



食品および酸化ストレス関連因子による生体タンパク質の翻訳後修飾に関する研究

静岡県立大学食品栄養科学部食品生命科学科 助教 石井 剛 志

はじめに

生合成されたタンパク質は、翻訳後修飾による構造変化を通じて、機能、局在、寿命および分子間相互作用などが厳密に制御されている。これまでに、リン酸化に代表される様々なタンパク質の翻訳後修飾が発見され、分析技術の構築を通じて生理的意義の解明が進み、発生・分化、老化および疾病発症などの生命現象との関わりが示されてきた。近年、生活習慣病をはじめとする種々の疾病の発症・進展における「酸化ストレス」の関与とその予防・改善における「食品」の役割が注目され、分子機構の解明が進められた。筆者らは、活性酸素種 (ROS) や脂質過酸化物質などの酸化ストレス因子によるタンパク質の酸化修飾が、生体の恒常性を崩壊させて疾病発症に関与するタンパク質の翻訳後修飾であると予想し、「酸化ストレスプロテオミクス」を展開してきた。また、食品因子とタンパク質との分子間相互作用が生理機能の発現を惹起するタンパク質の翻訳後修飾であると予想し、「食品因子とタンパク質との分子間相互作用解析」を展開してきた。以下に、研究成果の概要を紹介する。

1. 酸化ストレス因子によるタンパク質の翻訳後修飾：酸化ストレスプロテオミクス

酸化修飾されたタンパク質は、これまで酸化ストレスと疾病との因果関係を探るための指標として利用されていた。しかし、酸化修飾されたタンパク質がその構造と機能を変化させることでシグナル伝達ネットワークに影響を及ぼすことから、疾病発症機構を解明するための酸化ストレス特有の翻訳後修飾として注目されるようになった。筆者らは、質量分析法や二次元電気泳動法などを利用して酸化ストレスプロテオミクスを展開し、標的分子の探索やその構造・機能解析を進めることで、酸化ストレス因子による疾病発症機構の解明を目指した。

アクロレイン、4-ヒドロキシ-2-ノネナールおよびマロンジアルデヒドなどの脂質過酸化物質によるタンパク質の酸化修飾を質量分析と付加体特異的な抗体を組み合わせて解析する技術を構築し、修飾機構や構造・機能変化を解析することで、これらの酸化修飾が生体機能の低下や疾病発症に関与するタンパク質の翻訳後修飾として働く可能性を示した。さらに、求電子性化合物であるシクロペンテン型プロスタグランジンをヒト神経細胞に処理することで内因性の ROS が産生することを利用して、酸化ストレスに付随して生成するチオール化タンパク質をプロテオミクスにより網羅的に解析する技術を構築した。本技術の利用により同定したチオール化タンパク質の機能解析により、解糖系酵素の活性がチオール化・脱チオール化を介して可逆的に制御される可能性を示した。また、構築した技術を応用してカルボニル化タンパク質を探索し、ROS や求電子性化合物に感受性が高いプロテアソームサブユニットへの酸化修飾が、プロテアソームの不活化を介して不要なタンパク質の異常蓄積を

惹起する可能性を示した。以上より、酸化修飾が単に酸化ストレスの指標としてだけでなく、生体機能の低下に関与する酸化ストレス特有の翻訳後修飾として疾病発症に寄与する可能性が示された。

2. 食品因子によるタンパク質の翻訳後修飾：食品因子とタンパク質との分子間相互作用解析

食品因子の有する生理機能は、生活習慣病の予防に有用であると考えられている。生理機能の中でも特に注目されたのは抗酸化活性であり、これまでに酸化ストレスが関与する様々な疾病に対する予防効果が確認されてきた。しかし、研究の進展に伴い抗酸化活性の強弱だけでは説明できない様々な事例が報告され、異なる視点から生体調節機能を解析することが求められた。その過程で、食品因子にも ROS や薬物と同様に感受性が高いタンパク質が存在し、何らかの結合反応 (非共有結合や共有結合など) を介した分子間相互作用によって様々な生理機能の発現が惹起されることが予想された (図1)。筆者らは、新しい分析技術の構築を基盤として食品因子とタンパク質との分子間相互作用解析を展開し、標的分子の探索およびタンパク質に対する結合構造や結合による機能変化の解析を進めることで、食品因子による疾病予防機構の解明を目指した。

