

氏名	かまた しょうたろう 鎌田 祥太郎
学位の種類	博士(薬科学)
学位記番号	博士甲第 4616 号
学位授与の日付	平成 29 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	プロテオミクスを用いた心血管病発症危険因子ホモシステインの 新規作用機序の探索
論文審査委員	(主査) 教授 長谷 耕二 (博士(薬学)) (副査) 教授 服部 豊 (医学博士) 教授 大澤 匡範 (博士(学術))

論文内容の要旨

【背景・目的】

ホモシステイン(Homocysteine、Hcy、 $\text{HS}-(\text{CH}_2)_2-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{COOH}$)は、必須アミノ酸の Met から Cys が生合成される際の間接代謝体で、生体に普通に存在するアミノ酸であるが、その血中濃度の上昇は心血管病発症の独立の危険因子として認識されている。Hcy の代謝酵素である Cystathionine β -synthase (CBS) の先天欠損は、血栓塞栓症や精神発達遅延などの重篤な病態を示す遺伝病ホモシチン(Hcy²、Hcy 二量体)尿症の原因として知られ、未治療患者は 30 歳代より心筋梗塞や脳卒中で亡くなるため、本邦を含む先進国では新生児マススクリーニング検査項目に指定され、早期治療が行われている。しかし、Hcy の作用機序については諸説あるものの未だ不明である。ホモシチン尿症モデルとして作製された CBS 欠損マウスは成長遅滞や脂質代謝異常(脂肪肝)を示し、多くが 4 週齢までに死亡するが、その理由もやはり不明である。本研究は Hcy の作用機序を調べることを目的とし、2D-DIGE 網羅的 Proteome 解析系を用いて、脂肪肝を呈する 2 週齢 CBS 欠損マウスの血漿と肝臓のタンパク質発現プロファイルを対照野生型マウスと比較した。その結果、CBS 欠損肝における脂質代謝の主要制御因子 PPAR α の活性抑制を見出し、さらに Hcy² が PPAR α アンタゴニストとして機能すること、そして Hcy が PPAR α ligand-binding domain (LBD) の Cys248 残基への S-S 付加修飾する X 線結晶構造を初めて明らかにした。

【実験方法】

2D-DIGE 網羅的 Proteome 解析系とタンパク質同定

2 週齢の野生型及び CBS 欠損マウスの肝臓 Homogenate (各 $n=4$)、そして全 8 サンプルを均等混合したものを Cy2、Cy3、Cy5 のいずれかで蛍光標識し、二次元電気泳動を行った。野生型と CBS 欠損マウスでタンパク質濃度に差がある血漿については、個々

のサンプル間で比較した。蛍光スキャナーで3種蛍光を検出し、肝臓では DeCyder 2D (GE Healthcare) ソフトウェアを用いて定量解析した。さらに銀染色スポットを切り出し、トリプシン消化後、MALDI-TOF/MS と MASCOT Search を用いて同定した。

Time-Resolved Fluorescence Resonance Energy Transfer (TR-FRET) assay

Hcy を含む各種生体硫黄化合物のヒト PPAR α 及び PPAR γ への結合活性は、LanthaScreen® TR-FRET PPAR α (PPAR γ) Coactivator Assay Kit (Life Technologies) を用いて測定した。自ら精製した hPPAR α LBD (Ligand-binding domain) を用いる場合には LANCE Ultra TR-FRET Assay (PerkinElmer) を使用した。

Surface Plasmon Resonance (SPR) Analysis

Sensor Chip SA に Biotin-PGC1 α ペプチドを固定し、精製 hPPAR α LBD と PPAR α アゴニストである GW7647 をあらかじめ混ぜたものをアナライトとして、レスポンスの変化及び Kd 値を Biacore X100 または Biacore T100 (GE Healthcare) を用いて測定した。

食餌誘導高ホモシステイン血症における PPAR α 阻害効果の検証

マウス標準飼育餌 CE-2 (日本クレア、0.44% Met 含有) を元に、6 倍の Met (2.64%) を含む 6 \times Met 餌、0.1% (w/w) Fenofibrate 餌 (FF 餌)、6 \times Met-0.1% Fenofibrate 餌 (FF-Met 餌) を作成した。野生型マウスに 4 日間 CE-2 または Met 餌を与え、その後 3 日間 CE-2 を与えた群の半分を FF 餌に、Met 餌を与えた群の半分を FF-Met 餌に換えて飼育した (各 $n=8$)。

X 線結晶構造解析

大腸菌に hPPAR α LBD プラスミドを導入し、IPTG を用いて発現誘導した。15 °C 24 時間培養後、集菌、超音波破碎し、コバルトカラムで His-Tag タンパク質を精製した。その後 His-Tag を切断し、陽イオン交換カラム、ゲル濾過カラムで精製した。精製タンパクとリガンドを混合した後、各種リザーバー溶液と 1 μ L ずつ混ぜ、Sitting drop または Hanging drop 法で静置した。Seeding 法では hPPAR α LBD と Wy14643 の共結晶をすりつぶし、Streak-seeding を行なった。Soaking 法では脂肪酸結合結晶をリガンド溶液に浸し、2 週間 4 °C 静置した。X 線回折データはつくば Photon Factory または SPring-8 ビームラインにて取得した。X 線回折データ処理計算は HKL2000、構造精密化計算は Phoenix パッケージ、分子モデル構築は Coot を用いて行った。

【結果・考察】

CBS 欠損マウスでは、血中総 Hcy、AST、ALT とも 1、2、4 週と経時的に増加し、一方 (随時) 血糖値は低下していた。血中 TG、NEFA、PL、T-Cho は 2 週齢でのみ有意に上昇していたが、肝切片の Oil red O 染色の結果では、1 週齢ですでに脂肪変性が確認され、2、4 週では次第に寛解する傾向にあった。

CBS 欠損マウスの血漿タンパク質を 2D-DIGE 解析すると、1 週齢は顕著な変化はなく、2、4 週齢で多くのタンパク質発現変化が観察された。うち 16 種を同定した。ほと

んどのタンパク質の発現が低下する中、 α -fetoprotein (AFP) の顕著な発現増加が 2、4 週齢で観察された。胎児期に卵黄嚢と肝臓で合成されるアルブミンスーパーファミリーに属する糖タンパク質である AFP は、生後発現量が著しく減少することが知られている。エストロゲンや脂肪酸、ビリルビン、 Cu^{2+} や Ni^{2+} などを輸送する機能を担うとされ、成人における血中 AFP 発現は肝細癌マーカーとして知られている。二次元電気泳動ゲルを転写し抗 AFP 抗体で Immunoblot すると、化学修飾状態が異なると考えられる 9 個のスポットが確認された。CBS 欠損マウスでは、そのいずれも発現量が高かった。血清と肝臓で週齢ごとに Immunoblot したところ、1 週齢まで違いはなく、2 週齢では野生型で減少したが CBS 欠損では発現量を維持していた。Afp mRNA を qPCR 定量すると、野生型では 2、4 週と mRNA 発現が減少したのに対し、CBS 欠損ではその減少は緩やかだった。以上より、成長に伴う AFP 減少が CBS 欠損マウスでは遅延すると判明した。

肝臓では 1 週齢では顕著な変化はなく、2、4 週齢で多くのタンパク質の発現変化が観察された。Decyder 2D による定量解析で有意な発現変化を示したタンパク質 116 種を同定した。そのうち 1.5 倍以上の増減を示すタンパク質について IPA により上流制御因子を調べたところ、23 種の制御に関わる PPAR α が最高スコアで推定された。PPAR α 及びその制御遺伝子群は、1~2 週齢にかけて肝臓での mRNA 発現が減少し、その一部はタンパク質発現減少も伴っていた。PPAR はステロイドホルモン受容体スーパーファミリーに属する核内受容体であり、PPAR α 、PPAR δ 、PPAR γ の 3 つのサブタイプが存在する。PPAR α は脂質代謝、糖代謝、アミノ酸代謝、炎症、細胞増殖など多岐に亘る生理機能を制御し、PPAR α 欠損マウスは定常状態で顕著な表現型を示さないが、絶食時に脂質の β 酸化がうまく機能せず脂肪変性を引き起こす。FF など Fibrate 系薬剤は PPAR α アゴニストとして働き、血中 TG 減少と HDL 増加作用により高脂血症の治療薬として使われ、さらに糖尿病性網膜症などの微小血管疾患に対しても効果が確認されている。

Hcy と PPAR α の関係を調べるため、まず PPAR α TR-FRET Assay Kit を用いて PPAR α と Coactivator (PGC1 α) の結合に対する各種生体硫黄化合物の活性を測定し、Hcy²、シスチン (Cys²)、酸化型グルタチオン (GSSG) に競合活性を確認した。さらに hPPAR α -Full-Length (FL) 精製タンパク質と PGC1 α ペプチドを用いて SPR assay を行い同様の結果を得た。野生型マウスに CE-2、6 \times Met 餌、0.1%FF 餌、0.1%FF-6 \times Met 餌を与えた実験では、血中総 Hcy 濃度は CE-2 餌及び FF 餌と比べ、Met 餌及び FF-Met 餌で上昇していた。肝臓中の PPAR α 及びその制御遺伝子の mRNA 量を qPCR 定量したところ、Acat1、Acox1、Ppara は CE-2 餌と比べ Met 餌で、Acat1 と Ucp3 は FF 餌と比べ FF-Met 餌で、それぞれ有意に減少していた。食餌誘導性高 Hcy 血症においても PPAR α 及びその制御遺伝子の mRNA 発現は有意に抑制され、さらに FF の作用を減弱させていることが判明した。

当初精製 hPPAR α -FL と PGC1 α ペプチドを用い TR-FRET を試みたが、タンパク質安定性の問題で還元剤不在下での測定は困難であった。山梨大学の大山拓次准教授に

hPPAR α -LBD の精製方法を御教授頂き、それを用いたところ Hcy² と Cys² のそれぞれに阻害活性を確認した。次に SPR assay を行い、Hcy² と Cys² による PPAR α 阻害活性を確認した。つまり、PPAR α アゴニストの GW7647 を加えると K_d 値は低下するが、Hcy² や Cys² を加えるとその K_d 値は上昇した。以上により、Hcy²、Cys² が内在性 PPAR α アンタゴニストとして作用しうることが示された。

次に hPPAR α -LBD との結合様式を明らかにするため共結晶化を試みた。様々な検討を行い(大腸菌由来)脂肪酸の結合結晶、Wy14643 共結晶、Wy14643 Soaking 結晶、Hcy² 共結晶、Hcy² Soaking 結晶、GSSG 共結晶の 6 種結晶を得た。これらをつくば Photon Factory または SPring-8 のビームラインにて解析し、X 線回折データを得た。そして現在 PDB 登録されている 18 種の PPAR α 構造解析データ中の最高分解能 1.75 Å を上回る、最高 1.28 Å の高分解能データの取得に成功した。リガンド無添加で作成した結晶では、大腸菌由来の脂肪酸がリガンドポケットに結合していた。GSSG 共結晶では GSSG の結合は確認できず、同脂肪酸が結合していた。そして、Hcy² 共結晶と Hcy² Soaking 結晶では共に Cys248 残基に、Hcy が S-S 共有結合することが確認された。同脂肪酸はリガンドポケットに結合したままであった。また、Wy14643 共結晶、Wy14643 Soaking 結晶では、同脂肪酸の代わりに 2 分子の Wy14643 が結合していた。PPAR α はアゴニストが結合すると Helix 12 を形成し、Coactivator と結合できる立体構造となるが、今回得られた 6 種結晶全てにおいて Helix 12 が形成していた。また、PPAR α 結晶中の脂肪酸と Wy14643 が Soaking により入れ替わることが示された。

以上、本研究では、2D-DIGE 網羅的 Proteome 解析系を立ち上げ、高 Hcy 血症(ホモシスチン尿症)モデルである CBS 欠損マウスの血漿・肝臓タンパク質の解析に適用し、その結果、Hcy の新規作用機序として直接化学修飾による PPAR α シグナル抑制作用を示唆する強力な証拠(TR-FRET assay、SPR assay、X 線構造解析)を取得した。この Hcy 付加修飾が、CBS 欠損マウス或いはホモシスチン尿症患者に見られる各種表現型の原因であるか否かを今後調べていく予定である。

なお本研究は、薬学部遺伝子組換え実験安全委員会(許可番号 06-11: アミノ酸代謝・脂質代謝に関する研究)及び慶應義塾動物実験委員会(許可番号 09187-(2)~(5): メチオニン代謝系の生理的役割)に研究計画書を提出し、その内容が承認されたものである。

論文審査結果の要旨

本論文は、ホモシスチン尿症モデルマウスにおける病態とその発症原因について調べようとしたものである。ヒト遺伝病であるホモシスチン尿症の発症頻度は約 20 万人に 1 人と低頻度であるが、未治療の場合若齢期に死亡しうるため、現在マススクリーニング項目に指定され、早期発見・早期治療が行われている。その病態は高ホモシステイン血症によると思われるが、その分子機序は不明である。一方で、血中ホモシステイン濃度のわずかな上昇は心血管病の危険因子として広く知られているが、その機序もまた不明である。申請者は、そのモデル動物である CBS 欠損マウスの血液と肝臓のプロテオーム解析を通して、その病態発症と関連しうる血中 AFP の蓄積と肝臓での PPAR α シグナルの減弱を明らかにした。

申請者はまず、本学にて 2D-DIGE プロテオーム解析系を立ち上げ、CBS 欠損マウスの血漿において AFP が過剰蓄積することを見出した。また、CBS 欠損マウスの肝臓において数多くのタンパク質発現が変化し、その中で主に脂質代謝に関わる核内受容体である PPAR α シグナルの抑制を示唆するタンパク質発現変化を見出した。これらの結果から含硫アミノ酸代謝物の中に、PPAR α アンタゴニストとなるものがあると予想して TR-FERT 及び SPR assay を行い、ホモシスチンに PPAR α アンタゴニスト活性があることを発見した。さらにホモシスチンの PPAR α への結合様式を明らかにするため、様々な結晶化法の試行錯誤の後、ホモシスチンと PPAR α の共結晶作成に成功して X 線結晶構造解析を行い、過去に報告されたどの PPAR α 結晶構造よりも高解像度での解析に成功した。そして、PPAR α のとあるシステイン残基にホモシステインが共有結合することを見出した。脂質代謝のメインレギュレーターで創薬標的でもある PPAR α に内在性アミノ酸が結合して制御しうるという、波及効果の大きな新発見と思われる。

口頭発表に対し、副査の服部教授から「CBS 欠損マウスの肝臓において PPAR α の mRNA が減少するのはなぜか」との質問があり、申請者は「おそらくポジティブフィードバックを受けるため」と返答した。また「PPAR α は AFP を制御しているか」との質問には「受けるとの報告は過去にない」と回答した。また副査の大澤教授からは「結晶構造と活性との相関をどのように説明するか」とのご指摘があり、それには「結晶構造では溶液中とは異なる構造をとる可能性があり、それも考慮したさらなる解析が必要である」と返答した。また「X 線結晶構造解析とは別の方法でも、結合を確認する必要があるのではないか」と指摘を受け、今度の課題とした。

申請者の博士論文、発表会での発表、諮問に対する回答はおおむね妥当であり、ホモシステインの新規作用点を独自の手法により提案した本研究は学術的に大きな価値があり、博士(薬科学)を授与するにふさわしい学力を有すると判断した。

論文目録

1.主論文に関連する原著論文

Kamata S, Akahoshi N, Ishii I. 2D DIGE proteomic analysis highlights delayed postnatal repression of α -fetoprotein expression in homocystinuria model mice. *FEBS Open Bio*, 5:535-541 (2015)

2.参考論文

Kamata S, Ishii I. Rapid 2D DIGE proteomic analysis of mouse liver. In *Methods in Molecular Biology, Difference Gel Electrophoresis-Methods and Protocols*. Ohlendieck K, eds, Springer, New York, *in press* (2017)

Kitada Y, Kajita K, Taguchi K, Mori I, Yamauchi M, Ikeda T, Kawashima M, Asano M, Kajita T, Ishizuka T, Banno Y, Kojima I, Chun J, **Kamata S**, Ishii I, Morita H. Blockade of Sphingosine 1-Phosphate Receptor 2 Signaling Attenuates High-Fat Diet-Induced Adipocyte Hypertrophy and Systemic Glucose Intolerance in Mice. *Endocrinology*, 157(5):1839-1851 (2016)

Ishii I, **Kamata S**, Hagiya Y, Abiko Y, Kasahara T, Kumagai Y. Protective effects of hydrogen sulfide anions against acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice. *J Toxicol Sci*, 40(6):837-841 (2015)

Abiko Y, Ishii I, **Kamata S**, Tsuchiya Y, Watanabe Y, Ihara H, Akaike T, Kumagai Y. Formation of sulfur adducts of N-acetyl-p-benzoquinoneimine, an electrophilic metabolite of acetaminophen in vivo: participation of reactive persulfides. *Chem Res Toxicol*, 28(9):1796-1802 (2015)

Yamamoto J, **Kamata S**, Miura A, Nagata T, Kainuma R, Ishii I. Differential adaptive responses to 1- or 2-day fasting in various mouse tissues revealed by quantitative PCR analysis. *FEBS Open Bio*, 5:357-368 (2015)

Nakano S, Ishii I, Shinmura K, Tamaki K, Hishiki T, Akahoshi N, Ida T, Nakanishi T, **Kamata S**, Kumagai Y, Akaike T, Fukuda K, Sano M, Suematsu M. Hyperhomocysteinemia abrogates fasting-induced cardioprotection against ischemia/reperfusion by limiting bioavailability of hydrogen sulfide anions. *J Mol Med*, 93(8):879-889 (2015)

*Hagiya Y, ***Kamata S** (*equal contribution), Mitsuoka S, Okada N, Yoshida S, Yamamoto J, Ohkubo R, Abiko Y, Yamada H, Akahoshi N, Kasahara T, Kumagai Y, Ishii I. Hemizygoty of transsulfuration genes confers increased vulnerability against acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice. *Toxicol Appl Pharmacol*, 282(2):195-206 (2015)

Akahoshi N, **Kamata S**, Kubota M, Hishiki T, Nagahata Y, Matsuura T, Yamazaki C, Yoshida Y, Yamada H, Ishizaki Y, Suematsu M, Kasahara T, and Ishii I. Neutral aminoaciduria in cystathionine β -synthase-deficient mice, an animal model of homocystinuria. *Am J Physiol Renal Physiol*, 306(12):F1462-1476 (2014)

Kamata S, Yamamoto J, Kamijo K, Ochiai T, Morita T, Yoshitomi Y, Hagiya Y, Kubota M, Ohkubo R, Kawaguchi M, Himi T, Kasahara T, and Ishii I. Dietary deprivation of each essential amino acid induces differential systemic adaptive responses in mice. *Mol Nutr Food Res*, 58(6):1309-1321 (2014)

Kamata S and Ishii I. Protective roles of transsulfuration against methionine toxicity. In: Methionine: Biosynthesis, Chemical Structure and Toxicity, edited by Snegursky A. New York, *Nova Science Publishers*. p143-153 (2013)

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, and Ishii I. Methionine excess in diet induces acute lethal hepatitis in mice lacking cystathionine β -ase, an animal model of cystathioninuria. *Free Radic Biol Med*, 52:1716-1726 (2012)