

# 疾患に関連したタンパク質 翻訳後修飾に関する研究

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  
生命機能化学講座  
食品機能化学研究分野

中島史恵

2018 年 2 月

## 略語一覽

APS	ammonium peroxydisulfate
CAN	acetonitrile
BSA	bovine serum albumin
CBB	coomassie brilliant blue R250
CMF-PBS	Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> -free PBS
15d-PGJ <sub>2</sub>	15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -PGJ <sub>2</sub>
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	dimethyl sulfoxide
DTT	dithiothreitol
DW	distilled water
ECL	enhanced chemiluminescence
ESI	electrospray ionization
EtOH	ethanol
FBS	fetal bovine serum
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GSH	glutathione
GSSG	glutathionedisulfide
HPLC	high performance liquid chromatography
HRP	Horseradish peroxidase
HSA	human serum albumin
IgG	Immunoglobulin G
LC-MS/MS	liquid chromatography-mass spectrometry
LDL	low density lipoprotein
MeOH	methanol
MS	mass spectrometry or mass spectrometer
MSA	mouse serum albumin
MW	molecular weight
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PB	phosphate buffer

PBS	phosphate-buffered saline
PG	Prostaglandin
RIPA	radioimmunoprecipitation assay
r.t.	room temperature
SDS	sodium dodecyl sulfate
TCEP	tris(2-carboxyethyl)phosphine
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -tetramethylethylenediamine
TFA	trifluoroacetic acid
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethane
TBS-T	Tris buffered saline containing Tween20
UV	ultraviolet light

# 目次

第1章	序論	6
1-1	生体の恒常性を維持するタンパク質の翻訳後修飾	7
1-2	疾患の状態を反映した翻訳後修飾	8
1-3	Human serum albumin	11
1-4	Cyclooxygenase	15
1-5	目的	20
第2章	S-ホモシステイン化修飾血清アルブミンによる炎症誘導	22
第1節	はじめに	22
1-1	生体内における脂質の役割	22
1-2	血中の脂質量と脂質異常症の関係	22
1-3	脂質異常症の種類	23
1-4	本研究の目的	24
第2節	ヒト血清に含まれる修飾タンパク質の探索	25
2-1	脂質異常症患者特異的な修飾タンパク質の探索	25
2-2	脂質異常症患者特異的に形成される修飾血清アルブミンの解析	30
2-3	タンパク質 S-チオール化の解析	31
第3節	S-チオール化修飾部位の解析	35
3-1	脂質異常症患者血清由来血清アルブミンの解析	35
3-2	CBS KO, CSE KO マウス血清アルブミンの解析	38
3-3	<i>In vitro</i> で作製した S-チオール化血清アルブミンの解析	39
第4節	S-チオール化に伴う血清アルブミンの機能性変化の解析	41
4-1	低分子化合物結合能の評価	41
4-2	タンパク質表面疎水性領域の評価	42
4-3	粒子径および電荷の評価	43
第5節	S-ホモシステイン化修飾血清アルブミンによる炎症誘導機構の解析	44
5-1	S-チオール化血清アルブミンの炎症誘導活性評価	44
5-2	コレステロール引き抜きと炎症応答	45
5-3	血清アルブミン投与による脂質ラフトの構造変化	48
5-4	S-ホモシステイン化血清アルブミン誘導性の炎症誘導機構の解析	51
第6節	血清アルブミンと低分子チオールの反応性の検討	58
6-1	シスチンおよびホモシスチンの血清アルブミンとの反応性の検討	58
6-2	血清アルブミンとホモシスチンの反応性	59
6-3	血清アルブミンと低分子チオール化合物の相互作用	59

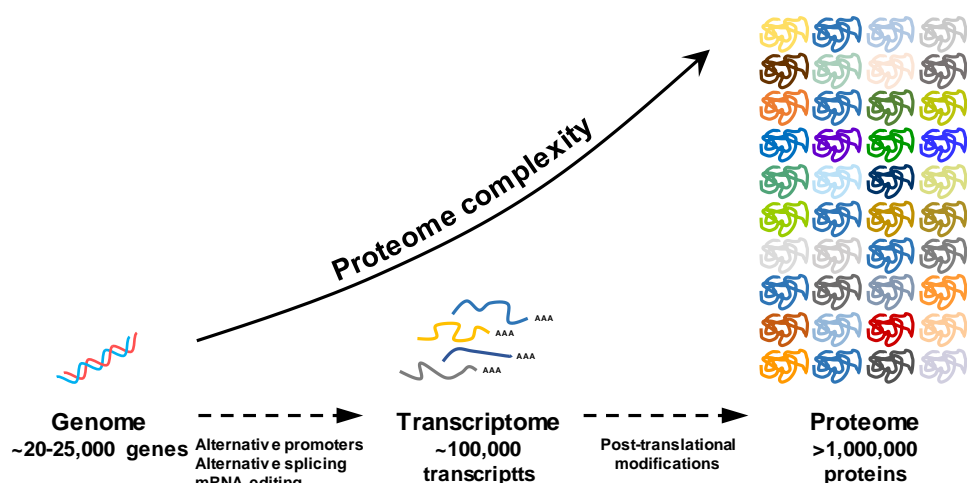
第7節 まとめおよび考察.....	61
第3章 プロスタグランジン D <sub>2</sub> 代謝物修飾血清アルブミンによる炎症誘導.....	68
第1節 はじめに .....	68
1-1 脂質メディエーター .....	68
1-2 アラキドン酸カスケードとプロスタグランジン .....	68
1-3 PGD <sub>2</sub> の生理活性 .....	70
1-4 PGD <sub>2</sub> 変換経路 .....	71
1-5 J <sub>2</sub> 型 PGの生理活性.....	71
1-6 目的 .....	72
第2節 15d-PGJ <sub>2</sub> の血清に依存した炎症応答.....	73
第3節 15d-PGJ <sub>2</sub> の炎症誘導に関わる血清成分の探索.....	76
3-1 15d-PGJ <sub>2</sub> による炎症誘導に関与する血清成分の探索.....	76
3-2 NAR ラット血清を用いた検討.....	79
第4節 血清アルブミン結合型 15d-PGJ <sub>2</sub> の COX-2 発現誘導への関与 .....	81
4-1 COX-2 発現への血清アルブミン-15d-PGJ <sub>2</sub> 複合体の関与 .....	81
第5節 15d-PGJ <sub>2</sub> の血清タンパク質への結合の選択性.....	83
5-1 15d-PGJ <sub>2</sub> の血清アルブミンへの結合評価 .....	83
第6節 15d-PGJ <sub>2</sub> の結合部位の解析.....	85
6-1 全長タンパク質の解析 .....	85
6-2 15d-PGJ <sub>2</sub> のアルブミン結合部位の解析 .....	86
第7節 15d-PGJ <sub>2</sub> -血清アルブミンによる COX-2 発現誘導メカニズムの解析.....	89
第8節 まとめおよび考察.....	91
第4章 総括 .....	96
第5章 実験方法 .....	98
8-1 試薬および使用機器 .....	98
8-2 Buffer、試薬類の調製.....	103
8-3 生化学実験 .....	103
あ	
8-5 細胞培養 .....	117
8-6 機器分析 .....	119
8-7 生体サンプル .....	130
8-8 統計処理 .....	131

# 第 1 章

## 序論

## 第1章 序論

2003年に完了したヒトゲノム計画によって、タンパク質をコードしている遺伝子の数はヒトの持つタンパク質の数と比べて遥かに少ないことが明らかとなった<sup>1</sup>。実際に、過去数十年間の研究によって、ヒトのプロテオームはヒトゲノムよりもはるかに複雑であることが認められており<sup>2</sup>、これは単一遺伝子が複数のタンパク質をコードすることに加えて、生合成されたタンパク質が翻訳後修飾を受けることによってその複雑性が高められるためであると考えられている (Figure 1-1)<sup>3</sup>。翻訳後修飾は、タンパク質の活性、コンフォメーション、局在性や安定性だけでなく、他のタンパク質や核酸、脂質、補因子などの生体分子との相互作用を調節し、多彩な生命機能を制御する上で非常に重要な役割を果たしている。一般的にタンパク質修飾は、特定の酵素によって触媒されるが、反応性の高い代謝物とタンパク質中のシステイン残基のような求核性アミノ酸残基との非酵素的な反応によっても生じる。また、タンパク質中のシステイン残基は、タンパク質の構造や機能の維持を担う重要なアミノ酸残基であることから、システイン残基の翻訳後修飾はタンパク質の活性を維持する上で重要な役割を担っていると考えられる<sup>4</sup>。このように、翻訳後修飾は生体の恒常性を維持する上で非常に重要な役割を果たす一方で、近年、ある種の翻訳後修飾は生体の状態を反映していることが明らかとなってきた。



International Human Genome Sequencing Consortium, *Nature* (2004)  
Jensen O. N., *Curr Opin Chem Biol.* (2004)

**Figure 1-1 タンパク質の翻訳後修飾**

DNA から転写・翻訳されたタンパク質は生体内で様々な翻訳後修飾を受けることにより、その機能や活性が制御される。

## 1-1 生体の恒常性を維持するタンパク質の翻訳後修飾

タンパク質はゲノム塩基配列によってコードされたアミノ酸配列に基づいているが、転写・翻訳されて生合成されたタンパク質がそのまま機能を発揮することは少ない。生合成されたタンパク質は、その後にリン酸化やメチル化、ユビキチン化などの翻訳後修飾を受け、生理機能の獲得や、細胞内局在や複合体形成、分解除去などが調節される (Figure 1-2)。このように翻訳後修飾はタンパク質の機能や活性を調節することから、生体の恒常性を維持する上で非常に重要な役割を果たしていると言える。実際に、翻訳後修飾の異常は細胞の増殖や分化機能に支障を来し、結果的に疾患病態を引き起こす場合もあることが分かっている。多くのがん細胞では、シグナル伝達に関わるタンパク質のリン酸化が亢進していることが報告されており、これががん細胞の増殖性や転移性に影響を及ぼしていると考えられている。このように、翻訳後修飾はタンパク質の活性を調節し、生体の恒常性を維持する化学修飾であるが、その調節機構が破綻すると生体の恒常性バランスが崩れ、疾病の発症につながる事が分かっている。

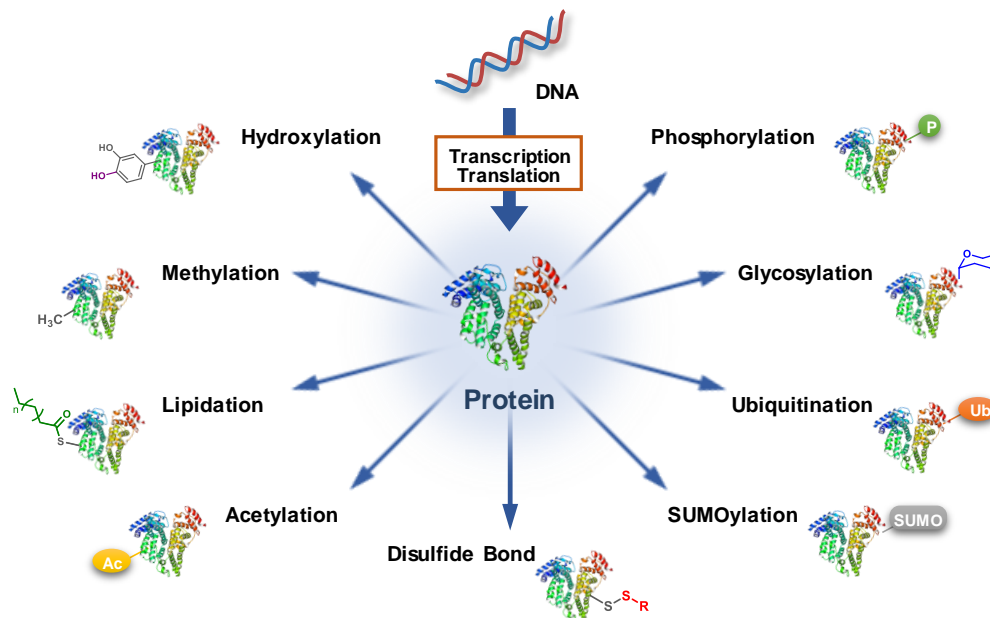


Figure 1-2 翻訳後修飾の種類

リン酸化や糖鎖付加、ユビキチン化など、翻訳後修飾は実に 300 種類以上存在している。



## 1-2 疾患の状態を反映した翻訳後修飾

翻訳後修飾は生体の恒常性を維持する重要な化学修飾であるが、近年になってタンパク質にリガンド様の活性を付与し、疾病の発症や進展に関わる翻訳後修飾や、生理機能には直接関係しないが生体状態を反映し、病態依存的に増加する翻訳後修飾の存在が明らかになってきている (Figure 1-3)。

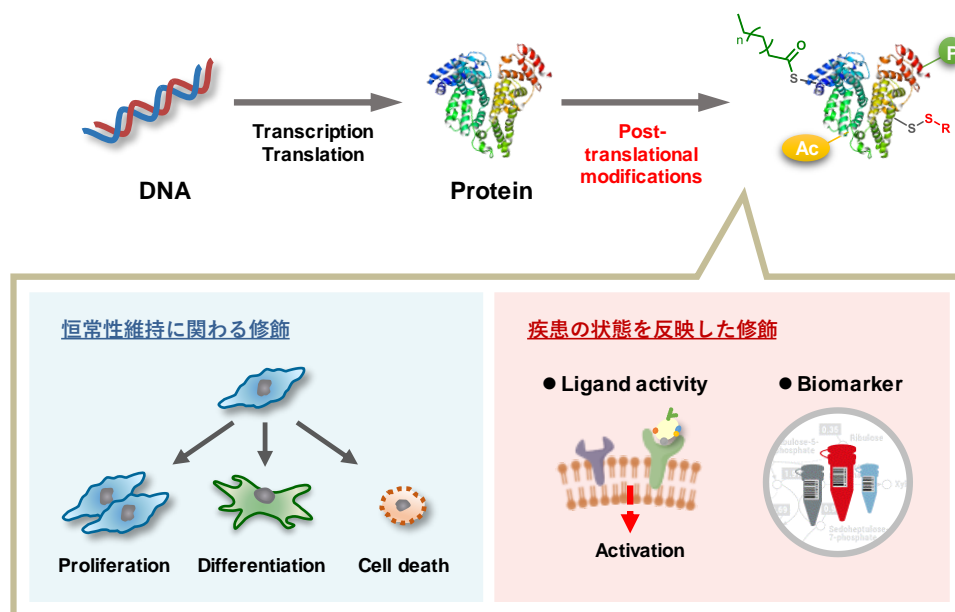


Figure 1-3 生体の状態を反映した翻訳後修飾

翻訳後修飾には、恒常性の維持に関与するものだけでなく、生体の状態を反映した修飾も存在することが明らかとなってきた。

### 1-2-1 疾病の発症や進展に関与する翻訳後修飾

タンパク質に対するある種の翻訳後修飾は、特にスカベンジャー受容体や toll 様受容体 (TLR) などのパターン認識受容体 (PRRs) 群に対するリガンド活性 (ダメージ関連分子パターン; DAMPs) の獲得に関与し、疾病の発症や進展に関与することが知られている。

脂質異常症に伴い増大する低密度リポタンパク質 (LDL) の酸化修飾物である酸化 LDL (oxLDL) は、生体内における DAMPs の代表例であり、血管内皮下においてマクロファージ細胞に存在するスカベンジャー受容体に結合し、炎症応答を誘導することが明らかとなっている。さらに、スカベンジャー受容体を介した oxLDL の取り込みは、マクロファージの泡沫化を引き起こし、これが血管内

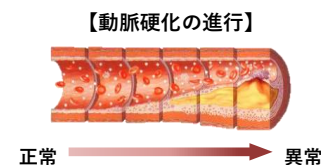
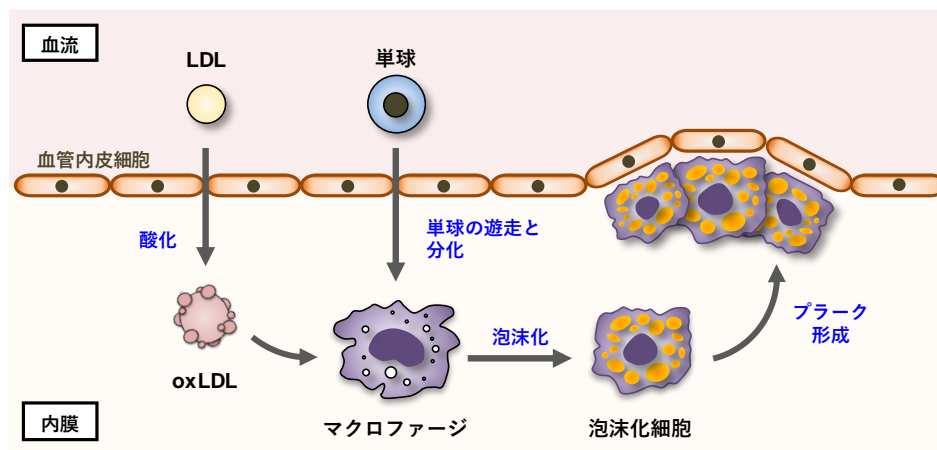


Figure 1-4 動脈硬化の進行  
病態の進行に伴って、血管壁にプラークが形成され、動脈の肥厚や硬化が引き起こされる。

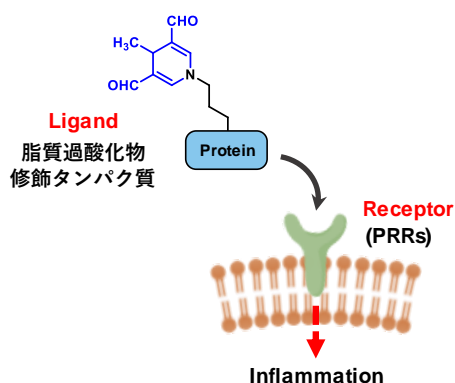
膜に蓄積することでプラークを形成し、動脈硬化の進展に関与することがよく知られている (Figure 1-4, 5)<sup>5-7</sup>。



**Figure 1-5 oxLDL の動脈硬化への関与**

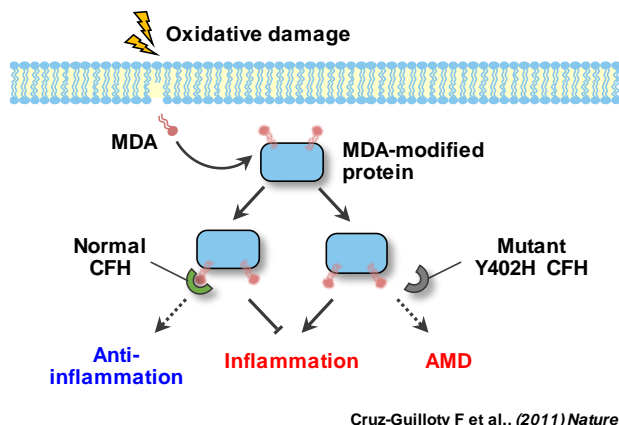
動脈硬化は、マクロファージのスカベンジャー受容体を介した oxLDL の取り込みによって誘導されることが明らかにされている。

また、加齢に伴い眼の網膜にある黄斑部分に異常が現れ、視野や視力の低下を引き起こす疾病である加齢黄斑変性 (AMD) の発症にも修飾タンパク質が関与していることが分かっている。AMD 患者血清中では脂質過酸化分解生成物のひとつであるマロンジアルデヒド (MDA) 濃度が上昇することが分かっており、反応性の脂質過酸化分解産物である MDA はすみやかに生体内のタンパク質と反応して MDA 修飾タンパク質を形成する。これにより形成された MDA 修飾タンパク質はリガンド活性を獲得し、炎症誘導や AMD の発症に関与することが報告されている (Figure 1-6, 7)<sup>8</sup>。



**Figure 1-6 MDA 修飾タンパク質の構造**

生体膜由来のマロンジアルデヒドによって形成されたマロンジアルデヒドアセトアルデヒド修飾タンパク質は、パターン認識受容体を介して受容され、炎症応答を引き起こす。

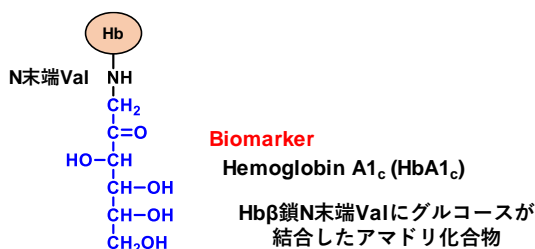


**Figure 1-7 修飾タンパク質による加齢黄斑変性の発症誘導**

マロンジアルデヒドアセトアルデヒド修飾タンパク質は、炎症応答を誘導するだけでなく、加齢黄斑変性の発症にも関与することが報告されている。また、生体のマロンジアルデヒド修飾タンパク質による炎症誘導に対する防御機構も明らかにされている。

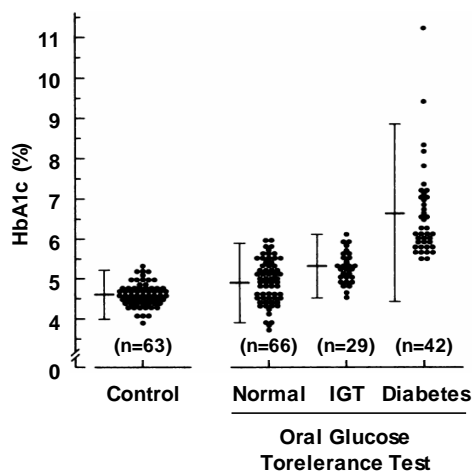
## 1-2-2 疾病依存的に形成される翻訳後修飾

疾患の状態を反映したタンパク質の翻訳後修飾の中には、生理機能には直接関係しないが、生体状態を反映し、病態依存的に増加する翻訳後修飾の存在が明らかになってきている。このような翻訳後修飾を受けたタンパク質は、疾病の診断や治療において有用なバイオマーカーとして用いられている。身近な代表例としては、ヘモグロビン A1c (HbA1c) が挙げられる<sup>9)</sup>。HbA1c は赤血球中に含まれるヘモグロビン (Hb) に糖が結合したグリコヘモグロビンの一種であり、Hb の  $\beta$  鎖 N 末端のバリン残基にグルコースが結合したアマドリ化合物である (Figure 1-8)。血中のグルコース濃度に比例して HbA1c が形成されることから (Figure 1-9)、臨床現場において糖尿病の診断や治療の際のバイオマーカーとして使用されている。糖尿病の診断には、過去数か月の持続的な血糖値を測定する必要があるが、血糖値は採血時点の瞬間的な血糖状態を反映し、食事の摂取によって変動することから、血糖値のみで糖尿病を診断するのは難しい。しかし、血糖値に依存して非酵素的に形成される HbA1c は、一度の食事によって影響を受けず、また過去 1~2 か月の血糖値を反映することから、糖尿病の診断において非常に有用なバイオマーカーである。また、糖尿病患者は食事療法や運動療法などで持続的に血糖をコントロールすることが必要であり、過去数か月の血糖値を反映する HbA1c は糖尿病の診断のみならず、治療においても優れたバイオマーカーであると言える。



**Figure 1-8 ヘモグロビン A1c (HbA1c)の化学構造**

Hb $\beta$  鎖の N 末端 Val にグルコースが結合したアマドリ化合物である。

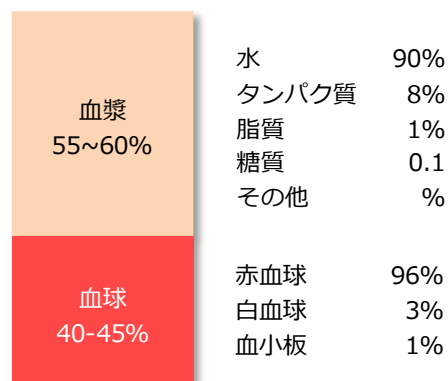


Jeppsson et al., (1986) Clin Chem. より引用

**Figure 1-9 糖尿病患者における HbA1c の増加**  
HbA1c は糖尿病患者において特異的に増加することから、糖尿病の診断や治療において有用なバイオマーカーとして使用されている。

### 1-3 Human serum albumin

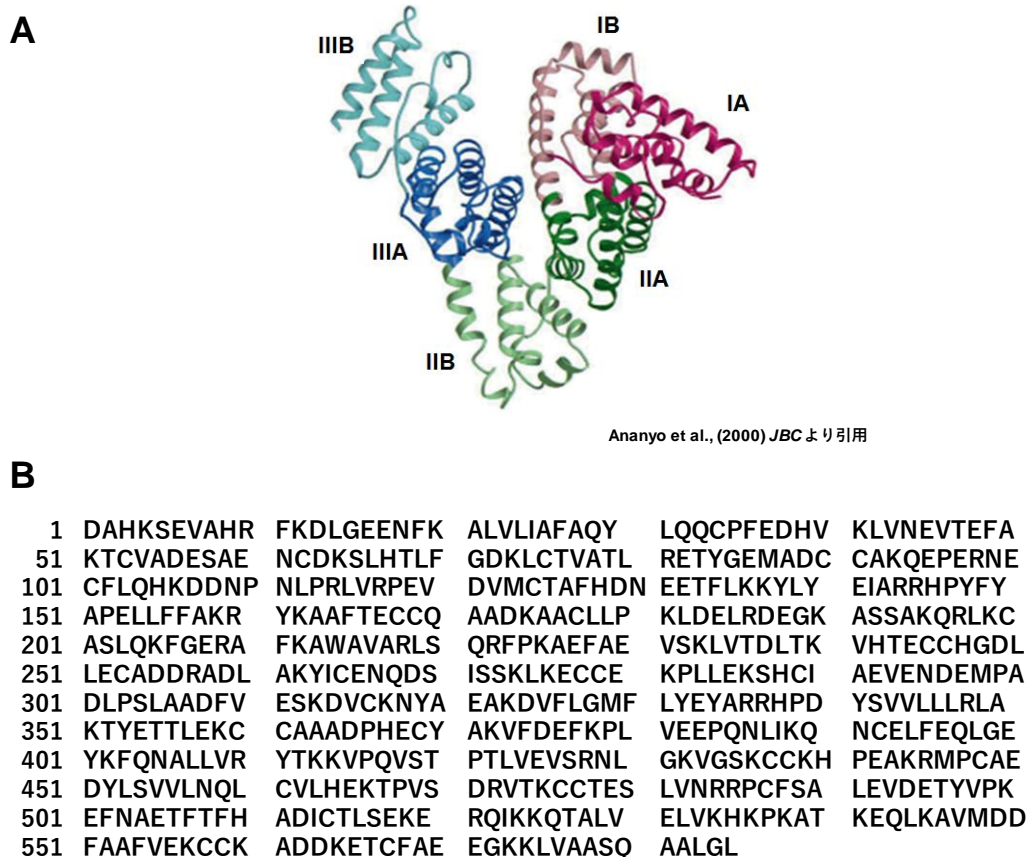
血液は大きく分けて血球成分と血漿成分に区分される。血漿成分の大部分は水分で構成されており、血漿タンパク質は血漿成分のおよそ 8 % を占めている。血漿タンパク質のおよそ 6 割を占めているのが血清アルブミン (HSA : Human serum albumin) で、血漿タンパクの中で最も量が多く含まれているタンパク質である <sup>10,11</sup> (Figure 1-10)。血清アルブミンは分子量約 66,000 のタンパク質である。



**Figure 1-10 血液を構成する成分とその割合**

HSA は古くは 100 年以上前からその存在が知られており、50%硫酸により沈殿してくる画分はグロブリン画分、50%硫酸により沈殿してこない画分はアルブミン画分と呼ばれていた。その後、1941 年にアメリカ人の Cohn によって低温エタノール分画法が確立された <sup>12</sup>。これは、低温下においてヒト血漿にエタノールを添加し、エタノール濃度や pH、温度等の条件を調節し、血漿中の HSA をその他のタンパク質から単離・精製する方法である。この方法は工業的規模の生産においても利用される精製方法となり、現在も世界の多くのメーカーで採用されている。その後、1975 年に Meloun により HSA の 585 残基のアミノ酸配列が明らかとされ <sup>13</sup>、1992 年には Carter により HSA の三次元結晶構造が明らかとされた <sup>14</sup>。HSA は、67%が  $\alpha$  ヘリックス、15%が  $\beta$  シートで構成されたハート型の三次元構造を有しており、大きく 3 つの類似したドメインにより構成されている (Figure 1-11)。種間の相同性は比較的高く、ウシ血清アルブミンとは 76.2%、ラット血清アルブミンとは 73.2%の相同性があることが知られている。これらの種

間に共通していることとして、アルブミン分子中にフリーの Cys を 1 つまたは 2 つ有していることが挙げられる。



**Figure 1-11 血清アルブミンの結晶構造とアミノ酸配列**

折り重なった 3 つの相同領域 (ドメイン) から構成されている。ドメイン I (赤色)、ドメイン II (緑色)、ドメイン III (青色)

成人の場合、HSA は肝臓で一日に 6～12 g 生合成される。生体に存在する HSA のうち、約 40% が血管内に、残り 60% が細胞や組織間液中などの血管外に分布している。血管内と血管外の HSA の濃度を調節することにより血漿膠質浸透圧を維持し、血漿中の HSA は通常 4.4～5% に保たれている。アルブミンは血液中に存在するだけでなく、その一部は貯蔵されている。体重 1 kg あたり 4～5 g が体内に貯蔵されると言われていることから、体重 60 kg の成人の場合では、およそ 240～300 g のアルブミンが存在することとなる。アルブミンの半減期は 14～18 日間で、その後、筋肉や皮膚において分解を受ける。

通常、健常人の HSA 濃度の基準値は約 40～50 mg/ml といわれている。HSA の生合成は肝臓で行われるため、肝機能の低下は HSA 濃度の低下につながる。また、肝機能は正常であっても、食事からのタンパク質摂取量の不足や小腸の吸収機能低下などによる原料とな

るアミノ酸の不足は HSA の生合成量を低下させる原因となる。また、炎症により血管の透過性が亢進することで血管外へ HSA が漏出し、血清中の HSA 濃度が低下する。このように、血清中の HSA 濃度は健康状態を反映していることから、疾病や栄養状態の指標となる。実際に、HSA と血清タンパク質であるグロブリン濃度との比は、肝機能を評価する上で重要な検査項目として利用されている。また、アルブミンの発現は様々な因子によって影響を受けていることが報告されており、Trp<sup>4</sup>、グルココルチコイド、インスリン、成長ホルモン、甲状腺ホルモン、低浸透圧などは HSA の発現を亢進するのに対し、IL-1、IL-6、TNF- $\alpha$ 、アミノ酸 (Trp 以外)、レチノイン酸、ビタミン B6、高浸透圧などは HSA の発現を抑制することが報告されている<sup>15,16</sup>。

### 1-3-1 HSA の生理学的機能

血漿タンパク質の大部分を占めている HSA はマルチな機能を持つタンパク質として広く知られている。その中でも代表的な生理学機能として、①血漿膠質浸透圧の維持、②様々な物質の保持・運搬が挙げられる。

1 つ目の代表的な生理機能である血漿膠質浸透圧の維持は、血液を正常に循環させるために非常に重要である。血漿膠質浸透圧とは、毛細血管壁を介した血管内外の浸透圧のことであり、血漿浸透圧は電解質によって、膠質 (コロイド) 浸透圧はアルブミンによって維持されている。血液中に含まれる他のタンパク質も膠質浸透圧の維持に関与する可能性があるが、血液中にはアルブミンが最も多く含まれることから、血漿膠質浸透圧はアルブミンによって維持されていると考えられている。血液中のアルブミン量が低下する低アルブミン血漿では膠質浸透圧が低下するため、循環血漿が維持できずに間質へ流出し、全身性浮腫や血管内の脱水が引き起こされる。

2 つ目の代表的な生理機能である様々な物質の保持・運搬は疎水性低分子化合物を主としている。具体的には、脂肪酸などは Arg117、His146、Lys351、Lys475、Lys525 などの塩基性アミノ酸を中心に保持することが結晶構造解析による検討から明らかにされている<sup>17</sup>。薬物に関しては Lys199、Trp214、His242、Arg257 を中心とした Site I や Arg410、Tyr411、Ser489 を中心とした Site II の 2 つの結合サイトを有していることも様々な解析から報告されている<sup>18-21</sup>。その他には、ホルモン、2 価の遷移金属イオン、ビリルビン、トリプトファンなどの運搬にも関与しているといわれている<sup>22,23</sup>。

さらに、これら 2 つの代表的な生理機能の他に HSA は、触媒活性を有することが報告されている。Arg410、Tyr411 を活性中心としたエステラーゼ様活性<sup>24,25</sup>、Cys34 を活性中心と

したチオエステラーゼ様活性などがある。また、PGD<sub>2</sub> の脱水<sup>26</sup> や 15-ketoPGE<sub>2</sub> や PGJ<sub>2</sub> の異性化<sup>27,28</sup> に関与するという報告もされている。さらに、HSA は金属イオンを保持、運搬できるため、補酵素活性を有していることも知られている。

HSA は 1 つのフリーの Cys のチオール基が存在するために、溶媒条件により SH 基が触媒になり、可逆的に S-S 結合（共有結合）の組み換えられた別の立体構造に変化することが報告されている。N→F、F→E（酸膨潤）転移では、2 段階に  $\alpha$  ヘリックス含量は減少し、 $\beta$  構造は増加し、ホルモン、薬物、生体内代謝産物などに対する結合能が N→F 転移で消失する。N→B 転移では、 $\alpha$  ヘリックス、 $\beta$  構造などの二次構造は変化せず、主として三次構造が変化し、各種化学物質に対する結合能も増加する。低塩濃度、pH7 以上のとき、分子内 SH、S-S 交換反応により、N 型（非老化型）より A 型（老化型）に異性化する (Figure 1-12)。この現象は分子老化現象(molecular aging)と呼ばれている<sup>36</sup>。

Figure 1-12 血清アルブミンの分子老化現象

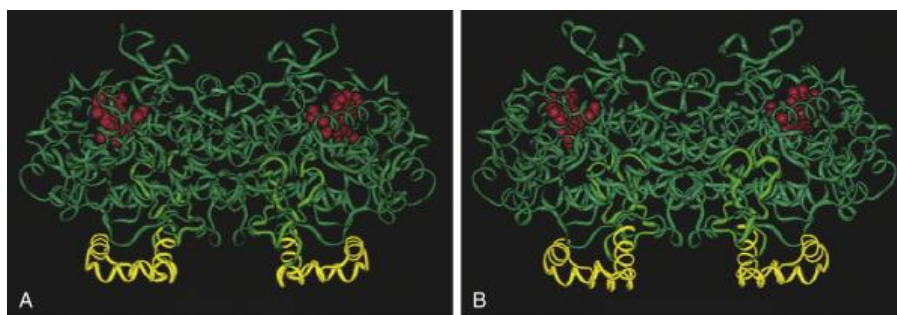
これまでに HSA と疾病との相関性を示す報告は多数なされているが、実際に HSA が直接疾病を引き起こすことはあまり報告されていない。慢性肝炎、肝硬変、肝がんなどに代表される肝疾患は、血清アルブミンの産生の低下を引き起こすことが知られている。また、腎不全、腎炎、ネフローゼ症候群などに代表される腎疾患では、タンパク質が尿中に



排出されることによってアルブミンの運搬能が著しく低下すると共に低アルブミン血症を引き起こす。血清中のアルブミン濃度が低下し、低アルブミン血症が引き起こされると、血漿膠質浸透圧が維持できなくなり、浮腫を発症する。また、炎症性サイトカインにより HSA の産生が低下した低アルブミン血症や遺伝的に正常な HSA の合成ができない無アルブミン血症が知られている。このような疾病では、あまり重篤な症状を示さないが、疎水性低分子化合物の保持・運搬がうまくできないため、ビリルビンが高濃度に蓄積されてしまうことで黄疸を誘発したり、脂肪酸のクリアランスが正常に機能せず、高脂血症を引き起こすことなどが知られている。

#### 1-4 Cyclooxygenase

Cyclooxygenase (COX) は生体膜に結合したヘムを活性中心に有する膜糖タンパク質である<sup>37-42</sup>。生体内において形質膜などのリン脂質からホスホリパーゼ A<sub>2</sub> の作用により切り出されたアラキドン酸は、アラキドン酸カスケードにおいてプロスタグランジン G<sub>2</sub>(PGG<sub>2</sub>) やプロスタグランジン H<sub>2</sub>(PGH<sub>2</sub>) へと代謝される。PGG<sub>2</sub> や PGH<sub>2</sub> は最終的にプロスタグランジン (P G) 類やトロンボキサン (TX) 類などの生理活性物質へと変換される (Figure 1-14)。COX はそのシクロオキシゲナーゼ活性及びヒドロペルオキシダーゼ活性によりアラキドン酸から PGG<sub>2</sub>、PGG<sub>2</sub> から PGH<sub>2</sub> というアラキドン酸カスケードにおいて最も上流に位置する二段階の反応を触媒し、カスケードにおける律速酵素として働くことが知られている<sup>43</sup>。アラキドン酸カスケードにおいて産生された生理活性物質は、生体内の様々な機能制御に関わっている。



Firestein: Kelley's Textbook of Rheumatology, 8th ed. より引用

Figure 1-13 シクロオキシゲナーゼ (Cyclooxygenase; COX) の結晶構造  
A. COX-1, B. COX-2



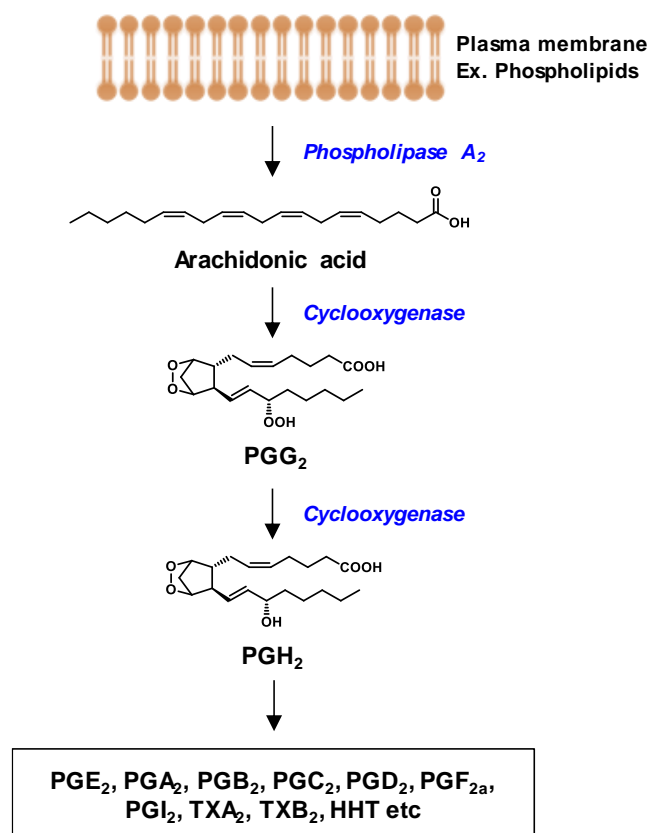


Figure 1-14 アラキドン酸カスケード

#### 1-4-1 COX-1/2/3

現在までに、COX には構成酵素と誘導酵素の二種類が存在することが知られている。構成酵素は常に細胞内に一定量存在し、産生物質の調節は、基質の供給や補酵素、活性化イオンなど酵素の活性化によって行われているのに対し、誘導酵素は細胞内にほとんど存在せず、サイトカイン、増殖因子などにより誘導され、産生物質の調節は酵素の誘導量により行われている。COX-1 および COX-3 は構成酵素、COX-2 は誘導酵素に分類される。これらの酵素によって生成された生理活性物質は、血圧降下、血小板凝集の抑制、消化管の機能の維持、分娩誘発、体温、細胞増殖などの様々な機能制御に関与している。現在まで明らかとなっている COX-1 と COX-2 の性質の違いを [Table 1-1](#) にまとめた (COX-3 は COX-1 の transcript variant であり、その機能として明らかとなっていない点が多い)。この中で最も注目すべき性質の違いとしては、COX-2 は誘導酵素であること、そして COX-2 のみが phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) によって細胞内に遊離した内因性のアラキドン酸を用いて PG を合成できることが挙げられる。

Table 1-1 COX-1 と COX-2 の比較

	COX-1	COX-2
染色体の位置	9	1
mRNAサイズ	2.7-3 kb	4-4.5 kb
構成アミノ酸数	576個	603-604個
タンパク質のサイズ	65 kDa	70 kDa
タンパク質の性質	構成タンパク質	誘導タンパク質
発現細胞	血小板、血管内皮、胃腎臓など、 ほとんど全ての細胞	サイトカイン、増殖因子等に 刺激を受けた白血球などの炎症関 連細胞など
生理的役割	血小板凝集ほか	炎症反応ほか
病態での発現上昇		大腸ポリープ、大腸がん
細胞内局在	小胞体と核膜	小胞体と核膜
使用されるアラキドン酸	外因性	おもに内因性
アラキドン酸以外の脂肪酸	基質になりにくい	基質になりやすい

COX の生理的意義としては、COX-1 は急激な生理反応に対する防御機構に関与しているのに対し、COX-2 は大部分が炎症に関与している点であると考えられている。

COX-1 が関与していると考えられている生理作用としては、血小板凝集、疼痛、胃粘膜保護、生理状態下での血圧及び血流の維持等が挙げられる。例えば出血に対して、血小板(血小板には COX-1 のみしか存在しない)では、アラキドン酸からトロンボキサンチン  $A_2$  (TXA<sub>2</sub>) が生成され、自己を含めた周囲の血小板のレセプターに結合して活性化のシグナルが伝えられることによって活性化血小板が凝集し、止血される。このように COX-2 を誘導する時間的余裕がなく、迅速な反応が必要とされる場合に備えて COX-1 は予防的意味合いをもって存在していると考えられている。

一方、COX-2 が関与していると考えられる生理作用としては、炎症、大腸がん、血管新生、ショックの際の血圧低下、分娩、骨代謝、アポトーシス等が挙げられる。炎症の場合におけるサイトカイン発現に伴う PGE<sub>2</sub> 産生は、浮腫、発熱、発痛に関与するばかりでなく、IL-6 などのサイトカイン産生や VEGF などの増殖因子産生を促し、周囲の炎症系の細胞に COX-2 発現を誘導することから、炎症反応において大きな役割を果たしていると考えられている。

炎症反応とは、本来、異物の侵入や物理的・化学的な刺激による障害を排除し、障害を受けた組織を修復する生理的な生体防御反応であると考えられている。しかしながら、この炎症反応はその過程において生体に多少なりの損傷をもたらし、その程度が過剰となると生体に何らかの支障をきたすようになる。この炎症反応過程にはいくつかのメディエーター

が同時に存在し、これらが相互に作用しあうことで炎症反応は進行する。これらの炎症に関わるメディエーターは脂肪酸・脂質類 (PG、TX、ロイコトリエン、血小板活性化因子)、ペプチド・タンパク質 (ブラジキニン、補体、サイトカイン類)、アミン類 (ヒスタミン、セロトニン) など多岐にわたるが、中でもアラキドン酸代謝産物である PG はこれらの炎症過程において特に注目すべきメディエーターのひとつと考えられる。前述したようにこの PG の生成過程において律速酵素として働いているのが COX である。炎症部位において様々な刺激により COX-2 の発現が誘導され、COX-2 により過剰量の PG の生成が起こる。PG は炎症部位において細動脈を拡張する作用を示し、血流量を増加することでその他のメディエーターの血管透過性を増強する。その結果、炎症反応が過剰となり、何らかの生体障害が引き起こされると考えられる。更に PG は TNF- $\alpha$  や IL-1、IL-6、IL-8 などの炎症性サイトカインなどの誘導に関与することも示され、これらの作用により更なる炎症反応の増幅が起こると考えられる。これらのことから、生体内における COX-2 の過剰な発現は炎症反応の増大をもたらすと考えられる。実際に慢性炎症として捉えられる大腸がん、肺がんなどの様々ながんの病巣やアルツハイマー病などの神経変性疾患、リュウマチ、肝臓疾患、粥状動脈硬化症病巣など、種々の病態部位において COX-2 発現の亢進が免疫組織化学的に確認されている。大腸がんにて代表される多くのがん組織においては PGE<sub>2</sub> などの PG 類の産生が多いことも報告されている<sup>44</sup>。また、COX-2 の阻害剤である NSAIDs によってヒト由来の大腸がん細胞のアポトーシスを誘導することも報告されている<sup>45</sup>。これらの疾病の発症及び進行と COX-2 の発現亢進がどのように関与しているのか、また COX-2 の発現による過剰な PG の生成によって全ての疾病の発症、進行を説明できるかは明らかではないが、COX-2 とこれらの疾病に何らかの関係があると考えられ、現在研究が進められている。

#### 1-4-2 COX-2 の発現調節

前述したように、COX-1 及び COX-3 は構成酵素で、COX-2 は誘導酵素であるが、その違いはプロモーター領域が異なっていることに起因する。COX-1 のプロモーター領域には SP1、AP2 サイトなどは認められるものの、TATA ボックスは認められない。一方、COX-2 のプロモーター領域には、TATA ボックスをはじめ、CRE (cAMP response element)、NF-IL6 (nuclear factor-IL6)、NF- $\kappa$ B (nuclear factor- $\kappa$ B)、SP1 サイトなど、誘導酵素に特徴的な転写因子結合サイトをもっている<sup>46</sup>。さらに、COX-2 mRNA の 3' 領域には、AUUUA 配列 (ARE) が存在しており、mRNA の不安定化に関与していると考えられている<sup>47</sup>。Table 1-2 に COX-2 の活性および発現を制御する因子についてまとめた。

Table 1-2 COX-2 発現を制御する因子

COX-2発現抑制因子	食品成分由来	レスベラトロール、レチノイン酸、カフェイン酸、クロロゲン酸など
	内在性因子	グルココルチコイド、IL-4、IL-10、ビタミンK <sub>2</sub> 、PPARs、15d-PGJ <sub>2</sub>
COX-2発現誘導因子	サイトカイン類	IL-1 $\alpha$ 、IFN $\gamma$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF $\alpha$
	増殖因子	EGF、 $\alpha$ FGF、 $\beta$ FGF、PDGF、TGF、IGF
	ホルモン	FSH、PTH、LH、インスリン
	物理的環境	流れ刺激、機械的刺激、浸透圧、虚血
	その他	PGE <sub>2</sub> 、LPS、NO、発癌プロモーター、リゾフォスファチジルコリン、抗リン脂質抗体
COX-2を直接阻害	非ステロイド系抗炎症薬 (NSAIDs)	
	サリチル酸塩	アスピリン、サルサレート、ジフルニサルなど
	COX-2選択的阻害剤	セレコキシブ、ロフェコキシブ、バルデコキシブなど
	その他	ジクロフェナク、エトドラクなど

