

新規細胞死誘導剤を基盤とした  
酸化ストレス誘導性ネクロシスの分子機構解明

佐藤 伸一

【研究背景・研究目的】

細胞死の研究は、これまで生体内で最も良く観察されるアポトーシスを中心に盛んに行われ、実行因子のカパーゼの発見を契機にして詳細な制御機構が解明されてきた。これに対して物理的傷害で偶発的に起きるような膜機能の破綻を形態的な特徴とするネクロシスはこれまで制御されない細胞死として考えられ、あまり研究対象とされてこなかった。しかし近年では神経変性疾患・虚血性疾患への関与や、いくつかのネクロシス制御機構の存在が提唱され、アポトーシスのバックアップとして働く古典的なプログラム細胞死であるとする説もある (Golstein, P. and Kroemer, G., *Trends Biochem. Sci.*, 2007, 32, 37.)。よって本細胞死の分子機構解明は未だ決定的な治療法の無い上記の疾患の理解のみならず、細胞死研究において大きなブレイクスルーになると考えられる。

古くから酸化ストレスとネクロシスの関連が知られていたが、酸化ストレスを与える薬剤の標的選択性の低さからそのメカニズム解明は困難であった。そこで筆者は、選択性の高いネクロシス誘導剤の開発とその標的特定を通じて本細胞死の分子機構解明を目指した。

【酸化ストレス誘導性ネクロシスの解析ツール NecroTrigger の創製】

我々は酸化ストレス誘導性ネクロシスの選択的な抑制剤 IM-54 (Dodo, K. et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2005, 15, 3114.) を用いた評価系により、カテプシンの阻害剤として知られる Cathepsin Inhibitor-1 (CATI-1; Fig.1A) と酸化ストレスを与える薬剤が同種のネクロシスを誘導することを見出した。しかし、他のカテプシン阻害剤を検討した結果、ネクロシス誘導活性とカテプシン阻害活性は相関しないことがわかり、CATI-1 はカテプシンとは別の標的分子に作用しネクロシスを誘導していることが示唆された。

一方、CATI-1 の C 末構造はカテプシン活性中心のシステインと反応性を示すことで知られているが、ネクロシス誘導活性には必須であったため、ネクロシスの制御分子を同様にラベル化している可能性が考えられた (Fig.1B)。

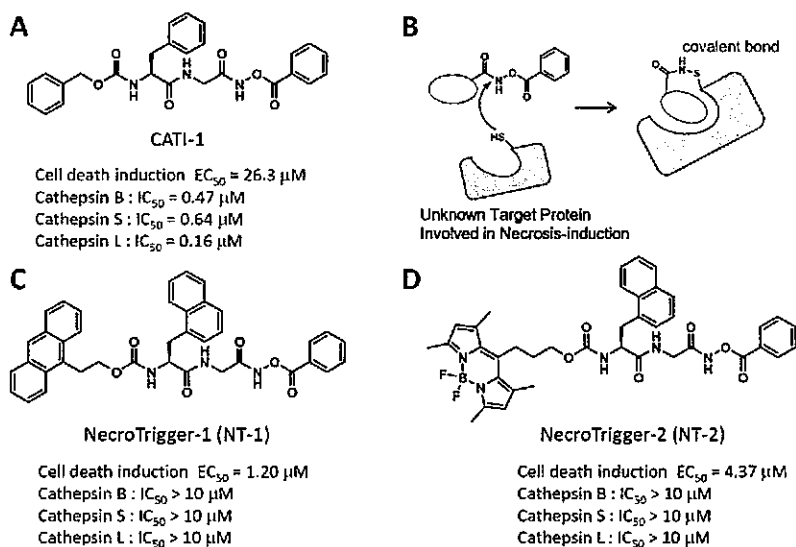


Fig.1 本研究で用いたケミカルツールの創製戦略と構造

このように本研究では標的タンパク質と共有結合を形成する低分子化合物を用いることで、未だ不明な細胞死制御因子を直接ラベル化して同定するという戦略をとった。これは、遺伝子操作技術を主に用いて研究を進める従来の生物学的手法にはないものであり、本研究の特色である。

そこで、ネクロシス制御分子の同定を行うべく、CATI-1 をリードとし、ネクロシス誘導活性を保持させつつ、カテプシン阻害活性を除去することを目標に構造展開を行った。その結果、カテプシン阻害活性をほとんど示さずに強いネクロシス誘導活性を示す NecroTrigger-1 (NT-1; Fig.1C) およびその蛍光プローブ NT-2 (Fig.1D) の創製に成功した。

#### 【NecroTrigger・酸化ストレスによる細胞死シグナルの解析】

従来酸化ストレスの誘導に用いられてきた過酸化物は自身が活性酸素 (ROS) として振る舞うため、これらを用いた ROS シグナルの解析は困難な点が多いが、NecroTrigger 自身は酸化力を持たないため、生体内で二次的に発生する活性酸素に焦点を当てて解析することができる。この利点を活かし、酸化ストレス誘導性ネクロシスに関わる ROS シグナルを解析した。その結果、NecroTrigger や酸化ストレスはミトコンドリア電子伝達系 - complex III から superoxide anion の発生により細胞内の ROS の急激な上昇 (ROS のバースト)、膜過酸化反応を引き起こし、ネクロシスを誘導することを明らかにした (Fig.2)。

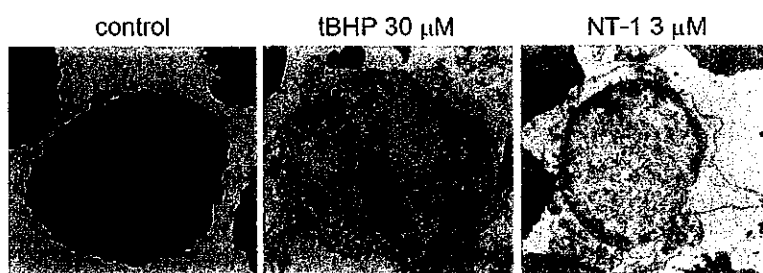


Fig.2 ネクロシス誘導時の電子顕微鏡写真 HL60 細胞

#### 【NecroTrigger 標的タンパク質の同定】

構造展開により得られた蛍光プローブ NT-2 を用いて、NecroTrigger の標的タンパク質の同定を試みた。NT-2 の細胞内局在の観測により NecroTrigger の標的タンパク質はミトコンドリアに局在することが示唆されたので、HL-60 細胞を NT-2 処理した後、ミトコンドリアを精製した。これを二次元電気泳動、質量分析法を用いたプロテオミクス手法に付すことにより、数種の NT-2 結合タンパク質を同定した。その中から、酸化ストレス誘導性のネクロシスに関与しているタンパク質を特定するために、IBHP 処理時での NT-2 によるラベル化実験を行ったところ、VDAC (Voltage-dependent Anion Channel) 1,2 において IBHP と NT-2 の競合効果が認められた。

そこで HEK293T 細胞中、VDAC1、VDAC2 それぞれのタンパク質に対して siRNA によるノックダウンを行った。その結果、VDAC1 ノックダウン時により高い効果で IBHP ならびに NT-1 による ROS シグナル誘導や細胞死誘導が抑制され、VDAC1 の酸化ストレス誘導性ネクロシスへの関与が示唆された。

VDAC1 はミトコンドリア外膜に局在する多機能性のチャンネル型タンパク質であり、生体内の様々なタンパク質と複合体を形成することが知られている。VDAC1 は複合体を形成するタンパク質の活性の調節や、複合体形成による VDAC1 自身の機能特性のチューニングによって生体内

で多機能性を発揮していると考えられる。VDAC1 のカスパーゼ活性の調節によるアポトーシスへの関与は知られていたが、カスパーゼ非依存的な細胞死やネクローシスへの関与は未だほとんど明らかとなっていない。そこで筆者は NecroTrigger の結合タンパク質として同定された VDAC1 が酸化ストレスの標的分子であり、そのセンサーとして働いているという仮説を立て、以降の解析を進めた。

**【NecroTrigger は VDAC1 のシステイン残基を分子修飾し、複合体形成を抑制する】**

VDAC1 による酸化ストレスのセンシング機構の解明を目指し、まず NecroTrigger の結合サイトの同定を試みた。NT-2 による VDAC1 のラベル化が、<sup>35</sup>S-Met やシステインのキャッピング剤である iodoacetamide で競合されることや、NT-1 処理により VDAC1 の変性時の分子内ジスルフィド形成反応が抑制されるという知見により、NecroTrigger は VDAC1 のシステイン残基を修飾していると推定した。そこで、VDAC1 タンパク質を精製 (VDAC1-His)、既知の手法でフォールディングさせ、これを用いて結合サイトの同定を試みた。VDAC1 はその配列中に二箇所のシステイン残基 (Cys 127, Cys 232) を含んでいる。VDAC1 の酵素消化断片での解析、ならびに、各システイン残基変異体の VDAC1-His を用いた実験の双方において、NecroTrigger は Cys 127 を分子修飾していることが示唆された。

次に、ラット肝臓由来のミトコンドリアを材料に、クロスリンカーを用いた実験系により、NecroTrigger が VDAC1 の複合体形成に与える影響を検討した。既存の報告では、アポトーシス刺激時においては VDAC1 複合体化の促進が観測されるとされているが、興味深いことに NT-1 によるネクローシス刺激においては逆に、複合体形成を抑制した。

**【総括・考察】**

筆者が独自に開発した新規細胞死誘導剤 NecroTrigger を用いた分子機構解明研究によって、以下の Fig.3 に示す酸化ストレス誘導性ネクローシスの分子機構が示唆、考察された。

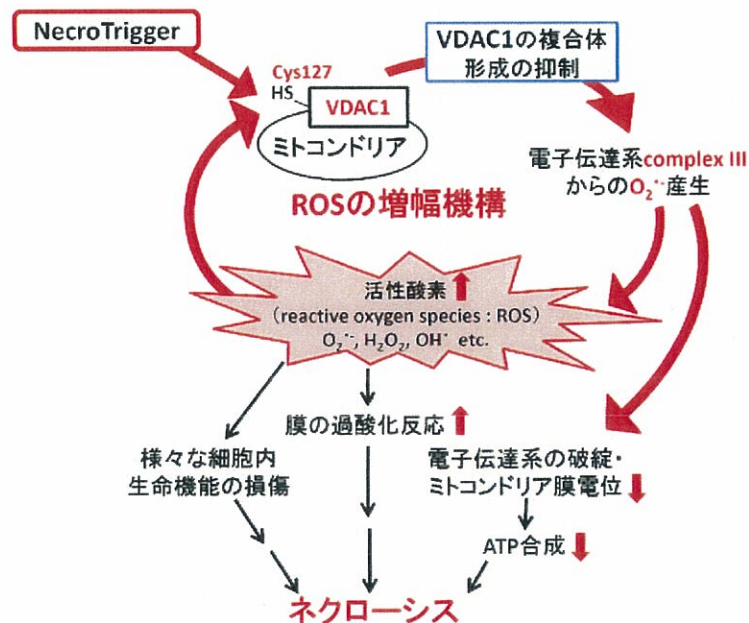


Fig.3 総括 NecroTrigger を用いた解析により見出したシグナル変化

- 酸化ストレスによりミトコンドリア外膜で VDAC1-Cys127 残基が酸化され、酸化ストレスが感知される。
- 活性酸素センシングに関わる VDAC1 の複合体が解離し、ミトコンドリア内膜 - 電子伝達系にシグナルが伝わり、complex III より ROS のバーストが起きる。
- それに伴い、電子伝達系の破綻によるミトコンドリア膜電位の低下により ATP が枯渇する。バーストした活性酸素は細胞内で膜の酸化反応などにより様々な生命機能を損傷しネクロシスに至る。

以上の研究成果によって、上記に示す酸化ストレス誘導性ネクロシスの分子機構の一端を提唱することができたと考えている。