

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 6 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24300260

研究課題名(和文) フマル酸による翻訳後修飾の抑制を指標とした最適な栄養バランスの検討

研究課題名(英文) Investigation of optimal nutritional balance based on the inhibition of S-(2-succinyl) cysteine (2SC), post-translational modification by fumarate

研究代表者

永井 竜児 (Nagai, Ryoji)

東海大学・農学部・准教授

研究者番号：20315295

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,000,000円

研究成果の概要(和文)：以前我々は、生活習慣病の進展に伴い脂肪細胞でS-(2-succinyl)cysteine(2SC)が生成することを明らかにしている。今回我々は、組織を破碎せずに血液検査等で2SCを定量する測定法を確立した。さらに、医療従事者による採血が不要で簡便に生体2SCを測定法として髪、爪、さらに指先からの微量血液でも2SCの測定を可能にした。これらの測定法により、腎疾患の発症に伴って顕著に血中2SCが上昇すること、コレステロール値の高い者および、コレステロール値は正常であるが、野菜嫌いな者でも高値になる傾向があることを確認した。

研究成果の概要(英文)：We previously demonstrated that S-(2-succinyl)cysteine(2SC) is generated by the reaction between cysteine and fumarate in adipocytes under hyperglycemic conditions. In the present study, we established the measurement system of 2SC in order to evaluate the mitochondrial disorders without tissue destruction. As results, 2SC was detected not only in serum but also in solid tissues such as hair and nail. Especially 2SC was detectable with 5 microl serum that was obtained from the blood collection from the fingertip. Serum 2SC was increased by the pathogenesis of kidney failures, patients in hypercholesterolemia, and people who do not eat vegetables.

研究分野：生化学 食品化学 分析化学

キーワード：翻訳後修飾 脂肪細胞 生活習慣病 フマル酸 糖尿病

1. 研究開始当初の背景

現在、我が国には糖尿病患者が 890 万人、その予備軍まで含めると 2210 万人存在するが、本疾患を発症すると糖尿病合併症である動脈硬化が進展する。既に、生活習慣病やメタボリックシンドロームという動脈硬化を惹起する病態名は世間に広く浸透しているが、依然として動脈硬化の発症率は増加の一途をたどっている。この原因として、本疾患は進行段階では痛みなどの自覚症状がほとんど現れないため自主的な予防意識が持ち難いという点や、脂質異常症と診断されてから開始される薬物治療では、動脈硬化の発症を遅延はできても十分に抑制できない点があげられる。したがって、動脈硬化の予防は、普段の食生活より糖質・脂質代謝異常を早期に改善することが最善策と考えられる。脂肪組織はアディポサイトカインと呼ばれる様々な内分泌因子の産生を介して糖・脂質代謝、動脈壁の恒常性維持に重要な役割を果たしていることが知られている。しかし、肥大化に伴って脂肪細胞の『善』である生理機能が低下することが知られているが、何故善玉アディポカインであるアディポネクチンの分泌が低下するかなど、そのメカニズムは不明な点が多い。我々は 3T3-L1 脂肪細胞を用いて、脂肪細胞の機能変化に関して化学的翻訳後修飾という側面から解析した結果、高血糖状態では TCA 回路の中間体であるフマル酸の細胞内濃度が上昇し、システインのチオール基と不可逆的に反応して、アディポネクチン、糖代謝に重要な GAPDH、構造蛋白であるビメンチンなど、様々な細胞内蛋白に S-(2-succinyl)cysteine (2SC) が形成される新規な翻訳後修飾反応を発見した (図 1)。

