

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 5月21日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010年度～2012年度

課題番号：22590061

研究課題名（和文） ADAM型出血毒素による新規の信号伝達と細胞機能の解明

研究課題名（英文） Investigation of new signal transduction and cell function of ADAM-type hemorrhagic toxin

研究代表者

荒木 聡彦（ARAKI SATOHIKO）

名古屋大学・大学院理学研究科・講師

研究者番号：80242808

研究成果の概要（和文）：ADAM型出血毒素は血管内皮細胞に細胞断片化を引き起こす。このような細胞断片化を制御している信号分子が特定された。またこの分子による制御が多くの細胞で一般的に共通して行われていることが示された。これにより細胞形態制御の新しい制御機構が解明された。

研究成果の概要（英文）：ADAM-type hemorrhagic toxins induce cell fragmentation on vascular endothelial cells. A signaling molecule was identified as the responsible factor regulating the cell fragmentation, and shown to perform on various cell types. It suggests one of regulating mechanism of cell morphology is clarified.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：細胞生物学、毒素

1. 研究開始当初の背景

細胞膜プロテアーゼである ADAM ファミリーは、癌・免疫など多くの疾患に関わると考えられているが、ファミリーの殆どの分子の具体的な役割は明らかではない。この中で、本申請者は、出血性ヘビ毒の中に、血管内皮細胞特異的に細胞死（アポトーシス）を引き起こす ADAM ファミリータンパク質（VAP (Vascular apoptosis-inducing proteins) と命名）が存在することを発見し、最近その X 線結晶構造解析にも成功した^{1,2,3)}。これは、ADAM ファミリータンパク質では世界初の立体構造データである。この VAP には細胞死誘導活性に加えて、個体においては出血活性もある。そこで、このような活性の明らかな

ADAM を用いることにより、不明な ADAM の機能を明らかにできる可能性が示唆された。

2. 研究の目的

ADAM ファミリーの一つである ADAM 型ヘビ毒素が、血管内皮細胞に新規のシグナル伝達を引き起こすことを最近見出した。この新しいシグナル伝達では新規の脂質代謝が起こり、細胞膜に著しい変化をもたらすことが分かったことから、このような新しい細胞機能とシグナル伝達の詳細の解析を行う。この新しい細胞機能とシグナル伝達の詳細が解明されれば、血管内皮細胞の新しい制御経路として新薬開発の道が開かれる。またこれが ADAM ファミリーの普遍的なシグナル伝達経路で

あれば、さらに血管細胞以外に対する新薬の道も開かれるため、このシグナル伝達の詳細を解明する。

3. 研究の方法

(1) 細胞とその培養

今回の実験では Jaffe らの方法⁷⁾によって得たヒト臍帯血管内皮細胞 (HUVEC) を使用した。培養液として、MCDB105 培養液 (Sigma) にウシ胎仔血清を 10 %、FGF を 70 ng/ml (Lobb および Fett の方法⁸⁾でウシの脳より抽出)、ヘパリンを 100 ng/ml の最終濃度になるように加えた溶液を用いた。細胞は、0.1 %ゼラチンコートしたプラスチックディッシュにまき、37°Cで培養を行った。

(2) VAP1 の精製

VAP1 はガラガラヘビ粗毒から 2 段階のクロマトグラフィーを行うことで精製した。まず、ガラガラヘビの毒素を 25 mM NaCl Tris-HCl (25 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7.0)、1 mM CaCl₂) buffer に溶かし、CM-Sephadex column を用いて、NaCl 勾配により溶出を行った。各画分より 25 μ l を取り、還元せずに SDS-PAGE を行い、バンドを検出した。銀染色の結果より、110 kDa のバンドを多く含む画分を等量の 25 mM リン酸ナトリウム Buffer (pH 7.0) と混合し、同緩衝液で平衡化した。hydroxyapatite column に添加し、吸着させた。十分洗浄した後、リン酸ナトリウム Buffer の濃度を順次あげることで溶出を行った。各濃度で溶出される画分を還元せずに SDS-PAGE を行い、銀染色を行った。以上の操作より VAP1 は約 110 kDa の単一なバンドとして精製される。この約 110 kDa のバンドを主要に含んでいる画分を、アミコンウルトラ (Amicon Ultra) -15 遠心式フィルターユニットを用いて濃縮して以降の実験を行った。

(3) 脂質代謝阻害剤の細胞処理

カバーガラスを敷き、ゼラチンコートをしたディッシュ上に HUVEC を培養した。細胞の培養液を MCDB 培地に換え、ET180CH3 と compound 48/80 をそれぞれ 1.3 mM と 0.02 mg/ml の濃度で加え、24 時間インキュベートした。ディッシュから培養液を除き、固定液 1 ml を加えた。室温で 30 min 静置した後、PBS で 3 回洗浄した。ファロイジン を 1000 倍希釈、DAPI 2 mg/ml となるようにサポニン溶液で希釈した溶液をのせ、2 時間反応させた。PBS で 3 回洗浄し、カバーガラスの水分を軽く切って 10 %グリセロール in PBS 溶液を 10 ml 滴下し、スライドガラスに乗せ検鏡した。

(4) 細胞の PIP2 抗体での染色

カバーガラスを敷き、ゼラチンコートをしたディッシュ上に HUVEC を培養した。細胞の培養液を MCDB 培地に換え、VAP1 を終濃度 3 mg/ml で加え 17 時間インキュベートした細胞

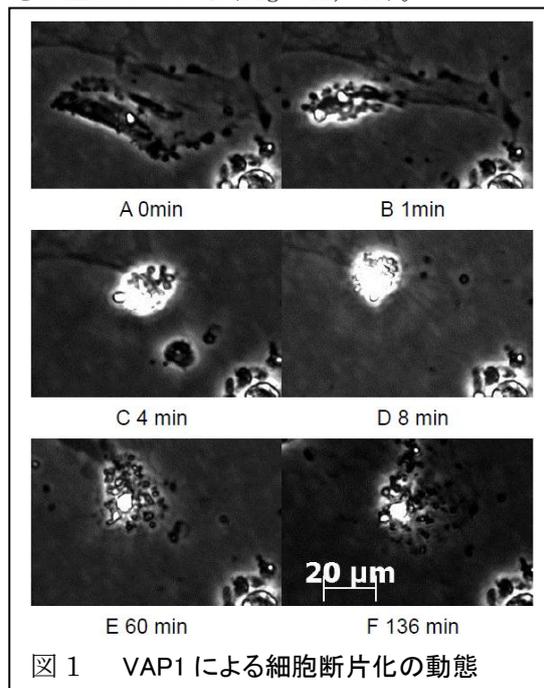
と、コントロールとしてなにも加えず 7 日間インキュベートした細胞を準備した。準備したディッシュから培養液を除き、固定液 1 ml (40 mg パラホルムアルデヒド, 900 ml DW, 3 ml 1N NaOH, 95 °Cで 3 min, 65 °Cで 10 min インキュベート, 10×PBS を 100 ml 加える) を加えた。室温で 30 min 静置し、PBS で 3 回洗浄した。サポニンブロッキング溶液 (0.1 % サポニン, 0.2 % スキムミルク, PBS) を 2 ml 加え、30 min 静置した。Mouse monoclonal antibody [2C11] to PIP2 をサポニンブロッキング溶液で 20 倍希釈した溶液を乗せ、ディッシュをパラフィルムでシールし、4 °Cで 5 時間反応させた。PBS で 3 回洗浄した後、Alexa fluor 488 goat anti mouse IgM [μ chain] を PBS で 3000 倍希釈した二次抗体溶液を室温で一時間反応させた。PBS で 3 回洗浄し、カバーガラスの水分を軽く切って 10 %グリセロール in PBS 溶液を 10 ml 滴下し、スライドガラスに乗せ検鏡した。

4. 研究成果

(1) VAP1 を添加した血管内皮細胞の細胞断片化の動態

6 cm ディッシュに培養した HUVEC に 3 mg/ml になるように VAP1 を加え、37°Cで 26 時間インキュベートした。その後 37°Cで位相差顕微鏡を用いて 6 時間観察した。

その結果、bleb を出して粒状のアポトーシスを起こしている細胞を観察した。細胞の端から bleb を出し (Fig. 1B)、その次に細胞全体が粒状になって bleb を出していた (Fig. 1C, 1D)。bleb が始めてから 45 分後まで bleb は出たり入ったりしているが、その後動きが止まっている (Fig. 1E, 1F)。



(2) 脂質代謝阻害剤による細胞断片化誘導

ET180CH3 を加えた細胞では細胞が断片化して粒状 (fragmented type) になり、死んでいた (Fig. 2 A)。また核が断片化しておりアポトーシスを起こして死んでいることが分かる (Fig. 2 B)。

Compound 48/80 を加えた細胞では細胞が断片化して粒状 (fragmented type) になり、死んでいた (Fig. 2 C)。また核が断片化しておりアポトーシスを起こして死んでいることが分かる (Fig. 2 D)。

血管内皮細胞に粒状 (fragmented type) のアポトーシスを誘導した化合物は ET180CH3 と compound 48/80 であった。この二つの化合物に共通する作用として PI-PLC 阻害活性が考えられた。

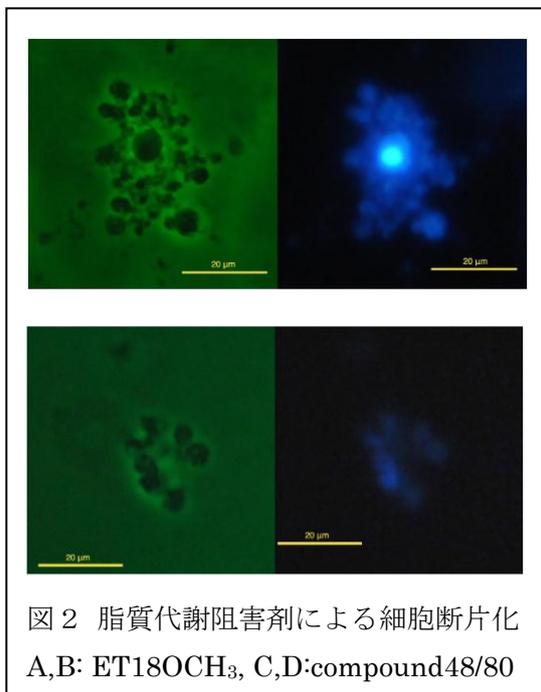


図2 脂質代謝阻害剤による細胞断片化
A,B: ET180CH₃, C,D: compound 48/80

PI-PLC は PIP₂ を inositol 1,4,5 phosphate (IP₃) と diacyl glycerol (DAG) に分解する酵素で

あるので、PI の脂質代謝に関係する分子として PIP₂ の局在性と量的変化を検討した。

(3) アポトーシスを起こした血管内皮細胞の PIP₂ 抗体染色

VAP1 を加えてアポトーシスを誘導した細胞においても、GF 飢餓によりアポトーシスを誘導した細胞においても、bleb を出している細胞においては PIP₂ に由来する蛍光強度が増加していた (Fig. 3A, B)。

一方、GF 飢餓によるアポトーシスによって球状 (rounding type) になって死んでいる細胞では蛍光強度が弱くなった (Fig. 3C, D)。

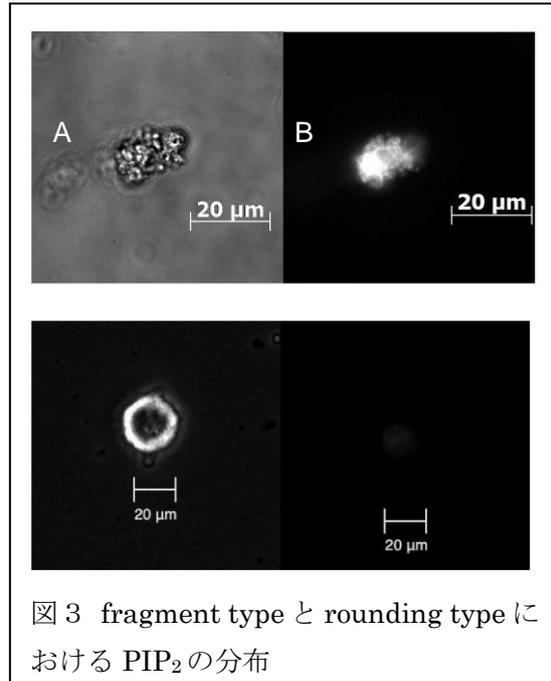


図3 fragment type と rounding type における PIP₂ の分布

PIP₂ の蛍光染色から bleb を出している間はいずれのタイプのアポトーシスでも PIP₂ の量が多いが、球状になってアポトーシスを起こしている細胞では PIP₂ の量が減少することが考えられる。この結果と粒状のアポトーシスを起こす化合物の共通点から、アポトーシスにおいて bleb が引き込まれて細胞が球状 (rounding type) になるためには、PIP₂ の分解が必要である可能性が考えられた。

(4) 血管内皮細胞以外の細胞における細胞断片化制御

血管内皮細胞で上記のように初めて見つかった細胞断片化の制御機構が、一般性があるかどうかの実験を行った。他の細胞として、細胞断片化しない HeLa 細胞等、また細胞断片化する COS 細胞等を用い、細胞死に際して制御信号の様子を見た。その結果、血管内皮細胞以外でも、細胞断片化しない細胞死および細胞断片化した細胞で、制御分子の動態が血管内皮細胞の場合と同じであった。

他方、制御信号の分解を阻害する阻害剤によって、細胞断片化しない細胞に、細胞断片化を誘導することができた。

これにより、血管内皮細胞以外の細胞においても一般的に、この制御信号が細胞断片化を制御していることが分かった。

(5) 細胞断片化の制御仮説

アポトーシスを起こした細胞が粒状 (fragmented type) になるか球状 (rounding type) になるかは、細胞の種類によって決まっているという報告がある (10, 11) が、血管内

皮細胞におけるこの二つの実験結果はアポトーシスにおいて細胞が球状になるか粒状になるかの決定に PIP2 の分解が深く関わっているという新しい可能性を示唆している。今後 PIP2 抗体でのドットプロットや、PIP2 の分解によってできた脂質セカンドメッセンジャーによるシグナルなどを調査していく必要がある。

PI-PLC 阻害剤によるアポトーシスが VAP1 によるアポトーシスと形態的に類似していることに加えて、VAP1 により粒状 (fragmented type) のアポトーシスを起こした細胞では PIP2 の量が増加していたことから、VAP1 の細胞に対する作用機構として PI-PLC やそれに関連する脂質代謝経路への関与が考えられる。

VAP1 の細胞に対する作用機構は不明な点が多く、VAP1 が PI の脂質代謝に関わっているということは全く新しい知見であり、これが VAP1 のみならず ADAM ファミリータンパク質全般の作用機構の解明の足がかりとなるかもしれない。

細胞死において細胞断片化を起こすか否かは、生体の細胞代謝機構の中ではっきりと区別されている¹²⁾。この制御分子の一つが特定されたことは、細胞代謝に関する病態を示す疾患への薬剤の開発に繋がる可能性がある。

参考文献

- 1) Araki S, Ishida T, Yamamoto T, Kaji K, Hayashi H. Induction of apoptosis by hemorrhagic snake venom in vascular endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 190 : 148-153, 1993
- 2) Masuda S, Araki S, Kaji K, Hayashi H. Purification of a vascular apoptosis-inducing factor from hemorrhagic snake venom. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 235: 59-63, 1997
- 3) Araki S, Simada Y, Kaji K, Hayashi H. Role of protein kinase C in the inhibition by fibroblast growth factor of apoptosis in serum-depleted endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 172(3) 1081-1085, 1990
- 4) D Li, B Yang, J L Mehta. Ox-LDL induces apoptosis in human coronary artery endothelial cells: role of PKC, PTK, bcl-2, and Fas. *Am. J. Physiol.* 275 pp. H568-H576, 1998
- 5) Bovellan M, Fritzsche M, Stevens C, Charras G. Death-associated protein kinase (DAPK) and signal transduction: blebbing in

programmed cell death. *FEBS J.* 277(1): 58-65, 2010, Epub 2009 Oct 30. Review.

6) Coleman M L, Sahai E A, Yeo M, Bosch M, Dewar A, Olson M F. Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK I. *Nat. Cell Biol.* 3: 339-345, 2001

7) Jaffe E A, Nachan R L, Becher C G, Minick R C. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin. Invest.* 52: 2745-2756, 1973

8) Lobb R R, Fett J W. Purification of two distinct growth factors from bovine neural tissue by heparin affinity chromatography. *Biochemistry.* 23: 6295-6299, 1984

9) Suh P G, Park J I, Manzoli L, Cocco L, Peak J C, Katan M, Fukami K, Kataoka T, Yun S, Ryu S H. Multiple roles of phosphoinositide-specific phospholipase C isozymes. *BMB Rep* 41(6): 415-434, 2008

10) Orlando KA, Stone NL, Pittman RN. Rho kinase regulates fragmentation and phagocytosis of apoptotic cells. *Exp Cell Res.* 312(1): 5-15, 2006 Jan. Epub 2005

11) Moss DK, Betin VM, Malesinski SD, Lane JD A novel role for microtubules in apoptotic chromatin dynamics and cellular fragmentation. *J Cell Sci.* 119(Pt 11):2362-74,2006

12) Yamaguchi Y, Shinotsuka N, Nonomura K, Takemoto K, Kuida K, Yosida H, Miura M. Live imaging of apoptosis in a novel transgenic mouse highlights its role in neural tube closure. *J. Cell Biol.* 195:1047-1060, 2011

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 2 件)

- ① 荒木聡彦、Vascular Apoptosis-Inducing Protein 1、Handbook of Proteolytic Enzymes、査読無、vol.1、2013、1036-1038
DOI: 10.1016/B978-0-12-382219-2.00228-3
- ② 長谷真、三浦嘉子、三浦沙紀、柳井望、吉野由有、荒木聡彦、Effects of minerals and trace elements on apoptosis and necrosis of human vascular endothelial cells、別府大学短期大学部紀要、査読有、2012、第 31 号、

1-8

<http://repo.beppu-u.ac.jp/modules/xoonips/detail.php?id=tk03101>

〔学会発表〕（計 5 件）

- ①鈴木雄士、松本佳央里、澤田均、荒木聡彦、出血性ヘビ毒素 VAP1,VAP2 の切断部位特異性の解析、第 5 7 回トキシシンポジウム、2011 年 7 月 6 日、滋賀
- ②大島康徳、菊島英一、中村詩帆、澤田均、林博司、荒木聡彦、ADAM 型出血性ヘビ毒素の新しい機能、第 5 8 回トキシシンポジウム、2012 年 7 月 7 日、東京
- ③荒木聡彦、出血性 ADAM プロテアーゼの作用と構造、平成 2 4 年度日本生化学会九州支部例会、2012 年 5 月 29 日、福岡
- ④瀬尾忠彦、加治和彦、澤田均、荒木聡彦、蛇毒 ADAM による細胞死形態の制御の分子機構、トキシシンポジウム、2012 年 8 月 30 日、帯広
- ⑤ Tadahiko Seo、Kazuhiko Kaji、Hitoshi Sawada、Satohiko Araki、Molecular mechanism of regulation of apoptosis morphology by snake venom ADAM. 第 35 回日本分子生物学会年会、2012 年 12 月 11 日、福岡

〔産業財産権〕

○出願状況（計 1 件）

名称：ADAM 作用阻害物質のスクリーニング方法、仮足の保存方法、仮足保持剤、仮足の制御物質のスクリーニング方法、及び ADAM 作用阻害剤

発明者：荒木聡彦

権利者：名古屋大学

種類：特願

番号：2011-099107

出願年月日：2011 年 4 月 28 日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

荒木 聡彦 (ARAKI SATOHIKO)

名古屋大学・大学院理学研究科・講師

研究者番号：80242808

(2) 研究分担者

澤田 均 (SAWADA HITOSHI)

名古屋大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号：60158946

