

平成 22 年 4 月 6 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20790113

研究課題名（和文）ジフェニルアルシン酸が小脳グルタミンナーゼ活性に及ぼす影響について

研究課題名（英文）Effects of diphenylarsinic acid on the cerebellar glutaminase activity

研究代表者

北 加代子 (KITA KAYOKO)

帝京大学・薬学部・助教

研究者番号：30407887

研究成果の概要（和文）：本研究では神栖市地下水ヒ素汚染物質ジフェニルアルシン酸(DPAA)による小脳症状が、興奮性神経伝達物質の合成酵素グルタミンナーゼの低下に基づくものか否かを解明することを目的とした。協調的運動能力の低下を小脳症状の指標としてマウスに運動試験を課したところ、DPAA 投与期間依存的に運動成績の低下がみられた。しかし小脳グルタミンナーゼ活性は殆ど変化せず、従って、DPAA による小脳症状の誘発にグルタミンナーゼは関与しない可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：To investigate the relationship between the diphenylarsinic acid(DPAA)-induced cerebellar dysfunction and glutaminase downregulation, the cerebellar phosphate-activated glutaminase(PAG) activities and GLS1 expression levels were examined. DPAA induced the impairment in motor coordination toward the almost all mice which were orally administrated DPAA for 36 days. However, no significant changes were observed in cerebellar PAG activities and GLS1 levels. These results suggested that glutaminase was not involved in the DPAA-induced cerebellar dysfunction.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・環境系薬学

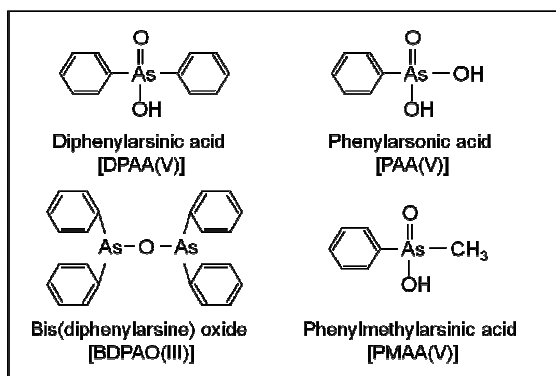
キーワード：ジフェニルアルシン酸、グルタミンナーゼ、小脳、運動試験

1. 研究開始当初の背景

2003年、茨城県神栖市で起こった地下水ヒ素汚染事件では、その地下水を利用する住民

の間に手足の痺れやふらつき、歩行障害など小脳症状を主症状とする中枢神経障害が多発した。地下水中からは基準値の450倍の濃

度のヒ素が検出され、その主なヒ素化合物として自然界には存在しないジフェニルアルシン酸 (DPAA) が同定された。ヒ素による環境汚染問題はこれまで中国やバングラディッシュなどで、地下水に含まれる無機ヒ素による慢性的な中毒事例が報告されているが、DPAA のようなフェニルヒ素化合物による中毒の報告は無く、具体的な治療法も確立されていない。これまで我々は、DPAA による中毒症状の原因および治療法の一助となる知見を得るため、DPAA で処理した培養ヒト細胞内で変動するタンパクの検索を行い、DPAA によって減少する因子としてグルタミンナーゼを同定した。グルタミンナーゼはグルタミンからグルタミン酸の合成に関わる酵素であり、特に中枢神経系では、興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸の生合成に関わる重要な酵素である。このことは、実際に患者の脳内においても DPAA がグルタミンナーゼ発現に影響を与え、小脳の機能に影響を与える可能性を示唆するものである。また、神栖市の汚染地域からは DPAA の他にビスジフェニルアルシノキシド (BDPAO) やフェニルアルソン酸 (PAA)、フェニルメチルアルシン酸 (PMAA) といったフェニルヒ素化合物が検出されており、これらの化合物とグルタミンナーゼの関係についても考慮する必要があると考えられる。



神栖市で検出されたフェニルヒ素化合物 DPAA, PAA および BDPAO は地下水中から、PMAA は汚染地域のお米中から検出された。

2. 研究の目的

本研究では DPAA によるグルタミンナーゼの発現低下が個体レベルの脳内において起こりうるか解明するとともに、神栖市のヒ素汚染地域から検出された DPAA 以外のフェニルヒ素化合物にグルタミンナーゼ発現低下作用が認められるかどうか、また、DPAA によるグルタミンナーゼの発現低下がどのような機構を介して行われているのか明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1), DPAA 投与マウス小脳内の phosphate-activated glutaminase (PAG) お

よびグルタミンナーゼ (GLS1) タンパク発現レベルの検討:

神栖市住民に歩行困難、平衡感覚の異常など小脳の異常に起因すると思われる症状が多く認められたことから、DPAA 投与したマウスにロータロッド試験およびブリッジテストによる協調的運動能力試験を行い、小脳の異常の有無を調べた。ロータロッド試験は 32rpm で回転する直径 30 mm の回転棒にマウスを乗せ、回転棒に滞在できる平均滞在時間 (最長 180 秒) を指標とした。またブリッジテストは床面からの高さが 40cm になるよう設置した直径 15 mm の木製の棒上にマウスを 300 秒間滞在させ、その間の落下回数を指標とした。運動試験成績が顕著に低下した時点で小脳を単離し、小脳内 PAG 活性および GLS1 タンパクレベルを測定した。なお、マウスは ICR 雄性マウス (投与開始時 6 週齢) を使用し、体重当たり 5 mg の DPAA を 1 日 1 回、経口ゾンデにより連続投与した。

(2), フェニルヒ素化合物による細胞内 PAG 活性および glutaminase C (GAC) タンパクレベルの検討:

ヒト培養細胞に種々のフェニルヒ素化合物を添加し、一定時間培養後の細胞内 PAG 活性および GAC タンパクレベルを調べた。

(3), DPAA による細胞内 GAC タンパク発現低下機構の検討:

GAC タンパク発現低下メカニズムについて、GAC の転写、翻訳及び翻訳後の 3 点を検討した。

① 転写について: DPAA 処理後の細胞から total RNA を抽出し、逆転写反応後、real time PCR 法により処理前後の GAC mRNA 量を定量・比較した。

② 翻訳について: 細胞を DPAA で一定時間処理後、RI 標識したメチオニン (³⁵[S]Met) を加え、新たに翻訳される GAC タンパクに取り込ませた。細胞から細胞抽出液を調製し、GAC に対する抗体で免疫沈降し、GAC タンパクを回収した。その後 SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって GAC タンパクを分離し、オートラジオグラフィーで RI 標識された GAC タンパク (³⁵S-GAC) 量を比較・定量した。

③ 翻訳後について: 一定時間 ³⁵[S]Met を取り込ませた細胞を DPAA で処理し、②の手順に従って GAC タンパクを回収し、³⁵S-GAC 量を比較・定量した。

4. 研究成果

(1), DPAA 投与マウスの小脳 PAG 活性および GLS1 タンパク発現変化

マウスにロータロッド試験およびブリッジテストを行い、協調的運動能力を測定したところ、DPAA 投与群では投与 15 日目辺りか

ら、ロータロッドの平均滞在時間の減少が認められるようになり、36日目では投与群の殆どのマウスで、著しい滞在時間の減少がみられた(図1)。また、ブリッジテストによる落下回数はDPAA投与20日目以降から顕著に増加した(図2)。試験時の様子を観察したところ、DPAA投与群ではロータロッドのスピードについてゆけず落下する個体や、ブリッジテストにおいては、ブリッジ上で体を支えるのがやっとの状態の個体やブリッジ上で方向転換を試みた時に落下する個体が多数出現した。しかし、平地における活動量をY字迷路における異なるアームへの進入回数を指標に調べたところ、両群で活動量に差は認められなかった(data not shown)。このことから、DPAAによる影響はバランスを必要とする運動課題において顕著に認められ、従って、DPAAによって小脳の障害に起因すると思われる協調的運動障害が生じることが確認された。

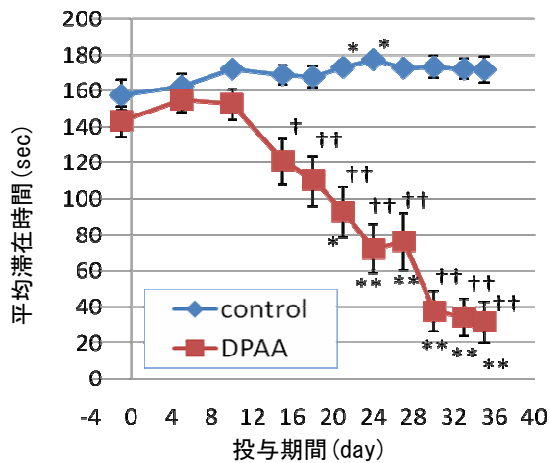


図1 DPAA投与によるロータロッド試験成績の変化
32 rpmで回転するロッド上に滞在できる平均時間を測定した(最長180sec)

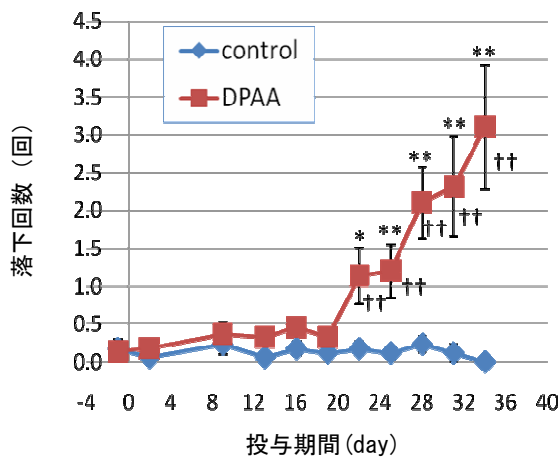


図2 DPAA投与によるブリッジからの落下回数の変化
300秒間における落下回数を測定した

そこで、運動障害が顕著にみられたDPAA 36日間投与マウスから小脳を単離し、小脳中のPAG活性およびGLS1タンパクレベルを測定した。その結果、両群間でPAG活性およびGLS1レベルに有意な差は認められなかった(図3、4)。

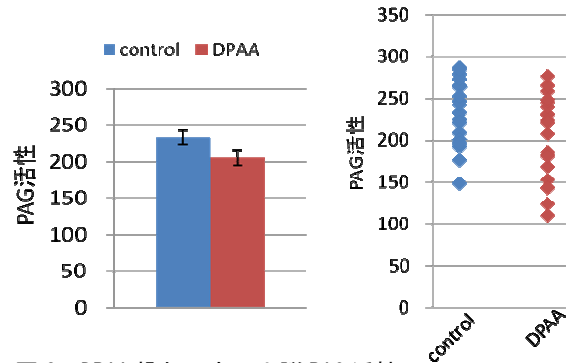


図3 DPAA投与マウス小脳PAG活性
36日間DPAAを投与したマウスから小脳を単離し、小脳ミトコンドリア中のPAG活性を測定した。
左：平均±SE、右：各群のPAG活性値の分布

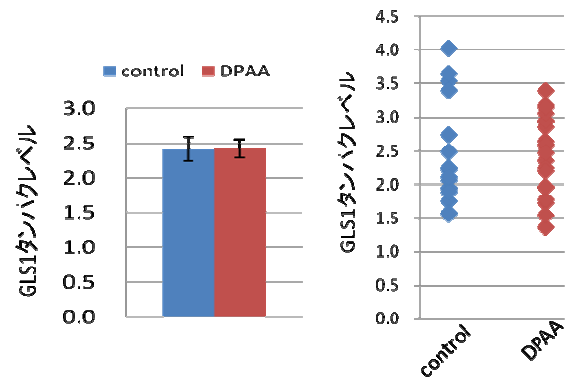


図4 DPAA投与マウス小脳GLS1発現レベル
36日間DPAAを投与したマウスから小脳を単離し、小脳ミトコンドリア中のGLS1タンパク発現量を測定した。
左：平均±SE、右：各群のGLS1発現量の分布

しかし、個体ごとのPAG活性値の分布を比較したところ、コントロール群に比べ、DPAA投与群で活性の低い個体が認められた。そこで、DPAA投与36日後のロータロッド試験成績とPAG活性の相関性について調べたところ、両者に関連性は認められず、DPAAによる協調的運動能力の低下に小脳のPAG活性値は殆ど影響しない可能性が示された(図5)。

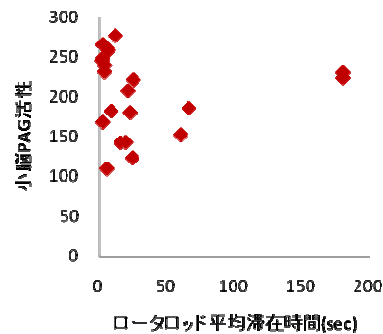


図5 DPAA投与マウス小脳PAG活性とロータロッド平均滞在時間の関係

(2), フェニルヒ素化合物による細胞内 GAC タンパク発現レベルおよび PAG 活性の変化

種々のフェニルヒ素化合物による GAC タンパク発現レベルおよび PAG 活性を測定したところ、DPAA の他にも神栖市の汚染地域で検出された PAA と PMAA に GAC タンパク発現低下作用とそれに伴う PAG 活性の減少が認められた (図 6)。

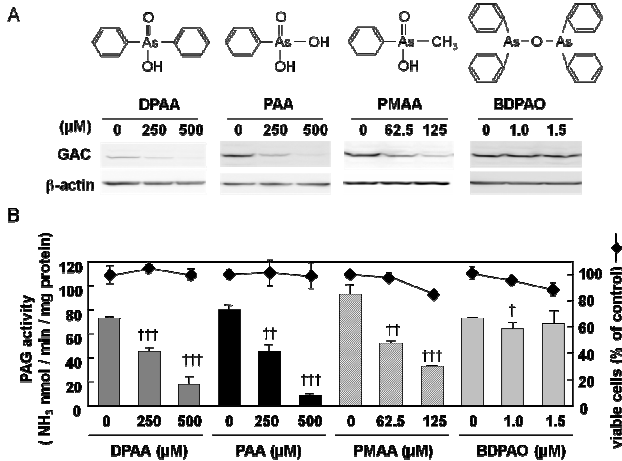


図 6 フェニルヒ素化合物による細胞内 GAC タンパクレベル (A) および PAG 活性変化 (B)-1
フェニルヒ素化合物処理時の細胞生存率を B の折れ線グラフで示した。

しかし、DPAA, PAA および PMAA の水酸基を全てメチル基に置き換えた化合物であるジフェニルメチルアルシンオキシド (DPMAO) やフェニルメチルアルシンオキシド (PDMAO) で処理した場合、GAC タンパク低下作用が認められなくなった (図 7)。さらに 5 価の無機ヒ素や、DPAA のフェニル基をメチル基に置き換えたジメチルアルシン酸においても GAC タンパクの発現低下が認められなかったことから (data not shown)、GAC タンパク発現低下作用はフェニル基と水酸基を一つ以上持つ 5 価のヒ素化合物に特異的である可能性が示唆された。

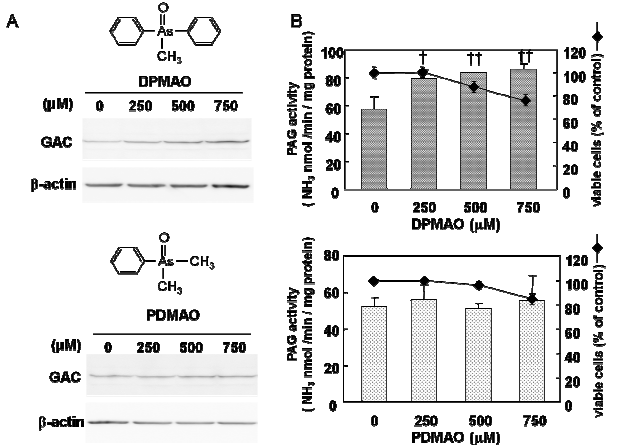


図 7 フェニルヒ素化合物による細胞内 GAC タンパクレベル (A) および PAG 活性変化 (B)-2

(3), DPAA による GAC タンパク低下機構

DPAA による GAC タンパク低下機構について、転写・翻訳・翻訳後の 3 点について検討した。まず、種々の濃度の DPAA で処理した細胞から total RNA を抽出し、定量 PCR 法で GAC mRNA 量を測定したところ、処理濃度および処理時間による影響は殆ど認められなかった (図 8)。次に DPAA で一定時間処理した細胞に RI 標識されたメチオニン (³⁵[S]-Met) を加え、一定時間内に翻訳される GAC への取り込み量を調べたところ、DPAA による影響は認められなかった (図 9)。

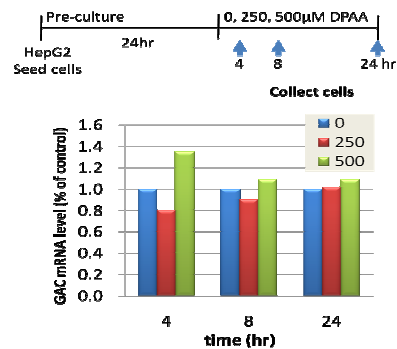


図 8 DPAA が GAC mRNA 発現レベルに及ぼす影響
種々の濃度の DPAA で一定時間処理した HepG2 中の GAC mRNA 量を定量 PCR で測定した。

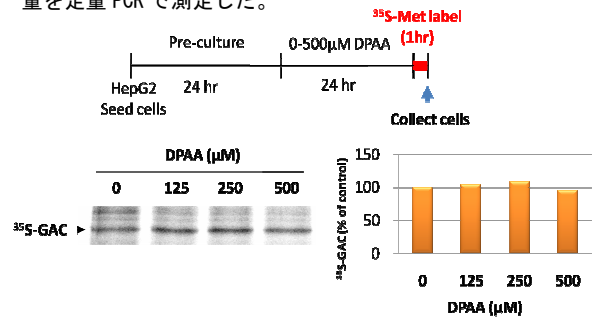


図 9 DPAA が GAC タンパクの翻訳に及ぼす影響
種々の濃度の DPAA で 24 時間処理後、³⁵[S]メチオニンを含む培地で 1 時間培養し、GAC タンパク内に取り込まれた ³⁵[S]メチオニン量 (³⁵S-GAC) を調べた。グラフは ³⁵S-GAC のバンドを定量したものである。

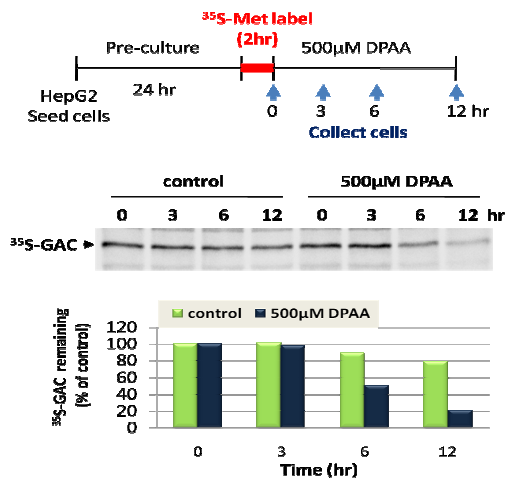


図 10 DPAA が GAC タンパクの分解に及ぼす影響
³⁵[S]メチオニンを含む培地で 2 時間培養し、新規に合成される GAC タンパクに ³⁵[S]メチオニンを取り込ませた。その後 500 μM の DPAA を含む培地に置き換え、一定時間後の ³⁵[S]メチオニンでラベルされた GAC (³⁵S-GAC) の変動を調べた。グラフは ³⁵S-GAC のバンドを定量したものである。

