

令和 2 年 6 月 22 日現在

機関番号：32659

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08391

研究課題名(和文) 亜ヒ酸毒性発現機構におけるペントースリン酸経路の役割

研究課題名(英文) Role of pentose phosphate pathway in arsenite toxicity

研究代表者

高橋 勉 (Tsutomu, Takahashi)

東京薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：00400474

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)：ヒ素は環境汚染物質の一つであり、世界各地でヒ素汚染による健康被害が発生しているものの、その毒性発現に関わる分子メカニズムは不明な点が多い。本研究では糖代謝経路の一つで様々な生理活性物質の合成に関わるペントースリン酸経路について解析を行い、酵母細胞およびヒトがん細胞において亜ヒ酸がペントースリン酸経路の非酸化段階に関わる酵素群(TKIおよびRPIA)の遺伝子発現を転写レベルで抑制することによって細胞の生存に必須なリボース-5-リン酸の細胞内レベルを低下させ、細胞毒性を発現させることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒ素は環境中に広く存在する有害物質であり、世界各地で地下水の高濃度ヒ素汚染が問題となっている。しかしながらヒ素の毒性発現メカニズムは未だ完全には解明されておらず、その全容解明が求められている。本研究では、亜ヒ酸によるペントースリン酸経路の抑制を介した毒性発現機構の一端を明らかにしており、ヒ素の毒性発現機構の解明研究に新たな知見を提供するものと考えられ、将来的にはヒ素曝露によって発症リスクが上昇する様々な疾病の予防につながることを期待される。また本研究成果は亜ヒ酸の抗がん剤としての応用研究にも新たな知見を提供するものであると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Arsenic is a hazardous element that exists widely in the environment. Health hazards caused by arsenic pollution of ground water have been issues of global concern, especially in Southeast Asia. However, the detailed mechanisms that mediate arsenic toxicity remain unclear. In this study, we found that arsenite repressed expression of genes involved in non-oxidative branch of pentose phosphate pathway (PPP), which is important for generating ribose-5-phosphate, in human cancer cells and yeast cells. We also found that addition of D-ribose, a precursor of ribose-5-phosphate, to culture medium decreased the toxicity of arsenite in human cancer cells and yeast cells. These results suggest that arsenite might inhibit synthesis of ribose-5-phosphate through transcriptional repression of genes involved in non-oxidative branch of PPP.

研究分野：分子毒性学

キーワード：亜ヒ酸 がん ペントースリン酸経路 リボース

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒ素は環境中に広く存在する有害物質であり、世界各地(特にバングラデシュやインドなどの南アジア地域)で地下水の高濃度ヒ素汚染による地域住民の健康被害が問題となっている。ヒ素は、皮膚での色素沈着、多臓器における発がんや循環器疾患など、さまざまな健康障害を引き起こすことが知られている。また、ヒ素毒性に関わる分子メカニズムとして、酸化ストレス誘導による細胞障害作用などが報告されている。しかし、ヒ素の毒性発現に関わる分子メカニズムは未だに不明な点が多く残されている。

我々は真核生物モデルとして生物学的研究に広く利用されている出芽酵母を用いた独創的な環境汚染物質感受性決定因子の検索方法を確立し、その方法を利用した網羅的スクリーニングによってヒ素化合物の中でも特に毒性の強い亜ヒ酸に対する感受性に影響を与える因子を多数同定することに成功したが、その中には、ペントースリン酸経路に関わる因子が多数含まれていた(*J. Toxicol. Sci.*, 2011; *Fundam. Toxicol. Sci.*, 2014)。ペントースリン酸経路は酸化的段階と非酸化的段階に大別され、酸化的段階は NADPH の産生、非酸化的段階は核酸合成に必要な糖の相互変換に関与することが知られているが、亜ヒ酸毒性との関係は全く検討されていない。これまでに我々は酵母細胞を用いた検討により、亜ヒ酸がペントースリン酸経路関連因子の発現抑制を介して細胞毒性を発現させることを見出している。

2. 研究の目的

本研究では、亜ヒ酸によるペントースリン酸経路の抑制を介した毒性発現機構の解明研究を行い、新たな亜ヒ酸毒性発現に関わる分子機構の解明を目指した。具体的にはヒトがん細胞や真核生物モデルとして有用な出芽酵母を用いて以下の検討を行った。(1) ペントースリン酸経路は多くの生理活性物質の合成に関わるがそれら生理活性物質の細胞生存における必須性についての詳細な検討はされていない。そこで、亜ヒ酸による細胞毒性に関わるペントースリン酸経路由来の生理活性物質を特定し、その作用機構を明らかにする。(2) 亜ヒ酸によるペントースリン酸経路関連因子の発現抑制に関わる転写制御因子(転写活性化因子または転写抑制因子)を特定し、その発現抑制機構を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 酵母の亜ヒ酸感受性試験

遺伝子改変した酵母を亜ヒ酸存在下で培養した後、培養液の濁度(A₆₂₀)を測定することで酵母の増殖(亜ヒ酸感受性)を調べた。

(2) 亜ヒ酸が酵母のペントースリン酸経路関連遺伝子発現レベルに与える影響

亜ヒ酸存在下で培養した酵母から総 RNA を抽出し、逆転写反応によって得られた cDNA を用いてリアルタイム PCR 法を行い、ペントースリン酸経路関連遺伝子の発現量を調べた。

(3) 亜ヒ酸処理時の核酸合成量の測定 : D-[14C(U)]-グルコースおよび亜ヒ酸を含む培地で培養した酵母から RNA を抽出し、液体シンチレーションカウンターを用い、RNA に取り込まれた 14C の量を測定した。

(4) がん細胞の亜ヒ酸感受性試験

がん細胞(ヒト急性単球性白血病由来 THP-1 細胞やヒト子宮頸がん由来 HeLa 細胞など)を亜ヒ酸存在下で 6~48 時間培養後、Cell counting kit-8 アッセイや MTT アッセイを用いて細胞生存率を測定した。

(5) 亜ヒ酸がペントースリン酸経路関連因子の mRNA レベルに与える影響

亜ヒ酸存在下 6~48 時間培養したがん細胞から RNA を抽出し、ペントースリン酸経路関連因子の mRNA レベルをリアルタイム PCR 法によって測定した。

(6) 亜ヒ酸がペントースリン酸経路関連因子のタンパク質レベルに与える影響

亜ヒ酸存在下 6~48 時間培養したがん細胞におけるペントースリン酸経路の非酸化的段階関連因子(Ribose 5-Phosphate Isomerase A: RPIA、TKT: Transketolase)のタンパク質レベルをウェスタンブロッティング法によって測定した。

4. 研究成果

(1) 亜ヒ酸による酵母細胞のペントースリン酸経路の抑制

真核生物モデルとして有用な酵母を用いてペントースリン酸経路と亜ヒ酸毒性との関係を調べたところ、*RKII* と同様に非酸化的段階に関わる酵素(*RPE1*、*TKL1* および *TAL1*)を欠損させた酵母も高い亜ヒ酸感受性を示した。一方、酸化的段階に関わる酵素を欠損させた酵母は亜ヒ酸高感受性を示さなかった。したがって、ペントースリン酸経路の非酸化的段階で産生される代謝物が亜ヒ酸の毒性軽減に関与していると考えられる。また、亜ヒ酸処理によって非酸化的段階に関わる酵素の発現レベルが低下することも判明した。以上の結果からペントースリン酸経路の非酸化的段階の抑制が、亜ヒ酸毒性発現において重要な役割を果たしていると考えられる。また、細胞内でリボキナーゼによってリン酸化されリボース-5-リン酸となる D-リボースを培地中に添加すると亜ヒ酸毒性が顕著に軽減されることが明らかとなった。したがって、亜ヒ酸がペントースリン酸経路のうち、非酸化的段階に関わる遺伝子の発現を抑制し、その結果として細胞内のリボース-5-リン酸の量が減少する可能性が考えられる。実際に亜ヒ酸処理によって、リボース-5-

リン酸から合成される RNA のレベルが著しく低下することが確認された。したがって、亜ヒ酸はペントースリン酸経路を抑制することで細胞内リボース-5-リン酸レベルを低下させ、その結果核酸合成を阻害する可能性が考えられる。

