

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

2013

筑波大学大学院博士課程人間総合科学研究科

安孫子 ユミ

筑波大学

博士（医学）学位論文

目次

略語

0. 序論 研究の背景	
0.1. はじめに	1
0.2. 環境中化学物質	1
0.2.1. 環境中化学物質による生体影響に関する研究の歴史	1
0.2.2. 環境中の親電子物質	2
0.2.3. 親電子物質の反応性	2
0.2.4. 求核置換基の反応性	3
0.2.5. S-トランスアリール化	4
0.2.6. 親電子修飾の検出法	4
0.3. 代謝活性化を介した親電子物質の生成	5
0.3.1. 異物代謝	5
0.3.2. ブチルヒドロキシアニソール (BHA)	6
0.3.3. ナフタレン	7
0.3.4. その他	7
0.4. 環境中化学物質による転写因子を介した生体応答	8
0.4.1. Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 (Nrf2)	8
0.4.2. Aryl hydrocarbon receptor (AHR)	9
0.5. 本研究の目的と特色	10
0.6. 序論図表	11
実験の部	19
実験方法	19
1. 試薬	19
2. 細胞培養	22
3. 細胞生存率の測定	23
4. タンパク質定量	23
4.1. Bradford 法	23
4.2. BCA 法	23
5. タンパク質の分離および検出	23
5.1. 核分画の抽出	23
5.2. BPM 標識アッセイ	23
5.2.1 細胞を用いた BPM 標識アッセイ	23

5.2.2	精製タンパク質を用いた BPM 標識アッセイ	24
5.3.	免疫沈降法	24
5.4.	SDS 電気泳動法 (SDS-PAGE) 及びウエスタンブロット	24
5.5.	蛍光免疫染色	25
6.	核酸の検出	25
6.1.	mRNA の抽出	25
6.2.	DNA マイクロアレイ	26
6.3.	Realtime-PCR 法による mRNA の定量	26
7.	遺伝子の導入	27
7.1.	Small interfering RNA (siRNA) による Nrf2 発現抑制	27
7.2.	ベクターの導入	27
8.	ルシフェラーゼ活性測定	27
9.	クロマチン免疫沈降反応	28
10.	タンパク質の精製	29
10.1.	大腸菌用培地の調製	29
10.2.	マウス Keap1 タンパク質の精製	30
11.	TBQ 結合タンパク質の検出	30
11.1.	タンパク質中チオール基の測定	30
11.2.	TBQ とタンパク質との反応	30
12.	TBQ-グルタチオン結合体 (TBQ-SG) の合成	30
12.1.	TBQ-monoGSH 結合体	30
12.2.	TBQ-diGSH 結合体	31
12.3.	TBQ-SG の精製	31
13.	機器分析	31
13.1.	高速液体クロマトグラフィー (HPLC) -紫外可視吸光検出器 (UV-VIS) による化合物の分析	31
13.2.	超高速液体クロマトグラフィー (UPLC) -エレクトロスプレーイオン化質量分析計 (MS) による蛋白修飾部位の同定	31
13.3.	HPLC-電子捕獲検出器 (ECD) による GSH の分析	32
14.	統計処理	32
第 1 章.	<i>tert</i> -Butyl-1,4-benzoquinone (TBQ) による Keap1/Nrf2 システム活性化機序	
1.1.	目的	33
1.2.	結果	33
1.2.1.	TBQ による Nrf2 の活性化および下流タンパク質の誘導	33
1.2.2.	TBQ による ARE 転写活性化	33

1.2.3.	Nrf2 活性化における活性酸素種の関与	33
1.2.4.	TBQ による Keap1 修飾	34
1.2.5.	TBQ による細胞毒性に対する Nrf2 の関与	34
1.2.6.	TBQ による Nrf2 の活性化における GSH の関与	34
1.2.7.	GSH を介した TBQ 修飾の S-トランスアリアル化	34
1.3.	考察	35
1.4.	まとめ	38
1.5.	図表	38
第 2 章. 環境中親電子物質による芳香族炭化水素受容体活性化機序		
2.1.	目的	58
2.2.	結果	58
2.2.1.	TBQ により発現が変動する mRNA	58
2.2.2.	環境中親電子物質による CYP1A1 の発現誘導	58
2.2.3.	環境中親電子物質による CYP1A1 発現誘導に対する AHR の関与	59
2.2.4.	環境中親電子物質による AHR の核内移行と ARNT 相互作用亢進	59
2.2.5.	環境中親電子物質による XRE 転写活性化	59
2.3.	考察	59
2.4.	まとめ	62
2.5.	図表	62
総合考察		82
図表		85
引用文献		87
謝辞		101
参考論文		

略語

ABC	重炭酸アンモニウム
ABS	吸光度
ADI	1日摂取許容量
AHR	aryl hydrocarbon receptor, 芳香族炭化水素受容体
AKRs	アルドケト還元酵素
Ala	アラニン
APS	過硫酸アンモニウム
ARE	antioxidant responsive element, 抗酸化応答配列
Arg	アルギニン
ARNT	AHR nuclear translocator
BP	ベンゾ[a]ピレン
BCA	ビンシコニン酸
BHA	ブチルヒドロキシアニソール
BMCC	1-biotinamido-4-(4'-[maleimidoethylcyclohexane]-carboxamido)butane
BPB	ブロモフェノールブルー
BPM	biotin-PEAC ₅ -malaimide
1,4-BQ	1,4-ベンゾキノン
BR/HLH	basic region/helix-loop-helix
BSA	ウシ血清アルブミン
BSO	L-ブチオニル-(S,R)-スルフォキシイミン
BTB	broad complex, tramtrack, and bric-a-brac 領域
cGMP	環状グアノシンーリン酸
CBB	クマシーブリリアントブルーG-250
CTR	C末端領域
CYPs	cytochrome P450, シトクロム P450 分子種
Cys	システイン
DDT	ジクロロジフェニルトリクロロエタン
DDW	distilled deionized water
DEP	ディーゼル排気微粒子
DMSO	ジメチルスルフォキシド
D-PBS	ダルベッコリン酸緩衝液
DRE	ダイオキシン応答領域
DTNB	5,5'-dithiobis-nitrobenzoic acid
DTT	ジチオスレイトール

ECD	電子捕獲検出器
EDTA	エチレンジアミン四酢酸四ナトリウム四水和物
EI-MS	電子衝撃質量分析法
EqRE	親電子物質応答配列
ESI	エレクトロスプレーイオン化法
ESI-MS	エレクトロスプレーイオン化質量分析法
FBS	ウシ胎児血清
GCL	グルタミン酸システイン合成酵素
GCLC	GCL 触媒サブユニット
GCLM	GCL 修飾サブユニット
Gln	グルタミン
GSH	グルタチオン
GST	GSH S-転移酵素
¹ H NMR	プロトン核磁気共鳴分光法
HO-1	ヘムオキシゲナーゼ-1
HOMO	最高被占軌道, Highest occupied molecular orbital
HPLC	高速液体クロマトグラフィー
HRP	西洋ワサビペルオキシダーゼ
HSAB	hard and soft acid and base
HSP	熱ショックタンパク質
H ₂ DCFDA	2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate
IAB	<i>N</i> -iodoacetyl- <i>N</i> -biotinylhexylenediamine
IARC	国際がん研究機関
IPTG	イソプロピル-β-チオガラクトピラノシド
IVR	central intervening region
Keap1	kelch-like ECH-associated protein 1
LB	lysogeny broth
LUMO	最低空軌道, lowest unoccupied molecular orbital
MALDI	マトリックス支援レーザー脱離イオン化法
3-MC	3-メチルコランスレン
MRPs	多剤耐性関連タンパク質
MS ^E	elevated energy MS
MTT	臭化 3-(4,5-ジメチル-2-チアゾリル)-2,5-ジフェニル-2H-テトラゾリ
ウム	
NAC	<i>N</i> -アセチルシステイン
NES	核外移行シグナル配列

NF-E2	nuclear factor-erythroid 2
NLS	核移行配列
1,2-NQ	1,2-ナフトキノン
1,4-NQ	1,4-ナフトキノン
NQO1	NAD(P)H: キノン酸化還元酵素 1
Nrf2	nuclear factor erythroid-2 related factor 2
NTR	N 末端領域
PAHs	多環芳香族炭化水素類
PAS	Per-Arnt-Sim
PCR	ポリメラーゼ連鎖反応法
PDA	フォトダイオードアレイ
PEG-CAT	ポリエチレングリコール結合カタラーゼ
Phe	フェニルアラニン
pKa	酸解離定数
pol II	ポリメラーゼ II
PTP1B	プロテインチロシンフォスファターゼ 1B
PVDF	ポリビニリデンフルオライド
RIPA	radio-immunoprecipitation assay
ROS	reactive oxygen species, 活性酸素種
SDS	ドデシル硫酸ナトリウム
SDS-PAGE	SDS 電気泳動法
SH	チオール
S ⁻	チオレートイオン
siRNA	small interfering RNA
SOC	super optimal broth with catabolite repression
TBHQ	2-tert-ブチル-1,4-ヒドロキノン
TBQ	2-tert-ブチル-1,4-ベンゾキノン
TBQ-SG	TBQ-グルタチオン結合体
TCDD	2,3,7,8-テトラクロロジベンゾ-p-ダイオキシン
TEMED	N,N,N',N'-テトラメチレンジアミン
TFA	トリフルオロ酢酸
Thr	スレオニン
TOF-MS	飛行時間質量分析計
Tris	2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-1,3-プロパンジオール
UPLC	超高速液体クロマトグラフィー
UV-VIS	紫外可視吸光検出器

XAP2

X-associated protein 2

XRE

xenobiotic-responsive element, 異物応答領域

0. 序論 研究の背景

0.1. はじめに

ケミカルアブストラクツサービスには 6500 万を超える化学物質が登録され、昼夜を問わず更新されている。このことから分かるように、我々を取り巻く環境中には様々な化学物質が遍在し、生体は常にストレスに曝されている。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、より反応性の高い化学形態となる (1)。興味深いことに、生体内でも親電子物質は産生される。それにもかかわらず、生体の機能はすぐに破綻を来さずに恒常性を維持している。化学物質には量-反応関係が存在し、遺伝子にダメージを与える発がん物質以外は有害性の閾値が存在する。有害作用が観察される閾値以下の低濃度の摂取は二次的な化学物質曝露に対して防御的な効果を有し、有害性の閾値を超えた摂取は防御応答が破綻して毒性を示すことが知られている (2-5)。これらのことは、生体は化学物質を感知・応答し、さらに適応する優れた制御システムを有することを示している。すなわち、化学物質が生体内に侵入すると、センサー分子による感知・そのセンサー分子に対するシグナル伝達分子による応答の結果、細胞保護効果のあるタンパク質制御が行われるといった一連の制御システムの存在が示唆される。本研究ではこの優れた細胞内制御システムを紐解くために、環境化学物質に応答する転写因子に注目した。化学物質の反応性の高さから、特に、その性質のひとつである“親電子性”に注目し、転写因子の活性化における親電子修飾の意義の解明を試みた。

0.2. 環境中化学物質

0.2.1. 環境中化学物質による生体影響に関する研究の歴史

1873 年にジクロロジフェニルトリクロロエタン (DDT) はオーストリアの学生によって合成され、当時は特に注目されなかった。しかし、1939 年スイスの Paul Hermann Muller により DDT の殺虫効果が発見されてから (6)、殺虫・除草効果のある農薬として、特にアメリカ合衆国で広く使用されるようになった。当時、DDT などの殺虫剤は害虫のみに作用し、他の動物には無害であると信じられていた。しかし、生物学者である Rachel Louise Carson は自身の著書『沈黙の春』の中で農薬の残留性や生態系への影響を訴え、やみくもな農薬の使用は見直されることとなった。我が国では環境省環境安全課により 1973 以来、このような一般環境中の既存化学物質の残留状況の把握を目的として“化学物質環境調査”が開始された。人体に影響を及ぼす環境化学物質は農薬だけではない。例えば、合成樹脂を製造する原料であるビスフェノール A はエストロゲン類似作用を示し (7)、船底塗装や漁網防汚剤に使用される有機スズ化合物は性ステロイドホルモン代謝を攪乱する (8)。

環境化学物質による生体影響に関する研究の歴史において注目すべきは、1775 年に Percival Pott が煙突掃除夫に陰嚢がんが多いことを記録して、人における化学発がん

の最初の手がかりを得たことである (9, 10). その後, 1915 年に山極勝三郎はコールタール塗布による人工発がん実験を世界に先駆けて成功させ, 化学発がんの存在を初めて示した (11). これらの発見は, がん研究において多大な影響を与えた. コールタール中には, 高濃度の多環芳香族炭化水素類 (PAHs) が含まれており (12, 13), 生体内代謝活性化によって親電子性を獲得する (1). PAHs はディーゼル排気微粒子 (DEP) 中等にも含まれているが, DEP による酸化ストレス, 循環器疾患および喘息用疾患等に関与する化学物質の同定はされていなかった. 当研究室は DEP 中の親電子物質である多環芳香族炭化水素キノン体が酸化ストレスの主因であることを 1997 年に明らかにし (14), モルモットを用いた気管リング収縮実験により揮発性大気成分中に含まれる 1,2-ナフトキノン (1,2-NQ) が親電子性により気管収縮作用を引き起こすことを見いだした (15).

0.2.2. 環境中の親電子物質

環境中にはすでに親電子性を有する化学物質だけでなく, 生体内に取り込まれた後で代謝活性化を受け親電子物質に変換される物質も存在する. 交通量が多いロサンゼルス地区の大気中にナフタレン類量は $6,000 \text{ ng/m}^3$ 程度含まれている. ナフタレンは光酸化や生体内代謝を受けて 1,2-NQ や 1,4-NQ を生じる (詳細は 0.3.3. に記載). 同様に, PAHs は生体内代謝活性化によって親電子物質へと変換される (表 1).

油脂等の酸化防止剤として使用されるブチルヒドロキシアニソール (BHA) や 2-*tert*-ブチル-1,4-ヒドロキノン (TBHQ) は食品や化粧品に含まれており, 体内で代謝活性化を受けて, 親電子物質を生じる (詳細は 0.3.2. に記載). BHA の 1 日摂取許容量 (ADI) 値は 0.5 mg/kg/日 とされている.

我々が普段摂取する植物から抽出した脂溶性画分抽出液にも親電子物質は存在し, 植物や抽出液を摂取した際の薬効成分となり得る. リコピン (トマト), (6)-ジングロール (ショウガ), レスベラトロール (ブドウ), クルクミン (ウコン), スルフォラファン (ブロッコリー), ジアリルスルフィド (ニンニク) 等, 薬効の研究が進んでおり, ガンに対しての応用も研究されている (16). ハーブはヨーロッパ等で古くから薬用として親しまれている. その一部は食用もしくはスパイスとして用いられ, 様々な成分を含有している. 古くから伝承されている薬効を科学的に証明した報告は, ほんの一部に過ぎず, 今もなお詳細が不明なものが多い.

0.2.3. 親電子物質の反応性

親電子物質 (Electrophile) についての研究は 100 年以上の歴史があり, 1901 年に炭素親電子剤について認識されることに端を発し, 1929 年に親電子 (Electrophile) と求核 (Nucleophile) という概念がイギリスの科学者 Christopher Kelk Ingold により提唱された (17). 親電子とは, 異なる物質間で電子の授受を伴いながら化学結合を生成する

過程において、電子を受け取る側である (求核は電子を渡す側である). 親電子物質の反応の強弱は親電子性という言葉によって表される. ある化合物に対して “親電子性が大きい (もしくは強い)” という場合は求核剤の電子に対する親和性が高く, 反応速度が大きいことを意味する. この親電子性の大小は, 陽荷電の強さ, 電子を共有することで生成される分子軌道のエネルギー準位や立体因子などによって決定される. 分子内に α, β -不飽和カルボニル構造を持つ化合物の親電子性は大きく, 例えば, マイケル付加反応を介して, 反応性求核基と共有結合を形成することが知られており, 生体内に豊富に存在するグルタチオン (GSH) やシステインなどの生体内チオール (-SH) は脱プロトン化してチオレートイオン ($-S^-$) になると, 親電子物質の標的となる.

求核剤に対する親電子の反応性は, Ralph G. Pearson によって 1963 年に提示された Hard and Soft Acid and Base (HSAB) 則によって予測・評価できる. HSAB 則は Lewis の定義した酸 (電子対受容体) や塩基 (電子対供与体) を Soft や Hard という表現で分類し, この酸と塩基の反応は Hard 同士や Soft 同士の方が Hard-Soft よりも相互作用し, 複合体を形成しやすいといった考え方である. Hard な酸塩基の特徴は最低空軌道 (lowest unoccupied molecular orbital, LUMO) のエネルギーが高く, 最高被占軌道 (highest occupied molecular orbital, HOMO) は低い. そのために, エネルギー差は大きく分子軌道の相互作用は小さいが, それぞれに電荷密度が高いため静電相互作用をもつ. 一方, Soft な酸塩基は LUMO が低く, HOMO が高いためエネルギーの差は小さく, 分子軌道相互作用が大きくなり共有結合を形成する. 例えば, キノン化合物は Soft 酸に, チオレートイオンは Soft 塩基に属するために, キノンとチオレートイオンは共有結合を形成しやすい (図 1A).

0.2.4. 求核置換基の反応性

ヒトゲノム中には約 214,000 個ものシステイン残基がコードされているが, その 80 ~90% はジスルフィド結合や翻訳後修飾もしくはタンパク分子内に埋没しているために反応性が低い (18). 親電子物質によるシステイン残基の修飾には, SH 基が解離してチオレートイオンになることが必須である (図 1A)(19). 本解離には, 亜鉛の配位 (20) や塩基性アミノ酸が持つアミノ基やイミダゾール基による誘起効果が影響する. タンパク質の立体構造において, システイン残基の近傍に塩基性アミノ酸が存在する場合, SH 基の脱プロトン化が亢進してシステイン残基の pKa 値は低くなる. GSH は細胞内に数 mM オーダーで存在するが, GSH の持つシステイン残基の pKa 値は 9.12 (21) であり, 生理条件下では約 2% しか解離していない. 一方, タンパク質の立体構造を考えた際にシステイン残基の近傍に塩基性アミノ酸が存在すると, SH 基の脱プロトン化が亢進してシステイン残基の pKa 値は低くなる. 一般に亜鉛を配位するシステイン残基の pKa 値は低下してチオレートイオンとなる (20).

