

機関番号：15401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24651061

研究課題名(和文) チューブリンは環境化学物質の新規毒性標的となりうるか？

研究課題名(英文) Can tubulin be a novel target of toxicity of environmental chemicals ?

研究代表者

古武 弥一郎 (Kotake, Yaichiro)

広島大学・医歯薬保健学研究院(薬)・准教授

研究者番号：20335649

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)：これまでにチューブリンが化学物質の毒性ターゲットになるのは重合、脱重合の平衡をかく乱する場合に限局されており、それ以外の場合に毒性ターゲットになることは考えられてこなかった。本研究では、環境化学物質の毒性標的としてチューブリンに着目し、チューブリンを毒性ターゲットとする化学物質の探索を行った。チューブリンのアセチル化、ユビキチン化に対する様々な環境化学物質の影響を調べたところ、ユビキチン化を阻害する物質が見出された。チューブリンのタンパク寿命延長は細胞毒性に繋がる可能性があり、環境化学物質の毒性標的となる可能性が考えられる。

研究成果の概要(英文)：Tubulin as a target of toxicity was limited to the case of disturbance of polymerization/depolymerization, and it was not expected that tubulin is a target in other cases. In the present study, we focused on tubulin as a target of toxicity and searched chemicals acting on tubulin. When we examined the effects of environmental chemicals on acetylation and ubiquitination of tubulin, we found chemicals inhibiting tubulin ubiquitination. Life extension of tubulin accompanied with the inhibition of ubiquitination will lead to cytotoxicity, and it raises the possibility that some kinds of environmental chemicals acts on tubulin and exerts the toxicity.

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：チューブリン 環境化学物質 ユビキチン化

1. 研究開始当初の背景

古くから知られている細胞骨格タンパクであるチューブリンは、重合して微小管を構成している。チューブリンと微小管の間で重合と脱重合を繰り返し、重合・脱重合の動的平衡により微小管の構造を維持している。そのため、チューブリンのはたらきを阻害する化学物質は生命の維持にとって致命的となる。チューブリンの重合を安定化するタキソール、あるいは反対に重合を阻害するコルヒチンのような物質は、強力な毒性を惹起することが知られているが、従来、このようなチューブリンの重合・脱重合を直接阻害する物質を除いて、チューブリンに作用し、毒性発現する環境化学物質は見出されていなかった。

タキソールやコルヒチンのように重合/脱重合を直接阻害する強力な作用を持っていなくても、チューブリン翻訳後修飾に影響を与えるような一見軽微にみえる作用を有する化学物質が、チューブリンの動態や微小管の機能異常を誘発し、その慢性的な毒性発現に関与しているのではないかと考えた。実際に低濃度化学物質を細胞に曝露し、チューブリン抗体で免疫染色すると、細胞死が起きる時間よりかなり前に、細胞骨格が崩れている場合がよくあることに我々は気付いた。

一方我々は、様々な化学物質の毒性メカニズムについて報告してきたが、近年、ある種の化学物質が、チューブリンのユビキチン化を阻害する可能性を見出した。これは、ユビキチン化阻害という重合・脱重合以外のメカニズムでチューブリンに作用し、毒性発現する環境化学物質が存在することを意味する。ユビキチン化阻害はチューブリンタンパク質の寿命を延長し、細胞毒性に繋がることが知られている。例えば、他の翻訳後修飾もチューブリンおよび微小管の機能と密接に関わっているため、その阻害や亢進は細胞機能に異常をきたす可能性が考えられる。

また、チューブリンにおいてユビキチン化されるリジン残基の周辺には、アセチル化部位やアミノ酸化部位が存在するため、これらの部位における翻訳後修飾の亢進はユビキチン化を阻害し、チューブリンタンパク質寿命

の延長により細胞毒性を惹起する可能性が考えられる。

これまでに環境化学物質の毒性標的として様々なタンパク質が研究されてきたが、チューブリンが化学物質の毒性ターゲットになるのは重合、脱重合の平衡をかく乱する場合に限局されており、それ以外の場合に毒性ターゲットになることは考えられてこなかった。

2. 研究の目的

以上の背景を踏まえて本研究では、環境化学物質の毒性標的としてチューブリンに着目し、チューブリンを毒性ターゲットとする化学物質を同定することにより、ヒトに与えるリスク評価を行う。また、化学物質がチューブリンに作用することによる影響を、チューブリン重合のみならず、微小管動態異常、チューブリンタンパク質の寿命延長に基づく不溶性チューブリン増加の観点から検討し、環境化学物質によるチューブリンを介した新規毒性とそのリスク影響を解明することが、本研究の目的である。

3. 研究の方法

3-1. チューブリンは様々な翻訳後修飾をうける部位がほぼ明らかになっている。そこで数十種類の環境化学物質について、-チューブリンのユビキチン化およびアセチル化に対する影響について調べる。神経芽細胞腫 SH-SY5Y に当該物質を添加し、アセチル化についてはアセチル化チューブリン特異的抗体を用いたウエスタンブロットにより調べる。また、ユビキチン化については抗-チューブリン抗体を用いて免疫沈降を行った後、抗ユビキチン抗体を用いてウエスタンブロットを行うことにより調べた。

3-2. チューブリンのユビキチン化に影響を与える物質については、チューブリンをユビキチン化するユビキチンリガーゼとして報告されている parkin のユビキチン化活性についても調べた。parkin は自身のユビキチン化も行うため、抗 parkin 抗体を用いて免疫沈降を行った後、抗ユビキチン抗体を用いてウエスタンブロットを行うことにより調

べた。

3-3. チュープリンの高次構造変化は溶解性を低下させ、不溶性チュープリンを増加させる可能性がある。不溶性チュープリンは微小管重合に参加できず、その蓄積は毒性に繋がることが予想される。そこで、1% Nonidet P-40 不溶性画分 (TNE 不溶性画分) を用いてウエスタンブロットを行い、翻訳後修飾かく乱物質による不溶性チュープリン増加を調べた。

4. 研究成果

4-1. パーキンソン病脳脊髄液中で増加する 1-ベンジルテトラヒドロイソキノリン (1BnTIQ) という環境中にも存在する化学物質、およびパーキンソン病モデル動物作製に汎用されるモデル物質 MPTP の活性代謝物 MPP+ が各々 10 μ M で α -チュープリンのユビキチン化を阻害することが明らかとなった。アセチル化に関して影響を与える物質は見出されなかった。また、その他の環境中に存在する代表的な化学物質に関しては、チュープリンのアセチル化およびユビキチン化に影響を与えるものは見出されなかった。

4-2. α -チュープリンのユビキチン化を阻害することが示された 1BnTIQ および MPP+ について、 α -チュープリンのユビキチン化を担う parkin の自己ユビキチン化活性を調べたところ、10 μ M MPP+ は parkin のユビキチン化を阻害した。この結果から、低濃度 MPP+ はユビキチンリガーゼ parkin の活性を低下させることにより、基質であるチュープリンのユビキチン化が阻害されることが示唆された。

4-3. MPP+ によるユビキチン化阻害がどのような影響をもたらすかを調べる目的で、チュープリンの不溶化について検討を行った。その結果、低濃度 MPP+ は TNE 不溶性画分におけるチュープリンおよび parkin を増加させることが明らかとなった。

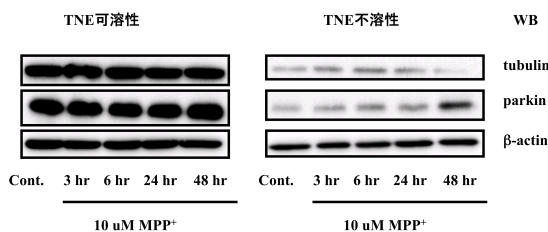


図. 低濃度 MPP+ によるチュープリンおよび parkin の不溶化

以上の結果より、本研究において一般的な環境化学物質によるチュープリンの翻訳後修飾阻害は見出されなかったものの、パーキンソン病関連物質 MPP+ が低濃度でチュープリンのユビキチン化を阻害し、この原因はチュープリンのユビキチン化を担う E3 リガーゼである parkin のユビキチン化活性低下による可能性が示唆された。また、おそらくこの結果として、チュープリンの不溶化が起きていることが明らかとなった。このようなチュープリンのユビキチン化阻害およびそれに伴うチュープリンの不溶化は、化学物質の新たな毒性ターゲットとなりうる可能性が考えられる。

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6件)

1. Isomura M, Kotake Y, Masuda K, Miyara M, Okuda K, Samizo S, Sanoh S, Hosoi T, Ozawa K, Ohta S. Tributyltin-induced endoplasmic reticulum stress and its Ca²⁺-mediated mechanism. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2013 Oct 1;272(1):137-46. doi: 10.1016/j.taap.2013.05.026. (査読有)

2. Ishida K, Kotake Y, Miyara M, Aoki K, Sanoh S, Kanda Y, Ohta S. Involvement of decreased glutamate receptor subunit GluR2 expression in lead-induced neuronal cell death. *J Toxicol Sci.* 2013;38(3):513-21.

https://www.jstage.jst.go.jp/article/jts/38/3/38_513/_article (査読有)

3. Yamada S, Kotake Y, Sekino Y, Kanda Y. AMP-activated protein kinase-mediated glucose transport as a novel target of tributyltin in human embryonic carcinoma cells. *Metallomics*. 2013 May;5(5):484-91. doi: 10.1039/c3mt20268b. (査読有)

4. Kotake Y. Molecular mechanisms of environmental organotin toxicity in mammals. *Biol Pharm Bull*. 2012;35(11):1876-80. https://www.jstage.jst.go.jp/article/bpb/35/11/35_b212017/_article (査読有)

5. Klionsky DJ, . . . , Kotake Y, . . . et al. (1270 名中 548 番目), Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy*. 2012 Apr;8(4):445-544. <https://www.landesbioscience.com/journals/autophagy/article/19496/?nocache=1671244998> (査読有)

6. Sanoh S, Horiguchi A, Sugihara K, Kotake Y, Tayama Y, Uramaru N, Ohshita H, Tateno C, Horie T, Kitamura S, Ohta S. Predictability of metabolism of ibuprofen and naproxen using chimeric mice with human hepatocytes. *Drug Metab Dispos*. 2012 Dec;40(12):2267-72. doi:10.1124/dmd.112.047555. (査読有)

〔学会発表〕(計6件)

1. 宮良政嗣、古武弥一郎、太田 茂 低濃度 MPP+によるオートファジー阻害を介した神経毒性メカニズムの解明 日本薬学会第134年会 2014年3月27-30日 熊本

2. 古武弥一郎 有機スズによるグルタミン酸受容体発現減少を介した神経影響 メタロバイオサイエンス 2013 2013年9月

26-27日 静岡

3. Miyara M, Kotake Y, Ohta S. Low concentration of Parkinson's disease-related neurotoxin MPP+ inhibits autophagy. The 13th International Congress of Toxicology 2013年6月30日-7月4日 ソウル(韓国)

4. 宮良政嗣、古武弥一郎、太田 茂 パーキンソン病関連神経毒 MPP+低濃度曝露によるオートファジー阻害 第40回日本毒性学会学術年会 2013年6月17-19日 千葉

5. 古武弥一郎、幸田龍紀、宮良政嗣、太田 茂 パーキンソン病関連化学物質による神経毒性メカニズム フォーラム 2012 衛生薬学・環境トキシコロジー 2012年10月25-26日 名古屋

6. 古武弥一郎 パーキンソン病関連神経毒性物質によるチュープリンのユビキチン化阻害とオートファジー 第39回日本毒性学会学術年会 2012年7月17-19日 仙台

6. 研究組織

(1)研究代表者

古武 弥一郎 (KOTAKE YAICHIRO)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・

准教授

研究者番号：20335649