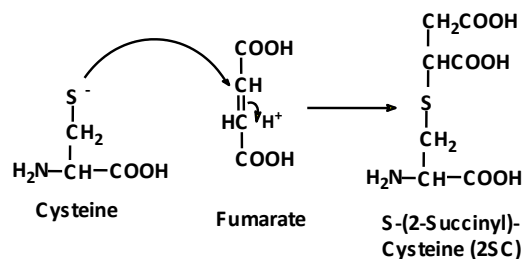


図 1 : 2SC はシステインとフマル酸から生成する

特に、アディポネクチンは重合体形成に関与する Cys-39 が 2SC 化のターゲットであること、細胞内では 2SC 化アディポネクチンが検出されるが細胞培養上清では検出されないことから、2SC 化アディポネクチンの重合体形成および分泌を阻害していることが示された (図 2)。しかし、脂肪細胞においてフマル酸濃度が上昇するメカニズムは解明されていない。

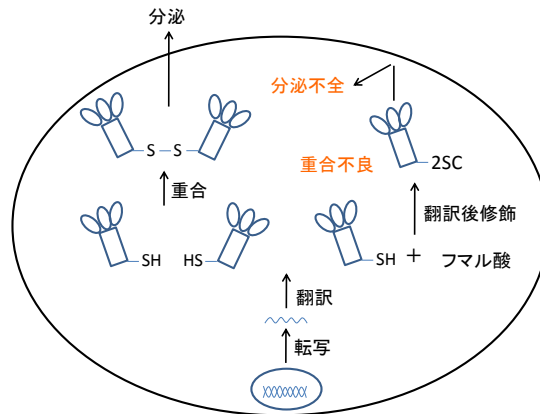


図 2: アディポネクチンの 2SC 化は重合形成と分泌を阻害する

2. 研究の目的

脂肪細胞においてフマル酸濃度が上昇するメカニズムは解明されていない。細胞内フマル酸濃度の上昇は、TCA 回路の代謝異常によって引き起こされると考えられる。現在、細胞内の酸化・還元状態を評価する方法として、培養細胞あるいは組織をまるごと破碎し、細胞内の NADH/NAD 比を測定することが行われている。Frizzell N(Biochem. J., 445, 247-254, 2012)らは、脂肪細胞を 5 mM あるいは 25mM グルコースで培養すると、細胞内 NADH/NAD 比が上昇すると同時に、細胞内 2SC 含量が上昇することを報告している。TCA 回路は NAD 依存的な脱水素酵素反応が 3 カ所存在するため、血液等の体液に含まれる 2SC を測定することによって、組織を破碎せずに細胞内酸化還元環境が評価可能となる可能性が高い。

今回、(1) 2SC 測定系の確立、(2) 糖尿病動物における 2SC の変化、(3) 如何なるヒトの疾患で 2SC が変化するかを検討し、2SC を上昇させる疾患及び食習慣との関与を検討した。

3. 研究の方法

標準 2SC の合成

2SC は N-acetyl-Cys 30 mM, N-ethylmaleimide 60 mM を反応させた後、薄層クロマトグラフィーで生成物を確認した。生成物をダウエックス 50 カラムにアプライした後、5M アンモニアで溶出し、2SC と思われる溶出物をアミノ酸分析で純度検定、NMR で構造解析、液体クロマトグラフィータンデム質量分析装置 (LC-MS/MS) による 2SC 測定の標準物質を得た。同様に 13C-Cys を用いて、内部標準用の 2SC を合成した (図 3)。

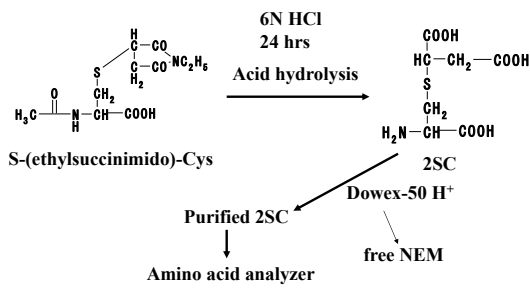


図 3： 2SC の合成

脂肪細胞中 2SC の測定

3T3-L1 脂肪細胞を定法に従って脂肪細胞に分化させた後、回収した細胞蛋白 0.1 mg を 6N HCl、100°C で加水分解した後、細胞内 2SC を LC-MS/MS で定量した。同様に、ラット腸管膜より得たプライマリー脂肪細胞でも細胞内 2SC の測定を行った。

2SC に対するモノクローナル抗体の作製

フマル酸と還元処理したウシ血清アルブミン (BSA) を保温して、2SC が生成したウシ血清アルブミン (以下 2SC-BSA) の調製に成功した。本 2SC-BSA を抗原としてマウスに免疫した後、定法に従い脾臓をミエローマ細胞と融合し、2SC-KLH と反応する株を選択することによって新たにモノクローナル抗 2SC 抗体を作製した。

動物実験

オスの 8 週齢 Wistar ラットにストレプトゾトシンで糖尿病を誘発し、3 ヶ月飼育した後、全血採取、大腿骨、腹大動脈を採取して各検体中の 2SC を測定した。

ヒト検体の分析

如何なる病態で生体における 2SC が促進しているかを評価する目的で、糖尿病患者血清及び腎疾患患者血清において 2SC 含量を測定した。

4. 研究成果

脂肪細胞中 2SC の検出

Hillic カラムを備えた LC-MS/MS 分析では溶出時間 10 分に、親イオン 237+1、プロダクトイオン 221 で 2SC の測定が可能となった。同様に、¹³C-2SC は親イオン 241+1、プロダクトイオン 224 で測定が可能となった (図 4)。

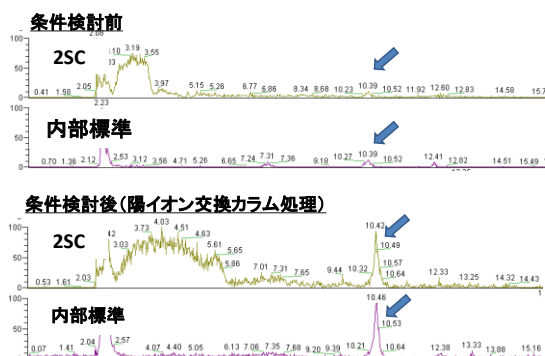


図 4： 標準品及び内部標準品のプロダクトイオン検出条件

脂肪細胞中 2SC の測定は、脂肪酸や様々な夾雑物によってイオンサプレッションの現象がおり、内部標準を含む 2SC の測定感度が著しく低下した。対応策として、細胞蛋白 0.1 mg を 6N 塩酸で加水分解後に塩酸を乾固し、陽イオン交換カラムである Strata-X-C カラムを用いて夾雑物を低減した結果、2SC のシグナルが検出可能となった。実際、未分化 3T3-L1 細胞に比較して、脂肪細胞に分化した細胞では 2SC 含量が高値を示し、脂肪細胞をフマル酸共存下で培養するとさらに 2SC 含量が上昇することが LC-MS/MS で確認された (図 5)。

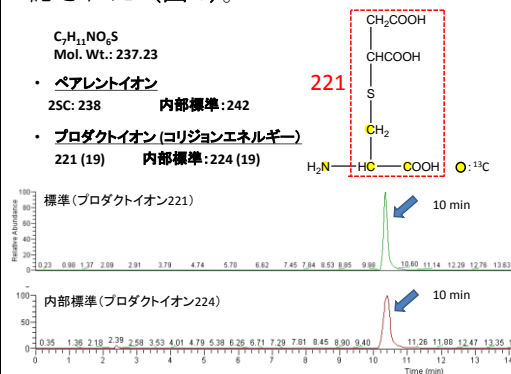


図 5： 前処理条件検討による脂肪細胞 (3T3L1) 中の 2SC 検出ピークの変化

動物組織中 2SC

血清中 2SC の測定は、血清を分子量 3000 のカットオフフィルターで低分子量画分を得ることで測定が可能となった。そこで、健康及び糖尿病を誘発したラットの血清中 2SC を比較した結果、検出されたピークサイズは小さく測定値の信頼性は高くないものの、糖尿病個体で高値を示す傾向にあった。(図 6)。

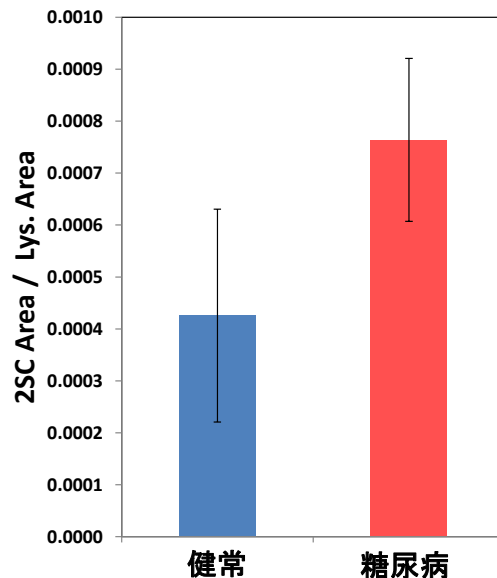


図 6： ラット血清における 2SC 含量の比較

ヒト検体中 2SC の測定

如何なる生体の異常で 2SC が変動するかを検討する目的で、熊本大学との共同研究で糖尿病患者の血清（倫理委員会承認番号 13113）、福岡大学との共同研究で腎疾患患者の血清（倫理委員会承認番号 14035）中 2SC を測定した。その結果、糖尿病では顕著な差は認められなかったが、腎疾患（図 7）の発症に伴って顕著に血中 2SC が上昇することが明らかとなった。

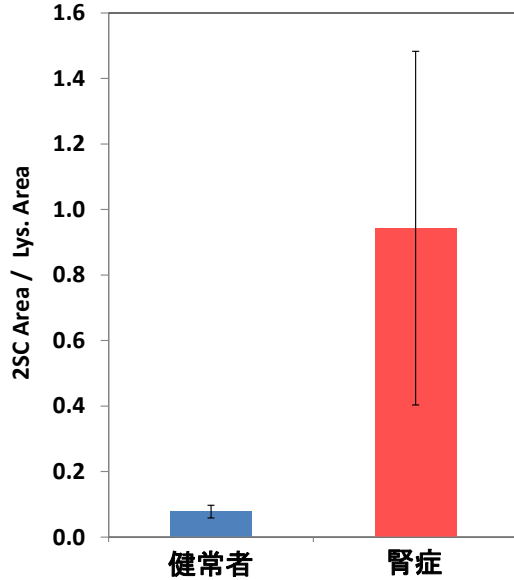


図 7: 健常者及び腎症患者血清中 2SC 含量の比較

ヒト硬組織における 2SC の測定

簡便な 2SC 測定法を確立する目的で、非侵襲的に採取できる爪および毛髪において 2SC の測定を行った。その結果、塩酸加水分解した爪および毛髪には顕著に 2SC が含まれることが明らかとなった（図 8）。

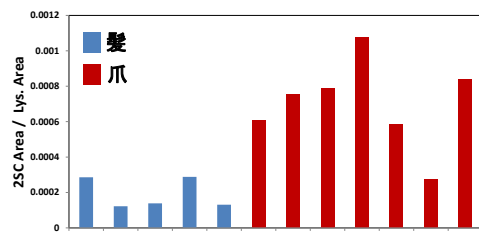


図 8: ヒトの毛髪および爪における 2SC 含量の比較

食習慣と血中 2SC の相関

供与を受けた血清を用い、食習慣と血中 2SC 含量の相関を確認した結果、カップヌードル等、インスタント食の多量摂食者および生活習慣病の罹病履歴のある者において 2SC 含量が高値を示す傾向が認められた（図 9）。