#### 1-4-3 粥状動脈硬化症と COX-2

COX-2 が生体内における炎症反応に大きな役割を果たしていることは上記の通りである。よって COX-2 が関わりとされる様々な疾病も炎症反応のひとつとみなすことができる。COX-2 との関与が報告されている疾病としては、リュウマチ<sup>48</sup>、アルツハイマー病<sup>49</sup> などがあるが、特に、がん (大腸がんや皮膚のアデノーマ、肺がん、乳がんなど) については最も多く報告されている。がん病巣の炎症部位では COX-2 の過剰な発現が起こっており<sup>50</sup>、COX-2 遺伝子のノックアウトマウスを用いた実験<sup>51</sup>や、COX-2 の阻害剤 (アスピリン、イブプロフェン、インドメタシン、ピロキシカム、サリンダックなど) を処理した実験により、遺伝的な大腸がんの発症が抑制されるという報告がある<sup>52-54</sup>。しかしながら、大腸がん発症のメカニズムを始め、がん病巣における COX-2 の誘導機構やがんの進行における COX-2 の役割など、依然として不明な点が多い。したがって、COX-2 の過剰発現が直接的に大腸がんの誘発に結びつくのかどうかは疑問として残り、分子生物学的な大腸がん発症機構の解明へのさらなるアプローチが続けられている。

また、1987 年 Sato らは狭心症の中でも、最も急死に至りやすい不安定狭心症患者の冠動脈に、単球やマクロファージが浸潤していることを見だし<sup>55</sup>、動脈硬化が炎症性の疾患として認識されるようになった<sup>56,57</sup>。動脈硬化症、とくに血管内膜下にコレステロールが蓄積する粥状動脈硬化症は、狭心症や心筋梗塞などの虚血性心疾患や脳血管障害などの重篤な疾病の原因となる。このような動脈硬化性疾患は、食の欧米化に伴って増加し、現在では日本における死亡原因の一位となっている。このような背景から、動脈硬化の発症メカニズム

の解明が求められている。1999 年、ヒト粥状動脈硬化病巣 (頸動脈、冠動脈、及び大動脈) における免疫組織化学的研究により、正常動脈では検出されない COX-2 がマクロファージで強く発現していることが示された<sup>58-60</sup>。実際に、COX-2 が律速酵素となりアラキドン酸より生成されるプロスタノイドのいくつかは粥腫の不安定性に関与し動脈硬化を悪化させる<sup>61,62</sup>。しかしながら、プロスタノイドの中には NF- $\kappa$ B を阻害し抗炎症作用を示すものも存在する<sup>63-67</sup>。以上述べたように、COX-2 の動脈硬化へ関与については不明な点が多く、今後の研究が期待される。

## 1-5 目的

翻訳後修飾は生体の恒常性を維持し、多彩な生命現象を制御する上で非常に重要な役割を果たす化学修飾であるが、近年、生体の状態を反映した翻訳後修飾の存在が明らかになってきた。つまり、ある種の翻訳後修飾は疾病の発症や進展に関与したり、あるいは、病気の進行には関与しないものの、病態を反映する翻訳後修飾が存在する。このことから、生体の状態に依存して形成される翻訳後修飾を明らかにすることは、今後、疾病の発症予防や治療方法を確立する上で非常に重要な研究となると考えられる。また、疾患特異的な翻訳後修飾の解明は、バイオマーカーとして疾病の診断に利用が期待される。疾患の早期に形成される修飾構造であれば、病態が進展する前に診断することができるとともに、病気の治療効果を高めたり、病気を予防するという観点からも非常に有用であると考えられる。

そこで本研究では、疾患に依存して増加する翻訳後修飾およびその機能性の解明を目的として研究を行うこととした。2つの内容について研究を行い、一つ目は脂質異常症に着目し、その患者血清中で特異的に増加する修飾タンパク質の探索と修飾に伴う機能性の変化について検討を行った。二つ目の研究では、これまで抗炎症活性を有すると報告されていた 15d-PGJ<sub>2</sub> についてその血清依存的な炎症応答の変化について解析を行った。

# 第 2 章

## S-ホモシステイン化修飾 血清アルブミンによる 炎症誘導

## 第2章 S-ホモシステイン化修飾血清アルブミンによる炎症誘導

### 第1節 はじめに

#### 1-1 生体内における脂質の役割

脂質とは水に不溶で、有機溶媒に可溶であるものと定義される。血液中には、トリグリセリド、リン脂質、遊離脂肪酸、コレステロールの4種類の脂質が存在し、それぞれ生体内で重要な役割を果たす。脂質は、タンパク質と炭水化物と共に三大栄養素のひとつであり、1gにつき約9kcalのエネルギーを放出し、糖やタンパク質の2倍以上の熱量を放出する重要なエネルギー源である。またそれだけでなく、脂質は生体膜の主要な構成成分であるほかに、生理活性脂質やホルモン、胆汁酸などの前駆体でもある。

脂質には、食事によって摂取するものと、生体内で生合成されるものがある。生体内の脂質は、カイロミクロンや超低密度リポタンパク質 (VLDL)、低密度リポタンパク質 (LDL)、高密度リポタンパク質 (HDL) などのリポタンパク質に結合し、血流に乗って全身の細胞に運ばれる。コレステロールは、LDL によって体の隅々まで運ばれ、細胞に取り込まれる。細胞中のコレステロールが余剰な場合には、HDL によってコレステロールは肝臓へと戻される。肝臓に戻ったコレステロールの一部は、胆汁酸となり十二指腸へ排出されるが、多くは腸で再吸収され肝臓に戻る。このように、生体内で厳密に制御され、様々な役割を果たす脂質であるが、生体の脂質が余剰は問題となる場合があり、健康のためにはそのバランスを維持することが重要である。

#### 1-2 血中の脂質量と脂質異常症の関係

脂質異常症とは、血中の LDL やトリグリセリドが過剰に増えるか、または HDL が減少した状態のことである。空腹時の血清中濃度が、LDL コレステロール:140 mg/dL 以上、トリグリセリド:150 mg/dL 以上、HDL コレステロール:40 mg/dL 未満の3つの項目のうち1つでも当てはまると、脂質異常症と診断される。これまでは LDL コレステロールや HDL コレステロールを区別せずに、血中の総コレステロール値が一定の値を超えた状態を「高コレステロール血症」とし、治療の対象とされてきた。しかし、実際に心筋梗塞や脳卒中を起こすリスクが高いのは、血中の LDL 量が高い場合であることが明らかとなってきたため、現在では LDL の管理が重要視されている。また、脂質異常症は、以前は「高脂血症」と呼ばれていたが、血中 HDL は高いことが望ましく、HDL 量が低い場合には病気と診断され

ることから、「高コレステロール血症」と「高脂血症」を合わせて、2007 年から「脂質異常症」という病名が使用されるようになった。

多くの場合、脂質異常症に自覚症状はないが、放置すると動脈硬化が進展し、やがて心筋梗塞や脳卒中などの命に係わる深刻な病気となる。動脈硬化の発症には種々の病気や生活習慣等が関係していると言われているが、それらの中でも脂質異常症が動脈硬化の最も重要な原因であることが分かっている。

このように脂質異常症は命に係わる深刻な病気の原因となりうるが、高血圧や糖尿病と比べて認知度は非常に低い。しかし、厚生労働省の「平成 26 年（2014）患者調査の概況」<sup>68</sup>によると、脂質異常症患者（脂質異常症のため継続的に医療を受けている者）の総数は平成 8 年 96 万 4,000 人であったが、平成 26 年には 206 万 2,000 人と推計されており、その患者数は年々増え続けている。また、男女別の患者は男性が約 59 万 6,000 人であるのに対し、女性は約 146 万 5,000 人であり、男女別の割合では女性の方が男性よりも罹患率が約 2.5 倍多い。さらに年代別割合は、30～39 歳 5.8%、40～49 歳 10.7%、50～59 歳 17.7%、60～69 歳 26.8%、70 歳以上 35.0%であり、加齢に伴って発症しやすい傾向にあることも分かっている<sup>68</sup>。病気の主な原因としては食生活の欧米化や運動不足などが関係していると考えられている。

### 1-3 脂質異常症の種類

脂質異常症は原因によって大きく二つに大別される。原発性高脂血症と二次性高脂血症の二つであり、さらに異常値を示す脂質によって高 LDL コレステロール血症、低 HDL コレステロール血症および高トリグリセリド血症の 3 種類に分けられる。

**原発性高脂血症** 遺伝性の脂質異常症であるが、まだ原因となる遺伝子が解明されていないものもある。「家族性高コレステロール血症」は、遺伝的要因により発症し、生活習慣はその発症に関係ないことが分かっている。

**二次性高脂血症** 別の病気や薬の服用が原因となり発症する脂質異常症で、原因となっている病気の治療や、薬の種類を変えたり、投薬をやめたりすることにより改善する。甲状腺機能低下症や腎臓病などの疾病や、ステロイドホルモンや利尿薬、避妊薬などにより発症することが分かっている。



**高 LDL コレステロール血症**      LDL コレステロールが 140mg/dL 以上の状態の場合に診断される。

**低 HDL コレステロール血症**      HDL コレステロールが 40 mg/dL 未満の場合に診断される。

**高トリグリセリド血症**      トリグリセリドが 150 mg/dL 以上の場合に診断される。

#### 1-4 本研究の目的

血清にはタンパク質、脂質、糖、ホルモン、低分子化合物などの様々な分子が含まれ、それらの物質が体内の隅々まで行き渡り、細胞が正常に機能する上で非常に重要な役割を担っている。一方で、血清に含まれる分子が異常な値に達したり、血清により有害な物質が運搬されたりすると、細胞の正常な働きが抑制され動脈硬化やアルツハイマー病、糖尿病といった様々な疾病の原因となる。しかしながら、血清は成分の多様性及び機能の複雑さゆえに疾病への関与について未知な点が多い。

疾病依存的な翻訳後修飾を探索するため、本研究では生体状態を反映していると考えられる血清を使用して検討を行うことにした。また、特に脂質異常症に着目し、健常者血清と比較して患者血清において特異的に増加する修飾タンパク質の探索を行った。さらに、翻訳後修飾タンパク質が疾病の発症や進展に関与することが予想されることから、同定した修飾タンパク質について、修飾に伴う機能性変化についても評価を行い、疾病の発症や進展への関与についても検討を行うことにした。

## 第2節 ヒト血清に含まれる修飾タンパク質の探索

脂質異常症患者 (LDL $\geq$ 140 mg/dL, トリグリセリド $\geq$ 150 mg/dL, 総コレステロール $\geq$ 220 mg/dL) に着目し、健常者と比較して患者血清中で特異的に形成される修飾タンパク質の探索を行うことにした。

### 2-1 脂質異常症患者特異的な修飾タンパク質の探索

脂質異常症患者血清中に含まれる特異的な修飾タンパク質の探索を行うため、陰イオン交換カラムを用いて、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により分析を行った。分析の結果、健常者血清 (n=5)、脂質異常症患者血清 (n=15) の両方の検体において、リテンションタイム (RT) 14min と 20min 付近に二つの主要なピーク Peak1 (RT: 14min) および Peak2 (RT: 20min) が確認された (Figure 2-1)。

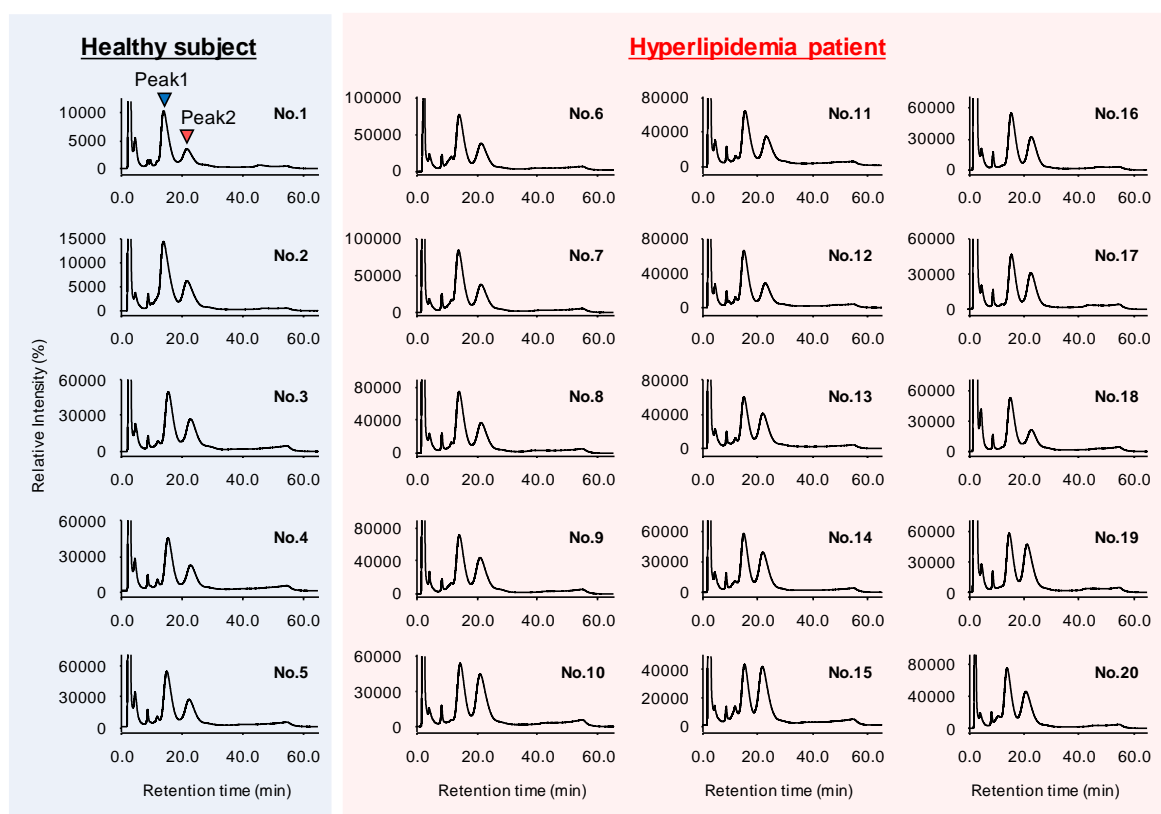
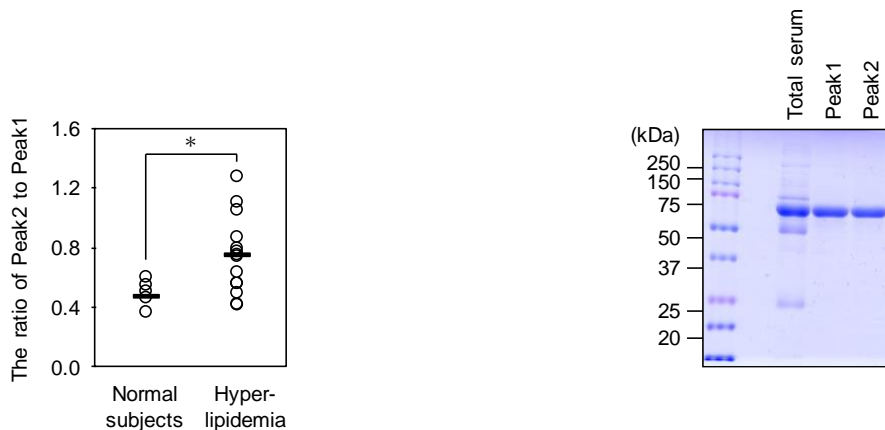


Figure 2-1 陰イオン交換クロマトグラフィーによるヒト血清の分析

健常者 (No.1-5, n=5) および脂質異常症患者 (No. 6-20, n=15) 由来の血清を HPLC の陰イオン交換カラムにより分析し、励起波長 280nm、蛍光波長 340 nm を検出した。

HPLC 分析で得られたクロマトグラムをもとに、Peak1 および Peak2 のピーク面積を解析した結果、脂質異常症患者では、健常者と比較して Peak2 の割合が有意に増加していることが明らかとなった (Figure 2-2)。二つのピークを解析するため、それぞれのピークを単離・精製した後に還元条件下で SDS-PAGE を行った結果、いずれのピークも 65 kDa 付近に主要なバンドが検出された (Figure 2-3)。そこで、バンドを切り出し、還元アルキル化の後にトリプシン消化を行い、MALDI-TOF/TOF MS によりタンパク質同定を行った結果、どちらのバンドもヒト血清アルブミン (human serum albumin: HSA) であると同定された (Table 2-1 and 2-2, Figure 2-4)。単離・精製した二つのピークが抗 HSA 抗体により検出されることを確認した (Figure 2-5)。



**Figure 2-2 Peak1 に対する Peak2 の割合**

Figure 2-1 で得られたクロマトグラムをもとに算出したピーク面積から、Peak1 に対する Peak2 の割合を比較した。\* $p < 0.05$

**Figure 2-3 Peak1 および Peak2 タンパク質の SDS-PAGE**

ヒト血清より単離・精製した Peak1 および Peak2 を還元条件下において SDS-PAGE に供し、CBB 染色により検出した。

Table 2-1 Peak 1 の MALDI-TOF/TOF MS 解析結果

Position	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Missed Cleavage	Score	Peptide
1 - 10	1149.5907	1148.5834	1148.5686	1	79	DAHKSEVAHR.F
5 - 10	698.3707	697.3634	697.3507	0	31	K.SEVAHR.F
11 - 20	1226.5764	1225.5691	1225.5979	1	66	R.FKDLGEENFK.A
13 - 20	951.423	950.4157	950.4345	0	60	K.DLGEENFK.A
21 - 41	2504.3352	2503.3279	2503.2933	0	108	K.ALVLIAFAQYLQQCFEDHVK.L + Propionamide (C)
42 - 51	1149.6576	1148.6503	1148.6077	0	85	K.LVNEVTEFAKT
52 - 64	1526.5875	1525.5802	1525.6024	0	111	K.TCVADESAENCDK.S + 2 Propionamide (C)
65 - 81	1874.9493	1873.942	1874.0084	1	74	K.SLHTLFGDKLCTVATLR.E
65 - 81	1945.9956	1944.9883	1945.0455	1	138	K.SLHTLFGDKLCTVATLR.E + Propionamide (C)
74 - 81	947.5121	946.5048	946.527	0	53	K.LCTVATLR.E + Propionamide (C)
82 - 93	1462.5458	1461.5385	1461.5574	0	102	R.ETYGEMADCCAK.Q + 2 Propionamide (C)
82 - 93	1478.5504	1477.5431	1477.5523	0	110	R.ETYGEMADCCAK.Q + Oxidation (M); 2 Propionamide (C)
94 - 106	1657.7419	1656.7346	1656.7678	1	66	K.QEPERNECFQHK.D
94 - 106	1728.7906	1727.7833	1727.8049	1	83	K.QEPERNECFQHK.D + Propionamide (C)
99 - 106	1089.4939	1088.4866	1088.5073	0	43	R.NECFLQHK.D + Propionamide (C)
99 - 114	1939.8612	1938.8539	1938.9006	1	60	R.NECFLQHKDDNPPLPR.L
99 - 114	1940.8407	1939.8334	1939.8846	1	53	R.NECFLQHKDDNPPLPR.L + Deamidated (NQ)
99 - 114	2010.8983	2009.891	2009.9377	1	121	R.NECFLQHKDDNPPLPR.L + Propionamide (C)
99 - 114	2012.0114	2011.0041	2010.9217	1	47	R.NECFLQHKDDNPPLPR.L + Deamidated (NQ); Propionamide (C)
107 - 114	940.44	939.4327	939.441	0	59	K.DDNPPLPR.L
115 - 136	2593.1797	2592.1724	2592.2352	0	55	R.LVRPEVDVMCTAFHDNEETFLK.K
115 - 136	2664.2209	2663.2136	2663.2724	0	71	R.LVRPEVDVMCTAFHDNEETFLK.K + Propionamide (C)
115 - 137	2721.2783	2720.271	2720.3302	1	88	R.LVRPEVDVMCTAFHDNEETFLK.Y
115 - 137	2792.2959	2791.2886	2791.3673	1	110	R.LVRPEVDVMCTAFHDNEETFLK.Y + Propionamide (C)
115 - 137	2808.3008	2807.2935	2807.3622	1	59	R.LVRPEVDVMCTAFHDNEETFLK.Y + Oxidation (M); Propionamide (C)
137 - 144	1055.5667	1054.5594	1054.5811	1	70	K.KYLYEIAR.R
138 - 144	927.475	926.4678	926.4861	0	49	K.YLYEIAR.R
145 - 159	1899.0016	1897.9943	1897.9879	1	79	R.RHPYFYAPELFFAK.R
146 - 159	1742.9054	1741.8981	1741.8868	0	112	R.HPYFYAPELFFAK.R
163 - 174	1399.5779	1398.5706	1398.5908	0	78	K.AAFTGCCQAADK.A + 2 Propionamide (C)
182 - 186	645.3514	644.3441	644.3493	0	34	K.LDEL.R.D
182 - 190	1074.535	1073.5277	1073.5353	1	57	K.LDEL.RDEGK.A
200 - 205	720.3697	719.3624	719.3636	0	37	K.CASLQK.F + Propionamide (C)
213 - 218	673.3677	672.3605	672.3707	0	40	K.AWAVAR.L
234 - 240	789.4512	788.444	788.4644	0	53	K.LVTDLT.K.V
241 - 257	2128.8262	2127.8189	2127.8772	0	84	K.VHTECCHGDLLCADDR.A + 3 Propionamide (C)
241 - 262	2556.072	2555.0647	2555.1203	1	26	K.VHTECCHGDLLCADDRADLAK.Y + 2 Propionamide (C)
241 - 262	2627.125	2626.1177	2626.1574	1	63	K.VHTECCHGDLLCADDRADLAK.Y + 3 Propionamide (C)
263 - 274	1386.5608	1385.5535	1385.6133	0	29	K.YICENQDSISSK.L
263 - 274	1386.5917	1385.5844	1385.6133	0	70	K.YICENQDSISSK.L
275 - 286	1574.7875	1573.7802	1573.8207	1	46	K.LKECCEKPLLEK.S + 2 Propionamide (C)
287 - 313	2988.375	2987.3677	2987.3528	0	220	K.SHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESK.D + Propionamide (C)
287 - 313	2989.4785	2988.4712	2988.3368	0	86	K.SHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESK.D + Deamidated (NQ); Propionamide (C)
287 - 313	3004.3772	3003.3699	3003.3477	0	120	K.SHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESK.D + Oxidation (M); Propionamide (C)
318 - 323	695.3401	694.3329	694.3286	0	40	K.NYAEAK.D
318 - 336	2300.1023	2299.095	2299.0983	1	148	K.NYAEAKD.VFLGMFLYEYAR.R
324 - 336	1623.8113	1622.804	1622.7803	0	108	K.DVFLGMFLYEYAR.R
324 - 336	1639.7744	1638.7671	1638.7752	0	67	K.DVFLGMFLYEYAR.R + Oxidation (M)
337 - 348	1467.8123	1466.805	1466.8358	1	76	R.RHPDYSVVL.L.L
338 - 348	1311.7167	1310.7094	1310.7347	0	90	R.HPDYSVVL.L.L
352 - 359	984.4741	983.4668	983.4811	0	54	K.TYETLEK.C
360 - 372	1452.5543	1451.547	1451.5632	0	61	K.CCAAADPHECYAK.V + Propionamide (C)
360 - 372	1523.5923	1522.585	1522.6003	0	65	K.CCAAADPHECYAK.V + 2 Propionamide (C)
360 - 372	1594.6331	1593.6258	1593.6374	0	79	K.CCAAADPHECYAK.V + 3 Propionamide (C)
373 - 389	2045.0439	2044.0366	2044.0881	0	131	K.VFDEFKPLVEEPQNLK.Q
390 - 402	1600.6633	1599.656	1599.7239	0	48	K.QNCELFEQLGEYK.F
390 - 402	1671.7059	1670.6986	1670.761	0	97	K.QNCELFEQLGEYK.F + Propionamide (C)
390 - 410	2542.2466	2541.2393	2541.2686	1	125	K.QNCELFEQLGEYKFQNAL.LVR.Y
390 - 410	2613.2869	2612.2796	2612.3057	1	149	K.QNCELFEQLGEYKFQNAL.LVR.Y + Propionamide (C)
390 - 410	2614.4141	2613.4068	2613.2897	1	110	K.QNCELFEQLGEYKFQNAL.LVR.Y + Deamidated (NQ); Propionamide (C)
403 - 410	960.5303	959.523	959.5552	0	63	K.FQNAL.LVR.Y
414 - 428	1639.91	1638.9027	1638.9305	1	122	K.VPQVSTPTLVEVSR.N
415 - 428	1511.7891	1510.7818	1510.8355	0	128	K.VPQVSTPTLVEVSR.N
415 - 428	1511.9017	1510.8944	1510.8355	0	106	K.VPQVSTPTLVEVSR.N
437 - 444	986.4459	985.4386	985.4473	1	43	K.CCKHPEAK.R + Propionamide (C)
445 - 466	2702.3389	2701.3316	2701.339	1	65	K.RMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKT + 2 Propionamide (C)
467 - 475	1002.5547	1001.5474	1001.5506	1	27	K.TPVSDRVTK.C
476 - 484	1095.4795	1094.4722	1094.4848	0	51	K.CCTESLVNR.R + Propionamide (C)
476 - 484	1166.5199	1165.5126	1165.522	0	59	K.CCTESLVNR.R + 2 Propionamide (C)
485 - 500	1853.8702	1852.8629	1852.9029	0	68	R.RPCFSALEVDETYVPK.E
485 - 500	1924.8923	1923.885	1923.94	0	86	R.RPCFSALEVDETYVPK.E + Propionamide (C)
501 - 519	2273.9648	2272.9575	2273.031	0	136	K.EFNAETFTFHADICTLSEK.E + Propionamide (C)
501 - 519	2275.1055	2274.0982	2274.015	0	28	K.EFNAETFTFHADICTLSEK.E + Deamidated (NQ); Propionamide (C)
501 - 521	2489.1816	2488.1743	2488.1216	1	48	K.EFNAETFTFHADICTLSEKER.Q + Deamidated (NQ)
501 - 521	2559.1133	2558.106	2558.1747	1	177	K.EFNAETFTFHADICTLSEKER.Q + Propionamide (C)
525 - 534	1128.6528	1127.6455	1127.6914	1	94	K.QTALVELVK.H
526 - 534	1000.5637	999.5564	999.5964	0	71	K.QTALVELVK.H
546 - 557	1342.6814	1341.6741	1341.6275	0	84	K.AVMDDFAAFVEK.C
546 - 557	1358.5752	1357.5679	1357.6224	0	103	K.AVMDDFAAFVEK.C + Oxidation (M)

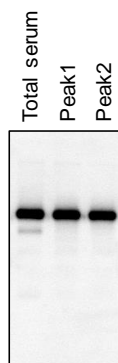
Table 2-2 Peak 2 の MALDI-TOF/TOF MS 解析結果

Position	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Missed Cleavage	Score	Peptide
1 - 10	1149.6279	1148.6206	1148.5686	1	82	DAHKSEVAHR.F
5 - 10	698.387	697.3797	697.3507	0	30	K.SEVAHR.F
11 - 20	1226.6522	1225.6449	1225.5979	1	65	R.FKDLGEENFK.A
13 - 20	951.4334	950.4261	950.4345	0	62	K.DLGEENFK.A
21 - 41	2434.2598	2433.2525	2433.2402	0	38	K.ALVLIAFAQYLQQCPFEDHVK.L + Deamidated (NQ)
21 - 41	2504.3069	2503.2996	2503.2933	0	108	K.ALVLIAFAQYLQQCPFEDHVK.L + Propionamide (C)
21 - 41	2505.3181	2504.3108	2504.2773	0	47	K.ALVLIAFAQYLQQCPFEDHVK.L + Deamidated (NQ); Propionamide (C)
42 - 51	1149.5868	1148.5795	1148.6077	0	72	K.LVNEVTEFAK.T
65 - 73	1017.5012	1016.4939	1016.5291	0	57	K.SLHTLFGDK.L
65 - 81	1874.9221	1873.9148	1874.0084	1	88	K.SLHTLFGDKLCTVATLR.E
65 - 81	1945.9714	1944.9641	1945.0455	1	143	K.SLHTLFGDKLCTVATLR.E + Propionamide (C)
74 - 81	947.5287	946.5215	946.527	0	52	K.LCTVATLR.E + Propionamide (C)
82 - 93	1391.4935	1390.4862	1390.5203	0	49	R.ETYGEMADCCAK.Q + Propionamide (C)
82 - 93	1462.5707	1461.5634	1461.5574	0	96	R.ETYGEMADCCAK.Q + 2 Propionamide (C)
82 - 93	1478.6016	1477.5943	1477.5523	0	111	R.ETYGEMADCCAK.Q + Oxidation (M); 2 Propionamide (C)
94 - 106	1657.7701	1656.7628	1656.7678	1	72	K.QEPERNECFLQHK.D
94 - 106	1728.8123	1727.805	1727.8049	1	82	K.QEPERNECFLQHK.D + Propionamide (C)
94 - 106	1729.7687	1728.7614	1728.7889	1	30	K.QEPERNECFLQHK.D + Deamidated (NQ); Propionamide (C)
99 - 106	1089.5018	1088.4945	1088.5073	0	54	R.NECFLQHK.D + Propionamide (C)
99 - 114	1939.8688	1938.8615	1938.9006	1	84	R.NECFLQHKDDNPPLR.L
99 - 114	1940.8682	1939.8609	1939.8846	1	32	R.NECFLQHKDDNPPLR.L + Deamidated (NQ)
99 - 114	2010.9178	2009.9105	2009.9377	1	98	R.NECFLQHKDDNPPLR.L + Propionamide (C)
99 - 114	2012.0138	2011.0065	2010.9217	1	21	R.NECFLQHKDDNPPLR.L + Deamidated (NQ); Propionamide (C)
107 - 114	940.4733	939.4661	939.441	0	59	K.DDNPPLR.L
115 - 136	2593.1545	2592.1472	2592.2352	0	32	R.LVRPEVDVMCTAFHDNEETFLK.K
115 - 136	2664.1797	2663.1724	2663.2724	0	77	R.LVRPEVDVMCTAFHDNEETFLK.K + Propionamide (C)
115 - 137	2721.2466	2720.2393	2720.3302	1	67	R.LVRPEVDVMCTAFHDNEETFLK.Y
115 - 137	2792.2712	2791.2639	2791.3673	1	102	R.LVRPEVDVMCTAFHDNEETFLK.Y + Propionamide (C)
115 - 137	2808.2727	2807.2654	2807.3622	1	56	R.LVRPEVDVMCTAFHDNEETFLK.Y + Oxidation (M); Propionamide (C)
137 - 144	1055.636	1054.6287	1054.5811	1	63	K.KVLYEIAR.R
138 - 144	927.4799	926.4726	926.4861	0	44	K.YLYEIAR.R
145 - 159	1898.9993	1897.992	1897.9879	1	78	R.RHPYFYAPELFFAK.R
146 - 159	1742.8868	1741.8795	1741.8868	0	100	R.RHPYFYAPELFFAK.R
163 - 174	1399.6169	1398.6096	1398.5908	0	64	K.AAFTECCQAADK.A + 2 Propionamide (C)
175 - 181	786.4415	785.4342	785.4469	0	33	K.AACLLPK.L + Propionamide (C)
182 - 190	1074.5723	1073.565	1073.5353	1	57	K.LDELRDEGK.A
200 - 205	720.3903	719.383	719.3636	0	40	K.CASLOK.F + Propionamide (C)
213 - 218	673.3762	672.3689	672.3707	0	40	K.AWAVAR.L
219 - 225	875.5167	874.5094	874.5025	1	33	R.LSQRFPAK.A
234 - 240	789.4596	788.4523	788.4644	0	54	K.LVTLTK.V
241 - 257	2128.8599	2127.8526	2127.8772	0	109	K.VHTECCHGDLLECAADDR.A + 3 Propionamide (C)
241 - 262	2556.0796	2555.0723	2555.1203	1	37	K.VHTECCHGDLLECAADDRADLAK.Y + 2 Propionamide (C)
241 - 262	2627.1257	2626.1184	2626.1574	1	92	K.VHTECCHGDLLECAADDRADLAK.Y + 3 Propionamide (C)
263 - 274	1386.5618	1385.5545	1385.6133	0	59	K.YICENQDSISSK.L
263 - 274	1457.6744	1456.6671	1456.6504	0	56	K.YICENQDSISSK.L + Propionamide (C)
275 - 286	1574.8185	1573.8112	1573.8207	1	72	K.LKECKEPLLEK.S + 2 Propionamide (C)
287 - 313	2988.3418	2987.3345	2987.3528	0	227	K.SHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESK.D + Propionamide (C)
287 - 313	3004.3215	3003.3142	3003.3477	0	155	K.SHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESK.D + Oxidation (M); Propionamide (C)
318 - 323	695.3604	694.3531	694.3286	0	45	K.NYAEAK.D
318 - 336	2300.1016	2299.0943	2299.0983	1	142	K.NYAEAKDVFLGMFLYEYAR.R
318 - 336	2301.1069	2300.0996	2300.0823	1	82	K.NYAEAKDVFLGMFLYEYAR.R + Deamidated (NQ)
324 - 336	1623.7968	1622.7895	1622.7803	0	100	K.DVFLGMFLYEYAR.R
324 - 336	1639.7778	1638.7705	1638.7752	0	58	K.DVFLGMFLYEYAR.R + Oxidation (M)
337 - 348	1467.783	1466.7757	1466.8358	1	79	R.RHPDYSVLLLR.L
338 - 348	1311.6967	1310.6894	1310.7347	0	83	R.RHPDYSVLLLR.L
352 - 359	984.4985	983.4912	983.4811	0	73	K.TYETLEK.C
360 - 372	1523.642	1522.6347	1522.6003	0	48	K.CCAAADPHECYAK.V + 2 Propionamide (C)
360 - 372	1594.6838	1593.6765	1593.6374	0	73	K.CCAAADPHECYAK.V + 3 Propionamide (C)
373 - 389	2045.0261	2044.0188	2044.0881	0	119	K.VFDEKPLVEEPQNLK.Q
390 - 402	1600.6648	1599.6575	1599.7239	0	72	K.QNCELFEQLGEYK.F
390 - 402	1671.6873	1670.68	1670.761	0	103	K.QNCELFEQLGEYK.F + Propionamide (C)
390 - 410	2542.2207	2541.2134	2541.2686	1	132	K.QNCELFEQLGEYKFNALLVR.Y
390 - 410	2613.2551	2612.2478	2612.3057	1	155	K.QNCELFEQLGEYKFNALLVR.Y + Propionamide (C)
390 - 410	2613.2961	2612.2888	2612.3057	1	54	K.QNCELFEQLGEYKFNALLVR.Y + Propionamide (C)
390 - 410	2614.2957	2613.2884	2613.2897	1	89	K.QNCELFEQLGEYKFNALLVR.Y + Deamidated (NQ); Propionamide (C)
403 - 410	960.5396	959.5323	959.5552	0	59	K.FQNALLVR.Y
414 - 428	1639.9016	1638.8943	1638.9305	1	126	K.VPQVSTPTLVEVSR.N
415 - 428	1511.8065	1510.7992	1510.8355	0	119	K.VPQVSTPTLVEVSR.N
445 - 466	2702.3391	2701.3318	2701.339	1	77	K.RMPCAEDYLSVLLNQLCVLHEK.T + 2 Propionamide (C)
467 - 472	674.3772	673.3699	673.3395	0	43	K.TPVSDR.V
476 - 484	1024.4467	1023.4394	1023.4477	0	48	K.CCTESLVNR.R
476 - 484	1095.4441	1094.4368	1094.4848	0	57	K.CCTESLVNR.R + Propionamide (C)
476 - 484	1166.5387	1165.5314	1165.522	0	62	K.CCTESLVNR.R + 2 Propionamide (C)
485 - 500	1853.8573	1852.85	1852.9029	0	98	R.RPCFSALEVDETYVPK.E
485 - 500	1924.8708	1923.8635	1923.94	0	96	R.RPCFSALEVDETYVPK.E + Propionamide (C)
501 - 519	2202.9299	2201.9226	2201.9939	0	125	K.EFNAETFTFHADICTLSEK.E
501 - 519	2203.9517	2202.9444	2202.9779	0	25	K.EFNAETFTFHADICTLSEK.E + Deamidated (NQ)
501 - 519	2273.9424	2272.9351	2273.031	0	151	K.EFNAETFTFHADICTLSEK.E + Propionamide (C)
501 - 521	2489.0874	2488.0801	2488.1216	1	55	K.EFNAETFTFHADICTLSEKER.Q + Deamidated (NQ)
501 - 521	2489.137	2488.1297	2488.1216	1	73	K.EFNAETFTFHADICTLSEKER.Q + Deamidated (NQ)
501 - 521	2559.0745	2558.0672	2558.1747	1	187	K.EFNAETFTFHADICTLSEKER.Q + Propionamide (C)
525 - 534	1128.6578	1127.6505	1127.6914	1	84	K.QGTALVELVK.H
526 - 534	1000.5624	999.5551	999.5964	0	71	K.QTALVELVK.H
546 - 557	1342.577	1341.5697	1341.6275	0	44	K.AVMDDFAAFVEK.C
546 - 557	1342.6844	1341.6771	1341.6275	0	96	K.AVMDDFAAFVEK.C
546 - 557	1358.6757	1357.6684	1357.6224	0	84	K.AVMDDFAAFVEK.C + Oxidation (M)

<b>A</b>					
1	DAHKSEVAHR	FKDLGEENFK	ALVLIAFAQY	LQQCPFEDHV	KLVNEVTEFA
51	KTCVADESAE	NCDKSLHTLF	GDKLCTVATL	RETYGEMADC	CAKQEPERNE
101	CFLQHKDDNP	NLPRLVRPEV	DVMCTAFHDN	EETFLKKYLY	EIARRHPYFY
151	APELLFFAKR	YKAAFECCQ	AADKAACLLP	KLDELRLDEGK	ASSAKQRLKC
201	ASLQKFGERA	FKAWAVARLS	QRFPKAEFAE	VSKLVTDLTK	VHTECCHGDL
251	LECADDRADL	AKYICENQDS	ISSKLEKCE	KPLLEKSHCI	AEVENDEMPA
301	DLPSLAADFV	ESKDVCKNYA	EAKDVFLGMF	LYEYARRHPD	YSVLLLRLA
351	KTYETTLEKC	CAAADPHECY	AKVFDEFKPL	VEEPQNLIKQ	NCELFEQLGE
401	YKFQNALLVR	YTKKVPQVST	PTLVEVSRNL	GKVGSKCCKH	PEAKRMPCAE
451	DYLSVLNQL	CVLHEKTPVS	DRVTKCCTES	LVNRRPCFSA	LEVDETVVPK
501	EFNAETFTFH	ADICTLSEKE	RQIKKQTALV	ELVKHKPKAT	KEQLKAVMDD
551	FAAFVEKCKK	ADDKETCFAE	EGKKLVAAASQ	AALGL	
<b>B</b>					
1	DAHKSEVAHR	FKDLGEENFK	ALVLIAFAQY	LQQCPFEDHV	KLVNEVTEFA
51	KTCVADESAE	NCDKSLHTLF	GDKLCTVATL	RETYGEMADC	CAKQEPERNE
101	CFLQHKDDNP	NLPRLVRPEV	DVMCTAFHDN	EETFLKKYLY	EIARRHPYFY
151	APELLFFAKR	YKAAFECCQ	AADKAACLLP	KLDELRLDEGK	ASSAKQRLKC
201	ASLQKFGERA	FKAWAVARLS	QRFPKAEFAE	VSKLVTDLTK	VHTECCHGDL
251	LECADDRADL	AKYICENQDS	ISSKLEKCE	KPLLEKSHCI	AEVENDEMPA
301	DLPSLAADFV	ESKDVCKNYA	EAKDVFLGMF	LYEYARRHPD	YSVLLLRLA
351	KTYETTLEKC	CAAADPHECY	AKVFDEFKPL	VEEPQNLIKQ	NCELFEQLGE
401	YKFQNALLVR	YTKKVPQVST	PTLVEVSRNL	GKVGSKCCKH	PEAKRMPCAE
451	DYLSVLNQL	CVLHEKTPVS	DRVTKCCTES	LVNRRPCFSA	LEVDETVVPK
501	EFNAETFTFH	ADICTLSEKE	RQIKKQTALV	ELVKHKPKAT	KEQLKAVMDD
551	FAAFVEKCKK	ADDKETCFAE	EGKKLVAAASQ	AALGL	

**Figure 2-4 Peak 1 および Peak 2 のタンパク質同定**

ヒト血清より単離・精製した (A) Peak 1 および (B) Peak 2 を還元アルキル化処理の後にトリプシン酵素消化し、MALDI-TOF/TOF MS によりタンパク質同定を行った。カバーされたアミノ酸配列を赤色で示す。



**Figure 2-5 Peak1 HSA および Peak2 HSA のウエスタンブロッティング**  
ヒト血清より単離・精製した Peak1 HSA および Peak2 HSA をウエスタンブロッティングに供し、抗 HSA 抗体により検出した。

## 2-2 脂質異常症患者特異的に形成される修飾血清アルブミンの解析

Peak1 HSA および Peak2 HSA についてさらなる分析をするため、血清から単離・精製したサンプルを用いて解析を行った。各ピークを限外濾過により濃縮し、非還元 SDS-PAGE および native-PAGE に供した後、CBB 染色によりバンドを検出した。その結果、非還元 SDS-PAGE、native-PAGE いずれの検討によっても Peak1 HSA と Peak2 HSA でバンドに差は認められなかった (Figure 2-6)。それぞれのサンプルを酵素消化せずに MALDI-TOF/TOF MS の Linear Mode によりタンパク質の全長を解析した結果、Peak2 HSA は Peak1 HSA と比較して 213 Da の増加が認められた (Figure 2-7)。以上の結果から、Peak2 HSA は低分子化合物によって修飾を受けている可能性が示唆された。

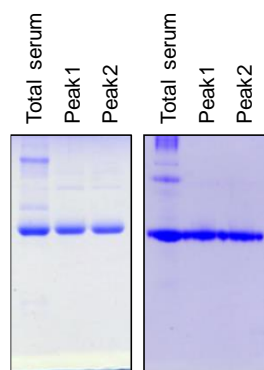


Figure 2-6 Peak1 および Peak2 HSA の分析

ヒト血清より単離・精製した Peak1 HSA および Peak2 HSA を非還元 SDS-PAGE (左)、native-PAGE (右) に供し、CBB 染色によりバンド検出した。

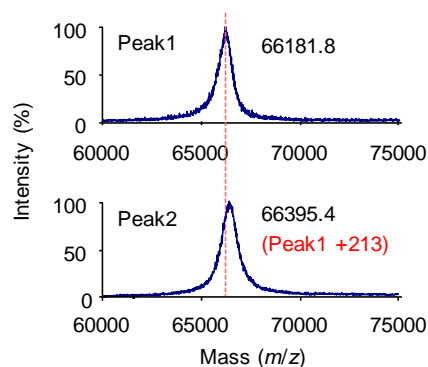
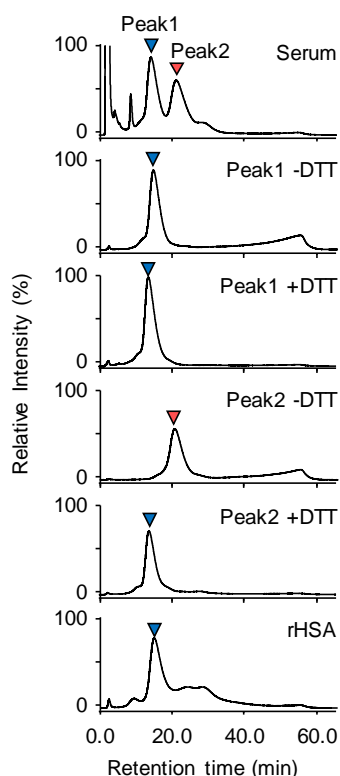


Figure 2-7 全長タンパク質の解析

ヒト血清より単離・精製した Peak1 HSA および Peak2 HSA を MALDI-TOF/TOF MS の Linear Mode によって測定し、全長タンパク質を解析した。

HSA はタンパク質中のシステイン残基の修飾状態によって還元型 HSA (redHSA) と酸化型 HSA (oxHSA) の二つの状態が存在することが報告されている。そこで、陰イオンクロマトグラフィーにより確認された Peak1 HSA と Peak2 HSA は、タンパク質中のシステイン残基の酸化還元状態に由来するのではないかと予想した。ヒト血清より単離・精製した Peak1 HSA および Peak2 HSA をジチオスレイトール (DTT) により還元処理した後に先ほどと同様に陰イオン交換カラムを用いて分析した結果、Peak1 HSA は還元処理の有無によって RT に違いは認められなかった一方、Peak2 HSA は還元処理によって溶出時間が早くなり、Peak1 HSA と同じ RT に溶出された (Figure 2-8)。このことから、Peak1 HSA はタンパク質のシステイン残基が遊離の状態である redHSA であり、Peak2 HSA はシステイン残基が低分子チオール化合物により修飾を受けた oxHSA であることが明らかとなった。また、還元処理によ

り Peak2 HSA が Peak1 HSA と同じ挙動を示したことから、Peak2 HSA のシステイン残基は低分子チオール化合物とジスルフィド結合を形成しており、酸化修飾の中でも *S*-チオール化修飾を受けていることが明らかとなった。



**Figure 2-8 Peak1 HSA および Peak2 HSA の還元処理による変化**  
Peak1 HSA および Peak2 HSA を DTT で3時間処理し、HPLC の陰イオン交換クロマトグラフィーにより分析を行い、励起波長 280 nm、蛍光波長 340 nm を測定した。

