

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25340051

研究課題名(和文)有害重金属の毒性発現に関与する細胞内タンパク凝集体の研究

研究課題名(英文) Study of cellular protein aggregates involved in the expression of harmful heavy metal toxicity.

研究代表者

高田 耕司 (TAKADA, KOJI)

東京慈恵会医科大学・医学部・教授

研究者番号：30179452

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：有害重金属の毒性発現に関連した細胞内タンパク凝集体の性状と意義を解明するため、凝集成分の解析では、細胞抽出用緩衝液の組成を見直すことで凝集タンパク分画の純度を改善した。また、高分解能HPLC/Q-TOFによるショットガン解析を軸とする手法を導入し、凝集成分の同定を進めた。タンパク凝集の形成機序に関しては、安定同位体含有アミノ酸を用いた培養細胞の代謝標識実験を導入し、時間軸の観点から現象を分析した。この他、難溶性ポリユビキチン化タンパク質を指標としたタンパク凝集評価系の実験操作を改善し、効率的な手法によってヒト上皮系細胞に対する有害重金属の作用を検証・分析した。

研究成果の概要(英文)：To elucidate properties and significance of intracellular protein aggregates related to cytotoxicity of harmful heavy metals, in the analysis of aggregated components, we improved the purity of the aggregated protein fraction by reviewing the composition of cell extraction buffers. In addition, identification of aggregated components was carried out by a method based on shotgun analysis using high-resolution HPLC / Q-TOF. To study the formation mechanism of protein aggregation, we introduced the cell culture experiments using stable isotope-containing amino acids, and analyzed it in a time-dependent manner. Additionally, we improved the method of evaluation system of the protein aggregation using the hardly soluble polyubiquitinated proteins as an indication of cellular protein aggregation, and by this efficient method we verified and analyzed the effect of heavy metals on human epithelial cells.

研究分野：生化学・細胞生物学

キーワード：有害重金属 タンパク質 カドミウム メチル水銀 タンパク凝集体 ユビキチン ポリユビキチン ユビキチン化

1. 研究開始当初の背景

化学物質の毒性は、通常、実験動物に対する半数致死量や臓器・組織に対する最終的な影響等の一般毒性で評価され、有害性の機序は通常問われない。米国環境保護庁 (EPA) は、化学物質の毒性評価の戦略的計画として分子生物学やゲノミクス等を活用した包括統合的な『毒性経路に基づくリスク評価系』の目標を 2009 年に掲げた。その後、EPA、米国国立衛生研究所 (NIH)、米国食品医薬品局 (FDA) の 3 機関は、Tox21 と呼ばれる共同プロジェクトを展開し、培養細胞に対する化学物質の影響を各種指標で総合的に解析する「新たな毒性評価」の確立を志向している。このような動向は、動物毒性試験の削減につながるとともに、毒性の発現機序の理解に役立つため、今後の進展が期待される。このような背景から、培養細胞を活用した各種化学物質の毒性研究は、新時代を迎えつつあるといえよう。我々はこれまで、ヒト組織由来の株化細胞に対するカドミウム (Cd) などの有害重金属の曝露によって、高度にユビキチン化された難溶性タンパク質からなるタンパク凝集体が形成されることを見出してきた。本研究では、このタンパク凝集体の性状を解析するとともに、細胞毒性との関連性について実証的に調査する。

細胞から個体に至るまで、大半の生命現象はタンパク質によって直接的に駆動される。酵素、転写調節因子、受容体等、各タンパク質が担う機能は多岐に渡るが、このようなタンパク質の個性は、アミノ酸配列によって規定される「高次構造」によるものである。一方、様々な有機分子がひしめき合う細胞内は、タンパク質の高次構造形成や形成後の構造維持において、理想的な環境ではなく、不適切なフォールディングや構造異常化による変性さらには変性タンパク質が集積することによる凝集のリスクを抱えている。このようなリスクと関連した疾患が、アルツハイマー病、パーキンソン病、プリオン病といった神経変性疾患であり、各々において特有のタンパク凝集体が細胞内に蓄積し、神経細胞死をもたらされる。一方、ヒトを含む真核生物の細胞は、構造が異常化したタンパク質に結合して凝集を防ぎ再生に導く各種シャペロンタンパク質をもつ。また、シャペロンに認識された異常タンパク質は、状況によってユビキチン-プロテアソームシステム (UPS) に引き渡され、一連の酵素反応によって、複数のユビキチンが続けて付加されてユビキチン化される。するとプロテアソームはこのユビキチン鎖を認識して基質タンパク質を分解し、異常タンパク質を排除する。

重金属の細胞毒性と UPS には深い関係がある。すなわち、Jentsch のグループは、酵母を用いて UPS が Cd 耐性に不可欠であることを証明し、Cd 曝露で生じた異常タンパク質が毒性発現に関与し、UPS はそれを処理することで解毒を担う可能性を報告した (Nature

361: 369-371, 1993)。その後、我々を含む研究者により、哺乳類由来の細胞においても同様の現象が見い出され、細胞毒性の発現過程において細胞内タンパク質の一部が凝集およびユビキチン化されて蓄積することも明らかとなった。さらに我々は、様々な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・分画・精製・同定を目的とした複数の実験手技を開発してきた (Eur J Biochem 233:42-47, 1995; Biochem J 356:199-206, 2001)。また、その過程で各種ストレスによるユビキチン含有タンパク凝集体の蓄積現象を見出してきた (Brain Res 620:171-173, 1993; J Cereb Blood Flow Metab 19:750-756, 1999)。このような研究の経緯を踏まえ、本研究では、有害重金属の曝露によって出現する細胞内タンパク凝集体の含有成分を分析する。また、その性状と形成機序の知見を集積し、細胞毒性との関連性を探索する。

2. 研究の目的

これまでの研究から我々は、モデル細胞への Cd 曝露で出現するタンパク凝集体は難溶性ユビキチン化タンパク質を含有することを見出し、この分画・精製・成分分析を進めてきた。しかし、現在の方法では膜タンパク質を中心とした難溶性の未変性タンパク質が凝集体画分に混入するため、分析標品の純度に問題があった。そこで抽出用緩衝液の組成を変更するための検討が必要である。

凝集体を構成するタンパク質成分の同定は、変性・凝集の機序を解明する上できわめて重要な情報である。また、その機序には様々な細胞内環境が影響するため、各種条件下での同定解析を繰り返す必要がある。これまで我々は NanoFrontier eLD (Hitachi) を用いた LC-MS/MS 解析を実施してきたが、利用環境の問題から再現性の確認が不十分だった。そこで継続的な分析が可能な実験環境の構築が求められる。

有害重金属の曝露による凝集体形成には、12~24 時間の時間経過が必要である。そのため、形成機序の解明には、曝露下における経時的な分析が必要である。そこで安定同位体含有アミノ酸を用いた培養細胞の代謝標識法 SILAC (stable isotope labeling with amino acids in cell culture) を活用した解析の導入が必要である。

ヒト腎近位尿細管由来 HK-2 細胞を用いた我々のこれまでの検討では、通常の培養条件下 Cd 48 時間曝露において、ミトコンドリア内酵素の活性を指標する細胞生存アッセイ (WST-1 法) で求めた Cd の 50% 半数影響濃度 (EC₅₀) は約 70 μM である。しかし、この値は他の類似した方法による報告よりも高値であるため、その妥当性を培養条件の比較と直接的な細胞死評価法の導入によって検証しなければならない。

これまでの研究で我々は凝集体形成の指標として、難溶性ユビキチン化タンパク質（ポリユビキチン）の定量解析を用いてきた。この方法は、細胞内タンパク質の変性・凝集現象の比較検討に有用であるが、実施の際には、「培養細胞への被験物質の曝露実験」とその後の「細胞抽出、分画、ELISA」の各操作において試料を各専用容器に移し換えるなど操作が煩雑で時間もかかる。今後、この方法を様々な化学物質の毒性研究に広く利用して頂くためには、一連の実験操作を見直し、定量解析系全体の効率化・標準化が必要である。

3. 研究の方法

(1) 凝集体分画法の改変

通常の培養条件下でHK-2細胞を0~280 μM Cdに24時間曝露させた。その後、細胞を回収し、1% Triton X-100含有緩衝液中で超音波処理することで膜タンパク質を可溶化した。次いで遠心分離によって、上清のTriton可溶性画分と沈殿のTriton不溶性画分に分離し、後者はさらに2% SDS含有緩衝液を用いて可溶化し、Triton不溶性の難溶性タンパク質画分として回収した。その後、前処理を経て、各試料のポリユビキチン量をELISA (Eur J Biochem 233:42-7, 1995)を用いて測定した。

(2) 質量分析による構成成分の同定

研究開始時から使用してきた早稲田大学のLC-MS/MS (NanoFrontier eLD)に加えて東京慈恵会医科大学・総合医科学研究センターに設置されたHPLC/UHR-ESI-Q-TOFシステム (Maxis 3G, Bruker)を用いたショットガン解析および安定同位体ピーク比の解析を実施した。