そこで、GAC に ^{35}S -Met を一定時間取り込ませた細胞に DPAA を処理し、標識された GAC (^{35}S -GAC) の変化を調べたところ、 ^{35}S -GAC 量はコントロールに比べ、DPAA 処理細胞では処理時間依存的に減少した (図 10)。

以上の結果から、DPAA は GAC の転写・翻訳の段階には影響せず、GAC タンパクの分解を促進することにより、GAC タンパクレベルの低下を引き起こしている可能性が示唆された。

本研究から、DPAA はマウスに協調的運動障害を誘発したものの、その原因は小脳内のグルタミンナーゼ活性およびタンパクレベルの低下によって引き起こされたものではなく、従って、DPAA による協調的運動障害の発現にグルタミンナーゼが関与する可能性は低いことが判明した。しかし、DPAA 投与群では小脳 PAG 活性が低い個体も存在しており、また、予備検討においても同様の傾向がみられたことから、DPAA は個体脳内において、グルタミンナーゼ活性の低下を引き起こす可能性も示された。さらに本研究から、DPAA の他にも神栖市の汚染地域で発見された PAA と PMAA の 2 種類のフェニルヒ素化合物にグルタミンナーゼ発現低下作用が認められた。このことは、これらフェニルヒ素化合物によるグルタミンナーゼタンパクの低下が中毒の発症に何らかの影響を与える可能性を示唆するものである。また、神経伝達に着目した場合、小脳全体のグルタミンナーゼ活性に変化がみられなくても、局所的なグルタミンナーゼ活性低下が影響する可能性も考えられる。特にシナプス前細胞におけるグルタミンナーゼの低下は、神経伝達物質であるグルタミン酸の合成量を減少させ、神経伝達効率やシナプスの可塑性等、神経機能にも影響を与えると思われる。特に小脳はグルタミン酸作動性神経が豊富に存在しており、グルタミンナーゼ発現低下の影響を受けやすい部位であると考えられることから、今後は小脳の局所的なグルタミンナーゼタンパクレベルについて詳細な検討が必要であると思われる。

これまでグルタミンナーゼタンパクの発現制御に関わる報告は殆ど無く、また、フェニルヒ素化合物によってグルタミンナーゼタンパクの分解が促進する現象を明らかにした研究は本例が最初であると思われる。近年、グルタミンナーゼは癌細胞の増殖において注目されており、癌細胞のエネルギー代謝に関する研究から、ある種の癌細胞ではグルタミンナーゼの発現上昇によって、glutamiolysis と呼ばれるグルタミンをエネルギー源に利用するための機構が亢進していることが報告されている。本研究を通して得られた知見は、DPAA による中枢神経系障害の発症との関わりだけでなく、癌研究においても重要な知

見を与えるものであると考えられる。今後は DPAA によるグルタミンナーゼタンパクの具体的な分解経路を明らかにするとともに、グルタミンナーゼの発現制御について詳細な検討を行う必要があると思われる。

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 1 件)

① Kayoko Kita, Motohiro Sato, Toshihide Suzuki, Takafumi Ochi, Structure-effect relationship in the down-regulation of glutaminase in cultured human cells by phenylarsenic compounds, Toxicology, 査読有, vol. 258, 2009, 157-163

[学会発表] (計 3 件)

① 北 加代子、鈴木 俊英、越智 崇文
ジフェニルアルシン酸は Lon protease を介してグルタミンナーゼの分解を促進する
フォーラム 2009 衛生薬学・環境トキシコロジー 2009. 11. 5-6 沖縄

② 北 加代子、鈴木 俊英、越智 崇文
ジフェニルアルシン酸による細胞内グルタミンナーゼ発現低下機構

メタロチオネインおよびメタルバイオサイエンス研究会 2009 2009. 10. 16-17 東京

③ 北 加代子、鈴木 俊英、越智 崇文
地下水ヒ素汚染物質ジフェニルアルシン酸によるグルタミンナーゼ発現低下機構について

日本薬学会 第 129 年会 2009. 3. 26-28 京都

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北 加代子 (KITA KAYOKO)

帝京大学・薬学部・助教

研究者番号：30407887

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：