

平成21年 6月12日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19780079

研究課題名（和文）

タンパク質のジスルフィド結合に着目した、がん細胞のアポトーシス誘導機構の解明

研究課題名（英文）

Studies on the regulation of apoptosis through the protein disulfide bond formation.

研究代表者

細野 崇（HOSONO TAKASHI）

国立長寿医療センター研究所・アルツハイマー病研究部・外来研究員

研究者番号：80445741

研究成果の概要：

酸化ストレスは、生体に様々な影響を及ぼすことが報告されているが、その直接的な標的タンパク質についての検討は少ない。本研究では、酸化ストレスによって誘導されるタンパク質のジスルフィド結合形成が、細胞周期の停止やアポトーシスの誘導を引き起こすこと、酸化ストレスの標的タンパク質として β -tubulin と thioredoxin を見出したこと、酸化ストレスが複数のタンパク質にジスルフィド結合形成を誘導することを明らかにした。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,100,000	0	2,100,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	390,000	3,790,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物化学

キーワード：酸化ストレス、ジスルフィド結合、アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

天然物に由来する抗がん物質の研究を進める中で、ガーリックを調理、破碎した際に発生する香り成分の有機硫黄化合物 diallyl trisulfide (DATS, $\text{CH}_2=\text{CHCH}_2\text{-SSS-CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$) が、生体に酸化ストレスを与え、ヒト大腸がん細胞に細胞周期の M 期での停止と、アポトーシスを誘導することを報告した(Hosono *et al.*, J. Biol. Chem., 2005; 280: 41487-41493)。そのメカニズムの一つとして、細胞分裂に必須なタンパク質である β -tubulin の特定のシステイン残基と

DATS が直接ジスルフィド結合を形成することで細胞分裂を停止させ、アポトーシスを誘導することを明らかにした。一方、様々な臓器・器官に由来するがん細胞を用いて DATS の作用を検討した結果、細胞周期「依存的」にアポトーシスを誘導する細胞と、細胞周期「非依存的」にアポトーシスを誘導するがん細胞の存在を確認した。この結果から、 β -tubulin 以外にも DATS の標的タンパク質の存在が示唆された。

2. 研究の目的

酸化ストレスは細胞内のタンパク質の機能を低下させ、細胞周期の停止や細胞死を誘導する。本研究では細胞内タンパク質(β -tubulin)とジスルフィド結合を形成し、細胞分裂を阻害した DATS と、その類縁化合物を酸化ストレス誘導剤に用いて、ジスルフィド結合形成が細胞応答に及ぼす影響について検討した。細胞周期停止や細胞死誘導のメカニズムの解明、細胞に酸化ストレスを与える DATS がどのタンパク質にジスルフィド結合を形成させるかの同定を目的として、以下の検討を行った。

- ① DATS による細胞周期停止が SH 基との反応を介していることの確認
- ② DATS によるアポトーシス誘導機構の解明
- ③ DATS によるジスルフィド結合形成タンパク質の検索

3. 研究の方法

化合物の合成

実験に使用した DATS ならびにその類縁化合物(図 1)は、Bunte salt 法を用いて合成した。合成した化合物は HPLC で精製し、GC-MS による分子量とフラグメントイオンの情報から、目的化合物であることを確認し、実験に使用した。

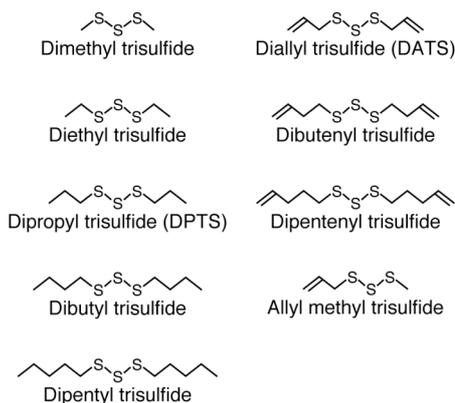


図 1. 実験に用いた DATS とその類縁化合物

- ① DATS による細胞周期停止が SH 基との反応を介していることの確認

細胞培養

ヒト大腸がん細胞株 HT-29 は、10% FBS を添加した McCoy's 5A 培地で 48 時間前培養した。その後、培地交換とともに DATS、または類縁化合物を 10 μ M の終濃度で細胞に処理し、細胞周期解析や β -tubulin の免疫染色を行った。

細胞周期の解析

トリプシンで培養器から剥離させた細胞を、PBS(-)で洗浄した後、氷冷 70%エタノールで固定した。PBS(-)でエタノールを洗浄した後、RNase A と propidium iodide で処理した。フローサイトメーターを用いてデータを取り込み、FlowJo を用いて細胞周期を解析した。

β -tubulin 蛍光免疫染色

I 型コラーゲンをコーティングしたスライドガラスに細胞を播種し、DATS などの化合物を処理した。細胞は、PBS(-)で洗浄した後、acetone:methanol = 1:1 の溶液で固定した。その後、正常ヤギ血清でブロッキング、mouse anti- β -tubulin monoclonal antibody、Alexa Fluor 488-labeled goat anti-mouse IgG と反応させた。細胞核は propidium iodide で染色した。プレパラートは共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。

- ② DATS によるアポトーシス誘導機構の解明
細胞培養

ヒトリンパ腫由来細胞株 U937 は、10% FBS を添加した RPMI-1640 培地で 24 時間前培養した。その後、DATS を 10 μ M の終濃度で細胞に処理し、ウェスタンブロッティングにより各種タンパク質発現、リン酸化、タンパク質局在について検討した。

ウェスタンブロッティング

U937 細胞を protease inhibitor を加えた RPIA buffer 中で超音波破碎し、12000rpm、20 分遠心した上清をサンプルとして用いた。リン酸化タンパク質の解析は、RIPA buffer に脱リン酸化阻害剤を加えて回収した。また、細胞分画が必要な解析では、細胞を digitonin で処理し、得られた上清を細胞質分画、沈殿に RIPA buffer を加えて回収したものをミトコンドリア分画として解析した。サンプルは SDS-PAGE で分離し、各種抗体でウェスタンブロッティングを行った。

- ③ DATS によるジスルフィド結合形成タンパク質の検索

対角線電気泳動

サンプルは、破碎による非特異的なジスルフィド結合を防ぐため、iodoacetamide 含有細胞溶解液を用いて調製した。1 次元目の泳動は、還元剤を含まない sample buffer で SDS-PAGE を行った。泳動後、DTT と iodoacetamide を含む sample buffer 中でゲルを還元処理した後、2 次元目の泳動を行った。タンパク質スポットの確認は、銀染色を用いた。

4. 研究成果

- ① DATS による細胞周期停止が SH 基との反応を介していることの確認

これまでの研究で、DATS はヒト大腸がん細胞の細胞周期を M 期で停止させることを報告した (Hosono *et al.*, J. Biol. Chem., 2005; 280: 41487-41493)。DATS と β -tubulin を試験管内で反応させると、特定のシステイン残基の SH 基と DATS の間でジスルフィド結合が形成されること、 β -tubulin と DATS が反応すると tubulin の重合を阻害し、脱重合を促進することを見出している。DATS と β -tubulin の間に形成されるジスルフィド結合が、 β -tubulin の機能を阻害し、細胞周期を

M 期で停止させる原因と考えられた。しかしながら、細胞内では DATS と β -tubulin の SH 基の反応生成物を検出することができなかった。そこで本研究では、これらの結果を踏まえ、DATS による細胞周期の停止が、細胞内 SH 基と DATS の反応によるかを検証した。

ヒト大腸がん細胞株 HT-29 の細胞周期を解析すると、非処理細胞の G₂/M 期の割合は 10%程度であるが、10 μ M DATS の 12 時間処理で 45%に増加した。このとき、培地にシステインを過剰に添加(2 mM)した後に DATS を処理すると、G₂/M 期の増加が見られなくなった(図 2A)。DATS を 12 時間処理後、 β -tubulin の免疫染色を行ったところ、核膜が消失し紡錘糸形成が異常な細胞が多数観察された。システインとの共処理は、DATS による紡錘糸形成の異常をキャンセルした(図 2B)。さらに、グルタチオン合成酵素阻害剤(L-buthionine sulfoximine, BSO)の前処理によって、細胞内グルタチオン量(細胞内 SH 量)を減少させると、DATS 処理による G₂/M 期細胞の増加と持続時間の延長が認められた(図 2C)。システインにより SH 基が培地中に過剰に存在すると、DATS による細胞周期の停止が抑制されること、細胞内 SH 量を減少させると、DATS による細胞周期停止を増強されることから、細胞周期の停止には、DATS と細胞内 SH 基の直接的な反応が関与することが明らかとなった。

続いて、9種類の trisulfide を用いて、側鎖の構造と細胞周期停止の関係を検討した。側鎖に二重結合を持つ化合物は、薬剤処理後 12 時間後の G₂/M 期細胞の割合を増加させたが、二重結合を持たないものでは、細胞周期の停止は認められなかった(図 2D)。このことから、trisulfide と SH 基の反応性には、側鎖の種類が関係することが明らかとなった。

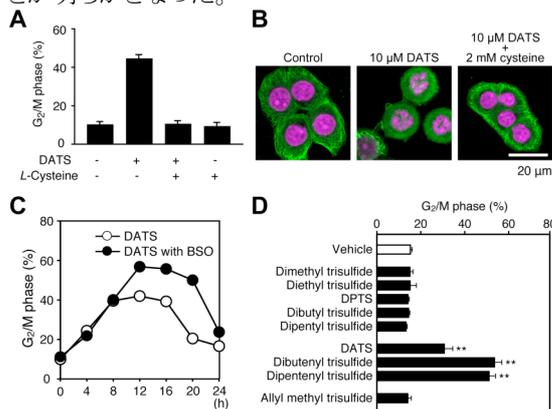


図 2. DATS とその類似化合物が細胞周期に及ぼす影響 (A) HT-29 細胞に 10 μ M DATS (\pm 2 mM cysteine) を処理 12 時間後の G₂/M 期の割合。 (B) DATS (\pm cysteine) 処理 12 時間後の β -tubulin 蛍光免疫染色像。 (C) グルタチオン合成阻害剤(BSO)の前処理が DATS による細胞周期停止に及ぼす影響。 (D) 各種 trisulfide 処理 12 時間後の G₂/M 期の割合。

② DATS のアポトーシス誘導機構の解明

DATS をヒトリンパ腫由来細胞株 U937 に処理すると、細胞周期の停止を介さずにアポトーシスを誘導した。この結果から、 β -tubulin 以外にも DATS の標的タンパク質の存在が示唆された。

そこで、U937 のアポトーシス誘導機構について検討し、細胞死誘導における DATS 標的タンパク質を明らかにしようとした。

ヒトリンパ腫由来細胞株 U937 細胞に 10 μ M DATS を処理すると、4 時間後以降に切断されて活性化された caspase-9、caspase-3 の発現が確認された(図 3A)。このとき、ミトコンドリアから細胞質へのシトクロム c の放出も確認された(図 3B)。ミトコンドリアからのシトクロム c 放出を制御する Bcl-2 発現は DATS 処理により減少し、Bax の細胞質からミトコンドリアへの移行が認められた(図 3C)。これらの結果から、DATS はミトコンドリア経路を介してアポトーシスを誘導することが明らかとなった。

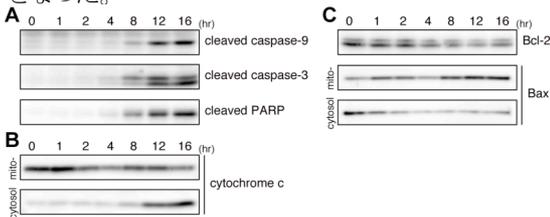


図 3. DATS 処理後のアポトーシス関連タンパク質の発現と局在変化

(A) 10 μ M DATS を一定時間処理した U937 細胞における、切断された caspase-3、caspase-9、PARP の発現。 (B) DATS 処理による cytochrome c のミトコンドリアから細胞質への移行。 (C) DATS 処理細胞の Bcl-2 発現と、Bax の細胞質からミトコンドリアへの移行。

DATS がミトコンドリアを介したアポトーシスを誘導する際、caspase の活性化以前にストレス応答キナーゼである JNK のリン酸化が認められた(図 4A)。さらに、JNK 阻害剤(SP600125)を前処理することで、DATS による caspase-3 と caspase-9 の活性化の遅延が確認された(図 4A)。JNK 活性化の上流に位置すると報告されている ASK1 の活性化について検討したところ、DATS は ASK1-thioredoxin 複合体を解離させ、ASK1 活性化を引き起こすことが明らかとなった(図 4B)。これまでの報告で、thioredoxin 中のシステイン残基が酸化ストレスセンサーとなり、ASK1 と解離することで ASK1 を活性化することが報告されており、DATS による ASK1 活性化→アポトーシス誘導においても、DATS と thioredoxin の SH 基の反応が関与すると考えられた。

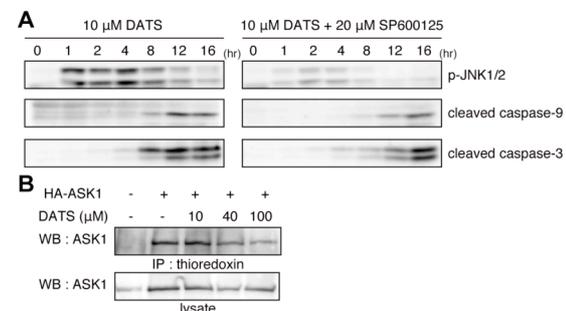


図 4. DATS 処理が JNK リン酸化と ASK1-thioredoxin 複合体に及ぼす影響

(A) 10 μ M DATS (\pm 20 μ M SP600125; JNK 阻害剤)を一定時間処理した U937 細胞における、リン酸化 JNK1/2、cleaved caspase-9、cleaved caspase-3 発現の状況 (B) ヒト ASK1 を導入した HEK293 細胞に DATS を処理後、1 時間の細胞を回収し、抗 thioredoxin 抗体で免疫沈降後、抗 ASK1 抗体で検出した。下のパネルは細胞抽出物を抗 ASK1 抗体で検出した。

③ DATSによるジスルフィド結合形成タンパク質の検索

DATS の細胞内標的タンパク質として、①では β -tubulin、②では thioredoxin を見出した。これらタンパク質と同様、細胞内で酸化ストレスによってシステイン残基の修飾が生じ、細胞機能に影響を及ぼすタンパク質が存在すると考えられた。そこで DATS 修飾タンパク質の検出を試みたが、これまでに検出することはできていない。DATS による酸化ストレス応答は、タンパク質の SH 基と DATS の直接的な結合だけではなく、タンパク質-タンパク質間のジスルフィド結合が形成されることが予想された。そこで、DATS 処理した細胞と未処理の細胞のジスルフィド結合形成タンパク質の状態を対角線電気泳動により比較した。対角線電気泳動では、ジスルフィド結合を持たないタンパク質は対角線上に泳動され、分子内、あるいは分子間にジスルフィド結合を持つタンパク質は対角線から外れた位置にスポットとして検出される。Control の U937 細胞においても、複数のジスルフィド結合が形成されたタンパク質が検出された(図 5 左)。DATS 処理 10 分後の細胞において、control 細胞には認められないジスルフィド結合を形成したタンパク質を複数確認した(図 5 右○印)。この結果から、DATS 処理はタンパク質のジスルフィド結合形成を誘導することが明らかとなった。現在、これらタンパク質の同定を LC-MS/MS を用いて行っている。

