

自己評価報告書

平成 23 年 4 月 1 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究 (A)

研究期間：2008～2011

課題番号：20241015

研究課題名 (和文) 親電子性環境物質の感知・応答センサーとリスク軽減因子

研究課題名 (英文) Sensor proteins and cellular protection factors for environmental electrophiles

研究代表者

熊谷 嘉人 (KUMAGAI YOSHITO)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・教授

研究者番号：00250100

研究分野：環境医学

科研費の分科・細目：環境学・放射線・化学物質影響科学

キーワード：環境科学物質、親電子物質、化学修飾、センサータンパク質、リスク軽減因子、解毒・排泄

1. 研究計画の概要

親電子物質は分子中に極性の偏りによる電子密度の低い部分を有しており、電子密度の高い生体内高分子の求核置換基 (タンパク質のシステイン残基や DNA のグアニン残基等) と共有結合し、組織の壊死やがん化の原因となることが知られている。環境中にも親電子性を有するものは数多く見出されており、主に有害性の観点からヒトの健康との関係が懸念されている。したがって、親電子性環境物質の分子標的および解毒・排泄に係わる因子を明らかにすることは、当該物質のリスク軽減戦略を理解する上で重要である。本研究では、1) 細胞内での作用点を知る目的で、親電子性環境物質の分子標的となる反応性システイン残基を有するタンパク質 (感知・応答センサー) を同定し、それに起因するシグナル伝達の攪乱、2) 親電子性環境物質に対するリスク軽減因子としての Keap1/Nrf2 システムの役割、3) 親電子性環境物質の毒性発現に対する Nrf2 活性化剤の毒性軽減効果についてそれぞれ検討した。親電子性環境物質のモデルとして、ヒ素 (東アジア地域での地下水汚染の原因物質)、メチル水銀 (食物連鎖と生物濃縮を介して大型食用魚類に蓄積) および多環芳香族炭化水素キノン体 (化石燃料の燃焼で大気中に存在) を使用した。

2. 研究の進捗状況

感知・応答センサー：多環芳香族炭化水素キノン体である 1,2-ナフトキノン (1,2-NQ) は、A549 細胞および A431 細胞において、プロテインチロシンフォスファターゼ 1B (PTP1B) の Cys121 に共有結合して上皮成

長因子レセプター (EGFR) のリン酸化を亢進した。1,2-NQ で生じた EGFR リン酸化は、MEK/ERK/AP-1 シグナルを活性化した。ヒ素の親電子代謝物であるモノメチル 3 価ヒ素 (MeAsIII) およびメチル水銀は、PTP1B の Cys121 および Cys215 にそれぞれ共有結合して本酵素活性を阻害した。1,2-NQ は転写因子 CREB の Cys286 を共有結合して、その DNA 結合活性は低下した。1,2-NQ は抗酸化タンパク質であるチオレドキシシン (Trx) の Lys85 に共有結合してレドックスサイクルに起因する酸化ストレスを生じることが示唆された。その結果、ASK1/p38 シグナル活性化を生じてアポトーシスを誘導した。1,2-NQ、MeAsIII およびメチル水銀は、何れも Keap1 に共有結合 (ただし、システイン残基の修飾部位は異なる) して、転写因子 Nrf2 を活性化してその下流遺伝子群の発現誘導を亢進した。メチル水銀はアルギナーゼ I に共有結合 (S-水銀化) して本タンパク質の不溶化を誘発した。

リスク軽減因子：Nrf2 ノックダウン細胞および Nrf2 ノックアウトマウスの初代肝細胞を用いて、本転写因子が 1,2-NQ、メチル水銀およびヒ素の細胞毒性の軽減に重要であることが明らかとなった。多環芳香族炭化水素キノン体であり、共有結合能はないがレドックスサイクル能を有する 9,10-フェナントラキノン (9,10-PQ) の細胞毒性においてもリスク軽減因子として働くことが示された。また、1,2-NQ および 9,10-PQ の解毒にそれぞれのモノグルクロナイド形成とその細胞外への排泄が関与していることを見出した。一方、メチル水銀の場合も Nrf2 欠損により細胞毒性は増加し、その原因が細胞内タンパ

ク質の S-水銀化とそれに伴う細胞内蓄積の上昇によることが示唆された。そこで、植物由来の Nrf2 活性化剤であるスルフォラファン（ブロッコリースプラウト成分）および 6-HITC（ワサビ成分）をマウス初代肝細胞およびマウス個体に前処置した結果、野生型に比べてメチル水銀の細胞（組織）蓄積と細胞毒性（急性中毒症状）はそれぞれ緩和された。

3. 現在までの達成度

②おおむね順調に進展している。

研究当初に予定していた親電子性環境物質の感知・応答センサーとして複数の分子が同定でき、その化学修飾に伴うシグナル伝達の破綻を示すことができた。また、リスク軽減因子については、何れのモデル親電子物質についても、Keap1/Nrf2 システムが重要であることが細胞レベルで立証でき、メチル水銀に関しては個体レベルでも証明された。以上より、計画どおりの進捗と言えよう。ただ、ヒ素の毒性に対する Nrf2 活性化剤の効果は、北里大学・山内教授らの研究グループが行ったことから、本研究は遂行しなかった。

4. 今後の研究の推進方策

Keap1/Nrf2 システムは親電子応答だけでなく、酸化ストレス応答にも関与していることが知られている。事実、共有結合能はないが、レドックスサイクルを介して細胞内に過剰の活性酸素種を産生する 9,10-PQ および 2,4,6-トリニトロトルエン（本年度に実施済み）の細胞毒性にも、Keap1/Nrf2 システムがリスク軽減因子として働いていることを見出したので、如何なるメカニズムが関与しているかを明確にする。

5. 代表的な研究成果

（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 10 件）

- ① 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: in press. 査読有
- ② 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: in press. 査読有

- ③ 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. 査読有
- ④ Taguchi K, Shimada M, Fujii S, Sumi D, Pan XQ, Yamano S, Nishiyama T, Hiratsuka A, Yamamoto M, Cho AK, Froines JR, Kumagai Y. Redox cycling of 9,10-phenanthraquinone to cause oxidative stress is terminated through its monoglucuronide conjugation in human pulmonary epithelial A549 cells. *Free Radical Biology & Medicine* 2008; 44: 1645-1655. 査読有
- ⑤ Kanda H, Sumi D, Endo E, Toyama T, Chen CL, Kikushima M, Kumagai Y. Reduction of arginase I activity and manganese levels in the liver during exposure of rats to methylmercury: a possible mechanism. *Archives of Toxicology*. 2008; 82: 803-808. 査読有

〔学会発表〕（計 11 件）

- ① 熊谷嘉人：ヒ素の感知・応答センサーおよびリスク軽減因子としての Keap1/Nrf2 システム. 第 16 回ヒ素シンポジウム, 2011 年 1 月 5 日 旭川市
- ② 熊谷嘉人：環境化学物質によるシステイン残基を介したタンパク質の翻訳後修飾. 日本衛生学会総会シンポジウム, 2010 年 5 月 9 日 仙台市
- ③ 熊谷嘉人：親電子物質による翻訳後修飾: 親電子シグナルとその制御系. 第 82 回日本生化学会大会, 2009 年 10 月 22 日 神戸市
- ④ 熊谷嘉人：酸化ストレスおよび化学修飾を生じる環境物質を対象としたフィールドサイエンスと実験科学の融合. 日本薬学会 129 年会 日本薬学会学術振興賞受賞講演, 2009 年 3 月 25 日 京都市
- ⑤ 熊谷嘉人：メチル水銀の分子標的と細胞応答システム. 衛生薬学・環境トキシコロジー, 2008 年 10 月 17 日 熊本市

〔図書〕（計 2 件）

- ① 熊谷嘉人：本の泉社. 改定版 分子予防環境医学, 2010 年 576 - 583.
- ② 熊谷嘉人：羊土社. 実験医学増刊号「活性酸素シグナルと酸化ストレス」, 2009 年 50 - 55.