Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-12-04

Pentose phosphate pathway activation via HSP27 phosphorylation by ATM kinase: A putative endogenous antioxidant defense mechanism during cerebral ischemia-reperfusion

Yamamoto, Yusuke

(Degree)
博士（医学）

(Date of Degree)
2018-09-25

(Resource Type)
doctoral thesis

(Report Number)
甲第7292号

(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1007292

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。

（課程博士関係）

学位論文の内容要旨

Pentose phosphate pathway activation via HSP27 phosphorylation by ATM kinase: A putative endogenous antioxidant defense mechanism during cerebral ischemia-reperfusion

ATM kinase による HSP27 リン酸化を介したペントースリン酸経路の活性化は、脳虚血再灌流における内因的抗酸化防御機構と推定される

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻
脳神経外科学
指導教員：甲村英二教授

山本　祐輔

虚血性脳卒中は脳卒中の最も典型的なものであるがその分子的機序はあまり解明されていない。我々は以前にペントースリン酸経路(PPP)中の Glucose-6-phophate dehydrogenase(G6PD)が虚血中に Ataxia telangiectasia mutated(ATM)kinase による S85 での Heat shock protein 27(HSP27)リン酸化を介して活性化されることを報告した。このメカニズムは虚血中に働く内因性抗酸化機構のようである。再灌流障害は活性酸素種(ROS)産生を増加させて虚血による脳損傷を悪化させるが、この防御機構が再灌流でも同様に働くのかどうかを明らかにする為に中大脳動脈閉塞(MCAO)ラットの脳皮質代謝へ再灌流が与える効果について比較代謝解析を行った。

GS/MS を用いた代謝解析で 96 種の水溶性代謝物が抽出され、多変量解析で対照群、1 時間 MCAO・再灌流なし群、1 時間 MCAO・24 時間再灌流群が明瞭に分離された。他の短時間の再灌流群は再灌流時間が増えるにつれて緩徐な変化を示し、時間依存的な反応であることが示された。さらに loading weight に基づいて虚血再灌流に関連する代謝物の選定を行い、16 代謝物が選択された。これらを用いて Enrichment analysis を行うと虚血再灌流中に PPP が著明に亢進していることが示され、前回の虚血単独の研究結果と一致した。

炭水化物異化に関わる主な経路における経時的変化では主要な代謝物の変動を認めた。その中でフルクトース 6 リン酸(F6P)とリブロース 5 リン酸(Ru5P)は 1 時間 MCAO で減少し、F6P は 5 時間再灌流とそれ以降で有意に増加、Ru5P は 5 時間再灌流とそれ以降で有意に増加した。再灌流後の F6P と Ru5P の増加はこれもまた PPP の亢進を支持する。

PPP に関して HSP27 と G6PD の遺伝子発現を定量的 RT-PCR で測定した。HSP27 の mRNA は対照群と比較して 1 時間 MCAO で 2 倍、1 時間再灌流で 4 倍、3 時間再灌流で 14 倍、5 時間再灌流で 55 倍、24 時間再灌流で 69 倍まで上昇した。一方 G6PD は有意な変化を認めなかった。

Immunoblotting では時間依存的に HSP27 蛋白の緩徐な増加とリン酸化 HSP27(pHSP27)の著明な増加が示された。ここでも G6PD 蛋白に有意な変化を認めなかった。

pHSP27 の増加が PPP 亢進に関連するかを調べるために G6PD 活性と NADPH/NADP+比を測定した。G6PD 活性は 1 時間 MCAO で有意に上昇、1 時間再灌流で対照群水準まで低下した後、徐々に上昇して 24 時間再灌流で有意な上昇に達した。NADPH/NADP+比も同様の上昇傾向を示した。

前回の研究で ATM kinase 阻害薬(KU-55933)の脳室内注射により HSP27 リン酸化と G6PD 活性化が有意に減少し、ATM kinase による HSP27 リン酸化を介した G6PD 活性化が虚血早期に働く内因性の抗酸化神経防御機構の一部である可能性が示された。ATM kinase による HSP27 リン酸化が虚血再灌流でも影響するのかを調べるため前回と同様に ATM kinase 阻害薬を同濃度同量で脳室内に注入した。この実験に関しては 90 分 MCAO に続く 24 時間再灌流を行い、ATM kinase 阻害薬は MCAO の 60 分前に投与した。虚血再灌流単独により HSP27 蛋白で 3.9 倍、HSP27 リン酸化で 9 倍、pHSP27/HSP27 比で 2.7 倍の有意な

増加を認めた。ATM kinase 阻害薬を投与すると HSP27 リン酸化の増加が 3.2 倍に減少したが HSP27 蛋白の総量は 4.0 倍で影響しなかった。その結果 pHSP27/HSP27 比の有意な上昇も抑えられた。虚血再灌流も ATM kinase 阻害も G6PD 蛋白量には影響しなかった。

G6PD 活性は虚血再灌流で有意に上昇したがこれもまた ATM kinase 阻害薬投与で阻害された。

蛋白質の酸化修飾はカルボニル化蛋白誘導体の産生を伴うため、虚血再灌流による酸化障害を調べるためにカルボニル化蛋白誘導体の産生を測定した。カルボニル化蛋白は MCAO で 28%まで増加し ATM kinase 阻害でさらに 64%まで増加した。

梗塞サイズも ATM kinase 阻害により 71.3±25.9mm^3 (16.3±5.8%)から 141.4±26.0mm^3 (33.9±6.5%) へと有意に増加した。

PPP は NADPH を産生し NADPH はグルタチオン還元酵素の補因子としての役割を果たす。グルタチオン還元酵素は還元型グルタチオン GSH を再生し、これがグルタチオンペルオキシダーゼと働いて H_2O_2 を H_2O に変換する。従って PPP 活性化は虚血再灌流における脳の酸化ストレスに対する防御機構の一部を形成するようである。

HSP27 は G6PD と複合体を形成することでその活性を増加させ、それによって PPP の亢進を補助することが報告されている。G6PD は PPP の律速酵素であり NADPH の産生を調整することができる。従って G6PD は抗酸化機構の酸化還元力を供給する NADPH 量の維持に重要である。

再灌流での HSP27 mRNA の著明な上昇に対して、HSP27 蛋白量はわずかしか上昇せず最終的に 24 時間再灌流で統計学的に有意な上昇となった。これらの結果は過去の虚血再灌流研究の結果に一致する。しかし前回の研究では pHSP27 は再灌流なしの 60 分 MCAO や 120 分 MCAO でさえ有意に増加することが判明した。今回もラット脳皮質において HSP27 リン酸化と pHSP27/HSP27 比は再灌流でも有意に上昇することを確認した。

ATM 依存的な HSP27 リン酸化に続く HSP27 のリン酸化小規模多量体と G6PD との相互作用が G6PD 活性の増加につながると報告されている。Protein kinase D (PKD)による S15 や S82 での HSP27 リン酸化もまた、マウスの虚血再灌流モデルで虚血性神経損傷に対する HSP27 由来の神経防御に重要であることが明らかとなっている。ヒト HSP27 における S82 はラット HSP27 における S85 に相当するが、後者は我々が虚血再灌流でリン酸化されると特定した特異的な位置である。このリン酸化は HSP27 の G6PD に対する親和性を増加させて G6PD 活性を増加させる可能性がある。前回の研究では ATM kinase が脳虚血早期における S85 での HSP27 リン酸化に関わる主な kinase であることを明らかにし、PKD はそうではないことも示した。今回の結果は、ATM kinase は少なくとも最初の 24 時間は再灌流中においても S85 での HSP27 リン酸化に関わる主な kinase であることを示した。

今回の研究では G6PD の mRNA と蛋白量は虚血再灌流中には有意な変化を認めず、これは過去の報告にも一致する。G6PD 活性では 1 時間 MCAO で有意に上昇したが、1 時間再灌流で対照群レベルまで戻り、以降徐々に上昇し 24 時間再灌流で統計学的に有意な上昇まで到達した。G6PD 活性と同様に NADPH/NADP+比も虚血再灌流で増加した。この結果は虚血後再灌流でも脳組織が酸化ストレスへの防御に求められる NADPH の再生能力が損なわれないことを示した。

前回の研究は ATM kinase 阻害薬の脳室内注射が虚血での G6PD 活性の増加を阻害し、PKD 阻害薬はそうではないことを示した。これらの知見は虚血に起因する ATM kinase による HSP27 リン酸化を介した G6PD 活性化が虚血早期に働く内因性の抗酸化神経防御機構の一部を担っている可能性を示した。今回の研究は虚血早期における ATM kinase 阻害が HSP27 リン酸化の増加と G6PD 活性の有意な増加を阻害し、蛋白カルボニル化形成や梗塞サイズを有意に増加させることを示した。しかしながら ATM kinase 阻害薬の投与は虚血再灌流で生じた HSP27 蛋白の総量の増加には影響しなかった。まとめるとこれらの結果は虚血早期の HSP27 蛋白量の増加よりもむしろ ATM kinase による HSP27 リン酸化の方が脳虚血の重症度に影響することを示唆する。

ROS は虚血再灌流で産生され酸化ストレスは梗塞後の脳損傷において重要な役割を果たす。ROS は蛋白質に結合し酸化ストレスの主要マーカーである蛋白質カルボニル化を引き起こす。今回の研究では MCAO 後の虚血再灌流が蛋白質カルボニル化を有意に増加させ、ATM kinase 阻害薬が増加を悪化させることを明らかにした。今回観測された KU55933 の効果は ATM kinase が虚血再灌流中の酸化ストレス反応において重要な役割を担っているという見解を支えてくれる。以上のことから ATM kinase による HSP27 リン酸化を介した G6PD 活性化が虚血早期だけでなく再灌流でも機能する内因性の抗酸化防御機構の一部である可能性を示した。

今回の結果は内因性の ATM kinase による S85 での HSP27 リン酸化がその後の HSP27 と G6PD との相互作用において、また虚血再灌流中の G6PD 活性化による NADPH/NADP+比の増加促進において重要な段階である可能性を示している。ATM kinase の阻害は蛋白質カルボニル化修飾の増加や梗塞サイズの増大に関連していることが認められ、これは ATM kinase による HSP27 リン酸化が虚血再灌流における酸化還元代謝や神経保護の調節に重要な役割を果たしていることを示している。これらの知見は ATM kinase による HSP27 リン酸化を介した神経保護モデルにつながり、脳梗塞の新しい治療法の特定の一助となる。

(3995 字)

神戸大学大学院医学(系)研究科（博士課程）

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 2814 号	氏 名	山本 祐輔
論文題目 Title of Dissertation	Pentose phosphate pathway activation via HSP27 phosphorylation by ATM kinase: A putative endogenous antioxidant defense mechanism during cerebral ischemia-reperfusion ATM kinaseによるHSP27リン酸化を介したペントースリン酸経路の活性化は、脳虚血再灌流における内因的抗酸化防御機構と推定される		
審査委員 Examiner	主 査 Chief Examiner 宇田 健一 副 査 Vice-examiner 古屋敷 智之 副 査 Vice-examiner 匂坂 敏朗		

（要旨は１，０００字～２，０００字程度）

【背景】

申請者らは、以前にペントースリン酸経路(PPP)中の Glucose-6-phophate dehydrogenase (G6PD) が脳の虚血中に Ataxia telangiectasia mutated (ATM) kinase による Heat shock protein 27 (HSP27)のリン酸化を介して活性化されることを報告した。再灌流障害は活性酸素種(ROS)産生を増加させて虚血による脳損傷を悪化させるが、ATM kinase による HSP27 リン酸化の作用を明らかにする目的で、中大脳動脈閉塞(MCAO)ラットの脳皮質代謝へ再灌流が与える効果について比較代謝解析を行った。

【方法と結果】

GS/MS を用いた代謝解析で 96 種の水溶性代謝物が抽出され、多変量解析で対照群、1 時間 MCAO・再灌流なし群、1 時間 MCAO・24 時間再灌流群が明瞭に分離された。他の短時間の再灌流群は再灌流時間が増えるにつれて緩徐な変化を示し、時間依存的な反応であることが示された。さらに loading weight に基づいて虚血再灌流に関連する代謝物の選定を行い、16 代謝物が選択された。これらを用いて Enrichment analysis を行うと虚血再灌流中に PPP が著明に亢進していた。

炭水化物異化に関わる主な経路において、フルクトース 6 リン酸(F6P)とリブロース 5 リン酸(Ru5P)は 1 時間 MCAO で減少し、F6P は 5 時間再灌流とそれ以降で有意に増加、Ru5P は 5 時間再灌流とそれ以降で有意に増加した。

PPP に関して HSP27 と G6PD の遺伝子発現を定量的 RT-PCR で測定した。HSP27 の mRNA は 1 時間 MCAO で 2 倍、1 時間再灌流で 4 倍、3 時間再灌流で 14 倍、5 時間再灌流で 55 倍、24 時間再灌流で 69 倍まで上昇した。Immunoblotting では時間依存的に HSP27 蛋白の緩徐な増加とリン酸化 HSP27(pHSP27)の著明な増加が示された。pHSP27 の増加が PPP 亢進に関連するかを調べるために G6PD 活性と NADPH/NADP+比を測定した。G6PD 活性は 1 時間 MCAO で有意に上昇、1 時間再灌流で対照群水準まで低下した後、徐々に上昇して 24 時間再灌流で有意な上昇に達した。NADPH/NADP+比も同様の上昇傾向を示した。

ATM kinase による HSP27 リン酸化が虚血再灌流でも影響するのかを調べるため、ATM kinase 阻害薬を同濃度同量で脳室内に注入した。90 分 MCAO に続く２４時間再灌流を行い、ATM kinase 阻害薬は MCAO の 60 分前に投与した。虚血再灌流単独により HSP27 蛋白で 3.9 倍、HSP27 リン酸化で 9 倍、pHSP27/HSP27 比で 2.7 倍の有意な増加を認めた。ATM kinase 阻害薬を投与すると HSP27 リン酸化の増加が 3.2 倍に減少したが HSP27 蛋白の総量は 4.0 倍で影響しなかった。その結果 pHSP27/HSP27 比の有意な上昇も抑えられた。G6PD 活性は虚血再灌流で有意に上昇したがこれもまた ATM kinase 阻害薬投与で阻害された。

次に、虚血再灌流による酸化障害を調べるためにカルボニル化蛋白誘導体の産生を測定した。カルボニル化蛋白は MCAO で 28%まで増加し ATM kinase 阻害でさらに 64%まで増加した。梗塞サイズも ATM kinase 阻害により有意に増加した。

【考察】

PPP は NADPH を産生し NADPH はグルタチオン還元酵素の補因子としての役割を果たす。したがって、PPP 活性化は虚血再灌流における脳の酸化ストレスに対する防御機構の一部を形成すると考えられる。

【結論】

本研究は、AATM kinase による HSP27 リン酸化を介した G6PD 活性化が、虚血再灌流において内因性の抗酸化防御機構の一部である可能性を示したものであり、脳梗塞の新しい治療法の開発に新たな知見を示した重要な成果である。よって、本研究者は博士（医学）の学位を得る資格があると認める。