

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月25日現在

機関番号：11401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790219

研究課題名（和文） システイン合成系破綻動物を用いた腎尿細管機能に及ぼす含硫アミノ酸代謝の役割の解明

研究課題名（英文） Analysis of the role of sulfur amino acids metabolism in renal proximal tubules using mice lacking cysteine-producing enzymes.

研究代表者

赤星 軌征 (AKAHOSHI NORIYUKI)

秋田大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：70534551

研究成果の概要（和文）：硫黄を含むメチオニンをシステインに代謝する経路の2酵素 Cystathionine β -synthase (CBS) と cystathionine γ -lyase (CSE) の欠損は、前者は重篤な病態だが、後者は顕著な症状はない。マウスでは両酵素は肝臓や腎近位尿細管に強く発現するが、本件は不明点の多い腎での生理的役割を探索した。CBS 欠損マウスでは毒性の高いメチオニンの尿中排泄の効率が低いのに対し、CSE 欠損マウスでは CBS による代謝物の排泄効率が高く、両者の病態差に関わると考えられた。また一見正常な CSE 欠損マウスでも妊娠高血圧腎症様の病態があった。両酵素は血管弛緩因子の硫化水素を産生するが、腎内の硫化水素は両酵素の発現部位に高濃度に存在しており、病態への関与が考えられた。

研究成果の概要（英文）：Cystathionine β -synthase (CBS) and cystathionine γ -lyase (CSE) are the transsulfuration enzymes that are involved in sulfur amino acids metabolism. CBS-deficient patients show severe clinical symptoms, while CSE-deficient persons are considered to be free of any clinical manifestations. Although both enzymes are primarily expressed in the liver and the kidney of mice, their roles in the kidney remain to be elucidated. In CBS-deficient mice, the urinary excretion of toxic methionine was much lower efficiency, while the cystathionine was efficiently excreted into the urine in CSE-deficient mice. The efficiency of excretion is considered to be related to the difference of symptoms. Pregnancy-induced hypertension and proteinuria was developed in normal-appearing CSE-deficient mice. H₂S that has vasorelaxant activity is known to be produced by CBS and CSE, and its distribution was overlapped with both enzymes in kidney.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：含硫アミノ酸, Cystathionine β -synthase (CBS), Cystathionine γ -lyase (CSE) または (CTH), 硫化水素, ホモシスチン尿症, 妊娠高血圧腎症

1. 研究開始当初の背景

含硫アミノ酸の一つであるシステインは、もう一つの含硫アミノ酸であり必須のメチ

オニンより派生するホモシステインから Transsulfuration (TS) 経路によって生合成される。TS 経路では、まず CBS によりホモシ

ステインにセリンが付加されてシスタチオニンが生じ、さらにそのシスタチオニンがCSEにより加水分解されてシステインを生じる(図1)。TS経路の生理的役割として、1)タンパク質合成の原料として、また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としてのシステインの供給、2)過剰蓄積による毒性が知られるメチオニン及びホモシステインの代謝、3)多彩な作用を持つ生理活性ガスである硫化水素(H₂S)の産生、などが考えられている。CBS欠損によるホモシステインの過剰蓄積は遺伝病の「ホモシステイン尿症(ホモシステイン血症)」として知られ、血栓塞栓症や精神発達遅延、骨格異常や水晶体脱臼などの重篤な障害が報告されている。一方CSE欠損によるシスタチオニンの過剰蓄積はやはり遺伝病の「シスタチオニン尿症/血症」として知られ、こちらは顕著な臨床症状はないとされる。我々は、CBSとCSEがマウスにおいて肝臓に次ぎ、腎臓に強く発現することを見出した(Ishii, Akahoshi ら, Biochem. J. 381:113-123, 2004)。また妊娠期の腎臓でのCSE発現誘導を明らかにした(Akahoshi ら, Biol. Pharm. Bull, 29:1799-1802, 2006)。主要なアミノ酸異化の場である肝臓での両酵素の発現は理解しうるが、腎臓での発現の生理的意義は不明である。しかし、心血管病のリスクファクターと考えられている血中ホモシステイン濃度が末期腎不全患者で上昇すること(腹膜透析患者は健常者の約4.5倍、血液透析患者は健常者の約5.5倍)から、その働きが血中ホモシステイン濃度維持(低下)に関与する可能性が考えられる。またCSEにより産生される硫化水素が虚血再灌流障害時に尿細管保護的に働き(Tripatara ら Lab. Invest.

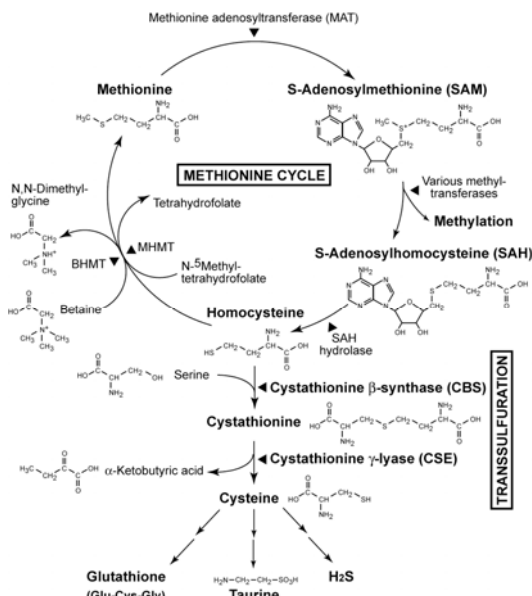


図1. システイン生合成系

88:1038-48, 2008), CBS/CSEによる硫化水素産生が糸球体濾過量を増大させること(Xia ら J. Pharmacol. Exp. Ther. 329:1056-62, 2009)が近年報告されている。そこで本研究では、CBSとCSEそれぞれの遺伝子欠損マウスを用いて、両酵素の腎臓、特に近位尿細管での生理的役割を調べることにした。

2. 研究の目的

CBS欠損マウスはWatanabeらによって作成・報告され(PNAS 92:1585-9, 1995)、現在C57BL/6J背景のマウスが米国Jackson研究所より頒布され世界中で汎用されているが、そのホモ欠損マウスは4週齢までにそのほとんどが肝障害により死亡する。我々はCBS欠損マウスの致死性を回避するためマウスの遺伝的背景を他近交系に変換することにより、より生存率が高く成長遅延が軽度であるC3H/HeJ背景のCBSホモ欠損マウスの作成に成功した(Akahoshi ら, Hum. Mol. Genet. 17:1994-2005, 2008)。一方、CSE欠損マウスについては既報が無かったため我々は新規に作成した(発表論文④)が、そのホモ欠損マウスには見かけ上の異常はなく、問題なく成長した。CBS抗体とCSE抗体、各種腎細胞マーカーを用いて成体マウス腎での両酵素の分布を調べたところ、近位尿細管(Proximal Convoluted Tubule (PCT) および Proximal Straight Tubule (PST))に共発現していた(図2)。CBSとCSEの染色像はそれぞれの欠損マウスの腎組織では全く検出されなかったが、それぞれの欠損マウスの腎臓の大きさや糸球体・尿細管の形態に異常は観察されなかった。しかし両酵素が発現する近位尿細管は虚血再灌流による組織障害に脆弱な部位であり、抗酸化物質の前駆体であるシステイン生合成破綻が、ストレス負荷時に影響すると予想された。近位尿細管はアミノ酸や糖などの低分子の再吸収の場であることから、尿中への排泄を考慮した腎臓中の含硫アミノ

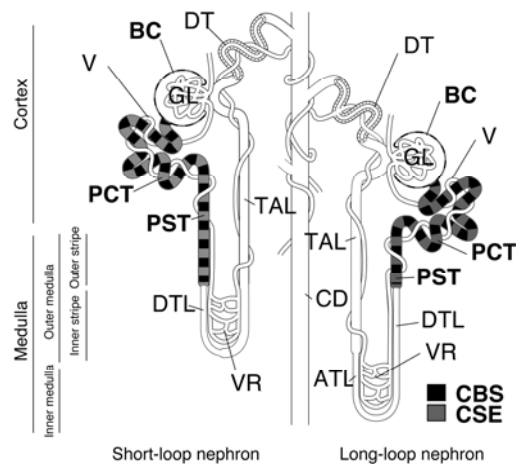


図2. 成体腎でのCBS/CSE発現の様式

酸代謝物のプロファイルが必要と考えられた。また両酵素によって発生する硫化水素は微細な血管が集中する腎臓において生理的機能が予想されるが、その腎臓中含有量・局在をはじめ、その機能はほとんど分かっていない。それぞれの欠損マウスを用い、予想される機能の差を明らかにし、この違いが、虚血再灌流時の抵抗性や血圧調整へどのように影響するかを調べ、両酵素の近位尿管での発現の生理的意義とその欠損による変化を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 血中・尿中のアミノ酸定量と再吸収率の算出

2週齢時のCBS欠損、CSE欠損および野生型マウス(全てC57BL/6J背景)の血中・尿中のアミノ酸をNBD-F(同人化学)により蛍光標識した後に逆相HPLCにより分離・定量し、それをクレアチン濃度で補正して、アミノ酸再吸収率の結果を得た。

(2) 腎組織中の低分子代謝物の一斉定量と特定物質の腎内分布の検出

TS経路で処理できないメチオニンは脱アミノを受け代謝されると考えられるが、その場合上述のアミノ酸標識法では検出できないため、CE-TOF-MSを用いて腎ホモジネート中の低分子代謝物の一斉定量(メタボローム解析)を行った。グルタチオンについてはCoulArray (Coulometric Electrochemical Detection-HPLC)を用いて酸化型(GSSG)と還元型(GSH)を分けて測り、酸化ストレス度の評価に用いた。尿中硫酸定量はSulfate Assay kit (BioChain)を用いた。

(3) 腎臓に由来する病態の検討

CBS欠損マウスは肝機能異常の影響が大きいため、CSE欠損マウスについて検討した。血圧測定はカフ式血圧測定器(Softron)を用いた。腎機能・肝機能の評価のため、血清・尿中のクレアチニン(CRE M kit, Wako), 総蛋白(Micro TP test kit, Wako), 尿素窒素(DRI-CHEM BUN-PIII, FUJIFILM), GPT(DRI-CHEM GPT/ALP-PIII, FUJIFILM), GOT(DRI-CHEM GOT/ALP-PIII, FUJIFILM)測定した。マウスを麻酔・腹部露出後、腎動静脈を一定時間クランプ後に再灌流させて、24時間後に採血・採尿・腎摘出し、腎組織切片を作製した。そしてPAS染色などの組織化学により急性尿管壊死(Acute Tubular Necrosis: ATN)スコアを算出して、尿管障害の程度を評価した。

(4) 腎内硫化水素の検出

硫化水素濃度はDB-1 dimethylpolysiloxane column (Agilent)と7090S sulfur chemiluminescence detector (Antek)を備えたGC-2010 Plus gas chromatograph (Shimadzu)を用いて計測した。腎内の局在を

調べるため、腎臓組織切片をスタンプした銀蒸着板をTime of flight secondary ion mass spectrometry (TOF-SIMS)により表面解析し、銀との反応性が高い硫化水素に由来する分子(Ag²Sクラスターに由来するS²⁻またはAgS⁻)シグナルを基材である銀シグナルとの検出比を算出することでイメージングする手法を新たに構成した(発表論文②)。本手法は富士フイルム社、アルバックファイ社との共同研究である。

4. 研究成果

(1) 2週齢時のCBS欠損、CSE欠損および野生型マウスの血中および尿中アミノ酸濃度の比較し、再吸収率を算出したところCBS欠損ではほとんどの中性アミノ酸の再吸収率が低下し、過剰排泄されるが、血中で特に過剰なメチオニンの再吸収率は野生型並であること、CSE欠損では血中に蓄積するシスタチオンンは効率よく排泄されることが示され(図3), 含硫成分排泄の差が両欠損の表現型の違いに結びつくと考えられた。

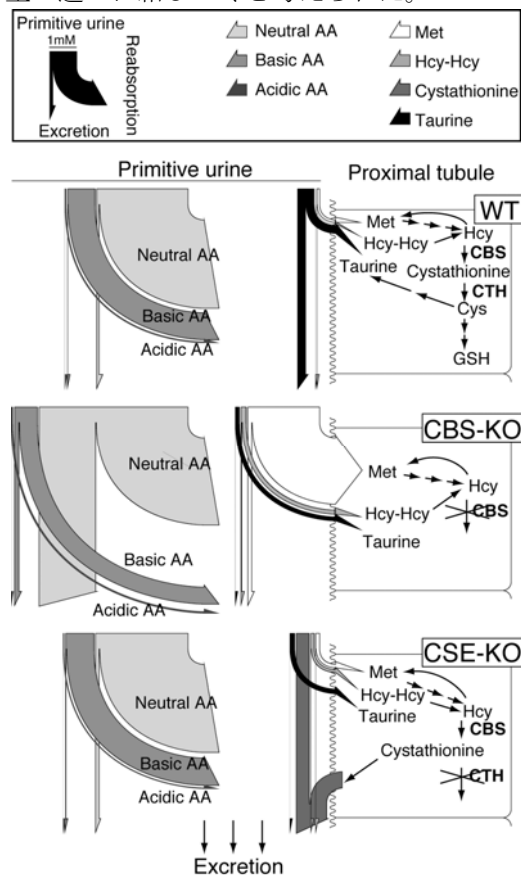


図3.尿管でのアミノ酸再吸収模式図

(2) 硫黄排泄の90%を占める尿中硫酸を測定したところ、CSE欠損マウスでは著減するのに対し、CBS欠損マウスでは、尿中への硫酸排泄は正常だった。シスタチオンンが排泄経路となりうるCSE欠損マウスに対し、CBS欠損マウスでは硫黄排泄経路の代替経路が

働いていることが考えられた。CE-TOF-MS, クーロアレイ, GC を用いた低分子硫黄代謝物のメタボローム解析の結果, 高メチオニン食を投与された野生型マウスでは, 肝臓においてトランスアミレーション経路が活性化すること(発表論文①)が明らかになった。トランスアミレーション経路では毒性のあるメチルメルカプタンが産生されるため, メチオニンが過剰に蓄積する CBS 欠損マウスにおいてもトランスアミレーションによる毒性が病態に関与すると考えられた。また各欠損マウスの GSH レベルは肝臓では著減するが, 腎臓では野生型と同等に維持されており, 腎臓虚血再灌流による尿細管壊死の観察でも顕著な差はなかった。

(3) 野生型および CSE 欠損マウスの成長期および妊娠期の血圧測定では, 成長過程では差は見られなかったが, 妊娠期は経過に伴い野生型マウスでは低下する傾向があったが, CSE 欠損マウスでは上昇傾向で, 妊娠後期には SBP, DBP, MBP ともに有意差が見られた。授乳期に差は見られなかった。CSE 欠損マウスは尿中タンパクが高く, 妊娠高血圧腎症様の病態が見出された(図 4)。CSE 欠損マウスの血清のタンパク質, クレアチニン, 尿素窒素, GOT, GPT レベルは差がないことから, 尿中タンパク量増加は肝疾患や筋量低下などの腎前性の影響ではなく, 腎性のタンパク尿であると考えているが, 組織学的な検証では異常は確認出来ておらず, さらなる検証が必要である。

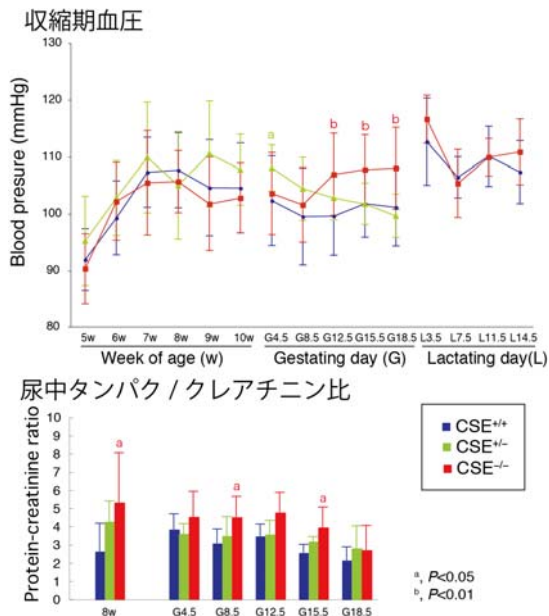


図 4. 血圧変化と尿中タンパク

(4) 妊娠期の血圧上昇の原因として, この時期に著増する腎臓 CSE (肝臓では変化なし) の関与が考えられ, 特に血管拡張因子である硫化水素産生能の低下による血圧上昇が考えられた。GC による硫化水素計測では, 腎臓

は主要臓器で最も硫化水素レベルが高いこと, また野生型マウスを用いた腎臓組織切片の TOF-SIMS による表面解析で, CBS・CSE が発現する腎臓皮質-髄質外帯外層の硫化水素由来と考えられる成分のレベルが高いことが明らかになった(図 5, 発表論文②)。しかしながら各欠損マウスで明確な違いは現在のところ得られておらず, 今後更なる検討が必要である。

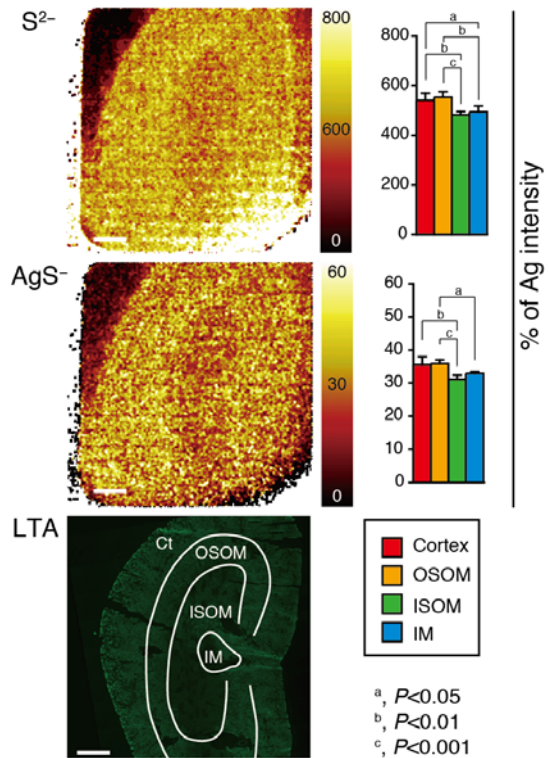


図 5. 硫化水素由来成分の腎内分布

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 4 件)

① Yamada H, Akahoshi N, Kamata S, Hagiya Y, Hishiki T, Nagahata Y, Matsuura T, Takano N, Mori M, Ishizaki Y, Izumi T, Kumagai Y, Kasahara T, Suematsu M, Ishii I. Methionine excess in diet induces acute lethal hepatitis in mice lacking cystathionine γ -lyase, an animal model of cystathioninuria. *Free Radic Biol Med.* 52:1716-1726, 2012 (査読あり)

② Akahoshi N, Ishizaki I, Naya M, Maekawa T, Yamazoe S, Horiuchi T, Kajimura M, Ohashi Y, Suematsu M, Ishii I. TOF-SIMS imaging of halide/thiocyanate anions and hydrogen sulfide in mouse kidney sections using silver-deposited plates. *Anal. Bioanal. Chem.* 402:1859-1864, 2011 (査

読あり)

③Ikeda K, Kubo A, Akahoshi N, Yamada H, Miura N, Hishiki T, Nagahata Y, Matsuura T, Suematsu M, Taguchi R, Ishii I. Triacylglycerol/phospholipid molecular species profiling of fatty livers and regenerated non-fatty livers in cystathionine beta-synthase-deficient mice, an animal model for homocysteinemia/homocystinuria. Anal. Bioanal. Chem. 400:1853-1863. 2011 (査読あり)

④Ishii I, Akahoshi N, Yamada H, Nakano S, Izumi T, Suematsu M. Cystathionine gamma-Lyase-deficient mice require dietary cysteine to protect against acute lethal myopathy and oxidative injury. J. Biol. Chem. 285:26358-26368, 2010 (査読あり)

[学会発表] (計 1 件)

① Akahoshi N, Suematsu M, Ishii I. Pregnancy-induced hypertension and proteinuria in hyperhomocysteinemic mice. 日本生化学会大会, ポスター, 12/2010, 神戸

6. 研究組織

(1) 研究代表者

赤星 軌征 (AKAHOSHI NORIYUKI)
秋田大学大学院・医学系研究科・助教
研究者番号：70534551

(2) 研究分担者 該当なし

(3) 連携研究者 該当なし