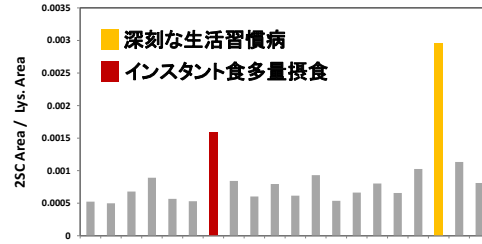


図 9: 食習慣と血中 2SC の相関

モノクローナル抗 2SC 抗体の作製

今年度の研究により、抗原の合成法を改良して新たにモノクローナル抗 2SC 抗体が得られた（図 10）。本抗体は、フマル酸で修飾した BSA および、2SC を結合した KLH と反応性を示すが、未修飾の BSA および KLH とは反応性を示さなかった。

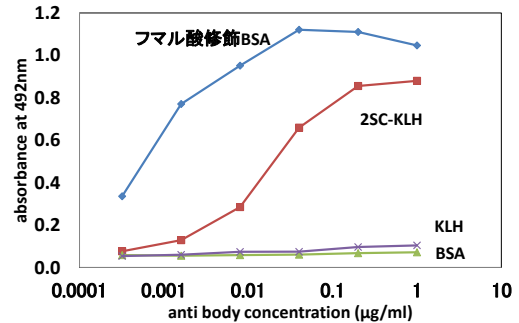


図 10: 抗 2SC 抗体の反応性

まとめ

これまで生体 2SC の測定は、2SC を誘導体化した後、ガスクロマトグラフィー質量分析装置で測定がなされてきたが、より簡便・迅速に 2SC を測定する目的で、液体クロマトグラフィー質量分析装置（LC-MS/MS）で測定する系を検討した。その結果、内部標準の合成に成功し、血清のみならず、爪、毛髪等の生体成分中 2SC の定量が可能となった。ラット血清中 2SC を測定した結果、糖尿病の発症によって高値を示した。ヒトにおける 2SC の変動を調べる目的で、糖尿病患者および腎疾患患者の血清 2SC を測定した結果、腎症において高値を示した。今回得られた糖尿病患者血清は、既に治療が施されており、血糖コントロールの良いグループであったことから、糖尿病群でも高値を示さなかった可能性が高い。つまり血中 2SC は単に高血糖を反映するものではなく、代謝異常によって生成が増加するものと考えられる。

腎症の発症によって高値を示したことから、腎疾患ではミトコンドリアの機能異常が進行している可能性が高い。本メカニズムは、腎症の進展度合いの異なる患者血清中 2SC を測るなど、より詳細な分析が必要となる。

また今回、爪や毛髪という硬組織の 2SC 測定が可能となった。爪や毛髪における 2SC はどの程度昔の代謝環境を反映しているか、病態を反映しているかは今後の課題である。し

かし、非侵襲的に採取できる生体成分から測定できることから、今後、簡便な代謝異常の評価が可能となる可能性が考えられる。

さらに、予試験の段階であるが、食習慣と血中 2SC の相関を確認した結果、インスタント食を多用する者で 2SC 含量が高い者が確認された。今後、被験者を増やし、さらに食週間と 2SC の関連を検討したい。

2SC を測定して代謝異常を簡便に測定するには、ELISA 等、抗体を用いた免疫化学的手法の開発が重要である。今回、モノクローナル抗 2SC 抗体が得られた、本抗体はフマル酸修飾蛋白および、2SC 結合 KLH と顕著な反応性を示した。今後、本抗体を用いた迅速な 2SC 測定系の確立が望まれる。

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 10 件) (全て査読有)

- ① Ohno R, Moroishi N, Sugawa H, Maejima K, Saegusa M, Yamanaka M, Nagai M, Yoshimura M, Amakura Y, Nagai R Mangosteen pericarp extract inhibits the formation of pentosidine and ameliorates skin elasticity, *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition* 査読有、in press 2015 (査読有)
- ② Jo-Watanabe A, Ohse T, Nishimatsu H, Takahashi M, Ikeda Y, Wada T, Shirakawa J, Nagai R, Miyata T, Nagano T, Hirata Y, Inagi R, Nangaku M
Glyoxalase I reduces glycativ and oxidative stress and prevents age-related endothelial dysfunction through modulation of endothelial nitric oxide synthase phosphorylation.
査読有 *Aging Cell*, 13(3):519-528, 2014
doi: 10.1111/accel.12204 (査読有)
- ③ Heilmann M, Wellner A, Gadermaier G, Ilchmann A, Briza P, Krause M, Nagai R, Burgdorf S, Scheurer S, Vieths S, Henle T, Toda M.
Ovalbumin modified with pyrrolidine, a Maillard reaction product, shows enhanced T-cell immunogenicity.
査読有 *J Biol Chem*. 289(11):7919-7928, 2014
doi: 10.1074/jbc.M113.523621 (査読有)
- ④ Nagai R, Shirakawa J, Ohno R, Moroishi N, Nagai M
Inhibition of AGEs formation by natural products
、*Amino Acids*, 46(2):261-266 2014
doi: 10.1007/s00726-013-1487-z (査読有)

- ⑤ Nakano M, Kubota M, Owada S, Nagai R.
The pentosidine concentration in human blood specimens is affected by heating.
査読有 *Amino Acids*. 44(6):1451-1456, 2013
doi: 10.1007/s00726-011-1180-z (査読有)
- ⑥ Moore CJ, Shao CH, Nagai R, Kutty S, Singh J, Bidasee KR.
Malondialdehyde and 4-hydroxynonenal adducts are not formed on cardiac ryanodine receptor (RyR2) and sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPase (SERCA2) in diabetes.
Mol Cell Biochem. 376(1-2):121-135, 2013
doi: 10.1007/s11010-013-1558-1 (査読有)

[学会発表] (計 34 件)

- ① 永井竜児、白河潤一、品川雅敏、畑野孝太、市川寛子、濱田空斗、加藤紗優里、荒川翔太郎、
ミトコンドリアの新規ストレスマーカー 2SC の発見と疾患との関連、
第 67 回日本酸化ストレス学会、京都府上京区 同志社大学今出川キャンパス 良心館、2014 年 9 月 5 日
- ② Nagai R, Shirakawa J, Shinagawa M, Ohno R, Nagai M.
Detection of S-(2-succinyl)cystein (2SC) in adipocytes and in serum by LC-MS/MS as a marker for adipocyte metabolism.
17th Biennial Meeting of Society for Free Radical Research International. 京都府左京区 国立京都国際会館 2014 年 3 月 23 日
- ③ 永井竜児、白河潤一、品川雅敏、多々良友博、有富美貴、佐藤瑛記、永井美芽、
ミトコンドリアの新規ストレスマーカー 2SC の測定意義、
第 66 回日本酸化ストレス学会、愛知県名古屋市 ウィンク愛知 2013 年 6 月 13 日

[図書] (計 4 件)

- ① 品川雅敏、永井竜児・メディカルレビュー、
第 3 版 アンチエイジング医学の基礎と臨床、2015、印刷中
- ② 白河潤一、永井竜児・公益社団法人 日本農芸化学会、化学と生物、2015 印刷中
- ③ 永井竜児、白河潤一、大野礼一、品川雅敏、畑野孝太、須川日加里、山中幹宏、荒川翔太郎、永井美芽・振興医学出版社、
生物学的精神医学会誌、2015 印刷中

- ④ 永井竜児、大島寛史・アイ・ケイコーポレーション、基礎生化学—健康・疾病とのつながり, 2013 総ページ数 259

6. 研究組織

(1) 研究代表者

永井 竜児 (NAGAI Ryoji)
東海大学・農学部・准教授
研究者番号：20315295

(2) 研究分担者

藤原 章雄 (Fujiwara Yukio)
熊本大学・生命科学研究科・講師
研究者番号：70452886

荒木 朋洋 (ARAKI Tomohiro)
東海大学・農学部・教授
研究者番号：20193071