

ヒ素誘導性細胞死における、ヒ素結合タンパク質 Id3 の役割

研究代表者： 黒岡 尚徳 (医学部・准教授)

概 要	
	ヒ素は代表的環境汚染物質であり、細胞毒性や発がん性を有する一方で、急性前骨髄性白血病の治療薬としても用いられている。3価のヒ素は、近接した2～3つのシステイン残基に強い親和性を示すが、PML-RAR α 融合タンパク質と結合して分解を誘導することが最近判明し、ヒ素とタンパク質の結合の重要性の認識が高まっている。代表者はこれまで、細胞の分化抑制と増殖促進作用を示す転写調節因子 Id の細胞内局在制御の解析を行ってきたが、新たに Id3 タンパク質が、ヒ素 (3 価) 処理に伴い細胞質へ集積することを見出した。この効果はヒ素の結合で生じると考えられ、本研究では、ヒ素が誘導する細胞死における Id3 の役割を解析した。その結果、Id3 はヒ素誘導性細胞死を増強することが明らかになったが、細胞質への集積やヒ素の結合と、細胞死の関連は認められなかった。
関連キーワード	ヒ素、Id3、NES、システイン、細胞死

研究の背景および目的

有毒微量元素ヒ素は、代表的な環境汚染物質であり、大量に摂取すると急性あるいは慢性中毒を引き起こし、少量では細胞増殖を亢進させ、疫学的に皮膚、肺、膀胱、肝臓等で発がん性が認められる。一方で、ヒ素化合物亜ヒ酸は、急性前骨髄性白血病の治療薬としても用いられている。このように、ヒ素は生体内で様々な作用を発揮するが、その機序や分子標的に関しては不明な点が多い。ヒ素は、化学形態 (無機と有機、3 価と 5 価) の違いによって毒性に差が認められ、毒性が強い 3 価のヒ素はチオール基 (SH 基) に結合しやすく、近接した 2～3 つのシステイン残基に強い親和性を示す。これまで、タンパク質リン酸化/脱リン酸化酵素、酸化還元反応を司るレドックス酵素、細胞骨格系タンパク質とヒ素の結合が報告されているが、酵素活性の阻害以外にその影響は不明であった。しかし最近、亜ヒ酸が急性前骨髄性白血病の原因遺伝子産物である PML-RAR α 融合タンパク質に結合して分解を誘導し、骨髄細胞を分化させることが判明し、ヒ素とタンパク質の結合の重要性に対する認識が高まっている。

Id は、bHLH 型転写因子の機能を阻害し、細胞の分化抑制及び増殖促進作用を示す転写調節因子である。腫瘍化した細胞や組織の多くで Id の発現亢進が報告されており、発癌との関連が指摘されているもの (Fong et al, Trends Mol Med, 2004)、

その分子機構に関してはよくわかっていない。

Id 活性制御の解析は、これまで主に転写レベルで行われてきたが、代表者は Id タンパク質の細胞内局在制御について精力的に解析し、Id1 及び Id2 タンパク質が nucleocytoplasmic shuttling 活性を有し、それぞれ異なる核排出配列 (nuclear export signal; NES) により制御されていることを明らかにしてきた (Kurooka and Yokota, J Biol Chem, 2005, Makita, Kurooka et al., FEBS Lett, 2006)。一方で Id3 は、Id1 と類似の NES 配列を持つにもかかわらず、nucleocytoplasmic shuttling 活性を示さないが、様々な刺激を与えて細胞内局在を観察したところ、ヒ素 (3 価) 処理に伴い細胞質へ集積することが明らかになった。また、Id1 と類似の NES 配列を変異させると細胞質への集積がみられなくなることから、通常遮蔽されている NES 配列が、ヒ素処理により露出することが推測された。さらに、ヒ素による Id3 タンパク質の細胞質への集積の機序について検討した結果、N 末端領域の 3 つのシステイン残基とヒ素の結合が重要であることが判明した。本研究では、ヒ素応答において Id3 がどのような役割を果たすのか調べ、ヒ素との結合や、ヒ素による Id3 細胞内局在変動の意義を明らかにすることを目指す。本研究ではまず、ヒ素によって誘導される細胞死における Id3 の役割について解析を行った。

研究の内容および成果

(1) Id3 によるヒ素誘導性細胞死の増強

ヒ素結合タンパク質 Id3 が、ヒ素によって誘導される細胞死においてどのような役割を果たすのか調べるため、レトロウィルスを用いて GFP-Id3 及びコントロールの GFP を安定に発現する NIH

3T3 細胞株を樹立した。これらの細胞株を比較的低濃度 (5~10 μ M) のヒ素 (亜ヒ酸ナトリウム) を含む培地で 48 時間培養すると、GFP 発現細胞株ではごくわずかし細胞死が認められなかったのに対し、GFP-Id3 発現細胞株では、5 μ M のヒ素

処理で約 30 %、10 μM のヒ素処理では約 80 % の割合で細胞死が認められた (図 1)。このことから Id3 は、ヒ素によって誘導される細胞死を増強することが明らかになった。

(2) Id3 によるヒ素誘導性細胞死増強の機序

Id3 によるヒ素誘導性細胞死の増強が、どのような機序で生じるのか明らかにするために、細胞死関連分子の発現をウェスタンブロットで検討した。その結果、GFP-Id3 発現細胞株ではアポトーシスの代表的マーカーとして知られる PARP の発現がヒ素処理に伴い有意に低下することが判明し (図 2 上段)、この細胞死がアポトーシスであることが示唆された。また従来の報告通り、アポトーシス促進作用を持つ Bax の発現が、コントロールの GFP 発現細胞株に比べて約 1.3~1.6 倍上昇していることが示されたが (図 2 中段)、この上昇が Id3 によるヒ素誘導性細胞死の増強に、どの程度寄与しているのかは現段階では不明である。さらに、ヒ素処理で変動することがわかっているシグナル経路のうち、ERK と p38MAP キナーゼの活性化について検討したが、それぞれの細胞株で顕著な差は認められなかった。JNK キナーゼの活性化については現在検討中であり、それ以外のシグナル経路に関しても、今後、解析を行う予定である。

(3) Id3 の細胞内局在及びヒ素との結合と、Id3 によるヒ素誘導性細胞死増強の関係

ヒ素による細胞質への集積がみられなくなる Id3N 末端システイン変異体、及び、ヒ素と結合しなくなるシステイン残基全ての変異体を作成し、レトロウイルスを用いて、それぞれ GFP-Id3 融合タンパク質を恒常的に発現する NIH3T3 細胞株を樹立した。これらの細胞株を 5~10 μM のヒ素 (亜ヒ酸ナトリウム) を含む培地で 48 時間培養したところ、野生型の GFP-Id3 と同程度に、ヒ素によって誘導される細胞死が亢進することが判明した。このことは、Id3 の細胞内局在やヒ素との結合は Id3 によるヒ素誘導性細胞死の増強とは直接関係がないことを示すものである。ヒ素の作用として他に活性酸素の発生があり、活性酸素は細胞死を誘導することから、今後は Id3 と活性酸素の関係を中心に解析を行う予定である。

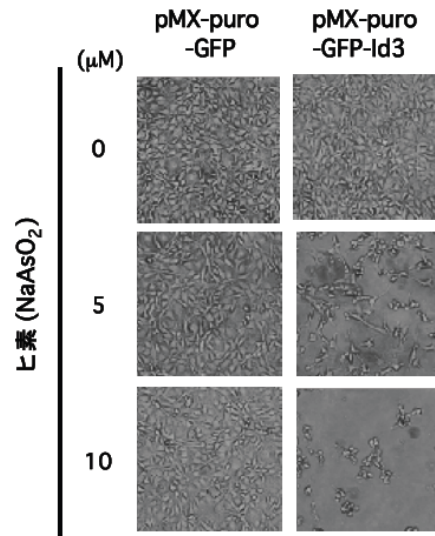


図 1. Id3 によるヒ素誘導性細胞死の増強

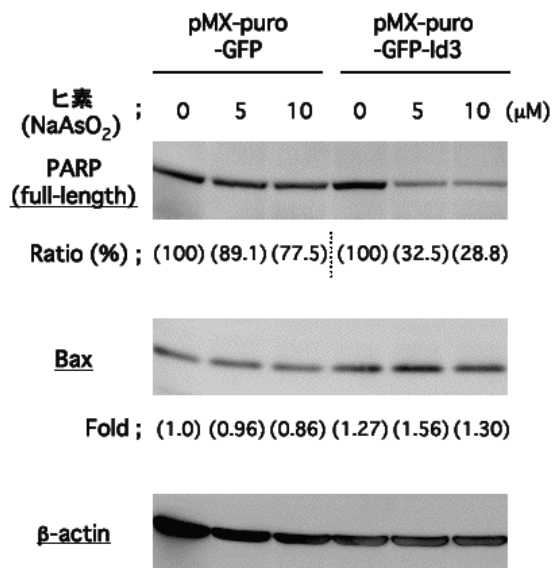


図 2. Id3 による細胞死関連分子の発現変動

本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況

「主な論文・学会発表」

【論文】

Hisanori Kurooka, Manabu Sugai, Kentaro Mori, and Yoshifumi Yokota

The metalloloid arsenite induces nuclear export of Id3 possibly via binding to the N-terminal cysteine residues.

Biochem. Biophys. Res. Commun., in press.

【学会発表】

Hisanori Kurooka and Yoshifumi Yokota

Roles of BMP signaling in serum-induced Id2 expression and inhibition of myoblast differentiation.

第 35 回日本分子生物学会年会, 2012/12, 福岡

「特記事項」

特になし

「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

日本学術振興会・科研費補助金・基盤 (C)・H25~27・「ヒ素結合性転写因子によるヒ素細胞応答分子機構の解明」・代表・申請中