

氏名（本籍）	安孫子 ユミ（埼玉県）			
学位の種類	博士（医学）			
学位記番号	博甲第 6696 号			
学位授与年月	平成 25 年 7 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	環境化学物質による転写因子 Nrf2 および AHR の活性化における親電子修飾の意義			
主査	筑波大学教授	医学博士	加藤 光保	
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（農学）	蕨 栄治	
副査	筑波大学助教	博士（薬学）	船越 祐司	

論文の内容の要旨

（目的）

我々を取り巻く環境中には様々な化学物質が遍在する。生体内に取り込まれた化学物質の一部は代謝活性化を受けて親電子性を獲得し、より反応性の高い分子となる。化学物質の作用には量-反応関係が存在し、閾値を超えた摂取は有害であるが、閾値以下の低濃度の摂取は有害性を示さない。本研究では、生体が化学物質を感知・応答する優れた制御システムを解明するために、環境化学物質に反応する転写因子に注目した。芳香環を持つ親電子物質に対する細胞の二次機能的な働きを想定し、転写因子 Nrf2（第 1 章）および芳香族炭化水素受容体（aryl hydrocarbon receptor; AHR, 第 2 章）の活性化における親電子修飾の関与を明らかにすることを目的とした。

（対象と方法）

第 1 章では、マウスマクロファージ様単核細胞（RAW264.7 細胞）およびヒト肝芽腫由来細胞（HepG2 細胞）を対象に研究を行った。Nrf2 の活性化およびその下流タンパク質の変動はウェスタンブロット法によって検出した。細胞内で産生された活性酸素種（ROS）は活性酸素種に反応して蛍光を発する H₂DCFDA を用いて検討した。TBQ の Keap1 への修飾および修飾部位は、精製マウス Keap1 タンパク質を用いた Biotin-PEAC₅-maleimide (BPM) 標識アッセイおよび超高性能液体クロマトグラフィー・高エネルギー質量分析 (UPLC-MS^E) により検出した。Keap1 と *tert*-ブチル-1,4-ベンゾキノン (TBQ) の結合体 (TBQ-Keap1) の TBQ 修飾がグルタチオン (GSH) を介した S-トランスアリアル化によって解離した結果として得られると予測される TBQ-グルタチオン結合体 (TBQ-GSH) を合成した。得られた反応産物はカラムで分離して、UPLC-MS^E および核磁気共鳴 (NMR) により解析した。

第 2 章では、主に、マウス肝細胞癌由来細胞（Hepa1 細胞）および Hepa1c1c7 C35 細胞（C35 細

胞)を対象とした。リアルタイム PCR 法にて、*Cyp1a1* の発現の変動を解析した。また、抗 AHR 抗体を用いた蛍光免疫染色法により、AHR の核移行を検出した。さらに、芳香族親電子物質による AHR と CYP1A1 プロモーター領域 (XRE) との結合をクロマチン免疫沈降法により検出した。

(結果)

〈第 1 章〉 RAW264.7 細胞に TBQ を曝露したところ、濃度および時間依存的に Nrf2 の核移行が認められ、曝露後 3 時間がピークであった。Nrf2 の活性化に伴い、下流タンパク質群が誘導された。同条件下において ROS の産生が観察されたが、ポリエチレングリコール結合カタラーゼ (PEG-CAT) 処理で ROS を消去しても TBQ による Nrf2 の活性化に有意な変化は見られなかった。TBQ の濃度依存的に細胞内 Keap1 およびマウス精製 Keap1 の修飾が見られ、UPLC-MS^E 解析の結果、マウス精製 Keap1 の Cys23、Cys151、Cys226 および Cys368 への TBQ の共有結合が検出された。次に、合成した TBQ-Keap1 と GSH を反応させたところ、GSH の濃度および時間依存的に TBQ による Keap1 への修飾が減少した。この TBQ-Keap1 と GSH との反応産物を、合成した TBQ-SG を標品として解析した結果、本反応産物は TBHQ-di-SG、TBQ-di-SG および TBHQ-mono-SG であることが確認された。HepG2 細胞に GSH 合成阻害剤である L-ブチオニル-(S, R)-スルフォキシイミン (BSO) もしくは GSH の前駆体である *N*-アセチルシステイン (NAC) で前処理を行ったところ、BSO 処理では TBQ による Nrf2 活性化の持続が見られ、逆に NAC 処理で TBQ による Nrf2 の活性化は抑制された。

〈第 2 章〉 Hepa1 細胞に芳香族親電子物質 [TBQ、1,4-ベンゾキノ (1,4-BQ)、1,2-ナフトキノ (1,2-NQ) および 1,4-NQ] を曝露したところ、CYP1A1 の発現誘導および AHR の核移行が検出された。親電子性を持たないこれらの親化合物であるブチルヒドロキシアニソール (BHA)、*tert*-ブチル-1,4-ヒドロキノ (TBHQ)、ベンゼン、1,4-ベンゾジオールおよびナフタレンではチトクローム P450 A10 (CYP1A10) の誘導は見られなかった。AHR の競合阻害剤は、親電子物質による CYP1A1 の誘導を抑制した。さらに、変異により転写活性化能を持たない AHR を有する C35 細胞では当該親電子物質による CYP1A1 の誘導は認められなかった。Hepa1 細胞に TBQ、および 1,2-NQ を曝露し、クロマチン免疫沈降法による解析を行った結果、XRE 領域に AHR の結合が見られ、プロモーター領域には XRE の転写活性化を示す RNAPolIII の結合が検出された。

(考察)

第 1 章では、BHA や TBHQ の代謝により生じる TBQ が、Keap1 に共有結合して Nrf2 を活性化すること、ならびに親電子修飾された Keap1 タンパク質の細胞内運命の一部が明らかになった。TBHQ は、自動酸化で TBQ に変換されてレドックスサイクルを介して、ROS を産生することが示唆されている。TBHQ による Nrf2 の活性化には酸化ストレスが主因とされてきたが、本研究結果から、TBQ による ROS の産生は Nrf2 活性化の主因ではないことが示唆された。本研究で Keap1 への TBQ 修飾部位として同定された Cys151 は、Nrf2 の活性化に重要な役割を持つとされている。これらのことから、酸化ストレスよりもむしろ Keap1 への親電子修飾が、TBQ による Nrf2 の活性化に重要な役割を示すと想定される。

親電子修飾を受けた Keap1 は、オートファジー系等で分解されるもしくはその修飾が解除される運命が予測される。所属研究室の先行研究で、1,2-NQ による GAPDH の親電子修飾が GSH を介した S-トランスアリアル化反応により解除され、その活性が回復することを見出している。TBQ-Keap1 においても同様の反応経路が予想されたことから、TBQ-Keap1 に GSH を反応させたところ、TBHQ-SG、

TBHQ-di-SG、および TBQ-di-SG の生成が見られた。すなわち、TBQ-Keap1 の TBQ は GSH を介した S-トランスアリール化により解離した。また、BSO および NAC 前処理での結果から、GSH が Nrf2 の活性化を一部制御していることが示唆された。TBQ によって起こる一過性な Nrf2 の活性化の少なくとも一部は、Keap1-TBQ 結合体の GSH 依存的 S-トランスアリール化が関与している可能性が高い。

第 2 章では、AHR の新奇活性化機序として親電子物質が AHR を活性化することを明らかとした。これまでの広範な研究より、化合物が AHR のリガンド活性を有する条件の一つとして、リガンドのサイズは 12 Å 程度の長さが必要であるが 14×12×5 Å 以下であることが明らかにされている。使用した親電子性を示さない芳香族炭化水素である BHA、TBHQ、ナフタレンおよびベンゼンの分子サイズは、12 Å 以下と小さく、AHR に認識されない。一方、これらの親電子代謝物である TBQ、1, 2-NQ、1, 4-NQ および 1, 4-BQ の分子サイズは殆ど変わらないにもかかわらず、AHR 活性化能および CYP1A1 誘導能を示した。これらのことから、AHR は、芳香族親電子物質のような一部の親電子物質に応答して活性化し、CYP1A1 を誘導することが明らかとなった。

(結論)

(BHA)や TBHQ の親電子代謝物である TBQ は、Keap1 の Cys23、Cys151、Cys226 および Cys368 の修飾を介して、Nrf2 を活性化し下流タンパク質である第二相薬物代謝酵素群を誘導する。TBQ によって修飾を受けた Keap1 は GSH を介した S-トランスアリール化によって、その親電子修飾が解除される。Keap1 だけでなく、多環芳香族炭化水素類に応答する転写因子である AHR も TBQ のような芳香族親電子物質に対して感知・応答して活性化される。

審査の結果の要旨

(批評)

TBHQ による Nrf2 の活性化は酸化ストレスが主因と考えられていたが、酸化ストレスよりもむしろ Keap1 への親電子修飾が、TBQ による Nrf2 の活性化に重要な役割を示すことが本研究によって明らかになり、さらにその一部は、GSH を介した S-トランスアリール化により解離することを示している。また、類似の親電子修飾が AHR の活性化による第一相薬物代謝酵素群の誘導にも働いていることを明らかにしており、親電子修飾の生物学的意義を明らかにした独創性の高い優れた研究であると評価される。

平成 25 年 6 月 4 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求め、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）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認める。