

令和 2 年 5 月 12 日現在

機関番号：34517

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K18275

研究課題名（和文）新たな非対称性ジメチルアルギニン分解活性測定法の開発と機能性食品成分探索への展開

研究課題名（英文）Development of a Dimethylarginine Dimethylargininohydase Assay for a Functional Food Ingredients Screening

研究代表者

横路 三有紀（Yokoro, Miyuki）

武庫川女子大学・生活環境学部・助教

研究者番号：80757188

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：非対称性ジメチルアルギニン（ADMA）の過剰な増加は血管内皮障害の一因となる。本研究は、体内ADMA濃度を低下させる効果を有する機能性食品成分の探索に向けて、ADMA分解活性を評価するスクリーニング系を確立を目指すものである。まず、ADMA分解酵素の活性を評価するバイオセンサーの作成を試みた。研究期間内に完遂できなかったため、今後も作成を継続する。別のアプローチとして我々が独自に樹立したADMA-ELISA系を簡便化し、スクリーニング系として実用性を高め、培養細胞を用いたADMA低減効果の評価を行った。今後、本法を用いてADMA低減効果を有する機能性食品成分の探索を進めていく。

研究成果の学術的意義や社会的意義

体内ADMA蓄積が心血管疾患のリスク因子として知られる。しかし、体内ADMA蓄積の予防に有効な物質はみつかっていない。その一因として、既存のDDAH活性測定法では多検体評価や生きた細胞での評価が難しいことがあげられる。本研究は、スクリーニング段階におけるこれらの問題点の解決に繋がるものである。今後、DDAH活性を高める食品成分を探索をすすめ、体内ADMA蓄積を予防、低減させる機能性食品成分を見つけたい。それは、非感染性疾患が蔓延する世界中の人々の健康増進に貢献するものであると期待される。

研究成果の概要（英文）：An excessive increase of asymmetric dimethylarginine (ADMA) causes endothelial dysfunction. In this study, we aimed to development an ADMA degrading activity screening for an exploratory of functional food ingredients. First, we tried to produce an biosensor to measure an ADMA degrading activity. Second, a protocol of ADMA-ELISA method, which we previously developed, was simplified and applied to ADMA degrading activity assay using cultured cells. In the future, we are going to explore functional food ingredients for degrading ADMA using improved ADMA-ELISA methods.

研究分野：栄養学

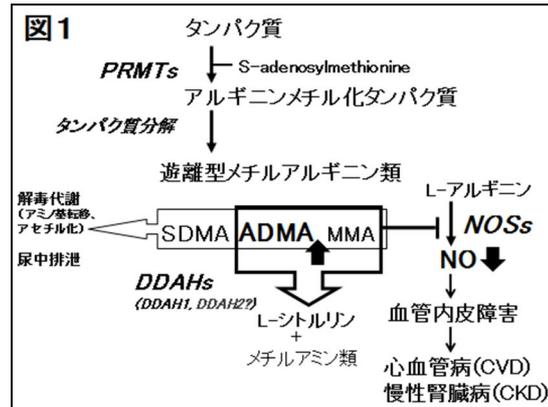
キーワード：非対称性ジメチルアルギニン 一酸化窒素 血管内皮機能 スクリーニング 評価法 ELISA ジメチルアルギニンジメチルアミノヒドラーゼ

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。

1. 研究開始当初の背景

血管内皮細胞から産生される一酸化窒素 (NO) は血管拡張作用以外に抗血栓細胞や抗炎症作用などを有し、心筋梗塞など心血管疾患予防に重要な役割を果たす。非対称性ジメチルアルギニン (Asymmetric dimethylarginine; ADMA) は、L-アルギニンにメチル基が2つ付加された翻訳後修飾アミノ酸であり、NO合成を容量依存的に阻害する内因性 NO合成酵素 (NOS) 阻害物質である。¹⁾ 図1に示すように、ADMAはタンパク質の翻訳後修飾の後、代謝回転に伴うタンパク質分解で産生される。その後、一部肝臓での解毒代謝、腎臓からの尿中排泄を受けるが体内ADMAのおよそ9割は特異的な加水分解酵素 Dimethylarginine dimethylaminohydrolase-1 (DDAH-1)により代謝される。ADMAは腎機能の低下に伴って血中濃度が上昇するため尿毒素物質としても知られている。

また炎症、インスリン抵抗性などで惹起される酸化ストレスはDDAH-1活性を著しく低下させ、血中ADMA濃度を上昇させる (J Biol Chem. 2007)。この結果、高ADMA血症は、NO低下を介した内皮障害、動脈硬化を進展させ、心血管疾患発症リスクを上昇させる心血管疾患発症リスク因子であると注目されている。²⁻⁴⁾ 体内の過剰ADMA蓄積は、NO産生阻害を介して生体に様々な悪影響をもたらす。そのため、体内ADMA蓄積を予防すること、低減させることは、ADMA蓄積が一因となる様々な疾患 (高血圧、糖尿病、心血管疾患、CKDなど)の発症予防に有用であると考えられる。しかしながら、現在、外因的にNOを補給する方法 (NOドナー) はあるが、体内に溜まったADMAを減少させる有力な方法はまだ明らかとなっていない。



2. 研究の目的

DDAHは高いADMA特異性を有するため、ADMA低下標的としてはDDAH活性を高めることが有用である。DDAH活性促進効果を示す食品成分を探索することができれば、体内ADMA蓄積を予防、低減させる機能性食品を創出できると考える。しかし、従来のDDAH活性測定法は簡便でなく、スクリーニング目的とすると、多くの検体を一度に処理しにくい、生細胞での活性は評価できないなどの問題がある。

本研究は、DDAH活性を指標とした簡便で早いスクリーニング系の構築を目指すことを目的とした。

3. 研究の方法

1) DDAH-1活性測定用バイオセンサーの作出の試み - ADMA存在下でDDAH-1に特異的に結合するタンパク質の探索 -

Dynabeads 3mgに抗DDAH-1抗体 (Rab mAb to DDAH1, abcam, ab181859) 16.3 μgを結合させた。DDAH-1抗体結合Dynabeads 1.5 mg x2に分け、DDAH-1高発現マウス肝臓の粗抽出液、DDAH-1高発現マウス肝臓の粗抽出液 + 50 μM ADMAを添加し、インキュベートした。洗浄後、溶出液を用いて抗体に結合したタンパク質を溶出した。

及びの溶出液 (10 μg protein) をNuPAGE Bis-Tris 4-12%ゲルを用いて泳動後、SYPRO Ruby Protein Gel Stainを用いて染色し、及びの溶出物の違いを観察した。

2) ADMAに対する高感度ELISA法の簡便化と培養細胞を用いたDDAH活性促進効果の評価

我々が構築したADMA-ELISAのプロトコール⁵⁾は、サンプルの誘導化 (1.5時間) 一次抗体反応 (1時間) 二次抗体反応 (1時間) 発色を1日で行うが、多検体を扱うには操作負担感があり、プレート間のばらつきが大きいことが問題であった。そこで、多検体用の方法として、プレートシェーカーを用いて工程を簡便化するとともに、サンプルの誘導化 (1.5時間) ・一次抗体反応 (4時間、一晩) 二次抗体反応 (1時間) ・発色を二日間に分けて行った。

イヌ腎尿細管上皮 (MDCK) 細胞を用いて、食品由来成分のDDAH活性促進効果の評価を行った。10 cmディッシュにMDCK細胞を培養し、Influenza (0.001 MOI) 、ダイゼイン (275 μM) 、Influenza + ダイゼイン添加を行い、24時間後培養上清と細胞を回収した。培養上清は等量の5%トリクロロ酢酸 (TCA) を加え、遠心して得られた上清 20 μl にリン酸緩衝液 (pH 7.4) 39 μl、2 M NaOH 1 μl を加えたものを測定に供した。培養細胞は、プロテアーゼインヒビターを添加したリン酸緩衝液 (pH 7.4) を加え、超音波破碎し、遠心した。上清を回収し、等量の5% TCAを添加し、再度遠心して徐タンパクを行ったものを測定に供した。細胞検体はNaOHを用いてpH調整を行

なくても、誘導化工程の際に添加する緩衝液によって中性域に戻ることを確認した。ADMA 濃度の差は一元配置分散分析を用いて統計学的に評価した。P<0.05 を統計学的に有意と判断した。

4. 研究成果

1) DDAH-1 活性測定用バイオセンサーの作出の試み - ADMA 存在下で DDAH-1 に特異的に結合するタンパク質の探索 -

DDAH が ADMA を認識すると同時に結合するタンパク質が存在すれば、DDAH と ADMA 依存性 DDAH 結合タンパク質をリンクさせ、DDAH 活性評価に用いるバイオセンサーを作ることができると考え、ADMA 存在下で特異的に DDAH タンパク質と結合するタンパク質を探索した。

図 1 は、ADMA 非添加、添加の抗 DDAH 抗体を用いた共免疫沈降の溶出物のタンパク質パターンを示す。ADMA 添加のみに現れるタンパク質バンドの存在を期待したが、ADMA 非添加、添加のタンパク質パターンの違いは認められなかった。ADMA 依存性結合タンパク質の探索は困難と判断される。今後、ペプチドライブラリーを用いた探索や DNA アプタマーの作出など別の方法によるバイオセンサーの作出を考えたい。

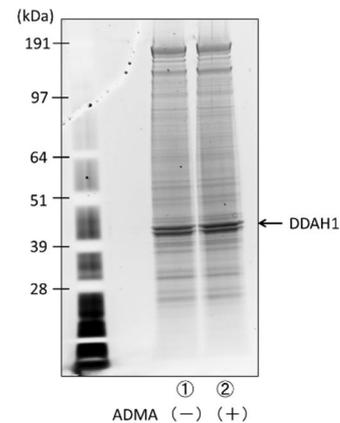


図2. 共免疫沈降溶出液のタンパク質染色

2) ADMA に対する高感度 ELISA 法の簡便化と培養細胞を用いた DDAH 活性促進効果の評価

次に、すでに我々が構築した ADMA に対する ELISA 法のプロトコールを多検体測定用に改良し、培養細胞を用いた DDAH 活性評価を行った。初期のプロコールでは測定の速さを重視し、検体の誘導化から発色まで 1 日で終わるものがあったが、プレート間のばらつきが大きい、一日の作業が多く多検体測定をするには作業負担感が大きいという課題があった。そこで、一次抗体反応を 4、一晩行い、作業を二日に分けた。結果、プレート間のばらつきが小さくなり、一日に行う工程が減ったため作業負担感が小さくなった。

この方法を用いて、インフルエンザウイルスを感染させた MDCK 細胞の ADMA 産生量とインフルエンザウイルス感染力を低下させる効果が認められている⁶⁾ダイゼイン添加による ADMA 産生量を測定し、DDAH 活性を評価できるか検討した。図 3 に示すように、MOCK 群に比し、Influenza 感染群の培養上清中 ADMA 濃度の変化は認められなかったが、ダイゼイン添加により培養上清中 ADMA 濃度は有意に低下した。次に、細胞内 ADMA 濃度の測定を行った結果を図 4 に示した。Influenza 感染群は細胞内 ADMA 濃度が低く、インフルエンザ感染 + ダイゼイン添加群においても ADMA 濃度の低下が認められた。培養上清中の ADMA 濃度と細胞内 ADMA 濃度の変化に矛盾が生じた原因は不明であるが、敗血症やある種の腫瘍など NO 産生過剰が生じる病態に対して DDAH-1 阻害剤が開発されている⁷⁾ことから、ウイルス感染時には DDAH 活性が上昇し、ADMA が過剰に分解されることが考えられる。インフルエンザウイルス感染はウイルス感染後の急性期の病態を反映するものであるため、心血管疾患など慢性疾患に有用であると考えられる DDAH 活性促進作

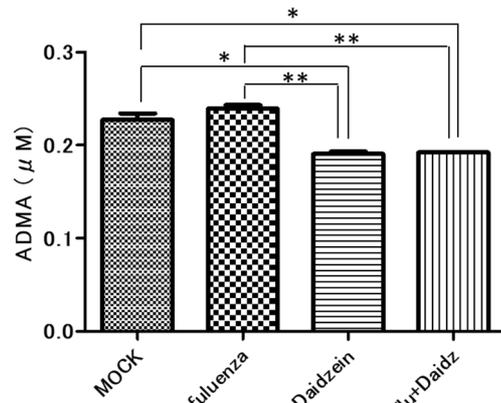


図3. 培養上清中ADMA濃度の比較

各群 n=3. *P<0.05, **P<0.01.

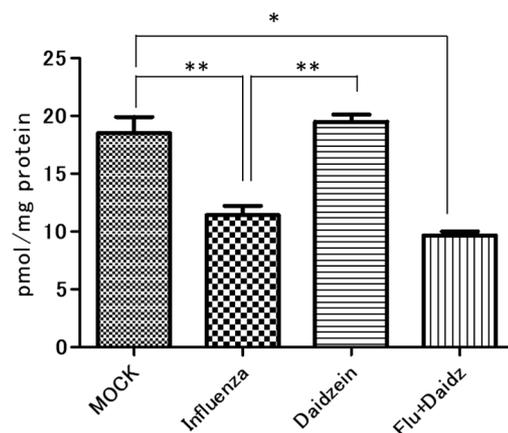


図4. 細胞内ADMA濃度の比較

各群 n=3. *P<0.05, **P<0.01.

用を評価したい場合、今回用いたウイルス感染実験は不適と考えられる。

しかしながら、培養上清中の ADMA 濃度だけでなく、細胞内 ADMA 濃度も簡単に測定する方法を確立できたことは、本研究の成果といえる。今後は、培養細胞への刺激の種類の検討、より多くの食品成分の添加実験を行い、DDAH 活性促進作用を有する機能性食品成分の探索を進める予定である。

引用文献

- 1) P Vallance, A Leone, A Calver, J Collier, S Moncada. Accumulation of an Endogenous Inhibitor of Nitric Oxide Synthesis in Chronic Renal Failure: *Lancet*. 1992 Mar 7;339(8793):572-5.
- 2) G Bouras, S Deftereos, D Tousoulis, G Giannopoulos, G Chatzis, D Tsounis, MW Cleman, C Stefanadis. Asymmetric Dimethylarginine (ADMA): A Promising Biomarker for Cardiovascular Disease?: *Curr Top Med Chem*. 2013;13(2):180-200. (Curr Top Med Chem. 2013, Curr Pharm Des. 2014., Clin Chim Acta. 2015)
- 3) S Ueda, S Yamagishi, M Yokoro, S Okuda. Role of Asymmetric Dimethylarginine in Cardiorenal Syndrome: *Curr Pharm Des*. 2014;20(14):2448-55.
- 4) PN Alpoim, LP Nunes Sousa, AP Lucas Mota, DR Alves Rios, LM SantAna Duse. Asymmetric Dimethylarginine (ADMA) in Cardiovascular and Renal Disease: *Clin Chim Acta*. 2015 Feb 2;440:36-9.
- 5) M Yokoro, M Suzuki, M Yatani, H Yamashita, Y Takahashi, H Tsuji, M Kimoto. Development of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay System for the Determination of Asymmetric Dimethylarginine Using a Specific Monoclonal Antibody: *Biosci Biotechnol Biochem*. 2012;76(2):400-3.
- 6) Y Horio, R Sogabe, M Shichiri, N Ishida, R Morimoto, A Ohshima, Y Isegawa. Induction of a 5-lipoxygenase Product by Daidzein Is Involved in the Regulation of Influenza Virus Replication: *J Clin Biochem Nutr*. 2020 Jan;66(1):36-42.
- 7) TW Linsky, W Fast. Discovery of Structurally-Diverse Inhibitor Scaffolds by High-Throughput Screening of a Fragment Library With Dimethylarginine Dimethylaminohydrolase: *Bioorg Med Chem*. 2012 Sep 15;20(18):5550-8.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yokoro M, Minami M, Okada S, Yano M, Otaki N, Ikeda H, Fukuo K.	4. 巻 41(11)
2. 論文標題 Urinary sodium-to-potassium ratio and serum asymmetric dimethylarginine levels in patients with type 2 diabetes.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Hypertension Research	6. 最初と最後の頁 913-922
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41440-018-0098-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 横路三有紀、南美樹、岡田董、矢野めぐむ、大滝直人、池田弘毅、中山陽介、深水圭、福尾恵介
2. 発表標題 尿毒素物質である非対称性ジメチルアルギニン（ADMA）と尿中ナトリウム/カリウム比との関連
3. 学会等名 第2回Uremic Toxin研究会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----