

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20390228

研究課題名(和文)

心筋レドックス応答におけるアミノ酸代謝の重要性

研究課題名(英文)

A role of amino acid metabolism in the oxidative stress response

研究代表者

佐野 元昭 (SANO MOTOAKI)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：30265798

研究成果の概要(和文):

脂肪族アルデヒドは活性酸素と比べて安定で膜も通過できるため細胞内を自由に拡散して、タンパク質や核酸などの生体高分子と付加体を形成する。したがって、脂質の過酸化物質、特に脂肪族アルデヒドは、酸化ストレスのメディエーターとして主要な役割を果たしている。我々はアルデヒドが細胞内アミノ酸インバランスを起こすことによって GCN2-eIF2α-pgα-ATF4 経路を活性化させ細胞内アミノ酸代謝を活性化することによって抗酸化ストレス応答を高めることを発見した。

研究成果の概要(英文):

We by contraries found that chronic exposure of aldehydes enhanced cardioprotection against ischemia-reperfusion injury in the transgenic mice exposed to elevated levels of aldehydes. The mechanism was revealed as that selective up-regulation of Atf4 under phosphorylation of eIF2 coordinately expressed sets of genes that are involved in amino acid biosynthesis and resistance to oxidative stress. However, an essential key point remains unknown as to how aldehydes are sensed to stimulate phosphorylation of eIF2 in a quantitative manner. In this study, we revealed that the intracellular levels of free histidine were selectively decreased by 50% in hearts exposed to elevated levels of aldehydes. In particular, a sensor of amino acid deficiency, GCN2 (general control nonderepressible 2), which is one of the eIF2 kinases, was activated. Interestingly, normalization of the intracellular levels of free histidine by feeding a high-histidine diet decreased the phosphorylation levels of GCN2 and eIF2 in hearts, resulting in the suppression of ATF4-mediated gene expression and cardioprotection against ischemia-reperfusion injury. An aldehyde, 4-hydroxy-2-nonenal directly reacts histidine to decrease intracellular free histidine levels, culminating in the phosphorylation of eIF2 in wild-type cells, but not in GCN2<sup>-/-</sup> cells. Thus, GCN2 senses aldehyde stress in a quantitative manner by monitoring a decline in intracellular free histidine levels. This must be a novel and common scheme as an important sensor of oxidative stress.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	7,700,000	2,310,000	10,010,000
2009年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
2010年度	2,800,000	840,000	3,640,000
総計	14,600,000	4,380,000	18,980,000

研究分野：分子循環器病学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：心筋代謝，抗酸化ストレス応答，レドックス制御

1. 研究開始当初の背景

酸化的エネルギー合成過程の副産物としてミトコンドリアの電子伝達系から活性酸素が生じる。活性酸素が膜脂質の構成成分である不飽和脂肪酸を攻撃してラジカル連鎖反応をおこすと脂質ペルオキシラジカル(LOO•)、脂質ヒドロペルオキシド(LOOH)などの過酸化脂質が生じる。過酸化脂質がさらに酸化分解をおこすと脂肪酸アルデヒドが出来る。脂肪酸アルデヒドは活性酸素と比べて安定で膜も通過できるため細胞内を自由に拡散して、タンパク質や核酸などの生体高分子と付加体を形成する。したがって、脂質の過酸化物、特に脂肪酸アルデヒドは、酸化ストレスのメディエーターとして主要な役割を果たしている。生体において、脂質の過酸化物を除去する抗酸化機構として主要な役割を担っている分子はグルタチオン(GSH)である。グルタチオンは、それ自身が還元物質として脂質ペルオキシラジカル(LOO•)を消去するだけでなく、グルタチオンペルオキシダーゼ(GPx)とよばれる酵素の“基質”として作用し、脂肪酸アルデヒドの前駆体でもある脂質ヒドロペルオキシド(LOOH)を脂質ペルオキシド(LOOH)に還元し除去する役割を担っている。この結果、酸化されたグルタチオン(GSSG)は、グルタチオン還元酵素の働きで、主としてペントースリン酸経路で合成される“補酵素”NADPHを電子供与体として利用して還元型に戻る(グルタチオンレドックスサイクル)。GSHの合成を薬理的に減少させたり、ペントースリン酸経路への代謝流速を妨げてNADPHの供給を妨げると心筋細胞の収縮機能や生存に悪影響を及ぼすことから、グルタチオンレドックスサイクルを正常に維持することが、心筋細胞の恒常性維持にとって必須であると考えられる。

アルデヒド脱水素酵素(ALDH)はアルデヒドの無毒化を司っている酵素のひとつである。ALDHの中で活性酸素の発生源であるミトコンドリアに局在するALDH2の変異体ALDH2\*2(4量体で作用するALDH2に

対して優勢抑制的に作用し、この遺伝子変異はヒトにおいてアルツハイマー病などの加齢性疾患発症との相関が分子疫学的調査で示されている)を全身に過剰発現させたトランスジェニック(TG)マウスを作製した。ALDH2\*2 Tgマウスは、

(1)脂質アルデヒドに対するALDH活性の低下に伴って脂質過酸化物(リン脂質ヒドロペルオキシド体、そのアルデヒド型代謝産物の増加と4-HNE付加体の上昇を認めた。

(2)筋萎縮、骨密度の低下、亀背、神経細胞変性による記憶障害など老化類似の表現型を呈した。

(3)対照的に心筋の収縮機能は正常であり、虚血再還流障害による酸化ストレス障害に対して抵抗性を示した。

(4)遺伝子発現様式と代謝産物の量的変化を網羅的に解析した結果、ALDH2\*2 Tgマウスの心筋では 解糖系からペントースリン酸経路への代謝流速の変移によるNADPH供給増加、アミノ酸代謝経路の活性化を介するglutathione前駆体アミノ酸(Gly, Cys)の合成増加、リン脂質ヒドロペルオキシドからヒドロキシドへの還元反応の亢進が観察された。

(5)TGマウスの心筋において最も大きな発現上昇を示していた遺伝子は、アミノ酸合成酵素(3-phosphoglycerate dehydrogenase 122倍, asparagine synthetase 55.9倍, methylenetetrahydrofolate dehydrogenase 47.8倍, phosphoserine aminotransferase 110.9倍)、アミノ酸のトランスポーター(cationic amino acid transporter, y+ system, member 3 18.9倍, member 5 17.12倍, member 4 16.25倍)であったことからアミノ酸代謝が転写制御を介した心筋レドックス応答において重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

2. 研究の目的

ALDH2\*2 TGマウスの心臓では代謝過程の動的変化を介して抗酸化反応の維持に必要な補酵素NADPHとグルタチオンペルオ

キシダーゼ反応の基質となるグルタチオンの供給を増加させることによって酸化ストレスに対する防御機構を樹立していることが明らかになった。本研究では、特に遺伝子レベルで代謝酵素の発現誘導が顕著であったアミノ酸代謝経路に着目して、その活性化の分子メカニズムを gain-of-、loss-of-function の実験とマウス遺伝子工学的手法を駆使して明らかにしていく。

### 3. 研究の方法

(1) 心筋におけるセリン合成系路の生理学的意義の検討

酸化ストレスによって最も強く誘導されたアミノ酸代謝酵素遺伝子は、解糖系の中間代謝産物 3-phosphoglycerate からセリンを合成する最初の反応を触媒する酵素 Phgdh (3-phosphoglycerate dehydrogenase) であった。この酵素を培養心筋細胞、マウス心臓においてノックアウトし、細胞(組織)内の還元型、酸化型グルタチオン含量の変化や酸化ストレスに対する抵抗性の変化を観察する。

(2) 過酸化脂質由来アルデヒドによって誘導されるアミノ酸代謝活性化の分子メカニズムの解明

細胞内過酸化脂質アルデヒドの蓄積をどのように感知し、シグナルを伝達し、最終的にアミノ酸代謝酵素の誘導へと導くのか、その分子メカニズムの全貌を解明していく。

### 4. 研究成果

(1) 心筋におけるセリン合成系路の生理学的意義の検討

酸化ストレスによって最も強く誘導されたアミノ酸代謝酵素遺伝子は、解糖系の中間代謝産物 3-phosphoglycerate からセリンを合成する最初の反応を触媒する酵素 Phgdh (3-phosphoglycerate dehydrogenase) であった。13C-ラベルしたグルコースを ex vivo (Langendorff 摘出灌流心) および in vivo の心臓に取り込ませると、ラベル体に入った解糖系の中間代謝産物の増加に加えて、酸化ストレスマウスの心臓においてラベル体に入ったセリンが著明に増加していた。この結果は、慢性的な酸化ストレス状態にある心臓において、糖代謝が活性化し、さらに、アミノ酸セリンの合経路が活性化していることを意味する。

