

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：18001

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2016

課題番号：24790533

研究課題名(和文)酸化ストレス性ミトコンドリア障害に対するグルタチオントランスフェラーゼの役割

研究課題名(英文)The role of a membrane-bound glutathione transferase in the oxidative stress-induced mitochondria dysfunction

研究代表者

今泉 直樹 (IMAIZUMI, Naoki)

琉球大学・医学部・助教

研究者番号：10547384

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ミトコンドリア膜結合性グルタチオントランスフェラーゼ(mtMGST1)の未知機能を解明するために、酸化ストレス性ミトコンドリア膜透過性遷移(MPT)孔(pore)との関連性について注目した。酸化ストレスによるMPT poreの開口には、mtMGST1のジスルフィド結合、adenine nucleotide translocase(ANT)、cyclophilin D(CypD)との高分子蛋白複合体(MPC)の形成、ミトコンドリア膜の構成脂質であるカルジオリピンが関与していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we aimed to confirm the role of mtMGST1 in the oxidative stress-induced mitochondrial permeability transition (MPT) pore opening. We found that the inner membrane mtMGST1 and MPT regulator proteins such as ANT and CypD are involved in the oxidant peroxynitrite (PON)-induced MPT pore opening, which is mediated by a disulfide bond, and that PON induces mitochondrial swelling accompanied by formation of high molecular weight proteins complex (MPC) of mtMGST1, ANT, and CypD via caldiolipin(CL), which is a phospholipid exclusively located in mitochondria.

研究分野：臨床検査

キーワード：グルタチオントランスフェラーゼ ミトコンドリア 透過性遷移 酸化ストレス

## 1. 研究開始当初の背景

薬物代謝第2相の解毒酵素であるグルタチオントランスフェラーゼ(GST)は、抗がん薬、化学発がん物質、脂質過酸化物質等のグルタチオン抱合を触媒する他に、グルタチオンペルオキシダーゼや結合蛋白等の役割を持つ多機能酵素である。GSTには多くのアイソザイムが存在するが、ミクロソーム膜結合性 GST(MGST1)は細胞質性 GST と異なり、分子量 17.1kDa のホモ 3 量体で、サブユニットは膜を 4 回貫通した形で存在する。また、モノマー当たり 1 個の SH 基を有し、この SH の修飾により活性化される (Toxicology of glutathione transferases, Taylor & Francis, p294-311, 2007)。注目すべきは、通常多くの酵素が酸化ストレスによって酵素活性が失活するのに対して、MGST1 は酵素活性が上昇するというユニークな特徴を持っている。我々は、長年ミクロソーム MGST1 の活性化を研究してきており、MGST1 が酸化ストレスによって活性化されることを最初に報告している (Aniya et al. J Biol Chem, 1989)。ミトコンドリア外膜にはミクロソームの MGST1 と同じ GST が存在している事が知られていたが、内膜への存在については不明であった。我々は MGST1 ポリクローナル抗体でミトコンドリア内膜にも MGST1 が存在している事を確認し、これらのミトコンドリア膜結合性 MGST1 (mtMGST1) が酸化ストレス性の肝障害時に活性化されることやアポトーシスを引き起こすチトクロム C のミトコンドリアからの遊離を MGST1 抗体が抑制すること (Lee et al. Toxicol Appl Pharmacol, 2008)、さらに、酸化剤で誘導されるミトコンドリア膜透過性遷移 (MPT) が GST 阻害剤によって抑制されること (Hossain et al. Toxicol Appl Pharmacol, 2009) を発見し、mtMGST1 がミトコンドリア膜透過性遷移 (MPT) に関係していることを初めて報告した。ミトコンドリア膜透過性遷移 (MPT) は膜の急激な透過性亢進現象で、アポトーシスやネクロトーシスを起こす重要な要因であり、この MPT 制御の破綻は多くの病因、薬物毒性の要因となっている。MPT は  $Ca^{2+}$  や酸化ストレス (酸化物質) によりミトコンドリア内膜に存在する MPT 孔 (pore) が開口 (opening) することにより引き起こされると考えられている (Lemasters JJ. J Gastroenterol Hepatol. 2007)。しかし、MPT pore の構成成分及び pore opening メカニズムについてはまだはっきりとは解明されていない。我々は上記に述べたように mtMGST1 が GST としての機能の他に MPT に関与するという新機能を見出したが、さらに、内膜 mtMGST1 は MPT 調節タンパクである adenine nucleotide translocase (ANT) や Cyclophilin D (CypD) の阻害剤である ADP やシクロスポリン A で阻害され、これらの調節蛋白と会合 (interaction) していること (Ulziikhishing et al. Life Sci, 2010)、MGST1 がミトコンドリア特異的膜脂

質であるカルジオリピン (CL) との相互作用により活性化されること (Shimoji et al. Biol Pharm Bull. 2011)、酸化ストレス性 MPT 誘導時に mtMGST1 は ANT、CypD とジスルフィド結合を介した高分子を形成し、MPT pore として機能していること (Imaizumi et al. Arch Biochem Biophys 2011) を報告した。これらの研究成果より、mtMGST1 は酸化ストレス時に引き起こされる MPT pore の主成分として機能していることが強く示唆され、mtMGST1 がミトコンドリアを介する酸化ストレス性肝障害の regulator として機能することが推定された。これらを踏まえて、本研究は mtMGST1 が MPT pore 構成要素として働いているかを詳細に解明し、酸化ストレス性アポトーシス制御の物質 (治療薬) の開発へと展開するための基礎研究を行う。

## 2. 研究の目的

本研究は mtMGST1 が酸化ストレス性 MPT pore の構成成分として働いているかを明らかにし、そのメカニズムについて解明する。そして、MPT 調節物質、すなわちミトコンドリア性アポトーシスの制御を焦点とした治療薬、肝保護薬の開発を視野にいれ、期間内に以下のことを明らかにする。

- (1) ラット肝ミトコンドリア内膜 mtMGST1 や MPT 調節タンパクを精製する。
- (2) 精製された mtMGST1、MPT 調節タンパク (ANT) とカルジオリピンを含むリン脂質を用いて人工膜を作製し、酸化剤を作用させた場合、これらの蛋白が MPT pore を形成するかを検討し、機能を解析する。
- (3) 精製したラット肝ミトコンドリア内膜 mtMGST1 の一次構造を解明する。
- (4) 培養細胞を用いて MPT と mtMGST1 との関係を明らかにする。
- (5) 酸化ストレス性肝障害を誘導させたラットに GST 阻害剤を投与した際の肝障害、MPT、アポトーシス、GST 活性への影響について調べる。

## 3. 研究の方法

- (1) MtMGST1、MPT 調節タンパクの精製、一次構造決定と機能解析  
ミトコンドリア内膜から mtMGST1 と ANT を分離精製し、リン脂質を用いて人工ミトコンドリア膜を再構成する。これを用いて MPT pore opening のメカニズムを解明する。また、精製した mtMGST1 のアミノ酸配列 (一次構造) を同定し、ミクロソーム MGST1 との相同性を明らかにする。
- (2) 培養細胞やストレス性肝障害に対する阻害剤の MPT への影響について  
MtMGST1 が酸化ストレス性 MPT pore の構成成分として働いているか培養細胞を用い MPT 誘導現象について明らかにする。また、酸化ストレス性肝障害を誘導させたマウスに GST 阻害剤や天然バイオ資源、その抽出物及び成

分を投与した際の肝障害、MPT、アポトーシス、GST 活性への影響について明らかにする。

#### 4. 研究成果

##### (1) MtMGST1、MPT 調節タンパクの精製、一次構造決定と機能解析

ラット肝ミトコンドリア内膜からカラムクロマトグラフィーにて単一蛋白の mtMGST1 を精製し、2 種類の ANT (30 kDa と 48 kDa) の部分精製画分を得た。そして、精製した mtMGST1 と 2 種類の ANT にリン脂質や酸化剤である peroxyinitrite (PON) の存在/非存在下で反応させ、抗 MGST1、抗 ANT 抗体を用い、Western blot にて高分子蛋白 (HMP) の有無を確認した。すると mtMGST1 と 48 kDa の ANT、cardiolipin (CL) を混合し、PON を作用させた場合のみ HMP の形成が確認された。これに 2-mercaptoethanol を作用させると HMP は消失した。一方、mtMGST1 と 30 kDa の ANT とリン脂質、PON を反応させた場合や、MGST1 と 2 種類の ANT 単独を反応させた場合では HMP は確認されなかった。以上のことは、CL を多く含むミトコンドリア内膜では酸化ストレスにより mtMGST1 が特異的に 48 kDa の ANT とジスルフィド結合を介して MPC を形成することを裏付けた。

ミトコンドリア内膜に存在する mtMGST1 の一次構造についての検討では、まず、内膜 mtMGST1 の効率的な精製方法の検討を行った。ゲノムデータベースより mtMGST1 と推測されるターゲットの検索を行ったが決定に至る情報が得られず、ラット肝臓ミトコンドリアからの内膜 mtMGST1 の効率的な精製方法の検討を行うこととした。この検討により最適と考えられる可溶化剤、pH、緩衝液、各種カラムへの吸着条件を設定した。さらに、mtMGST1 は GSH カラムへの親和性があり、このカラムを用いることによって内膜と外膜の mtMGST1 を分離することが可能であることが示唆された。次にミトコンドリア内膜、外膜各々から mtMGST1 を精製したところ、その比活性に違いが見られ、電気泳動でも分子量、等電点にわずかな違いが観察された。N 末端アミノ酸解析では、十分量のタンパクを検出に用いたにもかかわらず検出感度以下となったため N 末端アミノ酸が翻訳後修飾によりブロックされている可能性が示唆された。内膜、外膜 mtMGST1 の違いの理由として、構造的な違い、周囲の環境 (他のタンパクや脂質との相互作用)、修飾の影響などが推測され、それぞれ異なる構造を持つ可能性が示唆された。また、mtMGST1 の効率的な精製方法はまだ確立されておらず、14 週齢前後のラットから精製した mtMGST1 の比活性が高いことが明らかとなり、今後の抗体作製、人工膜再構成実験等の研究の進展に大きく影響する結果を得られた。

(2) 培養細胞やストレス性肝障害ラットに対する阻害剤の MPT への影響について酸化ストレス性肝障害モデルの検討を行うため、アセトアミノフェン(AAP)を用いた実験系の有用性を検討した。ラット肝ミトコンドリアに酸化ストレスを与えた際のミトコンドリア膨化反応(mitochondria swelling)及びマウスを用いたアセトアミノフェン肝毒性を天然抗酸化物質であるジメルミ酸(DMA)を用いて評価したところ、MPT の変化と毒性の軽減作用が確認された (Fig.1 and 2)。加えて、マウスより分離した初代培養細胞を用い、酸化ストレス性肝障害と MPT の関係性についての検討を行った。この評価系においてジメルミ酸により MPT の変化と毒性の軽減作用が確認され、酸化ストレス性肝障害を抑えることが示唆された。

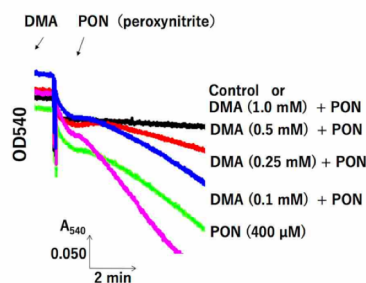


Fig. 1. 酸化ストレスによるラット肝ミトコンドリア膨化反応に対する DMA の影響

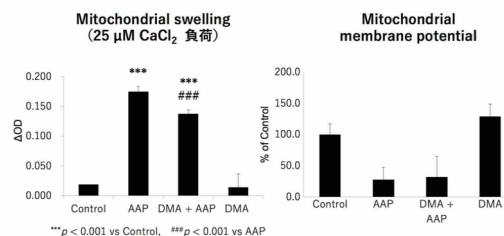


Fig. 2. AAP 投与マウスの肝 MPT に対する DMA の影響

以上のことから、mtMGST1、ANT、CypD との MPC 形成を阻害することによって肝障害軽減作用を有していることが確認された。すなわち、mtMGST1 が酸化ストレス性ミトコンドリア障害に深く関係していることが証明された。

#### 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 2 件)

- ① Kang Kwang Lee, Naoki Imaizumi, Sally R. Chamberland, Nathan N. Alder, Urs A. Boelsterli. Targeting

mitochondria with methylene blue protects mice against acetaminophen-induced liver injury. Hepatology. 査読有 1 (2015) 326-336. DOI: 10.1002/hep.27385.

- ② Naoki Imaizumi, Kang Kwang Lee, Carmen Zhang, Urs A. Boelsterli. Mechanisms of cell death pathway activation following drug-induced inhibition of mitochondrial complex I. Redox Biology. 査読有 4 (2015) 279-288  
DOI:10.1016/j.redox.2015.01.005.

[学会発表] (計 3 件)

- ① 今泉 直樹、上原 安紀子、崎浜 秀悟、中尾 浩史. 酸化ストレス性ミトコンドリア機能障害に対するジメルミ酸の影響. 第 42 回日本毒性学会学術年会. 2015 年 6 月 29 日～7 月 1 日 石川県立音楽堂・金沢市アートホール・ホテル日航金沢 (石川県・金沢市)
- ② 今泉 直樹、渡慶次 愛、呉屋 純乃、上原 安紀子、崎浜 秀悟、安仁屋 洋子、中尾 浩史. ジメルミ酸のミトコンドリア酸化ストレスに対する影響. 第 40 回日本毒性学会学術年会. 2013 年 6 月 17 日～7 月 19 日 幕張メッセ国際会議場 (千葉県・千葉市)
- ③ Naoki Imaizumi, Shugo Sakihama, Kenya Matsuda, Hiroshi Nakao, Yoko Aniya. Formation of disulfide-linked high molecular protein complex by glutathione transferase in the mitochondrial inner membrane and adenine nucleotide translocator through peroxynitrite. The 6th International Congress of Asian Society of Toxicology. 2012 年 7 月 17 日～7 月 20 日 仙台国際センター (宮城県・仙台市)

[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

6. 研究組織

(1) 研究代表者  
今泉 直樹 (IMAIZUMI, Naoki)  
琉球大学・医学部・助教  
研究者番号：10547384

(2) 研究分担者 ( )

研究者番号：

(3) 連携研究者 ( )

研究者番号：

(4) 研究協力者 ( )