

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 16 日現在

機関番号：32653

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24870025

研究課題名(和文)線虫をモデルとした重金属ストレス感知システムの同定

研究課題名(英文)Analysis of heavy metal stress sensing system in *Caenorhabditis elegans*

研究代表者

藤木 恒太(Fujiki, Kota)

東京女子医科大学・医学部・助教

研究者番号：80632504

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：環境汚染物質の一つである重金属は活性酸素の産生を含む様々な要因で細胞および個体に障害を与えることが知られている。生物はこれを感じ、その要因を除去し、また、ダメージを修復するためのさまざまなシステムを備えている。本研究では、重金属ストレスに対する応答機構を明らかにする目的で、神経伝達物質セロトニンが銅ストレスのセンサーとなる可能性について線虫を用いて検討し、その可能性を見出した。さらに、ヒトの腎組織の一部である近位尿細管上皮細胞のカドミウムストレス応答において、PI3K/Akt経路が転写因子FOXO3aおよびATF4の発現量の制御を介して重要な役割を担っている可能性を見出した。

研究成果の概要(英文)：Heavy metals are important environmental pollutants and have been known to induce various damages in vivo and in vitro through the different mechanisms including the overproduction of reactive oxygen species. Organisms might have the environmental stress adaptation mechanisms (stress sensing, signaling, and response) for the survival against the exposure to heavy metals. In the present study, we examined the molecular mechanisms responsible for the stress adaptation following exposure to copper and cadmium. We found that the neuronal transmitter serotonin functions as a copper stress sensor in *Caenorhabditis elegans*. We also revealed that PI3K/Akt signaling pathway plays a role in the cell survival via regulation of expression or activity of some transcription factors including FOXO3a and ATF4 in human renal proximal tubular cells exposed to cadmium.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：細胞生物学

キーワード：重金属 ストレス応答

1. 研究開始当初の背景

環境汚染物質の一つである重金属は活性酸素の産生を含む様々な要因で細胞および個体に障害を与えることが知られている。そこで、生物はこれを感知し、その要因を除去し、また、ダメージを修復するためのさまざまなシステムを備えている。ストレス応答型 MAP キナーゼ経路はそのようなシステムの一つであり、重金属曝露によって活性化され、酸化酵素などの発現を誘導することが報告されている。しかしながら、重金属を感知してストレス応答型 MAP キナーゼ経路を活性化する因子、いわゆる重金属ストレスセンサーについては現在のところ未解明のままである。

ストレス応答型 MAP キナーゼ経路は種を越えて良く保存されており、線虫 *Caenorhabditis elegans* でも非常に良く保存されている。これまでに、線虫における重金属ストレス応答は KGB-1 (JNK ホモログ) MAP キナーゼ経路が担うことが分かっている (Mizuno T. et al., EMBO., 2004) KGB-1 経路は MLK-1 (MAPKKK) MEK-1 (MAPKK) KGB-1 (MAPK) から構成される MAP キナーゼ経路で、重金属曝露によって活性化される。また、この経路が欠損した線虫は重金属存在下で生育できなくなる (重金属感受性)。さらにキナーゼである MAX-2 が MLK-1 の 355 番目のセリン残基のリン酸化を介して MLK-1 を活性化することにより KGB-1 経路を制御することも分かった (Fujiki K. et al., Mol. Cell. Biol., 2010) しかしながら、max-2 遺伝子欠損変異体は mlk-1 遺伝子欠損変異体等他の KGB-1 経路を活性化する因子と比較して弱い重金属感受性しか示さず、重金属による KGB-1 の活性化も起きるため、他に重金属を感知して KGB-1 経路を活性化する因子が存在すると予想されている。さらに、その上流で重金属を感知して KGB-1 経路を活性化する重金属ストレスセンサーの実体がなんであるかはわかっていない。

2. 研究の目的

近年の培養細胞を用いた実験結果から、セロトニンは二価の銅によって *in vivo* で容易に酸化され、5,5'-dihydroxy-4,4'-bityptamine (DHBT) に変化することが報告されている (Jones C.E. et al., J. Neurochem., 2007)。このことから、われわれはセロトニンが個体レベルでも銅に対するストレスセンサーであり、銅の濃度が線虫個体内で高まるとセロトニンが酸化されて DHBT に変化し、その結果セロトニンが枯渇することが重要なのではないかと考えた。そこで、その可能性について、線虫を用いた分子遺伝学的、生化学的解析により検討することを本研究の目的とする。

また、これまでに重金属の一つであるカドミウムを慢性的に曝露されると様々な組織に障害が起き、特に近位尿細管細胞に傷害が

誘導されることが報告されている (Nordberg GF, Handbook on the toxicology of metals, 3rd edn. Academic Press., 2007)。また、カドミウム曝露によって細胞死が惹起されることも報告されている (Hamada T et al., Apoptosis, 1997, Matsuoka M. et al., Kidney Int., 2008, Komoike Y et al., Arch Toxicol., 2012)。しかしながら、どのようなメカニズムで起こっているのか、またそのストレスセンサーは何なのか、十分に明らかになっていない。近年、プロテインキナーゼ PI3K および Akt によって構成される経路 (PI3K/Akt 経路) がカドミウム曝露依存的にさまざまな細胞で活性化すること報告されている (Misra UK et al., Cell Signal, 2003; Barthel A et al., Arch Biochem Biophys., 2007; Xiao W et al., Toxicol Appl Pharmacol., 2009; Chen L et al., Free Radic Biol Med, 2011; Jing Y et al., Toxicol Sci., 2012; Son Y-O et al., Toxicol Appl Pharmacol., 2012)。そこで、ヒト近位尿細管細胞 (HK-2) を用いてカドミウムストレス応答における PI3K/Akt 経路とその下流因子の重要性について生化学的解析を行ったので、併せて報告する。

3. 研究の方法

(1) 野生型、max-2 機能欠損変異体、cat-4 機能欠損変異体、tph-1 機能欠損変異体、cat-2 機能欠損変異体、max-2; cat-4 機能欠損変異体、max-2; tph-1 機能欠損変異体、max-2; cat-2 機能欠損変異体を作製し、各個体の卵を 100 個程度硫酸銅を含んだ寒天培地と含まない培地におき、五日後に成虫にまで発生した割合を測定する。また、野生型、max-2 機能欠損変異体、ser-1 機能欠損変異体、ser-4 機能欠損変異体、ser-7 機能欠損変異体、max-2; ser-1 機能欠損変異体、max-2; ser-4 機能欠損変異体、max-2; ser-7 機能欠損変異体を作製し、上記と同様の方法で五日後に成虫にまで発生した割合を測定する。

(2) カドミウム曝露による転写因子 FOXO3a のリン酸化とその毒性的意義の解析

HK-2 細胞に塩化カドミウムを曝露後、リン酸化型 FOXO3a (Thr32, Thr253)、FOXO3a、リン酸化型 Akt (Thr308)、Akt の蛋白レベルをウエスタンブロットにより測定する。PI3K 阻害剤 Wortmannin、EGFR 阻害剤 AG1478、IGF1R 阻害剤 PPP、CAMK 阻害剤 KN93 で処理した細胞にカドミウムを曝露し、上記の蛋白レベルを測定する。ERK 阻害剤 U0126、JNK 阻害剤 SP600125、p38 阻害剤 SB203580 で処理した細胞にカドミウムを曝露し、上記の蛋白レベルを測定する。カドミウム曝露後、核抽出液、細胞質抽出液を調整し、リン酸化型 FOXO3a、FOXO3a の蛋白レベルをウエスタンブロットにより測定する。FOXO3a を siRNA により機能阻害した細胞にカドミウムを曝露し、細胞の

形態の観察、nucleosome 量を測定する。

(3)PI3K シグナリングを介した転写因子 ATF4 発現によるカドミウム細胞毒性抑制機構

HK-2 細胞に塩化カドミウムを曝露後、ATF4、リン酸化型 eIF2 (Ser51)、リン酸化型 Akt(Thr308)、リン酸化型 GSK-3 / (Ser21/9)、リン酸化型 mTOR (Ser2448)、リン酸化型 S6K1 (Thr389)、リン酸化型 RSK2 (Ser227)の蛋白レベルをウエスタンブロットにより測定する。PI3K 阻害剤 LY294002、Akt 阻害剤 MK2206、GSK-3 / 阻害剤 SB216763、mTOR 阻害剤 Rapamycin、RSK 阻害剤 BI-D1870 で処理した細胞にカドミウムを曝露後、ATF4、リン酸化型 eIF2 の蛋白レベルをウエスタンブロットにより測定する。LY294002 処理と同時に、proteasome 阻害剤 MG132、タンパク合成阻害剤 cycloheximide、転写阻害剤 actinomycin D をそれぞれ処理した細胞にカドミウム曝露後、ATF4 の蛋白レベルをウエスタンブロットにより測定する。EGF リガンドで処理した細胞にカドミウム曝露後、ATF4 の蛋白レベルをウエスタンブロットにより測定する。

4. 研究成果

(1) 野生型と比べ、max-2 機能欠損変異体で強い重金属感受性が認められた。max-2;cat-4 機能欠損変異体、max-2;tph-1 機能欠損変異体で max-2 機能欠損変異体の示す重金属感受性が抑制された。一方、max-2;cat-2 機能欠損変異体では max-2 機能欠損変異体の示す重金属感受性の抑制は認められなかった。野生型と比べて cat-4 機能欠損変異体、tph-1 機能欠損変異体、cat-2 機能欠損変異体の示す重金属感受性に变化は認められなかった。また、max-2;ser-1 機能欠損変異体、max-2;ser-7 機能欠損変異体で max-2 機能欠損変異体の示す重金属感受性が抑制された。一方、max-2;ser-4 機能欠損変異体では max-2 機能欠損変異体の示す重金属感受性の抑制は認められなかった。野生型と比べて ser-1 機能欠損変異体、ser-4 機能欠損変異体、ser-7 機能欠損変異体の示す重金属感受性に变化は認められなかった。

本研究では、重金属に対するストレス応答に神経伝達物質セロトニンが関与する可能性、重金属ストレスセンサーとなりうる可能性を初めて明らかにした。セロトニンの前駆体である 5-Hydroxytryptophan を合成する酵素 cat-4 機能欠損変異および tph-1 機能欠損変異によって max-2 機能欠損変異体の示す重金属感受性を抑制された一方、cat-2 機能欠損変異では max-2 機能欠損変異体の示す重金属感受性が抑制されなかったことから、セロトニンが重金属ストレス応答に重要な役割を果たしていることを明らかにした。セロトニン受容体である ser-1 機能欠損変異および ser-7 機能欠損変異が max-2 機能欠損変異体

の示す重金属感受性を抑制できることからセロトニンの重要性が示唆される。一方、ser-4 機能欠損変異では max-2 機能欠損変異体の示す重金属感受性が抑制されなかったことから、重金属ストレス応答に関与するセロトニン受容体に特異性があることも示唆された。今後は、セロトニンがどのように重金属ストレスを受容しているのか、その詳細を明らかにするさらなる検討が必要です。また、セロトニン受容体の特異性は、どのようにして生じているのか検討する必要もある。

(2) カドミウム曝露による転写因子 FOXO3a のリン酸化とその毒性学的意義の解析

カドミウム曝露後、リン酸化型 FOXO3a (Thr32、Thr253) の増加と共に、FOXO3a の蛋白レベルも若干の増加が認められた。このリン酸化型 FOXO3a の変動に一致したリン酸化型 Akt(Thr308)の蛋白レベルの変動が認められた。PI3K 阻害剤 Wortmannin、EGFR 阻害剤 AG1478、IGF1R 阻害剤 PPP、CAMK 阻害剤 KN93 で処理した細胞でコントロール細胞と比べ、カドミウム曝露によるリン酸化型 Akt、リン酸化型 FOXO3a および FOXO3a の蛋白レベルの増加が抑制された。p38 阻害剤 SB203580 で処理した細胞では、コントロール細胞と比べ、カドミウム曝露によるリン酸化型 Akt、リン酸化型 FOXO3a および FOXO3a の蛋白レベルの増加が抑制された。一方、ERK 阻害剤 U0126、JNK 阻害剤 SP600125 で処理した細胞はコントロール細胞と比べ、カドミウム曝露によるリン酸化型 Akt、リン酸化型 FOXO3a および FOXO3a の蛋白レベルに変化は認められなかった。カドミウム曝露後、FOXO3a 蛋白レベルは核画分において一度減少した後、再度増加する傾向が認められた一方、リン酸化型 FOXO3a は増加し続ける傾向が認められた。一方、細胞質画分では、FOXO3a およびリン酸化型 FOXO3a はカドミウム曝露時間依存的に増加する傾向が認められた。siRNA を用いて FOXO3a の機能阻害した細胞ではコントロール細胞と比べ、カドミウム曝露後の細胞の形態の崩壊および nucleosome 量の増加が抑制された。

本研究では、カドミウムを曝露した近位尿管由来上皮細胞における Thr32、Thr253 のリン酸化を伴う FOXO3a の細胞内局在の変化、カドミウム毒性発現における重要性をはじめ明らかにした。FOXO3a のリン酸化は CAMK / EGFR / IGF1R / PI3K / Akt 経路によって制御されていることが認められた。さらに、p38 MAPK 経路がカドミウム曝露依存的な PI3K/Akt 経路の活性化に重要であることも認められた。また、カドミウム曝露後、一時的に FOXO3a の Thr32 お



よび Thr253 のリン酸化に伴い、FOXO3a は細胞質に輸送され、核内に局在する蛋白レベルが減少する。しかしながら、その後、FOXO3a の Thr32 および Thr253 のリン酸化非依存的に再度核内に蓄積することが認められた。さらに、FOXO3a を機能阻害した細胞では、カドミウムの毒性が抑制されたことから、FOXO3a の核内への蓄積は、カドミウム毒性発現を促進する役割を担っていると考えられた。今後は、カドミウム曝露後、FOXO3a がどのような遺伝子の転写を誘導するのかはさらなる検討を要する。さらに、カドミウム曝露後、FOXO3a は Akt によってリン酸化されているにも関わらず、どのようにして核内へと戻されているのか明らかにするためにはさらなる検討を要する。本研究成果は、毒性学国際雑誌に論文発表した。(Fujiki K et al., Arch Toxicol., 2013)

(3) PI3K シグナリングを介した転写因子 ATF4 発現によるカドミウム細胞毒性抑制機構

カドミウム曝露後、ATF4、リン酸化型 eIF2 の蛋白レベルの増加が認められた。また、siRNA を介して ATF4 の機能阻害した細胞では、コントロール細胞と比べてカドミウム曝露依存的な細胞死が促進されることが認められた。一方、カドミウム曝露後リン酸化型 Akt の蛋白量の増加が認められた。さらに、PI3K 阻害剤 LY294002 で処理した細胞にカドミウムを曝露すると、コントロール細胞と比べて ATF4 の蛋白レベルが顕著に抑制される一方、リン酸化型 eIF2 の蛋白レベルに顕著な変化は認められなかった。さらに、LY294002 処理によるカドミウム曝露依存的な ATF4 発現抑制効果は、タンパク合成阻害剤 cycloheximide 処理した時に、抑制された。一方、蛋白分解阻害剤 MG132 処理、転写阻害剤 actinomycin D 処理では顕著な抑制効果は認められなかった。また、EGF リガンドを添加した細胞にカドミウムを曝露すると、ATF4 の発現がコントロール細胞と比べて増加した。カドミウム曝露後、リン酸化型 GSK-3 / (Ser21/9)、リン酸化型 mTOR (Ser2448)、リン酸化型 S6K1 (Thr389)、リン酸化型 RSK2 (Ser227) の蛋白レベルの増加が観察された。さらに、Akt 阻害剤 MK2206、mTOR 阻害剤 Rapamycin、RSK 阻害剤 BI-D1870 で処理した細胞にカドミウムを曝露すると、ATF4 の発現量がリン酸化型 eIF2 の蛋白レベル非依存的に抑制される一方、GSK-3 阻害剤 SB216763 で処理した細胞では ATF4 の発現量が増加した。

本研究では、カドミウムを曝露した近位尿細管由来上皮細胞における PI3K およびその下流因子による蛋白翻訳機構の調節を介した ATF4 発現制御機構を初めて明らかにした。カドミウム曝露後、これまでに報告されている小胞体ストレス応答 eIF2 /ATF4 経路が活

性化していることを示した。さらに、ATF4 がカドミウムの毒性に対して抑制効果があることを示した。一方、PI3K が、リン酸化型 eIF2 非依存的に ATF4 の発現量



を促進することを示した。さらに、PI3K による ATF4 発現調節は翻訳機構依存的であることを示した。また、PI3K 下流で働き、かつ蛋白翻訳調節機構で機能する Akt、GSK-3 / 、mTOR、RSK も ATF4 の発現量の制御に関与したことから、PI3K はカドミウム曝露依存的に翻訳機構を活性化することで、eIF2 非依存的に ATF4 の発現量を増加していると考えられる。今後は、カドミウム曝露後、ATF4 がどのような遺伝子の転写を誘導するのかはさらなる検討を要する。さらに、他のストレスや細胞でも上記の PI3K による ATF4 制御機構が存在するのか検討を要する。本研究成果は、毒性学国際雑誌に論文発表した。(Fujiki K et al., Arch Toxicol., 2014)

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)

Fujiki K, Inamura N, Matsuoka M, PI3K signaling mediates diverse regulation of ATF4 expression for the survival of HK-2 cells exposed to cadmium, Archives of Toxicology, 88:403-414, 2014 (査読あり) DOI 10.1007/s00204-013-1129-y

Fujiki K, Inamura N, Matsuoka M, Phosphorylation of FOXO3a by PI3K/Akt pathway in HK-2 renal proximal tubular epithelial cells exposed to cadmium, Archives of Toxicology, 87:2119-2127, 2013 (査読あり) DOI 10.1007/s00204-013-1077-6

〔学会発表〕(計 3 件)

藤木恒太、松岡雅人 PI3K シグナリングを介した ATF4 発現によるカドミウム細胞毒性抑制機構、第 84 回日本衛生学会学術総会、2014 年 5 月 25 日、岡山

藤木恒太、松岡雅人、カドミウム曝露 HK-2 細胞における転写因子 FOXO の機能、フォーラム 2013 衛生薬学・環境トキシコロジー学会、2013 年 9 月 13 日、福岡

藤木恒太、松岡雅人、カドミウム曝露 HK-2 細胞における転写因子 FOXO の機能、第 83 回日本衛生学会学術総会、2013 年 3 月 26 日、石川

〔その他〕

東京女子医科大学衛生学公衆衛生学（一）教室

<http://gyoseki.twmu.ac.jp/twmhp/KgApp?k ozac=C11100000000&year=2013>

6．研究組織

(1)研究代表者

藤木 恒太 (FUJIKI KOTA)

東京女子医科大学・医学部・助教

研究者番号：80632504

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし