

研究紹介

リジン付加反応を利用したイソチオシアネート類の標的分子探索のための基礎的研究

中村 俊之
(農芸化学コース)

Fundamental study on identification of target molecule of isothiocyanates using stable conjugation with lysine residue

Toshiyuki Nakamura
(Course of Agrochemical Bioscience)

Isothiocyanates (ITCs) are contained as glucosinolates in cruciferous plants such as *Wasabia japonica* (wasabi) and broccoli. Numerous studies have shown that ITCs have beneficial effects in our body such as induction of detoxification enzymes and inhibitory effects on cancer cell growth. The biological activities of ITCs are considered to be triggered in the reaction of ITC with thiols to form an unstable thiocarbamoyl adduct. On the other hand, ITCs are also known to react with amino moieties stably under alkaline pH. However, the reaction of ITCs with amino moieties under physiological conditions has not been explored fully. Therefore, we investigated the reactivity of allyl ITC (AITC) with amino groups under neutral conditions. When AITC was incubated with bovine serum albumin (BSA) as a model protein in a phosphate buffer (pH 7.4), amino groups were decreased. In addition, AITC-modified N^ε-benzoyl-glycyl-L-lysine (BGK) with a N^ε-thiocarbamoyl linkage was detected by incubation of AITC and BGK in the buffer. To verify the transformation of ITC from predominant target 'thiol' to amine, synthetic AITC-modified N^ε-acetyl-L-cysteine (NAC) was incubated with BGK. The AITC-Lys adduct was generated in a time-dependent manner, while AITC-NAC adduct was degraded. Furthermore, AITC-Lys adduct was detected from the mixture of AITC-NAC and BSA using a novel anti-AITC-Lys monoclonal antibody. Thus, the adduct of ITC and Lys residue may be a useful tag for identification of ITC target molecules.

Key words : isothiocyanate, lysine, cysteine, reactivity

緒言

食品には、一次機能(栄養面での働き)、二次機能(嗜好面での働き)、三次機能(生体調節面での働き)といっ

た3つの機能がある。一次機能は、生命維持に必要な不可欠なエネルギー源や生体構成成分の供給源としての食品機能である。そして、食品(栄養素)をより美味しく摂取するために味や香りといった嗜好性を与える食品機能が二次機能であると定義されている。加えて、疾病を予防・改善する食品機能として1980年代に文部省(現・文部科学省)により三次機能が提唱された。その背景には、食生活の乱れ、喫煙、飲酒や運動不足などに伴う生活習慣病患者の増加が挙げられる。米国においては、生活習慣病の中でも最も多い死因である「がん」に対して、1990年にデザイナーフーズ計画、すなわち、フィトケミカルによるがん予防計画がスタートした。この十数年にわたる計画により、がん予防に有効と考えられる約40種の食品群が示された。その機能性食品群の中には、キャベツやブロッコリーといったアブラナ科の植物が含まれている。それらの有効性成分はイソチオシアネート(ITC)類であり、特徴的な官能基(NCS基)を有する。ITCは側鎖の違う百種以上もの類縁体が報告されており¹⁾、代表的なITCとして、わさびに含まれるallyl ITC(AITC)や6-methylsulfinylhexyl ITC(6MSITC)、洋からしに含まれるbenzyl ITC(BITC)、クレソンのphenethyl ITC(PEITC)、ブロッコリーのsulforaphane(SFN, 4-methylsulfinylbutyl ITC)などがある(Fig. 1)。これらITC類によるがん抑制効果は、解毒酵素の誘導やがん細胞の増殖抑制によることが示唆されている。最も広く知られているITCの機能性発現機構にKeap1-Nrf2システムがある。通常時、転写因子であるNrf2はKeap1の制御下でありプロテアソームによる分解を受ける。しかし、ITC存在下では、ITCのNCS基とKeap1のSH基が反応することでKeap1からNrf2が解離し、その解離したNrf2は核内へ移行し第二相薬物代謝酵素群を誘導する

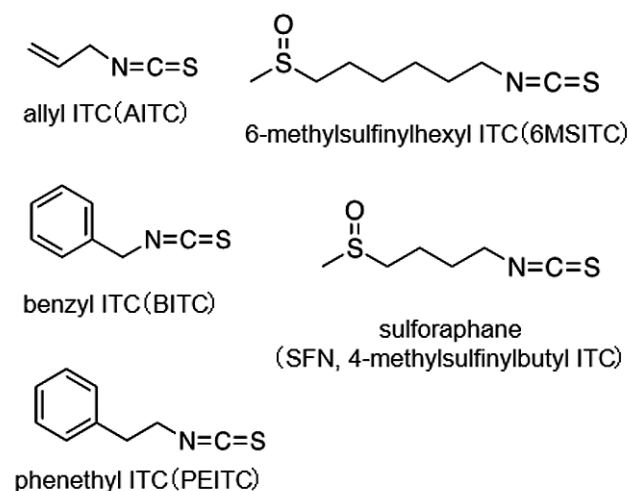


Fig. 1 Chemical structure of ITCs.

