

平成 21 年 5 月 15 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19590608

研究課題名 (和文) 有害化学物質による p53 を介したミトコンドリアの機能障害機構

研究課題名 (英文) The mechanism of p53-mediated mitochondrial dysfunction induced by toxic chemicals

研究代表者

住澤 知之 (SUMIZAWA TOMOYUKI)

産業医科大学・産業生態科学研究所・講師

研究者番号：90206582

研究成果の概要：

有害化学物質への曝露による中毒発症の分子機構を解明するため、特にアポトーシス誘導などの重要な生理機能を持つ p53 に着目して解析を行った。その結果、アクリルアミド(特定化学物質第 2 類)に曝露されたヒト神経芽細胞腫由来 SH-SY5Y 細胞では、p53 の転写活性化は認められたものの、細胞毒性発現への明らかな関与は見出せていない。一方で、①細胞外の熱ショックタンパク質は毒性の良い指標になり、②カルボキシフラーレンは毒性を軽減させる可能性があることを見出した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2008 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：分子細胞生物学

科研費の分科・細目：社会医学・衛生学

キーワード：環境中毒、中毒発症機構、有害化学物質、p53、ミトコンドリア、シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

(1) 有害化学物質への曝露により引き起こされる中毒やがんなどの健康障害は、産業医学における重要な課題である。近年、化学物質による発がん機構に関しては分子レベルで急激に解明されつつあるが、それに比べ有害化学物質への曝露による中毒発症の分子機構は、未だ十分に解明されているとは言い難い。

(2) p53 タンパク質は転写因子として働き、損傷を受けた DNA の修復蛋白質の活性化、細胞周期の制御、DNA が修復不可能な損傷を受

けた場合のアポトーシス誘導など多彩な生理機能を持つ。また、p53 は少なくともその転写活性を通してミトコンドリアの機能異常を引き起こし、代表的神経変性性疾患の一つである Huntington 病の発症に関わるという報告もなされていた (p53 mediates cellular dysfunction and behavioral abnormalities in Huntington's disease. Bae, B. *et al.*, Neuron, 47:29-41, 2005)。

(3) p53 タンパク質の機能は、リン酸化やユビキチン化などにより制御されている。本研究代表者が所属する研究室では、現在まで

にアスベストが p53(Ser15)の特異的リン酸化を促進することを見出していた (Phosphorylation of p53 protein in A549 human pulmonary epithelial cells exposed to asbestos fibers. Matsuoka, M. *et al.*, *Env. Health Perspect.*, 111:509-512, 2003)。

(4) 本研究代表者は、ヒト神経芽細胞腫由来 SH-SY5Y 細胞にアクリルアミド(特定化学物質第 2 類)を曝露することにより誘導される細胞死では、①細胞内において、p53 タンパク質と p53(Ser15)の特異的リン酸化が増加していること、②mitogen-activated protein kinase (MAPK)系の extracellular signal-regulated protein kinase (ERK)のリン酸化が亢進していること、③ERK のリン酸化阻害剤である U0126 で ERK のリン酸化を阻害すると p53(Ser15)の特異的リン酸化も阻害されて、細胞死から一部回避されることを見出し報告していた (Involvement of the extracellular signal-regulated protein kinase pathway in phosphorylation of p53 protein and exerting cytotoxicity in human neuroblastoma cells (SH-SY5Y) exposed to acrylamide. Okuno, T. *et al.*, *Arch. Toxicol.*, 80:146-153, 2006)。これは、アクリルアミドにより引き起こされる SH-SY5Y 細胞の細胞死では、MAPK 系の活性化とそれにより引き起こされる p53 の特異的リン酸化が関与していることを示唆している。

(5) さらに、SH-SY5Y 細胞に対するアクリルアミドの細胞毒性発現には、少なくともその一部には、アポトーシスが直接関与していることも明らかにしている (Apoptosis induced by acrylamide in SH-SY5Y cells. Sumizawa, T. and Igisu H., *Arch. Toxicol.*, 81:279-282, 2007)。

(6) 一方で、本研究代表者が所属する研究室では、アクリルアミドを含む種々の神経毒性物質が、動物脳内でクレアチンキナーゼ (CK ; ATP + クレアチン ⇌ ADP + P-クレアチン 両方向の反応に関与する) 活性を阻害していることを明らかにしていた (Effects of neurotoxins on brain creatine kinase activity. Matsuoka, M. *et al.*, *Environ. Res.*, 61:37-42, 1993 など)。CK は骨格筋や脳で多く発現し、細胞内での ATP 利用と維持に重要と考えられる酵素で、ミトコンドリアにも存在している。そのため、CK 活性の低下は、アポトーシスやネクローシスにもつながるミトコンドリアの機能異常に関連していると考えられた。

2. 研究の目的

有害化学物質への曝露により引き起こされる中毒発症の分子機構を解明するため、本研究では、特に p53 に着目し、有害化学物質による p53 を介した細胞毒性発現機構の解明

を目指す。今回は現在までに明らかにした知見に基づき構築した、『化学物質への曝露 → MAPK 系の活性化 (ERK のリン酸化) → p53 の特異的なリン酸化 → ミトコンドリアの機能障害 → アポトーシス誘導/細胞傷害』という細胞応答経路のモデルの検証を行うため、有害化学物質への曝露による p53 (の特異的リン酸化)とその転写活性、ミトコンドリアの機能障害及びアポトーシスとの関連について明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、野生型 p53 を有するヒト神経芽細胞腫由来 SH-SY5Y 細胞をアクリルアミドに曝露して解析を行った。

(1) 細胞毒性は、ミトコンドリア機能を利用して測定する MTT アッセイの変法 (WST-8 アッセイ) や、乳酸脱水素酵素 (LDH) の細胞外漏出を指標にして測定した。

(2) アポトーシス誘導の指標としては、Promega社のCaspase-Glo 3/7 Assayキットを用いたcaspase-3 活性測定による、caspase-3 の活性化の検出と、propidium iodide染色した細胞核のフローサイトメトリー法での解析によるsub-G₁ 細胞集団の検出を用いた。

(3) タンパク質の発現レベルの解析は、total cell lysate、培養上清、または細胞分画により核画分、細胞質画分、あるいはミトコンドリア画分を調製後、イムノブロッティング法により行った。

(4) タンパク質濃度の測定は、Bradford法により行った。

(5) 電気泳動後にCoomassie Brilliant Blue 染色されたゲル中の、バンドに含まれるタンパク質の同定は、(株)日立ハイテクノロジへの外注により、ペプチド・マス・フィンガープリンティング法で行われた。

(6) 細胞内 GSH 濃度の測定は、Dojindo Molecular Technologies 社の Total Glutathione Quantification Kit を用いて行った。

(7) 細胞内へのアクリルアミドの取り込みは、¹⁴C 標識アクリルアミドを利用し、液体シンチレーションカウンターを用いて測定した。

(8) 過酸化脂質の測定は、OxisResearch社のBIOXYTECH MDA-586 キットを用いて行った。

(9) p53 ノックダウン細胞株の樹立には、IMGENEX 社の GeneSuppressor System (For Knockdown of Human p53) を使用した。

(10) Puma 特異的な siRNA は、Invitrogen社のSTEALTH SELECT RNAを用いた。

(11) p53 による転写活性化を調べるためのレポータージーンアッセイは、Promega 社の Dual-Luciferase Reporter Assay System を用いて測定した。

4. 研究成果

(1) アクリルアミド曝露による SH-SY5Y 細胞からの熱ショックタンパク質 (Hsp) の放出

① アクリルアミドによるアポトーシス誘導を、ミトコンドリアから細胞質への cytochrome c の放出により検出するため、アクリルアミドに曝露された SH-SY5Y 細胞から、細胞分画によりミトコンドリア画分と細胞質画分を調製し、それぞれをイムノブロッティング法により解析した。その結果、ミトコンドリア画分ではアクリルアミドの用量依存的に明らかな cytochrome c レベルの低下が認められたが、細胞質画分においては、cytochrome c レベルの有意な増加が見られないばかりでなく、むしろ低下していた。

② アクリルアミド曝露により SH-SY5Y 細胞では、用量依存的に培養液中の総タンパク質濃度が増加し、電気泳動後の銀染色により多くのバンドの出現・増加が見られた。目立ったバンドの一つをペプチド・マス・フィンガープリンティング法により同定したところ、Hsp90 であった。そこで、培養液中の Hsp90、Hsp70 及び Hsp27 をイムノブロッティング法により検出すると、何れも用量依存性に増加していた。

③ 一方、細胞内ではアクリルアミド曝露により Hsp70 の発現だけが誘導されていた。

④ アクリルアミドによる細胞死から部分的に回避させることができる U0126 は、アクリルアミドにより引き起こされる培養液中の Hsp の増加も抑制した。しかし、細胞内 Hsp70 の発現誘導は抑制できなかった。

⑤ cytochrome c も、アクリルアミド曝露により培養液中で検出されるようになっていた。

以上より、SH-SY5Y 細胞のアクリルアミド曝露による細胞死では、Hsp を含む種々タンパク質の細胞外への放出を伴うことが明らかとなった。そのため、細胞内発現量が高い Hsp の細胞外への放出は、アクリルアミドによる細胞毒性の良い指標になると考えられた。

(2) アクリルアミド曝露による SH-SY5Y 細胞におけるアポトーシス誘導

① ERK の特異的活性化阻害剤である U0126 は、SH-SY5Y 細胞において、アクリルアミド曝露による caspase-3 の活性化と sub-G₁ 細胞集団の増加を抑制し、LDH の細胞外漏出を抑制した。

② フラーレンの水溶性誘導体の一つであるカルボキシフラーレンは、WST-8 ならびに LDH 漏出を指標として評価した SH-SY5Y 細胞におけるアクリルアミドによる細胞毒性を、いずれも有意に軽減させた。しかし、LDH 漏出を指標とした場合には 300 μM まで用量

依存性に細胞生存を回復させたのに対し、WST-8 を指標とした場合には 30-60 μM で最も強く細胞生存回復効果を示し、より高濃度での効果は、30-60 μM の場合より低かった。60 μM のカルボキシフラーレンによる前処理は、SH-SY5Y 細胞において、アクリルアミド曝露による caspase-3 の活性化と sub-G₁ 細胞集団の増加を抑制していた。カルボキシフラーレンは、細胞内へのアクリルアミドの取り込みを阻害してはならず、それどころか逆に亢進させていた。

③ アクリルアミドにより、SH-SY5Y 細胞では細胞内のグルタチオン (GSH) 濃度が、用量依存的に著しく低下していた。60 μM のカルボキシフラーレンによる前処理は、この細胞内 GSH 濃度の低下を、ほぼ完全に抑制した。そこで、L-buthionine sulfoximine (BSO) を用いて細胞内での GSH 合成を阻害した後にカルボキシフラーレン処理したところ、カルボキシフラーレンによるアクリルアミドの細胞毒性からの保護効果は、全く認められなくなった。

④ 細胞培養液中に、5 mM のグルタチオンモノエチルエステル (GShest)、GSH または N-アセチルシステイン (NAC) を添加し、SH-SY5Y 細胞内の GSH 濃度を上昇させた後にアクリルアミドに曝露したところ、何れも 3 mM アクリルアミドにより誘導される caspase-3 の活性化と sub-G₁ 細胞集団の増加を抑制し、細胞外への Hsp90 及び Hsp70 の放出も抑制した。

(GShest、GSH 及び NAC は、何れも還元能を有するため、酸化還元反応に基づく WST-8 と LDH 漏出を指標にした細胞毒性評価は利用できなかった。) GShest、GSH 及び NAC は、何れも細胞内へのアクリルアミドの取り込みを低下させてはならず、GShest は逆に有意に増加させていた。

⑤ SH-SY5Y 細胞では、アクリルアミドへの曝露により、有意な過酸化脂質の増加は検出できなかった。

以上より、SH-SY5Y 細胞ではアクリルアミドによるアポトーシス誘導に、MAPK 系の ERK 経路と細胞内 GSH レベルが密接に関与していると考えられた。また、カルボキシフラーレンは、アクリルアミドによる細胞内 GSH の低下を抑制することにより、少なくともアポトーシスの誘導を阻害して、アクリルアミドの細胞毒性に対する細胞保護効果を発揮していると考えられた。この結果は、カルボキシフラーレンが、アクリルアミドの神経毒性を軽減させることが出来る可能性を、初めて明瞭に示したものである。一方、現在までのところ、アクリルアミドが活性酸素種の産生を伴う酸化ストレスを引き起こしているという証拠は得られていない。

(3) アクリルアミドによる SH-SY5Y 細胞

における p53 の転写活性化

① アクリルアミドに曝露された SH-SY5Y 細胞から、細胞分画によりミトコンドリア画分と核画分を調製し、それぞれをイムノブロッティング法により p53 のレベルを調べた。その結果、何れの画分においてもアクリルアミドの用量依存的に明らかな p53 の蓄積が認められた。

② 野生型 p53 を有する SH-SY5Y 細胞を用いて、p53 の転写活性化による代表的な標的遺伝子の一つである p21 のプロモータ領域を利用したルシフェラーゼアッセイ系を確立した。この系を用いて、アクリルアミド曝露による p53 の転写活性化の有無を検討した結果、有意な p53 の転写活性化が認められた。

③ SH-SY5Y 細胞をアクリルアミドに曝露した際の、アポトーシスの促進に働く p53 標的遺伝子である Bax、Noxa、Puma の発現誘導を、イムノブロッティング法により検出した。その結果、Puma に関しては、アクリルアミドの用量依存的に明らかな発現の増加が認められた。

④ p53 依存的転写の特異的阻害剤である pifithrin- α や cyclic-pifithrin- α による前処理で、アクリルアミドによる p53 の転写活性化を完全に阻害しても、アクリルアミドの SH-SY5Y 細胞における細胞毒性発現を抑制することは全く出来なかった。

以上より、SH-SY5Y 細胞ではアクリルアミド曝露により p53 の転写活性化が起こることが明らかとなった。しかし、アクリルアミドによる細胞毒性発現が、少なくとも p53 の転写活性化だけで説明出来る訳ではないと考えられた。

(4) p53 ノックダウン細胞株の樹立とその解析

① SH-SY5Y 細胞を用いて、ショートヘアピン型 RNA を恒常的に発現させることによる RNA 干渉で、恒常的に p53 タンパク質の発現を半分以下にまで低下させた細胞株を樹立した。これらの細胞株をアクリルアミドに曝露すると、やはり p53 タンパク質の蓄積は起こるものの、p53 の発現を低下させていないコントロールの細胞株の、アクリルアミド非曝露時の p53 発現レベル程度までしか増加しなかった。これらの細胞株のアクリルアミドに対する感受性をコントロール細胞株と比較したところ、WST-8 を指標にした細胞毒性評価では両者に差を認めなかった。

従って、SH-SY5Y 細胞におけるアクリルアミドによる細胞毒性発現では、残存する p53 のレベルで充分であるか、p53 は関与していない、あるいは、p53 だけで細胞毒性が発現している訳ではないと考えられた。

(5) SH-SY5Y 細胞におけるアクリルアミドによる Puma の発現誘導

① pifithrin- α による前処理でアクリルアミドによる p53 の転写活性化を阻害しても、SH-SY5Y 細胞における Puma の発現誘導を阻害することは、全く出来なかった。

② Puma の発現誘導がアクリルアミドによる細胞毒性の発現に必須であるかを、Puma 特異的な siRNA を利用して Puma の発現を低下させて調べた。その結果、Puma の発現誘導を抑制しても、アクリルアミドの感受性には影響を与えなかった。

