

平成 21 年 6 月 16 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007 -2008

課題番号：19500329

研究課題名（和文）ガス分子受容・生成系を標的とした脳微小循環血流制御機構の解明

研究課題名（英文） Regulation of vascular tone by gaseous mediators; Interactions of multiple gas-transducing systems

研究代表者

梶村 眞弓 (KAJIMURA MAYUMI)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：10327497

研究成果の概要：

ガス分子を生成する酵素系や受容系の多くは、他のガス生成反応と拮抗あるいは共役している例が多数存在するにもかかわらず、その生物学的・病態生理学的意義の探究はほとんどなされていない。本研究の目的は、中枢神経系(CNS)で産生される低分子ガス状メディエータの生成・受容機構を探究し、ガス分子による脳局所血流調節のメカニズムを解明することである。最近 NO や CO のみならず、生体内で cysteine の分解ともなって生成される硫化水素(H₂S)が神経伝達や血管弛緩に関わる新しい分子として注目されている。そこで sGC や NOS 以外の CO の標的分子の候補蛋白として H₂S 産生酵素である cystathionine β-synthase (CBS)に着目し、ガス状メディエータを介した情報伝達制御機構の解明を目指した。第一に、肝組織のメタボローム解析の結果から一酸化炭素(CO)が transsulfuration pathway を抑制することに着目し、この代謝系の律速酵素である CBS の活性が CO により阻害され、NO では阻害されない CO 特異的な受容体であることを見出した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2008 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,700,000	810,000	3,510,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経化学・神経薬理学

キーワード：脳血流代謝カップリング、一酸化炭素、硫化水素、ガスバイオロジー

1. 研究開始当初の背景

ガス状メディエータは生体内で生成される低分子で、酵素分子の構造内に比較的容易に浸透し、金属原子や硫黄原子を有する補欠分子族に結合することによって酵素反応速度を変化させその生物活性を発揮する。このような分子群のうち一酸化窒素(NO)や一

酸化炭素(CO)は神経伝達や血管弛緩など生体恒常性維持に不可欠なガス状メディエータである。これまでに、少なくとも NO に関してはその標的分子の同定及び分子レベルでの活性化制御のメカニズムが明らかにされた。一方、CO に関しては還元型ヘム鉄を補

欠分子族とする soluble guanylate cyclase (sGC)、NO synthase (NOS)、cystathionine β -synthase (CBS)、cytochrome P450、hemoglobin などのヘム蛋白質への強い結合性を有することが知られているが、その生体内での主要標的分子は未だ同定されていない。

我々はこれまでに CO が NO との共通の受容体である sGC との相互作用により NO 濃度に依存して 2 面性に細胞機能を制御することを報告した。またラット脳をモデルとした脳微小循環実験系において内因性の CO 生成を抑制すると細動脈の拡張が起こることを見出し CO が NO による血管拡張反応の抑制機構として働いていることを明らかにした。

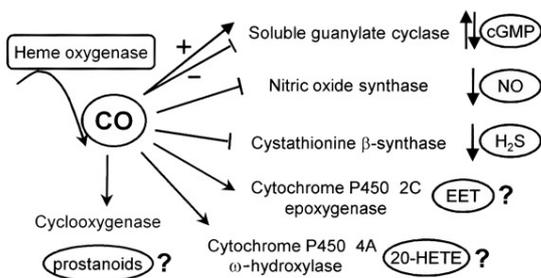


図 1. 脳組織における CO の標的酵素候補分子と血管作動性物質。

脳は全組織重量の僅か 2% を占めるに過ぎないながらも、全組織の 20% に達する非常に高い酸素消費を賄うため cardiac output の 14% を受容しており、特に grey matter では $100\text{ml blood min}^{-1} 100\text{g tissue}^{-1}$ という他組織平均の約 10 倍もの血流量を維持している。この驚異的に高い血流量を非常に compliance の低い頭蓋骨という狭い空間に納め、しかも正常な intracranial pressure を保つためには厳格な血流制御が必須となる。興味深いことに、血流制御の中心的な役割を担う細動脈（抵抗血管）への自律神経支配は他組織に比べ極めて乏しいことが知られている。この見地より CO が neuro-modulator としての役割に加えて、アドレナリン、コリン非依存性 (NANC) の vascular regulator として作用している可能性を探究する。本研究では、CO、NO、 H_2S 産生酵素欠損マウスの動物実験モデルと *in vitro* での

