

## 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6月12日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22510074

研究課題名（和文）真核細胞が有する異常タンパク質識別機構に基づく有害物質評価系の確立

研究課題名（英文）Establishment of assessment system for toxic chemicals based on abnormal protein recognition mechanism in eukaryotic cells.

研究代表者

高田 耕司 (TAKADA KOJI)

東京慈恵会医科大学・医学部・准教授

研究者番号：30179452

研究成果の概要（和文）：化学物質の有害性を新たな指標で評価するため、細胞内タンパク質の異常度を反映するポリユビキチン化タンパク質の蓄積に着目した。6種類の株化細胞を用いて各被験物質の曝露による難溶性ポリユビキチン鎖の変動を解析したところ、有害物質は、その毒性発現に伴い細胞内異常タンパク質を①増やすもの、②細胞の種類に依存して増やすもの、③変化させないもの、以上3種類に分類された。本評価系は毒性機序の理解に基づく化学物質の安全管理に有用である。

研究成果の概要（英文）：

We focused accumulation of polyubiquitinated proteins in cells which reflect protein abnormality to evaluate chemical-induced toxicity with a new index. By analyzing changes in hardly-soluble polyubiquitin chains due to exposure to each test substance using six established cell lines, toxic chemicals could be divided into three groups in terms of their toxic effects on levels of cellular abnormal proteins, which were (1) increased in all cells, (2) increased in a cell type-dependent manner, and (3) unchanged in all cells. The present evaluation system is useful for safety management of chemicals based on the understanding of toxic mechanism.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：生化学・生物学

科研費の分科・細目：環境学・放射線・化学物質影響科学

キーワード：有害化学物質、ユビキチン、異常タンパク質

## 1. 研究開始当初の背景

化学物質の有害性は、実験動物を用いた一般毒性で判定されることが多い。その際、評価の対象は体重変化や臓器・組織の状態などであり、毒性の発現機序が問われることは少ない。また、動物実験は、感度や正確性など技術的問題に加え、効率・コストや倫理面でのデメリットも指摘される。近年、米国環境保護庁は、化学物質の毒性評価のための戦略計画において、『毒性経路に基づくリスク評価』という目標の下、分子生物学やゲノミクスなど様々な最新の成果を活用した包括・統合的評価系を構築する旨の方針を発表した (<http://www.epa.gov/osa/spc/toxicitytesting/>)。本研究はこのような背景のもと、毒性学領域での研究が遅れている化学物質の曝露による“細胞内タンパク質の異常化現象”に着目して新規評価系の構築を目指すものである。

人間を含む真核生物の細胞には、正常な構造を失った異常タンパク質に結合して凝集を防ぎ再生に導く分子シャペロン群が存在する。また、異常タンパク質の種類や量に応じて、分子シャペロンに認識された異常タンパク質は、ユビキチンシステムの酵素反応によってポリユビキチン鎖が付加され(ユビキチン化)、これを認識するプロテアソームによって分解される。この『分子シャペロン-ユビキチン系』は、異常タンパク質の毒性から細胞を防御するシステムとして重要であり、真核生物の細胞に普遍的に備わっている。化学物質の毒性とユビキチン系の関係を初めて解明したのは、Jentsch のグループである (Nature 361: 369-371, 1993)。彼らは酵母を用いてユビキチン-プロテアソームシステムがカドミウム耐性に不可欠であることを証明し、カドミウム曝露によって生じた異常タンパク質が毒性発現に関与し、ユビキチン系はその処理を通じて解毒を担うと指摘した。その後、我々を含む内外の研究者によって、各種化学物質に曝露した哺乳類細胞において同様の現象が観察され、毒性発現の過程において、異常化したタンパク質がユビキチン化され、不溶性成分として増加・蓄積する可能性が報告されてきた。しかし、これらのタンパク質複合体は難溶性で広範な分子サイズを有するため、性状解析がきわめて難しくその実体は未だに解明されていない。また、このようなタンパク質を毒性評価に応用する試みもない。

我々は、各種疾患や細胞ストレスによって増加するユビキチン化タンパク質の性状を解明するため、その定量・分析・精製・同定を可能とする数々の手法の開発を進めてきた (Eur J Biochem 233: 42-47, 1995; Biochem J 356: 199-206, 2001)。また、その過程で化学物質を含む各種ストレスによる“細胞内

難溶性ポリユビキチン化タンパク質の増加蓄積現象”を観察してきた (Brain Res 620: 171-173, 1993; J Cereb Blood Flow Metab 19: 750-756, 1999)。こうした背景を踏まえて、本研究では、難溶性ポリユビキチン化タンパク質(異常タンパク質)の定量および成分分析を基盤とした有害化学物質の評価系の確立を目標とする。

## 2. 研究の目的

ユビキチン系は分子シャペロンと共役して、細胞内タンパク質の異常を識別し、当該タンパク質にポリユビキチン鎖を付加する。そのため、ポリユビキチン化タンパク質の量的変動は、化学物質の細胞毒性を解析するための指標として有望である。そこで本研究では、下記の検討を通じて、有害化学物質の新たな評価系の構築を目指す。

有害化学物質による細胞内タンパク質の異常化に関して世界標準となる評価系の確立を目標とする。すなわち、培養が容易で化学物質に対する応答が安定しているモデル株化細胞を選定するとともに ELISA 法による難溶性ポリユビキチン化タンパク質(難溶性成分中のポリユビキチン鎖)の定量法の改良に努める。また、これらの検討に基づいて代表的な化学物質の有害性を精査し、評価系の有用性を検証する。

培養細胞からの難溶性ポリユビキチン化タンパク質の抽出・精製・分析法の改良を進めるとともに、LC-MS/MS を用いた当該タンパク質の同定法を構築することで有害化学物質の標的となる細胞内タンパク質の情報収集に着手する。

## 3. 研究の方法

### (1) モデル株化細胞の選定

6 種類の株化細胞(ヒト神経芽細胞腫由来 SH-SY5Y, マウス神経芽細胞腫由来 Neuro2A, マウス線維芽細胞由来 NIH 3T3, ヒト腎近位尿細管上皮由来 HK-2, ヒト乳癌由来細胞 MCF7, ヒト肝細胞癌由来 FLC-4)を 10% 牛胎児血清を含む DMEM または DMEM/F-12 (1:1) 培地での単層培養系で継代培養した。

有害化学物質の毒性評価においては、培養細胞の培地中に被験物質を添加し、24~48 時間後の細胞の生存率を WST-1 法で求めた。また、ポリユビキチン化タンパク質の分析には、これらの細胞の抽出液を試料とする。その際、難溶性タンパク質を ELISA 法での測定に供するため、2% SDS を用いて調製した全タンパク質画分に SDS-Out 試薬、Tween 20、cycloamylose を作用させ、過剰な SDS を除去するとともにタンパク質の変性緩和処理を行った。上記の実験に使用した主要な化学物質は、パラコート、過酸化水素、ダイオキシン、メチル水銀、カドミウムである。

## (2) 難溶性ポリユビキチン鎖の定量

ポリユビキチン化タンパク質の量的な指標であるポリユビキチン鎖は、特異的な ELISA (Eur J Biochem 233: 42-47, 1995) で定量した。すなわち、結合型ユビキチンを認識する FK2 抗体を 96 穴マイクロプレートに固相化後、同プレートを 1% 牛血清アルブミン で被覆処理し、各 well に試料または標準品 (reference preparation 1, RP1) を 0.1 ml 分注、室温で 3 時間放置後、0.05% Tween20 含有 PBS で 3 回洗浄した。次に、ビオチン標識した FK2 抗体の希釈液を各 well に 0.1 ml 注入し、室温で 2 時間放置後、同様に洗浄した。続いて、HRP 標識ストレプトアビジン希釈液 0.1 ml を添加し、室温で 30 分間放置後、再び洗浄した。最後に 0.15 mg/ml テトラメチルベンジジンと 0.0025% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を含有する発色液で 15 分間の反応後、1.2 N 硫酸 0.05 ml を添加し、その後、各 well の 450 nm の吸光度を測定した。

## (3) 各種阻害剤を用いた検討

化学物質の細胞毒性とユビキチン-プロテアソーム系の関係を解析するため、プロテアソーム阻害剤 (epoxomicin, MG132)、ユビキチン活性化酵素 E1 阻害剤 (UBE1-41) および脱ユビキチン化酵素 USP14 阻害剤 (IU1) が半致死的なカドミウム曝露に与える影響を調べた。

## (4) 抗体アフィニティー精製用基材の調製

結合型ユビキチンを認識する FK2 モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを培養後、BALB/C マウスに腹腔に接種して貯留した腹水から同抗体を精製した。抗体 (10 mg) を NHS 活性化セファロース (1 ml) に共有結合させ FK2 抗体セファロースを作成し、免疫沈降に供した。

## (5) LC-MS/MS を用いた解析

LC-MS/MS 装置 (日立ハイテクノロジー社, Nano Frontier eLD) を用いたプロテオーム解析では、様々な細胞抽出物を試料として利用し、ペプチド断片化酵素の選定やキャピラリーカラムの最適化等、効率的な解析に向けた条件設定を進めた。

## 4. 研究成果

### (1) ポリユビキチン鎖定量法の最適化

難溶性ポリユビキチン鎖の測定に関しては、試料調製と ELISA の両者について方法を再検討し、前者においては SDS 除去作業の簡略化によって 2 日間の作業工程を 1 日に短縮した。ELISA においては、従来使用してきた自作の標準品 (RP1) の安定供給が困難であるため、新規標準品の設定を行った (図 1)。3 種類のポリユビキチン (Ub) 鎖の内、K63-Ub8 鎖 (ユビキチン 8 分子の K63 型鎖) と Ub10 直鎖 (ユビキチン 10 分子の直鎖) は RP1 と類似した標準曲線を示したが、K48-Ub5 鎖 (ユ

ビキチン 5 分子の K48 型鎖) は鎖長の不足によって交差性が不完全であった。この結果、性状が明確な上、市販品として入手も容易な Ub10 直鎖を新たな標準品とするプロトコルを作成した。こうした標準品の設定は、各施設で測定された結果を比較し分析する上できわめて重要であり、今後のポリユビキチン鎖の定量解析法の普及に寄与する成果である。

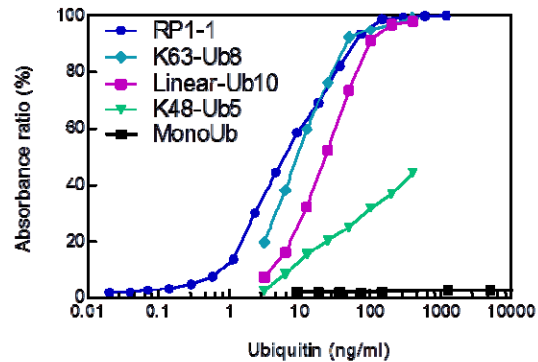


図1 ポリユビキチン測定用ELISAにおける標準物質の検討

### (2) 化学物質の曝露と細胞内難溶性ポリユビキチン化タンパク質含量の関係

株化細胞 6 種類を様々な濃度の各化学物質の存在下で 24~48 時間培養し、半数の細胞が死滅する濃度 (EC<sub>50</sub>) を求め、この曝露条件での細胞内難溶性ポリユビキチン化タンパク質 (ポリユビキチン鎖) の量的変化を分析した。その結果、図 2 の典型例からわかるように、カドミウム (Cd) の曝露は、すべての細胞において、遷延性のポリユビキチン鎖量の増加をもたらした。メチル水銀 (MeHg) の曝露では、HK-2 細胞においてのみ同様のポリユビキチン鎖の増加現象を認めた。一方、パラコートや過酸化水素の曝露では、何れの細胞においてもポリユビキチン鎖量の変化は観察されなかった。これらの結果から、有害化学物質は、その細胞毒性の発現に伴って細胞内異常タンパク質の量が ①増加する (カドミウム)、②細胞の種類に依存して増加する (メチル水銀)、③変動しない (パラコート、過酸化水素)、以上 3 種類に分けられることが明らかとなった。このような分類は、従来にないものであり、各々の細胞毒性の発現機序を解明する上で有用な情報と考えられる。今後、本評価系で分析する被験物質の種類を追加し、有害化学物質の包括的な理解と安全管理に貢献したい。

モデル株化細胞の選定については、上述の結果と ELISA 測定値の安定性の観点から、HK-2 細胞と NIH3T3 細胞の併用が望ましいと結論した。

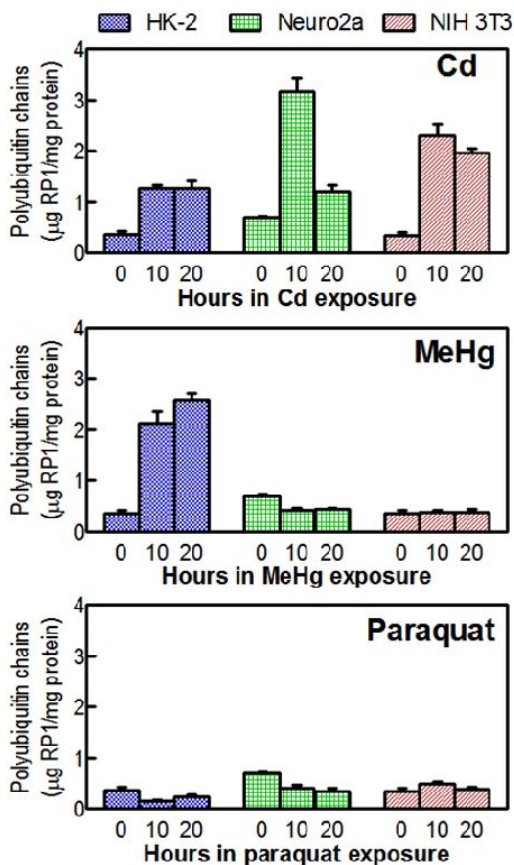


図2 難溶性ポリユビキチン鎖の細胞内含量に対する有害化学物質の影響

(3) カドミウムの細胞毒性に対するユビキチン-プロテアソーム系の作用

プロテアソーム阻害剤 (epoxomicin, MG132)、ユビキチン活性化酵素 E1 阻害剤 (UBE1-41) および脱ユビキチン化酵素 USP14 阻害剤 (IU1) について HK-2 細胞の増殖に影響を与えない濃度域を求め、各薬剤が半致死的なカドミウム曝露に与える影響を調べたところ、プロテアソーム阻害剤と E1 阻害剤には HK-2 細胞のカドミウム感受性を高める作用が見出された。一方、プロテアソームの活性を間接的に高める USP14 阻害剤は、HK-2 細胞のカドミウム耐性を増強させた。これらの結果から、HK-2 細胞においてもユビキチン-プロテアソーム系がカドミウム毒性に対する保護作用を担うことが示された (図 3)。

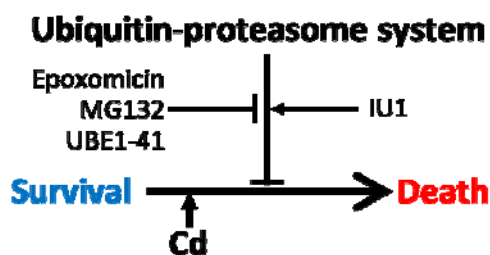


図3 カドミウムの細胞毒性に対するユビキチン-プロテアソーム系の保護作用 (→促進, ←抑制)

ユビキチン-プロテアソーム系の機能不全は、こうした保護作用の破綻とともに難溶性ポリユビキチン化タンパク質の蓄積をもたらす可能性があり、この結果は本研究で確立した有害物質評価系の意義を強く支持する結果と考えられる。今後、ポリユビキチン化タンパク質の蓄積が認められる他の細胞と化学物質の組み合わせについても同様の解析を進める計画である。

(4) LC-MS/MS を用いた解析

様々な細胞抽出試料を対象として、LC-MS/MS でのプロテオミクスの解析手法の検証と改良を重ね、最終的に 120cm 長のキャピラリーカラムを連結した装置にて、5 µg 程度の細胞や組織由来の蛋白質のトリプシン消化ペプチドを分析試料として、100~500 蛋白質分子の同定と、非標識法による相対定量を実施することが可能となった。また、数百の分子リストから生物学的な意味を推定することはきわめて困難なので、遺伝子オンロジー解析あるいはパスウェイ解析 (エルゼビア社, Pathway Studio; Visualization and Integrated Discovery (DAVID), <http://david.abcc.ncifcrf.gov/>; 京都大学 the Kyoto Encyclopaedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway database, <http://www.genome.jp/kegg/pathway.html> など) の手法を導入して結果解釈へ進めるプロトコルを確立した。本研究で調製した HK-2 細胞由来の難溶性ポリユビキチン化タンパク質の精製標品の解析は現在進行中である。

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 6 件)

- ① Mechkarska M, Meetani M, Michalak P, Vaksman Z, Takada K, Conlon JM. Hybridization between the African clawed frogs *Xenopus laevis* and *Xenopus muelleri* (Pipidae) increases the multiplicity of antimicrobial peptides in skin secretions of female offspring. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*. 7:285-91, 2012. (査読有) 10.1016/j.cbd.2012.05.002.
- ② Conlon JM, Mechkarska M, Ahmed E, Leprince J, Vaudry H, King JD, Takada K. Purification and properties of antimicrobial peptides from skin secretions of the Eritrea clawed frog *Xenopus clivii* (Pipidae). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology* 2011; 153:

- 350-4. (査読有)  
10.1016/j.cbpc.2010.12.007
- ③ Mechkarska M, Eman A, Coquet L, Jérôme L, Jouenne T, Vaudry H, King JD, Takada K, Conlon JM. Genome duplications within the Xenopodinae do not increase the multiplicity of antimicrobial peptides in *Silurana paratropicalis* and *Xenopus andrei* skin secretions. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*. 2011; 6: 206-12. (査読有)  
10.1016/j.cbd.2011.03.003
- ④ Suzuki N, Yachiguchi K, Hayakawa K, Omori K, Takada K, Tabata JM, Kitamura K, Endo M, Wada S, Srivastav AK, Chowdhury VS, Oshima Y, Hattori A. Effects of inorganic mercury on osteoclasts and osteoblasts of the goldfish scales in vitro. *J Fac Agr Kyushu Univ* 2011; 56: 47-51. (査読有)  
<https://qir.kyushu-u.ac.jp/dspace/handle/2324/19635>.
- ⑤ Iwase T, Uehara Y, Shinji H, Tajima A, Seo H, Takada K, Agata T, Mizunoe Y. *Staphylococcus epidermidis* Esp inhibits *Staphylococcus aureus* biofilm formation and nasal colonization. *Nature* 2010; 465: 346-9. (査読有) 10.1038/nature09074.
- ⑥ Eda H, Aoki K, Kato S, Okawa Y, Takada K, Tanaka T, Marumo K, Ohkawa K. The proteasome inhibitor bortezomib inhibits FGF-2-induced reduction of TAZ levels in osteoblast-like cells. *European Journal of Haematology* 2010; 85: 68-75. (査読有)  
10.1111/j.1600-0609.2010.01435.x

[学会発表] (計8件)

- ① 高田耕司, 湯川豊一, 青木勝彦, 吉田清嗣. カドミウムの細胞毒性に対するユビキチン-プロテアソーム系の保護作用. 第85回日本生化学会大会. 2012年12月16日. 福岡国際会議場 (福岡市).
- ② 青木勝彦, 宮野千草, 梅村翔也, 朝倉正, 吉田清嗣, 海老原史樹文, 高田耕司. 絶望行動を制御する脱ユビキチン化酵素 USP46 と相互作用するタンパク質の検索. 第85回日本生化学会大会. 2012年12月16日. 福岡国際会議場 (福岡市).
- ③ 松本倫典, 松浦知和, 矢永勝彦, 高田耕司. ヒト高分化型肝細胞癌株を用いたフィブリノゲンの効率的産生システムの検討. 第48回日本肝臓学会総会. 2012年6月7日. ホテル日航金沢 (金沢市).
- ④ 青木勝彦, 宮野千草, 山田宙史, 梅村翔也, 岩室祥一, 大川 清, 海老原史樹文, 高田耕司. 絶望行動を制御する脱ユビキチン化酵素 USP46 の解析. 日本動物学会第64回関東支部大会. 2012年3月17日. 東邦大学 (習志野市).
- ⑤ 高田耕司. カドミウムの腎細胞毒性の分子機序: 細胞内タンパク質の質的变化との関連. 環境先進県とやまにおける産業由来重金属の生物毒性研究の国際的新拠点の形成 公開シンポジウム-生物毒性研究の最前線-. 2012年3月17日. 富山大学 (富山市). (招待講演)
- ⑥ 高田耕司, 青木勝彦, 山田宙史, 岩室祥一, 大川 清. 細胞内ポリユビキチン鎖の定量による化学物質の毒性発現機序の検討. 第84回日本生化学会大会. 2011年9月24日. 国立京都国際会館(京都市).
- ⑦ 松本倫典, 松浦知和, 大川 清, 高田耕司. ヒト肝臓由来の高分化型細胞株FLC-4, FLC-7を用いた血漿タンパク質の効率的産生. 第84回日本生化学会大会. 2011年9月24日. 国立京都国際会館(京都市).
- ⑧ 高田耕司, 福田隆浩, 青木勝彦, 加藤尚志, 大川 清. カドミウムの継続投与によるマウス腎臓のタンパク質の性状変化. 第83回日本生化学会大会. 2010年12月9日. 神戸ポートアイランド (神戸市).

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

高田 耕司 (TAKADA KOJI)  
東京慈恵会医科大学・医学部・准教授  
研究者番号: 30179452

### (2) 研究分担者

加藤 尚志 (KATO TAKASHI)  
早稲田大学・教育・総合科学学術院  
研究者番号: 80350388