

審査の結果の要旨

氏名 新庄 記子

ヘムは、ミトコンドリア電子伝達系酵素群やその他様々なタンパク質の補欠分子族として機能する重要な分子である。特に、神経細胞におけるヘムの重要性は従来より示唆されており、老化した脳やアルツハイマー病の脳においてヘムの減少がみられることや神経特異的ヘムタンパク質（ニューログロビン、nNOSなど）が存在すること、またヘム合成の阻害が神経細胞特異的遺伝子発現に異常をきたすことが報告されている。さらに、神経細胞分化の過程におけるヘムの重要性も示唆されており、PC12細胞およびSHSY5Y細胞の分化の系において、ヘム合成阻害剤により分化が阻害されるという報告がある。しかし、神経細胞分化の過程でヘムがどのような役割を果たすのかについては、まだ明らかではない。そこで、神経細胞の分化におけるヘムの役割を知る手掛りを見出す目的で、Neuro2a細胞のレチノイン酸誘導分化の系を用い、「分化の過程におけるヘム合成の変化(1)」を解析した。さらに近年、神経細胞の分化誘導のシグナルとしてのROS生成が示唆されていること、ヘムには活性酸素(ROS)の生成側プロオキシダントとしての側面とROSを消去するアンチオキシダントとしての側面の両方が知られていることから、(1)の解析結果をふまえ、「分化の過程で生成するROSとヘム合成の関係(2)」についての解析を行った。

1. 分化の過程におけるヘム合成酵素群の発現およびヘムの量的変化の解析

1-1. ヘム合成酵素群 mRNA レベルの変化

ヘム合成酵素群 mRNA レベルを定量PCRにより解析したところ、ALAS、CPG oxidase、PPG oxidase、UPG cosynthase に発現の上昇がみられた。通常、ヘム合成においてはALAS、CPG oxidase が律速であることから、分化の過程でヘムの合成が転写レベルで活性化されていると推測される。

1-2. ヘムの量的変化

細胞内には3種類のヘムが存在し、ミトコンドリア電子伝達系酵素群をはじめとする多くのタンパク質の補欠分子族であり、最も一般的なタイプであるヘム*b*、ミトコンドリア電子伝達系複合体IV(シトクロム*c*オキシダーゼ)の補欠分子であるヘム*a*、ミトコンドリアのシトクロム*c*のペプチドに共有結合しているヘム*c*が知られている。分化の過程でのそれぞれの変化を調べるため、ヘム*a*、*b*については酸性アセトンで抽出してHPLCで分析し、タンパク質に共有結合して抽出されないヘム*c*については非還元条件下 SDS-PAGE で分離後、ヘム染色法により検出した。

その結果、分化の過程後半でのヘム*b*の増加、および分化の初期におけるミトコンドリアのシトクロム*c*に由来するヘム*c*の増加が観察され、細胞全体とミトコンドリアでの結果

の比較から、分化後半で増加しているヘム *b* は非ミトコンドリア画分に由来すること、また、分化の初期においてシトクロム *c* 前駆体のミトコンドリアへの取り込みの過程、すなわちアポシトクロム *c* からホロシトクロム *c* への成熟過程が促進されていることが明らかになった。

2. ROS とヘム生合成の関係の解析

2-1. シトクロム *c* 増加の ROS 依存性

1-2 の解析から、分化初期においてミトコンドリアのシトクロム *c* に由来するヘム *c* が増加しているのに対し、他のミトコンドリア電子伝達系構成因子の補欠分子族であるヘム *a*、*b* は増加しておらず、シトクロム *c* の増加は、ミトコンドリア電子伝達系酵素群とは独立したものであることが示唆された。このことから、シトクロム *c* の増加はミトコンドリア電子伝達系の構成因子としての機能ではなく、もう1つの機能である抗酸化タンパク質としての役割と関係するのではないかと考え、分化初期のシトクロム *c* の増加に対する ROS 消去剤である N-Acetyl-Cystein(NAC)の影響を調べた。その結果 NAC の添加によりシトクロム *c* の増加が抑制され、シトクロム *c* 増加に分化過程における ROS 生成が関与していると考えられる。

2-2. カタラーゼ (ヘムタンパク質) とヘム生合成の関係

補欠分子族としてヘム *b* を持つカタラーゼはペルオキシソームのマーカータンパク質として知られ、細胞内の ROS 消去に非常に重要な役割を果たす酵素である。分化の過程でのカタラーゼ活性を測定したところ、カタラーゼ活性の上昇がみられた。また、ヘム生合成阻害剤(SA succinyl-acetone)によりカタラーゼ活性の上昇は顕著に抑制され、このことから、分化過程で新たに生成されたヘムがカタラーゼの補欠分子として積極的に取り込まれており、カタラーゼの活性化に寄与していることが示唆された。さらに ROS 消去剤 NAC により、分化誘導によるカタラーゼおよびヘム生合成酵素の mRNA レベルの上昇が抑制されることから、カタラーゼおよびヘム生合成系は、共に遺伝子発現レベルで、分化の過程で生成する ROS による制御を受けていると推測される。

2-3. ROS 消去剤 (NAC) 添加のヘム *a*, *b* レベルへの影響

上記の ROS 消去剤 NAC を用いた解析により、分化誘導によるシトクロム *c* の増加とヘム生合成の活性化が ROS 依存であることが示されたが、次に、細胞内のヘム *a*、*b* の量が NAC 添加によりどのように影響されているかを調べた。その結果 NAC 存在下では、分化誘導の有無に関わらず、ヘム *a* レベルが顕著に減少していることがわかった。さらに、形態的観察から、NAC により Neuro2a 細胞の分化が阻害され、また、ヘム生合成前駆体を添加することで NAC 存在下においても分化が進行することから、ROS シグナル下流におけるヘム生合成の重要性が示唆された。

以上の解析より、Neuro2a 細胞分化の過程でヘム生合成系の活性化がおこること、抗酸化ヘムタンパク質であるシトクロム *c* およびカタラーゼの増加がおこることが示され、また

それらが ROS シグナルによる制御を受けていることが明らかになった。

ROS は、その過剰な生成がストレスにつながるということが知られている一方で、シグナル分子としての機能が示唆されている。近年、神経細胞の分化過程における ROS レベルの上昇とその分化誘導のシグナルとしての重要性が示されており、高い ROS レベルの下で分化を進行させるためには酸化ストレスから細胞を守る抗酸化系の役割が非常に重要であると考えられる。本研究により示された抗酸化ヘムタンパク質の増加、活性化はこのような細胞防御にかかわるものであると推測される。また、神経細胞の分化は、発生の過程だけでなく神経再生においても重要な現象であり、今回の解析で明らかになったヘム生合成の役割は発生分化だけでなく生体内の神経再生においても重要な役割を果たすのではないかと考えられる。

また、分化誘導の有無に関わらず、ヘム *a* レベルが ROS の影響を顕著に受けることが示された。ヘム *a* はミトコンドリア電子伝達系末端酸化酵素であるシトクロム *c* オキシダーゼの補欠分子族であり、エネルギー生成に必須の要素である。ヘム *a* が ROS レベルの制御を受けるという今回の結果は、エネルギー代謝の制御という観点から興味深い。また、アルツハイマー病の脳組織においてヘム *a* レベルが顕著に低下しているとの報告もあり、今回示された ROS とヘム生合成の関係は神経疾患や老化にも関わる可能性がある。

本研究の成果は、神経細胞の分化過程におけるヘムの役割およびヘム生合成と ROS との関係を見出したものであり、今後、神経再生や脳の老化防止の研究にも貢献すると期待され、博士（薬学）の学位論文として十分な価値があるものと認められる。