

令和 6 年 5 月 21 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K12180

研究課題名（和文）親電子ストレスの可逆性担保における活性イオウ分子の意義

研究課題名（英文）A role of reactive sulfur species in keeping reversibility of electrophilic S-modification

研究代表者

安孫子 ユミ（Abiko, Yumi）

長崎大学・医歯薬学総合研究科（薬学系）・准教授

研究者番号：80742866

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、EGFRを負に制御するPTP1Bを用いてタンパク質結合パーサルフィドもしくはポリサルフィド（P-SSH/-SSnH）への親電子修飾は可逆的であることを検討した。P-SSnH化した精製PTP1Bに親電子物質である1,4-ベンゾキノンもしくは1,2-ナフトキノン（1,2-NQ）を反応させてPTP1B活性を阻害しても、ジチオスレイトールにより還元されて当該活性が回復した。A431細胞において、1,2-NQ曝露によるEGFRの活性化はNa<sub>2</sub>S<sub>2</sub>を前処理で減少する傾向が見られた。以上より、PTP1B-SSnHへの親電子修飾は可逆的であり、還元を受けて再生しEGFRを再び抑制できると示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

親電子物質はタンパク質のチオール基と共有結合して被修飾タンパク質の機能を変化させる。本研究では、チオール基がパーサルフィドもしくはポリサルフィド化されている場合は、還元により親電子修飾が解除されることを示した。本結果は、パー（ポリ）サルフィドが親電子物質によるタンパク質への影響をバッファリングしていることを示唆しており、タンパク質のパー（ポリ）サルフィド化は環境中親電子物質に対する防御機構の一つと考えられる。毒性学および予防医学においてパー（ポリ）サルフィドの重要性を示す知見となったといえよう。

研究成果の概要（英文）：We investigated whether or not electrophilic modification of protein-bound persulfides or polysulfides is reversible using PTP1B, which negatively regulates EGFR. PTP1B activity was inhibited by the recombinant per or polysulfhydrated PTP1B with electrophilic substances 1,4-benzoquinone or 1,2-naphthoquinone (1,2-NQ). The inhibited activity was recovered through reduction by dithiothreitol. In A431 cells, the activation of EGFR by 1,2-NQ exposure tended to decrease with sodium disulfide pretreatment. These results suggest that the electrophilic modification of PTP1B-SSnH is reversible and that it can be regenerated by reduction and suppresses EGFR again.

研究分野：毒性学

キーワード：親電子物質 PTP1B EGFR ナフトキノン ベンゾキノン

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

Chemical Abstracts Service には1億1700万以上の化学物質が登録されていることから分かるように、我々を取り巻く環境中には様々な化学物質が存在し、呼吸や飲食等の生命維持行為により常に体内に摂取している。例えば、IARC によってグループ1 (ヒトに対して発がん性がある) に分類された大気汚染および大気中粒子状成分は、種々の化学物質を含み、ガソリン中に含まれるベンゼン (グループ1)、および防虫剤として使用されるナフタレン (グループ2B:ヒトに対して発がん性が疑われる) の環境中濃度を鑑みても環境化学物質による生体影響が危惧される。化学発がん物質の90%以上はそれ自体には発がん性がなく、大気中での光酸化もしくは生体内で薬物代謝酵素等による代謝で生じた親電子物質が発がん性を有するとされる。親電子物質は、生体内であるタンパク質のチオール (SH) 基等と安定な共有結合 (親電子修飾) を形成し、その反応性の高さから “the most prominent class of toxicants” (Rappaport SM, *Science*, 2010) などと分類される。ところで、ヒトゲノムにコードされる SH 基 (全約 214,000 個) のうち容易に化学修飾される SH 基は 10–20% 程度存在し、このような SH 基をもつセンサータンパク質は親電子物質の標的タンパク質になり得る (Jones DP, *Am J Physiol*, 2008)。従って、親電子物質による化学修飾を制御することは、環境中化学物質曝露による生体影響や化学発がん機序の理解を深め予防医学を発展させる上で重要である。

申請者は、これまでの研究において、環境中親電子物質であるメチル水銀 (MeHg, 大型魚類に蓄積) や 1,4-ナフトキノン (1,4-NQ, 大気中に存在) は、タンパク質の親電子修飾を介して細胞応答を誘導することを報告した。また、 $pK_a$  が低く解離性 SH 基を持つパースルフィド (R-SSH) ・ポリスルフィド化合物 (R-S<sub>n</sub>SH) 等の求核性の高いイオウ化合物 (活性イオウ分子) と MeHg や 1,4-NQ が反応すると、親電子性を有さないイオウ付加体を形成することも明らかとした。また、親電子物質や酸化ストレスのセンサータンパク質として知られるプロテインチロシン脱リン酸化酵素 (PTP) 1B を用いて、SH 基の過酸化は不可逆的な修飾として知られていたが、タンパク質結合パースルフィド (P-SSH) が介在すると、酸化修飾の可逆性が過酸化状態においても担保されることを示したこれらのことから P-SSH は親電子物質による親電子修飾の可逆性の担保にも関わると示唆される。

### 2. 研究の目的

本研究では、これまで明らかになっていない、親電子物質によるレドックスシグナル伝達制御における活性イオウ分子の関与をセンサータンパク質の観点から検討し、タンパク質結合パースルフィドもしくはポリスルフィド (P-SSH/-SSnH) への親電子修飾は可逆的であるか否かを検討することを目的とした。活性イオウ分子の生物学的機能を解明し、毒性学および予防医学においてその重要性を提示することを目指す。

### 3. 研究の方法

精製ヒト PTP1B (hPTP1B) および PTP1B および上皮成長因子受容体 (EGFR) の発現が高いヒト類表皮癌由来細胞株 (A431 細胞) を用いて P-SSH/-SSnH が、親電子物質曝露による PTP 活性の阻害および EGFR シグナル活性化の制御に参与するか検討した。

#### (1) P-SSH/-SS<sub>n</sub>H を介した親電子修飾

申請者らは、PTP1B の活性部位に存在する Cys121 がパースルフィド (-SSH) 化されると、その可逆性が担保されるため、不可逆とされていたタンパク質の過酸化に対して保護作用を発揮することを明らかとした。本研究においてもモデルとして PTP1B を用い、パースルフィド化によって親電子修飾の可逆性が担保されるか否かを検討した。まず、hPTP1B とパースルフィドのモデル化合物である二硫化ナトリウム (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>) を酸化的に反応させてパースルフィド化 (PTP1B-SSH) し、未反応の Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub> を除いた。PTP1B-SSH と環境中親電子物質である 1,2-ナフトキノン (1,2-NQ)、1,4-ベンゾキノン (1,4-BQ)、1,4-NQ、クロトンアルデヒドもしくはアクリルアミドをそれぞれ反応させ PTP1B-SS-親電子物質結合体を生成し、本付加体が還元剤であるジチオスレイトール (DTT) で還元されて PTP 活性が回復するか否かを PTP 活性測定により検討した。

#### (2) 環境中親電子物質による EGFR 活性化に対する活性イオウ化合物前処理の効果

A431 細胞を用いて、各環境中親電子物質単独曝露で見られる影響が Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub> を存在下で変化するかどうか検討した。その指標として、センサータンパク質である PTP1B の応答分子である EGFR の活性化をそれぞれウエスタンブロット法で検出した。

### 4. 研究成果

本研究では、タンパク質結合パースルフィドもしくはポリスルフィドへの親電子修飾は可逆

的であるか否かを検討することを目的とし、酸化ストレスのセンサータンパク質として知られる PTP1B を親電子物質の標的タンパク質として用いた。PTP1B の活性部位の反応性システイン残基は容易に酸化もしくは親電子修飾されて活性を失うと、応答分子である EGFR が活性化する。先行研究において環境中親電子物質である 1, 2-NQ は PTP1B への修飾を介して EGFR を活性化することが知られており (Iwamoto N et al, *J Biol Chem*, 2007)、1,2-NQ 以外の環境中親電子物質による PTP1B/EGFR シグナルの攪乱も懸念される。hPTP1B に環境中親電子物質である 1,4-BQ、1,2-NQ、クロトンアルデヒドもしくはアクリルアミドを反応させると、1,4-BQ および 1,2-NQ との反応では PTP 活性が阻害された。Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub> の存在下でパースルフィド化した PTP1B-SSH においても、1,4-BQ および 1,2-NQ は PTP 活性を阻害した。さらに DTT を反応させると、Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub> の存在下では阻害された PTP 活性が回復し、1,4-BQ で阻害された PTP 活性の方が回復の程度が大きかった。この結果から、PTP1B-SS-親電子物質結合体が DTT により還元されて PTP1B-SH に戻ったことが示唆された。細胞内においても、PTP1B-SSH/-SS<sub>n</sub>H は親電子修飾に対して可逆性を担保する可能性を明らかにするために、PTP 活性を阻害した 1,4-BQ および 1,2-NQ について、A431 細胞における EGFR の活性化を検討した。まず、A431 細胞を EGF 曝露により EGFR のリン酸化を亢進させると、そのリン酸化は曝露後 180 分まで認められて一過性であった。一方、環境中親電子物質である 1,2-NQ で認められた EGFR の活性化は曝露後 30-60 分をピークに 120 分後では定常レベルまで減少し、180 分後に再び活性化する二峰性を示した。Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub> を前処理すると 1,2-NQ 曝露 30 分後の EGFR のリン酸化は減少する傾向が見られた。この結果から、1,2-NQ が PTP1B-SSH 修飾を介して EGFR を活性化し、何らかの還元を受けてモノスルフィドに再生し EGFR を抑制したと示唆された。また、PTP1B のシステイン残基は反応性が高く容易に酸化されることから、再生したシステイン残基が再び化学修飾を受けて二峰性を示したと推測される。なお、1,4-BQ は hPTP1B を有意に阻害したにも関わらず、1,4-BQ (0-100 μM) に A431 細胞を曝露しても EGFR および ERK のリン酸化は認められなかったことから、細胞内で 1,4-BQ は PTP1B に対する反応性が低いもしくは EGFR への非特異的修飾により EGFR のリン酸化が阻害されているのかもしれない。今後、環境親電子物質による生体影響や化学発がん機序の包括的に解明するために 1,4-BQ に対する細胞内シグナル応答についても詳細に検討を進める必要がある。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Matsuo Kohei, Abiko Yumi, Yamano Shigeru, Toriba Akira, Matsusue Kimihiko, Kumagai Yoshito	4. 巻 46
2. 論文標題 Activation of the Keap1/Nrf2 Pathway as an Adaptive Response to an Electrophilic Metabolite of Morphine	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 338 ~ 342
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b22-00543	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Matsuo Kohei, Abiko Yumi, Yamano Shigeru, Matsusue Kimihiko, Kumagai Yoshito	4. 巻 46
2. 論文標題 Activation of HSP90/HSF1 Signaling as an Adaptive Response to an Electrophilic Metabolite of Morphine	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 334 ~ 337
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b22-00531	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Abiko Yumi, Taguchi Keiko, Hisamori Miwa, Hiyoshi-Arai Kyoko, Luong Nho Cong, Toriba Akira, Kumagai Yoshito	4. 巻 35
2. 論文標題 Redox Homeostasis is Disturbed by Redox Cycling between Reactive Cysteines of Thioredoxin 1 and 9,10-Phenanthrenequinone, an Atmospheric Electron Acceptor	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Chemical Research in Toxicology	6. 最初と最後の頁 1425 ~ 1432
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.chemrestox.2c00174	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Abiko Yumi, Toriba Akira, Kumagai Yoshito	4. 巻 2023
2. 論文標題 Phytochemicals to regulate oxidative and electrophilic stress through Nrf2 activation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Redox Experimental Medicine	6. 最初と最後の頁 e220021
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1530/REM-22-0021	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Abiko Yumi, Kurosawa Kohki, Yamakawa Hiroto, Kumagai Yoshito	4. 巻 46
2. 論文標題 Activation of PTP1B/EGFR signaling and cytotoxicity during combined exposure to ambient electrophiles in A431 cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Toxicological Sciences	6. 最初と最後の頁 177 ~ 185
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2131/jts.46.177	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Abiko Yumi, Katayama Yusuke, Akiyama Masahiro, Kumagai Yoshito	4. 巻 150
2. 論文標題 Lipophilic compounds in garlic decrease the toxicity of methylmercury by forming sulfur adducts	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Food and Chemical Toxicology	6. 最初と最後の頁 112061 ~ 112061
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.fct.2021.112061	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 安孫子ユミ、黒澤航軌、山川寛人、熊谷嘉人
2. 発表標題 A431細胞における親電子物質複合曝露によるEGFR活性化.
3. 学会等名 フォーラム2021 : 衛生薬学・環境トキシコロジー
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 安孫子ユミ、熊谷嘉人
2. 発表標題 酸化ストレスエクスポソーム : 環境化学物質に起因する活性酸素種に着目したアプローチ
3. 学会等名 第48回日本毒性学会学術年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 安孫子ユミ、青木 はな子、岡田 美幸、溝河 真衣、熊谷 嘉人
2. 発表標題 親電子物質(E)-2-alkenal類を含有するC. sativum L.抽出液によるNrf2活性化と細胞中ヒ素濃度の減少
3. 学会等名 フォーラム2020衛生薬学・環境トキシコロジー
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yumi Abiko, Hanako Aoki, Akira Toriba, Yoshito Kumagai
2. 発表標題 Effect of combined exposure of HepG2 cells to environmental electrophiles on the Keap1/Nrf2 activation and cytotoxicity.
3. 学会等名 Society of Toxicology 63rd Annual Meeting and ToxExpo (国際学会)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 安孫子ユミ、吉田さくら、鳥羽陽、熊谷嘉人
2. 発表標題 親電子物質曝露におけるPTP1Bポリスルフィド化の役割
3. 学会等名 第50回日本毒性学会学術年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 安孫子ユミ、吉田さくら、鳥羽陽、熊谷嘉人
2. 発表標題 プロテインフォスファターゼ1B結合ポリスルフィドへの親電子修飾の可逆性に関する検討
3. 学会等名 フォーラム2023衛生薬学・環境トキシコロジー
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yumi Abiko, Yoshito Kumagai
2. 発表標題 Capture of methylmercury by super sulfide species
3. 学会等名 NIMDフォーラム(招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------