

平成24年度

博士論文

ポリアミン代謝により産生される
アクロレインの細胞毒性機序

千葉科学大学

大学院薬科学研究科

薬科学専攻

中村 瑞穂

平成25年3月

目 次

	ページ
【略称】	1
【序論】	5

第 1 章 アクロレイン耐性細胞の樹立及びその毒性解除機構の解明

	ページ
【目的】	19
【材料と方法】	
1. 細胞培養及びアクロレイン耐性細胞の作製	20
2. 細胞内グルタチオン量の測定	20
3. SDS-ポリアクリルアミド電気泳動 (PAGE) 及びウェスタンブロット解析	21
4. ノーザンブロット解析	22
5. GCLC mRNA 及び genome DNA の塩基配列決定	24
6. 統計処理	26
【結果】	
1. アクロレイン耐性細胞 FM3A-ATD の樹立及び FM3A-ATD の細胞増殖に対するアクロレインの影響	27
2. FM3A-ATD における細胞内グルタチオン量の増加	27
3. アクロレイン耐性細胞 Neuro2a-ATD の樹立及び Neuro2a-ATD の細胞増殖に対するアクロレインの影響	29
4. Neuro2a-ATD における細胞内グルタチオン量の増加	29
5. FM3A-ATD 及び Neuro2a-ATD の細胞増殖に対する過酸化水素の毒性	30
【考察】	39

第2章 アクロレイン抱合蛋白質の同定及びその細胞毒性 機序の解明

	ページ
【目的】	43
【材料と方法】	
1. 細胞培養	44
2. 免疫染色法によるアクロレイン付加体と GAPDH の検出	44
3. SDS-ポリアクリルアミド電気泳動 (PAGE)	45
4. Plasmid の作製	46
5. アクロレイン抱合を受けた HA 標識 GAPDH の精製	47
6. 質量分析	47
7. GAPDH 活性及び細胞内 ATP 量の測定	48
8. GAPDH 若しくは β -アクチン過剰産生株におけるアクロレイン毒性の感受性	49
9. 細胞分画及びアセチル化 GAPDH の検出	49
10. TUNEL assay を利用したアポトーシスの検出	50
【結果】	
1. アクロレインの蛋白質及び DNA との相互作用	52
2. アクロレイン抱合蛋白質の同定	52
3. GAPDH 上のアクロレイン抱合部位の同定	53
4. アクロレインによる GAPDH 活性の低下	54
5. アクロレイン抱合 GAPDH の局在とアポトーシス惹起作用	55
【考察】	64
【参考文献】	66
【総括】	75
【謝辞】	76

【略称】

1D-PAGE	One-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis
2D-PAGE	Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis
8-OHdG	8-Hydroxydeoxyguanosine
AcPAO	<i>N</i> ¹ -Acetylpolyamine oxidase
ADC	Arginine decarboxylase
ADP	Adenosine 5'-diphosphate
ALDH	Aldehyde dehydrogenase
AP-1	Activator protein 1
ATP	Adenosine 5'-triphosphate
AUH	Agmatine ureohydrolase
CA	Carotid atherosclerosis
Cat	Catalase
CBB	Coomassie brilliant blue
CBP	CREB(cAMP response element binding protein)-binding protein
cDNA	Complementary deoxyribonucleic acid
CHCl ₃	Chloroform
CO ₂	Carbon dioxide
CRP	C-reactive protein
Cys	Cysteine
D-MEM	Dulbecco's modified Eagle medium
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTP	Deoxyribonucleotide triphosphate
DTT	Dithiothreitol

EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EtOH	Ethanol
FBS	Fetal bovine serum
FDP-lysine	<i>N</i> ^ε -(3-Formyl-3,4-dehydropiperidino)lysine
FM	FM3A
FM-ATD	FM3A-ATD
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GCL	γ-Glutamylcysteine ligase
GCLC	γ-Glutamylcysteine ligase catalytic subunit
γ-GC	γ-Glutamylcysteine
GSHS	Glutathione synthetase
H ₂ O ₂	Hydrogen peroxide
HA	Hemagglutinin
HCl	Hydrochloric acid
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid
IC ₅₀	50% Inhibitory concentration
IL-6	Interleuken-6
IP	Immunoprecipitation
JNK	c-Jun N-terminal kinase
KOH	Potassium hydroxide
LC-MS/MS	Liquid chromatography-tandem mass spectrometry
Lys	Lysine

MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MeOH	Methanol
MgSO ₄	Magnesium sulfate
MOPS	3-(N-morpholino)propanesulfonic acid
MP-lysine	<i>N</i> ^ε -(3-Methylpyridinium)lysine
mRNA	Messenger ribonucleic acid
N2a	Neuro2a
N2a-ATD	Neuro2a-ATD
NaCl	Sodium chloride
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NaOH	Sodium hydroxide
n.d.	Not detected
NF-κB	Nuclear factor-κ B
NO	Nitric oxide
NP-40	Nonidet P-40
n.s.	Not significant
ODC	Ornithine decarboxylase
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
PBS(-)	Phosphate-buffered saline(-)
PC-Acro	Protein-conjugated acrolein
PC-HNE	Protein-conjugated 4-hydroxynonenal
PCR	Polymerase chain reaction
PUT	Putrescine
RNA	Ribonucleic acid

S100	100,000 xg Supernatant
SAMDC	S-Adenosylmethionine decarboxylase
SBI	Silent brain infarction
SDS	Sodium dodecyl sulfate
S.E.	Standard error
SMO	Spermine oxidase
SPD	Spermidine
SPDS	Spermidine synthase
SPM	Spermine
SPMS	Spermine synthase
SSAT	Spermidine/spermine <i>N</i> ¹ -acetyltransferase
SSC	Saline-sodium citrate buffer
TBS-T	Tris buffered saline with Tween 20
TCA	Trichloroacetic acid
Tris	Tris(hydroxymethyl) aminomethane
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling
WMH	White matter hyperintensity

【序論】

ポリアミンは窒素を含む低分子の塩基性生理活性物質であり、細菌から人に至るまで生物界に広く存在する。現在までに 20 種類以上のポリアミンが同定されているが、生体内で見出される主なポリアミンは、プトレスシン (PUT)、スペルミジン (SPD)、スペルミン (SPM) の 3 種類である (Fig. 1)。このうち大腸菌などの原核細胞には PUT と SPD が、酵母や哺乳類などの真核細胞には主に SPD と SPM が含まれている【1】。ポリアミンは細胞内において、1 価カチオンを除いた低分子物質としては Mg^{2+} 、ATP と共に三大構成成分であり、大腸菌や動物細胞には数 mM から数十 mM のオーダーで存在する。3 種のポリアミンは同じような生理作用を発揮するが、その有効濃度は $SPM < SPD < PUT$ であり、同じ作用を示すのに SPD は SPM の 3-5 倍、PUT は SPM の 50 倍以上の濃度が必要である【2】。

ポリアミンの生合成

大腸菌のポリアミン生合成は、オルニチンが出発物質であり、オルニチンデカルボキシラーゼ (ODC) により脱炭酸を受けると PUT が産生される。また、アルギニンを出発物質とした経路も存在する。アルギニンはアルギニンデカルボキシラーゼにより脱炭酸されるとアグマチンを合成し、アグマチンはアグマチンウレオヒドロラーゼにより PUT を産生する。その後、PUT はスペルミジンシンターゼにより SPD へと変換される。SPD の生合成に必要なアミノプロピル基は、S-アデノシルメチオニンが S-アデノシルメチオニンデカルボキシラーゼ (SAMDC) により脱炭酸されることにより産生されるデカルボキシアデノシルメチオニンによって供給される (Fig. 2)【3】。

一方、真核細胞のポリアミン生合成は、オルニチンが唯一の出発物質であり、ODC により PUT が産生される。その後、PUT はスペルミジンシンターゼにより SPD へ、SPD はスペルミンシンターゼにより SPM へと変換される。SPD と SPM の生合成に必要なアミノプロピル基は、S-アデノシルメチオニンから SAMDC により産生されるデ

カルボキシアデノシルメチオニンによって供給される (Fig. 2) 【3】。

ポリアミン生合成において ODC と SAMDC は律速酵素であり、これら酵素は精巧な調整を受けている 【4, 5】。ポリアミンは生合成の他にも、分解や輸送により、細胞内の濃度が厳密に調節されている。

ポリアミンの細胞内分布

ポリアミンの細胞内分布は、大腸菌やウシリンパ球、ラット肝臓で報告されている 【6, 7】。SPD と SPM は遊離の状態で存在することはほとんどなく、PUT のみが大腸菌において約 40%遊離状態で存在している。また、ポリアミンは大腸菌及びウシリンパ球、ラット肝臓において主として RNA と結合している。大腸菌では PUT の 48%、SPD の 90%、ウシリンパ球では SPD の 57%、SPM の 65%、ラット肝臓では SPD の 78%、SPM の 85%が RNA と結合している。また、RNA に対するポリアミン結合量をヌクレオチドあたりに換算すると、大腸菌では PUT と SPD がそれぞれ 3.5、1.4 分子/100 ヌクレオチド、ウシリンパ球では SPD と SPM がそれぞれ 2.7 と 3.7 分子/100 ヌクレオチド、ラット肝臓では SPD と SPM がそれぞれ 1.2 と 1.0 分子/100 ヌクレオチド結合している。すなわち、RNA のリン酸基の約 15%はポリアミンとイオン結合しており、ポリアミンの生理作用は RNA との相互作用により引き起こされていることが強く示唆される。

細胞増殖必須因子としてのポリアミン

ポリアミンの生理的役割は多岐にわたり、その主なものとして、核酸、特に RNA と相互作用することにより蛋白質や核酸合成を促進し、細胞増殖因子として機能することが知られている 【8】。ポリアミンの増殖因子としての役割は、1949 年に乳酸菌の一種である *Hemophdus purainjluenzae* の生育に PUT と SPD が必須であることが初めて報告された 【9】。その後、がん患者の尿中でポリアミンが増加することが報告され、ポ

リアミンが細胞増殖に関与することが示唆された【10】。細菌では大腸菌でポリアミンを合成できない菌株が分離され、外からポリアミンを加えるとその細胞増殖が著しく増加することにより、ポリアミンの細胞増殖因子としての地位を確立した【11】。次いで、酵母【12】やチャイニーズハムスター卵巣細胞【13】においてもポリアミンを合成できない細胞株が分離され、ポリアミンを外から加えると細胞増殖が開始することが明らかとなった。また、SAMDC ノックアウトマウスは、+/-ヘテロ接合体では生存可能であることが報告され、-/-ホモ接合体は3.5日胚までは卵由来のSPDにより生存できるが、3.5日胚以降の生存は不可能であることが報告された【14】。しかし、3.5日胚はSPDを添加すると増殖が可能となったことから、細胞死はSPDとSPMに依存しており、真核細胞ではポリアミンが細胞増殖必須因子であることが明らかとなった。

培地のポリアミン添加による細胞毒性

ポリアミンは細胞増殖必須因子として機能するため、細胞培養系の培地によく添加されるが、ウシ血清を含む培地にSPD若しくはSPMを添加すると細胞増殖が阻害されることが知られている【15】。これは血清アミノキシダーゼにより添加したポリアミンが酸化され、細胞毒性の強い過酸化水素 (H_2O_2) とアクロレイン ($CH_2=CHCHO$) を生じるために起きる【16】。当研究室では、この細胞増殖阻害が H_2O_2 とアクロレインのどちらによる現象なのか検討するため、これらの分解酵素であるカタラーゼ (Cat) やアルデヒドデヒドロゲナーゼ (ALDH) をSPMと同時に培地中に添加する実験を行った。その結果、 H_2O_2 の分解酵素である Cat をSPMと共に添加しても細胞増殖は回復しなかったが、アクロレインの分解酵素である ALDH をSPMと共に添加することにより細胞増殖が回復した (Fig. 3)【17】。SPDにおいても上記と同様の結果が得られた。また、アクロレインを $10\ \mu M$ 添加すると細胞増殖阻害を示すのに対し、 H_2O_2 では $200\ \mu M$ で同程度の阻害を示し、アクロレインの方が強い毒性を呈した (Fig. 3)。このことから、培地中へのポリアミン添加による細胞増殖阻害は、血清アミノキシダーゼによりポリアミンから産生されたアクロレインが原因であることが明らかとなった。

ポリアミンの酸化分解とアクロレインの産生

ポリアミンの細胞内濃度は厳密に保たれており、細胞内のポリアミン量が過剰になると、SPMとSPDはいくつかのステップを介して至適濃度を保つように分解され、PUTは直接細胞外へ排出される。

細胞内におけるポリアミンの分解経路は2つ存在する (Fig. 4)。1つは、SPMがスペルミンオキシダーゼ (SMO) により酸化分解を受け、SPDと3-アミノプロパナールを生じる経路である【18】。もう1つは、SPM若しくはSPDがスペルミジン/スペルミン N^1 -アセチルトランスフェラーゼ (SSAT) によりアセチル化を受け、さらに N^1 -アセチルポリアミンオキシダーゼ (AcPAO) により酸化分解され、それぞれSPDとPUT及び3-アセトアミドプロパナールを生じる経路である【19】。2つの分解経路には副生成物に大きな違いがあり、SMOによる分解経路で産生される3-アミノプロパナールは自発的にアクロレインに変換されるのに対し、SSATとAcPAOによる3-アセトアミドプロパナールからはアクロレインがほとんど産生されない【17】。このことから、ポリアミンの酸化分解により生じるアクロレインは、主にSPMがSMOにより酸化分解を受けてできると考えられている。

アクロレインと疾患

ポリアミンは細胞内で主にRNA-ポリアミン複合体として存在することから【6, 7】、アクロレインは通常、積極的に産生されず、組織の梗塞など細胞障害を受けることにより産生されると考えられる。このことから、当研究室では細胞障害性疾患とアクロレインの関連性に注目した。

ポリアミンは尿毒症の毒素の一つであり、尿毒症の進行を促進することから【20】、当研究室では腎不全患者を対象として血中ポリアミン量、SMO活性及びアクロレイン量の測定を行った。その結果、腎不全患者の血中ではSPM量の減少や、PUT量、SMO活性、遊離型及び蛋白質結合型アクロレイン (PC-Acro) 量の増加が見られた。PC-Acro量は健常者のおよそ6倍の増加を呈し、腎不全の重症度とよく相関していた【21】。こ

これらの結果は、細胞障害を伴う他の疾患においても患者の血中 PC-Acro 量が増加している可能性を示唆した。

また、SPM の代謝産物である 3-アミノプロパナールが脳虚血モデルラットの細胞障害に強く関連することが報告されていることから【22, 23】、当研究室では脳梗塞患者の血中においても PC-Acro 量が増加するか検証した。脳梗塞により障害を受けた組織は腎不全と比較して小さいため、SMO に加え AcPAO の活性も測定した。その結果、脳梗塞患者の血中では SMO 活性、AcPAO 活性、及び PC-Acro 量の著しい増加が確認された (Fig. 5)。脳梗塞の大きさは PC-Acro 量や総ポリアミンオキシダーゼ (SMO + AcPAO) 活性に相関し、PC-Acro とポリアミンオキシダーゼが脳梗塞の良いバイオマーカーとなることを見出した【24】。また、これらの測定に加え、インターロイキン-6 (IL-6) や C 反応性蛋白質 (CRP) 量を測定することにより、脳梗塞の前段階である無症候性脳梗塞 (Silent brain infarction: SBI) を 89% の感度と 91% の特異性で発見できることを報告した【25】。脳梗塞の危険因子は SBI だけでなく、頸部動脈硬化 (Carotid atherosclerosis : CA) や大脳白質病変 (White matter hyperintensity : WMH) が知られている【26, 27】。CA や WMH 患者においても血中 PC-Acro、IL-6 及び CRP 量が高く、脳梗塞になる危険率は SBI > CA > WMH であることが示された【28】。

さらに、涙腺や唾液腺を標的とする臓器特異的な自己免疫疾患の原発性シェーグレン症候群患者の唾液中【29】や認知症の一つであるアルツハイマー病患者の血中【30】においても PC-Acro 量が増加していることを明らかにし、細胞障害性疾患にアクロレインが深く関与することが示唆された。

脳梗塞モデルにおけるアクロレイン

臨床研究により、細胞障害性疾患ではアクロレインが関与していることが多数報告されているものの、血漿レベルの解析でとどまっているため、近年、当研究室では脳梗塞モデルマウスを用いて、脳梗塞部位におけるポリアミンとアクロレインの関係性について解析が行われた。その結果、梗塞部位の PC-Acro 量が約 30 倍に増加し、SPM や SPD 量が減少することを明らかにした【31】。またこれに対し、活性酸素由来の蛋白質結合型

4-ヒドロキシノネナールや8-ヒドロキシデオキシグアノシンは2-3倍程度しか増加せず、梗塞部位の細胞障害にアクロレインが関与していることが示唆された (Fig. 6)。さらに国内で脳保護剤として使用されているラジカルスカベンジャーのエダラボン (ラジカット) は、梗塞作成時に投与すると梗塞巣の拡大を有意に抑制したが、梗塞6時間後投与では無効であった。これに対し、アクロレイン除去剤である*N*-ベンジルヒドロキシルアミンは梗塞作成時だけでなく、梗塞6時間後の投与でも梗塞巣の拡大を有意に抑制し、脳梗塞の症状悪化にアクロレインが深く関与すること、またアクロレインの除去が脳梗塞の治療に有効であることが実験的に証明された【32】。

また、ポリアミンからアクロレインを産生するSMOを欠損したGyマウスを用いてポリアミン代謝と脳梗塞の関係性について調べられた。Gyマウスによる脳梗塞モデルマウスでは、脳梗塞体積とPC-Acro量がそれぞれ約30、50%も減少し、SPMからSMOにより生じるアクロレインが細胞障害を引き起こしていることを支持した【32】。

アクロレインの毒性

酸化ストレスは、種々の疾患を引き起こすことが知られており、スーパーオキシドアニオン ($O_2^{\cdot-}$) やヒドロキシラジカル ($\cdot OH$)、 H_2O_2 などの活性酸素とアクロレインや4-ヒドロキシノネナール、マロンジアルデヒドのような不飽和アルデヒドが原因で細胞障害が起きる。一般的には、活性酸素が主に細胞障害を引き起こすと考えられており、活性酸素についてよく研究されている。しかしながら、当研究室ではアクロレインが H_2O_2 に比べて極めて毒性の強い物質であることや【17】、 H_2O_2 がDNA合成阻害作用を示すのに対し、アクロレインは蛋白質合成を阻害することにより細胞毒性を発揮することを明らかにした【33】。また、アクロレインが細胞障害性疾患に深く関与することを明らかにした【21, 24, 29, 30】。

不飽和アルデヒドの中でも特にマロンジアルデヒドや4-ヒドロキシノネナールについては多数報告されている【34-40】。アクロレインも含めたこれら不飽和アルデヒドは脂質過酸化により産生され、特にマロンジアルデヒドは脂質過酸化により産生される主なアルデヒドであることや【35, 40】、4-ヒドロキシノネナールは広範な病理過程に関連

することが知られている【34, 35, 41-45】。しかしながら、当研究室では、アクロレインが4-ヒドロキシノネナールより強い毒性を示すこと【31】、また、アクロレインは脂質過酸化よりポリアミンの酸化分解により効率よく産生されることを明らかにした【24】。

アクロレインは、システインのチオール基、リジンの ϵ -アミノ基、ヒスチジンのイミダゾール基に対して選択的に反応する【46, 47】。アクロレインは特に、蛋白質中のシステイン残基と反応性が良く、マイケル付加反応を起こす【48】。また、2分子のアクロレインが蛋白質中のリジン残基と結合することにより、PC-Acroとして N^{ϵ} -(3-Formyl-3,4-dehydropiperidino)lysine (FDP-lysine) 及び N^{ϵ} -(3-Methylpyridinium)lysine (MP-lysine) を形成する【49, 50】。FDP-lysineは不飽和カルボニル基が存在し、これがさらにグルタチオンのようなチオール化合物と反応し【51】、他の蛋白質の求核性部位と架橋形成する【52】。このようにアクロレインは、蛋白質中のアミノ酸残基に結合することにより、蛋白質を不活化させることが報告されている【53, 54】。しかしながら、これまでに報告されたアクロレイン修飾を受ける蛋白質は、いずれも細胞増殖に直接関与していないため、アクロレインの細胞増殖阻害機構は未だに不明な点が多い。

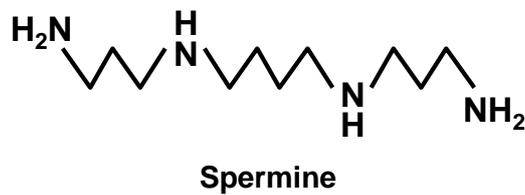
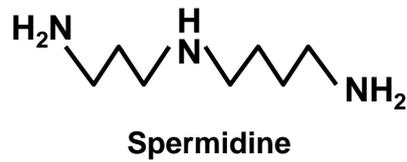
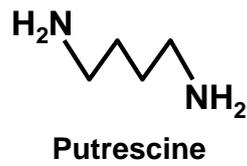


Fig. 1 ポリアミンの構造

ポリアミンは窒素を含む低分子の塩基性生理活性物質であり、細菌から人に至るまで生物界に広く存在する。生体内で見出される主なポリアミンは、プトレスシン (PUT)、スペルミジン (SPD)、スペルミン (SPM) の3種類である。このうち大腸菌などの原核細胞には PUT と SPD が、酵母や哺乳類などの真核細胞には主に SPD と SPM が含まれている【1】。

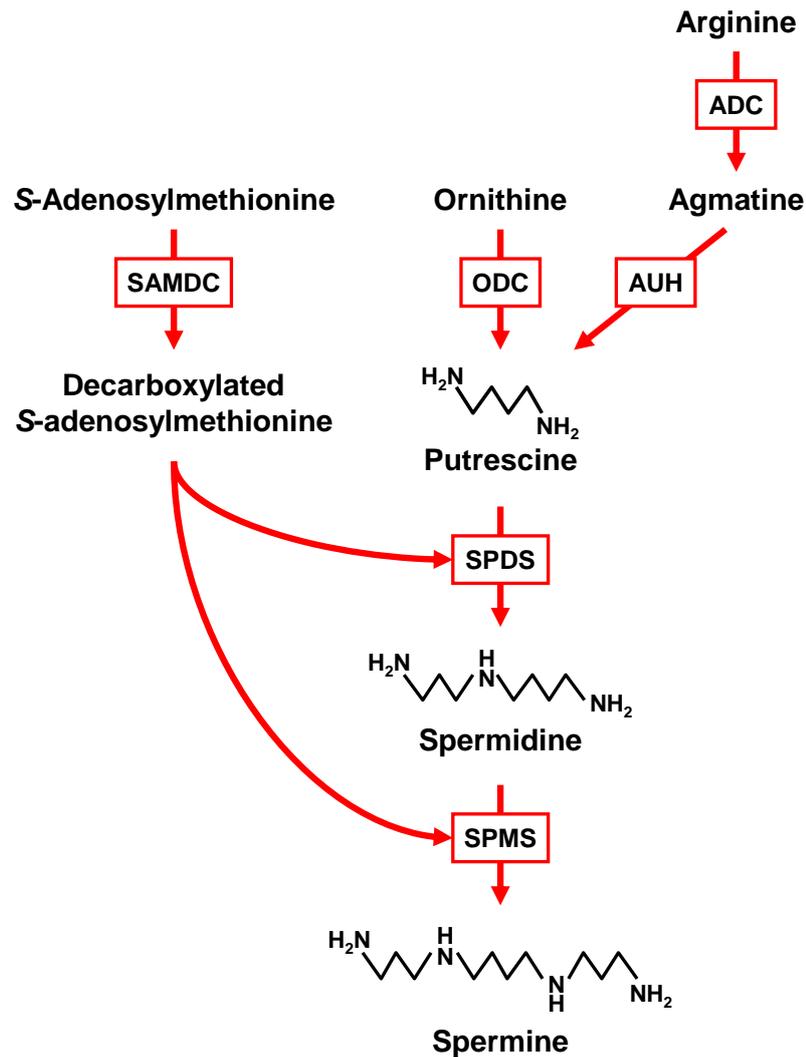


Fig. 2 ポリアミンの生合成

ポリアミンの生合成はオルニチンが出発物質であり、オルニチンからオルニチンデカルボキシラーゼ (ODC) によりプトレスシン (PUT) が合成される。また、大腸菌ではアルギニンを出発物質とした経路も存在し、アルギニンはアルギニンデカルボキシラーゼ (ADC) によりアグマチンに変換され、アグマチンはアグマチンウレオヒドロラーゼ (AUH) により PUT に変換される。PUT はスペルミジンシンターゼ (SPDS) によりスペルミジン (SPD) に、動物細胞では SPD はスペルミンシンターゼ (SPMS) によりスペルミン (SPM) に変換される。SPD と SPM の合成に必要なアミノプロピル基は、*S*-アデノシルメチオニンが *S*-アデノシルメチオニンデカルボキシラーゼ (SAMDC) により脱炭酸されることにより産生されるデカルボキシアデノシルメチオニンによって供給される【3】。

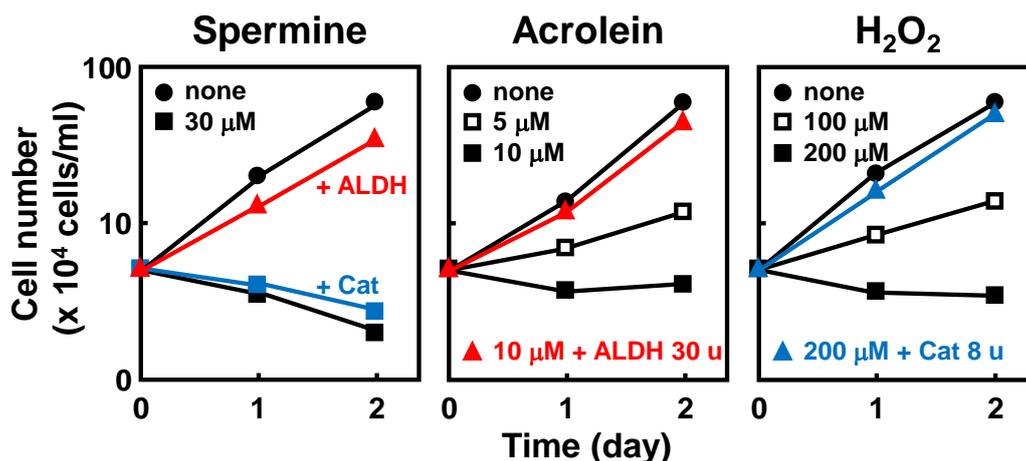


Fig. 3 スペルミン、アクロレイン及び過酸化水素の細胞毒性

マウス乳がん細胞 FM3A (5 x 10⁴ cells/mL) を用いて 2% 胎児ウシ血清を添加した ES 培地にて、スペルミン (SPM) とアクロレイン、過酸化水素 (H₂O₂) の細胞毒性を比較した。培地中に 30 μM の SPM を添加すると、細胞増殖を著しく阻害した。SPM 添加による増殖阻害は、H₂O₂ の分解酵素であるカタラーゼ (Cat) を添加しても回復しないが、アクロレインを分解する酵素であるアルデヒドデヒドロゲナーゼ (ALDH) の添加により回復した。また、アクロレインは 10 μM で細胞増殖を阻害するが、ALDH を添加することにより回復が見られた。一方、H₂O₂ は 200 μM で細胞増殖阻害を示すが、Cat を添加することにより回復が見られた。このことから、SPM を培地中に添加した時の細胞毒性の原因はポリアミンの酸化分解により生じるアクロレインであることや、アクロレインは H₂O₂ より強い毒性を示すことが明らかとなった【17】。

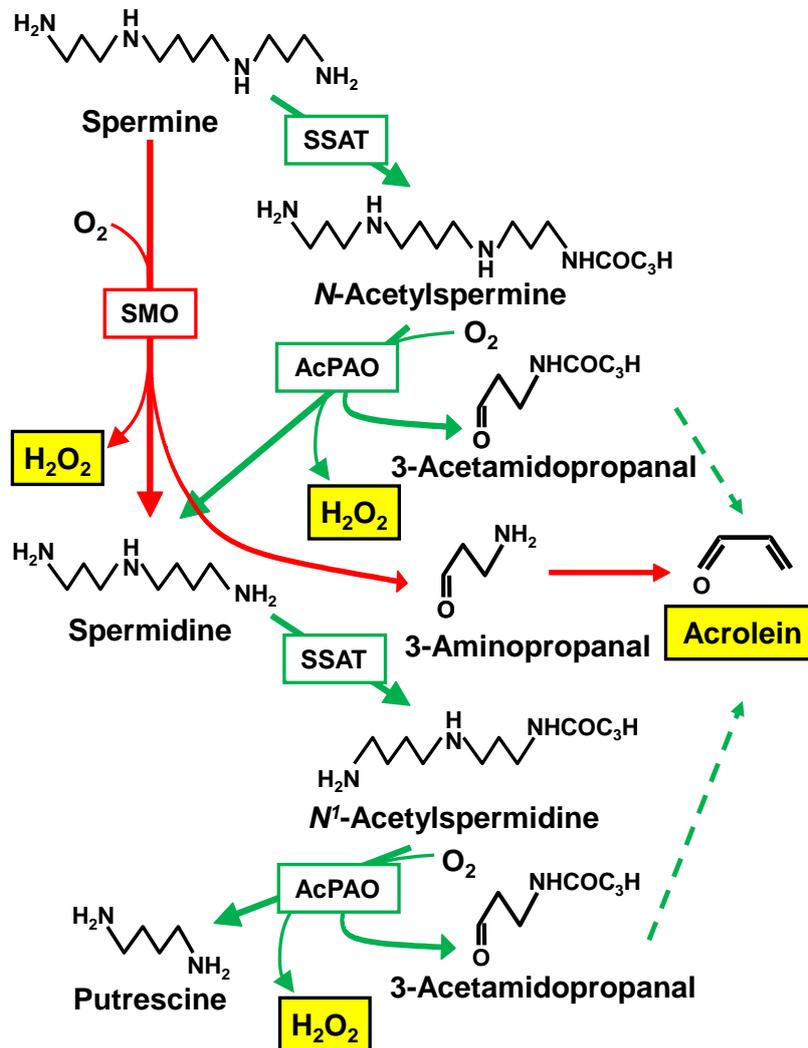


Fig. 4 ポリアミン酸化分解とアクロレイン産生

アクロレインは 2 つのポリアミン酸化分解経路により産生される。スペルミン (SPM) からスペルミンオキシダーゼ (SMO) により産生される 3-アミノプロパナールより自発的にアクロレインが産生される経路と【18】、SPM 若しくはスペルミジンからスペルミジン/スペルミン *N*¹-アセチルトランスフェラーゼ (SSAT) 及び *N*¹-アセチルポリアミンオキシダーゼ (AcPAO) によって産生される 3-アセトアミドプロパナールより生じる経路が存在する【19】。アクロレインは、3-アセトアミドプロパナールより 3-アミノプロパナールから効率良く産生されることから【20】、主に SPM が SMO に分解されて生じると考えられている。

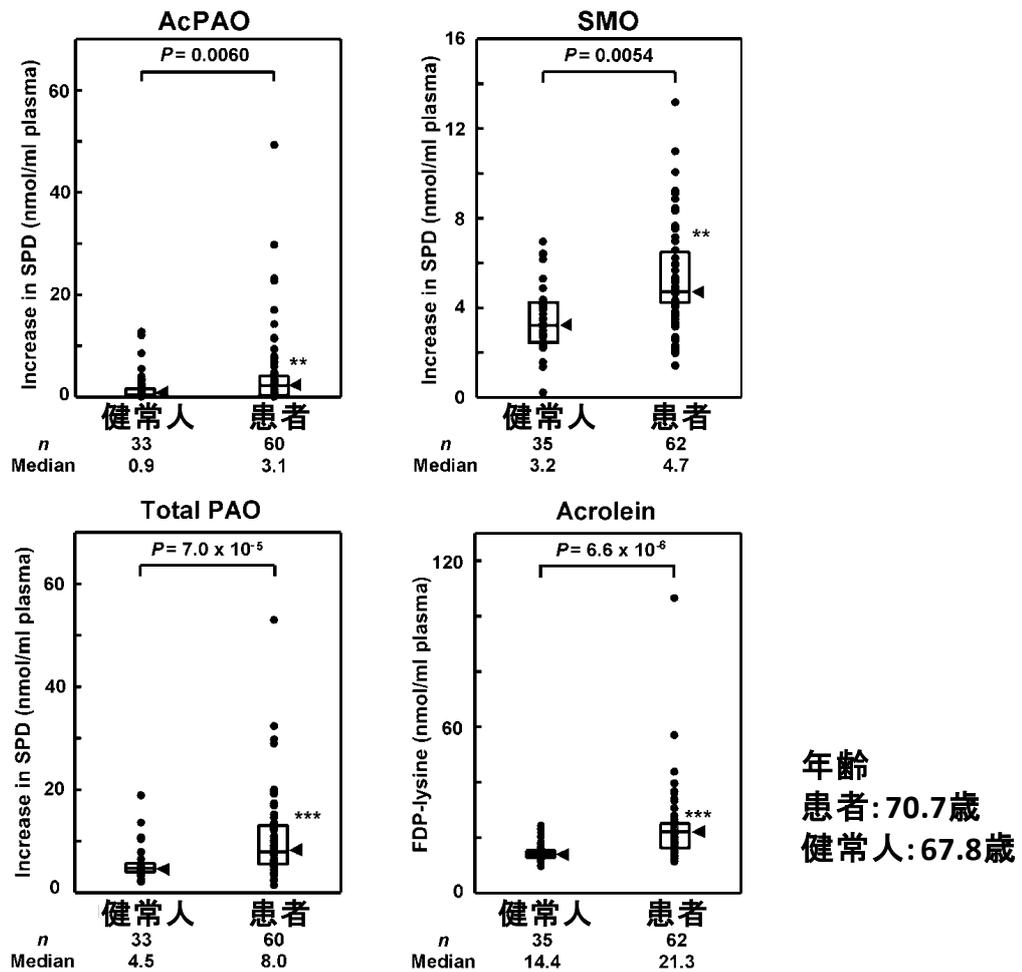


Fig. 5 脳梗塞患者の血中ポリアミンオキシダーゼ活性及びアクロレイン量の増加

健常者と脳梗塞患者の血中ポリアミンオキシダーゼの活性及びアクロレイン量を比較した。血中ポリアミンオキシダーゼの比較は、スペルミンオキシダーゼ (SMO)、*N*¹-アセチルポリアミンオキシダーゼ (AcPAO) 及び両酵素を加えた総ポリアミンオキシダーゼ (total PAO) で行い、血中アクロレイン量の比較は蛋白質に結合したアクロレイン (FDP-lysine) で行われた。脳梗塞患者ではこれらの値が有意に増加しており、バイオマーカーとして有用であることが提唱された【24】。**は $p < 0.01$ 、***は $p < 0.001$ を表す。

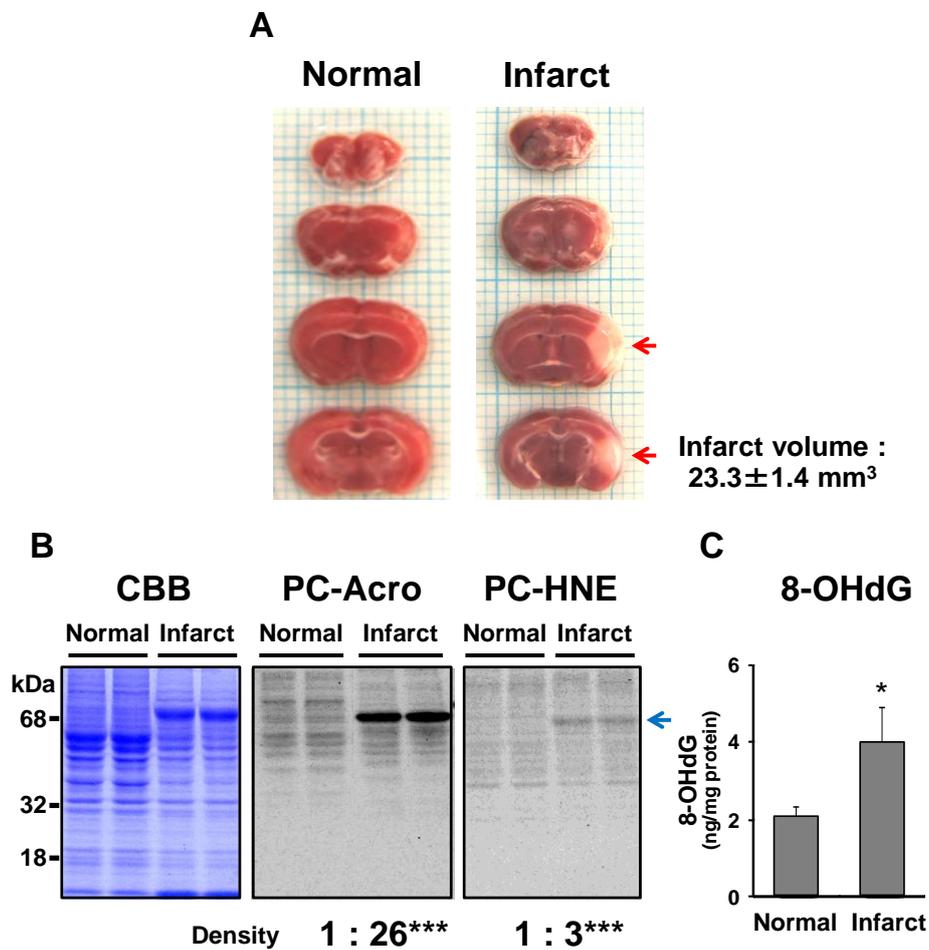


Fig. 6 脳梗塞部位における PC-Acro の増加と活性酸素による PC-HNE 及び 8-OHdG

脳梗塞モデルマウスを用いて、梗塞部位のアクロレインと活性酸素の発生量を比較した。A. 白い部分が梗塞巣であり、←で示す。B, C. アクロレインの指標として蛋白質結合型アクロレイン (PC-Acro) を、活性酸素の指標として蛋白質結合型 4-ヒドロキシノネナール (PC-HNE) と 8-ヒドロキシデオキシグアノシン (8-OHdG) を測定した結果、梗塞部位ではアクロレインがアルブミンと結合し (←)、PC-Acro が大量に発生していることを明らかにした。また、脳梗塞の細胞障害には活性酸素だけでなくアクロレインが関与することを示唆した【31】。

第 1 章

アクロレイン耐性細胞の樹立及び その毒性解除機構の解明

【目的】

これまでに、当研究室では腎不全や脳梗塞などの細胞障害性疾患において、患者血中のポリアミンオキシダーゼ活性や蛋白質結合型アクロレイン (PC-Acro) 量が有意に増加していることを明らかにしてきた【21, 24】。また、脳梗塞モデルマウスの実験で、アクロレイン除去剤である *N*-ベンジルヒドロキシルアミンが梗塞巣の拡大を有意に抑制し、梗塞部位の細胞障害にアクロレインが深く関与していることを明らかにした【32】。細胞内において、アクロレインは mM オーダーで存在するグルタチオンと結合して無毒化されるか【53, 56】、アルデヒドデヒドロゲナーゼにより分解されることが知られているが【56】、アクロレインの細胞増殖阻害機構は未だに不明な点が多い。本研究では、アクロレインの細胞毒性機序を明らかにすることを目的として、アクロレインの毒性除去に関わる重要な因子を解明するため、アクロレイン耐性細胞の樹立を試みた。

【材料と方法】

1. 細胞培養及びアクロレイン耐性細胞の作製

マウス乳がん細胞 FM3A (Japan Health Science Foundation) とマウス神経芽細胞腫 Neuro2a (DS Pharma Biomedical Co., Ltd.) を用いて、アクロレイン耐性細胞を作製した。FM3A (1×10^4 cells/mL) は、D-MEM (Wako) に 2% 胎児ウシ血清 (FBS) (GIBCO®) を添加した培地で、37°C、5% CO₂ で培養した。Neuro2a (5×10^4 cells/mL) は、D-MEM に 10% FBS 及び非必須アミノ酸 (SIGMA-ALDRICH®) を添加した培地で、37°C、5% CO₂ で培養した。アクロレイン若しくは過酸化水素 (H₂O₂) の細胞毒性を見る際には、アクロレイン (TOKYO CHEMICAL INDUSTRY CO., LTD.) 若しくは H₂O₂ (Wako) を添加してから細胞培養を行った。細胞の生存数は 0.3% トリパンブルーで細胞を染色し、顕微鏡下で血球計算盤を用いてカウントした。

アクロレイン耐性細胞の作製は、Samata らの方法【57】を参考にして行った。対数増殖期の FM3A 若しくは Neuro2a を 2×10^5 cells/mL に調整し、0.1% Ethylmethanesulfonate (SIGMA-ALDRICH®) で 3 時間処理を行った。処理した細胞を培地で 3 回洗浄し、同培地で 3 日間培養した。後に、処理した細胞はアクロレインを添加した選択培地にて培養した。選択培地のアクロレイン濃度は、6 ヶ月以上をかけて、10 µM から段階的に濃度を上げ、アクロレイン耐性細胞を選別した。

2. 細胞内グルタチオン量の測定

グルタチオンの定量は Northwest Life Science Specialties, LLC のグルタチオン測定キットを用いて行った。細胞 5×10^6 cells に対し 500 µL の 10% TCA を添加し、氷中にて 30 分間放置し、4°C にて 15,000 回転で 10 分間遠心した。得られた上清は添付の assay buffer で 20 倍以上に希釈し、沈殿物は 0.2 M NaOH に溶解した。希釈した上清を 96 well plate に 50 µL 入れ、添付の 5-5'-dithiobis[2-nitrobenzoic acid] 及びグルタチオンレダクタ

ーゼを 50 μ L ずつ添加し、室温にて 3-5 分間放置し、酸化型グルタチオンを還元型グルタチオンにした。続いて添付の NADPH 溶液を 50 μ L 加え、直ちに BIO-RAD Model 550 MICROPLATE READER を用いて、1 分毎に 3 分間、405 nm で測定した。また、NaOH に溶解した沈殿物中の蛋白質量は Bradford 法【58】に従い、Bio-Rad protein assay (Bio-Rad) を用いて測定した。

3. SDS-ポリアクリルアミド電気泳動 (PAGE) 及びウェスタンブロット解析

細胞 2×10^6 cells に対し 100 μ L の cell lysis buffer (20 mM Tris-HCl(pH7.5), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 50 μ M FUT175) で懸濁し、凍結融解を 3 回繰り返した後に、ホモジナイズし、4°C にて 15,000 回転で 10 分間遠心し、得られた上清を細胞可溶化液とした。細胞可溶化液の蛋白質濃度の測定は Bradford 法【58】に従い、Bio-Rad protein assay (Bio-Rad) を用いて行った。

細胞可溶化液 (20 μ g 蛋白質相当量) を 2 x SDS-PAGE sample buffer (50 mM Tris-HCl(pH6.8), 10% Glycerol, 2% SDS, 2% Mercaptoethanol, 0.1% Bromophenol Blue) と混ぜ、加熱処理した。続いて、7.5-12%のポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動し、ゲルから蛋白質を Immobilon-P Transfer membrane (MILLIPORE) に 4°C にて 25 V で 16 時間転写した。メンブレンは 5% skim milk を含む TBS-T (10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 0.05% Tween20) で 1 時間ブロッキングし、1 次抗体は室温にて 1 時間若しくは 4°C にて一晩反応させた。2 次抗体 (anti-rabbit antibody 若しくは anti-mouse antibody (1: 10000, GE Healthcare)) は、室温にて 0.5-1 時間反応させた。Amersham™ ECL™ Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare) を用いて、FUJIFILM LUMINESCENT IMAGE ANALYZER LAS-3000 にて定量を行った。上記で用いた抗体は TBS-T で希釈した。また、PC-Acro (1: 2500) に対する 1 次抗体は NOF CORPORATION、 γ -グルタミルシステインリガーゼの catalytic subunit (GCLC, 1: 200)、グルタチオンシンテターゼ (GSHS, 1: 200)、c-Jun (1: 1000)、NF- κ B p65 (1: 1000)、c-Jun N 末端キナーゼ 1 (JNK1, 1: 1000) に対する 1 次抗体は、Santa Cruz Biotechnology, Inc.、phospho-c-Jun (1: 1000)、phospho-NF- κ B p65 (1: 1000)、JNK2 (1: 1000)、JNK3 (1: 1000)、phospho-JNK1 (1: 1000)、

phospho-JNK2/3 (1: 1000) に対する 1 次抗体は Cell Signaling Technology より購入した。

4. ノーザンブロット解析

細胞 5×10^6 cells に対して 1 mL の TRIzol® (Invitrogen™) に懸濁し、室温にて 5 分間放置した。続いて、0.2 mL の CHCl_3 を添加し、4°C にて 10,000 回転で 15 分間遠心し、得られた上層を 0.5 mL の isopropanol を添加し、4°C にて 10,000 回転で 10 分間遠心した。得られた沈殿物 (total RNA) を 75% EtOH で洗浄し、手早く乾燥させ、RNase-free water に懸濁した後に、55°C で 10 分間加熱した。

Poly(A)⁺ RNA の精製は、上記で得られた total RNA から Fast Track® 2.0 Kit (Invitrogen™) を用いて行った。1 mg の total RNA を EtOH で沈殿させ、洗浄、乾燥をした後、100 µL の添付の Elution Buffer で懸濁した。次に 10 mL の Fast Track® 2.0 Lysis Buffer を添加し、65°C にて 5 分間加熱した後に、1 分間氷中につけた。650 µL の 5 M NaCl を添加し、穏やかに転倒混和した。oligo(dT) cellulose を添加し、1 時間穏やかに反転させ、Poly(A)⁺ RNA と反応させた。次に、室温にて 3000 xg で 5 分間遠心して oligo(dT) cellulose を沈殿させ、20 若しくは 10 mL の Binding Buffer で 2 回洗浄した。さらに 10 mL の Low Salt Wash Buffer で 3 回洗浄した後に、800 µL の Low Salt Wash Buffer に懸濁し、スピнкаラムへ移し、室温にて 5,000 xg で 10 秒間遠心した。また、500 µL の Low Salt Wash Buffer でさらに 3 回洗浄した。次いで、スピнкаラムを新しいチューブに移し、200 µL の Elution Buffer で 2 回溶出した。溶出液に 60 µL の 2 M sodium acetate と 1 mL の EtOH を添加し、-80°C にて 15 分間放置し、4°C にて 15,000 回転で 15 分間遠心した。得られた沈殿物 (poly(A)⁺ RNA) を 75% EtOH で洗浄し、手早く乾燥させ、20 µL の Elution Buffer に懸濁した。

得られた total RNA 若しくは poly(A)⁺ RNA を核酸の濃度は分光光度計で測定し、total RNA (60 µg 相当量) 若しくは poly(A)⁺ RNA (3 µg 相当量) を、最終濃度が 40% formamide、5% formaldehyde、1 x MOPS (40 mM MOPS-KOH (pH 7.4), 4 mM Tricine-KOH (pH 7.4), 0.05% Trisodium citrate, 0.1% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.01% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2 µg/mL Thiamine, 50 mM NaCl) で 15 µL となるように添加し、65°C で 5 分間加熱し変性させた。続いて、氷中

に5分間置き、6 x Loading dye を3 μL 添加して、formaldehyde を含む1.2% アガロースゲルで泳動した。泳動後、ゲルは10 x SSC (1.5 M Sodium Chloride, 0.15 M Sodium Citrate, pH 7.0) で3回洗浄し、formaldehyde を除去した。ゲル中のRNAはキャピラリーブロット法を用いて、GeneScreen Plus[®] Hybridization Transfer membrane (Perkin Elmer[®]) に転写した。転写後のメンブレンは6 x SSC で洗浄し、UV crosslinker (CL-1000) を用いてRNAを固定させた。

Hybridization 及び Probe の標識化は、ECL Direct Nucleic Acid Labelling and Detection System (GE Healthcare) を用いて行った。添付の Hybridization Buffer 5 mL でメンブレンを42°C にて1時間振とうした。Probe (100 ng/10 μL RNase-free water) は、5分間煮沸し、氷中に5分間置いた後に、10 μL の DNA labeling reagent と10 μL の glutaraldehyde を添加し、37°C で10分間反応させてラベルした。ラベル化した Probe は Hybridization Buffer によく混ぜ、42°C で16-20時間反応させた。メンブレンは Primary wash buffer (4 mg/mL SDS を含む0.5 x SSC) と Secondary wash buffer (2 x SSC) で2回ずつ洗浄し、FUJIFILM LUMINESCENT IMAGE ANALYZER LAS-3000 にて定量を行った。

Probe は以下のように作製した。total RNA を Cloned AMV First-Strand cDNA Synthesis Kit (Invitrogen[™]) を用いて逆転写した。5 μg の total RNA を鋳型として、添付の50 μM Oligo(dT)₂₀ を1 μL 、10 mM dNTP Mix を2 μL 加え、65°C で5分間加熱した。次いで、氷中で5 x cDNA Synthesis buffer を4 μL 、0.1 M DTT を1 μL 、RNaseOUT[™] (40 U/ μL) を1 μL 、RNase-free water を1 μL 、Cloned AMV RT (15 U/ μL) を1 μL 添加し、50°C で1時間、85°C で5分間反応させ、cDNA を得た。また、Random hexamers (50 ng/ μL) を用いる場合は、Oligo(dT)₂₀ の代わりに Rndom hexamers を1 μL 添加し、25°C で10分間、50°C で50分間反応させ、cDNA を得た。続いて、cDNA を鋳型として、*Pfu* DNA polymerase (Bioneer Corporation) 及び Table 1 の Primer を用いて PCR 法より増幅した。cDNA を2 μL 、10 μM Primer を5 μL ずつ、添付の10 x Reaction buffer を10 μL 、dNTPs mixture を8 μL 、*Pfu* DNA polymerase を1 μL を混ぜて100 μL とし、Denaturation は94°C で30秒、Annealing は55°C で30秒、Elongation は72°C で1-4分の条件で30-35サイクル反応させ、増幅した。PCR産物は0.8% アガロース(L)ゲルを用いて低融点電気泳動で分離し、ゲルより目的の配列を切り出した。目的の配列は、QIAquick[®] Gel Extraction Kit (QIAGEN) を用いて、ゲルより抽出した。ゲルの3倍量の Buffer QG を添加し、

55°C で 10 分間、ゲルを溶解した。ゲルの 1 倍量の isopropanol を添加し、激しく混和した後に、添付のスピンカラムに吸着させた。さらに 500 μ L の Buffer QG を添加し、ゲルを除いた。次に 750 μ L の Buffer PE を加え、洗浄した。30-50 μ L の Buffer EB を添加し、1 分間放置し、スピンカラムに新しいチューブを設置して溶出し、Probe として用いた。

Table 1

Primer	Sequence
GCLC forward	5' -TACGTGTCAGACATTGATTGTCGCTGGGGA-3'
GCLC reverse	5' -TCCAGATAGGAGTTCAGAATGGGGATGAGT-3'
GSHS forward	5' -ACGCTTTTCCCCTCACCAGTACC-3'
GSHS reverse	5' -GTCGGTGCACAGCTGGAGTCC-3'

5. GCLC mRNA 及び genome DNA の塩基配列決定

total RNA を Cloned AMV First-Strand cDNA Synthesis Kit (Invitrogen™) を用いて逆転写し、cDNA を得た。また、GCLC genome DNA は total RNA の精製と同様に、TRIzol® (Invitrogen™) を用いて精製した。細胞 5×10^6 cells に対して 1 mL の TRIzol® (Invitrogen™) に懸濁し、室温にて 5 分間放置した。続いて、0.2 mL の CHCl_3 を添加し、4°C にて 10,000 回転で 15 分間遠心し、得られた下層に 0.3 mL の EtOH を添加し、反転させ、室温にて 2-3 分放置し、4°C にて 2,000 xg で 5 分間遠心した。得られた沈殿物は 1 mL の 0.1 M sodium citrate-10% EtOH 溶液に懸濁し室温にて 30 分間放置し、4°C にて 2,000 xg で 5 分間遠心した。これを 2 回繰り返した後に、1.5 mL の 70% EtOH で洗浄し、手早く乾燥させ 300 μ L の 8 mM NaOH に懸濁し、4°C にて 10,000 回転で 10 分間遠心した。得られた上清 (genome DNA) 1 mL に対して 0.1 M HEPES を 101 μ L 添加し、さらに最終濃度が 1 mM となるように EDTA-Na を添加した。

得られた cDNA 及び genome DNA は *Pfu* DNA polymerase (Bioneer Corporation) 及び Table 1, 2 の Primer を用いて PCR 法により増幅し、0.8% アガロース(L)ゲルを用いて低

融点電気泳動で分離し、ゲルより目的の配列を切り出した。目的の配列は、QIAquick® Gel Extraction Kit (QIAGEN) を用いてゲルより抽出し、BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を用いて反応させた。ゲルより抽出した鋳型に Table 1, 2 の Primer (2 μM) を 0.5 μL、添付の 5 x Sequencing Buffer を 1 μL、Sequencing RR-100 を 1 μL 添加し、Denaturation は 96°C で 10 秒、Annealing は 50°C で 5 秒、Elongation は 60°C で 4 分の条件で 25 サイクル反応させた。得られた反応生成物を Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer にて解析し、塩基配列を決定した。

Table 2

Primer	Sequence
GCLC forward_1	5' -AGCGGAGCTGCGGCCGGGAGGAGA-3'
GCLC forward_2	5' -ATGGGGCTGCTGTCCCAAGGCTCGCCACTG-3'
GCLC forward_3	5' -ATCCTCCAGTTCCTGCAGATCTACCACGCA-3'
GCLC forward_4	5' -CCATCCGACCCTCTGGAGACCAGAGTATGG-3'
GCLC reverse_1	5' -CTGGGGAATGAAGTGATGGTGCAGAGAGCC-3'
GCLC reverse_2	5' -TGTGAATCCAGGACAGCCTAGTCTGGGGAA-3'
GCLC forward_5	5' -TAAACAAGCACCCCCGCTTCGGTACTCTAA-3'
GCLC forward_6	5' -ATACACCTGGATGATGCCAACGAGTCTGAC-3'
GCLC forward_7	5' -AACATGAAAGTGGCCCAGAAGCGAGATGCT-3'
GCLC forward_8	5' -TCTGGAGAACTAATGACTGTTGCCAGGTGG-3'
GCLC reverse_3	5' -GTAAATTCAGTGAATCAGGTCCCAGGTAG-3'
GCLC genome DNA forward	5' -TTTTGGCTTTCACCTGGTGTGTTTATGAGTT-3'
GCLC genome DNA reverse	5' -GTACTCACTAAACTCATCCCTTCTATAGCA-3'

6. 統計処理

値は $\text{mean} \pm \text{S.E.}$ ($n = 3$) で示し、親株群と耐性株群を Student の t 検定を用いて比較した。

【結果】

1. アクロレイン耐性細胞 FM3A-ATD の樹立及び FM3A-ATD の細胞増殖に対するアクロレインの影響

アクロレインを外から加える場合、培地中に含まれるウシ血清とアクロレインが結合することによって、アクロレインの細胞毒性が減弱するため、培地中のウシ血清が低濃度で培養できる FM3A を用いてアクロレイン耐性細胞を作製した。FM3A は、対数増殖期に変異導入剤 Ethylmethanesulfonate で処理し、培地中のアクロレイン濃度を 6 ヶ月かけて段階的に上昇させ、アクロレイン耐性細胞を選別し、FM3A-ATD (Acrolein toxicity decreasing FM3A) と命名した。

FM3A-ATD のアクロレインに対する感受性を FM3A と比較したところ、FM3A に対するアクロレインの IC_{50} は $2.6 \mu\text{M}$ 、FM3A-ATD に対しては $7.6 \mu\text{M}$ を示し、約 3 倍に増加した (Fig. 7A)。また、細胞増殖速度を比較した (Fig. 7B)。その結果、アクロレイン非存在下で培養すると、FM3A-ATD は FM3A よりわずかに遅かった。 $4 \mu\text{M}$ のアクロレイン存在下で培養すると、FM3A の細胞増殖は著しく阻害されたが、FM3A-ATD はあまり阻害されなかった。以上の結果より、FM3A-ATD はアクロレインに耐性を示す細胞であることが示唆された。

2. FM3A-ATD における細胞内グルタチオン量の増加

アクロレインは、チオール基と良好に反応することが知られており【33】、細胞内の主なチオール化合物であるグルタチオンについて検討した【53】。FM3A 及び FM3A-ATD の細胞内グルタチオン量を測定したところ、FM3A は $47.2 \text{ nmol/mg protein}$ 、FM3A-ATD は $98.9 \text{ nmol/mg protein}$ を示し、FM3A-ATD は FM3A の約 2 倍のグルタチオン量を示した (Fig. 8A)。また、細胞内グルタチオン量はアクロレインを添加すると一時的に低下するが、次第に回復することから、高濃度のアクロレインを添加した際

の細胞内グルタチオン量を比較した。200 μ M のアクロレインで 1 時間処理すると、FM3A の細胞内グルタチオン量は著しく低下し、検出することができなかった。その一方で、FM3A-ATD の細胞内グルタチオン量は著しく低下したが、11.5 nmol/mg protein のグルタチオンが存在することが確認できた (Fig. 8A)。この時の PC-Acro 量をウェスタンブロット解析により確認したところ、FM3A の PC-Acro 量は FM3A-ATD より増加していた。特に、高分子帯はアクロレインにより架橋し重合化が見られ (Fig. 8A)、高分子帯における PC-Acro 量は FM3A-ATD の 2 倍以上を示し、細胞内グルタチオン量と負の相関を示した。アクロレインの細胞毒性の一つに蛋白質の不活化が報告されている【53】。したがって、細胞内グルタチオン量の増加はアクロレインの蛋白質への付加を減らし、アクロレインの細胞毒性を軽減させることを示唆した。

FM3A-ATD では、細胞内グルタチオン量が増加していたことから、グルタチオンの生合成に関わる酵素について検討した。グルタチオンは、 γ -グルタミルシステインリガーゼ (GCL) と GSHS による 2 段階反応で産生されることが知られている【59, 60】。グルタチオン生合成では、GCL が律速酵素であり、基質であるグルタミン酸とシステインが GCL の catalytic subunit (GCLC) に結合して、 γ -グルタミルシステイン (γ -GC) を合成する。次いで、GSHS が γ -GC にグリシンを結合させ、グルタチオンを合成する。これらグルタチオン産生に関わる酵素の蛋白質及び mRNA 発現量をウェスタンブロット解析やノーザンブロット解析を用いて比較した。その結果、FM3A-ATD では GCLC の蛋白質発現量が約 2 倍の増加を示したが、mRNA 発現量に変化が見られなかった (Fig. 8B)。また、GSHS の蛋白質及び mRNA 発現量は共に変化が見られなかった (Fig. 8B)。これらの結果から、FM3A-ATD の GCLC が翻訳レベルで増加することにより、細胞内グルタチオン量が増加したことが示唆された。

そこで GCLC mRNA の塩基配列を確認したところ、FM3A では完全長の mRNA と exon-7 の欠落した mRNA が同程度認められた (Fig. 9)。一方、FM3A-ATD は完全長の mRNA のみが認められ、FM3A の完全長の mRNA と相違ない配列が確認された (Fig. 9)。これらの結果から、FM3A の GCLC 遺伝子の対立遺伝子の一つが不活性化しており、FM3A-ATD はこれが再活性化したことが示唆された。そこで、GCLC genome DNA の配列を確認したところ、FM3A では intron-7 に 11 塩基の欠落が見られたが、FM3A-ATD では欠落した 11 塩基が挿入されていることが明らかとなった (Fig. 10)。

3. アクロレイン耐性細胞 Neuro2a-ATD の樹立及び Neuro2a-ATD の細胞増殖に対するアクロレインの影響

FM3A の GCLC 遺伝子は、対立遺伝子の一つが不活化しており特殊であった。そこで、異なる細胞株を用いて同様にアクロレイン耐性細胞の樹立を行い、アクロレイン毒性の耐性獲得にグルタチオンが関与するか検討した。Neuro2a は、FM3A 同様に変異原処理を行い、得られたアクロレイン耐性細胞を Neuro2a-ATD (Acrolein toxicity decreasing Neuro2a) と命名した。Neuro2a-ATD のアクロレインに対する感受性を Neuro2a と比較したところ、Neuro2a に対するアクロレインの IC_{50} は $4.2 \mu\text{M}$ 、Neuro2a-ATD に対しては $8.4 \mu\text{M}$ を示し、約 2 倍の増加を示した (Fig. 11A)。また、アクロレイン非存在下で培養した時の細胞増殖速度を比較したところ、Neuro2a-ATD は Neuro2a よりわずかに遅く、 $6 \mu\text{M}$ アクロレイン存在下で培養すると、Neuro2a は細胞増殖を強く阻害されたが、Neuro2a-ATD はあまり阻害されなかった (Fig. 11B)。以上の結果より、Neuro2a-ATD はアクロレイン耐性を示す細胞であることが示唆された。

4. Neuro2a-ATD における細胞内グルタチオン量の増加

FM3A と同様に細胞内グルタチオン量を測定したところ、Neuro2a は $20.4 \text{ nmol/mg protein}$ を示し、Neuro2a-ATD は $33.9 \text{ nmol/mg protein}$ を示した (Fig. 12A)。これに対し、 $200 \mu\text{M}$ のアクロレインに 1 時間処理した際の細胞内グルタチオン量は、Neuro2a では著しく低下し検出できなかったが、Neuro2a-ATD では $5.7 \text{ nmol/mg protein}$ を検出することができた (Fig. 12A)。また、この際の PC-Acro 量を比較したところ、Neuro2a はアクロレインにより重合化した蛋白質が Neuro2a-ATD の約 1.5 倍に増加していた (Fig. 12A)。これらの結果から、細胞内グルタチオン量の増加は、異なる細胞株の共通のメカニズムであり、アクロレイン毒性に対する耐性を得るための重要な役割を担っていることを支持した。

Neuro2a-ATD の細胞内グルタチオン量が増加するメカニズムを解明するため、グルタチオンの生合成に関わる酵素について検討した。Neuro2a-ATD は Neuro2a と比較し

て GCLC 及び GSHS の蛋白質や mRNA 発現量が増加し (Fig. 12B)、これらの酵素が転写レベルで増加していることを示唆した。これまでに、GCLC 及び GSHS は c-Jun や NF- κ B (Nuclear factor- κ B) のリン酸化による活性化によって転写が促進されることが報告されている【61, 62】。そこで、Neuro2a-ATD の c-Jun と NF- κ B p65 の蛋白質発現量及びそのリン酸化の程度をウェスタンブロット解析より比較した。その結果、c-Jun 及び NF- κ B p65 の蛋白質発現量に変化は見られなかったが、その活性型である phospho-c-Jun 及び phospho-NF- κ B p65 が増加していた (Fig. 13B)。また、c-Jun 及び NF- κ B のリン酸化は c-Jun N-末端キナーゼ (JNK) が担っていることが報告されている【63】。そこで、JNK1-3 の蛋白質発現量及びその活性型の量を比較した。その結果、Neuro2a と比較して、Neuro2a-ATD の JNK1-3 の蛋白質発現量に変化は見られなかったが、活性型である phospho-JNK1-3 が増加した (Fig. 13C)。これらの結果から、Neuro2a-ATD は、リン酸化による JNK の活性化を介してグルタチオン合成酵素の活性が高まり、細胞内グルタチオン量が増加したことを明らかにした。

5. FM3A-ATD 及び Neuro2a-ATD の細胞増殖に対する過酸化水素の毒性

活性酸素の一つである H_2O_2 は、カタラーゼやグルタチオン存在下のグルタチオンペルオキシダーゼにより水に代謝される【64, 65】。そこで、FM3A-ATD 及び Neuro2a-ATD がアクロレイン毒性を軽減したように、 H_2O_2 毒性を緩和できるか検討した。コントロールとして、アクロレインに対する毒性も検討した。アクロレイン (4-8 μ M) は、 H_2O_2 (50-100 μ M) より低い濃度で毒性を示すことが明らかとなっている【33】。

FM3A-ATD と Neuro2a-ATD の H_2O_2 に対する耐性度は、アクロレインと比較すると低かった。しかしながら、FM3A 及び Neuro2a と比較して、FM3A-ATD と Neuro2a-ATD は H_2O_2 の毒性を軽減していた (Fig. 14)。この結果は、グルタチオンはアクロレインだけでなく、グルタチオンペルオキシダーゼにより H_2O_2 も解毒するが、 H_2O_2 よりもアクロレインの解毒に関与していることを示唆した。

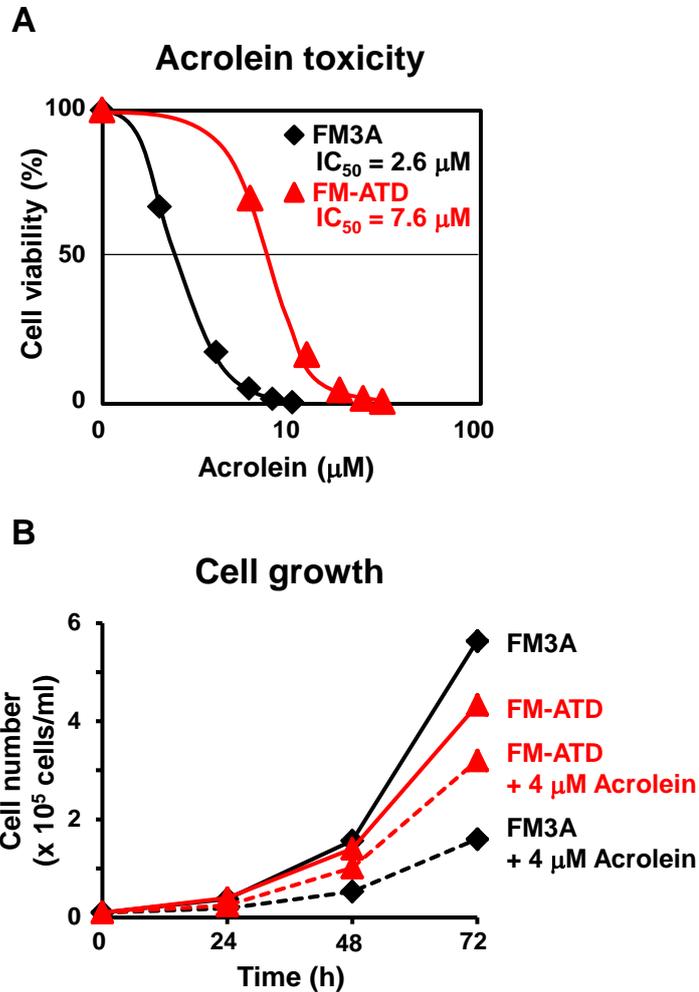


Fig. 7 マウス乳がん細胞 FM3A 由来アクロレイン耐性細胞 FM3A-ATD の細胞増殖に対するアクロレインの影響

A. アクロレイン濃度の異なる培地を用いて 3 日間培養し、FM3A 及び FM3A-ATD に対するアクロレインの IC_{50} を求めた。B. 4 μ M のアクロレインを含む培地で FM3A 及び FM3A-ATD を 3 日間培養し、細胞増殖を比較した。値は mean \pm S.E. (n = 3) で表す。FM-ATD は FM3A-ATD を示す。

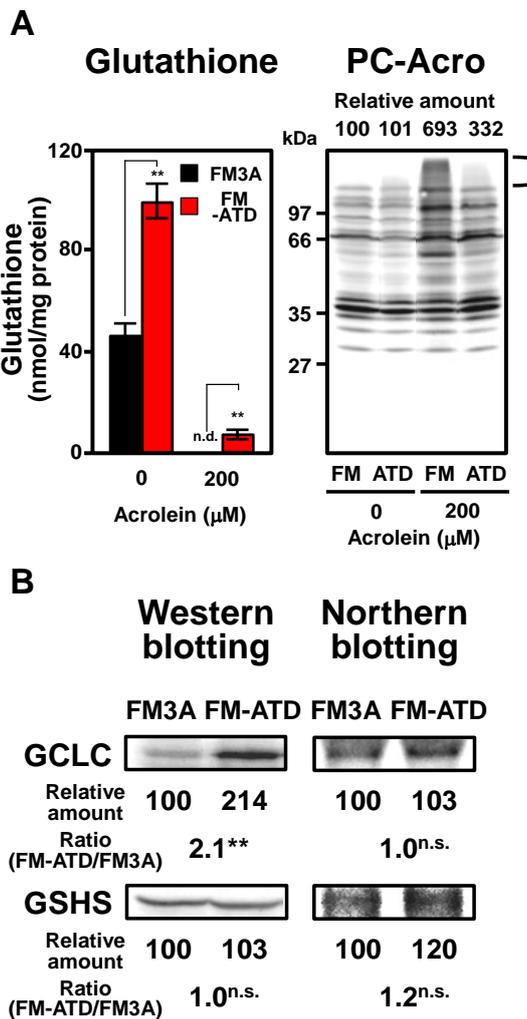


Fig. 8 FM3A-ATD におけるグルタチオン量の増加

A. 200 μM アクロレインで1時間処理した時の細胞内グルタチオン量と蛋白質結合型アクロレイン (PC-Acro) 量を比較した。アクロレインにより重合した蛋白質部分(角括弧部分)の PC-Acro 量を相対量として%で表す。B. グルタチオンの生合成酵素であるγ-グルタミルシステインリガーゼの catalytic subunit (GCLC) とグルタチオンシンターゼ (GSHS) の蛋白質及び mRNA の発現量をウェスタンブロット解析及びノーザンブロット解析を用いて比較した。値は mean±S.E. (n=3) で表す。^{n.s.}は p ≥ 0.05、**は p < 0.01、^{n.d.}は not detected を表す。FM は FM3A、FM-ATD 若しくは ATD は FM3A-ATD を表す。

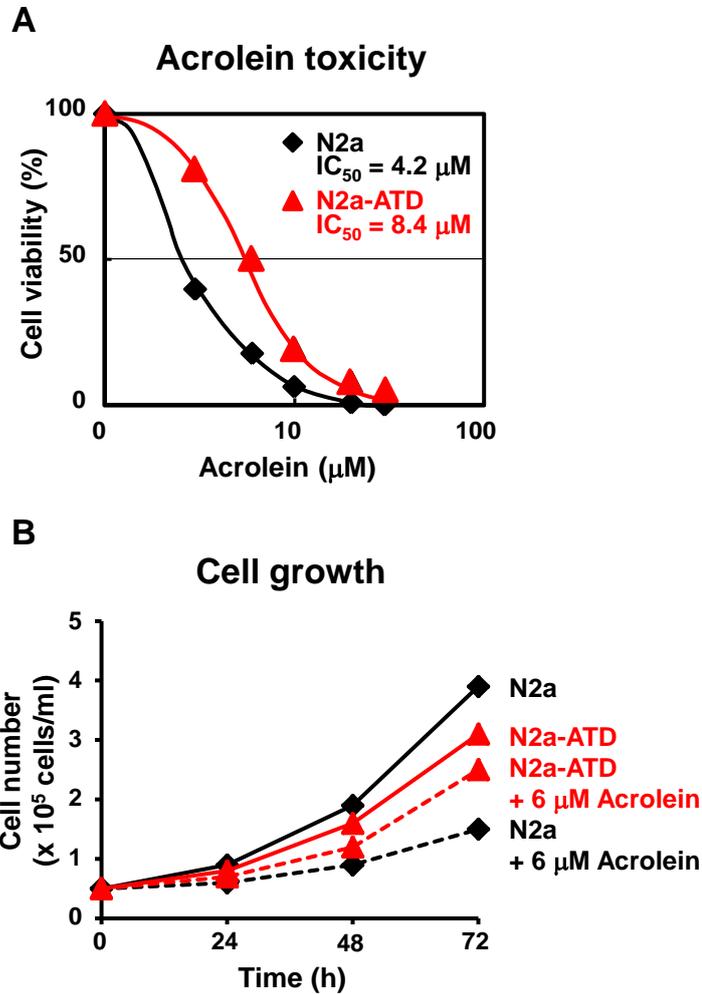


Fig. 11 マウス神経芽細胞腫 Neuro2a 由来アクロレイン耐性細胞 Neuro2a-ATD の細胞増殖に対するアクロレインの影響

A. アクロレイン濃度の異なる培地を用いて3日間培養し、Neuro2a及びNeuro2a-ATD に対するアクロレインの IC_{50} を求めた。B. 6 μM のアクロレインを含む培地で Neuro2a 及び Neuro2a-ATD を 3 日間培養し、細胞増殖を比較した。値は mean \pm S.E. (n = 3) で 表す。N2a は Neuro2a、N2a-ATD は Neuro2a-ATD を示す。

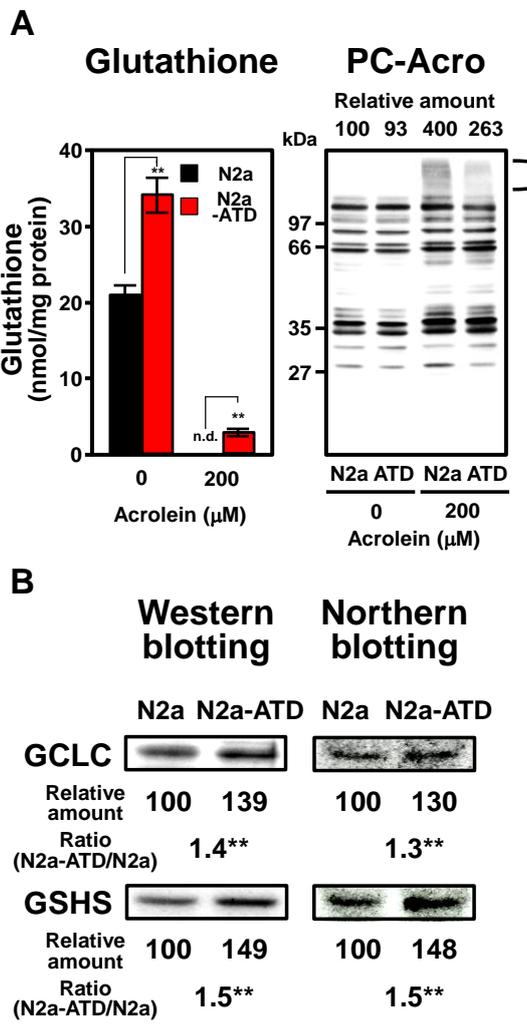


Fig. 12 Neuro2a-ATD におけるグルタチオン量の増加

A. 200 μM アクロレインで1時間処理した時の細胞内グルタチオン量と蛋白質結合型アクロレイン (PC-Acro) 量を比較した。アクロレインにより重合した蛋白質部分(角括弧部分)の PC-Acro 量を相対量として%で表す。B. グルタチオンの生合成酵素であるγ-グルタミルシステインリガーゼの catalytic subunit (GCLC) とグルタチオンシンターゼ (GSHS) の蛋白質及び mRNA 発現量をウェスタンブロット解析及びノーザンブロット解析を用いて比較した。値は mean±S.E. (n=3) で表す。**は p<0.01、n.d. は not detected を表す。N2a は Neuro2a、N2a-ATD 若しくは ATD は Neuro2a-ATD を示す。

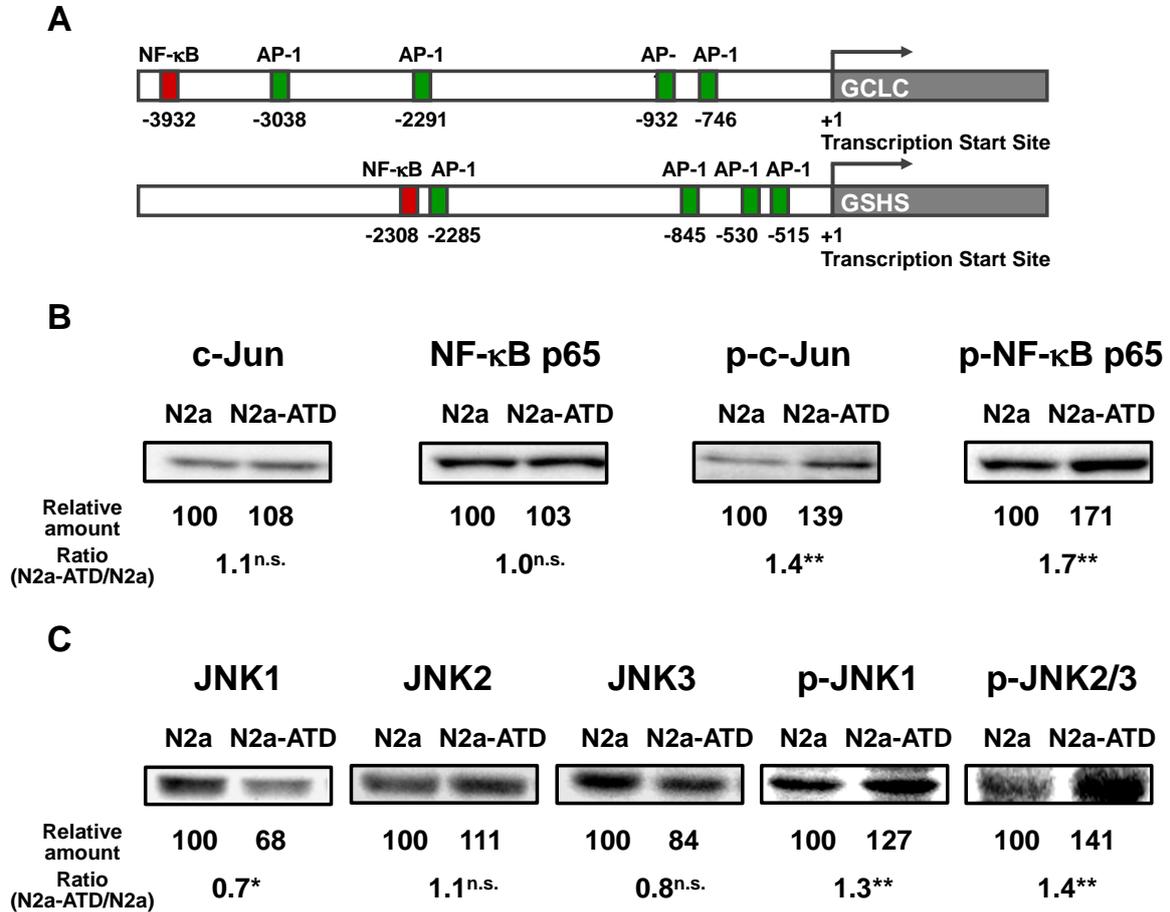


Fig. 13 Neuro2a-ATD における GCLC 及び GSHS の共通の転写因子とそのリン酸化

A. γ -グルタミルシステインリガーゼの catalytic subunit (GCLC) とグルタチオンシテターゼ (GSHS) の共通の転写因子である AP-1 (Activator protein 1、c-Jun 及び c-Fos) と NF- κ B (Nuclear factor- κ B) の結合部位を模した図を示す。B, C. c-Jun、NF- κ B p65、c-Jun N 末端キナーゼ (JNK1-3) の蛋白質発現量及びその活性型の量をウェスタンブロット解析により比較した。値は mean \pm S.E. (n = 3) で表す。^{n.s.}は $p \geq 0.05$ 、^{*}は $p < 0.05$ 、^{**}は $p < 0.01$ を表す。N2a は Neuro2a、N2a-ATD は Neuro2a-ATD を示す。

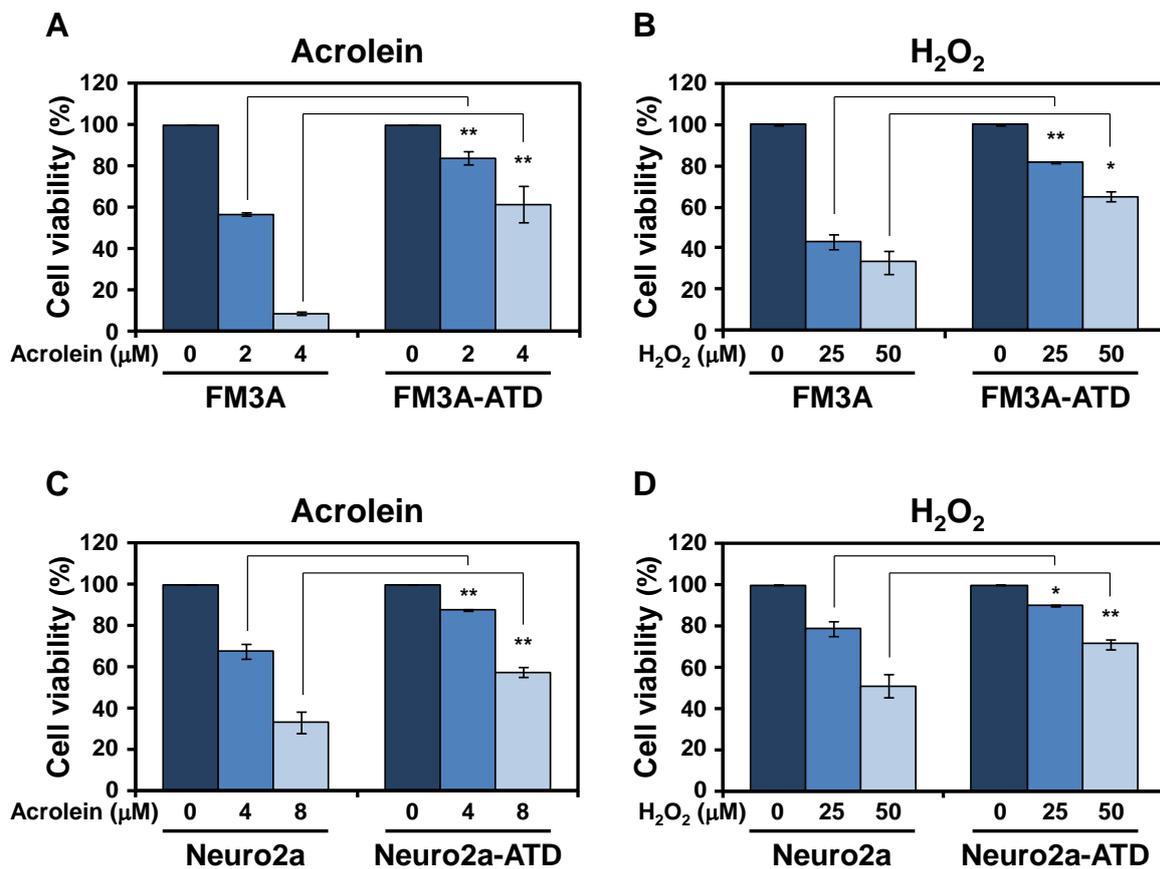


Fig. 14 FM3A-ATD 及び Neuro2a-ATD の細胞増殖に対する過酸化水素の毒性

細胞は 0-8 μM のアクロレイン若しくは 0-50 μM の過酸化水素 (H₂O₂) の存在下で 3 日間培養し、アクロレインと H₂O₂ の毒性による細胞増殖阻害の程度を比較した。値は mean ± S.E. (n = 3) で表す。*は p < 0.05、**は p < 0.01 を表す。

【考察】

本研究では、細胞内におけるアクロレインの毒性解除機構を解明するため、アクロレイン耐性細胞を樹立した。FM3A と Neuro2a は共に、細胞内グルタチオン量の増加によりアクロレインの毒性が減弱された。これらの結果は、グルタチオンがアクロレインの解毒に重要な因子であることを示唆した。通常、細胞内のグルタチオン濃度は 1-10 mM であることが知られているが【66】、FM3A-ATD 及び Neuro2a-ATD は、およそ 8-20 mM であった。それゆえ、これら耐性株よりも細胞内グルタチオン濃度が高く、アクロレイン毒性をより軽減するような細胞株を得ることは困難であった。その理由として、グルタチオン合成にグリシンやシステイン、グルタミン酸量が非常に多く必要であるためと考えられる。本研究結果は、アクロレインによる細胞死が細胞内グルタチオン量の変化と密接に関係しているという知見と一致した【67-69】。

FM3A-ATD と Neuro2a-ATD の耐性獲得の共通のメカニズムとして、グルタチオン含量の増加が見られた。しかし、グルタチオン増加のメカニズムは 2 つの細胞株で異なっていた。

FM3A-ATD の細胞内グルタチオン量は、FM3A の約 2 倍を示し (Fig. 8A)、律速酵素である GCLC の蛋白質発現量が約 2 倍に増加していた (Fig. 8B)。一方、GCLC の mRNA 発現量に変化が見られなかったため、GCLC mRNA の塩基配列を確認した。その結果、FM3A では完全長と exon-7 の欠落した mRNA が同程度確認された (Fig. 9)。最近、マウスの胚を用いて 2 種類の GCLC ノックアウトモデルが作製された【70, 71】。ノックアウトモデルは、exon-1 若しくは exon-4-6 をホモ欠損すると胎生期 8 日で致死を示すことが報告されている。また、exon-4-6 のヘテロ欠損においては GCLC 蛋白質発現量の減少及び酵素活性の低下、グルタチオン量の減少が起きていることが報告されている【71】。これらの報告から、exon-7 が欠落した場合においても成熟した蛋白質が発現されないことが推測される。また、FM3A の GCLC 遺伝子は、exon-7 の下流に位置する intron-7 の一部に 11 塩基の欠落が同程度見られたことから (Fig. 10)、exon-7 を巻き込んでスプライシングが起こることにより、exon-7 の欠落した mRNA を発現し、成熟した蛋白質を発現できないと考えられる。一方、FM3A-ATD において GCLC mRNA は、

FM3A と相違ない配列を持った完全長のみが認められ (Fig. 9)、GCLC 遺伝子は 2 本とも通常のスプライシングを受けていることが示唆された。これらの結果より、FM3A の GCLC 遺伝子は 2 種類の mRNA が存在するが、成熟した蛋白質は完全長の mRNA 由来のもののみであることが考えられる。したがって、FM3A-ATD は FM3A の GCLC 遺伝子の欠落を相補するように変異を生じ、GCLC の蛋白質発現量が 2 倍に増加したと考えられる。また、マウス神経芽細胞腫 Neuro2a の GCLC mRNA の塩基配列も確認したが、FM3A のように exon-7 を欠いた mRNA は見られなかった。そこで、FM3A と同様に Neuro2a に変異原処理を行い、アクロレイン耐性細胞の樹立を行ったところ、FM3A-ATD 同様にグルタチオン量が増加した株が得られた (Fig. 12A)。Neuro2a-ATD の細胞内グルタチオン量は Neuro2a の約 1.5 倍を示し、グルタチオンの生合成酵素である GCLC 及び GSXS の蛋白質、mRNA 発現量は共に増加していた (Fig. 12B)。

Neuro2a-ATD において、両酵素の mRNA の増加が確認されたことから、これらの酵素の共通転写因子について検討した。グルタチオン生合成酵素の発現に重要とされている転写因子には、AP-1 (Activator protein 1) 及び NF- κ B が知られている【61, 62, 72】。これらの転写因子は、酸化ストレスにより活性化されることが知られており、抗酸化に関わる遺伝子群の制御に関わっている【73】。AP-1 は、Jun や Fos ファミリーと呼ばれる蛋白質で構成されるホモ、若しくはヘテロ二量体の転写因子であり、DNA の AP-1 結合部位に結合して転写を促進する【74】。AP-1 の構成蛋白質である c-Jun の蛋白質発現量に差は見られなかったが、活性型である phospho-c-Jun が増加した (Fig. 13B)。また、NF- κ B はクラス I (p50 及び p52) とクラス II (p65, RelB 及び c-Rel) より構成される二量体の転写因子であり、中でも p50 と p65 により構成されるものが一般的である。クラス I は転写活性を有しておらず、クラス II と二量体形成しないと転写活性がないことが知られている【75】。このことから、NF- κ B p65 を検討したところ、蛋白質発現量に変化は見られず、活性型の phospho-NF- κ B p65 が 1.7 倍に増加した (Fig. 13B)。c-Jun 及び NF- κ B p65 は、JNK よりリン酸化を受けることで活性化されることが知られている【63】。また、JNK は酸化ストレスなど種々のストレスによる Mitogen-activated protein kinase (MAPK) のカスケード反応により活性化されることが報告されている【73, 76】このことから、Neuro2a-ATD では JNK より上流の因子に変異があることが予想される。また、Neuro2a-ATD では c-Jun 及び NF- κ B p65 のリン酸化

が重要であり、これにより GCLC と GSHS の転写が促進し、細胞内グルタチオン量が増加したと考えられる。また、FM3A の GCLC 遺伝子は特殊であるが、Neuro2a を用いても同様にグルタチオンが上昇する耐性株が得られ、アクロレイン耐性の獲得にグルタチオンが重要であることが明らかとなった。

グルタチオンはアクロレインだけでなく、グルタチオンペルオキシダーゼを介して H_2O_2 を解毒する【64, 65】。しかしながら、 H_2O_2 の解毒に対するグルタチオンの寄与はアクロレインより低かった (Fig. 14)。この結果は、グルタチオンによる H_2O_2 の毒性解除において、グルタチオンペルオキシダーゼの活性が律速であることを示唆した。また、グルタチオンによる酸化ストレスの緩和は、 H_2O_2 の除去も部分的に行われるが、主にアクロレイン除去によるものと考えられる。

当研究室では、以前に腎不全や脳梗塞で血中 PC-Acro 量が増加していたことを報告した【21, 24, 25, 28】。近年では、原発性シェーグレン症候群患者の唾液中【29】やアルツハイマー病患者の血中【29】においても PC-Acro 量が増加していることを明らかにした。また、他のグループより、アクロレインが脊髄損傷に関与することや、グルタチオンが損傷を和らげることも報告されている【77】。したがって、アクロレインは細胞障害を示す種々の疾患によく関連しており、グルタチオンがアクロレイン毒性を軽減する重要な役割を担っていることを明らかにした。

第2章

アクロレイン抱合蛋白質の同定及び その細胞毒性機序の解明

【目的】

アクロレインは、過酸化水素 (H_2O_2) に比べて極めて強い毒性を示す物質である【17】。 H_2O_2 が DNA 合成阻害作用を示すのに対し、アクロレインは蛋白質合成を阻害することにより、細胞毒性を発揮することが明らかとなっている【33】。また、アクロレインは、蛋白質中のシステイン、リジン、ヒスチジン残基と選択的に反応することが知られている【46, 47】。特に、アクロレインはシステインのチオール基と良好に反応する【33】。これまでに、アクロレインは、ADP/ATP トランスロカーゼ 1【78】、 β -アクチン【79】、NF- κ B (Nuclear factor- κ B)【80】及びチロシンホスファターゼ 1B【81】のシステイン残基と反応し、不活化させることが報告されているが、いずれも実験系は *in vitro* であり、細胞増殖への関与は明らかでない。このため、アクロレインの細胞増殖阻害機構は未だに不明な点が多い。本研究では、細胞培養系を用いてアクロレインが抱合する蛋白質を同定し、細胞レベルで起こるアクロレイン毒性機序の解明を試みた。

【材料と方法】

1. 細胞培養

マウス乳がん細胞 FM3A ($1-2 \times 10^4$ cells/mL) は、D-MEM (Wako) に 2% 胎児ウシ血清 (FBS) (GIBCO®) を添加した培地で培養した。マウス神経芽細胞腫 Neuro2a ($3-5 \times 10^4$ cells/mL) は、D-MEM に 10% FBS 及び非必須アミノ酸 (SIGMA-ALDRICH®) を添加した培地で培養した。アクロレインの細胞毒性を見る際には、アクロレイン (TOKYO CHEMICAL INDUSTRY CO., LTD.) を添加してから細胞培養を行った。細胞の生存数は 0.3% トリパンプルーで細胞を染色し、顕微鏡下で血球計算盤を用いてカウントした。

2. 免疫染色法によるアクロレイン付加体と GAPDH の検出

FM3A (5×10^5 cells/mL) は、0、50、100 μ M のアクロレインで 1 時間処理、若しくは FM3A (1×10^4 cells/mL) は、0、4、8 μ M のアクロレインで 6 時間処理した後に、細胞 5×10^6 cells に対し、1 mL の 2% paraformaldehyde と 0.2% picric acid を含む PBS(-) (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na_2HPO_4 , 1.5 mM KH_2PO_4) に懸濁し、4°C で一晩固定した。固定した細胞は PBS(-) で 3 回洗浄し、poly-L-lysine でコートしたカバーガラスに 10 分間吸着させ、よく冷やした MeOH で 6 分間、よく冷やした Acetone で 30 秒間処理し、細胞をカバーガラス上に完全に固定した。0.3% Triton X-100 を含む PBS(-) で 30 分間、浸透化処理し、5% FBS と 200 μ g/mL RNase A を含む PBS(-) で 30 分間、ブロッキングした。1 次抗体は PBS(-) で 100 倍に希釈し、4°C で一晩反応させた。次いで、2 次抗体 (anti-mouse IgG-Alexa Fluor 488 (Invitrogen™)) と Propidium iodode (Wako) はそれぞれ 200 倍、50 μ g/mL となるように PBS(-) に添加し、室温で 1 時間遮光しながら反応させた。カバーガラスは 0.3% Triton X-100 を含む PBS(-) で 3 回洗浄した後に SlowFade® Gold antifade reagent (Invitrogen™) で封入し、LSM 510 META Laser Scanning

Microscope (Carl Zeiss) を用いて観察した。PC-Acro と DNA 結合型アクロレインに対する 1 次抗体は NOF CORPORATION、GAPDH に対する 1 次抗体は Santa Cruz Biotechnology, Inc.より購入した。DNA 結合型アクロレインに対する 1 次抗体を用いる場合は、浸透化処理とブロッキングの間に以下のような操作を行った。100 µg/mL RNase A を含む TNE buffer (50 mM Tris-HCl(pH 7.5), 140 mM NaCl, 5 mM EDTA) で 1 時間処理し、さらに 10 mg/mL Proteinase K を含む 100 mM Tris-HCl(pH 7.5)-10 mM EDTA 溶液で 10 分間処理した。次いで、DNA を変性させるために 2 M HCl で 5 分間処理した後、2.5 倍量の 1 M Tris-base で中和した。

3. SDS-ポリアクリルアミド電気泳動 (PAGE)

細胞 2×10^6 cells に対し 100 µL の cell lysis buffer (20 mM Tris-HCl(pH7.5), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 50 µM FUT175) で懸濁し、凍結融解を 3 回繰り返した後に、ホモジナイズし、4°C にて 15,000 回転で 10 分間遠心し、得られた上清を細胞可溶化液とした。さらに、細胞可溶化液は 4°C にて 100,000 xg で 1 時間遠心し、得られた上清を S100 画分とした。蛋白質濃度の測定は Bradford 法【58】に従い、Bio-Rad protein assay (Bio-Rad) を用いて測定した。

1 次元電気泳動では、S100 画分 (20 µg 蛋白質相当量) を 2 x SDS-PAGE sample buffer と混和し、12%のポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動した。

また、2 次元電気泳動では、S100 画分の蛋白質を TCA で沈殿させ、1 mL の EtOH/Ether(1:1)で 2 回洗浄した。沈殿させた蛋白質 100 µg を 125 µL の Ready Strip™ 2D Starter Kit Rehydration/sample buffer (Bio-Rad) に溶解し、Ready Strip™ IPG strips (7 cm, pH3-10) (Bio-Rad) にて PROTEAN IEF cell (Bio-Rad) で等電点電気泳動を行った。REHYDRATION STEP は active@50V で、13 時間、FOCUSING STEP は S01 を 250 V、SLOP (Linear) で 15 分間、S02 を 4,000 V、SLOP (Linear) で 1 時間、S03 を 4,000 V、SLOP (Rapid) で 10,000 Vhours、S04 を 500 V、SLOP (Rapid) で 24 時間に設定し泳動した。泳動した strip は Ready Strip™ 2D Starter Kit Equilibration Buffer I (Bio-Rad) で 20 分間振とうし、次いで Ready Strip™ 2D Starter Kit Equilibration Buffer II (Bio-Rad)

で 10 分間振とうすることにより平衡化した。平衡化した strip は 1% アガロースゲルを用いて 12% の SDS-ポリアクリルアミドゲルに接着させ、電気泳動を行った。泳動したゲルはクマシーブリリアントブルー (CBB) を用いて染色した。

4. Plasmid の作製

FM3A 5×10^6 cells に対して 1 mL の TRIzol[®] (Invitrogen[™]) に懸濁し、total RNA を精製した。得られた total RNA を Cloned AMV First-Strand cDNA Synthesis Kit (Invitrogen[™]) を用いて逆転写し、GAPDH と β -アクチンの mRNA の全長を *Pfu* DNA polymerase (Bioneer Corporation) 及び Table 3 の Primer を用いて PCR 法により増幅した。増幅した配列 (insert) と vector として使用する pcDNA3.1(+) (Invitrogen[™]) は、BamH I 及び EcoR I で 3 時間以上処理した後に、0.8% アガロース(L)ゲルを用いて低融点電気泳動を行い、目的の insert 及び vector を分離した。目的の配列をゲルより切り出し、QIAquick[®] Gel Extraction Kit (QIAGEN) を用いて、ゲルより抽出した。続いて、insert と vector を混合し、65°C で 5 分間加熱し、氷中で 5 分間放置した。そこに T4 DNA Ligase (Wako) と添付の 10 x Ligation Buffer を 2 μ L ずつ添加し、16°C で一晩反応させ、insert と vector を連結し、pcDNA-GAPDH 及び pcDNA-GPADH(HA)、pcDNA- β -actin を作製した。

Table 3

Primer	Sequence
GAPDH_forward	5'-CGTAAGGATCCCAAAATGGTGAAGGTCGGT-3'
GAPDH_reverse	5'-GGTGAATTCTTTCTTACTCCTTGGAGGCCA-3'
GAPDH(HA)_reverse	5'-GTGAATTCTTAAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTACTCCTTG GAGGC-3'
β -actin_forward	5'-CGCCACGGATCCGCCATGGATGACGATATC-3'
β -actin_reverse	5'-TCAGTAGAATTCCGCCTAGAAGCACTTGCG-3'

5. アクロレイン抱合を受けた HA 標識 GAPDH の精製

Neuro2a (5 x 10⁵ cells/10 mL) を 48 時間培養し、4 µg の pcDNA-GAPDH(HA) を下記のように導入した。Transfection Reagent A として、750 µL の D-MEM、4 µg の plasmid、20 µL の PlusTM Reagent (InvitrogenTM) を混合し、15 分間室温にて放置した。次に、Transfection Reagent B として、750 µL の D-MEM、30 µL の LipofectamineTM Reagent (InvitrogenTM) を混合した。Transfection Reagent A と B を良く混ぜ、さらに 15 分間室温にて放置し、Transfection Reagent とした。培養した Neuro2a は PBS(-) で 3 回洗浄し、5 mL の D-MEM 及び Transfection Reagent を添加し、37°C、5% CO₂ で 3 時間導入した。その後、Transfection Reagent を除去し、新しい培地を添加し、24 時間培養した後に、40 µM のアクロレインで 9 時間処理した。細胞は PBS(-) で 2 回洗浄し、回収した。細胞 2 x 10⁶ cells に対し 100 µL の cell lysis buffer で懸濁し、細胞可溶化液を作製した。蛋白質濃度の測定は Bradford 法【58】に従い、Bio-Rad protein assay (Bio-Rad) を用いて測定した。細胞可溶化液は 500 µg/1 mL に調整し、HA に対する抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) を 10 µg 添加し、4°C にて一晩反応させた。次に 50% protein G agarose (GE Healthcare) を 60 µL 添加し、4°C で 1 時間反応させた。Protein G agarose は IP Wash buffer (20 mM Tris-HCl (pH7.5), 150 mM NaCl, 0.1% Triton X-100) で 3 回洗浄し、30 µL の 2 x SDS-PAGE sample buffer に懸濁した。蛋白質は 12% SDS-ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動より分離し、HA 標識 GAPDH をゲルより切り出した。

6. 質量分析

LC-MS/MS 解析は、Cai ら【46】と Seiner ら【82】の方法を参考にして行った。2 次元電気泳動で得られた蛋白質、若しくはアクロレイン抱合を受けた HA 標識 GAPDH は、DTT で還元し、アクリルアミドでプロピオンアミド化した。蛋白質は、トリプシン若しくは AspN (Roche Applied Science, USA) を用いて 37°C にて一晩処理した後、LCQ Deca XP を用いた nano LC-MS/MS (Finnigan, USA) により解析した。ペプチドは、reversed-phase material (Inertsil ODS-3, 3 µm, GL Science, Japan) を充填したナノスプレ

一カラム (100 μm i.d. x 375 μm o.d.) を用いて 400 nL/min の条件で分離を行った。質量分光計は positive-ion mode で作動させ、data-dependent MS/MS mode で得られたスペクトルは下記のパラメーターを用いて、NCBI nr 20090606 database 若しくは Mascot Version: 2.3 (Matrix Science, Boston, USA) の in-house database を利用して検索した。

Taxonomy: Mouse (144,768 sequences); Type of search: MS/MS Ion Search; Enzyme: Trypsin and/or Asp-N-ambic, Fixed Modification: none, Variable modifications: Gln->pyro-Glu (N-term Q), Oxidation (M), Propionamide (C), and additional modifications (Acrolein adduct (C): C(3) H(4) O(1), Acrolein adduct (N-term): C(3) H(2), FDP-lysine (K): C(6) H(6) O(1), MP-lysine (K): C(6) H(4), Nim-propanalhistidine (H): C(3) H(4) O(1)); Mass values: monoisotopic; Peptide Mass Tolerance; ± 2 Da, Fragment Mass Tolerance; ± 0.8 Da, Peptide charge 1+, 2+ and 3+, Instrument ESI-TRAP and Allow up to 3 to 4 missed cleavages.

7. GAPDH 活性及び細胞内 ATP 量の測定

FM3A (1×10^4 cells/mL) は 0、4、8 μM のアクロレインを添加した培地で 6、12、24 時間培養し、GAPDH 活性及び細胞内 ATP 量の測定を行った。GAPDH 活性は、Ambion® KAlert™ GAPDH Assay Kit (Life Technologies™) を用いてマニュアルに従って測定した。細胞 1×10^4 cells に対し 100 μL の KAlert™ Lysis Buffer に溶解した。10 μL のサンプルと 90 μL の KAlert Master Mix を 96 well brack plate に添加し、Varioskan Flash Multimode Reader (Thermo Scientific) にて excitation wavelength を 560 nm、emission wavelength を 590 nm に設定し、1 分毎に 5 分間測定した。

細胞内 ATP 量は、ENLITEN® ATP Assay System Bioluminescence Detection Kit for ATP Measurement (Promega) を用いてマニュアルに従って測定した。細胞 1×10^6 cells に対し 100 μL の 2% TCA を添加し、氷中で 10 分間放置した。次いで、4°C にて 15,000 回転で 10 分間遠心して、ATP を抽出した。遠心より得られた上清は、2% TCA で 1/10000-1/1000 に希釈し、沈殿物は 0.2 M NaOH に溶解した。10 μL の希釈したサンプルと 100 μL の rL/L Reagent を混合し、GloMax® 20/20n Luminometer (Promega) を用い

て10秒間測定した。また、NaOHに溶解した沈殿物中の蛋白質量はBradford法【58】に従い、Bio-Rad protein assay (Bio-Rad)を用いて測定した。

8. GAPDH若しくはβ-アクチン過剰産生株におけるアクロレイン毒性の感受性

Neuro2a (5×10^5 cells/10 mL)を48時間培養し、Lipofectamine™ Reagent (Invitrogen™)を用いて4 μgのpcDNA-GAPDH、pcDNA-β-actin若しくはpcDNA3.1(+) (vector)を形質導入した。導入24時間後に、アクロレイン濃度の異なる培地(0-10 μM)を用いて細胞を 5×10^4 cells/2 mLで播種し、3日間培養し、細胞数を確認した。また、播種して余った細胞はPBS(-)で2回洗浄し、細胞 2×10^6 cellsに対し100 μLのcell lysis bufferで懸濁し、細胞可溶化液を作製した。細胞可溶化液の蛋白質濃度の測定はBradford法【58】に従い、Bio-Rad protein assay (Bio-Rad)を用いて測定した。

細胞可溶化液(10 μg蛋白質相当量)を12%のポリアクリルアミドゲルにより電気泳動し、ゲルから蛋白質をImmobilon-P Transfer membrane (MILLIPORE)に転写した。メンブレンは、5% skim milkを含むTBS-Tで1時間ブロッキングし、1次抗体は室温にて1時間反応させ、2次抗体(anti-mouse antibody (1: 10000, GE Healthcare))は室温にて1時間反応させた。Amersham™ ECL™ Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare)を用いて、FUJIFILM LUMINESCENT IMAGE ANALYZER LAS-3000にて定量を行った。上記で用いた抗体はTBS-Tで希釈した。また、GAPDH (1: 2500)及びβ-アクチン (1: 1000)に対する1次抗体は、Santa Cruz Biotechnology, Inc.より購入した。

9. 細胞分画及びアセチル化GAPDHの検出

FM3A (1×10^4 cells/mL)は、8 μMのアクロレインで6時間処理し回収した。細胞分画は、Parkらの方法【83】を参考に行った。細胞 4×10^6 cellsに対し100 μLのNP-40 lysis buffer (10 mM Tris-HCl (pH7.5), 10 mM NaCl, 3 mM MgCl₂, 0.5%(v/v) NP-40, 50 μM

FUT175) に懸濁し、4°C にて 500 xg で 5 分間遠心した。得られた沈殿物 (核) は、0.5 mL の NP-40 lysis buffer で洗浄し、NP-40 lysis buffer 若しくは cell lysis buffer に再懸濁し、核画分とした。また、得られた上清は 4°C にて 5,000 xg で 10 分間遠心して核を除去し、細胞質画分とした。各画分中の蛋白質濃度は Bradford 法【58】に従い、Bio-Rad protein assay (Bio-Rad) を用いて測定した。

各画分を 100 µg/200 µL に調整し、アセチルリジンに対する抗体 (Cell Signaling Technology) を 5 µL 添加し、4°C にて一晩反応させた。次に 50% protein G agarose (GE Healthcare) を 20 µL 添加し、4°C で 1 時間反応させた。Protein G agarose を IP Wash buffer で 3 回洗浄し、20 µL の 2 x SDS-PAGE sample buffer に懸濁した。

各画分の蛋白質 (10 µg 蛋白質相当量) 若しくは免疫沈降法より得られた蛋白質は、12% のポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動し、ゲル中の蛋白質を Immobilon-P Transfer membrane (MILLIPORE) に転写した。メンブレンは TBS-T で洗浄した後に、5% skim milk を含む TBS-T で 1 時間ブロッキングし、1 次抗体 (GAPDH (1: 1000, Santa Cruz Biotechnology, Inc.) は室温にて 1 時間反応させ、2 次抗体 (anti-mouse antibody (1: 10000, GE Healthcare)) は室温にて 1 時間反応させた。Amersham™ ECL™ Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare) を用いて、FUJIFILM LUMINESCENT IMAGE ANALYZER LAS-3000 にて、各画分の GAPDH を定量した。

10. TUNEL assay を利用したアポトーシスの検出

FM3A (1×10^4 cells/mL) は、0、4、8 µM のアクロレインで 24 時間処理した後に、*In Situ* Cell Death Detection Kit, Fluorescein (Roche) を用いてマニュアルに従って行った。細胞 1×10^6 cells に対し 100 µL の 2% paraformaldehyde に懸濁し、室温にて 1 時間固定した。固定した細胞は PBS(-) で 1 回洗浄し、poly-L-lysine でコートしたカバーガラスに 10 分間吸着させ、0.1% Triton X-100 を含む 0.1% sodium citrate を用いて氷上で 2 分間、浸透化処理を行った。次いで、PBS(-) で 2 回洗浄し、0.5 µg/mL Propidium iodode を含む TUNEL reaction mixture を用いて 37°C にて 1 時間反応させた。続いて、PBS(-) で 2 回洗浄した後に *SlowFade*® Gold antifade reagent (Invitrogen™) で封入し、LSM 510

META Laser Scanning Microscope (Carl Zeiss) を用いて観察した。

【結果】

1. アクロレインの蛋白質及び DNA との相互作用

脳梗塞が起きると、アクロレインは DNA より蛋白質に影響を及ぼすことが明らかとなっている【31, 82】。そこで、細胞培養系を用いて、DNA、蛋白質とアクロレインの相互作用をについて検討した。FM3A を 0、50、100 μM のアクロレインで 1 時間処理し、PC-Acro 及び DNA 結合型アクロレインに対する抗体を用いて免疫染色を行った。その結果、アクロレイン未処理細胞と比較して、PC-Acro はアクロレイン濃度に依存的な増加を示した (Fig. 15A)。これに対し、DNA 結合型アクロレインは変化が見られなかった (Fig. 15B)。以上の結果より、アクロレインが DNA より蛋白質に強く結合することが示唆された【32】。

2. アクロレイン抱合蛋白質の同定

アクロレインは、蛋白質中のシステイン、リジン、ヒスチジン残基に選択的に反応する【46, 47】。これまでに *in vitro* の実験系でアクロレインがいくつかの蛋白質に結合することが報告されている【78-81】。本研究では、細胞培養系でより詳細な結果を得るため、40 μM のアクロレインで 9 時間処理した FM3A を用いてアクロレイン抱合蛋白質の検討を行った。アクロレイン処理した FM3A を SDS-ポリアクリルアミドゲルで電気泳動したところ、1 次元、2 次元電気泳動においてもアクロレイン処理により 37 kDa 付近の蛋白質が著しく減少していることを見出した (Fig. 16A)。この結果から、37 kDa の蛋白質は、アクロレイン抱合を受けることによって不溶化、若しくは細胞質からミトコンドリアや核へ移行したことが示唆された。

次に、アクロレイン未処理のゲルより消失した 37 kDa の蛋白質に相当するスポットを切り出し、蛋白質分解酵素で処理した後に、アミノ酸配列を LC-MS/MS により解析した。その結果、11 個のペプチド鎖が得られ (Fig. 16B)、これらの配列を解析したと

ころ、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) と同定された。マウス GAPDH は 333 個のアミノ酸で構成されており、このうち 137 個のアミノ酸 (41%) を同定することができた。また、2 次元電気泳動において、アクロレイン未処理細胞では 2 つのスポットを赤枠で示しているが (Fig. 16A)、LC-MS/MS 解析により 2 つとも GAPDH であることが同定された。これらの結果より、GAPDH はアクロレイン抱合を受ける蛋白質の一つであることが明らかとなった。

3. GAPDH 上のアクロレイン抱合部位の同定

アクロレイン処理した FM3A より得られた GAPDH 蛋白質は、GAPDH に対する抗体に反応しなくなり、免疫沈降できなかつた。そこで、ヘマグルチニン (HA) で標識した GAPDH を Neuro2a に形質導入し、アクロレイン処理を行った。HA に対する抗体を用いて HA 標識 GAPDH を免疫沈降し、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動にて分離し、ゲルより抽出した。抽出した HA 標識 GAPDH をトリプシン若しくは AspN で処理し、LC-MS/MS でアクロレイン抱合部位を解析した。アクロレイン化されたシステイン残基は、ペプチド断片の N 末端アミノ基と距離が近いと分子内転位反応が起こり、シッフ塩基を形成することが知られている【46】。そのため、アクロレイン化されたシステイン残基は修飾のない形で検出される。また、アクロレイン化されなかつたシステイン残基はプロピオンアミド化された形で検出される。これらの知見を基に解析した結果、アクロレインは GAPDH 上の Cys-150 及び Cys-282 の 2 つのシステイン残基に抱合することが明らかとなった (Fig. 17)。また、他のシステインやリジン、ヒスチジン残基にアクロレイン抱合は見られなかつた。なお、Cys-150 は GAPDH の活性中心であることが知られており【84】、アクロレイン抱合を受けることにより不活化することが考えられる。

また、ヒト GAPDH の結晶構造 (PDB ID: 1U8F) を基にマウス GAPDH の立体構造モデルを作製し、Cys-150 及び Cys-282 の 2 つのシステイン残基の位置を確認したところ、Cys-150 と Cys-282 は蛋白質の表面に位置していることが明らかとなった (Fig. 18)。また、GAPDH には Cys-150 と Cys-282 の他に、Cys-22、Cys-154、Cys-245 の 3 つのシ

ステイン残基が存在するが、立体構造モデルでは蛋白質の内部に位置していた。

4. アクロレインによる GAPDH 活性の低下

FM3A を用いて細胞増殖に対するアクロレインの影響を比較したところ、4 μM のアクロレインを添加した培地で培養すると増殖速度に低下が見られ、8 μM のアクロレインを添加した培地では増殖が停止した (Fig. 19A)。そこで、アクロレインを添加した6、12、24 時間後の GAPDH 活性を比較した。その結果、4 μM のアクロレインを添加すると、GAPDH 活性は6 時間後に一時的な低下が見られたが、12-24 時間の間に部分的に回復した (Fig. 19B)。これに対し、8 μM のアクロレインを添加すると、GAPDH 活性は6 時間後より著しく低下し、12-24 時間の間に回復は見られなかった (Fig. 19B)。また、この時の細胞内 ATP 量を比較したところ、4 μM のアクロレインでは細胞内 ATP 量に変化は見られなかったが、8 μM のアクロレインでは経時的に細胞内 ATP 量が減少した (Fig. 19C)。

そこで、アクロレインによる細胞増殖の低下に GAPDH 活性の低下が関与しているか検討するため、GAPDH を過剰産生させた際のアクロレイン感受性を確認した。Neuro2a に pcDNA-GAPDH、pcDNA- β -actin 若しくは pcDNA3.1(+) (vector) を形質導入し、細胞増殖に対するアクロレイン毒性の影響を検討した。 β -アクチンは Cys-374 にアクロレイン抱合を受けることが報告されていることから【79】、同様の実験を行った。GAPDH 過剰産生株における GAPDH の蛋白質発現量、また、 β -アクチン過剰産生株における β -アクチンの蛋白質発現量は、none や vector と比較して2 倍以上に増加した (Fig. 20A)。その時のアクロレインによる細胞増殖への影響は、GAPDH を過剰産生させることにより部分的に回復を示した。none、vector と GAPDH 過剰産生株に対するアクロレインの IC_{50} は、それぞれ 2.7、2.9、4.3 μM であった (Fig. 20B)。一方で、 β -アクチンを過剰産生させても細胞増殖に変化は見られず、アクロレインの IC_{50} は 2.9 μM を示した (Fig. 20B)。したがって、GAPDH の不活化がアクロレイン毒性を発揮する一因であることが示唆された。

5. アクロレイン抱合 GAPDH の局在とアポトーシス惹起作用

GAPDH は Cys-150 に一酸化窒素 (NO) が結合し、S-ニトロシル化を受けると不活化し、E3 ユビキチンリガーゼである Siah と共に核内移行し、転写コアクチベーターの p300/CBP を活性化させてアポトーシスを引き起こすことが知られている【85-87】。アクロレイン抱合を受けた GAPDH も核へ移行し、同様の現象を生じる可能性がある。そこで、アクロレイン処理した際に GAPDH が核へ移行するか検討するため、アクロレイン処理した FM3A を分画し、ウェスタンブロット解析を行った。その結果、アクロレイン未処理細胞の GAPDH は細胞質に存在したが、8 μM のアクロレインで6時間処理した細胞の GAPDH は細胞質だけでなく核にも存在した (Fig. 21A)。免疫染色法を用いて、同様に細胞内の GAPDH の局在を確認した結果、アクロレイン未処理細胞では GAPDH (緑) と DNA (Propidium iodide、赤) の重複部分が見られなかったが、4-8 μM のアクロレインで処理した細胞では GAPDH と DNA が著しく重複 (黄) し、GAPDH が核へ移行していた (Fig. 21B)。また、不活化された GAPDH は、p300/CBP により Lys-160 にアセチル化を受けることも報告されている【87】。そこで、各画分をアセチルリジンに対する抗体を用いて免疫沈降し、GAPDH に対する抗体で検出したところ、8 μM のアクロレインで6時間処理した細胞より得られた核画分でのみ GAPDH が検出された (Fig. 21A)。これらの結果から、アクロレイン処理した GAPDH は、NO 処理した GAPDH と同様に核へ移行し、アセチル化を受けることが明らかとなった。

また、アクロレイン処理した FM3A を用いて、TUNEL 陽性細胞の検出を行った結果、アクロレイン処理により、TUNEL 陽性細胞が著しく増加した (Fig. 22)。TUNEL 陽性細胞は、0、4、8 μM のアクロレインで24時間処理すると、それぞれ1、39、78%を示した (Fig. 22A)。これは、アクロレイン抱合 GAPDH が p300/CBP によりアセチル化を受け、ニトロシル化 GAPDH と同様にアポトーシスを引き起こすことを示唆した【87】。以上の結果から、アクロレインにより不活化した GAPDH が細胞増殖を部分的に阻害することが考えられる。

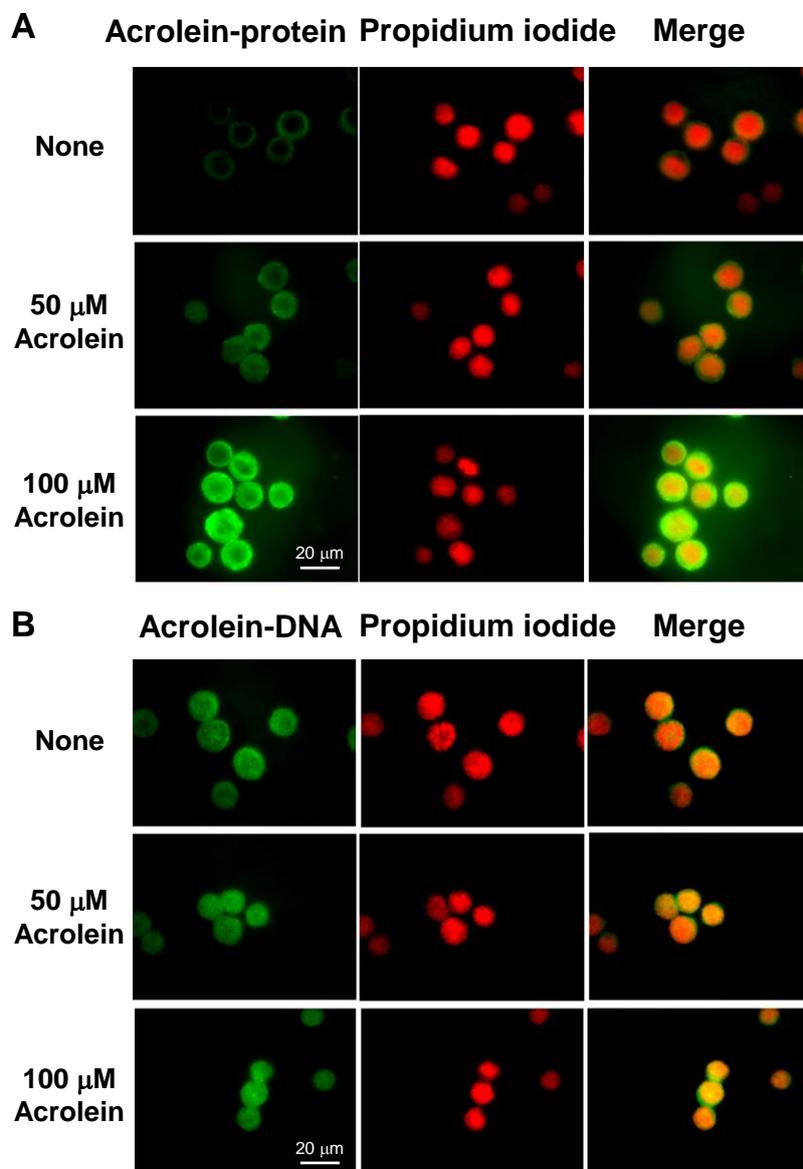
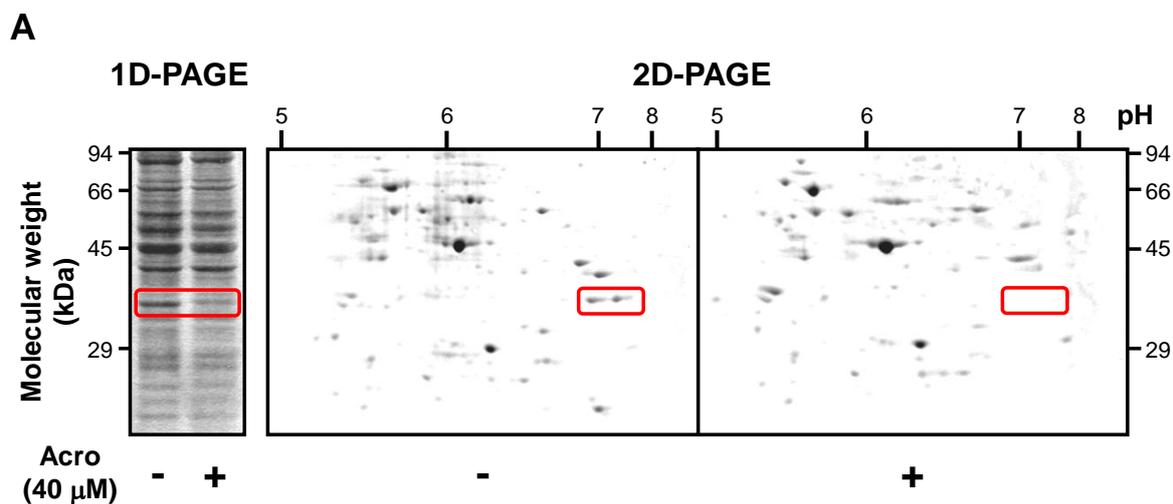


Fig. 15 アクロレインの蛋白質及び DNA との相互作用

FM3A を 0、50、100 μ M のアクロレインで 1 時間処理し、蛋白質結合型アクロレイン (A) 及び DNA 結合型アクロレイン (B) を免疫染色法より検出した。蛋白質結合型アクロレインはアクロレインとリジン残基の付加体を、DNA 結合型アクロレインはアクロレインと 2'-デオキシアデノシンの付加体を検出した。



B

1	MVKVGVNGFG	RIGRLVTRAA	ICSGKVEIVA	INDPFIDLNY	MVYMFQYDST	HGKFNGTVKA
61	ENGKLVINGK	<u>PITIFOERDP</u>	TNIKWGEAGA	<u>EYVVESTGVF</u>	<u>TTMEKAG AHL</u>	<u>KGGAKRVIIS</u>
121	<u>APSADAPMFV</u>	<u>MGVNHEKYDN</u>	<u>SLKIVSNASC</u>	<u>TTNCLAPLAK</u>	VIHDNFGIVE	GLMTTVHAIT
181	ATQKTVDGPS	GKLWRDGRGA	<u>AONLIPASTG</u>	<u>AAKAVGKVIP</u>	ELNGKLTGMA	FRVPTPNVSV
241	<u>VDLTCRLEKP</u>	AKYDDIKKVV	KQASEGPLKG	ILGYTEDQVV	SCDFNSNSHS	STFDAGAGIA
301	LNDNFVKLIS	<u>WYDNEYGYSN</u>	<u>RVVDLMAYMA</u>	<u>SKE</u>		

Fig. 16 アクロレイン処理により消失する蛋白質の同定

A. FM3A を 40 μ M のアクロレインで9時間処理し、S100画分を調整し、1次元(左)、2次元(右)電気泳動を行った。アクロレイン処理により 37 kDa の蛋白質が消失した(赤枠)。B. LC-MS/MS 解析より、アクロレインにより消失する 37 kDa の蛋白質を同定した。得られた 11 個のペプチド断片(下線部)のアミノ酸配列を解析した結果、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) に相当することが明らかとなった。

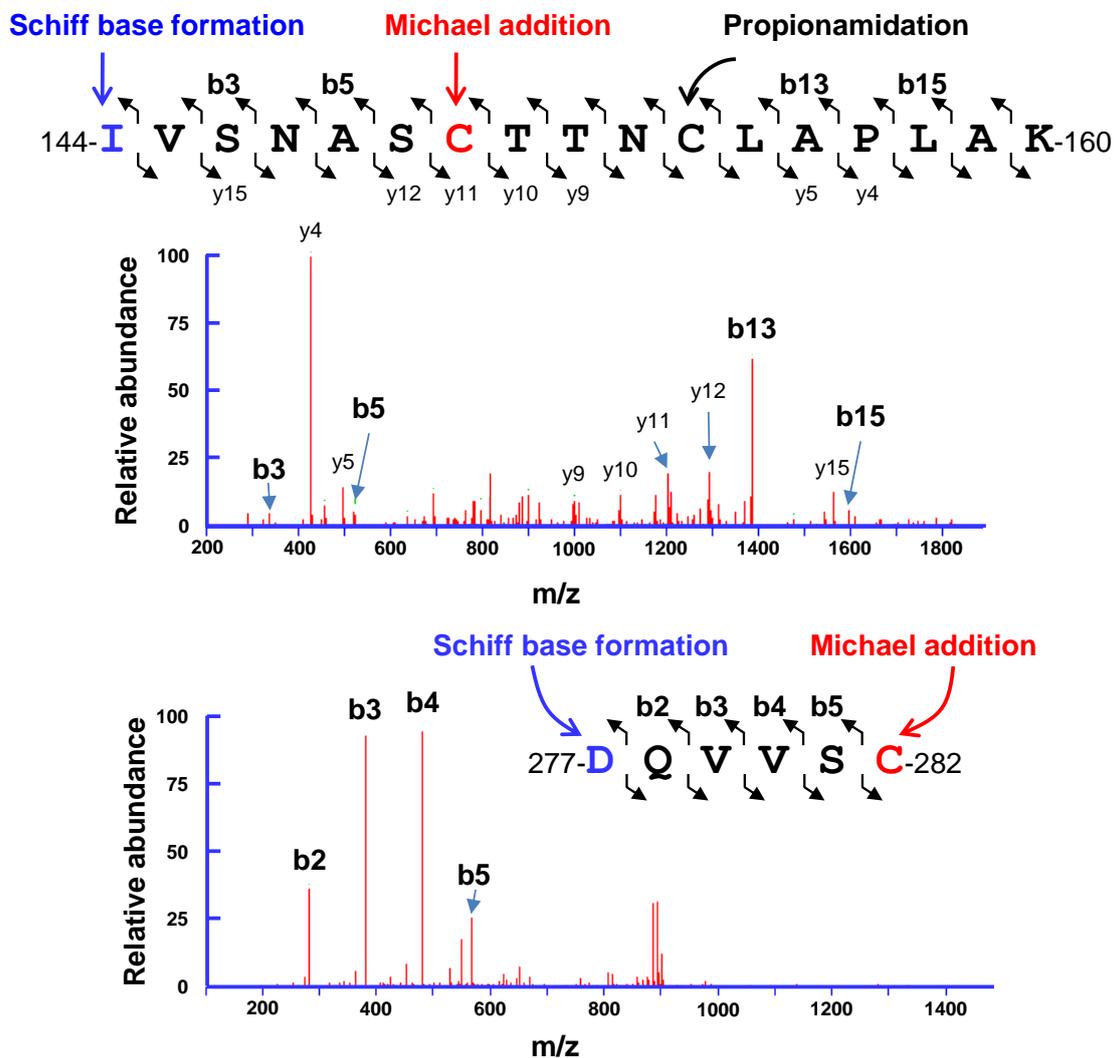


Fig. 17 GAPDH 上のアクロレイン抱合部位の同定

pcDNA-GAPDH(HA)を形質導入した Neuro2a を 40 μ M のアクロレインで 9 時間処理した。HA 標識 GAPDH を免疫沈降し、LC-MS/MS で解析することにより、GAPDH 上のアクロレイン抱合を受けたアミノ酸残基を同定した。144-160、277-282 番目のペプチド断片に、システイン残基に結合したアクロレインの MS/MS スペクトルが確認された。アクロレインは Cys-150 及び Cys-282 にマイケル付加し、ペプチドの N 末端アミノ基と分子内転移反応を起こし、シッフ塩基を形成した。

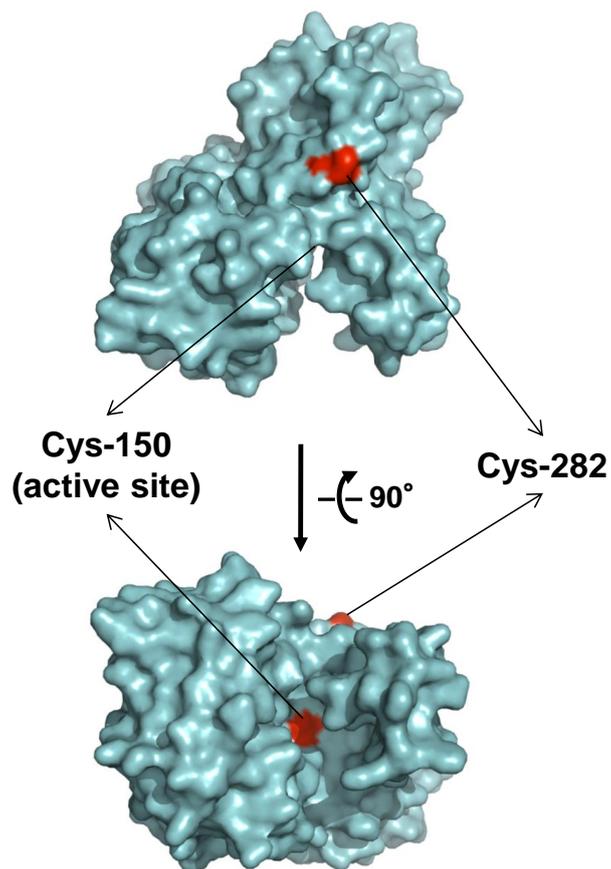


Fig. 18 マウス GAPDH の立体構造モデル

ヒト GAPDH の結晶構造 (PDB ID: 1U8F) を基に SWISS-MODEL Workspace を用いて立体構造モデルを作製した。アクロレイン抱合を受けた Cys-150 と Cys-282 を赤で示す。Cys-150 は活性中心である。

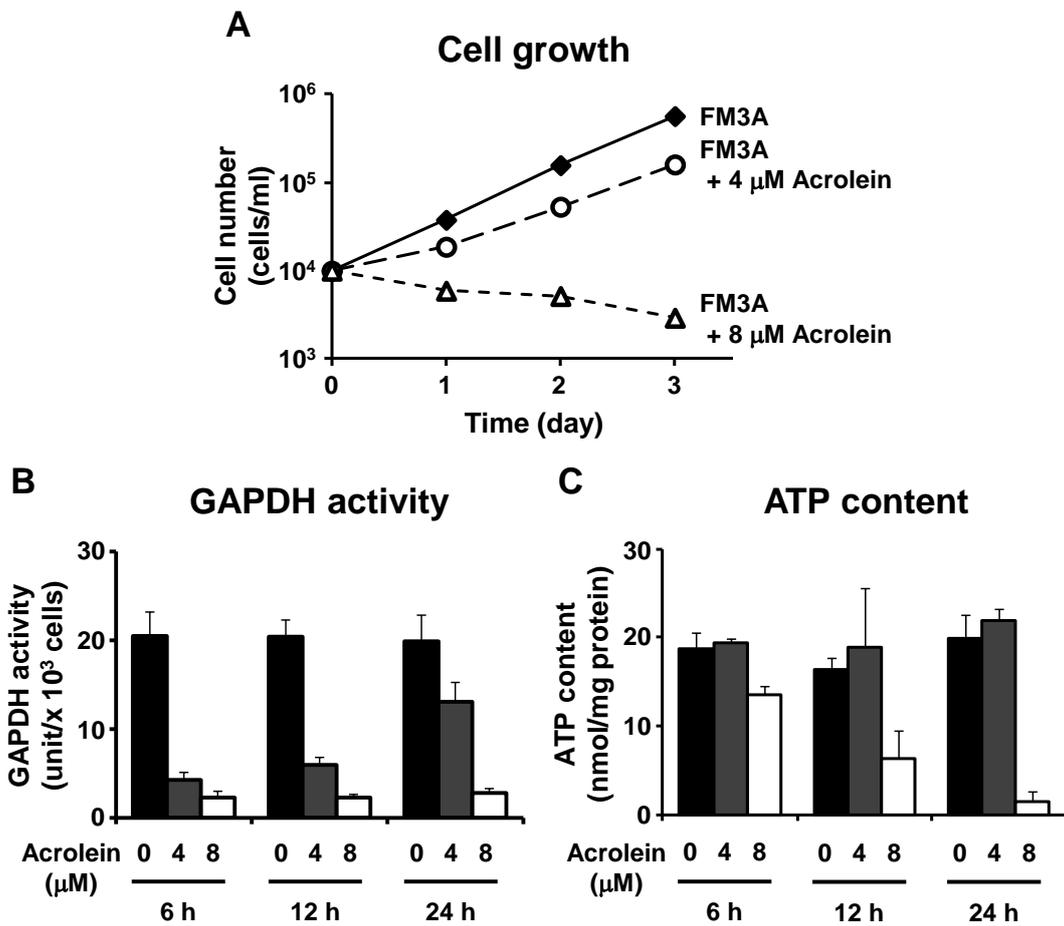


Fig. 19 アクロレインによる GAPDH 活性への影響

0、4、8 μ M のアクロレインで培養した時の細胞増殖 (A)、GAPDH 活性 (B)、細胞内 ATP 量 (C) に対する影響を検討した。A. 細胞増殖は、細胞の生存数をモニタリングした。B, C. GAPDH 活性及び細胞内 ATP 量の測定は、アクロレインを添加した 6、12、24 時間後に行った。値は mean \pm S.E. (n = 3) で表す。

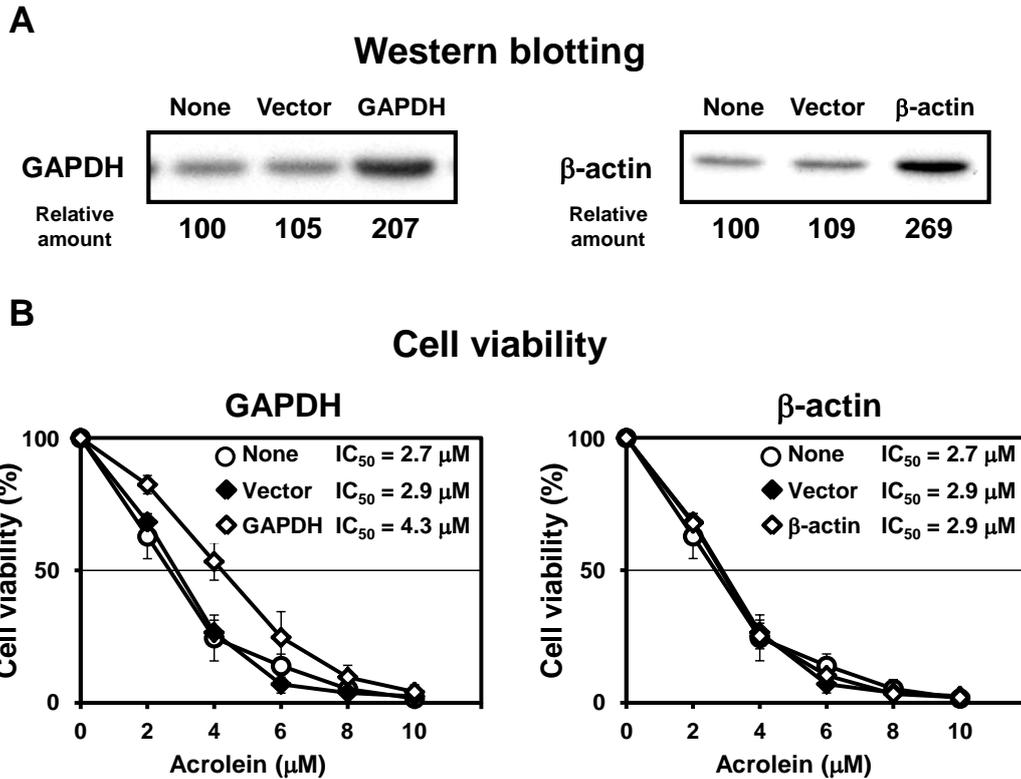


Fig. 20 GAPDH 過剰産生株におけるアクロレイン毒性の軽減

Neuro2a に pcDNA-GAPDH、pcDNA-β-actin 若しくは pcDNA3.1(+) (vector) を形質導入し、細胞増殖に対するアクロレイン毒性の影響を検討した。A. 形質導入した 24 時間後の細胞を回収し、ウェスタンブロット解析により、GAPDH 及びβ-アクチンの発現量を確認した。B. 形質導入した細胞は 24 時間後に、様々なアクロレイン濃度で 3 日間培養し、細胞の生存数を測定した。IC₅₀ を図中に示す。値は mean±S.E. (n = 3) で表す。

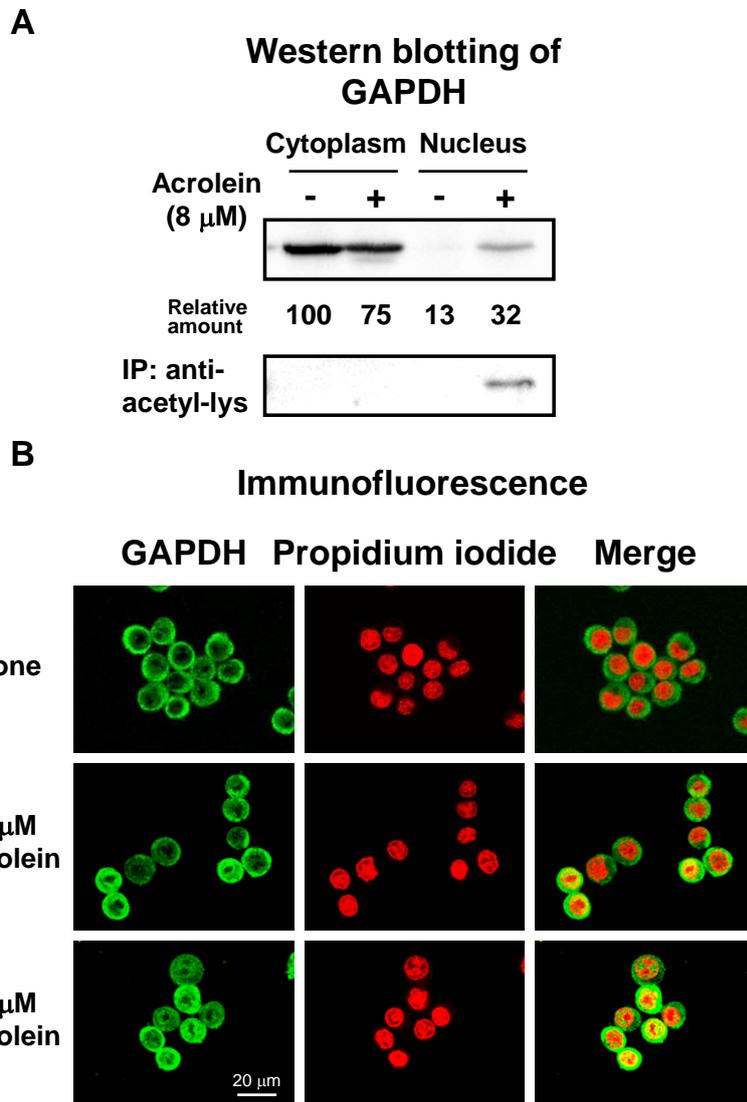


Fig. 21 アクロレイン抱合 GAPDH の核内移行

A. 0、8 μ M のアクロレインを添加した培地で FM3A を 6 時間培養した後に細胞質画分、核画分を調整し、ウェスタンブロット解析より GAPDH の局在を確認した。また、アセチルリジンに対する抗体を用いて免疫沈降し、GAPDH に対する抗体でウェスタンブロット解析を行った。B. 0、4、8 μ M のアクロレインを添加した培地で FM3A を 6 時間培養した後に、GAPDH に対する抗体 (緑) 及び DNA 染色の Propidium iodide (赤) を用いて免疫染色を行った。検出には共焦点顕微鏡を用いた。バーは 20 μ m を示す。

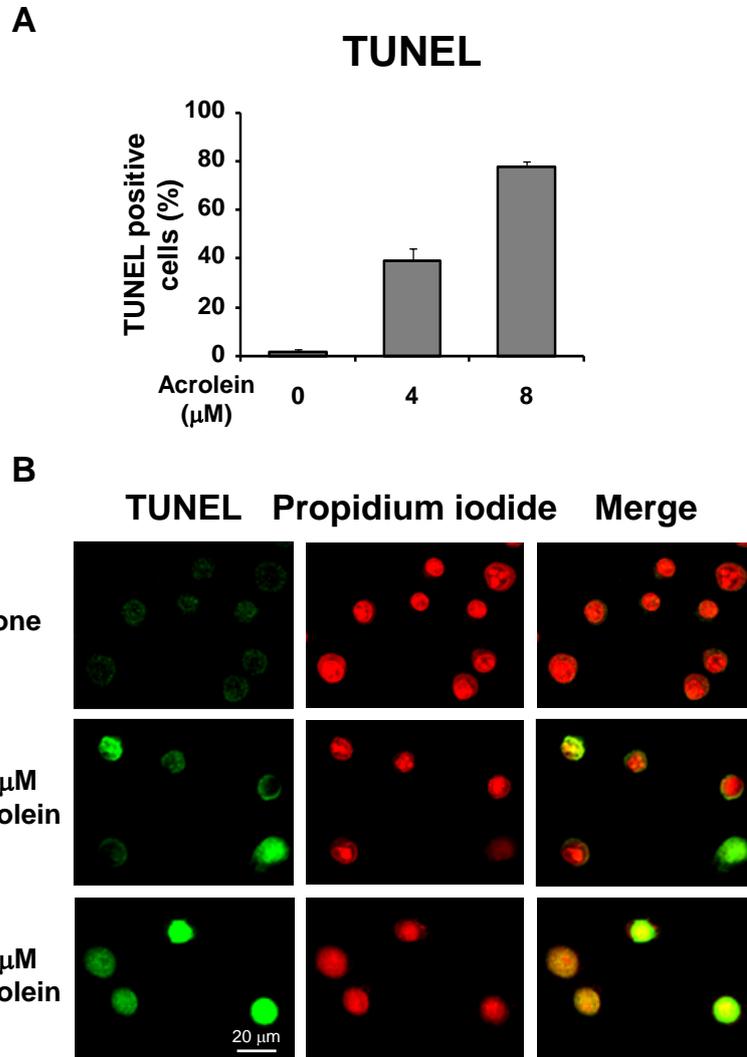


Fig. 22 アクロレインによるアポトーシス惹起作用

0、4、8 μM のアクロレインを添加した培地で FM3A を 24 時間培養した後に、TUNEL assay を行った。A. 約 500 cells における TUNEL 陽性の割合をグラフ化した。値は mean \pm S.E. (n = 3) で表す。B. TUNEL 陽性 (緑) 及び DNA 染色の Propidium iodide (赤) は、共焦点顕微鏡を用いて検出した。バーは 20 μm を示す。

【考察】

近年、当研究室では、脳梗塞などの組織障害は活性酸素よりアクロレインがより密接に関与していることを報告してきた【32, 33】。本研究では、アクロレインにより生じる細胞毒性のメカニズムについて検討した。その結果、GAPDH 活性の低下は細胞増殖の低下に相関しており、pcDNA-GAPDH を形質導入することにより細胞増殖は部分的に回復を示すことを明らかにした (Fig. 20B)。

アクロレインは、蛋白質中のシステイン、リジン、ヒスチジン残基に選択的に反応することが知られている【53, 54】。これまで、アクロレインは、ADP/ATP トランスロカーゼ 1【78】、 β -アクチン【79】、NF- κ B【80】、そしてチロシンホスファターゼ 1B【81】に結合することが報告されている。これら蛋白質はアクロレインが結合すると不活化するが、細胞増殖に直接関与していない。当研究室では、以前にアクロレインが、アミノ基よりチオール基と良好に反応することを報告しており【33】、これら蛋白質においてもシステイン残基は、GAPDH と同様に、活性中心に位置する。しかしながら、アクロレインによるこれら蛋白質の不活化と細胞増殖阻害の関係については詳細な研究がされていない。このことから、pcDNA- β -actin を Neuro2a に形質導入し、アクロレインの毒性を比較したが、変化は見られず (Fig. 20B)、細胞増殖に関与していないことが示唆された。

GAPDH は、エネルギー産生に関与する解糖系の酵素としての役割だけでなく、ヒストン遺伝子の発現を促進する転写因子、核膜融合蛋白質、DNA の不適切な核酸取り込みを認識する因子、テロメア構造を維持する制御因子としての働きが知られている【84】。しかし、GAPDH は NO により活性中心である Cys-150 に修飾を受けると、E3 ユビキチンリガーゼである Siah と複合体を形成して、核内移行し、細胞毒性を示す【85-87】。本研究結果より、GAPDH の Cys-150 にアクロレイン抱合を受けても、NO と同様に毒性を示すことが明らかとなった (Fig. 21, 22)。また、Cys-282 もアクロレイン抱合を受けることが明らかとなった (Fig. 17)。ウサギ GAPDH を用いた実験では、酸化ストレスにより GAPDH の凝集が誘導されるが、この凝集には活性中心である Cys-149 が必要であること、Cys-281 が凝集を補助することが報告されている【88】。

以上のことから、アクロレイン抱合を受けた Cys-282 もまた細胞毒性に関与していることが示唆された。本研究結果は、アクロレインにより不活化した GAPDH がアクロレインの細胞毒性に少なくとも部分的に関与していることを示した。また、不飽和アルデヒドである 4-ヒドロキシノネナールは、脂質過酸化により産生され、細胞毒性を示すことが知られており【89】、4-ヒドロキシノネナールもまた GAPDH のシステイン残基を修飾し、不活化することが報告されている【90】。しかしながら、当研究室ではアクロレインと 4-ヒドロキシノネナールの毒性を比較したところ、アクロレインが 4-ヒドロキシノネナールより強い毒性を示すことを明らかにした【31】。

当研究室では以前、LC-MS/MS 解析より、脳梗塞患者の血中でアルブミンの Lys-557 と Lys-560 にアクロレインが抱合することを報告した【82】。この場合、GAPDH とは異なり、アルブミンはアクロレインの毒性軽減に寄与していることが考えられる。

本研究では、8 μM のアクロレインを添加すると、アクロレイン抱合 GAPDH の核内移行を介したアポトーシスを惹起するだけでなく、細胞内 ATP 量の減少を引き起こした (Fig. 19C)。アクロレインはミトコンドリア障害を起こすことが知られているが【91, 92】、低濃度のアクロレインで処理した際のアクロレインによるミトコンドリア蛋白質の障害は不明である。アクロレイン毒性による細胞内 ATP 量の減少は、GAPDH の不活化とはまた別にアクロレインが毒性を示していることが予測される。アクロレインの細胞毒性を解明するためには、低濃度のアクロレイン (< 50 μM) で不活化する蛋白質を同定することは非常に重要であり、今後も詳細な検討が必要である。

【参考文献】

1. Tabor CW, Tabor H. 1,4-Diaminobutane (putrescine), spermidine, and spermine. *Annu Rev Biochem.* 1976;**45**:285-306.
2. Ogasawara T, Ito K, Igarashi K. Effect of polyamines on globin synthesis in a rabbit reticulocyte polyamine-free protein synthetic system. *J Biochem.* 1989;**105**:164-167.
3. Tabor CW, Tabor H. Polyamines. *Annu Rev Biochem.* 1984;**53**:749-790.
4. Kameji T, Hayashi S, Hoshino K, Kakinuma Y, Igarashi K. Multiple regulation of ornithine decarboxylase in enzyme-overproducing cells. *Biochem J.* 1993;**289**:581-586.
5. Suzuki T, Sadakata Y, Kashiwagi K, Hoshino K, Kakinuma Y, Shirahata A, Igarashi K. Overproduction of *S*-adenosylmethionine decarboxylase in ethylglyoxal-bis(guanylhydrazone)-resistant mouse FM3A cells. *Eur J Biochem.* 1993;**215**:247-253.
6. Watanabe S, Kusama-Eguchi K, Kobayashi H, Igarashi K. Estimation of polyamine binding to macromolecules and ATP in bovine lymphocytes and rat liver. *J Biol Chem.* 1991;**266**:20803-20809.
7. Miyamoto S, Kashiwagi K, Ito K, Watanabe S, Igarashi K. Estimation of polyamine distribution and polyamine stimulation of protein synthesis in *Escherichia coli*. *Arch Biochem Biophys.* 1993;**300**:63-68.
8. Cohen, S.S. A Guide to the Polyamines (Oxford University Press, Oxford, 1998).
9. Herbst EJ, Snell EE. Putrescine and related compounds as growth factors for *Hemophilus parainfluenzae* 7991. *J Biol Chem.* 1949;**181**:47-54.
10. Russell DH, Levy CC, Schimpff SC, Hawk IA. Urinary polyamines in cancer patients. *Cancer Res.* 1971;**31**:1555-1558.
11. Maas WK. Mapping of genes involved in the synthesis of spermidine in *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet.* 1972;**119**:1-9.
12. Cohn MS, Tabor CW, Tabor H. Regulatory mutations affecting ornithine decarboxylase activity in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol.* 1980;**142**:791-799.

13. Steglich C, Scheffler IE. An ornithine decarboxylase-deficient mutant of Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem.* 1982;**257**:4603-4609.
14. Nishimura K, Nakatsu F, Kashiwagi K, Ohno H, Saito T, Igarashi K. Essential role of S-adenosylmethionine decarboxylase in mouse embryonic development. *Genes Cells.* 2002;**7**:41-47.
15. Higgins ML, Tillman MC, Rupp JP, Leach FR. The effect of polyamines on cell culture cells. *J Cell Physiol.* 1969;**74**:149-154.
16. Wang Y, Casero RA Jr. Mammalian polyamine catabolism: a therapeutic target, a pathological problem, or both? *J Biochem.* 2006;**139**:17-25.
17. Sharmin S, Sakata K, Kashiwagi K, Ueda S, Iwasaki S, Shirahata A, Igarashi K. Polyamine cytotoxicity in the presence of bovine serum amine oxidase. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;**282**:228-235.
18. Wang Y, Devereux W, Woster PM, Stewart TM, Hacker A, Casero RA Jr. Cloning and characterization of a human polyamine oxidase that is inducible by polyamine analogue exposure. *Cancer Res.* 2001;**61**:5370-5373.
19. Wu T, Yankovskaya V, McIntire WS. Cloning, sequencing, and heterologous expression of the murine peroxisomal flavoprotein, N¹-acetylated polyamine oxidase. *J Biol Chem.* 2003;**278**:20514-20525.
20. Campbell RA, Talwalkar Y, Bartos D, Bartos F, Musgrave J, Harner M, Puri H, Grettie D, Dolney AM, Loggan B. Polyamines, uremia and hemodialysis, in: Campbell, R.A., Morris, D.R., Bartos, D., Daves G.D. Jr. (Eds.), *Advances in Polyamine Research*, vol. 2, Raven Press, New York, 1978;pp:319–343.
21. Sakata K, Kashiwagi K, Sharmin S, Ueda S, Irie Y, Murotani N, Igarashi K. Increase in putrescine, amine oxidase, and acrolein in plasma of renal failure patients. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;**305**:143-149.
22. Ivanova S, Botchkina GI, Al-Abed Y, Meistrell M 3rd, Batliwalla F, Dubinsky JM, Iadecola C, Wang H, Gregersen PK, Eaton JW, Tracey KJ. Cerebral ischemia enhances polyamine oxidation: identification of enzymatically formed 3-aminopropanal as an endogenous mediator of neuronal and glial cell death. *J Exp Med.* 1998;**188**:327-340.

23. Ivanova S, Batliwalla F, Mocco J, Kiss S, Huang J, Mack W, Coon A, Eaton JW, Al-Abed Y, Gregersen PK, Shohami E, Connolly ES Jr, Tracey KJ. Neuroprotection in cerebral ischemia by neutralization of 3-aminopropanal. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;**99**:5579-5584.
24. Tomitori H, Usui T, Saeki N, Ueda S, Kase H, Nishimura K, Kashiwagi K, Igarashi K. Polyamine oxidase and acrolein as novel biochemical markers for diagnosis of cerebral stroke. *Stroke*. 2005;**36**:2609-2613.
25. Yoshida M, Tomitori H, Machi Y, Katagiri D, Ueda S, Horiguchi K, Kobayashi E, Saeki N, Nishimura K, Ishii I, Kashiwagi K, Igarashi K. Acrolein, IL-6 and CRP as markers of silent brain infarction. *Atherosclerosis*. 2009;**203**:557-562.
26. O'Leary DH, Polak JF, Kronmal RA, Manolio TA, Burke GL, Wolfson SK Jr. Carotid-artery intima and media thickness as a risk factor for myocardial infarction and stroke in older adults. Cardiovascular Health Study Collaborative Research Group. *N Engl J Med*. 1999;**340**:14-22.
27. Inoue K, Matsumoto M, Shono T, Toyokawa S, Moriki A. Increased intima media thickness and atherosclerotic plaques in the carotid artery as risk factors for silent brain infarcts. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2007;**16**:14-20.
28. Yoshida M, Higashi K, Kobayashi E, Saeki N, Wakui K, Kusaka T, Takizawa H, Kashiwado K, Suzuki N, Fukuda K, Nakamura T, Watanabe S, Tada K, Machi Y, Mizoi M, Toida T, Kanzaki T, Tomitori H, Kashiwagi K, Igarashi K. Correlation between images of silent brain infarction, carotid atherosclerosis and white matter hyperintensity, and plasma levels of acrolein, IL-6 and CRP. *Atherosclerosis*. 2010;**211**:475-479.
29. Higashi K, Yoshida M, Igarashi A, Ito K, Wada Y, Murakami S, Kobayashi D, Nakano M, Sohda M, Nakajima T, Narita I, Toida T, Kashiwagi K, Igarashi K. Intense correlation between protein-conjugated acrolein and primary Sjögren's syndrome. *Clin Chim Acta*. 2010;**411**:359-363.
30. Waragai M, Yoshida M, Mizoi M, Saiki R, Kashiwagi K, Takagi K, Arai H, Tashiro J, Hashimoto M, Iwai N, Uemura K, Igarashi K. Increased protein-conjugated acrolein and amyloid- $\beta_{40/42}$ ratio in plasma of patients with mild cognitive impairment and Alzheimer's

- disease. *J Alzheimers Dis.* 2012;**32**:33-41.
31. Saiki R, Nishimura K, Ishii I, Omura T, Okuyama S, Kashiwagi K, Igarashi K. Intense correlation between brain infarction and protein-conjugated acrolein. *Stroke.* 2009;**40**:3356-3361.
 32. Saiki R, Park H, Ishii I, Yoshida M, Nishimura K, Toida T, Tatsukawa H, Kojima S, Ikeguchi Y, Pegg AE, Kashiwagi K, Igarashi K. Brain infarction correlates more closely with acrolein than with reactive oxygen species. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011;**404**:1044-1049.
 33. Yoshida M, Tomitori H, Machi Y, Hagihara M, Higashi K, Goda H, Ohya T, Niitsu M, Kashiwagi K, Igarashi K. Acrolein toxicity: Comparison with reactive oxygen species. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009;**378**:313-318.
 34. Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med.* 1991;**11**:81-128.
 35. Uchida K. Current status of acrolein as a lipid peroxidation product. *Trends Cardiovasc Med.* 1999;**9**:109-113.
 36. Gawel S, Wardas M, Niedworok E, Wardas P. Malondialdehyde (MDA) as a lipid peroxidation marker. *Wiad Lek.* 2004;**57**:453-455.
 37. Romero FJ, Bosch-Morell F, Romero MJ, Jareño EJ, Romero B, Marín N, Romá J. Lipid peroxidation products and antioxidants in human disease. *Environ Health Perspect.* 1998;**106**:1229-1234.
 38. Singh M, Dang TN, Arseneault M, Ramassamy C. Role of by-products of lipid oxidation in Alzheimer's disease brain: a focus on acrolein. *J Alzheimers Dis.* 2010;**21**:741-756.
 39. Benedetti A, Comporti M, Esterbauer H. Identification of 4-hydroxynonenal as a cytotoxic product originating from the peroxidation of liver microsomal lipids. *Biochim Biophys Acta.* 1980;**620**:281-296.
 40. Jordan RA, Schenkman JB. Relationship between malondialdehyde production and arachidonate consumption during NADPH-supported microsomal lipid peroxidation. *Biochem Pharmacol.* 1982;**31**:1393-1400.
 41. Yoritaka A, Hattori N, Uchida K, Tanaka M, Stadtman ER, Mizuno Y.

- Immunohistochemical detection of 4-hydroxynonenal protein adducts in Parkinson disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;**93**:2696-2701.
42. Okamoto K, Toyokuni S, Uchida K, Ogawa O, Takenawa J, Kakehi Y, Kinoshita H, Hattori-Nakakuki Y, Hiai H, Yoshida O. Formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and 4-hydroxy-2-nonenal-modified proteins in human renal-cell carcinoma. *Int J Cancer*. 1994;**58**:825-9.
43. Ando Y, Nyhlin N, Suhr O, Holmgren G, Uchida K, el Sahly M, Yamashita T, Terasaki H, Nakamura M, Uchino M, Ando M. Oxidative stress is found in amyloid deposits in systemic amyloidosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997;**232**:497-502.
44. Sayre LM, Zelasko DA, Harris PL, Perry G, Salomon RG, Smith MA. 4-Hydroxynonenal-derived advanced lipid peroxidation end products are increased in Alzheimer's disease. *J Neurochem*. 1997;**68**:2092-2097.
45. Morikawa S, Kurauchi O, Tanaka M, Yoneda M, Uchida K, Itakura A, Furugori K, Mizutani S, Tomoda Y. Increased mitochondrial damage by lipid peroxidation in trophoblast cells of preeclamptic placentas. *Biochem Mol Biol Int*. 1997;**41**:767-775.
46. Cai J, Bhatnagar A, Pierce WM Jr. Protein modification by acrolein: formation and stability of cysteine adducts. *Chem Res Toxicol*. 2009;**22**:708-716.
47. Uchida K, Kanematsu M, Morimitsu Y, Osawa T, Noguchi N, Niki E. Acrolein is a product of lipid peroxidation reaction. Formation of free acrolein and its conjugate with lysine residues in oxidized low density lipoproteins. *J Biol Chem*. 1998;**273**:16058-16066.
48. Lopachin RM, Barber DS, Geohagen BC, Gavin T, He D, Das S. Structure-toxicity analysis of type-2 alkenes: in vitro neurotoxicity. *Toxicol Sci*. 2007;**95**:136-146.
49. Uchida K, Kanematsu M, Sakai K, Matsuda T, Hattori N, Mizuno Y, Suzuki D, Miyata T, Noguchi N, Niki E, Osawa T. Protein-bound acrolein: potential markers for oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;**95**:4882-4887.
50. Furuhashi A, Ishii T, Kumazawa S, Yamada T, Nakayama T, Uchida K. N^ε-(3-methylpyridinium)lysine, a major antigenic adduct generated in acrolein-modified protein. *J Biol Chem*. 2003;**278**:48658-48665.
51. Furuhashi A, Nakamura M, Osawa T, Uchida K. Thiolation of protein-bound carcinogenic

- aldehyde. An electrophilic acrolein-lysine adduct that covalently binds to thiols. *J Biol Chem.* 2002;**277**:27919-27926.
52. Kuhla B, Haase C, Flach K, Lüth HJ, Arendt T, Münch G. Effect of pseudophosphorylation and cross-linking by lipid peroxidation and advanced glycation end product precursors on tau aggregation and filament formation. *J Biol Chem.* 2007;**282**:6984-6991.
53. Stevens JF, Maier CS. Acrolein: sources, metabolism, and biomolecular interactions relevant to human health and disease. *Mol Nutr Food Res.* 2008;**52**:7-25.
54. Aldini G, Orioli M, Carini M. Protein modification by acrolein: relevance to pathological conditions and inhibition by aldehyde sequestering agents. *Mol Nutr Food Res.* 2011;**55**:1301-1319.
55. Pompella A, Visvikis A, Paolicchi A, De Tata V, Casini AF. The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. *Biochem Pharmacol.* 2003;**66**:1499-1503.
56. Averill-Bates DA, Agostinelli E, Przybytkowski E, Mondovi B. Aldehyde dehydrogenase and cytotoxicity of purified bovine serum amine oxidase and spermine in Chinese hamster ovary cells. *Biochem Cell Biol.* 1994;**72**:36-42.
57. Samata K, Yamagishi T, Ichihara T, Nanaumi K, Ikeda T, Ikeya H, Kuraishi A, Nakaike S, Kashiwagi K, Igarashi K. Establishment and characterization of a mouse FM3A cell mutant resistant to topoisomerase II-inhibitor NC-190. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2002;**50**:367-372.
58. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;**72**:248-254.
59. Krejsa CM, Franklin CC, White CC, Ledbetter JA, Schieven GL, Kavanagh TJ. Rapid activation of glutamate cysteine ligase following oxidative stress. *J Biol Chem.* 2010;**285**:16116-16124.
60. Raftos JE, Whillier S, Kuchel PW. Glutathione synthesis and turnover in the human erythrocyte: alignment of a model based on detailed enzyme kinetics with experimental data. *J Biol Chem.* 2010;**285**:23557-23567.
61. Smeal T, Binetruy B, Mercola DA, Birrer M, Karin M. Oncogenic and transcriptional cooperation with Ha-Ras requires phosphorylation of c-Jun on serines 63 and 73. *Nature.*

- 1991;**354**:494-496.
62. Naumann M, Scheidereit C. Activation of NF- κ B in vivo is regulated by multiple phosphorylations. *EMBO J*. 1994;**13**:4597-4607.
 63. Spiegelman VS, Stavropoulos P, Latres E, Pagano M, Ronai Z, Slaga TJ, Fuchs SY. Induction of β -transducin repeat-containing protein by JNK signaling and its role in the activation of NF- κ B. *J Biol Chem*. 2001;**276**:27152-27158.
 64. Ng CF, Schafer FQ, Buettner GR, Rodgers VG. The rate of cellular hydrogen peroxide removal shows dependency on GSH: mathematical insight into in vivo H₂O₂ and GPx concentrations. *Free Radic Res*. 2007;**41**:1201-1211.
 65. Pompella A, Visvikis A, Paolicchi A, De Tata V, Casini AF. The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. *Biochem Pharmacol*. 2003 Oct 15;**66**(8):1499-1503.
 66. Griffith OW. Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. *Free Radic Biol Med*. 1999;**27**:922-935.
 67. Biswal S, Acquaah-Mensah G, Datta K, Wu X, Kehrer JP. Inhibition of cell proliferation and AP-1 activity by acrolein in human A549 lung adenocarcinoma cells due to thiol imbalance and covalent modifications. *Chem Res Toxicol*. 2002;**15**:180-186.
 68. Finkelstein EI, Ruben J, Koot CW, Hristova M, van der Vliet A. Regulation of constitutive neutrophil apoptosis by the α,β -unsaturated aldehydes acrolein and 4-hydroxynonenal. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2005;**289**:L1019-1028.
 69. Kern JC, Kehrer JP. Acrolein-induced cell death: a caspase-influenced decision between apoptosis and oncosis/necrosis. *Chem Biol Interact*. 2002;**139**:79-95.
 70. Shi ZZ, Osei-Frimpong J, Kala G, Kala SV, Barrios RJ, Habib GM, Lukin DJ, Danney CM, Matzuk MM, Lieberman MW. Glutathione synthesis is essential for mouse development but not for cell growth in culture. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;**97**:5101-5106.
 71. Dalton TP, Dieter MZ, Yang Y, Shertzer HG, Nebert DW. Knockout of the mouse glutamate cysteine ligase catalytic subunit (Gclc) gene: embryonic lethal when homozygous, and proposed model for moderate glutathione deficiency when heterozygous. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;**279**:324-329.
 72. Lu SC. Regulation of glutathione synthesis. *Mol Aspects Med*. 2009;**30**:42-59.

73. Sen CK, Packer L. Antioxidant and redox regulation of gene transcription. *FASEB J.* 1996;**10**:709-720.
74. Vesely PW, Staber PB, Hoefler G, Kenner L. Translational regulation mechanisms of AP-1 proteins. *Mutat Res.* 2009;**682**:7-12.
75. Morgan MJ, Liu ZG. Crosstalk of reactive oxygen species and NF- κ B signaling. *Cell Res.* 2011;**21**:103-115.
76. Go YM, Gipp JJ, Mulcahy RT, Jones DP. H₂O₂-dependent activation of GCLC-ARE4 reporter occurs by mitogen-activated protein kinase pathways without oxidation of cellular glutathione or thioredoxin-1. *J Biol Chem.* 2004;**279**:5837-5845.
77. Hamann K, Shi R. Acrolein scavenging: a potential novel mechanism of attenuating oxidative stress following spinal cord injury. *J Neurochem.* 2009;**111**:1348-1356.
78. Han B, Stevens JF, Maier CS. Design, synthesis, and application of a hydrazide-functionalized isotope-coded affinity tag for the quantification of oxylipid-protein conjugates. *Anal Chem.* 2007;**79**:3342-3354.
79. Dalle-Donne I, Carini M, Vistoli G, Gamberoni L, Giustarini D, Colombo R, Maffei Facino R, Rossi R, Milzani A, Aldini G. Actin Cys374 as a nucleophilic target of α,β -unsaturated aldehydes. *Free Radic Biol Med.* 2007;**42**:583-598.
80. Lambert C, Li J, Jonscher K, Yang TC, Reigan P, Quintana M, Harvey J, Freed BM. Acrolein inhibits cytokine gene expression by alkylating cysteine and arginine residues in the NF- κ B1 DNA binding domain. *J Biol Chem.* 2007;**282**:19666-19675.
81. Seiner DR, LaButti JN, Gates KS. Kinetics and mechanism of protein tyrosine phosphatase 1B inactivation by acrolein. *Chem Res Toxicol.* 2007;**20**:1315-1320.
82. Yoshida M, Higashi K, Jin L, Machi Y, Suzuki T, Masuda A, Dohmae N, Suganami A, Tamura Y, Nishimura K, Toida T, Tomitori H, Kashiwagi K, Igarashi K. Identification of acrolein-conjugated protein in plasma of patients with brain infarction. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;**391**:1234-1239.
83. Park CW, Zeng Y, Zhang X, Subramanian S, Steer CJ. Mature microRNAs identified in highly purified nuclei from HCT116 colon cancer cells. *RNA Biol.* 2010;**7**:606-614.
84. Tristan C, Shahani N, Sedlak TW, Sawa A. The diverse functions of GAPDH: views from

- different subcellular compartments. *Cell Signal*. 2011;**23**:317-323.
85. Hara MR, Agrawal N, Kim SF, Cascio MB, Fujimuro M, Ozeki Y, Takahashi M, Cheah JH, Tankou SK, Hester LD, Ferris CD, Hayward SD, Snyder SH, Sawa A. S-nitrosylated GAPDH initiates apoptotic cell death by nuclear translocation following Siah1 binding. *Nat Cell Biol*. 2005;**7**:665-674.
86. Bae BI, Hara MR, Cascio MB, Wellington CL, Hayden MR, Ross CA, Ha HC, Li XJ, Snyder SH, Sawa A. Mutant huntingtin: nuclear translocation and cytotoxicity mediated by GAPDH. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;**103**:3405-3409.
87. Sen N, Hara MR, Kornberg MD, Cascio MB, Bae BI, Shahani N, Thomas B, Dawson TM, Dawson VL, Snyder SH, Sawa A. Nitric oxide-induced nuclear GAPDH activates p300/CBP and mediates apoptosis. *Nat Cell Biol*. 2008;**10**:866-873.
88. Nakajima H, Amano W, Fujita A, Fukuhara A, Azuma YT, Hata F, Inui T, Takeuchi T. The active site cysteine of the proapoptotic protein glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is essential in oxidative stress-induced aggregation and cell death. *J Biol Chem*. 2007;**282**:26562-26574.
89. Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med*. 1991;**11**:81-128.
90. Uchida K, Stadtman ER. Covalent attachment of 4-hydroxynonenal to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. A possible involvement of intra- and intermolecular cross-linking reaction. *J Biol Chem*. 1993;**268**:6388-6393.
91. Luo J, Robinson JP, Shi R. Acrolein-induced cell death in PC12 cells: role of mitochondria-mediated oxidative stress. *Neurochem Int*. 2005;**47**:449-457.
92. Sun L, Luo C, Long J, Wei D, Liu J. Acrolein is a mitochondrial toxin: effects on respiratory function and enzyme activities in isolated rat liver mitochondria. *Mitochondrion*. 2006;**6**:136-142.

【総括】

本研究では、アクロレインの細胞毒性機序を明らかにすることを目的とし、アクロレイン耐性細胞の樹立やアクロレイン抱合蛋白質の同定を試みた。

第1章では、アクロレインの毒性除去に関わる重要な因子を解明するため、アクロレイン耐性細胞 FM3A-ATD と Neuro2a-ATD を樹立した。FM3A の γ -グルタミルシステインリガーゼ (GCLC) 遺伝子是对立遺伝子の一つが不活化しており、FM3A-ATD は、GCLC の対立遺伝子を再活性化することにより、細胞内グルタチオン量を増加させ、アクロレイン耐性を獲得した。Neuro2a-ATD は、リン酸化による c-Jun N-末端キナーゼ (JNK) の活性化を介して、GCLC とグルタチオンシンターゼ (GSHS) の発現を転写レベルで促進することにより、細胞内グルタチオン量を増加させ、アクロレイン耐性を獲得した。したがって、細胞内グルタチオン量の増加は、FM3A-ATD と Neuro2a-ATD の共通のメカニズムであり、グルタチオンはアクロレイン毒性を解除する重要な役割を担っていることが明らかとなった。

第2章では、細胞培養系を用いてアクロレイン抱合蛋白質の同定を試みた。アクロレイン抱合蛋白質の一つとして、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) を同定した。アクロレインは GAPDH の活性中心である Cys-150 と Cys-282 に抱合した。アクロレインは、細胞内 ATP 量を低下させると共に、不活化した GAPDH を核内移行し、アポトーシスを引き起こした。アクロレインの細胞毒性機序の一つとして、アクロレインが GAPDH を不活化し、細胞死をもたらすことが明らかとなった。

以上、本研究では、アクロレイン耐性細胞を樹立することによって、アクロレインの毒性解除にグルタチオンが重要であることを示した。また、アクロレインは GAPDH を不活化し、アポトーシスを引き起こすことにより、細胞毒性を示すことを明らかにした。これらの結果を基に、アクロレイン修飾により細胞内 ATP 量の減少を引き起こす標的蛋白質を同定し、さらなるアクロレインの毒性機序を解明することは、脳梗塞に代表される細胞障害性疾患に対する治療法の確立において重要な知見を与えることが推察される。本研究成果が、アクロレインによる細胞障害性疾患に対する治療薬開発の一助となることを期待する。

【謝辞】

本研究を遂行するにあたり、御指導、御鞭撻を賜りました柏木敬子教授に心より感謝致します。研究室配属当初より、直接の御指導を戴きました富取秀行准教授に深く感謝致します。そして、数々の御助言を戴きました照井祐介講師に深謝致します。先生方の議論を介して深い洞察を与えて下さったこと、また大変な時期もありましたが、先生方の御助言によりここまで頑張れたことに心より感謝致します。

数々の御指導を賜りました千葉大学大学院薬学研究院 五十嵐一衛名誉教授に深く感謝致します。本研究の遂行に御協力下さいました株式会社アミンファーマ研究所 吉田円博士と斎木遼太郎博士に感謝致します。また、本研究中の LC-MS/MS 解析をして下さいました理化学研究所バイオ解析チーム 堂前直博士と鈴木健裕博士に深く感謝致します。

日々の実験でお世話になりました病態生化学研究室の皆様に感謝致します。中でも、本研究の多くの実験に協力し進めるだけでなく、研究室の運営や学生実習にも積極的に取り組んで下さった坂本明彦氏に深く感謝致します。また、笠原拓馬氏と山本拓氏にも心より感謝致します。

最後に、私を支えてくれた両親や家族、大切な友人に深く感謝致します。千葉科学大学での 6 年間の研究生活は多くの方の御協力により充実した日々を送ることができました。そして、このように学位論文をまとめることができたことに深く感謝致します。誠にありがとうございました。

【主論文目録】

本学位論文は下記の発表論文による。

1. Tomitori H, Nakamura M, Sakamoto A, Terui Y, Yoshida M, Igarashi K, Kashiwagi K, Augmented glutathione synthesis decreases acrolein toxicity. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012;**418**:110-115.
2. Nakamura M, Tomitori H, Suzuki T, Sakamoto A, Terui Y, Saiki R, Dohmae N, Igarashi K, Kashiwagi K, Inactivation of GAPDH as one mechanism of acrolein toxicity. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013;**430**:1265-1271.

【審査委員】

本学位論文の審査は千葉科学大学で指名された下記の審査委員により行われた。

主査	千葉科学大学教授	柏木 敬子
副査	千葉科学大学教授	大熊 康修
副査	千葉科学大学教授	細川 正清
副査	千葉科学大学教授	榊 泰宏