

令和 6 年 4 月 29 日現在

機関番号：32206

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K06989

研究課題名(和文) 銅還元物質としてのセロトニンが持つ生理的役割の解明

研究課題名(英文) Physiological roles of serotonin as a biological reductant

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：モノアミン神経伝達物質であるセロトニンとドパミンは銅との酸化還元により活性酸素種を生み出す危険性を持つ。本研究ではモノアミン神経伝達物質と銅の酸化還元の制御に脳内ペプチドであるエンドルフィンEM1とコレシストキニンCCK8が関与する可能性を見出した。これらのペプチドはCu(II)とCu(I)の両銅イオンに対して親和性を持つ。この低分子ペプチドとしては珍しい性質により、EM1とCCK8はモノアミン神経伝達物質と銅の不必要な酸化還元を抑制し、酸化ストレスから脳を守る役割を持つと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アルツハイマー病などの神経変性疾患における細胞死に酸化ストレスが関与することは多くの研究者により指摘されているが、そもそも正常な状態で脳が酸化ストレスからどのようにして守られているか、防御機構の詳細は不明であった。本研究は、オピオイドや神経伝達物質として脳内に広く分布するペプチドが銅結合能を持ち、酸化ストレスの発生源となり得る銅とモノアミン神経伝達物質の酸化還元の制御に寄与し得ることを初めて示した。

得られた成果は、銅の恒常性、脳内酸化ストレス防御系、さらには酸化ストレスに起因する多くの疾患の発症メカニズムを解明する上での重要な基礎となる。

研究成果の概要(英文)：Serotonin and dopamine, which are monoamine neurotransmitters, have the risk of producing reactive oxygen species through redox reactions with copper. In this study, we found that the brain peptides endomorphin (EM1) and cholecystokinin (CCK8) may be involved in the regulation of redox between monoamine neurotransmitters and copper. These peptides have affinity for both copper ions, Cu(II) and Cu(I). Due to this unusual property for low-molecular-weight peptides, EM1 and CCK8 are thought to play a role in protecting the brain from oxidative stress by suppressing unnecessary redox between monoamine neurotransmitters and copper.

研究分野：生物物理学

キーワード：金属タンパク質 銅 酸化還元 酸化ストレス 神経変性疾患

1. 研究開始当初の背景

脳内において神経伝達物質として利用されているアミノ酸のうち、グリシンやグルタミン酸などはそのまま使われるのに対し、トリプトファンとチロシンは、側鎖芳香環に水酸基を付加するなどして、それぞれセロトニン、ドパミンとして利用されている。トリプトファンとチロシンは生体内条件ではほぼ酸化還元不活性な物質だが、水酸基の付加により酸化反応を受け易くなり、Cu(II)還元能を獲得する。酵素タンパク質などによる厳密な制御下でない状態でのCu(II)の還元は、活性酸素種の発生に繋がる。生体が安全なアミノ酸をそのまま使わずに、敢えて酸化還元活性な物質に変換して神経伝達物質として用いている理由について合理的な説明はされていない。

研究代表者は、過去に行った研究により、セロトニンがCu(II)を還元することで、細胞による銅取り込みに関与する可能性を示した(Saito et al. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 199, 110770, 2019)。銅は細胞の生命活動に必須の元素であるが、細胞内の還元的環境のため、細胞外にCu(II)として存在する銅をそのまま取り込むことができない。銅の細胞内取り込みを担うイオンチャネル copper transporter 1 (Ctr1)は、N末端細胞外領域にメチオニン残基に富む配列 (Met-rich 領域) を持ち、この領域がCu(I)選択的に銅を捕捉して、細胞内へ輸送する。このため、銅の細胞内輸送に先立ち、細胞外のCu(II)はCu(I)に還元される必要があるが、ヒトを含む哺乳類の場合、長年の探索にもかかわらず還元酵素が見つかっていなかった。研究代表者は、セロトニンによるCu(II)還元がCtr1のMet-rich領域により活性化されることを明らかにした。本知見はセロトニンが細胞外での酸化ストレスの発生を回避し、銅輸送に特化した還元を行い得ることを示唆する。

上記の様にセロトニンやドパミンのような酸化還元活性なモノアミン神経伝達物質はCu(II)を還元し、銅の細胞内取り込みに寄与する可能性を持つ。しかし、一方でモノアミンは酸化を受けることにより活性酸素種の発生源になる危険性も併せ持つ。モノアミンと銅の酸化還元を制御し、これに起因する酸化ストレスから脳を守る生体メカニズムは不明のまま残されている。

2. 研究の目的

- (1) セロトニンとCtr1の連携による銅の細胞内取り込み機構の詳細を明らかにする。
- (2) セロトニンやドパミンのような酸化還元活性なモノアミン神経伝達物質と銅の酸化還元を制御し、酸化ストレスから脳を守る役割を持つ生体物質の探索を行い、制御のメカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

- (1) 銅の輸送は細胞外でCu(II)、細胞内でCu(I)として行われるため、Ctr1による銅の細胞内取り込みは他のイオン輸送と比べて複雑であり、メカニズムの解明が遅れていた。Ctr1のアミノ末端細胞外ドメインには、Cu(II)結合部位であるHis-rich領域 (H1, H2) とCu(I)結合部位であるMet-rich領域 (M1, M2) が存在する。本研究では、主にM1領域に注目し、M1に相当するペプチドがセロトニンと銅、またはドパミンと銅の酸化還元反応に対してどのような影響を持つか調べた。また、M1の変異型ペプチドについても同様の検討を行い、個々のMet残基の役割を調べた。

MDHSHHMGMSYMDSNSTMQPSHHHPTTSASHSHGGGDSSMMMMPMPTFYFGFKNV

H1

M1

H2

M2

Ctrl1のアミノ末端細胞外ドメインのアミノ酸配列

(2) ドパミンと銅の間の不必要な酸化還元を抑制し、酸化ストレスから脳を守る役割を持つ生体物質の候補として、オピオイドペプチドであるエンドモルフィン 1 (EM1) と脳-腸ペプチドとして知られるコレシストキニン (CCK8) を取り上げ、これらの銅結合能、およびドパミンと銅の酸化還元抑制能を調べた。

4. 研究成果

(1) セロトニンと Cu(II)の間の酸化還元はゆっくりと進行するが、Ctrl の M1 領域に相当するペプチド (MGMSYMD) により顕著に促進され、セロトニンの酸化生成物である 5,5'-dihydroxy-4,4'-bitryptamine (DHBT) が速やかに生成された。M1 ペプチドのセロトニン-銅酸化還元促進能に対するアミノ酸配列改変の影響を調べたところ、次の結果が得られた。

3 個の Met 残基を全て Ala に置き換えると酸化還元促進能は消失した。Met を 1 残基のみ Ala に置き換えた場合、何れの Met を置き換えても酸化還元促進能は大きく低下したが、最も N 末端側の Met を変異させた際の影響が最も小さかった。以上の結果から、Ctrl に保存されている連続する MxM および MxxM 配列はセロトニン-銅酸化還元促進に重要であり、その中で特に MxxM 配列の Met による Cu(I)へのキレート配位は中心的役割を持つと予想された。また、酸化還元促進の原因が Met のチオエーテルによる銅の酸化還元電位上昇にあることを、サイクリックボルタンメトリーにより確認することができた。

一方、ドパミンと銅の酸化還元反応に対しても、M1 ペプチドは促進作用を持つことがわかった。脳神経系の広い範囲で、神経伝達物質が銅の細胞内取り込みに関わっている可能性がある。

(2) 内在性オピオイドペプチドであるエンドモルフィン 1 (EM1, Tyr-Pro-Trp-Phe) は Trp 残基のインドール環などを利用したカチオン- 相互作用により Cu(II)、Cu(I)両者に対して結合することが明らかになった。

ドパミンは Cu(II)添加によりキノンの構造を持つアミノクロムに変化し、その後、さらなる還元・酸化反応により種々の物質を経て黒色色素ニューロメラニンに至る。後者の過程では、活性酸素種の発生を促すセミキノラジカルが生じることが知られる。本研究では EM1 が、そのユニークな銅結合特性のため、ドパミンと銅の酸化還元反応を抑制する可能性の検証を行った。その結果、EM1 はドパミンの酸化還元反応のうち、特にアミノクロムからニューロメラニンが生じる過程を強く抑制することが明らかになった。

EM1 は配位結合ではなく、Cu(II)と Cu(I)に対する選択性が低いカチオン- 相互作用で銅と結合する。本研究で見出されたニューロメラニン以降の酸化還元反応の抑制効果は、EM1 が Cu(II)と Cu(I)の間の酸化還元を抑制することを示唆する。一般に、アミノ酸やペプチドなどの低分子物質は、Cu(II)または Cu(I)のいずれかに対して親和性を持つ。Cu(II)に対して選択性を持つキレーターに結合していた Cu(II)が Cu(I)に還元されると、その Cu(I)はキレーターから脱離し、活性酸素種の発生を促す。しかし、EM1 のような Cu(II)と Cu(I)両銅イオンに結合するペプチドは、酸化状態が変化しても銅イオンを保持し続けることができるため、酸化ストレスの発生原因となる無秩序な銅の酸化還元を抑制し、生体内抗酸化系に寄与する可能性がある。

(3) コレシストキニン(CCK8: Asp-Tyr-Met-Gly-Trp-Met-Asp-Phe)は脳内で神経伝達物質として用いられるペプチドである。1980年代にCCK8がドパミン神経終末からドパミンと共に放出されることが明らかとなり、異なる神経伝達物質の共存は多くの研究者の興味を惹くことになった。本研究ではCCK8の銅結合能に焦点を当て、酸化還元制御物質としての役割を検討し、以下の結果を得た。

まずCCK8はドパミンと銅の酸化還元反応に対する強い抑制作用を持つことがわかった。この抑制作用にはTyr2とMet3が必須であるが、Trp5からC末端側の残基は不要であった。実際、CCK8のN末端側半分の断片ペプチドCCKN4(Asp-Tyr-Met-Gly)でもCCK8と同程度の酸化還元抑制能を示した。CCKN4の金属結合様式について、さらに詳細な検討を行った結果、N末端アミノ基と脱プロトン化アミド基窒素に加えてMet3側鎖の硫黄原子がCu(II)との結合に用いられていることがわかった。一方、CCK8のC末端側半分の領域は酸化還元の抑制に直接的には関わらないが、脂質膜との結合に必要であることがわかった。ドパミンと共にニューロンから放出されたCCK8は、ドパミンと銅の不必要な酸化還元を抑制し、特に細胞膜を活性酸素種による毒性から保護する生理的役割を持つと予想される。

本研究により、従来、オピオイドや神経伝達物質として知られていた脳内ペプチドに、銅結合能を有するものが新たに見出され、酸化ストレスから脳を守る生体機構の一端を明らかにすることができた。EM1はカチオン-相互作用で、CCK8は異なる性質を持つ配位子を混用することで、それぞれCu(II)、Cu(I)両者に対して結合する性質を持つ。この性質のため、これらのペプチドはドパミンと銅の不必要な酸化還元を抑制すると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Kuwana Yusuke, Ashizawa Yuya, Ajima Miki, Nomura Takuya, Kakeno Mayu, Hirai Shunya, Miura Takashi	4. 巻 727
2. 論文標題 Micelle-associated endomorphin-1 has ability to bind copper in the oxidation state either Cu(II) or Cu(I)	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Archives of Biochemistry and Biophysics	6. 最初と最後の頁 109305 ~ 109305
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.abb.2022.109305	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6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、齋藤楓、大倉志織、佐々木裕望
2. 発表標題 銅還元物質としてのセロトニンとドパミン
3. 学会等名 金属の関与する生体反応シンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中山 ユミ、河内 良太、工藤 ななみ、野原 萌絵、熊田 知明、三浦 隆史
2. 発表標題 コレシストキニンCCK8に新たに見出された銅結合配列の生理的役割
3. 学会等名 日本薬学会第144年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 栗原 卓巳、瀧田 愛衣、三友 のぞみ、黒田 沙紀、三浦 隆史
2. 発表標題 モノアミン神経伝達物質と銅の酸化還元反応を促進する生体物質
3. 学会等名 日本薬学会第144年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 栗原 卓巳、青柳 理沙、英 咲希、三浦 隆史
2. 発表標題 セロトニンの銅還元作用に対するアミロイド ペプチドの影響
3. 学会等名 日本薬学会第143年会（札幌）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 濱田 愛衣、川上 礼愛、安嶋 美紀、三浦 隆史
2. 発表標題 2価と1価両銅イオンに結合するペプチドの抗酸化作用メカニズム
3. 学会等名 日本薬学会第142年会（名古屋）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 安嶋 美紀、芦澤 祐哉、野村 拓也、桑名 佑輔、掛布 眞由、平井 駿也、三浦 隆史
2. 発表標題 エンドモルフィンによる銅のレドックス制御メカニズム
3. 学会等名 日本薬学会第141回年会
4. 発表年 2021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
---------	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------