

機関番号：32607

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20590067

研究課題名（和文） セレン蛋白質GPx4による新規細胞増殖制御機構の解析

研究課題名（英文） Analysis of regulation of cell growth and novel cell death by selenoprotein GPx4

研究代表者

今井 浩孝 (IMAI HIROTAKA)

北里大学・薬学部・准教授

研究者番号：50255361

研究成果の概要（和文）：

リン脂質ヒドロペルオキシドグルタチオンペルオキシダーゼ（GPx4）は酸化ストレスにより生体膜に生じたリン脂質酸化一次生成物であるリン脂質ヒドロペルオキシドを直接還元する抗酸化酵素である。GPx4を欠損させると、様々な細胞が致死となる。このGPx4欠損による細胞死のメカニズムについて詳細な解析を行ったところ、本細胞死は典型的なアポトーシス、ネクローシス、オートファジー性細胞死でもない新規の細胞死であることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (GPx4) is one of the most important antioxidant enzymes that directly reduce phospholipid hydroperoxide generated in biomembrane by oxidative stress. Disruption of GPx4 induce cell death in in several tissues and MEF cells. Several experiments demonstrated that this cell death induced by depletion of GPx4 is not a canonical cell death, such as apoptosis, necrosis and autophagic cell death, but a novel cell death.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：グルタチオンペルオキシダーゼ、細胞死、リポドミクス、化合物ライブラリー、ビタミンE、脂質酸化、非アポトーシス、セレン蛋白質

1. 研究開始当初の背景

リン脂質ヒドロペルオキシドグルタチオンペルオキシダーゼ（GPx4）は、酸化ストレスなどによる活性酸素により生体膜脂質が酸化された1次生成物であるリン脂質ヒドロペルオキシド（PCOOH）をグルタチオン依存的に直接還元する抗酸化酵素である。GPx4は活性中心に微量元素セレンを

含む特殊なアミノ酸であるセレノシステインを有するセレン蛋白質のひとつである。GPx4のもう一つの特徴は、ひとつのゲノム遺伝子から、転写開始点の違いにより、オルガネラの局在の異なる3つのタイプのGPx4（ミトコンドリア型、核小体型、細胞質、核に存在する非ミトコンドリア型）が転写されることである。申請者はこれまでに、GPx4

4. 研究成果

(1) タモキシフェン誘導型 GPx4 欠損細胞における細胞死の経時的変化

CRE-RET2 細胞にタモキシフェンを添加すると 24 時間後には GPx4 蛋白質の発現が著しく減少し、MTT アッセイの結果から、24 時間後では増殖が見られなくなり 48 時間後から 72 時間後に致死となった (図 2)。この細胞死はビタミン E の添加により抑制された。また 3 つのタイプの GPx4 のうち、非ミトコンドリア型 GPx4 を発現させたとき、この細胞死は顕著に抑制された。この結果から、非ミトコンドリア型 GPx4 が細胞の増殖、生存に必須であることが明らかとなった。

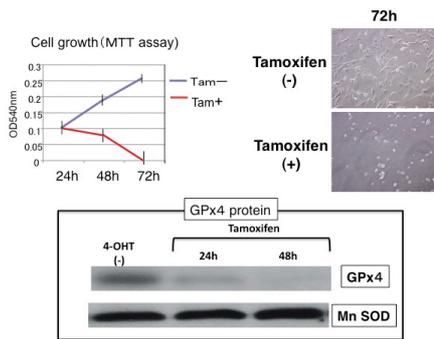


図2 タモキシフェン添加後24時間でGPx4は欠損し、48から72時間後に細胞死が誘導される

(2) GPx4 欠損による細胞死のメカニズムの解析

GPx4 欠損による細胞死がアポトーシスであるのかについて解析した。カスパーゼ阻害剤である z-Vad-FMK 処理や AIF の放出を抑制する DHIQ 処理によっても細胞死は抑制できなかった。また Bcl-xL の細胞内での高発現によっても細胞死は抑制できなかった。実際、この細胞をスタウロsporin 処理によりアポトーシスを誘導すると、チトクローム C のミトコンドリアからの放出に伴い、活性化カスパーゼ 3 の検出ができ、TUNEL 陽性となる。しかし、タモキシフェン添加細胞では、いずれの時間においてもチトクローム C の放出は見られず、活性化カスパーゼ 3 の検出も観察されなかった (図 3)。一方、TUNEL 染色では核の一部に陽性部位が観察されたが、DNA の断片化は見られなかった。このことから、GPx4 欠損による細胞死では DNA 障害は起きるものの典型的なアポトーシスは起きていないことが明らかとなった。

一般的に急激な酸化ストレスにより、脂質が酸化されると細胞が膨張し、細胞膜が壊れて細胞死を引き起こすネクローシスが起きることが知られている。そこで GPx4 欠損による細胞死がネクローシスであるのかについて、ネクローシスを引き起こす tBuOOH 処理と比較し検討した。HMGB1 は核に存在

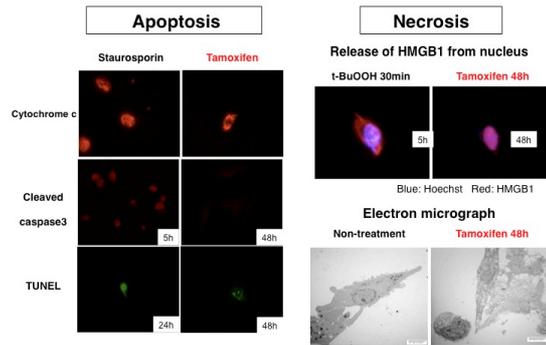


図3 GPx4欠損による細胞死は典型的なアポトーシスでもネクローシスでもない

しているが、ネクローシスの際、核から放出されることが知られている。そこで HMGB1 の核からの放出の有無について、抗 HMGB1 抗体による免疫染色により解析を行った。その結果、t BuOOH 処理では HMGB1 の核内からの放出が観察されたが、タモキシフェン添加による GPx4 欠損細胞死では全く放出は観察されなかった (図 3)。またタイムラプス解析による死ぬ瞬間では細胞の膨張も観察されず、電顕による細胞死時期の解析では、細胞の膨張は見られずむしろ、細胞内に無数の粒子が観察された。このことから、GPx4 による細胞死はネクローシスでもないことが明らかとなった。

次に細胞内に粒子様の構造が見られたことから第 3 の細胞死であるオートファジー性細胞死について解析を行った。

オートファジーが起きると LC-3II の誘導がかかることが知られている。実際にタモキシフェンを添加すると LC-3-II 蛋白質の増加、及び電顕におけるオートファゴソームの形成が観察された (図 4)。そこでオートファジーの形成が GPx4 欠損による細胞死に関与するのかについて、オートファジー形成必須因子である ATG5 のノックダウン細胞を shRNA 発現レトロウィルスシステムを用いて、ATG5 shRNA 発現細胞を樹立し解析を行った。その結果、樹立した 2 つの ATG5 ノックダウン細胞のいずれにおいても GPx4 欠損による細胞死の抑制効果は見られなかった (図 4)。よってこの細胞死はオートファジー性細胞死でもないことが確認された。

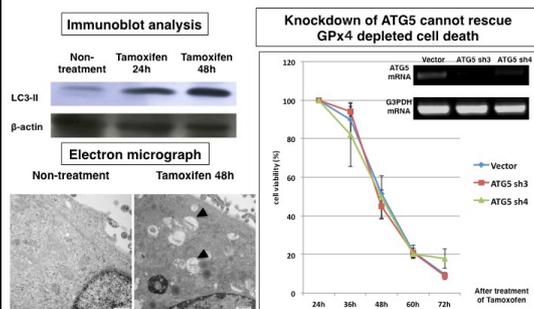


図4 GPx4欠損による細胞死はオートファジー性細胞死でもない

さらに最近、アポトーシスが抑制されたときに起きる新しい細胞死として、ネクロプトーシスが報告された。本細胞死は、Rip1 依存的に細胞死が誘導されるが、Rip1 のノックダウン細胞を樹立したが、細胞死は抑制が見られなかった。このことから、ネクロプトーシスでもないことが明らかとなった。以上の結果から、GPx4 欠損による脂質酸化を伴う細胞死はこれまで報告のあるアポトーシス、ネクロトーシス、オートファジー性細胞死、ネクロプトーシスでもない新規の細胞死であることが明らかとなった。

(3) 様々な抗酸化剤や抗酸化酵素の高発現による GPx4 欠損による細胞死の抑制効果及び細胞死過程での脂質酸化の検出

一般的に脂質の酸化反応は図 5 に示すように、ミトコンドリアや NADPH オキシダーゼにより産生されたスーパーオキシドがスーパーオキシドジスムターゼ (SOD) により過酸化水素に変えられ、さらに鉄によるフェントン反応によりヒドロキシラジカルが生成して、リン脂質を酸化し、リン脂質ヒドロペルオキシドを生成すると考えられている。

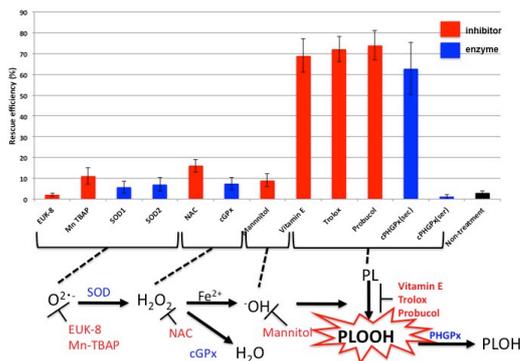


図5 GPx4欠損による細胞死は脂質酸化を抑制する抗酸化剤のみで抑制できる

そこで GPx4 欠損による脂質酸化による細胞死がこのフェントン反応を介した細胞死であるのかについて解析を行った。スーパーオキシドの消去剤である EUK-8 や Mn-TBAP 処理また、SOD1 や SOD2 の遺伝子導入による高発現によっても GPx4 欠損による細胞死は全く抑制されなかった。一方過酸化水素を消去する NAC (N アセチルシステイン) や細胞質型 GPx (GPx1) の遺伝子導入によっても全く細胞死は抑制できなかった。ヒドロキシラジカルのトラップ剤であるマンニトール処理によっても細胞死は抑制できなかった。しかし、脂質の酸化を抑制できるビタミン E やビタミン E の誘導体のトロロックス、及びプロブコールでは細胞死が抑制できた。また非ミトコンドリア型 GPx4 遺伝子の導入では致死は抑制できたが、活性中心をセリンに変えたものでは全く致死を抑

制できなかった。このことから、GPx4 やビタミン E などによる脂質酸化の抑制がこの細胞死には重要であることが明らかとなった (図 5)。また GPx4 欠損による脂質酸化反応は、いわゆるフェントン反応によるものではないことも明らかとなった。これまでのところ脂質の酸化反応の別経路として 15-リポキシゲナーゼ (15-LOX) によるリン脂質の直接的な酸化反応が知られているが、我々は、15-LOX KO マウスから樹立した MEF 細胞でも GPx4 欠損により致死が起きることから、新規の経路でリン脂質の酸化が起きていると考えている。

そこで次に実際に脂質の酸化反応がいつ起きているのかについて解析を行った。その結果、タモキシフェン添加後 2 4 時間後から 3 6 時間後で細胞内の脂質酸化反応が増大した。この時間は細胞死が誘導される 4 8 時間後から 7 2 時間後よりもかなり早い時間である。細胞死を抑制できるビタミン E の誘導体 (トロロックス) の添加時間を検討したところ、この細胞死は、タモキシフェン添加後 3 6 時間以降にトロロックスを添加すると細胞死の抑制効果が急激に落ちることが明らかとなり、2 4 時間から 3 6 時間後に起きる脂質酸化反応が細胞死の誘導に関与していることが明らかとなった (図 6)。

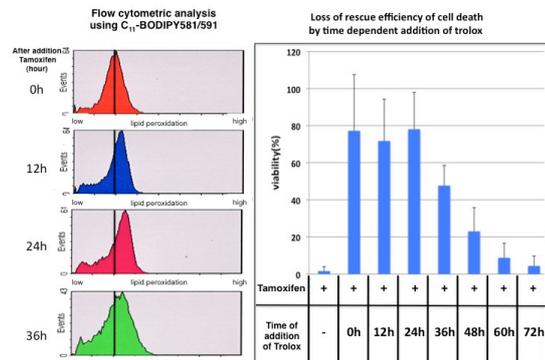


図6 GPx4欠損による細胞死では脂質酸化は24-36時間後で起きる

そこで実際に LC-ESI-MS/MS システムを用いてタモキシフェン添加後の細胞死が起きる過程の 2 4 時間、3 6 時間、4 8 時間での脂質酸化物について検出を行ったところ、ホスファチジルコリンの酸化 1 次生成物のホスファチジルコリンヒドロペルオキシド (PCOOH) が 2 4 時間後、3 6 時間後で増加し、4 8 時間後には減少していることが明らかとなった。PCOOH の生成は、リノール酸よりもアラキドン酸、DHA 由来の脂肪酸で起きていることも明らかとなった。以上の結果から GPx4 欠損による新規細胞死ではリン脂質の酸化ステップが細胞死の引き金となることが明らかとなった。

(4) 化合物ライブラリーを用いた新規細胞死を抑制する化合物のスクリーニング

GPx4欠損による細胞死が新規細胞死であることを証明するためには、細胞死を抑制する化合物とそのターゲット分子を明らかにすることが重要である。そこで、タモキシフェン添加後、既知の蛋白質に対する約300種類の阻害剤について細胞死を抑制する活性及び、脂質酸化抑制能についてスクリーニングを行った。その結果、脂質酸化抑制能を持たない、4種類の蛋白質に対する6種類の阻害剤を見いだした。これらの蛋白質はこれまで細胞死の誘導に関与している報告がないことから、この細胞死が新規の細胞死であることが示唆された。

