



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

オキシインドール-クルクミンハイブリッド化合物の
グルタチオン生合成調節による抗酸化防御機構の解
明

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2021-06-25 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 井川, 貴礼 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/81592

オキシインドール-クルクミンハイブリッド化合物の
グルタチオン生合成調節による抗酸化防御機構の解明

**(Elucidation of antioxidative properties of the oxindole-curcumin hybrid compound
in glutathione biosynthesis)**

2021

井川 貴礼

目次

第 1 章	序論	4
1-1.	神経変性疾患	4
1-2.	酸化ストレスと細胞障害	6
1-3.	グルタチオン	8
1-4.	本研究の目的	12
第 2 章	γ -グルタミルシステイン合成酵素触媒サブユニットの生合成を促進する新規オキシインドール化合物のスクリーニング	13
2-1.	緒言	13
2-2.	実験材料および実験方法	13
2-3.	結果	15
2-4.	考察	21
第 3 章	GIF-2165X-G1 と抗酸化物質 tBHQ の GCLC 誘導能の評価	23
3-1.	緒言	23
3-2.	実験材料および実験方法	23
3-3.	結果	26
3-4.	考察	30
第 4 章	GIF-2165X-G1 の GCLC 誘導機構の解析	32
4-1.	緒言	32
4-2.	実験材料および実験方法	32
4-3.	結果	33
4-4.	考察	37
第 5 章	総括	39
	参考文献	41
	略語一覧	48

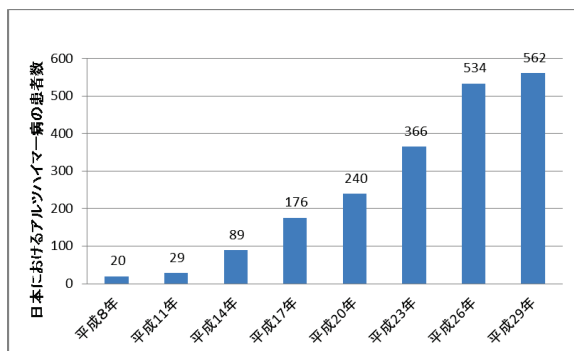
第1章 序論

1-1. 神経変性疾患

神経変性とは、細胞の構造および機能の損失が見られる神経細胞の状態を指し、神経変性疾患とは、神経系における神経細胞の脱落や神経細胞内外における異常タンパク質の蓄積を特徴として、進行性の認知・運動機能に障害が現れる疾患の総称である。神経変性疾患の最も一般的な例としては、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、および筋委縮性側索硬化症が挙げられる。これらの神経変性疾患のうち最も患者数が多いのはアルツハイマー病である。アルツハイマー病は病理学的にはアミロイド β ($A\beta$) ペプチドを含む細胞外神経斑とタウを含む細胞内神経原線維変化が存在することが特徴である (Grundke-Iqbal et al., 1986)。臨床学的には、アルツハイマー病は認知能力の漸進的な低下をもたらし、最終的には日常生活機能に困難をきたす (McKhann et al., 1984)。日本においては社会の高齢化に伴いアルツハイマー病の患者数は急増し、平成29年には国内で56.2万人 (65歳以上の高齢者の15%) と報告されている (図1)。さらに、認知症の前段階である軽度認知障害を有する人の数も増加していることから、高齢者の約3割は認知症ないし軽度認知障害を有する状態にある。その過半数はアルツハイマー病であるが、血管性認知症、レビー小体型認知症、血管性認知症、レビー小体型認知症、前頭側頭葉型認知症、前頭側頭葉型認知症、プリオン病など多数の疾患が含まれる (図2)。アルツハイマー病で承認されている治療法は対症療法のみであり、疾患病理の進行を変えることなく記憶力の中等度の改善をもたらす (Haas, 2012)。近年、 $A\beta$ の蓄積を直接または間接的に減少させるように設計された薬物候補を用いた多数の臨床試験が実施されているが、これらの試験はすべて失敗に終わっている (Gold, 2017)。

パーキンソン病はアルツハイマー病に次いで2番目に多い神経変性疾患である。パーキンソン病の特徴的な症状には、安静時振戦、徐行性振戦 (動きの遅さ)、硬直、および姿勢不安定がある。パーキンソン病はまた、認知障害の一因となる様々な非運動症状を伴う。症例の大部分は孤発性であり、家族性 (遺伝性) が約10-15%であると報告されている (Klein, 2012)。パーキンソン病の病理学的特徴は、黒質緻密部のドーパミン作動性ニューロンの変性である。これらのニューロンは線条体のニューロンとシナプスを形成するため、その変性は線条体ドーパミンの枯渇をもたらす。パーキンソン病はまた、黒質緻密部の残存するドーパミン作動性ニューロンにレビー小体と呼ばれる細胞質タンパク質の凝集体が存在することを特徴とする。

A. アルツハイマー病



B. パーキンソン病

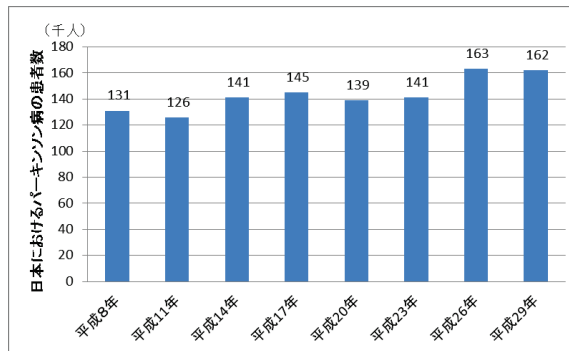


図1. アルツハイマー病とパーキンソン病の日本国内における推定患者数の推移

[厚生労働省患者調査 (平成 29 年) より抜粋]

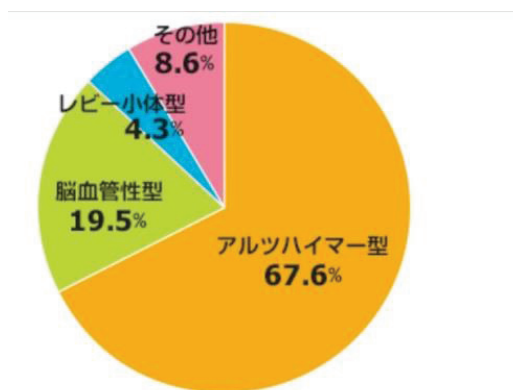


図2. 認知症におけるアルツハイマー型の割合

[総合研究報告書 (都市部における認知症有病率と認知症の生活機能障害への対応、研究代表者・朝田隆) 平成 25 年 3 月より引用]

パーキンソン病は現在のところ、運動症状の発症前にパーキンソン病を診断する検査はなく、治療法は症状を改善するだけで、病気の進行を止めるものではない。重要なことは、最初の症状が現れるまでに線条体におけるドーパミン作動性ニューロンは約 80%減少しているということである (Schulz et al., 2004)。したがって、より優れた診断方法と、病気が発症する前に開始できる治療法の両方が必要である。アルツハイマー病、パーキンソン病については、家族性と孤発性の両方があり、症例の大部分は孤発性である。これらの疾患発症の最も強いリスクファクターとなりうるのは加齢であることから、先進国においては平均寿命が長くなることに伴い、神経変性疾患の患者数も増加の一途をたどると予想されている。加齢に伴う脳の変化は神経変性疾患の

発症リスクを高めことになるが、その変化を特定することで、少なくとも疾患の発症や進行を遅らせることができる治療法を開発する手段を提供できる可能性があることを示唆している。

1-2. 酸化ストレスと細胞障害

酸化ストレス

神経変性疾患の発症機構の詳細については未だに明らかとなっていないことが多いが、主な特徴である神経細胞の脱落には酸化ストレスが関わっていることが報告されている (Gilgun-sherki et al., 2001)。酸化ストレスとは、生成される活性酸素種の量と生体内の抗酸化機構の間に不均衡が生じ、脂質過酸化やタンパク質や核酸の酸化的修飾など、細胞の生存に悪影響を及ぼす状態である。活性酸素種は、フェントン反応やハーバー・ワイス反応のような酸化還元性金属と酸素種との直接的な相互作用、または一酸化窒素合成酵素や NADPH オキシダーゼなどの酵素の活性化を伴う間接的な経路によって産生される。活性酸素種の例としては、スーパーオキシドアニオン、ヒドロキシルラジカル、過酸化水素 (H_2O_2)、一重項酸素が挙げられる。スーパーオキシドアニオンは、主に電子伝達系のミトコンドリア複合体 I と III によって生成され、反応性が高く、内部のミトコンドリア膜で H_2O_2 に還元される。 H_2O_2 はミトコンドリアで生成されるだけでなく、ペルオキシソームでも生成される。ペルオキシソームにはカタラーゼ (CAT) が含まれているため、 H_2O_2 は水に変換されることで蓄積を防がれる (図 3)。ペルオキシソームが損傷を受け、酵素反応が低下すると、 H_2O_2 は細胞質に放出され、酸化ストレスを助長する (Muller et al., 2004; Valko et al., 2007)。酸化ストレスは、心血管疾患や神経変性疾患、癌、糖尿病、白内障などのさまざまな病状に関係しており、そのほとんどは加齢との関連が挙げられている。

人間の脳は、体重のわずか 2%であるにもかかわらず、呼吸器系から供給される酸素の 20%を消費する (Johnson et al., 2012)。酸素消費量の多い脳は他のどの臓器よりも活性酸素種が発生するリスクが高く、酸化ストレスの影響を受けやすい組織である。実際に、高齢者や孤発性アルツハイマー病患者の脳では、酸化ストレスによる負荷が報告されている (Zhichun et al., 2014)。

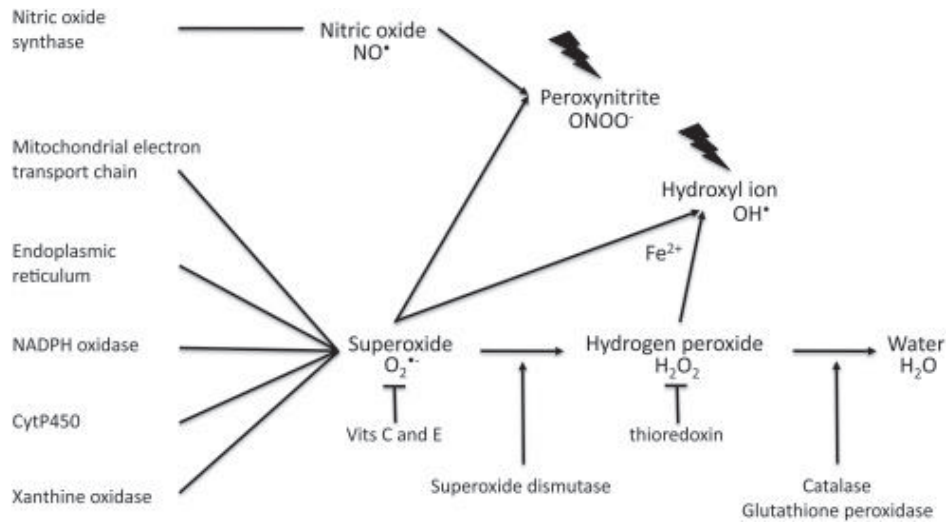


図 3. 活性酸素種の発生と代表的な還元酵素の作用

[Burton et al., Oxidative stress, Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, 25, 287-299 (2011)より
抜粋]

生体内の抗酸化機構

通常、生体内には活性酸素種を消去するための機構として様々抗酸化作用を持つ物質が働き、活性酸素種が過剰にならないように制御している。抗酸化酵素としてはスーパーオキシドアニオンを消去するスーパーオキシドディスムターゼ (SOD) や過酸化水素を消去する CAT などがある。また、過酸化脂質を還元する酵素としてはグルタチオンペルオキシダーゼ (GPx) が存在する。抗酸化物質とは活性酸素を還元して無害化する物質であり、生体内に存在する最も一般的な抗酸化物質にはグルタチオンがある。酸化ストレスに対する抗酸化物質の反応は、内因性および外因性の酸化的傷害に対する重要な防御機構として存在し、すべての生物で保存されている (Forman et al., 2014)。抗酸化酵素の発現を上昇させる仕組みの一つとして NF-E2 related factor 2-antioxidant response element (Nrf2-ARE) 経路があり、Nrf2 シグナルの伝達システムは、酸化ストレスおよび毒物に対する最も重要な生体防御機構である (Slocum et al., 2011)。転写因 Nrf2 は 1994 年にグロビン遺伝子発現制御領域中の NE-E2 結合配列と呼ばれる遺伝子発現制御配列に結合する因子としてスクリーニングされた。通常 Nrf2 は細胞質内で Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1) と複合体を形成しており、Keap1 は他のタンパク質とともに Nrf2 の局在、Nrf2 の分解の調節および酸化刺激の感知を制御している (Kobayashi et al., 2014)。酸化刺激を感知すると Nrf2 は核内へと移行し ARE 配列に結合することで、抗酸化関連遺伝子の発現を上昇させる。Nrf2 関連抗酸化酵素としてはグル

タミン酸システインリガーゼ (GCL) の2つのサブユニット (Zhang et al., 2007)、グルタチオンシンターゼ (GS)、SOD (Hasegawa et al., 2009)、CAT (Zhu et al., 2005)、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ (G6PDH; Rangasamy et al., 2005)、GPx (Thimmulappa et al., 2002)、グルタチオン S-トランスフェラーゼ (Yao et al., 1998) およびチオレドキシンレダクターゼ (Chen et al., 2005) が転写レベルで Nrf2 により調節されていることが示されている。

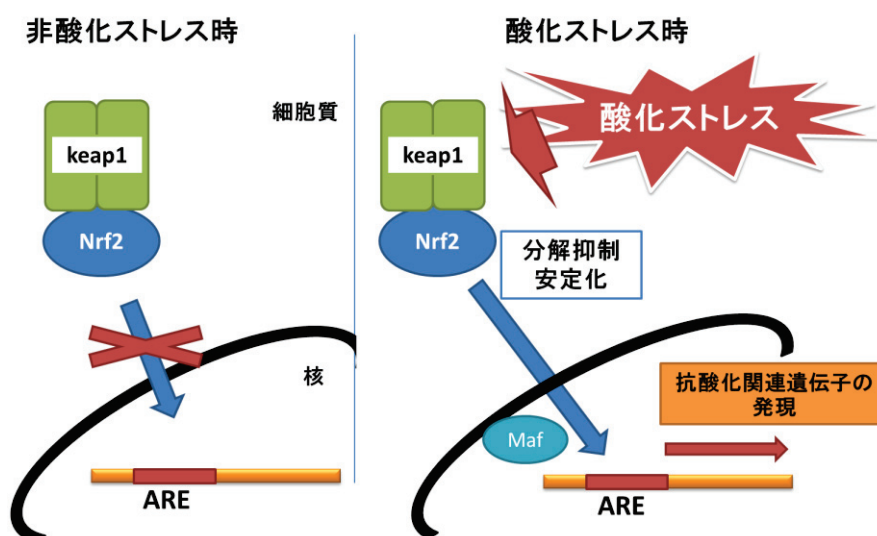


図 4. Nrf2-ARE 経路による抗酸化関連酵素の発現機構の概略

1-3. グルタチオン

グルタチオン

グルタチオン (γ -Glu-Cys-Gly; GSH) はグルタミン酸、システイン、グリシンから成るトリペプチドであり、高等動植物から微生物まで生物界に広く分布する天然の抗酸化物質である。細胞内には 0.5~10 mM もの高濃度で含まれ、非タンパク質性のチオールを占める化合物である (Shelly, 2013)。GSH は還元型 (GSH) および酸化型 (GSSG) の形で存在するが、細胞内の GSH は通常 98%以上が還元型として存在している (Kaplowitz et al., 1985)。細胞内 GSH の 80~85%は細胞質、10~15%はミトコンドリア、わずかな割合で小胞体に貯蔵されている (Meredith et al., 1982)。グルタミン酸とシステインのアミド結合は通常のペプチド結合とは異なり、グルタミン酸側鎖の γ -カルボキシル基とシステイン主鎖の α -アミノ基からなる特殊な γ -グルタミル結合を有している。

この結合を加水分解できる酵素はγ-グルタミルトランスぺプチダーゼ (GGT) とその近縁のごく限られた酵素のみであり、GGT は細胞の外表面にのみ存在する(Meister et al., 1983)。そのため GSH はペプチドでありながら、ほとんどのプロテアーゼに対して耐性があり、GGT を発現する細胞によってのみ細胞外で代謝される。GSH の抗酸化機能は、主に GPx が触媒する反応によって働く。初めに GSH が GSSG に酸化される際に H₂O₂ と過酸化脂質を還元し、次に GSSG は NADPH と GSSG レダクターゼを利用し GSH に還元され、レドックスサイクルを形成している (図 5)。

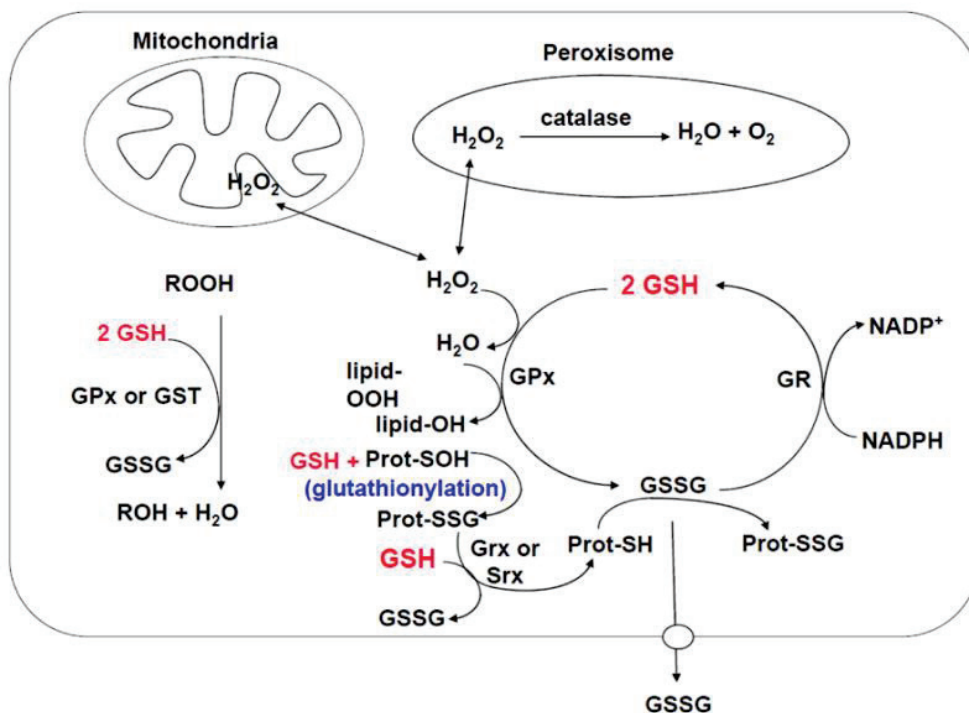


図 5. グルタチオンによる抗酸化機構の概略

Hydrogen peroxide (H₂O₂), GSH peroxidase (GPx), GSSG reductase (GR), Organic peroxides (ROOH), GSH S-transferase (GST), sulfenic acid (Prot-SOH), glutaredoxin (Grx), sulfiredoxin (Srx), protein sulfhydryl (Prot-SH), mixed disulfide (Prot-SSG) [Meister et al., Glutathione, Annu Rev Biochem, 52, 711-760 (1983) より抜粋]

グルタチオンの生合成機構

GSH の合成経路はグルタミン酸とシステインからの γ-グルタミルシステインの形成、γ-グルタミルシステインとグリシンからの GSH の形成の 2 段階の酵素反応によって成り立ち、構成アミノ酸からの GSH の合成は 2 つの ATP を必要とする酵素のステッ

プが含まれる (図 6)。GSH 生合成の第一段階は、 γ -グルタミルシステイン合成酵素 (GCL) によって触媒される。GCL を構成する触媒サブユニット (GCLC, 73 kDa) が、主な触媒活性を示し、GSH によるフィードバック阻害を受ける (Seelig et al., 1984)。調節サブユニット (GCLM, 31 kDa) は酵素的には不活性であるが、GCL のグルタミン酸に対する K_m を下げ、GSH に対する K_i を上げることで重要な調節機能を果たしている (Huang et al., 1993)。GCLM ノックアウトマウスは生存可能ではあるが、GCLC 単独の酵素活性は著しく低下した状態となり組織の GSH 量は著しく低下していることが報告されている (Franklin et al., 2009)。

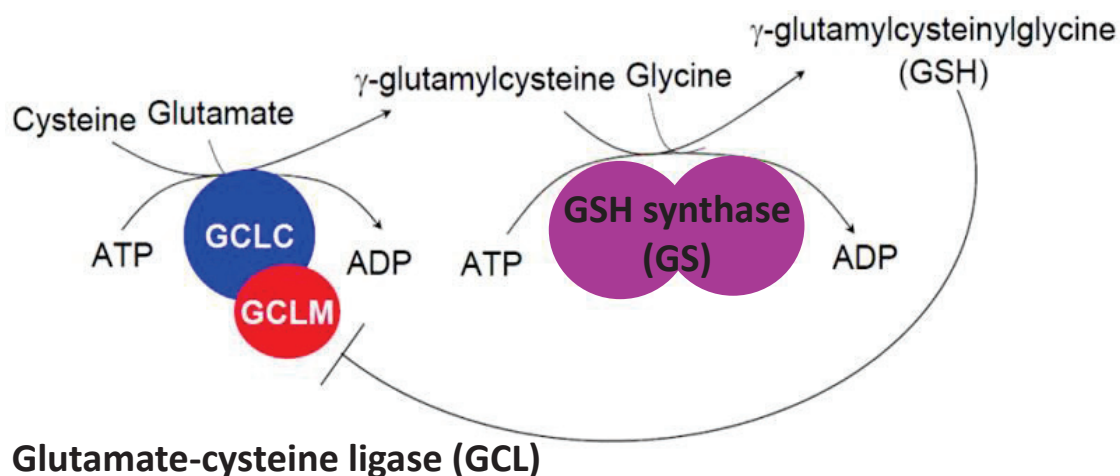


図 6. 2 段階の酵素反応によるグルタチオンの産生

GSH 合成の 2 番目のステップは、GSH シンテターゼ (GS) によって触媒される。GS は 2 つの同一のサブユニット (118 kDa) で構成されており、GSH によるフィードバック阻害の影響を受けない (Oppenheimer, 1979)。GCL の生成物である γ -グルタミルシステインは、GS が存在する場合、非常に低濃度でしか存在せず、GCL が GSH 産生の律速酵素とされている。実際に、GS の過剰発現が GSH 量を増加させなかったのに対し、GCL の過剰発現は GSH 量を増加させたという報告がこの考えを支持している (Grant et al., 1997)。GSH は細胞や組織で最も豊富な抗酸化物質であり、酸化ストレスからの細胞保護において主要な役割を果たしている。

グルタチオンと加齢

GSH の加齢に伴う変動は広く研究されており、GSH の総濃度と還元型グルタチオン濃度は、若い成人と比較して、高齢の実験動物およびヒトの多くの組織で著しく減少し、代わりに酸化型グルタチオン濃度が増加することが報告されている (Maher, 2005)。その他のグループの報告でも、GSH 濃度はラットの肝臓 (22 カ月対 5 カ月)、脳 (20 カ月対 2 カ月)、アカゲザルの頸動脈 (20 年対 2 カ月) およびヒトリンパ球 (50~60 歳 20~30 歳) で減少していることがわかっている (Aydin et al., 2010; Samarghandian et al., 2015; Ungvari et al., 2011)。GSH の年齢依存性の減少は、非侵襲的方法によるいくつかのヒト研究によっても裏付けされている。非侵襲的 NMR 法 (MRS: Magnetic Resonance Spectroscopy) を使用して行われた研究では、高齢者 (70 歳) の脳内の GSH 濃度は、若年者 (20 歳) と比較して 30%減少していることが明らかとなっている (Emir, 2011)。また、高齢者 (60~75 歳) の赤血球における GSH 濃度とその合成速度の両方が若年者 (20~40 歳) と比較して約 50%減少していることも報告されている。これらのデータは、GSH に一般的な年齢依存性の低下があることを示唆している。

グルタチオン合成における γ -グルタミルシステイン合成酵素触媒サブユニットの重要性

GCL は GSH 産生の律速酵素としての、GSH の恒常性の維持に重要な役割を果たしており、その発現レベルは GSH 濃度に比例する (Wang et al., 2003)。GCL は GCLC と GCLM で構成され 1:1 の複合体を形成するが、GCLC の発現量が高くなるほど、活性型のヘテロダイマー形成を促進することとなる (Krzywanski, 2004)。GCL の加齢に伴う変化としては Liu らが、GCLC と GCLM の mRNA レベルとタンパク質レベルの両方が、赤血球の GCL の活性とともに、老齢ラットの肝臓、肺、腎臓で減少したことを報告している (24 カ月対 6 カ月) (Liu, 2000)。老齢ラットの脳では GCLM の減少と GCLC の発現変化も確認されている (Liu, 2002)。GCL の誘導は、酸化ストレスに対する適応反応の重要なメカニズムであり、加齢に伴った発現量変化は、加齢に伴う酸化的傷害に対して影響を与えていると考えられる。特に GSH 産生への寄与が大きい GCLC の転写制御の分子機構を調べた研究は数多く行われていて、齧歯類とヒト GCLC プロモーター領域は、同様の制御機構を共有していることが明らかとなっている (Lu, 2013)。ヒト GCLC プロモーターでは、コンセンサス配列として NF- κ B、Sp-1、アクチベータープロテイン-1 (AP-1)、AP-2、金属応答 (MRE) および ARE/EpRE が同定されている (Yang et

al., 2001; Shenvi et al., 2009; Lu, 2013)。

グルタチオン産生と神経変性疾患

GSH 欠乏はアルツハイマー病、パーキンソン病など神経変性疾患および統合失調症などの神経精神疾患を含む様々な疾患の病態形成において重要とされる酸化ストレスに直接関与していることが報告されている (Riederer et al., 1989; Wu et al., 2004; Gysin et al., 2007; Zeevalk et al., 2008)。例えば GSH 前駆体、N-アセチルシステインおよび GSH アナログなどの物質は GSH 合成を増強することが示唆されている。また tert-ブチルヒドロキノン (tBHQ)、15-デオキシ $\Delta^{12,14}$ -プロスタグランジン J₂、クルクミンおよびメラトニンは転写レベルで GCLC 発現を増加させることが知られている (Urata et al., 1999; Dickinson et al., 2004; Biswas et al., 2005; Lu, 2013)。したがって、GCLC 発現に影響を与える低分子の天然化合物または合成化合物は、酸化ストレスに対する神経保護剤としての可能性を有し、脳内の GSH 量の減少が観察されている神経変性疾患における障害を治療するための有効な手立てとなりうる (Lavoie et al., 2008; Berk et al., 2013; Bavarsad Shahripour et al., 2014)。

1-4. 本研究の目的

アルツハイマー病とパーキンソン病は、神経変性疾患の中でも最も患者数が多く、高齢化社会となった日本において、社会的にも経済的にも大きな課題である。しかし、神経変性疾患は、その発症のメカニズムの詳細は明確になっておらず、完治させる治療法もいまだに確立されていない。抗酸化物質である GSH の欠乏を改善するために、本研究では、GSH 産生を制御している GCLC を標的として、GCLC プロモーター活性を指標にしたスクリーニングにより、神経保護剤の候補であるオキシインドール化合物において、GCLC の発現増強を担う化合物の探索を行った。その結果、GCLC の転写を強く誘導する化合物 GIF-2165X-G1 を見出し、GIF-2165X-G1 の GCLC 誘導に関する作用を解析した。

第2章 γ -グルタミルシステイン合成酵素触媒サブユニットの生合成を促進する新規オキシインドール化合物のスクリーニング

2-1. 緒言

GCL は GSH 合成の律速酵素と考えられているため、GCLC 転写活性は GSH の合成能を決定する上で重要である (Lu, 2009)。例えば、NMYC (N-myc proto-oncogene protein) を増幅した神経芽腫細胞による GCLC の転写活性の増加は、細胞において酸化ストレスに対する高い抵抗性をもたらす (Veas et al., 2010)。GCLC は、レチノイド X 受容体 α (RXR α) 欠損マウスにおいて下方調節され、RXR α 欠損マウス由来の初代肝細胞は、t-ブチルヒドロペルオキシド誘導性酸化ストレスに対して感受性が高まった (Wu et al., 2004)。これらの研究は、GCLC 転写を増加させる低分子化合物が酸化ストレスからの保護作用を有することを示唆している。

本研究では、GCLC プロモーターを利用したスクリーニング系を確立し、GCLC 転写を増加させる低分子化合物を探索した。スクリーニングを行う候補化合物として、パーキンソン病の症候性治療のための不可逆的モノアミンオキシダーゼ B (MAO-B) 阻害剤として最初に開発されたラサギリン (Azilect, Teva Pharmaceutical Co.) のアミノインダン構造を化学修飾したオキシインドール化合物に注目した。過去の当研究室の報告で、インダン型の骨格と、環系の C-1 の不飽和側鎖で構成されている GIF-0726-r が神経保護化合物であることを見出している。GIF-0726-r は、グルタミン酸誘発性のオキシトシス、エラスチン誘発性のフェロトシスおよびツニカマイシン誘発性の小胞体ストレスを低濃度で効果的に抑制することが明らかとなっている (Hirata et al., 2018; Hirata et al., 2020)。細胞保護の分子機構は完全には明らかとなっていないものの、ROS の蓄積や Ca²⁺の流入を防ぐことが示されており、直接的な活性酸素スカベンジャーとしての働きや、Nrf2-ARE 経路の活性化による抗酸化酵素の発現増強が示されている。本研究では、GIF-0726-r をリード化合物として GIF-0726-r の構造を改変した 200 種類以上のオキシインドール化合物を用いて、GCLC 転写を増加させる低分子化合物のスクリーニングを行った。

2-2. 実験材料および実験方法

2-2-1. オキシインドール化合物 (GIF 化合物)

オキシインドール化合物は GIF 化合物と総称しており、細胞培養グレードのジメチ

ルスルホキシドに溶解し、-20°C の暗所で保存した物を使用した。

2-2-2. 細胞培養

マウス海馬由来細胞 HT22 細胞は David Schubert 博士 (The Salk Institute for Biological Studies, La Jolla, CA, USA) より供与された。HT22 細胞の培養は、5% fetal bovine serum (FBS, HyClone, Logan, UT, USA) を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (Low glucose DMEM, 富士フィルム和光純薬株式会社, Osaka, Japan)を用いて、37°C、5% CO₂ の条件下で行った。

2-2-3. GCLC-HT22 安定発現株の樹立

ラット GCLC プロモーターの-1764/+2 の断片は 2.5 µg の rat genomic DNA (Novagen, Madison, WI, USA) を鋳型として PrimeSTAR HS DNA polymerase (Takara Bio, Shiga, Japan) を用いて増幅した。PCR 条件は denaturation ステップ 98°C で 10 秒、annealing ステップ 58°C で 5 秒、extension ステップ 72°C で 60 秒を 25-36 サイクルとした。使用したプライマーは表 1 に記載した。PCR 産物は pGL3-Basic (Promega Corporation, Madison, WI, USA) の *Mlu*I と *Xho*I の制限部位に組み込みサブクローニングした。作製した GCLC(-1764/2)-pGL3 Basic と pcDNA3.1/Hygro (Promega Corporation) は Lipofectamine™ LTX 試薬 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA, Cat#15338100) のプロトコルに従って HT22 に導入した。遺伝子導入した細胞は 0.4 mg/mL のハイグロマイシンを添加した条件で 1 週間培養し、遺伝子が導入された細胞を選別した。

表 1. 実験で使用したプライマーペア

	Forward primers	Reverse primers
-308/+2	5'-ATTACGCGTCTATAAAATCCGGA-3'	5'-CACTCGAGATGGCCGCGTCTCTCTCTG-3'
-334/+2	5'-ATTACGCGTGGCTTCGTTCCCGCCCC-3'	
-387/+2	5'-ATTACGCGTCCCGGAACACCCACGG-3'	
-1764/+2	5'-CAACGCGTCTGGAGAATCTCCAGCATCC-3'	
-3609/-1512	5'-GAGCTGGTTCTGAATGCTGGGAGCTC-3'	5'-GCTGTGGTTTCCACAGTGAATGCAT-3'
-5001/-3584	5'-CCGAGCTCAAGGCTCTCTGTCTCAA-3'	5'-GAGCTCCAGCATTGAGAACCAGCTC-3'

2-2-4. GCLC プロモーター活性の測定

GCLC-HT22 安定発現株を 2×10^4 /well になるように 48-well plate に播種し、各被験物質を任意の濃度となるように添加した。CO₂ incubator (37°C、5% CO₂) で 16 時間培養後、培養液を吸引除去し、 $1 \times$ Passive Lysis Buffer を各 well に 50 µL ずつ加えた。室温で

15 分間攪拌したあと、各 well の細胞抽出液を氷上にてエッペンチューブに回収し、14000 rpm × 5 min、4°C で遠心し Cell Lysate を得た。ルミノメーター用のチューブに Cell Lysate を 5 μL 入れ、室温に戻した Luciferase Assay System (Promega Corporation, Cat# E1500) を 25 μL 加えて vortex した後、ルミノメーターで Luciferase 活性を測定した。

2-2-5. 統計処理

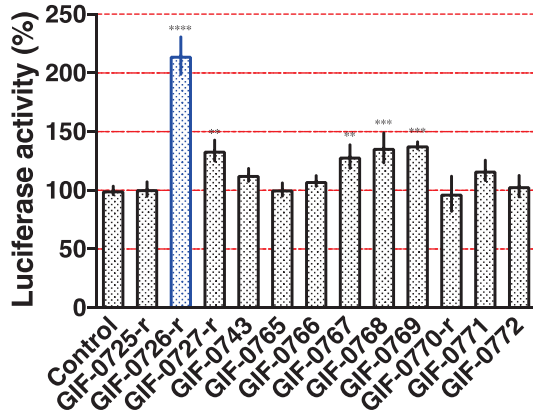
数値データは、GraphPad Prism 4 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) を使用して統計処理を行った。試験群間の有意差は、ANOVA とそれに続くボンフェローニの多重比較検定を用いて評価した。

2-3. 結果

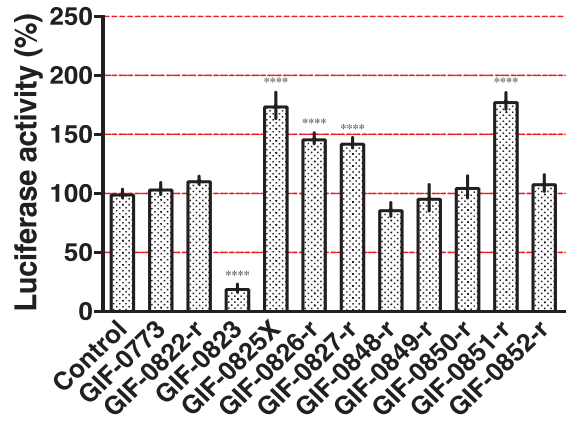
2-3-1. GIF 化合物のスクリーニング

初めに Yang らの実験を参考にラット GCLC プロモーター領域 (-1764/+2) を有するルシフェラーゼレポータープラスミドを調製した (Yang et al., 2001)。このレポータープラスミドを HT22 細胞にトランスフェクトし、GCLC (-1764/+2) プロモーターの安定発現株 (GCLC-HT22) を作製して、GCLC 転写活性を促す新規オキシインドール誘導体を探索した。検討した 220 個のオキシインドール誘導体のうち、5 個の化合物が 50 μM の濃度で GCLC プロモーター活性を 200%以上増加させ、16 個の化合物はプロモーター活性を約 150%増加させた (図 7)。最も効果のあった 5 個の化合物は GIF-0726-r、GIF-0885-r、GIF-2017、GIF-2127-r および GIF-2165X-G1 であり、その構造を図 8 に示した。これらの化合物は HT22 細胞において、濃度依存的に GCLC プロモーター活性を増加させた (図 9)。最も強く GCLC プロモーター活性を誘導した化合物は GIF-2165X-G1 であり、GIF-2165X-G1 をより詳細に解析することにした。

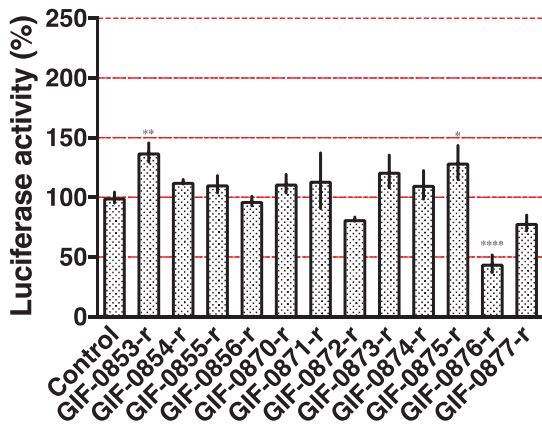
GIF-0725-r ~ GIF-0772



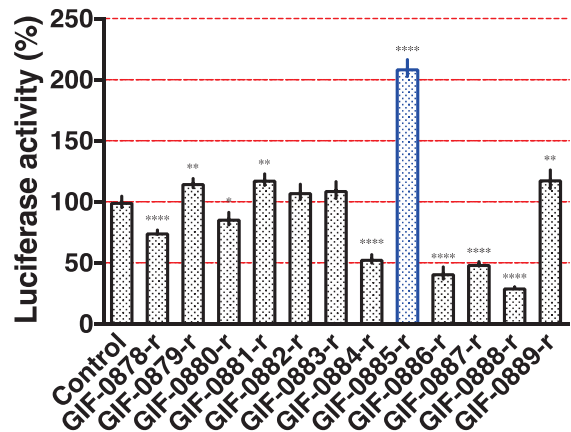
GIF-0773 ~ GIF-0852-r



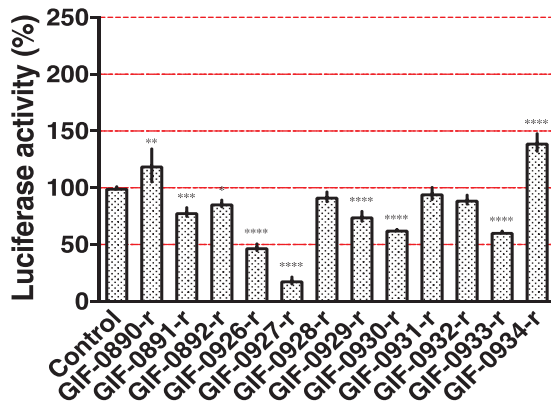
GIF-0853-r ~ GIF-0877-r



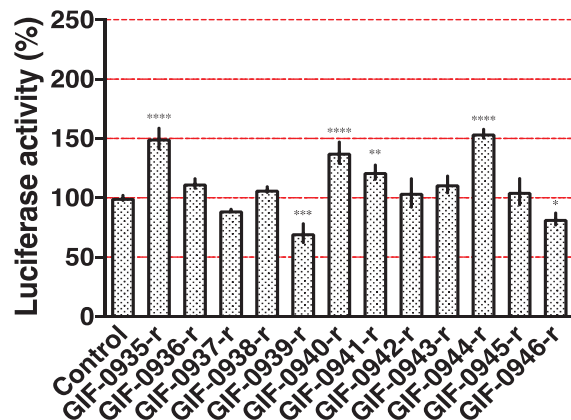
GIF-0878-r ~ GIF-0889-r



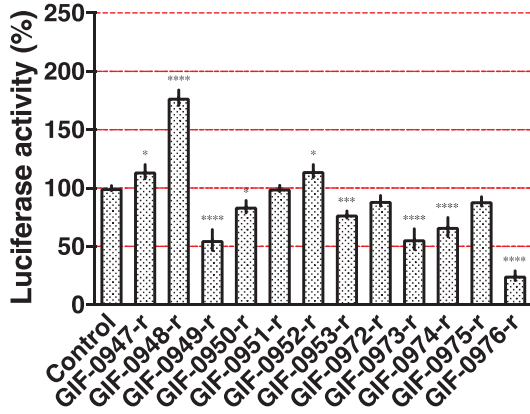
GIF-0890-r ~ GIF-0934-r



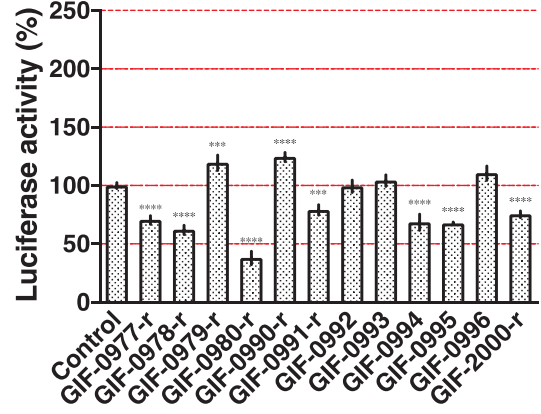
GIF-0935-r ~ GIF-0946-r



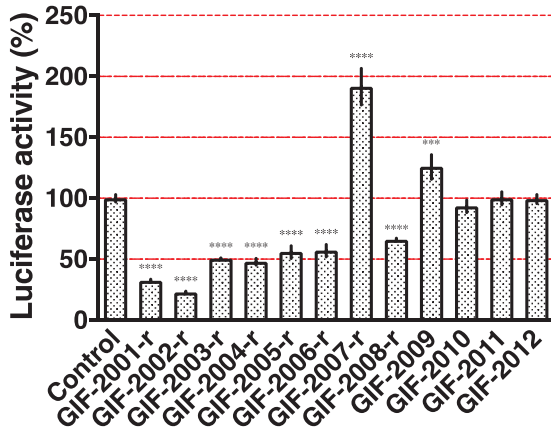
GIF-0947-r ~ GIF-0976-r



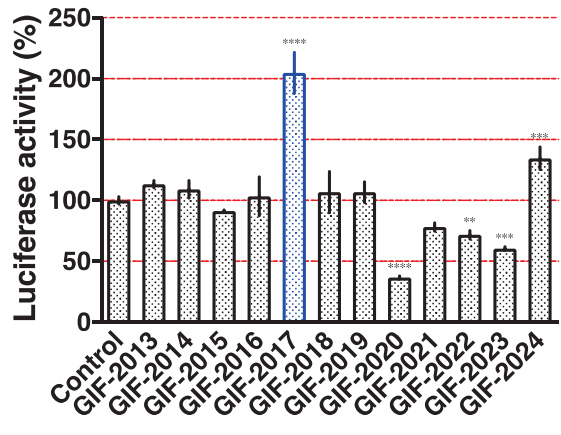
GIF-0977-r ~ GIF-2000-r



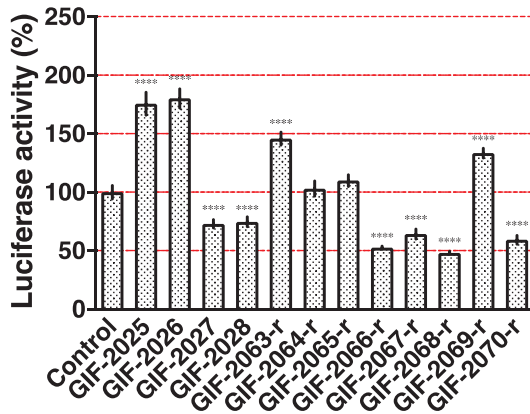
GIF-2001-r ~ GIF-2012



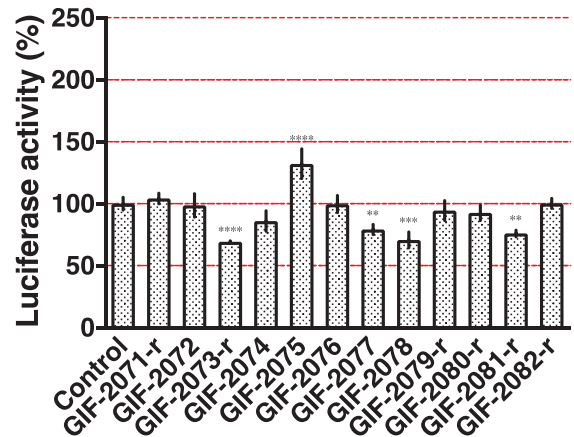
GIF-2013 ~ GIF-2024



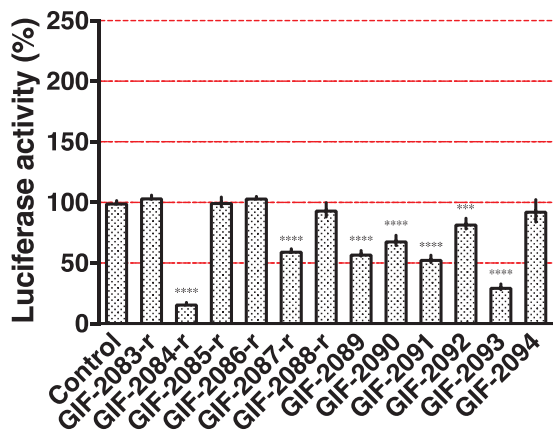
GIF-2025 ~ GIF-2070-r



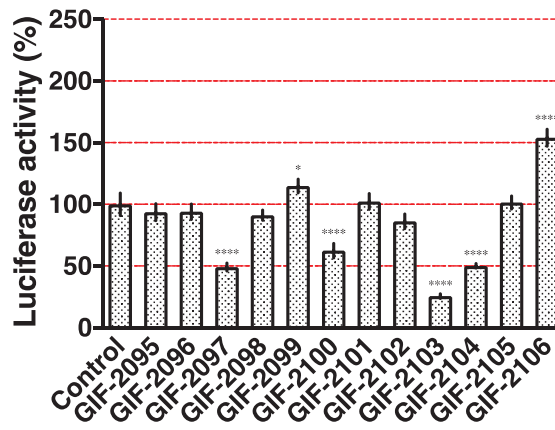
GIF-2071-r ~ GIF-2082-r



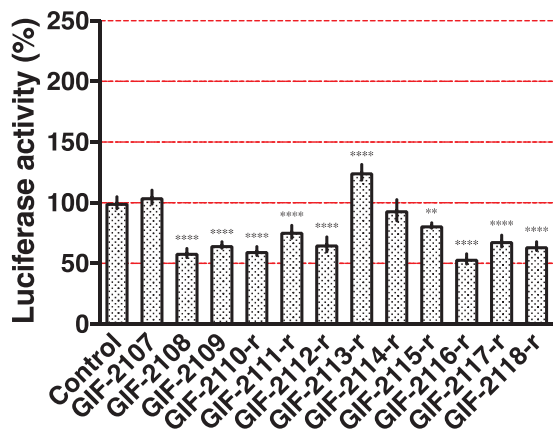
GIF-2083-r ~ GIF-2094



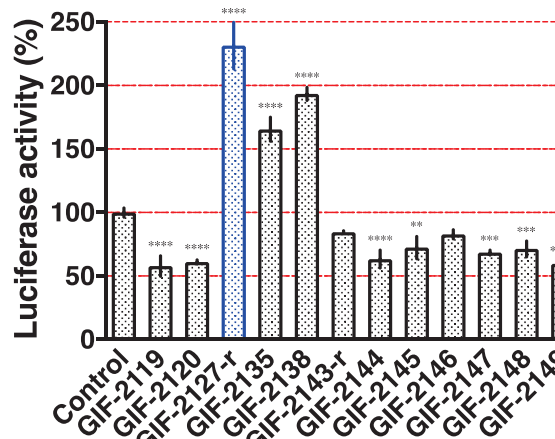
GIF-2095 ~ GIF-2106



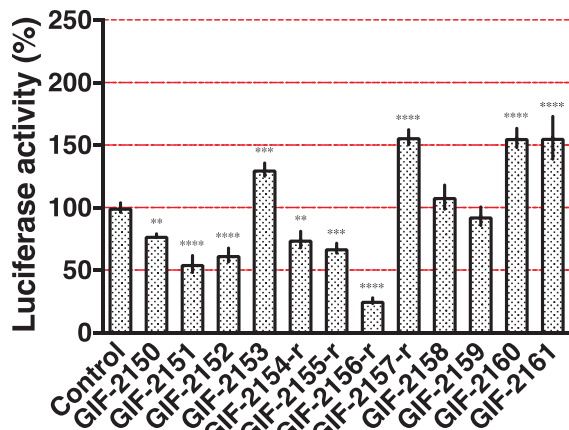
GIF-2107 ~ GIF-2118-r



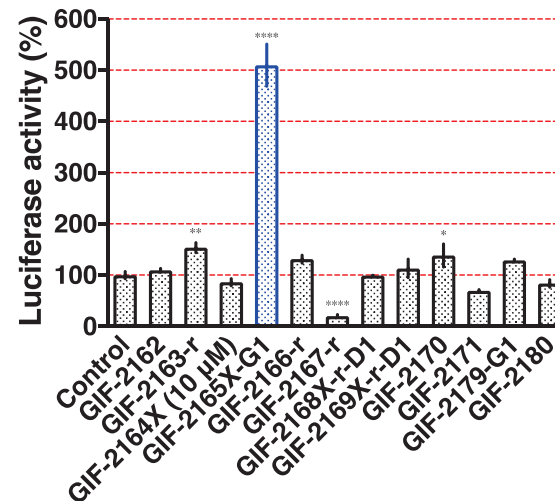
GIF-2119 ~ GIF-2149



GIF-2150 ~ GIF-2161



GIF-2162 ~ GIF-2180



GIF-2181 ~ GIF-2183

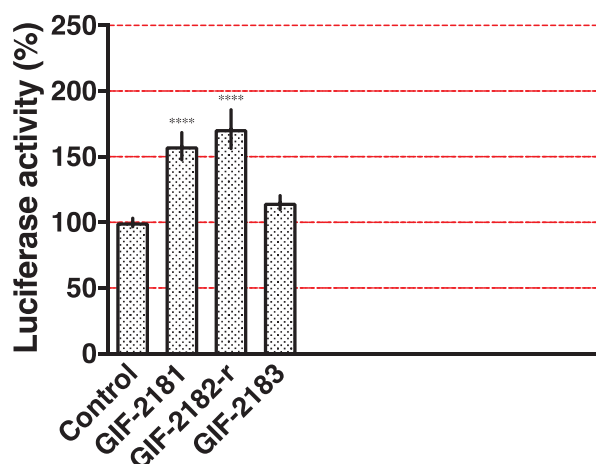


図 7. GIF 化合物の GCLC-HT22 細胞でのスクリーニング結果
GCLC-HT22 細胞を各種 GIF 化合物 (50 μ M) で 16 時間処理し、Luciferase 活性を測定した。(平均値 \pm SD, n=4, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001)

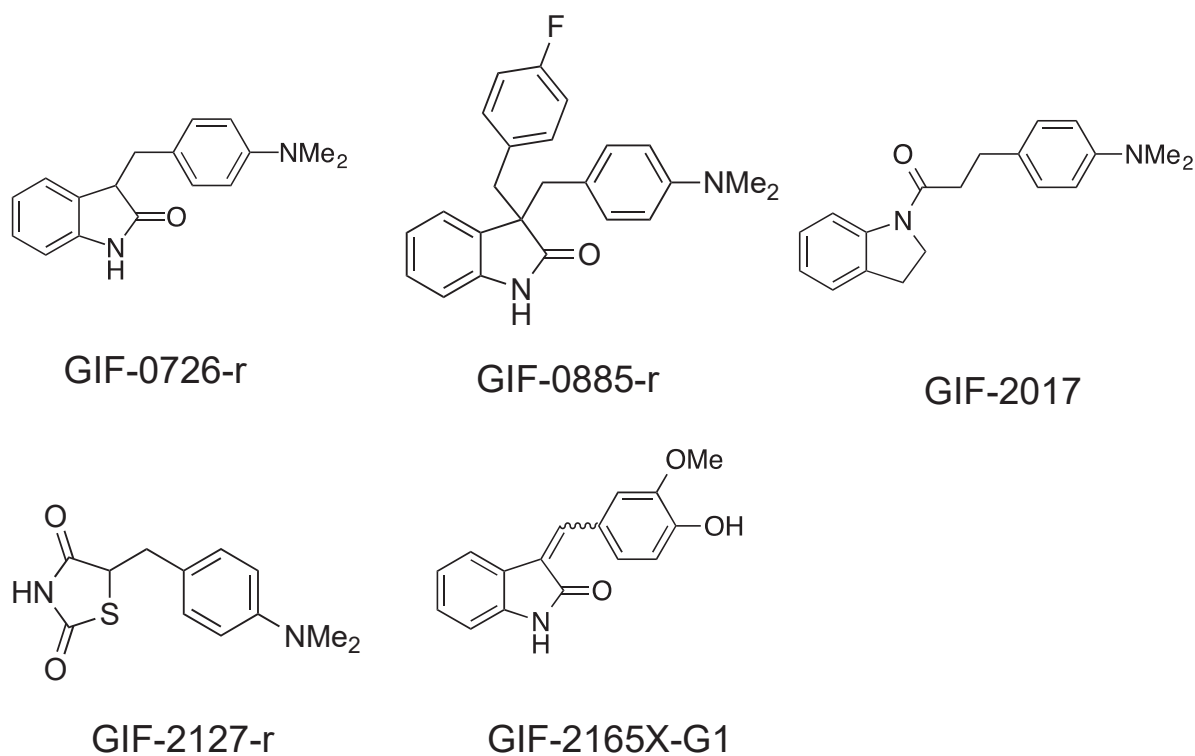


図 8. GIF-0726-r, GIF-0885-r, GIF-2017-r, GIF-2127-r および GIF-2165X-G1 の構造

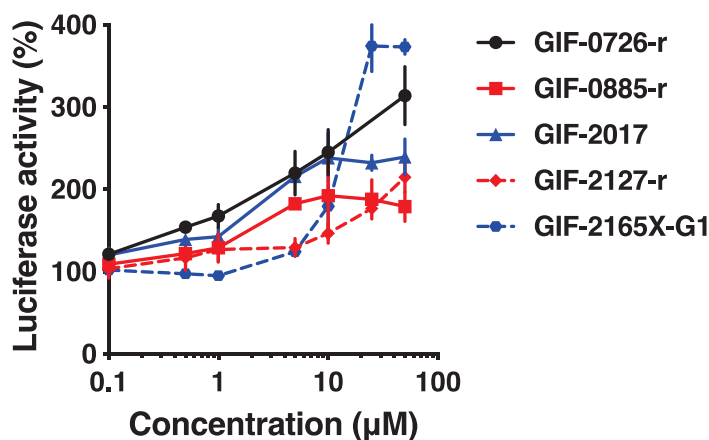


図 9. GIF-0726-r, GIF-0885-r, GIF-2017-r, GIF-2127-r および GIF-2165X-G1 の GCLC プロモーターに対する影響

GCLC-HT22 細胞を各種 GIF 化合物で 16 時間処理し、Luciferase 活性を測定した (平均値±SD, n=4)。

2-3-1. GIF-2165X-G1 とクルクミンの GCLC プロモーター活性におよぼす影響の比較

GIF-2165X-G1 はオキシインドールとクルクミンのハイブリッド化合物であるため、GCLC プロモーター活性に対する効果をクルクミンと比較した (図 10)。どちらの化合物も 10 μM の濃度では GCLC プロモーターを同程度に活性化し、GIF-2165X-G1 は 25 ~50 μM の濃度で GCLC プロモーターをさらに強く活性化した。これら結果から、その後の実験では 10~25 μM の濃度範囲を選択した。対照的に、クルクミンは 25 μM の濃度では HT22 細胞に強い毒性を示したため、25 μM 以上の濃度でのデータは図 10 には載せていない。

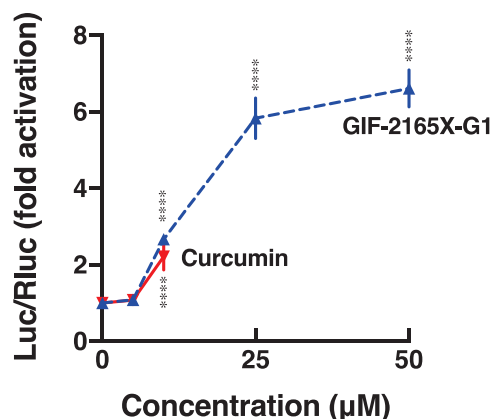


図 10. GIF-2165X-G1 およびクルクミンの濃度依存的 GCLC プロモーターの活性化
HT22 細胞をホタルルシフェラーゼおよびウミシイタケルシフェラーゼレポータープラスミドで約 8 時間一過性にトランスフェクションし、GIF-2165X-G1 およびクルクミンで 16 時間処理した。(平均値±SD, n=4, **** p<0.0001)

2-4. 考察

ラット GCLC プロモーター領域 (-1764/+2) を有するレポータープラスミドを HT22 細胞に発現させ、GCLC プロモーターを活性化する新規オキシインドール誘導体を探した。220 個のオキシインドール誘導体のうち、5 個の化合物 GIF-0726-r、GIF-0885-r、GIF-2017、GIF-2127-r および GIF-2165X-G1 の効果が強く、HT22 細胞において濃度依存的に GCLC プロモーター活性を増加させた (図 7)。過去の当研究室の報告で、オキシインドール化合物である GIF-0726-r および GIF-2165X-G1 が、HT22 細胞におけるグルタミン酸誘導オキシトシスおよびエラスチン誘導フェロトシスを阻害し、マウス線条体における 6-ヒドロキシドーパミン誘導毒性からドーパミン神経細胞を保護することを報告している (Hirata et al., 2020; Hirata et al., 2018)。GIF-2165X-G1 はオキシインドール-クルクミンハイブリッドの化合物である。クルクミンは天然ポリフェノールで、Aβ の凝集、およびアルツハイマー病および他の神経変性疾患の動物モデルにおける運動および認知能力を改善する報告がある (Yang et al., 2005; Begum et al., 2008)。クルクミンは強力な抗酸化物質として、スーパーオキシドアニオンおよびヒドロキシルラジカルを消去し、SOD、GPx、GST の活性化などの抗酸化酵素の発現を増強する (Biswas et al., 2005)。また、脂質過酸化、DNA 損傷およびタンパク質の酸化、またはタンパク質のカルボニル化から細胞を保護する作用を持つなどその作用は多岐にわたる (Jat et al., 2003)。GIF-2165X-G1 の過去の報告と照らし合わせると、GIF-2165X-G1 とクルクミンは、スーパー

オキシドアニオンを消去する作用、ARE-Nrf2-Keap1 経路を活性化する作用および鉄をキレートする能力において共通の特徴を有している。しかし、大きく異なる点としては化合物の毒性が挙げられる。HT22 細胞では、クルクミンは 25 μM 以上の濃度において、強い細胞毒性を示している。同様にクルクミンは高い抗酸化作用を有し、低濃度では神経保護を示すが、高濃度での使用において細胞に毒性がある可能性が報告されている (Cole et al., 2004)。いくつかの報告は、クルクミンが比較的低濃度 (0.1~1 μM) で強力な抗酸化、抗炎症、抗アミロイド特性を含む有益な効果を持っていることを示唆しているが、たとえば、3 μM 以上のクルクミンでは、ハンチントン病の *in vitro* モデルにおいて mHTT (mutant huntingtin protein) によって誘発される神経細胞毒性を増悪させることが報告されている (Jana et al., 2004)。また、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のターメリック抽出物が、用量および時間に依存した染色体異常の誘発、哺乳動物細胞株における DNA 損傷を引き起こすことも報告されている (Cao et al., 2006)。このようにさまざまな疾患におけるクルクミンの安全性については大きな懸念が残っている。一方で、GIF-2165X-G1 は 25~50 μM の濃度で細胞生存に影響を与えることなく GCLC プロモーターを 6 倍程度に活性化した。従って、GIF-2165X-G1 は GCLC プロモーターの活性化作用を有し、クルクミンの細胞毒性が軽減された安全性の面からも有益な化合物であると考えられた。

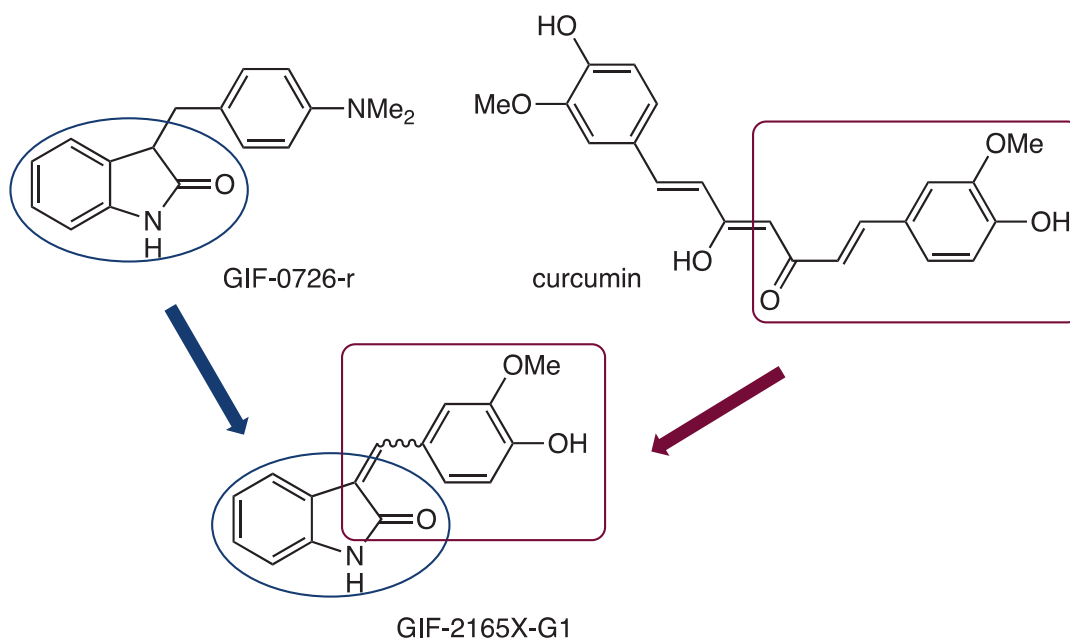


図 11. GIF-2165X-G1 の構造

第3章 GIF-2165X-G1 と抗酸化物質 tBHQ の GCLC 誘導能の評価

3-1. 緒言

第2章では GCLC (-1764/+2) プロモーター活性を指標にオキシインドール化合物のスクリーニングを行い GIF-0726-r、GIF-0885-r、GIF-2017、GIF-2127-r および GIF-2165X-G1 の5種類が強い GCLC (-1764/+2) プロモーター活性を持つことを明らかにした。本章では、その中で最も活性の強い GIF-2165X-G1 の GCLC 転写活性の評価を目的とした。GIF-2165X-G1 の GCLC 転写活性を評価するにあたり、抗酸化剤として汎用される tBHQ を比較対象として検討を行った。tBHQ は Nrf2-ARE 経路の活性化を介して、GCLC をはじめとした抗酸化関連タンパク質の発現を増強することが知られている (Urata et al., 1999)。GIF-2165X-G1 の GCLC への影響は、リアルタイム PCR による GCLC mRNA の発現、ウェスタンブロットによるタンパク質発現、ラット GCLC プロモーターにより解析した。

3-2. 実験材料および実験方法

3-2-1. リアルタイム PCR

Total RNA は TRIzol® 試薬 (Thermo Fisher Scientific) を用いて単離した。Total RNA (0.5 µg)、50 mM Tris-HCl (pH8.3)、75 mM KCl、3 mM MgCl₂、10 U の RNaseOUT (Invitrogen Corporation)、0.5 mM の各 dATP、dCTP、dGTP および dTTP、10 mM DTT、0.5 µg のオリゴ (dT) 12-18 プライマー (Thermo Fisher Scientific) および 200 U の SuperScript™ III RNaseH-逆転写酵素 (Thermo Fisher Scientific) で 20 µL となるように調製した。各サンプルを 50°C で 60 分間インキュベートした。次いで 70°C で 15 分間加熱することにより反応を終了させた。リアルタイム PCR は表 2 に示したプライマーおよび Platinum™ SYBR™ Green qPCR SuperMix-UDG (Thermo Fisher Scientific, Cat# 11733046) を用いた。増幅には Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific) を用いて、95°C で 15 秒、60°C で 30 秒の 40 サイクルで行った。遺伝子発現量は検量線法によって算出し、遺伝子発現量の相対値は、同じサンプル中の内因性コントロール遺伝子 GAPDH で補正し算出した。

表 2. リアルタイム PCR で用いたプライマーペア

Gene	GenBank Accession #		Sequence of primers	Size(bp)
mGCLC	NM_010295.2	770-789	GGAAGGAGGCGCATCAAAGT	107
		856-876	CCTTTTCTCCTCTCCGATGCC	
rGCLC	NM_012815.2	381-400	TGGCCAGCCGTCCGAGGAA	143
		505-523	CAGGGCAGCCTAGCCTGGG	
mHO-1	NM_010442.2	212-231	AAGCCGAGAATGCCCTGGG	123
		314-334	TGCGCTCTATCTCCTCTTCCA	
mGAPDH	NM_008084.2	445-465	AGGTCGGTGTGAACGGATTTG	123
		545-567	TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA	
rGAPDH	NM_017008.4	804-821	GACATGCCGCCTGGAGAA	92
		876-895	AGCCCAGGATGCCCTTTAGT	

3-2-2. ウェスタンブロット

HT22 細胞を 6-well plate に播種し、1 日培養後に各薬物で処理した。細胞を 2 × SDS サンプルバッファーで超音波破碎し、タンパク質濃度を測定後、終濃度 5% の 2-メルカプトエタノールを添加し、100°C で 5 分間熱処理した。タンパク質の濃度測定は γ -グロブリンを標準とし、DC Protein Assay Kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA, Cat# 5000111JA) を使用して測定した。サンプルは各レーンに 25 μ g のタンパク質となるように調製し、SDS ポリアクリルアミドゲルで電気泳動後、ニトロセルロース膜 (GE Healthcare Life Sciences, Bluckinghamshire, England) に転写した。検出には一次抗体として、抗 GCLC 抗体 (1:500, mouse monoclonal, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA, RRID:AB_2736837)、抗 GCLM 抗体 (1:1000, mouse monoclonal, Santa Cruz Biotechnology, sc-55586)、抗 NQO1 抗体 (1:1000, rabbit monoclonal, Abcam, RRID:AB_1603750)、抗 GAPDH 抗体 (1:5000, mouse monoclonal, Acris Antibodies, San Diego, CA, USA, RRID:AD_1616730)、二次抗体として抗 IgG-HSP 抗体 (1:2000, Cell signaling Technology, Beverly, MA, USA, RRID:AB_2099233, RRID:AB_330924) を使用した。目的タンパク質のバンド検出には enhanced chemiluminescence (GE Healthcare Life Sciences, Cat# RPN2106)、定量には Bio Image Intelligent Quantifer (Bio Image Systems, Jackson, MI, USA) を使用した。

3-2-3. ラット GCLC プロモーターコンストラクトの作製

各長さのラット GCLC プロモーターは 2.5 μ g の rat genomic DNA (Novagen, Madison, WI, USA) を鋳型として PrimeSTAR HS DNA polymerase (Takara Bio, Shiga, Japan) を用い

