

平成 30 年 6 月 17 日現在

機関番号：24403

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K13089

研究課題名(和文) ヒスチジンおよびイミダゾールジペプチドのレドックスメタボロミクス解析

研究課題名(英文) Redox-metabolomic analysis of histidine and imidazole dipeptides

研究代表者

居原 秀 (Ihara, Hideshi)

大阪府立大学・理学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：60254447

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ヒスチジン、イミダゾールジペプチド(IDPs)のレドックス代謝物の探索を行うことを目的とし、LC-ESI-MS/MSを用いて、レドックス代謝物の検出を試みた。その結果、2-オキソIDPsを世界に先駆けて定量的に同定した。2-オキソIDPsは、酸化ストレスが関連している敗血症性脳炎モデルマウスの脳において、レベルが上昇していた。カルノシン合成酵素を恒常的に過剰発現した神経芽腫細胞SH-SY5Yは、過酸化水素誘発性細胞毒性に対して耐性を示した。反応機構解析より、ラジカル中間体を経て、モノオキシゲネーション反応により、2-オキソIDPsが産生されることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Imidazole-containing dipeptides (IDPs), such as carnosine and anserine, show antioxidant activity. However, the underlying mechanisms that could fully explain the antioxidant effects of IDPs remain obscure. We identified 2-oxo-imidazole-containing dipeptides (2-oxo-IDPs) by the LC-ESI-MS/MS analysis. 2-Oxo-IDPs were ubiquitously detected in all mouse tissues examined. Enhanced production of 2-oxo-IDPs was seen in the brain of a mouse model of sepsis-associated encephalopathy. In SH-SY5Y human neuroblastoma cells stably expressing carnosine synthase, H₂O₂ exposure resulted in the intracellular production of 2-oxo-carnosine, which was associated with significant inhibition of H₂O₂ cytotoxicity. Mechanistic studies showed that mono-oxygenation of IDPs was mediated through the formation of a histidyl imidazole radical, followed by the addition of molecular oxygen.

研究分野：神経化学、レドックスバイオロジー

キーワード：レドックスメタボロミクス メタボローム解析 イミダゾールジペプチド 2-オキソ-イミダゾール

1. 研究開始当初の背景

近年、活性酸素種 (ROS) や活性窒素酸化物種 (RNS) が単なる毒性因子ではなく、シグナル分子としても機能していることが明らかになっている。ROS/RNS は、アミノ酸、核酸、脂質などと反応し、二次メッセンジャーに変換され、シグナル分子として機能する。応募者は、質量分析装置 (LC-ESI-MS/MS) を用いて ROS/RNS シグナルの二次メッセンジャーとして 8-ニトロ-cGMP を発見し、システイン SH 基に過剰なイオウが付加したシステインパースルフィドと反応しチオ型 (8-メルカプト-cGMP) に代謝されること、またシステインとの付加体を形成すること (S-グアニル化) を示した (Nature Chem Biol., 2007, 2012, PNAS, 2014) (図 1)。

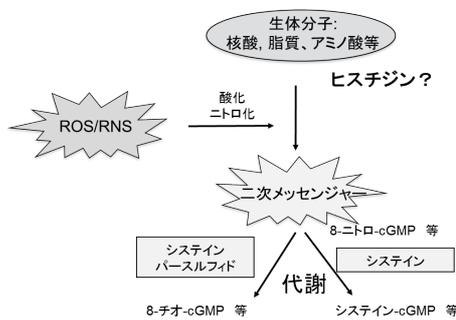


図 1 ROS/RNSシグナル機構の概要

これまでに、ROS、RNS の受容分子として核酸、脂質、アミノ酸 (主にシステイン) が知られていたが、他の受容分子に関する知見は十分に得られていない。連携研究者の内田は、ヒスチジンのイミダゾール基の 2 位炭素が酸化された 2-オキソ-ヒスチジンが試験管内酸化反応により生成されることを発見しており (BBRC 1986, 138, 659-65)、ヒスチジンが ROS/RNS シグナルの二次シグナルになる可能性を示している。また、化学合成的にヒスチジンは、イミダゾール基 2 位に、イオウやシステインが付加され、2-チオヒスチジン、2-システニル-ヒスチジンなどに変換されることが報告されている (J. Org. Chem. 1985, 50, 3636-38)。生体内でヒスチジンは、遊離型やカルノシン、アンセリン、ホモカルノシンなどのイミダゾールジペプチド (IDPs) で存在しているが、これらのレドックス代謝物の存在様式は不明である。

応募者は、LC-ESI-MS/MS を用いた予備的検討によりいくつかのヒスチジンレドックス代謝物の検出に成功していた。そこで、本研究課題では、LC-ESI-MS/MS を用いたヒスチジンおよび IDPs のレドックス代謝物の生体内存在様式を、網羅的かつ定量的に解析する方法を確立することを目的とした。

2. 研究の目的

ヒスチジンおよび IDPs のレドックス代謝物を解析するために、標準物質および安定同位体化合物の調製、LC-ESI-MS/MS を用いた多重反応モニタリング法の条件設定を行い、様々な生体サンプル中のヒスチジン-レドックス代謝物を網羅的かつ定量的に解析する。

3. 研究の方法

ヒスチジン (または 1-メチルヒスチジン、3-メチルヒスチジン) と βアラニンまたは γアミノ酪酸 (GABA) からなる IDPs の中で、現在市販品として入手可能なものはカルノシンとアンセリンの 2 種類のみである。その他の IDPs に関しては、市販のヒスチジン (または 1-メチルヒスチジン、3-メチルヒスチジン) と βアラニン、GABA を原料として、化学的に合成した。安定同位体標準物質に関しても、同様に化学合成した。

2-オキソ型の調製は、連携研究者 (内田) が報告しているアスコルビン酸-銅イオンシステム (BBRC 1986, 138, 659-65) により調製した。ヒスチジンまたは IDPs をアスコルビン酸、銅イオンとインキュベートしオキソ体を得た。2-チオ型、2-システニル型、2-グルタチオニル型、2-ホモシステニル型は、既報に準じて調製した (J. Org. Chem. 1985, 50, 3636-38)。ヒスチジンまたは IDPs を臭素で処理したのち、システイン (2-システニル型)、グルタチオン (2-グルタチオニル型)、ホモシステイン (2-ホモシステニル型) とインキュベートして調製した。2-システニル型をメルカプトプロピオン酸で処理し 2-チオ型を調製した。

上記の方法で調製した化合物に対して、HPLC-タンデム型質量分析装置 (Waters 社) による多重反応モニタリング法の条件設定を行い、定量的検出法を確立する。HPLC 分離カラムに Intrada AminoAcid カラム (Imtakt 社) 溶媒にギ酸アンモニウム/アセトニトリル系を用いることにより、ヒスチジン-レドックス代謝物を分離した。安定同位体希釈法により定量的検出を行った。

2-オキソ IDPs 産生と酸化ストレスの関係を調べるため、LPS による敗血症関連脳症 (SAE) モデルマウスを使用した。酸化ストレスマーカーである過酸化脂質と脳内の 2-オキソ IDPs の動態を解析した。

IDPs の抗酸化能と 2-オキソ IDPs 産生、さらに ROS の関与をカルノシン合成酵素 (CARNS) を過剰発現させたヒト神経芽細胞腫 (SH-SY5Y) 細胞を用いて調べた。H₂O₂、ロテノン処理し、細胞毒性や 2-オキソ IDPs 産生を解析した。

2-オキソ IDPs の産生メカニズムを明らかにするために試験管内で検討した。安定同位体標識した分子状酸素、水やラジカル捕捉剤である 4-amino-TEMPO を 2-オキソ IDPs 反応溶液に加えて反応させることで 2-

オキソ IDPs 合成における酸素原子の由来、反応中間体の解析を試みた。

4. 研究成果

安定同位体標識 IDPs、2-オキソ IDPs (2-オキソ-カルノシン、2-オキソ-アンセリン、2-オキソ-ホモカルノシン、図 2) を調製し、LC-ESI-MS/MS により確認した (図 3)。また、標準物質を用いて多重反応モニタリング法の条件設定を行った (表 1)。

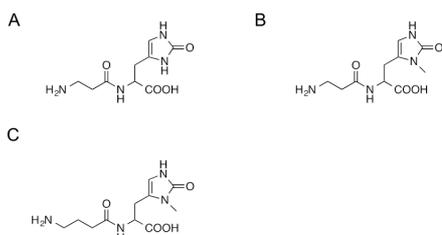


図 2 2-オキソ IDPs の構造。(A) 2-オキソカルノシン、(B) 2-オキソアンセリン、(C) 2-オキソホモカルノシン

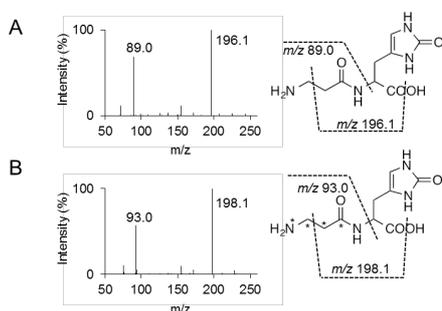


図 3 2-オキソ-カルノシン合成の確認。(A) 2-オキソカルノシンの MSMS スペクトラム、(B) 安定同位体標識 2-オキソカルノシンの MSMS スペクトラム