67 kDa ラミニン受容体にエピガロカテキンガレート (EGCg) が結合し、その機能を制御することでガン細胞の増殖抑制などに働くことが報告され、食品因子の示す生理機能の発現機構における新たな概念として注目された。しかし、食品因子が結合したタンパク質を分離し、簡便かつ高感度に検出する技術が乏しかったことから、一部の例外を除き研究の進展は遅れていた。筆者らはまず、レドックスサイクル反応を利用したポリフェノール結合タンパク質の検出技術と質量分析法を利用した結合構造の解析技術を構築し、カテキン類とモデルタンパク質との分子間相互作用を詳細に解析した。そして、カテキン類が B 環の自動酸化を経てキノン体となることでタンパク質中のチオール基に共有結合することを見出した (図2)。さらに、ホウ酸結合ビーズを利用したポリフェノール結合タンパク質の分離・精製技術を構築し、EGCg を処理したヒト胃ガン細

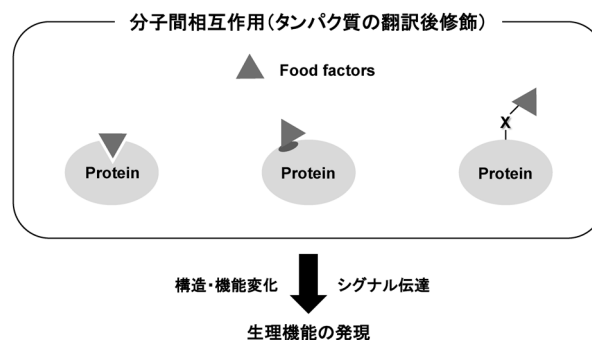


図1 分子間相互作用を介した食品因子の生理機能発現

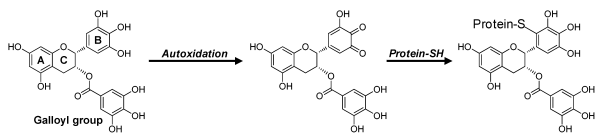


図2 カテキン類の自動酸化を介したタンパク質チオール基との共有結合反応

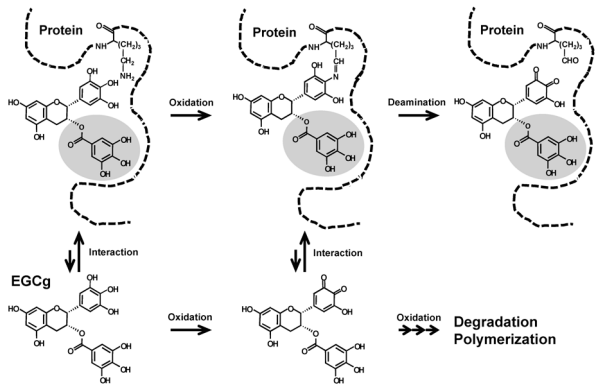


図3 推定されたHSAによるカテキン類の酸化抑制機構

胞から共有結合の標的分子を探索した。構造・機能解析の結果、DEAD-box型RNAヘリカーゼp68が、カテキン類と共有結合することでガン細胞増殖抑制作用を惹起する標的分子のひとつであることを示した。このように、食品因子とタンパク質との分子間相互作用を解析する技術を構築・応用することで、食品因子による疾病予防の機構解明に向けて標的分子の探索が可能になった。

