

平成 21 年 5 月 8 日現在

研究種目： 若手研究 (B)
 研究期間： 2007 ~ 2008
 課題番号：19790103
 研究課題名 (和文) 細胞内小器官におけるヒ素による酸化ストレス誘導の分子メカニズムの解明
 研究課題名 (英文) Mechanism of intracellular reactive oxygen species generation by exposure of trivalent arsenic compounds
 研究代表者
 氏名 (ローマ字)：鈴木 紀行 (Suzuki Noriyuki)
 所属機関・部局・職：千葉大学・大学院薬学研究院・特任准教授
 研究者番号：10376379

研究成果の概要：

近年、ヒ素の毒性が活性酸素種の生成と深く関与しているという見方が強くなってきた。この活性酸素種は、ヒ素曝露による発癌との関連から多くの研究者の注目を集めていたものの、この活性酸素種産生が細胞内の「どこで」「どのように」起こっているのか、といった詳細な分子メカニズムは不明であった。本研究において申請者は、ヒ素曝露により細胞内に生じる酸化ストレスに関して、細胞内小器官レベルで検討を行い、その分子メカニズムを明らかにすることに成功した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	0	1,800,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	420,000	3,620,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・環境系薬学

キーワード：環境・酸化ストレス・シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

ヒ素は毒物として、あるいは薬物として古来より人間と様々な関わりを持ってきた類金属である。薬剤としては感染症の治療薬として、また抗癌剤として用いられてきた一方で、ヒ素に汚染された地下水に由来する慢性ヒ素中毒は環境問題として発展途上国において現在深刻な問題となっており、その対策は急務と考えられていた。しかしながら、その毒性発現機構の詳細は不明であった。従来

は、ヒ素の毒性はそのチオール基との強い親和性に由来すると考えられていたが、近年、ヒ素の毒性が様々な抗酸化剤によって抑制されるなどの報告から、その毒性が活性酸素種 (Reactive Oxygen Species, ROS) 生成と深く関与しているという見方が強くなってきていた。この細胞内での ROS 産生は、ヒ素によるアポトーシスの誘導や、長期ヒ素曝露による発癌とも関係していると考えられ、現在も多くの研究者の注目を集めているトピックである。また従来、こういった化学物質

により亢進される ROS 産生について細胞内での局在性が議論されることは少なかったが、 O_2^- 、 H_2O_2 といった活性酸素種は生体分子との相互作用によって、非常に反応性が高く短寿命な活性種へと容易に活性化されるため、実際の拡散性は低く、ROS 産生が「いつ」「どこで」起こるのか、という時空間的な局在性は、細胞内での ROS の生理作用を考える上でも重要と考えられていた。

2. 研究の目的

近年 ROS がヒ素の毒性発現に関与しているとの報告がなされている。しかしながら、ヒ素が生体内で ROS 産生を誘導する分子機構に関しては、多くの研究者が興味の対象とし様々な議論がなされてはいるが、統一した見解はなかった。このような状況下、申請者は、現在の関連研究の多くがヒ素化合物の化学形やそれに伴う分布を考慮していないことが、上述のように議論が混沌としている原因の一つとなっているのではないかと考えた。ヒ素は有機ヒ素・無機ヒ素をふくめ様々な形態で生体に取り込まれ、そこからさらにメチル化などの代謝を受けて多くの化学形をとり、その化学形に特有の生体内分布を示す。価数や化学形の異なるヒ素化合物は、その毒性発現機構も異なると考えるのが自然である。そこで現在までに申請者は、ヒ素によって誘導される ROS 産生の分子メカニズムを明らかにするため、ヒ素の代謝・分布、その過程で産生される ROS をいずれもリアルタイムで分析することが可能な、メタロミクスとバイオイメージングの手法を併用することにより、ヒ素の化学形・細胞内分布とその時の ROS 産生を包括的・動的に検討してきた（若手研究 (B)H17~H18, ヒ素による酸化ストレス誘導機構のメタロミクスに基づく解明）。その結果申請者は、特に毒性の高い三価のヒ素化合物 (arsenite, MMA^{III} , DMA^{III}) について、

- (1) 以前から報告されていたような、三価のヒ素化合物が (Fenton 反応のような) それ自身の化学反応により直接 ROS を産生する反応は、細胞内での ROS 産生に殆ど寄与しない。
- (2) 化学形によって ROS 産生への寄与は異なり、 MMA^{III} , DMA^{III} などの有機ヒ素は ROS 産生能が高い。無機ヒ素である arsenite に関しては、その強い細胞毒性にも関わらず、ROS 産生能は比較的低い。
- (3) 同じ有機ヒ素である MMA^{III} , DMA^{III} についてもその ROS 産生の細胞内局在性には違いが見られ、 MMA^{III} 処理細胞では ROS 産生はミトコンドリアに局在していたのに対し、 DMA^{III} 処理細胞ではむしろミトコンドリア以外の小器官に散在して見られた。などの知見を得ている。これらの知見をふまえて、本申請課題では特にミトコンドリアに注

目し、有機・無機ヒ素化合物のミトコンドリアへの作用の違いを明らかにし、 MMA^{III} 暴露下で惹起されるミトコンドリア内での ROS 産生の機構、その詳細な分子メカニズムを明らかにすることを目的とした。ミトコンドリア内で ATP 産生に関わる電子伝達系は 4 つの巨大な酵素複合体からなり、それぞれ complex I~IV と呼ばれる。Complex I、complex II はそれぞれ NADH, succinate を基質として電子を生成し、CoQ を介して complex III に伝達する。complex III に移動した電子はシトクロム C を介して complex IV に移動し、terminal acceptor である酸素に電子を渡す。そして、これらの過程のいずれかの段階に異常が生じることにより、停滞した電子が leak し O_2^- などの活性酸素種を生成することが分かっている。このことを踏まえ、本課題では「 MMA^{III} による電子伝達系のいずれかの step の障害が、ヒ素暴露における ROS 産生の主要な要因なのではないか」という作業仮説を元に、ヒ素とミトコンドリア電子伝達系の酵素群との相互作用を詳細に検討した。また、そこから MMA^{III} の直接の作用点となっている蛋白質を明らかにし、その蛋白質の構造的特徴を考えあわせ MMA^{III} との相互作用の様式を明らかにし、ROS の産生部位を特定する事を目指した。また、 DMA^{III} についても同様に検討を行い、ミトコンドリアや他の細胞小器官への作用の違いについて、検討を加えることを目的とした。

3. 研究の方法

まず始めに、ミトコンドリアにヒ素を暴露することにより ROS 産生の亢進がみられるか、またその亢進の度合いはどの程度か、どの化学形のヒ素が強い亢進を起こすのか、について検討した。それにあたって、ミトコンドリアとヒ素化合物との相互作用を検討するための、最も単純かつ信頼できる系として、単離ミトコンドリアを用いることとした。このような系を用いることにより、他の小器官や細胞質成分の影響を排除することができた。

具体的には、ラット肝よりミトコンドリア画分を調製し、様々な化学形のヒ素化合物を暴露したうえで電子伝達系の基質を加え、その際に生成する ROS を蛍光プローブを用いて評価し、ヒ素化合物の化学形・用量に依存的な ROS 産生が観察されるかを検討した。この際、各 complex に対する基質や阻害剤を併用し、その組み合わせを工夫することでヒ素の作用点や ROS の産生部位を予想することができると考えた。例えば complex I は glutamate・malate、complex II は succinate を基質として電子を伝達する。Rotenone・marlonate はそれぞれ complex I・II を阻害し、stigmatellin は CoQ から complex III への電子伝達を阻害する。その他にも多くの阻

害剤が知られており、これらをヒ素化合物と共に処理した際の ROS 産生の変化を詳細に検討した。

その後、さらに詳細な検討を加えるため、サブミトコンドリアパーティクルを調製し、電子伝達系の各 complex の活性がヒ素化合物の暴露により阻害を受けるのか、その阻害は ROS の産生を引き起こすのか、またヒ素の化学形によりどのような違いが見られるかを直接的に検討した。

サブミトコンドリアパーティクルは、ミトコンドリアの内膜を反転させた小胞であり、単離ミトコンドリアを凍結融解・超音波処理することにより調製出来る。このサブミトコンドリアでは、マトリックス側に存在する触媒部位がむき出しになっているため、内膜上に存在するそれぞれの complex の活性をそれぞれ個別にアッセイすることができる。例えば、電子供与体として CoQ に相当するハイドロキノン誘導体、電子受容体として酸化型シトクロム C を加え、シトクロム C の還元反応を吸光度法にて追跡することにより complex III 活性を定量することができる。このようにそれぞれの complex の活性をヒ素暴露下でアッセイし、各ヒ素化合物が直接相互作用するのはどの complex であるのかについて検討した。

4. 研究成果

平成 19 年度には、前年度までの研究によりヒ素暴露時の活性酸素種生成において主要な役割を果たすと予想されたミトコンドリアについて詳細な検討を行った。その際ミトコンドリアとヒ素化合物との相互作用を他のオルガネラなどの影響を排除して検討するためミトコンドリア画分を調製し用いた。また、更に単純化した系として、ミトコンドリアの電子伝達系に存在する complex I~IV の活性をそれぞれ独立にアッセイすることが可能なサブミトコンドリア小胞を作成し、各々の複合体とヒ素化合物との相互作用を検討した。

ミトコンドリア画分を用いた検討の結果、正常な代謝を行っているミトコンドリアに対しヒ素暴露を行うと、ミトコンドリアからの ROS の産生が促進されることが明らかとなった。また、その促進効果はヒ素の化学形態に大きく依存することが示された。またサブミトコンドリア小胞を用いた研究から、ミトコンドリア内の ROS 産生は電子伝達系により生成されることが明らかになった。さらにはその中でも電子伝達系 Complex I と III が主な ROS の産生部位となっていることも示した。

詳しくは、 iAs^{III} ・ MMA^{III} ・ DMA^{III} では Complex I と III 活性に対して若干の上昇は見られたものの顕著な変化は確認されなかった。電子の leak site への影響がなく正常に働くこと

から、ヒ素化合物暴露時においても電子の増加に従い Complex I と III において ROS を放出することが考えられる。 iAs^{III} については Complex IV 活性を若干上昇させたが全ての Complex で大きな変化はみられず、II-1、2 の結果同様、 iAs^{III} は ROS 産生能が低いことが証明された。 MMA^{III} は Complex II と IV の両方の活性を有意に減少させた。このことから、 MMA^{III} は Complex II、IV の阻害により Complex I と III に停滞する電子が ROS 産生の上昇の原因であることが示唆された。すなわち、 MMA^{III} により Complex II が阻害されているため、電子の供給源はグルタミン酸とリンゴ酸のみとなりミトコンドリアマトリックス内で NADH を生成する。NADH は Complex I で電子に変換され、CoQ と Complex III を介し Complex IV へと運ばれる。しかし、 MMA^{III} の阻害により Complex IV へ伝達することはできず Complex III に電子が停滞することとなる。増加した電子は leak site である Complex III で ROS として放出されるというメカニズムが示された (Figure 1)。

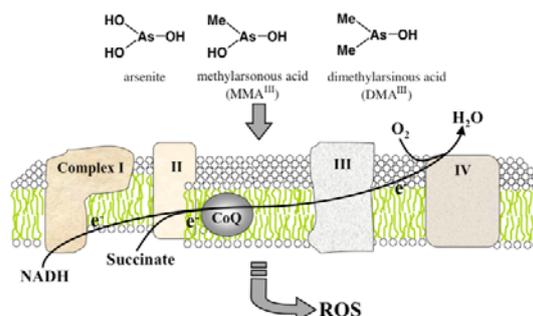


Figure 1. ヒ素とミトコンドリアとの相互作用

平成 20 年度においては、dimethylarsinous acid (DMA^{III})による酸化ストレス障害はミトコンドリアよりもむしろ小胞体に局在していることから、 DMA^{III} と小胞体ストレスとの関連を検討した。その結果、 DMA^{III} によって小胞体ストレスが誘発され、ROS が産生される事が明らかとなった。すなわち、 DMA^{III} は他の化学形態のものよりもモノチオール基に高い親和性をもつヒ素化合物であるため、小胞体内にある翻訳タンパク質の遊離のチオール基に強く結合する。 DMA^{III} が結合したタンパク質では適切なジスルフィド結合が形成できないため、異常タンパク質として小胞体内に蓄積し小胞体ストレスを引き起こす。この蓄積した異常タンパク質は正常にフォールディングすべく小胞体内で酸化と還元を繰り返す、ROS の産生源となる事が明らかとなった。

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9件)

- ① H. Naranmandura, N. Suzuki, J. Takano, M. W. Tony, Y. Ogra, K. T. Suzuki and X. C. Le: Systemic distribution and speciation of diphenylarsinic acid fed to rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol. in press*, 査読有
- ② Y. Tsuji, N. Suzuki, K. T. Suzuki and Y. Ogra: Selenium metabolism in rats with long-term ingestion of Se-methylselenocysteine using enriched stable isotopes. *J. Toxicol. Sci. in press*, 査読有
- ③ K. T. Suzuki, C. Doi, N. Suzuki. Simultaneous tracing of multiple precursors each labeled with a different homo-elemental isotope by speciation analysis: distribution and metabolism of four parenteral selenium sources. *Pure Appl. Chem. In press*, 査読有
- ④ H. Naranmandura, N. Suzuki and K. T. Suzuki. Reaction mechanism underlying the in vitro transformation of thioarsenicals. *Toxicol. Appl. Pharmacol. In press*, 査読有
- ⑤ Y. Ogra, T. Kitaguchi, K. Ishiwata, N. Suzuki, T. Toida, K. T. Suzuki. Speciation of selenomethionine metabolites in wheat germ extract. *Metallomics*, **1**, 78-86 (2008), 査読有
- ⑥ N. Suzuki, H. Naranmandura, S. Hirano, K. T. Suzuki. Theoretical calculations and reaction analysis on the interaction of pentavalent thioarsenicals with biorelevant thiol compounds. *Chem. Res. Toxicol.*, **21**, 550-553 (2008), 査読有
- ⑦ K. T. Suzuki, Y. Tsuji, Y. Ohta, N. Suzuki. Preferential organ distribution of methylselenol source Se-methylselenocysteine relative to methylseleninic acid. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **227**, 76-83 (2008), 査読有
- ⑧ Y. Ogra, T. Kitaguchi, N. Suzuki, K. T. Suzuki. In vitro translation with [³⁴S]-labeled methionine, selenomethionine and telluro-methionine. *Anal. Bioanal. Chem.*, **390**, 45-51 (2008), 査読有
- ⑨ Y. Ogra, T. Kitaguchi, K. Ishiwata, N. Suzuki, Y. Iwashita, K. T. Suzuki. Identification of Selenohomo-

lanthionine in Selenium- Enriched Japanese Pungent Radish. *J. Anal. At. Spectrom.*, **22**, 1390-1396 (2007), 査読有

[学会発表] (計7件)

- ① 鈴木紀行, 小池章太, 鈴木和夫: ヒ素化合物による小胞体ストレスの誘発, 日本薬学会第129年会, 平成21年3月26日, 京都
- ② 鈴木紀行: ヒ素の毒性発現における生体分子との相互作用: 第一回メタロミクス研究フォーラム, 平成20年11月28日, 東京
- ③ N. Suzuki, A. Sakamoto, and K. T. Suzuki: Mechanisms Underlying Inhibition of Protein Tyrosine Phosphatase by Arsenic Exposure. 4th International Conference on Metal and Genetics, 21 July 2008, Paris
- ④ N. Suzuki, A. Sakamoto, and K. T. Suzuki: Inhibition mechanisms of protein tyrosine phosphatase by arsenic exposure. 第18回金属の関与する生体関連反応シンポジウム, 平成20年6月5日, 名古屋
- ⑤ 鈴木紀行, 坂本亮, 鈴木和夫: ヒ素暴露に対する生体応答における protein tyrosine phosphataseの関与: 日本薬学会第128年会, 平成20年3月26日, 横浜
- ⑥ N. Suzuki, H. Naranmandura, and K. T. Suzuki: Pentavalent thioarsenicals: Theoretical study of extraordinary interaction with biorelevant thiol compounds. International Symposium on Metallomics 2007, 28 Nov. 2007, Nagoya
- ⑦ N. Suzuki, T. Sawada, and K. T. Suzuki: Influences of trivalent arsenic compounds on mitochondrial respiratory chain and reactive oxygen species generation. 第17回金属の関与する生体関連反応シンポジウム, 平成19年6月21日, 京都

[図書] (計1件)

- ① 鈴木紀行, 鈴木和夫: シーエムシー出版、ミネラルの科学と最新応用技術、420-430 (2008)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 紀行 (Suzuki Noriyuki)

千葉大学・大学院薬学研究院・特任准教授
研究者番号: 10376379