

## キノホルムによる銅・亜鉛関連蛋白の発現変化

勝山 真人 (京都府立医科大学大学院医学研究科中央研究室 RI 部門)

矢部 千尋 (京都府立医科大学大学院医学研究科病態分子薬理学)

### 研究要旨

#### 「目的」

キノホルムによるスモン発症のメカニズムは未だ不明である。キノホルムは銅・亜鉛イオンのキレート剤でありイオノフォアでもあることから、両金属イオンの恒常性の破綻がその毒性の一因となっている可能性が考えられる。そこでキノホルムが銅・亜鉛イオンの恒常性維持に関わる蛋白の発現に与える影響を解析した。

#### 「方法」

ヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞を定法により培養した。RNA を単離して逆転写を行い、定量 PCR によりキノホルムによる標的 mRNA 量の変化を測定した。細胞抽出液を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離し、ウエスタンブロット法により標的蛋白の発現を検出した。蛋白のシステイン酸化は、細胞抽出液を DNA マレイミドで標識した後、電気泳動・ウエスタンブロットを行うことにより検出した。

#### 「結果」

DNA チップを用いた網羅的解析の結果、キノホルムは金属結合蛋白であるメタロチオネインの4つのアイソフォームのうち、MT-1の7つのサブクラスとMT-2Aの発現を顕著に増加させることがわかった。またキノホルムはSLC30A1 (亜鉛排出トランスポーター ZnT1) の発現も誘導し、定量 PCR によってもその誘導が確認できたことから、キノホルムが重金属依存性転写因子 MTF1 に依存した転写を引き起こすことが示唆された。さらにキノホルムは銅シャペロンのひとつである ATOX1 のチオール基の酸化を引き起こしたことから、細胞内銅輸送に関わる ATOX1 の不活化をもたらすことが示唆された。

#### 「結論」

キノホルムが銅・亜鉛イオンの恒常性維持に関わる蛋白の発現とレドックス状態を変化させることが明らかとなった。両金属イオンの恒常性の破綻がキノホルムの神経毒性の一因である可能性が示唆された。

### A. 研究目的

我が国で亜急性脊髄視神経ニューロパチー (スモン) という重篤な薬害をもたらしたキノホルム (一般名: クリオキノール) は、metal protein attenuating compounds (MPACs) の一種である。その腸内殺菌作用は菌体内の金属酵素の金属をキレートすることにより発揮されると考えられていた。一方キノホルムによる

スモンの発症機構については分子レベルでの解明がなされないまま今日に至っている。

スモン患者に見られた緑色舌苔・緑尿・緑便の成分がキノホルムの鉄イオンキレート化合物だったことから、スモン発症の原因に関しても、キノホルムが高い親和性を示す銅・亜鉛・鉄イオンに対するキレート作用を介する可能性もある。しかし一方、キノホルムの

細胞毒性がこれらの金属イオンの添加で増強されることから、キノホルムは細胞内にイオンを導入するイオノフォアであるとの考え方も存在する<sup>1)</sup>。

MPACsであるキノホルムは金属イオンを介する蛋白の凝集を抑制することから、近年海外において神経変性疾患に対する改善効果や制がん作用が注目され、医薬品としての価値が見直されている。オーストラリアの製薬企業がキノホルムを基に開発したPBT2はアルツハイマー病とハンチントン病に対して第2相試験が行われるまでに至ったが、一定の症状改善効果が認められたとする同社の報告に対して、結果の解釈に懐疑的な意見も存在する。一方同社は別のキノホルム類縁化合物・PBT434について、パーキンソン病・運動障害に対する第1相試験を完了し、多系統萎縮症に対する希少疾病用医薬品（オーファンドラッグ）としての承認をアメリカ食品医薬品局（FDA）から既に取得している。

このようにキノホルム類縁化合物の医薬品としての価値が見直されている昨今、キノホルムの神経毒性の分子基盤の解明は、これらの化合物の臨床への再応用に警鐘を鳴らし新たな薬害を阻止するためにも必須である。

我々はDNAチップを用いて培養神経系細胞株においてキノホルムにより発現が変動する遺伝子を網羅的に解析し、キノホルムの細胞毒性には、DNA二本鎖切断によるATMの活性化と、それに伴う癌抑制性転写因子p53の活性化が関与することを明らかにした<sup>2)</sup>。またキノホルムが転写因子c-Fosの発現誘導を介して、痛み反応に関与する神経ペプチド前駆体VGFの発現を誘導することを見出した<sup>3)</sup>。さらにキノホルムが転写因子GATA-2およびGATA-3の発現抑制を介して、腸炎、視神経炎、神経因性疼痛への関与が報告されているインターロイキン-8（IL-8）の発現誘導を引き起こすことを見出した<sup>4)</sup>。VGF由来神経ペプチドやIL-8が腹痛等のスモンの初期症状のみならず、引き続いて起こる感覚異常や視神経炎にも関与する可能性が考えられる。

キノホルムは銅・亜鉛イオンのキレート剤でありイオノフォアでもあることから、両金属イオンの恒常性の破綻がその毒性の一因となっている可能性が考えら

れる。そこでキノホルムが銅・亜鉛イオンの恒常性維持に関わる蛋白の発現に与える影響を解析した。

## B. 研究方法

### 【細胞培養】

ヒト神経芽細胞腫SH-SY5Y細胞はハムF12：EMEM（アール塩含有）（1：1）（1%非必須アミノ酸と15%ウシ胎仔血清を添加）で培養した。ヒト神経芽細胞腫IMR-32細胞は、EMEM（アール塩含有）（1%非必須アミノ酸と10%ウシ胎仔血清を添加）で培養した。キノホルムはジメチルスルホキシド（DMSO）に溶解し、培地中に1000倍希釈となるよう添加し、刺激24時間における濃度依存性と、50 $\mu$ Mにおける時間経過を測定した。対照のサンプルにはDMSOを添加した。

### 【定量PCR】

キノホルム存在下で培養した細胞とコントロールの細胞から、QIAGEN社のRNeasy Plus Mini Kitを用いてtotal RNAを抽出した。TOYOBO社のReverTra Ace qPCR RT Master MixとKOD SYBR qPCR Mixを用いて逆転写とPCR反応を行った。反応と解析はサーモサイエンティフィック社のStepOnePlusを用いて行った。段階希釈したプラスミドを対照に絶対定量を行い、ヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ（HPRT）の発現量を指標に補正を行った。

### 【蛋白のS-マレイミド化とウエスタンブロット】

細胞から総蛋白を抽出し、2 $\mu$ gの蛋白のシステイン残基を-SulfoBiotics-Protein Redox State Monitoring Kit Plus（同仁化学）を用いてマレイミド化した。SDSポリアクリルアミド電気泳動後、紫外線照射によりマレイミドに結合するDNAを切断した。ウエスタンブロットは定法により行った。検出後stripを行い、 $\beta$ -actinの検出を行った。

## C. 研究結果

### 【亜鉛の恒常性維持に関わる蛋白の発現変化】

以前報告したように、我々はSH-SY5Y細胞を50 $\mu$ Mのキノホルムで24時間刺激した際の遺伝子発現

表1 キノホルムによるメタロチオネインの発現変化

metallothionein (MT)	induction rate
1B	61.5***
1E	247.3***
1F	14.5***
1G	101.6***
1H	73.5***
1M	71.5 or 59.8***
1X	150.8***
2A	252.4***
3	2.8*
4	low expression

表2 キノホルムによる亜鉛輸送体の発現変化

SLC30A (ZnT) exporter	induction rate	SLC39A (ZIP) importer	induction rate
1	39.5***	1	0.8
2	not detected	2	not detected
3	1.6	3	0.4*
4	0.8	4	0.9
5	2.0 or 2.1*	5	2
6	not detected	6	1.5
7	1.5	7	2.3*
8	0.7	8	1
10	not detected	9	1.3
		10	disappeared***
		11	0.9
		12	not detected
		13	1.3
		14	low expression

の変化を、DNAチップを用いて網羅的に解析した (GEO database accession code : GSE32173)<sup>2)</sup>。今回、銅・亜鉛イオンの恒常性維持に関わる蛋白の遺伝子発現変化に着目した。

キノホルムは、金属結合蛋白であり重金属から生体を防御する役割を持つメタロチオネインの4つのアイソフォームのうち、MT-1の7つのサブクラスとMT-2Aの発現を顕著に増加させた (表1)。

次に亜鉛トランスポーターに着目したところ、亜鉛排出輸送体 ZnT ファミリーのうち、細胞膜上に局在して細胞外に亜鉛を排出する SLC30A1 (ZnT1) の発現がキノホルムにより顕著に増加した。一方亜鉛取り込み輸送体 ZIP ファミリーのうち、細胞膜上に局在して細胞内に亜鉛を取り込む SLC39A10 (ZIP10) の発現がキノホルムにより顕著に抑制された (表2)。定量PCRにより確認したところ、SH-SY5Y細胞、IMR-32細胞のどちらにおいても、キノホルム刺激3時間で既に SLC30A1 (ZnT1) mRNA の発現が顕著に誘導されていた (図1)。

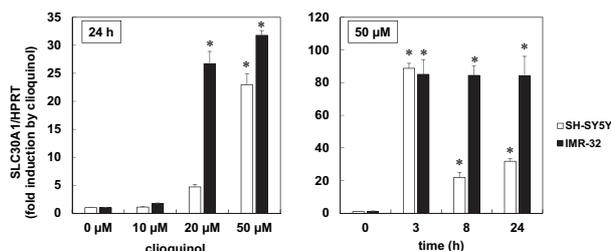


図1 キノホルムによる ZnT1 mRNA の発現誘導

表3 キノホルムによる銅関連蛋白の発現変化

Cu-related genes	induction rate
Ctr1 (SLC31A1)	1.8
Ctr2 (SLC31A2)	0.7
ATP7A	1.6
ATP7B	1
ATOX1	0.5*
SOD1 (Cu,Zn-SOD)	0.7
Cu chaperone for SOD (CCS)	0.6
MT-Cox1	1
Cox11	0.6
Cox17	0.6
SCO1	0.4*
SCO2	disappeared***

【銅の恒常性維持に関わる蛋白の発現変化】

次に銅の恒常性維持に関わる次の蛋白群の発現変化に着目した。

1. 細胞内に銅を取り込む輸送体である CTR1 と低親和性の CTR2
2. トランスゴルジネットワーク (TGN) に銅を取り込む輸送体である ATP7A と ATP7B、および両者に銅を運搬する銅シャペロンである Antioxidant-1 (ATOX1)
3. スーパーオキシドジスムターゼ 1 (SOD1、Cu, Zn-SOD) およびその銅シャペロンである CCS
4. ミトコンドリアのチトクローム c オキシダーゼ (CCO) の構成成分である MT-Cox1 とその銅シャペロンである Cox17、およびその間の銅運搬に関わる Cox11、SCO1、SCO2

上記の蛋白群のうち、DNAチップを用いた網羅的解析において認められた顕著な発現変動は、SCO2の発現低下のみであった (表3)。

【銅シャペロン ATOX1 のレドックス状態の変化】

キノホルムにより酸化ストレスは亢進する<sup>5)</sup>。銅シャ

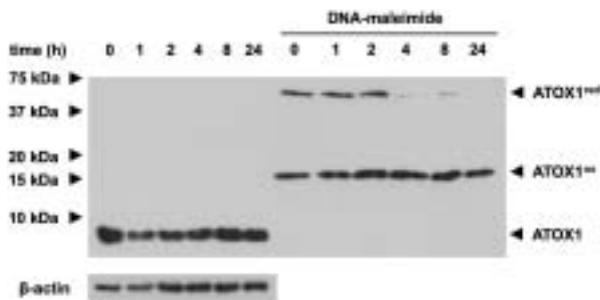


図2 キノホルムによる ATOX1 の酸化還元状態の変化

ペロン ATOX1 はその名の通り抗酸化蛋白でもある。分子内に 3 つのシステイン残基を持ち、そのうちの 2 つは銅イオンを配位する活性中心 metal binding domain を形成している<sup>6)</sup>。そこでキノホルム刺激により ATOX1 の活性中心のシステインが酸化されるのではないかと考え、DNA マレイミド試薬を用いてシステイン残基のレドックス状態のモニタリングを行った。

DNA マレイミド処理を行わない場合、ATOX1 は約 7kDa のバンドとして検出され、キノホルムによる蛋白量の変動は認められなかった。DNA マレイミドで処理したサンプルでは、DNA マレイミドが 1 つ結合した「酸化型」と考えられる 20kDa 弱のバンドと、DNA マレイミドが 3 つ結合した「還元型」と考えられる約 40kDa のバンドが検出された。50 μM のキノホルム刺激により約 40kDa のバンドは消失した。また経時変化を確認したところ、キノホルム刺激 4 時間で約 40kDa のバンドは消失した (図 2)。

#### D. 考察

キノホルムはメタロチオネインの 4 つのアイソフォームのうち、MT-1 の 7 つのサブクラスと MT-2A の発現を顕著に増加させた。またキノホルムは亜鉛排出輸送体 SLC30A1 (ZnT1) の発現を顕著に誘導する一方、亜鉛取り込み輸送体 SLC39A10 (ZIP10) の発現を顕著に抑制した。これらの遺伝子発現の変化は、過剰な亜鉛により活性化される重金属依存性転写因子 MTF1 に依存するものと考えられる<sup>7-9)</sup>。重金属から生体を防御する役割を持つメタロチオネインの発現誘導は、キノホルムの亜鉛イオンフォア作用により細胞内に流入した過剰な亜鉛に対する防御機構と考えられる。また細胞膜上に局在して細胞外に亜鉛を排出する ZnT1 の

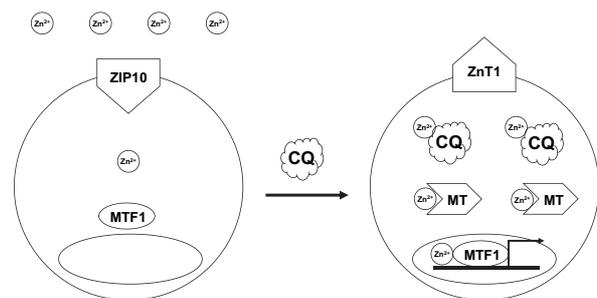


図3 キノホルムの亜鉛毒性 (想定図)

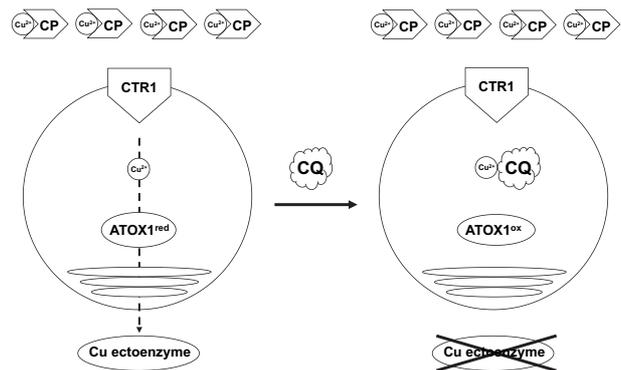


図4 キノホルムによる ATOX1 の酸化 (想定図)

発現誘導と、細胞外から亜鉛を取り込む ZIP10 の発現抑制についても、キノホルムにより過剰に流入した亜鉛の濃度を低下させようとする生体防御機構と考えられる (図 3)。

一方キノホルムは銅シャペロンのひとつである ATOX1 のチオール基の酸化を引き起こした。ATOX1 の活性中心である metal binding domain のシステインが酸化されると銅イオンを配位できなくなる。ATOX1 の機能不全により、TGN の銅輸送体である ATP7A と ATP7B への銅イオンの運搬が阻害される。TGN を介する銅輸送は、細胞外で機能する銅要求性のエクト型酵素の成熟・分泌阻害につながると考えられる (図 4)<sup>10-12)</sup>。キノホルムが実際にこのような銅輸送阻害を引き起こすのか、今後検討していく予定である。

#### E. 結論

キノホルムが銅・亜鉛イオンの恒常性維持に関わる蛋白の発現とレドックス状態を変化させることが明らかとなった。両金属イオンの恒常性の破綻がキノホルムの神経毒性の一因である可能性が示唆された。

## G. 研究発表

### 2. 学会発表

勝山真人, 矢部千尋. クリオキノールによる銅・亜鉛関連蛋白の発現とレドックス状態の変化. 第93回日本薬理学会年会. 2020年3月18日. 横浜.

## H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

## I. 文献

- 1) Ding WQ, Liu B, Vaught JL, Yamauchi H, Lind SE. Anticancer activity of the antibiotic clioquinol. *Cancer Res.* 2005; 65: 3389-3395.
- 2) Katsuyama M, Iwata K, Ibi M, Matsuno K, Matsumoto M, Yabe-Nishimura C. Clioquinol induces DNA double-strand breaks, activation of ATM, and subsequent activation of p53 signaling. *Toxicology.* 2012; 299: 55-59.
- 3) Katsuyama M, Ibi M, Matsumoto M, Iwata K, Ohshima Y, Yabe-Nishimura C. Clioquinol increases the expression of VGF, a neuropeptide precursor, through induction of c-Fos expression. *J Pharmacol Sci.* 2014; 124: 427-432.
- 4) Katsuyama M, Ibi M, Iwata K, Matsumoto M, Yabe-Nishimura C. Clioquinol increases the expression of interleukin-8 by down-regulating GATA-2 and GATA-3. *Neurotoxicology.* 2018; 67: 296-304.
- 5) Kawamura K, Kuroda Y, Sogo M, Fujimoto M, Inui T, Mitsui T. Superoxide dismutase as a target of clioquinol-induced neurotoxicity. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014; 452: 181-185.
- 6) Hatori Y, Lutsenko S. The Role of Copper Chaperone Atox1 in Coupling Redox Homeostasis to Intracellular Copper Distribution. *Antioxidants (Basel).* 2016; 5.
- 7) Grzywacz A, Gdula-Argasinska J, Muszynska B, Tyszka-Czochara M, Librowski T, Opoka W. Metal responsive transcription factor 1 (MTF-1) regulates zinc dependent cellular processes at the molecular level. *Acta Biochim Pol.* 2015; 62: 491-498.
- 8) Langmade SJ, Ravindra R, Daniels PJ, Andrews GK. The transcription factor MTF-1 mediates metal regulation of the mouse ZnT1 gene. *J Biol Chem.* 2000; 275: 34803-34809.
- 9) Lichten LA, Ryu MS, Guo L, Embury J, Cousins RJ. MTF-1-mediated repression of the zinc transporter Zip10 is alleviated by zinc restriction. *PLoS One.* 2011; 6: e21526.
- 10) Hamza I, Faisst A, Prohaska J, Chen J, Gruss P, Gitlin JD. The metallochaperone Atox1 plays a critical role in perinatal copper homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001; 98: 6848-6852.
- 11) Hatori Y, Yan Y, Schmidt K, Furukawa E, Hasan NM, Yang N, et al. Neuronal differentiation is associated with a redox-regulated increase of copper flow to the secretory pathway. *Nat Commun.* 2016; 7: 10640.
- 12) Schmidt K, Ralle M, Schaffer T, Jayakanthan S, Bari B, Muchenditsi A, et al. ATP7A and ATP7B copper transporters have distinct functions in the regulation of neuronal dopamine-beta-hydroxylase. *J Biol Chem.* 2018; 293: 20085-20098.