

令和 2 年 5 月 18 日現在

機関番号：32206

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08245

研究課題名(和文)脳内オピオイドペプチドによる酸化ストレス防御機構の解明

研究課題名(英文)Roles of opioid peptides in anti-oxidative stress in the brain

研究代表者

三浦 隆史(MIURA, Takashi)

国際医療福祉大学・薬学部・教授

研究者番号：30222318

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：銅は高い酸化還元能のため、活性酸素種生成の原因となる。脳は高い脂質含量等により、酸化を受け易い器官であるが、脳における酸化ストレス機構については未だ不明な点が多い。本研究では、オピオイドペプチドとして知られるエンドモルフィン1(EM1)が、SDSミセル結合状態において、2価および1価の銅と結合する能力を持つことを明らかにした。EM1は細胞膜脂質の酸化に関わる可能性がある。さらに、神経伝達物質であるセロトニンが、銅取り込みタンパク質Ctr1のメチオニンに富む領域の存在下で、2価銅を還元することも示された。細胞外2価銅の還元は、セロトニンの神経伝達以外の生理的役割であると予想される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

銅は、細胞障害を引き起こす酸化ストレスの直接の発生原因となるため、銅の酸化還元制御のメカニズムを解明することは大きい意義を持つ。本研究で得られた知見は、オピオイドペプチドや神経伝達物質が脳における銅恒常性に関わることを強く示唆する。このため、本研究の成果は、脳における銅酸化還元制御のメカニズムの解明に繋がるのが強く期待でき、酸化ストレスに起因する多くの疾患、例えばアルツハイマー病などの発症原因を解明する上での重要な基礎となる。従来と異なる発想に基づく治療薬開発への道が開かれるなど、本研究は発展性と波及効果の点においても大きい可能性を持つ。

研究成果の概要(英文)：Copper may lead to generation of toxic reactive oxygen species (ROS) due to its redox activity. Therefore, cellular uptake, storage and export of copper have to be tightly regulated in order to prevent copper-induced oxidative stress. Brain is considered to be vulnerable to oxidative damage because of its high oxygen consumption and lipid content. However, mechanism for anti-oxidative defense system in brain is still not well understood.

In the research project, we found that endomorphin 1 (EM1), endogenous opioid peptide, is capable of binding copper ion, either Cu(II) or Cu(I), in the SDS micelle-bound state. EM1 may play a part in protection of cellular lipids from ROS-induced oxidation.

We also examined anti-oxidative roles of neurotransmitter serotonin (5-HT), and found that 5-HT exhibits a high Cu(II) reducing activity in the presence of thioethers, such as the Met-rich region of copper transporter Ctr1. Reduction of extracellular Cu(II) may be another physiological role of 5-HT.

研究分野：生物無機化学

キーワード：酸化ストレス オピオイドペプチド セロトニン 銅

1. 研究開始当初の背景

脳は不飽和脂質に富み、酸素消費量も多いことから、生体内でも特に酸化ストレスに晒されやすい部位である。実際、多くの研究により酸化ストレスはアルツハイマー病、パーキンソン病などの神経変性疾患の発症や細胞傷害と深い関わりを持つ証拠が得られている [1]。失われた脳の神経細胞を再び増やして、認知機能を回復させることは困難である以上、発症を阻止することが神経変性疾患の根本的対策として最も重要である。予防医療の現状に目を向けると、例えば心血管疾患であれば酸化ストレスから動脈硬化に至る道筋の解明が進み、スタチンなどの薬物による予防的介入も一定の成功を収めている。これに対して、神経変性疾患に関しては有効な方法が見つかっておらず、予防、治療共に為す術もないのが実情である。脳の機能が正常であれば、神経細胞は常態的に生じる活性酸素類から守られているはずであり、何らかの原因でレドックス制御が破綻すれば酸化ストレス状態となり、病気が引き起こされる。従って、神経変性疾患の予防へ向けた合理的な戦略を立てるためには、脳が本来持つ酸化ストレスに対する防御機構の解明が必須となる。

2. 研究の目的

銅は生体内で Cu(II)と Cu(I)の2種の酸化状態をとることができる。銅の酸化還元はエネルギー産生や活性酸素の除去など、生体にとって有用な反応に利用されるが、厳密な制御から外れた酸化還元はフェントン反応などにより酸化ストレスを惹起する可能性を持つ [2]。このため、Cu(II)または Cu(I)に対して特異的に結合し、酸化還元を抑制するキレート物質は有力な抗酸化物質となり得る。例えば、細胞内で Cu(I)を安定化するグルタチオン、細胞外で Cu(II)を安定化するヒスチジンなどのアミノ酸やアルブミンは、この種の抗酸化物質の例である。

本研究では、鎮痛作用が主たる役割と考えられているオピオイドペプチド、特にエンドモルフィン 1 (EM1) が脳内における抗酸化系を担う可能性に着目し、その機能メカニズムを解明することを目的とした。また、神経伝達物質であるセロトニンについても、その銅酸化還元制御における役割を調べた。

3. 研究の方法

(1) エンドモルフィン-銅の親和性および複合体構造の解析

EM1 による銅レドックス制御のメカニズムを明らかにするため、Cu(I)もしくは Cu(II)との相互作用、結合様式を分光学的手法により調べた。EM1 (アミノ酸配列 YPWF-NH₂) は化学合成品を購入して用いた。

銅イオン添加による EM1 の Trp 残基由来蛍光の消光を利用して、金属と芳香環の近距離相互作用が生じる条件の検討、および EM1 が Cu(I)、Cu(II)に対して持つ親和性の定量的解析を行なった。銅イオンと芳香族残基の間にカチオン-π 相互作用が働いているか検証するため、トリプトファンの $\pi-\pi^*$ 遷移吸収の測定も行った。

EM1 のチロシンおよびプロリン残基を、それぞれアラニンに置換した変異ペプチドについて上記の検討を行った。

(2) セロトニンの銅還元活性とその生理的役割

5-HT による Cu(II) → Cu(I)還元は、Cu(I)選択的指示薬である bathocuproinedisulfonic acid (BC) による Cu(I)の定量、及び Cu(II)の d-d 遷移吸収の減弱により追跡した。Cu(II)による 5-HT の酸化は、5-HT の紫外吸収により調べた。また、銅取り込みタンパク質 Ctr1 の細胞外 Cu(I)結合部位に相当するメチオニンに富むペプチドを購入し、このペプチドが、セロトニンと銅の酸化還元反応に対してどのような効果を持つか調べた。

4. 研究成果

(1) エンドモルフィン-銅の親和性および複合体構造の解析

EM1 水溶液の 290 nm 励起蛍光スペクトルには、350 nm 付近にピークを持つ Trp 残基に由来するバンドが観測される。この水溶液に銅イオンを添加して蛍光スペクトルを測定したところ、Cu(I)、Cu(II)いずれの場合も銅濃度に依存した蛍光強度変化は観測されなかった。ところが、同様の測定を臨界ミセル濃度以上の濃度の SDS 存在下で行ったところ、銅濃度依存的な蛍光強度減少が観測された。この結果から、EM1 はミセル結合状態で、銅イオン結合能を獲得することがわかった。

EM1 と銅イオンの結合様式について調べるため、EM1 の Tyr 残基を Ala に置き換えた変異ペプチド EM1(Y A)について同様の測定を行ったところ、SDS ミセル存在下でも銅イオン添加による Trp 蛍光強度の減少が観測されなくなった。Tyr Ala 置換により、銅イオンが Trp に近接しなくなることから、EM1 は Trp 残基のインドール環と Tyr 残基のフェノール環の間に挟むようにして銅イオンと結合すると考えられる。

EM1 は、ミセル結合状態で Cu(I)と Cu(II)の両者に対して結合能を持つことから、脳内では、銅の酸化還元に起因する酸化ストレスから細胞膜の脂質などを保護する役割を持つ可能性がある。

(2) セロトニンの銅還元活性とその生理的役割

セロトニン(5-HT)は、神経伝達物質として働く生理活性アミンであるが、銅イオンにより容易に酸化され、細胞毒性を示す。比較的酸化ストレスに対する抵抗性が低い脳において、何故、敢えて酸化されやすい物質が利用されるのか、合理的な説明はされていない。そこで、5-HT と銅の酸化還元反応が生理的役割を持つ可能性について検証を行った [3]。

Cu(I)選択的キレート指示薬である BC 存在下で、Cu(II)に 5-HT を添加したところ、Cu(I)-BC 複合体による可視吸収が速やかに現れ、強度増大した。L-tryptophan 存在下での Cu(I)の生成は無視できる程度であったことから、インドール環に水酸基を持つ構造が Cu(II)の還元活性を顕著に高めることがわかった(図 1)。

BC 非存在下で Cu(II)にアスコルビン酸を添加すると、Cu(II)の d-d 遷移吸収が減弱した。しかし、5-HT を添加した場合は Cu(II)の d-d 遷移吸収の減弱は観測されないことから、5-HT による速やかな Cu(II)還元には、Cu(I)受容体の存在が重要と考えられた。そこで、BC の代わりに、Cu(I)に対して親和性を持つチオエーテル化合物を用いて、5-HT が銅還元活性を持つか調べた。図 2 に 5-HT 存在下で測定した Cu(II)-Gly₂ 錯体の可視吸収スペクトルを示す。690 nm にピークを持つ幅広いバンドは、Cu(II)の d-d 遷移吸収である。この溶液に分子内に 2 個のチオエーテルを持つ 3,6-dithia-1,8-octanediol (3,6-DT)を添加すると、3,6-DT 濃度依存的に d-d 遷移吸収強度が減少した。5-HT 非存在下では、3,6-DT 添加による d-d 遷移吸収強度の変化が観測されなかったことから、3,6-DT は 5-HT による Cu(II)の還元を促進する作用を

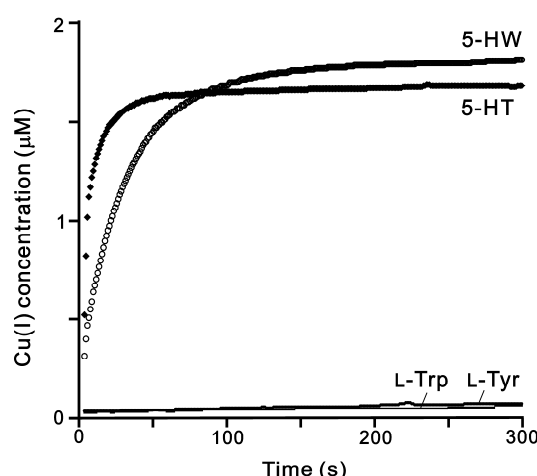


図 1 L-tyrosine (L-Tyr)、L-tryptophan (L-Trp)、5-hydroxy-L-tryptophan (5-HW)、5-HT の Cu(II) Cu(I)還元活性。Cu(I)の定量はバソクブロン法により行った。

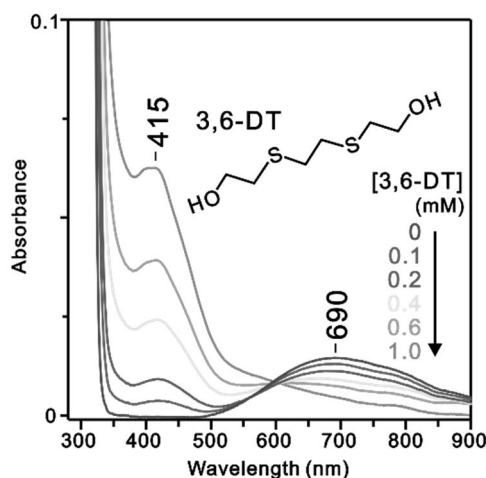


図 2 5-HT 存在下、Cu(II)-Gly₂ 錯体の可視吸収スペクトル (3,6-DT 濃度依存性)

持つことがわかった。

細胞内に銅イオンを輸送する役割を持つ膜チャネルタンパク質 Ctr1 の細胞外ドメインには、細胞外の Cu(I)を捕捉するための Met 残基に富むアミノ酸配列 (Met-rich motif) が存在する。Met-rich motif に相当するペプチド MGMSYMD (M1) を化学合成し、このペプチドが 5-HT と Cu(II)の間の酸化還元反応を促進するか調べた。5-HT と Cu(II)-Gly₂ 錯体の混合溶液に M1 ペプチドを添加したところ、M1 濃度依存的に 5-HT の酸化生成物が生じたことから、3,6-DT と同様に、M1 ペプチドも 5-HT-Cu(II)の酸化還元を促進することがわかった。

