

Title	レドックス応答の制御機構の解明
Sub Title	The mechanism of the oxidative stress response
Author	片山, 隆晴(Katayama, Takaharu)
Publisher	
Publication year	2010
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2009.)
JaLC DOI	
Abstract	アルデヒドの代謝・解毒に関わるアルデヒド脱水素酵素(ALDH2)の機能欠失マウスを作成した。老化類似の表現型を呈するこのマウスの心臓では、代謝過程の変化に基づいた急性の酸化ストレス障害(虚血再灌流障害)抵抗性が認められ、このレドックス応答を制御するシグナル伝達経路を特定することが本研究の主題である。
Notes	研究種目：若手研究(B) 研究期間：2008～2009 課題番号：20790552 研究分野：医歯薬学 科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_20790552seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

平成 22 年 6 月 16 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008 ～ 2009

課題番号：20790552

研究課題名（和文） レドックス応答の制御機構の解明

研究課題名（英文） The mechanism of the oxidative stress response

研究代表者

片山 隆晴（KATAYAMA TAKAHARU）

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：20365240

研究成果の概要（和文）：アルデヒドの代謝・解毒に関わるアルデヒド脱水素酵素(ALDH2)の機能欠失マウスを作成した。老化類似の表現型を呈するこのマウスの心臓では、代謝過程の変化に基づいた急性の酸化ストレス障害（虚血再灌流障害）抵抗性が認められ、このレドックス応答を制御するシグナル伝達経路を特定することが本研究の主題である。

研究成果の概要（英文）：We generated ALDH2*2 transgenic mice. Aldh2*2 transgenic mice showed senescence-like systemic phenotype and showed tolerance to ischemia reperfusion injury in the heart. We clarified the signal transduction mechanism governing this metabolic remodeling and oxidative stress resistant phenotype in this mice heart.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：酸化ストレス、シグナル伝達、アミノ酸、心筋代謝

1. 研究開始当初の背景

(1) アルデヒドの代謝・解毒に関わるアルデヒド脱水素酵素(ALDH2)の機能欠失マウスを作成した。

(2) このマウスは老化類似の全身性表現型を示し、心臓においては、複数の抗酸化機構が協調的に誘導され、その結果として虚血再灌流障害に抵抗性を示していた。

(3) Gcn2-eIF2a-Atf4 経路の活性化に伴う代謝過程の変化が、最終的にグルタチオン合成亢進を介して、虚血再灌流障害に対する抵抗性をもたらしめているものと予想された。

(4) マウス組織中のアミノ酸濃度は特徴的な変化を示していたが、その意義は不明であった。

2. 研究の目的

虚血再灌流障害耐性をもたらす代謝過程変化を制御するシグナル伝達機構を探求することで、生体内におけるレドックス応答を制御機構を明らかにし、新たな酸化ストレス関連疾患に対する治療の介入点を模索することが目的である。

本研究ではアミノ酸飢餓応答として知られる Gcn2-eIF2-Atf4 経路に焦点をあて、アルデヒド代謝障害・アルデヒド付加体の蓄積に対して、(1) 心筋細胞がどのようにストレスを感知しているのか、(2) Gcn2-eIF2a-Atf4 経路のグルタチオン合成亢進・虚血再灌流障害耐性に対する寄与、を明らかにすることを目的とする。

また、細胞内におけるアルデヒドと遊離ヒスチジンの直接付加体形成を証明し、ヒスチジンの消費亢進・枯渇を説明可能することが可能であれば、ストレス感知機構として成り立つと考えた。

3. 研究の方法

ラット心筋細胞を用いた解析

アルデヒド蓄積に伴う Gcn2-eIF2a-ATF4 経路の蛋白レベルでの誘導を確認する。

同様のシステムにおいて、低ヒスチジン培地条件でのシグナル応答を評価し、Gcn2-eIF2a-Atf4 経路に対するヒスチジン濃度の影響を検討する。

また、アデノウイルスによる Aldh2*2 の強制発現を行い、siRNA を用いた Gcn2 遮断を試みる。

Gcn2 ノックアウトマウスを用いた解析

GCN2^{-/-} 胎児線維芽細胞にアデノウイルスベクターを用いて ALDH2*2 を発現させたが、ATF4、phgdh といった遺伝子発現を認めなかった。この予備実験から GCN2 を介した経路がレドックス応答を制御する中心的役割を果たしている可能性が示唆された。

そこで GCN2 ノックアウトマウスと ALDH2*2 トランスジェニックマウスとを交配。表現型・虚血再灌流障害に対する心筋壊死範囲・シグナル応答 (QRT-PCR, Western Blot)・組織アミノ酸濃度測定による解析を行う。

高ヒスチジン餌を用いた解析

高ヒスチジン餌によって組織内ヒスチジン濃度を補正することによって、ALDH2*2 トランスジェニックマウスの表現型・シグナル応答 (QRT-PCR, Western Blot)・虚血再灌流障害による心筋壊死範囲の解析を行う。

アルデヒドと遊離ヒスチジンの付加体形成についての解析

蛋白内ヒスチジン残基と

4HNE (4-Hydroxy-2-nonenal) については Michaelis 反応により付加体を形成することが既知であるが、組織の遊離ヒスチジンもまた、4HNE をはじめとするアルデヒド類分子と付加体を形成して消費されることが予想される。精製済みの 4HNE-ヒスチジン付加体を標準物質として使用することで、4HNE とヒスチジンの付加体形成過程を捉える。

4. 研究成果

ラット心筋細胞を用いた解析

4HNE 刺激によって、Gcn2-eIF2a-ATF4 経路の誘導が、蛋白レベルで確認可能であった。

低ヒスチジン培地条件下で、4HNE 刺激を行い、Gcn2-eIF2a-Atf4 経路の誘導はさらに増幅されることが明らかになった。

アデノウイルスによる Aldh2*2 の強制発現を行い、Gcn2-eIF2a-Atf4 経路誘導の確認が可能であった。siRNA を用いた Gcn2 経路の遮断を試みたが、eIF2a あるいは Atf4 経路の誘導については明らかな変化は認められなかった。

Gcn2 ノックアウトマウスを用いた解析

交配によって Gcn2 ノックアウト・Aldh2*2 トランスジェニックのマウスが作成されたが、Gcn2 ノックアウトマウスの影響が認められなかった。

表現型は Aldh2*2 トランスジェニックマウスと同様であった。ATF4 および下流遺伝子発現に関して、マイクロアレイを用いた解析によって評価を行ったが、明らかな差を認めなかった。

その理由として生体内では、とくに Aldh2*2 トランスジェニックマウスのように著明なアルデヒド蓄積での適応を余儀なくされるような場合には、PERK, HRI, PKR といった他の eIF2a リン酸化酵素が補完的に機能する可能性を考えた。

Gcn2-eIF2a-Atf4 経路の関与を明らかにすることが重要であったことから、次に Atf4 ノックアウトマウスを用いた解析を行った。交配によって Atf4 ヘテロノックアウト・Aldh2*2 トランスジェニックマウスが作成され、これについて解析を行った。

マイクロアレイを用いた解析によって誘導遺伝子についての評価を行ったところ、Aldh2*2 による遺伝子誘導が抑制されること

が確認された。

細胞内グルタチオン濃度については、Aldh2*2 トランスジェニックによる上昇が、Atf4 ヘテロノックアウトによって抑制された。

虚血再灌流障害に対する抵抗性についても、Atf4 ヘテロノックアウトによって、虚血再灌流障害耐性の表現型が減弱する(すなわち、Aldh2*2 トランスジェニックマウス程には虚血再灌流障害に対して強い耐性を示さない)ことが示された。

上記結果から、Aldh2*2 トランスジェニックマウスにおけるレドックス応答の制御機構に Atf4 が重要な役割を果たすことが示された。

高ヒスチジン餌を用いた解析

離乳後(生後3週間後)から高ヒスチジン餌を投与した ALDH2*2 トランスジェニックマウスでは、心筋組織中のヒスチジン濃度が正常化した。表現型では、骨格筋・心筋の萎縮が抑制され、表現型も部分的ではあるが軽減された。

遺伝子発現については、ATF4 およびその下流遺伝子である Phgdh などのアミノ酸代謝遺伝子の発現誘導が、約 50%程度抑制されたことから、ヒスチジン濃度低下がこのレドックス応答制御に部分的に寄与していることが示された。

蛋白レベルの変化についても、ヒスチジン濃度の正常化によって Gcn2-eIF2a-Atf4 経路の亢進が減弱することが確認された。

細胞内グルタチオン濃度上昇についても、ヒスチジン濃度の正常化によって、合成亢進が抑制されたことが示された。

虚血再灌流障害に対する抵抗性についても、ヒスチジン濃度の正常化によって、虚血再灌流障害耐性の表現型が減弱する(すなわち、Aldh2*2 トランスジェニックマウス程には虚血再灌流障害に対して強い耐性を示さない)ことが示された。

上記結果から、組織ヒスチジン濃度の低下が、少なくとも部分的には、レドックス応答の制御機構として寄与している可能性を示すことができた。

アルデヒドと遊離ヒスチジンの付加体形成についての解析

試験管内においてヒスチジン 5mM と 4HNE 1mM を混合し、試験管内で新たな付加体が形成されていることを示すことができた。

心筋細胞を、無ヒスチジン培地中で 4HNE で刺激したが、明らかな付加体形成を捉える

ことができなかった。4HNE 刺激による心筋細胞内のヒスチジン濃度は、一過性の低下を認めしたが、表現型を説明しうる程の持続的な低下は証明できなかった。

ALDH2*2 トランスジェニックマウスの心臓組織サンプル中での 4HNE とヒスチジンの付加体の有無を解析したが、明らかな付加体形成は捉えることができなかった。

上記結果からは、4HNE と遊離ヒスチジンの付加体形成によって、組織中のヒスチジン濃度低下を説明することは難しいと考えた。

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 1 件)

Jin Endo, Motoaki Sano, Takaharu Katayama, et al. Metabolic Remodeling Induced by Mitochondrial Aldehyde Stress Stimulates Tolerance to Oxidative Stress in the heart. Circulation Research. 105(11).Oct 8, 2009.p1118 -1127 査読有

[学会発表](計 7 件)

発表者:Takaharu Katayama
標 題:Reduction of intracellular histidine triggers cardiac stress response to aldehydes
学会名:日本循環器学会
年月日:2010.3.7
場所:京都

発表者:Takaharu Katayama
標 題:Atf4 plays a key role in antioxidant stress response in the heart
学会名:日本循環器学会
年月日:2009.3.21
場所:大阪

発表者:Takaharu Katayama
標 題:Kinase dependent metabolic shift towards the serine synthesis enhances cardioprotection to oxidative stress as hormesis to aldehydes
学会名:国際心臓研究会
年月日:2008.12.5
場所:横浜

発表者:Takaharu Katayama
標 題:Sublethal levels of aldehydes

augmented cardiac anti-oxidative defense
through activation of eIF2a-Atf4 pathway
via Gcn2 kinase
学会名:アメリカ心臓病学会
年月日:2008.11.7
場所: New Orleans, USA

発表者:Takaharu Katayama
標 題 :Tissue histidine deprivation
mediates cardiac antioxidant defense via
activation of Gcn2-eIF2a-Atf4 pathway
学会名:心不全学会
年月日:2008.10.16
場所: 品川

発表者:Takaharu Katayama
標 題 :Tissue histidine deprivation
mediates cardiac antioxidant defense via
activation of Gcn2-eIF2a-Atf4 pathway
学 会 名 :Molecular Cardiovascular
Conference
年月日:2008.9.4
場所: 北海道きろろ

発表者:Takaharu Katayama
標 題 :Tissue histidine deprivation
mediates cardiac antioxidant defense via
activation of Gcn2-eIF2a-Atf4 pathway
学会名:アメリカ心臓病学会 BCVS
年月日:2008.7.29
場所: Keystone, USA

6 . 研究組織

(1)研究代表者

片山 隆晴 (KATAMAYAMA TAKAHARU)
慶應義塾大学・医学科・助教
研究者番号: 2 0 3 6 5 2 4 0

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし