

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590159

研究課題名(和文) 大気中親電子物質 1,4-ナフトキノンに対する細胞の生存シグナル制御機構

研究課題名(英文) Activation of cellular signal transduction pathways in protective response to an atmospheric electrophile, 1,4-naphthoquinone

研究代表者

新開 泰弘 (Yasuhiro, Shinkai)

筑波大学・医学医療系・助教

研究者番号：10454240

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)： 大気汚染物質である1,4-ナフトキノン(1,4-NQ)は親電子性を有しており、生体内にてタンパク質の反応性システイン残基と容易に共有結合を形成する。本研究では1,4-NQを特異的に認識する抗体を作製し、ヒト扁平上皮A431細胞を用いて細胞内の分子標的やそれに対応する生存シグナル伝達経路を解析することを目的とした。その結果、細胞は1,4-NQのような親電子物質に対して、センサータンパク質の親電子修飾を介して生存に関わる複数のシグナル伝達経路(HSP90/HSF1系、Keap1/Nrf2系、PTP1B/EGFR系など)を活性化させて防御応答することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)： 1,4-Naphthoquinone (1,4-NQ), an environmental electrophile, is capable of covalently binding to cellular proteins, which has been recognized to be associated with not only its toxicity but also the activation of cellular signal transduction pathways for cellular protection against reactive chemicals. In this study, we prepared specific anti-1,4-NQ antibody and found that 1,4-NQ-mediated covalent modification of heat shock protein 90 (HSP90) causes activation of heat shock factor-1 (HSF1), resulting in protection against 1,4-NQ toxicity in A431 cells. Furthermore, Keap1/Nrf2 and PTP1B/EGFR pathways as well as HSP90/HSF1 pathway also found to play a role in protective response to 1,4-NQ toxicity.

研究分野：毒性学

キーワード：1,4-ナフトキノン 親電子物質 ストレス応答 HSP/HSF1 Keap1/Nrf2 PTP1B/EGFR

1. 研究開始当初の背景

産業の発達に伴い、化石燃料の燃焼などにより発生する大気中汚染物質の健康影響が危惧されている。我々は大気中より、新奇の親電子物質としてナフタレンの光酸化体である 1,2-ナフトキノ (1,2-NQ) を同定し、その生体内分子標的や細胞の適応システムについて研究を行ってきた。1,2-NQ のような親電子物質は、タンパク質の反応性システイン残基と不可逆的な共有結合を形成してその機能障害に関わることから、反応性の高い有害物質であるといえる。一方、生体はそのような親電子物質から身を守る感知・応答の適応システムを有しており、最も代表的なシステムとして Keap1/Nrf2 系が明らかにされている。すなわち、生体はセンサータンパク質である Keap1 の反応性システイン残基で親電子物質を感知し、それが引き金となって普段は負に制御されている転写因子 Nrf2 の活性化を引き起こす。Nrf2 は第二相異物代謝酵素群および第三相トランスポーターの発現を一括制御していることから、細胞は親電子物質の解毒および細胞外への排泄を促進できる。我々は、この Keap1/Nrf2 システムが 1,2-NQ の毒性防御機構において重要な役割を担っていることを明らかにしている。

親電子物質に対するそれ以外の生体の感知・応答センサーとしては、PTP1B/EGFR 系や HSP/HSP1 系が考えられる。例えば、Protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) はプロテインフォスファターゼファミリーに属する脱リン酸化酵素であり、上皮成長因子受容体 (EGFR) の自己リン酸化による活性化を負に制御している。しかし、PTP1B の反応性システイン残基が 1,2-NQ のような親電子物質によって修飾を受けて不活性化されると、EGFR が活性化され、その下流の生存シグナル伝達系を活性化させることによって細胞は死から免れるのではないかと予想した。実際、1,2-NQ が PTP1B の Cys121 に共有結合して本酵素活性を阻害し、細胞内 EGFR のリン酸化を亢進させることを我々は既に明らかにしている。以上のように、これまで大気中のモデル親電子物質として 1,2-NQ に着目して研究を進めてきた。一方、我々は同じく大気中より親電子物質として 1,4-ナフトキノ (1,4-NQ) を同定しているが、1,4-NQ に対する感知・応答センサーや、それを介した細胞の生存シグナル伝達機構については未解明のまま残されていた。1,4-NQ と 1,2-NQ は共にタンパク質への共有結合能を有するが、化学的に 1,4-NQ の方がその反応性は低い。言い換えれば、1,4-NQ はタンパク質に非特異的に結合するというよりもむしろ、より反応性の高いシステイン残基 (センサータンパク質) と結合しやすい可能性が考えられる。大気汚染の深刻なアメリカ南カリフォルニア地区で採取した大気サンプルにおいて、1,4-NQ は 1,2-NQ よりも高い濃度で検出され

ていることから、当該物質に対する生体の防御機構を明らかにすることは環境衛生学的観点からも重要である。

2. 研究の目的

本研究では大気中に存在する親電子物質のモデルとして 1,4-NQ を用い、その特異的抗体を作製し、当該親電子物質に対する感知・応答センサーを介した細胞の生存シグナル制御機構を明らかにすること目的とする。細胞がどのようなシステムで親電子物質に反応しているのかを理解することで、効果的な生体防御戦略を構築するための基礎的知見を得ることを目指す。

3. 研究の方法

1) 抗 1,4-NQ 抗体の作製

ポリクローナル抗体の作製はヘモシアンに 1,4-NQ を共有結合させ、これをウサギ (New Zealand 系、雌性) に 2 週間毎に感作した。抗体の精製は得られた抗血清を 50% 硫酸画分 (50% 飽和) した後、沈殿タンパク質を溶解してプロテイン A カラムで IgG 画分を得た。抗体の力価は ELISA 法で検討した。

2) 細胞の生存シグナルの活性化とその防御的役割

細胞はヒト扁平上皮由来 A431 細胞およびヒト胎児腎由来 HEK293 細胞を用いた。タンパク質の相互作用は免疫沈降法を用いた。タンパク質の発現および核移行はウエスタンブロットにて検出した。遺伝子発現変動の解析はマイクロアレイ法を用いた。Heat shock response element (HRE) の転写活性化はルシフェラーゼ法を用いた。細胞毒性は MTT 法を用いて検討した。

4. 研究成果

1,4-NQ は親電子性を有しており、生体内にてタンパク質の反応性システイン残基と容易に共有結合を形成するが、その細胞内分子標的に関する知見は乏しい。そこでまず、1,4-NQ を特異的に認識する抗体を作製し、当該物質の細胞内標的タンパク質を検出・同定すること目的とした。1,4-NQ 抗原を感作して得られたウサギ抗血清を用いて ELISA 法にて検討したところ、1,4-NQ に対する抗体価の上昇を認めた。そこでウサギ血清中の IgG 画分を精製した後、抗 1,4-NQ 抗体の抗原特異性について検討した。本研究で作製したウサギポリクローナル抗体は、1,2-NQ に対する僅かな交差性を有したが、1,4-NQ を母骨格とした各種誘導体は全く認識しなかったことから、1,4-NQ に特異性の高い抗体であることが示唆された。

次に、ヒト扁平上皮 A431 細胞に 1,4-NQ を曝露後に、回収したタンパク質を 2 次元電気

泳動で分離し 1,4-NQ 抗体で 1,4-NQ の標的タンパク質を検出後、LC-MS にてそのタンパク質を同定した。その結果、合計 9 つのタンパク質を同定し、中でも 3 種類が熱ショックタンパク質ファミリー (HSP90, HSC71, HSP70) であることを明らかにした。近年、細胞の親電子シグナル伝達系の 1 つとして HSP/HSF1 系が報告されており、heat shock protein 90 (HSP90) や HSP70 は転写因子 heat shock factor-1 (HSF1) を負に制御していることが知られている。そこで次に、センサータンパク質への共有結合に伴う親電子シグナル伝達経路の活性化について解析した。A431 細胞を 1,4-NQ に曝露後、HSP90 を免疫沈降したところ確かに 1,4-NQ が結合していた。リコンビナント HSP90 を用いて 1,4-NQ の結合部位を LS-MS にて同定した結果、Cys564 または Lys565 に結合することを明らかにした。この結合部位は HSP90 の 2 量体化に関わるドメインに位置していることから、1,4-NQ は HSP90 の 2 量体化を阻害することによってその機能を低下させる可能性が示唆された。ところで、HSP90 は定常時に転写因子 HSF1 と結合することによってその機能を負に制御していることが知られている。そこで HSF1 の活性化を検討したところ、1,4-NQ の曝露により HSP90 と HSF1 の相互作用が低下し、HSF1 が核に移行することを明らかにした。また、1,4-NQ の曝露濃度依存的に HSF1 の下流遺伝子群である HSPA6、HSP40、HSP90 および HSP105 の発現が誘導された。更に、HSF1 のノックダウンにより 1,4-NQ による HSPA6 の発現亢進は抑制され、1,4-NQ の毒性は有意に増強した。以上の結果より、HSP90/HSF1 系が 1,4-NQ に対して細胞生存に働く防御応答システムの 1 つとして機能していることが示唆された。最後に、Keap1/Nrf2 系および PTP1B/EGFR 系を介した細胞の生存シグナル制御機構を検討した。ヒト扁平上皮 A431 細胞を 1,4-NQ に曝露したところ、転写因子 Nrf2 の核移行および下流タンパク質であるヘムオキシゲナーゼ-1 (HO-1) の発現亢進が観察された。また、1,4-NQ 曝露による遺伝子発現の変動をマイクロアレイにて網羅的に調べたところ、HO-1 だけでなく Nrf2 下流の γ -グルタミルシステインリガーゼ (GCL) やアルドケト還元酵素 (AKR) 分子種の発現誘導が見られた。一方、1,4-NQ に曝露した A431 細胞においては PTP1B の修飾とそれに伴う EGFR および ERK のリン酸化レベルの上昇も見られた。このとき、EGFR の阻害剤 PD153035 および ERK の阻害剤 PD98059 を前処理すると 1,4-NQ による濃度依存的な細胞死はいずれも増強したことから、PTP1B/EGFR 系が 1,4-NQ に対する毒性防御機構の 1 つとして機能していることが示唆された。すなわち、細胞は 1,4-NQ のような親電子物質に対して、複数の生存シグナル経路 (HSP90/HSF1 系、Keap1/Nrf2 系、PTP1B/EGFR 系など) を活性化させて応答す

ることが明らかとなった。

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 13 件)

1. Shinkai, Y., Abiko, Y., Ida, T., Miura, T., Kakehashi, H., Ishii, I., Nishida, M., Sawa, T., Akaike, T. & Kumagai, Y. Reactive Sulfur Species-Mediated Activation of the Keap1-Nrf2 Pathway by 1,2-Naphthoquinone through Sulfenic Acids Formation under Oxidative Stress. *Chem. Res. Toxicol.* 28, 838-847 (2015).
2. Shinkai, Y., Shinkai, Y. & Kumagai, Y. S-mercuration of cellular proteins by methylmercury and its toxicological implications. *J. Toxicol. Sci.* 39, 687-700 (2014).
3. Toyama, T.*, Shinkai, Y.*, Yazawa, A., Kakehashi, H., Kaji, T. & Kumagai, Y. Glutathione-mediated reversibility of covalent modification of ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 by 1,2-naphthoquinone through Cys152, but not Lys4. *Chem. Biol. Interact.* 214, 41-48 (2014). (*equal contribution)
4. Shinkai, Y., Nakajima, S., Eiguren-Fernandez, A., Di Stefano, E., Schmitz, D.A., Froines, J.R., Cho, A.K. & Kumagai, Y. Ambient vapor samples activate the Nrf2-ARE pathway in human bronchial epithelial BEAS-2B cells. *Environ. Toxicol.* 29, 1292-1300 (2014).
5. Fujie, T., Naka, H., Yamamoto, C., Shinkai, Y., Kumagai, Y. & Kaji, T. [Activation of cellular defense mechanism by organic-inorganic hybrid molecules]. *Yakugaku Zasshi* 134, 813-815 (2014).
6. Toyama, T.*, Shinkai, Y.*, Kaji, T. & Kumagai, Y. A convenient method to assess chemical modification of protein thiols by electrophilic metals. *J. Toxicol. Sci.* 38, 477-484 (2013). (*equal contribution)
7. Shinkai, Y., Yamanaka, I., Duong, H.H., Quynh, N.T., Kanaho, Y. & Kumagai, Y. *Garcinia vilsersiana* bark extract activates the Nrf2/HO-1 signaling pathway in RAW264.7 cells. *J. Toxicol. Sci.* 38, 875-878 (2013).
8. Beei, C., Iwamoto, N., Inaba, T., Shinkai, Y. & Kumagai, Y. Activation of

EGFR/MEK/ERK/AP-1 signaling mediated by 1,2-naphthoquinone, an atmospheric electrophile, in human pulmonary A549 cells. *J. Toxicol. Sci.* 38, 793-797 (2013).

9. Kumagai, Y., Kanda, H., **Shinkai, Y.** & Toyama, T. The role of the Keap1/Nrf2 pathway in the cellular response to methylmercury. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2013, 848279 (2013).
10. **Shinkai, Y.**, Iwamoto, N., Miura, T., Ishii, T., Cho, A.K. & Kumagai, Y. Redox cycling of 1,2-naphthoquinone by thioredoxin1 through Cys32 and Cys35 causes inhibition of its catalytic activity and activation of ASK1/p38 signaling. *Chem. Res. Toxicol.* 25, 1222-1230 (2012).
11. Kanda, H., Toyama, T., Shinohara-Kanda, A., Iwamatsu, A., **Shinkai, Y.**, Kaji, T., Kikushima, M. & Kumagai, Y. S-Mercuration of rat sorbitol dehydrogenase by methylmercury causes its aggregation and the release of the zinc ion from the active site. *Arch. Toxicol.* 86, 1693-1702 (2012).
12. Hirose, R., Miura, T., Sha, R., **Shinkai, Y.**, Tanaka-Kagawa, T. & Kumagai, Y. A method for detecting covalent modification of sensor proteins associated with 1,4-naphthoquinone-induced activation of electrophilic signal transduction pathways. *J. Toxicol. Sci.* 37, 891-898 (2012).
13. **Shinkai, Y.** & Kaji, T. Cellular defense mechanisms against lead toxicity in the vascular system. *Biol. Pharm. Bull.* 35, 1885-1891 (2012).

〔学会発表〕(計 20 件)

1. **Shinkai Y.**, Miura T, Kakehashi H, Akaike T, Kumagai Y. Reactive sulfur species-mediated activation of the Keap1-Nrf2 pathway by 1,2-naphthoquinone through sulfenic acids formation under oxidative stress. Society of Toxicology 54th Annual Meeting (San Diego, USA) 2015 年 3 月
2. Kumagai Y, **Shinkai Y.**, Schopfer F. J., Akaike T, Freeman B. A. Sulfur adducts formation during interaction of nitro-oleic acid with polysulfides. Gordon Research Conference (Ventura, USA) 2015 年 2 月
3. **新開 泰弘**, 三浦 高, 掛橋 秀直, 赤池 孝章, 熊谷 嘉人. 活性イオウ分子と活性酸素種が介在する可逆的な親電子シグナル

の活性化. 第 87 回日本生化学会大会, 2014 年 10 月, 京都

4. **新開 泰弘**, 三浦 高, 掛橋 秀直, 赤池 孝章, 熊谷 嘉人. 活性イオウ分子と酸化ストレスを介した 1,2-ナフトキノンによる親電子シグナルの活性化. 衛生薬学・環境トキシコロジー, 2014 年 9 月, つくば
5. **新開 泰弘**, 吉田 映子, Bruce A. FREEMAN, 西田 基宏, 澤 智裕, 赤池 孝章, 熊谷 嘉人. 活性イオウ分子産生酵素シスタチオニン β シンターゼによる親電子シグナル伝達系の制御. 第 41 回日本毒理学学会学術年会, 2014 年 7 月, 神戸
6. **Shinkai Y.**, Nakajima S, Eiguren-Fernandez A, Stefano ED, Schmitz DA, Froines JR, Cho AK, Kumagai Y. Ambient Vaper Samples Activate the Nrf2-ARE Pathway but Not an Inflammatory Response in Human Bronchial Epithelial BEAS-2B Cells. Society of Toxicology 53th Annual Meeting (Phoenix, USA) 2014 年 3 月
7. Hirose R, Miura T, Sha R, **Shinkai Y.**, Tanaka-Kagawa T, Kumagai Y. Proteomics Analysis to Identify Sensor Proteins with Covalent Modification Associated with 1,4-Naphthoquinone-Induced Activation of Electrophilic Signal Transduction Pathways. Society of Toxicology 53th Annual Meeting (Phoenix, USA) 2014 年 3 月
8. **Shinkai Y.**, Kaji T, Kumagai Y. Activation of Nrf1/ARE pathway by cadmium in vascular endothelial cells. The Environmental Response (仙台) 2014 年 2 月
9. **新開 泰弘**, 沙 亮, 熊谷 嘉人. 1,4 ナフトキノンは親電子修飾を介して生存シグナル制御に関わる HSF90/HSF1 系を活性化する. フォーラム 2013 : 衛生薬学・環境トキシコロジー, 2013 年 9 月, 福岡
10. 溝河 真衣, 安孫子 ユミ, **新開 泰弘**, 熊谷 嘉人. 転写因子 Nrf2 の活性化能を有する *Coriandrum sativum* L. 葉抽出物に含有される脂肪族親電子物質の同定. フォーラム 2013 衛生薬学・環境トキシコロジー, 2013 年 9 月, 福岡
11. 原 崇人, **新開 泰弘**, 山本 千夏, 熊谷 嘉人, 鍛冶 利幸. 血管内皮細胞においてピグリカンの発現制御はシンデカン-4 の発現を誘導する. フォーラム 2013 衛生薬学・環境トキシコロジー, 2013 年 9 月, 福岡
12. 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。有機-無機ハイブリッド分子による生体防御系の活性化。日本薬学会 第 133 年会，2013 年 3 月，横浜

13. Sha R, **Shinkai Y**, Kumagai Y. Activation of Heat Shock Response during exposure of human epithelial A431 cells to an environmental electrophile, 1,4-naphthoquinone. 第 12 回分子予防環境医学研究会，2013 年 2 月，つくば
14. **新開 泰弘**, Bruce A. Freeman, 西田 基宏、澤 智裕、赤池 孝章、熊谷 嘉人。硫化水素産生酵素シスタチオンβシクターゼによる細胞内親電子シグナル制御。第 85 回日本生化学会大会，2012 年，福岡
15. **新開 泰弘**、三浦 高、Bruce A. Freeman、赤池 孝章、熊谷 嘉人。シスタチオンβシクターゼに由来する H₂S/HS⁻は細胞内親電子シグナルを制御する。フォーラム 2012: 衛生薬学・環境トキシコロジー，2012 年，名古屋
16. 掛橋 秀直、**新開 泰弘**、熊谷 嘉人。マウス初代肝細胞における環境中親電子リガンド 1,2-ナフトキノンのグルタチオン抱合体の意外な細胞内運命。フォーラム 2012: 衛生薬学・環境トキシコロジー，2012 年，名古屋
17. Yoshida E, Toyama T, **Shinkai Y**, Kumagai Y. Bismethylmercury sulfide as a novel detoxified metabolite of methylmercury in mammalian cells. The 6th International Congress of Asian Society of Toxicology (仙台) 2012 年 7 月
18. Abiko Y, Miura T, Bui H Phuc, **Shinkai Y**, Kumagai Y. Activation of Nrf2 caused by tert-butylbenzoquinone, a metabolite of butylated hydroxyanisole, requires electrophilic modification of Keap1 through its reactivethiols. The 6th International Congress of Asian Society of Toxicology (仙台) 2012 年 7 月
19. Kumagai Y, **Shinkai Y**, Miura T, Freeman BA, Nishida M, Sawa T, Akaike T. Negative regulation of CBS to generate hydrogen sulfide on activation of an electrophilic signaling in human epithelial A431 cells. The 33rd Naito Conference on Oxygen, Oxidative Stress and Diseases (札幌) 2012 年 6 月
20. **Shinkai Y**, Miura T, Kakehashi H, Kumagai Y. Oxygen-mediated secondary electrophilic

modification of Keap1 associated with Nrf2 activation by 1,2-NQ-SH adduct during interaction of 1,2-NQ with hydrogen sulfide. The 33rd Naito Conference on Oxygen, Oxidative Stress and Diseases (札幌) 2012 年 6 月

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

筑波大学医学医療系環境生物学研究室

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

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

(2) 研究分担者

熊谷嘉人 (KUMAGAI, Yoshito)
筑波大学・医学医療系・教授
研究者番号：00250100