

平成21年 6月 5日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19790106

研究課題名（和文）ATP産生を阻害する環境化学物質の新規メカニズムによる神経細胞死

研究課題名（英文）Neuronal cell death induced by ATP-decreasing environmental chemicals

研究代表者

古武 弥一郎（KOTAKE YAICHIRO）

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・講師

研究者番号：20335649

研究成果の概要：ATP産生を阻害する有機スズ化合物（500 nM）、および脱共役作用を有する農薬・酸化フェンブタスズ（50 nM）による神経細胞死メカニズムを大脳皮質初代培養神経細胞を用いて調べた。その結果、神経細胞死と比較して非常に早い段階からATP減少が認められ、ATP減少により活性化されるAMP-activated protein kinase（AMPK）の活性化が認められた。AMPKを阻害すると神経細胞死が抑制されたことから、AMPKが両物質により惹起される細胞死のメディエーターとなっていることが示唆される。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,700,000	0	1,700,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	450,000	3,650,000

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：有機スズ、ATP、農薬、AMP-activated protein kinase

1. 研究開始当初の背景

農薬をはじめとする環境化学物質には、害虫等のミトコンドリア呼吸鎖を阻害してエネルギー産生を抑制するタイプのものが数多く存在する。これらの化学物質が大量暴露された場合には哺乳動物においてもATP減少を引き起こし、最終的に中枢神経細胞死を起こすことが既に報告されている。

船底塗料や漁網の防汚剤として広く使用されてきたトリブチルスズ（TBT）は、環境への影響が懸念されている。動物に対する影響として蓄積性があり、成長阻害や白血球、リンパ球の減少、胸腺の萎縮に加えて神経毒性を引き起こすことが報告されているが、詳細なメカニズムは不明である。TBTの毒性メカニズムのひとつとしてATP合成酵素の阻害が

報告されている。神経細胞は特にエネルギー欠乏に脆弱であり、ATP 産生が阻害されると細胞は最終的に死に至る。近年我々は、500 nM TBT がグルタミン酸放出を介して神経毒性を発現することを明らかにした。(Nakatsu, Kotake, Ohta, *Toxicol. Sci.*, 2006) TBT の作用点としてミトコンドリアにおける ATP 産生阻害が考えられている。そこで我々は、ATP 低下に伴い活性化される AMP-activated protein kinase (AMPK) に着目した。

AMPKはATPが減少し、AMPの増加に伴って活性化されるセリンスレオニンキナーゼであり、エネルギーセンサーとして生体内で重要な役割を果たしていることが明らかにされている。しかし現在のところTBTに限らず、AMPKがグルタミン酸放出に関与しているという報告はない。予備実験の結果から、TBTにより細胞死を引き起こす直接の原因はATP減少そのものではなく、むしろATP減少により起こる付随的なイベントが細胞死の直接の引き金を引いているという作業仮説が考えられる。

これらを考え合わせると、ATP産生低下を起こす農薬等の環境化学物質の中樞神経に対する作用として、TBTと同様にATPの減少によりAMPKが活性化され、グルタミン酸の過剰放出を介した神経細胞死が起きている可能性が考えられる。

2. 研究の目的

ATPを減少させる環境化学物質のグルタミン酸放出と、それにおけるAMPK関与の詳細なメカニズムを調べるのが本研究の目的である。

3. 研究の方法

神経細胞は分裂終了細胞であり、株化細胞はその点で神経細胞本来の性質を有していない。そこで、グルタミン酸受容体を多く発現して

いるラット胎児大脳皮質より調製した初代培養神経細胞を用いて研究を遂行した。

(1) TBTのようなATP産生を阻害する環境化学物質により、グルタミン酸神経毒性(過剰放出されたグルタミン酸がグルタミン酸受容体に結合し、細胞内カルシウム流入を介して神経細胞死を引き起こす現象)の有無を調べた。具体的には、

- ① 細胞内ATP量を定量し、これらの環境化学物質により実際にATP減少が起きていることを確認する。
- ② グルタミン酸の過剰放出について、培養液中グルタミン酸濃度をグルタミン酸測定蛍光試薬を用いて定量する。
- ③ トリパンブルー染色にて細胞死の評価を行い、グルタミン酸受容体アンタゴニスト MK-801による細胞死抑制を調べることで、細胞死におけるグルタミン酸受容体の関与を調べる。

(2) (1)の実験で見出されたATP産生を阻害し、細胞死を起こす環境化学物質の中から、AMPKが関与する環境化学物質を探索する。AMPK α 2 サブユニット(触媒サブユニット)に対するリン酸化抗体を用いてAMPKの活性化状態を調べる。

4. 研究成果

ATPを減少させる化学物質として、TBTと、脱共役作用を有する農薬・酸化フェンブタズ(fenbtatin oxide, FTO)を用いた。

(1) TBTとFTOはそれぞれ濃度依存的に神経細胞死を惹起した。また、500 nM TBTと50 nM FTOによる神経細胞死はNMDA型グルタミン酸受容体アンタゴニスト MK-801により有意に抑制されたことから、TBTとFTOによる神経細胞死にはグルタミン酸受容体が関与することが示唆される。

(2) 次にFTOによる細胞間隙グルタミン酸濃

度について調べたところ、TBTと同様に、FTOは濃度依存的にグルタミン酸濃度を上昇させた。

(3) 50 nM FTOは添加30分の早い段階から細胞内ATPを減少させ、AMPKを活性化させた。AMPKの阻害剤であるcompound cを前処置すると50 nM FTOによるAMPK活性化および神経細胞死が有意に抑制されたことから、FTOによる神経細胞死にAMPKが関与することが示唆される。

一方、500 nM TBTは速やかなATP減少、AMPK活性化を介した細胞間隙グルタミン酸濃度上昇を介してグルタミン酸受容体を過剰に活性化することにより、神経細胞死を惹起することを明らかにしたため、FTOとTBTの両者はAMPKを介した共通のメカニズムで神経細胞死を惹起する可能性が示唆されるとともに、このようなATPを減少させる物質による神経細胞死は、ATPが減少したとしてもAMPKを阻害することにより、細胞死を抑制できる可能性が考えられる。

今後は、AMPK活性化による細胞間隙グルタミン酸濃度上昇の解明、および細胞保護的にも細胞死促進的にも作用するAMPKの二面性メカニズムの解明を試みることで、ATP産生を阻害する化学物質の神経細胞死メカニズムの全容が明らかになるものと考えられる。

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5件)

① Kawasaki A., Hayashi T., Nakachi K., Trosko J. E., Sugihara K., Kotake Y., Ohta S. Modulation of connexin 43 in rotenone-induced model of Parkinson's disease. *Neuroscience* **160**, 61-68

(2009). (査読有)

② Nakatsu Y., *Kotake Y., Hino A., Ohta S. Activation of AMP-activated protein kinase by tributyltin induces neuronal cell death. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **230**, 358-363 (2008). (査読有)

③ *Kotake Y., Neurotoxicity induced by environmental low-molecular-weight substances. (review) *J. Health Sci.* **53**, 639-643 (2007). (査読有)

④ Nakatsu Y., *Kotake Y., Ohta S. Concentration dependence of the mechanisms of tributyltin-induced apoptosis. *Toxicol. Sci.* **97**, 438-447 (2007). (査読有)

⑤ *Kotake Y., Sekiya Y., Okuda K., Ohta S. Cytotoxicity of 17 tetrahydroisoquinoline derivatives in SH-SY5Y human neuroblastoma cells is related to mitochondrial NADH-ubiquinone oxidoreductase inhibition. *Neurotoxicology* **28**, 27-32 (2007). (査読有)

* は corresponding author

[学会発表] (計5件)

① 古武弥一郎、幸田龍紀、太田 茂 「環境化学物質のタンパク結合を介した作用とパーキンソン病」 日本薬学会第128年会シンポジウム 若手が切り開く Molecular Toxicology 3～化学物質の脳神経毒性とその作用メカニズム～ 2008年3月26日 横浜

② 幸田龍紀、古武弥一郎、泉 俊輔、杉原

数美、細谷孝充、平松俊行、大坪裕子、古山
浩子、鈴木正昭、太田 茂 「パーキンソン
病関連神経毒 1BnTIQ は tubulin に結合する」
第 30 回日本神経科学学会大会・第 50 回日本
神経化学学会大会・第 17 回日本神経回路学会
大会合同大会 2007 年 9 月 11 日 横浜

③ 河崎麻実、林 奉権、中地 啓、古武弥
一郎、太田 茂 「パーキンソン病誘発物質
は Astrocyte においてギャップ結合による細
胞間伝達を促進させる」 第 30 回日本神経
科学学会大会・第 50 回日本神経化学学会大会・
第 17 回日本神経回路学会大会合同大会
2007 年 9 月 10 日 横浜

④ 古武弥一郎 「パーキンソン病発症物質
候補テトラヒドロイソキノリン誘導体の
チューブリン結合を介した作用」 北陸大学
学術フロンティア推進事業・サテライトミー
ティング～内因性および外因性因子の毒性
発現にかかわる分子標的と生体応答を担う
システム～ 2007 年 7 月 28 日 岐阜

⑤ 古武弥一郎、中津祐介、太田 茂 「環
境汚染化学物質トリブチルスズによる
AMP-activated protein kinase を介した神経
細胞死」 第 34 回日本トキシコロジー学会
学術年会 2007 年 6 月 28 日 東京

〔図書〕(計 1 件)

Kitamura S., Sugihara K., Nakamura K.,
Kotake Y., Kashiwagi A., Fujimoto N.
Endocrine disruption in toxic response.
General and Applied Toxicology 3rd edition,
in press.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古武 弥一郎 (KOTAKE YAICHIRO)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・講
師

研究者番号：20335649

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者