

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 10 日現在

機関番号：34104

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22590091

研究課題名（和文） タンパク性制御因子の動態解析による酸化ストレス誘導神経細胞死機構の解明

研究課題名（英文） Study on some proteins controlling cell death in oxidative stress-induced neuronal cell death.

研究代表者

樋口 善博 (HIGUCHI YOSHIHIRO)

鈴鹿医療科学大学・薬学部・教授

研究者番号：10019630

研究成果の概要（和文）：

幾つかの神経疾患，例えば，パーキンソン病，虚血性脳疾患では，酸化ストレスが引き金となって脳神経細胞のアポトーシスが誘導されて発症する機構が提唱されている。培養グリア（ラットグリオーマ）細胞にグルタミン酸を添加することで細胞内グルタチオン（GSH）を枯渇させ細胞死を誘導する。C6 ラットグリオーマ神経系細胞を用いた本研究の実験系では，グルタミン酸によって起こる酸化ストレス誘導細胞死でプロテインキナーゼCの機能を分子レベルで調べそのサブタイプ種，さらにこの細胞死誘導に関与するタンパク性因子をディファレンシャル二次元電気泳動法により検討した。プロテインキナーゼCのサブタイプである分子量 75,000 の δ が関与していた。数倍量に誘導発現される Glucose regulated protein-78 (GRP-78), Galectin-1, および Annexin A5 が関与していることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：

We have reported that glutamate exerts cytotoxic action through inhibition of cystine uptake, which leads to a marked decrease in cellular glutathione (GSH) levels exposing the cells to oxidative stresses leading to cell death. This cell death seemed to be apoptosis accompanying with 1–2Mbp giant DNA fragmentation led to internucleosomal DNA fragmentation. We expand on recent studies of intracellular proteins by examining the cell death regulating proteins or factors by using two-dimensional differential in-gel electrophoresis (2D-DIGE) in the intracellular peptides from cell extracts of C6 rat glioma cells. We identified a protein kinase C- δ as one of protein kinases involved in the glutamate-induced cell death, and furthermore, identified 3 peptides derived from 10 proteins with LC-MS/MS in the glutamate-treated cells. Three peptides such as 78-kDa glucose-regulated protein (GRP78), annexin -A5 and galectin-1 were increased in glutamate -treated glioma cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
2012 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野： 薬学

科研費の分科・細目：薬理学

キーワード：グルタミン酸，細胞死，アポトーシス，プロテオミクス

1. 研究開始当初の背景

幾つかの神経疾患，例えば，パーキンソン病，虚血性脳疾患では，酸化ストレスが引き金となって脳神経細胞のアポトーシスが誘導されて発症する機構が提唱されている。脳梗塞では酸素供給の障害と二次的細胞障害が一体として進行するので酸化ストレスの脳梗塞病態での役割とその制御による臨床治療の可能性がきわめて重要である。脳梗塞のような虚血脳における活性酸素種の中で発生頻度が高いのは superoxide と NO であり，superoxide から派生する ONOO⁻ や OH ラジカルは特に反応性（毒性）が強いとされている。このような活性酸素種による損傷によって脳細胞は，エネルギー代謝障害に陥りはじめ、やがて機能的障害を生じながら生存シグナルと死シグナルとのバランスの中で不可逆性の細胞死に陥ってしまうと考えられている。この間，細胞内では発生した活性酸素，酸素フリーラジカルによりミトコンドリア・ストレスと滑面小胞体ストレス，プロテアソーム・ストレスという3つの酸化ストレスに曝されながら，しだいに細胞死の方向に向かって進んでいくことになる。神経系細胞を用いた本研究の実験系では，グルタミン酸によって起こる酸化ストレスで，いわゆる細胞内グルタチオン (GSH) の枯渇で，または外因性の活性酸素による神経細胞死誘導下で，細胞膜で起こるアラキドン酸代謝を介した脂質過酸化反応の機構では，いずれも抗酸化剤で抑制されることから活性酸素介在の可能性が示唆されており，細胞内活性酸素種に基づく細胞死と考えられている。

2. 研究の目的

様々な原因で誘導されるアポトーシスの過程において caspase により直接プロテインキナーゼ C が切断され，活性部位断片が細胞内に蓄積することが報告されている。特に酸素フリーラジカルによるアポトーシスの際に活性化されるプロテインキナーゼの中でそのタイプはまだ同定されていない。また，例えば，神経系細胞を用いた本研究の実験系では，グルタミン酸によって起こる酸化ストレス誘導細胞死でプロテインキナーゼの機能を分子レベルで解明する為に基質タンパクの同定が重要である。即ち，プロテインキ

ナーゼ C は caspase の下流で活性化し細胞死の進行を促進している。このとき caspase の活性化そのものも抑制されるので，プロテインキナーゼ C は caspase の上流においてもアポトーシスの進行を制御している可能性が示唆されている。プロテインキナーゼ C は細胞の生と死を分けるスイッチの可能性がある。それ故，プロテインキナーゼ C をはじめ，プロテインキナーゼによりリン酸化を受ける特定タンパク質因子の探索，およびその因子の同定を目的とした。

3. 研究の方法

培養グリア(ラットグリオーマ)細胞にグルタミン酸を添加することで細胞内グルタチオン (GSH) を枯渇させ細胞死を誘導する。GSH 枯渇により細胞内に発生しかつ蓄積する活性酸素種とその活性酸素代謝関連酵素の動態を調べる。次に，グルタミン酸による細胞死誘導で，シグナルに関与するプロテインキナーゼ C (PKC) の活性化とそのサブタイプを明らかにし，その其質となるリン酸化タンパク質を二次元電気泳動法を用いたプロテオミクス解析により同定する。次にそのリン酸化タンパク質の cDNA クローニングをし，リン酸化タンパク質遺伝子欠損マウスの作製に取り掛かる。作製した遺伝子欠損ホモマウスを用い，外的酸化ストレスを与え，脳組織における病理学的変化(神経性疾患)を観察する。更に，遺伝子欠損ホモマウス胎児神経系組織より primary culture 細胞を調製し，in vitro でグルタミン酸及び様式の異なる酸化ストレスを掛け細胞死を誘導し，脂質過酸化および染色体 DNA 損傷を引き起こす条件下での個々の細胞死シグナル因子の動態を調べる，

4. 研究成果

培養グリア(ラットグリオーマ)細胞を用い，グルタミン酸により細胞死を誘導させ，その際に発現・関与するプロテインキナーゼ C (PKC) をはじめ，プロテインキナーゼによりリン酸化を受ける特定タンパク質因子の探索を目的として細胞内 PKC 活性の動向を検討した。PKC のサブタイプである PKC- δ が特異的に関与していることが明らかになった。さらに，蛍光色素を用いたディファレンシャ

ル二次元電気泳動法により、数倍量に誘導発現される幾つかのタンパク質の存在が明らかとなった。それらは、LC-MS/MSにより分離同定した結果、Glucose regulated protein-78 (GRP-78), Galectin-1, および Annexin A5 であることが明らかになった。それらのタンパク質因子の細胞内動態をさらに検討している。

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 0 件)

[学会発表] (計 12 件)

① Higuchi, Y., Hashii, M., Tanii, H. and Kohriyama, Y. 16th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology, 2010年7月20日, コペンハーゲン

② 樋口善博、高木圭子、清水宣明、古川絢子、橋井美奈子、二酸化チタンナノ粒子による活性酸素非依存的細胞死誘導、第85回日本薬理学会、平成24年3月15日、京都

③ 樋口善博、古川絢子、橋井美奈子、紫外線照射誘導アポトーシスにおける活性酸素非依存的染色体巨大 DNA 断片化、日本薬学会第131回年会、平成24年3月29日、札幌

④ 古川絢子、樋口善博、島田厚良、興奮毒性による海馬神経細胞死に關与する酸化損傷タンパク質の網羅的解析、日本薬学会第131回年会、平成24年3月29日、札幌

⑤ Higuchi, Y., Hashii, M., Tanii, H. and Koriyama, Y. Reactive oxygen species-independent chromosomal giant DNA fragmentation associated with caspase-mediated apoptosis in ultraviolet-irradiated cells., SFRR-Europe 2011 Meeting, 平成23年9月10日, Istanbul

⑥ Higuchi, Y., Furukawa, A., Oowada, S., Komatsu, M. and Hiramatsu, M., Effect of zonisamide on apoptosis-related factors formed during iron-induced epileptogenesis in rat brain., 14th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry (ICHC 2012), 平成24年8月27日, 京都

⑦ Furukawa, A. Shimada, A. and Higuchi,

Proteomic identification of oxidatively damaged proteins in excitotoxin-induced hippocampal injury, 14th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry (ICHC 2012), 平成24年8月29日, 京都

⑧ Higuchi, Y., Takaki, K., Furukawa, A. and Shimizu, N., TiO₂ particles induces apoptosis associated with chromosomal DNA fragmentation and without ROS production in L1210 leukemia cells., 16th SFRR Biennial Meeting, 平成24年9月8日, ロンドン

⑨ 古川絢子, 柿田明美, 千葉陽一, 武井史郎, 石井さなえ, 河村則子, 細川昌則, 樋口善博, 高橋均, 島田厚良, 内側側頭葉てんかん患者の海馬硬化組織における酸化損傷タンパク質の検出と同定, 日本神経病理学会, 平成24年6月24日, 新潟

⑩ 樋口善博、古川絢子、高木圭子、清水宣明、二酸化チタンナノ粒子による活性酸素を介しない細胞死誘導、日本社会薬学会第31回年会、平成24年9月16日、鈴鹿

⑪ 古川絢子、樋口善博、村田真理子、及川伸二、川西正祐、食品中に含まれる有効成分の安全性評価 その1:カテキン類のDNA損傷性、日本社会薬学会第31回年会、平成24年9月16日、鈴鹿

⑫ 樋口善博、古川絢子、紫外線誘導アポトーシスにおける染色体DNA断片化と細胞内関連因子の動態、フォーラム2012:衛生薬学・環境トキシコロジー、平成24年10月25日、名古屋

[図書] (計0 件)

[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〕
ホームページ等 該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

樋口 善博 (HIGUCHI YOSHIHIRO)
鈴鹿医療科学大学・薬学部・教授
研究者番号：10019630

(2) 研究分担者

井上 純子 (INOUE SUMIKO)
鈴鹿医療科学大学・薬学部・准教授
研究者番号：20378657

橋井美奈子 (HASHI MINAKO)
金沢大学・医学系研究科. 研究員 (講師)
研究者番号：10272957