ことで生体防御として働くと考えられている^{2,3)}. ITC とタンパク質 SH 基の反応は, その他にも, BITC と tubulin の Cys 残基との反応⁴⁾や 6 MSITC と α -actin や Hsp 90 β など 5 種の分子中 Cys 残基との付加反応が報告されている⁵⁾. このように ITC は, 組織や細胞において SH 基に付加し生理活性を發揮していると考えられるが, SH 基との反応生成物は可逆的であり, かつ解毒酵素により速やかに代謝されるため, 上述したようにいくつかの付加タンパク質が報告されているものの, 標的分子同定は困難であると考えられる. 一方で, アミノ酸配列決定法である Edman 分解で示されている通り, ITC はアルカリ条件下で NH₂ 基と反応し安定な付加体を生じる. しかしながら, 生体条件下での ITC と NH₂ 基の化学的反応性については十分に検討されていなかった. そこで我々は, NH₂ 基との反応を指標に ITC 類の生理活性発現機序を解明することを目指し, 生体成分との直接的な化学的反応機構について解析を試みた. 具体的には, わさびの辛味成分である AITC を用い, 中性条件下で NH₂ 基と反応して付加体を生じているか検討を行った. この付加体が安定に存在する物質であれば, 生体内における ITC 反応の指標になると考えられ, 生理作用を誘導する最初のステップを明らかにすることも期待できる. 予備的な検討において, 核酸と ITC の反応性は低いことがわかっている. そこで, ターゲットをタンパク質に絞り, 種々の化学的・生化学的手法により修飾機構について検討を行った.

材料と方法

タンパク質中の遊離 NH₂ 基の測定と AITC 修飾 BSA のアミノ酸分析

AITC と bovine serum albumin (BSA) を 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) 中で 37°C, 24 時間反応させた. 遊離 NH₂ 基の定量として, AITC 処理 BSA と 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid sodium salt dihydrate (TNBS) を 1 時間反応し, 340 nm の吸光度を測定した. また, AITC により付加修飾されているアミノ酸を確認するため, AITC 修飾 BSA を peptidase および protease 処理し, liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) による測定を行った.

AITC 修飾 Lys の分析及び同定

タンパク質リジン残基のモデル物質として N^ε-benzoyl-glycyl-L-lysine (BGK) を用い, 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) 中で 37°C, 0-24 時間反応させ, HPLC により生成物を分析した. そして, 生成物を分取・精製し, LC-MS 及び proton nuclear magnetic resonance (¹H-NMR) により構造解析を行った.

AITC-Lys 付加体に対するモノクローナル抗体の作製およびキャラクタライズ

キャリアータンパク質として keyhole limpet hemocy-

anin (KLH) を用い, これと AITC の反応産物を免疫源とした. また, 抗体価の確認およびキャラクタライズのため, AITC 修飾 BSA も同様に作製した. 得られた免疫源 (AITC 修飾 KLH) を Balb/c マウスの腹腔にアジュバントとともに接種した. ELISA 法によりマウス血清中の抗体価を確認した. その後, 抗原との反応性の増加が認められなくなったところで, ポリエチレングリコールを用いてマウス脾臓細胞とミエローマ細胞を融合した. 得られた抗体は, サブクラスの決定後, ITC 修飾タンパク質, ITC-Lys 付加体および ITC 類縁体との反応性の確認を ELISA 法により行った.

AITC とタンパク質 Lys 残基との反応生成物の検出

AITC と glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) を 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) 中で 37°C, 24 時間反応させた. 反応液は, 電気泳動後, Western blotting を行い, 抗 AITC-Lys 抗体を用いてタンパク質中に AITC-Lys 付加体が生成されているか確認を行った. また, GAPDH 中の遊離 SH 基量を測定するため, 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) と GAPDH を 15 分間遮光しながら室温で反応させ, 反応液を 412 nm で測定した. 遊離 SH 基濃度はモル吸光係数 (14100 M⁻¹L⁻¹) より求めた.

SH 基から NH₂ 基への ITC の転移検討

AITC 修飾 N^ε-acetyl-L-cysteine (NAC) と BGK を 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) で 37°C, 0-24 時間反応させ, LC-MS(/MS) により AITC-BGK (407.0/308.0[M+H]⁺) および AITC-NAC (m/z 263.0[M+H]⁺) の経時変化を測定した. さらに, AITC-NAC と BSA を反応させ, タンパク質 Lys 残基と AITC の付加体の形成を確認した.

結果と考察

AITC のタンパク質への修飾を確認するため TNBS アッセイを行ったところ, AITC 濃度依存的に BSA 中の遊離 NH₂ 基が減少し, 20 mM の AITC 暴露により約 70% の NH₂ 基が減少した. そこで, どのアミノ酸が修飾されているか確認するため, AITC 処理 BSA を peptidase および protease により酵素的に加水分解し LC-MS/MS で分析した結果, AITC と Lys の付加体と考えられる物質が検出された. さらに, AITC により修飾された Lys の化学構造を確認するため, AITC と BGK を反応させ HPLC により測定した結果, AITC-BGK 付加体と思われる新規ピークが認められた (Fig. 2 A). このピークは, 中性条件下で時間依存的に増加し, 9 時間の反応により BGK の約 12% が付加体へと変化した. さらに, この付加体は 37°C で 1 週間保温反応しても安定に存在した. そこで, そのピークを HPLC にて分取・精製し, ¹H-NMR による構造解析を行った結果, AITC と Lys の ϵ -NH₂ 基が共有結合した N-チオカルバモイル構造体であることを同定した (Fig. 2 B).

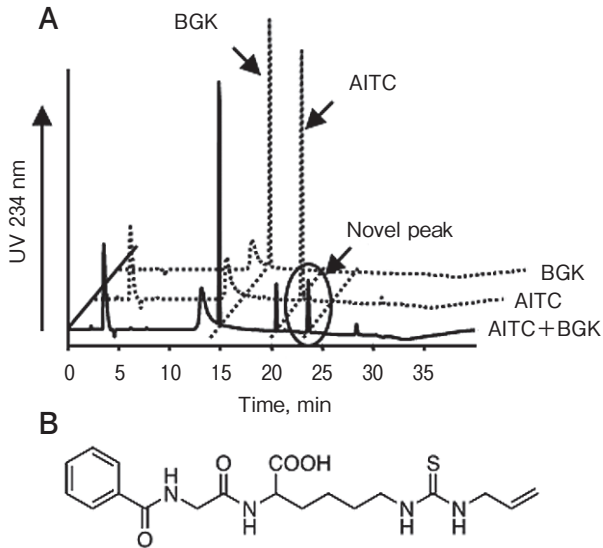


Fig. 2 (A) HPLC chart of reaction mixtures in the phosphate buffer. (B) Chemical structure of AITC-modified BGK. Reprinted with permission from Nakamura et al., *Chem. Res. Toxicol.*, 22, 536-542, 2009. Copyright 2009 American Chemical Society.

AITC-BSA 付加体の酵素処理から AITC-Lys の存在を確認したが、タンパク質を分解することなく ELISA や Western blotting により ITC-Lys 付加体を検出定量し、ITC のターゲットとなる特定のタンパク質の有無や組織における局在性を明らかにするため、AITC 修飾 KLH を免疫源とし新規モノクローナル抗体を作製した。得られた抗体は、未修飾の BSA とは反応せず、AITC-BSA を特異的に認識した。さらなる特異性解析を競争 ELISA 法により確認したところ、AITC-Lys 付加体のみと反応し、AITC の類縁体である allylamine, AITC-NAC, BGK いずれの低分子化合物とも反応しなかった (Fig. 3)。本抗体を用いて、GAPDH 中の Lys と AITC の付加反応を検討した。GAPDH には、ITC が優先的に反応すると考えられる SH 基が 1 分子に 4 つ存在する。このような条件下においても Lys との付加反応がなされるか検討した。その結果、約 1 μ M の AITC 処理により GAPDH 中の Lys と付加体を形成することが確認できた。用いた反応液中には DTNB 法により GAPDH に由来する約 10 μ M の遊離 SH 基が存在しており、それより低濃度の AITC 処理でも Lys 付加体が生成されることがわかった。

上述したように、ITC と SH 基との反応は不安定であるため、一度 SH 基と反応しても、再度遊離の ITC になると考えられる。実際に、ITC-SH 基付加体の ITC は生理条件下において遊離 SH 基があると容易に転移することが報告されている^{6,7)}。そこで、SH 基から NH₂ 基への AITC の転移を検討した。AITC-NAC 付加体を合成し

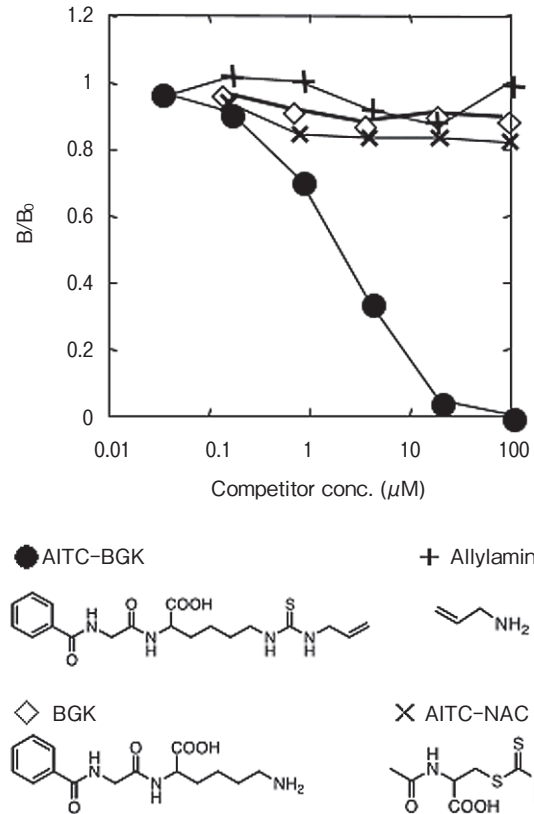


Fig. 3 Characterization of the antibody to AITC-Lys. Reprinted with permission from Nakamura et al., *Chem. Res. Toxicol.*, 22, 536-542, 2009. Copyright 2009 American Chemical Society.

BGK を中性条件で反応させたところ、AITC-NAC は 24 時間以内にほぼ消失し、新たに AITC-BGK が生成した (Fig. 4 A)。LC-MS/MS での定量により、24 時間で 150 nM の AITC-BGK が生じていた。さらに、AITC のタンパク質への転移を検討するため、AITC-NAC と BSA を中性条件下で反応させた。BSA 中の AITC-Lys 付加体を免疫化学的に検出したところ、AITC-NAC 濃度依存的に吸光度の増加が確認できた (Fig. 4 B)。従って、タンパク質分子においても低分子同様に SH 基から NH₂ 基への AITC の転移反応が起こることを明らかにした。以上より、ITC は優先的に Cys 残基と反応するものの、その反応は不安定であるため、解離した ITC が Cys 残基近傍の Lys 残基と反応し安定な付加体を形成すると考えた (Scheme 1)。すなわち、生体内において Lys 残基も ITC の標的である可能性を示唆した。実際に、AITC による TRPA 1 活性は N 末端側の Cys 残基と反応することによると示されているが、Cys 残基近傍の Lys 残基の関与も報告されている⁸⁾。また、PEITC がマクロファージ遊走阻止因子の N 末端 Pro 残基の NH 基と結合することでトートメラーゼ活性を抑制することが報告されて

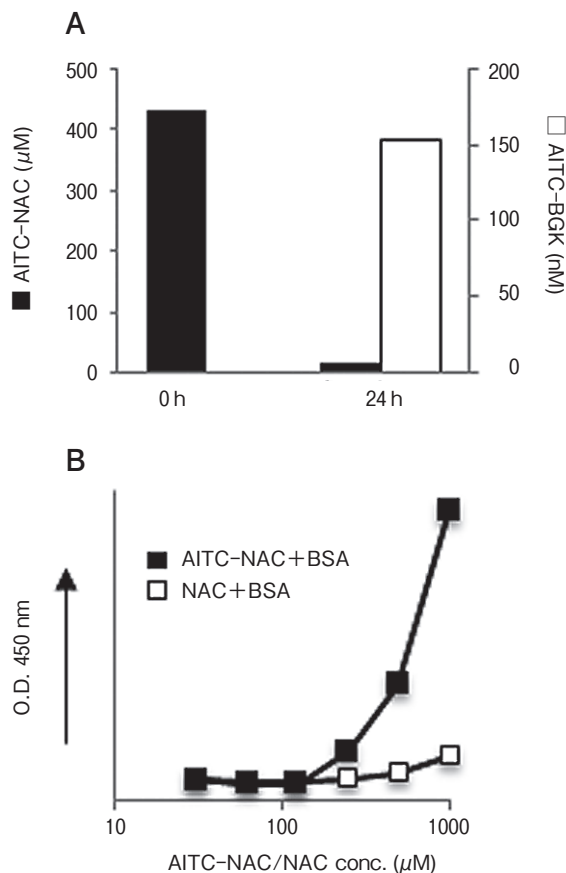


Fig. 4 (A) Formation of AITC-Lys during the incubation of AITC-Cys with Lys. (B) Generation of AITC-Lys during the incubation of AITC-NAC with BSA.

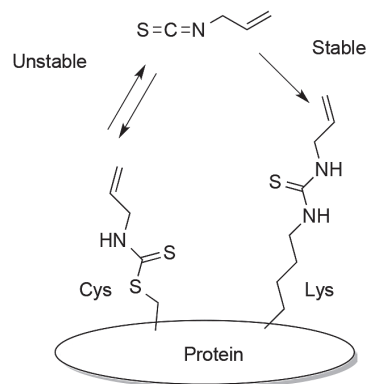
いる^{9,10}。さらには、ITC含有食品摂取後、血漿中タンパク質のLys残基とITCが付加体を形成していることが報告されている¹¹。Lys残基へのITC付加はタンパク質の構造や機能変化を引き起こす可能性があるため、ITCの生理活性に貢献している可能性が十分に考えられる。現在、NH₂基の反応を指標にITCの細胞内標的分子の同定を試みており、NH₂基付加の生理的意義を今後検討したいと考えている。

謝 辞

本研究を遂行するにあたりご指導いただきました加藤陽二教授(兵庫県立大学)に心より感謝いたします。

参 考 文 献

- 1) Fahey, J. W., A. T. Zalcman and P. Talalay : The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry*, **56**, 5-51 (2001)
- 2) Morimitsu, Y., Y. Nakagawa, H. Hayashi, H. Fujii, T. Kumagai, Y. Nakamura, T. Osawa, F. Horio, K. Itoh, K. Iida, M. Yamamoto and K. Uchida : A sulforaphane analogue that potently activates the Nrf2-dependent detoxification pathway.



Scheme 1 Plausible mechanism for the reaction of ITC with Cys or Lys.

- 3) Dinkova-Kostova, A. T., W. D. Holtzclaw, R. N. Cole, K. Itoh, N. Wakabayashi, Y. Katoh, M. Yamamoto and P. Talalay : Direct evidence that sulfhydryl groups of Keap1 are the sensors regulating induction of phase 2 enzymes that protect against carcinogens and oxidants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **99**, 11908-11913 (2002)
- 4) Mi, L., Z. Xiao, B. L. Hood, S. Dakshanamurthy, X. Wang, S. Govind, T. P. Conrads, T. D. Veenstra and F. L. Chung : Covalent binding to tubulin by isothiocyanates : a mechanism of cell growth arrest and apoptosis. *J. Biol. Chem.*, **283**, 22136-22146 (2008)
- 5) Shibata, T., Y. Kimura, A. Mukai, H. Mori, S. Ito, Y. Asaka, S. Oe, H. Tanaka, T. Takahashi and K. Uchida : Transthiocarbamylation of proteins by thiolated isothiocyanates. *J. Biol. Chem.*, **286**, 42150-42161 (2011)
- 6) Hong, F., M. L. Freeman and D. C. Liebler : Identification of sensor cysteines in human Keap 1 modified by the cancer chemopreventive agent sulforaphane. *Chem. Res. Toxicol.*, **18**, 1917-1926 (2005)
- 7) Kassahun, K., M. Davis, P. Hu, B. Martin and T. Baillie : Biotransformation of the naturally occurring isothiocyanate sulforaphane in the rat : identification of phase I metabolites and glutathione conjugates. *Chem. Res. Toxicol.*, **10**, 1228-1233 (1997)
- 8) Hinman, A., H. H. Chuang, D. M. Bautista and D. Julius : TRP channel activation by reversible covalent modification. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **103**, 19564-19568 (2006)
- 9) Cross, J. V., J. M. Rady, F. W. Foss, C. E. Lyons, T. L. Macdonald and D. J. Templeton : Nutrient isothiocyanates covalently modify and inhibit the inflammatory cytokine macrophage migration inhibitory factor (MIF). *Biochem. J.*, **423**, 315-321 (2009)
- 10) Brown, K. K., F. H. Blaikie, R. A. Smith, J. D. Tyndall, H. Lue, J. Bernhagen, C. C. Winterbourn and M. B. Hampton : Direct modification of the proinflammatory cytokine macrophage migration inhibitory factor by dietary isothiocyanates. *J. Biol. Chem.*, **284**, 32425-32433 (2009)
- 11) Kumar, A. and G. Sabbioni : New Biomarkers for Monitoring the Levels of Isothiocyanates in Humans *Chem. Res. Toxicol.*, **23**, 756-765 (2010)