



脂質メディエーターに関する化学生物学的研究

名古屋大学大学院生命農学研究科応用分子生命科学専攻 助教 柴田 貴広

はじめに

生体膜の主要な構成成分である脂質は、酵素的あるいは非酵素的な反応を受けて様々な構造を有する生理活性物質へと変換される。こうした脂質代謝物は、脂質メディエーターとも呼ばれ、生体内において様々な生理作用を発揮している。酵素的に産生される脂質メディエーターの中で最も有名なもののひとつが、プロスタグランジン (PG) である。血管拡張やアレルギー反応、睡眠などに関与するメディエーターとして知られる PGD₂ は、さらなる代謝を受けてシクロペンテン構造を有する J₂ 型 PG へと変換される。また、アラキドン酸などの多価不飽和脂肪酸は、非酵素的な酸化反応を経て反応性の高いアルデヒド類を生成することも明らかになっている。こうした脂質由来の活性種により誘導される生理作用や、生体内における生成については不明な点が多いのが現状であった。そこで筆者らは、J₂ 型 PG や脂質由来アルヒド化合物に焦点を当て、その生成機構や生理作用の解明を目的として研究を行ってきた。また、PG 産生の律速酵素であるシクロオキシゲナーゼ 2 (COX-2) の発現誘導や、Toll 様受容体 (Toll-like receptor; TLR) の活性化を指標とした炎症誘導機構とその制御に関する研究を行ってきた。以下にその概要を紹介する。

1. 炎症条件下における J₂ 型 PG の生成機構

筆者らは J₂ 型 PG の最終産物である 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -PGJ₂ (15d-PGJ₂) を特異的に認識するモノクローナル抗体の作製に成功した。この抗体を利用して、慢性炎症性疾患である粥状動脈硬化病巣における免疫染色を行った結果、泡沫状マクロファージに 15d-PGJ₂ が蓄積していることを初めて見出した。同様に、神経変性疾患のひとつである筋萎縮性側索硬化症 (ALS) 患者の脊髄においても 15d-PGJ₂ が産生されていること

を免疫化学的に明らかにした。また、マウスマクロファージ様細胞である RAW264.7 を用いた培養細胞系においても、リポ多糖 (LPS) 刺激により 15d-PGJ₂ が産生されることを明らかにした。さらにこの研究過程から、これまで考えられてきた PGD₂ 代謝経路の矛盾点を見出し、キラルカラムを用いた HPLC による詳細な解析を行った結果、真の変換経路を見出した。すなわち、PGJ₂ から血清アルブミン存在下では異性化して Δ^{12} -PGJ₂ が産生され、血清アルブミン非存在下では 15d-PGJ₂ が産生されるという変換経路を提唱した (図 1)。

2. J₂ 型 PG による細胞死誘導機構の解析

ヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞を用いた検討から、15d-PGJ₂ による細胞内酸化ストレスの亢進には、15d-PGJ₂ の有する親電子性が重要であることを見出した。15d-PGJ₂ はレドックス制御に関与するタンパク質であるチオレドキシンの活性中心のシステイン残基に共有結合することを質量分析により明らかにし、さらに 15d-PGJ₂ による共有結合修飾により、チオレドキシンの活性が顕著に低下することを確認した。また、15d-PGJ₂ によるアポトーシス誘導機構についても解析し、p53 依存的な Fas 遺伝子の発現誘導を見出した。さらに、p53 の活性化には 15d-PGJ₂ によるプロテアソームの阻害および ataxia telangiectasia-mutated (ATM) の活性化が関与していることを明らかにした (図 2)。加えて、脂質過酸化産物のひとつである 4-oxo-2-nonenal (ONE) にも p53 依存的な細胞死誘導活性を有することを見出し、ATM の活性化により p53 がリン酸化を受けることを明らかにした。

3. J₂ 型 PG と生体分子との相互作用

上記のように、15d-PGJ₂ はチオレドキシンのだけでなく、そのほかのタンパク質に対して共有結合修飾することにより、そ

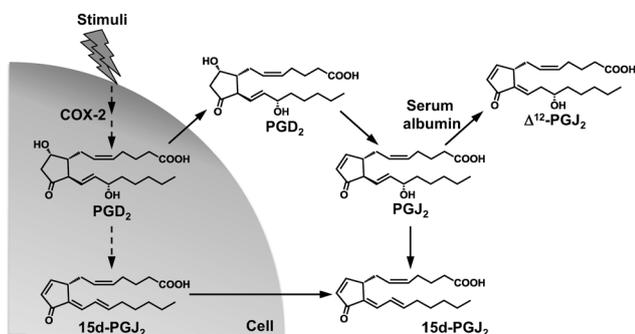


図 1 J₂ 型 PG 類の産生機構

PGD₂ より非酵素的に産生される PGJ₂ は、アルブミン存在下では、 Δ^{12} -PGJ₂ へと変換される。これまで考えられてきた変換経路では、 Δ^{12} -PGJ₂ から 15d-PGJ₂ へと変換されるものと考えられてきたが、筆者らの研究により、15d-PGJ₂ は Δ^{12} -PGJ₂ からは産生されず、アルブミン非存在下において PGJ₂ から直接的に 15d-PGJ₂ へ変換されることが明らかとなった。

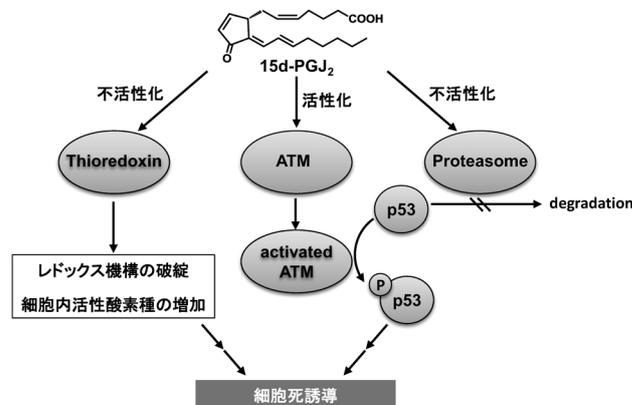


図 2 15d-PGJ₂ による細胞死誘導機構

15d-PGJ₂ は、チオレドキシンの共有結合修飾することによりその酵素活性を低下させ、細胞内活性酸素レベルが上昇し、細胞死を誘導する。また、15d-PGJ₂ は ATM やプロテアソームに対しても共有結合修飾することにより、p53 タンパク質の活性化を介して細胞死を誘導する。

の生理作用を發揮しているものと考えられている。これまでに、NF- κ B や I κ B キナーゼなどに共有結合することによりその転写活性を阻害し、炎症性遺伝子の発現を抑制していることが知られている。また、H-Ras が 15d-PG_{J2} による修飾を受けて活性化することや、15d-PG_{J2} の核内受容体として知られる peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) との間に共有結合が形成されることなどが明らかになっている。筆者らは 15d-PG_{J2} のビオチン標識体を調製し、15d-PG_{J2} の標的タンパク質の探索を行った結果、細胞骨格タンパク質であるアクチンに作用することを見出した。実際に、15d-PG_{J2} を処理した培養細胞において、アクチンフィラメントの脱重合を阻害することを確認している。またこのほかにも、第二相解毒酵素の発現に関わる転写因子 Nrf2 の制御タンパク質である Keap1 に対する 15d-PG_{J2} の共有結合修飾を明らかにしてきた。

4. 脂質由来アルデヒドによるタンパク質修飾と炎症誘導リガンド活性

脂質アルデヒドのひとつである 4-oxo-2-nonenal (ONE) は、タンパク質中のリジン残基と反応することによりケトアミド型リジン付加体を形成することが知られている。筆者らは、このケトアミド型リジン付加体に対する特異的モノクローナル抗体の作成に成功し、ヒト粥状動脈硬化病巣における付加体の蓄積を示した。さらに、LC-MS/MS を用いたケトアミド型リジン付加体の高感度定量法を確立し、動脈硬化モデルマウスにおいてこの付加体が蓄積していることを明らかにした。またこのケトアミド型付加体を認識する受容体として、スカベンジャーレセプターのひとつであるレクチン様酸化低密度リポタンパク質受容体 (LOX-1) を同定した。実際に、LOX-1 を発現させた細胞においてケトアミド型付加体を取り込まれることや、マクロファージ細胞において LOX-1 依存的に炎症性サイトカインの産生が亢進されることなどを確認した。さらに、ケトアミド型付加体だけでなく、そのほかの脂質アルデヒド修飾付加体も LOX-1 のリガンドとなりうる事が判明し、スカベンジャー受容体に対する炎症誘導リガンドとして、脂質アルデヒド修飾付加体の重要性が明らかになった (図3)。