## 2-3 タンパク質 *S*-チオール化の解析

ここまでの検討の結果、脂質異常症患者血清中には低分子チオール化合物により修飾を受けた oxHSA が多く存在することが明らかとなった。HSA はタンパク質中のシステイン残基がシステインやグルタチオンなどの低分子チオール化合物とジスルフィド結合を形成し、oxHSA となることが報告されている<sup>69</sup>。そこで、次に脂質異常症患者血清で増加が認められた oxHSA がどのような低分子チオール化合物とジスルフィド結合を形成しているか検討を行うことにした。

### 2-3-1 LC-MS/MS による低分子チオール化合物の検出方法の確立

低分子チオール化合物は LC-MS/MS による検出感度が低いため、チオール基と特異的に反応する試薬である 2-(dimethylamino)ethylaminosulfonyl-7-chloro-2,1,3-benzoxadiazole (DAABD-Cl) により誘導体化した後に検出を行うこととした (Figure 2-9)。DAABD-Cl は 4 位末端に存在するジメチルアミノ基がイオン化しやすいため、誘導体化をすることで LC-



MS/MS による低分子チオール化合物の高感度な検出が可能となる<sup>70,71</sup>。DAABD-Cl を用いた低分子チオール化合物の検出方法の確立にはシステインおよびホモシステイン、また、生体内に豊富に存在することが知られている還元型グルタチオンを用いた。チオール低分子化合物を DAABD-Cl と混合し、40 °C で 20 分間加熱して誘導体化した後、DABBD 誘導体化低分子チオール化合物を LC-MS/MS に供した。その結果、いずれの低分子チオール化合物についても誘導体化物に相当する

質量電荷比のピークが確認された。LC-MS/MS の最適化の結果、共通するプロダクトイオンとして誘導体化試薬 (DAABD) 由来の  $m/z$  72.2 が検出された (Figure 2-10)。

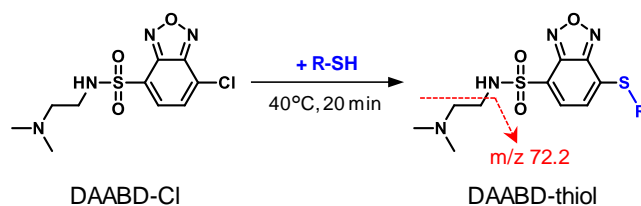


Figure 2-9 DAABD-Cl の低分子チオール化合物との反応

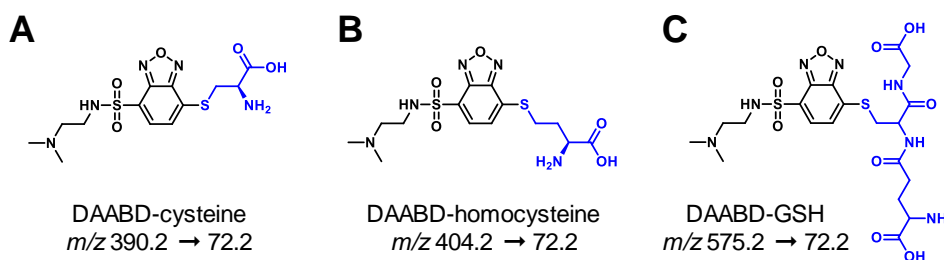


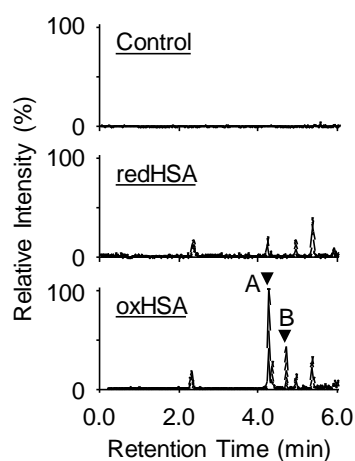
Figure 2-10 誘導体化低分子チオール化合物の化学構造

MS/MS 測定には、MRM ポジティブモードで (A) システイン (390.2 > 72.2)、(B) ホモシステイン (404.2 > 72.2)、(C) グルタチオン (575.2 > 72.2) を使用した。

### 2-3-2 血清アルブミン由来の低分子チオール化合物の検出・同定

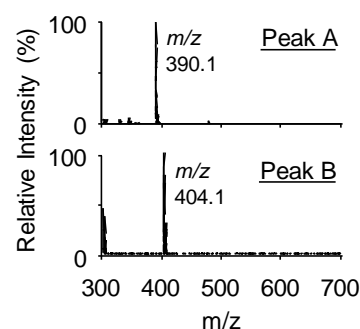
DAABD 誘導体化低分子チオール化合物は DAABD 由来の  $m/z$  72.0 がプロダクトイオンが形成される。そこでプリカーサーイオンスキャンによって  $m/z$  72.0 をプロダクトイオンに持つプリカーサーイオンを検出することにより、生体サンプル由来の低分子チオール化合物を検出することにした。ヒト血清より単離・精製した redHSA および oxHSA を TCEP により 57°C で 30 分間還元処理した後、限外ろ過により 3 kDa 以下の画分を回収して低分子化合物画分とし、DAABD-Cl により誘導体化した。プリカーサーイオンスキャンの結果、redHSA と比較して、oxHSA において増加する二つのピークとして Peak A および Peak B が認められた (Figure 2-11)。Peak A が  $m/z$  390.1、Peak B が  $m/z$  404.1 の質量電荷比を有することから (Figure 2-12)、二つのピークはそれぞれシステインとホモシステインの誘導体化物であると予想された。そこで、Peak A および Peak B を標品の DAABD 誘導体化システイン

(DAABD-Cys) および DAABD 誘導体化ホモシステイン (DAABD-Hcys) と比較した結果、RT が一致したことから、oxHSA のシステイン残基は低分子のシステインおよびホモシステインとジスルフィド結合を形成していることが明らかになった (Figure 2-13)。



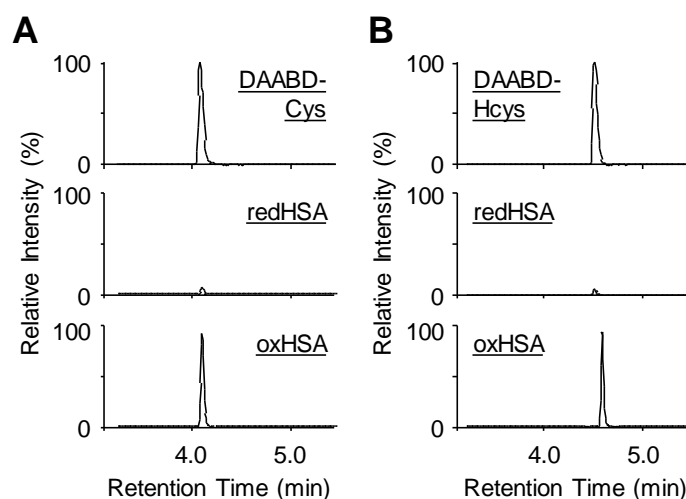
**Figure 2-11** 血清アルブミン由来の低分子チオール化合物の検出

脂質異常症患者血清より単離・精製した redHSA および oxHSA 由来の低分子化合物を DAABD-Cl により誘導体化した後、LC-MS/MS のプリカーサーイオンスキャンにより低分子チオール化合物を検出した。



**Figure 2-12** プリカーサーイオンスキャンのポジティブイオンスペクトル

PeakA は m/z 390.1 (上)、PeakB は m/z 404.1 (下) の質量電荷比を有する。

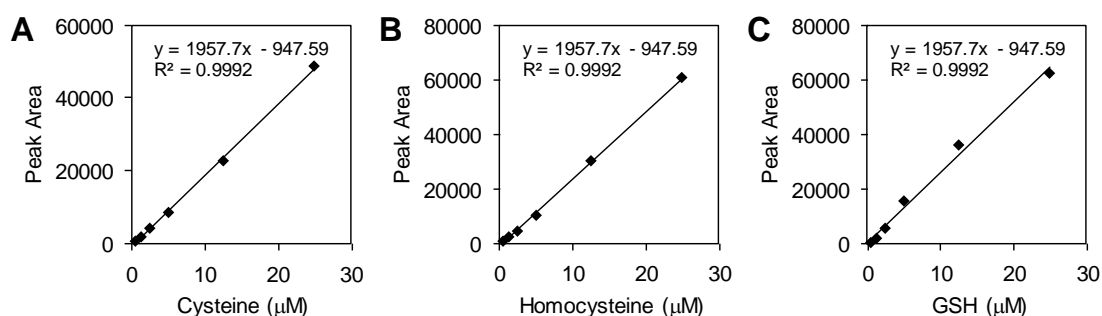


**Figure 2-13** 低分子チオール化合物の検出

LC-MS/MS の MRM ポジティブモードにより (A) DAABD-Cys、(B) DAABD-Hcys を検出した。

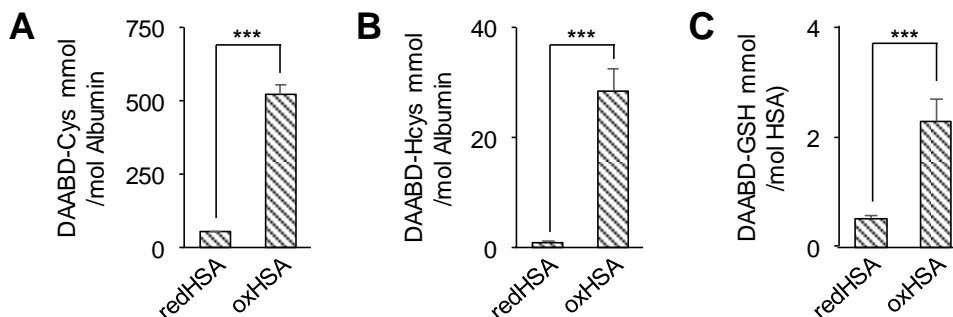
### 2-3-3 HSA 結合型低分子化合物の定量

HSA 結合型のシステインおよびホモシステインを安定同位体希釈法を用いて LC-MS/MS により定量することにした。ヒト血清より単離・精製した redHSA および oxHSA に一定量の安定同位体システイン及びホモシステインを添加し、TCEP により 57°C で 30 分間還元処理した後、限外ろ過により 3 kDa 以下の画分を回収して低分子化合物画分とした。回収した低分子化合物画分に DAABD-Cl を加え、40°C で 20 分間加熱して誘導体化し、LC-MS/MS の MRM ポジティブイオンモードにより定量を行った。標品の低分子チオール化合物を使用して作製した検量線 (Figure 2-14) から HSA 1 mol 当たりの低分子チオール化合物量 (mol) を算出した結果、システインおよびホモシステインのいずれの低分子チオール化合物も redHSA と比較して oxHSA において有意な増加が認められた (Figure 2-15 A, B)。また、GSH についても定量を行った結果、redHSA と比較して oxHSA において有意な増加が認められたが、その量はシステインやホモシステインと比較して非常に少ないことが明らかとなった (Figure 2-15 C)。



**Figure 2-14** 低分子チオール化合物の検量線

Figure 2-11 に示した測定条件を用いて安定同位体希釈法により (A)システイン、(B)ホモシステイン、(C) GSH の検量線を作製した。



**Figure 2-15** 低分子チオール化合物の定量

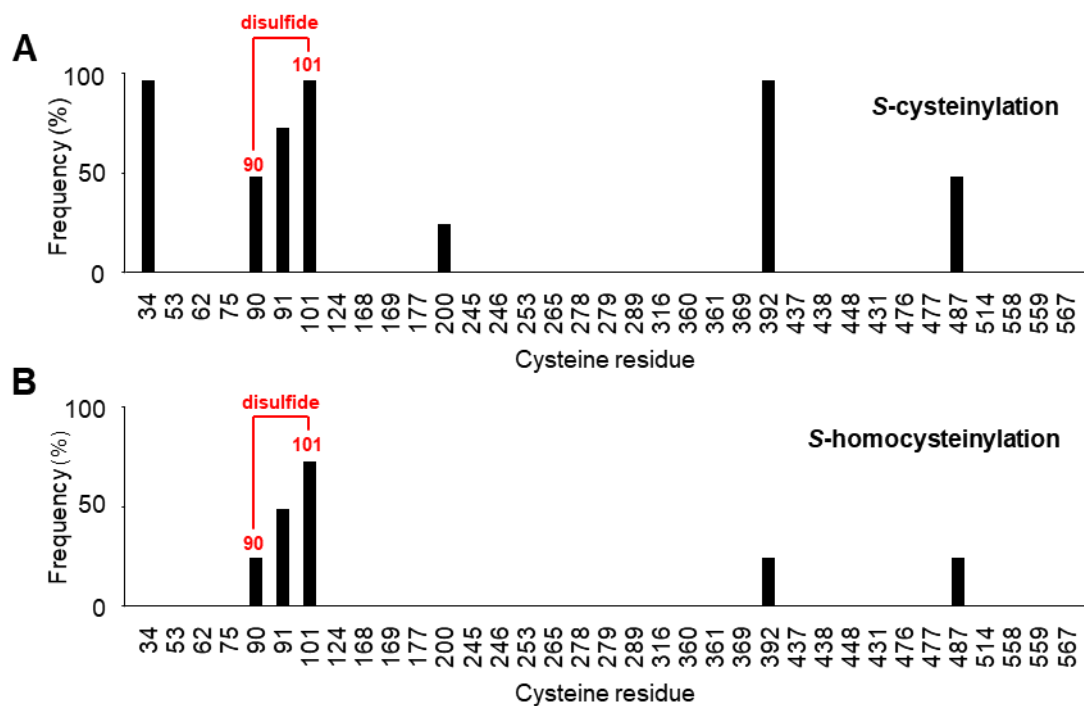
LC-MS/MS の MRM ポジティブモードにより redHSA および oxHSA に含まれる (A)システイン、(B)ホモシステイン、(C) GSH を安定同位体希釈法により定量した。\*\*\* $p < 0.005$

### 第3節 S-チオール化修飾部位の解析

ここまでの検討の結果、oxHSA はタンパク質中のシステイン残基が S-システイン化修飾および S-ホモシステイン化修飾を受けていることが明らかとなった。そこで次に、S-チオール化修飾部位を明らかにするため、MALDI-TOF/TOF MS を用いてシステイン残基の S-チオール化修飾の解析を行った。

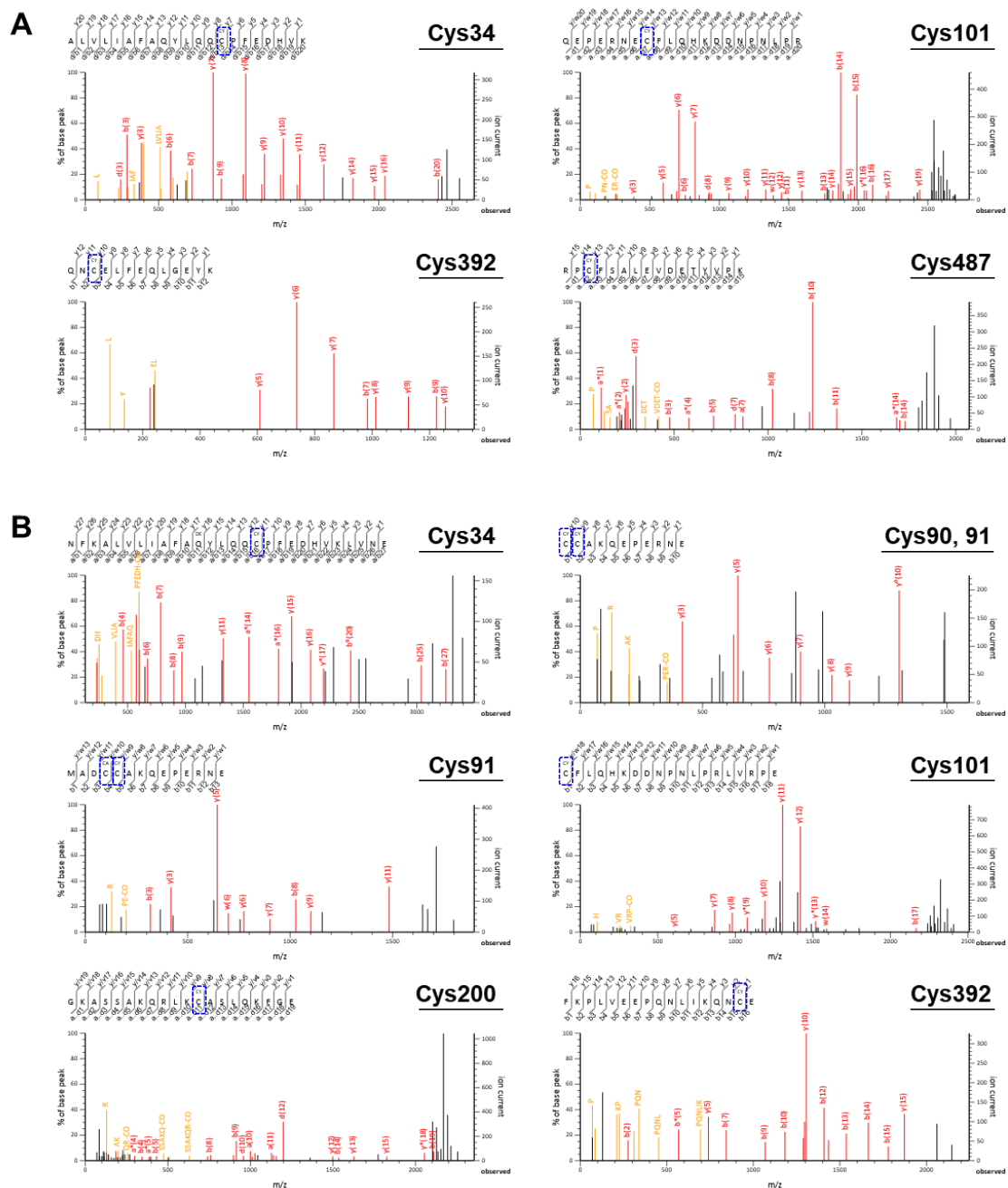
#### 3-1 脂質異常症患者血清由来血清アルブミンの解析

脂質異常症患者血清より単離・精製した oxHSA を TCA 沈殿により沈殿させた後、8 M Urea に再溶解した。S-チオール化修飾はシステイン残基とジスルフィド結合を形成した修飾構造であることから、還元処理を行わず、ヨードアセトアミドで遊離のシステイン残基をアルキル化した後、トリプシンあるいは V8 プロテアーゼによって非還元条件下において酵素消化を行った。その後、nanoLC により逆相カラムを用いて消化サンプルを分画したサンプルを MALDI プレートにスポットし、MALDI TOF/TOF MS に供した。解析の結果、これまで S-チオール化修飾の標的として考えられていた HSA 中に唯一存在する遊離のシステイン残基である Cys34 だけでなく、分子ジスルフィド結合を形成しているシステイン残基についても S-チオール化修飾を受けていることが明らかとなった。S-システイン化修飾については、Cys34 に加えて、全てのサンプル中で Cys101 と Cys392 の修飾が確認されたほか、3 検体で Cys90 と Cys487 が、1 検体で Cys200 の修飾が確認された (Figure 2-16 A, 2-17)。また S-ホモシステイン化修飾については S-システイン化修飾と比較して修飾が確認されたシステイン残基数は少なかったが、S-システイン化修飾と同様に Cys90 や Cys101 などの分子内ジスルフィド結合を形成している複数のシステイン残基において修飾が確認された (Figure 2-16 B, 2-18)。MALDI-TOF/TOF MS 測定により明らかとなった S-チオール化修飾を受けたシステイン残基は、HSA の薬物結合サイトの近傍に位置していたことから、システイン残基の S-チオール化修飾が HSA の構造変化や機能変化に寄与している可能性が示唆された。

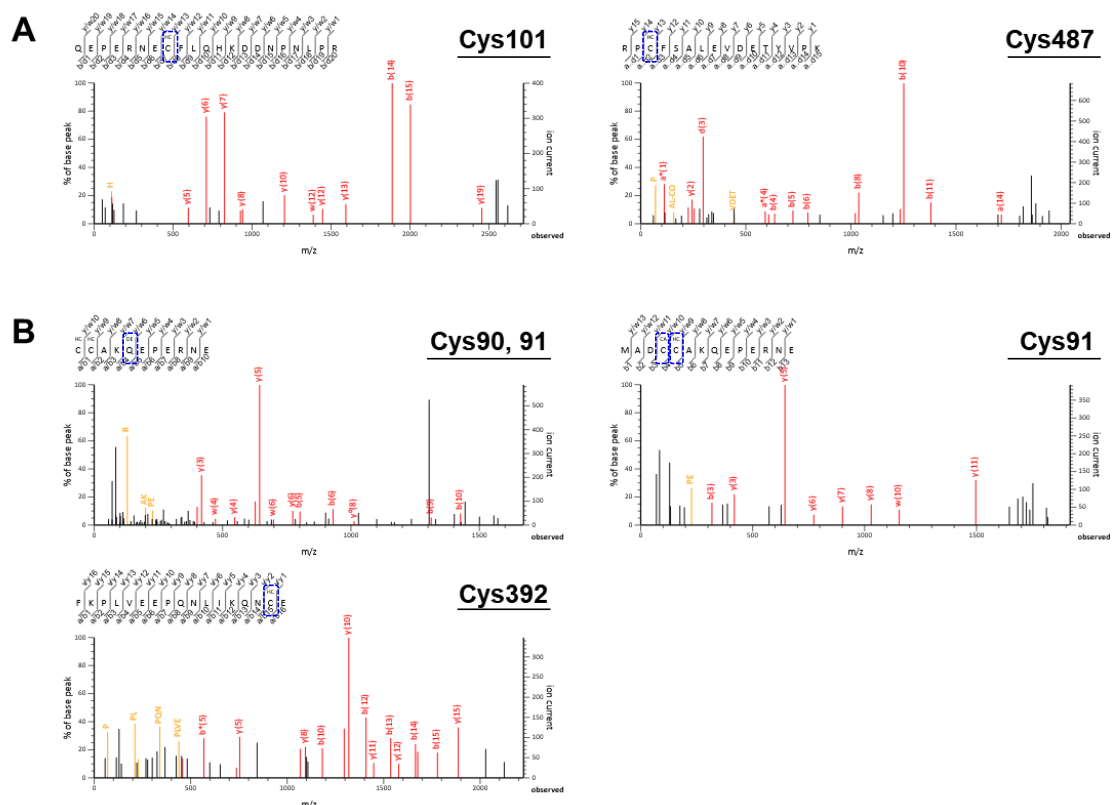


**Figure 2-16** 脂質異常症患者血清由来の酸化型血清アルブミンの S-チオール化修飾部位

脂質異常症患者 (n=4) 由来の oxHSA を MALDI-TOF/TOF MS により測定し、(A) S-システイン化修飾部位および (B) S-ホモシステイン化修飾部位の解析を行った。縦軸は修飾が確認された検体数を示す。



**Figure 2-17** *S*-システニン化修飾が確認されたペプチドのマッススペクトル  
脂質異常症患者 (n=4) より単離・精製した  $\alpha$ HSA を非還元条件下で (A) トリブシンあるいは (B) V8 プロテアーゼにより酵素消化した後、MALDI-TOF/TOF MS により測定を行い、*S*-システニン化修飾部位を解析した。



**Figure 2-18** *S*-ホモシステイン化修飾が確認されたペプチドのマスペクトル

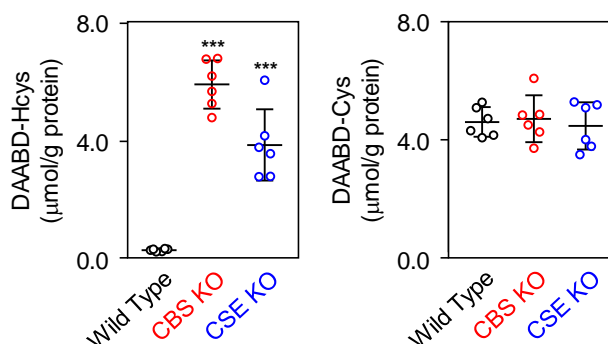
脂質異常症患者 (n=4) より単離・精製した  $\alpha$ HSA を非還元条件下で(A) トリプシンあるいは (B) V8 プロテアーゼにより酵素消化した後、MALDI-TOF/TOF MS により測定を行い、*S*-ホモシステイン化修飾部位を解析した。

### 3-2 CBS KO, CSE KO マウス血清アルブミンの解析

タンパク質の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の *S*-チオール化修飾についてさらなる解析を行うため、血中高ホモシステイン濃度を示すホモシチン尿症 (OMIN 236200) およびシスチン尿症 (OMIN 219500) を呈する遺伝的な cystathionine  $\beta$ -synthase (CBS) knockout (CBS KO)<sup>72</sup> および cystathionine  $\gamma$ -lyase (CSE) knockout (CSE KO)<sup>73</sup> の二つのモデルマウスを用いて検討を行うことにした。これら二つのモデルマウス (2 週齢) の血清中のホモシステイン量はそれぞれ 209  $\mu$ M と 145  $\mu$ M であり、野生型 (WT) マウス (2 週齢) の 6  $\mu$ M よりも有意に増加することが報告されている<sup>73</sup>。野生型マウス (n= 6)、CBS KO マウス (n= 6) および CSE KO マウス (n=6) の血清を TCEP によって 57  $^{\circ}$ C で 30 分還元した後、3 kDa 以下の画分を回収し、低分子化合物の画分とした。回収した低分子化合物画分を DAABD-Cl により誘導体化し、LC-MS/MS で安定同位体希釈法によってシステインおよびホモシステインを定量した結果、報告通り CBS KO マウスおよび CSE KO マウス

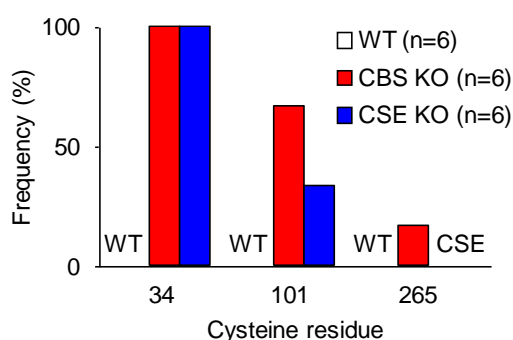
スの血清中のホモシステイン量は WT マウスと比較して有意な増加が認められた (Figure 2-19)。一方で、血清中のシステイン量については WT および CBS KO、CSE KO マウスの間で差は認められなかった。この結果から、CBS KO、CSE KO マウスの血清タンパク質が S-ホモシステイン化修飾を受けていると予想された。

MALDI-TOF/TOF MS により、CBS KO および CSE KO マウスの血清アルブミンの S-ホモシステイン化修飾部位を解析した結果、CBS KO マウスおよび CSE KO マウスの全て検体において遊離のシステイン残基である Cys34 において S-ホモシステイン化修飾が確認された (Figure 3-20)。さらに、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である Cys101 や Cys265 においても S-ホモシステイン化修飾が確認された。一方で、WT のマウスは、S-ホモシステイン化修飾は認められなかった。以上の結果から、血中ホモシステイン濃度の増加に伴って、S-ホモシステイン化修飾が形成され、遊離のシステイン残基のみならず、ジスルフィド結合を形成しているシステイン残基も修飾を受けることが明らかとなった。



**Figure 2-19 CBS KO および CSE KO マウス血清中の低分子チオール化合物の定量**

CBS KO, CSE KO マウス血清中に含まれる総ホモシステイン量 (左) および総システイン量 (右) を LC-MS/MS により安定同位体希釈法を用いて定量した。



**Figure 2-20 CBS KO および CSE KO マウス血清由来血清アルブミンの S-ホモシステイン化修飾部位解析**

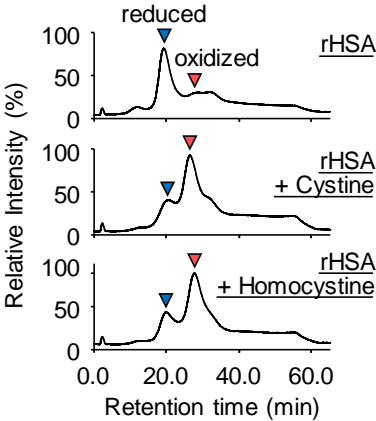
CBS KO, CSE KO マウス血清由来の血清アルブミンを MALDI-TOF/TOF MS により測定し、S-ホモシステイン化修飾部位の解析を行った。

### 3-3 *In vitro* で作製した S-チオール化血清アルブミンの解析

*In vitro* で作製した S-チオール化修飾 HSA についても同様に、S-チオール化修飾部位の解析を行うことにした。S-チオール化修飾 HSA の調製にあたっては、イネ胚乳中で作製され、翻訳後修飾を受けていないとされるリコンビナント HSA (rHSA) を用いることとした。こ



れまでに報告されている論文を参考に rHSA をシスチン、ホモシスチンと 37℃ で 24 時間 インキュベーションして調製した S-チオール化修飾 HSA を PBS 中で 4 時間、3 回透析を行い、未反応の低分子化合物を除去した。調製したサンプルを HPLC により分析した結果、S-チオール化修飾 HSA のピークの増加が確認された (Figure 2-21)。作製した S-チオール化修飾 HSA を先ほどと同様に非還元条件下において酵素消化を行った後に nanoLC で分画し、MALDI-TOF/TOF MS により解析した結果、遊離のシステイン残基である Cys34 のみならず、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 S-チオール化修飾の形成が確認された (Figure 2-22)。



**Figure 2-21 S-チオール化血清アルブミンの HPLC 分析**

*In vitro* で調製した S-チオール化修飾タンパク質を陰イオン交換クロマトグラフィーにより分析を行い、励起波長 280 nm、蛍光波長 340 nm を測定した。

	Cysteine residues																
	34	53	62	75	90	91	101	124	168	169	177	200	245	246	253	265	278
Control rHSA	Cys						Cys/ Hcys										
Cystine treated rHSA	Cys			Cys			Cys										
Homocystine treated rHSA	Hcys			Hcys			Cys/ Hcys	Hcys								Hcys	

	Cysteine residues																	
	279	289	316	360	361	369	392	437	438	448	461	476	477	487	514	558	559	567
Control rHSA																		
Cystine treated rHSA														Cys/ Hcys				
Homocystine treated rHSA							Hcys							Hcys				Hcys

**Figure 2-22 S-チオール化修飾血清アルブミンの修飾部位の解析**

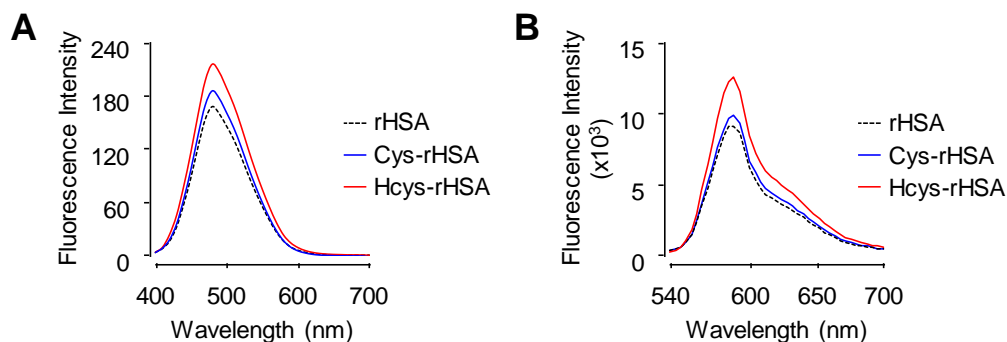
*In vitro* で調製した S-チオール化修飾血清アルブミンを MALDI-TOF/TOF MS により測定し、S-システイン化修飾および S-ホモシステイン化修飾部位を解析した。

## 第4節 S-チオール化に伴う血清アルブミンの機能性変化の解析

第3節での MALDI-TOF/TOF MS によるタンパク質の S-チオール化修飾部位の解析の結果、血清アルブミンの薬物結合サイト I の近傍に位置する Cys90 と Cys101 が修飾部位として同定されたことから、S-チオール化修飾が HSA の低分子化合物の構造や機能に影響を与えている可能性が予想された。そこで本節では S-チオール化修飾に伴う血清アルブミンの機能性の変化を中心に解析を行うことにした。

### 4-1 低分子化合物結合能の評価

HSA は脂肪酸やタンパク質、ホルモンなどの内因的および外因的な様々な化合物と相互作用し、全身へと運搬するキャリアとして働くことが知られている。HSA の低分子化合物との相互作用部位には、主に薬物結合サイト I (site I) と薬物結合サイト II (site II) の二つがあり<sup>74</sup>、それぞれサブドメインの IIA と IIIA に位置している<sup>75</sup>。低分子化合物の種類によって結合する薬物結合サイトは異なり、site I にはワルファリンやインドメタシンなどが、site II にはジアゼパムやイブプロフェンなどが相互作用することが報告されている。このように、HSA は生体内で様々な化合物と相互作用し、全身へと運搬することから、HSA の低分子化合物の結合能を評価することは、HSA の機能性を評価する上で非常に重要である。そこで、システイン残基の S-チオール化修飾に伴う HSA の結合能の変化を評価するため、結合サイト I および結合サイト II に特異的に結合する蛍光プローブである dansylamide および BD140 を用いて検討を行った。これらの蛍光プローブは HSA の低分子化合物の結合能に依存してその蛍光強度が変化するため、分光高度計を用いて簡便に低分子化合物の結合能を評価することが可能である。rHSA を用いて *in vitro* で作製した S-システイン化修飾 HSA および S-ホモシステイン化修飾 HSA と dansylamide あるいは BD-140 を 30 分間室温でインキュベーションしたのち、蛍光分光光度計により蛍光強度を測定した。その結果、site I は未修飾の HSA と比較して S-システイン化修飾 HSA および S-ホモシステイン化修飾 HSA のいずれの修飾 HSA も結合能の増加が認められ、中でも S-ホモシステイン化修飾 HSA は S-システイン化修飾 HSA よりも強い結合能を示すことが明らかとなった (Figure 2-23 A)。また site II についても同様に、いずれの S-チオール化修飾 HSA も未修飾の HSA と比較して結合能の増加が認められ、S-ホモシステイン化修飾 HSA が S-システイン化修飾 HSA よりも強い結合能を示すことが明らかとなった (Figure 2-23 B)。



**Figure 2-23 血清アルブミンの結合能の評価**

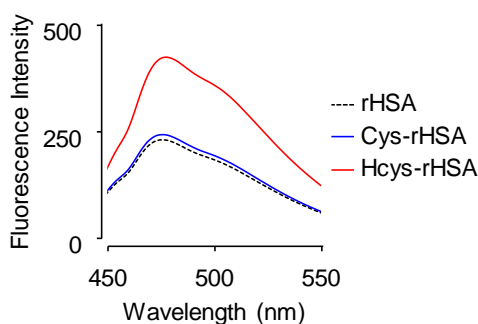
蛍光プローブを用いて血清アルブミンの結合能を評価した。血清アルブミンを (A) 結合サイト I に結合する dansylamide (Ex. 365 nm, Em. 400-700 nm)、(B) 結合サイト II に結合する BD-140 (Ex. 365 nm, Em. 540-700 nm) と混合し、室温で 30 分間インキュベーションした後、分光光度計により蛍光を測定した。

#### 4-2 タンパク質表面疎水性領域の評価

S-チオール化修飾によって HSA の低分子化合物結合能に変化が認められたことから、S-チオール化修飾に伴ってタンパク質表面の疎水性領域にも変化が生じる可能性が予想された。そこで、タンパク質表面の疎水性領域を評価する蛍光プローブである bis-ANS (4,4'-dianilino-1,1'-binaphthyl-5,5'-disulfonic acid, dipotassium salt) を用いて HSA の S-チオール化修飾に伴う疎水性領域の変化を評価した。*In vitro* で作製した S-チオール化修飾 HSA と bis-ANS を室温で 15 分室温でインキュベーションした後、蛍光分光光度計によって蛍光強度を測定した結果、S-システイン化修飾

HSA のタンパク質表面疎水性領域は未修飾の HSA と比較して変化は認められなかった一方、S-ホモシステイン化修飾 HSA のタンパク質表面疎水性領域が顕著に増加することが明らかとなった

(Figure 2-24)。この結果から、HSA のシステイン残基が S-ホモシステイン化修飾を受けることによりタンパク質の構造が変化し、HSA の疎水性領域が表面へと露出することが明らかとなった。



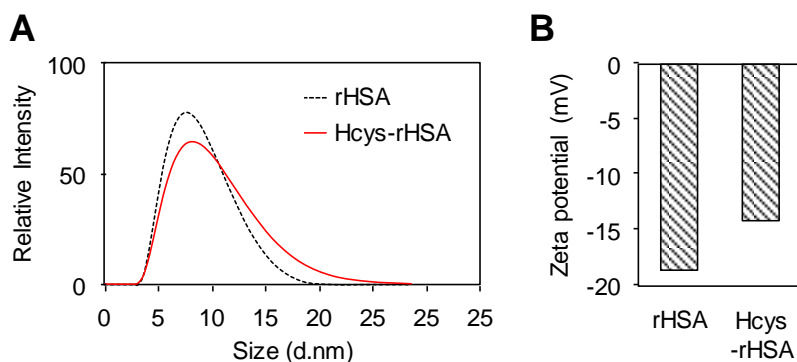
**Figure 2-24 タンパク質表面の疎水性領域の評価**

蛍光プローブを用いて血清アルブミンのタンパク質表面の疎水性領域を評価した。血清アルブミンを bis-ANS (Ex. 394 nm, Em. 450-550 nm) と混合し、室温で 30 分間インキュベーションした後、分光光度計により蛍光を測定した。

#### 4-3 粒子径および電荷の評価

DNA やタンパク質などの生体高分子は、粒子径が数 nm から 10 nm の大きさで、生命現象をつかさどる重要な分子である。水溶液中では熱運動によってランダムなブラウン運動をし、ブラウン運動は溶液の温度が高くなるほどは大きくなり、粒子径が大きくなると小さくなる。このように、粒子径はタンパク質の物性に大きく影響することから、粒子径測定はタンパク質の物性評価によく用いられている。また、粒子の電位は粒子間の反発力に影響し、水溶液中での分散安定性を決定することから、その指標としてゼータ電位が用いられている。そこで、先の検討で低分子化合物の結合能と表面疎水性領域の増加が認められた *S*-ホモシステイン化修飾 HSA について粒子径とゼータ電位の測定を行い、HSA の機能性変化を評価した。

*In vitro* で作製した *S*-ホモシステイン化修飾 HSA の粒子径を動的光散乱法により測定した結果、*S*-ホモシステイン化修飾に伴って、タンパク質の粒子径が増加が認められた (Figure 2-25 A)。さらに、*in vitro* で作製した *S*-ホモシステイン化修飾 HSA のゼータ電位 (zeta-potential) を測定した結果、*S*-ホモシステイン化修飾によって、タンパク質のゼータ電位が約 -11 mV 増加することが明らかとなった (Figure 2-25 B)。以上の検討により、*S*-ホモシステイン化修飾に伴って HSA の溶液中での運動性や反発力が変化することを明らかにした。



**Figure 2-25** *S*-ホモシステイン化修飾に伴う構造変化

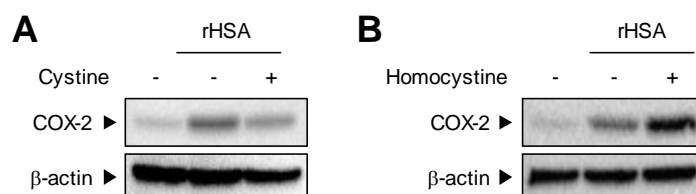
*S*-ホモシステイン化修飾が (A) 粒子径、(B) ゼータ電位に与える影響を評価した。

## 第5節 S-ホモシステイン化修飾血清アルブミンによる炎症誘導機構の解析

第4節までの検討の結果、S-チオール化修飾 HSA はこれまで唯一のターゲットと考えられてきたタンパク質中の遊離のシステイン残基である Cys34 のみならず、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修飾を受けていることが明らかとなった。さらに、S-チオール化修飾 HSA の中でも、S-ホモシステイン化修飾 HSA は、修飾に伴って低分子化合物の結合能の増加や、タンパク質表面疎水性領域の増加などの変化が認められたことから、修飾タンパク質の疾病発症への関与が予想された。特に、がんや糖尿病などは慢性炎症性疾患と呼ばれ、その発症に慢性的な炎症が関わっていることから、S-チオール化修飾を受けた HSA が炎症誘導活性を獲得するのではないかと予想し、検討を行った。

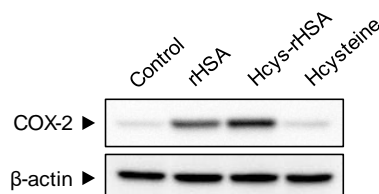
### 5-1 S-チオール化血清アルブミンの炎症誘導活性評価

S-チオール化修飾 HSA の炎症誘導活性を検討するため、炎症関連分子であるシクロオキシゲナーゼ-2 (COX-2) の発現を指標に評価した。*In vitro* で作製した S-システイン化修飾 HSA あるいは S-ホモシステイン化修飾 HSA をマウスマクロファージ様細胞である RAW264.7 細胞に 37°C で 4 時間処理した後にライセートを回収し、ウエスタンブロッティングに供した。抗 COX-2 抗体を用いて検出した結果、S-システイン化修飾 HSA は未修飾の HSA と比較して COX-2 の発現が減弱傾向にあったのに対し、S-ホモシステイン化修飾 HSA



**Figure 2-26 S-チオール化修飾血清アルブミンの炎症誘導活性評価**

*In vitro* で作製した (A) S-システイン化修飾血清アルブミンおよび (B) S-ホモシステイン化修飾血清アルブミンを投与し、COX-2 発現をウエスタンブロッティングにより評価した。



**Figure 2-27 低分子チオール化合物の炎症誘導活性**

S-ホモシステイン化修飾血清アルブミンあるいは低分子チオール化合物を処理し、COX-2 発現をウエスタンブロッティングにより評価した。

は未修飾の HSA と比較して COX-2 の発現を増強した (Figure 2-26)。また、低分子チオール化合物を処理した倍には COX-2 の発現誘導は認められなかった (Figure 2-27)。このことから HSA は S-ホモシステイン化修飾を受けることにより、炎症誘導活性を獲得することが明らかとなった。

## 5-2 コレステロール引き抜きと炎症応答

HSA は生体の恒常性維持に非常に重要な役割を果たしており、血漿膠質浸透圧の維持、ホルモンや薬物などの様々な物質の保持・運搬<sup>59</sup>、pH 緩衝作用、抗酸化作用<sup>76</sup>などを担っている。最近ではこれらの恒常性維持に重要な機能に加えて、アルブミンはコレステロールと結合することが報告されており、血清アルブミンのサブドメインIIA やIIIA が重要であるということも報告されている<sup>77</sup>。また、アルブミンは内皮細胞からコレステロールを引き抜くことも明らかとなってきた<sup>77-79</sup>。

コレステロールは分子式  $C_{24}H_{40}O_6$  で表される化合物であり、ステロイドの中でもステロールと呼ばれるサブグループに属している。ステロールは 6 個の炭素原子から成る環が 3 つと 5 個の炭素原子から成る環が 1 つあり、合わせて 4 つの環が融合して構成しているステロイド骨格を有する (Figure 2-28)。ステロイド骨格はほぼ平面構造であるため、C-C 結合のまわりに回転することができず、比較的強固な構造を持ち、非極性炭化水素 (ステロールと C-17 位の炭化水素鎖) と極性頭部 (C-3 位のヒドロキシ基) からなる両親媒性化合物である。

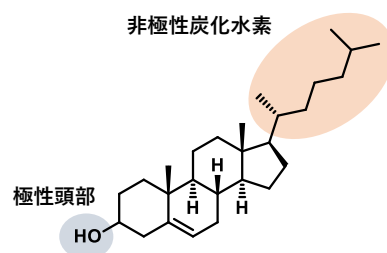


Figure 2-28  
コレステロールの化学構造

哺乳類においてコレステロールは食事から摂取したのものと、体内で合成される 2 種類の供給方法が知られているが、生体内に存在するコレステロールの多くは体内で合成されている。ヒトでは皮膚や肝臓においてスクワレンからラノステロールを経て合成される経路が知られている。合成されたコレステロールは脂肪酸とエステル結合を形成し、血液中のリポタンパク質により全身へと輸送される。

コレステロールはあらゆる組織の細胞膜に豊富に存在している構造脂質で、細胞膜上では極性頭部であるヒドロキシ基を細胞外へと向け、細胞膜に存在するリン脂質と水素結合を形成している。最近では細胞膜ドメインである脂質ラフトに関する研究が精力的に行われており、この脂質ラフトにコレステロールが多く含まれていることが明らかとなってきた。脂質ラフトは細胞シグナルに関わる様々なシグナルタンパク質の足場となっており、膜

の流動性の変化により、シグナル分子の会合や解離が調節されていると考えられている。実際に細胞膜に存在するコレステロールは膜の構築や維持に重要なだけでなく、膜の流動性を安定にするために必要であることが証明されてきている。このように、コレステロールは動物細胞膜において非常に重要な役割を果たしていることが明らかにされつつある。

このように、コレステロールは生体内で非常に重要な役割を担っているが、その一方で近年、動脈硬化症の危険因子として注目されてきている。これは、近年の食生活の変化によって食事からのコレステロール摂取量が増加したことに起因すると考えられている。このように生体における過剰なコレステロールの存在や、高コレステロール血症は動脈硬化症を引き起こす素因となりうるということが明らかとなってきた。

### 5-2-1 血清アルブミン投与による細胞のコレステロール量の変化

これまでにアルブミンとコレステロールの結合や、内皮細胞からのコレステロールの引き抜きなどが報告されていることから、*S*-ホモシステイン化修飾 HSA による COX-2 発現誘導に、細胞からのコレステロール引き抜きが関与していると予想された。そこで、*S*-ホモシステイン化修飾 HSA が未処理の HSA と比較して細胞からの強いコレステロール引き抜き能を評価した。細胞のコレステロール量の評

