

## 活性酸素による RB タンパクの酸化を介した細胞周期停止

寶迫睦美\*, 荻野哲也, 岡田 茂

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 病態探究医学

キーワード：細胞周期, RB タンパク, 活性酸素, モノクロラミン, 酸化ストレス

### はじめに

正常の体細胞の細胞周期は厳密に制御されており、多くの細胞は休止期にある。しかし、炎症や創傷治癒の際には、種々の細胞が分裂、増殖を開始し、組織修復に関わる。この反応は、サイトカインや増殖因子によって調節されている。一方、炎症の際には活性化好中球やマクロファージから活性酸素が産生され、これらの活性酸素は、細胞周期に影響を与え、炎症反応や組織修復を修飾する可能性が示唆されている。

私たちは、活性化好中球由来して生理的に産生されるオキシダントであるモノクロラミン ( $\text{NH}_2\text{Cl}$ ) が、T細胞性白血病細胞株 Jurkat 細胞に対して  $G_1$  arrest を誘起することを観察し、その細胞周期の機構解析を行っている。そこで、今回はこの  $\text{NH}_2\text{Cl}$  が血液のガンである白血病細胞にどのように影響を与えるのか、活性酸素が細胞周期に及ぼす影響について概説する。

### モノクロラミン ( $\text{NH}_2\text{Cl}$ ) とは

私たちは炎症の際に産生されるオキシダント、中でもクロラミンに注目して研究を続けている。クロラミ

ンの中でも細胞膜透過性のモノクロラミン ( $\text{NH}_2\text{Cl}$ ) は好中球由来のオキシダントで、サイトカインなどによる細胞接着分子やレセプターの発現、細胞周期、アポトーシスなどを修飾することができる。この研究に用いている  $\text{NH}_2\text{Cl}$  の作用機序については、当教室の荻野講師が意欲的に研究を続けてこられ、現在もその機能を研究中のオキシダントである<sup>1)</sup>。

ところでクロラミンというものにあまり耳慣れない方も多いと思われるが、これは好中球のスーパーオキシドに由来して生理的に産生されるオキシダントの一つである(図1)。スーパーオキシドは不均化反応によって過酸化水素を作り、これはミエロペルオキシダーゼによって次亜塩素酸へと代謝される。次亜塩素酸は周囲のアミノ化合物と反応し、クロラミンを形成する。

表1はクロラミンの性質をまとめたものであるが、クロラミンはオキシダントとして作用し、チオール基、チオエーテル基を好んで酸化し、細胞膜透過性のものが存在し、生体内で比較的高い濃度に産生されることが考えられる(活性化好中球は短時間で $100\mu\text{M}$ 程度のクロラミンを産生する)。また、DNA 修復の抑制、サイトカイン産生抑制、PKC 活性化抑制などの生物学的活性を持つことも認められており<sup>2-4)</sup>、近年では *H. pylori* 感染に伴うクロラミン産生と細胞障害が注目されている<sup>5)</sup>。従って、クロラミンは炎症の場で情報修飾分子と

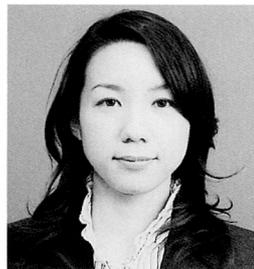
平成17年8月受理

\*〒700-8558 岡山市鹿田町2-5-1

電話：086-235-7147 FAX：086-235-7148

E-mail：hosako@md.okayama-u.ac.jp

### ◆プロフィール◆



#### 寶迫 睦美

平成16年3月岡山大学大学院医学研究科修了後、同年6月より岡山大学大学院医歯薬学総合研究科(現 医歯薬学総合研究科)病態探究医学教室の助手となり、現在に至る。今回の受賞論文は、博士課程在籍中の4年間に病態探究医学(旧第一病理)教室で行った研究成果をまとめたもので、博士号を取得した学位論文である。この研究内容で、2003年12月、International joint meeting on food factors and free radicals in health and diseasesにおいて、Poster Award (Young Investigator Award)を受賞し、2004年11月、日本白血病研究基金よりKYO特別研究賞を受賞した。この研究を行うにあたり、当教室の岡田茂名誉教授(今年の春に退官されました)には、何度も励ましていただきました。岡田先生の何事に対しても熱意をもって前向きな姿勢には心を打たれ感銘をうけました。また、荻野哲也講師に直接ご指導いただきましたおかげで今回の受賞論文をまとめることが出来ました。そして、病態探究医学教室の皆様にはお世話になりました。心よりお礼申し上げます。

して作用し、免疫反応、組織の修復、細胞増殖、発癌などに影響を与える可能性が示唆される。

今回は、細胞膜透過性であるアンモニアモノクロラミンのことをモノクロラミン (NH<sub>2</sub>Cl) とする。本研究では、この NH<sub>2</sub>Cl を用いて細胞周期に及ぼす影響、及びその機序について検討を行った。

## NH<sub>2</sub>Cl による細胞周期の制御

細胞周期は細胞増殖の制御におけるシグナル伝達の最終段階を担うもので、その異常は癌をはじめとした多くの疾患の発症に関わる。細胞が増殖している際には細胞周期も進行しているため、細胞周期の変化は正常の細胞回転のみならず、炎症の修復反応やある種の抗癌剤の効果にも影響を与える。従って、細胞周期の制御がどのようになっているか知ることは、その成因や治療法を考える上で重要である。

最近、私たちは炎症由来の活性酸素である NH<sub>2</sub>Cl が、Jurkat 細胞の細胞周期を G<sub>1</sub> 期で停止させることを見出した<sup>6)</sup>。さらに、この NH<sub>2</sub>Cl による細胞周期の停止が普遍的な現象であるのか検討を行った結果、T細胞性白血病細胞株 Jurkat T細胞、前骨髄球性白血病細胞株 HL-60細胞、肝癌細胞株 JHH5細胞のいずれも NH<sub>2</sub>Cl 投与 (70 μM, 10分) 24時間後には細胞周期に影響が見られたが、その効果は一様ではなく、Jurkat, HL-60細胞では G<sub>1</sub> arrest が主体と考えられたのに対し、JHH5細胞では、より高濃度の NH<sub>2</sub>Cl で G<sub>2</sub> arrest と思われる変化が見られた。このことから、NH<sub>2</sub>Cl による細胞周期の停止は普遍的な現象ではなく、細胞株によって感受性が異なっていることが示唆された。

表1 クロラミン (R-NHCl) の性質

1. Cl の酸化数が+1で、オキシダントとして作用する。
2. チオール基、チオエーテル基を酸化する。
3. 細胞膜透過性のクロラミンも存在する (NH<sub>2</sub>Cl など)。
4. 2-3 × 10<sup>6</sup> cells/mlの活性化好中球は短時間で100 μM 以上のクロラミンを産生する。
5. 生物学的活性を持つ。

DNA 修復を抑制する

マクロファージによるサイトカイン産生を抑制する

TNFα による接着分子の発現を抑制する

Fas 依存性のアポトーシスを促進する

プロテインキナーゼCの活性化を阻害する

*Helicobacter pylori* 感染の際に胃粘膜傷害を起こす

炎症の場で、情報伝達を修飾する分子として作用する可能性がある。

## NH<sub>2</sub>Cl による pRB のリン酸化の抑制

細胞周期を G<sub>1</sub> 期で抑制的に制御している有名な癌抑制遺伝子産物の一つである Retinoblastoma protein (pRB) は、細胞周期の G<sub>1</sub> 期から S 期への移行を抑制的に制御している<sup>7)</sup>。pRB の働きを簡単に説明すると、この蛋白はいろいろなリン酸化状態を取ることで機能を調節している。活性な pRB は転写因子 E2F を結合し、E2F によって転写が促進される S 期に必要な蛋白合成を抑制している (図 2)。Cyclin-dependent kinase (Cdk) によって pRB がリン酸化を受けると、pRB は E2F を遊離し、細胞は S 期へと進行する。つまり、リン酸化をあまり受けていない状態では転写因子 E2F と結合しこの機能を抑制するため、転写は起こらない。ところが pRB が強くリン酸化を受けると E2F を遊離して転写が開始、細胞は S 期へと進行する。このように、pRB は正常細胞において細胞周期の制御に不可欠な役割を果たしている。白血病の細胞株である Jurkat 細胞では、通常 pRB は強くリン酸化を受けており、そのため細胞はどんどん増殖している状態にある。

そこで、G<sub>1</sub> arrest が示唆された Jurkat 細胞を用いてさらに解析を行った。G<sub>1</sub> チェックポイントを制御している pRB の量とそのリン酸化状態を検討すると、NH<sub>2</sub>Cl を 70 μM 投与後 1.5 時間から 3 時間目で pRB は高リン酸化型が減少し、低リン酸化型が増加した。さらにそのリン酸化の状態を pRB のリン酸化抗体で検討すると、特に Ser780, Ser795 の部位の脱リン酸化が顕著に見られ、Ser807/811 の脱リン酸化は明らかでなかった。

