

環境中親電子物質エクスポソームとそれを制御する
活性イオウ分子

Environmental electrophiles exposome and reactive sulfur species as its regulator molecule

課題番号：18H05293

熊谷 嘉人 (KUMAGAI, YOSHITO)

筑波大学・医学医療系・教授



研究の概要

本研究では、ヒトの代替として培養細胞およびマウスを用いて、環境中親電子物質に特化したエクスポソーム研究のモデル化を試みた。すなわち、当該物質の用量と時間依存的な複合曝露実験を実施した。また、メチル水銀をモデルとして、活性イオウ分子による環境中親電子物質の捕獲で生じるイオウ付加体の生体内運命と未知代謝物の体外排泄について検討した。

研究分野：環境薬学、毒性学

キーワード：親電子物質、タンパク質の修飾、レドックスシグナル、活性イオウ分子、エクスポソーム

1. 研究開始当初の背景

ヒトは食生活、生活環境、ライフスタイルを介して日常的に種々の親電子物質に晒されている。当該物質は分子内に電子密度の低い部位を有し、タンパク質のシステイン残基のような求核置換基に共有結合することが知られている。我々は先行の基盤研究(S) (2013~2017年度)において、環境中親電子物質の個別曝露実験を行い、低用量ではレドックスシグナル（細胞生存、細胞増殖、細胞内タンパク質の品質管理、親電子物質の解毒・排泄に関与）を活性化、高用量では逆に攪乱して毒性を生じることを明らかにした。一連の現象は、高い求核性を有する活性イオウ分子が環境中親電子物質のイオウ付加体を形成することで制御されることを見出した。

環境因子によるヒトの生涯曝露の総体として「エクスポソーム」が注目されている一方で、測定項目の膨大さ、適切なバイオマーカーの選定等から本研究は混沌としていた。本研究の促進化を鑑みて、一般的外的要因、特殊外的要因（化学物質、食事、汚染物質、生活習慣因子など）および内的要因の3つに分類され、完全エクスポソームから限定エクスポソームへの移行が提案された。興味深い点は、特殊外的要因の中で親電子物質が優先被検物質とされていることである。

2. 研究の目的

環境中親電子物質に特化したエクスポソーム研究のモデル化を目的とし、環境中親電子物質の複合曝露実験を検討した。また、メチル

ル水銀をモデルとして、活性イオウ分子で生じたイオウ付加体の生体内運命とそれに起因する体外排泄の実態を調べた。

3. 研究の方法

異なる培養細胞に8種類の被検物質 [メチル水銀 (MeHg)、カドミウム (Cd)、アクリルアミド (AA)、クロトンアルデヒド (CA) と 1,4-ベンゾキノン (1,4-BQ)、1,2-および 1,4-ナフトキノン (1,2-および 1,4-NQ) および (E)-2-ヘキセナール (2-HN)] の組み合わせを変えて複合曝露を行い、曝露用量および曝露時間依存的なタンパク質の化学修飾、レドックスシグナル変動および細胞毒性について、個別曝露の結果との差異を調べた。HPLC/ASS、GC/MS および X線回折を用いて、MeHg のイオウ付加体 (MeHg)₂S の経時的な分解で生じる産物を同定した。マウスを (MeHg)₂S に曝露して、呼気中から未知代謝物を同定した。

4. これまでの成果

1) HepG2 細胞において、1,2-NQ、1,4-NQ、1,4-BQ、CA あるいは 2-HN の個別曝露において、細胞毒性が全く認められない低用量の複合曝露（それぞれの LC₅₀ 値の 1/10 量を混合）で、明快な細胞毒性が観察された。2) CA、AA、1,4-BQ あるいは 1,4-NQ の個別曝露で ERK リン酸化が見られない低用量において、マウス初代肝細胞での複合曝露により ERK 活性化が観察された。3) HepG2 細胞において、2-HN の個別曝露に比べて 1,2-NQ

および 1,4-NQ との複合曝露により、センサータンパク質 Keap1 のシステイン残基修飾、それに伴う転写因子 Nrf2 活性化、細胞毒性はそれぞれより低濃度で観察された。濃度加算モデルで評価した結果、3 つの被検物質の複合曝露において、GSH のような求核低分子の化学修飾能は相加的および細胞毒性は相乗的であった。4) A431 細胞において、1,2-NQ の個別曝露に比べて 1,4-NQ および 1,4-BQ との複合曝露により、センサータンパク質 PTP1B のシステイン残基修飾、それに伴うキナーゼ EGFR 活性化、細胞毒性はより低濃度で観察された。

金属の複合曝露（メタルエクスポーズ）を検討するために、Soft (MeHg、Cd)、borderline (Cu、Zn、Fe) および hard (Sn、Al、Mg) メタルに分類して行なった。内在性活性イオン分子であるパースルフィドとの反応性を調べた結果、MeHg、Cd、Cu、Zn はパースルフィドと良好に反応したが、Fe、Sn、Al および Mg は殆ど反応しなかった。MeHg によるアルブミンの S-水銀化はパースルフィド添加により顕著に抑制されたが、Cd や Cu が共存するとパースルフィドの本抑制効果は減弱した。HepG2 細胞を MeHg に曝露すると、用量依存的な細胞内タンパク質の S-水銀化および細胞毒性が観察されるが、Cu（それ自身では毒性がない用量）との複合曝露で MeHg の S-水銀化および細胞毒性は有意に上昇した。マウスにおける MeHg 曝露で見られる協調運動能の低下はパースルフィド処置で阻害されたが、Cd の複合曝露でその阻害効果は有意に抑制された。

環境中親電子物質の GSH 付加体の生成とその細胞外排泄を介して当該物質の毒性軽減に働く転写因子 Nrf2、および活性イオン分子であるシステインパースルフィド (CysSSH) を産生する CSE の単独および共欠損マウスを用いて、両者の環境中親電子物質のリスク軽減に対する役割について調べた。その結果、CSE が環境中親電子物質のイオン付加体生成を介して Nrf2 と並列してそのリスク軽減に働いていることを見出した。特筆すべき点は、Nrf2 は胎児期から成人期を通して発現量が変わらないのに対して、CSE は胎児期には殆ど発現が認められず、成長と共に発現量は増加することである。これは胎児性水俣病の原因を示す手がかりになることが示唆される。

(MeHg)₂S の経時的な分解を調べた。有機相および水相に分けて分離した結果、前者からジメチル水銀、後者から硫化水銀がそれぞれ同定された。想定される反応式は、 $\text{MeHg-S-HgMe} \rightarrow \text{Me-Hg-Me} + \text{HgS}$ である。そこで、マウスに (MeHg)₂S を曝露して呼気を採取して GC/MS 分析した結果、ジメチル水銀が同定された。一連の結果は、MeHg が生体内の活性イオン分子で捕獲されて

(MeHg)₂S に代謝され、それが徐々に分解されてジメチル水銀と硫化水銀に変換されることを示唆している。ジメチル水銀は揮発性が高いので、呼気を介して体外に排泄されることが考えられた。

5. 今後の計画

2 年間の得られた培養細胞実験での研究成果を基にして、マウスでの複合曝露を実施する。(MeHg)₂S がパースルフィドのような活性イオン分子と反応すると、驚くことに (MeHg)₂SSH およびその酸化体である (MeHg)₂SSO₃H が検出された。これらは共に水溶性であることから、尿中へ排泄される可能性がある。そこで、MeHgSSH および MeHgSSO₃H の化学合成を行い、それぞれの標品を用いて MeHg 曝露マウスの尿中から同定を試みる。また、CSE を全身に高発現したトランスジェニックマウスの実験から、細胞内で産生した CysSSH を細胞外に排泄するアンチポーターが存在することを見出した。発芽酵母の siRNA ライブラリーを用いて、当該アンチポーターの同定を試み、動物細胞のホモログについて検討する。

6. これまでの発表論文等（受賞等も含む）

1. Akiyama M, Unoki T, Shinkai Y, Ishii I, Ida T, Akaike T, Yamamoto M, Kumagai Y. Environmental electrophile-mediated toxicity in mice lacking Nrf2, CSE, or both. *Environmental Health Perspective* 127: 67002, 2019.
2. Nishimura A, Shimoda K, Tanaka T, Toyama T, Nishimura K, Shinkai Y, Numaga-Tomita T, Yamazaki D, Kanda Y, Akaike T, Kumagai Y, Nishida M. Depolysulfidation of Drp1 induced by low-dose methylmercury exposure increases cardiac vulnerability to hemodynamic overload. *Science Signaling* 12: eaaw1920, 2019.
3. 熊谷嘉人. 2018 年度日本毒性学会学会賞受賞「ケミカルバイオロジーを基盤とした酸化・親電子ストレスを生じる化学物質の毒性学的研究」

7. ホームページ等

http://www.md.tsukuba.ac.jp/environmental_medicine/kibanS2/index.html