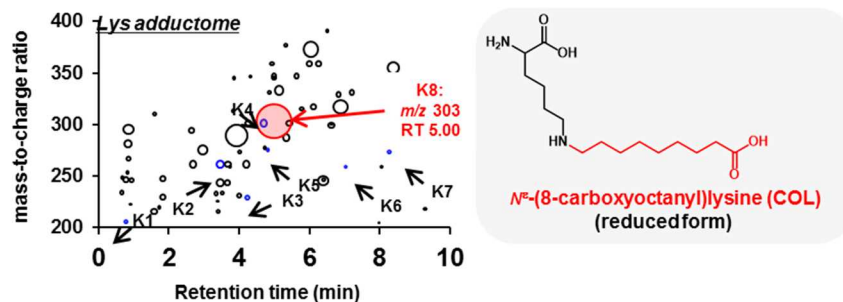


図1 酸化LDLにおけるリジンアダクトーム解析

アダクトーム解析の結果、酸化LDL中に生成される最も主要なリジン付加体として、COL付加体を同定した。

さらに、この COL 付加体について、*in vivo* サンプルにおける定量値と疾患との関連性について検討を行った。高脂血症や動脈硬化症のモデル動物として知られている apoE 欠損マウスより調製した血清タンパク質について、COL 付加体の定量解析を行った。その結果、コントロールマウスと比較して、apoE 欠損マウスにおいて有意に増加していることが明らかとなった。さらに、ヒト高脂血症患者血清における COL 付加体の定量を行ったところ、健常者と比較して、高脂血症患者血清

において有意に COL 付加体が増加することが明らかとなった（図 2）。この COL 付加体の血清タンパク質あたりの濃度は、血清中の LDL 濃度と比較的よい正の相関が認められた。以上の結果から、COL 付加体は高脂血症におけるよいマーカーとなりうる可能性が示唆された。

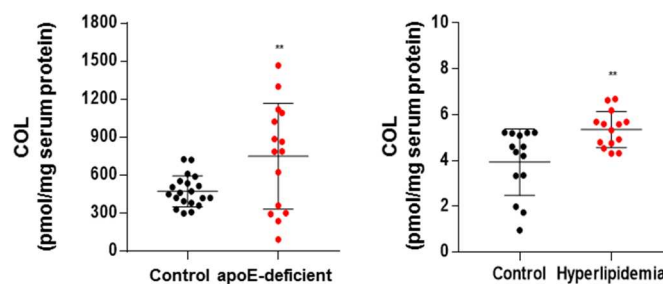


図2 *in vivo*におけるCOL付加体の定量

高脂血症モデルマウス血清（左図）および高脂血症患者血清（右図）において、コントロールと比較しCOL付加体が有意に増加している。

研究テーマ D「高脂血症患者血清アルブミンにおける酸化的修飾の解析」

高脂血症患者より採取された血清について、陰イオン交換カラムクロマトグラフィーによる分析を行った結果、健常者血清と比較して酸化型の血清アルブミンが有意に増加することが確認された。またその酸化様式として、血清アルブミン中のシステイン残基にシステインもしくはホモシステインなどの低分子チオール化合物がジスルフィド結合していることを明らかにした。そこで、血清アルブミン中のどのシステイン残基が酸化に関与しているのかを明らかにするため、ヒト高脂血症患者より、陰イオン交換カラムクロマトグラフィーにより酸化型と還元型の血清アルブミンをそれぞれ分取したのち、トリプシン消化し、質量分析により解析を行った。その結果、血清アルブミン中に唯一存在する遊離のシステイン残基だけでなく、分子内ジスルフィド結合を形成しているシステイン残基においても低分子チオール化合物が結合していることを見出した。また、リコンビナントヒト血清アルブミンを用いた解析から、S-ホモシステイン化により血清アルブミンのリガンド結合能が増強され、さらにマクロファージ細胞における炎症誘導活性を示すようになることを明らかにした。以上の結果から、血清アルブミンの S-チオール化修飾は高脂血症における重要なタンパク質化学修飾である可能性が示唆された。

3. 今後の展開

本研究により、タンパク質アダクトーム解析方法とそれを利用した疾患マーカー探索手法を確立することができた。今後は、様々な疾患サンプルを数多く解析することにより、それぞれの疾患に関するアダクトーム情報を蓄積し、疾患特異的な修飾付加体の探索を行っていく必要がある。さらなる解析により、タンパク質の化学修飾を指標としたよりよい疾患マーカーの探索を行い、臨床応用に向けた研究を展開していきたい。特に、疾患マーカーとしての有用性を示しながら、臨床応用が可能な簡便な検出方法の開発につなげていきたい。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

