

科学研究費助成事業（基盤研究（S））公表用資料
〔平成28年度研究進捗評価用〕

平成25年度採択分
平成28年3月23日現在

環境中親電子物質によるシグナル伝達変動とその制御に関する
包括的研究

Comprehensive study on environmental
electrophiles-mediated signal transduction pathways
regulated by active sulfur species

課題番号：25220103

熊谷 嘉人 (KUMAGAI YOSHITO)

筑波大学・医学医療系・教授



研究の概要

環境中親電子物質によるセンサータンパク質の化学修飾を介したレドックスシグナル伝達経路の活性化およびその破綻に起因する毒性発現（高濃度曝露）という2面性の実態を細胞および個体レベルで明らかにする。また、このような環境中親電子物質の反応性を制御する活性イオウ分子の役割を明快に示し、新たな環境リスクの軽減案を提言する。

研究分野：環境・衛生系薬学

キーワード：親電子物質、シグナル伝達、環境応答、化学修飾、活性イオウ分子

1. 研究開始当初の背景

環境中親電子物質は、生体内タンパク質のシステイン残基と共有結合し、発がん性や組織傷害等に関与すると理解されてきた。一方、生体には環境の変化に的確に応答し、恒常性を維持する様々なシグナル伝達経路が存在する。これに対して、このような細胞内シグナル伝達の破綻が、がん、生活習慣病、自己免疫疾患の発症要因になることが知られている。ところが、環境中親電子物質によるシグナル伝達変動の分子基盤は殆ど解明されていない。興味深いことは、反応性の高い（ pK_a 値の低い）システイン残基を有するセンサータンパク質と、それにより負に制御されている応答分子（キナーゼ、転写因子等）からなるレドックスシグナル伝達経路が複数明らかにされていることである。

2. 研究の目的

本研究では、環境中親電子物質によるセンサータンパク質の化学修飾を起点とする、細胞生存、細胞増殖、毒性防御に係る各種レドックスシグナル伝達経路の活性化と曝露量の増加に起因する当該シグナル系の破綻（毒性発現）を調べた。また、生体内で産生される硫化水素、パルスルフィド/ポリスルフィドのような活性イオウ分子（RSS）が、環境中親電子物質の捕獲・不活性化とそれに伴う当該シグナル伝達および有害性の制御分子であるか否かを検討した。

3. 研究の方法

ガソリンやタバコの燃焼で生じるナフト

キノン類（NQs）およびクロトンアルデヒド（CA）、マグロ等の食用魚類および米にそれぞれ蓄積するメチル水銀（MeHg）およびカドミウム（Cd）、水道管等に含まれる鉛（Pb）、加熱食品に広範に含まれるアクリルアミド（AA）を環境中親電子物質のモデルとして使用した。まず、環境中親電子物質によるタンパク質の化学修飾を検出するアッセイを確立し、つぎに環境中親電子物質による異なる4つのレドックスシグナル伝達経路変動の曝露量の特異性を調べた。次に培養細胞および野生型と活性イオウ分子産生に関与するcystathionine γ -lyase（CSE）欠損マウスを用いて、環境中親電子物質による各種レドックスシグナル伝達変動および毒性発現における活性イオウ分子の制御を検討した。

4. これまでの成果

ビオチン標識マレイミド（BPM）を用いたBPMアッセイの開発により、それぞれの環境中親電子物質を認識する特異的な抗体を作製しなくても、ウエスタンブロット分析による生体内および細胞内タンパク質の化学修飾を検出することに成功した。種々の培養細胞（A431細胞、A549細胞、SH-SY5Y細胞、血管内皮細胞、HepG2細胞、マウス初代肝細胞）において、1,2-NQ、1,4-NQおよびMeHgはセンサータンパク質PTP1BをS-アリアル化およびS-水銀化して、キナーゼであるEGFRを活性化したが、高濃度曝露ではむしろEGFR活性化は減弱した。

MeHg、Cd、PbおよびCAはセンサータンパク質Keap1を化学修飾して転写因子

Nrf2 を活性化した。しかし、高濃度曝露の増加に伴い Nrf2 活性化は減弱した。1,2-NQ のイオウ付加体である 1,2-NQ-SH は 1,2-NQ とは異なるメカニズムで Keap1 に結合し、Nrf2 を活性化する新たなメカニズムを見出した。

SH-SY5Y 細胞を MeHg に低濃度曝露すると、センサータンパク質 PTEN を S-水銀化を介して本酵素活性の低下を生じ、結果的にキナーゼ Akt が活性化されることで、下流の転写因子 CREB のリン酸化亢進を介した抗アポトーシス因子 Bcl-2 の転写誘導が見られた。しかし、MeHg の曝露量の増加に伴い、CREB の Cys286 が S-水銀化して Bcl-2 発現は逆に定常レベルより抑制されてアポトーシスを生じた。マウス初代肝細胞における 1,4-NQ でも低濃度曝露時には Akt/CREB シグナルは活性化し、高濃度では逆に破綻した。

培養細胞を 1,4-NQ および Cd に曝露すると、センサータンパク質 HSP90 が S-アリアル化および S-カドミウム化して、転写因子 HSF-1 を活性化して下流遺伝子である HSP70/90 の転写誘導が増加した。

環境中親電子物質曝露で生じるレドックスシグナル伝達経路の活性化を特異的な阻害剤あるいは応答分子をノックダウンすると、それぞれの細胞毒性は増強されることから、当該シグナルの活性化は環境中親電子物質の防御応答のひとつであることが示唆された。

従前は生体内の cystathionine β -synthase (CBS) や CSE から H₂S/HS⁻が生じると想定していたが、両酵素はシスチンを基質としてシステインパーサルフィド (Cys-SSH) を生成し、分子内の可動性イオウがグルタチオン (GSH) に転移して GSH パーサルフィド (GSSH) が生じるという全く新しい概念を発見した。

EI-MS、ESI-MS および FT-ICR-MS で解析した結果、MeHg、1,2-NQ、1,4-NQ、Cd およびアクリルアミドを RSS と反応すると、それぞれ構造の異なるイオウ付加体が検出された。マウス初代肝細胞における 1,4-NQ 曝露による Akt/CREB シグナル活性化は、ポリサルフィドのモデルである Na₂S₄ を同時曝露すると、1,4-NQ の細胞内タンパク質の S-アリアル化および本シグナル活性化が減弱した。また、血管内皮細胞における Cd 曝露による HSP90/HSF-1 シグナルは、CSE/CBS のノックダウンで増強し、CSE の高発現で低下した。

CSE 欠損マウスは野生型マウスでは中毒症状が見られない MeHg 曝露量に対し、運動失調および後肢伸張などの中毒症状を呈して最終的に殆どのマウスが死亡した。本知見は、MeHg の有害性の閾値を RSS が制御することを示唆する個体での最初の知見である。

5. 今後の計画

これまでの研究成果より、RSS は生体内に侵入した環境中親電子物質を細胞内 (外) で効率よく捕獲・不活性化し (フェーズゼロ反応)、曝露量の増加に伴い、各種レドックスシグナル伝達経路がそれぞれ活性化されて防御応答するが、更なる環境中親電子物質の曝露は pKa 値の高いシステイン残基を有するタンパク質の化学修飾も惹起して毒性が生じることが示唆された。

今後は野生型、CSE 欠損および CSE 高発現マウスを用いて、環境中親電子物質曝露による内因性の各種 RSS の減少と生体のレドックスホメオスタシスの破綻との因果関係を明らかにする。また、CSE 欠損マウスにニンニク中 RSS 含有低分子 (現在、単離・精製を開始) を与え、MeHg 曝露で観察された有害作用を抑制するかを調べる。さらに、RSS による環境中親電子物質 (モデルとして MeHg を使用) の捕獲・不活性化で生じるイオウ付加体の生体内運命を解明し、MeHg の大気、水および土壌を介した化学形態変化を伴う環境循環が生体内でも生じていることを立証する。

本課題で対象としている環境中親電子物質は、生活環境、嗜好品や食生活を介して日常的に摂取しているものなので、得られた成果は環境リスク軽減の新たな提案だけでなく、国民の安心と安全に繋がる。

6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

1. Abiko Y, Kumagai Y et al. Involvement of reactive persulfides in biological bismethylmercury sulfide formation. *Chem Res Toxicol* 2015; 28: 1301-1306.
2. Ida T, Kumagai Y, Akaike T et al. Reactive cysteine persulfides and S-polythiolation regulate oxidative stress and redox signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014; 111: 7606-7611.
3. 熊谷嘉人. 2013 年度日本薬学会環境・衛生部会学術賞受賞「タンパク質の化学修飾を生じる環境中親電子物質のケミカルバイオロジー」

ホームページ等

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