

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24651058

研究課題名(和文)カドミウムが引き起こす新規機構による小胞体ストレス

研究課題名(英文)Cadmium induces endoplasmic reticulum stress through novel mechanism

研究代表者

黄 基旭 (HWANG, GIWOOK)

東北大学・薬学研究科(研究院)・講師

研究者番号：00344680

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：小胞体関連蛋白質分解系(ERAD)によって分解される蛋白質(基質)のレベルはプロテアソーム阻害剤の処理によって増加するが、そのレベルはカドミウムの処理時でも増加した。カドミウムによるERAD基質量の増加はプロテアソーム阻害剤の存在下ではほとんど認められなかった。ERAD関連因子の発現を抑制したところ、ERAD基質量は増加し、それに伴ってBiPおよびCHOPのレベルも上昇した。また、カドミウム以外の小胞体ストレス誘導剤で細胞を処理してもERAD基質量はほとんど変動しなかった。これらのことは、カドミウムがERAD基質を細胞内に蓄積させることによって小胞体ストレスを誘導していることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：The molecular mechanisms underlying cadmium induced ER stress are not clearly understood. The levels of ERAD substrate were significantly increased by cadmium treatment, and were also increased by proteasome inhibitor treatment. However, the accumulation of ERAD substrates by cadmium was hardly accepted in cells treated with MG132. When the ERAD system was inhibited, levels of ER stress markers such as BiP and CHOP were significantly increased. ER stress-inducing agents such as tunicamycin, thapsigargin and dithiothreitol did not affect the levels of ERAD substrates. We conclude that cadmium may induce ER stress by inhibition of the function of the ERAD system and repression of the degradation of misfolded protein.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・放射線・化学物質影響科学

キーワード：トキシコロジー

1. 研究開始当初の背景

カドミウムはイタイイタイ病の原因物質として知られており、その健康被害が世界的に懸念されている。カドミウムによる細胞毒性に小胞体ストレスが深く関与しているが、そのストレス誘導に関わる分子機構はほとんど不明である。我々は、多くの小胞体ストレス関連因子がその発現抑制によってヒト胎児腎由来 HEK293 細胞に高いカドミウム感受性を与えることを見出している。同定された小胞体ストレス関連因子の中には、小胞体内で生じたミスフォールド蛋白質の除去機構として機能する小胞体関連分解系(以下 ERAD と略する)に関与する因子が多く含まれていた。このことは、カドミウムによる小胞体ストレス誘導に ERAD が何らかの形で関与している可能性を示唆するものである。本研究の成果はカドミウム毒性発現機構の解明にとどまらず、新しい細胞機能の発見にもつながるものと期待される。

2. 研究の目的

カドミウムによる小胞体ストレス誘導と ERAD との関わりを詳細に検討することによって、カドミウムによる小胞体ストレス誘導に関わる新規分子機構を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 細胞のカドミウムに対する感受性の検討

HEK293 細胞を剥がし、 2.5×10^5 cells / 2.3 ml D`MEM (10% FBS)となるように細胞数を合わせ、そこに transfection complex (OptiMEM 94 μ l に FBX06 遺伝子をターゲットする二種の 4 μ M siRNA を 3 μ l ずつ添加し、12 μ l の HiPerFect transfection reagent を入れた後、15 分以上インキュベートした)を添加し、2、3 回転倒混合させた後、10 分室温でインキュベートした。その後、2.1 ml の D`MEM を加え、96-well plate に 5×10^3 cells / 90 μ l / well となるように添加し、48 時間、37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ で培養後、塩化カドミウムを 10 μ l ずつ添加した。さらに 48 時間、37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ で培養した後、培地を取り除き、Alarma Blue 10% を含む D`MEM を 75 μ l を加え約 2 時間、37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ で培養後、蛍光プレートリーダーで蛍光測定した。(excitation 544 nm, emission 590 nm)

(2) 細胞へのプラスミド導入

5×10^5 cells の HEK293 細胞を 2 ml の D`MEM (- penicillin / streptomycin) で 6-well plate に播種し、24 時間、37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ で培養後、transfection complex 500 μ l (240 μ l OptiMEM に Lipofectamine 2000 10 μ l を混合し 5 分室温でインキュベートした後、DNA 1 μ g と OptiMEM 250 μ l を混合したものを合わせ、15 分室温でインキュベートして調整した。)を添加して、6 時間、37 $^{\circ}$ C、5% CO₂

で培養後、2 ml の D`MEM (+ penicillin / streptomycin) で置換し、24 時間、5% CO₂ で培養した。

(3) 蛋白質の抽出

6-well plate に 5×10^5 cell / 1.8 ml となるよう HEK293 細胞を播種し、24 時間、37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ で培養後、200 μ l / well のカドミウム (15~45 μ M) を入れ、37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ で培養した。その後、培地を除去し、一度 1 \times PBS で wash し、その後 0.5% NP40 buffer を 200 μ l / well 加え、氷上で粘性が弱くなるまでピペッティングを行い、回収した。その後 15 分間氷上でインキュベートした後、20,000 \times g、15 分、4 $^{\circ}$ C で遠心し、その上清を cell lysate とした。DC protein assay kit を用いて蛋白質を定量した後、蛋白質量が一定となるように滅菌蒸留水と 4 \times sample buffer で希釈した。5 分間 100 $^{\circ}$ C 加熱し、SDS-PAGE 用サンプルとした。

(4) イムノブロットティング

Transfer 後の membrane を blocking solution (5% スキムミルク、20 mM Tri-HCl (pH 7.5)、150 mM NaCl) で 3 回、それぞれ 10 分間振揺して洗浄した後に、二次抗体に浸し 1 時間振揺した。その後再び washing solution (0.5% スキムミルク、20 mM Tri-HCl (pH 7.5)、150 mM NaCl) で 3 回、それぞれ 10 分間振揺して洗浄した後に、Immobilon Western を用いて化学発光させ、Versa Doc Model 5000 により検出した。

(5) 免疫沈降

0.5% NP40 lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH7.4、150 mM NaCl、2 mM MgCl₂、0.5% NP40、protease inhibitor cocktail) で蛋白質を抽出した後、DC protein assay kit を用いて総蛋白質量を定量後、総蛋白質量が一定で、0.5% NP40 lysis buffer で希釈した。あらかじめ 3 回洗浄しておいた anti-Flag M2 affinity gel を加え、4 $^{\circ}$ C で 3 時間以上 incubate した。Beads を洗浄後、beads と 0.5% NP40 lysis buffer を合わせて 30 μ l となるように 0.5% NP40 lysis buffer を加え、更に 2 \times sample buffer (12.5% 濃縮ゲル調製用 buffer、10% glycerol、2% SDS、5% 2-mecaptoethanol、0.05% bromophenol blue) を加えた。100 $^{\circ}$ C で 5 分間加熱し、SDS-PAGE 用サンプルとした。

(6) PNGase 活性の測定

Flag-TCR プラスミドを導入した HEK293 細胞に 0.5% NP40 lysis buffer を加え、cell lysate を取った。その後、4 \times sample buffer (25% 濃縮ゲル調製用 buffer、20% glycerol、4% SDS、10% 2-mecaptoethanol、0.1% bromophenol blue) と合わせて cell lysate 100 μ g / 100 μ l とし、100 $^{\circ}$ C で 5 分間 incubate した後、そこにカドミウムおよ

び PNGase F 1 μ l (500 U)を加え、37 で更に1時間 incubate した。その後、100 で5分間加熱し、SDS-PAGE 用サンプルとした。

(7) 細胞内で脱糖鎖された TCR レベルの測定

Flag-TCR プラスミドを導入した HEK293 細胞 (5×10^5 cells / well) を 6-well plate に播き、24 時間インキュベートした後に、cycloheximide (100 μ g/ml) で 3 時間処理した。その後、新しい培地に交換し、MG132 (10 μ M) とカドミウム (30 μ M) を入れ、0、8、10、12 時間インキュベートした後に、0.5% NP40 lysis buffer を加え cell lysate を取って、イムノプロットングを行った。

4. 研究成果

(1) カドミウムが ERAD 機能に与える影響

カドミウムが ERAD の機能に与える影響を検討するために、ERAD によって分解される基質蛋白質である NHK および TCR の細胞内レベルを調べた。その結果、カドミウムはこれら蛋白質のレベルを共に濃度依存的に増加させた。このことから、カドミウムが ERAD 基質の分解を抑制する可能性が示唆された。そこで、蛋白質合成阻害剤であるシクロヘキシミド (CHX) 処理により、TCR および NHK の生合成を止めた状態で、カドミウムが NHK および TCR の分解速度に与える影響を検討した。その結果、カドミウム処理によって ERAD 基質である NHK および TCR の分解速度の遅延が認められた。このことは、カドミウムが ERAD 機能を抑制することを強く支持している。カドミウムによる ERAD 基質 NHK および TCR レベルの上昇にプロテアソーム分解系が関与することを確認するために、プロテアソーム阻害剤である MG132 の処理がカドミウムによる NHK および TCR レベルの上昇に与える影響を検討した。その結果、TCR および NHK の細胞内レベルの MG132 処理による著しい増加が観察された。しかし、MG132 存在下ではカドミウム処理をしても TCR および NHK のレベルはそれ以上はほとんど増加しなかった。このことは、TCR および NHK が主にプロテアソームで分解されており、この分解系がカドミウムによる ERAD 基質レベルの増加に関与していることを示唆している。

(2) ERAD の機能阻害が小胞体ストレスの誘導に与える影響

カドミウムが ERAD 機能を抑制することによって小胞体ストレスを誘発している可能性が示唆された。そこで、ERAD の機能阻害が小胞体ストレスの誘導に与える影響を検討した。VCP 複合体は ERAD 基質を小胞体から細胞質側へ引き出す機能を担っていることが知られている。この VCP の機能を抑制すると、ERAD 基質が小胞体から細胞質側への輸送ができず、小胞体内に蓄積することによって小

胞体ストレスが誘導されると予想される。そこで、VCP の発現抑制が小胞体ストレスマーカー蛋白質である BIP および CHOP のレベルに与える影響を検討した。その結果、VCP の発現抑制によって TCR のレベルが上昇し、同時に BIP および CHOP のレベルも増加することが確認された。また、プロテアソーム阻害剤である MG132 処理によっても、VCP 発現抑制時と同様の結果が得られた。このことは、ERAD 基質の細胞質側での分解が抑制されることによって小胞体ストレスが誘導される可能性を示している。

(3) 種々の小胞体ストレス誘導剤が TCR または NHK の細胞内レベルに与える影響

Dithiothreitol (DTT) はジスルフィド結合の破壊作用を、thapsigargin (TG) は小胞体内カルシウムの恒常性を乱す作用を、tunicamycin (TM) は蛋白質の糖鎖付加の阻害作用を持ち、いずれも小胞体ストレスを誘導することが知られている。しかし、これらの小胞体ストレス誘導剤が ERAD 機能に与える影響は不明である。そこで、カドミウム以外の小胞体ストレス誘導剤が ERAD の機能に与える影響を検討するために、これらの小胞体ストレス誘導剤処理が TCR または NHK の細胞内レベルに与える影響を検討した。その結果、カドミウム処理は NHK および TCR レベルを顕著に上昇させたのに対し、小胞体ストレス誘導剤 DTT、TG または TM で処理した際には小胞体ストレスマーカーである CHOP のレベルは著しく増加したにもかかわらず NHK レベルはほとんど影響を受けず、TCR のレベルが TG 処理によって僅かに増加したのみであった。

(4) カドミウムによる ERAD 機能阻害に関わる分子機構

ERAD は小胞体内で生じたミスフォールド蛋白質の分解系であり、以下の五つのステップで構成されている。ミスフォールドされた蛋白質は、ユビキチン化酵素によってユビキチン化され、VCP 複合体によって小胞体から細胞質側へ引き出される。その後、脱糖鎖酵素によって脱糖鎖され、プロテアソームへリクルートされた後に、プロテアソームによって分解される。そこで、カドミウムの ERAD 機能阻害作用に関わる分子機構を解明するために、カドミウムが ERAD の各ステップに与える影響を検討した。その結果、カドミウムは ERAD 基質蛋白質である TCR ユビキチン化、小胞体から細胞質側への引き出し、プロテアソームへのリクルートおよびプロテアソーム活性には影響を与えなかった。

細胞質側へ引き出された基質蛋白質がプロテアソームで分解されるためには、蛋白質に付いている糖鎖が解離される必要がある。そこで、カドミウム処理が細胞内で脱糖鎖された ERAD 基質のレベルに与える影響を検討した。Flag-TCR プラスミドを導入した細胞

胞を、まず、蛋白質合成阻害剤である CHX で 3 時間処理し、細胞内の TCR が十分に分解されるまで培養した後に、新しい培地に交換した。そして、MG132 添加によって TCR の分解を止めた状態で、新しく生成された TCR に付いている糖鎖の解離にカドミウムが与える影響を検討した。その結果、カドミウム非存在下では、上の糖鎖修飾を受けている TCR のレベルが増加すると共に、脱糖鎖によって糖鎖がついていない TCR のレベルも顕著に増加した。一方、カドミウム 30 μ M で処理することによって下の糖鎖がついていない TCR のレベルがカドミウム未処理時に比べて低下した。このことから、カドミウムは ERAD 基質の脱糖鎖反応を抑制すると考えられる。

(5) カドミウムが PNGase の活性に与える影響

小胞体内から細胞質側に引き出された基質蛋白質がプロテアソームで分解されるためには、脱糖鎖酵素である PNGase によって蛋白質の糖鎖が解離される必要があるという報告がある。そこで、カドミウム処理が PNGase の活性に与える影響を検討した。試験管内でカドミウム存在下また非存在下で、Flag-TCR を含む cell lysate と PNGase を混ぜて、37 度で 30 分間 incubate した後に、イムノプロットングを行った。その結果、PNGase を添加していない場合は、TCR は主に四本の糖鎖が付いている形で存在していたが、そこに脱糖鎖酵素 PNGase を添加すると TCR から糖鎖が解離し、バンドが下にシフトして、主に糖鎖 1 本または糖鎖が付いていない形になった。一方、カドミウムを PNGase と同時に添加すると、PNGase による TCR の脱糖鎖が一部抑制され、糖鎖が 3 本ついている TCR のバンドが検出されると共に、1 本の糖鎖が付いている TCR のバンドが減少し、2 本の糖鎖が付いているバンドが著しく増加した。この結果はカドミウムが PNGase の活性を抑制することを示している。

(6) PNGase の高発現が細胞のカドミウム感受性に与える影響

カドミウムが脱糖鎖酵素 PNGase の活性を抑制することによって ER ストレスを誘導している可能性が示唆された。そこで、PNGase の C 末端に myc タグを融合した PNGase-myc プラスミドを HEK293 細胞に導入して、PNGase の高発現が同細胞のカドミウム感受性に与える影響を調べたところ、PNGase を発現させた細胞はカドミウムに対して顕著な耐性を示した。以上のことから、カドミウムは PNGase の活性を抑制することによって小胞体ストレスを引き起こし、細胞毒性を増強すると考えられる。

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 0 件)

[学会発表](計 8 件)

1. 黄基旭、杜可、永沼章、Analysis of Molecular Mechanisms Involved in Induction of Endoplasmic Reticulum Stress by Cadmium、53th Annual Meeting of the Society of Toxicology、2014 年 3 月 25 日、Phoenix (米国)
2. 黄基旭、Investigation of the Mechanisms Involved in Cadmium-induced Endoplasmic Reticulum Stress、2013 年 11 月 1 日、Buyeo (韓国)
3. 黄基旭、杜可、永沼章、ユビキチンリガーゼ FBX06 によるカドミウム毒性軽減作用とその分子機構、メタルバイオサイエンス研究会 2013、2013 年 9 月 27 日、静岡
4. 杜可、永沼章、黄基旭、カドミウムによる小胞体ストレス誘導と小胞体関連分解系との関わり、メタルバイオサイエンス研究会 2013、2013 年 9 月 27 日、静岡
5. 杜可、黄基旭、永沼章、カドミウム誘発性小胞体ストレスにおける小胞体関連分解系の関与、日本薬学会第 133 年会、2013 年 3 月 30 日、横浜
6. 杜可、黄基旭、永沼章、カドミウムによる小胞体ストレス誘導：小胞体関連分解系 (ERAD) の関わり、平成 24 年度メチル水銀・カドミウム研究ミーティング、2012 年 12 月 19 日、東京
7. 杜可、黄基旭、永沼章、カドミウム誘発性小胞体ストレス軽減因子としてのユビキチンリガーゼ FBX06 の役割、フォーラム 2012：衛生薬学・環境トキシコロジー、2012 年 10 月 25 日、名古屋
8. 杜可、黄基旭、永沼章、カドミウムによる小胞体ストレスとユビキチンリガーゼ FBX06 との関わり、第 31 回生体と金属・化学物質に関する研究会(チョークトーク 2012)、2012 年 8 月 24 日、廿日市

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 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 0 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
<http://www.pharm.tohoku.ac.jp/~seitai/seitai-index.html>

6．研究組織

(1)研究代表者

黄 基旭 (HWANG, GI-WOOK)
東北大学・大学院薬学研究科・講師
研究者番号：00344680