

新規H⁺/Cl⁻-シンポーターによるオートファジー・アポトーシス制御機構

著者	大熊 勝治
著者別表示	Ohkuma Shoji
雑誌名	平成13(2001)年度 科学研究費補助金 基盤研究(B) 研究成果報告書
巻	1999-2001
ページ	9p.
発行年	2002-03
URL	http://doi.org/10.24517/00050624

新規H⁺/Cl⁻シンポーターによる
オートファジー・アポトーシス制御機構

(課題番号：11470483)

平成11～13年度 科学研究費補助金
(基盤研究 (B) (2)) 研究成果報告書

平成14年 6月

研究代表者 大熊勝治

所属機関 (〒100-8302 東京都千代田区千代田 1-3-3)



8011-05257-8

学部教授)

K1117
2001
15

新規H⁺/Cl⁻シンポーターによる
オートファジー・アポトーシス制御機構

(課題番号：11470483)

平成11～13年度 科学研究費補助金
(基盤研究 (B) (2)) 研究成果報告書

平成14年 3月

研究代表者 大熊勝治

(金沢大学薬学部教授)

著 者 寄 贈

新規 H^+/Cl^- シンポーターによる
オートファジー・アポトーシス制御機構

研究課題番号：11470483

平成11～13年度 科学研究費補助金
(基盤研究 (B) (2)) 研究成果報告書

平成14年 3月

研究代表者 大熊勝治
(金沢大学薬学部教授)

平成11～13年度 科学研究費補助金
(基盤研究 (B) (2)) 研究成果報告書

課題番号 11470483

研究課題 新規H⁺/Cl⁻シンポーターによる
オートファジー・アポトーシス制御機構

研究組織

研究代表者：大熊勝治（金沢大学薬学部 ・教授）
研究分担者：荒井國三（金沢大学薬学部 ・講師）
研究分担者：横山 謙（金沢大学薬学部 ・助手）
研究分担者：染井正徳（金沢大学薬学部・教授）
研究分担者：太田哲生（金沢大学医学部附属病院 ・助教授）

研究経費	平成11年度	8,600	千円
	平成12年度	2,900	千円
	平成13年度	2,900	千円
	計	14,400	千円

はじめに

本研究では、バフィロマイシンと比較しつつ、主としてプロジギオシン類等の空胞系プロトンポンプ阻害剤による、増殖阻害・分化・アポトーシス誘導機構を明らかにするとともに、構造活性相関より、癌増殖・細胞死誘導の選択的阻害に必須な構造、並びにプロトン輸送阻害機構の解明を目指した。特に、これまで殆ど注目されてこなかったオートファジーの役割を、体細胞遺伝学的・分子生物学的に明らかにしようとしたものである。

その結果、以下のことが判明した。

- (1) プロジギオシン類は、その H^+/Cl^- 共輸送活性により各種プロトンポンプを脱共役する、新規 H^+/Cl^- 共輸送活性である。
- (2) プロジギオシン類も、バフィロマイシン同様、ヌードマウスに移植した膀胱癌細胞の増殖を抑制した。
- (3) 高度好熱菌V-ATPaseの再構成に成功し、そのATP加水分解・ATP合成・プロトン輸送の各キネティクスの特徴を明らかにした。
- (4) バフィロマイシン同様、プロジギオシン類も神経細胞様突起進展(NOG)・アポトーシスを誘導することを発見した。アポトーシスも、NOGも、新たなRNA及び蛋白質合成を必要とし、MAPキナーゼ、セリン-スレオニンホスファターゼ、チロシンキナーゼ、チロシンホスファターゼ依存性である等、その情報伝達経路は酷似していた。しかしながら、アポトーシス誘導は共にチロシンホスファターゼに非依存性である点で、NOG誘導の情報伝達経路と異なっていた。
- (5) プロジギオシン類によるPC12細胞の増殖抑制・アポトーシス誘導も、 NH_4Cl 、クロロキン、イミダゾール等で全く阻害されないことより、細胞内pH以外の機構によると推察された。
- (6) プロジギオシン類の H^+/Cl^- 共輸送活性には最低2個のピロール環の存在が必須であることが明らかになった。
- (7) ベラパミルにも弱い活性が見られたものの、 H^+/Cl^- 共輸送活性を有する新規化合物は見出されていない。
- (8) タンビヤミン・グループのBE-18591も H^+/Cl^- 共輸送活性を示し、胃粘膜プロトンポンプ阻害、細胞内pH低下、リソソームpH上昇、破骨細胞分化の阻害、免疫細胞の増殖抑制、更にはNOG誘導やアポトーシス誘導作用を示すことを発見、その多彩な生理作用と H^+/Cl^- 共輸送活性とが相関していることが示唆された。
- (9) しかし、同じ H^+/Cl^- 共輸送体でも、テトラピロールには増殖阻害・アポトーシス誘導作用はあるものの、NOG誘導作用はなかった(投稿準備中)。
- (10) 同じくV-ATPase阻害剤であるデストラキシンも、EのみNOG誘導活性を示し、またEの方がBより増殖阻害作用が強かった。
- (11) バフィロマイシン類であるコンカナマイシンの光アフィニティープローブの作成に成功し

た。そのプロトンポンプ阻害活性はやや落ちるものの、遊離のコンカナマイシンによらないこと、アポトーシスやNOGを誘導することを明らかにすることが出来た。現在、膜不透過性担体がアポトーシスやNOGを引き起すか、検討中である（投稿準備中）。

- (12) プロジギオシン以外の H^+ / Cl^- 共輸送体がアポトーシス誘導活性持たないことより、 H^+ / Cl^- 共輸送活性が細胞増殖阻害の引き金になっていることは考えにくい。
- (13) 種々の合成化合物について、 H^+ / Cl^- 共輸送体として満たすべき構造を検討。
- (14) ノードマウスに移植した膵癌由来細胞に対して、プロジギオシン以外の H^+ / Cl^- 共輸送体も制癌効果を示した（投稿準備中）。
- (15) 3-メチルアデニン（オートファジー阻害剤）は血清非存在下では細胞死を促進したが、血清存在下では促進しなかったため、PC12細胞やCHO細胞では、アポトーシス誘導がオートファジー阻害による可能性は低いものと思われる（日本薬学会発表）。
- (16) GFPタンパク質遺伝子を細胞質やオルガネラ（ミトコンドリアやペルオキシソーム）に導入（それぞれに特有の移行シグナルを有するGFPを利用）したCHO細胞を作成した。フローサイトメトリーにより栄養飢餓状態でGFPを分解できないオートファジー突然変異体を、その蛍光を指標として生化学的・細胞生物学的に単離する方法の確立に向けて条件検討を行っている。
- (17) オートファジー関連遺伝子のヒトホモログをHeLa細胞より単離することに成功した。また、アポトーシスに伴う動態検討と、ドミナント・ネガティブ体のトランスフェクタントの作成にも成功した。現在そのCHOトランスフェクタントを用い、動物細胞オートファジーにおける機能を、フローサイトメトリー等を用いて検討している。今後、（毒素等を利用した）細胞生存率と、強制発現させたGFP蛋白質の分解異常を指標として、動物細胞のオートファジー変異体を選択する予定である。
- (18) オートファジーに伴って発現量の変動する遺伝子・蛋白質を、ディファレンシャルサブトラクション法とMultiphore II 二次元電気泳動とで複数検出した。
- (19) CHO細胞のペルオキシソームをベザフィブレートにより誘導することに成功した。更にその分解が、3-メチルアデニンやウォルトマンニン等の各種阻害剤によって阻害されることを、GFP標識したペルオキシソームを有するCHO細胞を用いて明らかにした。
- (20) リソソーム膜融合反応に必要なシンタキシン・ホモログの単離・同定には成功しているが、それがオートファゴソームとリソソームの膜融合に必須であるか否かは決定出来ていない。

平成14年3月

金沢大学薬学部

教授 大熊勝治

研究発表

ア 学会誌等

学術論文

1. Yokoyama, K., Fukumoto, K., Murakami, T., Harada, S., Hosono, R., Wadhwa, R., Mitsui, Y., and Ohkuma, S., Extended longevity of *C. elegans* by knocking in extra copies of hsp70F, a homologue of mot-2 (mortalin)/mthsp70/Grp75, *FEBS Lett.* in press (2002).
2. K. Arai, S. Ohkuma, T. Matsukawa, and S. Kato, A., Simple estimation of peroxisomal degradation with green fluorescent protein – an application for cell cycle analysis, *FEBS Lett.* 507, 181–186 (2001).
3. 石崎純子, 横川弘一, 大熊勝治, 市村藤雄, 宮本謙一, 塩基性薬物の脂溶性に基づく細胞内分布機構に関する研究, *YAKUGAKU ZASSHI* 121, 557–565 (2001)
4. Matsuya, H., Okamoto, M., Ochi, T., Nishikawa, A., Shimizu, S., Kataoka, T., Nagai, K., Wasserman, H.H., and Ohkuma, S., Reversible and potent uncoupling of hog gastric ($H^+ + K^+$)-ATPase by prodigiosins. *Biochem. Pharmacol.* 60, 1855–1863 (2000).
5. Ishizaki, J., Yokogawa, K., Ichimura, F., Ohkuma, S., Uptake of imipramine in rat liver lysosomes *in vitro* and its inhibition by basic drugs. *J. Pharmacol. Exptl. Therapeut.* 293, 1088–1098 (2000).
6. Elnemr, A., Ohta, T., Yachie, A., Fushida, S., Ninomiya, I., Nishimura, G.-I., Yamamoto, M., Ohkuma, S., and Miwa, K., N-ethylmaleimide-enhanced phosphatidylserine externalization of human pancreatic cancer cells and immediate phosphatidylserine-mediated phagocytosis by macrophages. *Intern. J. Oncol.* 16, 1111–1116 (2000).
7. Otani, H., Yamamura, T., Nakao, Y., Hattori, R., Fujii, H., Ninomiya, H., Kido, M., Kawaguchi, H., Osako, M., Imamura, H., Ohta, T., and Ohkuma, S., Vacuolar H^+ -ATPase plays a crucial role in growth and phenotypic modulation of myofibroblasts in cultured human saphenous vein. *Circulation* 102 (19 Suppl 3), III269–74 (2000).
8. Otani, H., Ohmiya, H., Fujii, H., Ninomiya, H., Kido, M., Kawaguchi, H., Osako, M., Imamura, H., Ohta, T., and Ohkuma, S., Potential role of vacuolar H^+ -ATPase in neointimal formation in cultured human saphenous vein. *J. Thorac. Cardiovasc. Sur.* 119, 998–1007 (2000).
9. Yokoyama, K., Ohkuma, S., Taguchi, H., Yasunaga, T., Wakabayashi, T., and Yishida, M., V-type ATPase/synthase from *Thermus thermophilus*, subunit structure and operon *J. Biol. Chem.* 275, 13955–13961 (2000).
10. Ohta, T., Tajima, H., Yachie, A., Yokoyama, K., Elnemr, A., Fushida, S., Kitagawa, H., Kayahara, M., Nishimura, Ge., Miwa, K., Yamamoto, M., Terada, T., and

Ohkuma, S., Activated lansoprazole inhibits cancer cell adhesion to extracellular matrix components. *Intern. J. Oncol.* 15, 33-39 (1999).

イ 口頭発表

海外および国際学会発表状況

1. Yokoyama, K., Yasunaga, T., Wakabayashi, T., and Ohkuma, S.
V-Type ATPase/synthase from *Thermus thermophilus*
11th European Bioenergetics Conference, University of Sussex, UK., 2000. 9.

国内学会

1. 谷垣佳司、占 紅、内田和典、大熊勝治
HeLa細胞に対するBafilomycin A₁の作用
日本薬学会第122回大会（千葉）、2002.3.
2. Zong Zhan, Ken, Yokoyama, Keiji Tanigaki, Hajime Otani, Hiroshi Yamamoto, Shoji Ohkuma
Cell proliferation and V-ATPase
日本薬学会第122回大会（千葉）、2002.3.
3. 大熊勝治、中西珠栄、横山 謙、谷垣佳司
酵母APG5及びAPG6のヒトホモログの単離とCHO細胞を用いたその生理機能の解析
第54回日本細胞生物学会大会（岐阜）、2001.5.
4. 荒井 國三、大熊 勝治、松川 通、加藤 聖、今中 常雄
ペルオキシソームのオートファジーによる分解
第73回日本生化学会大会（横浜）、2000.10.
5. 横山 謙、大熊勝治、吉田賢右
V-ATPaseの回転について
第73回日本生化学会大会（横浜）、2000.10.
6. 荒井國三、大熊勝治、清水栄、松川 通、加藤 聖
CHO細胞におけるペルオキシソームの誘導と分解
日本薬学会第120回（岐阜）、2000.3.
7. 谷垣佳司、西川あさ子、濱口景子、三原裕美、大熊勝治
V-ATPase阻害剤によるPC12細胞の分化・細胞死とオートファジー
日本薬学会第120回（岐阜）、2000.3.
8. 谷垣佳司、西川あさ子、濱口景子、三原裕美、大熊勝治
V-ATPase阻害剤によるPC12細胞の分化・細胞死とオートファジー
日本薬学会第120回（岐阜）、2000.3.
9. 谷垣佳司、西川あさ子、濱口景子、三原裕美、大熊勝治
V-ATPase阻害剤によるPC12細胞の分化・細胞死とオートファジー
日本薬学会第120年回（岐阜）、2000.3.

10. 伊与田 涼、谷垣佳司、全 理恵、大熊勝治
プロジギオシン類似物質の構造活性相関
第72回日本生化学会大会（横浜）、1999.10.
11. 西川あさ子、谷垣佳司、佐藤友彦、大熊勝治
新規H⁺/Cl⁻ Symporterプロジギオシン類による神経突起進展作用
日本薬学会第119年回（徳島）、1999.3.
12. 越智隆洋、西川あさ子、谷垣佳司、佐藤友彦、大熊勝治、永井和夫、川島博行
新規H⁺/Cl⁻ Symporter "BE-18591"の多彩な生物活性
日本薬学会第119年回（徳島）、1999.3.

ウ 出版物

1. 大熊勝治
化学と生物 実験ライン49 細胞生物学実験法－Ⅱ. 細胞観察法
編著、廣川書店、116頁
平成14年3月25日
2. 大熊勝治
化学と生物 実験ライン43 細胞生物学実験法－Ⅰ. 細胞培養法
編著、廣川書店、154頁
平成11年6月30日