

氏名(本籍)	えん どう あきこ 遠藤亜希子(茨城県)		
学位の種類	博士(医学)		
学位記番号	博甲第5125号		
学位授与年月日	平成21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	Disruption of Signal Transduction Pathway through Chemical Modification by 1, 2-Naphthoquinone as Environmental Chemicals in Air (大気中環境化学物質1, 2-ナフトキノンによる化学修飾を介したシグナル伝達経路の攪乱)		
主査	筑波大学教授	博士(医学)	土屋尚之
副査	筑波大学准教授	博士(医学)	工藤崇
副査	筑波大学准教授(連携大学院) (理化学研究所前任研究員)	理学博士	野村照明
副査	筑波大学助教	博士(薬学)	鈴木裕之

論文の内容の要旨

(目的)

本研究は、大気中サンプルから同定された親電子性物質1,2-ナフトキノン(1,2-NQ)をモデルとして、その生体影響をシグナル伝達経路の攪乱という観点から評価したものである。1,2-NQはタンパク質の解離性チオール基と結合するという化学的特性を有するため有害であることは周知の事実であるが、毒性発現の一端である1)細胞死に至る機序、2)生体内高分子との相互作用およびそれに起因する影響については未だ明らかでない。そこで、本研究は、1,2-NQによる細胞死の機序を解明すること、および、塩基性ロイシンジッパー構造中に活性に重要なシステイン残基を有し、その近傍に塩基性アミノ酸が多数存在することから、システイン残基のpKa値が低下し解離することで、1,2-NQの標的となるのではないかと仮説のもとに、転写因子cAMP response element-binding protein (CREB)に注目し、本化合物との相互作用および活性阻害機序について分子レベルで解明することを目的として施行された。

(対象と方法)

1) 1,2-NQによる細胞死のシグナル伝達経路への影響

マウスマクロファージ由来細胞(RAW264.7細胞)を用い、アポトーシスはAnnexin-Vによる免疫染色およびDNA断片化により、また、細胞死はMTT法により評価した。

2) 1,2-NQによるCREBのシグナル伝達経路への影響

ウシ大動脈血管内皮細胞(BAECs)、リコンビナントCREBおよび*in vitro*転写/翻訳システムにより作製したCREBタンパク質を用いた。タンパク質の発現量はウエスタンブロット法、1,2-NQとCREBの結合はビオチン・アビジン沈降法および免疫沈降法により評価した。CREBのDNA結合活性はゲルシフト法、転写活性はルシフェラーゼ法により測定した。1,2-NQによるCREBの修飾部位はMALDI-TOF/MS解析により同定した。

(結果)

1) 1,2-NQ による細胞死のシグナル伝達経路への影響

1,2-NQ 曝露により細胞死が誘導されたが、Annexin-V による染色および DNA 断片化など、アポトーシスを示す所見はみられなかった。次に、TNF α / アクチノマイシン D によるアポトーシスに対する影響を調べたところ、1,2-NQ 前処理でアポトーシスの誘導ならびに DNA 断片化の抑制が見られた。さらに、アポトーシス活性化における指標の一つであるポリ ADP リボース代謝酵素 (PARP) の切断を調べたところ、1,2-NQ 前処理により TNF α / アクチノマイシン D による PARP の断片化が抑制された。

2) 1,2-NQ による転写因子 CREB のシグナル伝達経路への影響

1,2-NQ は CREB と共有結合し、同条件下における CREB の DNA 結合活性は著しく低下した。修飾部位を検討したところ、塩基性ロイシンジッパー (bZIP) 構造に位置する Cys286, Lys290 および Lys319 に結合していた。Lys290 および Lys319 の変異体では、1,2-NQ による CREB の DNA 結合阻害は野生型と同様であったが、Cys286 をセリンに変異すると本阻害が抑制された。また、1,2-NQ-Cys 結合体の模倣として用いたトリプトファンへの変異体では、野生型に比較して活性が低下した。1,2-NQ による阻害効果は CREB 同様に bZIP 構造を有する AP-1 でも観察された。さらに、1,2-NQ は CRE 依存の転写活性を阻害し、CREB 制御下タンパク質の発現を抑制した。

(考察)

1) 1,2-NQ による細胞死のシグナル伝達経路への影響

RAW264.7 細胞では、1,2-NQ は TNF α / アクチノマイシン D によって誘導されるアポトーシスを促進せず、むしろ抑制することが観察された。さらに、1,2-NQ 単独曝露によりアポトーシスは誘導されなかったものの、細胞死が観察されたことから、1,2-NQ による細胞死はアポトーシス以外の機序によることが示唆された。

2) 1,2-NQ による転写因子 CREB のシグナル伝達経路への影響

1,2-NQ は CREB の bZIP 構造に位置する Cys286 を化学修飾することで DNA 結合活性を阻害し、CRE 依存の転写および下流遺伝子の発現を低下させることが明らかとなった。また、CREB と DNA の結合阻害は分子サイズとして 150 ~ 180Da 程度の分子が侵入してきたことによる物理的妨害が一因であることが示唆された。さらに、bZIP 構造をもつ AP-1 でも 1,2-NQ による阻害が見られたことから、“塩基性アミノ酸効果”により解離したチオール基が CREB 同様の機序で 1,2-NQ の標的となった可能性が考えられた。

(結論)

1) 1,2-NQ による細胞死のシグナル伝達経路への影響

1,2-NQ は RAW264.7 細胞のアポトーシスを誘導せず、むしろアポトーシス誘導を抑制する化合物であることが示唆された。

2) 1,2-NQ による転写因子 CREB のシグナル伝達経路への影響

1,2-NQ は CREB の Cys286 への化学修飾を介して DNA 結合活性を阻害し、CREB 制御下のタンパク質の発現を低下させることが明らかとなった。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は、大気中に存在する化学物質である 1,2-NQ による細胞への影響を分子レベルで検討したものであり、洗練された細胞生物学、分子生物学の手法を駆使して論理的に展開された、優れた研究である。環境医学領域における重要性はもちろんであるが、転写因子の構造活性連関に関する普遍的な仮説も提示されており、きわめて刺激的な内容である。

論文は、十分な背景を含め、丁寧に書かれており、プレゼンテーション能力も高く評価できる。背景知識

も深く、審査員との間に活発な討論を行うことができた。

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。