5. 炎症誘導機構とその制御に関する研究

炎症応答は、PG や脂質アルデヒドの生成を伴う主要な生体応答として知られている。筆者らは、自然免疫に關与する TLR や、PG 産生の律速酵素であるシクロオキシゲナーゼ 2 (COX-2) を指標とした炎症誘導機構とその制御に関する研究を行ってきた。特に、TLR シグナルを制御する食品成分の探索を行い、イソチオシアネートなどの含硫化合物やポリフェノールなどに強い TLR 阻害活性を見出してきた。また、COX-2 の発現を誘導する脂質アルデヒドや血清タンパク質の同定を行っており、その作用機構が明らかにされつつある。

おわりに

筆者らは脂質メディエーターの中でも、J₂型PG類や脂質アルデヒド類などの親電子性活性種を中心に研究を行ってきた。特に J₂型の PG に関しては、生体内における局在や変換経路を明らかにするだけでなく、標的タンパク質の同定とその分子機

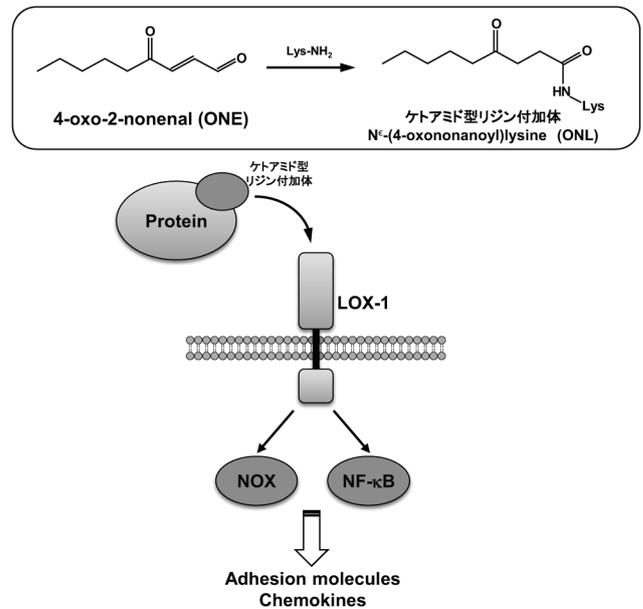


図3 スカベンジャー受容体により認識される脂質アルデヒド修飾付加体
4-oxo-2-nonenal (ONE) は、タンパク質中のリジン残基と反応し、ケトアミド型付加体を形成する。この付加体は、スカベンジャー受容体のひとつである LOX-1 のリガンドとして作用する。

構の解明を行ってきた。また、脂質アルデヒドにより形成される修飾付加体の生体内からの検出・定量にも成功し、炎症誘導性のリガンドとしての作用を見出すことができた。これらの成果により、脂質メディエーターの新たな一面を見出すことができたと考えている。今後は、親電子性活性種によりタンパク質分子上に形成される修飾構造複合体 (アダクトーム) を網羅的に解析することにより、生体内における修飾構造の生理的意義や疾患との関わりについて明らかにしていきたいと考えている。

謝辞 本研究は、名古屋大学大学院生命農学研究科応用分子生命科学専攻・食品機能化学研究分野において行われたものです。学生時代から、常に温かくご指導ご鞭撻を賜り、本研究を行う機会のみならず、研究の世界へ進むきっかけをお与えいただきました名古屋大学教授・内田浩二先生に心より感謝申し上げます。また、多大なるご助言とご支援を賜りました名古屋大学名誉教授 (現愛知学院大学教授)・大澤俊彦先生に深く御礼申し上げます。貴重なデータや研究資源をご提供くださいました多くの共同研究者の皆様にも心より感謝申し上げます。また、本研究の成果は、食品機能化学研究分野の現・旧スタッフの皆様によるご支援と、共に研究を行っていただいた卒業生ならびに在学生の努力の賜物であり、皆様にも心より感謝申し上げます。最後に、本奨励賞にご推薦くださいました日本農芸化学会中部支部長・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。