

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 24 日現在

機関番号：13301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670310

研究課題名(和文) 幹抗酸化物質リポ酸による細胞ストレス状態の解析

研究課題名(英文) Analysis of the metabolic pathway by the administration of lipid acid

研究代表者

松郷 誠一 (MATSUGO, SEIICHI)

金沢大学・自然システム学系・教授

研究者番号：30148126

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：抗酸化物質であるリポ酸は熱、光等の物理的な刺激に弱いために包接安定化することを検討した。水溶性シクロデキストリンと効率よく包接することを確認し、各種スペクトルにおいて確かめた。その過程でリポ酸のC-S、S-S結合がラマンスペクトルにおいて特徴的な波数を示すことが明らかになり、こうした特色を他の生体高分子(蛋白質)に生かせないかを検討した。また、リポ酸の細胞経路に及ぼす影響を網羅的に解析することにより全体像を把握しようとしてメタボローム解析を行なった所、リポ酸の投与はがん細胞のエネルギー経路にネガティブに働きかけ、ビルビン酸、乳酸の生成を抑え、糖新生の機構を抑制することが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Alpha-lipoic acid (LA) is a very powerful antioxidant. LA has two enantiomers, R(+)-LA and S(-)-LA (S-LA), of which R-LA is naturally occurring and an essential cofactor in energy metabolism. it is quite vulnerable to physical stimuli such as heat or irradiation. The inclusion complex of LA is promising to overcome this weakness. We prepared the CD-LA inclusion complex and analyzed its stability and spectroscopic characteristics. Raman spectroscopy showed the characteristics for its high sensitivity to C-S and S-S bonds, which can be applied to other bio-materials (protein). Next, we examined the time-course metabolites levels in LA-treated rat hepatoma and evaluated the effect of R-LA and the enantioselectivity. This study indicated that R-LA treatment inhibited the glycolysis pathway, the lactic acid production and the Gly-Thr-Ser pathway and finally caused the inhibition of the gluconeogenesis.

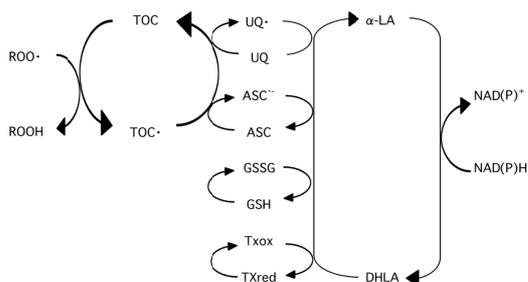
研究分野：生物工学

キーワード：抗酸化物質 顕微ラマンスペクトル メタボローム 包接化合物 代謝経路 光学異性体 リポ酸 酸化ネットワーク

1. 研究開始当初の背景

リポ酸はその強い抗酸化能力が知られており、酸化された他の抗酸化物質を還元し再生する能力を有しており、抗酸化ネットワークの中心をなす分子である(文献1)。リポ酸はその二電子還元体であるジヒドロリポ酸と共役することにより、生体における抗酸化システムの重要な役割を担っていることが知られている。(下図 Fig. 1)

Fig. 1 抗酸化ネットワーク



また、リポ酸はエネルギー代謝において重要な役割を担っており、ピルビン酸デヒドロゲナーゼなどの代謝に関わる補酵素の一つとして必須の物質である。リポ酸はこうした抗酸化機能の他に、リポ酸自身が細胞内の各種シグナル伝達系に作用し、細胞の生死のシグナルとも関わっていることが明らかになっている(文献2、3)。こうした観点からも世界中で基礎、応用、臨床を含めた幅広い分野で研究が活発に展開されてきている。

2. 研究の目的

リポ酸は生体の恒常性の寄与に役立っているのだろうか。リポ酸の投与は生体の恒常性維持を高めることが本当にできるのだろうか。このようにいくつもの疑問がわき起こってくる。こうした疑問に答えるためには、リポ酸の挙動を正確に捉えるシステムの構築が必要である。高感度でリポ酸の挙動をとらえることができれば、生体の酸化ストレス状態が正確に捕捉できる。リポ酸は生体の恒常性の維持に重要な役割を果たすグルタチオン量を増加させる力があることが知られており(文献1、2)。そうした意味においても究極の抗酸化物質、言い換えるならば、生体の抗酸化システムをコントロールすることが出来る『幹抗酸化物質』というべき物質である。リポ酸はその二電子還元体であるジヒドロリポ酸と共役することにより上記に示したように抗酸化ネットワークの中核をなす分子である。この分子の挙動を正確にとらえることができれば、生体の酸化ストレス状態をとらえることが可能になってくる。また、リポ酸が細胞内でどのような挙動をとり、どのような生体分子に働きかけていくのかなどの代謝システムの解析やリポ酸の生体への投与が生体の機能を高めることに本当

につながっているのか等の問題を幅広く検証していくことを目指して研究を展開して来た。

3. 研究の方法

1) リポ酸は融点が低く、熱、光等の物理的刺激に対して極めて弱い。こうした弱さを改善する目的で我々はリポ酸を環状オリゴ糖であるシクロデキストリン(CD)に包接して安定化を試みたところ、光や熱に対して極めて優れた安定性を示すことが明らかになった(文献4)。この安定性を評価することをはじめに行なった。包接固体状態の評価を、1)顕微 Raman、2)顕微 IR、3)SEM、4)XRD、5)DSCなどの各種スペクトルを用いて検討した。また、顕微 Raman によるマッピングを行ない、リポ酸の炭素-硫黄結合、硫黄-硫黄結合の包接化による影響等を詳細に解析した。(共同研究者、水上知行)また、これに関連して、顕微ラマンスペクトルの生体材料への利用について、リポ酸を標的分子としてパイロット的な研究を行なった。細胞内の直接的なラマンスペクトル測定は感度の面から困難であるため、表面増強ラマンスペクトル法を用いることを検討した。金属ナノ粒子に生体材料を付着させ、感度を高め生体材料への適用の可能性を検討した。(共同研究者 水上知行)

2) リポ酸は細胞のシグナル伝達系に作用することなどが知られている。リポ酸はC₆の炭素が不斉炭素であるので、S-体とR-体の光学異性体を有している。光学異性体の違いを含めリポ酸の投与が細胞のシグナル伝達系に及ぼす影響を生死に関わるシグナルの解析を通して行なった。

3) 生体において、光学異性体は全く異なる生理作用を示すことが知られている。私たちはこうした観点に興味を抱き、リポ酸のS-体とR-体の細胞に及ぼす影響をR-体、S-体、ラセミ体のリポ酸を用いて検討した。いくつかのマーカーとなる分子だけを測定するのではなく、網羅的に代謝産物を解析していくことにより、リポ酸の細胞代謝系に及ぼす影響を総合的に評価した。

4. 研究成果

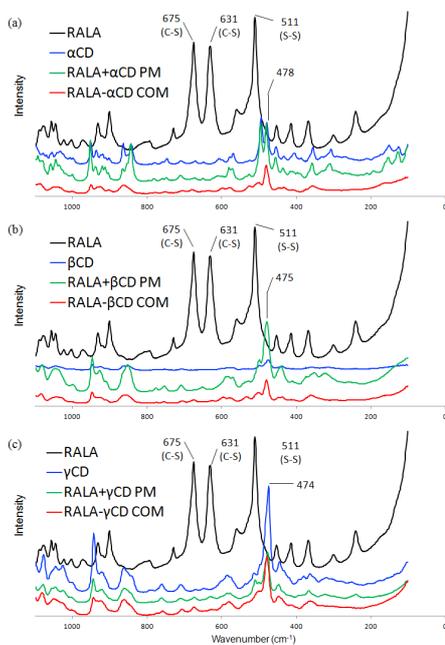
1) リポ酸の包接化による安定化

リポ酸は熱、光などの刺激により速やかに分解することより、安定状態を保つことの重要性が指摘されてきた。そこで、我々は環状グルコース構造を持つシクロデキストリン(CD)に注目し、リポ酸をCDにより包接安定化することを検討した。包接化されたCDがどのような構造を示すのかを詳細に解析することはこの複合体の生体への応用とも関連する重要なテーマである。CDにどのような形で包接されているのか

