

令和 6 年 6 月 27 日現在

機関番号：32684

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06652

研究課題名（和文）カルボニル化タンパク質の分解系に着目した統合失調症発症メカニズム解明の試み

研究課題名（英文）Elucidation of the onset mechanism of schizophrenia by focusing on the degradation system of carbonylated proteins.

研究代表者

小池 伸 (Koike, Shin)

明治薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：70751014

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：脳内におけるカルボニル化タンパク質の分解機構の一部が明らかとなった。特に、20Sプロテアソームが主要な分解系であることが解った。一方で、ある種の骨格タンパク質のカルボニル化は別の機構によって抑制されている可能性が示唆された。一部の統合失調症患者の血中には顕著に終末糖化産物が蓄積していることが報告されている。本研究では統合失調症患者由来のiPS細胞を用いた検討も行い、カルボニル化されたタンパク質を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本検討で明らかとなった脳内におけるカルボニル化タンパク質分解機構の存在は、カルボニルストレスが関与する中枢系疾患の発症機序の解明に繋がる可能性がある。また、カルボニル化タンパク質分解機構の活性化剤は、カルボニルストレス性疾患の治療薬として有効であると思われる。本検討では統合失調症に注目した検討を行ったが、本検討結果は、カルボニルストレスが関与する末梢系の疾患に対しても新たな知見を与えるものである。また、本検討では、これまで明らかになっていない、未知のカルボニル化タンパク質消去機構の存在も示唆されたが、この分解機構を明らかにすることは、新たな内在的な抗カルボニルストレス機構の解明に繋がる。

研究成果の概要（英文）：Part of the degradation mechanism of carbonylated proteins in the brain has been clarified. In particular, the 20S proteasome was found to be the major degradation system. On the other hand, it was suggested that different mechanisms suppress the carbonylation of specific skeletal proteins. It has been reported that advanced glycation end products markedly accumulate in the blood of some schizophrenia patients. This study also examined iPS cells derived from schizophrenia patients and identified carbonylated proteins.

研究分野：分析化学

キーワード：カルボニル化タンパク質 メチルグリオキサール AGEs 統合失調症 タンパク質分解系

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

統合失調症は人口の約1%が罹患するとされる代表的な精神疾患であるが、根本的な治療法はない。最近、一部の統合失調症患者において、血中のペントシジン濃度が上昇し、且つビタミンB6レベルが減少している一群が同定された(Arai et al. *Archives of general psychiatry* 67.6 (2010): 589-597.)。さらに、重症の患者において、グリオキサラーゼ1遺伝子の変異が見ついている。ペントシジンとは糖代謝の過程で産生される反応性の高いカルボニル化合物がタンパク質と反応して形成される終末糖化産物(AGEs)の一種である。また、ビタミンB6はメチルグリオキサールの消去能を有しており、グリオキサラーゼ1はメチルグリオキサールの代謝酵素である。従って、一部の統合失調症患者では、メチルグリオキサール消去能が低下している可能性が示唆されている。この仮説に基づき、メチルグリオキサール代謝能低下モデルマウスとして、グリオキサラーゼ1欠損マウスにビタミンB6欠乏餌を与えたマウスの解析を行った結果、このマウスの脳中において、AGEs群の蓄積とメチルグリオキサール濃度の上昇を認められた(Koike et al. *Antioxidants* 10.4 (2021): 574.)。また、このマウスは統合失調症様の行動異常を示すことも解った(Toriumi et al. *Redox Biology* 45 (2021): 102057.)。これらの背景から、統合失調症の症状と脳内カルボニル化合物やカルボニル化タンパク質の間に何らかの関係性があることが推定された。我々は予備的な検討により、神経系細胞にメチルグリオキサールを添加すると、顕著なカルボニル化タンパク質の蓄積を認めるが、時間経過とともに消失することを発見した。この知見から、生体にはカルボニル化タンパク質の消去系が存在することが示唆されたため、統合失調症ではカルボニル化タンパク質の消去系に異常が起こり、カルボニル化タンパク質の異常な蓄積を招いているのではないかという仮説を立てた。

本検討では、カルボニル化タンパク質の消去機構に注目し、統合失調症の発症機序解明の礎となるデータの獲得を目指した。

2. 研究の目的

本検討では、*in vitro*、*in vivo*の実験において、神経系細胞におけるメチルグリオキサール由来のカルボニル化タンパク質の蓄積パターンを解析し、その消去機構を解明することを目的とする。また、統合失調症患者由来のiPS細胞を用いてカルボニル化タンパク質の蓄積状態を検討することで、統合失調症患者の脳内におけるカルボニル化タンパク質の蓄積とその影響を考察する。

3. 研究の方法

(1)ヒト由来神経芽腫細胞SH-SY5Y細胞におけるメチルグリオキサール由来カルボニル化タンパク質の検出:SH-SY5Y細胞に対して、合成したメチルグリオキサールを添加して、蓄積したカルボニル化タンパク質の種類をウエスタンブロット法を用いて検討する。また、細胞内のメチルグリオキサール濃度は蛍光HPLC法によって定量する。

(2)蓄積したカルボニル化タンパク質の時間依存的な蓄積パターンの解析:(1)の実験と同様にSH-SY5Y細胞にメチルグリオキサールを添加してから各時間後にタンパク質を抽出し、

(1)で同定されたメチルグリオキサール由来カルボニル化タンパク質に着目して、そのカルボニル化タンパク質の処理時間依存的な蓄積状態をウエスタンブロット法で確認する。

(3)SH-SY5Y細胞におけるカルボニル化タンパク質消去機構の検討:神経細胞内に蓄積したカルボニル化タンパク質の減少がどのようなメカニズムで起きているのかを検討する。特に、オートファジー系とプロテアソーム系に注目して、それぞれの阻害剤を用いて検討する。

(4)マウス脳内に蓄積するカルボニル化タンパク質の検出:マウス海馬内にメチルグリオキサールを投与して、脳を抽出し、タンパク質を抽出後、ウエスタンブロット法にてカルボニル化タンパク質を検出する。また、この蓄積の経時的な変化もウエスタンブロット法で検討する。

(5)統合失調症患者由来iPS細胞より分化させたアストロサイトにおける、カルボニル化タンパク質の検出:(1)から(4)の検討で同定されたメチルグリオキサール由来カルボニル修飾体をウエスタンブロット法によって検出し、カルボニル化されたタンパク質の同定をLC-MS/MSによって行う。

(6)ヒト由来アストロサイトを用いたカルボニル化骨格タンパク質の解析:ヒト由来アストロサイトにメチルグリオキサールを添加し、(5)で同定されたカルボニル化タンパク質の蓄積とその消失を解析する。

4. 研究成果

(1)ヒト由来神経芽腫細胞SH-SY5Y細胞におけるメチルグリオキサール由来カルボニル化タンパク質の検出:SH-SY5Y細胞においてはメチルグリオキサールによって、終末糖化産物の一種であるMG-H1(Methylglyoxal-derived hydroimidazolone 1)化タンパク質の蓄積が顕著に認められた。また、カルボキシエチルリジン化タンパク質やアルグピリミジン化タンパク質の蓄積も認められた。一方で、カルボキシメチルリジン化タンパク質やペントシジン化タンパク質の

蓄積は認められなかった。以上の結果より、神経系細胞においては過剰量のメチルグリオキサールによって MG-H1 化タンパク質の蓄積が有意に生じることが解った。

(2) 蓄積したカルボニル化タンパク質の時間依存的な蓄積パターンの解析：メチルグリオキサール処理によって蓄積した MG-H1 化タンパク質を経時的に解析すると、処理後 12 時間後から徐々に消失していくことが解った。さらに、カルボキシエチルリジン化タンパク質は MG-H1 化タンパク質よりも遅れて蓄積することが解った。本検討から、蓄積した MG-H1 化タンパク質は神経細胞の何かしらの分解機構によって消失することが示唆された。

(3) SH-SY5Y 細胞におけるカルボニル化タンパク質消去機構の検討：SH-SY5Y 細胞に対して、オートファジー阻害剤とプロテアソーム阻害剤を前処理し、その後メチルグリオキサールを処理することで、細胞内に蓄積し消失する MG-H1 化タンパク質の検出を行った。その結果、プロテアソーム阻害剤を用いた場合に、より顕著に MG-H1 化タンパク質の消失が抑えられた。特に 20S プロテアソーム阻害剤を用いた場合に、その抑制が顕著であった。また、オートファジー阻害剤によっても MG-H1 化タンパク質の消失が抑制されたが、プロテアソーム阻害剤ほどの抑制効果はなかった。以上の結果から、蓄積した MG-H1 化タンパク質の消失には 20S プロテアソームによる分解が深く関与していることが明らかとなった。

(4) マウス脳内に蓄積するカルボニル化タンパク質の検討：マウス海馬内に麻酔下でメチルグリオキサールを投与して、その後ケージ内で飼育した。投与後各時間において各マウスから脳を摘出し、ウエスタンブロット法で MG-H1 化タンパク質を検出した。その結果、投与後 2 時間において海馬内における MG-H1 化タンパク質の蓄積が認められた。一方で、この蓄積は、メチルグリオキサール投与後 12 時間で顕著に減少した。この結果から、マウス脳内においても、蓄積後速やかにカルボニル化タンパク質の分解が誘導されていることが明らかとなった。また、海馬にメチルグリオキサールを投与したマウスにおいて、オープンフィールド試験と Y 字迷路試験を行ったところ、メチルグリオキサール未投与マウスと比較して、顕著な行動異常が認められた。

(5) 統合失調症患者由来 iPS 細胞より分化させたアストロサイトにおける、カルボニル化タンパク質の検出：ウエスタンブロット法によってアストロサイト内における AGEs 化タンパク質を検出したところ、MG-H1 化されたタンパク質由来の複数のバンドを検出した。このタンパク質を LC-MS/MS によって解析したところ、複数の骨格タンパク質が同定された。本検討結果は、統合失調症患者においてはアストロサイトにおいて骨格タンパク質が顕著にカルボニル化を受けており、それによってアストロサイトにおける機能的な異常が生じている可能性を示唆している。

(6) ヒト由来アストロサイトを用いたカルボニル化骨格タンパク質の解析：ヒト由来アストロサイトを培養し、メチルグリオキサール誘導性のカルボニル化タンパク質の同定を試みた。その結果、(5) で同定された骨格タンパク質が顕著に MG-H1 化されることが解った。また、この MG-H1 化された骨格タンパク質も時間経過とともに、脱 AGEs 化されることが明らかとなった。一方で、この骨格タンパク質に対する脱 AGEs 化機構は明らかにならず、プロテアソームやオートファジーではない別の分解機構の存在が示唆された。また、メチルグリオキサール処理によって、アストロサイトの形態異常が観察されたことから、骨格タンパク質のカルボニル化修飾は、アストロサイトの形態に影響を与えることが示唆された。

以上の結果から、神経系細胞内においてメチルグリオキサール誘導性の AGEs として MG-H1 が同定され、その蓄積は健常状態では一過性であることが明らかとなった。蓄積した MG-H1 化タンパク質の分解には 20S プロテアソームの働きが深く関与していることが明らかとなり、部分的にはオートファジーも関与しているものと思われる。さらに、統合失調症患者由来のアストロサイトの解析から、各種骨格タンパク質の顕著な MG-H1 化が認められ、この修飾がアストロサイトの機能的な異常を引き起こしている可能性がある。本研究から、統合失調症患者の脳内においては、神経系細胞におけるカルボニル化タンパク質分解機構の破綻による異常なカルボニル化タンパク質の蓄積誘導が脳機能に影響を与えている可能が推定され、今後詳細な検討を行う必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

| | |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名 Koike Shin, Saito Yuna, Ogasawara Yuki | 4. 巻 12 |
| 2. 論文標題 Novel Fluorometric Assay of Antiglycation Activity Based on Methylglyoxal-Induced Protein Carbonylation | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Antioxidants | 6. 最初と最後の頁 2030 ~ 2030 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/antiox12122030 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|---|-----------------|
| 1. 著者名 Shin Koike, Ko Sugiura, Yuki Ogasawara | 4. 巻 18 |
| 2. 論文標題 Methylglyoxal, which is also produced by the oxidation of glycerol, a moisturizing component, produce carbonylated collagen in the skin. | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 International Maillard Reactions Society | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし | 査読の有無 無 |
| 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 - |

| | |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名 Koike Shin, Saito Yuna, Ogasawara Yuki | 4. 巻 12 |
| 2. 論文標題 Novel Fluorometric Assay of Antiglycation Activity Based on Methylglyoxal-Induced Protein Carbonylation | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Antioxidants | 6. 最初と最後の頁 2030 ~ 2030 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/antiox12122030 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名 Koike Shin, Miyaji Yusuke, Suzuki Kazuhiro, Miyashita Mitsuhiro, Itokawa Masanari, Arai Makoto, Ogasawara Yuki | 4. 巻 634 |
| 2. 論文標題 Plasma unconjugated bile acids as novel biomarker for schizophrenia | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications | 6. 最初と最後の頁 70 ~ 74 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2022.09.110 | 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 - |

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Koike Shin, Toriumi Kazuya, Kasahara Sakura, Kibune Yosuke, Ishida Yo-ichi, Dan Takashi, Miyata Toshio, Arai Makoto, Ogasawara Yuki | 4. 巻 10 |
| 2. 論文標題 Accumulation of Carbonyl Proteins in the Brain of Mouse Model for Methylglyoxal Detoxification Deficits | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Antioxidants | 6. 最初と最後の頁 574 ~ 574 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/antiox10040574 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|--|-------------------------------|
| 1. 著者名 Toriumi Kazuya, Berto Stefano, Koike Shin, Usui Noriyoshi, Dan Takashi, Suzuki Kazuhiro, Miyashita Mitsuhiro, Horiuchi Yasue, Yoshikawa Akane, Asakura Mai, Nagahama Kenichiro, Lin Hsiao-Chun, Sugaya Yuki, Watanabe Takaki, Kano Masanobu, Ogasawara Yuki, Miyata Toshio, Itokawa Masanari, Konopka Genevieve, Arai Makoto | 4. 巻 45 |
| 2. 論文標題 Combined glyoxalase 1 dysfunction and vitamin B6 deficiency in a schizophrenia model system causes mitochondrial dysfunction in the prefrontal cortex | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Redox Biology | 6. 最初と最後の頁 102057 ~ 102057 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.redox.2021.102057 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

| |
|---|
| 1. 発表者名 鶴留里梨、小池伸、鈴木俊宏、小笠原裕樹 |
| 2. 発表標題 Nrf2活性化剤によるメチルグリオキサール誘導性カルボニルストレスの軽減作用 |
| 3. 学会等名 第67回 日本薬学会 関東支部大会 |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 鶴留里梨、小池伸、鈴木俊宏、小笠原裕樹 |
| 2. 発表標題 Nrf2系の活性化によるメチルグリオキサール誘導性カルボニルストレスの軽減 |
| 3. 学会等名 日本薬学会 第144年会 |
| 4. 発表年 2024年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 鶴留里梨、小池伸、鈴木俊宏、小笠原裕樹 |
| 2. 発表標題 Nrf2活性化剤によるメチルグリオキサル誘導性カルボニルストレスの軽減作用 |
| 3. 学会等名 日本薬学会第144回年会 |
| 4. 発表年 2024年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 鳥海和也、小池伸、段孝、鈴木一浩、宮下光弘、堀内泰江、小笠原裕樹、宮田敏男、糸川昌成、新井誠 |
| 2. 発表標題 メチルグリオキサル解毒障害による統合失調症様行動異常発現の分子機序解明 |
| 3. 学会等名 第95回日本生化学会大会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 鳥海和也、小池伸、段孝、鈴木一浩、宮下光弘、堀内泰江、小笠原裕樹、宮田敏男、糸川昌成、新井誠 |
| 2. 発表標題 メチルグリオキサル解毒障害による統合失調症様行動異常発現の分子機序解明 |
| 3. 学会等名 第96回日本薬理学会年会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Shin Koike, Sakura Kasahara, Kazuya Toriumi, Takashi Dan, Toshio Miyata, Makoto Arai, Yuki Ogasawara |
| 2. 発表標題 Accumulation of Carbonyl Proteins in the Brain of Mouse Model for Methylglyoxal Detoxification Deficits |
| 3. 学会等名 日本メイラード学会 |
| 4. 発表年 2021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 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|