

氏名(本籍)	あおのじゅんこ 青野淳子(茨城県)		
学位の種類	博士(医学)		
学位記番号	博甲第3808号		
学位授与年月日	平成17年3月25日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
審査研究科	人間総合科学研究科		
学位論文題目	Activation of Nrf2 and accumulation of ubiquitinated A170 by arsenic in osteoblasts. (骨芽細胞におけるヒ素化合物による Nrf2 の活性化とユビキチン化 A170 の蓄積)		
主査	筑波大学教授	理学博士	岡村直道
副査	筑波大学助教授	薬学博士	田中榮之介
副査	筑波大学助教授	医学博士	轟健
副査	筑波大学講師	博士(医学)	申田茂樹

論文の内容の要旨

(目的)

骨芽細胞を用いてヒ素化合物の細胞毒性の仕組みを、細胞内の抗酸化ストレス応答系 (Nrf2, A170, HO-1, Prx I など) の動態を中心に解析を行った。

(対象と方法)

マウス頭蓋冠由来の骨芽細胞 (MC3T3-E1) を用いた。

培養した骨芽細胞に無機ヒ素化合物であるヒ酸塩 [As (V)], 亜ヒ酸塩 [As (III)] を各々曝露した際の抗酸化ストレス応答系の動態を、免疫染色法, ノーザンブロット法, 蛍光染色法, パーコール濃度勾配分離法などを用いて解析した。

(結果)

骨芽細胞への無機ヒ素化合物曝露により、転写因子 Nrf2 が活性化されることを初めて証明した。その結果、Nrf2 制御下にあるストレスタンパク質 A170, HO-1, Prx I の発現レベルが増加した。この際、HO-1 の発現レベルが As (V) の濃度依存的に増加するのに対し、A170 の発現レベル (通常 60kDa) はわずかに増加しただけであったが 65kDa を超える高分子領域にスミアー状のバンド (HMM-A170: higher molecular mass forms of A170) が認められた。また無機ヒ素化合物曝露により細胞内にユビキチン化タンパク質の蓄積が認められた。HMM-A170 とユビキチン化タンパク質の細胞内動態を免疫染色法, 蛍光染色法, パーコール濃度勾配分離法などを用いて解析した結果、無機ヒ素化合物曝露により細胞内にユビキチン化されたタンパク質が蓄積し、そのうちの1つが A170 であることが明らかになった。これまでに A170 の C 末端部分にユビキチンが非共有結合で相互作用することは知られているが、ユビキチン化した A170 を検出したのは初めてであった。

この現象に対する薬剤特異性の検討では、パラコート, DEM, HNE などの酸化ストレス誘導剤および有機ヒ素化合物では同様の現象は認められず、無機ヒ素化合物および CdCl₂ に特異的であることが明らかになった。また、As (III) は As (V) よりも低濃度で同様の現象を起こすことが明らかになった。

(考察)

今回の結果から、無機ヒ素化合物は細胞質内で形成されている Nrf2-Keap1 複合体から転写因子 Nrf2 を遊離、核内移動させ、ARE (antioxidant responsive element) と相互作用しストレスタンパク質 A170、HO-1、Prx I の発現を増加させることが証明された。さらに無機ヒ素化合物によりユビキチン化されたタンパク質が細胞内に蓄積し、そのうちの 하나가 A170 であることを初めて見出した。

これまでの報告から、無機ヒ素化合物はプロテアソームの活性を抑制することが分かっており、今回の現象も As (V) がプロテアソームの活性を抑制するためと予想された。しかしながら、プロテアソームの阻害剤である MG132 を曝露しても As (V) 曝露時と同様な細胞内の HMM-A170 蓄積は認められなかったことから、As (V) による HMM-A170 蓄積の作用機序はプロテアソーム活性の抑制だけではなく、無機ヒ素化合物が A170 タンパク質と相互作用した結果ユビキチン化されたものであることが示唆された。

以上のことから無機ヒ素化合物の細胞毒性の一端として、A170 を含めたタンパク質の著しいユビキチン化を引き起こすことが明らかになり、その結果シグナル伝達系の調節因子である A170 や、プロテアソームを介して標的タンパク質の分解、除去を行うユビキチンの不活性化を導くと考えられた。

(結論)

HMM-A170 の形成は、A170 の正常な機能が破綻した結果であることと考えられた。よってユビキチン化 A170 タンパク質の検出と定量が、無機ヒ素化合物による毒性発現の判定基準、すなわち新しいバイオマーカーとして有用であることが示唆された。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は、無機ヒ素化合物の培養骨芽細胞の抗酸化ストレス応答系に対する作用を明らかにしたものである。即ち、無機ヒ素化合物は生体防御系転写因子 Nrf2 を核へ移行させ、その制御下にある A170 をはじめとするストレスタンパク質の発現を増加させること、さらに、A170 をユビキチン化してその機能を修飾していることを初めて明らかにした。これらの知見は、無機ヒ素化合物の毒性発現のメカニズムの解明に貢献するのみならず、無機ヒ素化合物の毒性の新しい判定法の開発に結びつくことが予想でき、今後の研究の発展が大いに期待される。

よって、著者は博士 (医学) の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。