

研究課題名：ガス分子を介した新しい生体制御機構の学際的アプローチ
による解明と医学への応用

研究課題名：Biomedical Application of Gas Biology through
Multidisciplinary Approaches

研究代表者：末松 誠 (MAKOTO SUEMATSU)
慶應義塾大学医学部教授 医化学教室



推薦の観点：創造的・革新的・学際的学問領域を創成する研究

研究の概要：生体高分子の隙間に浸透し、低分子の官能基を認識して部位特異的に結合しその機能を調節できるガス分子による生体制御の生物学 (Gas Biology) の推進を目指し、**ガス分子の生成・受容・分配に関わる主要標的分子を同定**し、これらの分子機能の人為的制御法を確立することにより、代謝の酸素依存性が問題となる**幹細胞生物学**や**病原微生物統御**などの基礎医学研究、あるいは**循環器疾患制御**、**救急蘇生学**などの臨床医学研究での展開を果たすことを目的とする。

研究分野・科研費の分科・細目/キーワード：医歯薬学・基礎医学・病態医化学/一酸化炭素、ガスバイオロジー、酸素センサー、メタボローム、生体情報工学、構造生物学、グルタチオン、Hypoxia inducible factor

1. 研究開始当初の背景

生体ガス分子は(1)酵素分子構造の「隙間」に浸透し部位特異的に金属原子や硫黄原子を含有する補欠分子族に結合することにより酵素反応速度を劇的に変化させる、(2)低分子生理活性分子と可逆的・不可逆的に複合体を形成することにより生物作用を發揮すると考えられる。従って、ガス分子の標的分子に対する親和性は、結合部位の生理的酸化還元状態により大きく左右されるため、*in vitro*での genomics や proteomics 技術では取得できない、*in vivo*の酵素の酸化還元状態を反映させた解析技術によるガス分子の作用点探索法が必要であった。末松と分担研究者の曾我は学際的研究を通じ、分子量 1000 以下の低分子代謝物の網羅的定量的解析を可能とする世界最先端のメタボローム・質量分析技術が、生体試料に含有される(2)の機序で生成される代謝物の探索のみならず、(1)に該当する代謝制御点を構成する酵素を *in vivo*を反映した状態で探索するために極めて有用な技術であることを示した。これを契機として特殊なガス環境で恒常性を保つ幹細胞やマクロファージの生物学や病原性微生物特異的な代謝制御機構の探索に応用する機運が高まり、本研究を展開するに至った。

2. 研究の目的

遺伝子および蛋白質の構造と機能の網羅的解析技術の進歩により、生体機能制御機構の系統的理解は急速に進展したが、一方で低分子化合物の生体機能制御分子群としての包括的理解は極めて遅れている。これらの化合物のうち、血管弛緩因子として同定された NO、TCA 回路から生成する CO、ヘムの生理的分解で生じる CO、あるいは含硫アミノ酸の分解で生じる H₂S、SO_x など常温でガスとして存在する分子の生物作用の系統解析は十分でない。本プロジェクトでは生理的に意味のあるガス分子依存性の代謝制御点を *in vivo*に準じた新たなアプローチとしてメタボローム技術を駆使して探索し、ガス分子と候補レセプターの相互作用を物理化学的に厳密に証明する。さらにその知見を再度 *in vivo*に戻して定量的に検証することを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、海外に先行する方法論でありながら統合的应用が果たされなかった異分野の先端技術と研究者を結集し新しい研究領域を創成することにより目的の達成を図る。即ち細胞・組織の代謝変動を網羅的・定量的に把握できるメタボローム・質量分析技術

やバイオイメージングによる生体計測情報収集を融合させた**生命情報科学**、ガス分子と生体高分子複合体の物理化学的構造解析技術やレーザー技術応用によるガス分子挙動の生体計測技術を駆使する**生物物理化学**、さらにコンディショナルな遺伝子改変動物を用いた**病態医化学**を結集し、学際的融合研究を通じて目的の達成を図ることを特色とする。

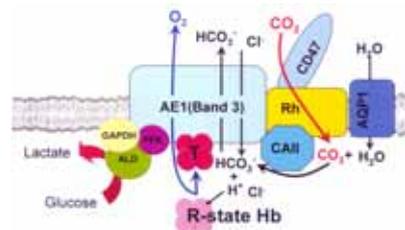
4. これまでの成果

(1) Cytochrome *c* oxidase の再構成系を用いた蛋白質構造内プロトン駆出経路の解析 (文献 1)

呼吸系の末端酸化酵素であるチトクロム酸化酵素 (C_o) は、分子状酸素を水に還元し、プロトン (H⁺) を膜の内側から外側にポンプする。ウシ C_o の X 線構造及び分子シミュレーションの結果から、水分子の移動する空洞 (水経路) が予測され、酵素分子の膜内側表面と分子内部のアルギニン残基及びアスパラギン酸残基 (Asp51) とを連結する水素結合のネットワークが配置されていることが示唆されている。我々はこの経路の出口に位置する Asp51 がプロトンポンプ機構に不可欠なアミノ酸であるとの仮説をたて、本酵素の変異体を作成しこの経路 (H pathway) の重要性を検証した。その結果は、酸化型 C_o が水経路と水素結合ネットワークを介して Asp51 が膜内側 H⁺を取り込み、還元によって H⁺を膜外側に放出するというプロトンポンプ経路 (H pathway) と機構を支持するものであった。

(2) 赤血球の hemoglobin を介した酸素センシング機構解明とガス分子による人為的機能制御 (文献 2)

赤血球はヘモグロビンの構造を巧みに調節して組織への効率的な酸素運搬を実現していることは昔から知られていたが、低酸素に晒された赤血球自身のエネルギー代謝が、実際にどのような機構で支えられているのかは不明であった。そこで、E-Cell System version 3 上に構築した赤血球代謝のシミュレーションモデルを用いて、低酸素状



赤血球における巨大蛋白質複合体による低酸素性エネルギー制御

態の赤血球における代謝変動を予測し、CE-MS で測定したメタボロームデータにより実証的検証を行った。本研究で構築したモデルは、ヘモグロビンの酸素飽和度と代謝の連関、赤血球膜タンパクの中で最も多く含まれているバンド III 膜タンパク(BIII)と、ヘモグロビンまたは解糖系酵素の結合を実装して低酸素応答を全細胞スケールでシミュレーションできる初めてのモデルである。赤血球の解糖系の中盤の酵素 (PFK, Aldolase, GAPDH) が低酸素応答としての Hb の Band III への結合が起こった際に活性化するモデルでは、PGK, PK などの ATP を生成する酵素が基質の増加により活性化する一方、上流の酵素 (HK, PGM) の基質が減ることによって glucose の pentose monophosphate shunt への利用が効果的に抑制され、全体として解糖系が活性化して ATP 生成が補填されることが明らかになった。

(3) CO による新規代謝制御ネットワークの同定と検証 (文献 3)

低酸素や cytokine で誘導される heme oxygenase (HO)-1 が CO を増加させて細胞保護作用や抗炎症効果を発揮することが示されているが、これまで NO で作動せず、CO で特異的に作動するレセプタは知られていなかった。研究代表者は CE-MS による metabolome 解析により CO が増加して細胞・臓器機能制御の起こるアセトアミノフェン肝障害モデルを用い分子量 1000 以下の低分子化合物を解析し、コントロールと比較することにより、CO の新規レセプタの探索を行った。その結果肝臓で CO が増加するこの病態モデルでは transsulfuration pathway の生成物が低下すること、一方で remethylation cycle の代謝物は増加傾向か、維持される傾向にあるため両方の代謝経路の中間にあたる cystathionine β -synthase (CBS) が CO の標的である可能性が示唆された。また肝臓 GSH 含量の低下に鋭敏に反応し生成される未知の物質が ophthalmic acid (GSH の中央の cysteine が 2-aminobutylate になったもの) であることを同定した。ophthalmic acid は肝障害が惹起される前に血液中が急速に増加することから surrogate marker となることが明らかになった。疾患分子マーカーの探索が differential metabolomics display の開発により推進され、これまでよい分子マーカーがなかったとされる薬剤性肝障害などの病態で ophthalmic acid が早期マーカーになる可能性があり、極めて意義深い成績となった。

(4) CO による NO 生成の制御 (文献 4)

脳組織における CO と NO のクロストークに関する検証を行った。その結果、局所の HO-2 から生成される CO が NO による血管拡張反応の抑制機構として働いていることを明らかにした。これまで CO の脳血管に対する作用の検討は動物種や観察する血管のサイズ、部位、*in vivo* と *ex vivo* の違い、動物の週齢によりまちまちな知見が得られてきた。我々は、ラット脳軟膜微小循環床で CO 及び NO 産生酵素の局在を検討した結果、CO 産生酵素と NO 産生酵素とが共存していることが明らかになった。さらに軟膜細動脈は HO の阻害により拡張し、局所の CO 灌流により拡張が解除されることが明らかになった。このとき NO の蛍光指示薬である DAF を用いて局所の NO 量の変動を観察すると、HO 抑制により NO が増加、CO の共存により NO の増加が抑制されることが判明した。さらに培養内皮細胞を用いた *in vitro* の系でも NO の生成が CO の投与により抑制されること、また CO とヘム酵素の結合を可逆的に解離できる白色光の照射により、CO の NO 生成抑制効果が解除できることを示した。この実験系では CO 投与により NOS そのもののリン酸化修飾が認められないことから、おそらく CO が NOS のヘムに結合して NO 生成を抑制したものと考察される。これらの結果を過去の結果と統合すると、CO と NO-cyclic GMP 系の相互作用の mechanism は、CO が産生部位の極めて近傍でのみ標的蛋白質 (NOS または sGC) と作用して血管収縮作用を発揮する可能性が明らかになった。これまでのガスシグナリングの概念は、ガス分子は比較的容易に細胞間を拡散により移動し paracrine 的に

作用すると考えられてきたが、これらの結果は逆にガス産生部位と受容体の anatomical proximity がガスシグナリングの重要な因子であることを強く示唆するものである。

(5) 新しい代謝経路・代謝酵素の発見 (文献 5)

Metabolome, fluxome 技術の確立で Genomics, Proteomics 情報との有機的な多層解析によって代謝学領域で多くの発見がなされてきた。病原微生物の genomics 情報と代謝流速情報を比較することによる新しい代謝経路・代謝酵素の発見もできるようになった (上図: 結核菌の細胞内寄生による宿主からの 2-Oxoglutarate 収奪酵素の発見)。精密質量分析技術に立脚したこれらの実績はいずれも世界最先端のものである。



5. 今後の計画

神経幹細胞・造血幹細胞・骨代謝・心筋ミトコンドリアの代謝制御シグナルの研究が数年で劇的に増加し、希少数の細胞で代謝流速の全体像を把握できる fluxome 解析を利用した研究が活性化しつつある。幹細胞の stemness の変化、細胞の分化・脱分化、あるいは癌の転移による微小環境変化によりエネルギー代謝のベクトルに興味深い共通した方向性があることが明らかになりつつある。resting 状態にある stem cell は glucose を lactate に変えることにより嫌氣的にエネルギーを獲得し、glucose 当りの ATP 合成効率は悪いものの、解糖系の流速で稼ぐ方法で ATP を維持できること、増殖シグナルが入ると蛋白質分解により増加したアミノ酸プールでエネルギーを獲得して、糖自身は DNA の合成に必要な Ribose の合成に用いられる方向にあることが示唆されている。Stem cell のような希少細胞での代謝情報収集は極めて困難であったが、*in vitro* virus による蛋白質間相互作用解析と fluxome 情報収集による律速段階探索によりブレイクスルーを目指す。

6. これまでの発表論文等

- Shimokata K, Katayama Y, Murayama H, Suematsu M, Tsukihara T, Muramoto K, Aoyama H, Yoshikawa S, Shimada H. The proton pumping pathway of bovine heart cytochrome c oxidase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104: 4200-4205 (2007).
- Kinoshita A, Tsukada K, Soga T, Hishiki T, Ueno Y, Nakayama Y, Tomita M, Suematsu M. Roles of Hemoglobin Allosteric in Hypoxia-induced Metabolic Alterations in Erythrocytes: SIMULATION AND ITS VERIFICATION BY METABOLOME ANALYSIS. *J Biol Chem*, 282:10731-10741 (2007).
- Soga T, Baran R, Suematsu M, Ueno Y, Ikeda S, Sakurakawa T, Kakazu Y, Ishikawa T, Robert M, Nishioka T, Tomita M. Differential metabolomics reveals ophthalmic acid as an oxidative stress biomarker indicating hepatic glutathione consumption. *J Biol Chem*, 281:16768-16776 (2006).
- Ishikawa M, Kajimura M, Adachi T, Maruyama K, Makino N, Goda N, Yamaguchi T, Sekizuka E, Suematsu M. Carbon monoxide from heme oxygenase-2 is a tonic regulator against NO-dependent vasodilatation in the adult rat cerebral microcirculation. *Circ Res*, 97:e104-e114 (2005).
- Tian J, Bryk R, Itoh M, Suematsu M, Nathan C. Variant tricarboxylic acid cycle in Mycobacterium tuberculosis: identification of alpha-ketoglutarate decarboxylase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102:10670-10675 (2005).

ホームページ: <http://www.gasbiology.com>