

申請者	学科名	栄養学科	職名	教授	氏名	高橋 吉孝
調査研究課題	慢性炎症性疾患の予防法ならびに治療薬の開発を目指す基礎研究					
調査研究組織	氏名	所属・職		専門分野	役割分担	
	代表	高橋 吉孝	教授	病態生化学	研究総括・酵素活性測定	
	分	川上 祐生	准教授	脂質生化学	クローニング、変異体作成	
	担	神崎 圭太	助教	食品生理学	動物実験、酵素免疫測定	
者	森 香子	博士後期課程保健福祉科学専攻・2年生		栄養学	組織染色、細胞培養実験	
調査研究実績の概要	<p>1. NASHの進行に関わる12-リポキシゲナーゼ分子種の同定</p> <p>非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH)は、生活習慣によって肝臓に脂肪が蓄積した単純性脂肪肝に、セカンドヒットとして酸化ストレスが加わることによって引き起こされると考えられている進行性の慢性炎症性肝疾患で、高率に肝硬変から肝臓癌に進行する予後の悪い疾患であるが、有効な治療法はまだ知られていない。リポキシゲナーゼは不飽和脂肪酸に酸素分子を添加して酸化ストレス物質である過酸化脂質を生成する酵素であり、国内外の研究によって本疾患への関わりが示唆されている。NASHの進行に関わるリポキシゲナーゼ分子種としては、これまで白血球型12-リポキシゲナーゼが着目され研究されてきたが、申請者らは昨年度までの研究で、NASHモデルマウスでコントロールと比較して、活性にばらつきはあるもののMCD食摂取により100倍以上に上昇する12-リポキシゲナーゼのアラキドン酸生成物として、12-ヒドロペルオキシ酸以外に、白血球型酵素の生成物に特徴的な15-ヒドロペルオキシ酸が含まれていないことを見出した。12-リポキシゲナーゼには白血球型のほかに、血小板型、皮膚型、ならびに生成物の立体特異性の異なる12R-リポキシゲナーゼが知られている。そこで、NASHモデルマウスで上昇する12-リポキシゲナーゼの分子種を同定する実験を実施した。</p> <p>メチオニン・コリン欠損食を与えて作成したNASHモデルマウスの肝臓から調整した可溶性画分とアラキドン酸を反応させて生成する12-ヒドロペルオキシ酸を還元したものを、光学異性体を分離できるキラルフェーズの高速液体クロマトグラフィーで分離し、標準品と移動度を比較したところ、生成物はS体 (12S-ヒドロキシ酸、12S-HETE) であることが判明した。そこで、S体を作る白血球型、血小板型、皮膚型のいずれであるのかを調べるため、白血球型あるいは血小板型12-リポキシゲナーゼに対する抗体をプロテインAセファロースに結合させ、NASHモデルマウスの肝臓から調整した可溶性画分と反応させて免疫沈降を行い、沈殿物と上清それぞれをアラキドン酸と反応させて酵素活性を調べたところ、8週目のNASHモデルマウスの肝臓から調整した可溶性画分において、抗血小板型12S-LOX抗体では抗体量に依存して沈殿で酵素活性が検出され、それに依って上清では酵素活性が低下した。抗白血球型12S-LOX抗体では酵素活性の免疫沈降は起こらなかった。なお、皮膚型酵素に関連して、cDNAを購入しFLAGタグをつけたものをプロモーター活性の高い発現ベクターに組みなおしてCOS-7で発現させたが、抗FLAGタグ抗体を用いたウエスタンブロットで発現が確認されたものの、活性は検出できなかった。皮膚型の酵素はturnover numberが極めて低いことが報告されており、今回の実験結果でもそれが再現できたため、MCD食投与開始後8週目のNASHモデルマウスの肝臓において活性が上昇している12-リポキシゲナーゼは血小板型であると結論した。今後は、活性上昇のタイムコースを調べるとともに、発現している細胞の同定を進める予定である。</p>					

<p>調査研究実績 の概要</p>	<p>2. ロイコトリエンに幅広く結合できる抗ロイコトリエンC₄単鎖抗体の変異体の作成</p> <p>これまでの国内外の研究で、各種ロイコトリエン(LT)が、慢性炎症性疾患の一つである肺線維症の進行に深く関与することが示されているが、申請者らがこれまでの研究で作成してきた抗LTC₄単鎖抗体は、各種LTの受容体への結合の阻害を介して、LTの作用を抑制することが証明されている。本計画では、これまでに有効な治療法が知られていない肺線維症の抗体治療薬開発を目指して各種LTにより幅広く結合できる抗LTC₄単鎖抗体の変異体の作成を試みるとともに、その基盤を確立する目的で得られた結果を基にしてさらにLT受容体の変異体を作成することにより、LTの特異的認識の分子の根拠を明らかにすることを目的として研究を進めた。</p> <p>これまでの研究で、X線結晶解析に基づき網羅的に作成した抗LTC₄単鎖抗体変異体の中でV_L上の特定のチロシン(Y)をトリプトファン(W)に変異させた部位特異的変異体において、酵素免疫測定法により、LTE₄への親和性が上昇することを示し、構造モデリングにより置換されたトリプトファン(W)とLTE₄との間に、新たな水素結合が形成されている可能性を示唆した。その後さらに、V_L上の特定のアスパラギン(N)をグルタミン(Q)あるいはチロシン(Y)に置換した部位特異的変異体においても、同様にLTE₄への結合親和性が上昇していることも明らかにした。そこで、これらの変異を組み合わせたダブルミュータントを作成し、酵素免疫測定法で各種LTに対する親和性を調べたところ、LTE₄への親和性がLTD₄への親和性を大きく上回っていることを見出した。これとは別に、私たちはこれまでの実験から、V_L上の特定のチロシン(Y)を、各種アミノ酸に置換した変異体において、LTC₄への親和性が大きく低下することを見出しており、このチロシン(Y)がLTC₄との親和性に大きく関与することを明らかにしている。そこで、先に作成したダブルミュータントに、このチロシン(Y)をフェニルアラニン(F)に置換したトリプルミュータントにおいては、LTE₄への結合特異性が上昇するのではないかと考え、このトリプルミュータントを酵母で発現し、各種LTとの結合親和性を酵素免疫測定法で調べた。その結果、このトリプルミュータントは、LTE₄への親和性がLTC₄ならびにLTD₄への親和性を上回り、LTE₄への親和性が最も高い単鎖抗体となっていることが確認できた。</p> <p>以上より、抗LTC₄単鎖抗体のわずか3つのアミノ酸を置換することにより、抗LTE₄単鎖抗体を作成することに成功した。今後は、構造モデリングならびに変異体のX線結晶解析等を行うことにより、この結合特異性の変化の分子の根拠の解明に向けて、さらなる研究を進めていく予定である。</p>
<p>成果資料目録</p>	<p>1. Kawakami Y, Kinoshita M, Mori Y, Okochi S, Hirano S, Shimoda I, Kanzaki K, Suzuki-Yamamoto T, Kimoto M, Sugahara M, Hori T, Saino H, Miyano Masashi, Yamamoto S, <u>Takahashi Y</u>. 2017 The Y54(L)W mutation of anti-leukotriene C₄ single-chain antibody increases affinity to leukotriene E₄. <i>J Biochem. (Tokyo)</i> 161(1):79-86.</p>