(3) SILACを用いた凝集体形成機序の解析

SILAC法のプロトコールに準じてHK-2細胞を¹³C含有アミノ酸(¹³C-Arg, ¹³C-Lys)含有培地で一定時間培養し、新規合成タンパク質に安定同位体¹³Cを取り込ませてから、半致死的なEC₅₀相当のCdに12時間または24時間曝露後、細胞を回収した。次いで1% Triton X-100含有緩衝液を用いた上述の方法で細胞を抽出・分画し、Triton可溶性および不溶性の各画分を調製した。次いで元素分析/同位体比質量分析計を用いて、各画分の¹³C/¹²C比を分析した。

(4) Cd曝露による細胞死の検証

CdのHK-2細胞に対する毒性評価において、他の報告では培地中の牛胎児血清(FBS)濃度が低い傾向が認められるため、FBS濃度が細胞毒性に及ぼす影響を検討した。すなわち、10, 5および0.1%のFBS含有培地を用いた培養条件下において、HK-2細胞に対するCdの細胞毒性をWST-1法で評価した。

WST-1法で求めたEC₅₀が本当に細胞死を反映したものであるかを検証するため、48時間のCd曝露後のHK-2細胞をトリプシン処理により培養容器から回収して試験管に移し、死

細胞に取り込まれる核酸染色色素PI (propidium iodide)と蛍光顕微鏡を用いて直接死細胞を計数した。

(5) 凝集タンパク成分の定量解析の効率化

有害重金属などの化学物質の曝露による細胞内タンパク凝集体の定量解析は、培養細胞への曝露実験、細胞の回収、抽出、分画、凝集タンパク成分の測定といった3段階で構成される。そこで96穴マイクロプレートを用いての実験を行い、次に培地除去後、同プレートと専用遠心機を用いての抽出と分画を迅速に進め、の測定に用いる試料を効率的に調製した。

4. 研究成果

(1) 凝集体分画法の改変

24時間のCd曝露後に回収したHK-2細胞からTriton可溶性画分とTriton不溶性画分を調製し、ポリユビキチン(ユビキチン化タンパク質)を定量したところ、半致死的なCd曝露によって誘導されるポリユビキチン量の増加は後者(Triton不溶性画分)においてのみ認められた(図1)。この結果から、膜タンパク質を可溶化するTritonの添加は難溶性ユビキチン化タンパク質の分画・回収に影響を与えず、凝集体タンパク画分の純度の改善に有用である。

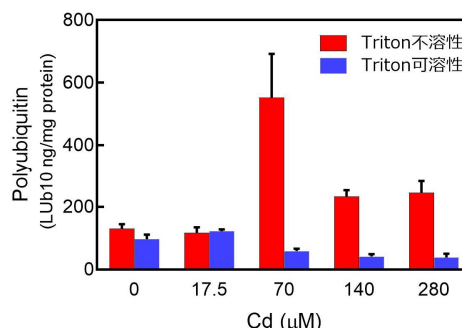


図1 Triton X-100含有抽出液を用いたタンパク質分画法の検証。

(2) 質量分析による構成成分の同定

Maxis 3Gを用いたLC-MS/MSのショットガン解析によって、HK-2細胞に対するCd曝露によって不溶化する複数のタンパク質候補が同定された。また、これら候補分子の構成は、曝露時間に依存して変化する傾向が認められた。これらの分子が変性・凝集に至る経路と細胞毒性との因果関係が今後の研究課題である。

(3) SILACを用いた凝集体形成機序の解析

HK2細胞に対する12時間の半致死性Cd曝露では、標識時間の長短にかかわらず、Triton可溶性および不溶性の両画分の¹³C/¹²C比に有意差を認めなかった(図2)。この安定同位体比は¹³C含有アミノ酸を取り込んだ新生タンパク質の量を反映するため、この曝露条件で変性・凝集するタンパク質は、Triton可溶性の未変性タンパク質と同程度の割合

で新生タンパク質を含むと推定される。一方、24 時間の曝露では、Triton 不溶性画分の $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ 比の方が Triton 可溶性画分のものよりも有意に低値を示した (図 2)。

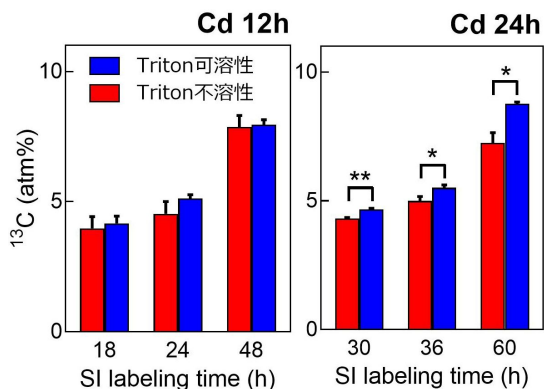


図 2 安定同位体含有アミノ酸を用いた検討：各タンパク質画分の代謝標識率。

これらの結果から、Cd 曝露時間の延長に伴い、新生タンパク質よりも既存の細胞内タンパク質の変性・凝集傾向が強まることが示唆された。

(4) Cd 曝露による細胞死の検証

培地中の FBS 濃度を通常使用する 10% から 5% および 0.1% まで減少させたところ、HK-2 細胞の Cd 耐性は、FBS 濃度依存性に損なわれ、0.1% FBS 条件下の 48 時間曝露実験での EC_{50} は約 $10 \mu\text{M}$ まで低下した (図 3)。この結果から、血清には Cd 毒性を低減する保護作用が認められた。この結果から、Cd の細胞毒性を培養細胞で評価・検証する場合、FBS の濃度は留意すべき基本条件であることが明確となった。

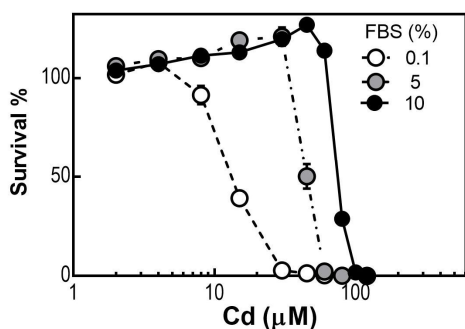


図 3 カドミウムの細胞毒性に対する培地成分 FBS 濃度の影響。

10% FBS 含有培地を用いた一般的な培養条件において、HK-2 細胞に各種濃度の Cd を 48 時間曝露させたところ、PI 染色で検出させる細胞死は $70 \mu\text{M}$ 以上の Cd 曝露で顕著に増加した (図 4)。この結果は、WST-1 法によって見積もられてきた Cd の EC_{50} 値 (約 $70 \mu\text{M}$) と一致しており、従来知見の妥当性が裏づけられた。

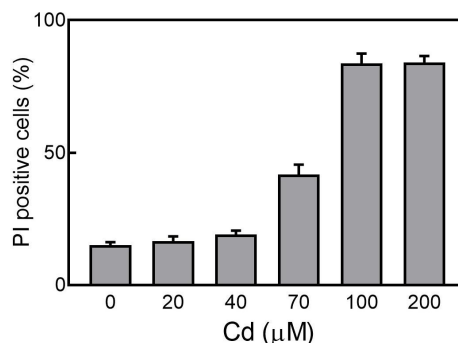


図 4 有害重金属 Cd の細胞毒性：PI 染色による細胞死の評価。

(5) 凝集タンパク成分の定量解析の効率化

有害重金属による細胞内タンパク質の変性・凝集現象の本質を理解するには、様々な化学物質と各種細胞の組合せによるデータの集積が不可欠である。そのため、複雑な一連の実験手技を見直し、96 穴マイクロプレートに播種した細胞を軸とした効率的な定量解析法を確立した。この方法を Cd と HK-2 細胞の組合せで検証したところ、これまでと同様の結果が得られた (データ省略)。そこで新たにヒト網膜色素上皮由来 RPE-1 細胞を用い、Cd とメチル水銀 (MeHg) の作用を検証したところ、両有害重金属は半致死性の曝露濃度域において、Triton 不溶性画分のポリユビキチン化タンパク質を増加させた (図 5)。これらの結果から、Cd とメチル水銀は、これらのヒト上皮系細胞に対して細胞内タンパク質の変性・凝集作用をもつことが明らかとなった。今後、ポリユビキチン測定用 ELISA を含めた実験系全体の効率・迅速化をさらに推し進め、広範な組合せによる分析を展開する計画である。

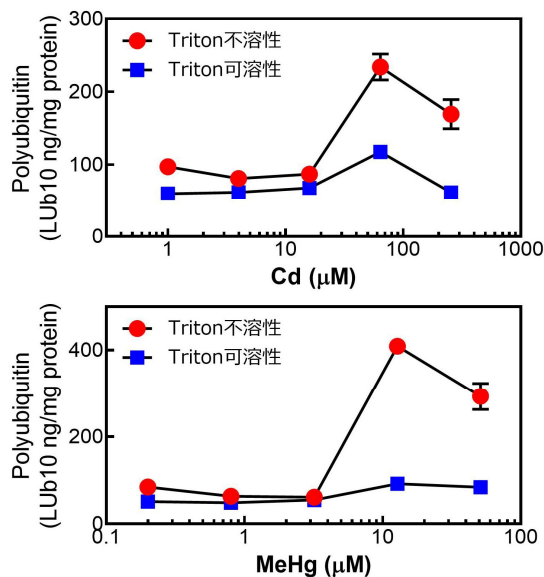


図 5 有害重金属による RPE-1 細胞のタンパク凝集作用：マイクロプレートを用いた効率的評価系での分析。

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5件)

Matsumoto M, Matsuura T, Aoki K, Maehashi H, Iwamoto T, Ohkawa K, Yoshida K, Yanaga K, Takada K. An efficient system for secretory production of fibrinogen using a hepatocellular carcinoma cell line. *Hepatology Research*. 2015; 45: 315-25. (査読有) 10.1111/hepr.12353.

永澤和道, 渡会敦子, 谷合正, 竹島功将, 加藤尚志. プロテオーム解析による比較生物学的ミッシングリンク探索の実際. *比較内分泌学*. 2014; 40: 134-9. (査読無) 10.5983/nl2008jsce.40.134

Matsumoto A, Ishibashi Y, Urashima M, Omura N, Nakada K, Nishikawa K, Shida A, Takada K, Kashiwagi H, Yanaga K. High UBCH10 protein expression as a marker of poor prognosis in esophageal squamous cell carcinoma. *Anticancer Research*. 2014; 34: 955-61. (査読有) <http://ar.iiajournals.org/content/34/2/955.long>

Iwase T, Tajima A, Sugimoto S, Okuda K, Hironaka I, Kamata Y, Takada K, Mizunoe Y. A simple assay for measuring catalase activity: a visual approach. *Scientific Reports*. 2013; 3: 3081 (1-4). (査読有) 10.1038/srep03081

Sugimoto S, Iwamoto T, Takada K, Okuda K, Tajima A, Iwase T, Mizunoe Y. *Staphylococcus epidermidis* Esp degrades specific proteins associated with *Staphylococcus aureus* biofilm formation and host-pathogen interaction. *Journal of Bacteriology* 2013; 195: 1645-55. (査読有) 10.1128/JB.01672-12.

[学会発表](計6件)

高田耕司, 平河多恵. 安定同位体標識アミノ酸を用いたカドミウム誘導性細胞内タンパク凝集の機序解析. 第89回日本生化学会大会, 2016年9月27日, 仙台国際センター(宮城県仙台市).

Yuta Tanizaki, Sumako Kameishi, Kei Sato, Shun Maekawa, Takashi Kato. Insights into the regulation of hematopoiesis through new animal models. *International Meeting on Aquatic Model Organisms for Human Disease and Toxicology Research*. 2016年03月19日. National Institute for Basic Biology, Okazaki, Japan.

高田耕司, 平河多恵. Cd誘導性細胞内タ

ンパク凝集体の形成 - 安定同位体を用いた解析. BMB2015(第38回日本分子生物学会年会、第88回日本生化学会大会 合同大会), 2015年12月2日, 神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市).

Chen Wu, Koji Takada, Katsuhiko Aoki, Kato Takashi, Ebihara Shizufumi.

Interaction of α -tubulin and USP46 in differentiated neuroblastoma cells. BMB2015(第38回日本分子生物学会年会、第88回日本生化学会大会 合同大会). 2015年12月1日. 神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市).

高田耕司, Wu Chen, 青木勝彦, 吉田清嗣, 谷合正光, 渡会敦子, 加藤尚志, 海老原史樹文. 神経芽腫細胞の内因性WDリピートタンパク質とUSP46の相互作用. 第87回日本生化学会大会 2014年10月16日, 京都国際会館(京都府京都市).

松本倫典, 松浦知和, 前橋はるか, 青木勝彦, 矢永勝彦, 大川清, 岩本武夫, 吉田清嗣, 高田耕司. FLC-7細胞の培養系でのフィブリノゲン産生: ラジアルフロー形バイオリアクターを用いた検討. 第86回日本生化学会大会, 2013年9月13日, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市).

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