ガス分子と精製レセプタ蛋白質の相互作用を検証すること、さらにメタボローム技術を駆使することにより、CO のセンサー蛋白の同定を目指す。

2. 研究の目的

近年 CO や NO に加えて、生体内で cysteine の分解にともなって生成される硫化水素 (H_2S) が血管弛緩に関わる第 3 のガス状メディエータとして注目され始めた。しかしながら、これらのガス分子が生体内で統合的にどのように生理活性調節を行っているかのメカニズムは未解決である。本研究の目的は CO、NO、 H_2S のガス分子が高レベルで存在する脳及び肝臓組織をモデルに、複数のガス分子が生物活性を發揮するメカニズム及び神経・血管系におけるエネルギー代謝とリンクしたガス分子の生成・受容及び情報伝達機構を包括的に解明することである。

本研究期間は、CO の標的分子として H_2S の生成酵素である CBS に着目した。 H_2S は血管平滑筋に存在する ATP 依存型のカリウム (K_{ATP}) チャンネルの開口確率を上昇させ細胞膜の過分極を起こすことによって血管平滑筋を弛緩させる vascular regulator であることが報告された (Zhao *et al.*, EMBO J., 2001)。 H_2S 生成酵素である CBS は N 末端にヘム結合モチーフを有する pyridoxal 5' phosphate (PLP) 酵素である。結合するヘムの役割は最近まで不明であったが、その構造が明らかにされ、oxidoreductase 活性中心を形成する PLP に近接して N 末端付近のヘムが存在すること、このヘムに CO が結合することによって引き起こされる構造変化が活性中心である PLP 付近の立体構造に影響して酵素反応の阻害剤として働く可能性が示された。興味深いことに *in vitro* では CO の CBS に対する K_i は $5-6 \mu\text{M}$ であり生理的に誘導された HO 由来の CO で十分抑制効果が發揮されるのに対し、NO では $320 \mu\text{M}$ であり阻害効果を發揮しない (Taoka *et al.*, Biochemistry, 1999)。これら 2 つのガス分子の推定される生理的濃度を考慮すると CO が CBS の生理的阻害物質である可能性が示唆される。 そこで CBS が高発現している肝臓・脳をモデルとして CO による CBS 活性の抑制により惹起され

る energy metabolism の remodeling 作用を最新の代謝解析技術を用いて解析した。

3 . 研究の方法

(1) メタボローム解析

マウスから肝臓を摘出し、液体窒素にて凍結した。内部標準として L-Methionine sulfone (Wako 502-76641) and 2-Morpholinoethane sulfonic acid (MES, Dojindo 349-01623) 各 300 μ M を含んだ methanol 溶液 2 mL に約 300 mg の組織を入れ、超音波破砕器で 2 分間破砕した。十分攪拌した後、水を 500 μ L 加え再攪拌した。300 μ L - aliquot に 200 μ L のクロロホルムを添加し、これを遠心した (15,000 rpm, 4 , 15 min)。上層の水-methanol 層から 200 μ L を限外濾過フィルター (分画分子量 5,000, Amicon Ultrafree MC 5,000, Millipore) に移し、90 分間遠心した (10,000 rpm, 4°C)。ろ液を遠心濃縮し capillary electrophoresis (CE) Mass spectrometry (MS) (Agilent) 解析試料とした。

(2) ガス分子とヘム酵素の相互作用の物理化学的解析

CO が CBS と相互作用して酵素活性を調節する機構を解明する目的で、蛋白質の分子構造と CO や NO のガス分子の相互作用を原子レベルで解析するため、可視分光スペクトルによるヘム軸配位子の解析および電子スピン共鳴 (ESR) などの物理化学的分光分析技術を駆使した。

(3) 免疫組織化学

マウスから脳組織を採取後、Periodate /Lysine/ Paraformaldehyde 液で浸漬固定を行った (4 , 4 時間)。固定後、10%、15%、20% ショ糖溶液で段階的に洗浄を行い、OCT compound (Miles Laboratories, Elkhart, IN) で包埋した。クライオスタットにて、厚さ 60 micron の切片を作成した。1 次抗体として、抗 CBS ポリクローナル抗体を、astrocyte を認識する抗 GFAP ポリクローナル抗体を使用した。凍結切片は 0.3% TritonX-100 を含む PBS (PBST) に正常ヤギ血清 5% を加えた溶液中で 1 時間インキュベートした後、抗体と

反応させた。これらの抗体は 5% ウシ血清アルブミンを含む PBST で溶解し 4 で一晩反応させた。1 次抗体を洗浄後、切片を 2 次抗体 Alexa Fluor 488 標識抗体、Alexa Fluor 555 標識抗体、及び TO-PRO-3 (Invitrogen, Basle, Switzerland) で 4 時間、室温にてインキュベートした。2 次抗体を洗浄後、4% Paraformaldehyde /PBS で 10 分間再固定した。レーザー共焦点顕微鏡 Radiance2100 MP (BioRad, Hercules, CA) を用いて撮像した。

4 . 研究成果

(1) CO-cystathionine β synthase (CBS) /H₂S 系による臓器機能制御機構の解明

CO 産生を up-regulate するため hemin を投与したマウスの肝臓では、誘導型の hemeoxygenase 1 の発現量の上昇が認められ、ガスクロマトグラフィーで肝臓組織内の CO を定量したところ hemin 投与 12 時間後の CO 量は、control の約 2.5 倍と確かに増加した。このストレス誘導性の CO は、胆汁分泌機能を亢進させることが明らかになった。同時に、胆汁の pH を上昇させ organic anion の溶解性を高める作用のある重炭酸もパラレルに増加することから、胆汁分泌亢進を惹起したのは、CO による vasodilatory effect 以外の因子であると予想し、機能的変化のおこる time point で採取した肝臓組織を用い、分子量 1,000 以下の生体構成成分の代謝変動を CE-MS によるメタボローム・質量分析技術を駆使して包括的に解析した。

その結果、CO overloading によってアミノ酸は相対的に減少し、AcetylCoA が増加することを確認した。Glutamate は無変化であったのに対し glutamine は有意に増加し、高エネルギーリン酸化合物も増加していることから、アミノ酸プールがエネルギー基質として利用されたことを示唆する結果であると解釈した。さらに methionine、tryptophan、histidine、serine が維持される一方、cystathionine、cysteine、hypotaurine などの transsulfuration 経路の代謝物の減少が認められた。これらの結果から、methionine-cysteine の代謝系のいずれかに CO の作用点があると考えた。

本動物モデルを用いたメタボローム解

析からは、COの生物作用にはストレス時の胆汁分泌増加作用など明らかにsGC調節機構では説明できない現象が存在することが判明し、CBS欠損マウスではCO感受性を失うことを証明した。以上のことから、CBSがCO感受性の代謝調節スイッチとなっている可能性が示唆された。

(2) COによるcystathionine β -synthase (CBS)活性の抑制

前述の結果に従い、COの標的分子として、H₂Sの生成酵素でありこの代謝経路に存在する唯一のヘム含有酵素であるCBSに着目した。「ヘム過剰投与は、CBS活性を抑制することによってtranssulfuration経路のmetabolitesの産生を抑制している」という仮説を検証した。まず肝臓組織中のH₂S量を測定したところ、ヘム過剰投与によるCO生成増加条件下では、H₂S生成が抑制されることが判明した。一方CBS heterozygous (+/-)KOマウスでは、COの生成増加は起きるにもかかわらずwild typeでみられたようなH₂S生成抑制はおこらず、CBS(+/-)ではCOへの感受性が消失することを見出した。

