

報告番号	甲 乙 第	号	氏 名	鎌田 祥太郎
主 論 文 題 名： 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				
<b>【背景・目的】</b> 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 $\beta$ -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スチン(Hcy <sup>2</sup> 、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。ホモシス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 $\alpha$ の活性抑制を見出し、さらにHcy <sup>2</sup> がPPAR $\alpha$ アンタゴニストとして機能すること、そしてHcyがPPAR $\alpha$ 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。				
<b>【結果・考察】</b> 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、 $\alpha$ -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 <sup>2+</sup> やNi <sup>2+</sup> 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15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 $\alpha$ が最高スコアで推定された。PPAR $\alpha$ 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 $\alpha$ 、PPAR $\delta$ 、PPAR $\gamma$ の3つのサブタイプが存在する。PPAR $\alpha$ 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 $\alpha$ 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 $\beta$ 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 $\alpha$ 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 $\alpha$ の関係を知るため、まずPPAR $\alpha$  TR-FRET Assay Kitを用いてPPAR $\alpha$ とCoactivator(PGC1 $\alpha$ )の結合に対する各種生体硫黄化合物の活性を測定し、Hcy<sup>2</sup>、シスチン(Cys<sup>2</sup>)、酸化型グルタチオン(GSSG)に競合活性を確認した。さらにhPPAR $\alpha$ -Full-Length(FL)精製タンパク質とPGC1 $\alpha$ 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 $\alpha$ 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 $\alpha$ 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 $\alpha$ -FLとPGC1 $\alpha$ 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 $\alpha$ -LBDの精製方法を御教授頂き、それを用いたところHcy<sup>2</sup>とCys<sup>2</sup>のそれぞれに阻害活性を確認した。次にSPR assayを行い、Hcy<sup>2</sup>とCys<sup>2</sup>によるPPAR $\alpha$ 阻害活性を確認した。つまり、PPAR $\alpha$ アゴニストのGW7647を加えるとKd値は低下するが、Hcy<sup>2</sup>やCys<sup>2</sup>を加えるとそのKd値は上昇した。以上により、Hcy<sup>2</sup>、Cys<sup>2</sup>が内在性PPAR $\alpha$ アンタゴニストとして作用していることが示された。

次にhPPAR $\alpha$ -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、Hcy<sup>2</sup>共結晶、Hcy<sup>2</sup> 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 $\alpha$ 構造解析データ中の最高分解能1.75Åを上回る、最高1.28Å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、Hcy<sup>2</sup>共結晶とHcy<sup>2</sup> 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 $\alpha$ 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 $\alpha$ 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 $\alpha$ 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。

### 【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 $\alpha$ 及び PPAR $\gamma$ への結合活性は、LanthaScreen® TR-FRET PPAR $\alpha$  (PPAR $\gamma$ ) Coactivator Assay Kit (Life Technologies) を用いて測定した。自ら精製した hPPAR $\alpha$ 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 $\alpha$ ペプチドを固定し、精製 hPPAR $\alpha$ LBD と PPAR $\alpha$ 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  $K_d$  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チン血症における PPAR $\alpha$ 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 6xMet 餌、0.1% (w/w) Fenofibrate 餌 (FF 餌)、6xMet-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 $\alpha$ LBD プラスミドを導入し、IPTG を用いて発現誘導した。15°C で 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、各種リザーブ溶液と 1  $\mu$ L ずつ混ぜ、Sitting drop または Hanging drop 法で静置した。Seeding 法では hPPAR $\alpha$ 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 で静置した。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。