

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18906

研究課題名(和文)キノン体による化学修飾を介した芳香族炭化水素受容体の活性化：新機構の提案

研究課題名(英文) Quinones-mediated activation of aromatic hydrocarbon receptor through its chemical modification

研究代表者

安孫子 ユミ (ABIKO, Yumi)

筑波大学・医学医療系・助教

研究者番号：80742866

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：5種類の芳香族炭化水素類(Ahs、親電子物質前駆体)、5種類の単環キノン体(AhQs)および7種類の二環AhQsを用いて、親電子性に起因するタンパク質修飾能を有する化合物においてCYP1A1の誘導が認められること、およびそのCYP1A1誘導が芳香族炭化水素受容体(AhR)依存的事であることを明らかにした。AhRを活性化しないとされてきた単環および二環AhQsによるAhR活性化を介したCYP1A1等の第一相薬物代謝酵素の誘導は、環境中化学物質暴露による健康リスクのひとつであることを示唆している。

研究成果の概要(英文)： Exposure of cells to electrophilic mono- and bi-cyclic quinones, but not aromatic hydrocarbons (Ahs, parent compounds of electrophiles) and quinones without covalent binding capability, to Hepa1c1c7 cells upregulated CYP1A1 through activation of aromatic hydrocarbon receptor (AhR). These findings suggest that induction of phase-I enzymes regulated by AhR by environmental electrophiles such as mono- and bi-cyclic quinones is a health risk of environmental chemicals exposure.

研究分野：環境生物学

キーワード：親電子物質 芳香族炭化水素受容体 チオール基 キノン体

1. 研究開始当初の背景

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。大気中成分には種々の芳香族炭化水素 (Ahs) が含まれ、発がん物質としてベンゾピレン類等の多環 Ahs が取り込まれているが、その約 10,000 倍程度のナフタレン [IARC によりグループ 2B (ヒトに対して発がん性が疑われる) に分類される] が揮発性成分中に含まれている。

ナフタレン等の Ahs を含む化学発がん物質の 90%以上は、大気中で光酸化を受ける、もしくは生体内の薬物代謝酵素等の働きにより反応性の高い親電子性代謝物であるキノン体 (AhQs) 等に活性化される。これらの親電子物質は、タンパク質のシステイン残基と共有結合を形成し、これが化学発がん物質等の毒性の原因とされている。従って、AhQs の標的タンパク質を探索することは、Ahs の生体影響や化学発がん機序の理解を深め予防医学を進展させる上で重要である。

本研究で着目する芳香族炭化水素受容体 (AhR) は、多環 Ahs により活性化され、第一相薬物代謝酵素等の誘導を介して恒常性の維持に必要なホルモンの代謝を攪乱し、多環 Ahs による種々の毒性の原因となることが知られている。一方で、存在量の多いナフタレンのような二環以下の Ahs および AhQs による生体影響について AhR が関与するか否か詳細な検討が行われていないのが現状である。

2. 研究の目的

本研究は、AhQs 曝露により AhR が活性化するか否か、およびその活性化機構を明らかにすることで、毒性学や予防医学において AhQs による化学修飾の重要性を提示することを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、これまで未検討であった単環および二環の Ahs のキノン系代謝物 (AhQs) を用いて、(1) *Cyp1a1* 誘導における親電子性の関与、(2) AhR 活性化の分子メカニズム、(3) AhQs による AhR 活性化に対する親電子物質の捕獲に寄与している反応性含硫化合物の修飾効果について研究を行った。

(1) *Cyp1a1* 誘導における親電子性の関与
親電子性が無い Ahs (親電子物質前駆体) として、ベンゼン、1,4-ヒドロキシベンゼン (HQ)、ブチルヒドロキシアニソール (BHA) tert-ブチル-1,4-ヒドロキノン (TBHQ) およびナフタレン、AhQs として 1,4-ベンゾキノ (1,4-BQ) 2-メチル-1,4-BQ、2-クロロ-1,4-BQ、tert-ブチル-1,4-BQ (TBQ)、2,3,5,6-テトラメチル-1,4-BQ、1,2-NQ、1,4-NQ、2-メチル-1,4-NQ、5-ヒドロキシ-1,4-NQ、2-ヒドロキシ-1,4-NQ、5,8-ジヒドロキシ-1,4-NQ、2,3-ジクロロ-1,4-NQ および 2-ヒドロキシ-3-(3-メチル-2-ブテニ

ル)-1,4-NQ を用い、それぞれ親電子指数および Global hardness を Gaussian09 (ver. 8.0) software で算出し、biotin-PEAC₅-maleimide (BPM) アッセイによりタンパク質への親電子修飾の程度を検討した。これらの化合物にそれぞれ、マウス肝細胞がん由来 Hepa1c1c7 およびヒト肝細胞がん由来 HepG2 細胞を曝露し、CYP1A1 mRNA の誘導をリアルタイム PCR で検出した。

認められた *Cyp1a1* の誘導が AhR 依存性であるか否か検討するために、変異 AhR を有し AhR の活性化が起こらない c35 細胞、および AhR の阻害剤である CH223191 を用いた。

(2) AhR 活性化の分子メカニズム

Cyp1a1 の誘導が顕著に認められた化合物に Hepa1c1c7 細胞を曝露し、AhR の核移行を蛍光免疫染色、AhR-ARNT 相互作用の亢進を免疫沈降法、XRE 転写活性化亢進をルシフェラーゼアッセイおよび ChIP 法で解析した。さらに、ヒト AhR-ARNT 相互作用を利用した AhR 活性化スクリーニング系 (国立台湾大学 Lee, H. 教授が開発) を使用し、AhR 活性化を検討した。

リガンドの結合に重要な PAS-B ドメイン上に存在する Cys327 のアラニン変異体を作成し、*Cyp1a1* の誘導について検討した。また、抗 1,2-NQ 抗体を用いた免疫沈降法により AhR への 1,2-NQ の結合を検出した。

(3) AhQs による AhR 活性化に対する制御機序

反応性含硫化合物の産生酵素であるシスタチオニン リアーゼ (CSE) のノックアウトマウス (昭和薬科大学石井功教授より供与) および野生型マウス由来の初代肝細胞に 1,2-NQ を曝露し、*Cyp1a1* の誘導をリアルタイム PCR で検出した。

4. 研究成果

AhQs 曝露による CYP1A1 の誘導は AhR 依存性であり、本転写因子活性化には AhQs の有する親電子性が重要であることが示唆された。

(1) *Cyp1a1* 誘導における親電子性の関与
Hepa1c1c7 細胞において、1,4-BQ、2-メチル-1,4-BQ、2-クロロ-1,4-BQ、tert-ブチル-1,4-BQ、1,2-NQ、1,4-NQ、5-ヒドロキシ-1,4-NQ、5,8-ジヒドロキシ-1,4-NQ、および 2,3-ジクロロ-1,4-NQ の曝露では、*Cyp1a1* 誘導が認められたが、2,3,5,6-テトラメチル-1,4-BQ、2-メチル-1,4-NQ、2-ヒドロキシ-1,4-NQ および 2-ヒドロキシ-3-(3-メチル-2-ブテニル)-1,4-NQ では *Cyp1a1* の誘導が認められなかった。本結果は、Gaussian09 で計算した親電指数が 6.6 eV 以下の化合物であり、他の AhQs より低い値であった。また、BPM アッセイで求めたタンパク質への親電子修飾の程度と一致した。一方、親電子物質前駆体である Ahs は *Cyp1a1* を誘導しなかった。

HepG2細胞およびA549細胞においても同様な結果を得たことから、親電子性 AhQs 曝露による CYP1A1 の誘導は Hepa1c1c7 細胞特異的な現象ではないことが明らかとなった。

Hepa1c1c7細胞に1,2-NQもしくはTBQを曝露すると、*Cyp1a1*の有意な発現誘導が見られたが、AhRアンタゴニストであるCH223191を前処理したHepa1c1c7細胞およびc35細胞では見られなかった。本結果から、親電子性の有無がAhR依存的な*Cyp1a1*誘導に関与することが示唆された。

(2) AhR活性化の分子メカニズム

1,2-NQもしくはTBQにHepa1c1c7細胞を曝露すると、AhRの核移行、AhR-ARNT相互作用の亢進および*Cyp1a1*プロモーター領域へのAhRの結合の亢進、XRE転写活性化が認められた。また、抗1,2-NQ抗体を用いた免疫沈降法により、1,2-NQの曝露濃度依存的にAhRへ結合していることを示唆する結果を得た。

1,2-NQによる*Cyp1a1*誘導がAhRアンタゴニストにより阻害されたことから、1,2-NQはAhRのリガンド結合部位を標的にしていることが推測されたため、PAS-Bドメイン上に存在するCys327変異体をc35細胞に高発現させて検討した。その結果、野生型AhRを高発現させた細胞と比較し、1,2-NQによる*Cyp1a1*誘導は弱かった。本結果は、1,2-NQは少なくともCys327をS-アリール化することで活性化していることを示唆している。

ナノルシフェラーゼ標識ヒトAhR高発現細胞溶解液と1,2-NQを反応させた反応液に、ARNT-His-Beadsをさらに反応させると、1,2-NQにより活性化したAhRとARNTとの相互作用が亢進する結果を得た。本結果は1,2-NQがAhRを活性化することを裏づけると共に、本AhR活性化スクリーニング系が1,2-NQのようなキノン体にも応用が可能であることを示唆した。

(3) AhQsによるAhR活性化に対する制御機序

CSEKOマウスおよび野生型マウス由来の初代肝細胞に1,2-NQを曝露し、*Cyp1a1*の誘導を検討したところ、野生型由来の初代肝細胞1,2-NQの濃度依存的に*Cyp1a1*が誘導され2.5μMをピークにして減弱した。本結果と一致して、Hepa1c1c7細胞、A549細胞およびHepG2細胞を用いた検討においても、高濃度のキノン体曝露は、CYP1A1の誘導を阻害することが示された。一方、CSEKOマウス由来の初代肝細胞では10μMまで*Cyp1a1*誘導の亢進が認められた。このことから、CSEは1,2-NQによるAhR活性化破綻の閾値を右方シフトするような何らかの関与があることが示唆された。先行研究により1,2-NQは反応性含硫化合物と反応して、親電子性の無いイオウ付加体を形成することが明らかとされている。CSEにより産生された反応性含硫化合物は、過剰な1,2-NQを捕獲することで、CYP1A1誘

導経路の破綻を抑制したのかもしれない。AhQsによるAhR活性化に対する反応性含硫化合物の効果に関する詳細なメカニズムについて、さらなる検討が必要である。

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6件)

Kumagai Y, Abiko Y. Environmental electrophiles: protein adducts, modulation of redox signaling and interaction with persulfides/polysulfides. *Chemical Research in Toxicology*. 2017; 30: 203-219, doi: 10.1021/acs.chemrestox.6b00326. 査読あり

Kumagai Y, Abiko Y, Luong CN. Chemical toxicology of reactive species in the atmosphere: two decades of progress in an electron acceptor and an electrophile. *Journal of Toxicological Sciences*. 2016; 41: SP37-SP47, doi: 10.2131/jts.41.SP37 査読あり

Abiko Y, Lin FY, Lee H, Puga A, Kumagai Y. Quinone-mediated induction of cytochrome P450 1A1 in HepG2 cells through increased interaction of aryl hydrocarbon receptor with aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator. *Journal of Toxicological Sciences*. 2016; 41: 775-781, DOI: 10.2131/jts.41.775. 査読あり

Abiko Y, Luong CN, Kumagai Y. A Biotin-PEAC₅-maleimide labeling assay to detect electrophiles. *Journal of Toxicological Sciences*. 2015; 40: 405-411, doi: 10.2131/jts.40.405. 査読あり

Abiko Y, Puga A, Kumagai Y. Covalent binding of quinones activates the Ah receptor in Hepa1c1c7 cells. *Journal of Toxicological Sciences*. 2015; 40: 873-886, doi: 10.2131/jts.40.873. 査読あり

熊谷 嘉人、安孫子 ユミ. レドックスサイクルを介して酸化ストレスを生じる大気中成分. 別冊「医学のあゆみ」レドックスUPDATE 2015; 312-317. 査読あり

[学会発表](計2件)

安孫子 ユミ, Luong Cong Nho, 熊谷 嘉人. 親電子性キノン化合物によるタンパク質修飾のBiotin-(PEAC)₅-maleimide-ELISA

を用いた検出. 衛生薬学・環境トキシコロジー、神戸学院大学(兵庫県神戸市)、2015年9月17日.

安孫子 ユミ、Luong Cong Nho、熊谷 嘉人. Biotin-(PEAC)₅-maleimide-ELISA を用いた親電子性キノン化合物によるタンパク質修飾の簡便アッセイの提案. 第42回日本毒性学会学術年会、石川県立音楽堂(石川県金沢市)、2015年6月29日.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔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

安孫子 ユミ (ABIKO, Yumi)

筑波大学・医学医療系・助教

研究者番号: 80742866

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号:

(4) 研究協力者

()