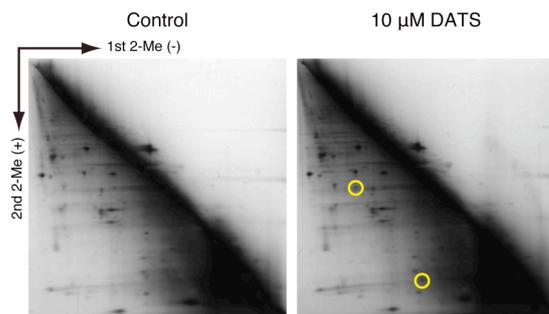


図 5. DATS 処理細胞の対角線電気泳動像

10 μ M DATS を一定時間処理、または未処理 U937 細胞抽出物を 1 次元目は非還元条件下で電気泳動を行い、2 次元目は還元条件下で電気泳動した。ゲルは銀染色を行った。○印は、各サンプル間で違いの見られたスポットである。

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 2 件)

1. Hosono T, Hosono-Fukao T, Inada K, Tanaka R, Yamada H, Iitsuka Y, Seki T, Hasegawa I, Ariga T., Alkenyl group is responsible for the disruption of microtubule network formation in human colon cancer cell line HT-29 cells., *Carcinogenesis*, 査読有り, 29, 2008, 1400-1406.

2. Seki T, Hosono T, Hosono-Fukao T, Inada K, Tanaka R, Ogihara J, Ariga T., Anticancer

effects of diallyl trisulfide derived from garlic., *Asia Pac J Clin Nutr.*, 査読あり, 2008, 17 suppl 1, 249,252.

[学会発表] (計 13 件)

1. 飯塚裕司、ネギ属植物に含まれる sulfide 類の構造と機能の違いについて、日本農芸化学会 2009 年度大会、2009 年 3 月 29 日、福岡

2. 稲田薫、Diallyl trisulfide(DATS)によるヒト白血病細胞株のアポトーシス誘導機構、日本農芸化学会 2009 年度大会、2009 年 3 月 29 日、福岡

3. 田中理江、ガーリック由来香気成分 Diallyl trisulfide の分子標的の解析、日本農芸化学会 2009 年度大会、2009 年 3 月 29 日、福岡

4. 稲田薫、Diallyl trisulfideによるヒト単球性白血病細胞U937アポトーシス誘導 機構、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 (BMB2008)、2008年12月10日、神戸

5. 田中理江、ニンニク由来香気成分ジアリルトリスルフィドが誘導する各種白血病細胞株のアポトーシスについて、第23回日本香辛料研究会学術講演会、2008年11月14日、金沢

6. 山田晴久、Diallyl trisulfide による微小管形成阻害機構に関する研究、日本農芸化学会 2008 年度大会、2008 年 3 月 27 日、名古屋

7. 稲田薫、Diallyl trisulfide はヒト単球性白血病細胞 U937 にアポトーシスを誘導する、日本農芸化学会 2008 年度大会、2008 年 3 月 27 日、名古屋

8. 寫本麻衣子、Diallyl trisulfide がヒト急性前骨髄球性白血病細胞に及ぼす影響、日本農芸化学会 2008 年度大会、2008 年 3 月 27 日、名古屋

9. Seki T, Anticancer effects of diallyl trisulfide derived from garlic. International Conference on Food Factors for Health Promotion (ICoFF2007), November 30th, 2007, Kyoto.

10. 細野(深尾)友美、ガーリック香気成分 diallyl trisulfide によるヒト大腸がん細胞株の増殖抑制機構の解析、日本農芸化学会関東支部 2007 年度大会、2007 年 11 月 10 日、宇都宮

11. 細野(深尾)友美、alk(en)yl trisulfide が大腸がん細胞株 HT-29 の細胞増殖と微小管に及ぼす影響、第 22 回日本香辛料研究会学術講演会、2007 年 9 月 22 日、東京

12. Seki T, Anticancer effects of diallyl trisulfide derived from garlic., 10th Asian Congress of Nutrition (10th ACN), September 11th, 2007, Taipei.

13. Fukao T, Structure-function relationship of alk(en)yl sulfides in the induction and suppression of drug-metabolizing enzymes., 10th Asian Congress of Nutrition (10th ACN), September 11th, 2007, Taipei.

6. 研究組織

(1)研究代表者

細野 崇 (HOSONO TAKASHI)
国立長寿医療センター研究所・
アルツハイマー病研究部・外来研究員
研究者番号:80445741

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし