

氏名（本籍）	内田 篤 宏 (岐 阜 県)
学位の種類	博士（工学）
学位授与番号	甲第 17 号
学位授与日付	平成 25 年 3 月 25 日
専攻	創薬科学専攻
学位論文題目	PC12 細胞におけるマンガンの caspase-3 遺伝子活性化機構に関する研究 (Up-regulation of caspase-3 gene expression by manganese in PC12 cells)
学位論文審査委員	(主査) 教授 木内 一 壽 (副査) 教授 丹羽 雅 之 (副査) 教授 吉田 敏 (副査) 准教授 森田 洋子

論文内容の要旨

マンガンはsuperoxide dismutaseをはじめとする様々な酵素に含まれており、細胞機能に不可欠な必須微量元素である。一方、マンガンは高濃度では毒性を示し、無機マンガン、あるいは有機マンガン化合物への暴露による健康リスクはどちらもよく知られている。マンガンの脳への蓄積はパーキンソン病とよく似た精神的及び運動障害を伴う神経症、すなわちマンガニズムを引き起こす。パーキンソン病はアルツハイマー病に次いで多く見られる神経変性疾患であり、黒質におけるドーパミン作動性ニューロンの選択的脱落により錐体外路症状を呈する。マンガンはドーパミンニューロンに選択毒性を示し、マンガン暴露を受けた大脳基底核の線条体においてドーパミンレベルの減少が見られること、また病理学的所見としてマンガン脳症の患者では淡蒼球が損傷を受けることなどが報告されている。これらの知見はマンガニズムとパーキンソン病の間に関連性があることを示唆している。しかし、マンガンの神経毒性のメカニズムは未だ解明されていない。

マンガンはPC12細胞を含む様々な細胞株でアポトーシスを誘導し、c-Jun N-terminal kinase、p38 mitogen-activated protein kinase、extracellular signal-regulated kinaseおよびp70S6 kinaseを含む様々な細胞内シグナリング経路およびカスパーゼ経路を活性化する。Caspase-3はカスパーゼ経路の下流に位置し、通常はpro-caspase-3として存在しているが、アポトーシス刺激により限定分解されて活性化型となる。そのため、caspase-3の活性化に伴いpro-caspase-3の量は減少する。しかし、*in vivo*において神経のアポトーシスに伴い、caspase-3のmRNAおよびタンパクレベルが上昇することが報告されている。また、我々は以前、マンガン処理されたPC12細胞においてcaspase-3が限定分解により活性化されるだけでなく、mRNAおよびタンパクの発現が増加することを報告した。しかし、マンガンがcaspase-3発現を誘導する機構については未だ不明である。本研究では、caspase-3遺伝子プロモーターのマンガンによる活性化機構および転写因子Sp1の関与について解析した。

ラットcaspase-3プロモーターの転写開始点を基準とした前後-1815/+45の領域を全長として、-33までの5' フランキング領域を順次欠失させたレポータープラスミドを作製し、ドーパミン細胞モデルとして用いられるPC12細胞に遺伝子導入した後、ルシフェラーゼ活性を測定することによってレポーター活性を評価した。その結果、-100までの欠失は基礎転写活性やマンガン応答性に有意な影響を及ぼさなかった。一方-33までの欠失により基礎転写活性、マンガン応答性はどちらも顕著に低下し、-100~-33の間に基礎転写活性、マンガン応答性に関与する配列が含まれることが示唆された。次に、-67~-36に

位置する3つのタンデム型Sp1結合サイトに変異を導入したところ、基礎転写活性は半減し、マンガン応答性は消失した。従ってこのSp1結合サイトが基礎転写活性およびマンガン応答性に重要な役割を果たしていることが示された。

また、転写開始点以降の5' UTR領域の転写因子結合サイト群を3つにわけ、3'側から順次欠失させていった所、+19~+45の欠失により基礎転写活性が大きく低下したが、マンガン応答性は失われなかった。また、各欠失コンストラクトのSp1結合サイトに変異を導入したところマンガン応答性が低下したが、基礎転写活性はSp1変異のみを導入した場合と変わらなかった。このことから、5' UTRの転写因子結合サイト群は基礎転写活性に一部寄与しているが、マンガン応答性には関与せず、Sp1結合サイト群はどちらにも重要であることが示された。

Sp1がcaspase-3遺伝子プロモーターの活性化に関与することが示唆されたので、マンガン処理後のPC12細胞におけるSp1リン酸化とcaspase-3 mRNAの変化を検討した。その結果、マンガンは濃度依存的にSp1をリン酸化した。リン酸化されたSp1がタンデム型SP1結合配列に結合することを確認するため、3つのSp1結合部位を含むcaspase-3プロモーター-70/-32に一致するオリゴヌクレオチドを用いてゲルシフトアッセイを行った。その結果、Sp1結合配列に特異的なタンパクの結合がマンガン濃度依存的に増加することが示された。

Sp1のリン酸化がcaspase-3 mRNAレベルの増加に関与していることを確かめるため、Sp1の2箇所のリン酸化部位のスレオニン残基をアラニンに置換した変異型Sp1 (T453A、T739AおよびT453A/T739A)の導入実験を行った。その結果、T453AおよびT453A/T739Aの過剰発現によりマンガン誘導性のcaspase-3 mRNA発現は有意に低下した。これはSp1のスレオニン453のリン酸化がマンガン誘導性caspase-3転写活性化に関与していることを示している。

以上の結果より、マンガンはSp1のリン酸化によりSp1を介してcaspase-3プロモーターを活性化し、caspase-3のmRNAおよびタンパクレベルを増加させることが示された。Sp1のリン酸化は、パーキンソン病とよく似た神経症マンガニズムにおいて、アポトーシスを誘導する重要な生化学メディエーターであると考えられる。これらの知見はマンガンによる神経毒性のメカニズムの解明に寄与するものである。

論文審査結果の要旨

マンガンは細胞機能に不可欠な必須微量金属であるが、脳に蓄積するとパーキンソン病に似た神経傷害を引き起こすことが知られている。申請者はマンガンの神経毒性作用を解明することを目的として、アポトーシスによる細胞死に不可欠なカスパーゼ-3のマンガンによる転写活性化機構を解析した。通常、カスパーゼ-3はアポトーシスが誘導されると限定分解を伴う活性化を受けるため細胞内のタンパク量は減少するが、マンガンによるアポトーシスではカスパーゼ-3は活性化されるにもかかわらず細胞内mRNA量およびタンパク質量が増加する。このことは、カスパーゼ-3の転写がマンガンにより調節されることを示唆している。本研究では、パーキンソン病およびマンガン脳症で細胞死が認められるドーパミン神経のモデル細胞としてPC12細胞を用い、プロモーター解析を行なった結果、カスパーゼ-3プロモーターのマンガン応答領域にはSp1応答配列が含まれており、Sp1応答配列に変異を導入することによりマンガン応答性が消失することを示した。また、マンガンはSp1のリン酸化を亢進させ、リン酸化部位のスレオニンをアラニンに置換した変異体を過剰発現させることにより、マンガンによるカスパーゼ-3の転写活性化が阻害されることを示した。以上の結果から、マンガンがSp1のリン酸化を介してカスパーゼ-3の転写を活性化することを初めて明らかにしている。

申請者は、パーキンソン病等アポトーシスが関与すると考えられる細胞死を伴う神経変性疾患においてSp1のリン酸化によるカスパーゼ-3の発現誘導が重要な役割を果たすと述べている。

最終試験結果の要旨

公聴会では、学位申請に係わる論文の発表は分かり易く丁寧なものであった。また、申請者は主査、副査及び公聴会出席者の質疑に対し、的確な応答を行った。

主査及び副査による質問は下記の通りである。

1. マンガンがAktのリン酸化を誘導する機構について。
2. カスパーゼ-3の発現が誘導されるとアポトーシスを起こし易くなるのか。
3. Sp1は脳に特に多く発現しているのか。
4. マンガンのカスパーゼ-3の転写誘導はPC12以外の細胞でも起こるのか。

以上の質問に対する各々の解答は、博士後期課程を修了するに相応しい一定レベル以上のものであった。申請者は本研究に対して深い洞察力を有しており、学位授与に値する能力を有していると判断した。

公聴会終了後、学位審査委員会の委員全員により、内田篤宏君は最終試験に「合格」と判定した。

公表論文

Uchida A, Oh-hashii K, Kiuchi K and Hirata Y (2012) Manganese regulates caspase-3 gene promoter activity by inducing Sp1 phosphorylation in PC12 cells, *Toxicology*, 302, 292-298 (インパクトファクター: 3.681)