さらにCOの生体内作用点がCBSであることを支持するこの結果に基づき、CBSの分離精製標品でさらなる解析を行ったところ、

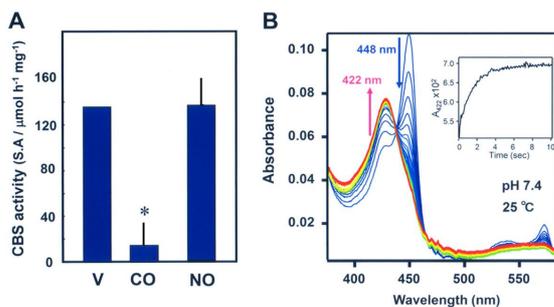


図2. CBS: CO-specific receptor

COは数 μ MレベルでCBS活性の阻害剤として作用した。さらに可視分光スペクトルによるヘム軸配位子の解析から、ヘムの2つの軸配位子のうちcysteine残基がCOと置換することが酵素反応を阻害することが作用メカニズムであることが判明した。CBSはNOでは阻害がかからないことから、CBSがCOの特異的なレセプタであると考えた。このことから、

CBSがCO感受性の代謝調節スイッチとなっている可能性が示唆された。

さらに、可視分光スペクトルによるヘム軸配位子の解析を行ったところ、ヘムの2つの軸配位子のうちcysteine残基がCOと置換することが酵素反応を阻害するメカニズムであることを突き止めた。またCBSのN末端のヘム鉄のredox stateをH₂Sが還元型にシフトさせることにより、COによる当該酵素の阻害効果を増強するしくみがあることの証左を得た(Shintani *et al.*, *Hepatology*, 2009)。

興味深いことに、小脳組織ではCBSがグリア細胞に、またCO産生酵素であるheme oxygenase(HO)-2がニューロンに、いずれも高発現していることが確認できた。今後は、COによる血流調節機能の修飾作用をマウス脳微小循環床をモデルとして検証したい。前述したように、H₂Sが脳血管の拡張因子として作用しており、COがその生成を抑制するという仮説が正しいとすると、定常状態で産生されるCOは脳血管が不必要に拡張するのを防ぐtonic regulatorの役割を担っていると言える。この仮説を検証するために、現在CBSの欠損マウス(CBS-KO)を用い、ガスによる血管作動性の挙動を解析中である。

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8件)

1. Morikawa T., Hattori K., Kajimura M., and Suematsu M. The effects of cilostazol on tissue oxygenation upon an ischemic-reperfusion injury in the mouse cerebrum, *Advances in Experimental Medicine and Biology* (in press) 査読有
2. Shintani T., Iwabuchi T., Soga T., Kato Y., Yamamoto T., Takano N., Hishiki T., Ueno Y., Ikeda S., Sakuragawa T., Ishikawa K., Goda N., Kitagawa Y., Kajimura M., Matsumoto K., and Suematsu M. Cystathionine β -synthase as a CO-sensitive regulator of bile excretion, *Hepatology*, 49, 141-150,

2009. 査読有
3. Ishikawa M., Kusaka G, Yamaguchi N, Sekizuka E, Nakadate H, Minamitani H, Shinoda S, and Watanabe E. Platelet and leukocyte adhesion in the microvasculature at the cerebral surface immediately after subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgery* 64: 546-553, 2009 査読有
 4. Terao S, Yilmaz G, Stokes KY, Russell J, Ishikawa M., Kawase T, Granger DN. Blood cell-derived RANTES mediates cerebral microvascular dysfunction, inflammation, and tissue injury after focal ischemia-reperfusion. *Stroke*. 2008;39:2560-2570 査読有
 5. Terao S, Yilmaz G, Stokes KY, Ishikawa M., Kawase T, Granger DN. Inflammatory and injury responses to ischemic stroke in obese mice. *Stroke*. 2008;39:943-950. 査読有
 6. Morikawa T., Kajimura M., Ichikawa M., and Suematsu M. Three-dimensional imaging of growing thrombus *in vivo*. *Microvascular Reviews and Communications*, 2, 8-12, 2008. 査読有
 7. Osaka M., Hagita S., Haraguchi M., Kajimura M., Suematsu M., and Yoshida M., Real time imaging of mechanically injured femoral artery in mouse revealed a biphasic pattern of leukocyte accumulation, *American Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology*, 292: H1876-H1882, 2007. 査読有
 8. Ishikawa M., Sekizuka E, Yamaguchi N, Nakadate H, Terao S, Granger DN, and Minamitani H. Angiotensin II type 1 receptor signaling contributes to platelet-leukocyte-endothelial cell interactions in the cerebral microvasculature. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292: 315, H2306-H2315, 2007 査読有

