

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460072

研究課題名(和文) 含硫アミノ酸代謝と虚血再灌流障害からの心保護機構との関連解析

研究課題名(英文) Functional relationship between metabolism of sulfur-containing amino acids and cardioprotection from ischemia-reperfusion injury

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：血中ホモシステイン(Hcy)濃度の上昇は心血管病発症の危険因子として知られるが、その機序については未だ不明である。我々はHcyからシステインを生合成するトランススフレーション経路に必須の二酵素で、生体内硫化水素の産生酵素でもあるCBSとCTHのそれぞれの遺伝子欠損マウスの解析を通して、その全容解明を目指している。本研究課題では、ホモシステインの新規作用機序として、Hcyが生体内の硫化水素を直接トラップ(Hcyパーサルフィド形成)し、その生理作用(細胞保護など)に拮抗する可能性を指示する実験結果が得られた。したがって、硫化水素シグナルの制御がホモシステイン病態改善に寄与する可能性が考えられる。

研究成果の概要(英文)：Elevated levels of homocysteine in plasma are considered as a risk factor for cardiovascular diseases; however, how homocysteine works are still largely unclear. We aim to reveal its molecular mechanisms through investigating genetically engineered mice lacking CBS and CTH, two trans-sulfuration enzymes essential for cysteine biosynthesis from homocysteine as well as for endogenous production of bioactive (cell-protective) hydrogen sulfide production. In this project, we obtained experimental evidence as a novel mechanism of homocysteine actions that homocysteine directly captures a hydrogen sulfide anion (by forming homocysteine persulfide), thereby counteracting their biological effects. Our results suggest that the regulation of hydrogen sulfide signaling may contribute to the amelioration of homocysteine-related cardiovascular diseases.

研究分野：生化学・病態生理学

キーワード：ホモシステイン システイン 硫化水素 心血管病 危険因子 活性イオウ分子 虚血再灌流障害 硫黄転移経路

1. 研究開始当初の背景

哺乳動物において、必須アミノ酸の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(Hcy)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 H₂S 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、Hcy 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 上昇により冠動脈疾患発症リスクは 1.6 倍になることが報告されている。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ニン シンターゼ(CBS)とシスタチオニン リアーゼ(CTH)はともに生体内 H₂S 産生酵素としても知られる。H₂S は血管平滑筋弛緩や神経機能調節に関わ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 Hcy 代謝と H₂S 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を用いた解析を行っている。

2. 研究の目的

現在わが国における死因の 2 位と 4 位を占める心疾患や脳血管疾患などの虚血性疾患においては、虚血時より再灌流時における(酸化的)細胞障害が大きいとされる。我々はマウスランゲンドルフ灌流心を用いた虚血再灌流障害実験において、二日間絶食したマウス個体から調製した心臓はその心筋障害が大きく抑えられていること、そしてその心臓で CBS の遺伝子発現誘導が見られることを見出した。本研究は絶食による心筋保護作用を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1)ランゲンドルフ灌流心による心機能評価系の確立：慶應義塾大学医学部の新村健博士の協力を得て、虚血再灌流障害や遺伝子欠損による心機能の評価のためのランゲンドルフ灌流システムを立ち上げた。それにより eNOS 欠損マウス、CBS 欠損マウス、CTH 欠損マウスの絶食時あるいは虚血再灌流障害時による再現性のある心機能評価が可能となった(論文 12, 13)。

(2)絶食による心臓タンパク質リモデリングの解析：タンパク質リモデリングの評価のために、2D-DIGE によるタンパク質量比較評価系を立ち上げた。そして、アセトアミノフェン肝障害時の CTH 欠損マウスにおける肝臓タンパク質変化(論文 14)、絶食時の野生型マウスにおける肝臓タンパク質変化(論文 12)、

また CBS 欠損マウス脂肪肝における肝臓・血中タンパク質変化(論文 12)を調べた。絶食による影響は、他の主要臓器においても調べている(論文 9、他投稿中)。

(3)CTH 欠損マウスの機能解析：CTH 欠損マウスにおける 虚血再灌流時の腎障害(論文 1)、心・腎・肺・脳的主要臓器におけるタンパク質 S-persulfidation レベルの評価(論文 3)、アセトアミノフェン肝障害に対する脆弱性の複合要因(論文 5, 6, 14)、肺発達の傷害(論文 7)、シスタチオニン尿症成立の理由(論文 15)、薬物誘導急性膵炎における役割(論文 19)などを順次調べた。