心筋特異的 Phgdh ノックアウトマウスを複製して、セリン合成経路の活性化の心筋酸化ストレス応答機構への関与を検討中である。

(2) 過酸化脂質由来アルデヒドによって誘導されるアミノ酸代謝活性化の分子メカニ

ズムの解明

アルデヒドによる“ホルメシス”の分子機構は培養細胞レベルでの検討に限られ個体レベルでの解明はまったくなされてこなかった。我々は、ALDH2\*2 TG マウスの心臓において観察された特徴的な遺伝子発現パターンの変化に着目した。アミノ酸合成酵素 (3-phosphoglycerate dehydrogenase, asparagine synthetase, methylenetetrahydrofolate dehydrogenase, phosphoserine aminotransferase 1)、アミノ酸のトランスポーター (cationic amino acid transporter, y+ system) など顕著に誘導されていた遺伝子は、アミノ酸飢餓応答として GCN2-eIF2-ATF4 経路を介して誘導されることが知られている。心筋細胞内遊離アミノ酸の中で、ヒスチジン (52%) とリジン (24%) が TG マウスにおいて選択的に減少していた。ウエスタンブロットの結果、TG マウスの心臓において GCN2 と eIF2 のリン酸化 (= 活性化)、転写因子 ATF4 の蛋白レベルでの発現亢進が確認された。また、GCN2<sup>-/-</sup>胎児線維芽細胞に ALDH2\*2 を発現させても野生型胎児線維芽細胞において観察されるアミノ酸の代謝に関わる酵素の遺伝子発現上昇が認められなかった。また、脂質過酸化由来アルデヒドのひとつ 4-ヒドロキシ-2-ノネナール (4-HNE) で刺激すると GCN2 のリン酸化が観察された。この結果は、GCN2-eIF2-ATF4 経路が心筋レドックス応答を制御する中心的な役割を果たしている可能性を示唆している。

また、高ヒスチジン食によって細胞内ヒスチジン濃度を補正することによって、ALDH2\*2 TG マウスの表現型、遺伝子発現様式、GCN2-eIF2-ATF4 経路の活性化が抑制されるか否かを検討した。離乳(生後3週間)後から高ヒスチジン餌を投与した ALDH2\*2 TG マウスでは、筋組織中のヒスチジン濃度が正常化し、骨格筋、心筋重量、心筋アミノ酸代謝酵素の誘導がともに約 50% 程度抑制されていた。

最後に、アルデヒドによる生体高分子障害の程度を感知する機構と細胞内アミノ酸イオンバランス(特にヒスチジン、リジンの低下)との間にどのような因果関係が成り立つのかを検討した。4-ヒドロキシ-2-ノネナール (4-HNE) に代表される不飽和脂肪族アルデヒドがタンパク質のアミノ酸残基と Michael 付加体を形成するさいには、主としてアミノ酸のヒスチジン、リジン、システインを好んで標的にすることが知られている。試験管内で、ヒスチジンと 4-HNE を混ぜると様々な異性体を含む“ヒスチジン-4-HNE 付加体”の形成が確認された。

したがって、アルデヒドの蓄積が、容量依存性に細胞内の遊離ヒスチジン、リジンを減少させ、これが、アミノ酸飢餓として GCN2 に感知され、下流のシグナル伝達系を活性化している可能性が示唆された。