[学会発表](計11件)

1. Mar 24, 2009 Blood Brain Barrier KI-KEIO G-COE joint meeting at Karolinska Institute, Stockholm, Sweden. Kajimura M., Hattori K., and Suematsu M., Regulation of vascular tone by gaseous mediators; Interactions of multiple gas-transducing systems (invited speaker)
2. 2009年2月20日 第34回日本微小循環学会、(東京) Takayuki Morikawa, Katsuji Hattori, Mayumi Kajimura, and Makoto Suematsu Carbon monoxide as a tonic modulator against hydrogen sulfide dependent vasodilatation in the murine cerebellar microcirculation.
3. Dec 11, 2008 The 81th Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society, Kobe, Japan. Kuga K, Mandai S, Kajimura M., Suematsu M, Takeoka S. Effect of poly(ethylene glycol)-modified albumin on blood components.
4. Aug 6, 2008 International Society on Oxygen Transport to Tissue, Sapporo, Japan. Morikawa T., Hattori K., Kajimura M., and Suematsu M., The effects of cilostazol on tissue oxygenation upon an ischemic-reperfusion injury in the mouse cerebrum.
5. Aug 4, 2008 International Society on Oxygen Transport to Tissue, Sapporo, Japan. Kajimura M., Hattori K., Morikawa K., Ishikawa M., and Suematsu M., Regulation of vascular tone by gaseous mediators; Interactions of multiple gas-transducing systems utilizing molecular oxygen (invited speaker)
6. 2008年6月6日 第31回日本バイオレオロジー学会、(東京)(シンポジスト) 梶村 真弓、石川 眞実、未松

誠。低分子ガスを介した情報伝達系による脳微小循環機能制御機構。

7. Apr 10, 2008 “Vascular Response to Injury” UC Davis KEIO G-COE joint meeting at University of California, Davis, U.S.A. Kajimura M., Hattori K., and Suematsu M., Multiple gaseous transducing systems (invited speaker)
8. Dec 12, 2007 The 80th Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society, Yokohama, Japan. Morikawa T. Kajimura M., Ichikawa M., Hoshino R., Suematsu M. Distinct effects of cilostazol and aspirin on thromboembolic reaction and microvascular permeability.
9. Aug 18, 2007 The 8th World Congress for Microcirculation, Wisconsin, USA. Mandai S. Kajimura M., Morikawa T. Tsukada K., Mochizuki Y., Takeoka S., Nakajou K., and Suematsu M. Effects of polyethylene glycol modified human recombinant albumin on hemostasis.
10. Aug 16, 2007 The 8th World Congress for Microcirculation, Milwaukee, Wisconsin. Kajimura M., Interactions of multiple gas transducing systems in the brain microcirculation (invited speaker)
11. 2007年8月3日 第28回日本炎症再生医学会、(東京)。森川 隆之、梶村 眞弓、木村 美緒、星野 利津子、末松 誠。止血血栓形成プロセス及び血管透過性に及ぼす cilostazol の効果 - aspirin との比較 -。

〔図書〕(計1件)

1. 山本 雄広、高野 直治、梶村 眞弓、足立 健、末松 誠。一酸化炭素とシグナル伝達 吉川 敏一監修 **酸化ストレスの医学** 診断と治療社 131-137, 2008.

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

梶村 眞弓 (KAJIMURA MAYUMI)
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号：10327497

(2) 研究分担者

石川 眞実 (ISHIKAWA MAMI)
自治医科大学・医学部・講師
研究者番号：60212859

(3) 連携研究者

なし