

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年4月18日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22310039

研究課題名（和文）

蛋白質品質管理系破綻による神経細胞死惹起における重金属の分子作用メカニズム

研究課題名（英文）：Molecular mechanism of neuronal cell death induced by methyl mercury via endoplasmic reticulum stress

研究代表者

上原 孝 (TAKASHI UEHARA)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：00261321

研究成果の概要（和文）：ヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞において、メチル水銀は濃度依存的に S-ニトロシル化タンパク質ジスルフィドイソメラーゼ（PDI）の減少を引き起こした。このことから、メチル水銀は一酸化窒素（NO）と同じシステイン残基を修飾している可能性が推定された。このとき、メチル水銀は神経細胞死を惹起させるが、小胞体ストレスマーカーである XBP1 mRNA スプライシングの増加、リン酸化 IRE1 α レベルの有意な増加が観察された。以上より、メチル水銀はタンパク質成熟機構を破綻させることで小胞体ストレスを惹起し、細胞死を誘導することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：We found that methyl mercury results in neuronal cell death and the reduction of S-nitrosylated PDI formation in a concentration-dependent manner in SH-SY5Y cells. These observations suggested methyl mercury affects same cysteine residue that is oxidized by nitric oxide. Treatment with methyl mercury stimulated the specific splicing of XBP1 mRNA and phosphorylation of IRE1 α . Thus, methyl mercury might induce apoptosis via endoplasmic reticulum stress caused by dysfunction of protein maturation system.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	6,100,000	1,830,000	7,930,000
2011年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
2012年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
総計	13,900,000	4,170,000	18,070,000

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：メチル水銀，一酸化窒素，酸化ストレス，神経細胞，アポトーシス，神経変性疾患，シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

メチル水銀（MeHg）は生体内でフリーのシ

ステイン（Cys）と複合体を形成する。このとき、メチオニンと類似した構造を取るため

に、メチオニン輸送系を利用して血液脳関門を通過することが可能である。したがって、MeHgの主な標的器官は中枢神経系であり、とくに神経細胞への強い障害がみられる。しかしながら、環境汚染が社会問題化してから50年以上経った今でも、その詳細な神経細胞死発生機序については未だ不明なままである。

近年、様々な神経変性疾患において、小胞体内での新生タンパク質成熟に必須な、タンパク質ジスルフィドイソメラーゼ (protein disulfide isomerase, PDI) ファミリーが一酸化窒素 (Nitric Oxide, NO) による修飾 (SNO化) を受け、その酵素活性を失っていることが見出されつつあり、疾患発症との因果関係が指摘されている。本修飾によって、未成熟なタンパク質が小胞体内に蓄積することで小胞体ストレスが惹起され、UPR (unfolded Protein response) と呼ばれる特異的なシグナルが活性化するが、このUPRの持続的な活性化はアポトーシスを引き起こすことが知られている。SNO化は、タンパク質システイン (Cys) 残基チオール (SH) 基に対して起こるが、興味深いことに MeHg も親電子物質であり、Cys 残基 SH 基に対する親和性が高いことが知られている。

2. 研究の目的

本研究では、未だ詳細な機序が明らかではない MeHg 誘発性神経細胞死過程における小胞体ストレスの関与、とくに MeHg による PDI Cys 残基 SH 基への修飾 (S-Mercuration: S-水銀化) を調べ、その細胞毒性機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ルシフェラーゼアッセイによる

IRE1/XBP1 系および PERK/ATF4 系の活性化：Promega 社の Luciferase 1000 Assay System

kit を利用して行った。細胞を氷冷 PBS (-) 100 μ L で wash 後、Luciferase Cell Culture Lysis 100 μ L を加え、細胞ライセートを 1.5 mL チューブに移した。これを 4 $^{\circ}$ C, 12000 \times g, 5 min 遠心分離し、上清を回収した。さらに Luciferase Cell Culture Lysis で 100 希釈し、そのうち 2 μ L と Luciferase Assay Reagent 100 μ L をルミノメーター用チューブに加え、mix した後、ルミノメーターにて発光強度を 10 sec 測定した。

(2) MALDI-TOF/MS による PDI S-Mercuration 化の検討および MeHg 結合部位の同定：PDI 2 μ g を 50 mM Tris-HCl (pH7.5) の溶液中で 1, 5, 10 μ M MeHg と 37 $^{\circ}$ C, 1 hr 反応させた後 MALDI-TOF/MS 解析に供し、結果から MeHg 処理濃度依存的に増加するフラグメントイオンピークを検討した。

4. 研究成果

ヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞に MeHg を処理し、MTT アッセイによって細胞生存率を測定したところ、MeHg の濃度および時間依存的な減少が見られた。このとき、PCR 法および Western Blotting, レポーター遺伝子アッセイによって種々の小胞体ストレスマーカーの変動を検討した。その結果、濃度依存的な XBP1 の splicing 亢進、ATF4 の活性化、ATF6 の開裂 (限定分解) がそれぞれ有意に観察された。このことから、MeHg によって 3 つの小胞体ストレス応答経路 (IRE1/XBP1 系、PERK/ATF4 系、ATF6 系) すべてが活性化していることが明らかになった。また、IRE1 α の特異的阻害薬である STF-083010 を処理したところ、1~4 μ M MeHg による細胞死が有意に抑制された。本成績から、MeHg は小胞体ストレスによる UPR (unfolded protein response) を介して神経細胞死を惹起する可能性が示唆された。次に、PDI が MeHg による

S-Mercuration 化を受けるか否かを検討した。これまでに、生体内における S-Mercuration を証明する方法は開発されていない。MeHg が結合することが予想される SH 基は反応性に富み、NO などの修飾も起こる部位であると想定した。そこで、MeHg 処理後に一定濃度の NO を処理し、Biotin-Switch Assay に供した。その結果、MeHg 処理濃度に依存して NO ドナー (SNOC) による SNO-PDI 形成が抑制されたが、高濃度 MeHg を処理しても完全に抑制されなかった。このことから、おそらく MeHg は PDI の SNO 化を受ける Cys 残基すべてに結合するのではなく、その一部にだけ結合していることが示唆された。

さらに、リコンビナント PDI を用いた MALDI-TOF/MS 解析により、PDI の S-Mercuration 化およびその結合部位を検討したところ、C 末側の活性中心 (チオレドキシソドメイン, TRX domain) で MeHg の分子量と同程度のフラグメントイオンピークの増加が見られた。したがって、MeHg は N 末側の活性中心に存在する Cys には結合せず、C 末側の Cys383 か Cys386 に結合している可能性が示唆された。

生理機能に様々な影響を与える SNO 化と異なり、S-Mercuration 化はタンパク質の立体構造を破綻させて、酵素活性を消失させることが報告されている。したがって、PDI の S-Mercuration 化は、酵素機能の消失を招くことで、新生タンパク質成熟機構を阻害して、UPR を活性化し、最終的に細胞死を惹起している可能性が示唆された。

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)

- ① Watanabe, Y., Kaida, Y., Fukuhara, S., Takechi, K., Uehara, T., and Kamei, C.

Participation of metabotropic glutamate receptors in pentetrazol-induced kindled seizure. *Epilepsia* 52, 140-150. (2011) doi: 10.1111/j.1528-1167.2010.02764.x.

- ② Numajiri, N., Takasawa, K., Nishiya, T., Tanaka, H., Ohno, K., Hayakawa, W., Asada, M., Matsuda, H., Azumi, K., Kamata, H., Nakamura, T., Hara, H., Minami, M., Lipton, S.A. and Uehara, T. On-off system for PI3-kinase-Akt signaling through S-nitrosylation of PTEN. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108, 10349-10354 (2011) doi: 10.1073/pnas.1103503108.
- ③ Uehara, T. and Nishiya, T. Screening systems for identification of S-nitrosylated proteins. *Nitric Oxide* 25, 108-111 (2011) doi: 10.1016/j.niox.2010.11.002.
- ④ Matsumoto, K., Nishiya, T., Maekawa, S., Horinouchi, T., Ogasawara, K., Uehara, T., and Miwa, S. The ECS (SPSB) E3 ubiquitin ligase is the master regulator of the lifetime of inducible nitric-oxide synthase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 409, 46-51 (2011) doi: 10.1016/j.bbrc.2011.04.103.
- ⑤ Nishiya, T., Matsumoto, K., Maekawa, S., Horinouchi, T., Fujimuro, M., Ogasawara, K., Uehara, T., and Miwa, S. SPRY domain-containing SOCS box protein-1 (SPSB1), SPSB2, and SPSB4 are master regulators of proteasome-dependent degradation of iNOS. *J. Biol. Chem.* 286, 9009-9019 (2011) doi: 10.1074/jbc.M110.190678.

[学会発表] (計 8 件)

- ① 上原 孝: 「ガス状分子の神経細胞死に対する作用機構」第 39 回日本毒性学会学術

年会 仙台国際センター (2012.07.19) 招待講演

- ② 上原 孝: 「NOによる蛋白質修飾と神経細胞死制御」第53回日本生化学会 中国・四国支部例会 岡山大学 (2012.05.18) 招待講演
- ③ 上原 孝: 「A novel modulatory 'on-off' system for PI 3-kinase-Akt signaling through S-nitrosylation」第11回日本NO学会学術集会, 昭和薬科大学 (2011.5.14) 招待講演
- ④ 上原 孝: 「抗体アレイを使用した新規S-ニトロシル化蛋白質の探索」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 神戸国際会議場 (2010.12.9)
- ⑤ Takashi Uehara: 「Detection of oxidized protein-disulfide isomerase with a specific antibody」40th Annual Meeting Neuroscience 2010 San Diego Convention Centre (2010.11.15)
- ⑥ 上原 孝: 「ニトロソ化ストレスを切り口とした神経変性疾患の早期診断/治療薬開発へのアプローチ」生体機能と創薬シンポジウム 2010京都 グランヴィア京都 (2010.9.9) 招待講演
- ⑦ Tadashi Nishiya, Satoshi Maekawa, Masahiro Fujimuro, Kouetsu Ogasawara, Takashi Uehara, and Soichi Miwa: 「The life time of iNOS is regulated by the SPRY domain-containing SOCS box protein family linking iNOS to the elongin BC-Cul5-Rbx2 E3 ubiquitin ligase complex」The 6th International Conference on the Biology, Chemistry, and Therapeutic Applications of Nitric oxide, 京都国際会議場 (2010.6.17)
- ⑧ Takashi Uehara: 「Detection of oxidized

ER protein by nitrosative/oxidative stress with a specific antibody」The 6th International Conference on the Biology, Chemistry, and Therapeutic Applications of Nitric oxide, 京都 (2010.6.16)

〔図書〕(計6件)

- ① 上原 孝: 一酸化窒素 (NO) 結合性 (S-ニトロシル化) タンパク質の網羅的同定, 生化学85(1), p6 (2013)
- ② 上原 孝: 小胞体内ニトロシル化による神経変性疾患の発症, 脳21, p6(2013) 金芳堂
- ③ 上原 孝: タンパク質ニトロシル化による細胞生死調節, 実験医学30(17), p7 (2012) 羊土社
- ④ 鎌田英明, 上原 孝: 発癌/神経細胞の生死に関わる細胞内ROSシグナル制御, 細胞工学31(2), p6 (2012) 秀潤社
- ⑤ 上原 孝: NOはPI3-キナーゼ-Aktシグナルのスイッチ分子として機能している, 実験医学29(18), p4 (2011) 羊土社
- ⑥ 上原 孝: NO・ニトロソ化シグナルと細胞死, 実験医学27(15), p5 (2009) 羊土社

〔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〕

報道関連情報

- ① 平成 23 年 6 月 7 日掲載, 山陽新聞 (27 面)
「NO 濃度細胞生死の鍵／脳梗塞新薬に期待」
- ② 平成 23 年 6 月 7 日放送, RSK 山陽放送 RSK
ニュース「脳梗塞に新たな治療の可能性」
- ③ 平成 23 年 6 月 7 日放送, KSB 瀬戸内海放送
KSB ニュース「脳こうそくの治療に期待 世界初の発見」
- ④ 平成 23 年 6 月 7 日 WEB 掲載, 東京新聞「細胞生死の鍵は NO, 治療応用も」
- ⑤ 平成 23 年 6 月 7 日 WEB 掲載, 福井新聞「細胞生死の鍵は NO, 治療応用も」
- ⑥ 平成 23 年 6 月 16 日掲載, 朝日新聞 (29 面)
「一酸化窒素濃度 脳細胞生死の鍵」
- ⑦ 平成 23 年 6 月 17 日掲載, 科学新聞 (4 面)
「細胞生死の鍵握る一酸化窒素 2 面性の作用機構解明 ガンなどの新たな治療薬も」
- ⑧ 平成 23 年 6 月 19 日掲載, 読売新聞 (31 面)
「細胞の保護・破壊 濃度次第 一酸化窒素の作用解明」

ホームページ等

http://www.pharm.okayama-u.ac.jp/lab/yakuri/Uehara_Lab/Welcome.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上原 孝 (TAKASHI UEHARA)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号 : 00261321

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :