

令和 2 年 10 月 15 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19296

研究課題名（和文）サリン誘導体BIMPの作用機序の解明

研究課題名（英文）Clarifying cytotoxic mechanism of BIMP (bis(isopropyl methyl) phosphonate)

研究代表者

村田 和夫 (Murata, Kazuhiro)

広島大学・医歯薬保健学研究科（医）・助教

研究者番号：70758218

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：サリン誘導体BIMPによるNF-κBの活性化が確認された。その知見をもとにアセチルサリチル酸により培養細胞レベルで毒性が阻害されたことを見出した。この結果は、神経ガスによるテロなどが起こった際の治療に大いに役立つ知見だと考えられる。また、阻害剤を用いて、毒性発現の分子メカニズムについて検討したところヒストンH3のユビキチン化が確認された。それに付随してメチル化DNAの現象も確認された。この結果は、近年注目されている、脱ユビキチン化酵素の阻害剤の開発につながる結果だと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

サリン誘導体BIMPによるNF-κBの活性化が確認された。その知見をもとに特定の既知のNF-κB阻害薬を用いて解析を行ったところ培養細胞レベルで毒性が阻害されたことを見出した。この結果をもとに動物実験レベルでの毒性の阻害剤を探索しており一定の成果が得られている。これらの成果は神経ガスによるテロなどが起こった際の治療に大いに役立つ知見だと考えられ社会的意義の非常に大きい国際平和に貢献する成果だと考えられる。

研究成果の概要（英文）：I found that sarin-like organic phosphorus compounds BIMP (bis(isopropyl methyl) phosphonate) induced activation of NF-κB and the toxicity was inhibited at cultured cells by acetylsalicylic acid. It is thought that this result is knowledge to help treatment when terrorism with the nerve gas was caused.

In addition, after examining molecular mechanism of the toxic expression, using a repressor, becoming it was confirmed ubiquitin of histone H3. I accompanied it, and the phenomenon of methylation DNA was confirmed. In late years, as for this result, it is thought that it is a result to lead to the development of the repressor of the enzyme de-ubiquitin attracting attention.

研究分野：分子生物学

キーワード：中毒学 ユビキチン化 メチル化

### 1. 研究開始当初の背景

有機リン系神経剤は農薬として世界中で広く汎用されている。また、サリンなど強い毒性を示す有機リン系神経剤はしばしば戦争やテロに用いられることがある。平成7年に日本で発生した東京地下鉄サリン事件では、社会に大きな衝撃を与え12名の死者と5,000名に及ぶ被害者を出した。今年で事件から20年が経過するが、未だ数多くの被害者がサリン中毒による後遺症を訴えている。サリン等の有機リン系神経剤の生体に対する毒性機序はアセチルコリンエステラーゼ(AChE)阻害を介したコリン作動性神経系の異常亢進によるものと考えられており、一般に急性期の症状が消退した後は、重大な後遺症は残らないものと考えられている。しかし、近年の報告では有機リン系神経剤による中間期症状、遅発性神経障害の存在が示され、その詳細な毒性機序の解明が求められている。

### 2. 研究の目的

我が国では平成7年に東京地下鉄サリン事件に用いられ国民に大きな衝撃を与えた。有機リン系神経剤の作用機序はアセチルコリンエステラーゼ阻害を介したコリン作動性神経の亢進によるものであると考えられているが、サリン事件の被害者の追跡調査等から遅発性の神経障害の存在が示されその詳細な分子メカニズムの解明が必要とされている。サリンは使用が厳しく制限されているためサリンの構造類似難揮発性有機リン剤 bis(isopropyl methyl) phosphonate (BIMP)を合成し、in vivo、in vitroにおいてその影響を解析してきた。その結果、培養細胞においてBIMP添加時に細胞周期に異常が見られることを見出した。本研究では、BIMPの細胞周期に対する毒性についての分子メカニズムを解明し、サリンに対する治療法の開発を目的としている。BIMPの細胞周期に対する毒性についての分子メカニズムを解明し、サリンに対する治療法の開発を目的としている。

### 3. 研究の方法

BIMPの作用機序を明らかにするために下記の項目について実行する。

1)BIMP添加による細胞周期への影響を確認する。

2)BIMP添加により惹起されるシグナル伝達経路の解明。

3)BIMPの標的分子の同定。

4)BIMPの効果を阻害するための解析。

本研究ではBIMPの作用機序を解明し、サリンの治療法を発見するために細胞周期の停止という表現型に着目してパスウェイ解析などの網羅的な解析を駆使し、分子メカニズムの解明を行う。

### 4. 研究成果

(1)サリン誘導体BIMPの培養細胞への影響について、最適濃度と時間に関して解析を行い、その結果を得た。ヒト神経芽細胞腫、ヒ

ト網膜色素上皮細胞、ヒト子宮頸がん細胞を用いて影響をマイクロアレイ法及びパスウェイ解析法に調べたところNF-kBのシグナルが有意に上昇していることが示唆された。その結果をもとにいくつかの薬剤を用いてBIMPの細胞死に対する影響をスクリーニングしたところアセチルサリチル酸がBIMPによる細胞死を阻害することが確認された。

(2)BIMPの添加により、細胞周期の解析をしている中で、ヒストンH3のコピキチン化の変動を確認した。この修飾は、維持メチル化に関与することが近年明らかになったため、その解析をしたところBIMP添加時においてDNMT1、及びUSP7のクロマチンへの蓄積をウエスタンブロット法により確認した。さらにDNA複製部位への蓄積を確認した。さらにこれらの結果は、アセチルサリチル酸添加時に、阻害されることを確認した。以上のことから、USP7の活性の阻害がBIMPの毒性の一部であることが示唆された。さらに、有機リン剤のDFPではこれらの現象が見られないことを確認した。このことは、USP7の活性阻害作用が神経ガス特異的であることを示唆している。

### 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 1件)

“The sarin-like organophosphorus agent bis(isopropyl methyl)phosphonate induces ER stress in human astrocytoma cells.” Arima Y, Shiraishi H, Saito A, Yoshimoto K, Namera A, Makita R, Murata K, Imaizumi K, Nagao M. *J Toxicol Sci.* 2016;41(5):617-25(査読あり)

[学会発表](計 3件)

「サリン誘導体BIMPはNF-kBの活性化に関与している」村田和太、奈女良昭、吉本寛司、長尾正崇 第101回法医学会全国集会2017年

「サリン構造類似有機リン剤BIMPは細胞接着を制御する」村田和太、奈女良昭、吉本寛司、長尾正崇 ConBio2017 2017年

「Sarin-like organic phosphorus compounds, BIMP inhibited maintenance DNA methylation.」Kazuhiro Murata、Akira Namera, Kanji Yoshimoto, Masataka Nagao. IALM 2018 2018年

[図書](計 件)

[産業財産権]

出願状況(計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況（計 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

村田 和大 (MURATA, Kazuhiro)  
広島大学・医歯薬保健学研究科・助教  
研究者番号：70758218

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

##### (4) 研究協力者

( )