

赤色酵母由来 D-アミノ酸オキシダーゼを利用したミトコンドリア H₂O₂ 産生系の構築およびその応用

Construction of mitochondrial H₂O₂-producing system based on D-amino acid oxidase and its biological application

熊倉夏希¹⁾ 池谷知美¹⁾
藤川雄太¹⁾ 井上英史¹⁾

東京薬科大学 分子生物化学研究室¹⁾

キーワード: 活性酸素種, ミトコンドリア, 酸化ストレス,

緒言

生体内に取り込まれた酸素のうち数パーセントは、ミトコンドリア電子伝達系などにおいて還元を受け、活性酸素種 (Reactive Oxygen Species; ROS) へと変換される。ROS は、反応性の違いによりスーパーオキシド (O₂⁻) や過酸化水素 (H₂O₂)、ヒドロキシラジカル (·OH)、一重項酸素 (¹O₂) などに分類される。これに対して、生体内には ROS の除去や消去を行う機構が存在し、ROS による生体分子への無差別なダメージを軽減・消去することが知られている。

しかしながら、ROS 除去能を超える過剰な ROS が産生されると ROS は生体分子を傷害し、細胞の機能不全を誘発する。これは酸化ストレスとして、老化やがん、生活習慣病などの悪性化を引き起こす一因と考えられている。このような生体分子を傷害する ROS は、除去すべきものと考えられてきたが、近年の研究によって、ROS の中には酸化還元シグナルを調節する役割を担うものも存在することが明らかとなってきた¹⁾。特に H₂O₂ はタンパクシステイン残基の酸化還元を介したレドックスシグナリングにおいて中心的な役割を果たすことが示唆されている。

生体内における H₂O₂ の機能を明らかにするためには、時空間的に H₂O₂ の発生を制御できる方法を用いて、発生した H₂O₂ がどのような現象を起こし、どのタンパク質を酸化するかといったことを調べ

る必要がある。そこで本研究では、H₂O₂ による影響を精査するためのツールとして、D-アミノ酸投与濃度によって細胞内に発生する H₂O₂ の量を調整できる系を構築した。これによって、H₂O₂ が誘導する細胞内変化のメカニズムを明らかにすることを目指す。

方法

任意のタイミングで濃度依存的に H₂O₂ を産生するために、触媒活性の高い D-アミノ酸オキシダーゼの一つ、赤色酵母由来 D-アミノ酸オキシダーゼ (rgDAO) を用いた。rgDAO は、D-アミノ酸を α-ケト酸に代謝する酵素であり、この過程において H₂O₂ を産生する。(図 1) 細胞内には D-アミノ酸がほとんど存在しないため、D-アミノ酸を投与したときのみ H₂O₂ を発生させることができる。この rgDAO をミトコンドリアに局在させた細胞を樹立し、その細胞に対して D-アミノ酸を投与することで人工的にミトコンドリアにおいて H₂O₂ を発生させる系を構築した。また、使用する D-アミノ酸濃度を変化させることによって、H₂O₂ 発生量を調節することができる。

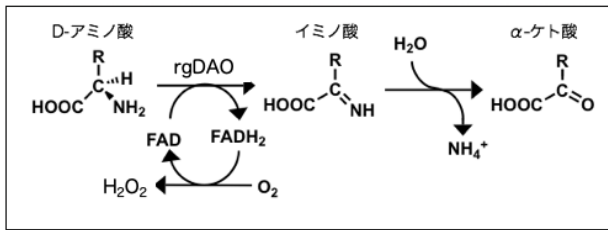


図1 ; rgDAO による D-アミノ酸代謝および H₂O₂ の産生

まず、MCF7 細胞および HeLa 細胞のミトコンドリアに rgDAO を発現させた細胞安定株を樹立した。(以下 MCF7/mitoDAO、HeLa/mitoDAO と示す。)その後、ウエスタンブロッティングおよび免疫染色によって樹立した安定発現細胞株において、rgDAO が発現すること、ミトコンドリアへ局在することを確かめた。次にミトコンドリア H₂O₂ 検出蛍光プローブ mitoPY を用いて、D-アミノ酸を投与することによって H₂O₂ が確かに発生することを確認した。さらに D-アミノ酸投与によって発生した H₂O₂ がタンパク質のシステインの酸化を引き起こすことを確かめるために、ミトコンドリア局在型の抗酸化酵素 Peroxiredoxin-3 (Prx3) の酸化状態を評価した。次に D-アミノ酸投与によって発生した H₂O₂ がミトコンドリア恒常性を示す膜電位に影響を及ぼすことを確かめるために JC-1 色素を使って膜電位の変化を評価した。さらに、膜電位の低下によって引き起こされるマイトファジーに重要である Parkin の損傷ミトコンドリアへの局在化を評価した。

結果・考察

本研究では、rgDAO が高い触媒作用を示す D-Met を基質として利用した。

D-Met 投与により mitoPY の蛍光強度が上昇した。抗酸化剤システインを同時に投与することでその蛍光強度上昇が抑制されたことから、確かに H₂O₂ が発生していることを確認した。

D-Met を MCF7/mitoDAO および HeLa/mitoDAO に投与したところ、時間および D-Met 濃度依存的にミトコンドリア膜電位の低下が確認された。また、D-Met 以外のアミノ酸を投与しても、同様の結果

が得られた。一方、コントロールとして L-アミノ酸を投与した場合、rgDAO を発現させていない細胞である MCF7/empty、HeLa/empty に対して D-Met を投与した場合には、膜電位の変化が見られなかった。以上のことから、ミトコンドリアで H₂O₂ を発生させると、濃度および処理時間依存的に膜電位を低下させることが明らかとなった。さらに細胞死アッセイから、D-Met 10mM を 6 時間投与した場合には細胞死は誘導されないものの、24 時間投与した場合には誘導されることを確認した。

次に、膜電位低下がミトコンドリア外膜への Parkin の局在化を引き起こすことから、これに対して検証をしたところ、MCF/mitoDAO ではおこらなかったものの、HeLa/mitoDAO では確認された。

考察および今後の展望

本研究では、D-アミノ酸投与濃度を調節することにより、任意のタイミングでミトコンドリアにおいて H₂O₂ の発生を起こすことのできる実験系を構築した。そして、D-アミノ酸投与に伴う細胞への影響を観察した。

今後、この系を利用して、H₂O₂ が関与する生命現象のメカニズムを明らかにしていきたい。

参考文献

1. Schieber M., Chandel NS., ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Curr Biol.*, 24, 453-462 (2014).