#### 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 13 件)

1. Shimizu N, Yoshikawa N, Ito N, Maruyama T, Suzuki Y, Takeda S, Tagata Y, Nishitani S, Takehana K, Sano M, Fukuda K, Suematsu M, Morimoto C, Tanaka H. Crosstalk between glucocorticoid receptor and nutritional sensor mTOR in skeletal muscle. **Cell Metab.** 13(2):170-82. (2011) 査読有
2. Kinouchi K, Ichihara A, Sano M, Sun Wada GH, Wada Y, Kurauchi Mito A, Bokuda K, Narita T, Oshima Y, Sakoda M, Tamai Y, Sato H, Fukuda K, Itoh H. The (pro)renin receptor/ATP6AP2 is essential for vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase assembly in murine cardiomyocytes. **Circ Res.** 107(1):30-4. (2010) 査読有
3. Sano M Cardioprotection by hormetic response to aldehyde. **Circ J.** 74(9):1787-93 (2010) 査読有
4. Zhang Y, Sano M, Shinmura K, Tamaki K, Katsumata Y, Matsuhashi T, Morizane S, Ito H, Hishiki T, Endo J, Zhou H, Yuasa S, Kaneda R, Suematsu M, Fukuda K. 4-Hydroxy-2-nonenal protects against cardiac ischemia-reperfusion injury via the Nrf2-dependent pathway. **J Mol Cell Cardiol.** 49(4):576-86 (2010) 査読有
5. Sano M. Mitochondrial protection and the reversal of left ventricular remodeling. **Circ J.** 73(11):2017-8 (2009) 査読有
6. Endo J, Sano M, Katayama T, Hishiki T, Shinmura K, Morizane S, Matsuhashi T, Katsumata Y, Zhang Y, Ito H, Nagahata Y, Marchitti S, Nishimaki K, Wolf AM, Nakanishi H, Hattori F, Vasiliou V, Adachi T, Ohsawa I, Taguchi R, Hirabayashi Y, Ohta S, Suematsu M, Ogawa S, Fukuda K. Metabolic Remodeling Induced by Mitochondrial Aldehyde Stress Stimulates Tolerance to Oxidative Stress in the Heart. **Circ Res.** 105(11):1118-27. (2009) 査読有
7. Yoshikawa N, Nagasaki M, Sano M,

Tokudome S, Ueno K, Shimizu N, Imoto S, Miyano S, Suematsu M, Fukuda K, Morimoto C, Tanaka H. Ligand-based gene expression profiling reveals novel roles of glucocorticoid receptor in cardiac metabolism. **Am J Physiol Endocrinol Metab.** 296(6):E1363-73 (2009) 査読有

8. Tokudome S, Sano M, Shinmura K, Matsuhashi T, Morizane S, Moriyama H, Tamaki K, Hayashida K, Nakanishi H, Yoshikawa N, Shimizu N, Endo J, Katayama T, Murata M, Yuasa S, Kaneda R, Tomita K, Eguchi N, Urade Y, Asano K, Utsunomiya Y, Suzuki T, Taguchi R, Tanaka H, Fukuda K. Glucocorticoid protects heart from ischemia-reperfusion injury through activation of lipocalin-type prostaglandin D synthase-derived PGD2 biosynthesis. **J Clin Invest.** 119(6):1477-88 (2009) 査読有
9. Sano M, Fukuda K. Mitochondrial biogenesis by hormesis. **Circ Res.** 103:1191-3 (2008) 査読有
10. Shimizu N, Yoshikawa N, Wada T, Handa H, Sano M, Fukuda K, Suematsu M, Sawai T, Morimoto C, Tanaka H. Tissue- and context-dependent modulation of hormonal sensitivity of glucocorticoid-responsive genes by HEXIM1. **Mol Endocrinol.** 22(12):2609-23 (2008) 査読有
11. Yoshikawa N, Shimizu N, Sano M, Ohnuma K, Iwata S, Hosono O, Fukuda K, Morimoto C, Tanaka H. Role of the hinge region of glucocorticoid receptor for HEXIM1-mediated transcriptional repression. **Biochem Biophys Res Commun.** 371(1):44-9 (2008) 査読有
12. Hayashida K, Sano M, Ohsawa I, Shinmura K, Tamaki K, Kimura K, Endo J, Katayama T, Kawamura A, Kohsaka S, Makino S, Ohta S, Ogawa S, Fukuda K. Inhalation of hydrogen gas reduces infarct size in the rat model of myocardial ischemia-reperfusion injury. **Biochem Biophys Res Commun.** 373(1):30-5 (2008) 査読有
13. 佐野元昭 老化とアルデヒド 呼吸と循環 56(7) 733-736(2008)

[学会発表](計 18 件)

1. 佐野元昭. レドックスバランスと細胞機能 遺伝子改変マウスを用いた解析 アルデヒドに対するホルミシス効果による心筋保護。分子生物学会。(2010/12/7)神戸

2. 佐野元昭。ホルミシス効果による心筋抗酸化ストレス応答。第 10 回日本抗加齢医学会総会。(2010/6/6)神戸
  3. Sano M. Metabolic Response To Lifelong Mitochondrial Oxidative Stress. The 74nd Annual Meeting of the Japanese Circulation Society.(2010/3/5) Kyoto
  4. Sano M. Mitochondrial oxidative stress induces an integrated stress response in the heart. The 26th Annual Meeting of International Society for Heart Research (ISHR) Japanese Section. (2009/12/4) Sapporo
  5. 第 31 回心筋生検研究会シンポジウム：佐野元昭。ミトコンドリア酸化障害と心筋リモデリング。(2009/11/27)。大阪
  6. Sano M. Metabolic remodeling induced by mitochondrial aldehyde stress stimulates tolerance to oxidative stress in the heart. The 4th International Congress on Stress Response in Biology and medicine/The 4th Annual Meeting of The Biomedical Society for Stress Response (BSSR) 2009/10/7. Sapporo
  7. 佐野元昭。心筋脂質代謝からアプローチする新たな心不全治療戦略 メタボローム解析に基づく心筋機能制御 第 82 回日本薬理学会シンポジウム (2009/3/16)横浜
  8. 佐野元昭。循環器疾患におけるミネラルコルチコイドとグルココルチコイド。山口大学二内科フォーラム。(2009/1/13)。山口。
  9. 佐野元昭。アルデヒド蓄積モデルマウスからみた加齢性疾患発症の分子機序の解明。第 30 回心筋生検研究会。(2008/11/28)。三重
  10. 佐野元昭。アルデヒドに対する臓器特異的ストレス応答。第9回 Cardiovascular Regeneration。(2008/11/22)。京都。
  11. 佐野元昭。メタボローム・トランスクリプトーム統合解析による組織特異的アルデヒドストレス応答機構の解明。第 3 回メタボロームシンポジウム。(2008/10/30)鶴岡
  12. 佐野元昭。細胞内低分子代謝産物(メタボローム)の定量情報から心臓病態生理を理解する新しい試み。神奈川心不全フォーラム。(2008/10/25)横浜
  13. Sano M. ATF4-dependent metabolic shift towards Phgdh-mediated serine synthesis enhanced cardioprotection to oxidative stress as a hormetic response to aldehydes. Lipid peroxidation 2008 (2008/10/17), Karuizawa, Japan
  14. 佐野元昭。セリン合成酵素はアルデヒドによって誘導される心筋抗酸化ストレス応答において重要な役目を果たす。第 33 回日本医用マスメクトル学会。(2008/9/25)。東京。
  15. 佐野元昭。新しい抗酸化治療法：水素ガスの吸入による心筋虚血再灌流障害治療法。大阪大学レジデントセミナー。(2008/8/29)。大阪。
  16. Sano M. The metabolic remodeling induced by the aldehyde stress stimulates favorable tolerance to oxidative stress. Basic Cardiovascular Sciences Conference (early career young investigator award) (2008/7/29) Keystone, Colorado, USA.
  17. 佐野元昭。抗酸化ストレス酵素としてのアルデヒド脱水素酵素の意義。第 61 回日本酸化ストレス学会学術集会。(2008/6/20) 京都。
  18. Sano M. Metabolic shift towards the Phgdh-mediated serine synthesis enhanced cardioprotection to oxidative stress. International Society for Biomedical Research on Alcoholism (ISBRA)/ Research Society on Alcoholism (RSA) Symposium. (2008/6/2) Washington, D.C., USA
- 〔図書〕(計 4 件)
1. 佐野元昭 医学のあゆみ：心筋ミトコンドリアの酸化的障害に対する代謝応答 医歯薬出版株式会社 232 巻 58887-8891 (2010)
  2. 佐野元昭。「心不全発症のメカニズム」酸化ストレスと心筋老化 Bio Clinica. 10 巻 891-896 (2009)
  3. 佐野元昭, 菱木貴子, 末松 誠, 中西広樹, 田口 良. Annual Review 循環器 2009 中外医学社 25-28 (2009)
  4. 佐野元昭。アンチエイジング医学の基礎と臨床(改訂 2 版) Medical Review 社 372-375 (2008)
- 〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)  
取得状況(計 0 件)
- 〔その他〕  
なし
6. 研究組織  
(1)研究代表者  
佐野元昭(SANO MOTOAKI)  
慶應義塾大学・医学部・講師  
研究者番号：30265798

(2)研究分担者  
なし

(3)連携研究者  
なし