カテキン類は、中性以上のpHを示す水溶液中では自動酸化を起こすため不安定である。筆者らは、EGCgの自動酸化が血清中で抑制されることを見出し、安定性を高める因子としてHSAを同定した。そこで、上述した方法に加えて、新たにHSA結合カラムを備えたHPLC法、水晶発振子マイクロバランス法および等温滴定型カロリメトリ法を利用した解析技術を構築し、HSAとの分子間相互作用を詳細に解析した。カテキン類は、主にB環とガロイル基を介してHSAに非共有結合することを見出し、ガロイル基が結合親和性を高める最重要因子であることを示した。また、HSAに結合した状態でEGCgの酸化が進行した場合には、アミノ基とイミン付加体を形成することを示した。なお、HSAに対する結合親和性が低いエピガロカテキンの安定性は高まらなかった。以上を踏まえ、EGCgはガロイル基を介してHSAに結合することで安定な複合体を形成し、さらに自動酸化を受けやすいB環が水素結合や可逆的な共有結合をすることで酸化が抑制されると推察した(図3)。血清中では、HSAに結合したEGCgが時間とともに他のタンパク質に移行する現象が認められたことから、HSAによ

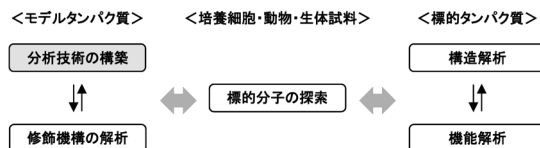


図4 「酸化ストレスプロテオミクス」と「食品因子とタンパク質との分子間相互作用解析」の流れ

る安定化の有無は血液循環を介したカテキン類の標的部位への輸送に重要な役割を担うことが予想された。

おわりに

本研究では、分析技術の構築と修飾(結合)反応の解析、標的分子の探索および構造・機能解析を基盤として研究を展開することで(図4)、「酸化ストレスプロテオミクス」や「食品因子とタンパク質との分子間相互作用解析」が進展した。鍵となったのは分析技術の構築であり、用途に応じて様々な分析法を用いることで、複雑な結合反応の解析や標的分子の探索が可能になった。ここでは紹介できなかったが、筆者らはテアフラビン類、 α -リポ酸およびピロキノリンキノンなどの他の食品因子を対象に同様の研究を進めており、新たな分析技術の構築や標的分子の同定に挑んでいる。今後は、本研究アプローチが酸化ストレスによる疾病発症とその食品による予防の機構解明に貢献できるよう、更なる検討を進めていく予定である。

本研究は、静岡県立大学食品栄養科学部食品分子工学研究室と名古屋大学院生命農学研究科食品機能化学研究室で行われたものです。本研究の機会を与えて頂き、学生時代から今日まで終始ご指導ご鞭撻を賜りました中山 勉先生(静岡県立大学・現日本獣医生命科学大学)ならびに内田浩二先生(名古屋大学)に深く感謝いたします。本研究を遂行するにあたり多大なご指導を頂きました大澤俊彦先生(名古屋大学・現愛知学院大学)、中村宜督先生(名古屋大学・現岡山大学)、熊澤茂則先生(静岡県立大学)に厚く御礼申し上げます。大阪府立大学の赤川 貢先生には数多くの研究において発想・推進に多大なるご協力を賜りましたこと厚く御礼申し上げます。様々な機会でご協力頂きました静岡県立大学の伊藤創平先生と三好規之先生に感謝致します。研究の世界に導いて頂きました恩師である日本獣医生命科学大学の沖谷明紘先生(現名誉教授)と松石昌典先生に心より御礼申し上げます。本研究の成果は、森 大気博士を中心に研究室の卒業生・在校生ならびに技術補佐員の皆様の多大なる努力の賜物です。また、すべての方々のお名前を挙げることはできませんが、共同研究者の皆様や試料を提供頂いた方々のご協力により研究が進展しました。ここに深く感謝いたします。最後になりましたが、本賞にご推薦頂きました日本農芸化学会中部支部長の小鹿 一先生ならびにご支援賜りました学会の諸先生方に厚く御礼申し上げます。