

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 15 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23710253

研究課題名(和文) 過酸化水素・分子状水素のWntシグナル伝達経路に対する作用分子機構研究

研究課題名(英文) Molecular mechanism of H2O2 and H2 on Wnt signaling pathway

研究代表者

大河原 美静 (Ohkawara, Bisei)

名古屋大学・高等研究院(医)・特任講師

研究者番号：80589606

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：過酸化水素(H2O2)は活性酸素の一種である。分子状水素(H2)は、これら活性酸素の効果を打ち消すのではないかと病態モデルマウスで研究されている。しかし、現在までにH2の分子機構は不明である。Wntシグナル伝達経路は様々な生命現象に関連したシグナル伝達経路である。

本研究は、H2O2とH2の分子機構を解明することを目的に、これら処理した細胞におけるWntシグナル伝達経路の活性化状態を検討した。その結果、Wntシグナル伝達経路を制御するH2O2の効果は、H2で処理時間依存的に部分的に打ち消される事がわかった。よって、H2がH2O2依存的と非依存的に細胞に影響を与えていることを示唆している。

研究成果の概要(英文)：Hydrogen peroxide (H2O2) is reactive oxygen species (ROS). Molecular hydrogen (H2) is thought to cancel the ROS effects in disease model mice, however the molecular mechanism of H2 remain elusive. Wnt signaling is involved in several phenomena in vivo.

Here, for the purpose to know the molecular mechanism of H2O2 and H2 effects, we analyzed the Wnt signaling activity in cells treated with these factors. Within cultured cells, H2 partially cancelled H2O2 effects on Wnt signaling in treatment duration-manner. The results suggest that H2 have effects on the signaling pathway both in H2O2-dependent manner and H2O2-independent manner.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

キーワード：過酸化水素 分子状水素 Wntシグナル

1. 研究開始当初の背景

H_2O_2 (過酸化水素) は主にミトコンドリアの電子伝達系において酸素(O_2)を水(H_2O)に還元する際に副次的に生じる $O_2^{\cdot-}$ を経て作られる。 H_2O_2 は反応性が高い活性酸素の一種で、生体内でDNA、脂質、蛋白質と非特異的に反応し障害をする。また、より反応性が高いOH \cdot に変換されることにより細胞毒性を持つことが知られていた。しかし、近年、 H_2O_2 は低濃度では様々な蛋白質のリン酸化状態を変化させることにより細胞の増殖、生存、移動に必須のシグナル伝達因子(セカンドメッセンジャー)であることが報告されてきている。具体的には H_2O_2 はキナーゼ、フォスファターゼのシステイン残基の酸化還元状態を変えることにより酵素活性を制御すると考えられている。

一方、 H_2 (分子状水素)は、 H_2O_2 ならびにOH \cdot を直接消去することにより脳梗塞・パーキンソン病をはじめとする35種類の酸化ストレス関連病態モデル動物に有効であることが報告されつつある。しかし、活性酸素の除去のみでは H_2 の効果を説明ができない病態も多く、作用の分子機構は不明である。

細胞増殖因子が誘導するシグナル伝達経路とは、細胞外の細胞増殖因子の存在が膜受容体から細胞内へ特異的な蛋白質群を介して伝えられる一連の経路のことである。細胞増殖因子Wntは様々な蛋白質が介在する複雑な経路を使い、最終的に遺伝子発現や細胞骨格を制御し、多種類の正常細胞や腫瘍細胞の生存、増殖、移動(浸潤)を制御している。Wntシグナル伝達経路は、進化の過程でその仕組みがよく保存されている基本的なシグナル伝達経路であり、多くのキナーゼ、フォスファターゼが関わっている。

2. 研究の目的

以前に、Funatoら(*Nat Cell Biol* 8: 501, 2006)は、 H_2O_2 がWntシグナル伝達経路のDvlとnucleoredoxin (NRX)の結合を抑制するこ

とによりWntシグナル伝達経路を活性化することを報告した。また、Shinら(*Cellular Signaling* 18: 601, 2006)は、 H_2O_2 がAkt/PKBを介してWntシグナル伝達経路のキナーゼGSK3の活性を抑制し、Wntシグナル伝達経路を負に制御していることを報告した。 H_2O_2 はさらにWntシグナル伝達経路の他の分子を制御している可能性が強く示唆されている。

そこで本研究では、(1) H_2O_2 によるWntシグナル伝達経路の制御に関わる因子を明確にする。(2) 次に、この H_2O_2 のWntシグナル伝達経路への作用に対する H_2 の効果を検証する。(3) 最終的に、どの細胞種で H_2O_2 と H_2 のWntシグナル伝達経路での働きが保存されているのかを調べ、(4) Wntが関連する細胞増殖などの生命現象において H_2O_2 と H_2 がどのように関わっているのかの解明につなげたい。

3. 研究の方法

本研究は、研究目的(1)(2)のために H_2O_2 と H_2 のWntシグナル伝達経路、特にWnt/beta-catenin経路における分子作用機構を調べる。このため、各細胞にTOPFLASHレポータープラスミドを導入し、ルシフェラーゼアッセイを行った。この時、細胞内のシグナル伝達経路の活性化の状態を変化させるため、Wnt-3Aリガンドを分泌する培養細胞(L Wnt-3A, ATCC)の培養上清(Wnt3aCM)や特異的活性分子もしくは阻害分子(LiCl, IWR, Niclosamid, Quercetin)を培養液に添加した(図1)。また、Wnt/beta-cateninの各たんぱく質の動態を検討するため、特異的抗体を用いたウェスタンブロット法や細胞免疫染色などを用いた。研究目的(3)(4)では、様々な株細胞(研究結果を参照)を用いたが、多くはTOPFLASHレポータープラスミドやsiRNAを細胞に導入することが難しかった。そのため、上記と同様に細胞を培養液もしくは阻害分子で処理した後、ウェスタンブロット法や

細胞免疫染色で検討した。さらに引き続き、これらの実験結果の定量性と再現性を確認するため、MetaMorph ソフトウェアを用いて画像解析を行った。

4. 研究成果

(1) 短時間の H_2O_2 は Wnt/beta-catenin シグナル伝達経路を活性化する。しかし、長時間の H_2O_2 は Wnt/beta-catenin シグナル伝達経路を抑制する。

ヒト胎児由来腎臓細胞 HEK293 細胞を用い、レポーターアッセイを行った。Wnt/beta-catenin シグナル伝達経路の活性化状態を検討したところ、細胞毒性を持たない低濃度 H_2O_2 (100 μ M) を 30 分 (30min) 処理するとシグナルは亢進し、3 時間 (3hrs) 処理では変化がなく (図 1 参照)、12 時間以上の処理では逆にシグナルは抑制されることがわかった。この事より、 H_2O_2 は細胞内で多様な役割を持つ事が示唆された。

(1) H_2O_2 は Wnt/beta-catenin シグナル伝達経路を細胞内の因子を介して活性化する。

と同様の実験において H_2O_2 と同時期に Wnt シグナル伝達経路の阻害剤 Quercetin, IWR, Nicrosamide を処理したところ、Quercetin では完全に IWR では部分的に H_2O_2 の効果が抑えられたのに対し、Nicrosamide では全く抑えられなかった (図 1 参照)。Wnt/beta-catenin シグナルにおいて、Quercetin は転写因子の、IWR は細胞内因子の、Nicrosamide は受容体の阻害剤である。この結果から、短時間低濃度の H_2O_2 は転写因子の上流で細胞内の因子を活性化していることが示唆された。また IWR の作用が部分的である事から、細胞内の二つの因子に機能していることも考えられた。

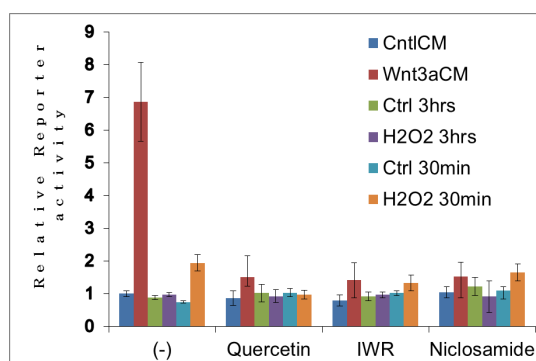


図 1: ATF-2 ルシフェラーゼレポーターの活性

Cntl: Control、Wnt3a: Wnt3a たんぱく質、H2O2: 過酸化水素処理

(2) H_2 は短時間の H_2O_2 処理が活性化する Wnt/beta-catenin シグナル伝達経路を抑制する。

(1) の結果を元に、次に H_2O_2 を 30 分処理する 12 時間前から H_2 を細胞に持続的に処理すると、 H_2O_2 の効果が見られなくなることがわかった。しかし、同時に H_2 と H_2O_2 の両方を 12 時間持続的に処理すると H_2O_2 が抑制する Wnt/beta-catenin シグナル伝達経路には影響しなかった (未発表)。この事から H_2 は短時間低濃度の H_2O_2 の作用を打ち消すという効果を持つ事がわかった。一方で、長時間低濃度の H_2O_2 の作用は打ち消すことはできないことから、 H_2O_2 への効果以外の別の効果を持つ事が予想された。

(3) 上記で示した H_2 の役割は、L 細胞や HeLa 細胞など由来が異なる細胞に共通している。 H_2 の効果が細胞種、動物種を超えて保存されているかについて、マウス線維芽細胞 L 細胞、神経細胞 Neuro2a、マウス筋肉細胞 C_2C_{12} を用い beta-catenin タンパク質の細胞内での局在を検討した所、 H_2 は様々な細胞種において細胞内 (核内も含む) の beta-catenin 量を減少させていることがわかった。この事から、 H_2 は Wnt/beta-catenin シグナル伝達経路を負に制御していることがわかった (未発表)。

(4) H_2 は生体内の生命現象に関わる多数の酵

素の活性化に関与している可能性がある。

本研究から H₂ は多くのキナーゼ、フォスファターゼが関わっている Wnt/beta-catenin シグナル伝達経路を負に制御することがわかった。近年の報告からも H₂ はキナーゼなど細胞内の酵素に作用することが示唆されている。そこで Wnt シグナル伝達経路に関わるキナーゼの活性を in vitro で解析したところ、多数の酵素の作用を制御していることがわかった。

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 7 件)

Ohkawara B, Cabrera-Serrano M, Nakata T, Milone M, Asai N, Ito K, Ito M, Masuda A, Ito Y, Engel AG, Ohno K., LRP4 third -propeller domain mutations cause novel congenital myasthenia by compromising agrin-mediated MuSK signaling in a position-specific manner., Hum Mol Genet., 査読有, Apr 1;23(7), 2014, 1856-68. doi: 10.1093/hmg/ddt578.

Takamatsu A, Ohkawara B, Ito M, Masuda A, Sakai T, Ishiguro N, Ohno K., Verapamil Protects against Cartilage Degradation in Osteoarthritis by Inhibiting Wnt/ -Catenin Signaling., PLoS One., 査読有, Mar 21;9(3), 2014, e92699 doi: 10.1371/journal.pone.0092699.

Cruciat CM, Dolde C, de Groot RE, Ohkawara B, Reinhard C, Korswagen HC, Niehrs C., RNA helicase DDX3 is regulatory subunit of casein kinase 1 in Wnt-beta-catenin signaling., Science, 査読有, Mar22; 339(6126), 2013, 1436-41, doi: 10.1126/science.1231499.

Ohkawara B, Niehrs C., An ATF2-based luciferase reporter to monitor non-canonical Wnt signaling in Xenopus embryos., Dev Dyn. 査読有, Jan; 240(1), 2011, 188-94, doi: 10.1002/dvdy.22500.

〔学会発表〕(計 2 件)

大河原美静, Macarena Cabrera-Serrano, 中田智彦, Margherita Milone, 浅井信之, 伊藤康友, Andrew G.Engel, 大野欽司, Mutations in LRP4 in congenital myasthenia reveal position-specific regulations of agrin and Wnt signaling of LRP4, SFN2013 (Society for Neuroscience Meeting), 平成 25 年 11 月 13 日(水) アメリカ、サンディエゴ、サンディエゴコンベンションセンター

中島宏彰, 大河原美静, 石黒直樹, 大野欽司 R-spondin2 is crucial for neuromuscular junction formation, SFN2013 (Society for Neuroscience Meeting), 平成 25 年 11 月 13 日(水) アメリカ、サンディエゴ、サンディエゴコンベンションセンター

〔図書〕(計 1 件)

Ohkawara Bisei, Cristina-Maria Cruciat, Christine Dolde, and Christof Niehrs, American Association for the Advancement of Science (AAAS), Japanese Scientists in *Science* 2013 サイエンス誌に載った日本人研究者、2014、p27-p27

6. 研究組織

(1)研究代表者

大河原 美静 (OHKAWARA, Bisei)
名古屋大学 医学系研究科・特任助教
研究者番号: 80589606

(2)研究分担者

なし ()