て増幅した。PCR 条件は denaturation ステップ 98°C で 10 秒、annealing ステップ 58°C で 5 秒、extension ステップ 72°C で 60 秒を 25-36 サイクルとした。使用したプライマーは第 1 章の表 1 に記載した。各 PCR 産物は pGL3-Basic (Promega Corporation, Madison, WI, USA) の *Mlu*I と *Xho*I の制限認識部位に組み込みサブクローニングした。GCLC (-3609/+2) のプロモーターは増幅した GCLC (-3609/-1512) 断片を *Sac*I と *Eco*T22I で切断し、GCLC (-1764/+2)-pGL3-Basic に挿入して作製した。GCLC (-5001/+2) のプロモーターは増幅した GCLC (-5001/-3584) 断片を *Sac*I で切断し、GCLC (-3609/+2)-pGL3-Basic に挿入して作製した。各プロモーターの塩基配列は NCBI Reference Sequence の NC_005107.2. を参照し、確認した。

3-2-4. ルシフェラーゼ活性の測定 (Transient transfection)

1.5×10⁴/well の密度で 48-well plate で一晩増殖させた HT22 細胞 に、Lipofectamine™ LTX 試薬 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA, Cat# 15338100) のプロトコルに従って、内部標準としてウミシイタケルシフェラーゼをコードする発現プラスミドである pGL4.70[hRluc] (Promega Corporation, Madison, WI, USA) を 20 ng と各 pGL3-ルシフェラーゼレポーター 180 ng を添加し、遺伝子導入を行った。6-8 時間後、細胞を通常の増殖用培地に戻し、被験物質を添加した。細胞をさらに 16 時間インキュベートし、1 well あたり 50 μL の 1 × Passive Lysis Buffer (Promega Corporation) を加えて回収した。各ルシフェラーゼ活性は Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega Corporation, Cat# E1500) を用いて測定した。ホタルルシフェラーゼの数値はウミシイタケルシフェラーゼの数値を基準として、相対ルシフェラーゼ活性として算出した (RLA)。

3-2-5. 統計処理

2-2-5 と同様の方法で行った。

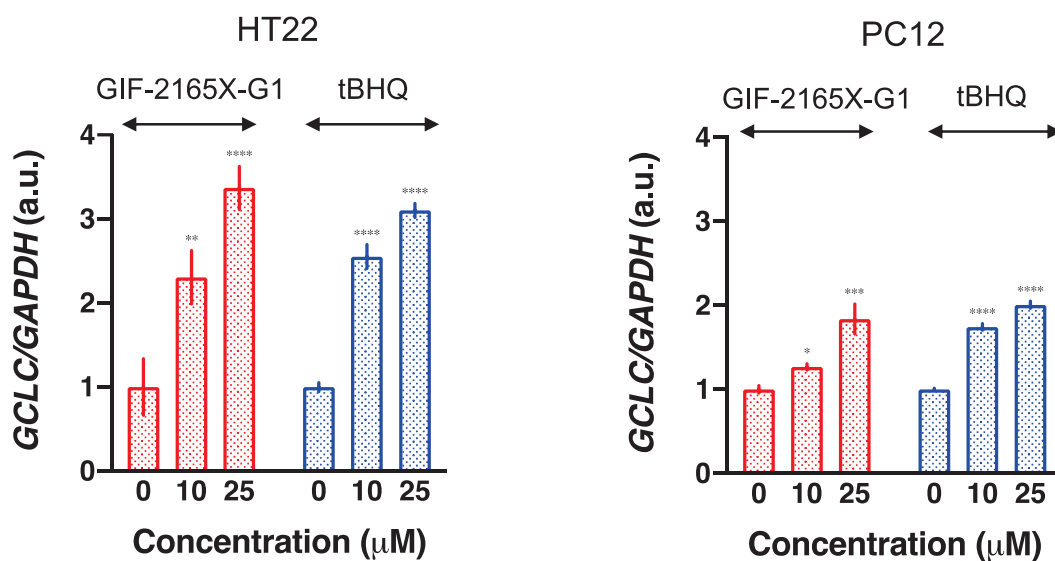
3-3. 結果

3-3-1. HT22, PC12 および C6 細胞における GIF-2165X-G1 および tBHQ の GCLC 転写活性への影響

初めに、GCLC プロモーターの活性化を誘導する GIF-2165X-G1 が遺伝子レベルで GCLC の転写を誘導するかを調べた。使用した細胞は HT22、PC12 (ラット副腎髄質褐色細胞腫)、および C6 (ラット神経膠腫細胞)である。実験では、GIF-2165X-G1 処理により誘導された GCLC mRNA 量と、一般的な Nrf2 誘導物質である tBHQ の応答性を測定し比較した。その結果、GIF-2165X-G1 と tBHQ は、HT22 細胞において 10~25 μ M で GCLC の mRNA 発現を強く増加させた。PC12 細胞と C6 細胞では、HT22 細胞を用いた場合よりも GIF-2165X-G1 および tBHQ による GCLC mRNA の増加の程度は減少したものの、GCLC mRNA の有意な増加がみられた (図 12A)。これらの結果から、GIF-2165X-G1 がマウスおよびラットの細胞において GCLC 転写活性を誘導することが明らかとなった。

また、最も効果的な作用を示した HT22 細胞を GIF-2165X-G1 で処理し、ウェスタンブロットにて GCLC、GCLM および NQO1 のタンパク質発現への影響を検討したところ、GIF-2165X-G1 の処理によって濃度依存的なタンパク量の増加がみられた (図 12B)。

A



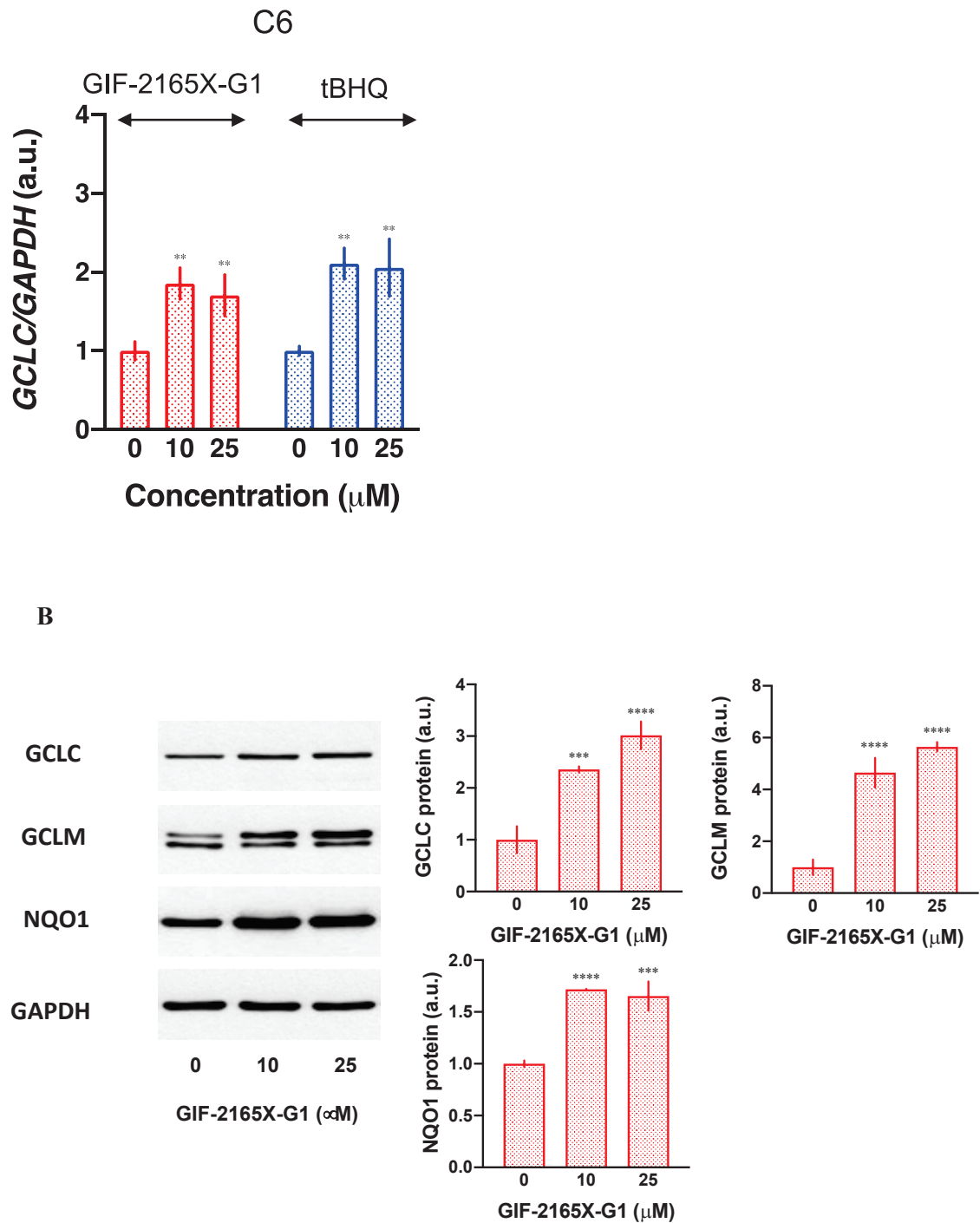


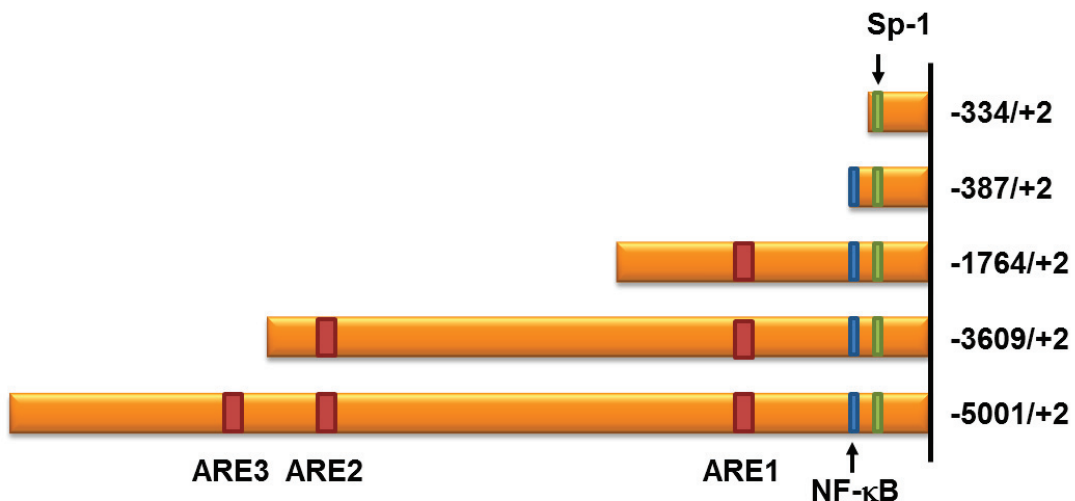
図 12. (A) HT22、PC12、C6 細胞における GIF-2165X-G1 および tBHQ の GCLC mRNA 発現への影響 (B) GIF-2165X-G1 のタンパク質発現への影響
 A) 各細胞を、記載した濃度の GIF-2165X-G1 または tBHQ で 8 時間処理し、GCLC mRNA 量をリアルタイム PCR 法を用いて測定した。GCLC mRNA 発現量は各サンプルごとに GAPDH の数値で補正した (平均値±SD, n=4)。B) 各細胞を、記載した濃度の GIF-2165X-

G1 で 24 時間処理し、GCLC、GCLM および NQO1 タンパク質をウエスタンブロット法を用いて測定した。(平均値±SD, n=3, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001)

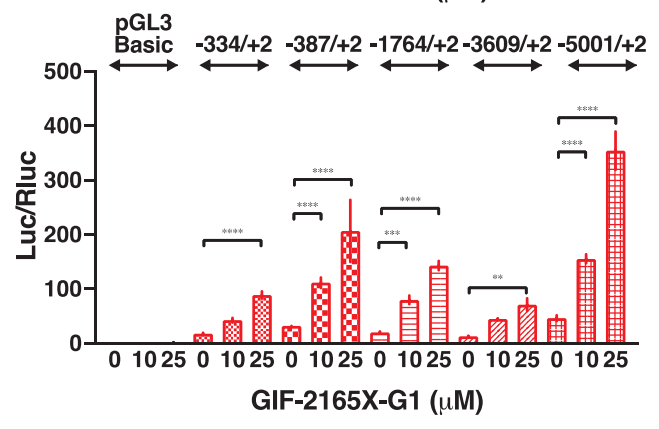
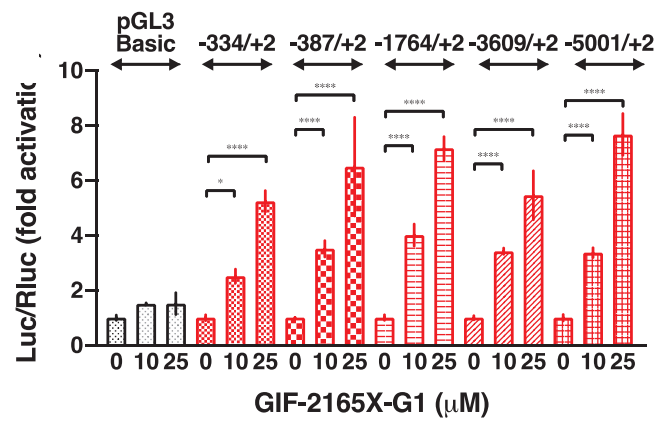
3-3-2. GIF-2165X-G1 と tBHQ の様々な長さの GCLC プロモーター領域に対する影響

ラット GCLC プロモーターにおける GIF-2165X-G1 の応答性領域の位置を解析するために、5'側の長さを変えた様々なコンストラクトを作製した (-334/+2、-387/+2、-1764/+2、-3609/+2 および -5001/+2 ; 図 13A)。各コンストラクトを組み込んだレポータープラスミドを一過性に HT22 細胞に導入し、GIF-2165X-G1 で処理し、GCLC プロモーター活性を測定したところ、GIF-2165X-G1 は、プロモーターの長さに関係なく、すべてのコンストラクトにおいて濃度依存的に GCLC プロモーター活性を増加させた(図 13 B)。また、tBHQ も同様の方法 GCLC レポーター活性を測定したところ、tBHQ は約 3.6 kb までのコンストラクトでは GCLC プロモーター活性に影響を与えず、GCLC (-5001/+2) のルシフェラーゼ活性を 1.6 倍に増加させただけであり、比較対象として測定した ARE プロモーター活性への影響とは対照的であった (図 13 C)。

A



B



C

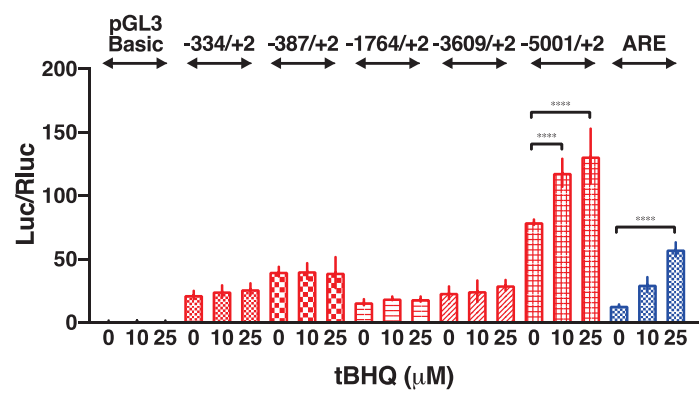
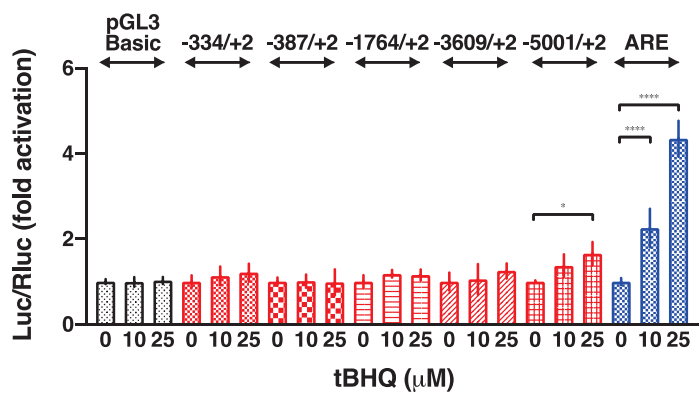


図 13. A) 実験に用いた GCLC プロモーターの模式図

B, C) 異なる長さの GCLC プロモーターに対する GIF-2165X-G1 および tBHQ の影響

HT22 細胞を、ホタルルシフェラーゼおよびウミシイタケルシフェラーゼレポータープラスミドを約 8 時間一過性にトランスフェクションし、GIF-2165X-G1 および tBHQ を各濃度でさらに 16 時間処理した後、ルシフェラーゼ活性を測定した。(平均値 \pm SD, n=4, * $p < 0.05$, **** $p < 0.0001$) 上のグラフは各コンストラクトのコントロールに対する相対的な増加比率を示した。下のグラフは各コンストラクトについて、ルシフェラーゼ活性の測定値を示した。

3-4. 考察

GIF-2165X-G1 の GCLC への影響をリアルタイム PCR による GCLC mRNA の発現、ウエスタンブロットによるタンパク質発現、ラット GCLC プロモーターの応答性領域の解析により評価した。GIF2165X-G1 は、第 2 章にて GCLC (-1764/+2) プロモーター活性を強く誘導することが明らかとなったが、本章で、その誘導能はマウス、ラットの種差を問わず GCLC mRNA の発現を増加させ、それに伴ってタンパク質レベルでも GCLC の発現量を増加させることが明らかとなった。GIF-2165X-G1 は GCLC に加えて、GCLM および NQO1 の発現を増加させた。我々は、GIF-2165X-G1 が ARE の活性化剤であることをすでに報告しているが、tBHQ と同様に Nrf2-ARE 経路を介した複数の抗酸化酵素を誘導することが裏付けられた。しかし、GSH 生合成の律速酵素である GCLC が増加するにも関わらず、GIF-2165X-G1 は細胞内 GSH 量には影響しない (Hirata et al., 2020)。これは、GSH の産生が最終生成物の GSH によって負のフィードバック制御により調節されているため、一定量の GSH 量が存在する一般的な細胞内では、更なる GSH 産生が促されないためと考えられる。細胞内 GSH を下げるために、L-buthionine (S,R)-sulfoximine (BSO) による GCL の活性阻害の方法が挙げられるが、BSO は標的とする GCL を不可逆的に阻害してしまうため、GIF-2165X-G1 の GSH 産生能の評価には適していなかった (data not shown)。

GCLC プロモーターの -334/+2、-387/+2、-1764/+2、-3609/+2 および -5001/+2 のコンストラクトを組み込んだレポータープラスミドで GCLC プロモーター活性を測定したところ、GIF-2165X-G は、プロモーターの長さに関係なく、すべてのコンストラクトにおいて濃度依存的に GCLC プロモーター活性を増加させた。齧歯類とヒト

GCLC プロモーター領域は、同様の制御機構を共有していることが明らかとなっている (Lu, 2013)。ヒト GCLC プロモーターでは、コンセンサス配列 NF- κ B、Sp-1、アクチベータープロテイン-1 (AP-1)、AP-2、金属応答 (MRE) および ARE/EpRE が同定されている (Yang et al., 2001; Shenvi et al., 2009; Lu, 2013)。tBHQ は、図 13 A で示された ARE3 を持つ (-5009/+2) GCLC プロモーター活性を上昇させたことからラット GCLC プロモーターの Nrf2-ARE 経路の活性化による GCLC の制御は ARE3 を介することが示された。これは -3 kb までの領域にある ARE1 および ARE2 は抗酸化剤応答配列として機能しないというこれまで知見と一致していた (Li et al., 2009; Shenvi et al., 2009)。一方で、GIF-2165X-G1 は ARE 配列の有無を問わず一様に GCLC プロモーター活性を上昇させていることから、GIF-2165X-G1 の GCLC プロモーターへの影響は Nrf2-ARE 経路には依存しないことが示唆された。

第4章 GIF-2165X-G1 の GCLC 誘導機構の解析

4-1. 緒言

第3章では GIF2165X-G1 が GCLC を上方制御することを明らかとし、抗酸化剤 tBHQ との比較によって、GIF2165X-G1 の GCLC プロモーター活性の誘導は Nrf2-ARE 経路とは別の経路によるものであることが示唆された。本章では Nrf2 をノックアウトした HT22 を用いて GIF-2165X-G1 の GCLC プロモーター活性の誘導機構をより詳細に検討した。さらに、GIF-2165X-G1 の応答領域を特定するために Sp1 結合配列を欠損させた (-308/+2) GCLC プロモーターを作製した。

4-2. 実験材料および実験方法

4-2-1. リアルタイム PCR

3-2-1 と同様の方法で行った。

4-2-2. ラット GCLC プロモーターコンストラクトの作製

各長さのラット GCLC プロモーターは 2.5 μ g の rat genomic DNA (Novagen, Madison, WI, USA) を鋳型として PrimeSTAR HS DNA polymerase (Takara Bio, Shiga, Japan) を用いて増幅した。PCR 条件は denaturation ステップ 98°C で 10 秒、annealing ステップ 58°C で 5 秒、extension ステップ 72°C で 60 秒を 25-36 サイクルとした。使用したプライマーは第1章の表1に記載した。各 PCR 産物は pGL3-Basic (Promega Corporation, Madison, WI, USA) の *Mlu* I と *Xho* I の制限部位に組み込みサブクローニングした。

4-2-3. ルシフェラーゼ活性の測定 (Transient transfection)

3-2-4 と同様の方法で行った。

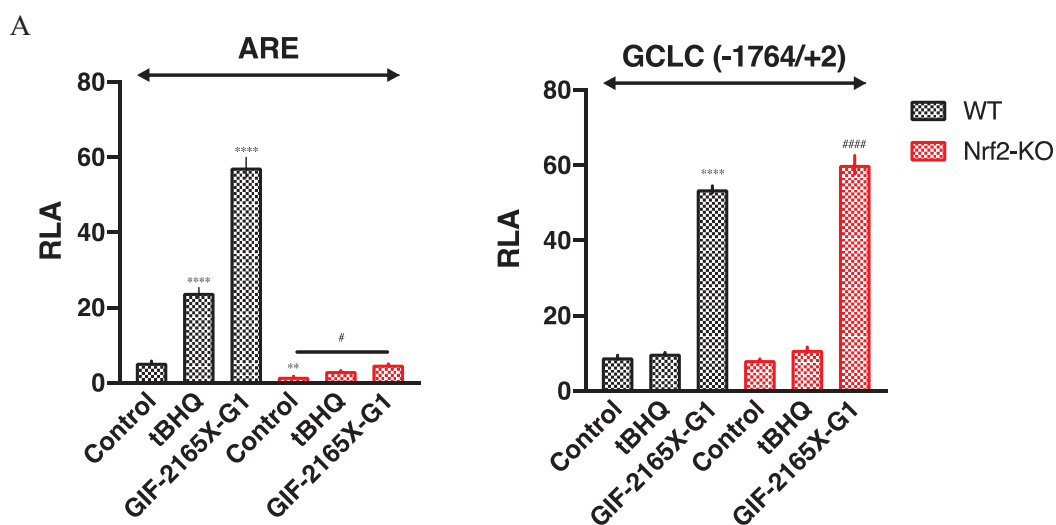
4-2-4. 統計処理

2-2-5 と同様の方法で行った。

4-3. 結果

4-3-1. Nrf2-KO HT22 細胞における GIF-2165X-G1 の GCLC 転写活性に及ぼす影響

GCLC 転写調節における Nrf2-ARE 経路の関与を詳細に検証するために、Nrf2 ノックアウト HT22 (Nrf2-KO HT22) 細胞を用いた (Hirata et al., 2020)。図 14 A に示すように tBHQ および GIF-2165X-G1 による ARE レポーター活性の上昇は、Nrf2-KO HT22 細胞においてほぼ完全に遮断され、Keap1-Nrf2-ARE 経路が Nrf2-KO HT22 細胞において機能していないことを確認した。Nrf2-KO HT22 細胞と野生型 HT22 細胞を用いて、GIF-2165X-G1 の GCLC (-1764/+2) プロモーターへの影響を比較したところ、GIF-2165X-G1 は、野生型 HT22 細胞と Nrf2-KO HT22 細胞の両方で GCLC プロモーター活性を増加させた (図 14 A)。また、同様に GCLC mRNA 量を測定したところ、Nrf2-KO HT22 細胞では、GIF-2165X-G1 による GCLC mRNA の誘導が野生型 HT22 細胞と比較すると弱くなったものの、有意な GCLC mRNA の増加が確認できた (図 14B)。これら結果から、HT22 細胞における GIF-2165X-G1 の GCLC 発現に対する効果は、Keap1-Nrf2-ARE 経路に依存しているわけではないことが示唆された。一方、第 2 相酵素に分類されている抗酸化酵素の一つであるヘムオキシゲナーゼ-1 (HO-1) の mRNA 発現は完全に Nrf2 に依存していた (図 14 B)。



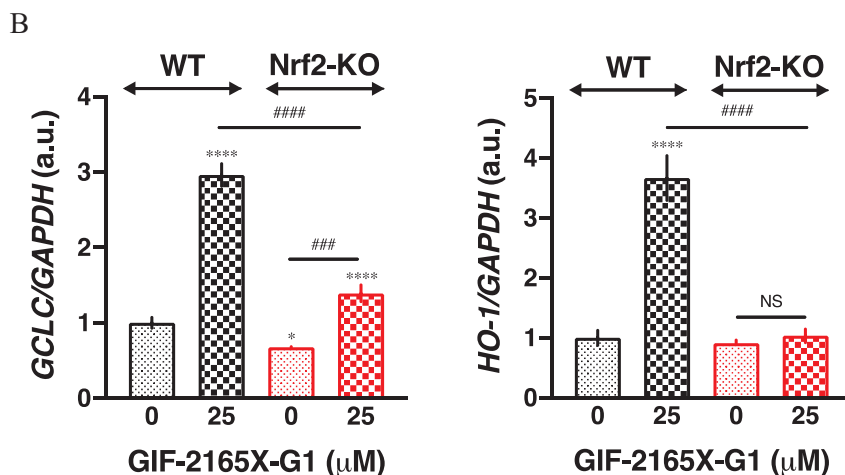


図 14. Nrf2-KO HT22 細胞における GIF-2165X-G1 の GCLC 発現誘導への影響

A) Nrf2-KO HT22 細胞における GIF-2165X-G1 と tBHQ の ARE および GCLC (-1764/+2) プロモーターに対する効果。野生型 HT22 および Nrf2-KO HT22 細胞に ARE または GCLC (-1764/+2) を組み込んだホタルルシフェラーゼおよび内部標準としてウミシイタケルシフェラーゼレポータープラスミドを約 8 時間トランスフェクトした後、25 μM の GIF-2165X-G1 または tBHQ でさらに 16 時間処理し、ルシフェラーゼ活性を測定した。B) Nrf2-KO HT22 細胞における GIF-2165X-G1 の GCLC および HO-1 mRNA 発現量に対する効果。野生型 HT22 および Nrf2-KO HT22 細胞を 25 μM の GIF-2165X-G1 で 8 時間処理し、GCLC および HO-1 の mRNA 量をリアルタイム PCR 法で測定した。(平均値±SD, n=4, vs Control, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001, #p<0.05, ###p<0.01, #####p<0.0001, NS: not significant)

4-3-2. Nrf2-KO HT22 細胞における GIF-2165X-G1 の様々な長さの GCLC プロモーターへの影響

次に野生型 HT22 細胞および Nrf2-KO HT22 細胞に、様々な長さの GCLC プロモーターを組み込んだルシフェラーゼレポータープラスミドを一過性にトランスフェクトし、ルシフェラーゼ活性の変化を測定した。野生型 HT22 細胞および Nrf2-KO HT22 細胞における各コンストラクトのプロモーター活性を比較すると、Nrf2-KO HT22 細胞では GCLC (-5001/+2) のルシフェラーゼ活性が著しく低下していた (図 15 A)。続いて、各細胞を GIF-2165X-G1 で処理したところ、両細胞において GCLC プロモーターの長さに関わらずルシフェラーゼ活性が上昇した (図 15 B)。また、GIF-2165X-G1 で誘導され

るルシフェラーゼ活性の強さに細胞間の違いは見られなかったが、両細胞では GCLC(-334/+2) のルシフェラーゼ活性は GCLC (-387/+2) の 1/2 程度に低下した (図 15 B)。

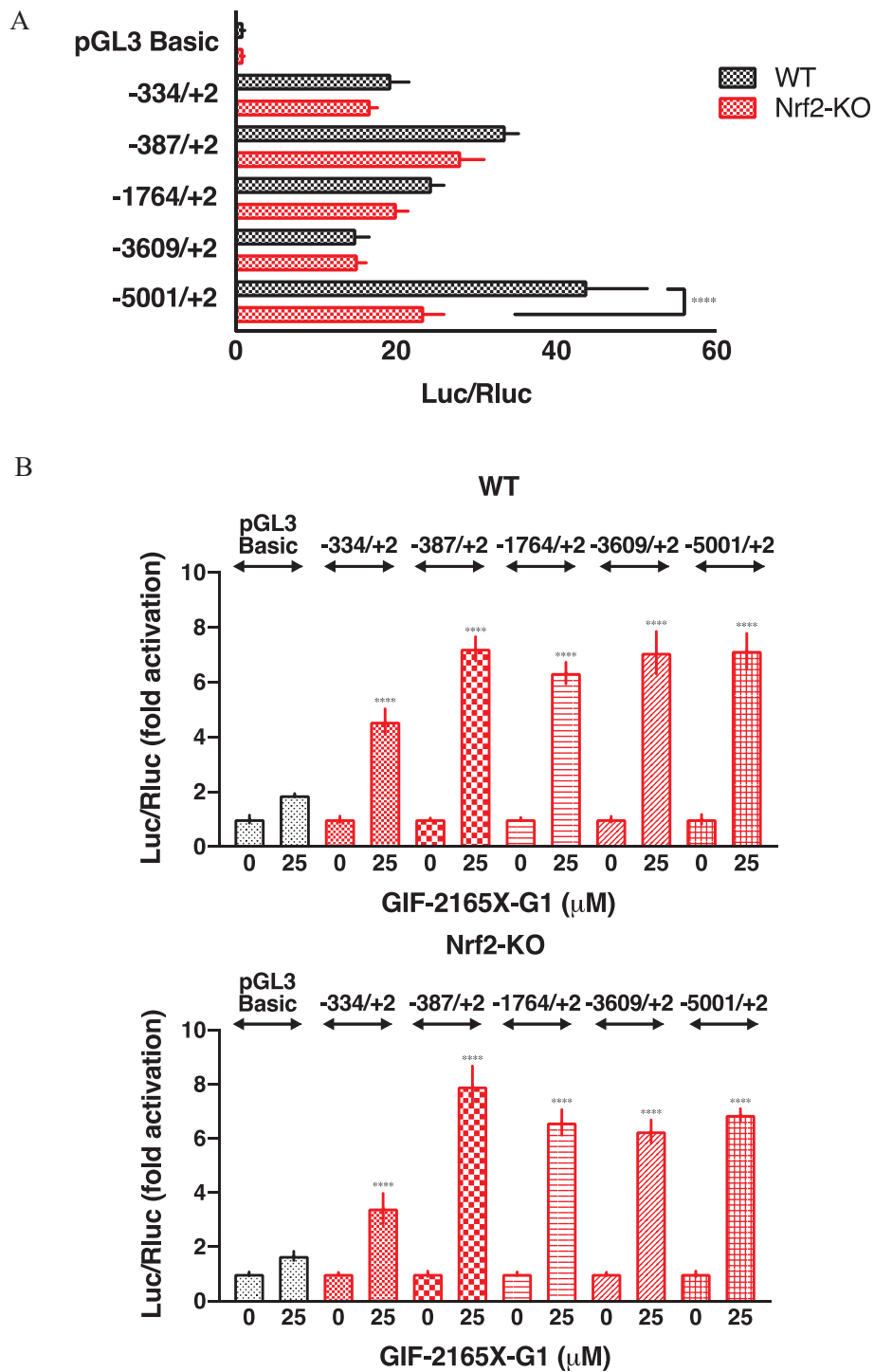
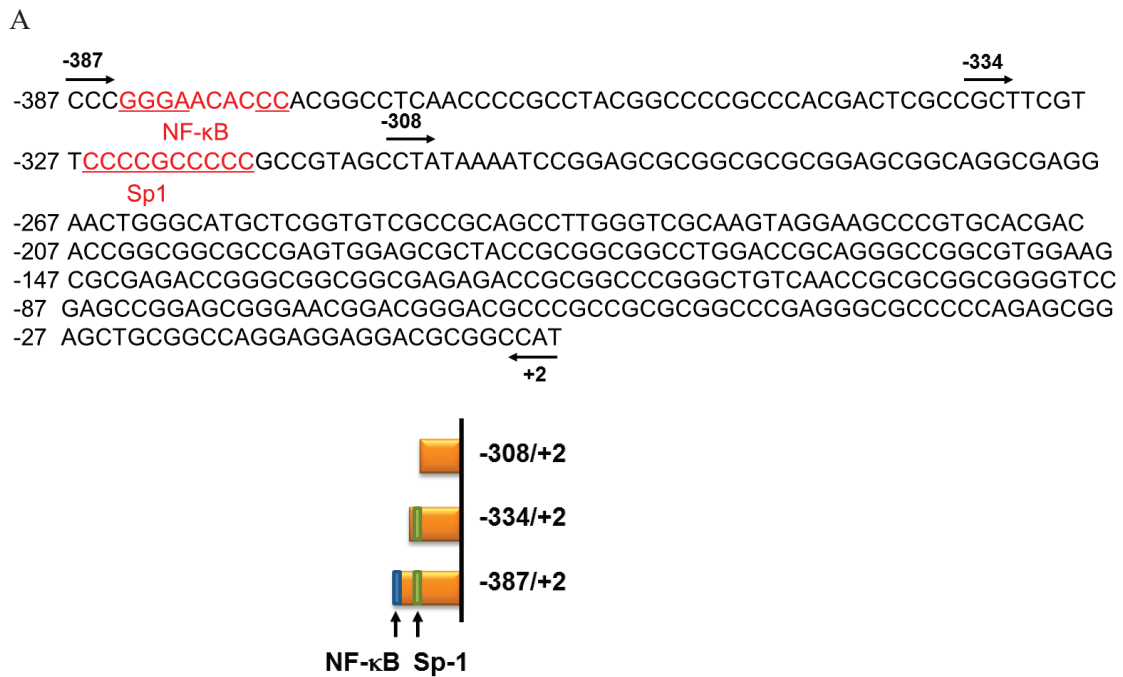


