

機関番号： 10101

研究種目： 若手研究 (B)

研究期間： 2009 ~ 2010

課題番号： 21780267

研究課題名 (和文)

加齢性疾患の制御に向けた p66shc による酸化ストレス調節メカニズムの解析

研究課題名 (英文)

Analysis of regulatory mechanism in p66shc-mediated oxidative stress

研究代表者

山盛 徹 (YAMAMORI TOHRU)

北海道大学・大学院獣医学研究科・准教授

研究者番号： 00512675

研究成果の概要 (和文) : p66shc タンパク質を欠損したマウスは約 30%の寿命の延長を示し、さまざまな加齢性疾患に対し抵抗性となる。このメカニズムを明らかにすることを目的に、本研究を行った。本研究の結果、細胞の酸化ストレス感受性および放射線感受性は p66shc タンパク質により調節されていることが明らかになった。また、この酸化ストレスは細胞内の過酸化水素により引き起こされること、さらに、p66shc と Heat shock protein 72 との相互作用が細胞の放射線感受性に影響を与えることが明らかとなった。

研究成果の概要 (英文) : P66shc-deficient mice have a maximum lifespan that was up to 30% greater than that of normal mice and are less susceptible to various aging-associated diseases, such as cardiovascular diseases and diabetes, than normal mice. This study was aimed to elucidate the molecular mechanism behind this phenomenon. We revealed that cellular susceptibility to oxidative stress and ionizing radiation was regulated by p66shc. We also found that hydrogen peroxide was responsible for mediating the oxidative stress to p66shc, and that the interaction between p66shc and Heat shock protein 72 influenced the cellular radiosensitivity.

交付決定額

(金額単位：円)

		直接経費	間接経費	合計
2009	年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010	年度	1,400,000	420,000	1,820,000
	年度			
	年度			
	年度			
総計		3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生化学、細胞生物学

科研費の分科・細目：農学／畜産学・獣医学／基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：加齢性疾患、活性酸素、酸化ストレス、p66shc

## 1. 研究開始当初の背景

近年、犬や猫のペットの寿命が伸び、高齢化が進んでいる。これにより、老化に伴う疾患（加齢性疾患）に罹患するペットが増加している。加齢性疾患は概して慢性疾患であることから、ペットの生活に支障を来すのみならず、ケアを行う飼い主に多大な金銭的・精神的負担を強いることとなる。したがって、

加齢性疾患の発症および病態を制御する因子の解明は獣医学的に重要な課題である。

老化および加齢性疾患発症のメカニズムはかなりの部分が未知であるものの、活性酸素が何らかの役割を果たしていることが分かっている。p66shc タンパク質を欠損したマウス (p66<sup>-/-</sup>マウス) は約 30%の寿命の延長を示し、さまざまな加齢性疾患に対し抵抗性

となる(図1)。この際、p66<sup>-/-</sup>マウスにおいて酸化ストレスに対する抵抗性が增大していることが明らかとなっている。

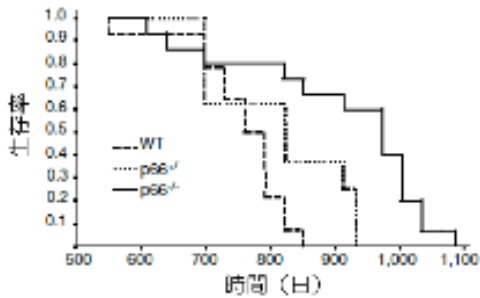


図1: p66shc 欠損による寿命延長効果  
野生型 (WT)、p66shc<sup>-/-</sup>、p66shc<sup>-/-</sup> マウス  
における生存率を比較してある。

## 2. 研究の目的

酸化ストレスとは活性酸素の生成と消去のバランスが崩れた状態であることから、p66shc は、現在までに示唆されているような活性酸素の生成を調節するよりも、むしろ活性酸素の消去に関与することで酸化ストレスレベルを調節しているのではないかと考える。すなわち、p66shc は活性酸素の消去に関わる遺伝子群(抗酸化遺伝子)の発現を負に調節しており、p66shc の欠損は抗酸化遺伝子の発現を亢進することで酸化ストレスに対する抵抗性を上昇させている、という仮説である。さらに、この p66shc による抗酸化遺伝子の発現レベルの変化が加齢性疾患の病態に影響を与えるものと考え、本研究によりこれらの仮説の検証を行う。

## 3. 研究の方法

(1) 6-hydroxydopamine により誘導される酸化ストレスシグナルにおける p66shc の関与  
①細胞: ヒト神経芽細胞腫由来 SH-SY5Y 細胞ならびに野生型/p66shc ノックアウトマウス由来胚線維芽細胞(それぞれ WT MEF、p66<sup>-/-</sup> MEF) を常法に従って維持し、実験に供した。また、p66<sup>-/-</sup> MEF に対して、野生型(WT)ないしリン酸化部位である Ser36 が Ala に変異した p66shc(S36A) をレトロウイルスベクターにより遺伝子導入し、薬剤選択して安定発現細胞を得た。  
②細胞生存率: 薬剤処理後の SH-SY5Y 細胞の生存率は MTT アッセイにより評価した。マウス胚線維芽細胞についてはトリパンブルー色素排除能試験により評価した。  
③ウェスタンブロット: p66shc リン酸化の検出のため、常法に従いウェスタンブロットを行った。抗リン酸化 p66shc 抗体は Calbiochem 社、抗 shc 抗体は BD Bioscience 社のものを使用した。

(2) 細胞の放射線感受性に対する p66shc の

意義

①細胞: ヒト胎児腎由来 HEK293 細胞ならびにマウス扁平上皮がん由来 SCCVII 細胞を常法に従い維持し、実験に供した。SCCVII 細胞に対して、コントロールベクターないし野生型 p66shc をレトロウイルスベクターにより遺伝子導入し、薬剤選択した安定発現細胞(それぞれ SCCVII/vec および SCCVII/WT p66) を作出した。

②X 線照射と細胞生存率: X 線照射は 200 kV、20 mA、1.0 mm aluminum filter、3.9 Gy/min の条件で行った。X 線照射を受けた細胞の生存率はコロニー形成法により評価した。

③質量分析によるタンパク質相互作用の検出: p66shc CH2 ドメインと結合する細胞内タンパク質の探索を行った。ヒト p66shc タンパク質由来 CH2 ドメインを His(x6)融合タンパク質として大腸菌内で発現し、ニッケルビーズを用いて粗精製した。精製タンパク質はさらにイオン交換クロマトグラフィーにより精製した。HEK293 細胞抽出液と精製した His(x6)-p66shc CH2 タンパク質を混和し、ニッケルビーズと混合、洗浄することで CH2 ドメインタンパク質と結合するタンパク質を選別した。結合タンパク質は SDS-PAGE により分離後、CBB 染色することで可視化した。結合タンパク質の候補に相当するバンドを切り出し、LC-MS/MS によりこれを同定した。

④免疫沈降: タンパク質相互作用を免疫沈降法により検出した。細胞抽出液に抗 Heat shock 72 (HSP72)抗体を添加し一晩混和後、Protein G-Sepharose を加え、さらに 2 時間混和した。免疫沈降物を洗浄後、SDS-PAGE sample buffer を添加し、ウェスタンブロットのサンプルとした。免疫沈降物は SDS-PAGE により分離し、ウェスタブロットにより解析した。

## 4. 研究成果

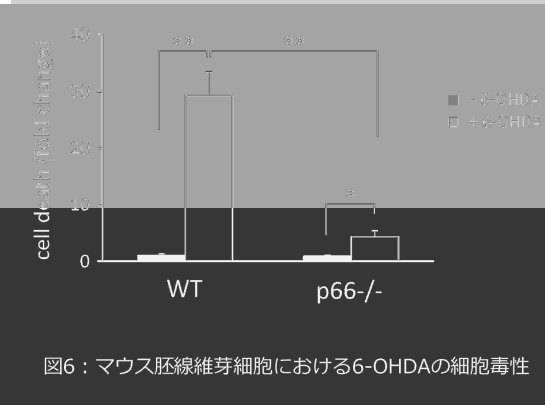
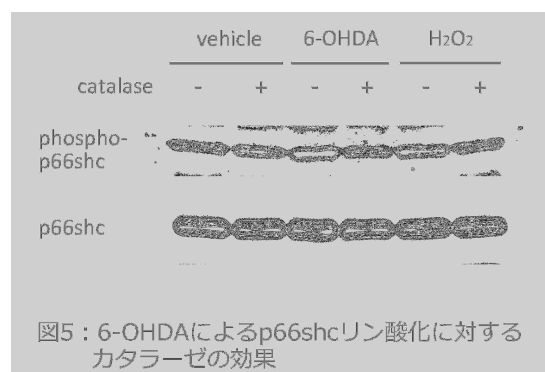
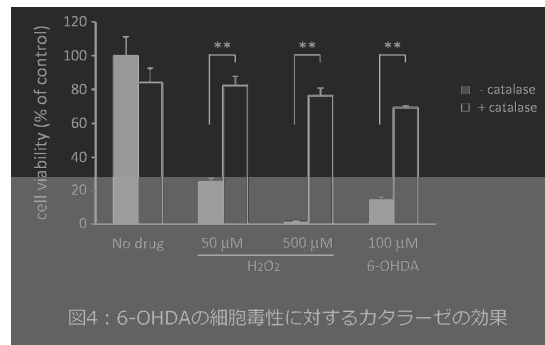
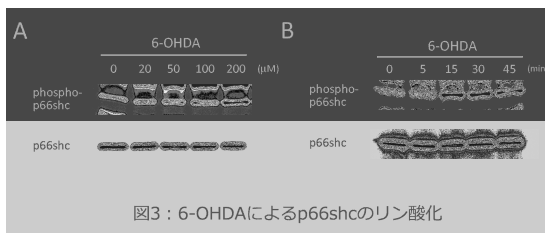
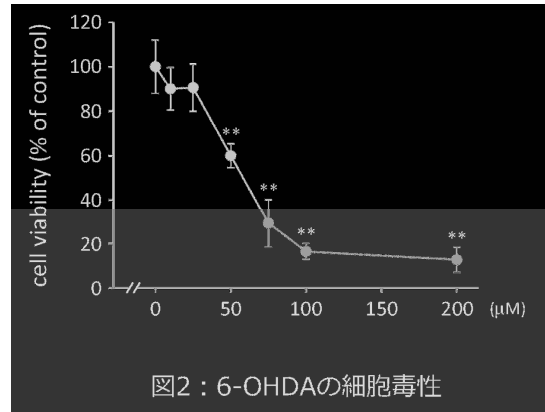
(1) 6-hydroxydopamine により誘導される酸化ストレスシグナルにおける p66shc の関与  
dopamine の酸化修飾物である 6-hydroxydopamine (6-OHDA) は、内因性的カテコールアミン作動性神経毒であり、神経細胞死を引き起こす。6-OHDA は水溶液中で自動酸化され、過酸化水素を生じるが、これが細胞毒性の原因となりうるということが報告されている。しかしながら、6-OHDA により引き起こされる細胞死のシグナル伝達については不明な点が多いことから、6-OHDA により誘導される細胞死に p66shc ならびにそのリン酸化が関与しているかどうかについて検討を行った。

まず、ヒト神経芽細胞腫由来 SH-SY5Y 細胞における 6-OHDA の細胞毒性を MTT アッ

セイにより評価したところ、6-OHDA 処理後 24 時間において、50  $\mu\text{M}$  以上の濃度域で有意な細胞毒性を示した (図 2)。現在までの研究により、p66shc に存在する 36 番目のセリン残基 (Ser36) がリン酸化を受けることが p66shc シグナル伝達機能に重要であることが報告されていることから、6-OHDA 処理を行った際における p66shc Ser36 リン酸化状態の変化をウェスタンブロットにより評価した。その結果、6-OHDA 濃度依存的な p66shc リン酸化の増加が観察された (図 3A)。さらに、100  $\mu\text{M}$  6-OHDA 処理を行った際の経時変化を調べたところ、薬剤処理後 15 分でピークを迎えるリン酸化の変動が観察された (図 3B)。次に、6-OHDA の自動酸化の結果生じる過酸化水素が、6-OHDA による細胞死にどの程度寄与しているのかを調べるため、6-OHDA 誘導細胞死に対するカタラーゼの効果を検討した。その結果、カタラーゼの前処理により 6-OHDA に起因する細胞毒性はほぼ完全に消失したことから、本実験系における 6-OHDA の細胞毒性は過酸化水素に強く依存することが示唆された (図 4)。6-OHDA により誘導される p66shc のリン酸化に対するカタラーゼの影響を検討したところ、6-OHDA ならびに過酸化水素処理により引き起こされる p66shc リン酸化もまたカタラーゼ処理により顕著に抑制されていた (図 5)。したがって、6-OHDA による p66shc リン酸化は、細胞毒性同様、過酸化水素により媒介されるということが示唆された。

次に、6-OHDA により誘発される細胞死における p66shc の意義を、WT MEF および p66<sup>-/-</sup> MEF を用いて検討した。これらの細胞に対し 6-OHDA 処理を行い、生じた細胞死をトリパンブルー色素排除能試験により評価したところ、WT MEF では 6-OHDA による強い細胞死の誘導が見られたのに対し、p66<sup>-/-</sup> MEF は 6-OHDA に対する抵抗性を示した (図 6)。この結果から、p66shc の存在が 6-OHDA による細胞毒性発現に重要であることが示唆された。さらに、p66shc のリン酸化が 6-OHDA の細胞毒性発現に関与するかどうかを調べるため、野生型 (WT) ないしリン酸化部位を変異した (S36A) p66shc を安定発現した p66<sup>-/-</sup> MEF を作出し、p66shc の発現をウェスタンブロットにより確認した (図 7A)。これらの細胞に 6-OHDA 処理をして引き起こされた細胞死をトリパンブルー色素排除能試験により評価したところ、野生型 p66 を導入した細胞では、6-OHDA に対する細胞の感受性が回復したのに対し、S36A 変異体ではそのような現象は見られなかった (図 7B)。したがって、p66shc の Ser36 のリン酸化が 6-OHDA による細胞毒性発現において重要であることが示唆された。本研究の成果は、Free Radical Research 誌にて公

表した。



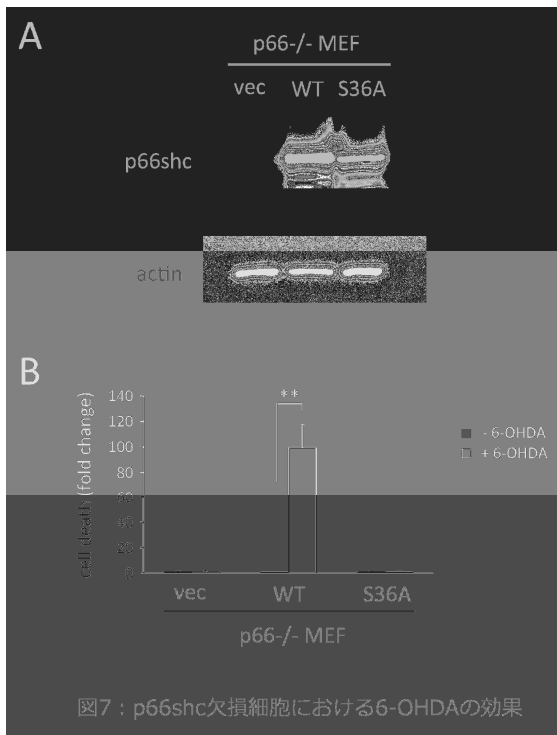


図7：p66shc欠損細胞における6-OHDAの効果

## (2)細胞の放射線感受性に対する p66shc の意義

(1)の研究やこれまでのさまざまな研究により、p66shc は細胞レベルでの酸化ストレス感受性に対し影響を与えることが報告されているが、他の種類のストレスに対する p66shc の意義を調査するため、次に放射線による DNA 損傷ストレスについて検討を行った。マウス扁平上皮がん由来 SCCVII 細胞に対し、ヒト野生型 p66shc あるいはコントロールベクターを導入し、安定発現細胞を作出した（それぞれ SCCVII/WT p66、SCCVII/vec）。これらの細胞に対し 0 から 8 Gy の X 線を照射後、コロニー形成法により細胞の X 線感受性を評価した。図 8 に示すように、SCCVII/WT p66 では同線量の放射線による生残率が SCCVII/vec に比較して減少しており、p66shc の発現により細胞の X 線感受性が上昇していることが示された。

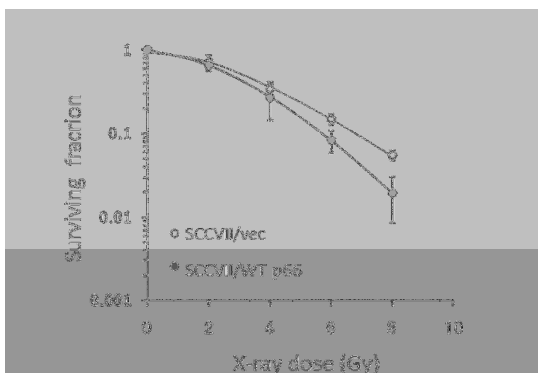


図8：SCCVII細胞における放射線感受性

shcA タンパク質は、p66、p52、p46 の 3 つのアイソフォームにより構成される。すべての shcA タンパク質は基本的に共通したドメイン構造を持つが、p52 や p46shc と異なり p66shc にはその N 末端に CH2 と呼ばれる独自のドメインが存在する (図 9)。

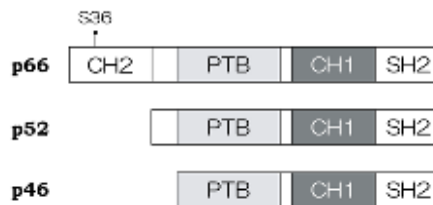


図9：shcA各アイソフォームのドメイン構造

このことから、p66shc に特徴的なストレス感受性の調節機能というものは、この CH2 ドメインに由来する可能性が考えられる。そこで、細胞内における CH2 を介したタンパク質相互作用が p66shc を特徴づける細胞の酸化ストレス応答や放射線感受性に重要な役割を果たしているのではと考え、この CH2 ドメインに相互作用するタンパク質の同定を次に行った。ヒト p66shc CH2 ドメインを His タグ融合タンパク質として大腸菌を用いて作出・精製した。これを bait として HEK293 細胞の細胞抽出液と混合し、ニッケルビーズを用いた pull-down 法を行った。得られたサンプルを一次元電気泳動後、CBB 染色を行い、検出されたバンドを LC-MS/MS に供したところ、熱ショックタンパク質である Hsp72 の存在が確認された。

次に、哺乳動物細胞内における p66shc と Hsp72 の相互作用の有無を調べるため、HEK293 細胞に野生型の全長ヒト p66shc を強制発現し、Hsp72 抗体を用いた免疫沈降法を行うことで、細胞内における Hsp72 と p66shc の相互作用について検討した。その結果、明瞭な p66shc のバンドが観察され、細胞内で p66shc と Hsp72 の相互作用が存在することが示された (図 10)。さらに、この相互作用は内因性の p66shc と Hsp72 との間にも成立していることが確認され (図 11)、この相互作用が細胞内で生理的に存在するものであることが示唆された。

さらに、p66shc と Hsp72 との相互作用が、p66shc による X 線感受性の増大に関与しているかどうかを調べるため、Hsp72 と結合し Hsp72 と基質タンパク質の結合を阻害することが報告されている低分子化合物、2-phenylethanesulfonamide (PES) の効果を上述の二種類の SCCVII 細胞について検討した。その結果、2 μM PES は SCCVII/vec の X 線感受性に影響を与えなかったのに対し、同濃度の PES 処理により SCCVII/WT p66 の X 線感受性は増大し、4、8 Gy 照射した際

の生残率は PES 非存在下のものと比較して、それぞれ 68%と 17%に減少していた(図 12)。このことから、p66shc 発現細胞における放射線感受性は HSP72 阻害剤処理により増大することが示され、細胞の放射線感受性に p66shc と Hsp72 の相互作用が影響を与えている可能性が示唆された。現在、これを引き起こすメカニズムの解明を試みている。

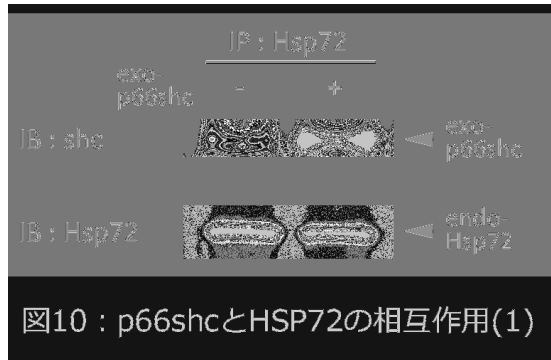


図10 : p66shcとHSP72の相互作用(1)



図11 : p66shcとHSP72の相互作用(2)

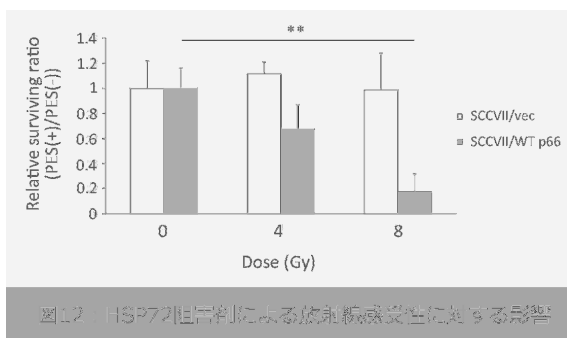


図12 : HSP72阻害剤による放射線感受性に対する影響

## 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 7 件)

1. Yamamori T, Mizobata A, Saito Y, Urano Y, Inanami O, Irani K, Noguchi N. Phosphorylation of p66shc mediates 6-hydroxydopamine cytotoxicity. *Free Radical Research* 2011;45(3):342-350. (査読有)

2. 山盛徹, Kaikobad Irani, Sirt1 による AP エンドヌクレアーゼ 1 脱アセチル化は DNA 塩基除去修復活性を調節する *基礎老化研究* 2011;35(1):29-32. (査読無)
3. 山盛徹, Kaikobad Irani, 寿命調節関連タンパク質 Sirt1 による DNA 修復酵素 AP エンドヌクレアーゼ 1 の機能調節機構 *北海道獣医師会誌* 2011;55:45-49. (査読無)
4. Jung SB, Kim CS, Naqvi A, Yamamori T, Mattagajasingh I, Hoffman T, Cole M, Kumar A, Dericco J, Jeon BH, Irani K. Histone Deacetylase-3 Antagonizes Aspirin-Stimulated Endothelial Nitric Oxide Production by Reversing Aspirin-Induced Lysine Acetylation of Endothelial Nitric Oxide Synthase. *Circulation Research* 2010;107(7):877-887. (査読有)
5. Naqvi A, Hoffman T, Dericco J, Kumar A, Kim CS, Jung SB, Yamamori T, Kim Y, Mehdi F, Kumar S, Rankinen T, Ravussin E, Irani K. A single nucleotide variation in a p53 binding site affects nutrient-sensitive human SIRT1 expression. *Human Molecular Genetics* 2010;19(21):4123-4133. (査読有)
6. Yasui H, Ito N, Yamamori T, Nakamura H, Okano J, Asanuma T, Nakajima T, Kuwabara M, Inanami O. Induction of neurite outgrowth by  $\alpha$ -phenyl-N-tert-butyl nitron through nitric oxide release and Ras-ERK pathway in PC12 cells. *Free Radical Research* 2010;44(6):645-54. (査読有)
7. Yamamori T, DeRicco J, Naqvi A, Hoffman T, Mattagajasingh I, Kasuno K, Jung SB, Kim CS, Irani K. SIRT1 deacetylates APE1 and regulates cellular base excision repair. *Nucleic Acids Research* 2010;38(3):832-845. (査読有)

[学会発表] (計 25 件)

1. Tohru Yamamori, Hironobu Yasui, Hideo Nakamura, Masayuki Yamazumi, Osamu Inanami Ionizing radiation increased

- mitochondrial electron transport chain activity and mitochondrial content in human lung carcinoma A549 cells. International Symposium on Free Radical Research 2011 年 1 月 21 日 Hyatt Regency Kyoto (京都)
2. 山盛徹、安井博宣、中村秀夫、山住雅之、稲波修 X線照射により誘導されるミトコンドリア由来活性酸素種生成上昇メカニズムの解析 日本放射線影響学会 第 53 回大会 2010 年 10 月 20 日 京都テルサ (京都)
  3. 山盛徹、溝端綾乃、斎藤芳郎、浦野泰臣、野口範子 6-Hydroxydopamine による細胞死のシグナル伝達における p66Shc の役割 第 150 回日本獣医学会学術集会 2010 年 9 月 17 日 帯広畜産大学 (帯広)
  4. 山盛徹、溝端綾乃、斎藤芳郎、浦野泰臣、野口範子 6-Hydroxydopamine により誘導される細胞死シグナルにおける p66Shc の関与 第 63 回日本酸化ストレス学会学術集会 2010 年 6 月 24 日 神奈川県民ホール (横浜)
  5. 溝端彩乃、斎藤芳郎、山盛徹、野口範子 6-ヒドロキシドーパミンにより誘導される細胞毒性と p66Shc リン酸化の関係 日本分子生物学会 第 32 回年会 2009 年 12 月 12 日 パシフィコ横浜 (横浜)
  6. Tohru Yamamori, Kaikobad Irani Deacetylation of APE1 and regulation of cellular AP endonuclease activity by SIRT1. SFRBM's 16th Annual Meeting 2009 年 11 月 20 日 Hyatt Regency San Francisco (米国)
  7. 山盛徹、Irani Kaikobad タンパク質脱アセチル化酵素 Sirt1 による AP エンドヌクレアーゼ 1 の脱アセチル化が DNA 塩基除去修復に与える影響 日本放射線影響学会 第 52 回大会 2009 年 11 月 11 日 広島市南区民文化センター (広島)
  8. 山盛徹、Irani Kaikobad NAD<sup>+</sup>依存性タンパク質アセチル化酵素 Sirt1 による AP エンドヌクレアーゼ 1 の脱アセチル化を介した DNA 修復活性の調節機構 第 148 回日本獣医学会学術集会 2009 年 9 月 25 日 鳥取市民会館 (鳥取)
  9. 山盛徹、Jeremy DeRicco、Asma Naqvi、

Timothy A. Hoffman、Kaikobad Irani Sirt1 により脱アセチル化される AP エンドヌクレアーゼ 1 のリジン残基の同定とその制御機構の解析 第 62 回日本酸化ストレス学会学術集会 2009 年 6 月 12 日 九州大学医学部百年記念講堂 (福岡)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山盛 徹 (TOHRU YAMAMORI)

北海道大学・大学院獣医学研究科・准教授

研究者番号：00512675

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし