

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010 ～ 2011

課題番号：22790128

研究課題名（和文） 重金属毒性に対する転写因子 Nrf1 の防御的役割とその応答機構の解析

研究課題名（英文） Analysis of role of transcription factor Nrf1 in protective response to heavy metals

研究代表者

新開 泰弘（SHINKAI YASUHIRO）

筑波大学・医学医療系・助教

研究者番号：10454240

研究成果の概要（和文）：

我々を取り巻く環境にはカドミウムやメチル水銀などの種々の有害金属が存在し、生体は常にそれらのストレスに曝されている。一方、生体はそれらの環境ストレスを感知し、応答・適応する生体防御システムを有することが近年示されている。本研究では生体防御遺伝子群の発現を制御している転写因子 Nrf1 に着目し、重金属に対する防御的役割およびその応答機構を解析した。その結果、ウシ大動脈血管内皮細胞において、Nrf1 はカドミウムおよびメチル水銀に対して毒性防御に働いていることを明らかにした。更に、Nrf1 はカドミウムによって活性化されて核に移行し、抗酸化剤応答配列 (ARE) 下流の NAD(P)H:キノン酸化還元酵素やペルオキシレドキシシン 1 などの発現を誘導することを明らかにした。これらの結果は、転写因子 Nrf1 が重金属に対する毒性防御の細胞応答システムとして機能していることを示唆している。

研究成果の概要（英文）：

Heavy metals such as cadmium and methylmercury are environmental pollutants that can target the vascular endothelium. In this study, we investigated the participation of transcription factor Nrf1 in cellular protective response to heavy metals. siRNA-mediated knockdown of Nrf1 resulted in an increase in sensitivity to cadmium and methylmercury in bovine aortic endothelial cells. Furthermore, exposure of cells to cadmium caused activation of Nrf1, leading to up-regulation of downstream genes such as NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 and peroxiredoxin 1. Taken together, these results suggests that Nrf1 acts as a defense system against heavy metals-induced toxicity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：トキシコロジー

科研費の分科・細目：薬学・環境系薬学

キーワード：重金属、カドミウム、メチル水銀、Nrf1、血管内皮細胞

1. 研究開始当初の背景

環境中には多種多様な化学物質が存在し、生体は常にそれらのストレスに曝されている。その中でも重金属であるカドミウムやメチル水銀は、それぞれイタイタイ病および水俣病の原因物質であることが知られているが、現在でも低レベルで環境中および食品中にユビキタスに存在しヒトの健康を障害する可能性があることから、国際的にもFAO/WHO 合同食品添加物専門家会議による安全性評価の積極的な見直しが行われている。カドミウムおよびメチル水銀の生体影響を理解するには、その毒性発現機構の解明が不可欠であり、国内外の研究者によりこれまで積極的に研究が進められてきた。しかしながら、カドミウムおよびメチル水銀に対する細胞応答を担う生体防御システムの解明は立ち遅れていたと言える。

一般に有害な化学物質に曝された細胞は、ストレスを感知し、応答・適応する防御システムを備えている。しかしながら、その曝露量が過剰な場合や曝露期間が長期に渡る場合には、生体が適応可能な閾値を超えて恒常性が破綻し、その結果として中毒症状を引き起こす。したがって、カドミウムやメチル水銀による毒性の表現型は、毒性発現系と生体防御系との総和であり、その意味で特に生体防御系の解明は、カドミウムおよびメチル水銀の毒性を評価する上で重要である。