図 15. 野生型 HT22 細胞および Nrf2-KO HT22 細胞における様々な長さの GCLC プロモーター活性

- A) 各細胞にホタルルシフェラーゼおよびウミシイタケルシフェラーゼレポータープラスミドを一過性にトランスフェクションし、8時間後にルシフェラーゼ活性を測定した。
- B) 各細胞にホタルルシフェラーゼおよびウミシイタケルシフェラーゼレポータープラスミドで一過性にトランスフェクションし、8時間後に GIF-2165X-G1 または tBHQ を記載された濃度で 16 時間処理した。(平均値±SD, n=4, **** p<0.0001)

4-3-3. GIF-2165X-G1 による GCLC 転写誘導への Sp1 結合配列の関与

最後に、GIF2165X-G1 の GCLC 転写活性における転写因子 Sp1 の関連を明らかにするために、GCLC プロモーターの転写開始部位に位置する Sp1 結合配列の役割を検討した (図 16A)。Sp1 結合配列を含む GCLC (-334/+2) プロモーターでは、GIF-2165X-G1 に対する応答が見られたが、Sp1 結合配列を持たない GCLC (-308/+2) プロモーターでは GIF-2165X-G1 によるルシフェラーゼ活性は、GCLC プロモーターを含まない空ベクターと同程度にまで低下した (図 16 B)。



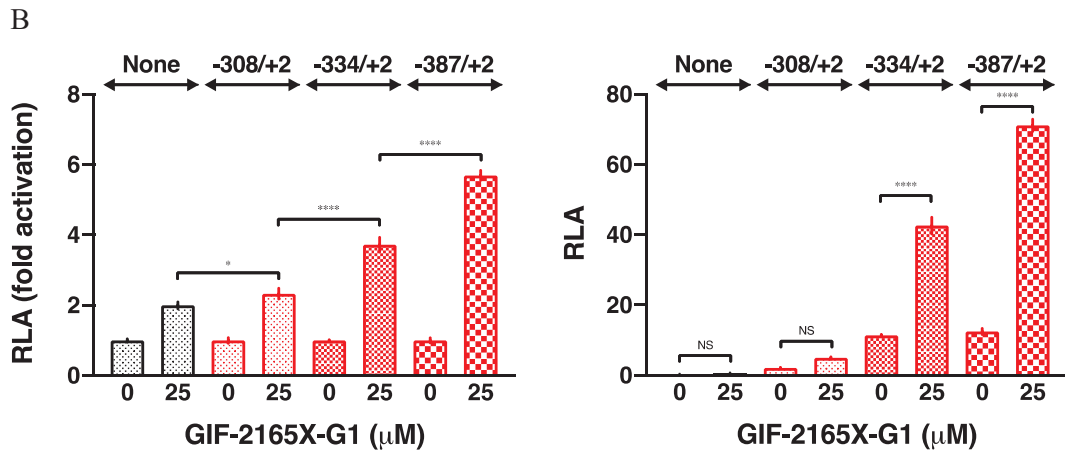


図 16. GIF-2165X-G1 による GCLC プロモーター活性化に及ぼす Sp1 結合配列の影響
 A) GCLC 5'側 (-387/+2) のヌクレオチド配列。 B) Sp1 結合配列を欠損させた GCLC プロモーターに対する GIF-2165X-G1 の GCLC プロモーター活性の評価。野生型 HT22 細胞に、ホタルルシフェラーゼおよびウミシイタケルシフェラーゼレポータープラスミドを一過性にトランスフェクションし、8 時間後に GIF-2165X-G1 を記載した濃度で 16 時間処理した。(平均値±SD, n=4, vs Control, *p<0.05, ***p<0.001, ****p<0.0001, NS: not significant)

4-4. 考察

第 3 章では GIF2165X-G1 が GCLC 転写を増加させることを明らかにした。GCLC プロモーター活性を高める抗酸化剤 tBHQ が GCLC プロモーターにおける ARE3 の配列を必要とし、Nrf2-ARE 経路に依存した作用機序を持つのに対し、GIF2165X-G1 の GCLC プロモーター活性の誘導は Nrf2-ARE 経路には依存しないことが示唆された。本章では Nrf2-KO HT22 を使用し、GIF2165X-G1 による GCLC 転写の活性化と Nrf2-ARE 経路との関連をより詳細に調べ、GIF-2165X-G の GCLC 転写誘導の経路を明らかにすることを目的とした。

野生型 HT22 細胞と Nrf2-KO HT22 細胞を GIF-2165X-G で処理し、HO-1 と GCLC の mRNA をリアルタイム PCR で測定したところ、Nrf2-KO HT22 細胞では、HO-1 の mRNA 誘導は消失したのに対し、GCLC の mRNA 誘導は消失しなかった。また、野生型 HT22 および Nrf2-KO HT22 細胞における GCLC のプロモーター活性は、プロモーターの長さにかかわらず、GIF-2165X-G1 で処理することで上昇した。このことから、HO-1 および GCLC のタンパク質は第 2 相酵素に分類され、同様に Nrf2 に依存して発現が

制御されていると考えられてきたが、HO-1 はより厳密に Nrf2 に依存した発現誘導がされていたのに対し、GCLC の転写活性は Nrf2 以外の因子によっても誘導されることが示された。特に GIF-2165X-G1 による GCLC の転写活性の増加は Nrf2-ARE 経路とは無関係に誘導されていることが示唆された。Lu らの報告では、TNF- α の添加によるラット GCLC の誘導では、NF- κ B や AP-1 が GCLC の基礎的な転写活性に影響していることを示唆している (Yang et al., 2005)。本研究でも、NF- κ B の結合部位の欠落によって、GIF-2165X-G1 の GCLC プロモーター活性が弱くなることが確認されたことから、GIF-2165X-G1 には NF- κ B の活性化剤としての可能性が考えられた。そのため、ルシフェラーゼアッセイによる転写活性に対する NF- κ B の阻害剤の影響や、ウエスタンブロット法による NF- κ B の核移行に対する I κ B リン酸化の影響などを検討したが、GIF2165X-G1 が NF- κ B の活性化を誘導する知見は得られなかった (data not shown)。

また、GIF2165X-G1 による GCLC 遺伝子の転写活性化に、Sp1 結合配列が関与することを GCLC プロモーター領域 (-387~-308) の解析により明らかにした。転写因子 Sp1 は、哺乳類細胞内でユビキタスに発現しており、様々なハウスキーピング遺伝子や誘導性遺伝子の転写制御に関与している (O'Connor et al, 2016)。今回の結果から、Sp1 結合配列 (5'-CCCGCCC-3', -326~-318) が GIF2165X-G1 による GCLC 遺伝子の誘導活性化に関与していることが明らかになった。これまでの報告によると、ヒト GCLC プロモーターの GC リッチ領域が、ケルセチンによる GCLC の発現誘導に必要であることが明らかになっている (Kang et al., 2009)。ケルセチンおよびクルクミンの両方は、活性酸素種を消去することにより酸化ストレスを減少させる作用と、GCL を含む抗酸化関連遺伝子を調節することにより内因性抗酸化防御システムの増強をするなど、共通の性質を持つポリフェノール化合物である (Moskaug et al., 2005; Uddin et al., 2020)。Sp1 結合配列への応答も同様であることは興味深い知見である。

以上の結果より本研究は、GSH による抗酸化防御機構において、Keap-1-Nrf2-ARE 経路に加えて、転写因子 Sp1 の活性化が重要な因子となりうることを示唆した。また、GIF-2165X-G1 は酸化ストレス関連疾患の治療薬の開発において、有用なツールとなることが期待できる。

第5章 総括

アルツハイマー病とパーキンソン病は、神経変性疾患の中で最も患者数が多く、超高齢化社会となった日本において、経済的および社会的に大きな課題となっている。しかし、神経変性疾患の発症メカニズムの詳細は明確になっておらず、完治させる治療法もいまだに確立されていない。細胞内抗酸化物質である GSH の欠乏はアルツハイマー病、パーキンソン病などの神経変性疾患および統合失調症などの神経精神疾患を含む様々な疾患の病態形成において重要とされる酸化ストレスに直接関与していることが報告されている。本研究では、GSH 生合成を制御している GCLC を標的として、GCLC プロモーター活性を指標にしたスクリーニングにより、神経保護剤の候補であるオキシインドール化合物の中で、GCLC の発現を増強させる化合物の探索を行った、その結果、GCLC の転写を強力に誘導する化合物 GIF-2165X-G1 を見出し、GIF-2165X-G1 による GCLC 誘導機構を解析した。

ラット GCLC プロモーター領域 (-1764/+2) を有するレポータープラスミドを HT22 細胞に発現させ、GCLC プロモーターを活性化する新規オキシインドール誘導体を探索した。220 個のオキシインドール誘導体のうち、5 個の化合物 GIF-0726-r、GIF-0885-r、GIF-2017、GIF-2127-r および GIF-2165X-G1 の効果が強く、HT22 細胞において濃度依存的に GCLC プロモーター活性を増加させた。最も強い効果をもつ GIF-2165X-G1 はオキシインドール-クルクミンハイブリッド化合物であり、GIF-2165X-G1 とクルクミンは、スーパーオキシドアニオンを消去する能力、ARE-Nrf2-Keap 経路を活性化する能力および鉄をキレートする能力において共通の特徴を有していたが、クルクミンは HT22 細胞に添加した際、25 μ M 以上の濃度で、強い細胞毒性を示したのに対し、GIF-2165X-G1 は 25~50 μ M の濃度で GCLC プロモーターを 6 倍程度に活性化したことから、クルクミン単独の構造よりもオキシインドールの骨格を持つ GIF-2165X-G1 は、GCLC プロモーターを活性化し、クルクミンによる細胞毒性が軽減された有益な化合物であることが示された。

次に GIF-2165X-G1 の GCLC 転写への影響を、リアルタイム PCR による GCLC mRNA、ウエスタンブロットによる GCLC タンパク質発現およびラット GCLC プロモーターにおける応答性領域の解析により評価した。その結果、GIF-2165X-G1 はマウス、ラットの種差を問わず GCLC mRNA の発現量を増加させ、それに伴ってタンパク質レベルでも GCLC の発現量を増加させることが明らかとなった。GIF-2165X-G1 は ARE の活性化剤でもあることから、Nrf2-ARE 経路を介した抗酸化酵素の発現を促す tBHQ と

同様に、GCLC プロモーター上の ARE 配列 (ARE3) に作用していると推測した。しかし、GIF-2165X-G1 は ARE 配列の有無を問わず一様に GCLC プロモーター活性を上昇させ、GIF-2165X-G1 の GCLC プロモーターへの影響は Nrf2-ARE 経路には依存しないことが示唆された。Nrf2-KO HT22 細胞株を使用し、GIF2165X-G1 による GCLC 転写活性と Nrf2-ARE 経路との関連をより詳細に調べたところ、Nrf2-KO 細胞においても GIF-2165X-G1 による GCLC 転写誘導が見られた。このことから、GIF-2165X-G1 による GCLC 転写誘導は Nrf2-ARE 経路とは無関係であることが明らかとなった。

さらに、様々な長さの GCLC プロモーターを用いて解析を行った結果、Sp1 結合配列 (5'-CCCGCCC-3', -326~-318) が GIF2165X-G1 による GCLC 遺伝子の誘導に関与していることが明らかになった。GIF-2165X-G1 が Sp1 に作用することで GCLC 転写を誘導させることから、GSH による抗酸化防御機構において、Keap1-Nrf2-ARE 経路に加えて、転写因子 Sp1 の活性化が重要な要素となることが明らかとなった。従って、酸化ストレス関連疾患治療薬の開発においても Sp1 は重要な標的となることが期待できる。

本研究により、オキシインドール-クルクミンハイブリッド化合物である GIF2165X-G1 は、Nrf2 活性化剤であるにも関わらず、Nrf2-ARE 経路ではなく転写因子 Sp1 を介して GCLC の転写活性を増加させることが明らかとなった (図 17)。今後、酸化ストレス関連疾患の治療における、GCLC の発現誘導の意義を明らかにするために、さらなる研究が必要である。

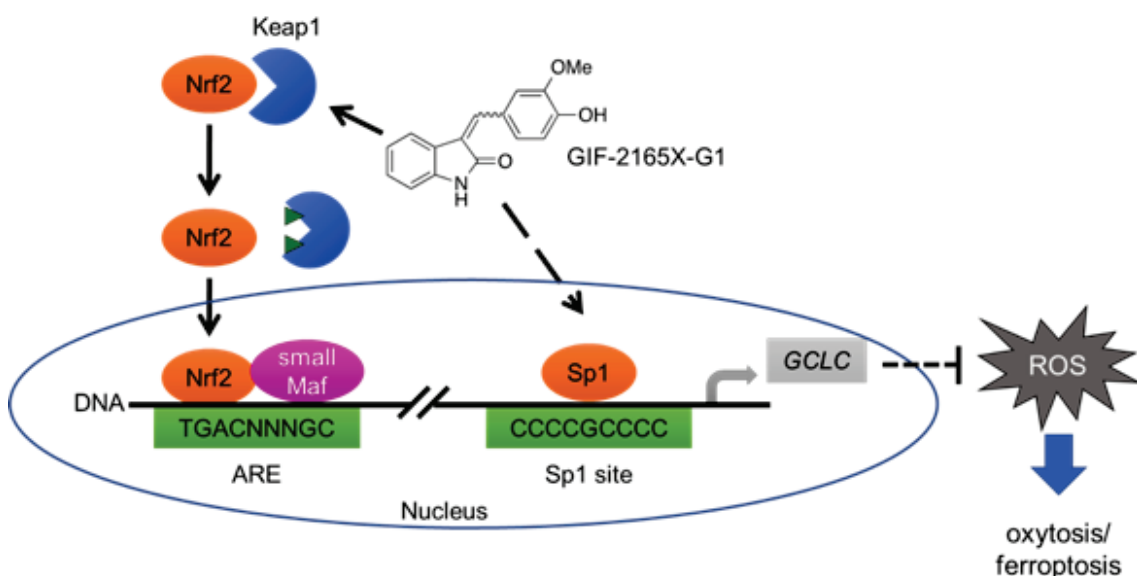


図 17. GIF-2165X-G1 による GCLC 誘導機構

参考文献

- Aydin AF, Küçükgergin C, Ozdemirler-Erata G, Koçak-Toker N, Uysal M, The effect of carnosine treatment on prooxidant-antioxidant balance in liver, heart and brain tissues of male aged rats, *Biogerontology*, 11, 103-9 (2010).
- Bavarsad Shahripour R, Harrigan MR, Alexandrov AV, N-acetylcysteine (NAC) in neurological disorders: mechanisms of action and therapeutic opportunities, *Brain Behav*, 4, 108-122 (2014).
- Begum AN, Jones MR, Lim GP, Morihara T, Kim P, Heath DD, Rock CL, Pruitt MA, Yang F, Hudspeth B, Hu S, Faull KF, Teter B, Cole GM, Frautschy SA, Curcumin structure-function, bioavailability, and efficacy in models of neuroinflammation and Alzheimer's disease, *J Pharmacol Exp Ther*, 326, 196-208 (2008).
- Berk M, Malhi GS, Gray LJ, Dean OM, The promise of N-acetylcysteine in neuropsychiatry, *Trends Pharmacol Sci*, 34, 167-177 (2013).
- Biswas SK, McClure D, Jimenez LA, Megson IL, Rahman I, Curcumin induces glutathione biosynthesis and inhibits NF- κ B activation and interleukin-8 release in alveolar epithelial cells: mechanism of free radical scavenging activity, *Antioxid Redox Signal*, 7, 32-41 (2005).
- Burton GJ, Jauniaux E, Oxidative stress, *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 25, 287-299 (2011).
- Cao J, Jia L, Zhou HM, Liu Y, Zhong LF, Mitochondrial and nuclear DNA damage induced by curcumin in human hepatoma G2 cells, *Toxicol Sci*, 91, 476-83 (2006).
- Chen ZH, Saito Y, Yoshida Y, Sekine A, Noguchi N, Niki E, 4-Hydroxynonenal induces adaptive response and enhances PC12 cell tolerance primarily through induction of thioredoxin reductase 1 via activation of Nrf2, *J Biol Chem*, 280, 41921-41927 (2005).
- Cole GM, Morihara T, Lim GP, Yang F, Begum A, Frautschy SA, NSAID and antioxidant prevention of Alzheimer's disease: lessons from in vitro and animal models, *Ann N Y Acad Sci*, 1035, 68-84 (2004).

Dickinson DA, Levonen AL, Moellering DR, Arnold EK, Zhang H, Darley-Usmar VM, Forman HJ, Human glutamate cysteine ligase gene regulation through the electrophile response element, *Free Radic Biol Med*, 37, 1152-1159 (2004).

Emir UE, Raatz S, McPherson S, Hodges JS, Torkelson C, Tawfik P, White T, Terpstra M, Noninvasive quantification of ascorbate and glutathione concentration in the elderly human brain, *NMR Biomed*, 24, 888-894 (2011).

Forman HJ, Davies KJ, Ursini F, How do nutritional antioxidants really work: nucleophilic tone and para-hormesis versus free radical scavenging in vivo, *Free Radic Biol Med*, 66, 24-35 (2014).

Franklin CC, Backos DS, Mohar I, White CC, Forman HJ, Kavanagh TJ, Structure, function, and post-translational regulation of the catalytic and modifier subunits of glutamate cysteine ligase, *Mol Aspects Med*, 30, 86-98 (2009).

Furuta K, Kawai Y, Mizuno Y, Hattori Y, Koyama H, Hirata Y, Synthesis of 3-[4-(dimethylamino)phenyl]alkyl-2-oxindole derivatives and their effects on neuronal cell death, *Bioorg Med Chem Lett*, 27, 4457-4461 (2017).

Furuta K, Mizuno Y, Maeda M, Koyama H, Hirata Y, Synthesis of 3-arylmethyl-2-oxindole derivatives and their effects on neuronal cell death. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 65, 1093-1097 (2017).

Gold M, Phase II clinical trials of anti-amyloid β antibodies: When is enough, enough?, *Alzheimer's Dement*, 3, 402-409 (2017).

Grant CM, MacIver FH, Dawes IW, Glutathione synthetase is dispensable for growth under both normal and oxidative stress conditions in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* due to an accumulation of the dipeptide γ -glutamylcysteine, *Mol Biol Cell*, 8, 1699-1707 (1997).

Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Tung Y, Quinlan M, Wisniewski H, Binder L, Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (τ) in Alzheimer cytoskeletal pathology, *Proc Natl Acad Sci USA*, 83, 4913-4917 (1986)

Gysin R, Kraftsik R, Sandell J, Bovet P, Chappuis C, Conus P, Deppen P, Preisig M, Ruiz V, Steullet P, Tosic M, Werge T, Cuenod M, Do KQ, Impaired glutathione synthesis in schizophrenia: convergent genetic and functional evidence, *Proc Natl Acad Sci USA*, 104, 16621-16626 (2007).

Haas C, Strategies, development and pitfalls of therapeutic options for Alzheimer's disease, *J. Alzheimer's Dis*, 28, 241–281 (2012).

Hasegawa G, Fukui M, Hosoda H, Asano M, Harusato I, Tanaka M, Shiraishi E, Senmaru T, Sakabe K, Yamasaki M, Kitawaki J, Fujinami A, Ohta M, Obayashi H, Nakamura N, Telmisartan, an angiotensin II type 1 receptor blocker, prevents the development of diabetes in male Spontaneously Diabetic Torii rats, *Eur J Pharmacol*, 605, 164-169 (2009).

Hirata Y, Yamada C, Ito Y, Yamamoto S, Nagase H, Oh-Hashi K, Kiuchi K, Suzuki H, Sawada M, Furuta K, Novel oxindole derivatives prevent oxidative stress-induced cell death in mouse hippocampal HT22 cells, *Neuropharmacology*, 135, 242-252 (2018).

Hirata Y, Ito Y, Takashima M, Yagyū K, Oh-Hashi K, Suzuki H, Ono K, Furuta K, Sawada M, Novel oxindole-curcumin hybrid compound for antioxidative stress and neuroprotection, *ACS Chem Neurosci*, 11, 76-85 (2020).

Huang CS, Anderson ME, Meister AJ, Amino acid sequence and function of the light subunit of rat kidney γ -glutamylcysteine synthetase, *Biol Chem*, 268, 20578-20583 (1993).

Jana NR, Dikshit P, Goswami A, Nukina N, Inhibition of proteasomal function by curcumin induces apoptosis through mitochondrial pathway, *J Biol Chem*, 279, 11680-11685 (2004).

Jat D, Parihar P, Kothari SC, Parihar MS, Curcumin reduces oxidative damage by increasing reduced glutathione and preventing membrane permeability transition in isolated brain mitochondria, *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 59 Suppl, OL1899-1905 (2013).

Johnson WM, Wilson-Delfosse AL, Mieyal JJ, Dysregulation of glutathione homeostasis in neurodegenerative diseases, *Nutrients*, 4, 1399-1440 (2012).

Kang JH, Chang SY, Jang HJ, Cho JM, Kim DB, Lee SS, Ko SH, Park YM, Needs PW, Jo YH, Kim MJ, Quercetin-induced upregulation of human GCLC gene is mediated by cis-regulatory element for early growth response protein-1 (EGR1) in INS-1 β -cells, *J Cell Biochem*, 108, 1346-1355 (2009).

Kaplowitz N, Aw TY, Ookhtens M, The regulation of hepatic glutathione, *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 25, 715-744 (1985).

Klein C, Westenberger A, Genetics of Parkinson's disease, *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2, a008888 (2012).

Kobayashi A, Kang MI, Okawa H, Ohtsuji M, Zenke Y, Chiba T, Igarashi K, Yamamoto M, Oxidative stress sensor Keap1 functions as an adaptor for Cul3-based E3 ligase to regulate proteasomal degradation of Nrf2, *Mol Cell Biol*, 24, 7130-7139 (2004).

Krzywanski DM, Dickinson DA, Iles KE, Wigley AF, Franklin CC, Liu RM, Kavanagh TJ, Forman H, Variable regulation of glutamate cysteine ligase subunit proteins affects glutathione biosynthesis in response to oxidative stress, *Arch Biochem Biophys*, 423, 116-125 (2004).

Lavoie S, Murray MM, Deppen P, Knyazeva MG, Berk M, Boulat O, Bovet P, Bush AI, Conus P, Copolov D, Fornari E, Meuli R, Solida A, Vianin P, Cuenod M, Buclin T, Do KQ, Glutathione precursor, N-acetyl-cysteine, improves mismatch negativity in schizophrenia patients, *Neuropsychopharmacology*, 33, 2187-2199 (2008).

Li M, Chiu JF, Kelsen A, Lu SC, Fukagawa NK, Identification and characterization of an Nrf2-mediated ARE upstream of the rat glutamate cysteine ligase catalytic subunit gene (GCLC), *J Cell Biochem*, 107, 944-954 (2009).

Liu R, Choi J, Age-associated decline in γ -glutamylcysteine synthetase gene expression in rats, *Free Radic Biol Med*, 28, 566-574 (2000).

Liu RM, Down-regulation of γ -glutamylcysteine synthetase regulatory subunit gene expression in rat brain tissue during aging, *J Neurosci Res*, 68, 344-351 (2002).

Lu SC, Regulation of glutathione synthesis, *Mol Aspects Med*, 30, 42-59 (2009).

Lu SC, Glutathione synthesis, *Biochim Biophys Acta*, 1830, 3143-3153 (2013).

Maher P, The effects of stress and aging on glutathione metabolism, *Ageing Res Rev*, 4, 288-314 (2005).

McKhann G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D, Stadlan EM, Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: Report of the NINCDS-ADRDA work group under the auspices of Department of Health and Humans Services Task Force on Alzheimer's disease, *Neurology*, 34, 939-944 (1984).

- Meister A, Anderson ME, Glutathione, *Annu Rev Biochem*, 52, 711-760 (1983).
- Meredith MJ, Reed DJ, Status of the mitochondrial pool of glutathione in the isolated hepatocyte, *J Biol Chem*, 257, 3747-3753 (1982).
- Moskaug J, Carlsen H, Myhrstad M, Blomhoff R, Polyphenols and glutathione synthesis regulation, *Am J Clin Nutr*, 81, 277-283, (2005).
- Muller FL, Liu Y, Van Remmen H, Complex III releases superoxide to both sides of the inner mitochondrial membrane, *J Biol Chem*, 279, 49064–49073 (2004).
- O'Connor L, Gilmour J, Bonifer C, The role of the ubiquitously expressed transcription factor Sp1 in tissue-specific transcriptional regulation and in disease, *Yale J Biol Med*, 89, 513-525 (2016).
- Oppenheimer L, Wellner VP, Griffith OW, Meister A, Glutathione synthetase, Purification from rat kidney and mapping of the substrate binding sites, *J Biol Chem*, 254, 5184-5190 (1979).
- Rangasamy T, Guo J, Mitzner WA, Roman J, Singh A, Fryer AD, Yamamoto M, Kensler TW, Tudor RM, Georas SN, Biswal S, Disruption of Nrf2 enhances susceptibility to severe airway inflammation and asthma in mice, *J Exp Med*, 202, 47-59 (2005).
- Riederer P, Sofic E, Rausch WD, Schmidt B, Reynolds GP, Jellinger K, Youdim MB, Transition metals, ferritin, glutathione, and ascorbic acid in parkinsonian brains, *J Neurochem*, 52, 515-520 (1989).
- Samarghandian S, Azimi-Nezhad M, Samini F, Preventive effect of safranal against oxidative damage in aged male rat brain, *Exp Anim*, 64, 65-71 (2015).
- Schulz JB, Falkenburger BH, Neuronal pathology in Parkinson's disease, *Cell Tissue Res*, 318, 135–147 (2004).
- Seelig GF, Simonsen RP, Meister A, Reversible dissociation of γ -glutamylcysteine synthetase into two subunits, *J Biol Chem*, 259, 9345-9347 (1984).
- Shelly C, Glutathione synthesis, *Biochim Biophys Acta*, 1830, 3143–3153.(2013)

Shenvi SV, Smith EJ, Hagen TM, Transcriptional regulation of rat γ -glutamate cysteine ligase catalytic subunit gene is mediated through a distal antioxidant response element, *Pharmacol Res*, 60, 229-236 (2009).

Slocum SL, Kensler TW, Nrf2: control of sensitivity to carcinogens, *Arch Toxicol*, 85, 273-284 (2011).

Thimmulappa RK, Mai KH, Srisuma S, Kensler TW, Yamamoto M, Biswal S, Identification of Nrf2-regulated genes induced by the chemopreventive agent sulforaphane by oligonucleotide microarray, *Cancer Res*, 62, 5196-5203 (2002).

Uddin MS, Al Mamun A, Kabir MT, Ahmad J, Jeandet P, Sarwar MS, Ashraf GM, Aleya L, Neuroprotective role of polyphenols against oxidative stress-mediated neurodegeneration, *Eur J Pharmacol*, 886, 173412 (2020).

Ungvari Z, Bailey-Downs L, Gautam T, Sosnowska D, Wang M, Monticone RE, Telljohann R, Pinto JT, de Cabo R, Sonntag WE, Lakatta EG, Csiszar A, Age-associated vascular oxidative stress, Nrf2 dysfunction, and NF- κ B activation in the nonhuman primate *Macaca mulatta*, *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 66, 866-875 (2011).

Urata Y, Honma S, Goto S, Todoroki S, Iida T, Cho S, Honma K, Kondo T, Melatonin induces γ -glutamylcysteine synthetase mediated by activator protein-1 in human vascular endothelial cells, *Free Radic Biol Med*, 27, 838-847 (1999).

Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J, Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease, *Int J Biochem Cell Biol*, 39, 44-84 (2007).

Veas-Perez de Tudela M, Delgado-Esteban M, Cuende J, Bolanos, JP, Almeida A, Human neuroblastoma cells with MYCN amplification are selectively resistant to oxidative stress by transcriptionally up-regulating glutamate cysteine ligase, *J Neurochem*, 113, 819-825 (2010).

Wang H, Liu H, Liu RM, Gender difference in glutathione metabolism during aging in mice, *Exp Gerontol*, 38, 507-517 (2003).

Wu G, Fang YZ, Yang S, Lupton JR, Turner ND, Glutathione metabolism and its implications for health, *J Nutr*, 134, 489-492 (2004).

Wu Y, Zhang X, Bardag-Gorce F, Robel RC, Aguilo J, Chen L, Zeng Y, Hwang K, French SW, Lu SC, Wan YJ, Retinoid X receptor α regulates glutathione homeostasis and xenobiotic detoxification processes in mouse liver, *Mol Pharmacol*, 65, 550-557 (2004).

Yang F, Lim GP, Begum AN, Ubeda OJ, Simmons MR, Ambegaokar SS, Chen PP, Kaye R, Glabe CG, Frautschy SA, Cole GM, Curcumin inhibits formation of amyloid β oligomers and fibrils, binds plaques, and reduces amyloid *in vivo*, *J Biol Chem*, 280, 5892-5901 (2005).

Yang H, Wang J, Huang ZZ, Ou X, Lu SC, Cloning and characterization of the 5'-flanking region of the rat glutamate-cysteine ligase catalytic subunit, *Biochem J*, 357, 447-455 (2001).

Yang HP, Magilnick N, Ou XP, Lu SC, Tumor necrosis α induces coordinated activation of rat GSH synthetic enzymes via NF κ B and AP-1, *Biochem J*, 391, 399-408 (2005).

Yao TP, Oh SP, Fuchs M, Zhou ND, Ch'ng LE, Newsome D, Bronson RT, Li E, Livingston DM, Eckner R, Gene dosage-dependent embryonic development and proliferation defects in mice lacking the transcriptional integrator p300, *Cell*, 93, 361-372 (1998).

Zeevalk GD, Razmpour R, Bernard LP, Glutathione and Parkinson's disease: is this the elephant in the room? *Biomed Pharmacother*, 62, 236-249 (2008).

Zhang H, Court N, Forman HJ, Submicromolar concentrations of 4-hydroxynonenal induce glutamate cysteine ligase expression in HBE1 cells, *Redox Rep*, 12, 101-106 (2007).

Zhichun C, Chunjiu, Oxidative stress in Alzheimer's disease, *Neurosci Bull*. 2014 30, 271-281 (2014)

Zhu H, Itoh K, Yamamoto M, Zweier JL, Li Y, Role of Nrf2 signaling in regulation of antioxidants and phase 2 enzymes in cardiac fibroblasts: protection against reactive oxygen and nitrogen species-induced cell injury, *FEBS Lett*, 579, 3029-3036 (2005).

略語一覽

ARE : antioxidant response element

ATP : adenosine triphosphate

BSO : L-buthione-(S,R)-sulfoximine

CAT : catalase

DMEM : dulbecco's modified eagle's medium

DMSO : dimethyl sulfoxide

DNA : deoxybonuclic acid

EDTA : ethylene diamine tetra acetic acid

GAPDH : glyceraldehyde 3 phosphate dhydrogenase

GCL : glutamate cysteine ligase

CCLC : glutamate cysteine ligase catalytic subunit

GCLM : glutamate cysteine ligase modifier subunit

GPX : glutathione peroxidase

GR : glutathione reductase

GS : GSH synthetase

GSH : glutathione

H₂O₂ : hydrogen peroxide

HO-1 : heme oxygenase-1

IκB : Inhibitor of nuclear factor kappa B

Keap1 : Kelch-like ECH-associated protein1

NF-κB : nuclear factor kappa B

NMDA : N-methyl-D-asparate

NMYC : N-myc proto-oncogene protein

NQO-1 : NAD(P)H quinone oxidoreductase -1

Nrf2 : NF-E2 related factor 2

ROS : reactive oxygen species

SDS : sodium lauryl sulfate

SOD : superoxide dismutases

tBHQ : tert-butylhydroquinone

謝辞

本稿を終えるにあたり、終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました連合創薬医療情報研究科 平田 (森田) 洋子教授に深甚なる謝意を表します。

本稿の作成にあたり、御校閲を賜りました連合創薬医療情報研究科 横川隆志教授、田中香お里教授、竹森洋教授に深謝致します。

本研究を行うにあたり、オキシインドール化合物を提供して下さった連合創薬医療情報研究科 古田亨史教授に深く感謝申し上げます。

本研究の遂行にあたり、適切な御指導および御助言を賜りました連合創薬医療情報研究科 大橋憲太郎准教授、多くの御協力を賜りました森田研究室の皆様に深く感謝いたします。

発表論文

Takanori Ikawa, Mina Sato, Kentaro Oh-hashii, Kyoji Furuta, Yoko Hirata, Oxindole–curcumin hybrid compound enhances the transcription of γ -glutamylcysteine ligase, *European Journal of Pharmacology*, 896, 173898 (2021).