(5) 本研究の今後の展開

本研究によってGPx4欠損による細胞死が新規の細胞死であることが明らかとなった。最近、ドイツのグループもGPx4欠損による細胞死を報告したが、彼らは15-LOX依存性かつAIF依存性細胞死であると報告している。しかし我々が樹立した細胞では、15-LOXは発現しておらず、AIFのノックダウンでも細胞死の抑制効果は見られなかった。また15-LOXは特異な組織、細胞にしか発現しておらず普遍的ではないことから、本研究で我々が見いだした細胞死が普遍的な経路であると考えている。また本研究では新たに新規細胞死を抑制する阻害剤を見いだしており、このターゲット蛋白質のノックダウンが細胞死を抑制できるのか、見いだした4種類の蛋白質群がどのような細胞死シグナル経路を形成しているのかが今後の重要な研究課題である。またこれらの阻害剤が、実際に組織特異的GPx4欠損マウスでの病態を抑制できるのかも今後の重要な検討課題である。

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4件)

1) 今井浩孝、ビタミンEはPHGPx欠損によるICM形成不全、MEF細胞死を抑制できる ビタミンE研究の進歩 査読無、第14巻、2010、131-137

2) Imai, H New strategy of functional analysis of PHGPx knockout mice model using transgenic rescue and Cre-loxP system. J.Clin. Biochem. Nutri. 査読有、46, 2010, 1-13

3) Imai, H., Hakkaku N., Iwamoto, R.,

Suzuki, J., Suzuki, T., Tajima, Y., Konishi, K., Minami, S., Ichinose, S., Ishizaka, K., Shioda, S., Arata, S., Nishimura, M., Naito, S., Nakagawa, Y. J. Biol. Chem., 査読有、284, 2009, 32522-32532

4) 今井浩孝、グルタチオンペルオキシダーゼ(GPx4、PHGPx)による胚発生・精子形成の制御機構 実験医学 増刊 査読有 27, No.15 2009、112-117

[学会発表] (計13件)

1) 今井浩孝 生命維持に必須な生体膜脂質酸化ホメオスタシスのGPx4による制御 第83回日本生化学会、第33回日本分子生物学会合同大会 シンポジウム 2010, 12.9, 神戸

2) 原田晋作 今井浩孝 脂質酸化による新規細胞死の解析 第83回日本生化学会、第33回日本分子生物学会合同大会 2010, 12.9, 神戸

3) 今井浩孝 生体膜脂質酸化ホメオスタシス制御の破綻による疾患 第63回日本酸化ストレス学会シンポジウム 2010, 6, 25, 横浜

4) 原田晋作、今井浩孝 新規PHGPx欠損細胞死のメカニズムの解析 第63回日本酸化ストレス学会 2010, 6,25, 横浜

5) 今井浩孝 膜酸化ストレスによる新規細胞死における酸化資質リポドミクス解析 第52回日本脂質生化学会研究会 2010, 6,15, 伊香保

6) Hiroataka Imai, Phenotype analysis of tissue specific and organelle specific PHGPx KO mice, 9th International Symposium on Selenium in Biology and Medicine Selenium 2010, 2010, 6,1 Kyoto

7) 今井浩孝 新規PHGPx欠損細胞死のメカニズム 日本薬学会130年会 2010, 3,28 岡山

8) 今井浩孝 ビタミンEはPHGPx欠損受精卵、繊維芽細胞の増殖阻害を抑制する 第21回ビタミンE研究会 2010, 1,23 東京

9) 今井浩孝 タモキシフェン誘導型PHGPx欠損MEF細胞における細胞死誘導機構の解析 第82回日本生化学会 2009,10,23 神戸

10) 今井浩孝 PHGPx欠損MEF細胞における細胞死の解析 第62回日本酸化ストレス学会 2009, 6,11 福岡

11) 今井浩孝 新規膜酸化ストレス細胞死におけるリピドミクス解析 第4回メタボロームシンポジウム 2009, 11,19 横浜

12) 大川信子 今井浩孝 PHGPx欠損による細胞死は非アポトーシス経路である 日本薬学会129年会 2009, 3,27 京都

13) 大川信子 今井浩孝 非ミトコンドリア型PHGPxによるPHGPx欠損MEFの致死抑制機構の解析 第31回日本分子生物学会 2008, 12,12 神戸

[その他]

ホームページ等

http://www.pharm.kitasato-u.ac.jp/eisei/eisei/Research_1.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

今井 浩孝 (HIROTAKA IMAI)

北里大学・薬学部・准教授

研究者番号：50255361