

平成 30 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：2016～2017

課題番号：16K18920

研究課題名(和文) 活性イオウ分子による環境中親電子物質の新奇解毒機構

研究課題名(英文) Research on detoxification mechanism of environmental electrophiles mediated by reactive sulfur species

研究代表者

鷓木 隆光 (UNOKI, TAKAMITSU)

筑波大学・医学医療系・特任助教

研究者番号：00742868

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)：我々を取り巻く食品や大気汚染物質中に含まれ、生体への曝露によりタンパク質のチオール基に容易に結合することからその健康影響が懸念される環境中親電子物質と称される一群がある。本研究では種々の環境中親電子物質のリスク評価と、高い求核性を有した活性イオウ分子によるその不活化という新奇防御機構の解明を目指した。その結果、活性イオウ分子が当該物質のイオウ付加体形成を通じてタンパク質の親電子修飾と細胞死を抑制することを見出した。また活性イオウ分子投与下では当該物質曝露に反応し細胞生存に寄与するシグナル伝達系の反応は低下した。すなわち活性イオウ分子は環境中親電子物質に対する初期防御因子であると示唆される。

研究成果の概要(英文)：Environmental electrophiles such as 1,4-napthoquinone (1,4-NQ) and methylmercury easily bind to the protein thiols, thereby inducing cytotoxicity. In this study, we investigated the cytoprotective roles of reactive sulfur species, a highly nucleophilic compounds. We found that exposure of primary mouse hepatocytes to polysulfide and 1,4-NQ markedly decreased 1,4-NQ-mediated cell death and S-arylation of cellular proteins. Activation of cell survival signaling under exposure to 1,4-NQ was suppressed in the presence of polysulfides. These results suggest that reactive sulfur species act as a initial cytoprotective factor by capturing this electrophile.

研究分野：環境衛生学

キーワード：活性イオウ分子

1. 研究開始当初の背景

私たちを取り巻く環境および食品中には多種多様な化学物質が含まれており、その生体内侵入による健康影響には常に社会的な関心が寄せられている。環境中化学物質には、親電子物質に類される一群がある。例えば、生物濃縮を介して大型食用魚類に蓄積するメチル水銀、米に含まれるカドミウム、鉛水道管から漏えいする鉛、ポテトチップスに含まれるアクリルアミド、大気汚染微粒子物質PM2.5やタバコの煙に含まれる1,2-ナフトキノ(1,2-NQ)および1,4-ナフトキノ(1,4-NQ)やクロトンアルデヒド、あるいは1,4-ベンゾキノ(1,4-BQ)があげられ、いずれも私たちの身近に存在する化学物質である。これら環境中親電子物質は分子中に電子密度の低い部位をもつゆえ、電子密度の高いタンパク質のチオール基に容易に共有結合し、付加体を形成する(親電子修飾)。したがって生体への環境中親電子物質の曝露によりタンパク質の親電子修飾が過剰に行われると、被修飾タンパク質の担う細胞機能が破綻する。これが環境中親電子物質の毒性要因と目されており、その標的タンパク質の同定と破綻メカニズムの解明が精力的に行われている。

一方で、環境中親電子物質の親電子性を奪い無毒化することで細胞保護作用を発揮する内在性求核物質が存在するのであるか? これまでイオウ転移酵素であるcystathionine γ -lyase (CSE)およびcystathionine β -synthase (CBS)はシステインを基質とし硫化水素の産生を担うと長らく考えられてきたが、申請者所属研究室と東北大・赤池教授らとの共同研究により、その実態はシスチン(Cys-S-S-Cys)を基質としてシステインパースルフィド(Cys-S-SH)を産生する酵素であることが明らかとなった(Ida T et al. *PNAS* 2014)。さらにシステインパースルフィドを起点とし、システインポリスルフィド(Cys-S-SnH)、種々のパースルフィド分子群(R-S-SH)およびポリスルフィド分子群(R-S-SnH/R-Sn-R)が産生される。これら活性イオウ分子と称される分子群の特徴的な化学的特性として極めて高い求核性がある。この知見から申請者は、CSE および CBS により産生される活性イオウ分子が環境中親電子物質を捕獲して不活性化(解毒化)し、タンパク質を親電子修飾から保護する生体防御機構を発揮するのではないかと着想した。

2. 研究の目的

健康影響が懸念される8つの環境中親電子物質について、その有害性の閾値が網羅的に明らかとし、毒性学的観点から有益な知見を提供する。活性イオウ分子産生酵素の欠失(あるいは発現量低下)によって活性イオウ分子量が減少した際には、環境中親電子物質

による被親電子修飾タンパク質量が増加し、細胞毒性が亢進するかを検討する。逆に外的に活性イオウ分子を投与した際には環境中親電子物質を不活化することで被親電子修飾タンパク質量を減少させ、細胞毒性も減弱するかを検討する。

これらの結果から、活性イオウ分子が環境中親電子物質に対する生体防御機構の担い手であることを立証し、高い求核性を有する活性イオウ分子の担う生理機能について新奇の知見を提供する。これによって我々の身近に存在する環境中親電子物質による健康リスクに対し、活性イオウ分子の摂取の有効性を提唱し、環境薬学的観点からも有用な知見を提供する。

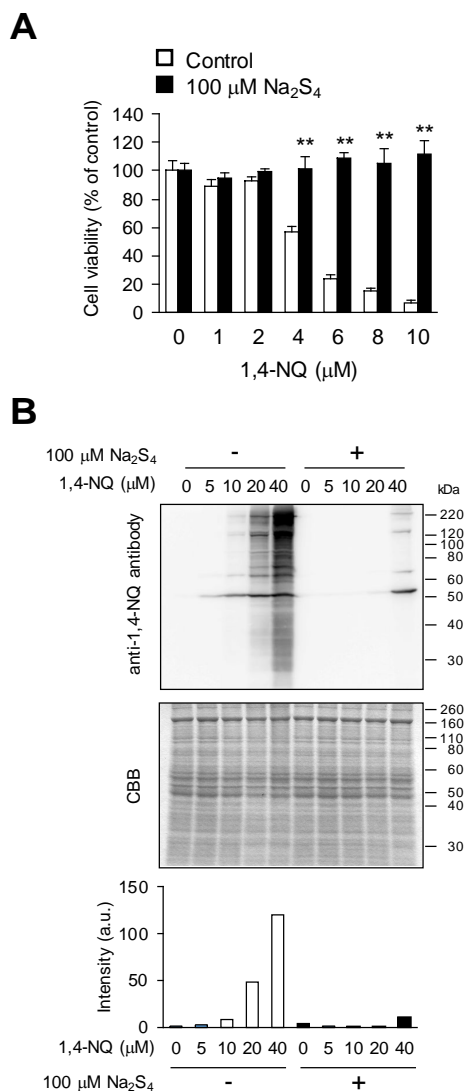
3. 研究の方法

マウス初代肝細胞に対する細胞死を指標として前述の環境中親電子物質8種の毒性を検討後、その作用がポリスルフィドの添加により緩和されるか、あるいは活性イオウ分子産生酵素の欠失により亢進するかを検討する。同時にこの変化が活性イオウ分子の増加または枯渇に起因する被親電子修飾タンパク質量の変化によるものかを解析する。これにより活性イオウ分子が環境中親電子物質によるタンパク質の親電子修飾量を軽減し細胞毒性に対する保護機能をもつことを立証する。また、環境中親電子物質の曝露により活性化される種々のレドックスシグナル伝達経路の応答性が活性イオウ分子の存在によってどのように変化するかを検討する。

4. 研究成果

(1) 高い親電子性を有するゆえ生体内に侵入した際にはタンパク質のチオール基に容易に共有結合し(親電子修飾)、その機能および細胞内シグナルを破綻させることで健康影響が懸念される環境中親電子物質のリスク評価と、高い求核性を有した活性イオウ分子によるその不活化という新奇生体防御機構の立証を目指している。我々の身近に存在する8つの環境中親電子物質メチル水銀、カドミウム、鉛、アクリルアミド、クロトンアルデヒド、1,2-NQ、1,4-NQ および 1,4-BQをマウス由来初代培養肝細胞に曝露し、MTT法により細胞生存率を解析することで各環境中親電子物質の濃度依存的な毒性発現を解析し、その有害性の閾値を網羅的に明らかとした。そこで、活性イオウ分子が環境中親電子物質を捕獲して不活性化(無毒化)するかを検証した。活性イオウ分子のうちポリスルフィドのモデル化合物である Na_2S_4 を初代培養肝細胞の培養液中へ添加したところ、1,2-NQ、1,4-NQ、カドミウム、鉛の曝露により誘導される細胞死が顕著に阻害された。また1,2-NQまたは1,4-NQを初代培養肝細胞へ曝露し、タンパク質の親電子修飾量を抗

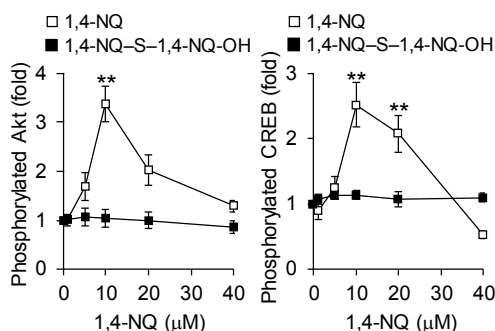
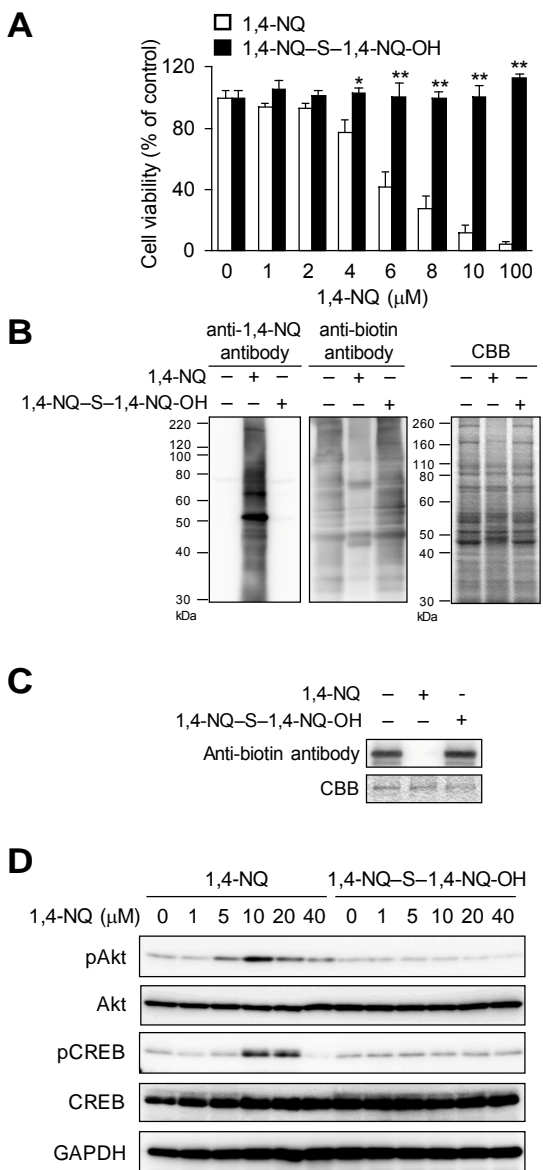
1,2-NQ および抗 1,4-NQ 抗体を用いたウェスタンブロットングにより確認したところ、 Na_2S_4 添加によって内在タンパク質の親電子修飾量が著しく減少していた。このことから外来的に添加した活性イオウ分子により環境中親電子物質の毒性が軽減されることが示された (図 1: 1,4-NQ 曝露における結果を例示)。



(図 1) 1,4-NQ 曝露による細胞死およびタンパク質の化学修飾は Na_2S_4 の投与により阻害される (A)細胞生存率 (B) 1,4-NQ 被修飾タンパク質

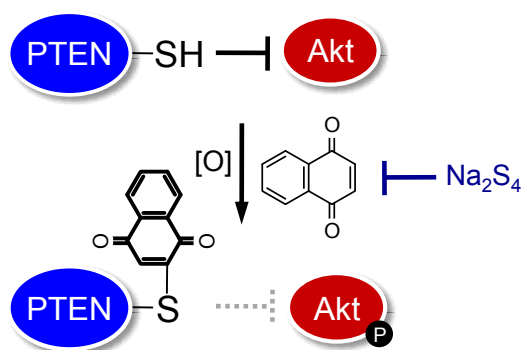
(2) 被験物質のひとつ 1,4-NQ を用い、活性イオウ分子モデル化合物 Na_2S_4 との反応により生じるイオウ付加体として、1,4-NQ-S-1,4-NQ-OH を同定した。そこで 1,4-NQ-S-1,4-NQ-OH 標品を精製し、マウス初代培養肝細胞に曝露したところ、1,4-NQ 曝露時に生じた内在タンパク質の 1,4-NQ 修飾および細胞死は引き起こされなかった (図 2)。また、1,4-NQ にマウス初代培養肝細胞を低用量曝露した際には、センサータンパク質 PTEN の 1,4-NQ 修飾を起点として下流分子の

Akt および CREB が活性化され、細胞生存に寄与するレドックスシグナル伝達経路が活性化された (図 2)。当該経路は 1,4-NQ 高用量曝露時には抑制へと転じ、曝露濃度依存的な釣り鐘型の変動を示した。1,4-NQ-S-1,4-NQ-OH 曝露においては検討したいずれの濃度においても当該経路の活性化変動は見られなかった (図 2)。同様の検討を Na_2S_4 存在下で行ったところ、Akt および CREB の活性化をもたらす 1,4-NQ 曝露用量はより高濃度へとシフトした。



(図2) 1,4-NQ イオウ付加体は細胞死、タンパク質の化学修飾および PTEN/Akt/CREB シグナルの活性化を引き起こさない (A) 細胞生存率 (B) 1,4-NQ 被修飾タンパク質 (C) 精製 PTEN タンパク質の 1,4-NQ 修飾 (D) Akt/CREB シグナル活性化の変動

以上の結果より、活性イオウ分子はイオウ付加体形成を通じて環境中親電子物質を不活化し、内在タンパク質の親電子修飾および細胞死を抑制する新奇因子であることが示唆された。また、活性イオウ分子の本特性により、環境中親電子物質曝露に際し活性化されるレドックスシグナル伝達経路が負に制御されることも示唆された(図3)。



(図3) Na_2S_4 はイオウ付加体形成を通じて 1,4-NQ による PTEN/Akt/CREB シグナルの活性化と細胞毒性を抑制する

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4件)

Akiyama, M., Shinkai, Y., Unoki, T., Shim, I., Ishii, I., Kumagai, Y. “The capture of cadmium by reactive polysulfides attenuates Cadmium-Induced adaptive responses and hepatotoxicity”, *Chem. Res. Toxicol.*, 30, 2209-2217 (2017) 査読有
DOI: 10.1021/acs.chemrestox.7b00278.

Abiko, Y., Shinkai, Y., Unoki, T., Hirose, R., Uehara, T., Kumagai, Y. “Polysulfide Na_2S_4 regulates the activation of PTEN/Akt/CREB signaling and cytotoxicity mediated by 1,4-naphthoquinone through formation of sulfur adducts”, *Sci. Rep.*, 7, 4814 (2017) 査読有
DOI: 10.1038/s41598-017-04590-z.

Abiko, Y., Sha, L., Shinkai, Y., Unoki, T., Luong, N.C., Tsuchiya, Y., Watanabe, Y.,

Hirose, R., Akaike, T., Kumagai, Y. “1,4-Naphthoquinone activates the HSP90/HSF1 pathway through the S-arylation of HSP90 in A431 cells: Negative regulation of the redox signal transduction pathway by persulfides/polysulfides”, *Free Radic. Biol. Med.*, 104, 118-128 (2017) 査読有
DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.12.047.

Unoki, T., Abiko, Y., Toyama, T., Uehara, T., Tsuboi, K., Nishida, M., Kaji, T., Kumagai, Y. “Methylmercury, an environmental electrophile capable of activation and disruption of the Akt/CREB/Bcl-2 signal transduction pathway in SH-SY5Y cells”, *Sci. Rep.*, 6, 28944 (2016) 査読有
DOI: 10.1038/srep28944.

[学会発表](計9件)

鶴木隆光, 安孫子ユミ, 新開泰弘, 広瀬玲子, 上原孝, 熊谷嘉人. ポリスルフィド Na_2S_4 はイオウ付加体形成を通じて 1,4-NQ による PTEN/Akt/CREB シグナルの活性化と細胞毒性を抑制する. フォーラム 2017: 衛生薬学・環境トキシコロジー (2017)

鶴木隆光, 新開泰弘, 増田章, 秋山雅博, Xian Ming, 熊谷嘉人. カドミウムによる HSP90 の化学修飾を介した転写因子 HSF1 の活性化と活性イオウ分子によるその制御. 第 44 回日本毒性学会学術年会 (2017)

鶴木隆光, 新開泰弘, 増田章, 秋山雅博, Xian Ming, 熊谷嘉人. カドミウムによる HSP90 の化学修飾を介する転写因子 HSF1 の活性化と活性イオウ分子によるその制御. 第 70 回日本酸化ストレス学会 (2017)

鶴木隆光, 安孫子ユミ, 外山喬士, 上原孝, 坪井康次, 西田基宏, 鍛冶利幸, 熊谷嘉人. 親電子物質による生体影響の二面性: SH-SY5Y 細胞におけるメチル水銀曝露により生じる Akt/CREB/Bcl-2 経路の活性化と破綻. フォーラム 2016 衛生薬学・環境トキシコロジー (2016)

鶴木隆光, 新開泰弘, 沙亮, 広瀬玲子, 熊谷嘉人. 1,4-ナフトキノンによる HSF90/HSF1 経路の活性化と活性イオウ分子によるその制御. 第 43 回日本毒性学会学術年会 (2016)

鶴木隆光, 新開泰弘, 秋山雅博, 熊谷嘉人. 活性イオウ分子によるカドミウムの毒性防御. 第 32 回臨床フリーラジカル

会議 (2016)

Unoki, T., Shinkai, Y., Sha, L., Hirose, R., Kumagai, Y.
“1,4-Naphthoquinone-mediated activation of the HSP90/HSF1 signal transduction pathway and its negative regulation by reactive sulfur species in human A431 cells”, IUTOX2016 XIV International Congress of Toxicology and X Mexican Congress of Toxicology, Merida, Mexico (2016)

Unoki, T., Shinkai, Y., Abiko, Y., Hirose, R., Kumagai, Y. “Sodium tetrasulfide, a reactive sulfur species, protects cells from 1,4-naphthoquinone induced cytotoxicity through sulfur adduct formation”, The 9th International Conference on the Biology, Chemistry, and Therapeutic Applications of Nitric Oxide. The 16th Annual Scientific Meeting of the Nitric Oxide Society of Japan, Sendai, Japan (2016)

Unoki, T., Shinkai, Y., Sha, L., Kumagai, Y.
“1,4-naphthoquinone-mediated activation of the HSP90/HSF1 signal transduction pathway and its modulation by reactive sulfur species in human A431 cells”, Society of Toxicology 55th Annual Meeting, New Orleans, USA (2016)

〔その他〕

ホームページ等

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

6 . 研究組織

(1)研究代表者

鵜木 隆光 (UNOKI TAKAMITSU)

筑波大学・医学医療系・特任助教

研究者番号：00742868