

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26350957

研究課題名(和文) 周産期における薬剤応答性アミノプロダクトの探索と薬剤作用機序の解析

研究課題名(英文) Search for the drug-responsive aminoproduct during the perinatal period and analysis of its reactive mechanism.

研究代表者

加香 孝一郎 (KAKO, Koichiro)

筑波大学・生命環境系・講師

研究者番号：60311594

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：妊娠高血圧モデルマウス(PAHマウス)へ投与された降圧剤に反応して、胎仔体内または母体血中でその濃度が変化するアミノ基含有物質(アミノプロダクト)として、それぞれエタノールアミン(Etn)とtele-メチルヒスタミン(tMH)を単離・同定した。妊娠後期の胎仔体内で高値であったEtnは、母体への血管収縮抑制剤(Hdz)及びアンジオテンシン受容体拮抗薬(ARB)投与に反応して、正常胎仔レベルまで改善が見られた。一方tMHは、Hdz投与のみで母体血中濃度の上昇が観察されたが、これは投与したHdzによりtMHの代謝酵素であるモノアミン酸化酵素Bの活性が、母体内で抑制された結果であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We identified ethanolamine (Etn) and tele-methylhistamine (tMH), as aminoproducts altering in embryonic tissue and maternal blood in response to antihypertensive drugs administered to pregnancy-associated hypertensive mouse. The high level of Etn in late-gestation embryo was responsive to the treatment with both the vasoconstriction suppressant (Hdz) and the angiotensin receptor antagonist (ARB), and ameliorated to normal level. On the other hand, the increase of maternal tMH level depended on the Hdz, not ARB. Since Hdz was shown to abrogate the enzymatic activity of monoamine oxidase B, a metabolic enzyme for tMH, as dose dependent manner in vitro, it is speculated that the inhibition of monoamine oxidase B by Hdz led to the increase of maternal tMH level.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：アミノ基 アミノプロダクト 妊娠高血圧 PAHマウス MALDI-QIT-TOF/MS LC-MS/MS

1. 研究開始当初の背景

申請者の所属する研究グループが、これまでに独自に開発してきた妊娠高血圧モデルマウス (PAH マウス: pregnancy-associated hypertensive mice) では、複数の降圧剤投与により正常血圧まで改善するにもかかわらず、降圧剤によっては心肥大や胎仔子宮内発育遅延など、他の周産期特有の症状についても治療効果を示すことが判明していた。

そこで、申請者はこれらの降圧剤にตอบสนองし、その効果や特異性を評価できる生体物質として、反応性に富み、多くの生体内化学反応の中心となるアミノ基を有する内因性低分子天然物アミノプロダクト (amino-natural product) に着目した。多くのペプチドホルモンやアミノ酸、アミン等がこれに含まれることから、PAH マウス体内で、正常妊娠マウスとは異なる動態を示すアミノプロダクトに着目した。

2. 研究の目的

前述の背景から、申請者は周産期疾患の治療に向けた基礎的知見の集積を目指して、アミノプロダクトの高精度検出系を確立し、薬剤にตอบสนองするアミノプロダクトの探索・同定と、その代謝制御の解明を目的とした。

3. 研究の方法

(1) アミノプロダクト同定・定量法の確立

アミノプロダクトは、アミノ基を有する主にアミンとその誘導体である。そこでアミノプロダクト検出・同定とその定量のために、以下の戦略で行った。

アミノ基のAQC誘導体化: アミノ基を特異的に蛍光標識するAQC基(6-アミノキノリルカルバミル基)を用いたHPLC分析によりサンプルを分離・分析する。

MALDI-QIT-TOF/MSによるアミノプロダクトの構造決定と同定: AQC基を手がかりに、マトリクス支援レーザー脱離/イオン化-四重極イオントラップ-飛行時間型質量分析法(MALDI-QIT-TOF/MS)により、MSⁿ解析を行うことで構造決定を行う。