4. 研究成果

絶食による心筋保護作用は、実験 1 日前のマウス腹腔内への H₂S ドナー(NaHS)の投与により模倣することができた。そして、C3H/HeJ 背景の CBS 欠損マウス、C57BL/6J 背景の CTH 欠損マウスのそれぞれで絶食による効果は確認されず、また NaHS 投与による心機能保護効果も確認できなかった。そこで両欠損マウスの共通項である高 Hcy 血症に着目し、野生型マウスに高メチオニン食を 1 週間自由摂餌させて中程度の高 Hcy 血症を誘導させたのち、NaHS の効果を試したところ、そこでも保護効果は観察されなかった。そこで、Hcy による HS 陰イオンの直接トラップを考えて、Hcy persulfide 産生を調べた。まず *in vitro* の系で Hcy と NaHS は効率よく反応し、Hcy persulfide を産生した。そして、*in vivo* の CTH 欠損マウス心臓においては野生型マウスに比べ、多量の Hcy persulfide 蓄積が確認された。すなわち、CTH 欠損マウスはそもそも H₂S の産生が低いだけでなく、わずかな内在性 H₂S も irregular に蓄積する Hcy にトラップされ、正常に機能し得ない可能性が示された。Hcy の新規作用機序として、Hcy persulfide 形成による H₂S 生理作用への作用拮抗が考えられた。

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 19 件)

Marko L, Ishii I, Gollasch M 他(13 人中 11 番目) Role of cystathionine gamma-lyase in immediate renal impairment and inflammatory response in acute ischemic kidney injury. *Sci Rep* in press (査読有)

Kitada Y, Ishii I, Morita H 他(16 人中 15 番目) Blockade of sphingosine 1-phosphate receptor 2 signaling attenuates high-fat diet-induced adipocyte hypertrophy and systemic glucose intolerance in mice.

Endocrinology 2016;157:1839-1851. (査読有)

DOI: 10.1210/en.2015-1768
Wedmann R, **Ishii I**, Filipovic MR 他(20人中13番目) Improved tag-switch method reveals that thioredoxin acts as deperoxidase and controls the intracellular levels of protein persulfidation. *Chem Sci* 2016;7:3414-3426. (査読有)
DOI: 10.1039/C5SC04818D
Klionsky DI, **Ishii I** 他(2468人中896番目) Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy* 2016;12:1-222. (査読有)
DOI: 10.1080/15548627.2015.1100356
Ishii I, Kamata S, Hagiya Y, Abiko Y, Kasahara T, Kumagai Y. Protective effects of hydrogen sulfide anions against acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice. *J Toxicol Sci* 2015;40:837-841. (査読有)
DOI: 10.2131/jts.40.837
Abiko Y, **Ishii I**, Kamata S, Tsuchiya Y, Watanabe Y, Ihara H, Akaike T, Kumagai Y. Formation of sulfur adducts of *N*-acetyl-*p*-benzoquinoneimine, an electrophilic metabolite of acetaminophen in vivo: participation of reactive persulfides. *Chem Res Toxicol* 2015;28:1796-1802. (査読有)
DOI: 10.1021/acs.chemrestox.5b00245
Madurga A, **Ishii I**, Morty RE 他(13人中4番目) The H₂S-generating enzymes cystathionine beta-synthase and cystathionine gamma-lyase play a role in vascular development during normal lung alveolarization. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2015;309:L710-L724. (査読有)
DOI: 10.1152/ajplung.00134.2015
Kamata S, Akahoshi N, **Ishii I**. 2D DIGE proteomic analysis highlights delayed postnatal repression of alpha-fetoprotein expression in homocystinuria model mice. *FEBS Open Bio* 2015;5:535-541. (査読有)
DOI: 10.1016/j.fob.2015.06.008
Yamamoto J, Kamata S, Miura A, Nagata T, Kainuma R, **Ishii I**. Differential adaptive responses to 1- or 2-day fasting in various mouse tissues revealed by quantitative PCR analysis. *FEBS Open Bio* 2015;5:357-368. (査読有)
DOI: 10.1016/j.fob.2015.04.012
Abiko Y, Yoshida E, **Ishii I**, Fukuto JM, Akaike T, Kumagai Y. Involvement of reactive persulfides in biological dimethylmercury sulfide formation. *Chem Res Toxicol* 2015;28:1301-1306. (査読有)

DOI: 10.1021/acs.chemrestox.5b00101
Shinkai Y, Abiko Y, Ida T, Miura T, Kakehashi H, **Ishii I**, Nishida M, Sawa T, Akaike T, Kumagai Y. Reactive sulfur species-mediated activation of the Keap1-Nrf2 pathway by 1,2-naphthoquinone through sulfenic acids formation under oxidative stress. *Chem Res Toxicol* 2015;28:838-847. (査読有)
DOI: 10.1021/tx500416y
Nakano S, **Ishii I**, Shinmura K, Tamaki K, Hishiki T, Akahoshi N, Ida T, Nakanishi T, Kamata S, Kumagai Y, Akaike T, Fukuda K, Sano M, Suematsu M. Hyperhomocysteinemia abrogates fasting-induced cardioprotection against ischemia/reperfusion by limiting bioavailability of hydrogen sulfide anions. *J Mol Med* 2015;93:879-889. (査読有)
DOI: 10.1007/s00109-015-1271-5
Shinmura K, Tamaki K, Ito K, Yan X, Yamamoto T, Katsumata Y, Matsushashi T, Sano M, Fukuda K, Suematsu M, **Ishii I**. Indispensable role of endothelial nitric oxide synthase in caloric restriction-induced cardioprotection against ischemia/reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2015;308:H894-H903. (査読有)
DOI: 10.1152/ajpheart.00333.2014
Hagiya Y, Kamata S, Mitsuoka S, Okada N, Yoshida S, Yamamoto J, Ohkubo R, Abiko Y, Yamada H, Akahoshi N, Kasahara T, Kumagai Y, **Ishii I**. Hemizygoty of transsulfuration genes confers increased vulnerability against acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 2015;282:195-206. (査読有)
DOI: 10.1016/j.taap.2014.11.015
Akahoshi N, Kamata S, Kubota M, Hishiki T, Nagahata Y, Matsuura T, Yamazaki C, Yoshida Y, Yamada H, Ishizaki Y, Suematsu M, Kasahara T, **Ishii I**. Neutral aminoaciduria in cystathionine beta-synthase-deficient mice, an animal model of homocystinuria. *Am J Physiol Renal Physiol* 2014;306:F1462-F1476. (査読有)
DOI: 10.1152/ajprenal.00623.2013
Kamata S, Yamamoto J, Kamijo K, Ochiai T, Morita T, Yoshitomi Y, Hagiya Y, Kubota M, Ohkubo R, Kawaguchi M, Himi T, Kasahara T, **Ishii I**. Dietary deprivation of each essential amino acid induces differential systemic adaptive responses in mice. *Mol Nutr Food Res* 2014;58:1309-1321. (査読有)

DOI: 10.1002/mnfr.201300758

Ishii I. Reconsideration of homocysteinemia. *Seikagaku* 2013;85:1067-1071. (査読無)

Okamoto M, Yamaoka M, Takei M, Ando T, Taniguchi S, **Ishii I.**, Tohya K, Ishizaki T, Niki I, Kimura T. Endogenous hydrogen sulfide protects pancreatic beta-cells from a high-fat diet-induced glucotoxicity and prevents the development of type 2 diabetes. *Biochem Biophys Res Commun* 2013;442:227-233. (査読有)

DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.11.023

Ang A, Rivers J, Hedge A, **Ishii I.**, Bhatia M. The effect of CSE gene deletion in caerulein-induced acute pancreatitis in the mouse. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2013;305:G712-G721. (査読有)

DOI: 10.1152/ajpgi.00044.2013

[学会発表](計 27 件)

Ishii I. H₂S and homocysteine: new insights from two hyperhomocysteinemic mutant mouse strains that lack H₂S-generating enzymes. The 95th German Physiological Society Annual Meeting Symposium. 2016年3月5日. University of Lübeck, Lübeck, Germany.

石井功, 中埜信太郎, 新村健, 玉城香代子, 菱木貴子, 赤星軌征, 井田智章, 中西豪, 鎌田祥太郎, 熊谷嘉人, 赤池孝章, 福田恵一, 佐野元昭, 末松誠. 心虚血再灌流障害におけるホモシステインの新規作用機序. 第38回日本分子生物学会年会・第88回日本生化学会大会合同年会. 2015年12月4日. 神戸国際会議場(兵庫県・神戸市).

鎌田祥太郎, 山本隼也, 海沼亮, 大谷遥香, 戸坂優花, 笠原忠, **石井功**. 第38回日本分子生物学会年会・第88回日本生化学会大会合同年会. 2015年12月4日. 神戸国際会議場(兵庫県・神戸市).

Yoshioka T, Goto S, Okuda Y, Kubo A, **Ishii I.**, Hishiki T, Yamamoto T, Takano N, Hoshino T, Nakamura T, Suematsu M, Kajimura M. The spatial distribution of glutathione persulfide in the mouse lens revealed by atmospheric-pressure MALDI MS imaging. 第38回日本分子生物学会年会・第88回日本生化学会大会合同年会. 2015年12月4日. 神戸国際会議場(兵庫県・神戸市).

戸坂優花, 大谷遥香, 三浦あす美, 長田知子, 鎌田祥太郎, **石井功**. 食餌誘導性高ホモシステイン血症感受性マウスの解析. 第59回日本薬学会関東支部大会. 2015年9月12日. 日本大学薬学部(千葉県・船橋市). 鎌田祥太郎, 山本隼也, 三浦あす美, 長田知子, 海沼亮, **石井功**. 短期絶食によるマ

ウス全身性応答1(臓器別遺伝子発現変化). 第59回日本薬学会関東支部大会. 2015年9月12日. 日本大学薬学部(千葉県・船橋市). 大谷遥香, 山本隼也, 戸坂優花, 鎌田祥太郎, **石井功**. 短期絶食によるマウス全身性応答2(臓器別タンパク質発現変化). 第59回日本薬学会関東支部大会. 2015年9月12日. 日本大学薬学部(千葉県・船橋市).

石井功, 安孫子ユミ, 鎌田祥太郎, 熊谷嘉人. システイン・活性イオウ分子産生酵素CSEのアセトアミノフェン肝障害における保護的役割. 第42回日本毒性学会学術年会シンポジウム. 2015年6月30日. 石川県立音楽堂(石川県・金沢市).

石井功, 中埜信太郎, 新村健, 玉城香代子, 菱木貴子, 赤星軌征, 井田智章, 中西豪, 鎌田祥太郎, 熊谷嘉人, 赤池孝章, 福田恵一, 佐野元昭, 末松誠.

Hyperhomocysteinemia abrogates fasting-induced cardioprotection against ischemia/reperfusion. 第16回 Pharmaco-Hematologyシンポジウム. 2015年6月13日. 日本薬学会長井記念館(東京都・渋谷区).

鎌田祥太郎, 赤星軌征, **石井功**. 高ホモシステイン血症マウスにおける血中

-fetoprotein蓄積. 第16回 Pharmaco-Hematologyシンポジウム. 2015年6月13日. 日本薬学会長井記念館(東京都・渋谷区).

鎌田祥太郎, 山本隼也, 上條健太, 落合崇人, 森田珠子, 吉富友里香, 萩谷至史, 久保田将史, 大久保里香, 笠原忠, **石井功**. Adaptive responses against essential amino acid deficiency in mice. 日本アミノ酸学会第8回学術大会. 2015年11月9日. 東京農業大学(東京都・世田谷区).

石井功, 萩谷至史, 鎌田祥太郎, 光岡紗野, 吉田早織, 山本隼也, 大久保里佳, 笠原忠. アセトアミノフェン肝障害に対するトランススルフェーション酵素の保護的役割. 第87回日本生化学会大会. 2014年10月18日. 兵庫県・神戸市.

鎌田祥太郎, 山本隼也, 上條健太, 落合崇人, 森田珠子, 吉富友里香, 萩谷至史, 久保田将史, 大久保里香, 笠原忠, **石井功**. 各必須アミノ酸欠失餌により異なるマウスの全身性適応応答. 第87回日本生化学会大会. 2014年10月18日. 神戸国際会議場(兵庫県・神戸市).

山本隼也, 鎌田祥太郎, 笠原忠, **石井功**. 絶食によるマウス各臓器の適応応答とリモデリング. 第87回日本生化学会大会. 2014年10月18日. 神戸国際会議場(兵庫県・神戸市).

赤星軌征, 鎌田祥太郎, 久保田将史, 菱木貴子, 長畑善子, 松浦友美, 山崎千穂, 吉田由香, 山田秀典, 石崎泰樹, 末松誠, 笠原忠, **石井功**. Neutral aminoaciduria in cystathionine beta-synthase-deficient

- mice, an animal model of homocystinuria . 第87回日本生化学会大会 . 2014年10月18日 . 神戸国際会議場(兵庫県・神戸市) .
- 岡田憲彦、山本隼也、鎌田祥太郎、萩谷至史、笠原忠、**石井功** . アセトアミノフェン肝障害におけるタンパク質発現変化のProteome解析 . 第58回日本薬学会関東支部大会 . 2014年10月4日 . 昭和薬科大学(東京都・町田市) .
- 軽部勝仁、三浦あす美、長田知子、鎌田祥太郎、**石井功** . 食餌アミノ酸センシングによる摂食抑制 . 第58回日本薬学会関東支部大会 . 2014年10月4日 . 昭和薬科大学(東京都・町田市) .
- 光岡紗野、吉田早織、大久保里香、山本隼也、鎌田祥太郎、萩谷至史、笠原忠、**石井功** . Cys生合成酵素欠損マウスにおける肝GSH生合成律速酵素の活性化 . 第58回日本薬学会関東支部大会 . 2014年10月4日 . 昭和薬科大学(東京都・町田市) .
- 三浦あす美、長田知子、山本隼也、鎌田祥太郎、**石井功** . 食餌誘導性高ホモシステイン血症マウスの解析 . 第58回日本薬学会関東支部大会 . 2014年10月4日 . 昭和薬科大学(東京都・町田市) .
- 長田知子、三浦あす美、山本隼也、鎌田祥太郎、**石井功** . 非必須アミノ酸欠乏によるマウス血中アミノ酸濃度変化 . 第58回日本薬学会関東支部大会 . 2014年10月4日 . 昭和薬科大学(東京都・町田市) .
- 21 菅澤智秋、鎌田祥太郎、**石井功** . 3T3-L1脂肪前駆細胞の脂肪分化に対するホモシステインの効果 . 第58回日本薬学会関東支部大会 . 2014年10月4日 . 昭和薬科大学(東京都・町田市) .
- 22 **石井功** . 心虚血再灌流障害におけるホモシステインと硫化水素の拮抗作用 . 第14回日本N0学会学術集会シンポジウム . 2014年5月17日 . ホテルニューオータニ佐賀(佐賀県・佐賀市) .
- 23 吉田早織、萩谷至史、鎌田祥太郎、大久保里佳、笠原忠、**石井功** . アセトアミノフェン肝障害におけるGlutamate-Cysteine Ligaseの役割 . 第57回日本薬学会関東支部大会 . 2013年10月26日 . 帝京大学(東京都・板橋区) .
- 24 久保田将史、吉田早織、吉川紗弓、山本隼也、大久保里佳、鎌田祥太郎、萩谷至史、笠原忠、**石井功** . アミノ酸欠乏餌投与によるマウス体重変化と血中アミノ酸濃度変化 . 第57回日本薬学会関東支部大会 . 2013年10月26日 . 帝京大学(東京都・板橋区) .
- 25 吉川紗弓、鎌田祥太郎、山本隼也、大久保里佳、吉田早織、笠原忠、**石井功** . ホモシステイン尿症モデルマウス肝臓の2D-DIGEプロテオーム解析 . 第57回日本薬学会関東支部大会 . 2013年10月26日 . 帝京大学(東京都・板橋区) .
- 26 萩谷至史、鎌田祥太郎、山本隼也、吉田早織、笠原忠、**石井功** . アセトアミノフェン

- 肝障害増悪化の遺伝的素因としてのシステイン生合成酵素欠損 . 第86回日本生化学会大会 . 2013年10月26日 . パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市) .
- 27 鎌田祥太郎、赤星軌征、吉川紗弓、笠原忠、**石井功** . 高ホモシステイン血症モデルマウスの血漿プロテオーム解析 . 第86回日本生化学会大会 . 2013年10月26日 . パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市) .

〔図書〕(計2件)

渡邊泰男、**石井功**、藤栄治 . RSSの生合成系とタンパク質機能制御 . 細胞工学 2015;34:372-376 . 秀潤社 .

石井功 . ホモシステイン血症再考 . 生化学 . 2013;85:1067-1071 . 日本生化学会 .

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