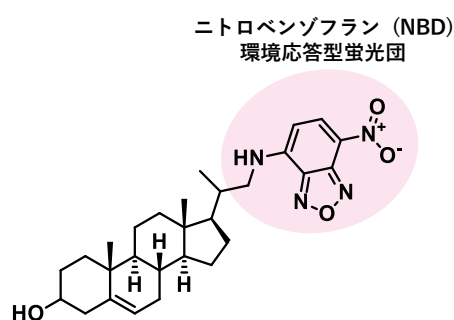
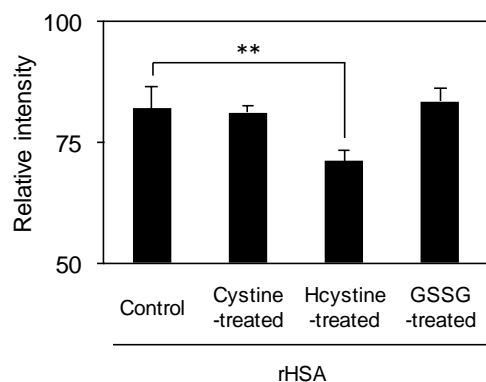


Figure 2-29  
NBD-cholesterol の化学構造

価には、コレステロールの誘導体化物である NBD-コレステロールを用いた (Figure 2-29)。NBD-コレステロールは本来の性質を保持したまま炭化水素鎖が環境応答型蛍光団であるニトロベンゾフラン (NBD) で標識されており、その特徴的な蛍光を検出することで生体内のコレステロールの分布や動態を観察することが可能である<sup>80,81</sup>。マクロファージ様細胞である RAW264.7 細胞に 1.0  $\mu$ M の NBD-コレステロールを 2.5% FBS DMEM 中で 37°C、1 時間処理して細胞に蛍光コレステロールを取り込ませた後に、500  $\mu$ g/ml の HSA を 37°C で 1 時間処理し、フローサイトメトリーにより細胞の蛍光 (励起波長 465 nm、蛍光波長 545 nm) を測定した。また、ポジティブコントロールとして、コレステロール引き抜き試薬として知られているメチル- $\beta$ -シクロデキストリン (M $\beta$ CD) を用いた。検討の結果、未修飾の HSA と比較して *S*-システイン化修飾 HSA や *S*-グルタチオン化修飾 HSA のコレステロール引き抜きに差は認められなかったが、*S*-ホモシステイン化修飾 HSA は細胞中のコレステロールを有意に減少させた (Figure 2-30)。この結果から、HSA はシステイン残基が *S*-ホモシステイン化修飾を受けることにより細胞からコレステロールを引き抜きやすくなり、その結果、



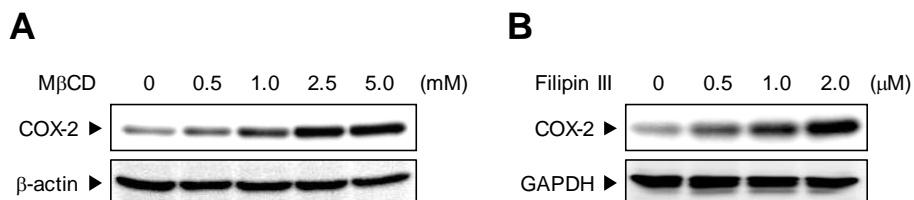
COX-2 の発現を誘導する可能性が示唆された。



**Figure 2-30 細胞のコレステロール量の変化**  
RAW264.7 細胞に NBD-コレステロールを取り込ませた後、各種 HSA を処理し、フローサイトメトリーにより蛍光コレステロールを測定した。

### 5-2-2 コレステロールの減少が細胞に及ぼす影響

S-ホモシステイン化修飾 HSA 誘導性の COX-2 発現上昇には細胞からのコレステロール引き抜きが重要である可能性が示唆されてきた。そこで次に、コレステロール除去試薬である methyl- $\beta$ -cyclodextrin (M $\beta$ CD) <sup>82</sup> および Filipin III を用いてマクロファージ様細胞における COX-2 発現誘導を評価することにした。M $\beta$ CD は環状オリゴ糖の一つで、 $\alpha$ -グルコピラノース基が  $\alpha$ -1,4-グリコシド結合によって環状につながったものである。環状構造の内側は疎水性で、外側が親水性という性質を持ち、内部に疎水性の分子を取り込み、包接化合物を形成する。Filipin III はポリエン系抗真菌薬であり、強い蛍光を発しながらコレステロールに特異的に結合することが知られている。このような性質から Filipin III は、コレステロールの組織化学的染色に広く使用されている。RAW264.7 細胞に M $\beta$ CD あるいは Filipin III を 37°C で 4 時間処理した後に細胞を回収し、ウェスタンブロッティングにより COX-2 の発現を評価した。その結果、コレステロール除去試薬の処理濃度依存的な COX-2 の発現誘導が認められた (Figure 2-31)。このことから、細胞のコレステロール引き抜きによって COX-2 発現が誘導されることが明らかとなった。



**Figure 2-31 細胞からのコレステロール除去による炎症誘導**  
コレステロール除去試薬である (A) M $\beta$ CD および (B) FilipinIII を様々な濃度で細胞に投与し、ウェスタンブロッティングにより COX-2 発現を評価した。



### 5-3 血清アルブミン投与による脂質ラフトの構造変化

細胞膜は比較的均一な脂質の二重膜から形成されており、その主要な成分としてリン脂質があげられる<sup>83</sup>。リン脂質はコリン、リン酸基からなる親水性の頭部と、炭化水素からなる疎水性の尾部により構成されている。リン脂質は尾部を内側に、頭部を外側にするように二重の膜を形成している。細胞膜は細胞の内部環境の維持や選択的透過バリア機能、隣接する細胞との情報交換など様々な役割を果たしている。

細胞膜の構造モデルは、1972年にSingerとNicolsonにより提唱された流動モザイクモデル (fluid mosaic model) が基礎となっている。流動モザイクモデルとは、リン脂質が集合してできた二重膜内に、タンパク質が入り混じるよう (モザイク状) に存在し、膜に埋め込まれたタンパク質は自由に動くことができる (流動性をもつ) という考え方である<sup>84</sup>。これに加えて近年、細胞膜に存在する脂質やタンパク質は均一に分布しているのではなく、組成の異なる膜マイクロドメインを多数含んでいることが明らかになってきた。カベオラ構造や脂質ラフト構造がマクロドメインとして知られている<sup>85</sup>。

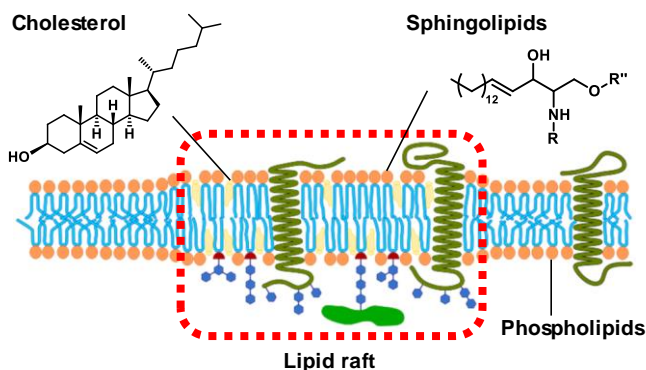
カベオラは、約50年前に上皮細胞と内皮細胞膜表面にくぼみを持った構造として同定された。カベオラはカベオリン (caveolin) と呼ばれる膜の裏打ちタンパク質によって比較的安定な構造を有しており、典型的なものは細い開口部と50-100 nm の内腔を有している。1992年にカベオラの主要構成タンパク質としてcaveolin -1 が同定され<sup>86</sup>、その後カベオラの形成や機能に関する報告が飛躍的に増加した。その結果、カベオラは非イオン性界面活性剤存在下かつ低温において不溶性の膜ドメインであり<sup>85</sup>、ドメイン中にシグナル伝達に関わるタンパク質群が多く含まれていることが見出された。その後の研究によりカベオリンを持たず、窪んだ形状を持たない膜構造であるが、カベオラと同様にシグナル伝達に関与するドメインとして脂質ラフトが発見された。脂質ラフトとは、「細胞膜という海に浮かぶ筏 (ラフト) のような膜構造」という意味である<sup>87</sup>。カベオリンが比較的安定な構造体であるのに対し、脂質ラフトは不安定で、刺激に応じて生成と崩壊を繰り返す。脂質ラフトの大きさは100 nm以下で、数個~数十個程度のタンパク質分子を含むと言われているが、ラフト自身の大きさや形が流動的であるため一定ではない。このようにマイクロドメインには多くのシグナル伝達に関わる受容体などが分布していることが明らかになった<sup>88,89</sup>。Table 2-3にマクロドメインに存在する脂質やタンパク質をまとめた<sup>90</sup>。

**Table 2-3** マクロドメインに存在する脂質やタンパク質

Lipids	Cholesterol, sphingomyelin, Glycosphingolipids (GM1, GM3, etc.), PIP <sub>2</sub>	
Proteins	Integral/Structural	Caveolin-1, -2, -3 (caveolae) Fltillin-1, -2 (lipid rafts), Stomatin (lipid rafts)
	Exoplasmic	GPI-anchored proteins (alkaline phosphatase, etc.) (lipid rafts)
	G proteins	Gi, Gs, Gq, Gt, H-Ras, Rho A, Rac 1, etc.
	Enzyme-linked receptor	EGF-R, PDGF-R, Insulin-R, Trk, p75, RET, etc.
	G protein-coupled receptor (GPCR)	Endothelin-R, Adrenergic b-R, Bradykinin-R, P2Y <sub>2</sub> -R, 5-HT <sub>2</sub> -R, etc.
	Protein kinases	Fyn, Lyn, c-Src, CSK, Erk-2, C-kinase, FAK, etc.
	Cytoskeleton	Tubulin, Annexin VI, Gelsolin, etc.
	Adhesion molecules	NCAM, Thy-1, L1, etc.
	Ion channels	K <sup>+</sup> -channel, Nicotinic-R, etc.
	others	eNOS, cGMP-PDE, Grb-2, Amyloid-b, b-secretase, g-secretase, plasmin, etc.

多くのタンパク質がカベオラと脂質ラフトのどちらにも存在することが確認されているが、タンパク質の中には脂質ラフトのみに局在し、カベオラには他の膜領域と同じ程度しか存在しないものも存在すると考えられている<sup>91</sup>。このように脂質ラフトには様々なタンパク質が会合し、シグナル伝達に関与していることが示唆されてきているが、その存在形式などまだ明らかにされていない部分が多く、議論の余地が残されている。

脂質ラフトはコレステロールやスフィンゴ脂質を豊富に含み (Figure 2-32)、その流動性をコレステロールに依存している。このことから細胞膜のコレステロール含有量の低下は脂質ラフトの機能低下に影響すると考えられている<sup>92</sup>。コレステロールの減少によりゲル状の脂質ラフトの適度な流動性が失われ、刺激に対する脂質二重膜上における脂質やシグナルに関与するタンパク質のスムーズな移動、およびラフトの再構成が阻害される。その結果、シグナル伝達や物質の流入・流出が障害され、細胞機能が低下すると言われている。この脂質ラフトの機能低下により、細胞機能・臓器機能が変化し、様々な疾患につながると思われる。脂質ラフト異常によりウイルス性、細菌感染症、敗血症などといった急性疾患に加えて、糖尿病や高血圧、免疫異常、神経疾患などの慢性疾患をはじめ悪性腫瘍などが引き起こされるとされている。また最近では、脂質ラフトはがん細胞の運動性を制御することが明らかにされ



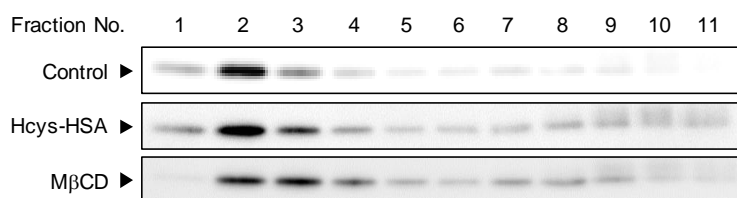
**Figure 2-32** 脂質ラフトの構造

ている。膜コレステロールが脂質ラフトの形成に重要であることから、コレステロール量の調節によってがんの進展を制御できる可能性があると考えられている。

S-ホモシステイン化修飾HSAによるCOX-2発現誘導への、細胞のコレステロール量の関が明らかとなったことから、HSA処理による細胞のコレステロールの減少は脂質ラフトに何らかの影響を与えている可能性が予想された。そこで次に、コレステロールを豊富に含む膜ドメインである脂質ラフトに着目して検討を行うこととした。

### 5-3-1 密度分画遠心法による検討

一般的に脂質ラフトの分離精製の生化学的解析手段としては、Triton-X、Lubrol98、Brij58/98、NP-40 等の非イオン性界面活性剤を用いて、低温下でショ糖密度勾配超遠心により界面活性剤不溶性核画分として分画する方法が用いられている<sup>90,93</sup>。今回は非イオン性界面活性剤である Brij98 を用いて界面活性剤不溶性画分を調製した。脂質ラフトの評価には、脂質ラフトに特異的に存在し、マーカータンパク質として広く使用されている Flotillin-1 を用いた<sup>94</sup>。S-ホモシステイン化修飾 HSA あるいはポジティブコントロールとして M $\beta$ CD を 37°C で 1 時間処理した RAW264.7 細胞を回収しソニケーションした後に、スクロース溶液を重層し、超遠心分離機で 16 時間遠心した。超遠心の後、サンプルを Fraction No.1 から Fraction No. 11 まで上層から 1 ml ずつ回収し、ウエスタンブロッティングに供した。抗 Flotillin-1 抗体で検出した結果、未処理の RAW264.7 細胞では Flotillin-1 のバンドは主に Fraction No. 2 において検出されたが、HSA や M $\beta$ CD 処理を行った細胞では Flotillin-1 は Fraction No. 2 だけでなく、Fraction No. 3 においても検出された (Figure 2-33)。このことから、S-ホモシステイン化修飾 HSA による細胞のコレステロール引き抜きが脂質ラフトに影響を与えていることが明らかとなった。



**Figure 2-33 S-ホモシステイン化修飾 HSA による脂質ラフト構造の変化**

S-ホモシステイン化修飾 HSA を処理した細胞のライセートを密度勾配遠心法により分画し、ウエスタンブロッティングに供した後、脂質ラフトのマーカータンパク質である Flotillin-1 を検出した。

### 5-3-2 共焦点レーザー顕微鏡による検討

S-ホモシステイン化修飾 HSA が脂質ラフトに与える影響についてさらなる解析を行うため、共焦点レーザー顕微鏡を用いて検討することにした。RAW264.7 細胞に S-システイン化修飾 HSA および S-ホモシステイン化修飾 HSA を 37°C で 1 時間で処理した後に、固定および透過処理を行った後、一次抗体として抗 Flotillin-1 抗体を 4°C で一晩インキュベーションした。二次抗体として rabbit-Alexa488 を用いて標識し、細胞を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。その結果、S-システイン化修飾 HSA 処理では細胞膜脂質ラフトの変化は見られなかった一方、S-ホモシステイン化修飾 HSA 処理により細胞膜脂質ラフトの構造が乱れている様子が観察された (Figure 2-34)。以上のことから、S-チオール化修飾 HSA の中でも S-ホモシステイン化修飾タンパク質が細胞からのコレステロール引き抜き活性を有することが明らかとなった。

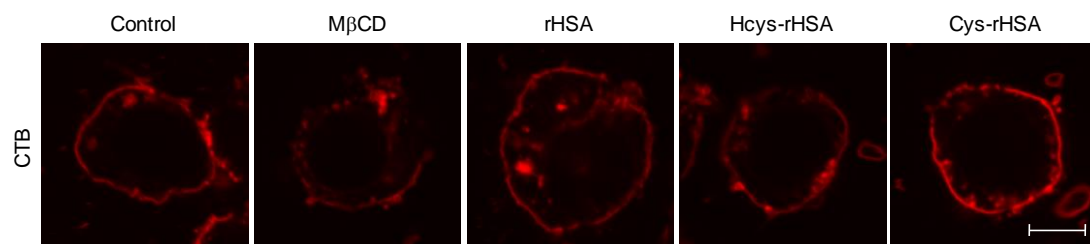


Figure 2-34 共焦点レーザー顕微鏡による脂質ラフト構造の観察

免疫蛍光染色により脂質ラフトのマーカータンパク質である Flotillin-1 を染色し、S-チオール化修飾 HSA 処理に伴う脂質ラフト構造の変化を観察した。

### 5-4 S-ホモシステイン化血清アルブミン誘導性の炎症誘導機構の解析

いかなる生命も生存のためには周囲の環境に適応する必要がある。実際に周囲の環境に適応するためには、内的・外的刺激を何らかの形で伝達する必要があり、特に細胞においてはこの情報伝達機構を「シグナル伝達機構」と呼び、刺激に対する反応が様々なシグナル分子によって伝達されている。刺激に対する応答により細胞のその後の運命が決定することから、シグナル伝達機構を解明することは非常に重要であると言える。

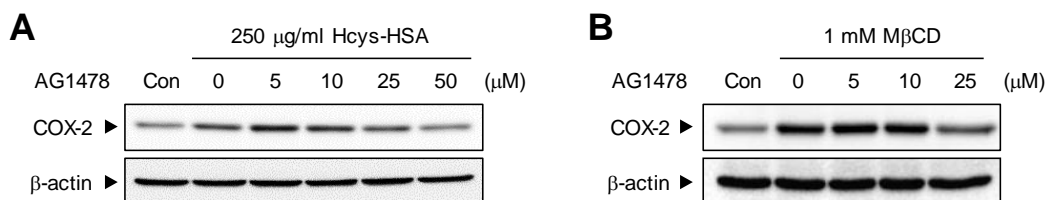
シグナル伝達で最も重要なのは刺激の変換過程であり、体内においては細胞が持つ受容体によって受容されている。受容体はシグナル伝達機構の最上流に位置し、細胞膜上の種々のレセプターやチャネルが含まれる。これらのセンサーが受容した細胞内外からの様々な刺激は、細胞内のシグナルへと変換される。細胞内シグナルは、タンパク質のリン酸化-脱リン酸化、電氣的勾配、タンパク質間相互作用や低分子活性化因子などにより伝達され、それらの段階的な反応により最終的には転写因子が活性化される。さらに活性化した転写因

子は核内へと情報を伝え、遺伝子発現や酵素活性の変化など、様々な応答を引き起こす。このシグナル伝達機構に深く関与するタンパク質群としてリン酸化を担うのがプロテインキナーゼであり、これまでに数多くのキナーゼが同定され、様々な情報伝達への関与が示されている。そこで、本節では第 5 節で明らかとなった *S*-ホモシステイン化修飾 HSA による COX-2 発現誘導メカニズムを明らかにするため、その詳細なシグナル伝達機構について解析を進めることにした。

#### 5-4-1 阻害剤を用いた検討

*S*-ホモシステイン化修飾 HSA 誘導性の COX-2 発現誘導機構を解析するため、阻害剤を用いてシグナル伝達の検討を行うことにした。上皮成長因子受容体 (epidermal growth factor receptor; EGFR) の阻害剤である AG1478 を RAW264.7 細胞に 30 分前投与した後に、100  $\mu\text{g/ml}$  の *S*-ホモシステイン化修飾 HSA を 37°C で 4 時間投与した。回収したライセートをウエスタンブロッティングに供し、COX-2 発現を評価した結果、AG1478 の投与濃度依存的に *S*-ホモシステイン化修飾 HSA 誘導性の COX-2 発現上昇が抑制されることが明らかとなった (Figure 2-35 A)。

コレステロール除去試薬である M $\beta$ CD についても AG1478 の前処理によって COX-2 発現が抑制されるか検討を行った。0, 5, 10, 25  $\mu\text{M}$  の AG1478 を 30 分前投与した後に、1 mM の M $\beta$ CD のを 37°C で 4 時間投与しウエスタンブロッティングに供した。その結果、*S*-ホモシステイン化修飾 HSA の場合と比較して COX-2 発現抑制は弱かったが、25  $\mu\text{M}$  の AG1478 を前投与することにより、M $\beta$ CD 誘導性の COX-2 発現が抑制された (Figure 2-35 B)。このことから、*S*-ホモシステイン化修飾 HSA 誘導性の細胞のコレステロール引き抜きを介した COX-2 発現誘導への EGFR の関与が示唆された。



**Figure 2-35 阻害剤処理の COX-2 発現への影響**

上皮成長因子受容体の阻害剤である AG1478 を 30 分間前処理した後、(A) *S*-ホモシステイン化修飾血清アルブミンあるいは (B) M $\beta$ CD を投与し、ウエスタンブロッティングにより COX-2 発現を評価した。



#### 5-4-2 上皮成長因子受容体のリン酸化評価

EGFRは増殖や成長の制御に関わる受容体型のチロシンキナーゼで、上皮系や神経系などの細胞膜表面に存在している。EGFRは柔軟なタンパク質で、621個のアミノ酸の細胞外領域と23個のアミノ酸の膜貫通領域、542個のアミノ酸<sup>95</sup>の細胞内領域の3つのドメインから構成されている。細胞外ドメインにはリガンド結合部分を有し、上皮成長因子 (EGF: epidermal growth factor) が結合して活性化したEGFRは他のEGFRに結合して安定な二量体となる。受容体は互いに接近し、細胞内領域に存在する柔軟な尾部 (青色点線で示した部分) にある細胞質側のC末領域に存在するチロシン残基はアデノシン三リン酸 (ATP) を利用して自己リン酸化を受ける (Figure 2-36)。細胞内チロシン残基がリン酸化されると、細胞内へとシグナルが伝達される。

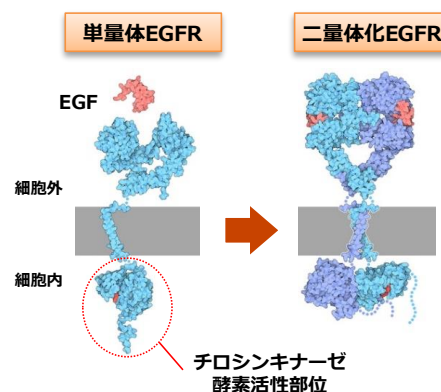


Figure 2-36 活性化に伴う EGFR の二量体化

EGFR のリガンドは EGF の他に TGF- $\alpha$ 、アンフィレギュリン、ヘパリン結合 EGF 様増殖因子 (Heparin-binding EGF-like Growth Factor; HB-EGF) などが報告されている。細胞シグナルが EGFR を通して送り終わると、受容体は複数に分かれた酵素により不活性化される。これらの酵素は活性化された時に柔軟な尾部へ付加されたリン酸を切断することにより、受容体の活性化状態を制御する。

EGFR のシグナル伝達経路には、PI3K/Akt 経路、Jak/STAT 経路、Ras/Raf/MAPK 経路の 3 つの経路が存在する。PI3K/Akt 経路は細胞成長やアポトーシス抑制、Jak/STAT 経路は細胞生存、Ras/Raf/MAPK 経路は細胞増殖と生存に関わる (Figure 2-37) <sup>96</sup>。

EGFR は生体に欠かせない受容体であるが、その活性状態に異常が見られると疾病の原因となりうる。実際に一部の肺がん症例においては EGFR の遺伝子異常が確認されている (Ref)。このとき、EGFR のリガンドである EGF が存在しない状態でも EGFR の活性が高いために酵素活性が保たれ、常に細胞の分化増殖が促進状態にあることが明らかとなっている。このようなことから、EGFR の阻害剤である Gefitinib や Erlotinib は抗がん剤として臨床現場において使用されている。

RAW264.7 細胞に S-ホモシステイン化修飾 HSA あるいは M $\beta$ CD を最大 60 分間投与した後にライセートを回収し、ウェスタンブロッティングに供し、EGFR のリン酸化を評価した。その結果、投与時間依存的なリン酸化が確認され、S-ホモシステイン化修飾 HSA は投与後 15 分から 30 分において、M $\beta$ CD は投与後 20 分において、EGFR がリン酸化されることが

明らかとなった (Figure 2-38)。

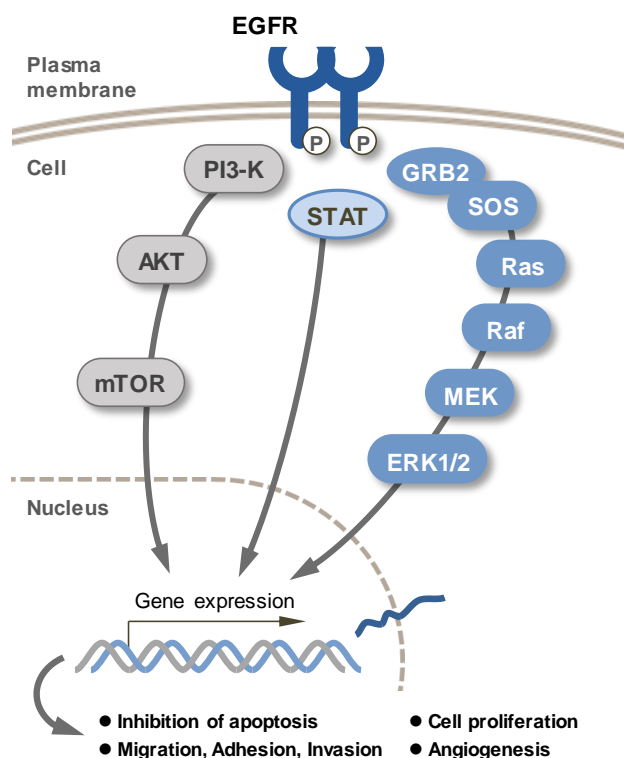


Figure 2-37 EGFR の 3 つのシグナル伝達経路

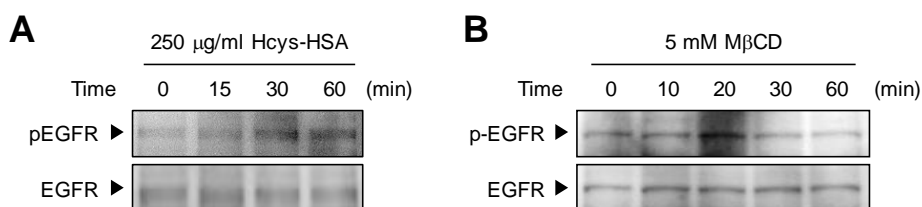


Figure 2-38 上皮成長因子受容体のリン酸化

(A) *S*-ホモシステイン化修飾血清アルブミンあるいは(B) MβCD 誘導性の EGFR のリン酸化をウエスタンブロッティングにより評価した。

### 5-4-3 血清アルブミンが活性化する下流シグナルの検討

MAP キナーゼカスケードは酵母から高等植物、哺乳動物に至るまで高度に保存された細胞内シグナル伝達経路であり、細胞の増殖、分化、ストレス応答など多くの細胞機能の制御に関わっている。MAP キナーゼファミリーは ERK、JNK、および p38 の 3 つに分類することができる。MAP キナーゼは、MAPK キナーゼ (MAPKK) により Thr 残基および Tyr 残基がリン酸化されることにより活性化し、MAPKK はその上流の MAPKK キナーゼ (MAPKKK) によってリン酸化を受けることで活性化する。このように細胞内シグナル伝達

経路が MAPKKK→MAPKK→MAPK といったように進むことから、MAP キナーゼカスケードと呼ばれている (Figure 2-39)。そこで、MAP キナーゼの ERK、JNK、p38 の 3 つのタンパク質のリン酸化に焦点を当てて検討を行った。

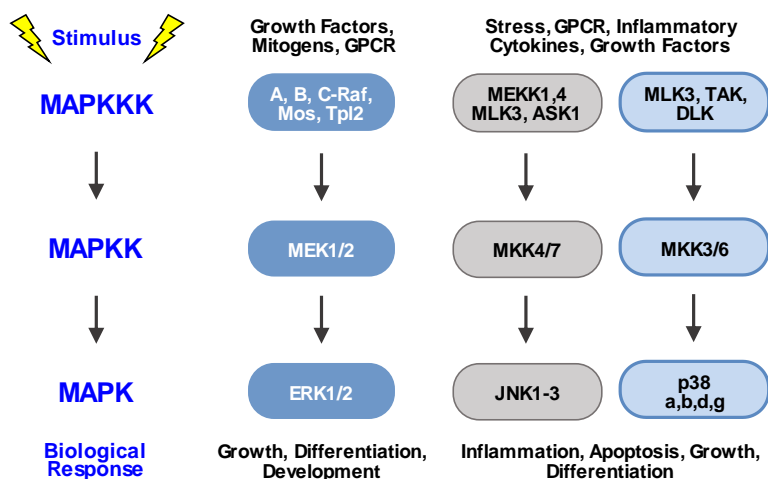


Figure 2-39 MAP キナーゼカスケード

RAW264.7 細胞に *S*-ホモシステイン化修飾 HSA あるいは M $\beta$ CD、また、ポジティブコントロールとして 10 ng/ml の LPS を 37°C で 30 分間投与し、ウエスタンブロッティングにより MAPK のリン酸化を評価した。その結果、*S*-ホモシステイン化修飾 HSA および M $\beta$ CD 処理により EGFR の下流に存在する MAP キナーゼである ERK が投与時間依存的にリン酸化されることが明らかとなった (Figure 2-40)。

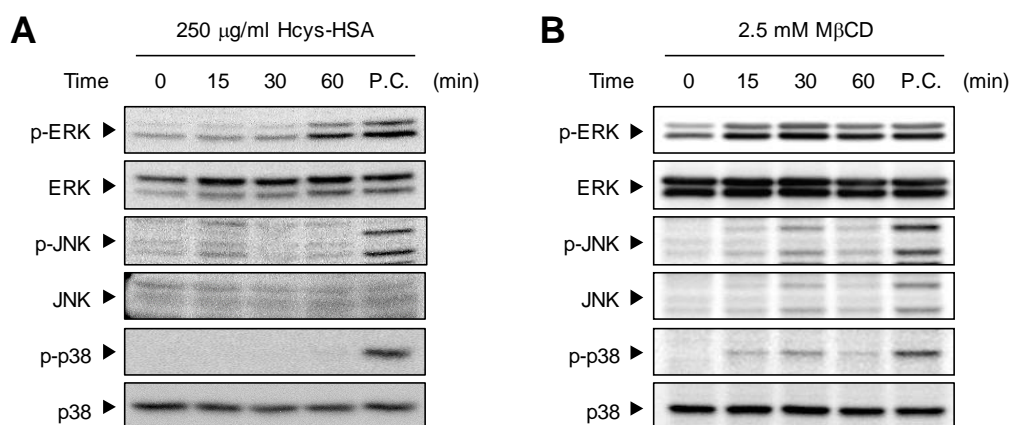
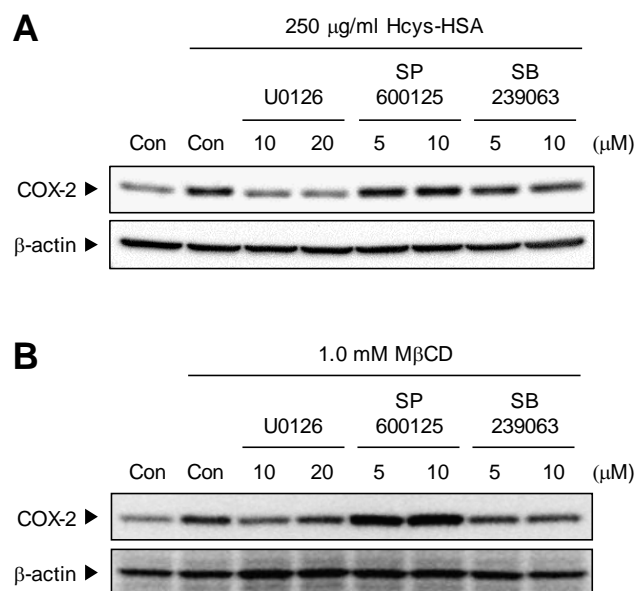


Figure 2-40 *S*-ホモシステイン化修飾 HSA による MAPK のリン酸化の評価

RAW264.7 細胞に(A) *S*-ホモシステイン化修飾 HSA、(B) M $\beta$ CD を処理し、ウエスタンブロッティングにより時間依存的な MAPK のリン酸化を評価した。P.C.: LPS



MAP キナーゼのリン酸化について更なる解析を行うため、各種阻害剤を用いた検討を行った。MAP キナーゼ阻害剤である U0126 (ERK inhibitor)、SP600125 (JNK inhibitor)、SB239063 (p38 inhibitor) を RAW264.7 細胞に 30 分間前投与した後に、250  $\mu\text{g/ml}$  *S*-ホモシステイン化修飾 HSA あるいは 2.5 mM M $\beta$ CD を 37°C で 4 時間処理した。ライセートを回収しウエスタンブロットティングに供した結果、ERK の阻害剤である U0126 の前処理によって COX-2 の発現誘導が抑制された。p38 の阻害剤である SB239063 の投与によっても COX-2 の発現誘導は若干抑制されたが、ERK の阻害剤を投与した場合の方がより強い COX-2 発現誘導の抑制が確認された (Figure 2-41 A)。M $\beta$ CD についても *S*-ホモシステイン化修飾 HSA の場合と同じく、ERK の阻害剤の前処理により COX-2 の発現誘導が抑制された (Figure 2-41 B)。



**Figure 2-41 MAPK 阻害剤の COX-2 発現への影響**

RAW264.7 細胞に各種 MAPK 阻害剤を 30 分間前処理した後、(A) *S*-ホモシステイン化修飾 HSA、(B) M $\beta$ CD を 4 時間処理した後にライセートを回収し、ウエスタンブロットティングにより COX-2 発現を評価した。

以上の検討から、*S*-ホモシステイン化修飾血清アルブミンは、細胞膜表面に存在するマクロドメインである脂質ラフトの構造を変化させることによって、EGFR のリン酸化を亢進し、その結果、EGFR の下流に存在するシグナルを活性化させることにより COX-2 の発現を誘導していることが明らかとなった (Figure 2-42)。

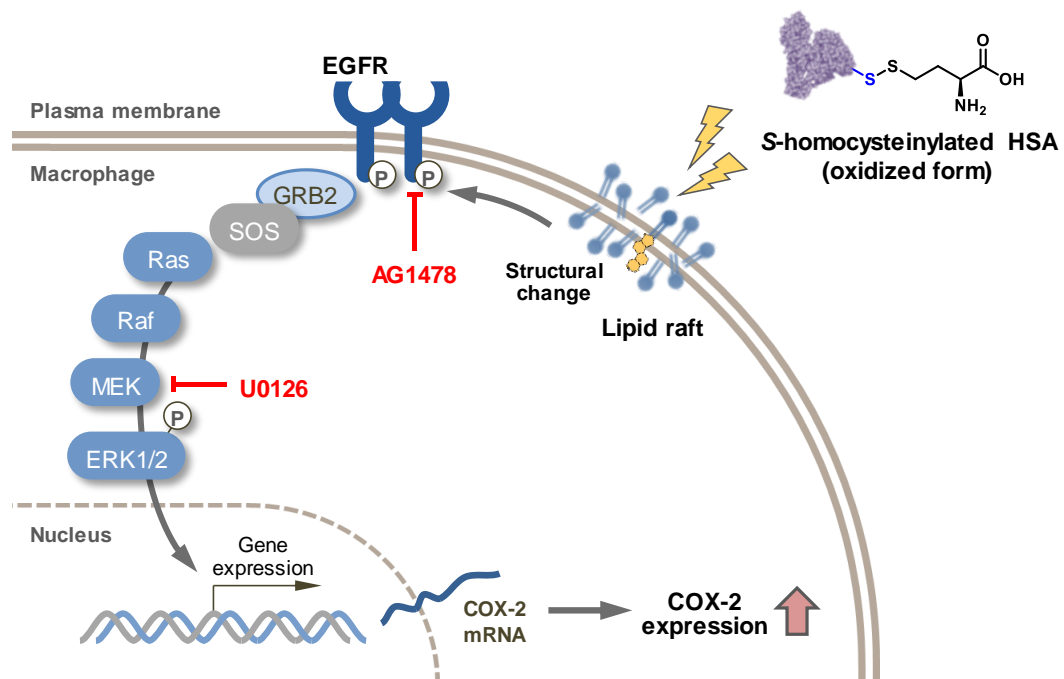


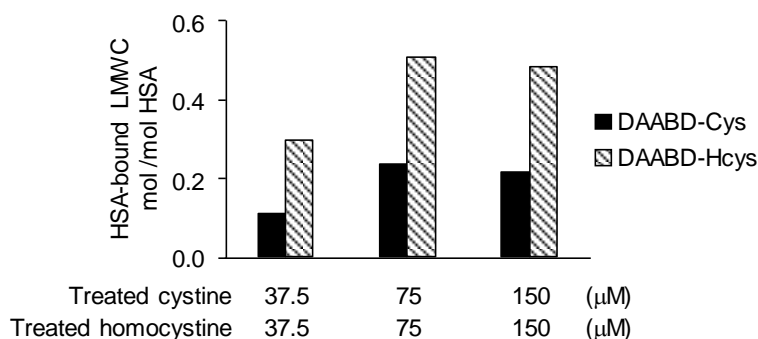
Figure 2-42 予想される S-ホモシステイン化血清アルブミンによる COX-2 発現誘導メカニズム

## 第6節 血清アルブミンと低分子チオール反応性の検討

血中においてシステインやホモシステインなどの低分子チオール化合物は、2分子の低分子チオール化合物がチオール基 (SH 基) の酸化によって生成するジスルフィド結合 (S-S) を介して繋がったシスチンやホモシスチンへと変換される。タンパク質中のシステイン残基はこれらの低分子ジスルフィド化合物とジスルフィド交換反応を起こし、S-チオール化修飾を形成する。実際、*in vitro* においても、HSA とシスチンやホモシスチンなどの低分子ジスルフィド化合物とのインキュベーションによって S-チオール化修飾 HSA を調製できることが報告されている。そこで、タンパク質のシステイン残基への S-チオール化修飾構造の形成について評価することとした。

### 6-1 シスチンおよびホモシスチンの血清アルブミンとの反応性の検討

生体内においてはシスチンとホモシスチンが共存していることから、低分子ジスルフィド化合物の共存下における HSA と低分子チオール化合物の反応性の差を検討した。等モルのシスチンおよびホモシスチンを rHSA と 37°C で 24 時間インキュベーションした後、透析により未反応の低分子ジスルフィド化合物を除去した。作製した修飾タンパク質を TCEP により還元し、限外濾過によって 3 kDa 以下の画分を回収し、得られたサンプルをタンパク質結合型の低分子化合物とした。その後、チオール基選択的な誘導体化試薬である DAABD-Cl により誘導体化し、LC-MS/MS の MRM ポジティブイオンモードにより測定した。HSA のモル当たりの低分子化合物量 (mol) を定量した結果、いずれの濃度においてもホモシステインはシステインの約 2 倍量 HSA に結合していたことから、ホモシスチンはシスチンとよりも高い反応性を有することが明らかとなった (Figure 2-43)。

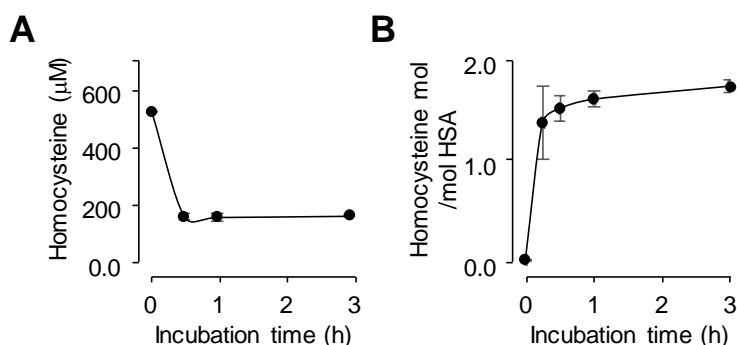


**Figure 2-43** 低分子チオール化合物のタンパク質との反応性

シスチンおよびホモシスチンを rHSA と 37°C で 24 時間インキュベーションし、rHSA 結合型低分子チオール化合物を LC-MS/MS により定量した。

## 6-2 血清アルブミンとホモシスチンの反応性

時間依存的な低分子チオール化合物の HSA との反応性を評価した。ホモシスチンと rHSA を最大 3 時間 37°C でインキュベーションした。各時間で回収したサンプルに直ちに冷アセトンを加え、タンパク質を沈殿させることにより反応を停止した。沈殿したタンパク質画分には TCEP を加え、還元処理した後に 3 kDa の限外濾過により低分子画分を回収し、DAABD-Cl により誘導体化を行った。未反応の低分子化合物を含む溶液画分は、遠心エバポレーターにより乾固した後、PB に再溶解し、タンパク質画分と同様に TCEP により還元処理した後に、DAABD-Cl により誘導体化した。調製したサンプルを LC-MS/MS の MRM ポジティブイオンモードにより測定し、低分子化合物の定量を行った結果、ホモシスチンは時間依存的に HSA と反応し、また多くのホモシスチンはタンパク質とのインキュベーション開始後約 30 分でタンパク質と反応することが明らかとなった (Figure 2-44)。



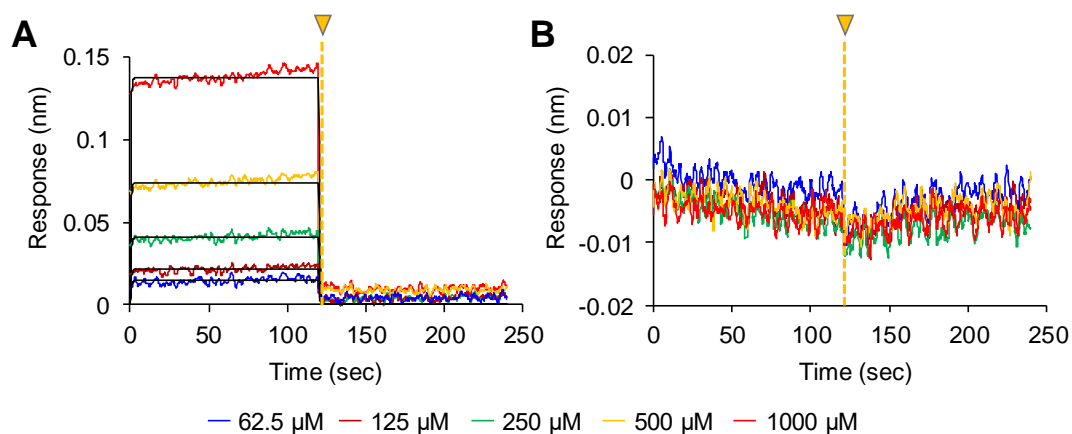
**Figure 2-44** ホモシスチンとタンパク質の反応性

ホモシスチンを rHSA と 37°C でインキュベーションし、(A) 未反応のホモシステインおよび (B) rHSA 結合型ホモシステインを LC-MS/MS により定量した。

## 6-3 血清アルブミンと低分子チオール化合物の相互作用

HSA はシスチンやホモシスチンなどの低分子ジスルフィド化合物と反応し、S-チオール化修飾を形成するが、システインやホモシステインなどの低分子チオール化合物とは反応せず、S-チオール化修飾を形成しないことが分かっている (Ref)。このことから、低分子化合物のジスルフィド結合の有無によるタンパク質反応性の違いに低分子化合物とタンパク質の相互作用に差があるのではないかと予想した。そこで、ホモシステインとホモシスチンの HSA との相互作用について、バイオセンサー技術 (BLI 法) を用いた Octet システムにより解析を行った。BLI 法は、アナライト分子がバイオセンサー先端に固定されたリガンドと結合する分子、またはバイオセンサーから解離する分子数の変化によって生じる波長シフト  $\Delta \lambda$  の変化をリアルタイムに計測し、評価するものである。

HSA のリジン残基にビオチンを付加したビオチン化 HSA をアビジンセンサーチップに固定化し、ホモシステインあるいはホモシスチンをアナライトとして測定した。センサーチップをアナライトと 120 秒間反応させ、低分子化合物 - タンパク質間の相互作用を解析した結果、ホモシステインと HSA の相互作用は認められなかった一方で、ホモシスチンと HSA の相互作用はホモシスチンの濃度依存的に増強することが明らかとなった。さらに、センサーチップとアナライトを 120 秒間反応させた後に水でセンサーチップを洗浄し、再び低分子化合物-タンパク質間の相互作用を測定したところ、相互作用は認められなかった。このことから、センサーチップをアナライトと反応させた 120 秒という比較的短時間では、低分子化合物はタンパク質と相互作用を起こすのみで、S-チオール化修飾は形成しないことが示唆された。これらの結果から、ホモシステインとホモシスチンのタンパク質との反応性の違いをもたらす理由のひとつとして、低分子化合物-タンパク質間の相互作用の違いが示唆された (Figure 4-45)。



**Figure 2-45 低分子化合物とタンパク質の相互作用解析**

(A) ホモシスチンあるいは (B) ホモシステインと rHSA の相互作用を BLI 法により測定した。ビオチン化 rHSA をセンサーチップに固定し、ホモシスチンあるいはホモシステインを添加した 96 ウェルにセンサーチップを 120 秒浸し、相互作用を測定した (黄色矢印で示す)。その後、センサーチップを水で洗浄し、再びセンサーチップ上の低分子化合物 - タンパク質の相互作用を解析した。

## 第7節 まとめおよび考察

本研究では、健常者および脂質異常症患者由来の血清を陰イオン交換カラムにより分析し、HSA に由来するユニークなピークを検出した。解析の結果、このピークはシステインやホモシステインとジスルフィド結合を形成した *S*-チオール化修飾 HSA であることを明らかにした。興味深いことに、*S*-チオール化修飾はこれまで唯一のターゲットと考えられてきた HSA の遊離のシステイン残基である Cys34 のみならず、Cys90 や Cys101 など、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形成されていることを明らかにした。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ける *S*-チオール化修飾は、血中高ホモシステイン濃度を示すモデルマウスである CBS KO および CSE KO マウス血清においてもその形成が認められた。これまでに、*in vivo* 由来のサンプルで、タンパク質中の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ける *S*-チオール化修飾の形成は報告されていなかった。本研究の結果、脂質異常症患者および CBS KO、CSE KO マウス由来のサンプルにおいて血清アルブミンの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ける *S*-チオール化修飾を検出した。*S*-チオール化修飾の形成メカニズムについては未だ不明であるが、これらの知見は生理学および病態生理学的条件における血清アルブミンの構造変化に新たな洞察を与えることが期待される。

ホモシステインを含む低分子チオール化合物は、生体内のレドックス恒常性を維持する上で重要な役割を果たしている。ヒト血液中においては、ホモシステイン（総ホモシステイン量として換算）は約 10  $\mu$ M 含まれ、その約 60%はタンパク質にジスルフィド結合を形成した形 (Hcys-S-S-protein) で存在している。残りの 30%は、ホモシステインやシステインとジスルフィド結合を形成して、ホモシスチン (Hcys-S-S-Hcys) や混合ジスルフィド (Hcys-S-S-Cys) などの酸化型の状態で存在している。総ホモシステイン量のうち、僅か 1%のみが遊離のホモシステインとして存在している<sup>97</sup>。ホモシステインなどの低分子チオール化合物は、このほかにも細胞を活性酸素種や反応性中間体生成物から保護する重要な役割を果たしている。しかしながら、血液中のホモシステイン量の増加は心臓発作などの心臓血管疾患<sup>98</sup>および末梢静脈の障害<sup>99</sup>との相関が報告されており、疾患のリスクファクターとして知られている。

脂質異常症患者において血液中の総ホモシステイン量と、HSA 結合型のホモシステインに高い相関が認められた一方、血液中の総システイン量と HSA 結合型システイン量および血液中の総 GSH 量と HSA 結合型 GSH は健常者および脂質異常症患者のいずれにおい

でも相関は認められないという結果が得られた。これらの結果と、CBS KO マウスおよび CSE KO マウス由来の血清アルブミンの複数個所のシステイン残基において S-ホモシステイン化修飾が認められたことから、血液中のホモシステイン量の増加に伴った HSA の S-ホモシステイン化修飾は、直接的あるいは間接的に心血管疾患の病態を反映している可能性が示唆された。これらの結果から、S-ホモシステイン化修飾 HSA のバイオマーカーとしての有用性と重要性を示す可能性があると共に、ホモシステインの疾病への関与を明らかにする上で重要な手がかりとなる可能性があると考えられる。

*In vitro* においてシスチンとホモシスチンの反応性を検討した結果、タンパク質へのホモシスチンの反応性はシスチンの反応性よりも高いことが明らかとなった。つまり、生体条件下においては、S-システイン化修飾よりも S-ホモシステイン化修飾の方が形成しやすい可能性が示唆された。これまでに、混合ジスルフィドを形成するチオールジスルフィド交換反応に、大きなエントロピーの損失を伴ったエンタルピー駆動の非共有結合性の相互作用の寄与が報告されている<sup>100</sup>。また、バッファー中に存在するチオレートアニオンのプロトン化および脱プロトン化がエンタルピー変化に関与することも報告されている<sup>100</sup>。遊離のホモシステインの  $pK_a$  は 8.7 であり、遊離のシステインの  $pK_a$  8.15 よりも高いことから、生体条件下においてホモシステインのチオレートアニオンはシステインのチオレートアニオンよりもプロトン化されやすいと予想される<sup>101</sup>。このことから、非共有結合性の HSA-ホモシスチン複合体の形成は HSA-シスチン複合体の形成よりもエンタルピー的に有利であると予想される。以上のことから、S-ホモシステイン化修飾 HSA と S-システイン化修飾 HSA の形成されやすさの違いは、低分子チオール化合物とタンパク質の相互作用をもたらしエンタルピーの違いによって説明できると考えられる。しかしながら、脂質異常症患者由来の血清アルブミンを解析した結果、Cys34 における S-システイン化修飾は 4 検体全てにおいて確認されたが、S-ホモシステイン化修飾は全く認められなかった。これは、脂質異常症患者の血清中の総ホモシステインが 1-5  $\mu\text{M}$  である一方、総システインは 20-100  $\mu\text{M}$  であり、システイン濃度がホモシステイン濃度よりもはるかに高いことが修飾構造の形成に影響していると予想されるが、Cys34 の S-ホモシステイン化修飾が *in vivo* サンプルで全く検出されなかった理由については不明である。

HSA は サブドメイン A と B により構成されたドメインが 3 つ (subdomain I, II, III) 連なった類似した構造モチーフにより構成されている。興味深いことに、脂質異常症患者や CBS KO、CSE KO マウス、*in vitro* で作製した修飾 HSA において検出された S-チオール化修飾を受けたシステイン残基の多くは、サブドメイン A に位置していた。これまでに、同

じサブドメイン内に存在するシステイン残基でチオール/ジスルフィド交換反応を介したジスルフィドの組み換えが起こり得るという報告<sup>102</sup>がされていることから、サブドメイン A のジスルフィド結合が、他のサブドメインに存在するジスルフィド結合よりもチオール/ジスルフィド交換反応を受けやすい可能性が考えられる。HSA のサブドメイン IA に位置する Cys90, Cys91 および Cys101 は、高い割合で S-チオール化修飾を受けている部位であることが明らかとなったことから、特にサブドメイン IA はシスチンやホモシスチンなどの低分子ジスルフィド化合物を結合しやすい部位であると予想される。実際に、HSA の Cys34 はシスチンやホモシスチンによる S-チオール化のターゲットであることがこれまでも報告されている<sup>101</sup>。低分子化合物-タンパク質間の相互作用解析によって、ホモシステインではなくホモシスチンが HSA と相互作用する結果が得られたことから、Cys34 におけるシスチンやホモシスチンのチオールジスルフィド交換反応が引き金となり、チオールジスルフィド交換反応によってサブドメイン IA の近傍に生じたシステインやホモシステインなどの遊離の低分子チオール化合物がその周囲に存在するジスルフィド結合と更なるチオールジスルフィド交換反応を起こして S-チオール化修飾を形成すると予想される。この連鎖反応メカニズムによってサブドメイン IA に存在するシステイン残基が選択的に S-チオール化修飾を受けることを説明できる可能性があると共に、タンパク質の S-チオール化に新たな洞察を与える可能性がある。

分子内ジスルフィド結合はタンパク質の構造や機能を維持する上で必要であることから<sup>103</sup>、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の修飾は HSA の構造や生理学的な機能を変化させることが予想された。これまでに、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の修飾が HSA の抗酸化活性が低下させることが報告されている<sup>104</sup>。タンパク質表面の疎水性領域や HSA の結合サイト I および II の低分子化合物の結合活性を評価する特異的な蛍光プローブを用いた検討の結果、S-ホモシステイン化修飾によって HSA 分子のタンパク質表面の疎水性領域の増加と低分子化合物の結合能の増加が認められた。この結果は、S-ホモシステイン化修飾が S-システイン化修飾よりも起こりやすいという結果と一致している。ホモシスチンがシスチンよりもタンパク質との高い反応性を有するのはホモシステイン残基に化学的には不活性と考えられているメチレン基が存在するためである可能性が考えられる。

近年、慢性炎症が種々の疾病発症に関与していることが報告されていることから、S-チオール化修飾 HSA の炎症誘導活性をマウスマクロファージ細胞である RAW264.7 細胞を用いて炎症関連分子であるシクロオキシゲナーゼ-2 (COX-2) の発現を指標に評価した結

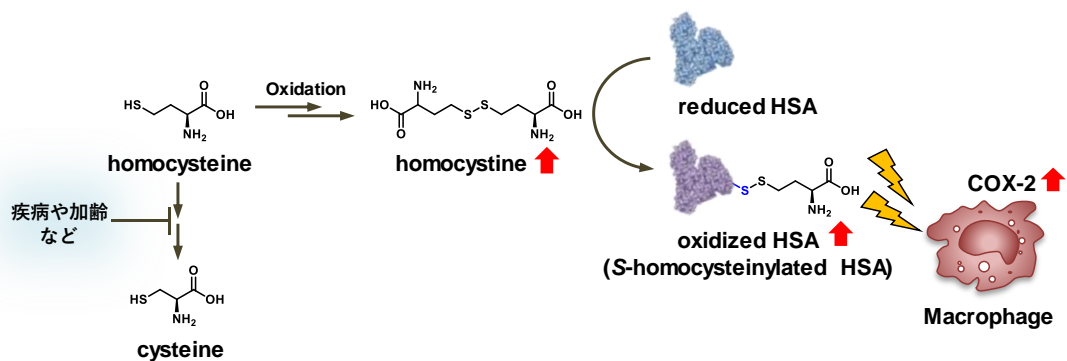


果、*S*-チオール化修飾の中でも、*S*-ホモシステイン化修飾を受けた HSA がマクロファージ細胞において COX-2 の発現を誘導することが明らかとなった。これは、*S*-ホモシステイン化修飾による HSA の機能性変化と一致していた。これまでに HSA がコレステロールと結合することや、内皮細胞からコレステロールを引き抜くことが報告されていたため、HSA の機能性変化に伴うコレステロール引き抜きが COX-2 発現に関与していると予想された。検討の結果、*S*-ホモシステイン化修飾 HSA は、細胞からコレステロールを引き抜くことによって COX-2 の発現を誘導していることが明らかとなった。コレステロールを豊富に含む細胞膜ドメインである脂質ラフトの変化を評価した結果、*S*-ホモシステイン化処理によって脂質ラフトの構造が変化していることが明らかとなった。さらに、コレステロール除去試薬である M $\beta$ CD や FilipinIII の RAW264.7 細胞への処理によっても COX-2 発現が誘導されたことから、細胞からのコレステロール引き抜きが炎症応答に関与していることが示唆された。

炎症応答に関与するシグナルについて検討した結果、上皮成長因子受容体 (EGFR) のリン酸化が確認され、その下流に存在する細胞増殖と生存に関与する Ras/Raf/MAPK 経路、細胞生存に関与する JAK-STAT 経路、細胞成長や抗アポトーシスなどに関与する PI3K-AKT 経路の 3 つのシグナル経路のうち、Ras/Raf/MAPK 経路の活性化が認められた。これは EGFR の活性化に関与するシグナル経路と一致していることから、EGFR-ERK 経路の活性化は、COX-2 発現誘導に重要であることが強く示唆された。更なる解析の結果、COX-2 発現誘導には脂質ラフトの構造変化が関与していると考えられることから、EGFR だけでなく脂質ラフトに存在している他の受容体が自己リン酸化を引き起こす可能性は十分に考えられる。EGFR の阻害剤の処理によって *S*-ホモシステイン化誘導性の炎症応答が抑制されることから、COX-2 発現誘導に関与していると考えられるが、実際にはこれ以外の受容体も細胞応答に関与している可能性が考えられ、今後の更なる検討が必要である。

以上をまとめると、本研究によって、*S*-チオール化修飾 HSA が脂質異常症に関連したタンパク質の翻訳後修飾であることを明らかとした。また、この *S*-チオール化修飾は遊離のシステイン残基である Cys34 のみならず、分子内ジスルフィド結合を形成している他のシステイン残基においても形成されていることが明らかとなった。興味深いことに、HSA は *S*-ホモシステイン化修飾を受けることによってリガンド結合能が増加することも明らかとなった。*S*-ホモシステイン化修飾に伴う HSA の生理機能の変化は、脂肪酸やホルモンなどの内因性分子によって誘導される細胞間や臓器間の生体応答に影響を与えられらる。さらに、*S*-ホモシステイン化修飾 HSA の炎症誘導とその誘導メカニズムを明らかに

し、*S*-ホモシステイン化修飾 HSA の疾病の発症や進展への関与を明らかにした。今後更なる検討が必要であるが、本研究によって明らかとなった *S*-チオール化修飾 HSA 誘導性の炎症応答は脂質異常症や他の慢性炎症性疾患の予防や治療法を確立する上で重要な指針となると期待される。



**Figure 2-46 本研究のまとめ**

疾病や加齢などにより増加したホモシスチンは血清アルブミンを修飾し、酸化型血清アルブミンである *S*-ホモシステイン化修飾血清アルブミン (*S*-Hcys-HSA) を形成する。さらに、*S*-Hcys-HSA はマクロファージを活性化し、炎症応答を引き起こす。



## 第 3 章

# プロスタグランジン $D_2$ 代謝物修飾血清アルブミン による炎症誘導

### 第3章 プロスタグランジン D<sub>2</sub>代謝物修飾血清アルブミンによる炎症誘導

#### 第1節 はじめに

##### 1-1 脂質メディエーター

脂質は生体において細胞膜の主要な構成成分やエネルギー源として重要な役割を担う他、種々の変換酵素によって脂質メディエーターに変換され、細胞内の情報伝達や生体防御に関与する。脂質メディエーターとはプロスタグランジン (PG) やロイコトリエン (LT) などのアラキドン酸代謝物、血小板活性化因子 (PAF)、リゾホスファチジン酸 (LPA)、スフィンゴシン 1-リン酸 (SIP) などのリン脂質性分子、アナンダミドなど、生理活性を有する脂質の総称であり、細胞に対する刺激に応答して生体膜の構成成分であるリン脂質やコレステロールから産生される。生体内の脂質メディエーター量は、合成と分解に関与する酵素によって調節され、神経伝達物質やホルモンと共同作用を営みながら、生体の機能を調整していると考えられている。

##### 1-2 アラキドン酸カスケードとプロスタグランジン

プロスタグランジンは、アラキドン酸由来の脂質メディエーターで、細胞の分化や成長などの生体内のホメオスタシス維持に重要な役割を果たしている<sup>105,106</sup>。細胞外からの刺激に応答してホスホリパーゼ A<sub>2</sub>が活性化すると、生体膜のリン脂質中の主要な脂肪酸であるアラキドン酸が切り出される。生体膜から遊離したアラキドン酸は、シクロオキシゲナーゼ-2 (COX-2) (EC1.14.99.1)のビスオキシゲナーゼ活性によって2分子の酸素が付加し、不安定な環状エンドペルオキシド中間体である PGG<sub>2</sub>へと変換される。さらに COX-2 のペルオキシダーゼ活性により15位のヒドロペルオキシ基が還元されて PGH<sub>2</sub>へと変換される。PGH<sub>2</sub>はその後、様々な特異的な PG 合成酵素による変換を受けて、PGE<sub>2</sub>、PGD<sub>2</sub>、PGF<sub>2α</sub>、PGL<sub>2</sub> やプロスタサイクリンに変換される。このように多岐にわたる合成経路はアラキドン酸カスケードと呼ばれている (Figure 3-1)。子宮を収縮させる脂溶性の低分子化合物 (後に PGE<sub>2</sub> であることが分かる) が1933年に Goldblatt によってヒトの精漿内に、1934年に Ulf Svante von Euler によって羊の精囊腺に存在することが発見し、その後1936年に精液中から初めて単離された。発見当時 PG は前立腺 (prostate gland) 由来であると考えられていたために prostaglandin と名付けられたものの、実際には PG は前立腺ではなく精巣で産生されていたことが後に明らかになった。つまり当初の命名は間違っていたのだが、訂正されることなく

この名で広く知られるようになった<sup>107108</sup>。PGの発見から30年以上後にその化学構造が決定され、その後も様々な生理活性が報告されており、脂質メディエーターの中でも最も研究が進んでいるもののひとつであると言える。このようなPGはGタンパク質共役型受容体を介して細胞応答を引き起こすことも分かってきており、脂質メディエーターが細胞内の情報伝達において重要な役割を担っていることが明らかにされつつある。

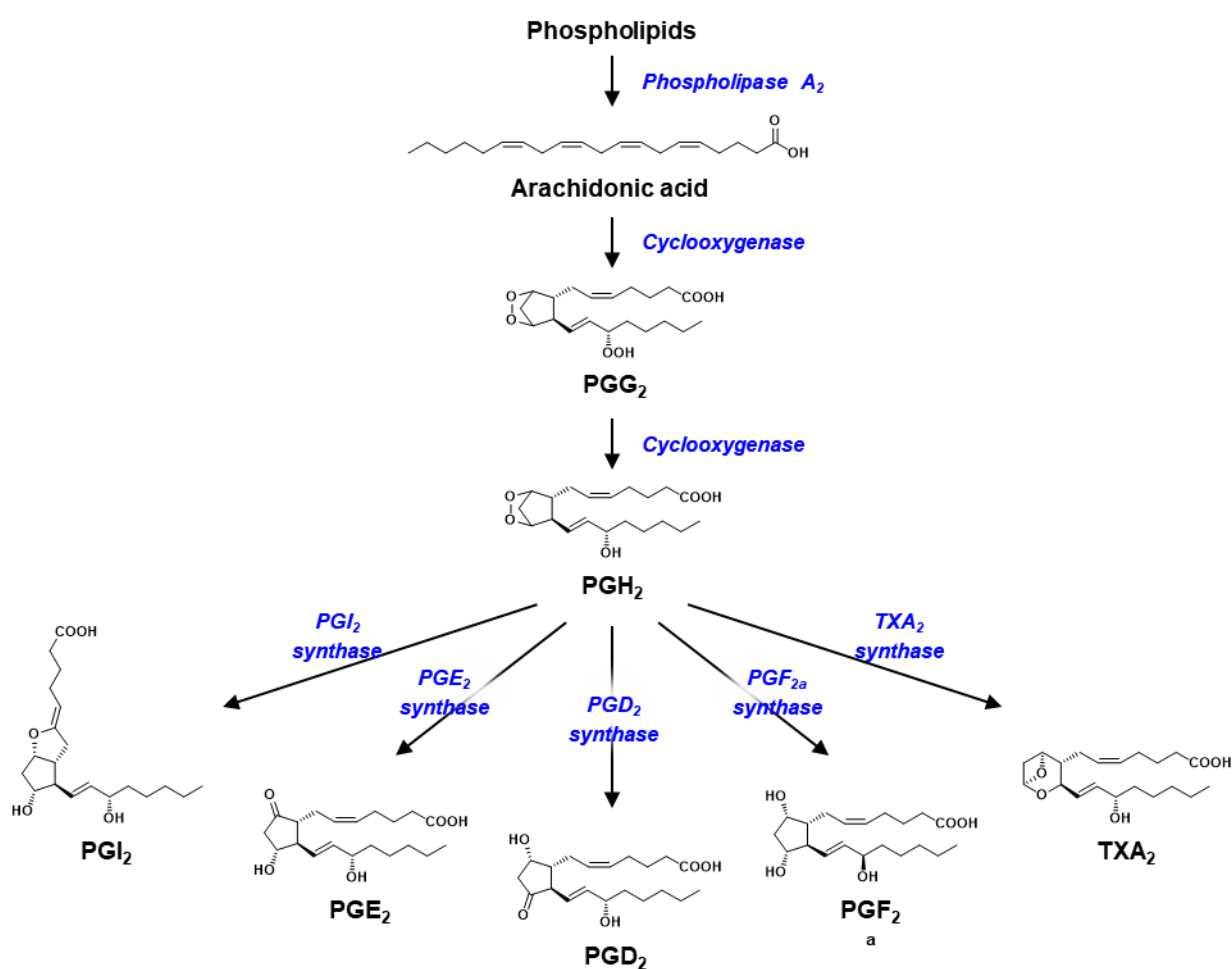


Figure 3-1 アラキドン酸カスケード

### 1-3 PGD<sub>2</sub> の生理活性

PG 類の中でも、PGD<sub>2</sub> は、COX-2 依存的に産生される主要な PG 類のひとつであり、PGD 合成酵素 (PGDS) により様々な PG 類の共通中間体である PGH<sub>2</sub> の 9,11 位を結ぶ分子内過酸化結合が還元型グルタチオン (GSH) の存在下において異性化を受けて、9 位が水酸基、11 位がケト基へ変換されることによって合成される (Figure 3-2)<sup>109</sup>。PGD<sub>2</sub> は、ほぼ全身の組織において PGH<sub>2</sub> から合成され、特に脾臓、骨髄、腸、肝臓、肥満細胞で多く産生されており<sup>110,111</sup>、平滑筋弛緩、神経細胞機能および血小板凝集を含む様々な生体反応を引き起こす<sup>112</sup>。PGDS は、分子進化的に全く異なる 2 つのタイプが存在する。ひとつはリポカリン型 PGDS (L-PGDS) と呼ばれ、脳脊髄液中に多量に存在している。もうひとつは、造血器型 PGDS (H-PGDS) と呼ばれ、マクロファージやマスト細胞、巨赤芽球などに発現している。L-PGDS は中枢神経や雄性生殖器、心臓に局在している。PGD<sub>2</sub> は中枢神経系の主要な PG として産生され、DP1 受容体を介してノンレム睡眠を自然に誘導するほか<sup>113</sup>、生殖器誘導など生命活動における重要な機能に関与している。一方、H-PGDS は肥満細胞や Th2 細胞に分布し、産生された PGD<sub>2</sub> は DP1 と DP2 の 2 種類の受容体を介してアレルギーや炎症のメ

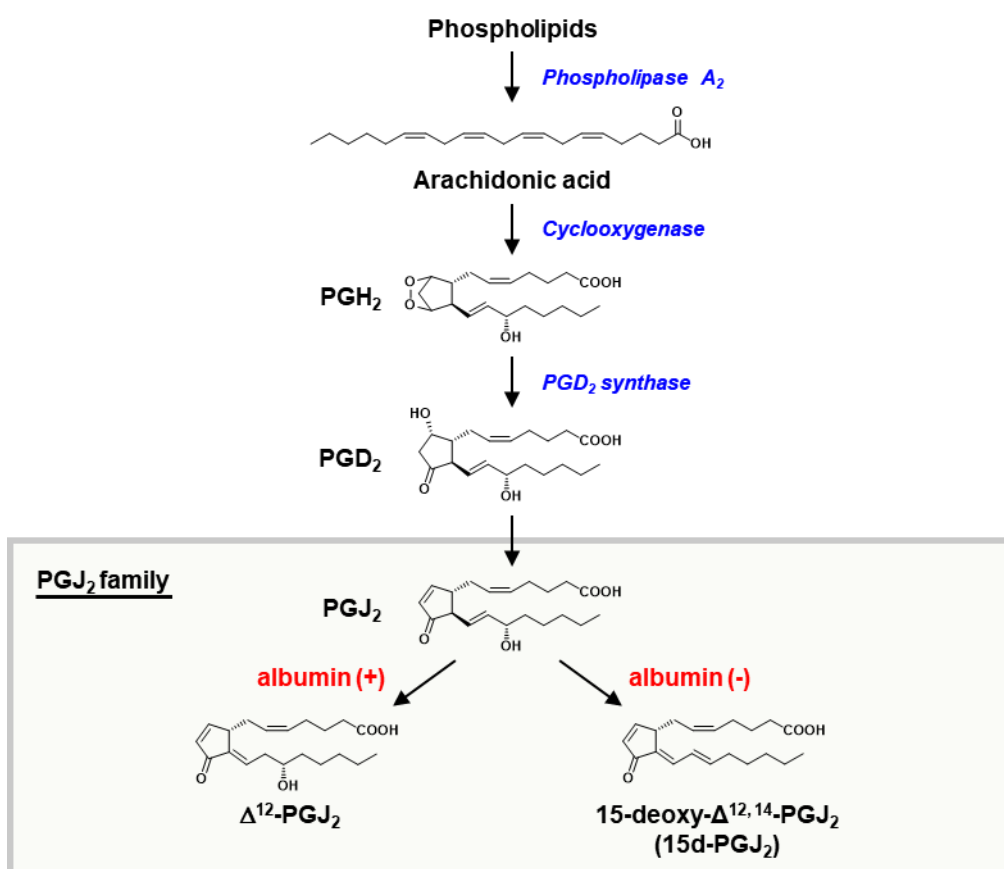


Figure 3-2 PGJ<sub>2</sub> ファミリーの合成経路

ディエーターとして働いている<sup>114-117</sup>。抹消組織において最も PGD<sub>2</sub> を多く産生する細胞は肥満細胞であり、抗原抗体刺激を行った肥満細胞において 50 ng / 1×10<sup>6</sup> cells 程度産生すると報告されている<sup>116</sup>。全身性マストサイトーシスの患者では、ヒスタミンに加え、PGD<sub>2</sub> の量が増加しており、潮紅、頻脈、低血圧、呼吸困難、腸能動性の上昇が起き、腹部痙攣、下痢、嘔吐を引き起こす<sup>116</sup>。ほかにも樹上細胞や Th2 細胞において産生されることが知られているが、その産生量は肥満細胞と比べて非常に少ないことが分かっている<sup>111,118</sup>。

#### 1-4 PGD<sub>2</sub> 変換経路

生体条件下において、PGD<sub>2</sub> は不安定であり、速やかに非酵素的な脱水および異性化され、PGJ<sub>2</sub> や Δ<sup>12</sup>-PGJ<sub>2</sub>、15-deoxy-Δ<sup>12,14</sup>-PGJ<sub>2</sub> (15d-PGJ<sub>2</sub>) などの求電子性を有する J<sub>2</sub> 型 PG 類へと変換される<sup>26,28,119</sup>。まず、PGD<sub>2</sub> は、C11 位のケト基が、C9 位の水酸基の β-脱離を促進し、PGJ<sub>2</sub> へと変換される。PGD<sub>2</sub> の 9 位のヒドロキシル基が脱水を受けると PGJ<sub>2</sub> へ、さらに 15d-PGJ<sub>2</sub> の 15 位のヒドロキシル基が脱水を受けると 15d-PGD<sub>2</sub> へと変換される。さらに、不安定な中間体である PGJ<sub>2</sub> は、血清アルブミンの存在下では Δ<sup>12</sup>-PGJ<sub>2</sub> へ変換され、15d-PGD<sub>2</sub> への変換は抑制される (Figure 3-2)<sup>28</sup>。血清アルブミンによる PG 類の異性化反応には血清アルブミンのサブドメイン IIA における微小塩基性環境が重要であるとされ、リジンやアルギニンといった塩基性アミノ酸残基の変異により、異性化反応が著しく阻害されることが報告されている<sup>120,121</sup>。実際に当研究室において、Δ<sup>12</sup>-PGJ<sub>2</sub> の血清アルブミンの結合部位として、His168 が見出されている<sup>122</sup>。

#### 1-5 J<sub>2</sub> 型 PG の生理活性

PGJ<sub>2</sub>, Δ<sup>12</sup>-PGJ<sub>2</sub>, 15d-PGJ<sub>2</sub> などの三者を含む PGJ<sub>2</sub> ファミリーは、その構造中にシクロペンテノン構造を有し、PGD<sub>2</sub> にはないユニークな生理活性を有する<sup>123</sup>。1980 年代後半から 1990 年代前半にかけて、がん細胞やウイルスの増殖抑制作用が明らかになり、抗腫瘍および抗ウイルス薬の候補として期待されていた。しかしながら、生体内において PGJ<sub>2</sub> ファミリーは不安定であると共に修飾を受けやすいこと、また比較的高濃度においてのみ効果が認められたことから、未だに臨床応用には至っていない。1995 年に 15d-PGJ<sub>2</sub> が核内転写因子であるペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 γ (PPARγ) の内因性リガンドであると報告され<sup>124,125</sup>、PGJ<sub>2</sub> ファミリーが再び注目されるようになった。この報告では、15d-PGJ<sub>2</sub> が、PPARγ へ直接的に結合することによって脂肪細胞の分化を惹起することが示された。さらにその後、15d-PGJ<sub>2</sub> がマクロファージの活性化を抑制すること<sup>67</sup> や、15d-PGJ<sub>2</sub> は炎症の後期に産



生され PPAR $\gamma$  を介する経路、また IKK を阻害する経路などの複数の経路を介して抗炎症作用を発揮することが報告されており (Figure 3-3)、PGD $_2$  により誘発された炎症をその変換産物が収束させるネガティブフィードバックがなされていると考えられている<sup>65</sup>。また、PPAR $\gamma$  は炎症部位であるヒト動脈硬化病巣のマクロファージにおいて高発現していることも明らかにされた<sup>126</sup>。さらに 15d-PGJ $_2$  は NF- $\kappa$ B のサブユニットである p65 および p50 に存在する DNA 結合サイトに存在するシス

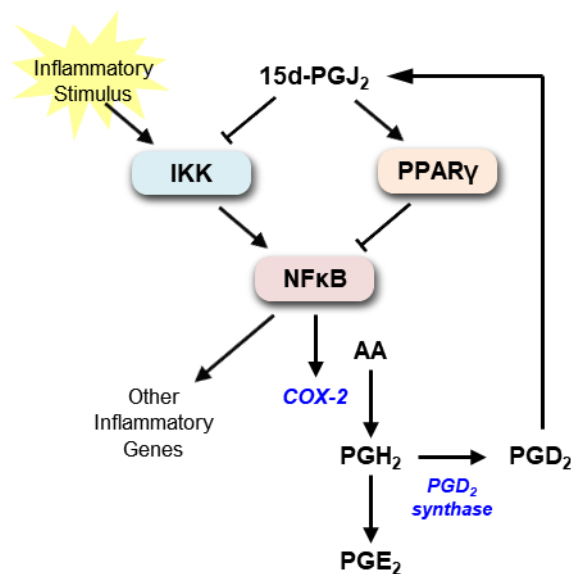


Figure 3-3 15d-PGJ $_2$  の PPAR $\gamma$  依存的・非依存的な抗炎症作用

より、DNA の結合を阻害することも知られている<sup>65,127</sup>。このように、J $_2$  型 PG は強力な抗炎症メディエーターとして認識されている。これまでに当研究室においては、J $_2$  型 PG に特徴的な生理機能として、解毒酵素誘導能や ROS 産生能、アポトーシス誘導能を見出している<sup>128,129</sup>。一般的にこのような生理活性の評価には  $\mu$ M レベルの PG が用いられているが、実際に *in vivo* で生成される PGD $_2$  の変換産物は、これらの活性を誘導するのに必要な濃度に対して低濃度であることが報告されており、PGD $_2$  変換産物の生物学的意義に疑問が残されている。

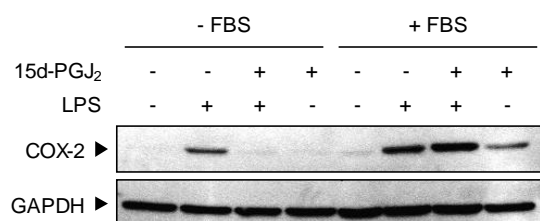
## 1-6 目的

抗炎症物質として広く知られている J $_2$  型 PG の一つである 15d-PGJ $_2$  が、興味深いことにマクロファージ細胞において細胞培養時に添加する牛血清 (FBS) の存在に依存した炎症応答を誘導することを発見した。血清は血液中に豊富に存在することからも、15d-PGJ $_2$  の血清に依存した活性変化が生体条件下において起こる可能性は非常に高いと考えられる。15d-PGJ $_2$  はこれまでもユニークな生理活性を有することが報告されているが、今回明らかとなった血清依存的な活性変化が J $_2$  型 PG に特徴的な応答であるかという点も含め、そのメカニズムの解明を行うこととした。

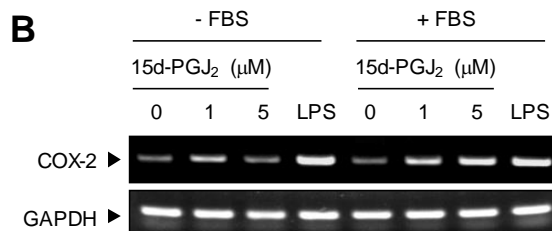
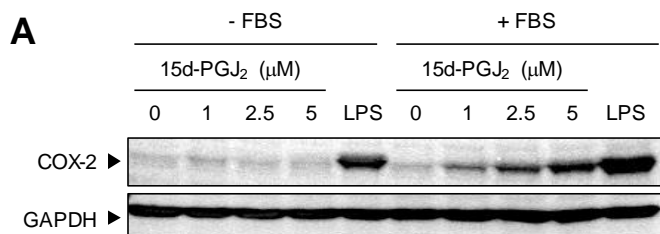
## 第2節 15d-PGJ<sub>2</sub>の血清に依存した炎症応答

マウスマクロファージ様細胞である RAW264.7 細胞を用いて、FBS の存在下および非存在下における 15d-PGJ<sub>2</sub> の炎症誘導を炎症関連分子であるシクロオキシゲナーゼ-2 (COX-2) の発現を指標に評価した。その結果、これまでの報告の通り 15d-PGJ<sub>2</sub> は FBS 非存在下において LPS 誘導性の COX-2 発現を抑制し、抗炎症活性が確認されたが、FBS 存在下においては、COX-2 発現を増強し、炎症誘導活性が認められた。さらに興味深いことに、FBS 存在下において 15d-PGJ<sub>2</sub> は COX-2 の発現を誘導することが明らかとなった (Figure 3-4)。

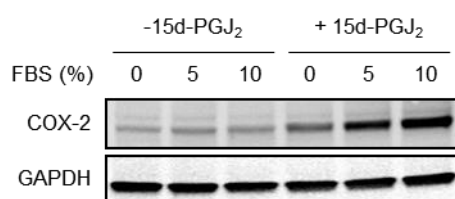
ウエスタンブロッティングおよび PCR 法を用いて細胞中のタンパク質レベルおよび mRNA レベルで COX-2 を評価した結果、FBS 存在下において 15d-PGJ<sub>2</sub> の濃度依存的に COX-2 の発現が誘導された (Figure 3-5)。また、15d-PGJ<sub>2</sub> は、FBS 濃度依存的に COX-2 の発現を誘導した (Figure 3-6)。



**Figure 3-4 15d-PGJ<sub>2</sub>の血清依存的な炎症応答**  
15d-PGJ<sub>2</sub> を FBS 存在下および非存在下において RAW264.7 細胞に処理し、COX-2 発現を評価した。

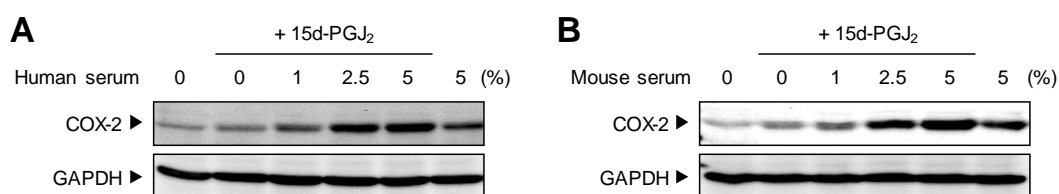


**Figure 3-5 15d-PGJ<sub>2</sub> 依存的な炎症応答**  
様々な濃度の 15d-PGJ<sub>2</sub> を FBS 存在下および非存在下において RAW264.7 細胞に処理し、(A) ウエスタンブロッティングにより COX-2 発現を、(B) PCR 法により COX-2 の mRNA を評価した。



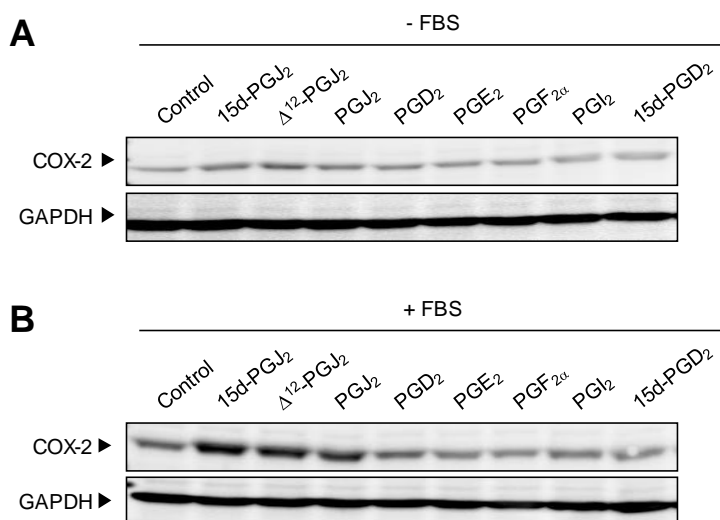
**Figure 3-6 血清依存的な炎症応答**  
様々な濃度の FBS を 15d-PGJ<sub>2</sub> 存在下および非存在下において RAW264.7 細胞に処理し、COX-2 の発現を評価した。

15d-PGJ<sub>2</sub> の血清に依存した炎症応答は牛血清に特異的なものであるか検討を行うため、ヒト血清やマウス血清を用いて検討を行った。その結果、15d-PGJ<sub>2</sub> は、FBS のみならず、ヒト血清やマウス血清によってもその濃度依存的に COX-2 の発現を誘導した (Figure 3-7)。また、PGJ<sub>2</sub> ファミリーを含む種々のプロスタグランジン類の FBS 存在下における COX-2 誘導活性を評価した結果、PGJ<sub>2</sub>,  $\Delta^{12}$ -PGJ<sub>2</sub>, 15d-PGJ<sub>2</sub> を含む PGJ<sub>2</sub> ファミリーのみが COX-2 誘導活性を有することが明らかとなった (Figure 3-8)。このことから、PG の求電子的な性質が炎症誘導活性に関与していると予想された。15d-PGJ<sub>2</sub> と、特異的な  $\omega$ 3 系の多価不飽和脂肪酸由来の抗炎症メディエーターであるプロテクチン D<sub>1</sub> やレゾルビン D<sub>1</sub> の投与による COX-2 発現誘導を評価した。その結果、プロテクチン D<sub>1</sub> やレゾルビン D<sub>1</sub>, DHA は FBS 存在下および非存在下において COX-2 発現を誘導しなかった (Figure 3-9)。これらの結果から、15d-PGJ<sub>2</sub> による炎症誘導に、血清が関与していることが明らかになった。



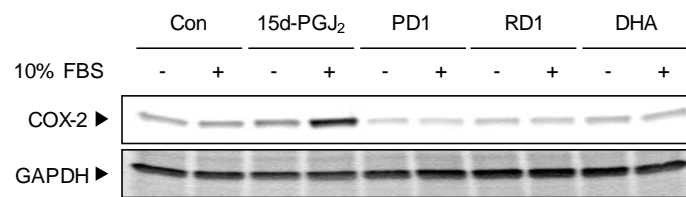
**Figure 3-7 15d-PGJ<sub>2</sub> の血清依存的な炎症応答**

(A) ヒト血清あるいは(B) マウス血清と 15d-PGJ<sub>2</sub> を RAW264.7 細胞に処理し、ウェスタンブロッティングにより COX-2 の発現を評価した。



**Figure 3-8 様々な PG 類の血清依存的な炎症応答**

様々な PG 類を(A) FBS 非存在下および (B) FBS 存在下において RAW264.7 細胞に処理し、COX-2 の発現を評価した。



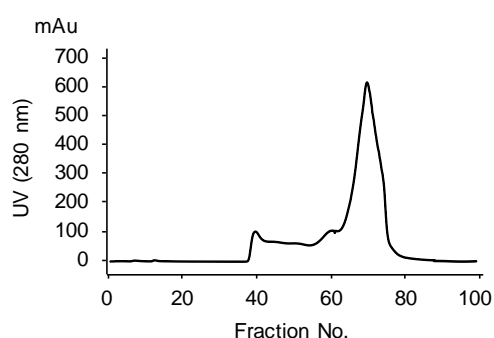
**Figure 3-9** ω3 系の多価不飽和脂肪酸由来の抗炎症メディエーターの血清依存的な炎症応答  
様々な抗炎症メディエーターと血清を RAW264.7 細胞に処理し、COX-2 の発現を評価した。

### 第3節 15d-PGJ<sub>2</sub>の炎症誘導に関わる血清成分の探索

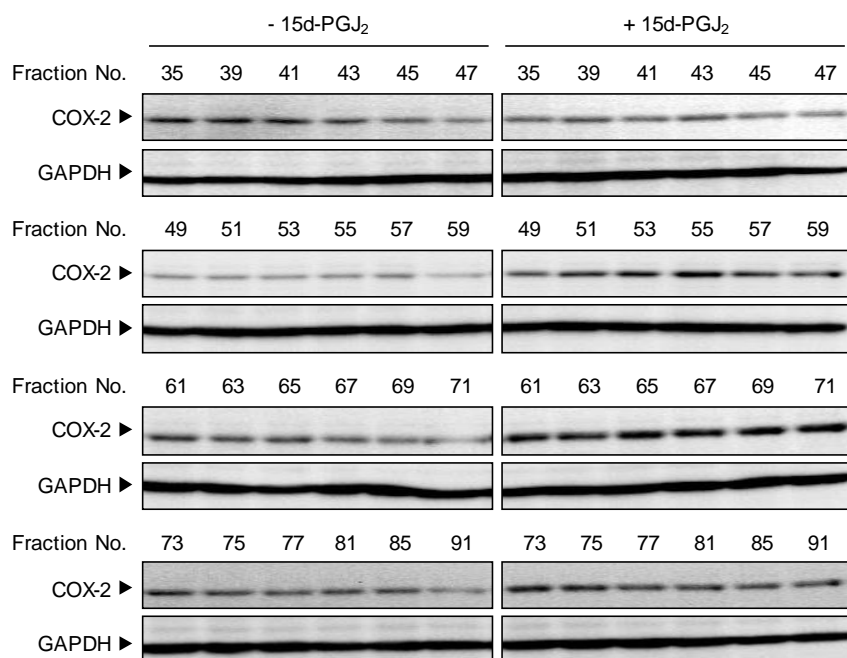
血清依存的な 15d-PGJ<sub>2</sub> の炎症誘導活性の変化は、血清成分に依存したものであると予想した。そこで、本節では 15d-PGJ<sub>2</sub> の活性を制御する血清成分の同定を行うこととした。

#### 3-1 15d-PGJ<sub>2</sub>による炎症誘導に関与する血清成分の探索

15d-PGJ<sub>2</sub>による炎症誘導に関与する血清成分を同定するため、FBS をゲルろ過クロマトグラフィーにより分画した (Figure 3-10)。分画して得られたフラクションを RAW264.7 細胞に 15d-PGJ<sub>2</sub> 存在下あるいは非存在下において処理し、37°C で 4 時間インキュベーションした後、ウエスタンブロッティングにより COX-2 発現を評価した。



**Figure 3-10 FBS の分画**  
ゲルろ過クロマトグラフィー (AKTAprime plus) により FBS を分画した。



**Figure 3-11 15d-PGJ<sub>2</sub> の血清依存的な炎症誘導に関与する血清成分の同定**  
ゲルろ過クロマトグラフィーにより分画した FBS を 15d-PGJ<sub>2</sub> 非共存下 (左)および共存下 (右) で RAW264.7 細胞に処理し、ウエスタンブロッティングにより COX-2 発現を評価した。

その結果、15d-PGJ<sub>2</sub> 非存在下と比較して 15d-PGJ<sub>2</sub> 存在下では、フラクション番号 (Fr. #) 61 から 71 の処理により、COX-2 の発現が誘導されることが明らかとなった (Figure 3-11)。Fr. # 61 から 71 に含まれる血清成分を同定するため、SDS-PAGE に供した結果、単一のバンドが確認された (Figure 3-12)。

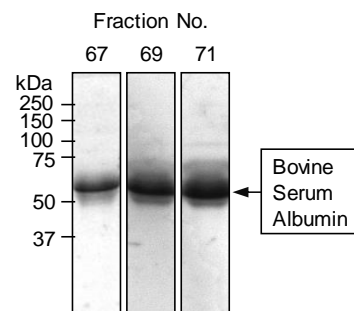


Figure 3-12 分画した FBS の SDS-PAGE COX-2 発現誘導活性が確認されたフラクション (Fr. #67, 69, 71) を還元 SDS-PAGE に供した後、CBB 染色によりバンドを検出した。

さらに、MALDI-TOF/TOF MS によりタンパク質同定を行った結果、フラクションに含まれる主要なタンパク質として、ウシ血清アルブミン (bovine serum albumin ;BSA) が同定された (Figure 3-13)。以上の結果から、血清成分の中でも血清アルブミンが 15d-PGJ<sub>2</sub> による炎症誘導に関与していることが明らかとなった。

**A**

1	MKWVTFISLL	LLFSSAYSRG	VFRDTHKSE	IAHRFKDLGE	EHFKGLVLIA
51	FSQYLQCCPF	DEHVKLVLNEL	TEFAKTCVAD	ESHAGCEKSL	HTLFGDELCK
101	VASLRETYGD	MADCCEKQEP	ERNECFLSHK	DDSPDLPKLG	PDPNTLCDEF
151	KADEKKFWGK	YLYEIAARRHP	YFYAPELLYY	ANKYNGVFQE	CCQAEDKGAC
201	LLPKIETMRE	KVLASSARQR	LRCASIQKFG	ERALKAWSVA	RLSQKFPKAE
251	FVEVTKLVTD	LTKVHKECCH	GDLLECADDR	ADLAKYICDN	QDTISSKLKE
301	CCDKPLLEKS	HCIAEVEKDA	IPENLPPLTA	DFAEDKDVCCK	NYQEAKEAFL
351	GSFLYEYSRR	HPEYAVSVLL	RLAKEYEATL	EECCAADDPH	ACYSTVFDKL
401	KHLVDEPQNL	IKQNCDDQFEK	LGEYGFQNAL	IVRYTRKVPQ	VSTPTLVEVS
451	RSLGKVGTRC	CTKPESERMP	CTEDYLSLIL	NRLCVLHEKT	PVSEKVTKCC
501	TESLVNRRPC	FSALTPDETY	VPKAFDEKLF	TFHADICTLP	DTEKQIKKQT
551	ALVELLKHKP	KATEEQLKTV	MENFVAFVDK	CCAADDKEAC	FAVEGPKLVV
601	STQTALA				

**B**

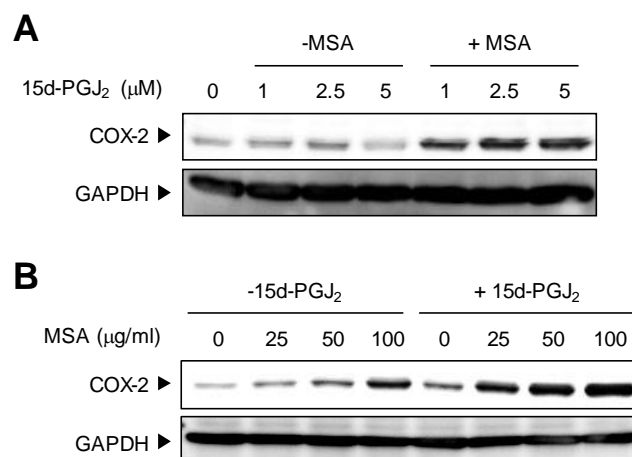
Start-End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	Miss	score	Sequence
161-167	927.51	926.51	926.49	22	0	45	K.YLYEIA.R
168-183	2045.09	2044.08	2044.02	29	1	43	R.RHPYFYAPELLYYANK.Y
347-359	1567.79	1566.78	1566.74	28	0	119	K.DAFLGSFLYEYSR.R
360-371	1439.85	1438.85	1438.80	29	1	66	R.RHPEYAVSVLLR.L
421-433	1479.83	1478.83	1478.79	27	0	100	K.LGEYGFQNALIVR.Y
437-451	1639.99	1638.98	1638.93	29	1	71	R.KVPQVSTPTLVEVSR.S

Figure 3-13 COX-2 発現誘導に関わる血清タンパク質の同定

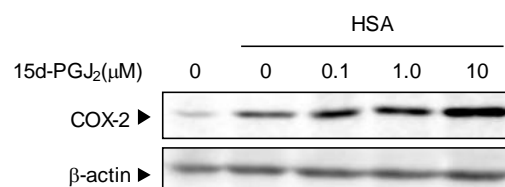
(A) 牛血清アルブミン (BSA) のアミノ酸配列。MALDI-TOF/TOF MS 測定によりカバーされた配列を赤色で示す。(B) フラクション No. 69 のバンドから同定されたペプチド配列の一覧。

血清より単離・精製された様々な種由来の血清アルブミンと 15d-PGJ<sub>2</sub> の共投与による COX-2 発現誘導を評価した結果、BSA のみならず、ヒト血清アルブミン (human serum albumin ;HSA) やマウス血清アルブミン (mouse serum albumin ;MSA) も 15d-PGJ<sub>2</sub> と協調し

て COX-2 発現を誘導することが明らかになった (Figure 3-14, 15)。また、J<sub>2</sub> 型 PG 類のひとつである  $\Delta^{12}$ -PGJ<sub>2</sub> も 15d-PGJ<sub>2</sub> と同様に BSA のみならず、HSA との共投与によって COX-2 発現を誘導した (Figure 3-16)。15d-PGJ<sub>2</sub> の炎症誘導が血清アルブミンによって特異的に誘導されるものであるか更なる解析を行うため、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) やシトクロム C、リボヌクレアーゼ A、リゾチーム、 $\beta$ -ラクトグロブリン、インスリン、フィブロネクチンなど、血清アルブミン以外のタンパク質によっても COX-2 の発現が誘導されるか評価した。その結果、血清アルブミン意外に 15d-PGJ<sub>2</sub> と協調して COX-2 発現を誘導するタンパク質は認められなかった (Figure 3-17)。以上の検討から、15d-PGJ<sub>2</sub> による炎症誘導には、血清成分の中でも血清アルブミンが重要性であることが示唆された。さらに、15d-PGJ<sub>2</sub> と加熱処理し、熱変性した MSA を RAW264.7 細胞に 37°C で 4 時間処理した結果、COX-2 発現は認められなかったことから、15d-PGJ<sub>2</sub> と血清アルブミンによる COX-2 発現誘導には血清アルブミンの立体構造が重要であると示唆された (Figure 3-18)。

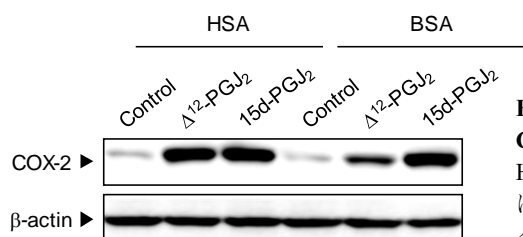


**Figure 3-14** マウス血清アルブミンと 15d-PGJ<sub>2</sub> の共投与による COX-2 発現誘導の評価  
MSA と 15d-PGJ<sub>2</sub> を RAW264.7 細胞に処理し、COX-2 発現をウエスタンブロッティングにより評価した。

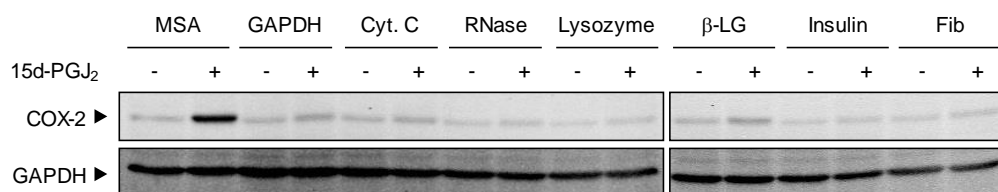


**Figure 3-15** ヒト血清アルブミンと 15d-PGJ<sub>2</sub> の共投与による COX-2 発現誘導の評価  
HSA と 15d-PGJ<sub>2</sub> を RAW264.7 細胞に処理し、COX-2 発現をウエスタンブロッティングにより評価した。

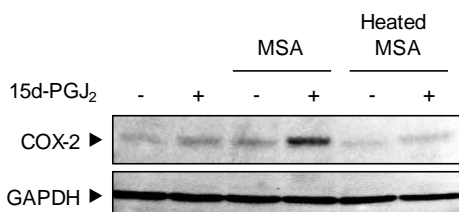




**Figure 3-16 J<sub>2</sub>型 PG 類の血清アルブミン依存的な COX-2 発現誘導の評価**  
HSA あるいは BSA と J<sub>2</sub>型 PG 類を RAW264.7 細胞に処理し、COX-2 発現をウエスタンブロッティングにより評価した。



**Figure 3-17 種々のタンパク質と 15d-PGJ<sub>2</sub> の共投与による COX-2 発現誘導の評価**  
種々のタンパク質と 15d-PGJ<sub>2</sub> を RAW264.7 細胞に処理し、COX-2 発現誘導をウエスタンブロッティングにより評価した。GAPDH; glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, Cyt. C; cytochrome c, RNase; Ribonuclease A, β-LG; β- lactoglobulin, Fib; fibronectin

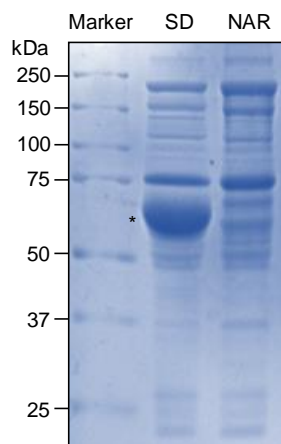


**Figure 3-18 熱変性の COX-2 発現誘導活性への影響**  
加熱変性させた MSA と 15d-PGJ<sub>2</sub> を RAW264.7 細胞に処理し、COX-2 発現誘導をウエスタンブロッティングにより評価した。

### 3-2 NAR ラット血清を用いた検討

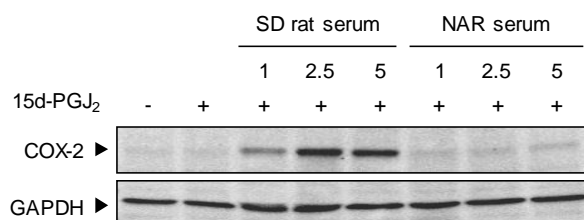
15d-PGJ<sub>2</sub> による COX-2 発現における血清アルブミンの重要性について更なる検討を行うため、Sprague-Dawley (SD) ラットから確立された常染色体劣性遺伝による無アルブミン血症を呈するミュータントラットである Nagase Analbuminemia Rat (NAR)<sup>130,131</sup> を用いて検討を行うことにした。SD ラットおよび NAR ラット血清を還元 SDS-PAGE に供し、CBB 染色によってバンドを検出した結果、NAR ラットでは確かに血清アルブミンのバンドが検出されなかった (Figure 3-19)。これらのモデルラット血清と 15-PGJ<sub>2</sub> を RAW264.7 細胞に処理し、COX-2 発現を評価した結果、15d-PGJ<sub>2</sub> は SD ラット血清の濃度依存的に COX-2 の発現を誘導するのに対し、NAR ラット血清の処理によって COX-2 の発現は全く誘導されなかった (Figure 3-20)。以上の結果から、15d-PGJ<sub>2</sub> による血清依存的な COX-2 発現誘導には血清タンパク質の中でも血清アルブミンが必要であることが示唆された。





**Figure 3-19 ラット血清の SDS-PAGE**

SD ラットおよび NAR ラット血清を還元条件下で SDS-PAGE に供した後、CBB 染色によりバンドを検出した。



**Figure 3-20 15d-PGJ<sub>2</sub> とラット血清の共投与による COX-2 発現誘導**

15d-PGJ<sub>2</sub> と SD ラットおよび NAR ラット血清を RAW264.7 細胞に共投与し、ウエスタンブロッティングにより COX-2 発現を評価した。

## 第4節 血清アルブミン結合型 15d-PGJ<sub>2</sub> の COX-2 発現誘導への関与

生体内において、血清アルブミンは不飽和脂肪酸やホルモンなどの種々の内因性分子を運搬することが知られている<sup>132</sup>。このことから、15d-PGJ<sub>2</sub> がリガンドとして血清アルブミンに結合することによって炎症促進メディエーターとして作用すると予想された。そこで本節では、15d-PGJ<sub>2</sub> の血清アルブミン依存的な炎症誘導における 15d-PGJ<sub>2</sub> - 血清アルブミン複合体形成の重要性について解析することにした。

### 4-1 COX-2 発現への血清アルブミン-15d-PGJ<sub>2</sub> 複合体の関与

MSA を 15d-PGJ<sub>2</sub> の存在下および非存在下においてインキュベーションしたサンプルをゲルろ過クロマトグラフィーによりタンパク質画分と低分子画分に分画した (Figure 3-21)。分画した各フラクションを RAW264.7 細胞に 37°C で 4 時間処理し、ウエスタンブロッティングにより COX-2 の発現を評価した。その結果、MSA のみをインキュベーションしたサンプルではいずれのフラクションにおいても COX-2 の発現誘導活性は認められなかったが、

MSA を 15d-PGJ<sub>2</sub> とインキュベーションしたサンプルではタンパク質を含むフラクション #8 においてのみ COX-2 の発現が認められた (Figure 3-22)。このとき、遊離の 15d-PGJ<sub>2</sub> を含むフラクションに COX-2 誘導活性は認められなかった。このことから、15d-PGJ<sub>2</sub> 誘導性の COX-2 発現誘導には 15d-PGJ<sub>2</sub>-血清アルブミン複合体の形成が重要であることが明らかになった。

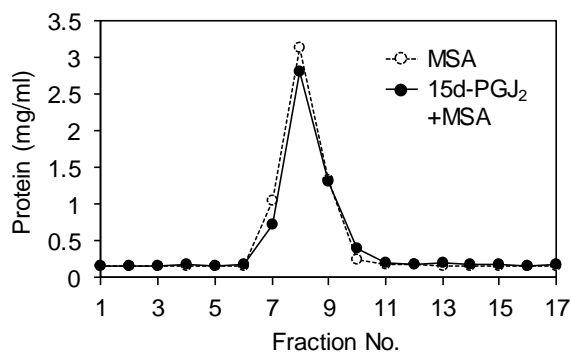


Figure 3-21 ゲルろ過カラムによるタンパク質画分の分画

15d-PGJ<sub>2</sub> とインキュベーションした MSA を PD-10 カラムによりタンパク質画分と低分子画分に分画した。

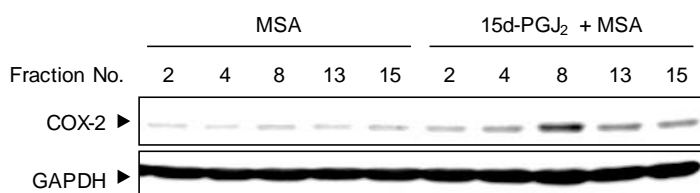
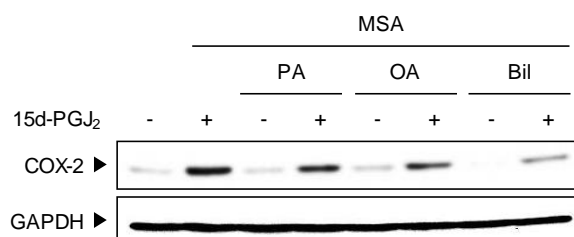


Figure 3-22 ゲルろ過カラムによる分画したフラクションの COX-2 発現誘導活性評価

ゲルろ過カラムにより分画した画分を RAW264.7 細胞に処理し、ウエスタンブロッティングにより COX-2 発現を評価した。

また、15d-PGJ<sub>2</sub> と MSA の共投与によって誘導された COX-2 発現は、パルミチン酸やオレイン酸といった非エステル化脂肪酸やビリルビンなど、血清アルブミンの内因性リガンドとして知られている低分子の前処理によって抑制された (Figure 3-23)。これらの結果からも、15d-PGJ<sub>2</sub> 誘導性の COX-2 発現には 15d-PGJ<sub>2</sub> の血清アルブミンへの結合が重要であると明らかになった。



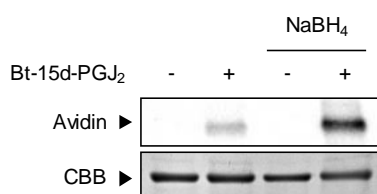
**Figure 3-23 血清アルブミンの内因性リガンドが COX-2 発現に与える影響**

血清アルブミンの内因性リガンドであるパルミチン酸 (PA)、オレイン酸 (OA)、ビリルビン (Bil) を RAW264.7 細胞に前処理した後、15d-PGJ<sub>2</sub> と MSA 共投与し、COX-2 発現をウエスタンブロッティングにより評価した。

## 第5節 15d-PGJ<sub>2</sub> の血清タンパク質への結合の選択性

### 5-1 15d-PGJ<sub>2</sub> の血清アルブミンへの結合評価

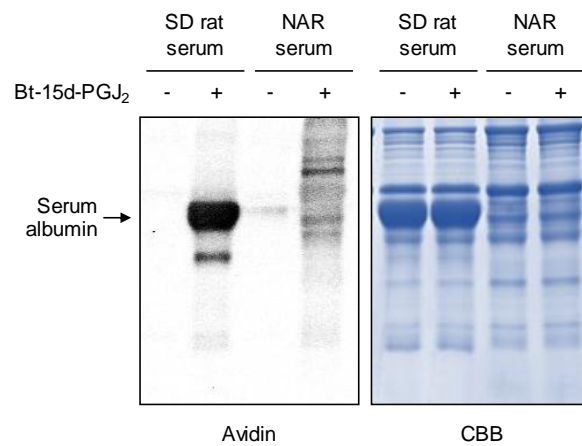
15d-PGJ<sub>2</sub> による COX-2 発現誘導には血清アルブミンが必要であることから、15d-PGJ<sub>2</sub> の血清タンパク質結合の特異性を評価した。15d-PGJ<sub>2</sub> のカルボン酸にビオチンタグを付加し、ビオチン化 15d-PGJ<sub>2</sub> (Bt-15d-PGJ<sub>2</sub>) を作製した。Bt-15d-PGJ<sub>2</sub> を血清アルブミンとインキュベーションした後、NaBH<sub>4</sub> によって還元処理を行い安定化した後に、Bt-15d-PGJ<sub>2</sub>-MSA 複合体の形成をウエスタンブロッティングにより評価した。その結果、還元処理により Bt-15d-PGJ<sub>2</sub> がタンパク質に不可逆的に結合していることが明らかとなった (Figure 3-24)。



**Figure 3-24 Bt-15d-PGJ<sub>2</sub>-MSA 複合体の検出**

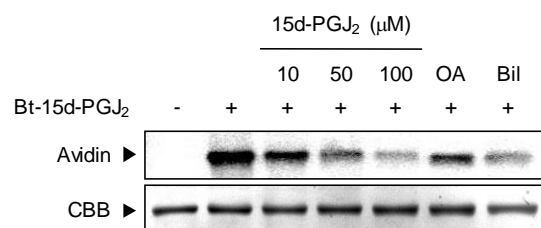
Bt-15d-PGJ<sub>2</sub> を血清アルブミンとインキュベーションした後、NaBH<sub>4</sub> によって還元処理を行い安定化し、アビジン抗体により検出した。

15d-PGJ<sub>2</sub> の血清タンパク質への結合の選択性を評価するため、SD ラットおよび NAR ラット由来の血清と Bt-15d-PGJ<sub>2</sub> をインキュベーションし、NaBH<sub>4</sub> によって還元処理を行い安定化した後にウエスタンブロッティングに供し、アビジン抗体で検出した。その結果、SD ラット血清サンプルにおいて血清アルブミンの分子量に相当するバンドが強く検出された。NAR ラットサンプルにおいては、SD ラットサンプルで検出されたバンドは全く検出されなかった。このことから、SD ラットサンプルで検出されたバンドは血清アルブミンであり、15d-PGJ<sub>2</sub> は血清タンパク質の中でも血清アルブミンに特異的に結合することが明らかとなった (Figure 3-25)。さらに、Bt-15d-PGJ<sub>2</sub> の MSA に対する結合は、ビオチンラベルしていない 15d-PGJ<sub>2</sub> や、非エステル化脂肪酸であるオレイン酸やビリルビン等の内因性リガンドによって阻害されることが明らかとなった (Figure 3-26)。



**Figure 3-25 15d-PGJ<sub>2</sub> の血清タンパク質への結合の選択性を評価**

Bt-15d-PGJ<sub>2</sub> と SD ラットおよび NAR ラット血清をインキュベーションし、ウエスタンブロッティングに供した後、アビジンにより検出した。



**Figure 3-26 Bt-15d-PGJ<sub>2</sub> の MSA に対する結合評価**

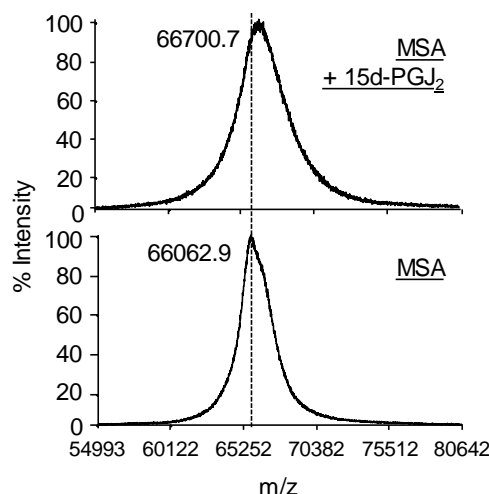
Bt-15d-PGJ<sub>2</sub> と MSA および血清アルブミンの内因性リガンドをインキュベーションしたサンプルをウエスタンブロッティングに供した後、アビジンにより検出した。

## 第6節 15d-PGJ<sub>2</sub>の結合部位の解析

### 6-1 全長タンパク質の解析

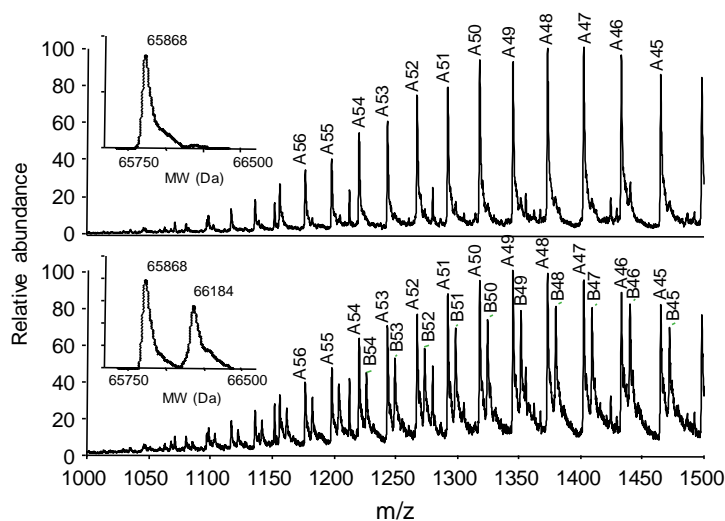
15d-PGJ<sub>2</sub> による生体反応は、求電子性のシクロペンテンノン環に由来する共有結合の形成が重要であると報告されている。15d-PGJ<sub>2</sub> の血清アルブミン依存的な COX-2 発現誘導には 15d-PGJ<sub>2</sub> と血清アルブミンの複合体形成が重要であることが明らかとなったことから、求電子性のシクロペンテンノン環が血清アルブミンと共有結合を形成していると予想された。そこで、15d-PGJ<sub>2</sub> とインキュベーションした MSA の全長タンパク質を MALDI-TOF/TOF MS の Linear mode によって測定し、MSA1 分子当たりの分子量の変化を解析した。MSA 自体は m/z 66,063 のピークが得られるのに対し、15d-PGJ<sub>2</sub> とインキュベーションした MSA のサンプルでは m/z 66,701 のピークが得られ、その差が 638 であることから、1 分子の MSA に 2 分子の 15d-PGJ<sub>2</sub> が結合していると予想された (Figure 3-27)。

さらに、血清アルブミンへの 15d-PGJ<sub>2</sub> 付加体の形成を LTQ Orbitrap XL により検討した。1:1 のモル比で混合した血清アルブミンと 15d-PGJ<sub>2</sub> を 37 °C でインキュベーションした後、フィルターろ過により不溶物を除去した後に測定した。その結果、15d-PGJ<sub>2</sub> とインキュベーションした血清アルブミンサンプルでは、血清アルブミンのみをインキュベーションしたサンプルと比較して 316 Da の増加が認められ、これは 15d-PGJ<sub>2</sub> 1 分子に相当することが明らかになった (Figure 3-28)。



**Figure 3-27 MALDI-TOF/TOF MS による全長タンパク質の解析**

15d-PGJ<sub>2</sub> とインキュベーションした MSA を MALDI-TOF/TOF MS の Linear mode により測定し、全長タンパク質の解析を行った。



**Figure 3-28 LC/ESI-MS によるタンパク質の解析**

15d-PGJ<sub>2</sub> とインキュベーションした MSA を LC/ESI-MS により測定し、MSA 質量変化を測定した。

## 6-2 15d-PGJ<sub>2</sub> のアルブミン結合部位の解析

15d-PGJ<sub>2</sub> の血清アルブミンへの結合部位を解析するため、MALDI-TOF/TOF MS による修飾部位の解析を行うことにした。15d-PGJ<sub>2</sub> は  $\alpha$ ,  $\beta$  不飽和カルボニルを有し、システインやヒスチジンとマイケル付加反応により共有結合的な結合を形成すると予想された。そこで、NaBH<sub>4</sub>還元により安定化した 15d-PGJ<sub>2</sub>-血清アルブミン複合体を還元条件下においてトリプシンあるいはキモトリプシンにより酵素消化し、MALDI-TOF/TOF MS により分析した。その結果、血清アルブミンの前配列のうち、80%のペプチドがカバーされ、His18、His67 および His146 において 15d-PGJ<sub>2</sub> が共有結合を形成していることが明らかとなった (Table 3-1, 3-2)。

Table 3-1 トリプシン消化サンプルの MALDI-TOF/TOF MS 測定結果

Start	End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta (Da)	Missed cleavage	Score	Peptide
1	10	1177.64	1176.64	1176.6	0.04	1	65	R.EAHKSEIAHR.Y
11	20	1568.82	1567.81	1567.79	0.02	0	20	R.YNDLGEQHF.K + 15d-PGJ2+Delta:H(2) (H)
34	41	952.41	951.4	951.38	0.02	0	27	K.CSYDEHAK.L
34	41	1009.43	1008.43	1008.4	0.03	0	39	K.CSYDEHAK.L + Carbamidomethyl (C)
42	51	1149.65	1148.64	1148.61	0.03	0	85	K.LVQEVTDFAK.T
52	64	1440.61	1439.6	1439.57	0.03	0	128	K.TCVADESAANCDK.S + 2 Carbamidomethyl (C)
65	73	1017.57	1016.57	1016.53	0.04	0	61	K.SLHTLFGDK.L
65	73	1335.78	1334.77	1334.75	0.02	0	33	K.SLHTLFGDK.L + 15d-PGJ2+Delta:H(2) (H)
74	81	956.53	955.52	955.53	-0.01	0	59	K.LCAIPNLR.E + Carbamidomethyl (C)
94	106	1657.82	1656.81	1656.77	0.04	1	75	K.QEPPERNECF.LQHK.D
99	106	1075.54	1074.53	1074.49	0.04	0	23	R.NECFLQHK.D + Carbamidomethyl (C)
99	128	3594.64	3593.63	3593.6	0.03	1	64	R.NECFLQHKDDNP.SLPPFERPEAEAMCTSF.K + 2 Carbamidomethyl (C)
107	128	2538.13	2537.12	2537.12	0	0	74	K.DDNPSLPPFERPEAEAMCTSF.K + Carbamidomethyl (C)
107	128	2538.17	2537.16	2537.12	0.04	0	96	K.DDNPSLPPFERPEAEAMCTSF.K + Carbamidomethyl (C)
175	181	834.43	833.42	833.4	0.02	0	35	K.ESCLTPK.L + Carbamidomethyl (C)
219	233	1681.83	1680.82	1680.84	-0.02	0	96	R.LSQTFPNADFAEITK.L
263	274	1431.67	1430.67	1430.62	0.05	0	83	K.YMCENQATISSK.L + Carbamidomethyl (C)
263	274	1447.67	1446.66	1446.61	0.05	0	48	K.YMCENQATISSK.L + Carbamidomethyl (C); Oxidation (M)
275	286	1503.85	1502.84	1502.79	0.05	1	35	K.LQTCCDKPLKK.A + 2 Carbamidomethyl (C)
324	336	1609.8	1608.79	1608.78	0.01	0	105	K.DVFLGTLFYEYSR.R
337	348	1455.84	1454.83	1454.8	0.03	1	84	R.RHPDYSVSLLLR.L
338	348	1299.69	1298.68	1298.7	-0.02	0	105	R.HPDYSVSLLLR.L
352	359	981.55	980.54	980.52	0.02	1	51	K.KYEATLEK.C
360	385	2950.43	2949.42	2949.33	0.09	0	104	K.CCAEANPPACYGTVLAEFQPLVEEPK.N + 3 Carbamidomethyl (C)
360	385	2950.47	2949.46	2949.33	0.13	0	91	K.CCAEANPPACYGTVLAEFQPLVEEPK.N + 3 Carbamidomethyl (C)
390	397	1042.47	1041.47	1041.44	0.03	0	24	K.TNCDLYEK.L + Carbamidomethyl (C)
398	410	1479.77	1478.77	1478.79	-0.02	0	105	K.LGEYGFQNAIVLR.Y
415	428	1440.8	1439.8	1439.76	0.04	0	16	K.APQVSTPTLVEAAR.N + Deamidated (NQ)
433	445	1563.78	1562.77	1562.72	0.05	1	77	R.VGKCCCTLPEDQR.L + 2 Carbamidomethyl (C)
437	445	1121.49	1120.48	1120.46	0.02	0	63	K.CCTLPEDQR.L + Carbamidomethyl (C)
437	445	1178.53	1177.52	1177.49	0.03	0	60	K.CCTLPEDQR.L + 2 Carbamidomethyl (C)
460	466	898.52	897.51	897.47	0.04	0	43	R.VCLLHEK.T + Carbamidomethyl (C)
467	475	997.56	996.55	996.52	0.03	0	53	K.TPVSEHVK.C
476	484	1067.48	1066.47	1066.45	0.02	0	45	K.CCSGSLVER.R + 2 Carbamidomethyl (C)
504	521	2153.03	2152.02	2152.01	0.01	1	57	K.AETFTFHSDICTLPEKEK.Q + Carbamidomethyl (C)
504	521	2153.03	2152.02	2152.01	0.01	1	89	K.AETFTFHSDICTLPEKEK.Q + Carbamidomethyl (C)
526	534	972.61	971.6	971.57	0.03	0	28	K.QTALAELVK.H
546	560	1850.79	1849.79	1849.77	0.02	0	107	K.TVMDDFAQFLDTCKK.A + 2 Carbamidomethyl (C)
561	578	1981.95	1980.94	1980.92	0.02	1	164	K.AADKDTCFSTEGPNLVTR.C + Carbamidomethyl (C)
565	578	1596.77	1595.76	1595.72	0.04	0	80	K.DTCFSTEGPNLVTR.C + Carbamidomethyl (C)

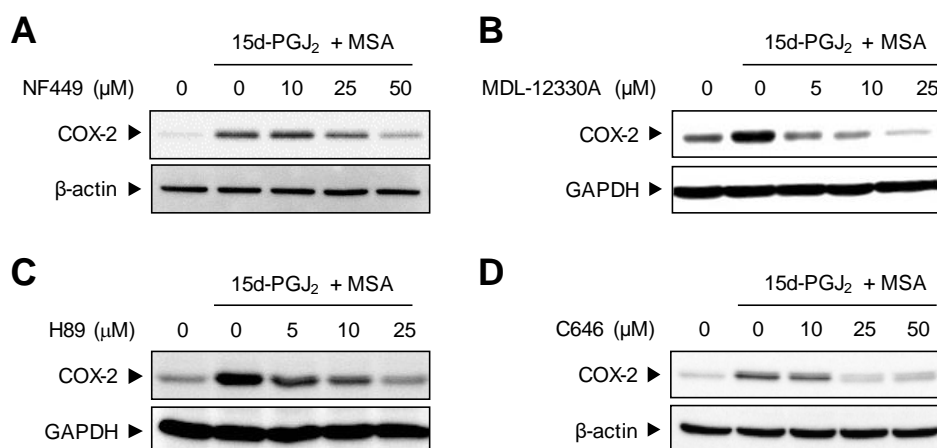


Table 3-1 キモトリプシン消化サンプルの MALDI-TOF/TOF MS 測定結果

Start	End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta (Da)	Missed cleavage	Score	Peptide
12	19	959.3904	958.3832	958.4145	-0.0313	1	26	Y.NDLGEQHF.K
75	84	1263.619	1262.6117	1262.6077	0.004	1	16	L.CAIPNLRENY.G + Propionamide (C)
85	102	2284.9988	2283.9915	2283.9558	0.0357	1	80	Y.GELADCCTKQEPERNECF.L + 3 Propionamide (C)
88	102	1985.7877	1984.7804	1984.8077	-0.0273	0	32	L.ADCCTKQEPERNECF.L + 3 Propionamide (C)
104	123	2308.0767	2307.0694	2307.059	0.0105	1	53	L.QHKDDNPSLPPFERPEAEAM.C
139	148	1277.6615	1276.6542	1276.6789	-0.0246	1	25	Y.LHEVARRHPY.F
139	148	1277.6997	1276.6924	1276.6789	0.0136	1	33	Y.LHEVARRHPY.F
139	148	1595.9237	1594.9164	1594.8984	0.0181	1	27	Y.LHEVARRHPY.F + 15d-PGJ2+Delta:H(2) (H)
140	148	1164.5923	1163.585	1163.5948	-0.0098	0	31	L.HEVARRHPY.F
140	148	1482.8329	1481.8256	1481.8143	0.0113	0	23	L.HEVARRHPY.F + 15d-PGJ2+Delta:H(2) (H)
191	198	978.5027	977.4955	977.5076	-0.0122	0	23	L.VSSVRQRM.K + Oxidation (M)
204	211	982.5055	981.4982	981.5032	-0.005	1	12	M.QKFGERAF.K
220	234	1681.8002	1680.7929	1680.8359	-0.043	1	38	L.SQTFPNADFAEITKL.A
220	234	1681.811	1680.8037	1680.8359	-0.0322	1	40	L.SQTFPNADFAEITKL.A
220	234	1681.8481	1680.8408	1680.8359	0.0049	1	47	L.SQTFPNADFAEITKL.A
276	283	1049.4496	1048.4423	1048.4681	-0.0258	0	23	L.QTCCDKPL.L + 2 Propionamide (C)
310	319	1297.5508	1296.5435	1296.5656	-0.0221	0	31	F.VEDEQEVCKNY.A + Propionamide (C)
335	345	1316.6553	1315.648	1315.6633	-0.0153	1	13	Y.SRRHPDYSVSL.L
354	370	2025.894	2024.8867	2024.8641	0.0226	1	39	Y.EATLEKCCAEANPPACY.G + 3 Propionamide (C)
358	370	1611.6116	1610.6043	1610.6527	-0.0484	0	28	L.EKCCAEANPPACY.G + 3 Propionamide (C)
412	430	2024.0699	2023.0626	2023.1062	-0.0436	1	54	Y.TQKAPQVSTPTLVEAARNL.G
412	430	2024.0883	2023.081	2023.1062	-0.0252	1	33	Y.TQKAPQVSTPTLVEAARNL.G
463	481	2197.0815	2196.0742	2196.0667	0.0075	1	79	L.LHEKTPVSEHVTKCCSGSL.V + 2 Propionamide (C)
482	488	977.468	976.4607	976.4913	-0.0305	0	14	L.VERRPCF.S + Propionamide (C)
482	488	977.4731	976.4658	976.4913	-0.0255	0	18	L.VERRPCF.S + Propionamide (C)
492	502	1327.6201	1326.6128	1326.6344	-0.0215	1	39	L.TVDETYVPKEF.K
530	544	1662.9243	1661.917	1661.9464	-0.0294	1	49	L.AELVKHKPKATAEQL.K
533	544	1349.7743	1348.767	1348.7827	-0.0156	0	45	L.VKHKPKATAEQL.K
555	568	1746.7556	1745.7483	1745.7423	0.0061	1	76	F.LDTCKKAADKDTCF.S + 3 Propionamide (C)
556	568	1633.6215	1632.6142	1632.6582	-0.044	0	34	L.DTCKKAADKDTCF.S + 3 Propionamide (C)

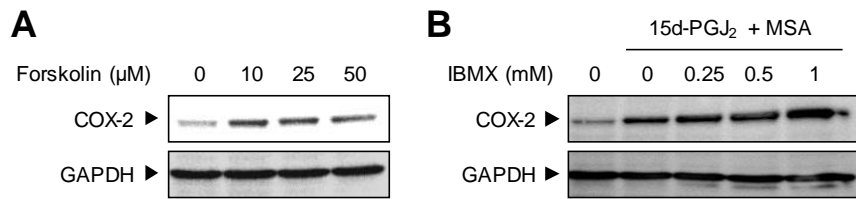
## 第7節 15d-PGJ<sub>2</sub>–血清アルブミンによる COX-2 発現誘導メカニズムの解析

15d-PGJ<sub>2</sub> による炎症誘導機構を明らかにするために各種阻害剤を用い、その下流シグナルを検討することにした。G $\alpha$  の選択的アンタゴニストである NF449 を RAW264.7 細胞に 30 分間前処理した後、15d-PGJ<sub>2</sub>-MSA を 4 時間処理した後、ライセートを回収し、ウェスタンブロッティングに供した結果、NF449 の処理濃度依存的に COX-2 の発現が抑制された (Figure 3-29 A)。このことから、15d-PGJ<sub>2</sub>-MSA 誘導性の COX-2 発現誘導には G タンパク質共役型受容体 (GPCR) の関与が示唆された。15d-PGJ<sub>2</sub> 誘導性の COX-2 発現における GPCR の関与について更なる検討を行うため、GPCR の下流に存在するアデニル酸シクラーゼの阻害剤である MDL-12330A を処理した結果、COX-2 発現が抑制された (Figure 3-29 B)。cAMP によって活性化される PKA の阻害剤にである H89 の前処理によっても 15d-PGJ<sub>2</sub>-MSA 誘導性の COX-2 の発現が抑制された (Figure 3-29 C)。転写因子である CREB の DNA への結合阻害剤である C646 の処理によっても 15d-PGJ<sub>2</sub>-MSA 誘導性の COX-2 の発現が抑制された (Figure 3-29 D)。また、cAMP 量を増加させる forskolin と cAMP 分解酵素ホスホジエステラーゼの阻害剤 IBMX の処理によって COX-2 の発現が増強したことからも GPCR の活性化が示唆された (Figure 3-30)。以上の結果より、15d-PGJ<sub>2</sub>-MSA 誘導性の COX-2 発現に GPCR の関与が強く示唆された (Figure 3-31)。



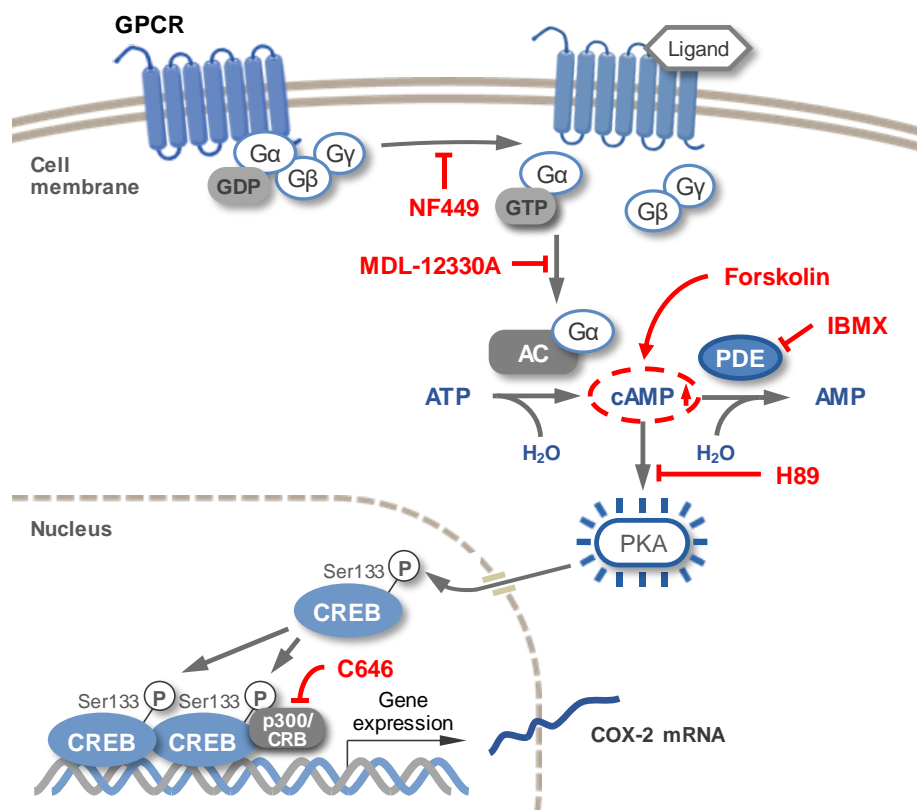
**Figure 3-29 15d-PGJ<sub>2</sub>-MSA 誘導性の COX-2 発現への阻害剤の影響**

(A) G $\alpha$  の選択的アンタゴニストである NF449、(B) アデニル酸シクラーゼの阻害剤である MDL-12330A、(C) PKA の阻害剤である H89、(D) CREB の DNA への結合阻害剤である C646 を RAW264.7 細胞に 30 分間前処理した後、15d-PGJ<sub>2</sub>-MSA 処理し、COX-2 発現を評価した。



**Figure 3-30 15d-PGJ<sub>2</sub>-MSA 誘導性の COX-2 発現への cAMP 増強試薬の影響**

細胞内の cAMP 量を増加させることが知られている試薬である (A) Forskolin および (B) IBMX を RAW264.7 細胞に 30 分間前処理した後、15d-PGJ<sub>2</sub>-MSA 処理し、COX-2 発現を評価した。



**Figure 3-31 予想される 15d-PGJ<sub>2</sub>-MSA 誘導性 COX-2 発現誘導メカニズム**

## 第8節 まとめおよび考察

活性化したマクロファージは COX-2 を含む炎症促進分子の発現を促進し<sup>133</sup>、更なる炎症応答を誘導する分子である PGE<sub>2</sub> や thromboxane A<sub>2</sub> などといった種々のエイコサノイド類を産生する<sup>134</sup>。一方で、15d-PGJ<sub>2</sub> は他のプロスタノイドとは異なり、炎症の後期に産生され、抗炎症物質として炎症応答を制御している。15d-PGJ<sub>2</sub> の抗炎症作用は Gilroy らによって始めて報告された<sup>135</sup>。彼らは、カラギーナン誘発性胸膜炎モデルラットを用いた検討を行い、炎症初期では PGE<sub>2</sub> の合成が優勢であり、主に炎症促進効果を発揮しているが、炎症後期では 15d-PGJ<sub>2</sub> が盛んに産生されることを明らかとし、炎症応答における PG 産生には二相性が存在することを実証した。

また、Cuzzocrea らは、15d-PGJ<sub>2</sub> がげっ歯類モデルにおける急性および慢性の炎症の発生を抑制することを示している<sup>136</sup>。さらに後の研究で Itoh らは、15d-PGJ<sub>2</sub> が、抗炎症酵素の遺伝子発現を正に調節する転写因子である Nrf2 の活性化を介して炎症プロセスを調節することを実証した<sup>137</sup>。これらの報告から 15d-PGJ<sub>2</sub> は炎症の後期で産生され、炎症応答の負のフィードバック調節因子として作用する病態生理学的意義を有すると推測されている。一方、いくつかの研究は、血清存在下において 15d-PGJ<sub>2</sub> がその活性を消失することを示している。Hagens らはまた、15d-PGJ<sub>2</sub> を 10% BSA とインキュベーションすることにより、細胞培養における 15d-PGJ<sub>2</sub> のアポトーシス誘導活性を完全に阻害することを示している<sup>138</sup>。これらの報告から、生体内には多量の血清アルブミンが存在するため、15d-PGJ<sub>2</sub> が *in vivo* では不活性になると考えられる。このように血清存在下における 15d-PGJ<sub>2</sub> の活性について様々な報告がなされている。本研究では、血清アルブミンの存在下で 15d-PGJ<sub>2</sub> がマクロファージ細胞における炎症メディエーターとして作用する可能性があることを明らかにした。

血清非存在下において 15d-PGJ<sub>2</sub> はこれまでの報告通り LPS 誘導性の COX-2 発現誘導を抑制する一方で、血清存在下においては、15d-PGJ<sub>2</sub> はさらなる炎症応答を誘導することが明らかとなり、血清依存的な 15d-PGJ<sub>2</sub> の活性変化が明らかとなった。これらの結果は、親電子性の PG が抗炎症に作用するという報告に反するものである。さらに、ゲル濾過による FBS の分画により、15d-PGJ<sub>2</sub> による炎症誘導に関与する血清成分として、血清アルブミンを同定した。血清アルブミンは、血液中に約 40 mg/ml の濃度で存在し、最も豊富に含まれるタンパク質であり、遊離脂肪酸、ステロイド、薬物などの多くの内因性および外因性化合物の輸送タンパク質として働いている<sup>75,139,140</sup>。注目すべき点は、血清アルブミンが親電子性 PG の産生を触媒するという点である。Watanabe らにより HSA が PGH<sub>2</sub> を触媒し、PGD<sub>2</sub> へ変換することが報告され<sup>141</sup>、さらに血清アルブミンは、PGJ<sub>2</sub> の  $\Delta^{12}$ -PGJ<sub>2</sub> への変換にも関

与することが報告されている<sup>26,28</sup>。これらのことから、血清アルブミンは、PGD<sub>2</sub>代謝だけでなく、親電子性 PG による炎症反応にも関与している可能性が考えられる。

初期のアテローム性動脈硬化症の特徴の 1 つは、主にコレステロールエステルの蓄積、およびコレステロールを吸収した泡沫化マクロファージ細胞の形成である。高脂血症は内皮細胞の機能低下を促進させ、疾病の進展段階において、膜透過性の増大をも引き起こす可能性がある。これまで、高脂血症と膜透過性の増大の関連は不明のままであったが、コレステロールが豊富な食餌によりウサギの内皮細胞の膜透過性を増加させることが示された<sup>142,143</sup>。さらに、Barnes と Weinberg は、膜透過性は年齢と生体内の NO 量に依存すると結論付けている。また、彼らは、アテローム性動脈硬化病変において HSA が蓄積することを示している。したがって、血清アルブミンは、障害を受けた内皮細胞を透過し、内皮下腔に入った後、内膜下に存在するマクロファージと相互作用し、COX-2 を含む炎症関連分子の発現を誘導する可能性が予想される。これら結果から、活性化マクロファージにおける HSA の蓄積の病態生理学的意義として、炎症反応のフィードバック調節因子として機能しているものと考えられる。アテローム性動脈硬化症に関連して、血清アルブミンは、アポトーシスおよび炎症などの様々な生物学的応答を調節することが示されている。Zoellner らは、血清アルブミンが内皮細胞のアポトーシスを抑制することを報告している。さらに、血清アルブミンは、AKT シグナル伝達活性化を介して DNA 損傷誘発アポトーシスを阻害することが示されている。一方、アルブミンを負荷すると、Fas-FADD カスパーゼ 8 経路を介して培養された近位尿細管細胞においてアポトーシスを誘導すること示されている。また、アルブミンは、monocyte chemoattractant protein-1<sup>144,145</sup>, osteopontin<sup>144</sup>, and endothelin-1<sup>146</sup> などのいくつかの炎症分子の発現を誘導することも示されている。Chang らは、マクロファージ様細胞である RAW264.7 における LPS 誘発性炎症応答に対する脂肪酸-アルブミン複合体の効果を評価した結果、不飽和脂肪酸-BSA 複合体が LPS 誘発性前炎症応答に対して阻害効果を発揮するのに対し、飽和脂肪酸-BSA 複合体は応答を増強することを明らかにした<sup>147</sup>。

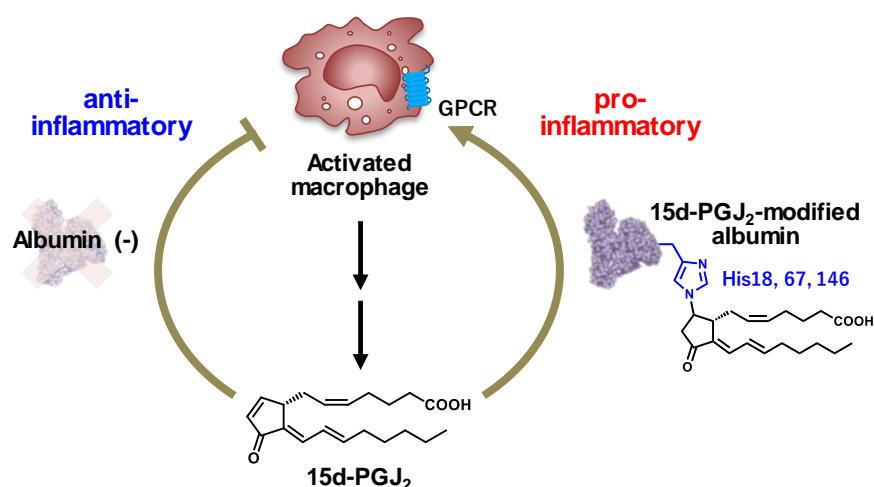
本研究において明らかにした血清アルブミンと 15d-PGJ<sub>2</sub> の複合体による COX-2 誘導には、血清アルブミンが PGD<sub>2</sub> の代謝産物との複合体形成を介して炎症応答を調節することを示唆している。LTQ Orbitrap XL による解析の結果、15d-PGJ<sub>2</sub> を処理した血清アルブミンは 15d-PGJ<sub>2</sub> と共有結合を形成していることが明らかとなった。また、15d-PGJ<sub>2</sub> 修飾血清アルブミンが細胞に作用し、炎症応答のシグナル伝達機構を活性化することも示唆された。15d-PGJ<sub>2</sub> のマイケル付加物が NaBH<sub>4</sub> による還元によって安定化され得るという利点を利用して、MALDI-TOF/TOF MS による修飾部位の解析を行った結果、MSA 中の 3 つのヒスチジン残

基、His18、His67 および His146 が 15d-PGJ<sub>2</sub> の標的として同定された。ヒトおよびウシ血清アルブミンの結晶構造に基づいて<sup>14,139</sup>、His18 および His67 立体構造の位置関係を確認した結果、His18 および His67 は MSA のヘリックス 2 および 4 の N 末端領域にそれぞれ位置することが明らかとなった。さらにこれらのヒスチジン残基は、血清アルブミン分子の立体構造の分子表面に位置していた。Liu らは、GETAREA プログラムを使用して HSA 中のヒスチジンの側鎖および骨格溶媒接触表面積 (SASA) のプロットを生成し、His67 の側鎖が分子表面に存在することを見出した。さらに、BSA 中の His18 も、比較的高い SASA 値を有することが示されている<sup>148</sup>。完全な分子環境を算出することはできないが、SASA 値が高い値を示すと、通常、アミノ酸側鎖はタンパク質の表面上に存在し、非常に接近可能であることを意味している。このように、His18 と His67 はタンパク質の分子表面に存在することから、15d-PGJ<sub>2</sub> が His18 および His67 を選択的に修飾しているものと考えられる。さらに、15d-PGJ<sub>2</sub> が高く保存されたアミノ酸残基であり、MSA のサブドメイン IB のヘリックス 8 をヘリックス 9 に連結するヘアピンターンにあると予想される His146 においても 15d-PGJ<sub>2</sub> の修飾が確認された<sup>14,139</sup>。His146 は、強力な求核的領域である脂肪酸の結合サイト I の入り口付近に位置し、これまでに種々の求電子剤による修飾を受けることが報告されている<sup>149 150 151</sup>。さらに Yamaguchi らは、質量分析装置および結晶構造解析により PGJ<sub>2</sub> シリーズのひとつである  $\Delta^{12}$ -PGJ<sub>2</sub> が共有結合的に HSA の His146 と反応することを報告している<sup>152</sup>。彼らはまた  $\Delta^{12}$ -PGJ<sub>2</sub> のマイケル付加型の修飾がサブドメイン IB と IIA との間の隙間に入り込むことを確認している。サブドメイン IB は、芳香族および正に荷電した残基を豊富に有するため、共有結合を形成するために必要な非共有的な相互作用を形成しやすいと考えられる。一方、血清アルブミンは、チオール含有化合物や  $\alpha$ ,  $\beta$ -不飽和アルデヒドおよび種々の金属イオンの主要リガンド結合部位である Cys34 を有している。しかし、質量分析装置による測定の結果、15d-PGJ<sub>2</sub> 処理血清アルブミン中の Cys34 において修飾は確認されなかった。これは、Cys34 で囲まれた空間が PG 分子と相互作用を形成するには狭すぎる可能性が考えられ、その結果、15d-PGJ<sub>2</sub> のシクロペンテン環は、Cys34 のチオール基から離れた位置に存在するアミノ酸残基においてマイケル付加物を形成したものと考えられる。

また、阻害剤を用いた 15d-PGJ<sub>2</sub>-血清アルブミン誘導性の COX-2 発現誘導メカニズムの解析の結果、G タンパク質共役型受容体 (GPCR) の関与が示唆される結果が得られた。このことから、15d-PGJ<sub>2</sub>-血清アルブミンが GPCR を活性化することにより炎症応答を誘導している可能性が予想される。GPCR についてはこれまでに勢力的に研究が行われており、多くのオーファン受容体のリガンドが同定されてきた。これまでに同定されている GPCR のリ

ガンドの多くは低分子化合物であり、タンパク質がリガンドとなるという報告はなされていない。このことから、15d-PGJ<sub>2</sub>-血清アルブミンは GPCR を間接的に活性化している可能性も十分に考えられるが、直接的に GPCR を活性化する可能性も現段階では否定できないことから、活性化メカニズムについて今後更なる検討が必要であり、メカニズムの解明が期待される。

本研究の結果、マクロファージ様細胞である RAW264.7 における 15d-PGJ<sub>2</sub> 誘発性 COX-2 発現に關与する血清タンパク質として血清アルブミンを同定した。さらに、15d-PGJ<sub>2</sub> が血清アルブミンのヒスチジン残基においてマイケル付加体を形成した 15d-PGJ<sub>2</sub> 修飾血清アルブミンが炎症応答を誘導することを示した。これらの知見は、炎症性疾患の病因における血清アルブミンおよび親電子性 PG による予想外の炎症誘導活性である。今後、15d-PGJ<sub>2</sub> を含む親電子性 PG 類の産生増強が生体内において炎症誘導に關連する可能性があるかどうか、またどのように増強されるかを検討する必要がある。



**Figure 3-32 本研究のまとめ**

活性化したマクロファージにおいて炎症の後期に産生される 15d-PGJ<sub>2</sub> は、(左) 血清アルブミンの非存在下においてはこれまでの報告通り抗炎症に働く。しかし、(右) 血清アルブミン存在下において 15d-PGJ<sub>2</sub> は血清アルブミンのヒスチジン残基においてマイケル付加体を形成し、マクロファージに存在する GPCR の活性化を介して炎症応答を誘導することから、炎症促進に働くことが明らかになった。

# 第 4 章

## 総括



## 第4章 総括

本研究により疾病に依存したタンパク質修飾として *S*-ホモシステイン化修飾血清アルブミンと 15d-PGJ<sub>2</sub> 修飾血清アルブミンの存在が明らかとした。これら 2 種類の修飾は、修飾構造を形成することでタンパク質の機能性を変化させたことから、生体内代謝物によるタンパク質修飾の重要性を示唆することができたと考えられる。またこれらの修飾は、血清アルブミンに炎症誘導活性を付与することから、修飾タンパク質が慢性炎症性疾患の発症に関与している可能性が予想される。今後、これらの疾病依存的な修飾タンパク質のバイオマーカーとして利用が期待されるだけでなく、炎症誘導機構の更なる解析や疾病との関わりを明らかにすることにより、種々の疾病の発症メカニズムの解明や病気の治療に役立つと期待される。

# 第 5 章

## 実験方法

## 第5章 実験方法

### 8-1 試薬および使用機器

本研究において、水はすべて超純水 (MilliQ) を使用した。特記しない限り全ての試薬は和光純薬株式会社の特級もしくはそれ以上のものを用いた。

#### ➤ 試薬類

AG1478	SIGMA
Acetonitrile	関東化学 (株)
ACTH	Karebay Biochem. Inc.
Angiotensin I (Human)	peptide 研究所
BCA protein assay reagent	PIERCE
BMS345541	SIGMA
BPB	半井化学工業
Bradykinin Fragment 2-9	SIGMA
Brij98	SIGMA
Can Get Signal	TOYOBO
Chemi-Lumi One L	ナカライテスク (株)
C646	
DAABD-Cl	東京化成工業
$\Delta^{12}$ -PGJ <sub>2</sub>	Cayman Chemical Company
15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -PGJ <sub>2</sub>	Cayman Chemical Company
DL-homocysteine (3, 3, 4, 4-D <sub>4</sub> , 98%)	Cambridge Isotope Laboratories, Inc.
DMEM (High glucose)	ナカライテスク (株)
DEPC	ナカライテスク (株)
ECL Prime Western Blotting Detection Reagent	GE Healthcare
EDTA	同仁化学
Ethanol	関東化学 (株)
Fatal Bovine Serum	SIGMA
Forskolin	
Glutathione (Glycine-13C <sub>2</sub> ,98%+; 15N,96-99%)	Cambridge Isotope Laboratories, Inc.

Glu-C, Sequencing Grade	Promega
[Glu1]-Fibrinopeptide B	GenScript
Homocysteine	SIGMA
Homocystine	SIGMA
Human serum albumin	SIGMA
H-89	SIGMA
IBMX	
ITSIPREP™ Albumin Segregation Kit-Solvent	(ITSI Biosciences
L-Cysteine-15N hydrochloride monohydrate	太陽日酸株式会社
Lysyl Endopeptidase®, Mass Spectrometry Grade	Wako
MagicMark XP Western Protein Standard	Invitrogen
Maleimide PEG <sub>2</sub> -Biotin	Thermo
MDL-12330A	
Methanol	関東化学 (株)
Methyl-β-cyclodextrin	SIGMA
Mouse serum albumin	SIGMA
NBD-cholesterol	SIGMA
NF449	
Opti-MEM	Lifetechnologies
Oriole™ 蛍光ゲルステイン	BioRad
PD98059	Calbiochem
Penicillin-Streptomycin Mixed Solution	ナカライテスク (株)
PGJ <sub>2</sub>	Cayman Chemical Company
Phosphatase inhibitor cocktail I, II	SIGMA
Polyvinylpyrrolidone (average mol wt 40,000)	SIGMA
Precision Plus Protein Standards	BioRad
Protease inhibitor cocktail	ナカライテスク (株)
ProteaseMAX™ Surfactant, Trypsin Enhancer	Promega
Proto Gel	National diagnostics
Ricombinant human serum albumin	(株)バイオベルデ
Sequence grade modified trypsin	Promega

Sphingomyelinase	SIGMA
Sucrose	SIGMA
SP600125	SIGMA
SB203580	BIOMOL
SB239063	SIGMA
Tris-(hydroxymethyl)aminomethane	ナカライテスク (株)
U0126	SIGMA
4-CHCA	Shimadzu

➤ 抗体

一次抗体

Goat anti-COX-2 (M-19) polyclonal antibody

Goat anti-NF- $\kappa$ B (C-20) polyclonal antibody

Rabbit anti-I $\kappa$ B (C-21) polyclonal antibody

以上、Santa Cruz Biotechnology

Rabbit anti-phospho-EGFR

Rabbit anti-phospho-ERK polyclonal antibody

Rabbit anti-ERK polyclonal antibody

Rabbit anti-phospho-p38 polyclonal antibody

Rabbit anti-p38 polyclonal antibody

Rabbit anti-phospho-SAPK/JNK polyclonal antibody

Rabbit anti-SAPK/JNK polyclonal antibody

以上、Cell Signaling Technology

Mouse anti- $\beta$ -actin

Rabbit anti-LaminA

Rabbit anti-flotillin-1

以上、Sigma

Goat anti-human serum albumin

Rabbit anti-EGFR

以上、Abcam

## 二次抗体

Donkey anti-rabbit IgG, horseradish peroxidase-linked species-specific whole antibody

Sheep anti-mouse IgG, horseradish peroxidase-linked species-specific whole antibody

Streptavidin

以上、Amarsham Pharmacia Biotech

polyclonal Rabbit anti-goat immunoglobulins/HRP

以上、DakoCytomation

## ➤ 研究用品

Hybond-P PVDF Membrane

Millipore

Amicon Ultra 0.5 mL centrifugal filters (30K)

Millipore

## ➤ 機器

冷却遠心機

HIMAC CT15RE (HITACHI)

HIMAC CF15R (HITACHI)

遠心機

HIMAC CT6D (HITACHI)

超遠心機

HIMAC CS 100FX (HITACHI)

Beckman Optima LE80K

マイクロプレートリーダー

Spark® 10M spectrophotometer  
(TECAN)

分光光度計

FP-770 fluorometer (Jasco)

恒温機

INCUBATOR IC-300 (IUCHI)

恒温槽

THERMO MINDER (TAITEC)

pH メーター

pH Meter F12 (HORIBA)

pH Meter F52 (HORIBA)

上皿天秤

PB1502-S

化学天秤	(METTLER TOLEDO) BP210S (Sartorius)
遠心エバポレーター	AB135-S (METTLER TOLEDO) CVE-3100 (EYELA) CVE-200D (EYELA)
ロータリーエバポレーター	(EYELA)
CO <sub>2</sub> インキュベーター	MCO-17A1 (SANYO)
クリーンベンチ	日本医科機器製作所 (株)
オートクレーブ装置	トミー精工 (株) SS-240
HPLC	
PU-2080 Plus (ポンプ)	JASCO
Gradient Unit LG2080-02 (グラジエントユニット)	JASCO
Degasser DG-2080-53 (デガッサー)	JASCO
PDA 検出器 MD-2010 Plus (PDA 検出器)	JASCO
UV 検出器 FP-1520S (UV 検出器)	JASCO
ES502N-7C カラム (7.5 mm ID × 100 mL, Shodex Asahipak)	Showa Denko Co.
LC-MS/MS	
検出装置一式	Waters
ACQUITY Xevo TQD system	Waters
MassLynx, version 4.1 (software)	Waters
Capcell Core ADME column	Shiseido Co.
電気泳動槽	BioRad
ブロットティング装置	AE-6675 (ATTO)
ライトキャプチャー	WSE-6100LuminoGraph I (ATTO, Tokyo, Japan)
PCR サーマルサイクラー	Takara PCR thermal cycler MP T1 Thermocycler(Biometra)
AKTA prime plus	GE Healthcare
Zetasizer nano ZS (ゼータ電位、粒子径測定)	Malvern

## 8-2 Buffer、試薬類の調製

### 1. PBS

- 1) 以下の割合で試薬を混合し、20×PBS を作製した。

NaCl	160 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 12H <sub>2</sub> O	58 g
(Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	44 g)
(Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , anhydrous	22 g)
KCl	4 g
<u>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></u>	<u>4 g</u>

MilliQ で 1000 mL にメスアップ

- 2) MilliQ で 20 倍希釈して 1×PBS を作製した。

### 2. Tris-HCl buffer

必要量の Tris を MilliQ に溶解後、12N HCl で pH を調整し、メスアップした。

※Tris buffer は温度で pH が変化する (1℃上昇することで、pH が 0.03 低下) ので、濃度の濃い buffer を調製する際は、考慮して調製する。

### 3. 0.2 M Phosphate Buffer (pH 7.4)

0.2 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> と 0.2M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> を混合し、pH 7.4 に調整した。

## 8-3 生化学実験

### 8-3-1 タンパク質定量

<準備>

#### ➤ BCA Protein Assay Reagent (PIERCE)

Reagent A : 0.1 M NaOH 中に Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>、NaHCO<sub>3</sub>、BCA 検出試薬、C<sub>4</sub>H<sub>5</sub>O<sub>5</sub>Na を含有

Reagent B : 4 % CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O

#### ➤ Bovine Serum Albumin Standard Ampules, 2 mg/mL (PIERCE)

0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mg/ml となるように MilliQ で希釈して BSA Standard を作製し、4℃ にて保存した。



<操作>

- 1) 96 穴マイクロプレートに BSA Standard (0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mg/ml) と濃度未知サンプルを 1 ウェル当たり 10  $\mu$ l ずつ 2 連で分注した。
- 2) 使用直前に、Reagent A : Reagent B = 50 : 1 となるように混合し、1 ウェル当たり 100  $\mu$ l 加え、37°C で 15 分間インキュベーションした。
- 3) マイクロプレートリーダーにより、550 nm の吸収を測定した。BSA standard の検量線から濃度未知サンプルのタンパク質濃度を算出した。

### 8-3-2 電気泳動

#### 1. サンプルの調製

<準備>

➤ RIPA buffer

(50mM Tris-HCl(pH7.5)、150mM NaCl、1%NP-40、0.5%sodiumdeoxycholate、0.1%SDS)

- 1) 1M Tris-HCl (pH 7.5) 5 ml、1.5 M NaCl 10 ml、NP-40 1 ml、sodium deoxycholate 0.5 g、SDS 0.1 g を溶解し、100 ml にメスアップした。
- 2) 作製したバッファーは 4°C 保存した（長期保存する場合は -30°C で保存した）。

➤ Protease Inhibitor Cocktail (PIC)

1.5 mL チューブに 100  $\mu$ L ずつ分注し、-30°C にて保存した。

➤ 5× 還元サンプルバッファー (-20°C 保存)

- 1) SDS 4.5 g、グリセロール 7.5 ml、プロモフェノールブルー (BPB) 少量、1 M Tris-HCl (pH6.8) 10.05 ml を混合した後、最後にメルカプトエタノールを 3 ml 加え、MilliQ で 50 ml にメスアップした。
- 2) 5 倍希釈して BPB の色が十分であるか確認した。
- 3) 適当なプラスチック容器に 2 ml ずつ分注し、-30°C にて保存した。

➤ 5× 非還元サンプルバッファー (-20°C 保存)

- 1) SDS 4.5 g、グリセロール 7.5 ml、プロモフェノールブルー (BPB) 少量、1 M Tris-HCl (pH6.8) 10.05 ml を混ぜ、MilliQ で 50 ml にメスアップした。
- 2) 5 倍希釈して BPB の色が十分であるか確認した。

3) 適当なプラスチック容器に 2 ml ずつ分注し、-30℃にて保存した。

➤ 2× native-PAGE サンプルバッファー (-20℃保存)

1) スクロース 3.4 g、ブロモフェノールブルー (BPB) 少量を混ぜ、MilliQ で 10 ml にメスアップした。

2) 適当なプラスチック容器に 2 ml ずつ分注し、-30℃にて保存した。

<操作>

- 1) 以下の操作はすべて非滅菌条件下にて行った。適当時間細胞を処理した後、培地を除去し、cold-PBS で 2 回 wash した。保存する場合は、PBS を完全に取り除いた後に、dish をパラフィルムで密封し、-80℃に保存した。
- 2) dish を冷やした状態、または凍らせた状態で cold-RIPAbuffer (1/100 量の PIC を含む) を 100 µl ずつ加え、セルスクレイパーを用いて細胞を溶かした。
- 3) cell lysate を 1.5 mL チューブに回収して、15,000 rpm で 10 分遠心した。
- 4) 上清を新しい 1.5 mL チューブにとり、保存する場合は-20℃で保存した。
- 5) BCA protein assay reagent を用いて回収した上清のタンパク質定量を行った。
- 6) 各サンプルのタンパク質濃度を調製した後、サンプルバッファーを終濃度が 1×となるように加え、80℃で 10 分間加熱した。(Native-PAGE の場合は加熱しない)

2. 10%アクリルアミドゲルの作製

<準備>

➤ 1.5 M Tris-HCl (pH 8.8) (4℃保存)

Tris 1.5 mol を MilliQ に溶解し、HCl で pH 8.8 に合わせた後、メスアップして 1 L にした。

➤ 0.5 M Tris-HCl (pH 6.8) (4℃保存)

Tris 0.5 mol を MilliQ に溶解し、HCl で pH 6.8 に合わせた後、メスアップして 1 L にした。

➤ 10% SDS (室温保存)

SDS 10 g を MilliQ に溶かして、100 ml にメスアップした。

➤ 10% 過硫酸アンモニウム (APS) (4°C保存)

APS 1.0 g を MilliQ に溶かして、10 ml にメスアップした。遮光して保存した。

➤ 30 % Protogel (組成: アクリルアミド 300 g/L/ メチレンビスアクリルアミド 8 g/L) (4°C 保存)

<操作>

- 1) ゲル板を MeOH で拭き、クリップで留めて組み立てた。
- 2) 下記の試薬を分量 (2 枚分を示す) 通り遠沈管内で混ぜ合わせて下層ゲルを調製した。

下層ゲル (10%)

Proto Gel	5000 $\mu$ l
1.5 M Tris-HCl (pH8.8)	3750 $\mu$ l
MilliQ	5880 $\mu$ l
10%SDS	150 $\mu$ l
10%APS	200 $\mu$ l
TEMED	20 $\mu$ l

- 3) 組み立てたミニゲル板を傾けながら、ビーカー内の下層ゲルを適当量ゆっくり流し込んだ。
- 4) 流し込んだゲルの上から MilliQ を適当量重層してゲルが直接空気に触れないようにした。
- 5) 下層ゲルが固まったら (5-10 分) 重層した MilliQ を濾紙に吸収させて除いた。
- 6) 下記の試薬を分量 (2 枚分を示す) 通り遠沈管内で混ぜ合わせて上層ゲルを調製し、3) と同様に上層ゲルを流し込んだ。

上層ゲル (4%)

Proto Gel	650 $\mu$ l
0.5 M Tris-HCl (pH6.8)	1200 $\mu$ l
MilliQ	3050 $\mu$ l
10%SDS	48 $\mu$ l
10%APS	25 $\mu$ l
TEMED	5 $\mu$ l

- 7) ゲルは作製して室温の場合 2 時間、4°Cの場合 24 時間以内に使用し、長時間使用しな

い場合は、乾燥を防ぐため MilliQ でしめらせたペーパータオルとラップで覆って保存した。アクリルアミドゲルの濃度を変えるときは、Proto Gel と MilliQ の割合を変化させて調製した。

### 3. 一次元電気泳動

#### <準備>

##### ➤ 泳動バッファー (SDS-PAGE)

- 1) Tris 9.0 g、SDS 3.0 g、Gly 43.2 g を MilliQ に溶かして、3 L にメスアップした。
- 2) 室温にて保存した。

##### ➤ 泳動バッファー (native-PAGE)

- 1) Tris 0.6 g、Glycine 2.88 g を MilliQ に溶かして、1 L にメスアップした。
- 2) 低温室にて保存した。

#### <操作>

- 1) 泳動装置に、クリップを外したゲル板を気泡が入らないようにセットし、泳動バッファーを注いだ。
- 2) サンプルを 10-60 µl アプライした。
- 3) 上層ゲルを流し切るまでは、定電圧流 (CV) 70 V 泳動し、BPB による泳動のフロントラインが下層ゲルに到達したら、CV 100-120V で泳動した。ゲルの底面から 5 mm 弱になったら、泳動を終えた。Native-PAGE の場合は、泳動層のバッファーが温まらないようにあらかじめ冷やしておいた泳動バッファーを使用した。

### 8-3-3 染色

#### 1. CBB 染色

##### <準備>

##### ➤ CBB 染色液

- 1) タブレット (PhastGel™ Blue R (Amersham Pharmacia Biotech AB)) 1 錠を 80 ml の MilliQ に入れて、スターラーで 5~10 分攪拌した。
- 2) 120 ml のろ過メタノールを加え、CBB タブレットを完全に溶解した。
- 3) 20% 酢酸水溶液を 200 ml 加えた。

➤ 脱色液

酢酸 70 ml、MeOH 50 ml に MilliQ を加えて、1 L にメスアップした。

<操作>

- 1) CBB 染色液を注ぎ、5-20 分振とうした。
- 2) CBB 染色液を除いて脱色液を加え、キムワイプを入れて色素を吸着させた。
- 3) タンパク質のバンドとバックグラウンドのコントラストを確認しながら、適当なところで脱色を終了した。

2. Oriole 染色

<準備>

➤ Oriole™ 蛍光ゲルステイン

<操作>

- 1) 泳動を終えたゲルを、Oriole™ 蛍光ゲルステインに浸し、遮光下で 60 分間浸とうした。
- 2) Oriole™ 蛍光ゲルステインを捨て、MilliQ でゲルをすすいだ。
- 3) UV を照射し、ゲル撮影装置で撮影した。

8-3-4 ウェスタンブロッティング

1. 転写

<準備>

➤ トランスファーbuffer A (0.3 M Tris / 5% MeOH)

Tris	54.5 g
MeOH	75 mL
MilliQ	<u>1425 mL</u>
	1500mL

➤ トランスファーbuffer B (25 mM Tris / 5% MeOH)

Tris	4.54 g
MeOH	75 mL

MilliQ 1425 mL

1500 mL

➤ トランスファーbuffer C (25 mM Tris / 5% MeOH / 6-amino-*n*-caproic acid)

Tris 4.54 g

6-amino-*n*-caproic acid 7.87 g

MeOH 75 mL

MilliQ 1425 mL

1500 mL

➤ TBS-T (tween 20 / Tris-HCl (pH7.0) buffered saline)

- 1) Tris 242.3 g、NaCl 194 g、Tween 20 10 ml を約 1.5 L の MilliQ に溶かした。
- 2) 12N HCl を用いて pH を 7.5 に合わせた後、MilliQ で 2 L にメスアップした (10×TBS-T)。
- 3) MilliQ で 10 倍に希釈して用いた。

<操作>

- 1) ゲルと同じ大きさに切ったろ紙 (4 cm × 7 cm) をトランスファーbuffer A に 2 枚、buffer B に 1 枚、buffer C に 3 枚浸した。また同じ大きさの PVDF 膜 1 枚を MeOH で 1-2 分浸して活性化処理した後、buffer B に浸し、使用するまで振とうした。
- 2) ブロッティング装置の下部電極板にトランスファーbuffer A に浸したろ紙 2 枚、buffer B に浸したろ紙 1 枚、PVDF 膜、ゲル、buffer C に浸したろ紙 3 枚をこの順に気泡が入らないように重ねた。
- 3) 上部電極板でしっかりと押さえ、ゲルと PVDF 膜を密着させてゲル面積 1cm<sup>2</sup> あたり 2 mA の電流を 1 時間通電した。(4 cm × 7 cm のゲル 1 枚の場合は 126 mA 通電した)

2. 検出

<準備>

➤ ブロッキング溶液 (0.25 % Polyvinylpyrrolidone / TBS-T)

- 1) 1.25 g の Polyvinylpyrrolidone を 500 mL の TBS-T に溶解した。
- 2) 4°Cにて保存した。

➤ Can Get Signal

- ・ Immunoreaction Enhancer Solution 1 for primary antibody
- ・ Immunoreaction Enhancer Solution 2 for secondary antibody

➤ ウェスタンブロッティング用化学発光検出試薬 Chemi-Lumi One L

➤ ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (検出が難しいタンパク質の場合)

<操作>

- 1) トランスファー終了後、ブロッキング溶液の入った容器に PVDF 膜を移し、室温で 1 時間もしくは 4℃でオーバーナイト振とうし、ブロッキングした。
- 2) TBS-T で 10 分、3 回洗浄した。
- 3) TBS-T で希釈した一次抗体溶液に PVDF 膜を浸し、室温で 2 時間もしくは 4℃でオーバーナイト振とうした。
- 4) TBS-T で 10 分、3 回洗浄した。
- 5) TBS-T で希釈した HRP 標識 IgG 二次抗体溶液に浸し、室温で 1 時間振とうした。
- 6) TBS-T で 10 分、3 回洗浄した。
- 7) PVDF 膜を ECL Chemi-Lumi One L あるいは ECL Prime Western Blotting Detection Reagent に浸した後、ライトキャプチャーにより検出を行う。
- 8) 検出が難しいタンパク質を扱う場合は、抗体希釈に Can Get Signal を用いた。

### 8-3-5 密度勾配遠心法

<準備>

- 装置 : Beckman Optima LE80K
- ローター : Beckman SW41 (スイングローター)
- Buffer A

(25 mM HEPES, 150 mM NaCl, 1 mM EGTA (pH 7.5) + protease inhibitor cocktail)

100 mM HEPES                      125 mL

600 mM NaCl                      125 mL

0.5 M EGTA (pH 7.5)                      1 mL

超純水で 500ml にメスアップ

使用する直前に 100 分の 1 量の PIC を添加する。

- 5% Brij / BufferA
- 2M Sucrose / BufferA (あらかじめ 4°C で冷やしておく)
- 0.9, 0.8, 0.75, 0.7, 0.6, 0.5, 0.4, 0.2 M Sucrose / BufferA (あらかじめ 4°C で冷やしておく)
- 遠心チューブ (使い捨て)
- 17G 針
- 5 mL シリンジ

#### <操作>

- 1) 10cm dish に 2 日後コンフルエントとなるように RAW264.7 細胞を播種した (1 サンプル当たり 10cm dish を 3 枚使用した)。
- 2) 適当時間処理した細胞を cold-PBS で 3 回洗った後、PBS で回収した。
- 3)  $3 \times 10^7$  細胞程度に培養したものに 0.8 ml の BufferA を加え、軽くソニケーションをかけた (O.P. 2 / duty 4 / 2min)。
- 4) 4°C で 800g、10 分間遠心した。
- 5) 遠心で得た上清を回収し、0.2 ml の 5% Brij / BufferA を加えた (Brij 98 final conc. 1%, final total volume 1mL)。
- 6) 37°C で 5 分間静置した。
- 7) 氷上に静置した後、cold-2M Sucrose / BufferA を 2 ml 加え (final sucrose conc: 1.33M, final Brij 98 conc: 0.33%)、泡立たないようにピペッティングで混合した。
- 8) 17G の針を装着したシリンジを使用して、遠心チューブにサンプルおよびスクロース溶液を重層した (高濃度のスクロースから重層)。
- 9) Beckman SW41 で 4°C, 38,000 rpm で 16 時間超遠心した。
- 10) チューブの上からシリンジで 1 ml ずつ分画し、最後は 3 ml まとめて分画した。

### 8-3-6 ゲルろ過クロマトグラフィー

#### <準備>

- 機器 : AKTA prime plus (4°C 冷蔵庫内に設置)
- 牛胎児血清 (FBS)
  - 0.45  $\mu$ m を用いてフィルターろ過し、不溶性分子を除去した。
- Cold-PBS



➤ 5 mL シリンジ

➤ 分取用試験管

<操作>

- 1) サンプルループ内を 1×PBS に置換した。
- 2) 1×PBS を用いてカラムの平衡化を行った。以下に示す条件を使用した。

Column	Hiprep 16/60 sephazryl s-300 (GE Healthcare)
Flow rate	0.2 ml/min
Fraction size	0 mL
Sample volume	0.1 mL
Elution volume	150 mL

3) UV ランプを安定させるため、使用 1 時間前にランプをつけて

おいた。

- 4) サンプル 2 mL をインジェクトし、分画を行った。以下に示す条件を使用した。

Column	Hiprep 16/60 sephazryl s-300 (GE Healthcare)
Flow rate	0.1 ml/min
Fraction size	0.5 mL
Sample volume	1.5 mL

### 8-3-7 修飾タンパク質の作製

#### 酸化型アルブミンの調製

<準備>

- rHSA
- 低分子チオール化合物
  - Cystine
  - Homocystine
  - GSSG

<操作>

- 1) 最終濃度が以下となるように試薬を混合した (すべて 100 mM PB (pH 6.8)で行った)。

300 $\mu$ M HSA	250 $\mu$ l
1mM Low molecular wight compound	150 $\mu$ l
<u>100mM PB / 1.5M NaCl</u>	<u>100 <math>\mu</math>l</u>
Total	500 $\mu$ l

- 2) 37°Cインキュベーターで 24 時間振とうした。
- 3) 1×PBS で 4 時間透析を 3 回行った。

### 8-3-8 15d-PGJ<sub>2</sub> のビオチン化

#### <準備>

- 15d-PGJ<sub>2</sub>
- EZ-link 5-(biotinamido)pentylamine

#### <操作>

- 1) 15d-PGJ<sub>2</sub> 1 mg と EZ-link (5-biotinamido)pentylamine 1 mg を *N,N'*-ジイソプロピルカルボジイミド存在下でアセトニトリルに溶解し、室温でオーバーナイトインキュベーションし、縮合した。
- 2) ビオチン化 15d-PGJ<sub>2</sub> を HPLC の逆相カラムで精製した (acetonitrile/water/acetic acid のグラジエントで溶出)。
- 3) 精製したビオチン化 15d-PGJ<sub>2</sub> をアルゴンで乾固した後、DMSO に再溶解した。

### 8-3-9 ヒト血清からの血清アルブミン単離

#### <準備>

- ITSIPREP™ Albumin Segregation Kit-Solvent
- ヒト血清

#### <操作>

- 1) ヒト血清を 1x PBS で希釈し、1.5 mL チューブに 20 mg/mL, 50  $\mu$ L 調製した。
- 2) ITSIPREP™ Albumin Segregation Kit-Solvent のプロトコルに従って、ヒト血清から血清アルブミンを単離した。
- 3) 単離した血清アルブミンに PBS を加え、溶解した (溶けにくい場合は、ソニケーションを行った)。

## 8-4 RT-PCR

### 8-4-1 細胞からの mRNA の単離

#### <準備>

- DEPC 水

#### <操作>

- 1) 適当時間細胞を処理した後、培地を除去し、cold-PBS で 2 回 wash した。  
保存する場合は、PBS を完全に取り除いた状態で dish をパラフィルムで密封し、-80°C に保存した。
- 2) dish を冷やした状態、または凍らせた状態で Trizol を約 1 ml ずつ加え、セルスクレイパーを用いて細胞を溶かした。
- 3) cell lysate を 1.5 mL チューブに回収して、クロロホルムを 200  $\mu$ l 加え、よく攪拌し、3 分間静置した。
- 4) 13000 rpm、4°C で 15 分間遠心し、上清 500  $\mu$ l を 1.5 mL チューブチューブに回収した。
- 5) イソプロパノールを 500  $\mu$ l を加え、よく攪拌した後、室温で 5 分間静置した。
- 6) 13000 rpm、4°C で 10 分間遠心し、上清をしっかりと除いた。
- 7) 70% EtOH を 300  $\mu$ l 加え、13000 rpm、4°C で 5 分間遠心し、上清をさらにしっかりと除き、風乾した。
- 8) DEPC 水を 20  $\mu$ l 加え、少し常温に静置した後、攪拌し、氷上で静置した。

### 8-4-2 mRNA 量の定量

#### <操作>

- 1) 抽出した RNA 溶液の 260 nm と 280 nm の吸光度を測定した。ブランクに DEPC 水を用いた。
- 2) RNA 濃度を  $O.D._{260nm} \times 4$  ( $\mu$ g/ $\mu$ l)、RNA 純度を  $O.D._{260nm} / O.D._{280nm}$  により算出した。

### 8-4-3 RT 反応

#### <準備>

- RT 反応液 (1 チューブ分)

5×RT buffer	5 $\mu$ l
DTT	2.5 $\mu$ l

RT	5 $\mu$ l
dNTP	5 $\mu$ l
<u>RNase out</u>	<u>0.5 <math>\mu</math>l</u>

<操作>

- 1) PCR チューブに Oligo-dT primer 2  $\mu$ l、DEPC 水を全量が 16.5  $\mu$ l となるように加えた。
- 2) mRNA を 10  $\mu$ g 分加えた。
- 1) 65°Cで 15 分間インキュベーションし、氷冷した。
- 2) RT 反応液を 10  $\mu$ l 加え、37°C、オーバーナイトで反応させた。
- 3) 94°C、2 分間インキュベーションし、酵素を失活させた。
- 4) -20°Cで保存した。

#### 8-4-4 PCR 反応

<準備>

➤ プライマー

・ COX-2

(F) 5'-CCC TGC TGG TGG AAA AGC CTG GTC C-3'

(R) 5'-TAC TGT AGG GTT AAT GTC ATC TAG-3'

・ GAPDH

(F) 5'-AAC CCA TCA CCA TCT TCC AGG AGC-3'

(R) 5'-CAC AGT CTT CTG AGT GGC AGT GAT-3'

➤ PCR 反応液 (1 チューブ分)

Primer (F)	0.5 $\mu$ l
Primer (R)	0.5 $\mu$ l
10×Taq buffer (+ KCl-MgCl <sub>2</sub> )	2.5 $\mu$ l
2 mM dNTPs	2.5 $\mu$ l
25 mM MgCl <sub>2</sub>	2 $\mu$ l
DW	16 $\mu$ l
<u>rTaq (最後に加える)</u>	<u>0.16 <math>\mu</math>l</u>

<操作>

- 1) PCR チューブに cDNA サンプル 0.75  $\mu$ L、PCR 反応液 25  $\mu$ l を加えた。
- 2) PCR 反応の条件は以下の通り。

セグメント	サイクル数	ステップ	温度 (°C)	時間
1	1	denaturing	94	5 min
2	25	denaturing	94	40 s
		annealing	55	40 s
		extension	72	40 s
3	1	elongation	72	10 min

※ ■ で示した数値は使用するプライマー及び cDNA によって異なり、条件検討が必要である。

	Anneal (°C)	Cycle
COX-2	64	21
GAPDH	64	21

#### 8-4-5 アガロースゲル電気泳動

<準備>

- 50×TAE buffer (2 M Tris-acetate / 1 mM EDTA)

Tris 242 g、EDTA・2Na (2H<sub>2</sub>O) 18.6 g、酢酸 57.1 ml を MilliQ に溶かし、1 L にメスアップした。

- 1×TE buffer (10 mM Tris-HCl ,1 mM EDTA pH 8.0)

1 M Tris-HCl buffer (pH 8.0) 10 ml と 0.5 M EDTA (pH 8.0) を混合し、MilliQ を加えて 1 L にした。

- 10%アガロースゲル

アガロース	1 g
50×TAE	2 ml
ethidium bromide	1 滴

アガロース、50×TAE、MilliQ 入れた三角フラスコを電子レンジで加熱し溶解させた後、流水で冷却し、ethidium bromide を 1 滴加えた。これをゲル成型トレイに流し込み、コームを差し込み遮光で固めた。ラップとアルミホイルで包んで 4°C で保存した。

#### <操作>

- 1) 1×TAE を満たした電気泳動槽に、コームを外してゲルをセットした。
- 2) パラフィルム上で 6×Loading Dye buffer 2  $\mu$ L とサンプル 10  $\mu$ L を混合し、全量をアプライした。
- 3) 1×TAE buffer 中 100 V で泳動した。
- 4) 色素のバンドがゲルの約 3 分の 1 まで達したところで泳動を停止した。
- 5) 検出器で検出した。

### 8-5 細胞培養

#### 8-5-1 培地及び試薬の調製

##### ➤ 牛胎児血清 (FBS)

- 1) ウォーターバスに凍ったままの FBS (500 ml) を容器全体が浸るようにして入れ、37°C に設定して FBS を溶かした。
- 2) FBS が溶けたら、56°C に設定した水浴中で時々容器を揺すりながら 30 分間処理して非働化した。
- 3) クリーンベンチ内で、乾熱滅菌したメディウム瓶 (100 ml) に分注し -20°C で保存した。

##### ➤ 1×PBS

- 1) 10×PBS を 10 倍希釈して 1×PBS を作製した。
- 2) 10×PBS および 1×PBS はオートクレーブにより滅菌し、10×PBS は室温保存、1×PBS はクリーンベンチ内または 4°C で保存した。

##### ➤ CMF-PBS

- 1) 1×PBS に終濃度が 0.5 mM になるように、2Na・EDTA を加えてオートクレーブにより滅菌した。

- 2) 滅菌処理後は、クリーンベンチ内で保存する。

➤ Penicillin-Streptomycin Mixed Solution

滅菌済みの 50 mL 遠沈管に 40 mL ずつ分注し、-30°C にて保存した。

➤ 10% FBS DMEM 培地 (マウスマクロファージ由来 RAW264.7 細胞)

- 1) DMEM (High glucose) 液体培地 500 mL (L-グルタミン、塩化カルシウム、リン酸水素ナトリウム、HEPES、フェノールレッドを含む) に 100×PS 5.5 ml、FBS 55.5 ml を加えた。
- 2) 開封後は 4°C にて保存した。

## 8-5-2 細胞の継代

細胞の取り扱いにはクリーンベンチ内で無菌的に行い、試薬・器具・容器等は滅菌したものを使用した。RAW264.7 は、比較的セルサイクルの短い細胞である。継代は約 3 日に一度行うのが望ましく、最長でも播種して 4 日目までには継代するようにした。また、細胞を播種する数が少なければ、増殖率や細胞の形態まで変化してしまうことがあるので注意した。培地中の栄養分が枯渇しても細胞の形質が変化することがあるので、継代用の dish には少し多めの培地 (10 mL 以上) を入れ、2 日に 1 度は培地交換をした。継代回数が 12 回くらいになれば、ストックしておいた細胞をおろし、新しい細胞を使用した。クリーンルーム内に設置されている 37°C の 5% CO<sub>2</sub> インキュベーターで培養した。

### <操作>

- 1) 細胞が 90 mm dish の面積の 80-90% を占めるようになったら、アスピレーターで培地を除去し、5 mL の CMF-PBS で 2 回洗った。
- 2) 新しく 5 ml CMF-PBS を加えた。
- 3) オートクレーブ済みの 50 ml スピッツ管に培地を 5 ml 入れ、そこにセルスクレイパーでディッシュから剥離した細胞の懸濁液を加え (必要に応じてピペティングで細胞を剥離)、軽く混ぜた。
- 4) 1300 rpm で 2 分間遠心した。
- 5) 上清をアスピレーターで取り除き、新しい培地 10 ml を加え、細胞を懸濁した。
- 6) 予め 9 ml の培地を入れた 90 mm dish に、5) の懸濁液を 0.5 ml 加えて均一に播種する

(血球計算板で数える場合には、 $3\text{--}5 \times 10^5 \text{ cells} / 90 \text{ mm dish}$  となるように播くと、およそ 2-3 日後に継代できるように増える)。

### 8-5-3 細胞への試薬等の投与

継代直後の細胞はダメージを受けているので、継代して 2 日後に約 80%コンフルエントとなった細胞に試薬を投与した。また、DMSO に溶解して投与する場合は DMSO の終濃度が 0.1%以下になるようにした。

### 8-5-4 細胞の回収

培地を捨て、PBS で 2 回洗ってしっかりと PBS を除いた後に、すぐにサンプル調製を行った。すぐに行えない場合はディッシュの周りをパラフィルムで巻き、 $-80^{\circ}\text{C}$ で保存した。

### 8-5-5 細胞の凍結保存と解凍

#### <凍結>

- 1) 細胞をシャーレからチューブに移し、1,300 rpm で 3 分間遠心した。
- 2) 上清を除き、セルバンカーを 10 cm ディッシュ 1 枚につき 1 ml 加えてよく懸濁し、細胞凍結用バイアルに移した。キムタオルや脱脂綿などに包み、速やかに $-80^{\circ}\text{C}$ のディープフリーザーで保存した。
- 3) 翌日以降、液体窒素保存容器に移して保存した。

#### <解凍>

- 1) 液体窒素中に凍結保存されているまたは、 $-80^{\circ}\text{C}$ に保存されている細胞のバイアルを $37^{\circ}\text{C}$ の水浴で半分程度溶かし、20~30 ml の培地の入ったチューブに移した。
- 2) 1,300 rpm で 2 分間遠心した。
- 3) 上清を除き、培地を 10 ml 加えよく混和して 10cm シャーレに播種し、 $37^{\circ}\text{C}$ 、5 %  $\text{CO}_2$  インキュベーターで培養した。

## 8-6 機器分析

### 8-6-1 HPLC

#### ヒト血清およびヒト血清アルブミンの分析

#### <準備>



➤ Acetate-Sulfate Buffer の作製

- 1) 0.05 M Sodium Acetate, 0.4 M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> を HCl で pH 4.85 に調製した。
- 2) 0.22 μm のフィルターでろ過し、不溶物を除去した。

➤ サンプル調製

- 1) 血清あるいは血清アルブミンを MilliQ で適切な濃度に希釈した。
- 2) 希釈したサンプルを Millex-GV 0.22 μm Filter Unit を使用してフィルターろ過し、不溶物を除去した。

<分析条件>

Column	ES502N-7C (7.5mm×100 mm)
Flow rate	1.0 ml/min
Detection	Excitation 280nm / Emission 340nm
Eluent	A : Acetate-Sulfate buffer B : 10% EtOH Acetate-Sulfate buffer

Gradient program

Time (min)	0	5	50	55	65
Solvent A (%)	100	100	0	100	100
Solvent B (%)	0	0	100		0

## 8-6-2 ESI-LC-MS/MS

### 誘導体化低分子チオール化合物の定量

<準備>

➤ 低分子チオール化合物

- Cysteine
- Homocysteine
- GSH

➤ 50 mM DAABD-Cl

DAABD-Cl 15.2375 mg を DMSO 1 mL に溶解する。(用事調製)

< 操作 >

- 1) 25 mM PB (pH 8.0)で調製した 100  $\mu$ M 低分子チオール 99 $\mu$ L に 50 mM DAABD-Cl を 1.0  $\mu$ L 加えた。
- 2) 50°Cで 20 分加熱した。
- 3) 10 %ギ酸を 0.5  $\mu$ l 加え、反応を停止したのち、LC-MS/MS により測定した。測定条件は以下の通り。

Ion mode	ESI-MS/MS in the positive ion mode
Precursor ion	DAABD-Cysteine : 390.1 DAABD-Homocysteine : 404.1 DAABD-Glutathione : 576.2
Product ion	72.2
Column	CAPCELL CORE ADME (2.7 $\mu$ m, 2.1 $\mu$ m $\times$ 100 mm)
Flow rate	0.3 ml/min
Eluent	A : 0.1% Formic acid H <sub>2</sub> O B : 0.1% Formic acid CH <sub>3</sub> CN
Injection	7.5 $\mu$ L
Cone potential	30 eV
Collision energy	35 eV

Gradient program

Time (min)	2	10	12	12.1	15
Solvent A (%)	99	50	50	99	99
Solvent B (%)	1	50	50	1	1

タンパク質結合型低分子チオール化合物の誘導体化

< 準備 >

- TCEP
- 安定同位体低分子チオール
  - ・ L-Cysteine-15N hydrochloride monohydrate

- ・ DL-homocysteine (3, 3, 4, 4-D4, 98%)
- ・ Glutathione (Glycine-13C2,98%+; 15N,96-99%)
- Amicon Ultra 0.5 mL centrifugal filters (30K) (Millipore)

#### <操作>

- 1) 低吸着 1.5 mL チューブでタンパク質 300 µg を 64.5 µL の 25 mM PB (pH 8.0)で希釈した。
- 2) 低分子チオール内部標準物質(1.0 mM 安定同位体標識 cysteine, homocysteine, glutathione)をそれぞれ 2.5 µL 加えた(最終濃度 25 µM)。
- 3) 25 mM TCEP を 8.0 µl 加え、57°Cで 30 分加熱し、還元した。
- 4) Amicon (30K) に移し、15000 rpm で 10 分間遠心し、溶液をすべて落としきった。
- 5) タンパク質を除去したサンプル(30K 以下の画分) を 60 µl ずつを新しい 1.5 mL チューブに移した。
- 6) 25 mM PB (pH8.0) 39µL と、50 mM DAABD-Cl を 1.0 µL 加えた。
- 7) 50°Cで 20 分加熱し、誘導体化した。
- 8) 10 %ギ酸を 0.5 µl 加え、反応を停止したのち、LC-MS/MS により測定した。測定には 誘導体化低分子チオール化合物の定量と同じ条件を使用した。

### 8-6-3 ESI-LC-MS

イタリアの Giancarlo Aldini 氏に測定を依頼した。

### 8-6-4 MALDI-TOF/TOF MS

#### MALDI-TOF/TOF MS スタンダードの作製

#### <準備>

- Bradykinin Fragment 2-9 (Mw. 904.1)
- Angiotensin I (Human) (Mw. 1296.5)
- [Glu1]-Fibrinopeptide B (Mw. 1570.6)
- ACTH (Mw. 2093.4)

#### <操作>

- 1) 終濃度が 1 mM となるように、それぞれのペプチドに MilliQ を加えて溶解した。すぐ

に使用しないものは、1.5 mL チューブに分注し、-30°C にて保存した。

- 2) 溶解した4種のペプチドを混合した後、MALDIプレートにスポットし、MALDI-TOF/TOF MS のリフレクターポジティブモードでピークを確認した。
- 3) 混合したペプチドスタンダードを 35  $\mu\text{L}$  ずつ 500  $\mu\text{L}$  の低吸着チューブに分注し、パラフィルムで封をして-30°Cにて保存した。
- 4) 使用する際には 0.01%の TFA を含む溶媒で希釈して用い、希釈後は室温遮光にて保存した。

## タンパク質同定

### <準備>

- 10% プロピオンアミド
- Trypsin gold, Mass Spectrometry Grade
- フィルター (Ultrafree-MC-VV Centrifugal filters Durapore PVDF 0.1 $\mu\text{m}$ )
- マトリックス ( $\alpha$ -Cyano-4-hydroxycinnamic acid (4-CHCA))
  - 1) 5 mg の CHCA を 50%アセトニトリル、0.1% TFA 2400  $\mu\text{L}$  と 2.5 mg クエン酸二アンモニウム 100  $\mu\text{L}$  で溶解する。
  - 2) 溶解したマトリックスは遮光のガラスバイアルに入れ、室温保存した。

### <操作>

- 1) サンプルを還元サンプルバッファーで調製時に最終濃度 0.5%となるようにプロピオンアミドを加えた後、80°Cで 10 分間加熱した。
- 2) SDS-PAGE によりタンパク質を泳動した後、CBB 染色を行った。
- 3) 目的のバンドをスパーテル(使用前に MeOH で拭いておく)で切り出し、低吸着チューブへ移した。
- 4) チューブに 500 $\mu\text{L}$  の  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  buffer / 30%  $\text{CH}_3\text{CN}$  (脱色液)を入れ、振とうした。
- 5) の操作を脱色が終わるまで2~3回繰り返した。
- 6) 脱色が終わったら脱色液を除き、 $\text{CH}_3\text{CN}$  を加えて浸透し、ゲルを脱水した。
- 7) 乾燥させたゲルを新しい低吸着チューブへ移した。
- 8) 99  $\mu\text{L}$  の  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  buffer と Trypsin gold (1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )を 5  $\mu\text{L}$  加えた。
- 9) 37°C、オーバーナイトでインキュベーションした。
- 10) 0.1%となるように TFA を加え、酵素反応を停止した。

- 11) ペプチド溶出液を新しい 1.5 mL チューブに回収した。
- 12) ゲル片の入ったチューブにアセトニトリルを加え、振とうし、ゲルを脱水した。
- 13) アセトニトリル溶液をペプチド溶出液を入れたチューブに回収した。
- 14) 12)、13)の操作をゲルの脱水が完了するまで 2、3 回繰り返した。
- 15) 回収したペプチド溶液を遠心エバポレーターで乾固した後、100  $\mu$ L の  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  buffer で再懸濁した。
- 16) 15000rpm で 10 分間遠心してフィルタを通し、不溶物を除去した。
- 17) DiNa Nano-flow LC system (KJA Technologies Corporation, Tokyo, Japan)に供し、MALDI プレートにマトリックスと共に直接スポットした。
- 18) Triple TOF 5800 System (AB SCIEX, USA)で  $m/z$  800-4000 のペプチドを測定した。
- 19) MALDI-TOF/TOF MS による測定によって得られたデータを MASCOT generic format (.mgf) data file に変換した後、MASCOT software (Matrix Sciences, London, UK) により Swiss-Prot データベースを用いて解析した。解析パラメーターは以下に示す条件を使用した。

MS/MS	ions
enzyme	trypsin or V8 protease
mass values	monoisotopic
number of possible missed cleavages	three
taxonomy	【ヒト血清】 Homo sapiens 【マウス血清】 Mus musculus
variable modification	【ヒト血清】 carbamidomethylation (Cys), deamidation (Asp and Glu), oxidation (Met) 【マウス血清】 carbamidomethyl (cysteine), propionamide (cysteine), oxidation (methionine), deamidation (asparagine, and glutamine), 15d-PGJ <sub>2</sub> addition (reduced form) (cysteine, and histidine).
peptide mass tolerance,	50 ppm
fragment mass tolerance	0.3 Da

## 全長タンパク質の解析

### <準備>

- microcon 50k (Millipore)
- マトリックス ( $\alpha$ -Cyano-4-hydroxycinnamic acid (4-CHCA))

### <操作>

- 1) サンプルを microcon 50K で濃縮した。
- 2) 濃縮したサンプルにさらに MilliQ を加え、遠心を繰り返し、脱塩した。
- 3) 濃縮したサンプルを MALDI プレートにマトリックスと共に直接スポットした。
- 4) Triple TOF 5800 System (AB SCIEX, USA)の Linear Mode で測定した。

## タンパク質システイン残基の修飾解析

### <準備>

- 低吸着 1.5mL チューブ
- ヨードアセトアミド
- Trypsin gold, Mass Spectrometry Grade
- Protease MAX Surfactant
- リシルエンドペプチダーゼ (Lys-C)
- V8 protease
- フィルター (Ultrafree-MC-VV Centrifugal filters Durapore PVDF 0.1 $\mu$ m)
- マトリックス ( $\alpha$ -Cyano-4-hydroxycinnamic acid (4-CHCA))

### <操作>

- 1) サンプルに終濃度 10% TCA となるように 50% TCA を加える。
- 2) On ice で 15 分以上インキュベーションした後、15000 rpm で 10 分間遠心する。
- 3) 上清を除去し、氷冷したアセトンを加え、再度 15000 rpm で 10 分間遠心する。
- 4) 1) から 3) の操作を 2 回繰り返す。
- 5) 沈殿に少量の 8M Urea で沈殿を再溶解する。
- 6) 終濃度が 40  $\mu$ M となるようにヨードアセトアミドを添加し、室温暗所にて 30 分間インキュベーションする。
- 7)  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  buffer を加え、Urea の濃度が 1M 以下となるようにする。

- 8) Protease MAX Surfactant (1 $\mu$ g/ $\mu$ L) 2.5  $\mu$ L と Trypsin gold (1  $\mu$ g/ $\mu$ L) 5  $\mu$ L あるいは Lys-C (X  $\mu$ g/ $\mu$ L) を 10  $\mu$ L を加える。
- 9) 57°Cで 1 時間インキュベーションする。
- 10) 0.1%となるように TFA を加え、酵素反応を停止する。
- 11) 不溶物を除去するため、フィルターろ過する (15000rpm, 10min)。
- 12) DiNa Nano-flow LC system (KYA Technologies Corporation, Tokyo, Japan) に供し、MALDI プレートにマトリックスと共に直接スポットする。
- 13) Triple TOF 5800 System (AB SCIEX, USA)で m/z 800-4000 のペプチドを測定する。
- 20) MALDI-TOF/TOF MS による測定によって得られたデータは MASCOT generic format (.mgf) data file に変換した後、MASCOT software (Matrix Sciences, London, UK) により Swiss-Prot データベースを用いて解析した。解析パラメーターは以下に示す条件を使用した。

MS/MS	ions
Enzyme	trypsin or V8 protease
mass values	monoisotopic
number of possible missed cleavages	three
variable modification	carbamidomethylation (Cys), deamidation (Asp and Glu), oxidation (Met), cysteinylation (Cys), and homocysteinylation (Cys)
peptide mass tolerance,	50 ppm
fragment mass tolerance	0.3 Da

#### 8-6-5 ゼータ電位測定

##### < 準備 >

- 機器 : Malvern zetasizer nano ZS (使用 30 分前に主電源を入れる)
- タンパク質サンプル

10 mM PB (pH 7.4) を透析外液として用い、タンパク質を PB で 3 回透析した後、タンパク質濃度を 0.75 mg/mL に調製した。

- シリンジ
- 17G 針

➤ 測定用セル (Folded capillary cells)

<操作>

- 1) タンパク質溶液 17G の針を装着したシリンジで吸引する。
- 2) 針を外して、測定用セルにシリンジを取り付け、気泡が入らないようにサンプルを測定用セルに充填する。
- 3) Zeta Sizer Software を用い、測定には以下に示すパラメーターを使用した。3 階の測定の平均値をゼータ電位の値とした。

Measurement type	Zeta
Material	protein
Dispersant	Water
Temperature	25°C
Equivaration time	0 sec
Cell	Disporsable folded capillary cells (DTS1060)
Measurement Duration	Minimum Runs: 4, Maximum Runs: 8, Number of measurement: 3

#### 8-6-6 粒子径測定

<準備>

➤ 機器 : Malvern zetasizer nano ZS (使用 30 分前に主電源を入れる)

➤ タンパク質サンプル

10 mM PB (pH 7.4) を透析外液として用い、タンパク質を PB で 3 回透析した後、タンパク質濃度を 0.75 mg/mL に調製した。

➤ シリンジ

➤ 17G 針

➤ 測定用セル (Folded capillary cells)

<操作>

- 1) タンパク質溶液 17G の針を装着したシリンジで吸引する。
- 2) 針を外して、測定用セルにシリンジを取り付け、気泡が入らないようにサンプルを測



定用セルに充填する。

- 3) Malvern zetasizer nano ZS で測定を行った。解析パラメーターは以下に示す条件を使用した。
- 4) 測定には以下に示すパラメーターを使用した。一度の測定につき各 5 回の電荷を測定し、3 連で測定した平均値を粒子径とした。

Measurement type	size
Material	protein
Dispersant	Water
Temperature	25°C
Equivaration time	60 sec
Cell	Disporsable folded capillary cells (DTS1060)
Measurement scattering angle	173
Number of run	10
Run duration second	10
Number of measurement	5

## 8-6-7 分光光度計

### 血清アルブミンのリガンド結合能評価

#### <準備>

- 1 mM DNSA (binding siteI)
- 1 mM BD140 (binding siteII)

#### <操作>

- 1) 修飾タンパク質を 10 mM PB (pH7.4)で希釈し、10  $\mu$ M とした。
- 2) 最終濃度が 10  $\mu$ M DNSA、3  $\mu$ M BD140 となるように蛍光プローブをサンプルに添加し、室温遮光で 15 分間インキュベーションした。
- 3) マイクロプレートリーダーで蛍光スペクトルを測定した <sup>153</sup>。条件は以下の通り。

	励起波長 (nm)	蛍光波長 (nm)
DNSA	365	540-700
BD140	365	400-700

## タンパク質疎水性領域の評価

### <準備>

- FP-770 fluorometer (工学部・馬場研究室にて測定)
- bis-ANS

### <操作>

- 1) 修飾タンパク質を 10 mM PB (pH7.4) で希釈し、1.0  $\mu$ M とした。
- 2) 最終濃度が 10  $\mu$ M bis-ANS となるように蛍光プローブをサンプルに添加し、室温遮光で 15 分間インキュベーションした。
- 3) FP-770 fluorometer (Jasco) で 1 cm のセルを用いて励起波長 394 nm、蛍光波長 XXX-XXX nm の蛍光スペクトルを測定した。

## 8-6-8 生体分子相互作用解析

### 低分子チオールとタンパク質の相互作用の検討

#### <準備>

- EZ-Link™ NHS-PEG<sub>4</sub>-Biotin
  - rHSA
  - ホモシステインおよびホモシスチン
- PBS に溶解し、1 mM に調製した。

#### <操作>

ビオチン化 rHSA の作製

- 1) 2 mg の NHS-PEG<sub>4</sub>-Biotin を 170  $\mu$ L の MilliQ に溶解し、20 mM NHS-PEG<sub>4</sub>-Biotin stock solution を調製した。
- 2) 10 mg/mL rHSA 1000  $\mu$ L と 20 mM NHS-PEG<sub>4</sub>-Biotin 7.5  $\mu$ L を混合し、氷上で 2 時間インキュベーションした。
- 3) 1×PBS で透析した後、BCA 法によってタンパク定量を行い、タンパク質濃度を 5 mg/mL に調製した。
- 4) 作製したビオチン化血清アルブミンは 4°C にて保存した。

#### <測定>

ホモシステインおよびホモシスチンと HSA との相互作用を Octet RED system を使用して測定した。測定はプライムテックの瀬口氏に依頼した。条件は以下の通り。

機器	Octet RED system (Pall ForteBio Corp.)
ソフトウェア	Octet User Software (version 8.1)
Operating temperature	30 °C
センサーチップ	Super Streptavidin Biosensors tips (Pall ForteBio)
リガンド	biotinylated rHSA
アナライト (96well plate, 200 $\mu$ L)	ホモシステインあるいはホモシスチン

#### 8-6-9 フローサイトメトリー

##### <準備>

- 1.0mM NBD-cholesterol

##### <操作>

- 1) 6cm dish に 2 日後コンフルエントとなるように RAW264.7 細胞を播種する
- 2) FBS free DMEM で 2 回洗浄する
- 3) 1.0mM NBD-cholesterol / 2.5% FBS DMEM を 2ml / dish で 1 時間投与する
- 4) FBS free DMEM で 2 回洗浄した後、サンプルを 1 時間投与する
- 5) 1×PBS で 2 回洗浄の後、細胞を回収する
- 6) 1500rpm 3min 上清を捨てる
- 7) 4%ホルムアルデヒドを 500ml 加え、遮光して室温で 15 分間振とうする
- 8) 1500rpm 3min 上清を捨てる
- 9) 1×PBS を 700ml 加え、フィルターを通した後、フローサイトメトリーにより測定する

#### 8-7 生体サンプル

##### 8-7-1 ヒト血清サンプル

健康者ヒト血清(n=5)、高脂血症患者血清(n=15)は名古屋大学医学部附属病院の松下正先生、菊地良介先生からご提供いただいた。患者は総コレステロール >220 mg/dl、トリグリセリド >150 mg/dl、LDL >140 mg/dl 基準に基づいて脂質異常症を有すると判断した。提供していただいたサンプルは直ちに低吸着チューブに分注し、-80℃にて保存した。

### 8-7-2 CBS KO および CSE KO マウス血清サンプル

昭和薬科大学の石井功先生より、高ホモシステイン血症モデルマウスである cystathionine  $\beta$ -synthase (CBS)-knockout (CBS KO) マウス (homocystinuria (OMIN 236200))<sup>72</sup> および cystathionine  $\gamma$ -lyase (CSE)- knockout (CSE KO) マウス (cystathioninuria (OMIN 219500))<sup>73</sup> の 2 週齢の血清をご提供いただいた。

### 8-8 統計処理

#### TTEST (Student T 検定)

2 つの標本が平均値の等しい母集団から取り出されたものであるかどうかを予測する検定結果として帰無仮説 (実験者の予測に反する仮説( $\Leftrightarrow$ 対立仮説)) が棄却できる確率。対立のない両側検定(尾部 2、種類 3)で検定を行った。

- ・ 尾部            片側 : 1  
                    両側 : 2
- ・ 種類            対をなすデータ                    : 1 (データ数が違うと選択できない)  
                    分散の等しい 2 標本                    : 2  
                    分散の等しくない 2 標本                    : 3

- 片側検定 : 対立仮説が方向性を持つ(A は B より～である)
- 両側検定 : 対立仮説では方向性を問題としない(A と B に差がある)

グラフ上の表記    \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001



## 参考文献

## 参考文献

1. International Human Genome Sequencing Consortium, I. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* **431**, 931–45 (2004).
2. Jensen, O. N. Modification-specific proteomics: characterization of post-translational modifications by mass spectrometry. *Curr Opin Chem Biol* **8**, 33–41 (2004).
3. Ayoubi, T. A. & Van De Ven, W. J. Regulation of gene expression by alternative promoters. *FASEB J* **10**, 453–60 (1996).
4. Moellering, R. E. & Cravatt, B. F. Functional lysine modification by an intrinsically reactive primary glycolytic metabolite. *Science* **341**, 549–53 (2013).
5. Lusis, A. J. Atherosclerosis. *Nature* **407**, 233–41 (2000).
6. Ross, R. Atherosclerosis — An Inflammatory Disease. *N Engl J Med* **340**, 115–126 (1999).
7. Witztum, J. L. & Steinberg, D. Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *J Clin Invest* **88**, 1785–1792 (1991).
8. Cruz-Guilloty, F. & Perez, V. L. Molecular medicine: Defence against oxidative damage. *Nature* **478**, 42–3 (2011).
9. Jeppsson, J. O., Jerntorp, P., Sundkvist, G., Englund, H. & Nylund, V. Measurement of hemoglobin A1c by a new liquid-chromatographic assay: methodology, clinical utility, and relation to glucose tolerance evaluated. *Clin Chem* **32**, 1867–72 (1986).
10. 渡辺明治. 臨床アルブミン学. (1999).
11. 恵良聖一. マルチ機能タンパク質：血清アルブミン. (1996).
12. Cohn, E. J. & Strong, L. E. Preparation and properties of serum and plasma proteins; a system for the separation into fractions of the protein and lipoprotein components of biological tissues and fluids. *J Am Chem Soc* **68**, 459–475 (1946).
13. Meloun, B., Moravek, L. & Kostka, V. Complete amino acid sequence of human serum albumin. *FEBS Lett* **58**, 134–137 (1975).
14. He, X. M. & Carter, D. C. Atomic structure and chemistry of human serum albumin. *Nature* **358**, 209–215 (1992).
15. Brenner, D. a, Buck, M., Feitelberg, S. P. & Chojkier, M. Tumor necrosis factor- $\alpha$  inhibits albumin gene expression in a murine model of cachexia. *J Clin Invest* **85**, 248–255 (1990).
16. HJ, M. Fibrinogen and albumin synthesis are regulated at transcriptional level during the acute phase response. **950**, 450–454 (1988).
17. Curry, S. Atomic structure and chemistry of human serum albumin. *Biochim Biophys acta* **1441**, 131 (1999).
18. Colmenarejo, G. In silico prediction of drug-binding strengths to human serum albumin. *Med Res*

- Rev* **23**, 275–301 (2003).
19. Chen, J., Fitos, I. & Hage, D. S. Chromatographic analysis of allosteric effects between ibuprofen and benzodiazepines on human serum albumin. *Chirality* **18**, 24–36 (2006).
  20. Estrada, E., Uriarte, E., Molina, E., Simón-Manso, Y. & Milne, G. W. a. An integrated in silico analysis of drug-binding to human serum albumin. *J Chem Inf Model* **46**, 2709–2724 (2006).
  21. Chuang, Victor Tuan Giam, M. O. Stereoselective Binding of Human Serum Albumin. *Chirality* **18**, 159–166 (2006).
  22. Adachi, K. & Watarai, H. Binding behavior of subphthalocyanine-tagged testosterone with human serum albumin at the n-hexane/water interface. *Anal Chem* **78**, 6840–6846 (2006).
  23. Karnaukhova, E. Interactions of human serum albumin with retinoic acid, retinal and retinyl acetate. *Biochem Pharmacol* **73**, 901–910 (2007).
  24. Watanabe, H. *et al.* Role of arg-410 and tyr-411 in human serum albumin for ligand binding and esterase-like activity. *Biochem J* **349 Pt 3**, 813–819 (2000).
  25. Yang, F. *et al.* Effect of human serum albumin on drug metabolism: structural evidence of esterase activity of human serum albumin. *J Struct Biol* **157**, 348–55 (2007).
  26. Fitzpatrick, F. A. & Wynalda, M. A. Albumin-catalyzed metabolism of prostaglandin D2. Identification of products formed in vitro. *J Biol Chem* **258**, 11713–8 (1983).
  27. Fitzpatrick, F., Liggett, W. & Wynalda, M. Albumin-eicosanoid interactions. A model system to determine their attributes and inhibition. *J Biol Chem* **259**, 2722–2727 (1984).
  28. Shibata, T. *et al.* 15-deoxy-delta 12,14-prostaglandin J2. A prostaglandin D2 metabolite generated during inflammatory processes. *J Biol Chem* **277**, 10459–66 (2002).
  29. Carballal, S. *et al.* Sulfenic acid in human serum albumin. *Amino Acids* **32**, 543–551 (2007).
  30. Anraku, M. *et al.* Intravenous iron administration induces oxidation of serum albumin in hemodialysis patients. *Kidney Int* **66**, 841–8 (2004).
  31. Kawakami, A. *et al.* Identification and characterization of oxidized human serum albumin. A slight structural change impairs its ligand-binding and antioxidant functions. *FEBS J* **273**, 3346–57 (2006).
  32. Cha, M. K. & Kim, I. H. Glutathione-linked thiol peroxidase activity of human serum albumin: a possible antioxidant role of serum albumin in blood plasma. *Biochem Biophys Res Commun* **222**, 619–25 (1996).
  33. Oettl, K. & Marsche, G. *Redox state of human serum albumin in terms of cysteine-34 in health and disease. Methods in enzymology* **474**, (Elsevier Inc., 2010).
  34. Colombo, G. *et al.* Redox Albuminomics: Oxidized Albumin in Human Diseases. *Antioxid Redox Signal* **17**, 1515–1527 (2012).
  35. Turell, L., Botti, H., Carballal, S., Radi, R. & Alvarez, B. Sulfenic acid--a key intermediate in albumin thiol oxidation. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **877**, 3384–92 (2009).



36. Dockal, M. Conformational Transitions of the Three Recombinant Domains of Human Serum Albumin Depending on pH. *J Biol Chem* **275**, 3042–3050 (2000).
37. 山本尚三. 総説プロスタグランジン. (1994).
38. 山本尚三. 治療学. (1996).
39. 清水孝雄. 細胞工学. (1998).
40. 森田育雄、小野寺光江、室田誠逸. 細胞工学. (1998).
41. 横田知永子. 生化学. (1999).
42. 大石幸子. タンパク質 核酸 酵素. (2000).
43. Smith, W. L., Garavito, R. M. & DeWitt, D. L. Prostaglandin Endoperoxide H Synthases (Cyclooxygenases)-1 and -2. *J Biol Chem* **271**, 33157–33160 (1996).
44. Kamei, D. *et al.* Potential role of microsomal prostaglandin E synthase-1 in tumorigenesis. *J Biol Chem* **278**, 19396–405 (2003).
45. Fujimura, T., Ohta, T., Oyama, K., Miyashita, T. & Miwa, K. Role of cyclooxygenase-2 in the carcinogenesis of gastrointestinal tract cancers: a review and report of personal experience. *World J Gastroenterol* **12**, 1336–45 (2006).
46. Tanabe, T. & Tohnai, N. Cyclooxygenase isozymes and their gene structures and expression. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **68–69**, 95–114 (2002).
47. Dixon, D. A. Post-transcriptional Control of Cyclooxygenase-2 Gene Expression. THE ROLE OF THE 3'-UNTRANSLATED REGION. *J Biol Chem* **275**, 11750–11757 (2000).
48. Bidgood, M. J., Jamal, O. S., Cunningham, A. M., Brooks, P. M. & Scott, K. F. Type IIA Secretory Phospholipase A2 Up-Regulates Cyclooxygenase-2 and Amplifies Cytokine-Mediated Prostaglandin Production in Human Rheumatoid Synoviocytes. *J Immunol* **165**, 2790–2797 (2000).
49. O'Banion, M. K. COX-2 and Alzheimer's disease: potential roles in inflammation and neurodegeneration. *Expert Opin Investig Drugs* **8**, 1521–1536 (1999).
50. Prescott, S. M. & Fitzpatrick, F. A. Cyclooxygenase-2 and carcinogenesis. *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer* **1470**, M69–M78 (2000).
51. Oshima, M. *et al.* Suppression of Intestinal Polyposis in Apc $\Delta$ 716 Knockout Mice by Inhibition of Cyclooxygenase 2 (COX-2). *Cell* **87**, 803–809 (1996).
52. Nakatsugi, S. *et al.* Suppression of Intestinal Polyp Development by Nimesulide, a Selective Cyclooxygenase-2 Inhibitor, in Min Mice. *Cancer Sci* **88**, 1117–1120 (1997).
53. Jacoby, R. F. *et al.* Chemopreventive Efficacy of Combined Piroxicam and Difluoromethylornithine Treatment of Apc Mutant Min Mouse Adenomas, and Selective Toxicity against Apc Mutant Embryos. *Cancer Res* **60**, 1864–1870 (2000).
54. Dannenberg, A. J. & Zakim, D. Chemoprevention of colorectal cancer through inhibition of cyclooxygenase-2. *Semin Oncol* **26**, 499–504 (1999).

55. Sato, T., Takebayashi, S. & Kohchi, K. Increased subendothelial infiltration of the coronary arteries with monocytes/macrophages in patients with unstable angina Histological data on 14 autopsied patients. *Atherosclerosis* **68**, 191–197 (1987).
56. Munro, J. M. & Cotran, R. S. The pathogenesis of atherosclerosis: atherogenesis and inflammation. *Lab Invest* **58**, 249–61 (1988).
57. Ross, R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* **362**, 801–809 (1993).
58. Schönbeck, U., Sukhova, G. K., Graber, P., Coulter, S. & Libby, P. Augmented expression of cyclooxygenase-2 in human atherosclerotic lesions. *Am J Pathol* **155**, 1281–91 (1999).
59. Curry, S., Brick, P. & Franks, N. P. Fatty acid binding to human serum albumin: new insights from crystallographic studies. *Biochim Biophys Acta* **1441**, 131–140 (1999).
60. Baker, C. S. R. *et al.* Cyclooxygenase-2 Is Widely Expressed in Atherosclerotic Lesions Affecting Native and Transplanted Human Coronary Arteries and Colocalizes With Inducible Nitric Oxide Synthase and Nitrotyrosine Particularly in Macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **19**, 646–655 (1999).
61. Corcoran, M. L., Stetlerstevenson, W. G., Dewitt, D. L. & Wahl, L. M. Effect of Cholera Toxin and Pertussis Toxin on Prostaglandin-H Synthase-2, Prostaglandin E2, and Matrix Metalloproteinase Production by Human Monocytes. *Arch Biochem Biophys* **310**, 481–488 (1994).
62. Kumagai, T. *et al.* A lipid peroxidation-derived inflammatory mediator: identification of 4-hydroxy-2-nonenal as a potential inducer of cyclooxygenase-2 in macrophages. *J Biol Chem* **279**, 48389–96 (2004).
63. Cipollone, F., Rocca, B. & Patrono, C. Cyclooxygenase-2 expression and inhibition in atherothrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **24**, 246–55 (2004).
64. Murakami, M. *et al.* Regulation of prostaglandin E2 biosynthesis by inducible membrane-associated prostaglandin E2 synthase that acts in concert with cyclooxygenase-2. *J Biol Chem* **275**, 32783–92 (2000).
65. Straus, D. S. *et al.* 15-deoxy-delta 12,14-prostaglandin J2 inhibits multiple steps in the NF-kappa B signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 4844–9 (2000).
66. Rossi, A. *et al.* Anti-inflammatory cyclopentenone prostaglandins are direct inhibitors of IkappaB kinase. *Nature* **403**, 103–8 (2000).
67. Ricote, M., Li, A. C., Willson, T. M., Kelly, C. J. & Glass, C. K. The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nature* **391**, 79–82 (1998).
68. 厚生労働省. 平成26年（2014）患者調査の概況 平成27年12月.  
<http://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/kanja/14/dl> (2014).

69. Fanali, G. *et al.* Human serum albumin: from bench to bedside. *Mol Aspects Med* **33**, 209–90 (2012).
70. Asamoto, H., Ichibangase, T., Saimaru, H., Uchikura, K. & Imai, K. Existence of low-molecular-weight thiols in *Caenorhabditis elegans* demonstrated by HPLC-fluorescence detection utilizing 7-chloro-N-[2-(dimethylamino)ethyl]-2,1,3-benzoxadiazole-4-sulfonamide. *Biomed Chromatogr* **21**, 999–1004 (2007).
71. Masuda, M., Toriumi, C., Santa, T. & Imai, K. Fluorogenic derivatization reagents suitable for isolation and identification of cysteine-containing proteins utilizing high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Chem* **76**, 728–35 (2004).
72. Akahoshi, N. *et al.* Genetic background conversion ameliorates semi-lethality and permits behavioral analyses in cystathionine beta-synthase-deficient mice, an animal model for hyperhomocysteinemia. *Hum Mol Genet* **17**, 1994–2005 (2008).
73. Ishii, I. *et al.* Cystathionine gamma-Lyase-deficient mice require dietary cysteine to protect against acute lethal myopathy and oxidative injury. *J Biol Chem* **285**, 26358–68 (2010).
74. Sudlow, G., Birkett, D. J. & Wade, D. N. The characterization of two specific drug binding sites on human serum albumin. *Mol Pharmacol* **11**, 824–32 (1975).
75. Carter, D. C. & Ho, J. X. Structure of Serum Albumin. *Adv Protein Chem* **45**, 153–203 (1994).
76. Roche, M., Rondeau, P., Singh, N. R., Tarnus, E. & Bourdon, E. The antioxidant properties of serum albumin. *FEBS Lett* **582**, 1783–1787 (2008).
77. Ha, J. S. *et al.* Human serum albumin and its structural variants mediate cholesterol efflux from cultured endothelial cells. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* **1640**, 119–128 (2003).
78. Zhao, Y. & Marcel, Y. L. Serum albumin is a significant intermediate in cholesterol transfer between cells and lipoproteins. *Biochemistry* **35**, 7174–7180 (1996).
79. Sankaranarayanan, S. *et al.* Serum albumin acts as a shuttle to enhance cholesterol efflux from cells. *J Lipid Res* **54**, 671–6 (2013).
80. Wüstner, D. Fluorescent sterols as tools in membrane biophysics and cell biology. *Chem Phys Lipids* **146**, 1–25 (2007).
81. Ostašov, P. *et al.* FLIM studies of 22- and 25-NBD-cholesterol in living HEK293 cells: Plasma membrane change induced by cholesterol depletion. *Chem Phys Lipids* **167–168**, 62–69 (2013).
82. Zidovetzki, R. & Levitan, I. Use of cyclodextrins to manipulate plasma membrane cholesterol content: Evidence, misconceptions and control strategies. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* **1768**, 1311–1324 (2007).
83. van Meer, G. Lipid traffic in animal cells. *Annu Rev Cell Biol* **5**, 247–275 (1989).
84. S. J. Singer and Garth L. Nicolson. The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes. 720–731 (1972).
85. Brown, D. a & London, E. Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane

- rafts. *J Biol Chem* **275**, 17221–4 (2000).
86. Rothberg, K. G. *et al.* Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell* **68**, 673–682 (1992).
  87. Simons, K. & Ikonen, E. Functional rafts in cell membranes. *Nature* **387**, 569–572 (1997).
  88. Ohkubo, S. & Nakahata, N. Role of lipid rafts in trimeric G protein-mediated signal transduction. *Yakugaku Zasshi* **127**, 27–40 (2007).
  89. Simons, K. & Toomre, D. Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**, 31–39 (2000).
  90. Nakahata, N. & Ohkubo, S. Lipid rafts and their analytical methods. *Nippon yakurigaku zasshi Folia Pharmacol Jpn* **122**, 419–425 (2003).
  91. Stuermer, C. a *et al.* Glycosylphosphatidyl inositol-anchored proteins and fyn kinase assemble in noncaveolar plasma membrane microdomains defined by reggie-1 and -2. *Mol Biol Cell* **12**, 3031–3045 (2001).
  92. Pralle, a., Keller, P., Florin, E. L., Simons, K. & Hörber, J. K. H. Sphingolipid–Cholesterol Rafts Diffuse as Small Entities in the PlasmaMembrane of Mammalian Cells. *J Cell Biol* **148**, 997–1007 (2000).
  93. Macdonald, J. L. & Pike, L. J. A simplified method for the preparation of detergent-free lipid rafts. *J Lipid Res* **46**, 1061–1067 (2005).
  94. Bickel, P. E. *et al.* Flotillin and epidermal surface antigen define a new family of caveolae-associated integral membrane proteins. *J Biol Chem* **272**, 13793–13802 (1997).
  95. The Royal Society is collaborating with JSTOR to digitize, preserve, and extend access to Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences. ® www.jstor.org.
  96. Scaltriti, M. The Epidermal Growth Factor Receptor Pathway : A Model for T argeted Therapy. **12**, 5268–5273 (2006).
  97. Medina, M. Á., Urdiales, J. L. & Amores-Sánchez, M. I. Roles of homocysteine in cell metabolism. *Eur J Biochem* **268**, 3871–3882 (2001).
  98. Beaumont, V. *et al.* Hyperhomocyst(e)inemia, anti-estrogen antibodies and other risk factors for thrombosis in women on oral contraceptives. *Atherosclerosis* **94**, 147–152 (1992).
  99. Taylor, L. M., DeFrang, R. D., Harris, E. J. & Porter, J. M. The association of elevated plasma homocyst(e)ine with progression of symptomatic peripheral arterial disease. *J Vasc Surg* **13**, 128–136 (1991).
  100. Iversen, R., Andersen, P. A., Jensen, K. S., Winther, J. R. & Sigurskjold, B. W. Thiol–Disulfide Exchange between Glutaredoxin and Glutathione. *Biochemistry* **49**, 810–820 (2010).
  101. Sengupta, S. *et al.* Albumin thiolate anion is an intermediate in the formation of albumin-S-S-homocysteine. *J Biol Chem* **276**, 30111–30117 (2001).
  102. Rombouts, I. *et al.* Formation and reshuffling of disulfide bonds in bovine serum albumin

- demonstrated using tandem mass spectrometry with collision-induced and electron-transfer dissociation. *Sci Rep* **5**, 12210 (2015).
103. Hogg, P. J. Disulfide bonds as switches for protein function. *Trends Biochem Sci* **28**, 210–214 (2003).
  104. Cha, M.-K. & Kim, I.-H. Disulfide between Cys392 and Cys438 of human serum albumin is redox-active, which is responsible for the thioredoxin-supported lipid peroxidase activity. *Arch Biochem Biophys* **445**, 19–25 (2006).
  105. Smith, W. L. The eicosanoids and their biochemical mechanisms of action. *Biochem J* **259**, 315–24 (1989).
  106. Smith, W. L. Prostanoid biosynthesis and mechanisms of action. *Am J Physiol - Ren Physiol* **263**, (1992).
  107. SAKAI, K. Chemistry of Prostaglandin. *J Synth Org Chem Japan* **29**, 205–226 (1971).
  108. (編)室田誠. プロスタグランジンの生化学. (東京化学同人, 1982).
  109. Smith, W. L., Urade, Y. & Jakobsson, P.-J. Enzymes of the cyclooxygenase pathways of prostanoid biosynthesis. *Chem Rev* **111**, 5821–65 (2011).
  110. Ujihara, M. *et al.* Prostaglandin D2 formation and characterization of its synthetases in various tissues of adult rats. *Arch Biochem Biophys* **260**, 521–31 (1988).
  111. Urade, Y., Ujihara, M., Horiguchi, Y., Ikai, K. & Hayaishi, O. The major source of endogenous prostaglandin D2 production is likely antigen-presenting cells. Localization of glutathione-requiring prostaglandin D synthetase in histiocytes, dendritic, and Kupffer cells in various rat tissues. *J Immunol* **143**, 2982–9 (1989).
  112. Giles, H. & Leff, P. The biology and pharmacology of PGD2. *Prostaglandins* **35**, 277–300 (1988).
  113. Hayaishi, O. Molecular mechanisms of sleep-wake regulation: a role of prostaglandin D2. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* **355**, 275–280 (2000).
  114. Hirai, H. *et al.* Prostaglandin D2 selectively induces chemotaxis in T helper type 2 cells, eosinophils, and basophils via seven-transmembrane receptor CRTH2. *J Exp Med* **193**, 255–61 (2001).
  115. Boie, Y., Sawyer, N., Slipetz, D. M., Metters, K. M. & Abramovitz, M. Molecular cloning and characterization of the human prostanoid DP receptor. *J Biol Chem* **270**, 18910–6 (1995).
  116. 山本尚三. プロスタグランジン. (1994).
  117. Matsuoka, T. *et al.* Prostaglandin D2 as a mediator of allergic asthma. *Science* **287**, 2013–7 (2000).
  118. Tanaka, K. *et al.* Cutting edge: differential production of prostaglandin D2 by human helper T cell subsets. *J Immunol* **164**, 2277–80 (2000).
  119. Kikawa, Y., Narumiya, S., Fukushima, M., Wakatsuka, H. & Hayaishi, O. 9-Deoxy-delta 9, delta

- 12-13,14-dihydroprostaglandin D2, a metabolite of prostaglandin D2 formed in human plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 1317–21 (1984).
120. Fitzpatrick, F. A. & Waynald, M. A. Albumin-lipid interactions: prostaglandin stability as a probe for characterizing binding sites on vertebrate albumins. *Biochemistry* **20**, 6129–34 (1981).
  121. Yang, J., Petersen, C. E., Ha, C.-E. & Bhagavan, N. V. Structural insights into human serum albumin-mediated prostaglandin catalysis. *Protein Sci* **11**, 538–45 (2002).
  122. Yamaguchi, S. *et al.* Delta12-prostaglandin J2 as a product and ligand of human serum albumin: formation of an unusual covalent adduct at His146. *J Am Chem Soc* **132**, 824–32 (2010).
  123. Fukushima, M. Biological activities and mechanisms of action of PGJ2 and related compounds: an update. *Prostaglandins, Leukot Essent Fat Acids* **47**, 1–12 (1992).
  124. Forman, B. M. *et al.* 15-Deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR gamma. *Cell* **83**, 803–12 (1995).
  125. Kliewer, S. A. *et al.* A prostaglandin J2 metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor gamma and promotes adipocyte differentiation. *Cell* **83**, 813–9 (1995).
  126. Ricote, M. *et al.* Expression of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) in human atherosclerosis and regulation in macrophages by colony stimulating factors and oxidized low density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 7614–9 (1998).
  127. Cernuda-Morollón, E., Pineda-Molina, E., Cañada, F. J. & Pérez-Sala, D. 15-Deoxy-Delta 12,14-prostaglandin J2 inhibition of NF-kappaB-DNA binding through covalent modification of the p50 subunit. *J Biol Chem* **276**, 35530–6 (2001).
  128. Kondo, M. *et al.* 15-Deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J(2): the endogenous electrophile that induces neuronal apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 7367–72 (2002).
  129. Kondo, M., Oya-Ito, T., Kumagai, T., Osawa, T. & Uchida, K. Cyclopentenone Prostaglandins as Potential Inducers of Intracellular Oxidative Stress. *J Biol Chem* **276**, 12076–12083 (2001).
  130. Nagase, S., Shimamune, K. & Shumiya, S. Albumin-deficient rat mutant: an animal model for analbuminemia. *Jikken Dobutsu* **29**, 33–8 (1980).
  131. Nagase, S., Shimamune, K. & Shumiya, S. Albumin-deficient rat mutant. *Science* **205**, 590–1 (1979).
  132. X.Ho, D. C. C. in 153–203 (1994). doi:10.1016/S0065-3233(08)60640-3
  133. Bogdan, C., Rölinghoff, M. & Diefenbach, A. Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. *Curr Opin Immunol* **12**, 64–76 (2000).
  134. Fu, J. Y., Masferrer, J. L., Seibert, K., Raz, A. & Needleman, P. The induction and suppression of prostaglandin H2 synthase (cyclooxygenase) in human monocytes. *J Biol Chem* **265**, 16737–40 (1990).
  135. Gilroy, D. W. *et al.* Inducible cyclooxygenase may have anti-inflammatory properties. *Nat Med* **5**, 698–701 (1999).

136. Cuzzocrea, S. *et al.* The Cyclopentenone Prostaglandin 15-Deoxy- $\Delta$ 12,14-Prostaglandin J2 Attenuates the Development of Acute and Chronic Inflammation. *Mol Pharmacol* **61**, (2002).
137. Itoh, K. *et al.* Transcription factor Nrf2 regulates inflammation by mediating the effect of 15-deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin j(2). *Mol Cell Biol* **24**, 36–45 (2004).
138. Hagens, W. I. *et al.* Targeting 15d-prostaglandin J2 to hepatic stellate cells: two options evaluated. *Pharm Res* **24**, 566–74 (2007).
139. Jr., T. P. *All about albumin : biochemistry, genetics, and medical applications.* (Academic Press, 1996).
140. Kragh-Hansen, U. Structure and ligand binding properties of human serum albumin. *Dan Med Bull* **37**, 57–84 (1990).
141. Watanabe, T., Narumiya, S., Shimizu, T. & Hayaishi, O. Characterization of the biosynthetic pathway of prostaglandin D2 in human platelet-rich plasma. *J Biol Chem* **257**, 14847–53 (1982).
142. Adams, C. W. M., Virág, S., Morgan, R. S. & Orton, C. C. Dissociation of [3H]cholesterol and 125I-labelled plasma protein influx in normal and atheromatous rabbit aorta. *J Atheroscler Res* **8**, 679–696 (1968).
143. Menzoian, J. O., Haudenschild, C. C., Shipman, J. L. & Chobanian, A. V. Functional alteration of endothelium by short-term cholesterol feeding. *Exp Mol Pathol* **45**, 270–8 (1986).
144. Eddy, A. A. Interstitial nephritis induced by protein-overload proteinuria. *Am J Pathol* **135**, 719–33 (1989).
145. Wang, Y. *et al.* Induction of monocyte chemoattractant protein-1 in proximal tubule cells by urinary protein. *J Am Soc Nephrol* **8**, 1537–45 (1997).
146. Zoja, C. *et al.* Proximal tubular cell synthesis and secretion of endothelin-1 on challenge with albumin and other proteins. *Am J Kidney Dis* **26**, 934–41 (1995).
147. Chang, C. F., Chau, Y. P., Kung, H. N. & Lu, K. S. The lipopolysaccharide-induced pro-inflammatory response in RAW264.7 cells is attenuated by an unsaturated fatty acid-bovine serum albumin complex and enhanced by a saturated fatty acid-bovine serum albumin complex. *Inflamm Res* **61**, 151–60 (2012).
148. Roy, D. *et al.* Spectroscopic and docking studies of the binding of two stereoisomeric antioxidant catechins to serum albumins. *J Lumin* **132**, 1364–1375 (2012).
149. Aldini, G. *et al.* Mass spectrometric characterization of covalent modification of human serum albumin by 4-hydroxy-trans-2-nonenal. *J Mass Spectrom* **41**, 1149–1161 (2006).
150. Per Brunmark, †, § *et al.* Identification of Subdomain IB in Human Serum Albumin as a Major Binding Site for Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Epoxides. (1997). doi:10.1021/TX9700782
151. Lindh, C. H., Kristiansson, M. H., Berg-Andersson, U. A. & Cohen, A. S. Characterization of adducts formed between human serum albumin and the butadiene metabolite epoxybutanediol. *Rapid Commun Mass Spectrom* **19**, 2488–2496 (2005).

152. Yamaguchi, S. *et al.* Delta12-prostaglandin J2 as a product and ligand of human serum albumin: formation of an unusual covalent adduct at His146. *J Am Chem Soc* **132**, 824–32 (2010).
153. Er, J. C., Vendrell, M., Tang, M. K., Zhai, D. & Chang, Y.-T. Fluorescent Dye Cocktail for Multiplex Drug-Site Mapping on Human Serum Albumin. *ACS Comb Sci* **15**, 452–457 (2013).





## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、大変興味深いテーマを与えて頂き、終始丁寧かつ熱心な御指導・御鞭撻を賜りました内田浩二先生に深く感謝し、厚く御礼申し上げます。また、御指導・御助言だけでなく研究生活や研究に対する姿勢に至るまで、あらゆる面において大変親切に御指導いただきました柴田貴広先生に感謝申し上げます。また、実験に関する様々なアドバイスを頂きました吉武淳先生、事務や生活の面など日頃から常々助けていただきました本堂由紀様に心より御礼申し上げます。

ヒト血清サンプルをご提供頂きました名古屋大学医学部附属病院 医療技術部 臨床検査部門の松下 正教授、菊地良介先生に感謝申し上げます。CBS KO および CSE KO マウス血清をご提供頂きました昭和薬科大学の石井 功教授に感謝申し上げます。各種サンプルの測定をして頂いた University of Milan の Prof. Giancarlo Aldini、Vanderbilt University の Assoc. prof. Claus Schneider、Dr. Juan A. Giménez-Bastida に感謝申し上げます。本研究の基礎を進めていただいた食品機能化学研究室の OB・OG である金山 雅也 氏、山口 悟 氏、森下 望美 氏に深く感謝申し上げます。

壁にぶつかったときに親身に相談にのってくださったり、様々なアドバイスをしていただいた近澤未歩様、平野啓太さん、本多和也さん、宮下宙士さんに深く感謝いたします。同期として共に励まし合い、成長してきた伊藤美香さん、清水和真君さんに深く感謝いたします。また、心地よく楽しい研究室生活を支えてくれた犬塚恵美さん、畑佐行紀君、日沖裕介君、島山千弥さん、成瀬摩希子さん、廣瀬冴美さん、古橋麻衣さん、今堀夏奈美さん、神谷孝平君、下村沙也子さん、平出直哉くん、笹月仁詞君、長谷川加奈さんに深く感謝いたします。最後に、長年にわたる学生生活を温かく見守ってくれた家族、友人に心から感謝します。

2018 年 2 月