

機関番号：82601
 研究種目：基盤研究 C
 研究期間：平成 20 年～平成 22 年
 課題番号：20590132
 研究課題名（和文） 特異な脂肪酸による神経細胞のプログラム細胞死に関する研究
 研究課題名（英文） Programmed cell death in neuronal cells induced by a trienoic fatty acid
 研究代表者： 近藤一成（KONDO KAZUNARI）
 国立医薬品食品衛生研究所・代謝生化学部・主任研究官
 研究者番号： 40270623

研究成果の概要（和文）：特異な脂肪酸の一つであるエレオステアリン酸（ESA）の神経細胞死のメカニズムを解明するために、各種阻害剤およびノックダウン実験を行った。その結果、ESA は形態学的には、典型的なアポトーシス様（細胞の縮小、核の凝集、アポトーシス小体）を示したが、カスパーゼ非依存性でかつ PARP-1 の活性化や DNA 酸化的損傷を伴うことなく AIF (apoptosis-inducing factor) の核移行および ERK (extracellular signal-regulated kinase) リン酸化依存的に細胞死を誘導した。この細胞死は ERK の阻害やトコフェロール存在下で完全に抑制された。

研究成果の概要（英文）：In order to clarify the mechanisms by which eleostearic acid (ESA) induces neuronal cell death, cell viability assay was performed using various inhibitors and RNA interference for apoptosis-related molecules such as MEK, PARP-1, AIF. ESA induces apoptotic cell death morphologically. However, activation of caspase and PARP-1, and DNA damage were not observed. AIF migrates from mitochondria to the nucleus upon ESA stimulation. ERK is also phosphorylated by ESA. The cell death is blocked by the inhibition of MEK and antioxidant tocopherol.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,400,000	0	1,400,000
2009 年度	1,200,000	0	1,200,000
2010 年度	900,000	0	900,000
年度		0	
年度			
総計	3,500,000	0	3,500,000

研究分野：天然物化学，生化学

科研費の分科・細目：薬学，環境系薬学

キーワード：脂肪酸，アポトーシス，神経科学，きのこ

1. 研究開始当初の背景

2004, 2005 年に 19 名の死者が出たスギヒラタケ摂取が原因と考えられる急性脳症の原因物質を解明する研究が各研究者によって行われ、これまでにいくつかの成分が単離された。低分子化合物では、脂肪酸や異常アミノ酸が報告されている。しかしながら、脳症に関係があると思われる物質

はその後の研究でも見出されていない。

そこで、急性脳症が発症した 2004, 2005 年に各地から採取したスギヒラタケについて、日本国内の各産地から集めたスギヒラタケのメタノール抽出エキスを調整して細胞毒性を調べたところ、シイタケ、マイタケ、シメジなどの食用キノコはいずれも細胞毒性を示さなかったのとは対照的に、スギヒラタケはどの産地のものも細胞

毒性を示した。さらに、その細胞毒性が単にネクローシスを起こしているのではなく、典型的なアポトーシスを起こしていることが形態学的観察からも明らかになったことから、スギヒラタケ中には少なくとも何らかのアポトーシス性の細胞毒性成分を含有しているものと考え、*in vitro* スクリーニングの実験を実施して細胞毒性成分として ESA を単離した。この ESA はこれまでとは異なる細胞死のメカニズムを示すことが示唆されたため、その細胞毒性のメカニズム解明を目的に研究に着手した。

2. 研究の目的

スギヒラタケ (学名: *Pleurocybella porringens*) 摂取後に原因不明の脳症になり、20名近い死者がでた健康被害が発生し、その原因物質の解明のために多くの検討を行ったが、原因物質の特定には至らなかった。しかしながら、その研究過程において、これまでに神経細胞モデル PC12 細胞 (rat pheochromocytoma cells) を用いた研究過程で、細胞毒性を示す成分として共役型トリエン脂肪酸 ESA を見出し、これがカスパーゼ非依存的な経路でアポトーシス様の細胞死を誘導することが分かった。そして、この共役型トリエン脂肪酸 ESA はスギヒラタケ以外のキノコには含有されていないこと、スギヒラタケ中には 8~170 g/g dry 含有されていることが HPLC での分析結果から明らかになった。さらに、構造が類似している非共役トリエンや共役ジエンは、同じ濃度でアポトーシスを誘導せず、脂肪酸間での構造活性相関も興味深いと考えられる。したがって、神経系細胞における共役型トリエン脂肪酸のアポトーシス様細胞死の作用機序の解明は、脳症との関わりを科学的に明らかにするだけでなく、いまだ不明な点の多い神経細胞におけるプログラム細胞死の仕組みを明らかにする上でも興味ある知見を与えるものとして極めて重要であると考えられる。平成 21, 22 年度の研究から、共役型トリエン脂肪酸はこれまで報告されているアポトーシス経路とは全く異なる機構で働いていることが示唆されたため、その詳細を明らかにすることを目的に研究に着手した。

3. 研究の方法

PC12 細胞を用いた *in vitro* スクリーニングにより単離・精製した ESA について以下のように検討した。

マウス、ラット、ヒトの培養神経細胞である NG108-15, PC12, SH-SY5Y 細胞お

よびラット初代培養細胞を用いて検討した。

(1) NG108-15, PC12, SH-SY5Y の各種細胞を、Br-cAMP, NGF, RA で分化誘導したのちに ESA を添加して細胞毒性を調べた。細胞毒性は、WST 法を用いて行った。各種阻害剤による細胞死の阻害効果は、ESA 添加 1 時間前に阻害剤で前処理することで同様に WST 法で行った。

(2) ERK1/2 のキナーゼである MEK1/2 阻害剤で完全に ESA による細胞死を抑制できることが分かったので、次に MEK1/2 の siRNA による遺伝子ノックダウン実験を行った。

(3) MEK1/2 以外にも細胞死に関連する分子である AIF, PARP-1, Drp-1, DAPK-1, Cyclophilin A の siRNA によるノックダウン実験を行い、詳細なシグナル伝達機構の解析を行った。また、細胞内局在を明らかにするために、免疫染色法により染色して、蛍光顕微鏡あるいはレーザー共焦点顕微鏡で解析した。

4. 研究成果

共役トリエン脂肪酸 (eleostearic acid, ESA) およびそのメチルエステル体を用いてアポトーシス誘導メカニズムについて検討した。ESA は神経細胞株 PC12, SH-SY5Y, NG108-15 細胞に対して低濃度でアポトーシスを誘導したが、神経細胞以外の細胞では細胞死を誘導しなかった。また、脂肪酸の中でも、共役 2 重結合を 3 つ以上を有する脂肪酸のみがアポトーシスを誘導した。そのメカニズムを解明するために、各種阻害剤を用いて ESA による細胞死の抑制効果を検討したところ、MAPK のひとつ ERK の阻害剤で完全にアポトーシスが抑制されることが、また、ESA 刺激ではカスパーゼ 3/7 の活性化が起こらないこと、AIF (apoptosis-inducing factor) がミトコンドリアから核に移行することが分かった。ESA 刺激によりウェスタンブロット解析から ERK のリン酸化 (活性化) が見られたが、カスパーゼ 3 の活性化型のバンドは検出されなかった。一方、レーザー共焦点顕微鏡を用いたタンパク質局在について調べたところ、AIF は脂肪酸 ESA 刺激で核に移行すること、ERK もリン酸化に伴い核に移行することが判明した。さらに、総 DNA を抽出し、パルスフィールド電気泳動で解析したところ、アポトーシスに典型的な DNA 断片化は観察されなかったが、40-50kbase 付近に、AIF によるものと考えられる DNA 断片が見られた。同様のメ

カニズムで細胞死を起こす MNNG (DNA アルキル化剤) や, NMDA 刺激を介した場合に見られる AIF 活性化に伴う PARP-1 分子の活性化が ESA 刺激では見られず, 同じカスパーゼに依存しないアポトーシスでありながらメカニズムは異なることが強く示唆される。この結果は, これまでには見出されていないアポトーシス経路がまだ存在することが考えられ, その機構を明らかにするためにさらに検討を行った。

ESA 刺激により cytochrome-c の遊離や Bax のミトコンドリアへの局在および DNA 損傷や PARP-1 の活性化を伴わずに AIF のミトコンドリアからの遊離とそれに続く核移行を誘導することが判明し, これまでにはない作用機構で進行する非カスパーゼ依存性細胞死の機構を明らかにする目的で, AIF の遊離を誘導する分子が何であるかを突き止めるために細胞死関連分子について検討した。Death-associated protein kinase (DAPK) は, セラミド刺激など細胞死刺激により活性化されるキナーゼであるが, WT および kinase-dead DAPK-K42A mutant を用いた実験から ESA 刺激による細胞死には DAPK は関与しないと考えられた。また, ミトコンドリア分裂が細胞死を誘導する因子の放出を促進することがこの細胞死に関与しているかを調べた。Drp1 の阻害剤 Mdivi-1 および Drp1 に対する siRNA を用いた検討から, 分裂阻害により長くつながったミトコンドリアが確認され, 分裂阻害 w p 誘導しても ESA 刺激による細胞死を阻害しなかったことから, ミトコンドリア分裂の抑制も重要ではないことが判明した。さらに, Cyclophilin A やリン酸化 histone-H2AX の核での AIF との共局在化が必須と報告されていたことから検討したが, Cyclophilin A siRNA においても細胞死阻害効果が全く認められず, また ESA 刺激ではリン酸化 histone-H2AX そのものが観察されなかった。また, 細胞質および核に局在化する AIF の deletion mutant である Δ N102AIF-GFP を発現させて同様の検討を行った。その結果, ESA 刺激しない条件での実験から Δ N102AIF-GFP の強い核移行および Cyclophilin A の局在化にも関わらず細胞死は見られず, ESA 刺激が必要であった。

以上の結果から, ESA により誘導される細胞死はカスパーゼ非依存的であるだけでなく, これまで必須と考えられてきた cyclophilin-A や H2AX リン酸化および PARP-1 の活性化が一切必要ではない新しいメカニズムで進行していると考えられた。どのような分子がこの ESA による細胞死に重要であるかを明らかにすることはでき

なかったが, 新しい細胞死のメカニズムが存在すること, 共役型不飽和脂肪酸のみがその細胞死を誘導することを今回新たに明らかにしたことは大変意義深いと考えられた。また, AIF に対する siRNA を用いたノックダウンや抗 AIF 抗体を用いた結果からも, この ESA による細胞死は, AIF が中心的な役割を果たしていると考えられた。今後もさらに検討を行いたい。

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 3 件)

(1) Kondo K, Obitsu S, Ohta S, Matsunami K, Otsuka H, Teshima R. Poly(ADP-ribose) Polymerase (PARP)-1-independent Apoptosis-inducing Factor (AIF) Release and Cell Death Are Induced by Eleostearic Acid and Blocked by alpha-Tocopherol and MEK Inhibition. *J.Biol.Chem.***285**, 13079-13091 (2010).

(2) 近藤一成, アポトーシスの分析法, *ぶんせき* **423**, 139-144 (2010).

(3) Kondo K, Obitsu S, Teshima R. α -Synuclein aggregation and transmission are enhanced by leucine-rich repeat kinase 2 in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Biol.Pharm.Bull.*, **34**, in press (2011).

[学会発表] (計 9 件)

(1) 近藤一成, 太田小夜香, 手島玲子 共役トリエン脂肪酸 eleostearic acid による ERK を介したアポトーシス様プログラム細胞死, 第31回日本分子生物学会 (神戸)

(2) 近藤一成, 太田小夜香, 穠山浩, 手島玲子 各産地からにスギヒラタケ中の毒性物質について 第45回全国衛生化学技術協議会年会 (佐賀)

(3) Kondo K, Ohta S, Teshima R. Detection of reactive oxygen species in cells using a fluorescent probe - application and limitation. 38th Federation of Analytical Chemistry and Spectroscopy Societies (Rino, USA).

(4) 近藤一成, 小櫃冨未, 太田小夜香, 手島玲子 共役型トリエン, テトラエン脂肪酸によるカスパーゼ非依存性の神経細胞死 第82回

日本生化学学会（神戸）

- (5) 小櫃冨未, 近藤一成, 手島玲子 PARP-1 と Caspase の活性化を伴わない, AIF の核移行を介した神経細胞死 第 32 回日本分子生物学会 (横浜)
- (6) Kondo K, Obitsu S, Teshima R. ERK1/2 is a critical for PARP-1-independent neuronal cell death. Keystone Symposia (Cell death pathways) (Vancouver, Canada).
- (7) 小櫃冨未, 近藤一成, 手島玲子 PARP-1 やカスパーゼを経由しないエレオステアリン酸刺激による細胞死における AIF の解析 第 33 回日本分子生物学会年会 (神戸)
- (8) 近藤一成, 小櫃冨未, 太田小夜香, 手島玲子 培養神経細胞を用いた HDAC 阻害剤によるエレオステアリン酸刺激による細胞死の抑制効果と解析 第 33 回日本分子生物学会年会 (神戸)
- (9) 近藤一成, 小櫃冨未, 手島玲子 LRRK2 共存下での synuclein タンパクの細胞間輸送と細胞毒性
日本薬学会第 131 回年会(2011.3)

[図書] (計 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

近藤一成 (KONDO KAZUNARI)
国立医薬品食品衛生研究所・
代謝生化学部・主任研究官

研究者番号：40270623

(2) 研究分担者

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：