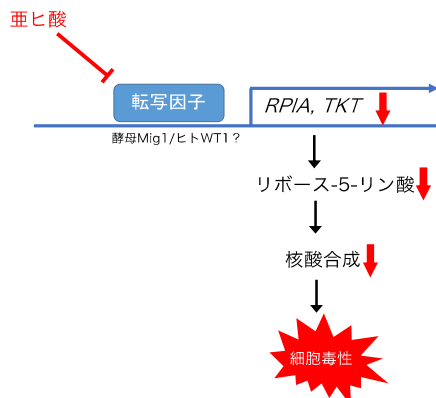
(2) 亜ヒ酸によるがん細胞のペントースリン酸経路の抑制

がん細胞(ヒト急性単球性白血病由来 THP-1 細胞、ヒト子宮頸がん由来 HeLa 細胞、ヒト脳腫瘍由来 U251 細胞など)を用いて亜ヒ酸毒性とペントースリン酸経路との関係について検討した。亜ヒ酸がペントースリン酸経路関連遺伝子の発現レベルに及ぼす影響を検討したところ、NADPH の産生に関わる酸化段階関連遺伝子 (PGLS および PGD) の mRNA 発現レベルはほとんど影響を受けなかった。一方、核酸合成に必要な糖の相互変換に関わる非酸化段階関連遺伝子 (RPIA および TKT) の発現レベルは亜ヒ酸濃度依存的に低下した。非酸化段階の主代謝物のリボース-5-リン酸の前駆体である D-リボースを培地中に添加することによって亜ヒ酸毒性が顕著に減弱された。一方、D-グルコースの添加は亜ヒ酸感受性にほとんど影響を与えなかったことから、亜ヒ酸毒性軽減作用はすべての糖に共通した作用ではなく、D-リボース特異的な作用である可能性が考えられる。以上の結果から、ヒトがん細胞においても亜ヒ酸はペントースリン酸経路の非酸化段階関連因子の発現を抑制することによって細胞の生存に必須なリボース-5-リン酸の細胞内レベルを低下させ、細胞毒性を発現させる可能性が考えられる。

(3) 亜ヒ酸によるペントースリン酸経路関連遺伝子の発現抑制機構解析

出芽酵母を用いて亜ヒ酸によるペントースリン酸経路の抑制機構について解析した。ペントースリン酸経路の非酸化段階関連因子 (*TKL1* および *RPII*) の発現調節に関わる可能性がある転写関連因子を Yeastrac(酵母転写因子検索サイト <http://www.yeasttract.com/>) で検索したところ、16 種の転写関連因子が該当した。これら 16 種類をそれぞれ欠損させた酵母の亜ヒ酸感受性を検討したところ、7 種が亜ヒ酸高感受性を示した。そこで、これら 7 種の転写関連因子の欠損がペントースリン酸経路の非酸化段階関連因子の発現レベルに与える影響をリアルタイム PCR 法によって解析した。その結果、転写メディエーターである *GAL11* の欠損によってペントースリン酸経路の非酸化段階関連因子の発現レベルが低下することが明らかになった。亜ヒ酸によって低下したペントースリン酸経路の非酸化段階関連因子の発現レベルは、*GAL11* を欠損させてもほとんど影響を受けないことから、亜ヒ酸が *Gal11* の機能を抑制している可能性が示唆された。我々は、*Gal11* と結合する転写因子として知られている *Mig1* が亜ヒ酸毒性軽減作用も有することを明らかにしているが、今回の検討により *MIG1* の欠損がペントースリン酸経路の非酸化段階関連因子の発現を抑制することも判明した。亜ヒ酸が *Mig1* を不活性化することも確認されたことから、亜ヒ酸は *Gal11* および *Mig1* 依存的な転写活性化機構を抑制することによって、ペントースリン酸経路の非酸化段階関連因子を抑制して、酵母の増殖を阻害している可能性が考えられる。

次に *Mig1* のヒトホモログである転写因子 *WT1* とペントースリン酸経路関連遺伝子の関係を調べた。HeLa 細胞を亜ヒ酸で処理したところ、処理濃度依存的に *WT1* の標的遺伝子 (*GAS1*, *QPRT*) の発現レベルが低下した。したがって、亜ヒ酸によって *WT1* の転写活性が抑制される可能性が考えられる。ペントースリン酸経路関連酵素 (*RPIA* および *TKT*) のプロモーター配列をプロモーター解析サイト (<https://epd.epfl.ch//index.php>) や転写因子検索サイト (http://algggen.lsi.upc.es/cgi-bin/promo_v3/promo/promoinit.cgi?dirDB=TF_8.3) で解析したところ、各遺伝子プロモーター上に *WT1* の結合サイトが存在することが判明した。また、*WT1* のノックダウンによって *RPIA* および *TKT* の遺伝子発現レベルも低下したことから、亜ヒ酸が *WT1* の転写活性を低下させることによってペントースリン酸経路を抑制し、細胞毒性を発現している可能性が考えられる。