親電子性物質/酸化ストレスに対する生体の感知・応答システムの発見に関しては、山本雅之教授（東北大）らの研究グループが「Keap1-Nrf2 システム」を世界に先駆けて発見し、非常に注目されている。すなわち、転写因子 Nrf2 は普段はその制御タンパク質である Keap1 によって細胞質に留められ素早い分解を受けているが、親電子性の異物や酸化ストレスなどによって感知・応答センサーである Keap1 の SH 基が修飾を受けると、Nrf2 の分解は抑制され核に蓄積し、抗酸化応答配列 (ARE) に結合して下流遺伝子の発現を強力に誘導する。Nrf2 によって転写活性化を受ける遺伝子群は多岐に渡り、ヘムオキシゲナーゼ-1 やペルオキシレドキシシン1 などの抗酸化酵素群、グルタチオン合成に関わる酵素群、グルタチオン S-転移酵素などの第2相異物代謝酵素群、多剤耐性関連タンパク質などの第3相異物排泄トランスポーターなどがこれまでに明らかにされている。一方、転写因子 Nrf2 と同じく CNC 転写因子群に属し、ARE に結合する転写因子 Nrf1 については、その制御機構を含め生体防御機構における役割はほとんど解明されていない。最近の研究により、Nrf1 は糖鎖修飾を受けた糖タンパク質であり、糖鎖結合型は小胞体膜に、脱糖

鎖型は核に局在していることが明らかとなった。このことは、Nrf1 は糖鎖シグナルを介した生体防御機構を有していることを示唆している。しかし、重金属に対する防御的役割を含め、その制御機構は全く明らかになっていない。

2. 研究の目的

近年、カドミウムの毒性に対する防御応答機構において、Keap1-Nrf2 システムが重要な役割を果たしていることを我々は明らかにした。また、2009年に Nrf1 がメタロチオネインの発現に関与していることが報告され、Nrf2 だけでなく Nrf1 も重金属の毒性に対して非常に重要な役割を果たしていることが予想される。そこで、本研究の目的は培養細胞を用いて、1) 重金属毒性に対する転写因子 Nrf1 の防御的役割を調べる、2) 転写因子 Nrf1 を介した重金属に対する細胞の応答機構を明らかにする。環境汚染重金属のモデルとして、カドミウムおよびメチル水銀を使用する。

3. 研究の方法

近年重金属の標的組織の1つとして血管内皮細胞が注目されていることから、細胞はウシ大動脈血管内皮細胞 (BAEC) を用いた。タンパク質の発現はウエスタンブロット法で検出した。mRNA の発現量の変化はリアルタイム PCR 法にて測定した。Nrf1 のノックダウンは、全長 Nrf1 を標的とする siRNA をリポフェクション法で導入した。細胞毒性は MTT 法および LDH 法にて検討した。ARE の転写活性化はルシフェラーゼ法で検討した。細胞内カドミウムの蓄積量は ICP-MS 法で測定した。転写因子と DNA の相互作用はクロマチン免疫沈降アッセイで検討した。

4. 研究成果

ウシ大動脈血管内皮細胞において、SDS-PAGE 上にて約 150 kDa の Nrf1 の発現が観察された。このバンドは N 結合糖鎖付加阻害剤であるツニカマイシンの処理により約 110 kDa にシフトしたことから、約 150 kDa のバンドが糖鎖結合型、約 110 kDa のバンドが脱糖鎖型であることが示唆された。そこで全長 Nrf1 を標的とする siRNA を設計・導入して当該転写因子をノックダウンしたところ、抗酸化剤応答配列 (ARE) の転写活性化は減弱し、カドミウムおよびメチル水銀の細胞毒性は有意に増強された。このとき、細胞内カドミウム蓄積量に変化は見られなかった。

次に、カドミウムに対する Nrf1 の応答について検討したところ、カドミウムの曝露により脱糖鎖型 Nrf1 の発現が濃度依存的に増加し、核に蓄積した。このとき、Nrf1 の mRNA 量に変化は見られなかったことから、カドミウムにより Nrf1 タンパク質の分解が抑制されている可能性が示唆された。そこで Nrf1 の分解機構について検討したところ、プロテアソームの阻害剤である MG-132 の処理により Nrf1 は短時間で細胞内に蓄積した。またタンパク質合成阻害剤であるシクロヘキシミドの処理により、Nrf1 は半減期約 14 分で速やかに分解された。カドミウム曝露による Nrf1 タンパク質の安定性の変化を検討したところ、糖鎖結合型 Nrf1 の半減期に変化は見られなかったが、脱糖鎖型 Nrf1 の半減期が Cd の曝露により増長されていたことから、Nrf1 は Cd により分解が抑制されることで活性化されることが示唆された。

