

氏名(本籍)	三浦高(東京都)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	博甲第6212号
学位授与年月日	平成24年3月23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	大気中親電子物質によるタンパク質の化学修飾に対する細胞内制御システム
主査	筑波大学教授 理学博士 石井哲郎
副査	筑波大学准教授 博士(薬学) 本間真人
副査	筑波大学講師 博士(理学) 小林麻己人
副査	筑波大学講師 博士(農学) 藤栄治

論文の内容の要旨

(目的)

ディーゼル排気などに含まれる1,2-ナフトキノン(1,2-NQ)は、大都市の大気汚染化学物質の一つであり、喘息などの呼吸器障害を引き起こす一因であると考えられている。この1,2-NQは、親電子性があり細胞毒性を有している。本研究の目的は、1,2-NQによる細胞内タンパク質の親電子修飾反応の解析、2電子還元酵素の同定と転写因子Nrf2に依存した解毒機構について解析することである。

(対象と方法)

実験には、初代マウス肝細胞およびヒト肺胞上皮由来A549細胞を用いた。細胞毒性は、MTT法により測定した。タンパク質への共有結合(S-アリール化)を1,2-NQを特異的に認識するウサギポリクローナル抗体を使用したウェスタンブロット分析で調べた。1,2-NQ-4-グルタチオン結合体(1,2-NQ-SG)の標準品は化学合成した。1,2-NQの標的タンパク質の同定は、nanoUPLC-MSを用いたプロテオミクス解析により同定した。ヒトグリセルアルデヒド-3-リン酸還元酵素(GAPDH)組み換え体は、同発現ベクターを導入した大腸菌を用いて調製した。1,2-NQの二電子還元体(1,2-NQH₂)は、無水酢酸によりジアセトキシ誘導体化して検出した。S-トランスアリール化反応は、1,2-NQ修飾GAPDH(1,2-NQ-GAPDH)を用いてGAPDH活性、ウェスタンブロット分析およびUPLC-MS^Eで解析した。

(結果)

培養液に添加した1,2-NQは、多くの細胞タンパク質をS-アリール化した。このS-アリール化は、野生型に比べてNrf2ノックアウトマウスの初代肝細胞で顕著に多かった。また、1,2-NQはKeap1のS-アリール化を介して、Keap1/Nrf2システムを活性化し、解毒代謝酵素群の発現を誘導した。1,2-NQは、グルクロン酸抱合経路および薬物トランスポーターを介して細胞外へ排出されることが示唆された。

1,2-NQによるS-アリール化の抑制には、2電子還元反応による親電子性の解除が考えられた。1,2-NQの主要な2電子還元酵素としてGAPDHを同定した。GAPDHはピリジンヌクレオチド依存的に1,2-NQによるS-アリール化を抑制した。GAPDHの1,2-NQ還元活性には機能中心のCys152が関与し、NADH濃度が低下するとこの残基が1,2-NQによりS-アリール化されることを証明した。また、グルタチオン(GSH)合成阻

害剤であるBSO処置により、1,2-NQによるCys152の修飾が増加した。GAPDH組換え体を用いた反応系で、1,2-NQ-GAPDHはGSHと反応するとS-トランスアリアル化反応を介してGADPHと1,2-NQ-SGを生じた。

一方、含硫低分子物質である硫化水素(HS⁻)と1,2-NQを反応させたところ、1,2-NQSHおよび(1,2-NQ)₂Sを生成した。HS⁻発生剤である硫化水素ナトリウム(NaHS)の前処置により、1,2-NQによる細胞内タンパク質のS-アリアル化は顕著に抑制された。さらに、HS⁻の細胞内での産生に係わるシスタチオンinβ合成酵素(CBS)をsiRNA処理によりノックダウンしたところ、1,2-NQによる細胞内タンパク質のS-アリアル化は著しく増加した。

(考察)

1,2-NQは、Keap1を親電子修飾し、Nrf2を活性化するが、その結果細胞内GSH濃度が上昇し、解毒酵素や代謝物の排出輸送系の発現が亢進する。また、1,2-NQを2電子還元して解毒化する酵素としてGAPDHを同定した。GAPDH自身がS-アリアル化され失活するが、細胞内のNADHの存在がS-アリアル化を防ぎ、さらにGSHがS-トランスアリアル化反応によって化学的にGAPDHの親電子修飾を解除することを証明した。また、HS⁻を産生するNaHSによる処理が1,2-NQによる細胞内タンパク質のS-アリアル化を抑制したが、CBSはGSHの代謝にも関与しており、1,2-NQSHおよび(1,2-NQ)₂Sが細胞代謝物として検出できていないので、実際に細胞内で産生されたHS⁻が1,2-NQの解毒に寄与しているかどうかの証明は今後の課題である。

審査の結果の要旨

本研究は、大気中に含まれる汚染化学物質1,2-NQによる細胞タンパク質の化学修飾反応、Keap1とGAPDHとの反応様式について詳細に検討し、1,2-NQの毒性と解毒機構について新しい知見を見だし、数編の国際誌に発表したこれらの成果は高い評価を受けている優れた研究成果であると評価できる。

平成23年12月22日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文について説明をもとめ、関連事項について質疑応答を行い、最終試験を行った。その結果、審査委員全員が合格と判定した。

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。