

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：34104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461565

研究課題名(和文)興奮毒性に应答するシグナル伝達経路の解明とNrf2による細胞死抑制機構の解析

研究課題名(英文)Proteomic identification of oxidatively damaged proteins in excitotoxin-induced cell death

研究代表者

古川 絢子 (Furukawa, Ayako)

鈴鹿医療科学大学・薬学部・助手

研究者番号：10455537

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：アストロサイトは脳内で細胞外グルタミン酸の恒常性を維持しているが、興奮毒性における応答の詳細は不明である。本研究ではC6グリオーマ細胞にグルタミン酸を負荷した実験系を用いて、C6細胞内のグルタチオン量が減少し、小胞体でのタンパク質折り畳みにおいてジスルフィド結合を形成するProtein disulfide isomerase、細胞保護機能を持つMitochondrial heat shock protein 70が酸化損傷を受ける事を明らかにした。GSH減少をきっかけとして生じる細胞保護機能の減弱と小胞体ストレスを改善することで、アストロサイトを正常化し、脳内環境を改善できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：High concentrations of glutamate may exert cytotoxic actions through reactive oxygen species. To identify oxidatively damaged proteins that are involved in glutamate-mediated cell death, we performed proteomic analysis of carbonylated proteins and mass spectrometric analysis in the C6 glioma cells treated with or without glutamate. We have demonstrated that glutamate treatment induces glutathione depletion in C6 rat glioma cells. Two-dimensional gel electrophoresis and western blot analysis revealed that glutamate induced eight oxidatively damaged proteins in C6 glioma cells. Among these 8 protein spots, we successfully identified 4 spots by the analysis of amino acid sequence. These proteins included protein disulfide isomerase, beta-actin and mitochondrial heat shock protein 70. These proteins may be a therapeutic targets for excitotoxin-induced cell death.

研究分野：生化学、神経科学

キーワード：酸化ストレス 興奮毒性 カルボニル化 グリア細胞 プロテオミクス

1. 研究開始当初の背景

てんかんは神経細胞の過剰な興奮によって引き起こされる発作である。過剰な興奮による神経細胞死が認められることから、興奮毒性と呼ばれる。申請者はこれまでに、興奮毒性試薬であるカイニン酸を投与したラットの海馬において、神経細胞死が起きるよりも早い超急性期に強く酸化損傷を受けるタンパク質を明らかにし、酸化ストレスによるタンパク質酸化損傷が興奮毒性による神経細胞死の原因となる可能性を報告した。一方、てんかん原性病巣は神経細胞の異常な興奮が繰り返り起きている部位であり、慢性的な興奮毒性による高い酸化ストレス状態が継続していると考えられることから、慢性的な興奮毒性により細胞の機能が変化している可能性が考えられる。最近の研究では、酸化ストレスに応答するリン酸化や転写因子が報告されている。これらのことから、慢性的な興奮毒性により、特定のタンパク質酸化損傷による機能障害、あるいは酸化ストレスをきっかけとした細胞内情報伝達系の活性化を介して、組織の環境が細胞傷害性に傾くことが考えられる。慢性的な興奮毒性に応答する分子を解明することは、興奮毒性によって作られる局所の組織環境悪化を改善する上で重要であると考えられる。

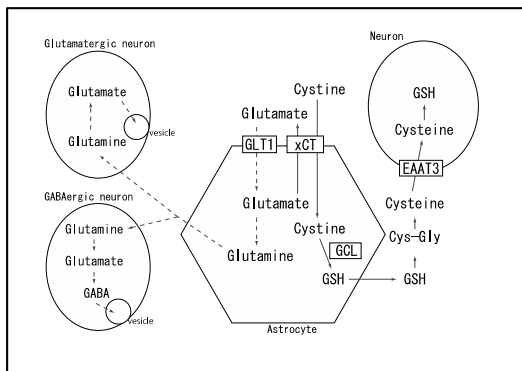


図1 アストロサイトによる細胞外グルタミン酸の取り込みとGSH合成経路

脳内のグルタミン酸濃度は、アストロサイトによって恒常的に保たれている(図1)。アストロサイトは glutamate transporter 1 (GLT1)を介してグルタミン酸を取り込み、グルタミンに変換して神経細胞へと輸送する一方、細胞膜に存在する glutamate/systine antiporter (xCT)を介して細胞内グルタミン酸と交換に細胞外 systine を取り込み、グルタチオン(GSH)を合成する。合成されたGSHは細胞外に放出され、神経細胞に取り込まれ、神経細胞内でのGSH合成に利用される。このようにアストロサイトは、細胞外グルタミン酸の代謝と抗酸化的防御による神経細胞保護の両方を担っている。興奮毒性時のアストロサイトの反応を解

明することは、興奮毒性における局所の環境変化と神経細胞の保護の両者にとって重要である。

2. 研究の目的

本研究では、慢性的な興奮毒性とそれに伴う酸化ストレスによって引き起こされる細胞機能の応答について、タンパク質発現量の増減やリン酸化などの翻訳後修飾、タンパク質の酸化損傷であるカルボニル化を指標として解析し、慢性的な興奮毒性による細胞傷害に寄与するメカニズムを明らかにすることが目的である。

3. 研究の方法

C6 ラットグリオーマ細胞(C6細胞)にグルタミン酸を負荷して、実験に用いた。MTTアッセイにて、生存率を検討した。高速液体クロマトグラフィーを用いて細胞内GSHを定量し、細胞内の酸化ストレス状態を評価した。タンパク質酸化損傷の指標のひとつであるカルボニル化タンパク質の生成を、以下の方法で定量解析した。細胞からタンパク質を抽出し、2,4ジニトロフェニルヒドラジンと反応させ、タンパク質のカルボニル基を標識した。標識部分を特異的に認識する抗体を用いて、スポットプロットを行い、カルボニル化タンパク質の生成を確認した。また、標識したタンパク質を二次元電気泳動した後に抗体を用いてカルボニル化タンパク質を検出することで、個々のタンパク質のカルボニル量を定量解析した。カルボニル化が増加したタンパク質をトリプシン消化し、得られたペプチド混合液をサンプルとして、MALDI-TOF-TOF タンデム質量分析装置を用いて同定した。

4. 研究成果

グルタミン酸を負荷したC6細胞は、グルタミン酸の濃度依存的な生存率の低下が認められた。また、10mMグルタミン酸負荷により時間依存的な生存率の低下が認められ、24時間後の生存率は20%程度であった。細胞内GSH量は、グルタミン酸負荷後3時間から減少が認められ、時間依存的に減少した。タンパク質酸化損傷の指標のひとつであるカルボニル化タンパク質の生成は、グルタミン酸負荷後9時間ごろから増加が認められた。これらの結果から、グルタミン酸負荷により細胞内GSH量が減少して酸化ストレス状態になったことで、タンパク質の酸化損傷が増加したと考えられた。

グルタミン酸負荷後9時間とコントロール細胞を用いて、個々のタンパク質のカルボニル化量を比較定量した。定量解析の結果、グルタミン酸負荷によりカルボニル化が増加したタンパク質が8個認められた(図2)。

この結果から、グルタミン酸負荷により生じた酸化ストレスに対して、特に脆弱なタンパク質が存在する事が明らかになった。

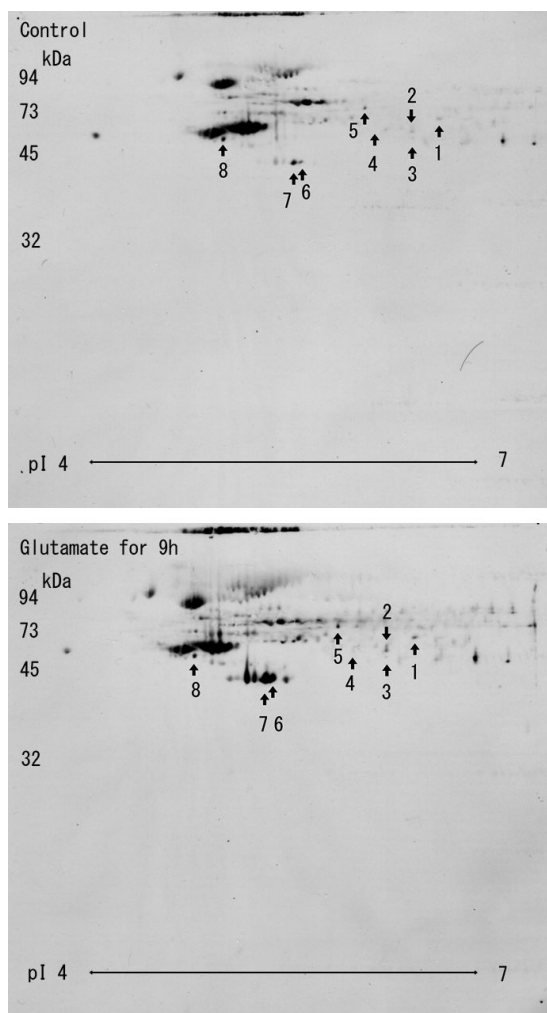


図2 グルタミン酸処理によるカルボニル化タンパク質の生成。図中の番号は、グルタミン酸によりカルボニル化が増加したタンパク質を示す。

上記の8個のタンパク質をゲルから切り出し、それぞれをトリプシン消化してペプチド抽出液をサンプルとして、質量分析を行った。ペプチド抽出液の質量分析から得られたスペクトルをデータベースと比較してタンパク質を同定するペプチドマスフィンガープリント法を行った後、同定されたタンパク質由来のペプチドをMS/MS解析し、アミノ酸配列を確認してタンパク質を決定した。測定の結果、以下の4つのタンパク質を同定した。各タンパク質の番号は、図2のスポット位置を示す番号と対応している。

- 1: Protein disulfide isomerase
- 5: Mitochondrial heat shock protein 70
- 6: Actin
- 7: Actin

Protein disulfide isomerase (PDI) は、小胞体でのタンパク質折り畳みにおいてジ

スルフィド結合を形成するために必要な酵素である。グルタミン酸負荷により酸化されることで、正常なタンパク質折り畳みができなくなる可能性が考えられる。Mitochondrial heat shock protein 70 (GRP75) は、ミトコンドリアに存在するシャペロンタンパク質であり、細胞保護機能を持つことが報告されている。Actin は細胞骨格タンパク質であり、細胞の形態維持に重要な分子である。これらの結果から、グルタミン酸負荷による細胞内 GSH 減少をきっかけとして細胞内が酸化ストレス状態となり、その結果としてタンパク質の酸化損傷が増加し、細胞保護機能やタンパク質折り畳みに関する機能が障害されていると考えられた。

酸化ストレスに応答する転写因子として、Nrf2 が知られている。Nrf2 は、抗酸化機能に関わる分子の発現を制御しているため、グルタミン酸負荷による酸化ストレスに対して、Nrf2 が保護的に作用する分子を発現する可能性がある。ウェスタンブロットを行ったところ、Nrf2 が制御する抗酸化酵素のひとつであるヘムオキシゲナーゼ1 (HO-1) の発現増加が認められたが、GSH 減少やタンパク質のカルボニル化増加よりも遅い時間であった。

以上の結果から、興奮毒性時にアストロサイトでは、GSH 減少をきっかけとしてタンパク質折り畳みやストレス応答に関わるタンパク質が酸化損傷を受けることが明らかになった。これらのタンパク質機能を補う、あるいは GSH 減少による酸化ストレス状態を改善することでアストロサイトの正常化を目指す事は、脳内環境の改善に繋がる可能性がある。また、Nrf2 経路を刺激して早期に抗酸化酵素の発現を増加させる事で、酸化ストレス状態を改善できる可能性がある。本研究で明らかになった分子は、興奮毒性による細胞障害を改善するための標的となると考えられる。

#### 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5件)

Furukawa A, Koriyama Y. A role of heat shock protein 70 in photoreceptor cell death: potential as a novel therapeutic target in retinal degeneration. *CNS Neuroscience & Therapeutics*. 査読有、22(1):7-14, 2016.

古川絢子, 郡山恵樹. HSP70 を標的とした網膜色素変性症の新規治療の可能性、*日本薬理学雑誌*、査読有、146:321-326, 2015.

Koriyama Y, Furukawa A, Muramatsu M, Takino J, Takeuchi M. Glyceraldehyde caused Alzheimer's disease-like alterations in diagnostic marker levels in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. Scientific Reports. 査読有, 5:13313. doi: 10.1038/srep13313.

Yoshikawa K, Kita Y, Furukawa A, Kawamura N, Hasegawa-Ishii S, Chiba Y, Takei S, Maruyama K, Shimizu T, Shimada A. Excitotoxicity-induced immediate surge in hippocampal prostanoid production has latent effects that promote chronic progressive neuronal death. Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids. 査読有, 88:373-381, 2013.

Thanan R, Pairojkul C, Furukawa A, Murata M. (14名中9番目) Inflammation-related DNA damage and expression of CD133 and Oct3/4 in cholangiocarcinoma patients with poor prognosis. Free Radical Biology and Medicine. 査読有, 65:1464-1472, 2013.

〔学会発表〕(計8件)

古川 絢子、辻夏美、杉原颯太、樋口善博 グルタミン酸誘導グリア細胞死における GRP78 の役割解明 日本薬学会第 136 年会、2016 年 3 月 29 日、神奈川県・横浜市

古川 絢子、樋口 善博 興奮毒性による海馬神経細胞死における酸化損傷タンパク質の役割解明 日本酸化ストレス学会東海支部・第 4 回学術集会、2016 年 2 月 6 日、三重県・鈴鹿市

近藤美帆、古川 絢子、樋口善博 グルタミン酸によるグリア細胞死誘導において生成する酸化損傷タンパク質の検出 日本酸化ストレス学会東海支部・第 4 回学術集会、2016 年 2 月 6 日、三重県・鈴鹿市

古川 絢子、樋口善博 グルタミン酸によるグリア障害におけるタンパク質の発現変動および酸化損傷解析 BMB2015・第 88 回日本生化学会大会、2015 年 12 月 3 日、兵庫県神戸市

古川 絢子、近藤美帆、梨本明日香、樋口善博 グルタミン酸によるグリア細胞死誘導における酸化損傷タンパク質の役割解明 日本薬学会第 135 年会、2015 年 3 月 28 日、兵庫県・神戸市

星崎彩加、古川 絢子、梨本明日香、近藤

美帆、樋口善博 グルタミン酸によるグリア細胞死誘導に関わる細胞内タンパク因子のプロテオミクス解析 第 60 回日本薬学会東海支部 総会・大会 2014、2014 年 7 月 5 日、三重県・鈴鹿市

Ayako Furukawa, Akiyoshi Kakita, Yoichi Chiba, Yoshihiro Higuchi, Atsuyoshi Shimada. Proteomic identification of oxidatively damaged proteins in the sclerotic hippocampus of patients with mesial temporal lobe epilepsy. SFRR1 2014, 2014 年 3 月 24 日, Kyoto.

Ayako Furukawa, Ayaka Hoshizaki and Yoshihiro Higuchi. Proteomic analysis of some proteins controlling glutamate-induced cell death associated with apoptosis in rat C6 glioma cells. SFRR1 2014, 2014 年 3 月 24 日, Kyoto.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

古川 絢子 (FURUKAWA, Ayako)  
鈴鹿医療科学大学・薬学部・助手  
研究者番号：10455537

### (2) 研究分担者

該当なし

### (3) 連携研究者

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