一方、カドミウムの曝露により、転写因子 Nrf2 の活性化に伴うヘムオキシゲナーゼ-1(HO-1)、メタロチオネイン-I/II(MT-I/II)、NAD(P)H:キノン酸化還元酵素 1(NQO1)およびペルオキシレドキシシン 1(Prx1)などの ARE 下流のタンパク質の発現誘導が観察されたが、Nrf1 のノックダウンにより NQO1 や Prx1 の発現誘導レベルが低下した。さらに、Nrf1 の当該遺伝子のプロモーター領域へのリクルートを検討したところ、カドミウムの曝露によって NQO1 および Prx1 のプロモーター上 ARE への Nrf1 の結合がいずれも有意に上昇していた。以上より、BAEC において Nrf1 はカドミウムによって活性化され、抗酸化酵素群の発現を制御してカドミウムの毒性に対して防御的に働く転写因子であることが示唆された。我々は Nrf2 がカドミウムによって活性化され、ARE を介して HO-1 や MT-I/II やの発現誘導に関わることを明らかにしていることから、BAEC はカドミウムの細胞内侵入に対して異なる CNC 転写因子群を活性化することで、本重金属の不活性化および酸化ストレス防御系を上昇させ適応しているのかもしれない。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 14 件) 全て査読有

1. Kumagai Y, Shinkai Y, Miura T, Cho AK. The chemical biology of naphthoquinones and its environmental implications. Annual Review of Pharmacology and Toxicology 2012; 52: 221-247.

2. Yoshida E, Toyama T, Shinkai Y, Sawa T, Akaike T, Kumagai Y. Detoxification of methylmercury by hydrogen sulfide producing enzyme in mammalian Cells. Chemical Research in Toxicology 2011; 24: 1633-1635.
3. Takayama N, Iwamoto N, Sumi D, Shinkai Y, Tanaka-Kagawa T, Jinno H, Kumagai Y. Peroxiredoxin 6 is a molecular target for 1,2-naphthoquinone, an atmospheric electrophile, in human pulmonary epithelial A549 cells. Journal of Toxicological Sciences 2011; 36: 817-821.
4. Miura T, Shinkai Y, Hirose R, Iwamoto N, Cho AK, Kumagai Y. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase as a quinone reductase in the suppression of 1,2-naphthoquinone protein adduct formation. Free Radical Biology & Medicine 2011; 51: 2082-2089.
5. Toyama T, Yoshida E, Shinkai Y, Kumagai Y. DNA microarray analysis of human neuroblastoma SH-SY5Y cells exposed to methylmercury. Journal of Toxicological Sciences 2011; 36: 843-845.
6. Miura T, Kakehashi H, Shinkai Y, Egara Y, Hirose R, Cho AK, Kumagai Y. GSH-mediated S-transarylation of a quinone glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase conjugate. Chemical Research in Toxicology 2011; 24: 1836-1844.
7. Abiko Y, Miura T, Bui H Phuc, Shinkai Y, Kumagai Y. Participation of covalent modification of Keap1 in the activation of Nrf2 by *tert*-butylbenzoquinone, an electrophilic metabolite of butylated hydroxyanisole. Toxicology and Applied Pharmacology 2011; 255: 32-39.
8. Toyama T*, Shinkai Y*, Yasutake A, Uchida K, Yamamoto M, Kumagai Y. Isothiocyanates reduce mercury accumulation via an Nrf2-dependent mechanism during exposure of mice to methylmercury. Environmental Health Perspective 2011; 119: 1117-1122. (*equal contribution)
9. Miura T, Shinkai Y, Jiang HY, Iwamoto N, Sumi D, Taguchi K, Yamamoto M, Jinno H, Tanaka-Kagawa T, Cho AK, Kumagai Y. Initial response and cellular protection through the Keap1/Nrf2 system during exposure of

- primary mouse hepatocytes to 1,2-naphthoquinone. *Chemical Research in Toxicology* 2011; 24: 559-567.
10. Fujiwara Y, Banno H, Shinkai Y, Yamamoto C, Kaji T, Satoh M. Protective effect of pretreatment with cilostazol on cytotoxicity of cadmium and arsenite in cultured vascular endothelial cells. *Journal of Toxicological Sciences* 2011; 36: 155-161.
 11. Toyama T*, Shinkai Y*, Sumi D, Kumagai Y. Carbon monoxide derived from heme oxygenase-2 mediates reduction of methylmercury toxicity in SH-SY5Y cells. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2010; 249: 86-90. (*equal contribution)
 12. Hirooka T, Fujiwara Y, Shinkai Y, Yamamoto C, Yasutake A, Satoh M, Eto K, Kaji T. Resistance of human brain microvascular endothelial cells in culture to methylmercury: cell-density-dependent defense mechanisms. *Journal of Toxicological Sciences*. 2010; 35: 287-294.
 13. Sumi D, Shinkai Y, Kumagai Y. Signal transduction pathways and transcription factors triggered by arsenic trioxide in leukemia cells. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2010; 244: 385-392.
 14. Abiko Y*, Shinkai Y*, Sumi D, Kumagai Y. Reduction of arsenic-induced cytotoxicity through Nrf2/HO-1 signaling in HepG2 cells. *Journal of Toxicological Sciences* 2010; 35: 419-423. (*equal contribution)

[学会発表] (計 21 件)

1. 新開泰弘 : 環境中親電子物質の細胞内運命. 第 28 回臨床フリーラジカル会議, 2012 年 1 月 20 日, 京都府
2. 新開泰弘, 伊藤友里, 山本千夏, 鍛冶利幸, 熊谷嘉人 : カドミウムによる転写因子 Nrf1 の活性化とそれを介した細胞の適応機構. メタロチオネインおよびメタルバイオサイエンス研究会 2011, 2011 年 12 月 8 日, 愛知県
3. 吉田映子, 外山喬士, 新開泰弘, 熊谷嘉人 : メチル水銀の解毒防御因子としての硫化水素. メタロチオネインおよびメタルバイオサイエンス研究会 2011, 2011 年 12 月 8 日, 愛知県
4. 藤江智也, 中寛史, 立浪忠志, 山本千夏, 廣岡孝志, 安池修之, 新開泰弘, 熊谷嘉人, 内山真伸, 鍛冶利幸 : ハイブリッド分子による血管内皮細胞の Nrf2 およびメタロチオネインの発現誘導. メタロチオネインおよびメタルバイオサイエンス研究会 2011, 2011 年 12 月 8 日, 愛知県
5. 新開泰弘, 角大悟, 外山喬士, 熊谷嘉人 : アクアポリン 9 はマウス初代肝細胞においてヒ素の細胞内蓄積とそれに伴う細胞毒性に関与する. 第 17 回ヒ素シンポジウム, 2011 年 11 月 19 日, 茨城県
6. 外山喬士, 神田洋紀, 新開泰弘, 熊谷嘉人 : メチル水銀による S-水銀化を介したソルビトール脱水素酵素の機能破綻. 衛生薬学・環境トキシコロジー, 2011 年 10 月 28 日, 石川県
7. 広瀬玲子, 三浦高, 新開泰弘, 香川(田中)聡子, 神野透人, 熊谷嘉人 : 大気親電子物質 1,4-ナフトキノンによるタンパク質の化学修飾を検出する免疫化学的手法の開発. 衛生薬学・環境トキシコロジー, 2011 年 10 月 28 日, 石川県
8. 三浦高, 掛橋秀直, 新開泰弘, 熊谷嘉人 : グルタチオンの新たな機能: 大気中親電子物質による細胞内タンパク質の化学修飾制御に係わる S-トランスアリアル化. 衛生薬学・環境トキシコロジー, 2011 年 10 月 27 日, 石川県
9. 伊藤友里, 新開泰弘, 山本千夏, 鍛冶利幸, 熊谷嘉人 : カドミウムによる親電子物質応答配列を介した転写因子 Nrf1 の活性化. 衛生薬学・環境トキシコロジー, 2011 年 10 月 27 日, 石川県
10. 安孫子ユミ, 岩本典子, Bui Hoang Phuc, 新開泰弘, 熊谷嘉人 : プチルヒドロキシアニソールで生じる Nrf2 活性化はその親電子代謝物による Keap1 の化学修飾が関与する. 第 38 回日本トキシコロジー学会学術集会, 2011 年 7 月 11 日, 神奈川県
11. Shinkai Y, Kumagai Y, Kimura T, Yamamoto C, Yamamoto M, Jinno H, Tanaka-Kagawa T, Kaji T : The Keap1-Nrf2 system regulates metallothionein expression and protects vascular endothelial cells from cadmium cytotoxicity. Society of Toxicology 50th Annual Meeting, 2011 年 3 月 8 日, Washington DC, USA
12. Miura T, Egara Y, Hirose R, Iwamoto N, Shinkai Y, Jinno H, Tanaka-Kagawa T, Cho AK, Kumagai Y : Mechanisms by which glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase protects itself against a chemical modification. Society of Toxicology 50th Annual Meeting, 2011 年 3 月 8 日, Washington DC, USA
13. 安孫子ユミ, 新開泰弘, 角大悟, 熊谷嘉

- 人：HepG2 細胞において Nrf2/HO-1 シグナルの活性化はヒ素の毒性の軽減に関与する。第 16 回ヒ素シンポジウム, 2011 年 2 月 5 日, 北海道
14. 熊谷嘉人、外山喬士、新開泰弘、角大悟、山本雅之：Keap1/Nrf2 システムを介したメチル水銀に対する生体応答・毒性防御。第 10 回分子予防環境医学研究会, 2011 年 1 月 21 日, 京都府
 15. 安孫子ユミ, Bui Hoang Phuc, 岩本典子, 新開泰弘, 熊谷嘉人：ブチルヒドロキシアニソールの親電子代謝物による Keap1/Nrf2 システムの活性化。衛生薬学・環境トキシコロジー, 2010 年 9 月 10 日, 東京都
 16. 矢澤亜季、岩本典子、安孫子ユミ、浅井聡、三浦高、新開泰弘、熊谷嘉人：S-トランスアルキル化を介した親電子修飾の自己制御タンパク質の同定。衛生薬学・環境トキシコロジー, 2010 年 9 月 10 日, 東京都
 17. 新開泰弘、山本千夏、鍛冶利幸、熊谷嘉人：血管内皮細胞において鉛は JNK-AP-1 経路を介して小胞体シャペロン GRP78 および GRP94 を誘導する。衛生薬学・環境トキシコロジー, 2010 年 9 月 10 日, 東京都
 18. 三浦高、岩本典子、新開泰弘、熊谷嘉人：親電子修飾の自己制御能を有する解糖系酵素としてのグリセルアルデヒド 3-リン酸脱水素酵素。衛生薬学・環境トキシコロジー, 2010 年 9 月 9 日, 東京都
 19. Kumagai Y, Toyama T, Shinkai Y, Yasutake A : Nrf2-dependent protection against methylmercury toxicity in vitro and in vivo. XII International Congress of Toxicology, 2010 年 7 月 22 日, Balcelona, Spain
 20. 新開泰弘、山本千夏、鍛冶利幸、熊谷嘉人：血管内皮細胞において Nrf1 はカドミウムに対する防御応答を担う転写因子である。第 37 回日本トキシコロジー学会学術年会, 2010 年 6 月 17 日, 沖縄県
 21. 新開泰弘、外山喬士、安武章、山本雅之、熊谷嘉人：メチル水銀の解毒排泄における転写因子 Nrf2 の役割。第 80 回日本衛生学会学術総会, 2010 年 5 月 11 日, 宮城県

[その他]

ホームページ等

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

6. 研究組織

(1)研究代表者

新開 泰弘 (SHINKAI YASUHIRO)

筑波大学・医学医療系・助教

研究者番号：10454240