LC-MS/MSによる定量分析: 液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析法(LC-MS/MS)により、同定されたアミノプロダクトの定量を行う。

(2) 周産期疾患モデルマウスを用いた薬剤応答性アミノプロダクト探索と薬剤応答性の評価

上記に上げた解析方法により、下記の手順で探索を行い、薬剤応答性を評価する。

PAHマウスで、野生型と比較して有意に変化しているアミノプロダクトを探索する。

で得られたアミノプロダクトが、降圧剤にตอบสนองして変動するかどうかを調べる。降圧剤投与により変動するアミノプロダクトを探索し、薬剤応答性を評価する。

(3) 薬剤応答性アミノプロダクトの生成/代謝経路の解明

同定されたアミノプロダクトが、薬剤投与によりどのような生成・代謝の結果変化したのかを代謝経路を追跡することで明らかにする。

4. 研究成果

(1) PAH妊娠19日目に有意に上昇し、降圧剤にตอบสนองして正常レベルに回復するアミノプロダクトの同定

妊娠19日目で正常妊娠マウスに比べPAHマウス胎仔組織で2倍程度上昇するアミノプロ

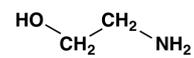


図1 エタノールアミン

ダクトを「3. 研究の方法」の(1)の方法で検出した。(1)の手法で、目的のアミノプロダクトを同定したところ、エタノールアミンであることが判明した(図1)。

そこでこのPAHマウスに、正常血圧にまで回復する濃度で、妊娠13日目より血管平滑筋弛緩剤のヒドララジン(Hdz)及びアンジオテンシン受容体拮抗薬(ARB)を投与したところ、それぞれの降圧剤で、胎仔組織のエタノールアミンの濃度が、いずれも正常妊娠胎仔の値まで回復した(図2)。

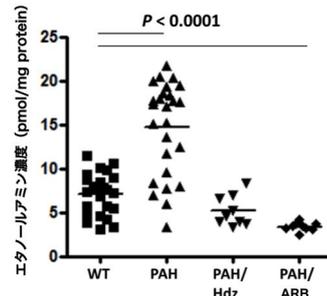


図2 降圧剤投与によるエタノールアミンの変化

この結果から、エタノールアミンが、2種の降圧剤の作用にตอบสนองするアミノプロダクトであることが判明した(論文10参照)。

(2) 血管平滑筋弛緩剤にのみตอบสนองして上昇するアミノプロダクトの同定

薬剤投与時のPAHマウスの母体側の変化として、ARB投与では変化しないものの、Hdz投与のみで血漿中に上昇してくるアミノプロダクトが検出された。そこでこの物質を単離し、前述(1)の手法で構造決定を行ったところ、ヒスタミン

の代謝物であるtele-メチルヒスタミン(tMH、図3)であることが判明した(論文5参照)。

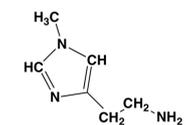


図3 tele-メチルヒスタミン

(3) Hdzは、モノアミン酸化酵素Bの活性阻害を通してtMHの代謝を抑制する

そこで、Hdz投与でtMHが増加する理由と

して、*t*MHの生成・代謝経路に着目した。*t*MHは、生体内でヒスタミン(HA)からヒスタミン*N*メチル基転移酵素(HNMT)により生成し、モノアミン酸化酵素B(MAO-B)により *tele*-メチルイミダゾール酢酸(*t*-MIAA)に代謝される(図4)。

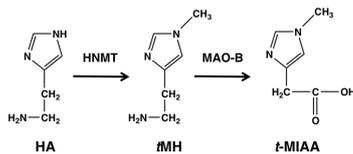


図4 HAの代謝

Hdzの投与では、HAの明らかな減少が認められな

かったことから、*t*HMの増加は生成の亢進ではなく、代謝の抑制が原因であることが予想された。そこで、*t*HMを基質としたMAO-B活性に対するHdz(橙色)の影響を調べる目的で、既知のMAO-A/Bの阻害剤であるトラニルシプロミン(TCP、赤)及びMAO-B特異的阻害剤であるラサギリン(rasagiline、緑色)をコントロールとして、酵素反応阻害実験を行った。その結果、HdzはMAO-B反応を*in vitro*で抑制した(図5)。

