

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：82101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2016

課題番号：16K15386

研究課題名(和文) 前骨髄性白血病タンパク質のSUMO化を指標としたヒ素の毒性作用機序の解明

研究課題名(英文) A mechanistic approach of arsenic toxicity using SUMOylation of Promyelocytic Leukemia protein as an indicator.

研究代表者

平野 靖史郎(Hirano, Seishiro)

国立研究開発法人国立環境研究所・環境リスク・健康研究センター・副研究センター長

研究者番号：20150162

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：亜ヒ酸の曝露に伴うPMLタンパクの不溶化反応、SUMO分子による修飾と細胞内におけるPMLの局在変化を調べるとともに、DaxxやMDM2などのPML核小体関連タンパク質の細胞内あるいは核内の動態も合わせて調べた。ヒトPML遺伝子、およびヒ素結合部位と推測される領域に変異を導入した遺伝子をほ乳類細胞に導入し、PMLの亜ヒ酸応答性について調べた。PMLとヒ素との結合形態、タンパク修飾、PML核小体にリクルートされるタンパク質をウェスタンブロッティング法や抗体を用いた蛍光免疫染色法を用いて解析したところ、PML核小体内には少なくとも2つの異なるコンパートメントが存在することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：SUMOylation of PML and tumor suppression events occur in response to arsenite (As<sup>3+</sup>). The solubility change of death-associated protein 6 (Daxx) and p53 repressor murine double minute 2 (MDM2) as well as PML and SUMO molecules in genetically engineered HEK293, Jurkat, and HL60 cells. PML and Daxx colocalized completely in immunofluorescence microscopic observation. However, Daxx was recovered in the RIPA-soluble fraction irrespective of exposure to As<sup>3+</sup>. MDM2, which is reportedly associated with PML in response to As<sup>3+</sup>, was also recovered in the RIPA-soluble fraction regardless of exposure to As<sup>3+</sup>. Those results indicate that proteins in the PML-NBs are subdivided at least into two compartments regarding the As<sup>3+</sup>-induced solubility change. An ancillary but significant finding was that MDM2-knockout cells were more resistant to As<sup>3+</sup> than pristine cells. Although As<sup>3+</sup> increased caspase-3/7 activity caspase inhibitors did not reduce the cytotoxic effects of As<sup>3+</sup>.

研究分野：環境毒性学

キーワード：ヒ素 細胞 前骨髄性白血病 SUMO 毒性

### 1. 研究開始当初の背景

三酸化ヒ素などの無機ヒ素化合物は、IARC がクラス 1 の発癌物質に分類している有害な環境汚染物質である。一方、亜ヒ酸は、悪性度が極めて高い APL の臨床薬としても実際トリセノックスという薬品名で販売されており、治癒率が 7-8 割と極めて高い。APL は遺伝子転座により、Promyelocytic Leukemia (PML) とレチノイン酸レセプター (Retinoic Acid Receptor-alpha, RARA) の融合タンパク質が細胞内で作られることにより発病する治癒が困難な白血病の一種であるが、亜ヒ酸の APL 治癒効果は、ヒ素が PML 部位に結合することによりもたらされることが最近の研究で明らかにされている。研究代表者は、平成 23 年度～平成 25 年度、基盤研究 B の研究課題名:「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」において、ヒ素と結合するタンパク質の分離方法や同定方法について検討を加えてきており、その中で、システインを高密度で多く含む、RING (Really Interesting New Gene) フィンガープロテインの一種である PML が、低濃度の亜ヒ酸とも特異的に強く反応するタンパク質であることを明らかにし、2 報の論文として掲載されたところである (S. Hirano, et al. (2013) Effects of arsenic on modification of promyelocytic leukemia (PML): PML responds to low levels of arsenite. Toxicol. Appl. Pharmacol. 273(3):590-599 ; S. Hirano, et al. (2015) Solubility Shift and SUMOylation of Promyelocytic Leukemia (PML) Protein in Response to Arsenic (III) and Fate of the SUMOylated PML. Toxicol. Appl. Pharmacol. 287:191-201)

### 2. 研究の目的

環境発癌物質である三価のヒ素(亜ヒ酸)は、急性前骨髄性白血病 (Acute Promyelocytic Leukemia, APL) に対して画期的な治癒効果をもつことが報告されている。発癌性と癌治癒性という一見相反する効果は、ヒ素化合物がタンパク質のシステイン残基などのチオール化合物と反応することに由来していると考えられている。本研究では、前骨髄性白血病タンパクである Promyelocytic Leukemia (PML) がシステイン高密度に存在する特殊な配列を持っていることに焦点を当て、ヒ素とタンパク質のシステイン残基との反応性との影響を明らかにすることにより、環境毒性学とヒ素化合物の癌治療への応用の両面よりヒト健康問題に資することを目的とする。

