

令和元年6月4日現在

機関番号：32624

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05107

研究課題名(和文) 心血管病危険因子ホモシステインの新規作用機序と活性イオウ分子シグナルとの関連解析

研究課題名(英文) Novel molecular mechanisms of actions of homocysteine, a risk factor of cardiovascular diseases

研究代表者

石井 功 (ISHII, Isao)

昭和薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：90292953

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：ホモシステインの血中濃度の上昇は心血管病の発症危険因子として広く知られているが、本研究は未だ不明なその作用機序の解明を目的としている。ホモシステインの標的分子と考えられるPPARalphaの構造解析を行い、また高ホモシステイン血症を示すcystathionine gamma-lyaseを欠損する母親マウスに見られるoxytocinシグナル(射乳及び母性行動)の異常を見いだした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高脂血症薬の標的分子であるPPARalphaの構造を解明したことは、同分子を標的とする創薬に貢献できる。また、ホモシステインの作用機序の解明は、心血管病発症進展予防に寄与すると期待される。

研究成果の概要(英文)：Elevated plasma levels of homocysteine are considered as a risk factor for cardiovascular diseases and this study aims to reveal yet unknown underlying molecular mechanisms. Here we investigated the structure of PPARalpha, a candidate of homocysteine target, and found the failure of oxytocin signaling (milk ejection and maternal behavior) in mice lacking cystathionine gamma-lyase that display homocysteinemia.

研究分野：代謝生化学

キーワード：ホモシステイン 病 高脂血症 PPARalpha オキシトシン X線結晶構造解析 硫化水素 活性イオウ分子種 心血管

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

Homocysteine(Hcy)は、哺乳動物が必須アミノ酸の Met から Cys を生合成する際の必須中間代謝物で生体に普通に存在する含硫アミノ酸であるが、その血中濃度上昇は三大死因の二つを占める心筋梗塞や脳卒中など心血管病の発症危険因子として認識されている。しかし、その作用機序は未だ不明である。

## 2. 研究の目的

我々は、遺伝病ホモシスチン尿症(高 Hcy 血症)のモデルである CBS 欠損マウスとその下流酵素 CTH の欠損マウス(シスタチオン尿症モデル)を用いてその解明を目指してきた。これまで、CBS 欠損マウスの脂質代謝異常、脳血管障害、中性アミノ酸尿、一見正常な CTH 欠損マウスの Cys 欠乏、Met 過剰、高脂肪食、有機水銀、アセトアミノフェン肝障害に対する脆弱性等を報告してきた。またランゲンドルフ灌流心を用いた実験で、CBS あるいは CTH が産生する H<sub>2</sub>S あるいは活性イオウ分子種(Reactive sulfur species:RSS)が虚血再灌流障害から心機能を保護すること、さらに CBS/CTH 欠損マウスだけでなく Met 過剰餌を与え高 Hcy 血症を誘導した野生型マウスでも H<sub>2</sub>S ドナーによる保護効果が消失することを見出した。一方で 2D DIGE を用いる網羅的 Proteome 解析系を立ち上げ、CBS 欠損マウス脂肪肝と野生型マウス正常肝を比較し、主に PPAR $\alpha$ により発現が制御されるタンパク質の発現変化を見出した。本研究はこれら新知見を詳細に検証し、「Hcy(新規)作用機序」として提案することを目的とした。

## 3. 研究の方法

多種類の実験を行ったが、主なものを列挙する。

- (1) CBS 欠損マウスの肝臓で、PPAR $\alpha$ シグナルの減退を見いだした。そして、Hcy が *in vitro* 実験系で PPAR $\alpha$ の活性化を直接阻害することを見いだした(いずれも未発表)。その現象の構造生物学的理解のために、PPAR $\alpha$ とリガンドの共結晶を作製しX線結晶構造解析を行った。その過程でこれまで報告されていなかった PPAR $\alpha$ と各種リガンドの構造解析に成功し、その活性化における新規の知見を得た。
- (2) 絶食飢餓により肝臓において PPAR $\alpha$ が活性化し脂質代謝を統括制御することが知られているが、他の臓器における役割は解っていない。そこで絶食したマウスの他臓器(腎臓、胸腺、脾臓、脳、精巣)におけるタンパク質発現を飽食マウスと比較し、その制御因子を探索した。
- (3) CBS や CTH とともに、H<sub>2</sub>S/RSS の産生に関わる酵素 MPST の遺伝子欠損マウスを新規に作成した。
- (4) CTH 欠損マウスの母親に見られる育児不良の原因を調査した。また、中枢異常を示す CBS 欠損マウスの脳脊髄液のアミノ酸組成を調べた。
- (5) CBS や CTH が関与すると考えられているセレノメチオニンの代謝系を調べるために、セレノ欠乏餌及びセレノメチオニン過剰餌の投与実験を行った。

## 4. 研究成果

- (1) PPAR $\alpha$ と各種リガンドの高解像度結晶構造解析により多くの知見を得たが、論文発表前であり、その詳細記載は控える。
- (2) 絶食後のマウスの6臓器(肝臓、腎臓、胸腺、脾臓、脳、精巣)におけるタンパク質発現

を飽食マウスの対象臓器と 2D DIGE プロテオーム解析により比較し、その制御因子候補をリストアップした (Kamata et al, FEBS Open Bio 誌発表)。

- (3) CRISPR/Cas-9 法により 3 系統の Mps1 欠損マウスを新規作成した。Mps1 酵素の完全欠損を確認し、現在その表現型を解析している。
- (4) CTH 欠損マウスの母親に見られる育児不良の原因として、オキシトシンシグナルの低下による射乳不全、そして哺乳養育活動の低下が考えられることを明らかにした (Akahoshi et al, 投稿中)。また CBS 欠損マウス及び CTH 欠損マウスの脳脊髄液中の異常なアミノ酸プロファイルを明らかにした (Akahoshi et al, Biol. Pharm. Bull. 誌発表)。
- (5) 野生型マウスを用いて、セレン欠乏時及びセレノメチオニン過剰餌における各種セレンタンパク質の発現変化を調べた (Akahoshi et al, J. Nutr. Biochem. 誌発表)。そして次に CTH 欠損マウスを用いて、その変化を野生型マウスと比較した (未発表)。

## 5 . 主な発表論文等

[ 雑誌論文 ] ( 計 17 件 )

N. Akahoshi, A. Yokoyama, T. Nagata, A. Miura, S. Kamata, **I. Ishii**. Abnormal amino acid profiles of blood and cerebrospinal fluid from cystathionine  $\beta$ -synthase-deficient mice, an animal model of homocystinuria. **Biol. Pharm. Bull.** 42 (2019) 1054–1057. 査読有

N. Akahoshi, Y. Anan, Y. Hashimoto, N. Tokoro, R. Mizuno, S. Hayashi, S. Yamamoto, K.I. Shimada, S. Kamata, **I. Ishii**. Dietary selenium deficiency or selenomethionine excess drastically alters organ selenium contents without altering the expression of most selenoproteins in mice. **J. Nutr. Biochem.** 69 (2019) 120–129. 査読有

K. Borowczyk, J. Wroblewski, J. Suliburska, N. Akahoshi, **I. Ishii**, H. Jakubowski. Mutations in homocysteine metabolism genes increase keratin N-homocysteinylolation and damage in mice. **Int. J. Genomics** 2018 (2018) 7570850. 査読有

S. Kamata, J. Yamamoto, H. Ohtani, Y. Tosaka, S. Yoshikawa, N. Akahoshi, **I. Ishii**. 2D DIGE proteomic analysis reveals fasting-induced protein remodeling through organ-specific transcription factor(s) in mice. **FEBS Open Bio** 8 (2018) 1524–1543. 査読有

I.A. Szijarto, L. Marko, M.R. Filipovic, J.L. Miljkovic, C. Tabeling, D. Tsvetkov, N. Wang, L.A. Rabelo, M. Witzernath, A. Diedrich, J. Tank, N. Akahoshi, S. Kamata, **I. Ishii**, M. Gollasch. Cystathionine gamma-lyase-produced hydrogen sulfide controls endothelial NO bioavailability and blood pressure. **Hypertension** 71 (2018) 1210–1217. 査読有

F. Nakashima, T. Shibata, K. Kamiya, J. Yoshitake, R. Kikuchi, T. Matsushita, **I. Ishii**, J.A. Gimenez-Bastida, C. Schneider, K. Uchida. Structural and functional insights into S-thiolation of human serum albumins. **Sci. Rep.** 8 (2018) 932. 査読有

M. Castelblanco, J. Lugin, D. Ehirchiou, S. Nasi, **I. Ishii**, A. So, F. Martinon, N. Busso. Hydrogen sulfide inhibits the NLRP3 inflammasome and reduces cytokine production both in vitro and in a mouse model of inflammation. **J. Biol. Chem.** 293 (2018) 2546–2557. 査読有

M. Akiyama, Y. Shinkai, T. Unoki, I. Shim, **I. Ishii**, Y. Kumagai. The capture of cadmium by reactive polysulfides attenuates cadmium-induced adaptive responses and hepatotoxicity, **Chem. Res. Toxicol.** 30 (2017) 2209–2217. 査読有

S. Kamata, **I. Ishii**. Rapid 2D DIGE proteomic analysis of mouse liver. **Methods Mol. Biol.** 1664

(2018) 153–166. 査読有

S.J. Han, M.R. Noh, J.M. Jung, **I. Ishii**, J. Yoo, J.I. Kim, K.M. Park. Hydrogen sulfide-producing cystathionine gamma-lyase is critical in the progression of kidney fibrosis. **Free Radic. Biol. Med.** 112 (2017) 423–432. 査読有

N. Takahashi, F.Y. Wei, S. Watanabe, M. Hirayama, Y. Ohuchi, A. Fujimura, T. Kaitsuka, **I. Ishii**, T. Sawa, H. Nakayama, T. Akaike, K. Tomizawa. Reactive sulfur species regulate tRNA methylthiolation and contribute to insulin secretion. **Nucleic Acids Res.** 45 (2017) 435–445. 査読有

R.R. Gaddam, R. Fraser, A. Badieli, S. Chambers, V.C. Cogger, D.G. Le Couteur, **I. Ishii**, M. Bhatia. Cystathionine-gamma-lyase gene deletion protects mice against inflammation and liver sieve injury following polymicrobial sepsis. **PLoS one** 11 (2016) e0160521. 査読有

S. Sarkar, Y.S. Ha, N. Soni, G.I. An, W. Lee, M.H. Kim, P.T. Huynh, H. Ahn, N. Bhatt, Y.J. Lee, J.Y. Kim, K.M. Park, **I. Ishii**, S.G. Kang, J. Yoo. Immobilization of the gas signaling molecule H<sub>2</sub>S by radioisotopes: detection, quantification, and in vivo imaging. **Angew. Chem. Int. Ed. Engl.** 55 (2016) 9365–9370. 査読有

L. Marko, I.A. Szijarto, M.R. Filipovic, M. Kassmann, A. Balogh, J.K. Park, L. Przybyl, G. N'Diaye, S. Kramer, J. Anders, **I. Ishii**, D.N. Muller, M. Gollasch. Role of cystathionine gamma-lyase in immediate renal impairment and inflammatory response in acute ischemic kidney injury. **Sci. Rep.** 6 (2016) 27517. 査読有

Y. Kitada, K. Kajita, K. Taguchi, I. Mori, M. Yamauchi, T. Ikeda, M. Kawashima, M. Asano, T. Kajita, T. Ishizuka, Y. Banno, I. Kojima, J. Chun, S. Kamata, **I. Ishii**, H. Morita. Blockade of sphingosine 1-phosphate receptor 2 signaling attenuates high-fat diet-induced adipocyte hypertrophy and systemic glucose intolerance in mice. **Endocrinology** 157 (2016) 1839–1851. 査読有

R. Wedmann, C. Onderka, S. Wei, I.A. Szijarto, J.L. Miljkovic, A. Mitrovic, M. Lange, S. Savitsky, P.K. Yadav, R. Torregrossa, E.G. Harrer, T. Harrer, **I. Ishii**, M. Gollasch, M.E. Wood, E. Galardon, M. Xian, M. Whiteman, R. Banerjee, M.R. Filipovic. Improved tag-switch method reveals that thioredoxin acts as depersulfidase and controls the intracellular levels of protein persulfidation. **Chem. Sci.** 7 (2016) 3414–3426. 査読有

D.J. Klionsky, **I. Ishii**, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). **Autophagy** 12 (2016) 1–222. 査読有

[学会発表](計 15 件)

嶋田貴一、赤星軌征、阿南弥寿美、橋本柚里、所夏未、水野涼華、林聖也、山本真吾、鎌田祥太郎、**石井功**：セレン欠乏時及び過剰時におけるマウス主要臓器 Se 含量とセレンタンパク質発現 日本薬学会第 139 年会(千葉市) 平成 31 年 3 月

竹本麟太郎、宮下雅嗣、吉澤俊紀、赤星軌征、**石井功**：適応免疫応答における Cystathionine  $\gamma$ -lyase 欠損の影響 第 91 回日本生化学会大会(京都府) 平成 30 年 9 月

藤波紘平、阿南弥寿美、橋本柚里、赤星軌征、**石井功**：食餌性セレノメチオニンの体内蓄積におけるイオウ転移経路(transsulfuration)の役割 第 62 回日本薬学会関東支部会(東京都) 平成 30 年 9 月

本多彰宏、石川諒、山本ゆめ、鎌田祥太郎、**石井功**：各種リガンド結合核内受容体 PPAR $\alpha$  の CD 測定法による熱安定性評価 第 62 回日本薬学会関東支部会(東京都) 平成 30 年 9 月

阿南弥寿美、藤波紘平、橋本柚里、赤星軌征、**石井功**：食餌性過剰セレノメチオニンのマ

ウス体内分布及び代謝におけるイオウ転移酵素 Cystathionine  $\gamma$ -lyase の重要な役割 第 29

回日本微量元素学会学術集会（名古屋市）平成 30 年 7 月

鎌田祥太郎、山本ゆめ、須田圭介、斎藤健太、赤星軌征、大山沢次、**石井功**：PPAR $\alpha$ リガ  
ンド/PPAR $\alpha$ -LBD 複合体の X 線結晶構造解析 第 17 回生命科学研究会（東京都）平成 30  
年 6 月

**Isao Ishii**, Noriyuki Akahoshi, Shotaro Kamata, Yuri Hashimoto, Seiya Hayashi, Natsumi Tokoro,  
Shingo Yamamoto, Ki-ichi Shimada, Yasumi Anan: Selenoprotein profiling in various organs of  
mice fed with selenium-deficient and high-selenomethionine diets. *Experimental Biology* 2018  
(San Diego, USA)、平成 30 年 4 月

横山輝、赤星軌征、**石井功**：二系統の高ホモシステイン血症マウスにおける脳脊髄液アミ  
ノ酸組成異常 日本薬学会第 138 年会（金沢市）平成 30 年 3 月

赤星軌征、半田博紀、横山輝、**石井功**：Cystathionine  $\gamma$ -lyase 欠損母マウスにおける授乳行  
動異常 日本薬学会第 138 年会（金沢市）平成 30 年 3 月

**Isao Ishii**: Novel targets of homocysteine, an independent risk factor for cardiovascular disease.  
2017 Fall International Convention of The Pharmaceutical Society of Korea (Seoul,  
Korea) 平成 29 年 10 月

半田博紀、横山輝、赤星軌征、**石井功**：Cystathionine  $\gamma$ -lyase 欠損マウスにおける乳清アミ  
ノ酸成分の異常 フォーラム 2017 衛生薬学・環境トキシコロジー（仙台市）平成 29 年  
9 月

赤星軌征、半田博紀、**石井功**：Cystathionine  $\gamma$ -lyase 欠損マウスにおける妊娠高血圧症候群  
フォーラム 2017 衛生薬学・環境トキシコロジー（仙台市）平成 29 年 9 月

Shotaro Kamata, Junya Yamamoto, Kenta Kamijo, Takahito Ochiai, Tamako Morita, Yurika  
Yoshitomi, Yoshifumi Hagiya, Masashi Kubota, Rika Ohkubo, Katsuhito Karube, Tadashi Kasahara,  
**Isao Ishii**: Dietary deprivation of each amino acid induces differential systemic adaptive responses  
in mice. The 9<sup>th</sup> International Conference on the Biology, Chemistry, and Therapeutic Applications  
of NO（仙台市）平成 28 年 5 月

**Isao Ishii**: Possible roles of H<sub>2</sub>S/RSS and homocysteine in the redox signaling via electrophiles.  
The 9<sup>th</sup> International Conference on the Biology, Chemistry, and Therapeutic Applications of NO  
（仙台市）平成 28 年 5 月

Shotaro Kamata, Junya Yamamoto, Katsuhiko Karube, Rika Ohkubo, Tadashi Kasahara, **Isao Ishii**:  
Dietary deprivation of each amino acid induces differential systemic adaptive responses in mice.  
*Experimental Biology* 2016 (San Diego, USA) 平成 28 年 4 月

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.shoyaku.ac.jp/research/laboratory/eisei/teacher/50>

## 6 . 研究組織

[1]研究代表者

石井 功 (ISHII, Isao)

昭和薬科大学・薬学部・教授

研究者番号:90292953

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。