また図 3 のように、このメカニズムに関与していると思われるサイクリン (Cyclin), Cdk タンパクの発現の有無を確認すると、細胞周期関連蛋白では、Cyclin A, B, D3, Cdk 1, 2, 6, 及び p27<sup>Kip1</sup> が検出されたが、発現レベルに著変は見られず、Cyclin D1, D2, 及び Cdk 4, p16<sup>INK4a</sup>, p21<sup>Cip1</sup> は検出されなかった。

特別なタンパク質へのリン酸基の付加や除去は、細胞に特定の状態変化を引き起こすシグナルに対応して起きることが多いため、pRB をリン酸化、脱リン酸化する酵素活性の変化についてさらに検討を行った。pRB にリン酸基を付加するリン酸化反応を触媒するのはタンパクキナーゼ (protein kinase) で、逆にリン酸基を取り除く脱リン酸化反応を触媒するのはタンパクホス

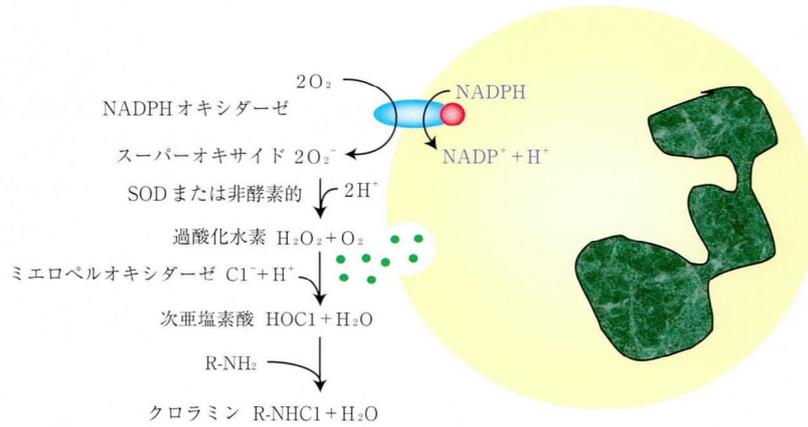


図1 活性化好中球によるオキシダントの産生

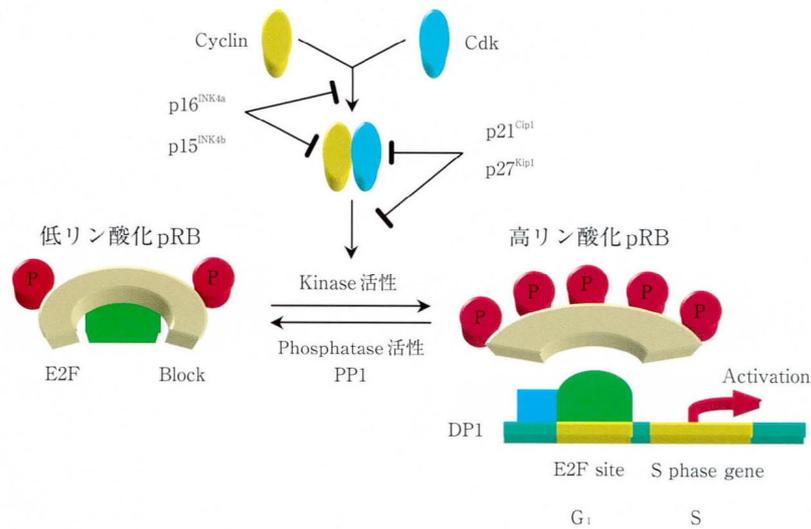


図2 Retinoblastoma protein (pRB) による細胞周期の調節

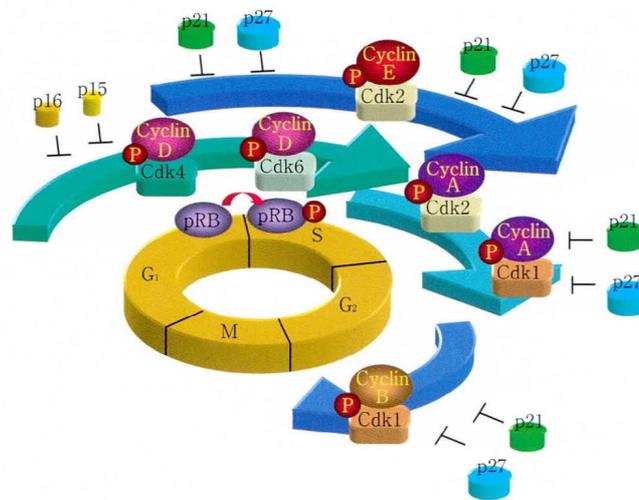


図3 細胞周期の調節機構

Modified from Robbins pathologic basis of disease (1999) W.B. Saunders

ファクターゼ (protein phosphatase) であるが (図2), 結果として, phosphatase 活性に軽度の上昇が見られるほかは有意な変化は認められなかった。

### NH<sub>2</sub>Cl による pRB の直接的な酸化

一方, Recombinant pRB を試験管内において NH<sub>2</sub>Cl で酸化した後, 細胞の溶解液でリン酸化させると, 酸化した pRB では特に Ser780と Ser795のリン酸化が起こりにくくなっていた (Ser807/811のリン酸化には著変はなかった)。この結果から, NH<sub>2</sub>Cl による pRB の直接的な酸化が pRB の脱リン酸化と細胞周期停止の主要な原因であることが示唆され, さらに酸化した pRB のアミノ酸分析を行うと, メチオニンがメチオニンスルホキシドへ酸化されていた。NH<sub>2</sub>Cl 処理した Jurkat 細胞の蛋白でもメチオニンの減少が見られ, 一方 SH 基にも有意な変化が見られず, メチオニンの酸化が pRB の機能修飾に重要と考えられた。

メチオニンの酸化は加齢や炎症性疾患などで報告されているので<sup>8)</sup>, pRB の酸化的修飾に伴う細胞周期の変化がこれらの病態で生じている可能性がある。

### 活性化好中球が細胞周期に与える影響

NH<sub>2</sub>Cl は, 過酸化水素-MPO-ハライド系で産生される次亜塩素酸 (HOCl) とアンモニウムイオン (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) が反応して生成されるオキシダントである。しかし, HOCl はアミノ化合物のみならず, 核酸や脂質を含む種々の物質と反応する。生体内では NH<sub>4</sub><sup>+</sup> の他に HOCl と反応する分子が多数存在するため, 正常血清レベルの NH<sub>4</sub><sup>+</sup> では NH<sub>2</sub>Cl の産生量は必ずしも多くないと考える。表2は, NH<sub>2</sub>Cl と HOCl の反応性の違いを

表2 モノクロラミン (NH<sub>2</sub>Cl) と次亜塩素酸 (HOCl) の反応性

Target	HOCl	NH <sub>2</sub> Cl
DNA, RNA	5-chlorouracil Semistable chloramines Nitrogen-centered radicals	
Lipids	$\alpha$ , $\beta$ -chlorohydrin isomers chloramines	
Amino acids	Met, Cys Cystine, His, $\alpha$ -NH <sub>2</sub> Trp, Lys Tyr	Met, Cys   Tyr
Others	NADH, NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	NADH
Commercial use	breach	Water disinfectant

示したものであるが, このように, NH<sub>2</sub>Cl は HOCl に比べて反応する分子に選択性があることが伺える。

そこで, HOCl 及び活性化好中球に由来する活性酸素が, Jurkat 細胞の細胞周期に与える影響と, これに対する NH<sub>4</sub><sup>+</sup> の効果を検討した。すると, HOCl (200  $\mu$ M, 10分) では細胞周期に影響を与えなかったが, ここに 1~2 mM の NH<sub>4</sub><sup>+</sup> を共存しておくと, NH<sub>2</sub>Cl で見られた G<sub>1</sub> 期での細胞周期停止が実際に観察された。

生体内では唾液<sup>9)</sup>, *Helicobacter pylori* 感染のある胃液<sup>10)</sup>, 大腸内容<sup>11)</sup>などに数~数十 mM レベルの NH<sub>4</sub><sup>+</sup> が存在している。特に *H. pylori* 胃炎や炎症性腸疾患では好中球浸潤が目立つので, これらの疾患の際には NH<sub>2</sub>Cl が局所で産生されていると考えられる。

### まとめ

活性化好中球が産生する生理的オキシダントである NH<sub>2</sub>Cl が細胞周期に与える影響及び G<sub>1</sub> 期での細胞周期停止の機構について検討した結果, NH<sub>2</sub>Cl は Jurkat 細胞で G<sub>1</sub> 期での細胞周期停止をもたらす, これは pRB の脱リン酸化によるものと考えられた。さらに, NH<sub>2</sub>Cl で酸化した Recombinant pRB はリン酸化を受けにくくなっており, アミノ酸分析の結果, メチオニンの酸化が確認された。以上のことより, pRB の直接的な酸化が NH<sub>2</sub>Cl による pRB の脱リン酸化と細胞周期停止の主要な原因であることが示唆される。今後は活性酸素によって酸化修飾された pRB の生理機能・機能変化についてさらに解析を行い, その作用機序の解明に努めたい。

### 今後の展望

pRB および複合体のリン酸化修飾を介した細胞周期の制御については数多く報告されているが<sup>12)</sup>, この pRB の酸化機構については私たちの報告 (Hosako et al, FRBM, 2004) 以外に報告はなく, 独創性に富んでいる。今後さらに pRB の酸化修飾機構を解析していき, 新しい創薬のターゲットの発見および疾患発症の病態機構の解明へとつなげたい。

私は大学院をまだ卒業したばかりで, 研究者としてはまだスタートラインに立っている状態だが, これまでに大学院で得た知見及び取得した技術をもって, 頑張っていきたい。研究は実際に実験を行っている現場にこそ, 新たな発見がある。長時間にわたる実験, 試

行錯誤など、研究には忍耐力が必要とされるが、一つでも多くの新しい発見が出来るように、また一つでも多くの病気の原因を解明することが出来るように、基礎医学的な研究の観点から貢献していきたい。

## 謝 辞

この研究を行うにあたり、病態探究医学教室のスタッフの皆様、岡山大学医学部共同実験室の皆様には大変お世話になりました。御礼申し上げます。

またこの研究内容は、平成16年度公益信託日本白血病研究基金より研究助成を受けた。本年度は、現在までに(勸岡山医学振興会、(勸川崎医学・医療福祉学振興会より、平成17年度研究助成を受けている。

## 文 献

- 1) Ogino T, Packer L and Maguire JJ : Neutrophil antioxidant capacity during the respiratory burst : loss of glutathione induced by chloramines. *Free Radic Biol Med* (1997) **23**, 445-452.
- 2) Ogino T, Kobuchi H, Sen CK, Roy S, Packer L and Maguire JJ : Monochloramine inhibits phorbol ester-inducible neutrophil respiratory burst activation and T cell interleukin-2 receptor expression by inhibiting inducible protein kinase C activity. *J Biol Chem* (1997) **272**, 26247-26252.
- 3) Than TA, Ogino T, Omori M and Okada S : Monochloramine inhibits etoposide-induced apoptosis with an increase in DNA aberration. *Free Radic Biol Med* (2001) **30**, 932-994.
- 4) Than TA, Ogino T, Hosako M, Omori M, Tsuchiyama J and Okada S : Physiological oxidants induce apoptosis and cell cycle arrest in a multidrug-resistant natural killer cell Line, NK-YS. *Leukemia & Lymphoma* (2003) **44**(12), 2109-2116.
- 5) Iishi H, Tatsuta M, Baba M, Mikuni T, Yamamoto R, Iseki K, Yano H, Uehara H and Nakaizumi A : Enhancement by monochloramine of the development of gastric cancer in rats : a possible mechanism of *Helicobacter pylori*-associated gastric carcinogenesis. *J Gastroenterol* (1997) **32**, 435-441.
- 6) Hosako M, Ogino T, Omori M and Okada S : Cell cycle arrest by monochloramine through the oxidation of retinoblastoma protein. *Free Radic Biol Med* (2004) **36**, 112-122.
- 7) 北川雅敏, 中道郁夫 : Rb 経路からみた細胞周期の制御. *病理と臨床* (1999) **17**, 795-800.
- 8) Wells-Knecht MC, Lyons TJ, McCance DR, Thorpe SR and Baynes JW : Age-dependent increase in ortho-tyrosine and methionine sulfoxide in human skin collagen is not accelerated in diabetes. Evidence against a generalized increase in oxidative stress in diabetes. *J Clin Invest* (1997) **100**, 839-846.
- 9) Huizenga JR, Vissink A, Kuipers EJ and Gips CH : *Helicobacter pylori* and ammonia concentrations of whole, parotid and submandibular/sublingual saliva. *Clin Oral Investig* (1999) **3**, 84-87.
- 10) Kearney DJ, Ritchie K and Peacock JS : Gastric-juice ammonia assay for diagnosis of *Helicobacter pylori* infection and the relationship of ammonia concentration to gastritis severity. *Am J Gastroenterol* (2000) **95**, 3399-3403.
- 11) Grasten SM, Juntunen KS, Poutanen KS, Gylling HK, Miettinen TA and Mykkanen HM : Rye bread improves bowel function and decreases the concentrations of some compounds that are putative colon cancer risk markers in middle-aged women and men. *J Nutr* (2000) **130**, 2215-2221.
- 12) Tamrakar S, Rubin E and Ludlow JW : Role of pRB dephosphorylation in cell cycle regulation. *Front Biosci* (2000) **5**, D121-137.