### 3. 研究の方法

○遺伝子導入キットを用いて、PML の RING フィンガードメインのシステインを複数個除去した遺伝子、あるいはアラニンに変異させた遺伝子を作成し、大腸菌をトランスフォー

ームしてプラスミドを調製する。

○遺伝子導入用細胞としては、トランスフェクション効率の高い Chinese Hamster Ovary (CHO) と Human Embryonic Kidney (HEK) 細胞を用いる。

○ネオマイシンを用いて、安定発現細胞をクローニングして安定樹立株を得る。得られた安定 PML 発現細胞は、他研究機関においても利用可能とする。

○ネオマイシンを用いて、安定発現細胞をクローニングして安定樹立株を得る。得られた安定 PML 発現細胞は、他研究機関においても利用可能とする。

○ヒ素反応性タンパク質の分離が可能となったヒ素固定化担体を用いてヒ素アフィニティカラムを作成し、中速液体クロマトグラフィーを行って、細胞より各種 PML タンパク質を分離精製する。ヒ素の定量にはプラズマ質量分析計 (ICP-MS) を使い、 $m/z=75$  をモニターすることにより行う。

○亜ヒ酸、あるいはアンチモンなどの半金属元素を添加した細胞における、PML タンパク質の高次構造の変化や半金属元素の結合数を分析する。半金属の分析には ICP-MS 等を用い、分析値をタンパク濃度で規格化する。○PML 安定発現細胞に亜ヒ酸を添加して、経時的、あるいは用量依存的に PML の SUMO 化過程をウエスタンブロットング法を用いて調べる。細胞の溶解には、PML が小体にも存在することから、通常の RIPA (Radio-Immunoprecipitation Assay) バッファー可溶性画分とともに、不溶性画分についても分析を行う。不溶性画分については DNase を用いてサンプルの粘度を低下させる。

○PML あるいはその変異タンパク発現細胞を、チャンバースライド上で培養し、固定化、界面活性剤を用いた細胞膜透過性の昂進、ブロッキングを行い、anti-PML (Alexa594-二次抗体)、および Alexa488-conjugated anti-SUMO 抗体を用いて、細胞を蛍光免疫染色する。また、核を DAPI で 3 重染色した後、蛍光顕微鏡と共焦点レーザー顕微鏡を用いて PML、あるいは SUMO 分子の細胞内局在性を調べる。特に亜ヒ酸の曝露時における PML 小体の形成について詳細に観察する。

○液体クロマトグラフィーを用いて、タンパク質の分離をできるだけ細胞内の状態に近い条件下で担体から溶出する方法を確立するとともに、短時間で PML あるいは変異導入 PML タンパク質を分離定量することができるハイスループットなアフィニティークロマトグラフィー法を構築し、またそれにより PML タンパク質のヒ素に対する親和性を評価する。

○PML のヒ素に対する親和性評価とともに、PML の RING フィンガードメインのヒ素結合性の部位を決定するとともに、ヒ素の結合がどのような機序で PML の SUMO 化を誘導

するのかを詳細に調べる。

○PML小体の解析は、ヒ素とPMLの結合にともなうPMLの質的变化やSUMO化の過程を調べる上で重要であると考えられる。PML小体を分離して、界面活性剤の処理と免疫沈降法を用いてSUMO化PMLとともに小体にリクルートされてくるタンパク質の解析を行う。タンパク質の同定はTOF-MSを用いた分析により実施する予定である。

○PML小体には、SIM(SUMO Interacting Motif)を介してSUMO化タンパク質に結合する分子が存在すると考えられる。SIM-SUMOを介してPMLに結合するタンパク質を調べることにより、ヒ素を曝露した細胞における、PMLのSUMOによる修飾過程を明らかにする。

○HL60、Jurkat、K562細胞を用いて、これまでPML遺伝子導入細胞で調べた結果が、実際の白血病細胞に適用可能であることを確認する。特に、PMLのRIPAバッファ可溶性/不溶性画分への分配係数、PMLのSUMO化過程がPML導入細胞と同じように起こるか否かについて調べる。

○アンチモンやビスマスを用いたときの実験結果も考慮し、半金属元素の生体作用機序をタンパク質と元素との結合、ならびに、それに伴うタンパク質の修飾・構造変化という観点から明らかにする。

#### 4. 研究成果

亜ヒ酸の曝露に伴うPMLタンパクの不溶化反応、SUMO分子による修飾と細胞内におけるPMLの局在変化を調べるとともに、death-associated protein 6 (Daxx)やmurine double minute 2 (MDM2)などのPML小体関連タンパク質の細胞内あるいは核内の動態も合わせて調べた。まず、ヒトPML遺伝子、およびヒ素結合部位と推測される領域に変異を導入した遺伝子をほ乳類細胞に導入し、PMLのN端の存在するRINGドメインの有無によるPMLの亜ヒ酸応答性について調べた。PMLとヒ素との結合形態、タンパク修飾、PML小体にリクルートされるタンパク質をウェスタンブロッティング法やプルダウン法、抗体を用いた蛍光免疫染色法を用いて解析したところ、PML小体内には、少なくとも2つの異なるコンパートメントが存在し、亜ヒ酸により不溶化する分子は、PMLのSUMO化に必要であり、亜ヒ酸応答的に小体内にリクルートされてくることを明らかにした。また、PML小体は、核小体(nucleolus)に存在することが知られているfibrillarinとは共局在しなかった。

一方、リガーゼなどの必要酵素をすべて含んだ溶液を用いてin vitroでPMLのSUMO化反応を実施したところ、RINGの有無にかかわらず、PMLのSUMO化が進行した。このことより、細胞においてヒ素を曝露した時にのみPMLのSUMO化修飾

が起こるのは、PML小体に何らかの変化が生じSUMO分子やその他の必要な酵素・因子が小体内にリクルートされてくるからであろうと考えられる。

PMLと核内で結合することが知られているMDM2をKOした293-MDM2細胞は、HEK293やHEKPML細胞に比べサイズが大きく、細胞増殖速度も有意に低下していた。293-MDM2細胞は、HEK293細胞に比べ亜ヒ酸に対してより耐性であった。293-MDM2細胞では、亜ヒ酸の曝露によりcaspase-3/7活性が上昇した。しかし、HEK293や293-MDM2細胞においては、亜ヒ酸の細胞障害性にcaspase inhibitorsの効果が見られなかったことより、ヒ素を曝露したこれらの細胞においてアポトーシス以外の細胞死の機構が考えられる。

これまで、細胞周期の間期においてPML、SUMO、Daxxの共局在性について調べてきたが、M期(mitosis)におけるこれらのタンパク質の動態についても検討を行った。核膜が崩壊するM期においては、PML小体は凝集して存在していたが、DaxxがPMLと完全に共局在していたのに対し、SUMOの一部はPMLとは共局在していなかった。

PMLは前骨髄性白血病細胞の維持に必要なタンパク質であり、ヒ素はPMLと結合し分解することにより前骨髄性白血病に治療薬としての効果を示すことが報告されている。今回の研究により、無機ヒ素を曝露した細胞における、PML関連タンパク質の動態が明らかとなったことから、無機ヒ素の他の白血病治療への応用にも道筋が開けたものと考えられる。

#### 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 2件)

1. Ayaka Kato, Yayoi Kobayashi, Osamu Udagawa, and Seishiro Hirano (2017) Pharmacodynamics of S-dimethylarsino-glutathione, a putative metabolic intermediate of inorganic arsenic, in mice. *Biochem. Pharmacol.* 126:79–86. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2016.11.020> (査読有)

2. Ilseob Shim, Kyunghee Choi, and Seishiro Hirano (2017) Oxidative stress and cytotoxic effects of silver ion in mouse lung macrophages J774.1 cells. *J. Appl. Toxicol* 37:471–478. DOI: 10.1002/jat.3382. (査読有)

〔学会発表〕(計 4件)

1. 平野靖史郎, 宇田川理, 加藤綾華, 小林弥生 (2016) HEK293細胞における

PML-MDM2の機能と亜ヒ酸の影響 第22回ヒ素シンポジウム (11月18日, 産業技術総合研究所臨海副都心センター, 東京江東区)

2.宇田川理, 塚本智史, 辰巳嵩征, 加藤綾華, 小林弥生, 平野靖史郎 (2016) ヒ素結合タンパク質 PML は卵子成熟過程において染色体の配置を安定化する 第22回ヒ素シンポジウム (11月18日, 産業技術総合研究所臨海副都心センター, 東京江東区)

3.加藤綾華, 小林弥生, 宇田川理, 平野靖史郎 (2016) S-dimethylarsino-glutathioneを投与したマウスにおける組織中のヒ素の動態 第22回ヒ素シンポジウム (11月18日, 産業技術総合研究所臨海副都心センター, 東京江東区)

4.加藤綾華, 小林弥生, 宇田川理, 平野靖史郎 (2016) マウス血漿に添加したS-dimethylarsino-glutathioneの化学形態分析 フォーラム 2016 衛生薬学・環境トキシコロジー (9月10日, 昭和大学旗の台キャンパス, 東京都品川区)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

平野靖史郎 (Hirano Seishiro )

国立研究開発法人国立環境研究所 環境リスク・健康研究センター 副センター長  
研究者番号：20150162