この結果から、PAHマウスへのHdz投与による*t*HMの増加は、*in vivo*でのMAO-B活性阻害に起因する可能性が示唆された。

Hdzは比較的副作用が少ない降圧剤として、臨床的にもしばしば使用されるが、作用機序や薬効と(軽度の頭痛や吐気等の)副作用との因果関係に関する情報が乏しいのが現状である。今回の研究結果は、妊娠高血圧治療におけるHdzの使用に関して、基礎的な知見を提供するものであると考えられる(論文5参照)。

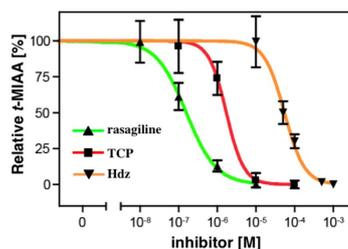


図5 HdzのMAO-B阻害効果

(4) 質量分析を用いた定性/定量測定系によるメチル化アミノ酸やメチル化ヌクレオシドの解析

(1)~(3)の研究成果を上げる過程で、確立した質量分析法(MALDI-QIT-TOF/MSやLC-MS/MS)を用いて、アミノ基を有するアミノ酸やヌクレオシドの測定技術を確立した。特に、アミノプロダクトの研究手法を応用することで、メチル化タンパク質(論文2、3、4、6参照)やメチル化RNA(論文1、7参照)の研究において、それぞれ加水分解して得られたメチル化アミノ酸やメチル化ヌクレオシドの定性/定量解析を行い、数多くの生化学的データを得て論文発表を行った。またデータの一部(メチル化アミノ酸及びメチル化ヌクレオシドのそれぞれの標準品)については、データベースとしてWeb上に公開した(〔その他〕ホームページ等参照)。

5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計12件)

- 1) Yokoyama W, Hirota K, Wan H, Sumi N, Miyata M, Araoi S, Nomura N, Kako K and Fukamizu A. rRNA adenine methylation requires T07A9.8 gene as rram-1 in *Caenorhabditis elegans*. *J. Biochem.* 163, 465-474 (2018) doi: 10.1093/jb/mvy018. (査読有)
- 2) Araoi S, Daitoku H, Yokoyama A, Kako K, Hirota K and Fukamizu A. The GATA transcription factor ELT-2 modulates both the expression and methyltransferase activity of PRMT-1 in *Caenorhabditis elegans*. *J. Biochem.* 163, 433-440 (2018). doi: 10.1093/jb/mvy012. (査読有)
- 3) Kanou A, Kako K, Hirota K, and Fukamizu A. PRMT-5 converts monomethylarginines into symmetrical dimethylarginines in *Caenorhabditis elegans*. *J. Biochem.* 161, 231-235 (2017) doi: 10.1093/jb/mvw066. (査読有)
- 4) Hirota K, Shigekawa C, Araoi S, Sha L, Inagawa T, Kanou A, Kako K, Daitoku H, and Fukamizu A. Simultaneous ablation of prmt-1 and prmt-5 abolishes asymmetric and symmetric arginine dimethylations in *Caenorhabditis elegans*. *J. Biochem.* 161, 521-527 (2017) doi: 10.1093/jb/mvw101. (査読有)
- 5) Kawasaki S, Kako K, Nagashima Y, Kanou A, Ishida J, and Fukamizu A. Hydralazine is involved in tele-methylhistamine metabolism by inhibiting monoamine oxidase B in pregnancy-associated hypertensive mice. *J. Biochem.* 161, 155-158 (2017) doi: 10.1093/jb/mvw090. (査読有)
- 6) Sha L, Daitoku H, Araoi S, Kaneko Y, Takahashi Y, Kako K, and Fukamizu A. Asymmetric arginine dimethylation modulates mitochondrial energy metabolism and homeostasis in *Caenorhabditis elegans*. *Mol. Cell. Biol.* 37, e00504-e00516 (2017) doi: 10.1128/MCB.00504-16 (査読有)
- 7) Waku T, Nakajima Y, Yokoyama W, Nomura N, Kako K, Kobayashi A, Shimizu T, and Fukamizu A. NML-mediated rRNA base methylation links ribosomal subunit formation to cell proliferation in a p53-dependent manner. *J. Cell Sci.* 129, 2382-2393 (2016) doi:10.1242/jcs.183723 (査読有)
- 8) Itoh Y, Fuchino H, Sanosaka M, Kako K, Hada K, Fukamizu A, Takemori H, and Kawahara N. Pteroin B has multiple targets in gluconeogenic programs, including coenzyme Q in ROR α -SRC2 signaling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 473, 415-420 (2016) doi:10.1016/j.bbrc.2016.03.016 (査読有)

- 9) Kim JD, Park KE, Ishida J, Kako K, Hamada J, Kani S, Takeuchi M, Namiki K, Fukui H, Fukuhara S, Hibi M, Kobayashi M, Kanaho Y, Kasuya Y, Mochizuki N, and Fukamizu A. PRMT8 as a phospholipase regulates Purkinje cell dendritic arborization and motor coordination. *Science Adv.* 1, e1500615 (2015) doi:10.1126/sciadv.1500615 (査読有)
- 10) Kako K, Nakamura A, Nagashima Y, Ishida J, and Fukamizu A. Detection of ethanolamine altering in fetuses of pregnancy-associated hypertensive mice treated with vasodepressors by using UPLC and MALDI-TOF/MS. *J. Chromatogr. B* 1006, 93-98 (2015) doi: 10.1016/j.jchromb.2015.10.018. (査読有)
- 11) Hamada J, Baasanjav A, Ono N, Murata K, Kako K, Ishida J, and Fukamizu A. Possible involvement of downregulation of the apelin-APJ system in doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 308, H931-H941 (2015) doi: 10.1152/ajpheart.00703.2013. (査読有)
- 12) Park KE, Kim JD, Nagashima Y, Kako K, Daitoku H, Matsui M, Park GG, and Fukamizu A. Detection of choline and phosphatidic acid (PA) catalyzed by Phospholipase D (PLD) using MALDI-QIT-TOF/MS with 9-aminoacridine matrix. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 78, 981-988 (2014) doi:10.1080/09168451.2014.910102. (査読有)
- [学会発表](計 17 件)
- 1) 石田純治、野口和之、金俊達、水上早瀬、陸偉哲、権哲源、加香孝一郎、石丸友博、川崎祥平、山縣邦弘、深水昭吉、ヒスタミン H3 アゴニストによる心腎病態への抗炎症プログラミング、生命科学系学会合同年次大会 神戸 2017 年
- 2) 加香孝一郎、川崎祥平、永島裕介、石田純治、深水昭吉、降圧剤応答性アミン代謝阻害の検討、第 20 回活性アミンに関するワークショップ つくば 2016 年
- 3) 加香孝一郎、川崎祥平、永島裕介、石田純治、深水昭吉、降圧剤によるモノアミンオキシダーゼ阻害作用に関する検討、第 38 回日本妊娠高血圧学会学術集会 さいたま 2016 年
- 4) Noguchi K, Ishida J, Ishimaru T, Kawasaki S, Kwon C, Kim JD, Kako K, Ohtsu H, Yamagata K, Fukamizu A., Histamine is involved in the pathophysiology of heart and kidney dysfunctions in mice, 3rd ERA-EDTA Congress, Vienna, AUSTRIA 2016
- 5) 金俊達、石田純治、加香孝一郎、濱田樹理、深水昭吉、ホスホリパーゼ活性を持つアルギニンメチル化酵素の小脳機能に対する役割、第 10 回炎症・メタボリサーチフォーラム 東京 2016 年
- 6) 狩野明彦、加香孝一郎、廣田恵子、深水昭吉、線虫を用いたタンパク質アルギニンメチル基転移酵素の探索、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大会 神戸 2015 年
- 7) 山内理恵子、廣田恵子、徐照、加香孝一郎、深水昭吉、生殖系列におけるメチオニン代謝の機能解析、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大会 神戸 2015 年
- 8) 小沼久里子、大徳浩照、平田優介、金子悠太、Eszter=Toth、有本光江、加香孝一郎、深水昭吉 転写因子 FOXO1/DAF-16 のグルコースに応答したアセチル化制御機構の解析、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大会 神戸 2015 年
- 9) 波田一誠、廣田恵子、稲野辺愛、加香孝一郎、深水昭吉、線虫の発生とアセチル化制御、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大会 神戸 2015 年
- 10) 金俊達、石田純治、加香孝一郎、濱田樹理、深水昭吉、Maintenance of phosphate metabolism in Purkinje cell dendritic arbors and motor coordination requires PRMT8 as phospholipase, 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大会 神戸 2015 年
- 11) 川崎祥平、加香孝一郎、永島裕介、石田純治、深水昭吉、降圧剤によるモノアミンオキシダーゼの阻害作用に関する研究、第 19 回日本心血管内分泌代謝学会学術総会 神戸 2015 年
- 12) 野口和之、石田純治、石丸友博、川崎祥平、権哲源、加香孝一郎、山縣邦弘、深水昭吉、ヒスタミンはヒスタミン H3 受容体を介して心腎連関の病態に保護的に作用する、第 6 回分子腎臓フォーラム 大阪 2015 年
- 13) 加香孝一郎、中村あゆみ、永島裕介、石田純治、深水昭吉、妊娠高血圧マウス胎仔において降圧剤応答性を示すエタノールアミンの同定、第 36 回日本妊娠高血圧学会 札幌 2015 年
- 14) 野口和之、石田純治、石丸友博、川崎祥平、金俊達、権哲源、加香孝一郎、山縣邦弘、深水昭吉、ヒスタミンの H3 受容体を介した心腎病態に対する作用の検討、Advans 研究会 2015 東京 2015 年
- 15) 加香孝一郎、永島裕介、石田純治、土屋敬広、嶋田崇史、深水昭吉、妊娠高血圧症候群病態に関与するアミノプロダクトの探索と同定、日本ケミカルバイオロジー学会第 9 回年会 大阪 2014 年
- 16) 加香孝一郎、永島裕介、金俊達、中村あゆみ、石田純治、嶋田崇史、土屋敬広、深水昭吉、妊娠後期マウス及び培養細胞におけるヒスタミンの生合成、第 18 回活

性アミンに関するワークショップ 高松
2014 年

- 17) 加香孝一郎、中村あゆみ、川崎祥平、永島裕介、石田純治、深水昭吉、妊娠高血圧モデルマウスにおいて増加するアミノプロダクトの同定、第 18 回日本心血管内分泌代謝学会学術総会 横浜 2014 年

〔その他〕

ホームページ等

・研究室ホームページ URL :

<http://akif2.tara.tsukuba.ac.jp>

・修飾アミノ酸データベース (MAADB)

<http://www.agbi.tsukuba.ac.jp/~akiftara/>

・メチル化ヌクレオシドデータベース (MNSDB)

<http://www.agbi.tsukuba.ac.jp/~akiftara/MNSDB/>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

加香 孝一郎 (KAKO, Koichiro)

筑波大学・生命環境系・講師

研究者番号 : 60311594