

機関番号：23701

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20590543

研究課題名（和文） 亜鉛による虚血性神経細胞障害の増悪機序の解明と新規治療薬の開発

研究課題名（英文） Molecular mechanism of zinc toxicity in ischemic brain

研究代表者

原 宏和（Hara Hirokazu）

岐阜薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：30305495

研究成果の概要（和文）：本研究では、亜鉛曝露により生じる神経細胞死にアポトーシス促進因子の BH3-only タンパク質（PUMA、Bim）が関与しているかどうかを検討した。その結果、（1）PUMA の発現が亜鉛により著しく亢進すること、（2）この発現にがん抑制遺伝子 p53 が関与すること、（3）Bim アイソフォームの中で最もアポトーシス活性の強い分子の発現が亜鉛により亢進することなどが明らかとなった。以上の結果から、亜鉛による神経細胞死はアポトーシス経路を介して制御されている可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：In this study, we examined effects of zinc (Zn) on expression of BH3-only proteins, which are known as major regulators of apoptosis, in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. We demonstrated here that Zn functions as an inducer of gene expression of these apoptotic proteins. Our findings suggest that Zn might activate cell death process via the intrinsic apoptotic pathway.

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	420,000	1,820,000
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：境界医学

科研費の分科・細目：応用薬理学・臨床薬理学

キーワード：亜鉛、神経細胞死、神経細胞

1. 研究開始当初の背景

中高年で発症頻度が増す脳卒中は、日本における死亡原因の第3位である。一命を取り留めたとしても寝たきりになるなど重篤な後遺症を伴うことも多く、患者の quality of life や医療費増加の観点から大きな社会的問題となっている。しかし、脳卒中の大部分を占める脳梗塞で認められる虚血性神経障害の分子機構は未だ十分に解明されておらず、また、有効な治療薬もほとんどないのが現状である。

近年、脳内に豊富に存在する亜鉛が脳虚血により惹起される神経細胞障害に関与していることが報告されたが、その詳細なメカニズムは不明である。虚血性脳血管障害時の神経細胞死では、以前からグルタミン酸受容体を介して多量に流入するカルシウムイオンが神経細胞死を惹起すると考えられてきた。しかし、グルタミン酸受容体拮抗薬の神経細胞保護は限定的のものであった。それゆえ、本疾患におけるカルシウム以外の分子の関与を明らかにすることは、本疾患の発症機序を

理解する上で極めて重要なことである。

2. 研究の目的

亜鉛は、脳内に豊富にする金属であり、通常はグルタミン酸作動神経の神経終末の小胞中に局在している。しかし、虚血やてんかん発作時に亜鉛が神経終末から多量に放出されること、高濃度の亜鉛が神経細胞死を惹起することなどから、亜鉛は脳虚血による神経細胞障害に深く関与していると考えられている。これまでに、亜鉛はミトコンドリア膜電位の低下など、ミトコンドリア機能障害を惹起することが報告されている。しかし、亜鉛による神経細胞死がアポトーシスにより実行されているかどうかは明らかでない。それゆえ、神経細胞死の分子機構を理解する上で、亜鉛がアポトーシス経路に及ぼす作用を解明することは重要である。本研究では、脳の虚血障害への関与も報告されているアポトーシス促進因子 BH3-only タンパク質 (PUMA、Bim など) に着目し、亜鉛が BH3-only タンパク質の発現に及ぼす影響を検討した。

3. 研究の方法

(1) 細胞障害性の測定：ヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞を 96 穴プレートに 1.5×10^4 個/well で播種した。次の日、ピュリチオン存在下で種々の濃度の硫酸亜鉛を SH-SY5Y 細胞に 16 時間曝露させた。培地で 1 回洗浄した後、MTT 法により細胞障害性を測定した。

(2) mRNA の測定：細胞から総 RNA を抽出した後、cDNA を作製した。この cDNA を鋳型としてそれぞれの遺伝子に特異的なプライマーを用い PCR を行った。

(3) Bim ミニ遺伝子の構築：Bim 遺伝子のエクソン 2-4、エクソン 4 の 3'フランキング領域の一部、エクソン 5 の 5'フランキング領域の一部およびエクソン 5 をつないだ遺伝子を作製した。この遺伝子を蛍光タンパク質 (EGFP) 発現ベクターにサブクローニングし、Bim ミニ遺伝子を構築した。

(4) レポーターアッセイ：SH-SY5Y 細胞を 24 穴プレートに 1.5×10^5 個/well で播種した。次の日、ヒト PUMA プロモーター領域を組込んだレポーター遺伝子 (PUMA-pGL4) と標準化用レポーター遺伝子 (TK-pRL) を細胞にトランスフェクションした。一晚培養した後、ピュリチオン存在下で硫酸亜鉛を 6 時間曝露させた。その後、細胞を可溶化し、ルシフェラーゼ活性を測定した。PUMA プロモーター変異体を用いる実験では、PUMA プロモーターの p53 結合部位を変異させたレポーター遺

伝子 (mut PUMA-pGL4) を使用した。

(5) ウェスタンブロット：細胞を可溶化した後、12% SDS-PAGE にて分離した。その後、PVDF 膜に転写し、抗 p53 抗体、抗アクチン抗体を用いてウェスタンブロットを行った。検出は化学発光により行った。

4. 研究成果

(1) 亜鉛による神経細胞死：本研究では、亜鉛を細胞内に速やかに流入させるために、亜鉛イオノファであるピュリチオン存在下で SH-SY5Y 細胞に亜鉛を曝露させた。その結果、図 1A に示すように、亜鉛濃度依存的に細胞障害が認められた。また、DNA 断片化も高濃度の亜鉛の曝露により引き起こされた (図 1B)。DNA 断片化が認められたことから、亜鉛により惹起される細胞死にはアポトーシス経路が関与している可能性が示唆された。

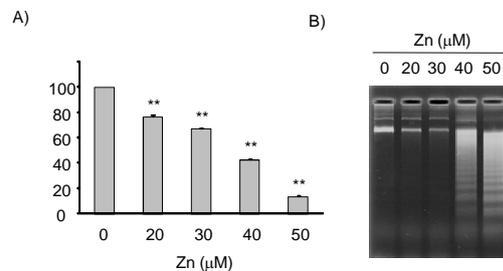


図 1 (A) 亜鉛曝露により惹起される SH-SY5Y 細胞障害 ** $P < 0.01$ vs 亜鉛未処理群 (B) 亜鉛曝露による DNA 断片化

(2) BH-3 only タンパク質発現に対する亜鉛の作用：PUMA、Noxa などの BH-3 only タンパク質はアポトーシスの実行において重要な役割を担っている。そこで、亜鉛がこれらの遺伝子発現に及ぼす影響について検討した。亜鉛曝露 4 時間後の発現を RT-PCR 法により解析した結果、図 2A に示すように、PUMA の発現が亜鉛濃度依存的に著しく亢進することが明らかとなった。一方、Noxa の発現は亜鉛により影響を受けなかった。次

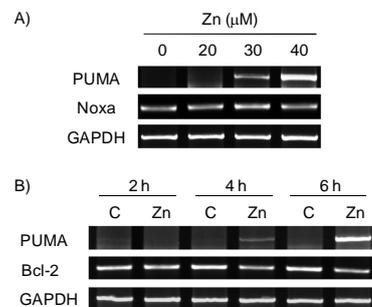


図 2 BH3-only タンパク質発現に対する亜鉛の影響 (A) 濃度依存性 (B) 時間依存性

に、亜鉛による PUMA 発現誘導の時間依存性について検討するために、亜鉛 (30 μM) を曝露し 2、4 および 6 時間後の PUMA 発現を RT-PCR 法により解析した。その結果、時間依存的に PUMA の発現が亢進し、6 時間で最も強い発現が認められた (図 2B)。

(3) PUMA プロモーター活性に対する亜鉛の作用：亜鉛による PUMA mRNA の増加が PUMA 遺伝子の転写活性の亢進により起きているかどうかをヒト PUMA プロモーターのレポーター遺伝子を作製し検討した。このレポーター遺伝子 (PUMA-pGL4) をトランスフェクションした細胞に亜鉛を 6 時間曝露し、そのレポーター活性を測定した。その結果、図 3 に示すように、PUMA プロモーターが亜鉛濃度依存的に活性化されることが明らかとなった。このことから、亜鉛による PUMA mRNA の増加は転写レベルで起きていると考えられた。

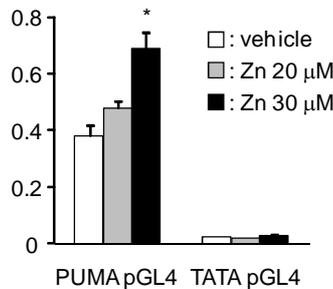


図 3 亜鉛による PUMA 遺伝子のプロモーターの活性化 * $P < 0.05$ vs 亜鉛未処理群

(4) 亜鉛による PUMA 発現誘導における p53 の関与：がん抑制遺伝子 p53 は、PUMA の発現調節に重要な転写因子であることが報告されている。そこで、亜鉛による PUMA 発現に p53 が関与しているかどうかを検討した。p53 は定常状態ではユビキチン化により分解されているが、DNA 損傷などによりその分解が抑制され、種々の遺伝子の転写を活性化する。そこで、亜鉛により p53 の分解が抑制されるかどうかをウエスタンブロット法を用いて検討した。その結果、図 4A に示すように、亜鉛曝露後、時間依存的に p53 タンパク量が増加することから、亜鉛により p53 の分解が抑制され、細胞内で p53 タンパクの蓄積が亢進することが明らかとなった。次に、p53 が PUMA 発現に及ぼす影響について PUMA プロモーターの p53 結合領域の変異体を用いて検討した。図 4B に示すように、p53 結合部位の変異プロモーター (mut) では野生型 PUMA プロモーター (WT) に比べ亜鉛によ

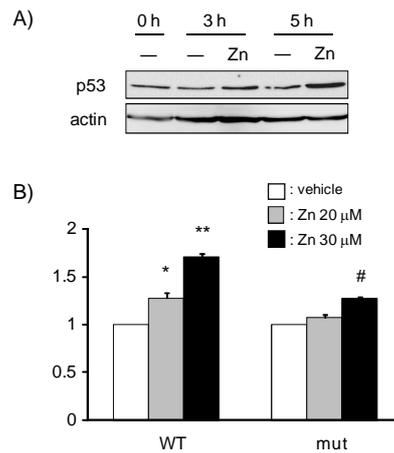


図 4 亜鉛による PUMA 発現誘導における p53 の関与 (A) 亜鉛による p53 の分解阻害 (B) PUMA 遺伝子の変異プロモーターを用いた解析 * $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ vs 亜鉛未処理群 (WT) # $P < 0.05$ vs 亜鉛未処理群 (mut)

る PUMA プロモーターの活性化が低下した (図 4B)。これらの結果から、亜鉛による PUMA mRNA の発現誘導では p53 が重要な役割を担っていることが明らかとなった。

(5) Bim の発現に対する亜鉛の作用：PUMA とは異なる BH3-only タンパク質 Bim の発現に対する亜鉛の影響を検討した。Bim には、主要な 3 種類のスプライスバリエント (BimEL、BimL、BimS) が存在していることが報告されている。図 5A に示すように、通常、3 種類のバリエントのうち BimEL mRNA が最も多く存在している。しかし、亜鉛曝露により BimEL が減少し、BimS が増加した (図 5A、B)。この結果から、亜鉛は Bim mRNA の BimEL から BimS への選択的スプライシングを促進することが明らかとなった。BimS はアポトーシス活性が Bim のバリエントの中で最も強いことから、亜鉛によるアポトーシスの亢進に Bim のスプライシングパターンの変化が関与している可能性が示唆された。

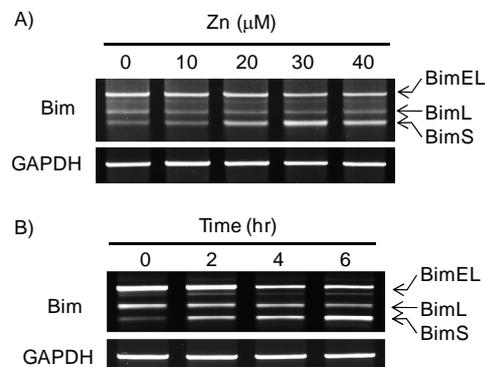


図 5 Bim 発現に対する亜鉛の作用 (A) 濃度依存性 (B) 時間依存性

(6) Bim ミニ遺伝子の作製と評価：亜鉛による Bim のスプライシングパターン変化の分子機構を解明するためのツールとして Bim ミニ遺伝子を作製した。Bim ミニ遺伝子は、Bim 遺伝子のエクソン 2-4、エクソン 4 の 3' フランキング領域の一部、エクソン 5 の 5' フランキング領域の一部およびエクソン 5 からなる遺伝子を蛍光タンパク質の EGFP 遺伝子につなげて作製したキメラ遺伝子である(図 6A)。Bim ミニ遺伝子を細胞にトランスフェクションした後、亜鉛を曝露させ、BimL-EGFP および BimS-EGFP の発現を RT-PCR 法により解析した。その結果、図 6B に示すように、BimS-EGFP の発現が亜鉛未処理の場合に比較し増加したことから、このミニ遺伝子は Bim の内因性的スプライシングを再現することが確認できた。それゆえ、この Bim ミニ遺伝子は、今後 Bim のスプライシング機構を解明するための有力なツールになると考えられた。

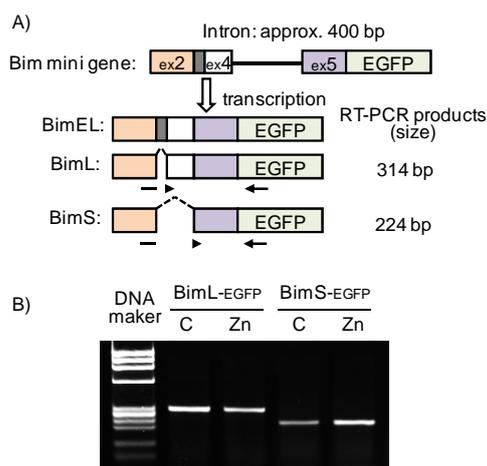


図 6 (A) Bim ミニ遺伝子の構造 (B) Bim ミニ遺伝子由来の Bim mRNA のスプライシングに及ぼす亜鉛の影響

(7) まとめ

以上の結果から、亜鉛による神経細胞死の過程はアポトーシス経路により制御されている可能性が示唆された。また我々は、亜鉛が Bim mRNA の選択的スプライシングを促進するという亜鉛の新規作用を発見した。これらの成果は、脳梗塞による神経細胞障害の分子機構を解明する上で重要な知見になると考える。

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)

Hara H, Kamiya T, Adachi T: Endoplasmic reticulum stress inducers provide protection against 6-hydroxydopamine-induced cytotoxicity. *Neurochem Int* **58**, 35-43, 2011. 査読有

Yamamoto A, Ashihara E, Nakagawa Y, Obayashi H, Ohta M, Hara H, Adachi T (他 7 名): Allograft inflammatory factor-1 is overexpressed and induces fibroblast chemotaxis in the skin of sclerodermatous GVHD in a murine model. *Immunol Lett* **135**, 144-150, 2011. 査読有

Hara H, Kamiya T, Adachi T: Zinc induces expression of the BH3-only protein PUMA through p53 and ERK pathways in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Neurochem Res* **34**, 1498-1506, 2009. 査読有

Aras MA, Hara H, Hartnett KA, Kandler K, Aizenman E. Protein kinase C regulation of neuronal zinc signaling mediates survival during preconditioning. *J Neurochem* **110**, 106-117, 2009. 査読有

Knoch ME, Hartnett KA, Hara H, Kandler K, Aizenman E: Microglia induce neurotoxicity via intraneuronal Zn²⁺ release and a K⁺ current surge. *Glia* **56**, 89-96, 2008. 査読有

[学会発表](計 8 件)

原 宏和, 中村洋子, 神谷哲朗, 二ノ宮真之, 瀧澤 守, 足立哲夫: ミクログリアにおける LPS による iNOS 発現誘導に対する飛騨紅かぶ由来化合物の抑制作用. 第 1 回岐阜薬科大学機能性健康食品(蜂産品)研究講演会(12/4/2010, 岐阜)

Hara H, Kamiya T, Adachi T: Pretreatment with endoplasmic reticulum stress inducers ameliorates 6-hydroxydopamine-induced cytotoxicity. Neuroscience 2010 (11/13-17/2010, San Diego (USA))

原 宏和, 神谷哲朗, 足立哲夫: 小胞体ストレスによるプレコンディショニングは 6-ヒドロキドパミンによる細胞障害を抑制する. 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会(12/7-10/2010, 神戸)

武田樹也, 原 宏和, 山本 希, 神谷哲朗, 足立哲夫: Bim mRNA 前駆体の選択的スプライシングに及ぼす亜鉛の影響. 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会(12/7-10/2010, 神戸)

Hara H, Kamiya T, Adachi T: Involvement of zinc in modulation of expression of proapoptotic BH3-only proteins. The 60th Fujihara Seminar – Zinc signaling and cellular functions (10/29-31/2010 , Osaka)

原 宏和: 酸化ストレス防御能評価法の応用 - 生活習慣病の予防を目指した機能性物質の探索 - .JST Innovation Bridge 岐阜県四大学研究シーズ発表会 (3/1/2010 , 東京)

原 宏和, 中村洋子, 神谷哲朗, 足立哲夫: ミクログリアにおけるサイトカイン産生に及ぼす亜鉛の影響 . 第 82 回日本生化学会大会 (10/22-24/2009 , 神戸)

Hara H, Kamiya T, Adachi T: Zinc induces expression of BH3-only protein PUMA through p53 and ERK pathways in SH-SY5Y neuroblastoma cells. Neuroscience 2008 (11/15-19/2008, Washington DC (USA))

[その他]

ホームページ等

http://www.gifu-pu.ac.jp/research/research_rinkyaku.html

6 . 研究組織

(1)研究代表者

原 宏和 (Hara Hirokazu)

岐阜薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号 : 30305495

(2)研究分担者

足立哲夫 (Adachi Tetsuo)

岐阜薬科大学・薬学部・教授

研究者番号 : 40137063

神谷哲朗 (Kamiya Tetsuro)

岐阜薬科大学・薬学部・助教

研究者番号 : 40137063

(3)連携研究者

太田光熙 (Mitsuhiro Ohta)

神戸薬科大学・薬学部・教授

研究者番号 : 00330423