

平成 22 年 6 月 16 日現在

研究種目：基盤研究（B）  
 研究期間： 2007～ 2009  
 課題番号：19390090  
 研究課題名（和文）メタボリックシンドロームにおける反応性低分子による蛋白質翻訳後修飾の解析  
 研究課題名（英文）Post-translational protein modification induced with reactive species in metabolic syndrome  
 研究代表者  
 足立 健（ADACHI TAKESHI）  
 慶應義塾大学・医学部・講師  
 研究者番号：50231931

研究成果の概要（和文）：メタボリックシンドローム（MS）は代謝複合病であり、病因にインスリン抵抗性が関わる。本研究はMSの代表的モデル Zucker Rat の血管につき解析を行った。MS血管では1）誘導型一酸化窒素合成酵素依存性の血管収縮能の低下2）チオール抗酸化能低下、アルギニン代謝変化、メチオニン代謝変化（特にメチル化供与体の低下）3）メチル化蛋白質の低下を認めた。また、インスリンシグナルに活性酸素種、窒素種、ガス分子が関与する事が培養内皮細胞にて示された。

研究成果の概要（英文）：Metabolic syndrome is a complex diseases, which is closely associated with insulin resistance. In this study, we characterized aorta from Zucker rat, a typical animal model of MS. In aorta from MS, we found following results, 1) Hypo-vasoconstriction induced by iNOS, 2) A decrease in thiol-antioxidants, Changes in arginine, methionine metabolisms (including a decrease in SAM level, a methyl donor) 3) Decreases in the methyl-arginine modifications on vascular proteins. Moreover, we found the involvement of reactive oxygen/nitrogen species and gas molecules with insulin signal in cultured endothelial cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	6,500,000	1,950,000	8,450,000
2008年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
2009年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
年度			
年度			
総計	14,100,000	4,230,000	18,330,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：分子病態学、メタボリック・シンドローム、プロテオミクス、インスリン、血管内皮細胞

## 1. 研究開始当初の背景

21世紀の成人病医療において、メタボリック・シンドロームの病態解明、治療法の開発は重要課題である。しかしメタボリック・シ

ンドロームは、肥満（内臓脂肪蓄積）、脂質代謝異常、糖代謝異常の代謝複合病であり、その多因子性から病因となる分子機構の解明は困難である。それに加えてこの病態では、

多数の高血圧関連ホルモン（アンジオテンシン II）や炎症性サイトカイン、脂肪細胞から放出されるアディポサイトカインが関与するために、一つの代謝経路やシグナル機構から病因を探るのは困難である。近年の関連研究によりインスリン抵抗性による糖代謝異常が主原因の一つである事は判明した。しかし実際の血管病理所見から考えると、高血糖を主体とする1型糖尿病とメタボリック・シンドロームにおける血管病変には大きな違いが認められる。メタボリック・シンドロームにおいては微少血管のみならず大・中動脈にも動脈硬化性病変が散見され、頸動脈、冠動脈、大動脈、大腿動脈硬化は予後と直結する問題点である。こういった背景を鑑みてメタボリック・シンドローム研究には A) 脂肪細胞、骨格筋を標的とした内分泌学的検討のみならず、最終標的である心血管系の病理・生化学的变化を詳細検討する必要がある。また、メタボリック・シンドロームが複合代謝病である原点に立ち戻り、B) 代謝経路より放出されるフリー・ラジカル（Reactive Oxygen/Nitrogen Species: ROS/RNS）やガス分子（一酸化窒素（NO）、一酸化炭素（CO）、硫化水素（H<sub>2</sub>S））等の反応性低分子による心血管の病態生化学的解析が重要である

## 2. 研究の目的

本研究は、21世紀成人病医療の重要課題である、メタボリック・シンドロームの最終標的である心血管系病変の病因解明、新規治療法の開発を最終目的とする。その為、メタボリック・シンドロームの際に、代謝経路より放出されるフリー・ラジカル（Reactive Oxygen/Nitrogen Species: ROS/RNS）やガス分子（一酸化窒素（NO）、一酸化炭素（CO）、硫化水素（H<sub>2</sub>S））等の反応性低分子に着目して、これらによる蛋白質翻訳後修飾生成機序と、その標的蛋白質を検索し、心血管病進展の病因と新たな治療分子標的の同定を行う。この申請期間内での達成目標として、メタボリック・シンドロームの動物モデル Zucker rat の心血管と、培養血管内皮細胞のインスリン抵抗性モデルを用いて、1) ROS/RNS に

よる 3`-nitrotyrosine, Thiol Oxidation, 及びメチル化アルギニン標的蛋白質の同定  
2) ROS/RNS, CO による蛋白質 methylation の制御機序とその病態への関与、3) これらの修飾の血管機能およびインスリンシグナルに及ぼす影響の3点を明らかにする事である。

## 3. 研究の方法

1) メタボリックシンドローム Zucker Rat の血管における内皮機能と血管収縮能: Zucker Fat Rat はオリエンタル酵母社から購入し雄 16-20 週齢を用いた。Rat の管理は慶應義塾大学医学部動物取り扱い規約に沿って行なった。フェントバルビツール (50 mg/kg) 麻酔下大動脈を剥離し、Krebs Buffer 内で結合組織と血管周囲脂肪を取り除いた。5mm 長に切断した血管リングを 5% オーガンチエンパーに装着し (いわしや、京都)、一部のリングは iNOS 阻害剤 L-*N*-Nitro-L-arginine (L-*N*-L-Arginine, 10 mmol L<sup>-1</sup>, 15 min) で処理した。リングをフェニレフリン (PE: 10<sup>-9</sup>-10<sup>-5</sup> mol L<sup>-1</sup>) で収縮させ、収縮能を評価した。

2) RT-PCR: RT-PCR は以下の Primer を用いて、Two-step RT-PCR kit を用いて行なった。eNOS (Forward GCCAGGAGGACTGCAGT Reverse GCGGGGAAGTGATGTCCA)

nNOS (Forward GCAGGTACAGCTCTGAAGA Reverse CTGGTCAACAGAATACAGGCT)

iNOS (Forward TGCTTTGTGCGCAGTGTCAGT Reverse CGGACCATCTCCTGCATTTCT)

3) Zucker Rat 蛋白質翻訳後修飾の特異的標識法・抗体を用いた検出、プロテオミクス: Zucker ラットの血管を用いて反応性低分子による翻訳後修飾解析を行なった。

Ettan Dige を用いた二次元電気泳動法を応用し、血管内のメチル化アルギニン修飾蛋白質の検出法を確立し、プロテオーム解析を行った。蛋白質を Cy5-Dye (赤) で標識後、IP Gopher (GEヘルスケア社) を用いて 13cm ゲルにより二次元電気泳動を行なった。PVDF 膜に transfer 後、メチル化アルギニン (ADMA: Asymmetrical Dimethyl Arginine) に対する特異的抗体による二次元ウエスタン・プロットを ECL PLUS (Cy2: 緑) で蛍光染色

した。蛍光イメージャー (Ettan DIGE Imager) により、二重染色画像を取り込み解析し、修飾蛋白質のマッピングを行なった。メチル化を受けた蛋白質は同時に用意したゲルから切り出し、LC/MS/MS で解析し、Masscot 解析ソフトを用いて同定した。

4) 血管メタボローム解析術: 大動脈をオーガンチェンバー内で 30 分安定化後、素早く取り出し、液体窒素で急速凍結した。凍結血管内の代謝産物はメタノール/クロロホルムバッファーで抽出を行なった。メタボローム解析は慶大鶴岡キャンパスの CE/MS/MS を用いて行なった。より、高精度の測定を行なうために SAM/SAH 測定は LC/MS/MS、を用いた。

5) 豚血管内皮細胞におけるインスリンシグナル: 豚血管内皮細胞を用いて、インスリンシグナルと SAM 濃度について検討を行った。まず、インスリンシグナルに対する ROS/RNS の関与について、PTEN/PP2A の S glutathiolation 修飾について検討を行った。また、CO donor RtCO を 6 時間投与し、CO のインスリンシグナル、及び血管内皮細胞内の代謝作用について検討を行った。

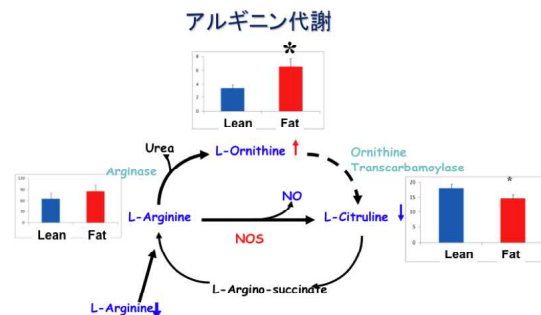
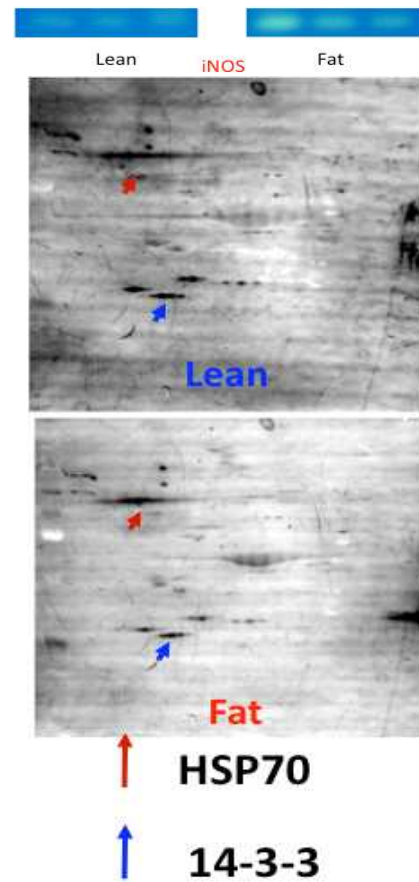
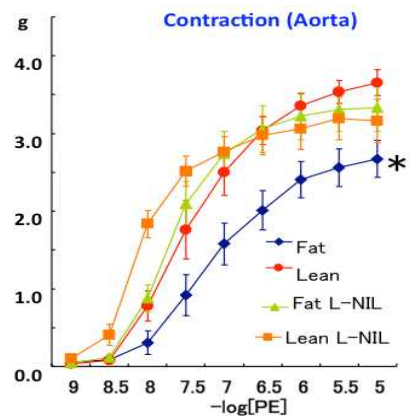
#### 4. 研究成果

大動脈リングを用いて PE による血管収縮を検討した。MS では血管収縮の低下を認めた。iNOS 阻害剤 L-Nil 投与後その差は消失した。RT-PCR 法で iNOS 発現を検討した所、上昇する傾向にあり iNOS からの ROS/RNS が病態に関わった可能性が示唆された。

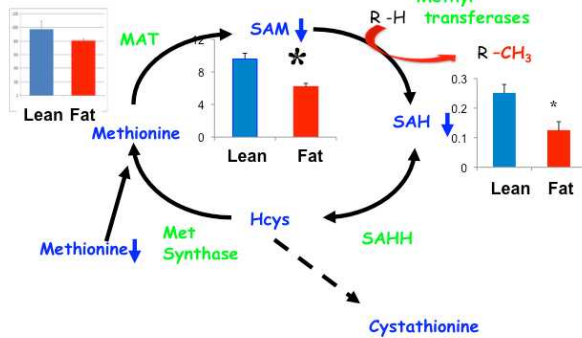
二次元ウエスタンブロットでは MS 血管で ADMA 修飾が低下する事が示唆された。プロテオミクス解析で特に 14-3-3、HSP60/70/90 でメチル化修飾低下を認めた。

メタボローム解析術では MS ラットの血管についてアルギニン代謝とメチオニン代謝に変化が認められた。メチオニン代謝ではメチル化供与体 SAM の低下が認められた。これが、蛋白質 ADMA 修飾の低下を招いた原因である可能性が示唆された。次に血管内皮細胞でイ

ンスリンシグナルに付き検討を行った。



## メチル化サイクル(メチオニン代謝)の低下



### 細胞内メチル基転移反応の低下

現在、血管内皮細胞の系で高血糖や脂肪酸負荷に付き検討を重ねている。一方、近年ヘムオキシゲナーゼ(HO)から生成される一酸化炭素(CO)の生体内作用が着目されている。そこで、内皮細胞にCO負荷を行い、インスリンの主要シグナルAktのリン酸化について検討を加えたところCOは容量依存性にAkt及びその下流のeNOS, GSK-3のリン酸化を増強した。また、COは細胞内SAM/SAHを増加させ、メチル化蛋白質を増加させた。この事からCOがMSの血管に対してメチル化増強によりインスリンシグナルを改善する可能性が示唆された。

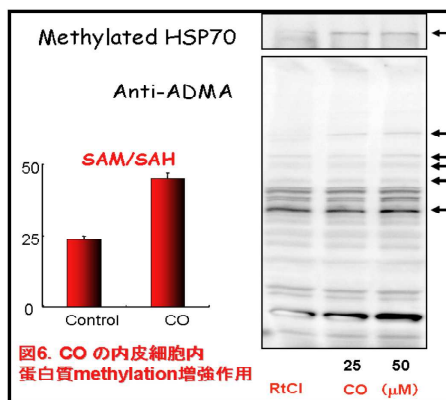


図6. COの内皮細胞内蛋白質methylation増強作用

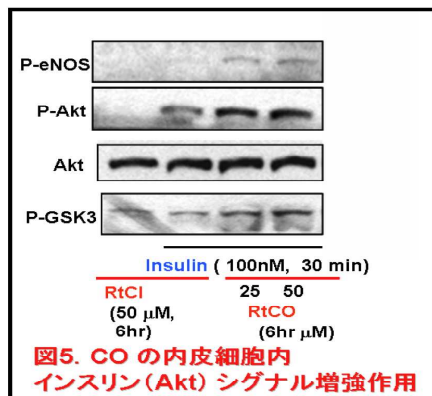


図5. COの内皮細胞内インスリン(Akt)シグナル増強作用

## 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12件)全て査読有

- 1) N. Takano, T. Yamamoto, T. Adachi, M Suematsu; Assessing a shift of glucose biotransformation by LC-MS/MS-based metabolome analysis in carbon monoxide-exposed cells. *Adv Exp Med Biol.* 2010;662:101-107
- 2) Momiyama Y, Ohmori R, Tanaka N, Kato R, Taniguchi H, Adachi T, Nakamura H, Ohsuzu F. High plasma levels of matrix metalloproteinase-8 in patients with unstable angina. *Atherosclerosis.* 2009 209(1):206-210
- 3) Tanaka K, Ito M, Kodama M, Hoyano M, Kimura S, Mitsuma W, Hirono S, Adachi T, Watanabe K, Nakazawa M, Aizawa Y. Long-term Carperitide Treatment Attenuates Left Ventricular Remodeling in Rats With Heart Failure After Autoimmune Myocarditis. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2009 54(3):232-239
- 4) Okamura K, Ito M, Tanaka K, Chinushi M, Adachi T, Mitsuma W, Hirono S, Nakazawa M, Kodama M, Aizawa Y. Comparative effects of olmesartan and azelnidipine on atrial structural remodeling in spontaneously hypertensive rats. *Pharmacology.* 2009;83(6):360-366.
- 5) Adachi T and Ohsuzu F. Cosmic effects of rosuvastatin in COSMOS. *Circ J* 2009 73(11):2015-2016
- 6) Endo J, Sano M, Adachi T, Suematsu M, Ogawa S, Fukuda K. et al. Metabolic Remodeling Induced by Mitochondrial Aldehyde Stress Stimulates Tolerance to Oxidative Stress in the Heart. *Circ Res.* 2009 105(11):1118-1127
- 7) M Nakagawa, S. Hori, T. Adachi, K.

- Miyazaki, S. Inoue, M. Suzuki, H. Mori, H. Nakazawa, N. Aikawa, S. Ogawa: Adenosine triphosphate-sensitive potassium channels prevent extension of myocardial ischemia to subepicardium during hemorrhagic Shock. *Shock*, 30(2): 178-183, 2008. (TA is the correspondence author)
- 8) Y. Yukutake, S. Tsuji, Y. Hirano, T. Adachi, T. Takahashi, K. Fujihara, P. Agre, M. Yasui, M Suematsu; Mercury chloride decreases the water permeability of aquaporine-4-reconstituted proteoliposomes. *Biol Cell*, 100(6): 355-363, 2008.
- 9) X.Y. Tong, J. Ying, D. Pimentel, M.P. Trucillo, T. Adachi, R.A. Cohen; High glucose oxidizes SERCA Cysteine-674 and prevents inhibition by nitric oxide of smooth muscle cell migration. *J Mol Cell Cardiol*, 44(2):361-369, 2008.
- 10) J. Ying, N. Clavreul, M. Sethuraman, T. Adachi, R.A. Cohen; Thiol oxidation in signal and response to stress: Detection and quantification of physiological and pathophysiological thiol modifications. *Free Radical Biology & Medicine*, 43(8):1099-1108, 2007
- 11) T. Adachi, M. Yamamoto, M Suematsu; Targeting NADPH oxidase: Ets-1 regulates p47phox. *Circ Res*, 101: 962-964, 2007.
- 12) H. Yada, M. Murata, K. Shimoda, S. Yuasa, H. Kawaguchi, M. Ieda, T. Adachi, M. Murata, S. Ogawa, K. Fukuda; Dominant negative suppression of Rad leads to QT prolongation and causes ventricular arrhythmia via modulation of L-type Ca<sup>2+</sup> channels in the heart. *Circ Res*, 101(1):69-77, 2007.
- 〔学会発表〕(計 19 件)
- 1) T. Adachi, Applications of metabolome analysis for cardiovascular diseases. Global COE, Summer School Lecture, 2008 Aug 5, Tokyo, Japan.
- 2) T. Adachi, M Suematsu; Global COE for humanoid metabolomics system Biology. GCOE symposium in UC Davis 2008 年 4 月 10 日
- 3) T. Adachi; Hypomethylation of aortic proteins in metabolic syndrome. GCOE symposium in UC Davis 2008 年 4 月 10 日
- 4) M. Yamamoto, T. Adachi, K. Ishiwata, S. Ikeda, Y. Hirayama, T. Soga, M. Suematsu; Mechanism of vasodilatation with N-acetylcysteine and NaHS: Contribution of ATP-sensitive potassium channels. *FASEB*, Experimental Biology 2008 April, 6
- 5) T. Hishiki, T. Adachi, M. Sano, T. Takayama, J. Endo, K. Fukuda, M. Suematsu; Characterization of the metabolic remodeling in liver by genetic mutation of ALDH2 in muscles. *FASEB*, Experimental Biology 2008 April, 6
- 6) T. Adachi, K. Ishiwata, M. Yamamoto, T. Yamamoto, M. Suematsu; Vascular proteomics for protein-arginine-methylation in metabolic syndrome. *FASEB*, Experimental Biology 2008 April, 7
- 7) T. Adachi, M Kajimura, T Yamamoto, M Suematsu; Vascular Effects of Carbon Monoxide; Symposium in 8th Nitric Oxide Society of Japan, 2008 年 5 月 9 日 (邦文) Application of metabolome for cardiovascular pathophysiology; CVI seminar, Department of Medicine, Boston University, 7<sup>th</sup> March 2008.

- 8) T. Adachi; Post-translational oxidative modifications in redox-sensitive mechanism. 第33回日本微小循環学会 2008年2月21日. 東京(邦文)
- 9) T. Yamamoto, N. Takano, T. Iwabuchi, T. Hishiki, T. Adachi, M. Suematsu; CO regulates the glucose metabolism via protein methylation. 第33回日本微小循環学会 2008年2月21日 東京(邦文)
- 10) 山本 雄広、高野 直治<sup>1,2</sup>、菱木 貴子、足立 健、末松 誠; 一酸化炭素(CO)による細胞内メチル化制御機構の解析 第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会 合同大会 2007年12月13日 横浜
- 11) 高野 直治、山本 雄広<sup>1</sup>、菱木 貴子、足立 健、末松 誠; 一酸化炭素(CO)による糖代謝酵素のメチル化修飾の解析 第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会 合同大会 2007年12月13日 横浜
- 12) T. Adachi, M. Suematsu; Post-translational protein modifications modulated by NO and CO. 4<sup>th</sup> International Redox Meeting. 2007Nov 1<sup>st</sup>
- 13) T. Yamamoto, N. Takano, T. Iwabuchi, T. Adachi, M. Suematsu; Role of stress-inducible CO in regulation of protein methylation and metabolism. Nobel Forum Symposium for Global COE Program "Gas biology in medicine" 2007 Nov 6-7, Stockholm, Sweden
- 14) N. Takano, T. Yamamoto, T. Iwabuchi, T. Adachi, M. Suematsu; CO regulates glucose metabolism via protein arginine methylation. Global COE Satellite Symposium "Metabolic Systems Biology and Liver Disease" 2007 Oct 24, Tokyo, Japan.
- 15) 足立 健; 血管病における一酸化窒素・一酸化炭素による蛋白質翻訳後修飾; 第17回脳血管シンポジウム, 2007年9月1日.
- 16) 上野 浩一、鈴木 昌、越智 梢、山本 美智子、足立 健、堀 進悟、相川 直樹; 高温環境におけるラット大動脈のフェニレフリン収縮の検討 2007.08.25 臨床体温研究会
- 17) 山本 美智子、足立 健、末松 誠; N-アセチル-システインおよびNaHSの血管拡張作用とその機序 2007.08.04 第25回ヒト細胞学会
- 18) 足立 健、山本 美智子、石渡 恭子、末松 誠; Zucker Rat における血管内蛋白質メチル化の変化 2007.08.04 第25回ヒト細胞学会
- 19) 高野直治、山本雄広、岩淵拓也、足立 健、末松 誠; COによる糖代謝酵素のメチル化修飾と代謝リモデリング 第28回 日本炎症・再生医学会 2007年8月2日 東京
- [図書](計0件)  
[産業財産権]○出願状況(計0件)
6. 研究組織
- (1)研究代表者  
足立 健 (ADACHI TAKESHI)  
慶應義塾大学・医学部・講師  
研究者番号: 50231931
- (2)研究分担者  
山本 美智子 (YAMAMOTO MICHIKO)  
慶應義塾大学・医学部・助教  
研究者番号: 60445450
- 泉 陽太郎 (IZUMI YOTAROY)  
慶應義塾大学・医学部・助教  
研究者番号: 90245506  
(H19~H20)
- (3)連携研究者 なし