従って、SH-SY5Y 細胞においては、アクリルアミドによる Puma の発現誘導は p53 非依存的であると考えられた。また、少なくとも Puma 単独でアクリルアミドによる細胞毒性を発現している訳ではないと考えられた。

(6) SH-SY5Y 細胞におけるアクリルアミドによるオートファジー誘導

① オートファジー誘導の指標となる LC3 の細胞質型から膜型への変換を、イムノブロッティング法により検出したところ、SH-SY5Y 細胞ではアクリルアミドの用量依存的に膜型 LC3 が増加していた。

② 同時に細胞内の COX IV などのミトコンドリアのタンパク質をイムノブロッティング法により検出したところ、ミトコンドリアタンパク質の特異的な減少は見られなかった。

従って、SH-SY5Y 細胞においては、アクリルアミドによりオートファジーが誘導されることが明らかとなった。しかし、誘導されるオートファジーは、ミトコンドリア特異的なオートファジー (マイトファジー) ではないと考えられた。

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 7 件)

- ① Tomoyuki Sumizawa and Hideki Igisu: Suppression of acrylamide toxicity by carboxyfullerene in human neuroblastoma cells in vitro., Archives of Toxicology, in press, 2009. 査読 有
- ② 住澤知之、加藤公児、田中秀明: Current Topics ラット肝由来の巨大な核酸蛋白質複合体 vault の X 線結晶構造, 実験医学, 印刷中, 2009. 査読 無
- ③ Hideaki Tanaka, Koji Kato, Eiki Yamashita, Tomoyuki Sumizawa 他 5 名: The structure of rat liver vault at 3.5 angstrom resolution., Science, 323, 384-388, 2009. 査読 有
- ④ Ryuji Ikeda, Ken-ichi Iwashita,

Tomoyuki Sumizawa 他 16 名 :
Hyperosmotic stress up-regulates the
expression of major vault protein in
SW620 human colon cancer cells.,
Experimental Cell Research, 314,
3017-3026, 2008. 査読 有

- ⑤ Koji Kato, Hideaki Tanaka, Tomoyuki Sumizawa 他 4 名 : A vault ribonucleoprotein particle exhibiting 39-fold dihedral symmetry., Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography, 64, 525-531, 2008. 査読 有
- ⑥ Tomoyuki Sumizawa and Hideki Igisu: Release of heat shock proteins from human neuroblastoma cells exposed to acrylamide., The Journal of Toxicological Sciences, 33, 117-122, 2008. 査読 有
- ⑦ Tokushi Tachiwada, Zhe-Sheng Chen, Xiao-Fang Che 他 10 名、7 番目 : Isolation and characterization of arsenite-resistant human epidermoid carcinoma KB cells., Oncology Reports, 18, 721-727, 2007. 査読 有
- ⑧ Tomoyuki Sumizawa and Hideki Igisu: Apoptosis induced by acrylamide in SH-SY5Y cells., Archives of Toxicology, 81, 279-282, 2007. 査読 有

[学会発表] (計 3 件)

- ① 住澤 知之
アクリルアミドがヒト神経芽細胞腫由来 SH-SY5Y 細胞に与える影響
第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会
平成 20 年 12 月 12 日
兵庫県神戸市
(神戸ポートアイランド)
- ② 住澤 知之
アクリルアミド曝露によるヒト神経芽細胞腫由来 SH-SY5Y 細胞からの熱ショックタンパク質の放出
第 26 回産業医科大学学会総会
平成 20 年 10 月 30 日
福岡県北九州市八幡西区
(産業医科大学)
- ③ 住澤 知之
ヒト神経芽細胞腫由来 SH-SY5Y 細胞のアクリルアミド曝露によるアポトーシス誘導
平成 20 年度 日本産業衛生学会
九州地方会
平成 20 年 7 月 18 日
福岡県北九州市八幡西区
(産業医科大学)

[その他]
ホームページ等
http://www.uoeh-u.ac.jp/kouza/kanchu/intro_j.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

住澤 知之 (SUMIZAWA TOMOYUKI)
産業医科大学・産業生態科学研究所・講師
研究者番号 : 90206582

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者