

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：82101

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390167

研究課題名(和文)ヒ素結合タンパク質のキャラクタリゼーションと生体影響評価への応用

研究課題名(英文)Characterization of arsenic-binding proteins and its application to health effect evaluation.

研究代表者

平野 靖史郎(HIRANO, Seishiro)

独立行政法人国立環境研究所・環境リスク研究センター・室長

研究者番号：20150162

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円、(間接経費) 4,050,000円

研究成果の概要(和文)：ヒ素をセファロースに固定したカラムを用いて、ヒ素に親和性の高いタンパク質を調べた。5価のヒ素には選択的に結合するタンパクは無かったものの、3価のヒ素に対していくつかのタンパク質は強い親和性を示した。次に、promyelocytic leukemia (PML)を発現している細胞より可溶性のタンパクを抽出し、ヒ素結合セファロースカラムを用いて、PMLのヒ素への結合能を調べた。PMLのシステインを多く含むRINGフィンガードメインに、ヒ素が3配位で結合するものと考えられた。ウェスタンブロットや蛍光免疫染色の結果から、ヒ素の曝露によりPMLにSUMO化が起きていることが確認された。

研究成果の概要(英文)：We prepared arsenic-bound sepharoses and investigated arsenic-binding proteins by chromatography using a column packed with the arsenic-bound sepharoses. SDS-PAGE analyses showed no proteins bound to pentavalent arsenic specifically, while several proteins that have specific and high affinity for trivalent arsenic. We prepared promyelocytic leukemia (PML) expressing cells and applied the cytosolic proteins to the arsenic-binding column and the column was eluted with glutathione-containing solution. PML appeared to bind trivalent arsenic by forming ternary complex at RING finger domain of this protein. Western blot and immunofluorescent microscopic analyses suggested that PML were conjugation with small ubiquitin-like modifier proteins (SUMOylation) in response to arsenic exposure. The arsenic-bound sepharose column enabled us to identify proteins which have a high affinity to arsenic using this method.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・衛生学

キーワード：環境中毒 ヒ素 タンパク質

1. 研究開始当初の背景

ヒ素による井戸水・大気の汚染は、特に途上国で大きな環境問題となっており、世界で数千万人も慢性ヒ素中毒患者がいると報告されている。ヒ素は国際ガン研究機構（IARC）においても、クラス1に認定されている発癌物質であるが、中国において3価の無機ヒ素が急性前骨髄性白血病（APL）の治療に有効であることが報告されて以来、APLのみならず、慢性白血病や固形癌にも効果があるという報告が相次いであり、世界においてヒ素の生体作用に関する研究が急速に進められているところである。ヒ素がAPL治療に顕著な効果を示すのは、核内タンパク質である promyelocytic Leukemia (PML) がシステインを多く含む特殊な構造を持つためであると考えられているが、その詳細については明らかにはなっていない。体内に取り込まれた無機ヒ素は、生体内のグルタチオンなどの還元物質で3価となり、その後順次メチル化を受け、モノメチルアルソン酸、次いで主たる代謝物であるジメチルアルシン酸となり主として尿中に排泄される。体内におけるヒ素のメチル化反応は、これまで無機ヒ素の無毒化のための代謝機構と考えられていたが、最近、モノメチルアルソン酸(5価)からジメチルアルシン酸(5価)に代謝される過程で生じる中間体である3価のモノメチルヒ素、即ちモノメチル亜ヒ酸が無機ヒ素より更に低い濃度で毒性を示すこと、また、このモノメチル亜ヒ酸が低濃度でもDNA障害を起こすことから、ヒ素のメチル化は、代謝活性化による毒性の増強あるいは発癌の本質と考えられるようになってきた。申請者を中心とする研究グループでは、高速液体クロマトグラフィーとプラズマ質量分析計やマススペクトロメーターを繋ぎ合わせたヒ素分析システムを用いて、生体試料におけるヒ素の還元反応やヒ素メチル化酵素や小動物を用いたヒ素のメチル化に関する研究に加えて細胞を用いたヒ素の毒性学的研究を進めてきている。これらの一連の研究の中で、3価の有機ヒ素が一部のタンパク質と非常に強く結合することを見出している。

2. 研究の目的

環境汚染物質であり、また前骨髄性白血病の治療薬としても実際に用いられているヒ素化合物と、生体分子との反応性を直接調べることにより、環境毒性学と臨床応用の両面に資することを目的とする。ヒ素反応性タンパク質を包括的に調べ、そのキャラクタリゼーションを行うことにより、生体内におけるヒ素の標的分子と反応機構を明らかにする。これらのタンパク質を同定して、その機能変化を調べることにより、生体内におけるヒ素

の標的分子を明らかにし、ヒ素の毒性発現機構、あるいはヒ素の白血病細胞に対する反応機序を解明する。

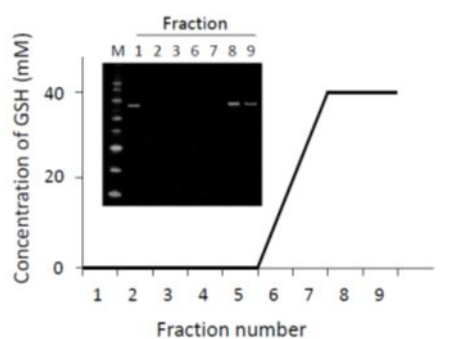
3. 研究の方法

ヒ素化合物をアガロース担体に固定化し、ヒ素アフィニティー用クロマトグラフィーを行うにより、ヒ素反応性のタンパクをハイスループットで分析することを可能とする。ヒ素結合性タンパク質を分離・同定し、一連のヒ素結合タンパク質のキャラクタリゼーションを行う。セファロースなどの担体に、タンパク分子との立体障害を起こさないように長いスペーサーを結合させ、さらにスペーサーの先端の活性化エステルとヒ素化合物であるパラアニサリル酸を反応させて、ヒ素を固定化する。培養細胞を溶解して調製した細胞可溶性画分のタンパク質を用いて、担体に結合したヒ素とアフィニティーの高いタンパク質を分画し、電気泳動法を用いて溶出パターンを調べる。同定されたヒ素結合タンパク質の中で、ヒ素の代謝に関連すると考えられる酵素や、ヒ素との強い結合を示したタンパク質に関して、当該タンパク質のヒ素による誘導、対応する遺伝子導入実験を行い、ヒ素と反応性が高いタンパク質が細胞や組織内でどのような機能を持っているか、また、生体内にヒ素が取り込まれた場合にヒ素がどの分子と反応して毒性を発現するかという点を明らかにする。そのため、PMLをトランスフェクトしたHEK293細胞からタンパク質を抽出して、ヒ素アフィニティー用クロマトグラフィーと電気泳動法により、ヒ素とPMLとの親和性について調べる。これまでに得られた、ヒ素反応性タンパク質の定性的、機能的、定量的情報をもとに、ヒ素化合物が生体内においてどのように作用し、毒性を発現するのかについて調べ、ヒ素の曝露バイオマーカーとなりうるかどうか検討する。

4. 研究成果

ヒ素のアフィニティーカラムを作成し、担体に固定化したヒ素に結合したタンパク質を遊離させる方法を確立した。AKTAシステムを用いて、細胞の可溶性画分のタンパク質のうち、ヒ素に結合能の高いタンパク質をカラムに結合させたのち、40mMのグルタチオン溶液で溶出させた。ヒ素の蛋白への結合は、ヒ素のシステイン残基への求電子反応により起こるものと推定されるが、システインを含むタンパク質の中でも、RINGフィンガー構造を持ち亜ヒ酸の処置により高い治癒率を示す急性前骨髄性白血病の原因物質とも考えられているPMLにも注目して、本タンパク質を過剰発現させた細胞を作製し、ヒ素を曝露した細胞にお

ける PML タンパク質へのヒ素の結合を調べた。



Elution profile of PML on As^{3+} -sepharose column by glutathione (GSH).

上に示した図は、PML を発現した HEK 細胞より抽出した蛋白を、ヒ素を結合した HiTrap カラムを用いて PML のカラムへの結合とグルタチオンによる流出パターンを示したグラフである。

各フラクションは溶出液を限外濾過膜で濃縮した後、電気泳動を行い、ウェスタンブロット後 anti-PML 抗体を用いて、ヒ素結合カラムからの PML 溶出プロファイルを確認したものである。PML はヒ素結合カラムに結合した後、過剰のグルタチオンにより溶出されていたことが明らかとなった。一方、PML タンパク質を多く発現した細胞を 0.1-30 μM の亜ヒ酸に曝露し、PML の細胞内存在形態を蛍光免疫染色法を用いて調べるとともに、ウェスタンブロット法を用いて、PML 蛋白の修飾について調べた。PML はヒ素と結合した後に、不溶性が高まり、また SUMO 蛋白により修飾を受けていることが分かった。

これまで、ヒ素を投与した動物、あるいはヒ素を培地に添加した培養細胞においてヒ素の影響を捉えるという一般的な毒性学の手法しか用いられることがなかった。本研究においては、ヒ素を担体に固定化し、それを用いてヒ素と反応性が高いタンパクを見出すというユニークな方法で、生体におけるヒ素の毒性発現機構にアプローチできることを示した。メタロイド化合物や固定化が可能な金属元素にも応用することができ、様々な有害あるいは必須元素のメタボロミクスの発展に繋がるものと期待される。

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 8 件)

Takayuki Watanabe and Seishiro Hirano

(2013) Metabolism of Arsenic and Its Toxicological Relevance. Arch. Toxicol. 87:969-979. (査読有)

Kobayashi, Y. and Hirano, S. (2013) The role of glutathione in the metabolism of diphenylarsinic acid in rats. Metallomics 5: 469-478. (査読有)

Takamitsu Miyayama, Yuta Arai, Noriyuki Suzuki and Seishiro Hirano (2013) Mitochondrial Electron Transport is Inhibited by Disappearance of Metallothionein in Human

Bronchial Epithelial Cells Following Exposure to Silver Nitrate. Toxicology 305:20-29. (査読有)

Seishiro Hirano, Takayuki Watanabe, and Yayoi Kobayashi (2013) Effects of arsenic on modification of promyelocytic leukemia (PML): PML responds to low levels of arsenite. Toxicol. Appl. Pharmacol., 273(3):590-599. (DIO:10.1016/j.taap.2013.10.004). (査読有)

Negishi T, Matsunaga Y, Kobayashi Y, Hirano S, Tashiro T. (2013) Developmental subchronic exposure to diphenylarsinic acid induced increased exploratory behavior, impaired learning behavior, and decreased cerebellar glutathione concentration in rats. Toxicol. Sci. 136(2):478-86. (査読有)

Negishi T, Takahashi M, Matsunaga Y, Hirano S, Tomoko T. (2012) Diphenylarsinic Acid Increased Synthesis and Release of Neuroactive and Vasoactive Peptides in Rat Cerebellar Astrocytes. Journal of Neuropathology and Experimental Neurology. 71:468-479. (査読有)

Takayuki Watanabe, Yuki Ohta, Ayano Mizumura, Yayoi Kobayashi, and Seishiro Hirano (2011) Analysis of arsenic metabolites in HepG2 and AS3MT-transfected cells. Arch. Toxicol. 85:577-588. (査読有)

Yuki Ohta, Noriyuki Suzuki, Yayoi Kobayashi, and Seishiro Hirano (2011) Rapid speciation and

quantification of selenium compounds by HPLC-ICP MS using multiple standards labelled with different isotopes. *Isotopes in Environmental & Health Studies*. 43:330-340. (査読有)

〔学会発表〕(計 11 件)

Kobayashi Y., Hirano S. (2014) Tissue distribution and excretion of arsenic and selenium following co-administration of diphenylarsinic acid and selenite in rats. 53rd SOT Annual Meeting (Phoenix)

平野靖史郎, 小林弥生, 渡辺喬之 (2013) 亜ヒ酸を曝露した細胞におけるPMLタンパク質の核内局在化 第83回日本衛生学会 S207 (金沢)

小林弥生, 平野靖史郎 (2013) 多剤耐性関連タンパク質 2 依存型・非依存型ヒ素の胆汁排泄に及ぼすセレンの影響. フォーラム 2013 衛生薬学・環境トキシコロジー (福岡)

平野靖史郎, 小林弥生, 渡辺喬之, 但野美保子 (2013) 亜ヒ酸にPMLのSUMO化はAREの活性化を介さない. 第19回ヒ素シンポジウム (福岡)

Yayoi Kobayashi, Ayano Mizumura, Ayaka Yamashiro, and Seishiro Hirano (2013) Implication of relationship between arsenic toxicity and arsenic metabolites. *X ISTERH 2013 Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* (Tokyo).

平野靖史郎, 小林弥生, 渡辺喬之, 太田悠葵 (2011) CHO-K1 細胞における亜ヒ酸のマクロピノサイトーシス阻害効果. 第16回ヒ素シンポジウム, (旭川)

Kobayashi Y., Yamashiro A., and Hirano S. (2011) Distribution and biliary excretion of arsenic in rats orally administered with diphenylarsinic acid. 3rd International Symposium on Metallomics. Muenster, Germany

Kobayashi Y., Mizumura A., Yamashiro A., and Hirano S. (2011) Distribution and excretion of arsenicals following a single oral administration of organic arsenic compounds in rats. 4th International IUPAC Symposium for Trace Elements in Food. Aberdeen, UK.

渡辺喬之, 小林弥生, 平野靖史郎 (2012) 多剤耐性タンパク質 MRP2 高発現細胞における細胞内ヒ素代謝・排泄機構の解析 第82回日本衛生学会総会 (京都)

S. Hirano, T. Watanabe, Y. Kobayashi, S. Kanno (2012) Effects of arsenite on macropinocytotic and autophagic activities in CHO-K1 cells. The 4th International Congress on Arsenic in the Environment As2012. (Cairns, Australia)

平野靖史郎, 小林弥生, 渡辺喬之 (2012) PML発現細胞における亜ヒ酸の影響 第18回ヒ素シンポジウム (宮崎, 11月)

〔図書〕(計 1 件)

Hirano, Western blot analysis. *Methods Mol Biol*; 2012;926:87-97, In "Nonotoxicology: Methods and Protocol (Ed. Joshua L. Reineke) Humana Press. (2012)
doi: 10.1007/978-1-62703-002-1_6.

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

平野 靖史郎 (HIRANO Seishiro)
独立行政法人国立環境研究所 環境リスク研究センター 室長
研究者番号: 20150162

(2) 研究分担者

小林 弥生 (KOBAYASHI Yayoi)
独立行政法人国立環境研究所 環境健康研究センター 主任研究員
研究者番号: 00391102