銅イオンは、細胞外では主として Cu(II)、細胞内では Cu(I)として輸送、貯蔵される。このため、Ctr1 による銅イオンの細胞内取り込みに先立ち、Cu(II)は Cu(I)に還元される必要がある。酵母の場合、細胞外の Cu(II)を還元する膜結合タンパク質の存在が知られていたが、ヒトでは対応する銅還元タンパク質は長年の探索にもかかわらず見出されていなかった。本研究の結果から、ヒト Ctr1 は、それ自体は銅還元活性を示さないものの、5-HT による銅還元を促進することがわかった。5-HT は Ctr1 の存在下でのみ Cu(II)を還元するため、生体にとって危険な、酸化条件下における Cu(I)の生成を避けることができる。単独で Cu(II)を還元するアスコルビン酸などと比べると、5-HT は銅の細胞内取り込みのための理想的な条件を備えた銅還元物質であることが明らかになった。

【文献】

- [1] Floyd R.A. & Hensley K. (2002) Oxidative stress in brain aging-implications for therapeutics of neurodegenerative diseases. *Neurobiol. Aging* **23**, 795–807.
- [2] Scheiber I.F., Mercer J.F. & Dringen R. (2014) Metabolism and functions of copper in brain. *Prog. Neurobiol.* **116**, 33-57.
- [3] Saito K., Watanabe K., Yanaoka R., Kageyama L & Miura T. (2019) Potential role of serotonin as a biological reductant associated with copper transportation. *J. Inorg. Biochem.* **199**, 110770.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

| | |
|--|----------------------|
| 1. 著者名 Mariko Okada, Takashi Miura, Takakazu Nakabayashi | 4. 巻 169 |
| 2. 論文標題 Comparison of extracellular Cys/Trp motif between Schizosaccharomyces pombe Ctr4 and Ctr5 | 5. 発行年 2017年 |
| 3. 雑誌名 J. Inorg. Biochem. | 6. 最初と最後の頁 97-105 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jinorgbio.2017.01.009 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名 Kunisato Kuroi, Masatomo Imaizumi, Takashi Miura, Takakazu Nakabayashi | 4. 巻 515 |
| 2. 論文標題 Examination of the association states of dehydroergosterol towards understanding the association structures of sterols in a membrane | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Biochem. Biophys. Res. Comm. | 6. 最初と最後の頁 228-233 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2019.05.109 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|--|----------------------|
| 1. 著者名 Kaede Saito, Kasumi Watanabe, Risa Yanaoka, Lisa Kageyama, Takashi Miura | 4. 巻 199 |
| 2. 論文標題 Potential role of serotonin as a biological reductant associated with copper transportation | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 J. Inorg. Biochem. | 6. 最初と最後の頁 110770 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jinorgbio.2019.110770. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 三浦 隆史, 渡邊 香純, 齋藤 楓, 柳岡 莉沙, 影山 莉沙 |
| 2. 発表標題 銅還元物質としてのセロトニンの役割 |
| 3. 学会等名 日本薬学会第139年会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--------------------------------------|
| 1. 発表者名 高橋 周太郎, 厚木 彩香, 三浦 隆史 |
| 2. 発表標題 ドーパミンの銅還元に対するチオエーテル配位子の影響 |
| 3. 学会等名 日本薬学会第139年会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|-----------------------------------|
| 1. 発表者名 影山 莉沙, 三浦 隆史 |
| 2. 発表標題 セロトニンの銅還元に対する二価銅配位子の影響 |
| 3. 学会等名 日本薬学会第139年会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 岡田 穂子, 三浦隆史, 中林孝和 |
| 2. 発表標題 銅輸送チャネルにおける金属結合モチーフの構造変化と、それに伴う脂質二重膜への埋没 |
| 3. 学会等名 第55回日本生物物理学会年会 |
| 4. 発表年 2017年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-------|---|---|----|
| 連携研究者 | 中林 孝和 (Nakabayashi Takakazu) (30311195) | 東北大学・大学院薬学研究科・教授 (11301) | |