本研究において、研究目的の主眼であったアダクトーム解析方法の確立をすることができた。また、酸化 LDL におけるアダクトーム解析から、新規な修飾リジン構造を明らかにしただけでなく、マウス高脂血症モデルやヒト高脂血症患者においても新規な修飾リジン構造が有意に増加することを見出し、高脂血症に関連したタンパク質修飾を指標とした疾患マーカーの可能性を見出すことができたと考えている。実際に臨床検査などへの応用には、まだまだ検討しなければならない点が多いというのが現状であるが、本研究で開発したタンパク質アダクトーム解析技術は、タンパク質の翻訳後修飾を指標とした疾患マーカーの探索とそれを基盤とした創薬開発などに資するものであると考える。研究実施体制ならびに研究費執行状況に関しては、追加措置を受けつつ、概ね当初の計画の通りに実施することができたと考えている。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

ヒト生体内のタンパク質の多くで、そのリジンやヒスチジンなどのアミノ酸残基に様々な化学構

造の修飾付加体が形成されることが知られている。しかしながら、従来は個別の修飾付加体について解析がなされてきた傾向があるため、様々な修飾付加体について、その生成機構や構造、タンパク質の安定性・機能への影響、疾患・老化との関連などについては不明な点が多い。そこで、本研究では、酸化脂質を中心とした代謝産物に注目し、これによるタンパク質修飾付加体の総体について、質量分析計で分析する“アダクトーム”解析法を確立することを目指した。

まずヒト血清アルブミンをモデルタンパク質として、リジン残基およびヒスチジン残基に対するアダクトーム解析の基本的方法を確立した。次に、各種酸化脂肪酸により形成される既知の付加体のアダクトームマップを作成し、このマップをもとに、ヒト酸化 LDL のモデルについてもアダクトーム解析をおこない、6 種類のヒスチジン修飾付加体および 7 種類のリジン修飾付加を同定できた。また、未知付加体の中で主要なリジン修飾付加体が N^{ϵ} -(8-carboxyoctanyl)-Lys (COL) であることも明らかにした。これらの成果により、本アダクトーム解析法が有用な方法であることが強く示唆された。一方で、解析が難しいため化学構造の決定には至らなかった未知の修飾付加体もあることから、今後はアダクトーム解析法をさらに発展させ、これら未知の修飾付加体の解析にも挑戦してほしい。

疾患と修飾付加体との関連を調べる研究としては、高脂血症モデルマウスである apoE 欠損マウスやヒト高脂血症患者の血清サンプルで COL 付加体が有意に増加することも判明し、疾患マーカーへの応用が期待される。さらに、S-ホモシステイン化された血清アルブミンが、リガンド結合能が増強され、マクロファージ細胞における炎症誘導活性を示すことも明らかとなった。よって、修飾付加体の疾患マーカーとしての利用のみならず、治療標的としての研究についても今後検討してほしい。

このような修飾付加体の疾患マーカーとしての応用については、医療・診断分野の研究者や企業とも連携し、ヒト血清サンプルのアダクトーム解析や迅速・簡便・低コストな検査キットの開発を効率的に進めることを期待している。

以上のように、さきがけ研究が大きな飛躍につながり、平成 28 年 1 月に准教授に昇格した。

5. 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

1. Miyashita H, Chikazawa M, Otaki N, Hioki Y, Shimozu Y, Nakashima F, Shibata T, Hagihara Y, Maruyama S, Matsumi N, & Uchida K. Lysine pyrrolation is a naturally occurring covalent modification involved in the production of DNA mimic proteins. *Scientific Reports*, 2014, 4: 5343.

(2)特許出願

研究期間累積件数:1 件

1.

発 明 者: 内田浩二、柴田貴広

発明の名称: 動脈硬化症マーカー及びその利用

出 願 人: 名古屋大学

出 願 日: 2015/7/16

出 願 番 号: 特願 2015-141652

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

主要な学会発表

(1) ○柴田貴広、内田浩二 「タンパク質の化学修飾を指標とした疾患マーカーの探索」
日本薬学会第 136 年会(横浜) シンポジウム 2016 年 3 月

(2) ○柴田貴広、中島史恵、内田浩二 「ヒト血清アルブミンの S-チオール化修飾と病態」
第89回日本生化学会大会(仙台) シンポジウム「チオールバイオロジーの新たな展開」
2016 年 9 月

受賞

農芸化学奨励賞(日本農芸化学会)平成 26 年 3 月

著作物

内田浩二、柴田貴広「アダクトーム解析法を用いた新しい疾患バイオマーカーの探索」バ
イオサイエンスとバイオインダストリー, 2016, 74, 26-29