

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 10 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590292

研究課題名（和文）システイン生合成系破綻により発症する急性筋萎縮症の病態解明とその制御法創出

研究課題名（英文）Pathophysiological analysis of acute muscle atrophy by failure of cysteine biosynthesis and development of its control strategy

研究代表者

石井 功（ISHII ISAO）

慶應義塾大学・薬学部・准教授

研究者番号：90292953

研究成果の概要（和文）：

システイン生合成の最終酵素であるシスタチオン γ リアーゼ（CTH）の遺伝子欠損マウスを作成し、本マウスにシステイン（シスチン）欠乏食を与えると急性の筋萎縮症が発症することを見出した。病理学的・免疫組織学的・生化学的解析により、本病態がシステイン不足による筋タンパク質の過度の自食（Autophagy）による筋原性（神経原性ではない）筋萎縮症であることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

We have developed mice lacking cystathionine gamma-lyase (CTH), the final step enzyme for cysteine biosynthesis, and observed acute muscle atrophy when fed a cyst(e)ine-deficient diet. Our pathological, immunohistochemical, and biochemical analyses revealed that this is myopathy (not neuropathy) caused by excessive autophagy of muscular protein due to severe cysteine deficiency.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：代謝生化学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：システイン、筋萎縮症、ホモシステイン、アミノ酸代謝、硫化水素、オートファジー、ミオパシー、イメージング

1. 研究開始当初の背景

哺乳動物において、必須アミノ酸であるメチオニンから生合成されるシステインは非必須アミノ酸と呼ばれる。その生合成過程はメチオニンサイクルとトランススフレーションから成り、生体にとって有毒なホモシステインの産生・蓄積・代謝、各種メチル化反応へのメチル基の供給、「主要抗酸化

物質であるグルタチオンやタウリンの生合成前駆体」あるいは「生理活性ガスである硫化水素 H_2S の発生源」としての生合成システインの供給などに必須の役割を担っている。そして、その破綻は血栓塞栓症、脂質代謝異常、精神発達遅延、貧血など重篤な病態に繋がること知られており、中でも中間代謝産物ホモシステインの血中濃度上昇は心血管病の独立のリスクファクター

として認識され、正常濃度 (~10 μM) のわず
か 5 μM 上昇が冠動脈疾患発症リスクを 1.6
倍にすると報告されている。また加齢に伴
う血中ホモシステイン濃度上昇と腎臓病・
アルツハイマー症などの神経変性疾患の発
症との相関も示唆されている。しかし、ホ
モシステイン蓄積による病態発症の分子メ
カニズムには諸説あるものの、その実体は
不明のままである。またトランススフレ
ーションを担う二つの酵素シスタチオン β
シクターゼ (CBS) と CTH はともに生体内 H_2S 産
生酵素としても注目されている。 H_2S は血管
平滑筋弛緩や神経機能調節に関する生理活
性ガスと考えられているが、その果たす生
理的役割・重要性は不明である。我々は上
記課題を明らかにするため、ホモシステ
イン代謝と H_2S 産生に必須のトランススフ
レーション酵素である CBS と CTH に注目し、そ
の遺伝子欠損マウスの解析を進めている。

2. 研究の目的

遺伝病シスタチオン尿症のモデルとし
て我々が新規に作成した CTH 欠損マウスは、
見かけ上は正常ながらも CBS 欠損マウス (血
栓塞栓症など重篤な病態を示す遺伝病ホ
モシチン尿症のモデル動物で 4 週齢以前に
95%が死亡) に匹敵する高ホモシステイン血
症を示す。我々は最近、CTH 欠損マウスをシ
ステイン欠乏餌で飼育すると急性の筋萎縮
症が発症することを見出した。極めて珍しい
食餌誘導型の筋萎縮症として、その発症の分
子メカニズムを明らかにすること、そしてさ
らにはその制御法を見出すことを目的とし
た。

3. 研究の方法

(1) CTH 欠損マウスの解析

研究代表者らが新規に作成した CTH 欠損マ
ウスは見かけ上正常な発育を示すが、3 週齢
離乳期よりシステイン (シスチン) 含有量が
45%の特別な餌 (KR 餌) を投与すると、即時に
体重増加を停止し、骨格筋萎縮を主徴とする
全身性の発達障害を示して約 2 週間後に死亡
する。本餌に通常餌相当になるようにシスチ
ン補充すると本病態は完全に消失すること
から、システイン生合成の破綻によるシステ
イン欠乏による病態が考えられる。

この骨格筋萎縮が神経原性か筋原性か明
らかにするため、1) 障害筋部位を細かく調べ、
遠位筋中心の萎縮か近位筋中心の萎縮かを
調べた。レントゲンや小動物用 PET などを用
いて、マウス個体のどの部分の筋肉がおち
ているか検討した。四肢の麻痺を起こす原因
の萎縮部位を中心に調べた 2) 各部位の筋切
片を作成・染色後、顕微鏡観察した 3) 線維
束性攣縮の有無を調べた。ビデオ撮影によ
りマウスの細かな動きを連続監視した 4) CK、LDH、

CRE などの血清生化学値を測定し筋細胞壊
死が起こっているか調べた 5) 脊髄の横断切
片を作成して、ALS など神経原性萎縮でよく
見られる脊髄前角細胞の脱落などの異常があ
るか調べた。

次にこの急性筋萎縮がシステイン欠乏に
特徴的な変化かどうか調べるために、他の標
準アミノ酸のそれぞれを含まない無タンパ
ク質アミノ酸配合餌を作成して野生型マウ
スに投与し、筋萎縮などの表現型の変化を調
べた。

(2) 硫化水素イメージング

筋萎縮発症における H_2S の役割は不明であ
る。それを考える上で、 H_2S 定量と分布イメ
ージングマップの作成は極めて重要な情報
を与えるはずであるが、いずれも満足の出来
る報告はない。そこで本研究課題では、銀蒸
着板と TOF-SIMS (Time of flight-secondary
ion mass spectrometry) を用いた H_2S の分子
イメージングを試みた。比較対照としては、
CBS 欠損マウスおよび CTH 欠損マウスの各種
臓器を用いた。

4. 研究成果

(1) 筋原性筋萎縮の証明

CTH 欠損マウスに KR 餌を与えたときに見
られる急性致死性の骨格筋萎縮について詳細
解析した。レントゲン撮影や解剖により僧帽
筋や大腿直筋など体幹に近い近位筋中心の
筋萎縮が観察された。しかし、それらを支配
する脊髄部位には ALS で特徴的な前角細胞の
脱落などの所見は観察されなかった。また、
大腿直筋の横断切片を作成して筋線維細胞
の横断面積を計算した所、ほぼ均等に減じて
おり、群性萎縮やそれに伴う小角化線維の出
現は観察されなかった。その横断切片を
Autophagy のマーカーである LC3b と p62 に免
疫染色した所、萎縮した筋線維細胞において
LC3b あるいは p62 の蓄積が確認された。つま
り LC3b が蓄積する細胞には p62 の蓄積は見
られず、p62 が蓄積する細胞には LC3b の蓄積
が見られなかったが、これは活発に
Autophagy を行っている細胞が LC3b に染まり、
その結果として Autophagy の component が枯
渇して p62 を処理できなくなった細胞に p62
が蓄積すると考えられた。血中 LDH 値の上
昇は見られず、CRE 値の減少が観察された。マ
ウスの詳細な動きを観察したが、線維束性攣
縮らしき動きは観察されなかった。以上の結
果より、本筋萎縮症は神経原性ではなく筋原
性の筋萎縮によるものと結論した。

(2) 他の必須アミノ酸欠乏餌の投与実験

上記の病態が、システイン欠乏に特徴的か
どうかを調べるため、新規に無タンパク質ア
ミノ酸配合餌 18 種を作成し、マウスに投与

した。通常のマウス飼育餌は、魚粉などの動物性タンパク質や大豆・酵母などの植物性タンパク質を配合しているが、本餌は全くタンパク質を含まず各種標準アミノ酸を配合したものである。まず通常マウス餌のアミノ酸組成をベースとした完全アミノ酸餌を野生型マウスに投与したところ順調な発育を示したが、システイン不含の餌でもそれは同じであった。完全アミノ酸餌とシステイン不含餌をCTH欠損マウスに投与した所、前者では順調な発育を示すのに対し後者では全く成長しなかったが、KR餌投与時に見られた顕著な筋萎縮症は発症せず、かわりに全身的痩身が観察された。次にKR餌のアミノ酸組成をベースにした完全アミノ酸餌からシステインを同程度に除いたKRベースのアミノ酸餌を作成・投与したが、やはりCTH欠損マウスへの投与時と同様の筋萎縮症は見られなかった。理由は不明であるが、この特別なアミノ酸配合餌では筋萎縮症を再現することは出来ないと考えられた(他の10種それぞれの必須アミノ酸欠乏時も同様)。したがって、ただシステインが足りなければ起こる病態ではないと思われる。

(3) H₂S イメージング

富士フィルムとULVAC-PHI両社の協力を得て、H₂Sの組織イメージング法を開発した。シリコンプレートに20 nmの厚さでクロムを蒸着後、200 nmの厚さで銀を蒸着した銀板は、富士フィルム社より得た。極めて均一な銀蒸着は、長年の写真フィルム生産の中で富士フィルム社が確立した高度な加工技術と生産管理により可能となっている。本品作成後、酸化から守るため窒素封入下にすぐに保管後、クライオスタットにより切り出した40 μmのマウス組織切片と接触させたものをガラス板で挟み込み、Agと親和性を持つガス(H₂S)を含む生体分子を-10°C下1時間かけてトラップした。その後サンプルは液体窒素下に保管したのち、組織切片部分を水・アセトンで洗い去り、その後の銀板をULVAC-PHI社のTOF-SIMSによりスキャン解析した。

本法により世界で初めてH₂S、及びI⁻、Br⁻そしてSCN⁻などの(偽)ハロゲンイオンの組織イメージングが可能となった。H₂Sは、免疫組織学的解析より明らかとなったマウス腎臓におけるCBS及びCTHタンパク質の発現分布と一致し、髄質部よりも皮質部に強く発現していた。一方I⁻、Br⁻、SCN⁻は髄質部に強く発現していた。しかし本手法の大きな問題点として、定量性に乏しいこと、操作が大変複雑で高額蒸着・測定機器を要すること、CBS欠損マウスやCTH欠損マウスなど高ホモシステイン血症を呈するマウスではH₂Sレベルを示すS²⁻のシグナルにホモシステインのシグナルも重なること、などの課題が残った。

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)

- ① Yamada H, Akahoshi N, Kamata S, Hagiya Y, Hishiki T, Nagahata Y, Matsuura T, Takano N, Mori M, Ishizaki Y, Izumi T, Kumagai Y, Kasahara T, Suematsu M, Ishii I (2012) Methionine excess in diet induces acute lethal hepatitis in mice lacking cystathionine gamma-lyase, an animal model of cystathioninuria. *Free Radic Biol Med* 52:1716-1726. DOI:10.1016/j.freeradbiomed.2012.02.033. 査読有り.
- ② Morikawa T, Kajimura M, Nakamura T, Hishiki T, Nakanishi T, Yukutake Y, Nagahata Y, Ishikawa M, Hattori K, Takenouchi T, Takahashi T, Ishii I, Matsubara K, Kabe Y, Uchiyama S, Nagata E, Gadalla MM, Snyder SH, Suematsu M (2012) Hypoxic regulation of the cerebral microcirculation is mediated by a carbon monoxide-sensitive hydrogen sulfide pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 109:1293-1298. DOI: 10.1073/pnas.1119658109. 査読有り.
- ③ Akahoshi N, Ishizaki I, Naya M, Maekawa T, Yamazoe S, Horiuchi T, Kajimura M, Ohashi Y, Suematsu M, Ishii I (2012) TOF-SIMS imaging of halide/thiocyanate anions and hydrogen sulfide in mouse kidney sections using silver-deposited plates. *Anal Bioanal Chem* 402:1859-1864. DOI: 10.1007/s00216-011-5647-2. 査読有り.
- ④ Taniguchi S, Kimura T, Umeki T, Kimura Y, Kimura H, Ishii I, Itoh N, Naito Y, Yamamoto H, Niki I (2012) Protein phosphorylation involved in the gene expression of the hydrogen sulphide producing enzyme cystathionine gamma-lyase in the pancreatic beta-cell. *Mol Cell Endocrinol* 350:31-38. DOI: 10.1016/j.mce.2011.11.016. 査読有り.
- ⑤ Ikeda K, Kubo A, Akahoshi N, Yamada H, Miura N, Hishiki T, Nagahata Y, Matsuura T, Suematsu M, Taguchi R, Ishii I (2011) Triacylglycerol/phospholipid molecular species profiling of fatty livers and regenerated non-fatty livers in cystathionine beta-synthase-deficient mice, an

animal model for homocysteinemia/homocystinuria. Anal Bioanal Chem 400:1853-1863. DOI: 10.1007/s00216-011-4703-2. 査読有り.

- ⑥ Ishii I, Akahoshi N, Yamada H, Nakano S, Izumi T, Suematsu M (2010) Cystathionine gamma-lyase-deficient mice require dietary cysteine to protect against acute lethal myopathy and oxidative injury. J Biol Chem 285:26358-26368. DOI: 10.1074/jbc.M110.147439. 査読有り.

〔学会発表〕(計 15 件)

- ① 鎌田祥太郎、上條健太、落合崇人、森田珠子、吉富友里香、萩谷至史、山本隼也、笠原忠、石井功。欠乏アミノ酸種により異なる飢餓応答の解析。日本薬学会第 133 年会。2013 年 3 月 29 日。横浜
- ② 山本隼也、萩谷至史、鎌田祥太郎、笠原忠、石井功。マウス臓器種により異なる飢餓応答の解析。日本薬学会第 133 年会。2013 年 3 月 28 日。横浜
- ③ 石井功、山田秀典、赤星軌征、鎌田祥太郎、萩谷至史、菱木貴子、長畑善子、松浦友美、高野直治、笠原忠、末松誠。メチオニン肝毒性に対するトランススルフィレーション経路の保護的効果。第 85 回日本生化学会大会。2012 年 12 月 16 日。福岡。
- ④ 赤星軌征、石崎逸子、納谷昌之、前川敏彦、山添省吾、堀内正、梶村真弓、大橋善治、末松誠、石井功。銀蒸着板-TOF-SIMS 解析によるマウス腎臓のハロゲン/チオシアン酸イオン及び硫化水素分布のイメージング。第 85 回日本生化学会大会。2012 年 12 月 15 日。福岡。
- ⑤ 石井功、鎌田祥太郎、萩谷至史、笠原忠、山田秀典、赤星軌征、菱木貴子、長畑善子、松浦友美、高野直治、末松誠。Cys 生合成系破綻マウスにおける高 Met 餌による急性肝炎誘導。日本アミノ酸学会第 6 回学術大会。2012 年 9 月 29 日。千葉
- ⑥ 萩谷至史、鎌田祥太郎、山本隼也、笠原忠、石井功。アセトアミノフェン肝障害におけるシステイン生合成系の役割。日本アミノ酸学会第 6 回学術大会。2012 年 9 月 28 日。千葉
- ⑦ 森田珠子、上條健太、落合崇人、吉富友里香、鎌田祥太郎、萩谷至史、山本隼也、笠原忠、石井功。必須アミノ酸種による差動的アミノ酸飢餓応答。日本アミノ酸学会第 6 回学術大会。2012 年 9 月 28 日。千葉
- ⑧ 中埜信太郎、新村健、玉城佳代子、西村重敬、赤星軌征、末松誠、石井功。Transsulfuration is essential for

fasting-induced cardioprotection against ischemia/reperfusion injury. 第 33 回内藤カンファレンス。2012 年 6 月 27 日。札幌

- ⑨ Isao Ishii. Cystathionine gamma-lyase-deficient mice as an animal model of cystathioninuria. Advances and controversies in B-vitamins and choline. 2012 年 3 月 8 日。Leipzig, Germany.
- ⑩ 石井功. Pathophysiology of impaired cysteine biosynthesis and hydrogen sulfide production. 第 84 回日本生化学会大会。2011 年 9 月 21 日。神戸
- ⑪ 石井功。システイン生合成・硫化水素産生系の破綻による病態。第 2 回日本学術振興会レドックス・ライフイノベーション第 170 委員会 Redox Signal Forum. 2011 年 7 月 9 日。小樽
- ⑫ 石井功。システイン生合成・硫化水素産生系の破綻によるマウス病態。第 11 回日本 NO 学会学術集会シンポジウム。2011 年 5 月 13 日。東京
- ⑬ 石井功、赤星軌征、山田秀典、中埜信太郎、和泉孝志、末松誠。Diet-induced acute lethal myopathy in mice lacking cystathionine gamma-lyase. 第 83 回日本生化学会大会。2010 年 12 月 10 日。神戸。
- ⑭ 赤星軌征、末松誠、石井功。高ホモシステイン血症マウスにおける妊娠高血圧症と蛋白尿。第 83 回日本生化学会大会。2010 年 12 月 7 日。神戸
- ⑮ 石井功、赤星軌征、山田秀典、久保亜紀子、末松誠、池田和貴、田口良。システイン生合成系の破綻による病態。第 35 回日本医用マクスベクトル学会。2010 年 9 月 9 日。名古屋

〔図書〕(計 1 件)

- ① Kamata S and Ishii I. Protective roles of transsulfuration against methionine toxicity. "Methionine: Biosynthesis, Chemical Structure and Toxicity, Chapter 8 (pp143-153)" Nova Science Publishers, Inc.

〔その他〕

ホームページ等
<http://www.pha.keio.ac.jp/laboratory/laboratory14.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石井 功 (Ishii Isao)
慶應義塾大学・薬学部・准教授
研究者番号：90292953

- (2) 研究分担者
なし
- (3) 連携研究者
なし