Analyte	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	Collision energy (V)
Carnosine	227.0	110.1	20
Carnosine*	231.0	110.1	20
Anserine	241.0	109.1	25
Anserine*	245.0	109.1	25
Homocarnosine	241.1	156.0	10
Homocarnosine*	244.1	159.0	10
2-Oxo-carnosine	243.1	196.1	10
2-Oxo-carnosine*	247.1	198.1	10
2-Oxo-anserine	257.2	169.1	15
2-Oxo-anserine*	261.1	169.1	15
2-Oxo-homocarnosine	257.1	172.0	15
2-Oxo-homocarnosine*	260.1	175.0	15

*Stable isotope-labeled derivatives

表 1 各種 IDPs、オキソ IDPs および安定同位体物質の多重反応モニタリング条件

マウス臓器を用い、安定同位体希釈法、多重反応モニタリング法による定量解析の結

果、様々なマウス臓器で 2-オキソ-カルノシン、2-オキソ-アンセリン、2-オキソ-ホモカルノシン が数 pmol/mg protein 程度の濃度で存在していることが明らかとなった。2-オキソ IDPs は IDPs に対して 1/1000 ~ 1/10000 程度で存在していた (図 4)。

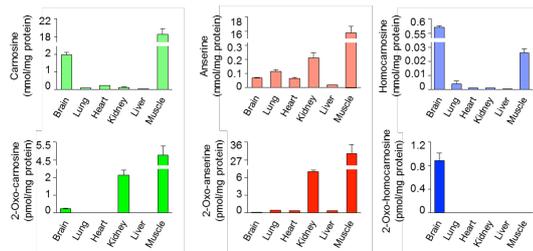


図 4 マウス各臓器における IDPs (上段) とオキソ体 (下段) の検出

SAE モデルマウスの脳の解析より、LPS 投与により、脳内の過酸化脂質が、投与後 24 時間で有意に増加しており、2-オキソ IDPs も、投与後 8 時間で有意に増加した後、24 時間ではコントロールレベルまで減少した (図 5)。

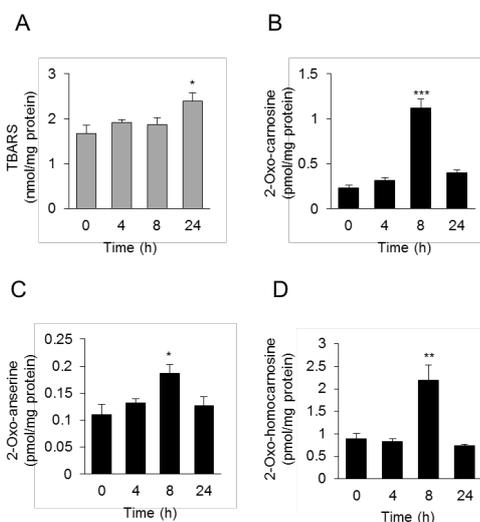


図 5 SAE モデルマウス脳における (A) 過酸化脂質、(B) 2-オキソカルノシン、(C) 2-オキソアンセリン、(D) 2-オキソホモカルノシンの産生

細胞実験より、カルノシン合成酵素恒常的発現 SH-SY5Y 細胞では control 細胞と比較し、 H_2O_2 または ロテノン による毒性、及び過酸化脂質量が有意に減少していた。また、 H_2O_2 またはロテノン処理により 2-オキソ IDPs が増加していた。さらに、膜透過性カタラーゼ (PEG-catalase) の前処理により 2-オキソ IDPs が有意に減少した (図 6)。

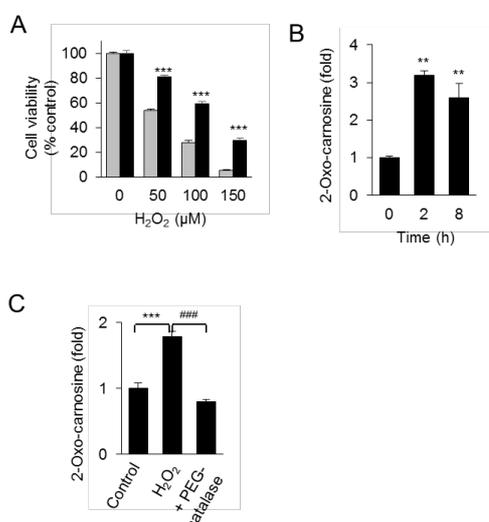


図6 カルノシン合成酵素恒常発現 SH-SY5Y における (A) 過酸化水素毒性、(B) 2-オキソカルノシン産生、(C) 2-オキソカルノシン産生に及ぼす PEG-カタラーゼの影響

産生メカニズムの検討では、IDPs の 2 位に、分子状酸素由来の酸素が付加し、また、4-amino-TEMPO が付加した 4-amino-TEMPO-IDPs の生成が確認され、ラジカル化イミダゾール基を中間体とし、分子状酸素由来の酸素原子の付加反応モデルが推測された (図 7)。

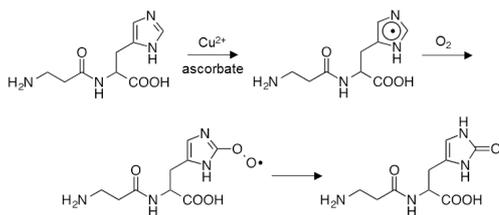


図7 2-オキソカルノシンの生成モデル

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 6 件)

- Masuda, K., Tsutsuki, H., Kasamatsu, S., Ida, T., Takata, T., Sugiura, K., Nishida, M., Watanabe, Y., Sawa, T., Akaike, T., and Ihara, H. (2018) Involvement of nitric oxide/reactive oxygen species signaling via 8-nitro-cGMP formation in 1-methyl-4-phenylpyridinium ion-induced neurotoxicity in PC12 cells and rat cerebellar granule neurons, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 495, 2165-2170. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.12.088> 査読有

- Takata, T., Ihara, H., Hatano, N., Tsuchiya, Y., Akaike, T., and Watanabe, Y. (2017) Reactive sulfur species inactivate Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase IV via S-polysulfidation of its active-site cysteine residue, *Biochem. J.* 474, 2547-2562. DOI: 10.1042/bcj20170092 査読有
- Ono, K., Jung, M., Zhang, T., Tsutsuki, H., Sezaki, H., Ihara, H., Wei, F. Y., Tomizawa, K., Akaike, T., and Sawa, T. (2017) Synthesis of L-cysteine derivatives containing stable sulfur isotopes and application of this synthesis to reactive sulfur metabolome, *Free Radic. Biol. Med.* 106, 69-79. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2017.02.023 査読有
- Kishimoto, Y., Kunieda, K., Kitamura, A., Kakihana, Y., Akaike, T., and Ihara, H. (2017) 8-Nitro-cGMP Attenuates the Interaction between SNARE Complex and Complexin through S-Guanylation of SNAP-25, *ACS Chem. Neurosci.* 9, 217-223. DOI: 10.1021/acschemneuro.7b00363 査読有
- Ihara, H., Kasamatsu, S., Kitamura, A., Nishimura, A., Tsutsuki, H., Ida, T., Ishizaki, K., Toyama, T., Yoshida, E., Abdul Hamid, H., Jung, M., Matsunaga, T., Fujii, S., Sawa, T., Nishida, M., Kumagai, Y., and Akaike, T. (2017) Exposure to Electrophiles Impairs Reactive Persulfide-dependent Redox Signaling in Neuronal Cells, *Chem. Res. Toxicol.* 30, 1673-1684. DOI: 10.1021/acs.chemrestox.7b00120 査読有
- Akaike, T., Ida, T., Wei, F. Y., Nishida, M., Kumagai, Y., Alam, M. M., Ihara, H., Sawa, T., Matsunaga, T., Kasamatsu, S., Nishimura, A., Morita, M., Tomizawa, K., Nishimura, A., Watanabe, S., Inaba, K., Shima, H., Tanuma, N., Jung, M., Fujii, S., Watanabe, Y., Ohmuraya, M., Nagy, P., Feelisch, M., Fukuto, J. M., and Motohashi, H. (2017) Cysteinyl-tRNA synthetase governs cysteine polysulfidation and mitochondrial bioenergetics, *Nat Commun* 8, 1177. DOI: 10.1038/s41467-017-01311-y 査読有

[学会発表](計 4 件)

- 垣花優希, 柴田貴広, 内田浩二, 居原秀、質量分析装置を用いたイミダゾールジペプチドの定量法の確立、日本農芸化学会 2017 年度大会

2. 山陰茜、垣花優希、柴田貴広、内田浩二、居原秀、酸化ストレスに対する細胞内カルノシンの神経保護効果、第 17 回日本 NO 学会学術集会 (2017 年度)
3. 垣花優希、柴田貴広、内田浩二、居原秀、酸化ストレスに依存した酸化イミダゾールジペプチドの産生、第 70 回日本酸化ストレス学会学術集会 (2017 年度)
4. Ihara H, Kakihana Y, Shibata T, Uchida K, Detection and quantification of 2-oxo-histidine-containing dipeptides, The Society for Redox Biology and Medicine's (SfRBM) 24th Annual Meeting 2017

授

研究者番号 : 40203533

(4)研究協力者
()

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

居原 秀 (IHARA, Hideshi)
大阪府立大学・大学院理学系研究科・准教授
研究者番号 : 60254447

(2)研究分担者

()

研究者番号 :

(3)連携研究者

内田浩二 (UCHIDA, Koji)
東京大学・大学院農学生命科学研究科・教