

鎌田健作 論文内容の要旨

主 論 文

Nuclear glutathione S-transferase π prevents apoptosis by reducing the oxidative stress-induced formation of exocyclic DNA products

核内 glutathione S-transferase π は酸化ストレスにより誘導される環外 DNA 産生物の形成を軽減することでアポトーシスを抑制する。

鎌田健作、後藤信治、奥永知宏、井原義人、辻健太郎、河合慶親、
内田浩二、大澤俊彦、松尾孝之、永田泉、近藤宇史

(Free Radical Biology and Medicine • 37 巻 11 号 1875—1884 2004 年)

長崎大学大学院医学研究科外科系専攻
(指導教授：永田 泉 教授)

(緒言)

過酸化水素 (H_2O_2) は、蛋白質、脂質、核酸などの細胞構成成分を過酸化することで、種々の細胞でアポトーシスの引き金として作用していることが示唆されている。glutathione S-transferase (GST) は、グルタチオン (GSH) 抱合活性、過酸化物を還元する GSH ペルオキシダーゼ (GPX) 活性などを示す酵素である。その分子種の一つである GST π は、細胞質や核に局在するが、神経膠芽腫では GST π が核にも存在する場合は、予後が著しく不良であることが示されている。以前、我々は、培養癌細胞にマッシュルームレクチン (ABL) を投与すると、GST π の核内移行が阻害され、抗癌剤感受性が高まることを報告した。さらに、過酸化脂質由来の高反応性アルデヒドである、4-oxo-2-nonenal (4-ONE) が DNA の

塩基と反応し、7-(2 oxo-heptyl)-substituted 1,*N*²-etheno-2'-deoxyguanosine adducts (oxo-heptyl- ϵ dG)を形成して、DNA 損傷をもたらすことを報告した。そこで今回、DNA 傷害、核の脂質過酸化、oxo-heptyl- ϵ dG 形成及び 4-ONE-GSH 抱合体形成を指標として、酸化ストレス時の核局在性 GST π の役割について検討した。

(対象と方法)

1. ヒト大腸癌細胞株 HCT8 を用いた。
2. アポトーシスの形態的指標である核クロマチンの凝縮は、Hoechst 33342 で染色し、蛍光顕微鏡を用いて観察した。DNA の二本鎖切断の指標である sub-G1 peak は、細胞を固定後、Propidium Iodide で染色し、フローサイトメーターで解析した。TdT-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) 法による DNA 傷害の測定は、Apop tag Plus Fluorescein in situ Apoptosis Detection kit を使用し、フローサイトメーターで行った。
3. GST π と GPX の存在量は、細胞質画分と核画分を調製し、特異抗体によるイムノブロット法で解析した。
4. 核の過酸化脂質は、チオバルビツール酸反応陽性物質(TBARS)検出法を用いて測定した。
5. 細胞核内での oxo-heptyl- ϵ dG 形成は、特異抗体を用いてフローサイトメーターで測定した。
6. oxo-heptyl- ϵ dG は、リノール酸の過酸化物である 13-hydroperoxyoctadecadienoic acid (13-HPODE)と FeCl₂を混合して静置後、GSH 及び GST 共存、非共存下に仔ウシ胸腺 DNA を加えて、37°C、1hr 静置することにより調製した。除タンパク後、DNA を抽出し、ニトロセルロース膜にスポットして、oxo-heptyl- ϵ dG の特異抗体を用いてイムノブロット法で検出した。
7. *in vitro* での 4-ONE-GSH 抱合体形成は、GST 共存、非共存下に、4-ONE と GSH を混合して静置後、一定量の試料を液体クロマトグラフィー/質量分析計 (LC/MS)で解析した。

(結果)

1. HCT8 細胞に ABL を単独投与した場合、核クロマチンの凝縮、sub-G1 peak の出現や TUNEL 陽性細胞は、ほとんど観察されなかった。ABL 前投与後に H₂O₂ で処理すると、H₂O₂ 単独処理の場合と比較して、核クロマチンの凝縮、sub-G1 peak の出現、及び TUNEL 陽性細胞が顕著に増加した。これらのことから、ABL の前投与が、細胞の H₂O₂ に対する感受性を増大させ、アポトーシスを誘導することが示唆された。
2. H₂O₂ の投与により、細胞質及び核 GST π の存在量は経時的に増加した。H₂O₂ や過酸化脂質を還元する GPX も、細胞質において経時的に増加したが、核での

存在は確認されなかった。ABL 前投与後の H_2O_2 の投与により細胞質 GST π は経時的に増加したが、核への GST π の移行は抑制された。ABL の前投与は、GPX の細胞内での局在や H_2O_2 投与による存在量の変化には影響しなかった。

3. 核画分の脂質過酸化及び oxo-heptyl- ϵ dG の存在量は、 H_2O_2 単独投与の場合と比較して、ABL 前投与後の H_2O_2 投与により顕著に増加した。

4. *in vitro* での oxo-heptyl- ϵ dG 形成は、反応系に GSH を添加すると抑制され、GSH と GST π を共存させると更に抑制された。

5. *in vitro* での 4-ONE-GSH 抱合体形成を LC/MS により解析したところ、4-ONE と GSH の 1 対 1 の抱合体に一致するシグナルが検出されたが、反応系に GST π を共存させると、そのシグナルが増大したことから、4-ONE と GSH の結合を GST π が触媒すると考えられた。

(考察)

今回、ABL の前投与が、細胞の H_2O_2 に対する感受性を増大させ、アポトーシスを誘導することが明らかとなった。HCT8 細胞では、ABL の前投与によって核の GST π の存在量が有意に減少するが、 H_2O_2 や過酸化脂質を還元する GPX が核には存在しないことから、核局在性 GST π が細胞の酸化ストレス感受性を規定する因子の一つであることが示唆された。細胞核に GST π が存在する場合は、13-PODE のような過酸化脂質がアルコールへと代謝されたり、生じた 4-ONE が GSH と抱合体を形成して、核酸塩基への付加が抑制されたりすることによって、DNA 損傷が抑制されていると考えられる。このように核内 GST π の働きを阻害することにより、難治性である神経膠芽腫の放射線感受性を増加させる可能性が示された。