亜ヒ酸によるペントースリン酸経路の抑制を介した毒性発現機構

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Tsutomu Takahashi, Tsuyoshi Nakano, Go Katoh, Yo Shinoda, Chika Yamamoto, Eiko Yoshida, Toshiyuki Kajii, Yasuyuki Fujiwara	4. 巻 45
2. 論文標題 Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (NRF2) is a negative regulator of tissue plasminogen activator synthesis in cultured human vascular endothelial EA.hy926 cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Toxicological Sciences	6. 最初と最後の頁 237-243
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2131/jts.45.237	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Dong-pan Wu, Tsuyoshi Nakano, Yayoi Tsuneoka, Tsutomu Takahashi, Yo Shinoda, Toshiyuki Kajii, Yasuyuki Fujiwara	4. 巻 7
2. 論文標題 Arsenite inhibits gene expression of perlecan, syndecan-1, -2, -3 and biglycan in cultured vascular endothelial cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Fundamental Toxicological Sciences	6. 最初と最後の頁 77-83
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 1件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Takahashi T., Nakano T., Fujiwara Y.
2. 発表標題 Arsenite suppresses expression of genes related to synthesis of ribose-5-phosphate in pentose phosphate pathway in human acute monocytic leukemia THP-1 cells.
3. 学会等名 The 8th International Congress of ASIAN Society of Toxicology (ASIATOX 2018)（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中野毅, 高橋勉, 吉田映子, 恒岡弥生, 篠田陽, 山本千夏, 鍛冶利幸, 藤原泰之
2. 発表標題 亜ヒ酸による血管内皮細胞株EA.hy926細胞における線溶活性の抑制
3. 学会等名 第45回日本毒性学会学術年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中野毅, 高橋勉, 加藤剛, 恒岡弥生, 篠田陽, 山本千夏, 鍛冶利幸, 藤原泰之
2. 発表標題 亜ヒ酸による血管内皮細胞における線溶活性の抑制機構
3. 学会等名 フォーラム2018: 衛生薬学・環境トキシコロジー
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高橋勉, 細野雅人, 佐久間竣介, 中野毅, 黄基旭, 永沼章, 藤原泰之
2. 発表標題 亜ヒ酸によるHeLa細胞のペントースリン酸経路の抑制を介した増殖阻害作用
3. 学会等名 メタルバイオサイエンス研究会2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中野毅, 高橋勉, 恒岡弥生, 篠田陽, 山本千夏, 鍛冶利幸, 藤原泰之
2. 発表標題 亜ヒ酸による血管内皮細胞のNrf2経路を介したt-PA合成阻害
3. 学会等名 メタルバイオサイエンス研究会2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高橋勉, 藤原泰之, 黄基旭, 永沼章
2. 発表標題 亜ヒ酸毒性発現機構におけるペントースリン酸経路の防御的役割
3. 学会等名 日本薬学会第139年会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田中裕士, 中野 毅, 高橋 勉, 黄 基旭, 永沼 章, 藤原泰之
2. 発表標題 酵母及びヒト細胞の亜ヒ酸毒性発現機構における転写因子Mig1及びWT1の役割
3. 学会等名 第44回日本毒性学会学術年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 田中裕士, 中野 毅, 高橋 勉, 篠田 陽, 藤原泰之
2. 発表標題 亜ヒ酸毒性発現における転写因子WT1の関与
3. 学会等名 フォーラム2017: 衛生薬学・環境トキシコロジー
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 高橋 勉, 田中裕士, 中野 毅, 黄 基旭, 永沼 章, 藤原泰之
2. 発表標題 酵母およびヒト子宮頸癌由来HeLa細胞における亜ヒ酸によるペントースリン酸経路関連遺伝子の転写抑制機構
3. 学会等名 第23回ヒ素シンポジウム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中野 毅, 高橋 勉, 吉田映子, 恒岡弥生, 篠田 陽, 山本千夏, 鍛冶利幸, 藤原泰之
2. 発表標題 ヒト血管内皮細胞株 EA.hy926細胞の線溶系に対する亜ヒ酸の抑制作用
3. 学会等名 日本薬学会第138年会
4. 発表年 2018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
--	---------------------------	-----------------------	----