を解明するために各種スペクトルを用いて解析していった。リポ酸の特色として炭素-硫黄 (C-S)、硫黄-硫黄(S-S)結合という極めて特徴的な結合を持つ。これらの結合は生体の構成成分である蛋白質中にも認められる結合である。この特徴的な結合を感知する手法として我々はラマンスペクトル測定を行った。ラマンスペクトル測定は赤外スペクトルにおいては観測されにくい結合(波数)を強く観測できることや、水によるスペクトル測定の妨害が赤外スペクトルの場合、多く認められるのに対してラマンスペクトルはそうした困難もないことより生体材料の観測に最近、多く用いられている。

リポ酸を α -、 β -、 γ -CD と包接した試料の顕微ラマンスペクトル測定の結果を Fig.2 に示す。リポ酸は包接されることにより特徴的な C-S に基づく波数や S-S 結合に基づく波数がいずれの CD との包接の場合においても極めて弱くなっており、また、リポ酸と CD を混ぜただけの物理混合物においては C-S に由来する波数や S-S に由来する波数は微弱ながら観測された。これらの事実は、ラマンスペクトルが微小な環境変化に敏感に対応することを示すものである。

Fig. 2 リポ酸の顕微ラマンスペクトル



顕微ラマンスペクトルが微小環境の変化を捉えることのできたことを踏まえて、次に我々は特徴的な C-S 結合や S-S 結合に由来する波数に着目し、広範囲な測定が可能なラマンマッピング法を用いて、リポ酸の存在を探った。まず、リポ酸の物理混合物のラマンマッピングをリポ酸の R-体、S-体を用いて行なった。このマッピング法において、リポ酸の存在は赤点として見る見ることが出来る。(Fig. 3A)

Fig.3A リポ酸物理混合物のラマンマッピング

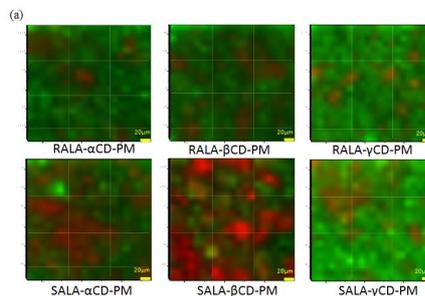
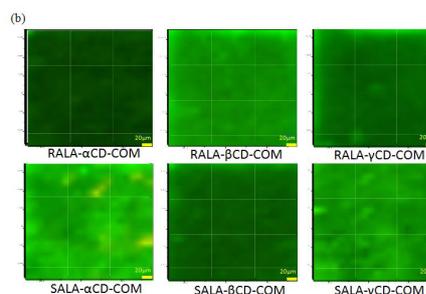


Fig.3B リポ酸複合体のラマンマッピング



リポ酸の混合物の場合いずれの系においても、リポ酸に相当する赤い点が散在していることがわかる。一方、リポ酸の包接体においては、物理混合物において観測されたリポ酸に相当する赤い点は一切観測されず、包接することによりリポ酸は完全に遮蔽された空間内にとどまっている可能性が高いことが明らかになった。次に、同様な条件で顕微 IR 測定を行ない、IR スペクトルにおいて強い振動波数を示すカルボニル基に焦点を絞り測定してみた。

Fig. 4 リポ酸の顕微 IR スペクトル

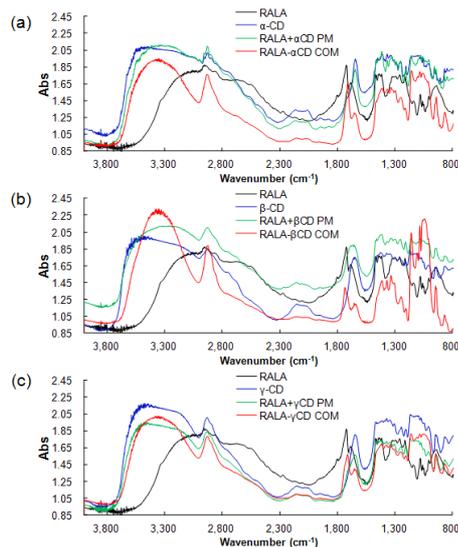
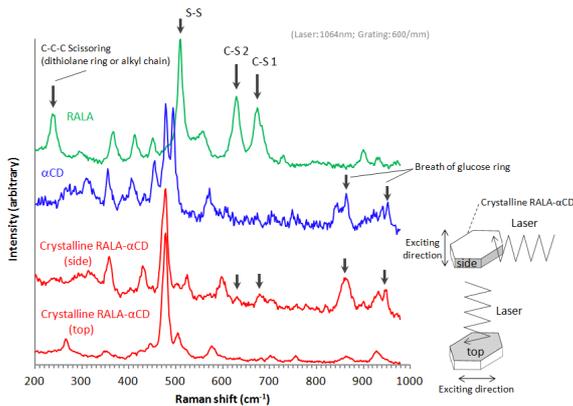


図 4 に示すように包接することによりカルボニル基の波数のシフトが顕著に観察された。包接することによりリポ酸のカルボニル基に特徴的な 1717cm^{-1} の波数は、 α -CD では、 1709cm^{-1} 、 β -CD では、 1733

cm^{-1} , γ -CD では 1709 cm^{-1} にそれぞれシフトした。カルボニル基の高波数へのシフトは β -CD とリポ酸の包接により、カルボニル基の水素結合が弱くなったことに帰することができる。事実、リポ酸との結合定数は β -CD では α -CD や γ -CD より大きい値を示すことがわかっている。このような波数の変化はリポ酸と CD を混合しただけの物理混合物においては観測されておらず、リポ酸と CD が包接することにより見られる現象である (雑誌論文 1)。

それでは、このような包接体がどのようなモル比で含まれており、どのような微細構造を示すのかという問いかけが出てくる。複合体は 1:1 として成立していると考えやすいが、環サイズは環を形成するグルコースの数により違いがある。構成するグルコースの数 (α -CD 6 個、 β -CD 7 個、 γ -CD 8 個) と内孔のサイズは関連しており、内孔のサイズは α -CD では 4.7-5.3、 β -CD では 6.0-6.5、 γ -CD では 7.5-8.3 である。このことは、包接する分子の大きさによりモル比が異なってくる。モル比を正確に捉えることは、リポ酸の生体への投与量の確定にも関わる重要な問題である。CD とリポ酸の複合体については、溶液中の NMR スペクトル測定等の結果が報告されているが (引用文献 6) 微細構造については、いくつかの可能性が指摘されているだけである。液体状態において固体同様な堅固な結合形態のまま存在するかは議論がある。結晶形として安定な状態を示す複合体のスペクトル解析が必要だと思われる。

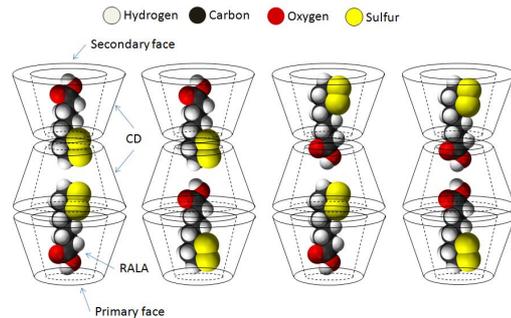
Fig. 5 α -CD とリポ酸複合体の顕微ラマンスペクトル



結晶系で単離された α -CD とリポ酸の結晶を用いて各種スペクトル解析を行なった所、XRD においては解像度が著しく向上した。また、顕微ラマンスペクトルの結果は結晶に対する励起レーザーの照射方向により異なったラマンスペクトルを与えるというこれまでに報告されていなかった結果を示すものであった。(Fig. 5) これらのスペクトル解析の結果、固体 NMR 測定の結果および HPLC による定量的なモル比の解析を通して、

α -CD とリポ酸との分子配向性は不明であるがモル比 3:2 で複合体を形成していることが明らかになった (Fig. 6) また、XRD の特徴的な吸収より CD はチャンネル型構

Fig. 6 リポ酸 α -CD の結晶構造



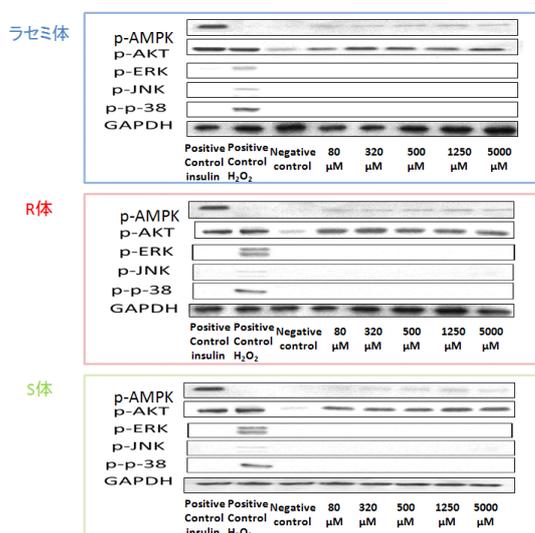
リポ酸のラマンスペクトルの結果を生体分子へ利用するためにラマンスペクトルを用いた細胞内の測定をいろいろな条件で検討した。細胞内にリポ酸を取込ませて直接測定することは顕微ラマンスペクトルを用いて試みたが感度が低いため、測定は不能であった。そこで、最近用いられている表面増強ラマンスペクトル(SERS)を利用することを検討した。タンパクと反応する金属コロイドタグを購入し、インスリンと反応させた後にラマンスペクトル測定を行なってみたが、SERS による増強効果は全く認められなかった。一方、インスリンを顕微ラマンスペクトル測定した時にはきれいなスペクトルを測定することができたので、金属コロイドへの吸着効率の問題が大きいことが明らかになった。今後、こうした点を改善する必要がある。

2) リポ酸の細胞への投与

タンパク質に結合したリポ酸 (R-体) はピルビン酸デヒドロゲナーゼに関わる補酵素の一つであり、エネルギー代謝に関わる重要な物質である。リポ酸の細胞への投与により解糖系を含めて多くの物質ならびに酵素群が動いていく。用いた細胞としてラット肝がん由来細胞 (H4IIEC) を用いた。リポ酸の R-体、S-体投与による細胞生存率を評価した所、両光学異性体とも $500 \mu\text{M}$ までは細胞死がほとんど観測されず、両異性体の差は認められなかった。一方、より高濃度においては、リポ酸の光学異性体間で生存率に違いが認められた。そこで、次に各種濃度で R-体、S-体、ラセミ体のリポ酸を細胞に投与し、24 時間後のシグナル伝達に及ぼす影響を調べた。シグナル伝達系として細胞の成長因子に関わるシグナル (Akt, AMPK) とストレスシグナル (ERK, JNK, p38) を用いた。これらのシグナルのリン酸化を評価して、リポ酸の細胞の影響を検討した。尚、この時にポジティブコントロールとして、過酸化水素

(ストレス応答) インスリンシグナル(成長因子)を用いた。インスリンを添加した系では、Akt, AMPK のリン酸化が顕著に認められた。一方、過酸化水素を投与した系では、Akt のリン酸化も認められたが、ストレス因子である ERK, JNK, p38 のリン酸化が認められた。リポ酸を投与した時においては、AMPK と Akt の活性化が認められたが、光学異性体による差はほとんど認められなかった。また、低濃度から高濃度まで濃度範囲を変化させながら、シグナル伝達の差を調べたが、ウエスタンブロットの系においては明確な濃度依存性は認められなかった。細胞生存率との違いが多少認められることより、代謝産物の影響等が想定された。

Fig.7 リポ酸投与におけるシグナル活性化

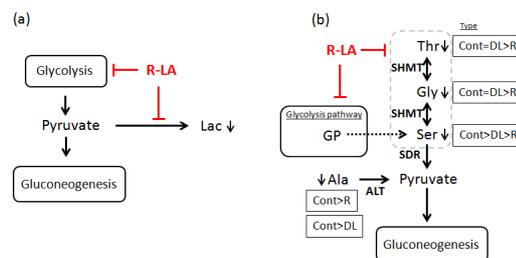


3) メタボローム解析

これまでの結果からリポ酸は細胞の生死を含めた形でシグナルとも密接に関わっていることが推定されるが、リポ酸の投与がどのような物質に影響を与え、それがどのように変動していくのかは不明である。こうしたことを解析するためにはリポ酸投与した時の細胞内代謝産物を網羅的に解析する必要がある。私たちは、R-体、S-体、ラセミ体のリポ酸をラット肝がん細胞と処理してその際における細胞の代謝産物を時間経過とともに網羅的に解析することを行なった。解析としては、中心炭素系、尿素回路、脂質代謝、分岐鎖アミノ酸、芳香族アミノ酸、核酸、補酵素などについて、24 時間処理後 CE-TOFMS(ヒューマンメタボローム社委託)により解析した。24 時間経過後のサンプルでは、いずれの異性体においても顕著な差が認められなかった (data not shown)。リポ酸の細胞における代謝速度は極めて速いことが報告されていることを踏まえて、代謝産物の早い段階からの時間コースを追いかけた。リポ酸はラセミ体、R-体を用い比較

のためにコントロールを用い、30 分~24 時間までの経時変化により細胞内の構成成分量がどのように変動するかを追跡した。メタボロミクスは統計的手法を用いて解析し、R-体とラセミ体、コントロールサンプルの間に有意な違いが認められた。特に R-体はラット肝がん細胞の解糖系に働きかけることにより、ピルビン酸の生成、乳酸の生成を抑制する (Fig. 8(a)) と同時に Gly-Thr-Ser の経路に対しても抑制的に作用する (Fig. 8b)。結果として糖新生の経路が抑えられてくる。

Fig. 8 リポ酸の代謝経路への関与機構



この結果は R-リポ酸はがん細胞のエネルギー代謝を促進する方向ではなくむしろ抑制する方向に動くことを示唆するものである。(投稿予定)

<引用文献>

- 1) Molecular Aspects of Lipoic Acid in the prevention of Diabetes Complications. Packer, L., Kaemer, K., Rimbach, G., *Nutrition*, **17**, 886-895 (2001).
- 2) Alfa-Lipoic acid (LA) enantiomers protect SH-SY5Y cells against glutathione depletion. Yamada, T., Hashida, K., Takarada-Iemata, M., Matsugo, S., Hori, O., *Neurochem. Int.*, **a59** (7) 1003-1009 (2011).
- 3) Protective effect of lipoic acid against oxidative stress is mediated by Keap1/Nrf2-dependent heme oxygenase-1 induction in the RGC-5 cell Line. Koriyama, Y., Nakayama, Y., Matsugo, S., Kato, S., *Brain Res.*, **499**, 145-157 (2013).
- 4) Analysis of the enhanced stability of R(+)-alpha lipoic acid by the complex formation with cyclodextrins. Ikuta, N., Sugiyama, H., Shimosegawa, H., Nakane, R., Ishida, Y., Uekaji, Y., Nakata, D., Pallauf, K., Rimbach, G., Terao, K., Matsugo, S., *Int. J. Mol. Sci.*, **14**, 3639-3655 (2013).
- 5) α-Lipoic Acid-Induced Inhibition of Proliferation and Met Phosphorylation in Human Non-Small Cell Lung Cancer Cells.

Michikoshi, H., Nakamura, T., Sakai, K., Suzuki, Y., Adachi, E., Matsumoto, K., Matsugo, S., *Cancer Letters*, **335**, 472-478 (2013).

6) NMR Studies of Inclusion Complexes Formed by (R)-alpha-Lipoic Acid with alpha-, beta-, and gamma-Cyclodextrins. Ikeda, H., Ikuta, N., Nakata, D., Ishida, Y., Terao, K., *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, **88**, 1123-1127 (2015).

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2件)

1, Structural Analysis of Crystalline R(+)-Alpha-Lipoic Acid – Alpha-Cyclodextrin Complex based on Microscopic and Spectroscopic Studies. Ikuta, N., Endo, T., Hosomi, S., Setou, K., Tanaka, S., Ogawa, N., Yamamoto, H., Mizukami, T., Arai, S., Okuno, M., Takahashi, K., Terao, K., Matsugo, S., *International J. of Molecular Sciences* **16**, 24614-24628 (2015). 査読有り
doi: 10.3390/ijms161024614.

2, Spectroscopic Studies of R(+)-Alpha-Lipoic Acid – Cyclodextrin Complexes. Ikuta, N., Tanaka, A., Otsubo, A., Ogawa, N., Yamamoto, H., Mizukami, T., Arai, S., Okuno, M., Terao, K., Matsugo, S., *International J. of Molecular Sciences*, **15**, 20469-20485 (2014). 査読有り
doi: 10.3390/ijms151120469.

[学会発表](計4件)

1, R- α lipoic acid γ -cyclodextrin complex increases energy expenditure: A 4-month feeding study in mice.

Naoko Ikuta, Sibylle Nikolai, Keiji Terao, Seiichi Matsugo, and Gerald Rimbach.

19th International Conference of FFC - 7th International Symposium of ASFFBC.

Functional and Medical Foods, Bioactive Compounds and Biomarkers: Longevity and Quality of Life November 17th-18th, Kobe University, Kobe, Japan, 2015.

2, Analysis of the enhanced stability of R(+)-alpha lipoic acid - cyclodextrin complexes.

Naoko Ikuta, Hironori Sugiyama, Hiroshi Shimosegawa, Rie Nakane, Akira Tanaka, Ayako Otsubo, Daisuke Nakata, Keiji Terao and Seiichi Matsugo.

17th International Cyclodextrin Symposium, Saarbrücken, May 29th to May 31st, Germany, 2014.

3, Spectroscopic studies of R(+)-alpha lipoic acid - cyclodextrin complexes.

Naoko Ikuta, Akira Tanaka, Ayako Otsubo, Tomoyuki Mizukami, Shoji Arai, Masayuki Okuno, Keiji Terao and Seiichi Matsugo.

17th International Cyclodextrin Symposium, Saarbrücken, May 29th to May 31st, Germany, 2014.

4, Mechanism of the enhanced bioavailability of R(+)-alpha lipoic acid by the complex formation with cyclodextrins.

Naoko Ikuta, Takahiro Furune, Daisuke Nakata, Keiji Terao, Norihiro Sakamoto and Seiichi Matsugo.

17th International Cyclodextrin Symposium, Saarbrücken, May 29th to May 31st, Germany, 2014.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

松郷 誠一 (MATSUGO Seiichi)

金沢大学・理工研究域・自然システム学系・教授

研究者番号：30148126

(2)研究分担者

水上 知行 (MIZUKAMI Tomoyuki)

金沢大学・理工研究域・自然システム学系・助教

研究者番号：80396811