0.2.5. S-トランスアリール化

親電子物質の炭素原子とシステイン残基は硫黄原子の電気陰性度は同程度なために、安定な非極性の共有結合を形成する。この共有結合によるタンパク質への修飾は不可逆であるとされてきたが、Bruce A. Freeman らによるニトロ-脂肪酸を用いた研究により、親電子修飾は β -メルカプトエタノールや GSH 等の求核基を介した逆マイケル付加反応により解除 (S-トランスアルキル化) される可能性が提示された (22)。2011 年に発表した当研究室の先行研究で、GSH は 1,2-NQ に修飾された GAPDH (それに伴い、本活性は阻害) に作用し、その親電子修飾を解除 (S-トランスアリール化) することで GAPDH 活性を回復させることを世界に先駆けて明らかにした (23)。このことは、タンパク質活性の“ON”と“OFF”が親電子修飾によって制御されている可能性を示唆している。

0.2.6. 親電子修飾の検出法

親電子修飾を検出するためには、親電子物質が修飾していないタンパク質のチオール基を検出する方法、または、結合した親電子物質を直接検出する方法の 2 つのアプローチがある。精製タンパク質中のシステイン残基は Ellman 法により定量でき、タンパク質当たりどの程度の親電子物質が結合しているかが推定できる。325 nm に最大吸収波長 (λ max) を持つエルマン試薬 (5,5'-dithiobis-nitrobenzoic acid; DTNB) はチオール基と反応すると、5-mercapto-2-nitrobenzoic acid と mixed disulfide を生成する。5-Mercapto-2-nitrobenzoic acid の λ max は 412 nm なので、可視光で検出可能である。また、定性的であるが、親電子プローブであるビオチン標識マレイミドを用いたアッセイにより、精製タンパク質および細胞内タンパク質への親電子修飾を評価できる。ビオチン標識マレイミドはマレイミドの親電子性によって解離性チオールへ結合するが、すでに親電子修飾を受けたチオール基へは結合しない。ビオチンはアビジンに親和性があるために、アビジン-アガロースを用いればビオチン-マレイミドに結合したタンパク質、すなわち親電子修飾されていないタンパク質のみを分離することができる。アビジン-アガロースにより分離したサンプルのウエスタンブロッティングを行い、目的とするタンパク質を抗体で検出し、親電子物質未処理群と比較して処理群でのバンド強度減少が認められれば、そのタンパク質は親電子物質により修飾されていることが示唆される。HRP 標識アビジンを検出抗体の代わりに用いることも有用である。親電子物質に対する抗体を用いれば親電子修飾を直接可視化できるが、これらの間接的な手段は抗体のない親電子物質によるタンパク質修飾を評価するうえで重要な手段となる。

親電子物質による修飾を受けたタンパク質は質量が変わるため、2002 年にノーベル賞を受賞した田中耕一博士が開発したマトリックス支援レーザー脱離イオン化法 (MALDI)-飛行時間質量分析計 (TOF-MS) のような質量分析装置で検出できる。サン

プルとマトリックスの混合結晶に窒素レーザーを照射すると、マトリックスは励起し、レーザーの余剰エネルギーが熱エネルギーに変換されて、サンプルおよびマトリックスは気化する。この時に、マトリックス-サンプル間でプロトンが授受されイオン化する。生成したイオンは磁場によって加速されて、電荷量に依存した運動エネルギーを得ることでイオン検出器まで飛行する。一定距離を飛行する時間を計測することで質量電荷比が測定できる。親電子物質処理・未処理精製タンパク質をペプチド消化したのち MALDI-TOF-MS 分析を行うことで、どのペプチド断片に親電子物質が付加しているか検出できる。この MALDI-TOF-MS で得られた結果に対してさらに MS 解析を行うと、タンパク質のどのアミノ酸残基に親電子修飾が起きているのか同定可能となる。しかしながら、この優れた MALDI-TOF-MS 分析はクロマトグラフィーと連結できないという欠点がある。この欠点を補ったのが超高速液体クロマトグラフィー (UPLC)-MS である。逆相カラムを用いた UPLC は、化合物の持つ極性によって分離でき、極性の低いものは固定相と相互作用して溶出が遅くなる。UPLC により分離されたサンプルは質量分析が可能となる。Waters 社の SYNAPT HDMS[®]では、分離したサンプルはエレクトロスプレーイオン化法 (ESI) によってイオン化され、四重極で通過するイオンを絞った後にコリジョンセルでイオンを開裂し、そして TOF 型の検出器により検出される。この UPLC-MS 分析を駆使した所属研究室の先行研究により、1,2-NQ 結合 GAPDH は GSH を介した S-トランスアリアル化によって 1,2-NQ 修飾が解除されることが明らかとなった (0.2.5 参照)(23)。

0.3. 代謝活性化を介した親電子物質の生成

0.3.1. 異物代謝

異物代謝は、薬物や毒物等の化学物質に対する代謝反応の総称である。役割に応じて第一相異物代謝 (酸化, 還元, 加水分解等), 第二相異物代謝 (抱合), 第三相異物代謝 (排泄) と分類されており、親水性を高めて細胞外へ排泄しやすくするための反応である。主に肝のミクロソームで行われ、異物代謝に係わる酵素群は異物代謝酵素と呼ばれる。第一相異物代謝はシトクロム P450 (CYP) 分子種による水酸化に代表され、CYP ファミリーの中でも CYP1~4 が酸化反応を触媒する。CYP は NAD(P)H と分子状酸素を補酵素として、ステロイドホルモンや脂肪酸、芳香族炭化水素類等の一酸素原子添加反応を触媒する (24, 25)。CYP によって酸化された異物の一部は、グルタチオンやグルクロン酸、硫酸等を付加されて極性がより大きくなり、腎や肝から尿や胆汁中に多剤耐性関連タンパク質 (MRPs) 等の第三相トランスポーターを介して排泄される。

芳香族炭化水素受容体 (Aryl hydrocarbon receptor, AHR) を活性化して CYP1A1 等の第一相異物代謝酵素を誘導する化合物は、特徴的な AHR のリガンドであり (図 2 および 3, 0.4.2 参照), Nrf2 を活性化して主に第二相および第三相異物代謝酵素を誘導

する化合物は monofunctional (単機能的) な化合物, AHR および Nrf2 どちらも活性化
する化合物は bifunctional (二機能的) な化合物として分類される (26)(図 4). 脂肪族ア
ルデヒドおよび BHA 等は単機能的, β -ナフトフラボンおよび代謝された PAHs は二
機能的な化合物に分類される (26). Nioi ら (26) によると, 単機能的および二機能的
な化合物は, ケモプリベンティブに働くとされる. しかしながら, PAHs の一つで
あるベンゾ[a]ピレン (BP) は代謝され, BP-3,6-キノンに変換されるが, DNA の損傷
を引き起こすためにケモプリベンティブ作用を持たない (26, 27). また, ヒ素化合物
は単機能的とされていたが (26), AHR を活性化することが報告されたことから (28),
AHR の活性化にはリガンドによる活性化以外の機序があると示唆される.

0.3.2. ブチルヒドロキシアニソール (BHA)

BHA は石油等の酸化防止剤として開発され, 動物性油脂等にも優れた抗酸化力
を発揮することから食品および化粧品の添加物として使用されている. 我が国では
種々の法により規制されており, 食品衛生法において 1954 年に指定添加物とされ,
薬事法では表示指定成分 (医薬部外品), 飼料安全法では飼料添加物指定品目に分類さ
れる. 伊東らによって BHA が F344 ラットに扁平上皮がんを引き起こすことが報告さ
れ (29), 国際がん研究機関 (IARC) ではグループ 2B (ヒトに対して発がん性がある可
能性がある物質) に分類された. BHA は酸化ストレスによってフェノールラジカルを
生成することにより, 細胞の生存に関与する MAPKs, ERK, JNK1 および MEK を活
性化する (30). しかしながら, BHA はがんの原因にならないという報告も存在し,
その発がん性は未だ結論が出ていない (31).

経済産業省の有害性評価書によると, BHA は経口投与後に, 消化管から吸収され
て器官に広範囲に分布し, 主に肝臓で代謝される (32). BHA はグルクロン酸や硫酸
により抱合され, 一部は CYPs により, *O*-脱メチル化されて TBHQ に変換し, 自動酸
化または酸化酵素によって親電子物質である 2-*tert*-ブチル-1,4-ベンゾキノン (TBQ)
に代謝活性化される. 日本で食品経由の BHA の摂取量を実測した報告によると, 3
万の食品サンプルを分析した結果, 日本での 1 日平均摂取量は, 約 120 μ g/日 (666
nmol/日) であった (33). ボランティアに BHA を摂取させた結果, 24 時間以内に回収
された尿中に, 代謝物として BHA の抱合体が投与量の 39%, TBHQ 抱合体が 9%, 少
量の TBHQ 由来の代謝物が排泄されたという報告があることから (34), 約 120 μ g/日
の摂取では TBHQ もしくは TBQ は少なくとも約 10.8 μ g (65 nmol) 排泄される. 尿
は 1 日 500~2000 mL 程度排泄されるので, 平均的に尿中に排泄されたとすると, 膀
胱内では 130 nM~32.2 nM の濃度となることが想定される. 親電子物質は生体内高分
子を修飾するため, 臓器中にはさらに高濃度の TBQ が存在すると推測される.

BHA や TBHQ は酸化防止剤として使用されるが, TBQ への酸化によってキノン化
合物特有のレドックスサイクルを介した活性酸素種 (ROS) 産生能を獲得する (35)

(図 5). ヒドロキノン体はキノン体との不均化反応によりセミキノンラジカルを生じ、それが分子酸素と反応してスーパーオキシドアニオンおよびキノン体を生成する (14, 36). キノン体は AKRs や NQO1 等のジアホラーゼにより還元されて、ヒドロキノン体、スーパーオキシドアニオンはこのヒドロキノン体と反応して、セミキノンラジカルと過酸化水素を産生する (14, 36) (図 5). このように、酸化還元反応を繰り返すことで、化学量論に見合わない過剰量の ROS を産生する. TBQ は親電子物質であるために、前述したように容易に生体内高分子を修飾する (0.2.4 参照). 以上のことから本研究では、BHA や TBHQ の作用は親電子代謝物である TBQ に起因すると仮定した.

0.3.3. ナフタレン

ナフタレンはタバコの煙中や大気中に広く存在する環境化学物質である(37, 38). ナフタレンはオゾンを介した光酸化反応や生体内における酸化によって 1,2-ナフトキノンや 1,4-ナフトキノンへと変換される (39, 40). ナフトキノン類も TBQ と同様にレドックスサイクルを介した ROS 産生能およびマイケル付加反応を介した求核置換基との共有結合能を有する. 溶血に代表されるナフタレンによる毒性は、代謝されて生じたナフトキノン類によるとされている. 我々のインビトロ代謝研究によると、ラット肝 9000g 上清を酵素源とすると、ナフタレンの約 40%が 1,2-NQ に変換され、速やかにタンパク質に共有結合することが見いだされており (41), ヒトにおいても同様なキノンへの代謝が報告されている (42, 43).

0.2.2.に記載したように交通量の多い地区では $6,000 \text{ ng/m}^3$ (47 nmol/m^3) のナフタレン類が大気中に含まれる. 50 kg のヒトは 1 回の呼吸で約 500 mL の空気を取り込むとすると、1 日で約 15 m^3 を体内に取り込む. すなわち、約 $90 \mu\text{g}$ (703.2 nmol) のナフタレン類を呼気から摂取することになる. また、ナフタレンは市販されているタバコ 1 本当たりの煙中に、主流煙で $< 4 \mu\text{g}$ (31.2 nmol), 副流煙で $< 46 \mu\text{g}$ (358.9 nmol) 程度含まれている (37). ナフタレンの約 40%が 1,2-ナフトキノンになると予測されるので (41), 同程度の 1,4-ナフトキノンが生じると仮定すると、大気中から約 562.6 nmol , タバコ 1 本分の煙中から約 312 nmol のナフトキノン類に曝露される可能性がある.

0.3.4. その他

BHA やナフタレン以外にも代謝活性化を介して親電子物質へと変換される化学物質は多く存在する. 例えば、1930 年にコールタール中から単離された BP は生体内に取り込まれ、シトクロム P450 によりエポキシ化され BP-7,8-エポキシドとなった後、エポキシド加水分解酵素により加水分解を受けて BP-7,8-ジヒドロジオール、再びシトクロム P450 によりエポキシ化され BP-7,8-ジオール-9,10-エポキシドとなる (44-46). BP-7,8-ジオール-9,10-エポキシドは発がん性物質であり、親電子性を有し DNA を修飾

する (44, 45, 47). また, 解熱鎮痛剤として広く使用されるアセトアミノフェンもシトクロム P450 による生体内代謝活性化により酸化されて, 反応性の高い親電子物質である *N*-アセチル-*p*-ベンゾキノニンイミンを生成する (48, 49)(表 1).

外来性の化学物質のみが親電子物質へと代謝されるのではなく, 内在性化学物質からも炎症等に起因する酸化ストレスにより生成する. 中枢神経系に存在する神経伝達物質のドパミンおよびドパは, 自動酸化によりそれぞれドパミンキノンおよびドパキノンに代謝され, アポトーシス様細胞死を引き起こす (50, 51). エストロゲン, プロスタノイド, および cGMP は酸化ストレスや炎症時において, エストロゲンキノン, 15-デオキシプロスタグランジン J2, および 8-ニトロ-cGMP に一部変換される (35, 52-54). 親電子性ニトロ脂肪酸はタンパク質を親電子修飾することで被修飾タンパク質の細胞局在を変え, その修飾は細胞内 GSH を介した *S*-トランスアルキル化により解除できることから (55), 内在性親電子物質による化学修飾を介したシグナル伝達 (親電子シグナル) の存在が示唆された (56). 内在性親電子物質は毒性の原因とされており, 生体内での必要性については十分な研究が進んでいないのが現状である.

0.4. 環境中化学物質による転写因子を介した生体応答

0.4.1. Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 (Nrf2)

Nrf2 は 1994 年に, β -グロビン遺伝子発現制御領域上の nuclear factor-erythroid 2 (NF-E2) 結合配列 [5'-T_AGCTGA^G/C TCA^T/C-3'] (57) に相互作用するタンパク質のスクリーニングによって同定された転写因子である (58). 1990 年に同定された第二相薬物代謝酵素の発現誘導に係わる抗酸化物質応答配列 [ARE; 5'-TGACNNNGC-3'] (59, 60) や親電子物質/抗酸化物質応答配列 [EpRE/ARE; 5'-A^A/G TGA^T/C NNNGC^A/G-3'] (2, 61, 62) に NF-E2 結合配列が類似しており, このことに注目した伊東らは 1997 年に Nrf2 が ARE を介して第二相薬物代謝酵素の発現を制御することを明らかにした (63). Nrf2 は cap 'n' collar (CNC)-bZip 型転写因子のひとつであり, 小 maf 因子群とヘテロ二量体を形成する (64). ヒトの同ファミリーには p45 NF-E2, Nrf1, Nrf3, Bach1 および Bach2 がある (65). Nrf2 は 6 個の Neh 領域を持ち (66), C 末端側の Neh1 領域は bZip 構造を有し, 小 maf 群との二量体形成および DNA への結合に必要である. 生物種間で保存性が高い Neh2 領域は, ETGE [5'-LDNETGE-3'] および DLG [5'-QDNDLG-3'] モチーフ (67) を介して Keap1 と相互作用することで Nrf2 の分解に関与している (68-70). Neh3, Neh4 および Neh5 領域は転写活性化に関与する (67, 71-73).

1999 年に伊東らは, Nrf2 の負の制御因子として, 親電子物質に対する感知分子 Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1) を発見した (図 1B) (66). Keap1 は N-末端領域 (NTR), broad complex, tramtrack, and bric-a-brac 領域 (BTB), intervening region (IVR) および c-末端 DC 領域から構成され, BTB 領域を介してホモ二量体を形成し (74),

β バレル構造を形成する DC 領域を介して Nrf2 と結合する (75). それによって, Nrf2 の空間的に配置されたリジンのユビキチン化を cullin3 ユビキチンリガーゼ複合体が促進する (75). Nrf2 の半減期は 20 分以内であり, Keap1 からの負の制御を免れて安定化した Nrf2 は 20~60 分かけて核内へ移行する (76). 核内へ移行した Nrf2 は小 Maf 群とヘテロ二量体を形成し, DNA 上の EpRE/ARE 領域と結合して抗酸化タンパク質群, 第一相・第二相薬物代謝酵素群および第三相トランスポーターの発現を増強する (表 2)(63, 77, 78). Keap1/Nrf2 システムは異物代謝にかかわる酵素群を包括的に制御しているため, 我々を異物から防御するための重要なシステムの一つといえる. 親電子物質は, 主に Keap1 を修飾することで Nrf2 の分解を抑制して, Nrf2 による転写活性化を増強する. ヒト Keap1 は 27 個, マウス Keap1 は 25 個のシステイン残基を有しており, 親電子物質や活性酸素種のセンサー分子として知られている (79). 親電子物質種によって修飾するシステイン残基が異なり, 1,2-NQ は Cys151, Cys257, Cys273, Cys288 および Cys489 に, 内在性親電子物質であるエストロゲンキノン は Cys77, Cys151, Cys257, Cys273, Cys288, Cys368, Cys434, Cys489 および Cys513 もしくは Cys518 に結合することを当研究室の先行研究で明らかにした (80, 81). 特に, Keap1 の Cys151, Cys273 および Cys288 が高い反応性を有することが明らかとなっており (82), これら 3 つのシステイン残基の近傍には複数の塩基性アミノ酸が存在するため pKa 値が低いと想定される (83, 84). さらに, Cys273 および Cys288 は亜鉛の配位子として知られるため, このことも pKa 値が低い要因と考えられる (85).

BHA は Nrf2 を活性化して第二相異物代謝酵素を誘導することが知られており (63), さらに, 転写因子 c-Jun と Nrf2 のヘテロダイマー形成を促進し CYP2J2 を誘導する (86). BHA による Nrf2 活性化には ERK や JNK が関与するとされるが, その機序については未だ不明な点が多い (87). BHA は CYPs により代謝を受けて TBHQ へ変換された後, すぐに自動酸化によって親電子物質である TBQ になることから (0.3.2 参照), TBQ が BHA や TBHQ による Nrf2 活性化の原因であると考えられる.

また, Nrf2 の活性メカニズムについて研究が進んでいる一方で, Keap1 の細胞内運命や Nrf2 の活性化がどのように終息されるかについての研究はほとんど行われていない. そこで本研究では, S-トランスアリアル化 (0.2.5 参照) により Keap1 の親電子修飾が解除され得るか否かについて検討した.

0.4.2. Aryl hydrocarbon receptor (AHR)

1976 年に Alan Poland らは, マウスの肝抽出液中のタンパク質に TCDD が結合していることを発見し, TCDD の結合量が種により違うこと, および化学構造の違いで親和性に差があることから TCDD に対する受容体の存在を示した (88, 89). その後, 放射性標識ダイオキシン誘導体を用いることで AHR は約 95kDa のタンパク質であることが分かった (90, 91). 1992 年にはマウス AHR の cDNA がクローニングされ, N 末

端に basic region/helix-loop-helix (BR/HLH) モチーフを持つことからリガンド結合型転写因子と判明した (92). HLH ドメインの他に, AHR は Per-Arnt-Sim (PAS)ドメイン, Q-rich ドメインを持つ. PAS ドメインは反復的な構造を持ち (PAS A/PAS B), PAS AがAHRとAHR nuclear translocator (ARNT) とのヘテロ二量体を形成するための結合部位, PAS Bがリガンドおよび熱ショックタンパク質 (Hsp) 90との結合部位である (93). C末端に位置するQ-richドメインはAHRの転写活性化に関与する (94). 定常状態のAHRは2分子のHsp90, X-associated protein 2 (XAP2), p23と結合して複合体を構成しており (95, 96), リガンドがAHRに結合すると, それに伴うAHRの構造変化によって核移行配列 (NLS(s)) が露出して核に移行する. 核に移行した本転写因子はARNTと結合し, 異物応答領域 (XRE), もしくはダイオキシン応答領域 (DRE) と呼ばれる領域の 5'-T^T/cGCGTG-3'に結合して下流遺伝子の転写を制御する (97, 98). AHRは転写因子の機能を終わると, 核外移行シグナル配列 (NES) が露出し, 核外へ移行して速やかに分解を受ける (99).

AHRのリガンドはTCDDに代表されるハロゲン化芳香族炭化水素や3-メチルコロンスレン (3-MC) 等の多環芳香族炭化水素などは平面構造をとり, サイズが14×12×5 Å以下の化合物とされる (図2). ゆえに, 二環であるナフタレンはAHRを活性化しない (100). このリガンド結合ポケットを構成するアミノ酸はArg282, Cys327, Thr343, Phe345, Ala375およびGln347とされ, Cys327は電子対供与体として働きTCDDと相互作用する (101). 典型的な構造的特徴を持たないリガンドの例もいくつか報告されているが, 詳細なメカニズムについては不明である (図3). BHAはAHRを活性化しないとされているが (102), TBHQはAHRを活性化してCYP1A1を誘導することが報告されており, 二機能的な化合物と考えられている (103, 104). 本研究ではTBHQによるAHRの活性化も, TBQが関与すると想定した.

AHRの活性化によってCYP1A1は誘導され (105), 本活性化はさらにCYP1A2およびCYP1B1といった第一相異物代謝酵素を誘導し, 異物の代謝に貢献するだけでなく (106, 107), 他の制御タンパク質との相互作用の結果, 成長因子シグナルや細胞増殖, 分化, 細胞周期の停止, アポトーシスなどの制御に関与する (108-110).

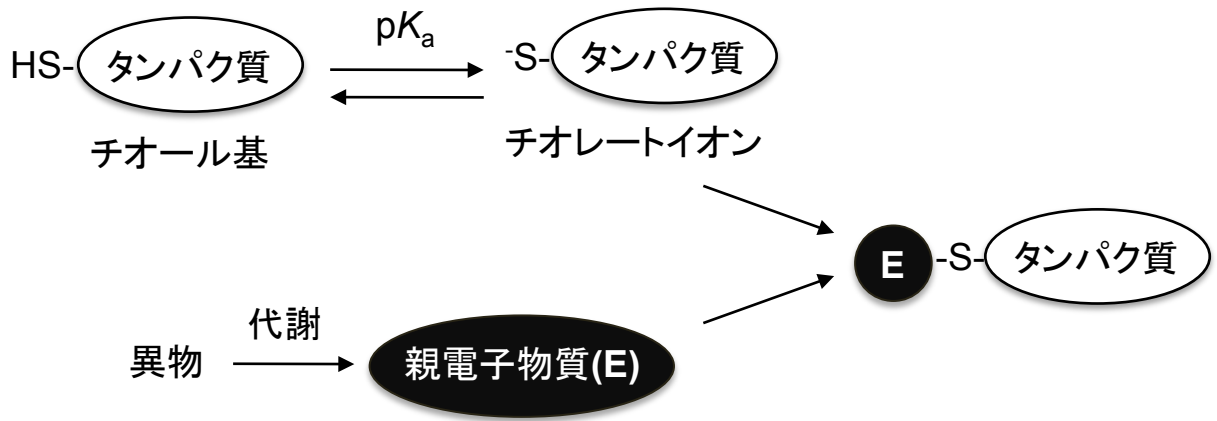
0.5. 本研究の目的と特色

化学物質の性質のひとつである“親電子性”に注目し, 親電子修飾によるタンパク質の翻訳後修飾の意義を解明しようとする点が特色である. 本研究では化学物質によるシグナル伝達に対する優れた細胞内制御システムの一つとして, 環境化学物質に反応する転写因子における親電子修飾の意義の解明を目的とした. 芳香環を持つ親電子物質による二機能的な働きを想定し, 第1章ではKeap1/Nrf2システムの活性化, 第2章ではAHRの活性化に着目した.

0.6. 序論図表

図 1-5, 表 1 および 2

A



B

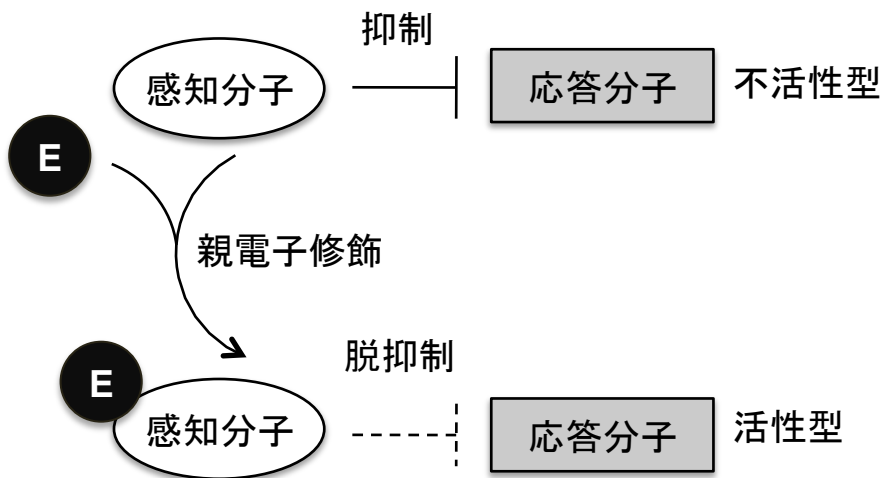


図1. 親電子物質によるタンパク質へのpKa依存的な修飾

A. タンパク質のチオール基はpKa依存的に解離してチオレートイオンとなる. 生体内の異物は代謝されて (もしくはそのもの), 親電子物質になり, チオレートイオンと結合する. B. Keap1のように反応性システイン残基を持つタンパク質は親電子物質の感知分子として機能する. 感知分子が親電子修飾を受けると感知分子の不活性化に伴い, 応答分子 (Keap1に対してはNrf2) が活性型になる.

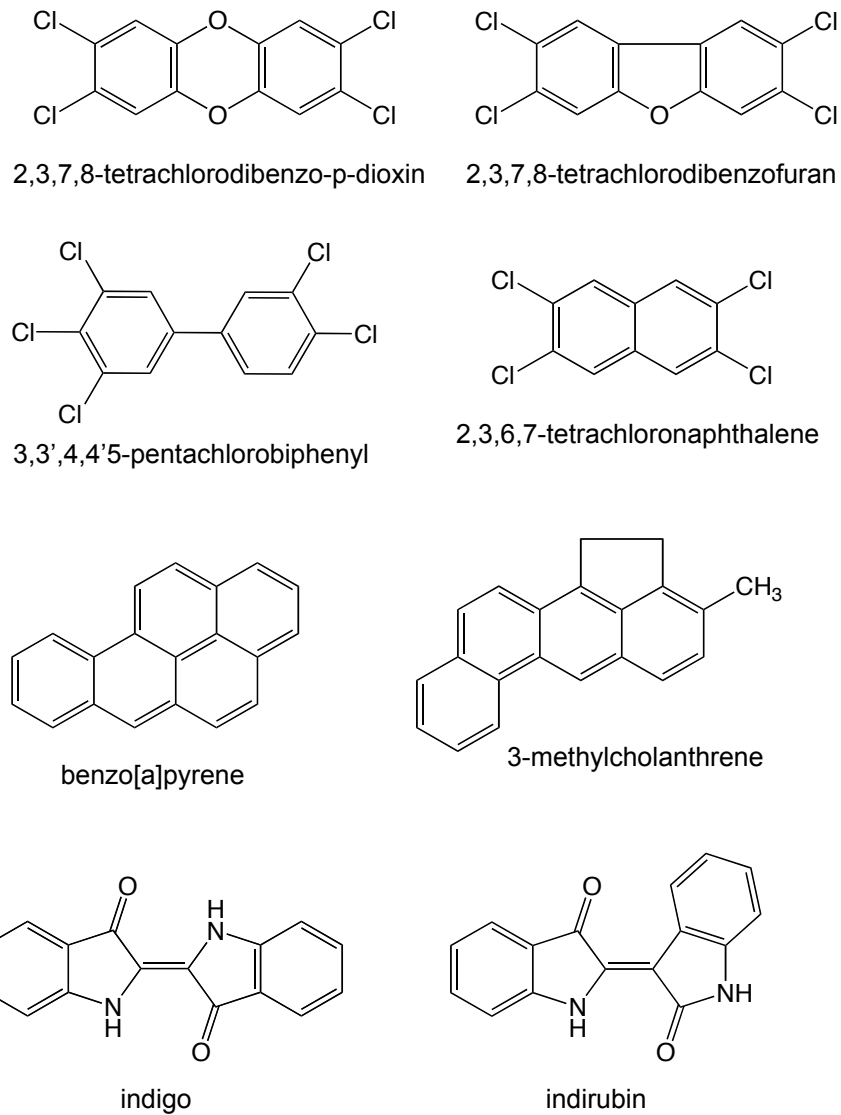


図2. AHRに対する典型的なリガンド

多環芳香族炭化水素類やダイオキシン類はAHRに対する典型的なリガンドとして知られる。

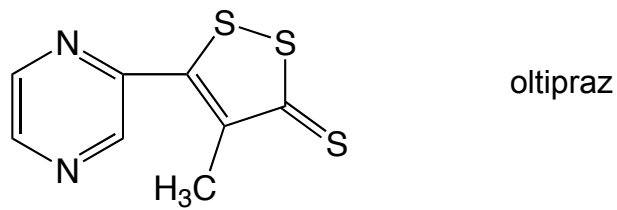
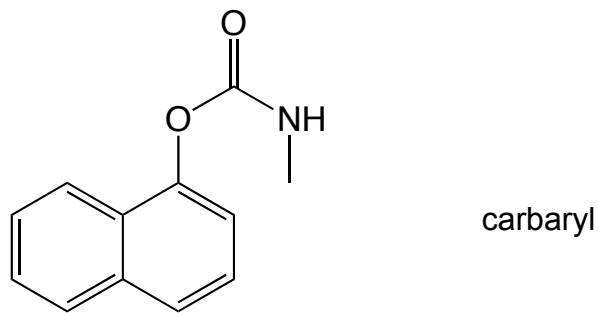
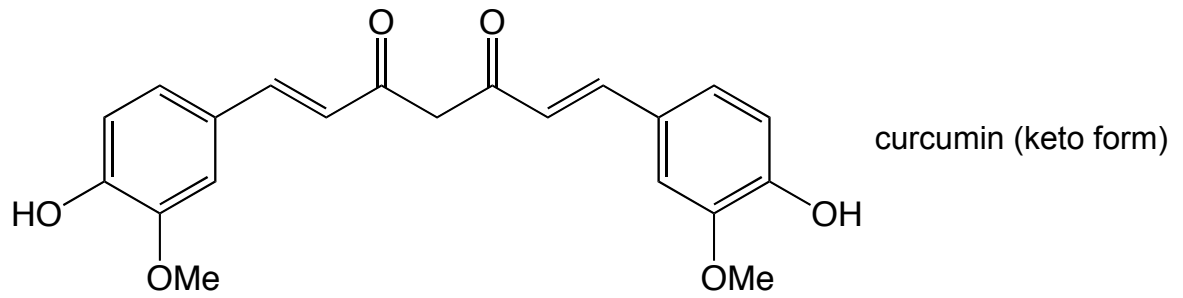
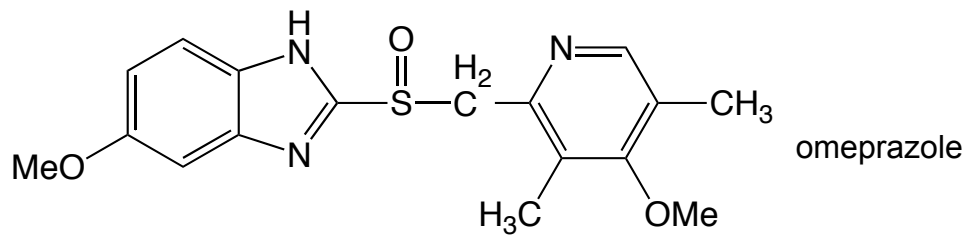


図3. 典型的な特徴を持たないAHRのリガンド

多環芳香族炭化水素類やダイオキシン類ではないがAHRのリガンドになるとされる。

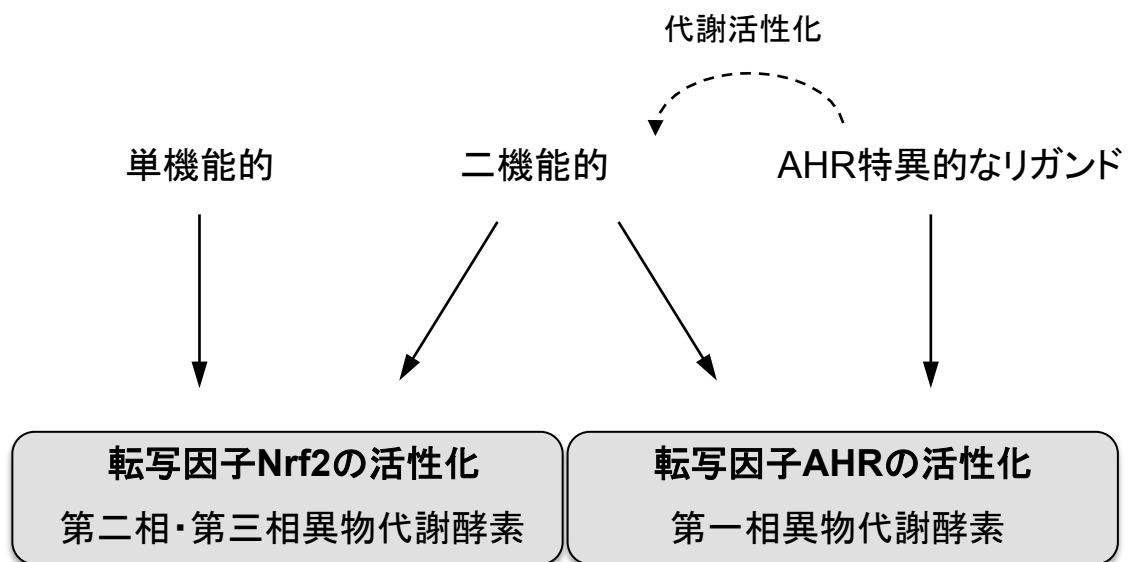


図4. 異物代謝酵素群誘導に係わる化合物の分類

Nrf2のみを活性化する化合物は単機能的な化合物と分類され、ケモプリベンティブ作用を持つとされている。Nrf2およびAHRを活性化する二機能的な化合物はβ-ナフトフラボン、代謝されたPAHs、等が含まれる。

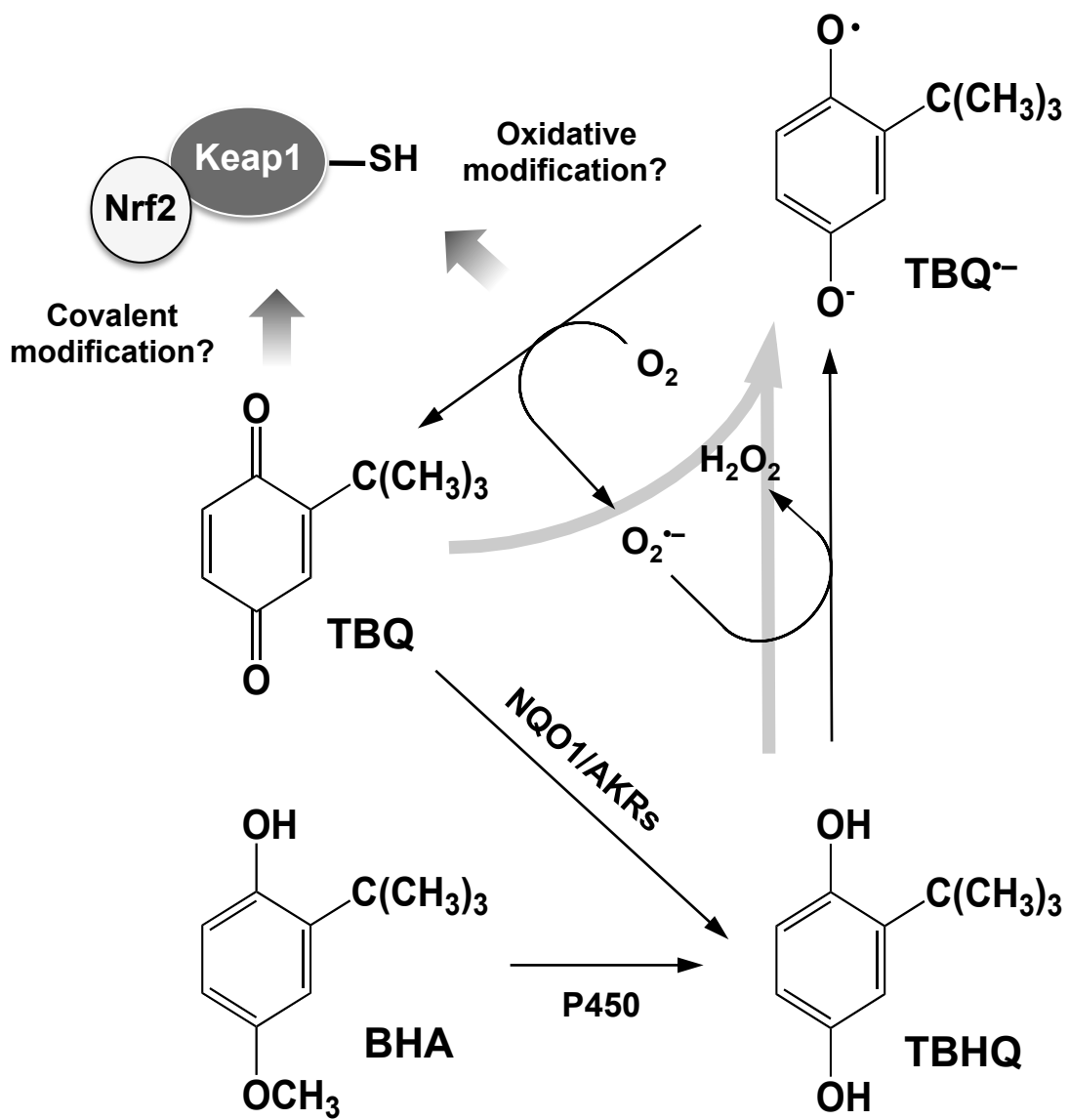


図5. BHAの代謝およびレドックスサイクル

表1. 化合物の代謝活性化における親電子物質の生成

化合物	親電子代謝物
内因性 エストロゲン	エストロゲンキノン
ドパミン	ドパミンキノン
PGD2	15-deoxy-PGJ2
cGMP	8-nitro-cGMP
モルヒネ	モルヒノン
脂肪酸	nitro-脂肪酸
外因性 ナフタレン	1,2-ナフトキノン, 1,4-ナフトキノン
ブチルヒドロキシアニソール	2- <i>tert</i> -ブチル-1,4-ベンゾキノン
アセトアミノフェン	N-アセチル-1,4-ベンゾキノンイミン
ベンゾピレン	ベンゾ[a]ピレン-7,8-ジオール-9,10-エポキシド

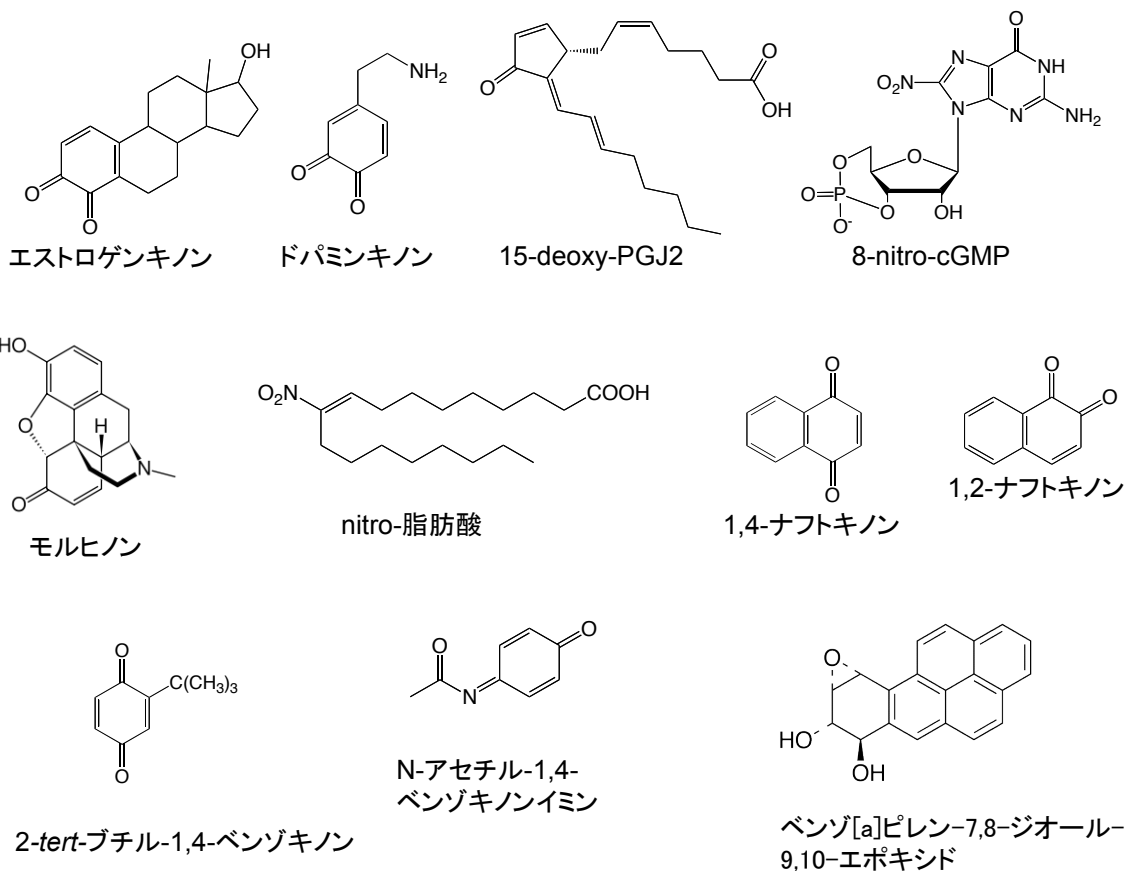


表2. 転写因子Nrf2によって発現が制御される遺伝子群

分類	タンパク質	文献
抗酸化タンパク質	Glutamyl cysteine ligase catalytic subunits	Enomoto et al., 2001
	Glutamyl cysteine ligase modifier subunits	Warabi et al., 2007
	Hemoxygenase-1	Ishii et al., 2000
	Peroxiredoxin 1	Ishii et al., 2000
第一相薬物代謝酵素	Aldo-keto reductases	Rangasamy et al., 2004
	NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1	Itoh et al., 1997
第二相薬物代謝酵素	Gluthathione-S-transferases	Itoh et al., 1997
	UDP-glucuronosyl transferase 1A6	Enomoto et al., 2001
第三相薬物代謝酵素	Multi drug resistance associated proteins 1-4	Hayashi et al., 2003; Okada et al., 2008

実験方法

1. 試薬

主な試薬は、下記の会社より購入した。特に記載のない試薬については特級試薬を用いた。実験に使用する水は、特に記載のない限り超純水装置ナノピュアダイヤモンド D12441 (Barnstead International 社, Dubuque, IA, USA) から得た比抵抗 18.2 M Ω -cm 以上の超純水を用いた。

コニカミノルタヘルスケア社 (東京)

- ・メディカルフィルム

東京化学工業社 (東京)

- ・2-*tert*-ブチル-1,4-ベンゾキノン (TBQ)
- ・1,2-ナフトキノン (1,2-NQ)

同仁化学研究所社 (熊本)

- ・臭化 3-(4,5-ジメチル-2-チアゾリル)-2,5-ジフェニル-2H-テトラゾリウム (MTT)

ナカライテスク社 (京都)

- ・アジ化ナトリウム (NaN₃)
- ・アセトニトリル [高速液体クロマトグラフ用]
- ・ウシ血清アルブミン (BSA)
- ・エチレンジアミン四酢酸四ナトリウム四水和物 (EDTA)
- ・*N*-アセチルシステイン (NAC)
- ・乾燥酵母エキス
- ・ギ酸 [高速液体クロマトグラフ用]
- ・クマシーブリリアントブルー-G-250 (CBB)
- ・グリシン [分子生物学研究用]
- ・グリセロール
- ・ジチオスレイトール (DTT) [分子生物学用]
- ・トリプトン
- ・ブロモフェノールブルー (BPB)
- ・メタノール [高速液体クロマトグラフ用]
- ・ヨードアセトアミド [分子生物学用]

富士フィルム社 (東京)

- ・インドール現像液
- ・レンフィックス定着液

和光純薬工業社 (大阪)

- ・亜鉛粉末
- ・アクリルアミド [電気泳動用]
- ・2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-1,3-プロパンジオール (Tris)
- ・イミダゾール
- ・エタノール
- ・塩化水素 (HCl)
- ・塩化ナトリウム (NaCl)
- ・過硫酸アンモニウム (APS)
- ・コラゲナーゼ タイプ 1
- ・酢酸
- ・水酸化ナトリウム
- ・スキムミルク
- ・スクロース
- ・トリフルオロ酢酸 (TFA)
- ・ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)
- ・トリエチルアミン
- ・L-ブチオニル-(S,R)-スルフォキシイミン (BSO)
- ・2-プロパノール
- ・ペニシリン-ストレプトマイシン
- ・ポリオキシエチレン (10) オクチルフェニルエーテル (Triton X-100)
- ・無水酢酸
- ・硫酸アンモニウム
- ・硫酸マグネシウム
- ・*N,N'*-メチレンビスアクリルアミド, *N,N,N',N'*-テトラメチレンジアミン (TEMED)
- ・2-メルカプトエタノール (生化学用)
- ・Tween 20

BIO-RAD 社

- ・プレステインタンパク質分子量マーカー

Calbiochem 社

- ・ HRP 標識 Goat 二次抗体

Cell Signaling Technology 社 (Danvers, MA, USA)

- ・ 西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) 標識抗ウサギ IgG 二次抗体
- ・ HRP 標識抗マウス IgG 二次抗体

Dako 社 (Glostrup, Denmark)

- ・ アルカリホスファターゼ標識抗ウサギ IgG 抗体

GIBCO 社

- ・ ウシ胎児血清 (FBS)
- ・ トリパンブルー
- ・ グルタマックス™

Santa Cruz Biotechnology 社 (Santa Cruz, CA, USA)

- ・ 抗 GAPDH 抗体
- ・ 抗 GCLM 抗体
- ・ 抗 GCLC 抗体
- ・ 抗 Keap1 抗体
- ・ 抗 Nrf2 抗体
- ・ 2-Diphenylacetyl-1,3-inandione-1-hydrazone (DAIH)

Sigma 社 (San Diego, CA, USA)

- ・ 6-アミノカプロン酸
- ・ 抗 Actin 抗体
- ・ ジメチルスルフォキシド (DMSO)
- ・ 西洋ワサビペルオキシダーゼ標識アビジン (HRP-アビジン)
- ・ プロテアーゼインヒビターカクテル
- ・ 0.25%トリプシン EDTA 溶液
- ・ LB agar, Miller
- ・ DMEM
- ・ MEM

STRESSGEN 社

- ・ 抗 HO-1 抗体

2. 細胞培養

細胞培養には CO₂ インキュベーター HERA cell (日本ケンドロ社) を用い、37°C・5% CO₂/95% Air の条件下で培養した。培地は DMEM 培地に非働化したウシ胎児血清 (FBS) を 10%、2 mM L-アラニル-L-グルタミン、100 U/mL ペニシリン、100 µg/mL ストレプトマイシンとなるように加えたものを基本培地として使用した。FBS の非働化は、56°C で 30 分間熱処理後に 1 時間の氷上静置を行った。基本培地から FBS を除いたものを実験培地とし、さらに、FBS とペニシリン、ストレプトマイシンを除いたものをトランスフェクション培地として用いた。ヒト肝芽腫由来細胞 (HepG2 細胞) は MEM 培地を DMEM と同様に基本培地および実験培地を調整した。

マウスマクロファージ様単核細胞 (RAW264.7 細胞)、HepG2 細胞およびヒト II 型肺胞上皮細胞 (A549 細胞) は理研セルバンクより購入した。マウス肝癌由来細胞 (Hepa1c1c7 Wild-type 細胞, Hepa1 細胞) および Hepa1c1c7 C35 細胞 (C35 細胞) は Puga 教授から頂いて使用した。継代培養及び細胞サンプルの準備は、細胞が 80-90% コンフルエントの状態になり次第行った。培地を除去し、D-PBS で洗浄後、0.25% トリプシン-EDTA 溶液を用いて細胞を遊離させて回収後に遠心し、細胞を基本培地で懸濁した。細胞懸濁液はトリパンブルーで染色して生細胞数をカウントし、10 cm ディッシュには継代培養用として、ウエスタンブロット用には 35 mm ディッシュ、細胞毒性試験用には 96 well プレートに適正細胞数を用意した。適正細胞数及び培地量は下表に示す。用意した細胞は 24 時間培養後、基本培地から実験培地に交換し、さらに 12 時間培養後実験を行った。

HepG2 細胞	35 mm	12 well	96 well	10 cm
HepG2 細胞 (cells/well)	8×10^5	3.2×10^5	5×10^4	3×10^6
培地量 (mL)	1	1	0.2	10
A549 細胞	35 mm	12 well	96 well	10 cm
A549 細胞 (cells/well)	8×10^5	3.2×10^5	5×10^4	3×10^6
培地量 (mL)	1	1	0.2	10
RAW264.7 細胞	35 mm	12 well	96 well	10 cm
RAW264.7 細胞 (cells/well)	1×10^6	2×10^5	5×10^4	3×10^6
培地量 (mL)	1	1	0.2	10
Hepa1 細胞	35 mm	12 well	96 well	10 cm
Hepa1 細胞 (cells/well)	8×10^5	3.2×10^5	5×10^4	3×10^6
培地量 (mL)	1	1	0.2	10
C35 細胞	35 mm	12 well	96 well	10 cm
C35 細胞 (cells/well)	8×10^5	3.2×10^5	5×10^4	3×10^6
培地量 (mL)	1	1	0.2	10

3. 細胞生存率の測定

細胞生存率は Denizot らと Mosmann の方法に従い MTT 法により求めた (111, 112). MTT は D-PBS で 5 mg/mL の濃度で溶解し, 0.22 μ M Millexfilter (Millipore 社) で濾過滅菌したものを使用した. 96 well プレートで培養した培養培地に対して 1/10 量の MTT を入れ, その後 30 分間培養した. 培地を除いた後, DMSO (100 μ L) を加えてマイクロプレートリーダーを用いて OD₅₄₀ を測定した.

4. タンパク質定量

4.1. Bradford 法

Bradford の方法に従った (113). サンプルは 0.01N 水酸化ナトリウムを用いて調整し, 各試料 2 mL と Protein Assay Kit (0.4 mL) を混和し, SHIMADZU UV-1600 (島津製作所) を用いて OD₅₉₅ を測定した. 標準タンパク質として BSA を用いた検量線 (0-10 μ g/mL) から, 各サンプルのタンパク質濃度を算出した.

4.2. BCA 法

サンプルは Smith (114) らの方法に従い BCA 法にてタンパク質定量を行った. BCA 法は BCA Protein Assay Reagent Kit (Pierce 社) を用いた. BCA 試薬 A と試薬 B を 50:1 で混合した混合液 100 μ L ずつを, 96 well プレート上でサンプル 5 μ L と混和した. 37°C で 30 分間反応させた後, OD₅₄₀ をプレートリーダーにより測定した. 標準タンパク質として BSA を用いた検量線から, 各サンプルのタンパク質濃度を算出した.

5. タンパク質の分離および検出

5.1. 核分画の抽出

60 cm ディッシュに細胞を用意して各種化合物に曝露した後, ディッシュを PBS で二回洗浄を行い, PBS で細胞を回収した. 13,000 rpm, 5 分間, 4°C で遠心分離を行い, 沈殿に 75 μ L の CERI を加えて懸濁し, vortex で 15 秒攪拌後, 10 分間氷上に静置した. 懸濁液に CERII を 4.125 μ L 加えて vortex で 5 秒間攪拌して 1 分間氷上に静置し, さらに vortex で 5 秒間攪拌した後に 13,000 rpm, 5 分間, 4°C で遠心分離を行い, 上清を細胞質分画とした. 沈殿を 70 μ L の CERI で洗浄し, 得られた沈殿に CER を 37.5 μ L 加えて vortex で 15 秒攪拌後, 10 分間氷上に静置した. vortex で攪拌して氷上に静置する一連の作業を 5 回繰り返した後, 13,000 rpm, 10 分間, 4°C で遠心分離を行い, 上清を核分画として回収した.

5.2. BPM 標識アッセイ

5.2.1 細胞を用いた BPM 標識アッセイ

RIPA バッファーで回収した細胞溶解液 (100 μ L) に 5 mM の Biotin-PEAC₅-maleimide (BPM) を 1 μ L 加えて, 37°C で 30 分間反応させた. 反応液に

25 μ L のアビジン-アガロースを加えて、4°C で一晩、沈降反応を行った。13,000 rpm, 1 分間、4°C 遠心分離で上清を取り除き、RIPA バッファーを 1 mL 加えて 2 回洗浄した。沈降したアガロースに 3×サンプルバッファー (10%グリセロール, 10% 2-ME, BPB) を 20 μ L 加えて、95°C, 5 分の加熱を行ったのち、全量を SDS-PAGE に供した。ウエスタンブロットの一次抗体には標的とするタンパク質に対する抗体を用いた。

5.2.2 精製タンパク質を用いた BPM 標識アッセイ

終濃度 5 μ M のタンパク質溶液 (10 μ L) に 1 mM の BPM を 1 μ L 加え、37°C で 30 分間反応させた。3×サンプルバッファーを 10 μ L と DDW を 10 μ L 加えて、95°C, 5 分の加熱を行ったのち、10 μ L を SDS-PAGE に供した。ウエスタンブロットを行い、アビジン-HRP にて検出した。

5.3. 免疫沈降法

60 cm ディッシュに細胞を用意して各種化合物に曝露した後、ディッシュを PBS で二回洗浄を行い、PBS で細胞を回収して、13,000 rpm, 5 分間、4°C で遠心分離を行い、沈殿を RIPA buffer に溶解した。Protein A Sepharose CL-4B を Pre-Beads, Ab-Beads 用として、各 1 サンプル当り 2 mg の Beads に TBS-0.1% BSA (1mL) を加え、一時間、4°C で混和しながら膨潤した。Beads を 13,000 rpm, 2 分間、4°C で遠心分離を行い、上清を捨て、Ab-Beads は 1 mL の TTBS で洗浄し、目的の抗体を加えて 2 時間、4°C で混和した。13,000 rpm, 2 分間、4°C で遠心分離を行い、上清を捨てて 1 mL の RIPA buffer を加え、もう一度遠心分離を行った。上清を捨てて、サンプル当り 10 μ L の RIPA buffer を加えた。Pre-Beads は、サンプル当り 10 μ L の RIPA buffer を加えた。400 μ g のタンパク質を含む細胞溶解液とプロテアーゼ阻害剤 (4 μ L) を加えて、RIPA buffer で合計 400 μ L に調整したサンプルに、20 μ L の Pre-Beads を加え、2 時間、4°C で混和した。その後、13,000 rpm, 5 分間、4°C で遠心分離を行い、上清を他のチューブに移し、そこに Ab-Beads を 20 μ L ずつ加えて 16 時間、4°C で混和した。反応後、13,000 rpm, 2 分間、4°C で遠心分離を行い、上清を捨てて 1 mL の RIPA buffer を加えて洗浄し、45 μ L の 3×サンプルバッファーにより 95°C 5 分間熱処理したものを泳動サンプルとした。

5.4. SDS 電気泳動法 (SDS-PAGE) 及びウエスタンブロット法

SDS-PAGE は Leammli らの方法に従い (115), ウエスタンブロット法は Towbin らの方法に従い行った (116)。用意した細胞は 4°C で冷却した PBS で 2 回洗浄後、Lysis バッファー [20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1% Triton X-100, 2.5 mM ピロリン酸ナトリウム, 1 mM β -グリセロリン酸, 1 mM バナジン酸ナトリウム (Na_3VO_4)] で回収して超音波破碎機 (OUTPUT 10, DUTY 10 の条

件で5回)を用いて細胞を破碎し、遠心分離後の上清をウエスタンブロット用サンプルとした。サンプルはタンパク濃度を定量した後、最終濃度が1 mg protein/mLとなるようにDDWで調整し、3×サンプルバッファーにより可溶化して、95°C 5分間熱処理したものを泳動サンプルとした。電気泳動は泳動バッファー (2.5 mM Tris, 19.2 mM グリシン, 0.01% SDS) を用い、マーカーには Dr. Western マーカー (オリエンタル酵母工業社) を用いた。アクリルアミドゲルの分離ゲル濃度は7.5%, 10%もしくは12%, 濃縮ゲルは4%とした。電源としてクロスパワー1000 (ATTO 社) を使用し、濃縮ゲル泳動中は10 mA, 分離ゲル泳動中には25 mA の電流で泳動を行った。SDS-PAGE 法にて電気泳動したゲル中のタンパク質をホライズブロット (ATTO 社) を用いて、事前に20秒間メタノール処理しDDW中に浸しておいたポリビニリデンフルオライド (PVDF) 膜に転写した。転写時のブロッティング液は1液 (0.3 M Tris, 10%メタノール), 2液 (25 mM Tris), 3液 (25 mM Tris, 10%メタノール, 40 mM 6-アミノカプロン酸) を用いた。転写条件は、クロスパワー1000を用いて2 mA/cm²で1時間とした。転写されたPVDF膜はブロッキング液 [5%スキムミルク-TTBS (80 mM Na₂HPO₄, 25 mM Na₂HPO₄ · 2H₂O, 0.1 M NaCl, 1% Tween20)] によりブロッキングを1時間震盪しながら行った。ブロッキング液を除いた後、TTBSにて10分間の洗浄を3回繰り返した。条件に合わせ希釈した一次抗体を反応させ、反応後にTTBSにて10分間の洗浄を3回繰り返した。その後、HRP 標識二次抗体を1時間反応させた。TTBSによる10分間の洗浄を3回繰り返す。ウエスタンブロッティング検出試薬 Chemi-Lumi One (ナカライテスク社) を用いて検出を行った。

5.5. 蛍光免疫染色

6 well プレートの各ウェルにカバーガラスを置き、0.1%ゼラチン溶液を1 mL 加えて静置し、15分後に液を除去した。ゼラチンコートをしたウェルに4×10⁵細胞を用意して各種化合物に曝露を行った後、氷冷したPBSで洗浄した。ウェルに4%パラホルムアルデヒドを1 mL 加えて4°Cで20分間固定した。氷冷したPBSで5分間3回の洗浄を行った後、氷冷した0.1% Triton-X-PBS (1 mL) で透過処理を20分間行い、氷冷したPBSで5分間3回の洗浄を行った。1% BSA-PBS (1 mL) を1時間反応させ、その後、1% BSA-PBSで400倍希釈した一次抗体を4°Cで一晩反応させた。PBSで5分間3回の洗浄を行い、1% BSA-PBSで500倍希釈した二次抗体を室温で1時間反応させ、PBSで5分間3回洗浄し、カバーガラスをウェルから取り出した。マウント剤 (DAPIを含む) をスライドガラスの上に滴下し、カバーガラスを載せて標本とした。

6. 核酸の検出

6.1. mRNA の抽出

35 mm ディッシュに細胞を用意して、各化合物を6時間曝露した。mRNAの回収は

RNeasy Mini Kit (QUIAGEN 社) を用い、添付のプロトコルに従い行った。すなわち、曝露後のディッシュを PBS で二回洗浄を行い、Buffer RLT Lysis buffer を 350 μ L ずつ入れて回収したサンプルに、350 μ L の 70%エタノールを加えた。その各サンプル全量を RNeasy スピンカラムに移し、10,000 g, 1 分間、室温で遠心分離を行い、通過液を廃棄し、700 μ L の Buffer RW1 をカラムに添加した。10,000 g, 1 分間、室温で遠心分離を行い、通過液を廃棄した後、カラムに 500 μ L の Buffer RPE を添加して、10,000 g, 1 分間、室温で遠心分離を行った。エタノールを完全に除去するため、通過液を廃棄した後、再び 10,000 g, 室温で 2 分間の遠心分離を行った。20 μ L の滅菌済み DDW をカラムに添加し、10,000 g, 1 分間、室温で遠心分離することで mRNA を溶出した。RNA の濃度および純度は、NanoDrop ND-100 (NanoDrop Technologies) により決定した。

6.2. DNA マイクロアレイ

6.1.に従い回収した RNA のマイクロアレイ解析は Agilent Technologies Inc.に依頼した。全てのヒト遺伝子 (41000 個) に対して、二色法による解析を行った。

6.3. Realtime-PCR 法による mRNA の定量

RT-PCR 法による cDNA の合成には、SuperScriptII (Invitrogen)を用い、添付文書に従って行った。RT 反応の条件は 70°C (10 分), 42°C (60 分), 70°C (10 分)で行った。得られた 100 ng の cDNA を、2.5 μ M に希釈したプライマー (0.8 μ L, プライマー配列は下記の表に記載) および 10 μ L の SYBER green master mix と混和し DDW で 20 μ L に調整し Realtime-PCR を行った。PCR 条件は 50°C で 2 分, 95°C で 10 分の反応の後, 95°C で 15 秒, 60°C で 1 分を 1 サイクルとし、40 サイクル行った。Realtime-PCR および分析には Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System を用いた。mRNA 発現解析は Δ Ct 法を用い、得られた Ct 値を GAPDH の Ct 値により標準化して $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ で表した。

遺伝子		5'-3'
hCYP1A1 217bp	Fwd	CCTTCCGACACGCTGCTTCCTTC
	Rev	CACCTTCTCACTTAACACC
hGAPDH 100bp	Fwd	GGCCTGCTTTTAACTCTGGTAA
	Rev	ATGGGTGGAATCATATTGGAAC
hHMOX1 219bp	Fwd	CTCAAACCTCCAAAAGCC
	Rev	TCAAAAACCAACCCCAACCC
mCYP1A1 198bp	Fwd	GTGTCTGGTTACTTTGACAAGTGG
	Rev	AACATGGACATGCAAGGACA

mGAPDH	Fwd	TCAACAGCAACTCTTCCA
114bp	Rev	ACCCTGTTGCTGTAGCCGTATTCA
mHMOX1	Fwd	GACCAGAGTCCCTCACAGATG
119bp	Rev	TGTCTGGGATGAGCTAGTGCT

7. 遺伝子の導入

7.1. Small interfering RNA (siRNA) による Nrf2 発現抑制

siNrf2-1 (Sense, 5'-GCAAUAAUAUGAAACUUUAdTdT-3'. Antisense, 5'-UAAAGUUUCAUAUUAUUGCdTda-3'), siNrf2-2 (Sense, 5'-CGUGAGUCC UGGUCAUCAAdTdT-3'. Antisense, 5'-UUGAUGACCAGGACUCACGdGdG-3') 及び対照群 siRNA (Sense, 5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3'. Antisense, 5'-ACGUGACA CGUUCGGAGATT-3') は Genixtalk 社から購入した. siRNA はエンドトキシンプリーの TE 緩衝液で 20 μ M となるように調整し, -20°C で保存した. siRNA の細胞への導入は Hiperfect (QIAGEN 社) により, 付属のマニュアルに準じて行った. RAW264.7 細胞を 24 well プレートに 1×10^5 cell/dish, もしくは 3×10^4 cell/well で 96 well プレートに用意し, 同時に siRNA を導入した. トランスフェクション培地に Hiperfect と siRNA を適量加え, 5 分間室温静置して siRNA-Hiperfect 複合体を形成した. 各ディッシュ・プレートにおける siRNA 及び Hiperfect の量を下表に示す. これを細胞に添加し, 24 時間培養することで siRNA を細胞に導入した. その後, 実験培地に交換し 12 時間培養後に各実験に使用した.

	培地量	Tranfection-Medium	Hiperfect	siRNA
24 well プレート	300 μ L	100 μ L	6 μ L	750 ng
96 well プレート	150 μ L	48.75 μ L	1 μ L	62.5 ng

7.2. ベクターの導入

12 well プレートに細胞を播種して 24 時間後, 下表に示された容量で調整した試薬を加えて 12 時間培養し, 実験培地に交換した. さらに 12 時間後に各実験に用いた.

細胞	OPTI-MEM	導入試薬	DNA 量	Control DNA 量	反応時間
RAW264.7	50 μ L	Polyfect 5 μ L	ARE-Luc or XRE-Luc 0.75 μ g	pRL-TK 0.75 μ g	10 分
A549	60 μ L	HilyMAX 8 μ L	ARE-Luc or XRE-Luc 2 μ g	pRL-TK 0.2 μ g	15 分
HepG2	100 μ L	Lipfoectamine2000 6 μ L	ARE-Luc or XRE-Luc 1.6 μ g	pRL-TK 0.16 μ g	20 分

8. ルシフェラーゼ活性測定

7.2.に従ってルシフェラーゼ活性測定ベクターを導入した細胞を, PBS で 2 回洗浄して passive lysis buffer (100 μ L) で回収し, vortex で 15 秒攪拌し, 13,000 rpm, 2 分間,

4°C で遠心分離を行い、20 μ L の上清を分取した。50 μ L の Luciferase assay reagent を加えピッペッティングで混和し、ルミノメーターにてルシフェラーゼ活性を測定した。さらに、50 μ L の Stop & Glo reagent を加え vortex で攪拌して再測定した。

9. クロマチン免疫沈降反応

Hepal 細胞を 15 cm ディッシュに用意して、37%ホルムアルデヒドを終濃度が 1% になるように (27 μ L/mL) 添加し、10 分間室温で震盪した。2.5 M グリシン水溶液を終濃度が 0.125 M になるように (50 μ L/mL) 添加し、さらに 5 分間室温で震盪した。ディッシュを氷冷した PBS で二回洗浄し、細胞を回収した。5,000 rpm, 5 分間の遠心により得られた細胞を、プロテアーゼ阻害剤および 10 mM EDTA を含んだ PBS に懸濁し、細胞数を数え、 2×10^6 細胞を 1.5 mL チューブに分注した。5000 rpm, 5 分間の遠心により沈殿を回収し、1 mL の Lysis buffer (0.5 mM PIPES pH 8, 85 mM KCl, 0.5% NP40, 1 \times Protein inhibitor cocktail) で懸濁した。氷上で 10 分間静置した後、3,000 rpm で 5 分間遠心して、回収したペレットに 300 μ L の Nuclei lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA, 1% SDS, 1 \times Protein inhibitor cocktail) を加え、氷上で 10 分間静置した。超音波破砕機 (HIGH, 0.5 min ON/0.5min OFF の条件で 6 分間 5 回) を用いてクロマチンを破砕した、14,000 rpm で 10 分間の遠心分離により上清を回収した。

回収したサンプルを 1500 μ L の IP dilution buffer (0.01% SDS, 1.1% Triton-X 100, 1.2 mM EDTA, 16.7 mM Tris-HCl pH 8, 167 mM NaCl, 1 \times Protein inhibitor cocktail) で希釈し、blocked protein A/G agarose を 30 μ L 加えて、4°C で 1 時間混和した。4,000 rpm, 5 分間、4°C で遠心分離を行い、上清を他のチューブに移し、そこに抗体を 4 μ g ずつ加えて 16 時間、4°C で混和した。サンプルの一部は、抗体と反応させないインプットサンプルとした。

反応後、各サンプルに blocked protein A/G agarose を 30 μ L 加えて、4°C で 3 時間混和した。3,000 rpm, 5 分間、4°C で遠心分離を行い、上清を捨てて、ゲルを 0.45 μ m SPIN-X corning microfuge filter (Costar 8163) に移し、500 μ L の dialysis buffer (2 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl pH 8, 1 \times Protein inhibitor cocktail, 0.2% sarkosyl[モノクローナル抗体を用いた場合は不要]) を加えて 3,000 rpm, 3 分間の遠心分離により 3 回洗浄した。さらに、500 μ L の IP wash buffer (100 mM Tris-HCl pH 9 [モノクローナル抗体を用いた場合は pH 8], 500 mM LiCl, 1% NP40, 1% deoxycholic acid, 1 \times Protein inhibitor cocktail) で 10 分間インキュベートした後、3,000 rpm, 3 分間の遠心分離を行った。この操作を 3 回繰り返した。カラムを他のチューブに移し、60 μ L の IP elution buffer (1% SDS, 50 mM NaHCO₃) を加えて、ボルテックスミキサーで 15 分間攪拌し、3,000 rpm, 3 分間の遠心操作を行った。さらに、60 μ L の IP elution buffer を加えて、15 分間攪拌した後 10,000 rpm, 5 分間の遠心操作により溶出を行った。得られたタンパク質-DNA 複合体、および 5 倍希釈したインプットサンプル 120 μ L に 10 mg/mL RNaseA

(Sigma R5503) を 1 μ L (インプットサンプルには 2 μ L), 5 M NaCl を 4.8 μ L 加えて 65°C で一晩反応させた. 反応後, 0.5 M EDTA (2.4 μ L), 1 M Tris-HCl pH 6.5 (4.8 μ L), 20 mg/mL proteinase K (1.5 μ L) を加えて, 45°C で 2 時間反応させた.

スピンドアウンを 1 分間行い, 上清に 5 μ L の 3 M 酢酸ナトリウム溶液 pH 5 を加え, quick PCR purification kit (Qiagen 社, cat. 28106) のプロトコルに従い, DNA の精製を行った. 抽出は, 30 μ L の DDW をカラムに添加して 1 分間静置し, 14,000 rpm, 1 分間の遠心操作を行った後, さらに 50 μ L の DDW により溶出を行った. 得られたサンプル (3 μ L) を下記のプライマーを用いて Real-time PCR に供した.

標的部位		5'-3'
mCYP1A1 +0.6 kb, 89 bp	Fwd	TGGGATACCATCAGCTCCAT
	Rev	AACCTTTGGAAGGTGGAAGG
mCYP1A1 +0.3 kb, 106 bp	Fwd	CTGAGGCCAGAGGTATCAGC
	Rev	CTAAAGGTGCAGGGAAGACG
mCYP1A1 -0.1 kb, 164 bp	Fwd	TATCCGGTATGGCTTCTTGC
	Rev	CACCTTCAGGGTTAGGGTGA
mCYP1A1 -0.5 kb, 136 bp	Fwd	AATTTGTGGGGCACAGAGTC
	Rev	GAACAGCTGGGTGGTGA
mCYP1A1 -0.9 kb, 97 bp	Fwd	AGGCTCTTCTCACGCAACTC
	Rev	TAAGCCTGCTCCATCCTCTG
mCYP1A1 -1.3 kb, 100 bp	Fwd	CAGAGAGCACCTGCAAAACA
	Rev	CTGAGAGCAAAGGCCTGAAC
mCYP1A1 -1.5 kb, 136 bp	Fwd	CATCAATCACCAGCATCCAG
	Rev	TGCTCTGTGACCAAGACCAG
mCYP1A1 -2.2 kb, 176 bp	Fwd	TGGGCAGACCTGGTAGATTC
	Rev	ACCCCTATTGATCCCAGAG
mCYP1A1 -2.9 kb, 140 bp	Fwd	TCCAGAGATGCAGTGAGTGG
	Rev	AAAGGGAGGAAGAAGAGGACA

10. タンパク質の精製

10.1. 大腸菌用培地の調製

乾燥酵母エキス (5 g/L), トリプトン (10 g/L) および塩化ナトリウム (5 g/L) をイオン交換水に溶解し, オートクレーブ滅菌を行い, 使用前にアンピシリンを終濃度 20 μ g/mL となるように加えて Lysogeny Broth (LB 培地) とした.

LB 寒天培地は, 37 g/L の LB agar, Miller をイオン交換水に溶解し, オートクレーブ滅菌を行い, 約 50°C に冷めた後にアンピシリンを終濃度 20 μ g/mL となるように加え

て、シャーレに分注した。十分に固まったら、遮光して 4°C で保存した。

Super Optimal broth with Catabolite repression (SOC 培地) は、乾燥酵母エキス (5 g/L)、トリプトン (20 g/L) および塩化ナトリウム (0.5 g/L) をイオン交換水に溶解し、オートクレーブ滅菌を行い、十分に冷えた培地にフィルター滅菌済みの 1 M 塩化マグネシウム (10 mL)、1 M 硫酸マグネシウム (10 mL) および 2 M グルコース (1 mL) を添加し、使用するまで 4°C、遮光下で保存した。

10.2. マウス Keap1 タンパク質の精製

マウス Keap1 高発現大腸菌 BL21 株を LB 培地中で好氣的に 37°C で培養した。培養菌液の濁度を波長 600 nm で測定し、ABS = 0.6 に達したら、終濃度 1 mM のイソプロピル-β-チオガラクトピラノシド (IPTG) を添加し、27°C で 72 時間培養した。培養菌液から菌体を遠心分離 (5,000 g, 10 分, 4°C) により回収し、菌体沈殿物の体積と等量の破碎バッファー [50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.1 M 塩化ナトリウム, 5%グリセロール, 5 mM 2-メルカプトエタノール]を加えて菌体を超音波破碎して、105,000 g, 1 時間, 4°C で遠心分離を行った。得られた上清を、平衡化バッファー [50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.1 M 塩化ナトリウム, 5 mM 2-メルカプトエタノール] で平衡化した nickel-chelating resin カラム (60×10 mm i.d.) に付し、100 mM イミダゾール含平衡化バッファーで溶出し、波長 280 nm の吸光度および SDS-PAGE により Keap1 の単一画分を調べた。得られた Keap1 は、0.1 mM DTT で 30 分間還元し、エコノカラム 10DG により DTT を除去した後に Bradford 法にてタンパク質濃度を測定した。

11. TBQ 結合タンパク質の検出

11.1. タンパク質中チオール基の測定

Ellman らの方法 (117) に従って行った。300 μL の 200 mM Tris-HCl-20 mM EDTA (pH 8.2) と 100 μL の 100 mM Tris-HCl (pH 7.5) で調整したタンパク質サンプル (0.4 mg/mL)を混合した。20 μL の 10 mM DTNB (メタノールに溶解) を添加し、直ちに 150 μL の 5%SDS と 930 μL の DDW を加えて反応させた。DTNB を添加して 2 分後に、波長 412 nm の吸光度を分光光度計 UV-1800 により測定した。キュベット中のチオール基の算出にはモル吸光係数 $13.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ を用いた。

11.2. TBQ とタンパク質との反応

終濃度 5 μM Keap1 と TBQ を 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) 中で 25°C、30 分間反応させた。余剰の TBQ は限外濾過にて取り除いた。

12. TBQ-グルタチオン結合体 (TBQ-SG) の合成

12.1. TBQ-monoGSH 結合体

TBQ (200 mg) を 15 mL のメタノールに溶解し、50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) に

溶解した GSH (374.5 mg) を滴下し, 1 時間攪拌した.

12.2. TBQ-diGSH 結合体

TBQ (200 mg) を 15 mL の ACN に溶解し, 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) に溶解した GSH (1874.4 mg) を滴下し, 72 時間攪拌した.

12.3. TBQ-SG の精製

TBQ-GSH 結合体は Ultra Pack ODS-S-50B (300×26 mm i.d., 50 μm, Yamazen Science) を用いて, 25% アセトニトリル, 流速 5 mL/min で溶出した. 溶出したフラクションは 280 nm の波長を用いて, HPLC で確認し, エバポレーターで濃縮後に凍結乾燥を行った. さらに, NMR 解析および UPLC-MS^E により同定した.

13. 機器分析

13.1. 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) -紫外可視蛍光検出器 (UV-VIS) による化合物の分析

HPLC-UV-VIS system はシステムコントローラー (SCL-10A, 島津社), 送液ポンプ (LC-10AD, 島津社), 脱気装置 (UGD-12A, 島津社), 紫外可視検出器 (SPD-10AV, 島津社), オートサンプラー (SIL-10AF) から成り, LCsolution ver. 1.2 software (島津社) により一括制御した. ガードカラムは, YMC-Pack ODS-AM 用カードリッジカラム (23 ×4.0 mm i.d., 5 μm, YMC 社) を, カラムには YMC-Pack ODS-AM (250×4.6 mm i.d., 5 μm, YMC 社) を用いた. TBQ を分析する際の移動相は, アセトニトリル-1%酢酸 (3 : 2, v/v), TBQ-グルタチオン抱合体を分析する際はアセトニトリル-1%酢酸 (2 : 8, v/v) を用いた.

13.2. 超高速液体クロマトグラフィー (UPLC) -エレクトロスプレーイオン化質量分析計 (ESI-MS) による蛋白修飾部位の同定

方法 で作成した TBQ-Keap1 (2 μg) を SDS-PAGE で分離し, 得られたゲル上の Keap1 タンパク質のバンドを切り取り, 50 mM 重炭酸アンモニウム溶液 (ABC)-50% アセトニトリルで 10 分間洗浄し, CBB 色素が脱色されるまで洗浄を繰り返した. ゲル内のタンパク質を 50 mM ABC-10 mM TCEP (100 μL) で 56°C, 1 時間還元し, その溶液を 50 mM ABC-55 mM ヨードアセトアミドに置換して 25°C, 遮光下でアルキル化反応を 45 分間行った. 50 mM ABC-50%アセトニトリルで 10 分間, 2 回洗浄した後, 100%アセトニトリル (100 μL) でゲルを脱水し, ゲルを風乾した後, 20 ng の MS grade 修飾済みトリプシン (Promega 社) を含む 50 mM ABC (10 μL) をゲルに染み込ませて, 37°C で 16 時間静置してタンパク質の消化を行った. 消化処理したゲルは, 5 μL のアセトニトリル-トリフルオロ酢酸-DDW (50 : 0.1 : 49.9, by vol) 中でよく混和し,

ペプチド断片を抽出した。得られたペプチド断片は、nanoUPLC-elevated energy MS (MS^E) system で分析した。

NanoUPLC-MS^E system の移動相は、0.1%蟻酸 (A) と 0.1%蟻酸含アセトニトリル (B) を用い、流速は 0.3 μ L/min で行った。はじめの 1 分間は 1% B, 1-120 分を 40% B までの直線勾配, 120-121 分を 95% B までの直線勾配, 121-125 分は 95% B で行い, 125-129 分で 1% B に戻して 1 分間流した。カラム温度 35°C, MS 測定範囲 m/z 50-1990, ポジティブイオンモード, キャピラリー電圧 2.8 kV, コーン電圧 35 V, コリジョンエネルギー 6 eV (MS), 15-60 eV (MS^E), ソース温度 80°C の条件下で行った。得られたデータの解析は、MassLynx ver.4.1 software および ProteinLynx Global Server Browser ver.2.3 software (Waters 社) を使用した。

13.3. HPLC-電子捕獲検出器 (ECD) による GSH の分析

GSH 量の定量は、Vingnaud らの方法 (118) に従って行った。細胞を 1 mM EDTA により回収して、超音波破碎機 (出力 3, 負荷 20, 10 回) で破碎した後, 13,000 g, 4°C で 10 分間の遠心分離を行い, 遠心上清を回収した。得られた細胞溶解液に等量の 20 mM リン酸アンモニウム (pH 2.5)-1.8% (v/v) アセトニトリルを加え, Ultrafree-MC (5,000 NMLW, Millipore 社) を用いて, 13,000 g, 4°C で 15 分間の遠心操作により濾液を分取し, サンプルとした。サンプル (20 μ L) は直ちに HPLC-ECD system で分析した。移動相には, アセトニトリル-20 mM リン酸アンモニウム (pH 2.5) (0.9 : 49.1, v/v) を用い, 流速は 0.6 mL/min で行った。ECD の条件は, ガードセル (E: 800 mV), チャンネル 1 (E: 450 mV, R: 10 μ A, Filter: 10 sec), チャンネル 2 (E: 600 mV, R: 10 μ A, Filter: 10 sec) を用いた。得られた GSH 量は, 方法 4.2. に従って求めた細胞溶解液のタンパク質量で補正した。

14. 統計処理

データ解析は特に記載がない限り, 3 回の実験で得た結果を用いた。有意差検定は母平均の差の検定を用い, 等分散を示したものには t 検定を, そうでないものには Welch 検定を行った。また, 3 サンプル以上の比較には多重比較検定である Dunnett の方法を用いた。半致死量等の統計解析には, データ解析プログラム Prism Ver. 4.0 (GraphPad Software 社) を用いた。

第 1 章 *tert*-Butyl-1,4-benzoquinone (TBQ) による Keap1/Nrf2 システム活性化機序

1.1. 目的

食品や化粧品等の酸化防止剤として使用されている BHA や TBHQ は、転写因子 Nrf2 を活性化させることが報告されているが、その分子機構は解明されていない。本転写因子活性化の主因として、Nrf2 の抑制分子である Keap1 の修飾が挙げられる。BHA は生体内で代謝を受け、TBHQ に変換された後、自動酸化により、TBQ へと代謝されることが知られている一方で (31), TBQ を用いて Keap1 の修飾および Nrf2 の活性化を検討した研究はない。本研究では、TBQ は親電子性だけでなく、レドックスサイクルを介した ROS 産生能を有することから、TBQ による Keap1 の化学修飾もしくは ROS による酸化修飾が、BHA および TBHQ 曝露で見られる Nrf2 活性化に関与すると考え、TBQ による Nrf2 活性化の本態の解明を目的とした。

さらに、これまでのところ、親電子物質により親電子修飾 (*S*-アリアル化) された Keap1 の生体内運命に関する研究はほとんど報告されていない。Nrf2 の活性化は一過性であることから、Keap1 の親電子修飾解除もしくは Keap1 の合成促進が起きていると予想される。当研究室では、*S*-トランスアリアル化による親電子修飾の可逆性について検討していることから (0.2.5 参照)、本研究では、*S*-トランスアリアル反応に注目して Keap1 タンパク質の親電子修飾の解除機序についても検討した。

1.2. 結果

1.2.1. TBQ による Nrf2 の活性化および下流タンパク質の誘導

RAW264.7 細胞を TBQ に曝露したところ、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 (図 6A)。また Nrf2 の活性化に伴い、下流タンパク質群 (GCLC, GCLM, NQO1, GSTA1, および HO-1) が誘導された (図 6B)。

1.2.2. TBQ による ARE 転写活性化

TBQ は Nrf2 を活性化するか否かを検討するために、ARE の転写活性化をルシフェラーゼ活性測定で検討した。RAW264.7 細胞に TBQ を 6 時間曝露した結果、TBQ の濃度依存的にルシフェラーゼ活性が上昇した (図 7)。

1.2.3. Nrf2 活性化における活性酸素種の関与

細胞内で産生された ROS を H₂DCFDA により検出したところ、陽性対照として使用した 500 μM H₂O₂ および 10 μM TBQ で H₂DCFDA による蛍光が確認された (図 8)。TBQ により産生された ROS はポリエチレングリコール結合カタラーゼ (PEG-CAT) 処理で消去された (図 8)。同条件下で、Nrf2 の活性化を検討したところ、PEG-CAT

処理による有意な差は認められなかった (図 9).

1.2.4. TBQ による Keap1 修飾

TBQ による Nrf2 の活性化が Keap1 の修飾によるものか否かを検討するために、BPM アッセイを用いて、細胞内 Keap1 タンパク質への TBQ 修飾の有無を検討した。その結果、TBQ の濃度依存的に Keap1 タンパク質の修飾が見られた (図 10)。また、マウス精製 Keap1 を用いて BPM 標識アッセイを行った。TBQ の濃度依存的に Keap1 の修飾が検出された。Keap1 の SH 基の定量を行ったところ、TBQ の濃度依存的に SH 基の減少が見られた (図 11)。さらに、UPLC-MS^E 分析を行った結果、MS 解析では Cys23, Cys151, Cys226, Cys257, Cys273, Cys288, Cys368 および Cys489 への結合が示唆され (表 3), MS^E 解析で Cys23, Cys151, Cys226 および Cys368 への TBQ の結合が検出された (図 12)。

1.2.5. TBQ による細胞毒性に対する Nrf2 の関与

RAW264.7 細胞に siRNA (siControl, siNrf2-1, siNrf2-2) を導入して 30 時間後、親電子性物質である 1,2-NQ に 1 時間曝露したところ、siNrf2 群で Nrf2 蓄積を抑制した (図 13A)。同条件下で TBQ を曝露した結果、対照群と比較して siNrf2 群では TBQ による細胞毒性が有意に増強した (図 13B)。

1.2.6. TBQ による Nrf2 の活性化における GSH の関与

HepG2 細胞に GSH 合成阻害剤である 200 μ M BSO もしくは GSH 誘導剤である 5 mM NAC で 24 時間の前処理を行ったところ、対照群と比較して BSO 処理群 GSH 量が約 14% に減少し、NAC 処理群では約 108% であった (図 14)。この条件下で TBQ を 1 時間曝露した結果、BSO 前処理下では対照群と比較して TBQ で生じる Nrf2 の活性化の持続が認められた (図 15)。NAC 前処理群において、TBQ による Nrf2 活性化は抑制された (図 15)。Nrf2 の下流タンパク質である HO-1 においても同様な結果を得た (図 16)。

1.2.7. GSH を介した TBQ 修飾の S-トランスアリール化

TBQ-Keap1 結合体と GSH を 60 分間反応させて、BPM 標識アッセイにより Keap1 の修飾を検討したところ、GSH の濃度および時間依存的に Keap1 への修飾が減少した結果を得た (図 17)。同条件下における Keap1 への TBQ 修飾を UPLC-MS で解析した結果、TBQ-Keap1 のシステイン残基の 9 残基に修飾が検出された (表 4A)。GSH を反応させた後は 4 残基しか認められず、Nrf2 の活性化に重要とされる Cys151 および Cys273 への修飾は見られなかった (表 4B)。また、修飾されたペプチドの割合も減少した (表 4)。次に、GSH を介した S-トランスアリール化の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-SG) の合成を試みた。得られた反応産物をカラムで分離して、それぞれを UPLC-MS^E で解析したところ、UPLC 上で保持時間 5.1 分、5.6 分および 5.8 分のピークが検出された。それぞれ $m/z = 775.2$ (TBHQ-di-SG と分子量が一致)、 $m/z = 468.1$ (TBQ-mono-SG と分子量が一致) および $m/z = 468.1$ (TBHQ-mono-SG と分子量が一致) を示した (図 18)。TBQ-mono-SG および TBHQ-mono-SG に関して、グルタチオンの結合位置を確定するために、NMR 解析を行った。その結果、TBQ-mono-SG および TBHQ-mono-SG は、共に 6 位に付加していた (図 19)。

この合成した TBQ-SG を基に、TBQ-Keap1 結合体と GSH の反応産物の UPLC-MS^E 解析を行った。その結果、本反応産物は、TBHQ-di-SG (分離時間 5.1 分、 m/z 775.2)、TBQ-di-SG (分離時間 5.3 分、 m/z 773.2) および TBHQ-mono-SG (分離時間 5.8 分、 m/z 470.2)であることが確認された (図 20)。

1.3. 考察

本研究では、BHA や TBHQ の代謝により生じる TBQ が、Keap1 への共有結合を介して Nrf2 を活性化すること、および TBQ による Keap1 タンパク質の修飾は GSH によって解除されることを明らかにした。

キノン化合物は、マイケル付加反応によるタンパク質の求核置換基への共有結合能、および、レドックスサイクルを介した ROS 産生能を有する (0.3.2 および 0.3.3 参照) (35)。Kahl ら (119) によると、ミクロゾームに局在する NADPH 依存的な酵素の働きにより BHA から産生される 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。0.3.2 に記載したレドックスサイクルは、9,10-フェナンスラキノンをを用いた先行研究によって証明されている (36)。そこで、TBQ による ROS の産生を調べたところ、TBQ 曝露によって細胞内 ROS 産生が検出された (図 8)。このことは、TBQ が TBHQ に二電子還元され、生じた TBHQ と TBQ との不均化反応によりセミキノンラジカル (TBQ \cdot) を生じ、TBQ \cdot が分子酸素と反応してスーパーオキシドアニオンを生成することを示唆している (図 5)。当研究室の先行研究において、カテコールエストロゲンの親電子代謝物および 1,2-NQ は、レドックスサイクルを介して ROS を産生するにも係わらず、産生された細胞内 ROS は Nrf2 の活性化に影響しなかった (80, 81)。同様に、TBQ 曝露で検出された細胞内 ROS が PEG-CAT 前処理で除去されるのに対して、TBQ による Nrf2 の活性化に本処理は効果を示さなかった (図 9)。TBHQ による Nrf2 の活性化には酸化ストレスが主要な原因とされてきたが (120)、上記の結果から、TBQ によるレドックスサイクルで産生される ROS は、RAW264.7 細胞での Nrf2 活性化の主因ではないことが示唆された。また、TBQ 曝露で NOS は誘導されなかったため、NOS に起因する NO と s おの酸化物の影響も否定された (データ未掲載)。以上より、TBQ による Nrf2 の活性化

には Keap1 の修飾が重要な役割を演じていることが示唆された。この仮説と一致して、TBQ はマウス精製 Keap1 タンパク質および細胞内 Keap1 の SH 基を修飾した (図 10 および図 11)。さらに UPLC-MS^E 解析により、TBQ はマウス精製 Keap1 タンパク質の Cys23, Cys151, Cys226 および Cys368 へ結合したことが明らかとなった (図 12)。マウスの Keap1 タンパク質 (分子量 = 69.6kDa) は NTR, BTB 領域, IVR 領域, および 6 つの Kelch 反復配列と C 末端領域 (CTR) を含む C 末端 DC 領域から構成される。Cys23 は Keap1 の E3 リガーゼ活性に重要な役割を持つとされる NTR 領域に含まれる (121)。高い求核性を持ち、様々な親電子物質に修飾される Cys151 は、Cul3 と相互作用を示す BTB 領域に位置する (122)。IVR 領域は、Cys226 を含む 8 つのシステイン残基を有し、Cys368 は Nrf2 と直接的に相互作用をする DC 領域に含まれ、これらのシステイン残基はスルフォラファン等によって修飾される (123)。いくつもの論文で、様々な親電子物質による Keap1 の修飾部位が同定されている (122)。例えば、1-biotinamido-4-(4'-[maleimidiethylcyclohexane] -carboxamido)butane (BMCC) は Cys23, Cys151, Cys226 および Cys368 を修飾し、Nrf2 を活性化する (122)。カテコールエストロゲンの親電子代謝物は Keap1 の Cys151, Cys257, Cys273, Cys288, Cys368 および Cys489 への修飾を介して Nrf2 を活性化し (81)、1,2-NQ は Cys151, Cys257, Cys273, Cys288 および Cys489 を修飾して Nrf2 を活性化する (80)。これらのことを総合すると、酸化ストレスよりもむしろ Keap1 への共有結合が、エストロゲンキノンや 1,2-NQ そして TBQ 等のキノン化合物による Nrf2 の活性化に重要な役割を示すと想定される。この仮説は Dinkova-Kostova らによっても支持されている (124, 125)。

Keap1/Nrf2 システムは、Nrf2 の活性化による第二相薬物代謝酵素および第三相トランスポーターの発現誘導を介して (63)、化学発がん物質や毒物の解毒・排泄に貢献する (126)。TBQ は第二相薬物代謝酵素 (GSTs, NQO1, UGTs) によって生体内代謝を受け、さらに、グルタチオン抱合体やグルクロン酸抱合体へ代謝される (103, 127)。これらの極性代謝物は MRPs によって排泄される (128)。本研究において、RAW264.7 細胞を用いて Nrf2 をノックダウンすると、TBQ による細胞毒性が有意に増強したことから (図 13B)、Keap1/Nrf2 システムは TBQ の解毒にも関与していることが示された。

図 6 および 15 に示すとおり、TBQ による Nrf2 の活性化は一過性であることから、Nrf2 を負に制御する Keap1 タンパク質の親電子修飾が解除されて Keap1 が再利用される可能性が示唆された。そのひとつとして、0.2.5 に記載したような GSH を介した S-トランスアリアル化反応が TBQ-Keap1 結合体において生じることが考えられた (図 21)。そこで、精製マウス Keap1 と TBQ の結合体に GSH を反応させたところ、Keap1 の TBQ 修飾が解除され (図 17 および表 4)、TBHQ-SG, TBHQ-di-SG, および TBQ-di-SG の生成が見られた (図 20)。図 21 に GSH による Keap1-TBQ 結合体の S-トランスアリアル化反応に関して想定される二つの反応機序を示す。ひとつは TBQ に共有結合

した Keap1-SH (化合物 1) の置換反応で生じる TBQ-mono-SG (化合物 2) の生成, もうひとつはマイケル付加反応を介した Keap1-TBHQ-SG 結合体の生成である (化合物 6). Song らはハロゲン基を有するキノン系化合物が GSH による求核付加攻撃を受けることで, 結果的にハロゲン基の脱離を伴い GSH が付加することを示しており, 我々が想定した反応に良く一致している (129). 化学合成した TBQ-GSH 結合体は TBQ-5-SG, TBQ-6-SG および TBQ-3,6-SG であったが (図 18 および 19), *S*-トランスアリアル化による反応生成物は TBHQ-mono-SG (化合物 3), TBHQ-di-SG (化合物 4), TBQ-di-SG (化合物 5) だった (図 20). 両者での生成物の差異については, GSH が Keap1-TBQ 結合体の *S*-トランスアリアル化反応を触媒しているだけでなく, 生成した TBQ-mono-SG (化合物 2) から TBHQ-mono-SG (化合物 3) への還元反応にも関与していることで説明されるかもしれない. 生じた TBHQ-mono-SG (化合物 3) は自動酸化を受けやすく TBQ-mono-SG (化合物 2) に変換され, 引き続いて生じるマイケル付加反応を介して, TBHQ-di-SG (化合物 4) およびその自動酸化体である TBQ-di-SG (化合物 5) が生成することが考えられた. 一方, 図 21 に示すとおり, Keap1-TBQ 結合体と GSH とのマイケル付加反応で生じた Keap1-TBHQ-SG 結合体 (化合物 6) は, TBHQ-SG 結合体と同様に酸化されて Keap1-TBQ-SG 結合体 (化合物 7) に変換され, このものは GSH の存在下で *S*-トランスアリアル化により Keap1 を遊離し, TBHQ-di-SG (化合物 4) を生成する. この一連の反応は, ブロモベンゼンの GSH 結合体を用いた Slaughter らの研究により支持されている (130). このことと一致して, 先行研究において, Keap1 (80, 81, 131), GAPDH (23), PTP1B (132), および CREB (133) を 1,2-NQ もしくは TBQ と反応させると, 何れの場合もヒドロキノン結合体ではなくキノン結合体として検出された. したがって, もし TBHQ-タンパク質結合体もしくは TBHQ-SG が好気条件下で自動酸化を受けなければ, *S*-トランスアリアル化は起こらないことになる. 言い換えれば, 自動酸化を受けやすいヒドロキノン-チオール結合体はキノン-チオール結合体となり, GSH による *S*-トランスアリアル化を受けることになる.

ところで, Peters らによる雄の F344 ラットを用いた先行研究では, 代謝物として TBHQ-3,6-di-SG 結合体が同定されており, 最初の GSH 付加位置のパラ位に二次的な GSH の付加が起こることを示唆している (127). 従前の考えに従えば, このような GSH 結合体は TBQ と GSH との共有結合に起因するとされてきたが, 本研究は, インビボで観察される TBHQ-3,6-di-SG 結合体の一部が, GSH による TBQ の共有付加攻撃だけでなく, タンパク質のシステイン残基に共有結合した TBQ が GSH により *S*-トランスアリアル化を受けることで生じる可能性を示唆している.

当研究室の先行研究において, 1,2-NQ に修飾されて活性を失った GAPDH の 1,2-NQ 修飾が, GSH を介した *S*-トランスアリアル化により解除され, 酵素活性が回復した (23). 同様な機序により Keap1 の機能が回復して Nrf2 の活性化が抑制されると予測

された (図 22). この仮説を裏付けるように, Nrf2 の活性に重要な Keap1 の Cys151 および Cys273 への TBQ 修飾が GSH により解除され (表 4), さらに, BSO 処理では TBQ による Nrf2 活性化の持続が見られたことから (図 15), GSH を介した S-トランスアリアル化が Nrf2 の活性化を一部制御していることが示唆された. GSH の前駆体である NAC 処理では GSH 量の増加が認められなかったにも係わらず (図 14), TBQ による Nrf2 活性化を抑制したことから (図 15), NAC そのものが S-トランスアリアル化反応に係わっていると示唆される (23).

親電子修飾された Keap1 による Nrf2 活性化についての研究は数多く存在するにも関わらず, 親電子修飾された Keap1 の細胞内運命についての研究は少ない (63, 134). 最近, 田口ら (135) によって, 親電子修飾された Keap1 タンパク質はオートファジーにより分解され, さらに, *de novo* 経路による Keap1 の新生により Keap1 の機能が補われる可能性が報告された. 同グループは TBHQ 曝露が Keap1 の分解を促進することを明らかにしたが (135), TBHQ は TBQ へ自動酸化されることから (図 5), TBQ-Keap1 結合体としてオートファジー分解をうけることが示唆される (図 22). この結果を支持するように, 1,2-NQ に修飾されたタンパク質はオートファジーによって分解されることが示されている (136). 以上の知見を総合すると, 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-トランスアリアル化が関与している可能性が高い (図 21 および図 22).

1.4. まとめ

・ BHA や TBHQ の親電子代謝物である TBQ は Nrf2 を活性化し下流タンパク質を誘導する.

- ・ TBQ により産生された酸化物は Nrf2 の活性化に重要でない.
- ・ TBQ は Keap1 の Cys23, Cys151, Cys226 および Cys368 を修飾する.
- ・ Nrf2 は TBQ による細胞毒性を軽減する.
- ・ GSH を介した S-トランスアリアル化により Keap1 の TBQ 修飾が解除された.
- ・ TBQ は GSH 一分子もしくは二分子と共有結合する.

1.5. 図表

図 6-22, 表 3, 4

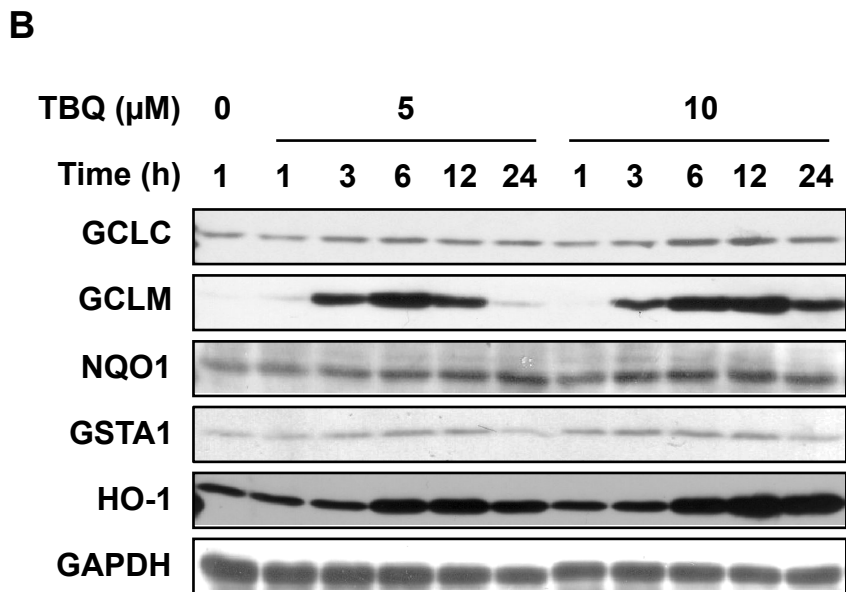
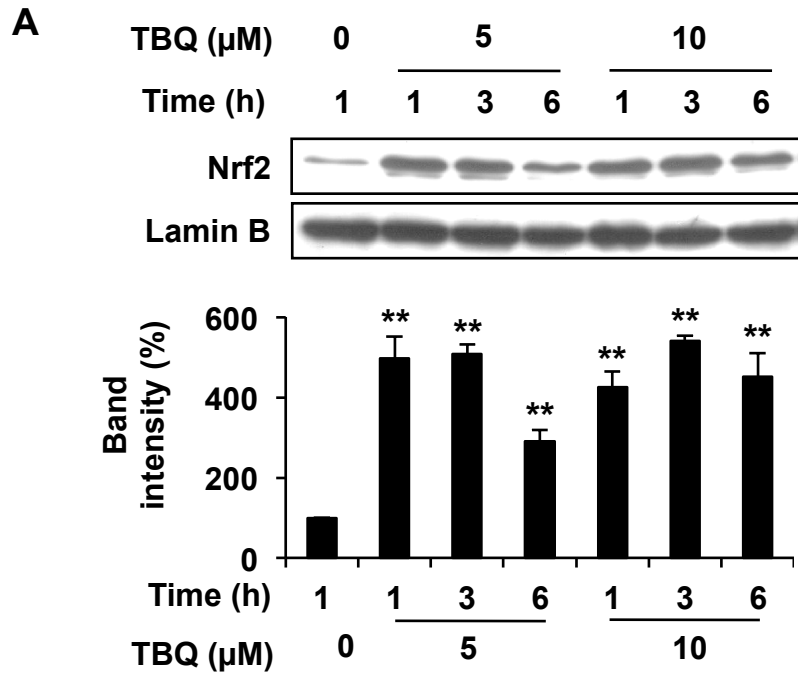


図6. TBQによるNrf2の活性化および下流タンパク質の発現誘導

A. RAW264.7細胞を0, 5または10 μM のTBQに1, 3,または6時間曝露し, 核画分を分離した後に, ウェスタンブロットを行った. 下図は Image J softwareを用いてバンド強度を定量した結果を示す. 同様の検討を3回行った平均値 \pm 標準誤差 (SE) として示す. **, $p < 0.01$ vs. control. B. 0, 5または10 μM のTBQを1-24時間曝露し, ウェスタンブロットにて各タンパク質を検出した.

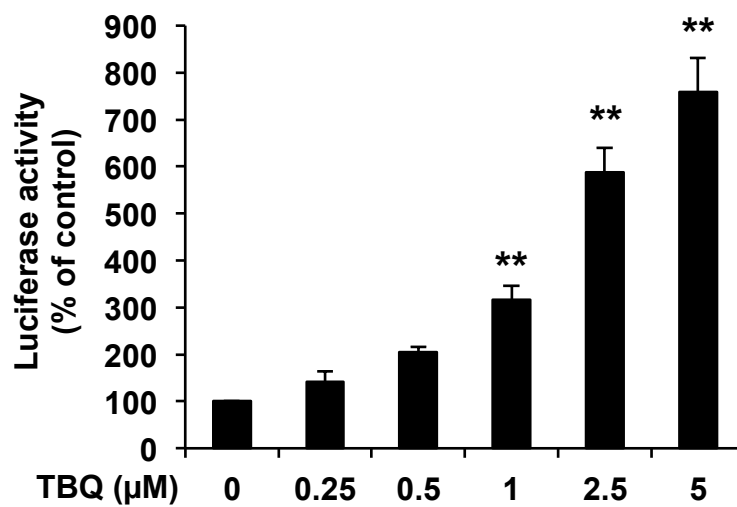


図7. TBQによるARE活性化

RAW264.7細胞にARE-Luciferaseベクターを導入し、12時間後に実験培地に交換し、さらに12時間後に実験に用いた。本細胞を0-5 μMのTBQに曝露し、6時間後に回収して、8に示した方法でルシフェラーゼ活性測定を行った。同様の検討を3回行った平均値±標準誤差 (SE) として示す。**, $p < 0.01$ vs. control.

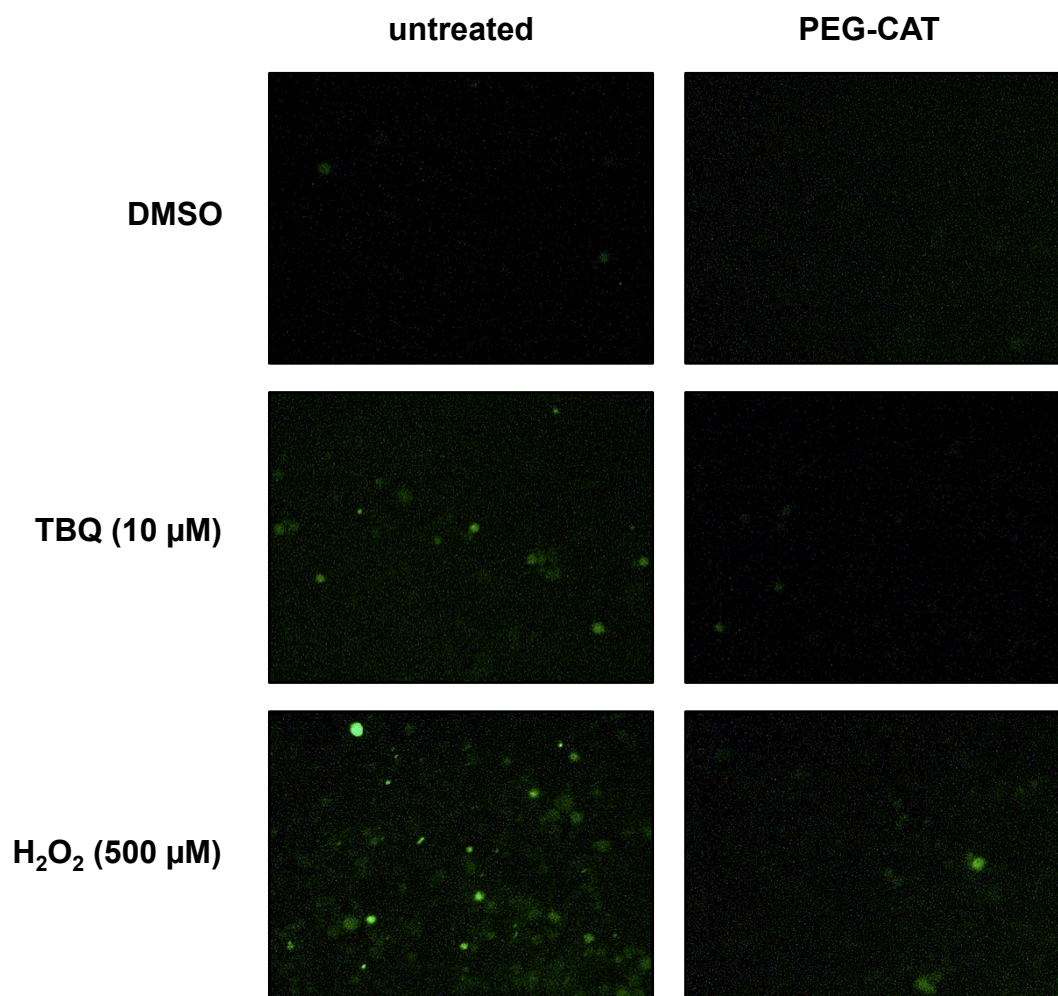


図8. TBQによる活性酸素種の産生

RAW264.7細胞を1000 U/mLのポリエチレングリコール結合カタラーゼ (PEG-CAT)に1時間処理し, 10 μM H₂DCFDAに30分間曝露した. その後, 本細胞を10 μM TBQもしくは500 μM H₂O₂に10分曝露し, 蛍光顕微鏡を用いてH₂DCFDAの蛍光を検出した.

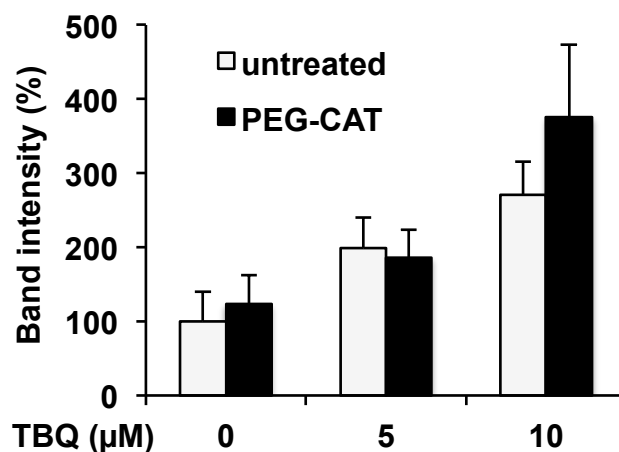
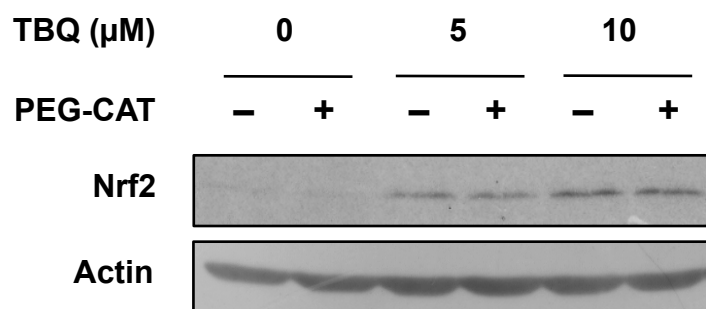


図9. TBQによるNrf2活性化における活性酸素種の関与

RAW264.7細胞を1000 U/mLのポリエチレングリコール結合カタラーゼ (PEG-CAT)に1時間処理し、その後、本細胞を0, 5, もしくは10 μM のTBQを1時間曝露し、ウエスタンブロットを行った。下図はImage J softwareを用いてバンド強度を定量した結果を示す。同様の検討を5回行った平均値 \pm 標準誤差 (SE)として示す。

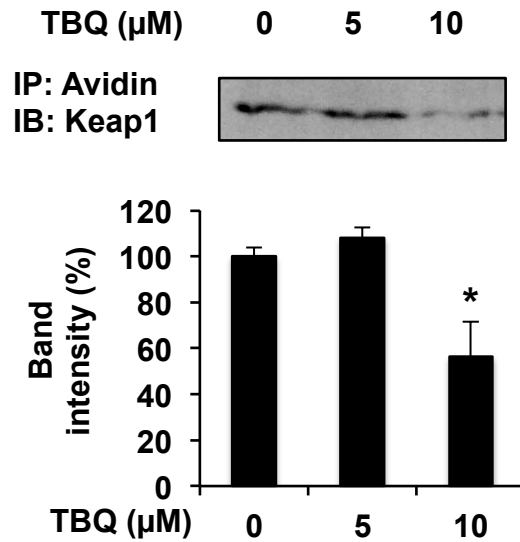


図10. TBQによる細胞内Keap1タンパク質の修飾

TBQ (0, 5, 10 μM) にRAW264.7細胞を1時間曝露した後に, RIPAバッファで本細胞を回収した. 4.2.1に記載した方法でBPM標識アッセイを行い, BPMは終濃度50 μM で行った. 下図はImage J softwareを用いてバンド強度を定量した結果を示す. 同様の検討を3回行った平均値 \pm 標準誤差 (SE) として示す. *, $p < 0.05$ vs. control.

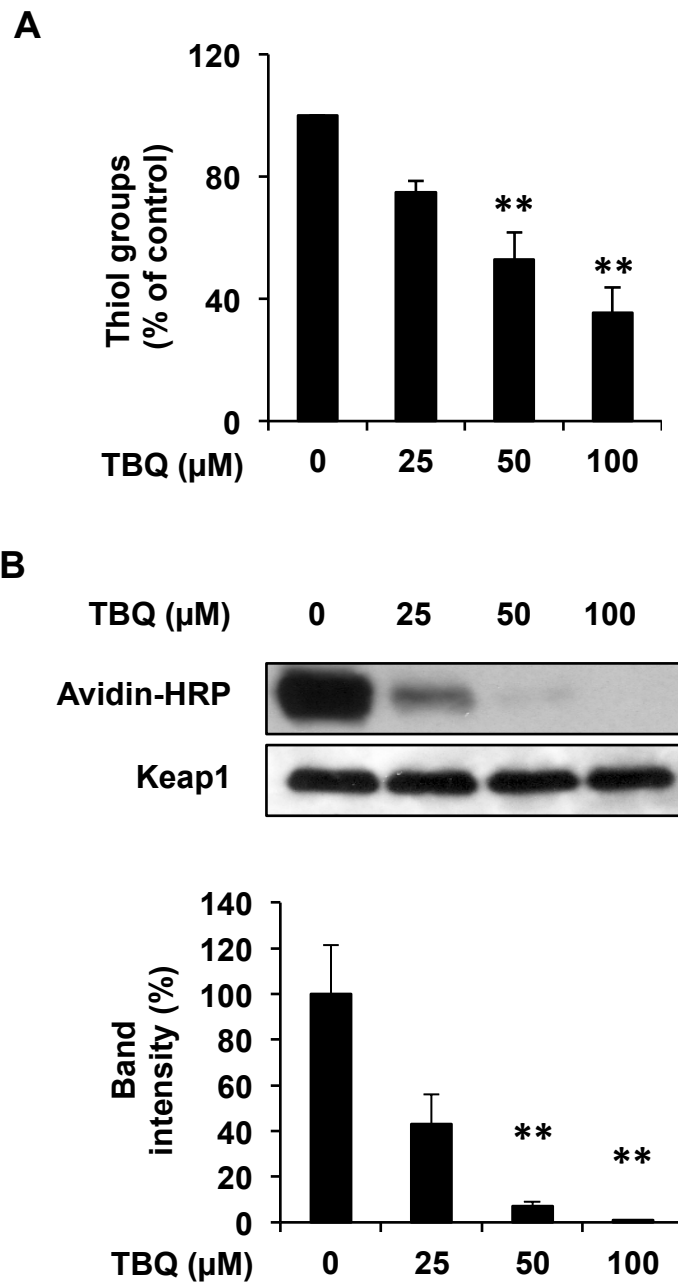


図11. TBQによる精製Keap1タンパク質の修飾

マウス精製Keap1タンパク質に0-100 μMのTBQを25°Cで30分間反応させた。A. 11.1.に従いKeap1中のチオール基を測定した。B. 5.2.2に記載した方法でBPM標識アッセイを行い、終濃度50 μMのBPMを用いた。下段はImage J softwareを用いてバンド強度を定量した結果を示す。同様の検討を3回行った平均値±標準誤差 (SE) として示す。**, $p < 0.01$ vs. control.

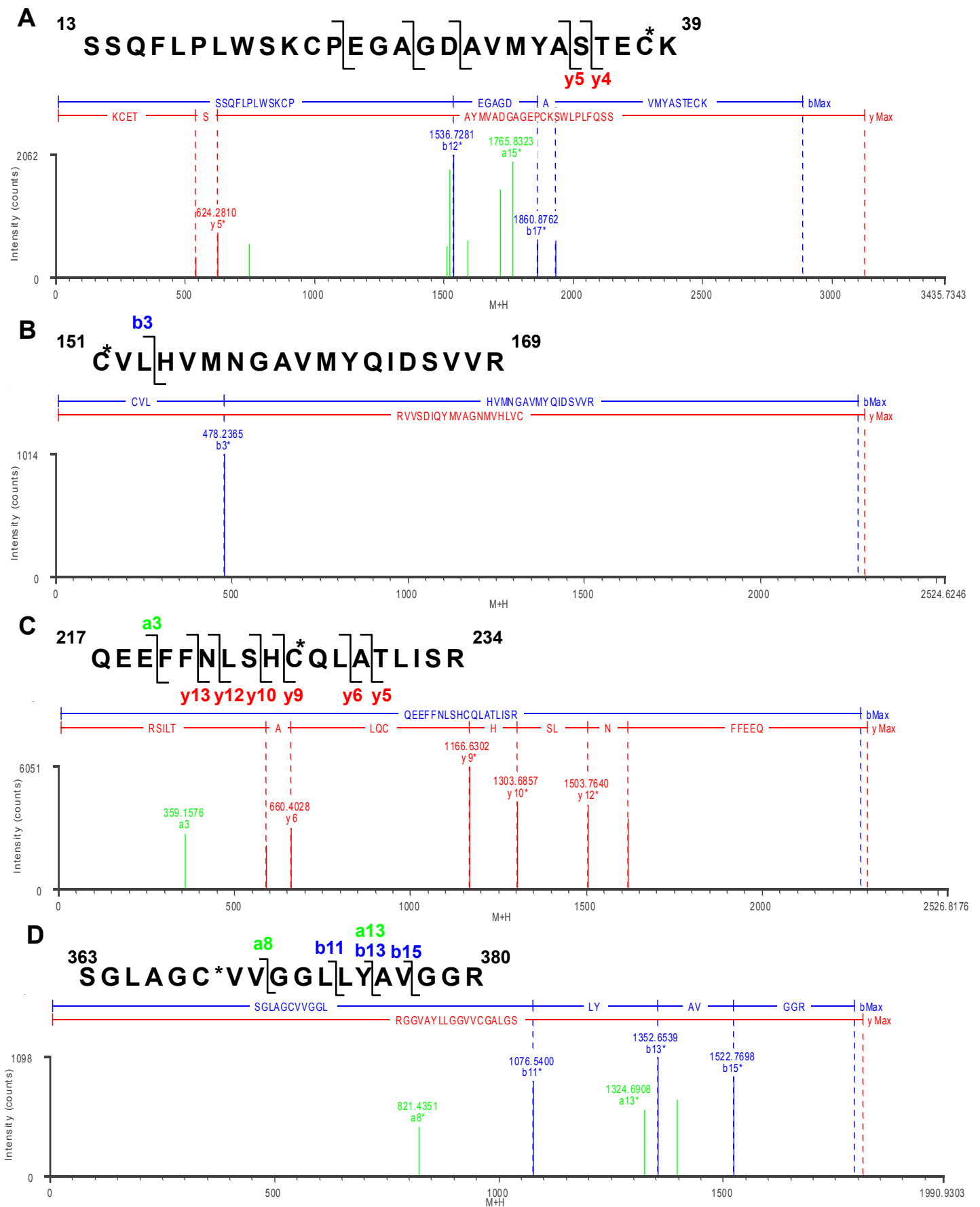


図12. MS^E解析によるKeap1へのTBQ修飾部位の同定

マウス精製Keap1タンパク質に50 μMのTBQを25°Cで30分間反応させた。トリプシン消化を行った後、UPLC-MS^E解析を行った。

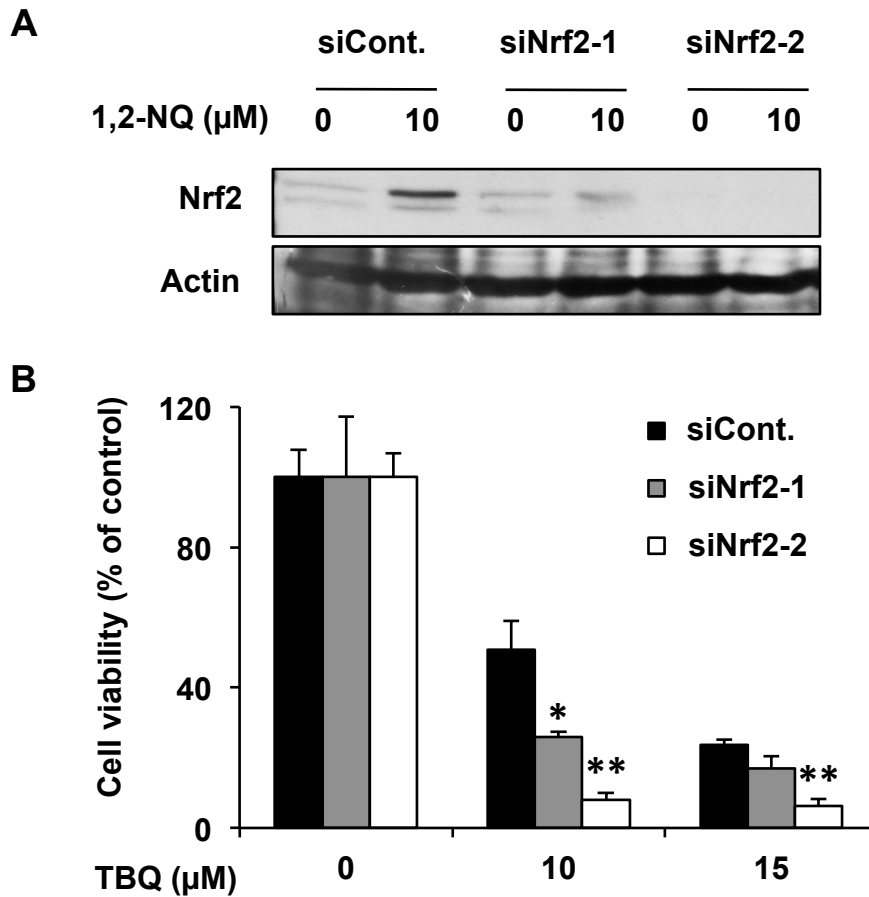


図13. TBQによる細胞毒性に対するNrf2の関与

A. RAW264.7細胞にsiNrf2-1, siNrf2-2およびsiCont.を導入し, 30時間後に10 μM 1,2-NQに1時間曝露した. 本細胞を回収し, ウェスタンブロットでNrf2が抑制されたことを確認した. B. RAW264.7細胞にsiNrf2-1, siNrf2-2およびsiCont.を導入し, 18時間後に無機三価ヒ素に曝露した. 3. に示したようにMTTアッセイにて細胞生存率を測定した. 同様の検討を3回行った平均値 \pm 標準誤差 (SE) として示す. *, $p < 0.05$. **, $p < 0.01$ vs. control.

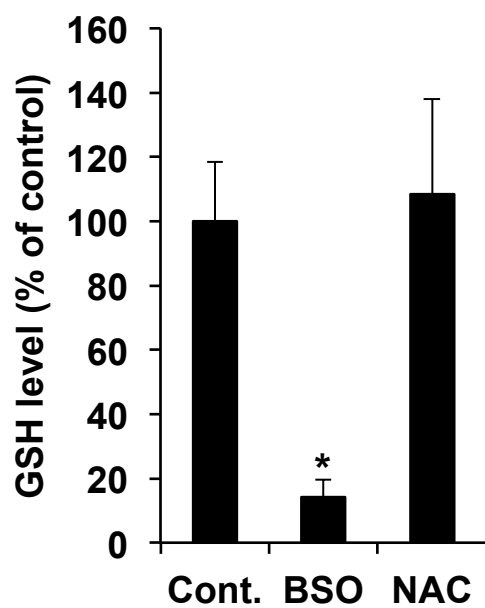


図14. BSOやNACによるGSHの変動

HepG2細胞を200 μ M BSOまたは5 mM NACに前処理し, 24時間後に本細胞を回収し, HPLCでGSH濃度を検出した. 同様の検討を3回行った平均値 \pm 標準誤差 (SE) として示す.

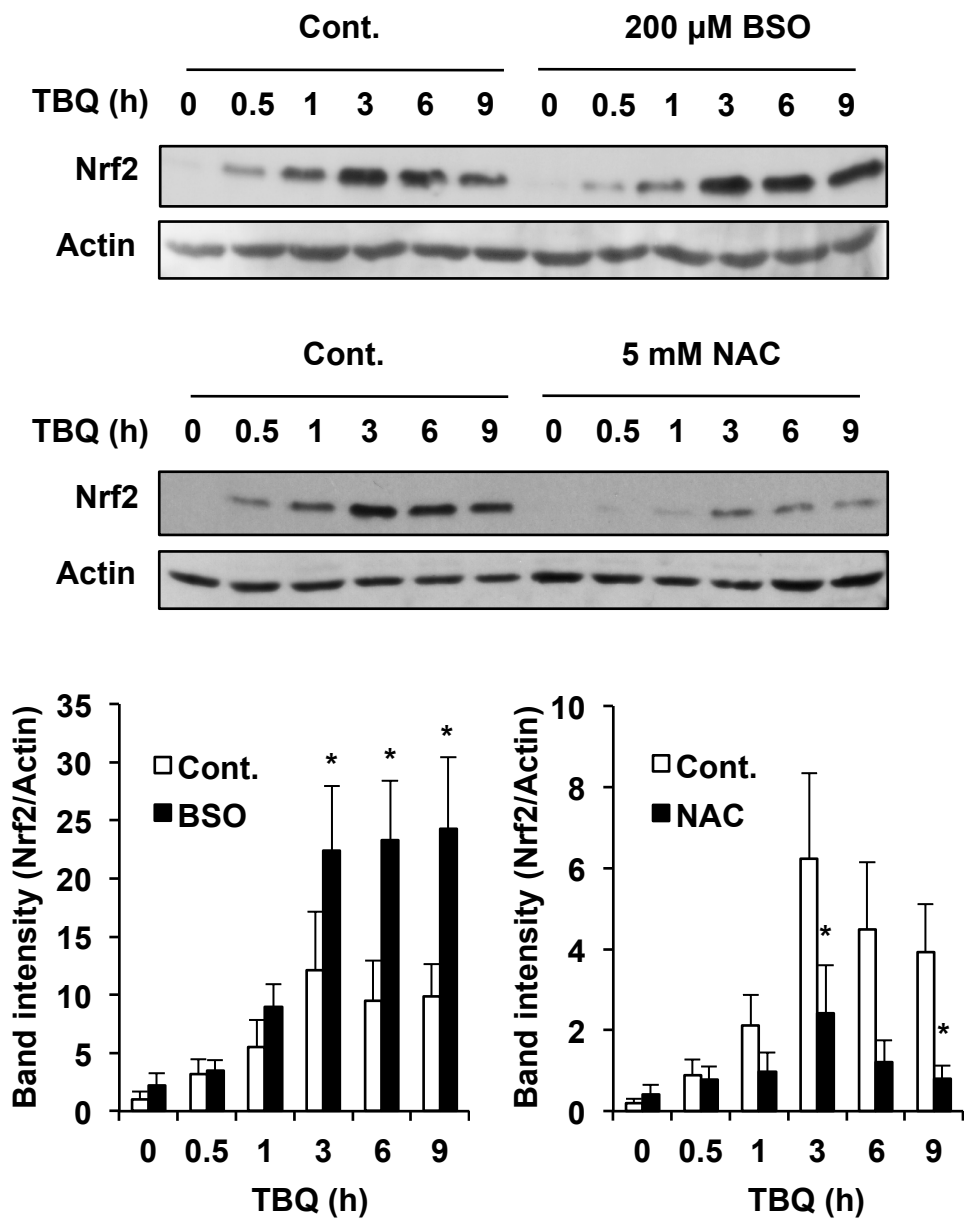


図15. Nrf2活性化におけるGSHの影響

HepG2細胞を200 μM BSOまたは5 mM NACに前処理し、24時間後に50 μM TBQに0-9時間曝露した。本細胞を回収し、ウエスタンブロットでNrf2を検出した。下図はImage J softwareを用いてバンド強度を定量した結果を示す。同様の検討を3回行った平均値±標準誤差 (SE) として示す。

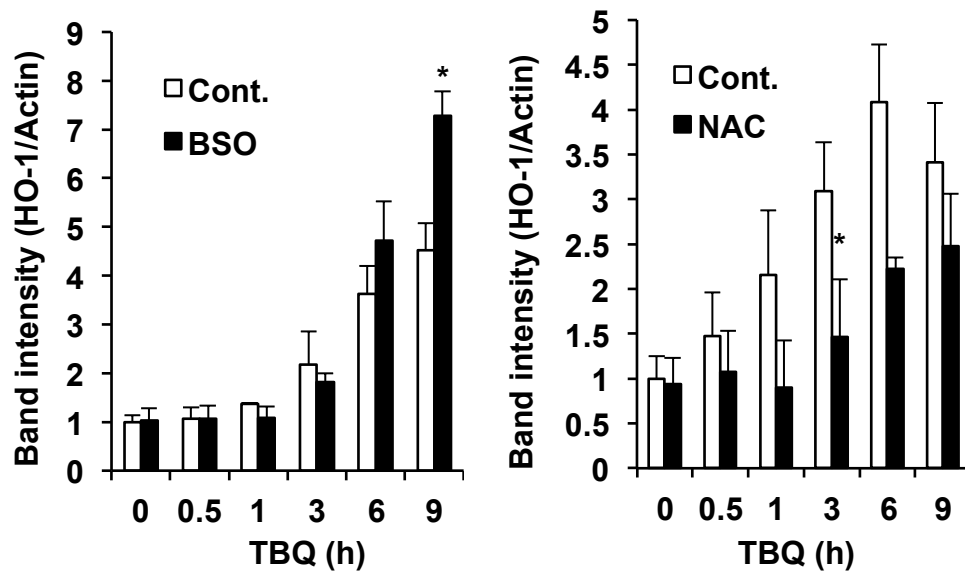
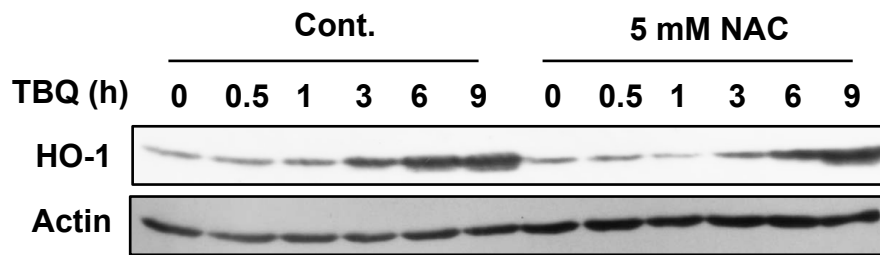
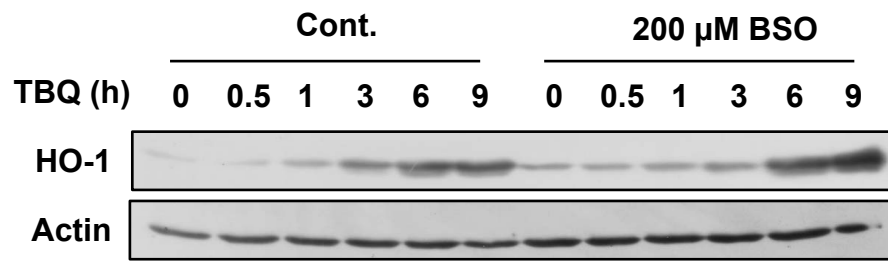


図16. HO-1誘導におけるGSHの影響

HepG2細胞を200 μ M BSOまたは5 mM NACに前処理し、24時間後に50 μ M TBQに0-9時間曝露した。本細胞を回収し、ウエスタンブロットでHO-1を検出した。下図はImage J softwareを用いてバンド強度を定量した結果を示す。同様の検討を3回行った平均値 \pm 標準誤差 (SE) として示す。

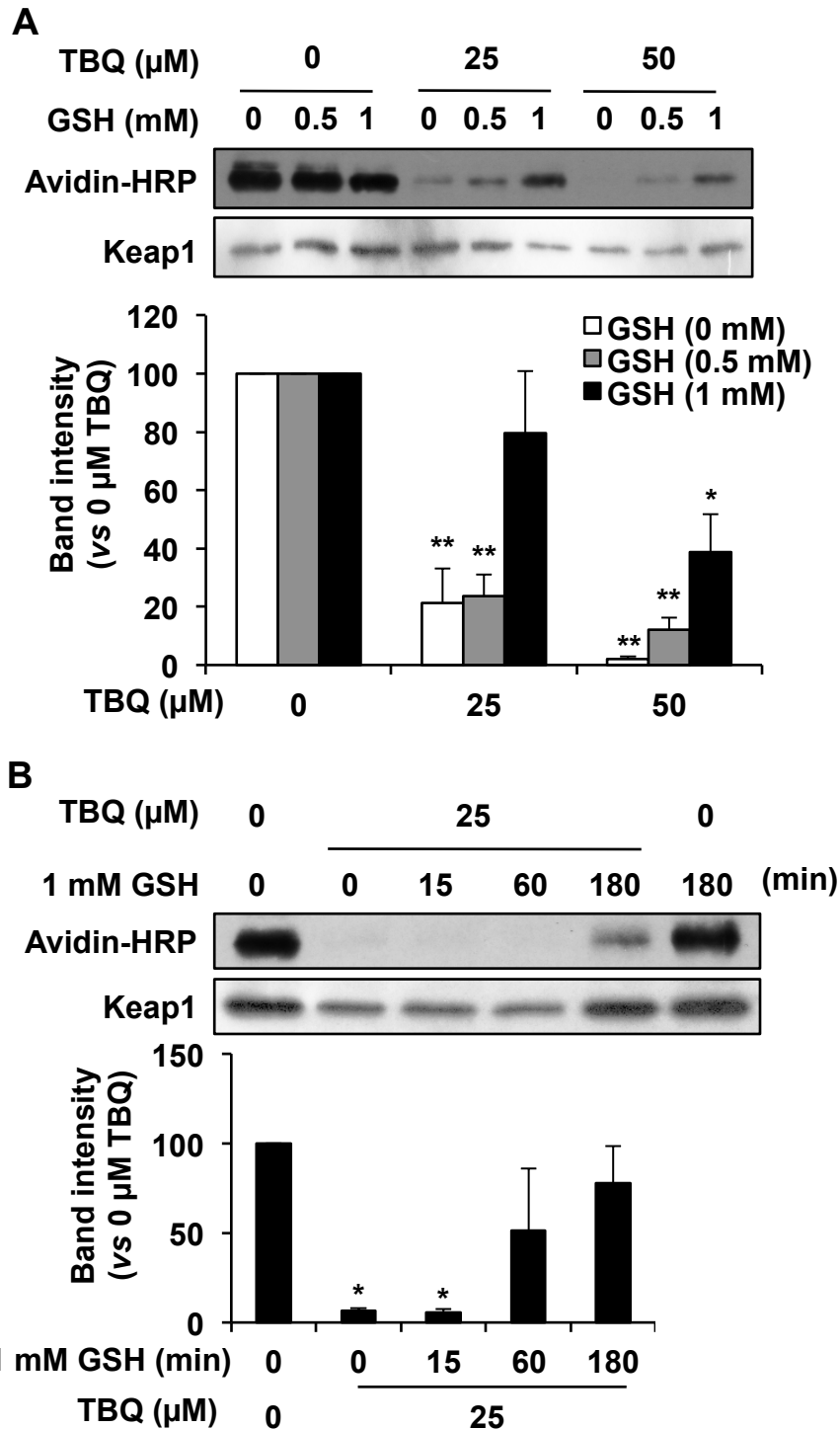


図17. GSHによる濃度・時間依存的なTBQ修飾の解除

A. マウス精製Keap1に0, 25もしくは50 μM TBQを反応させ、限外濾過でTBQを取り除いた後、タンパク定量を行い、0-1 mMのGSHをそれぞれ反応させた。下図はImage J softwareを用いてバンド強度を定量した結果を示す。同様の検討を3回行った平均値 \pm 標準誤差 (SE) として示す。B. マウス精製Keap1に0または25 μM のTBQを反応させ、限外濾過でTBQを取り除いた後、タンパク定量を行い、1 mMのGSHを0-180分間それぞれ反応させた。反応後、BPM標識アッセイを行った。下図はImage J softwareを用いてバンド強度を定量した結果を示す。同様の検討を3回行った平均値 \pm 標準誤差 (SE) として示す。

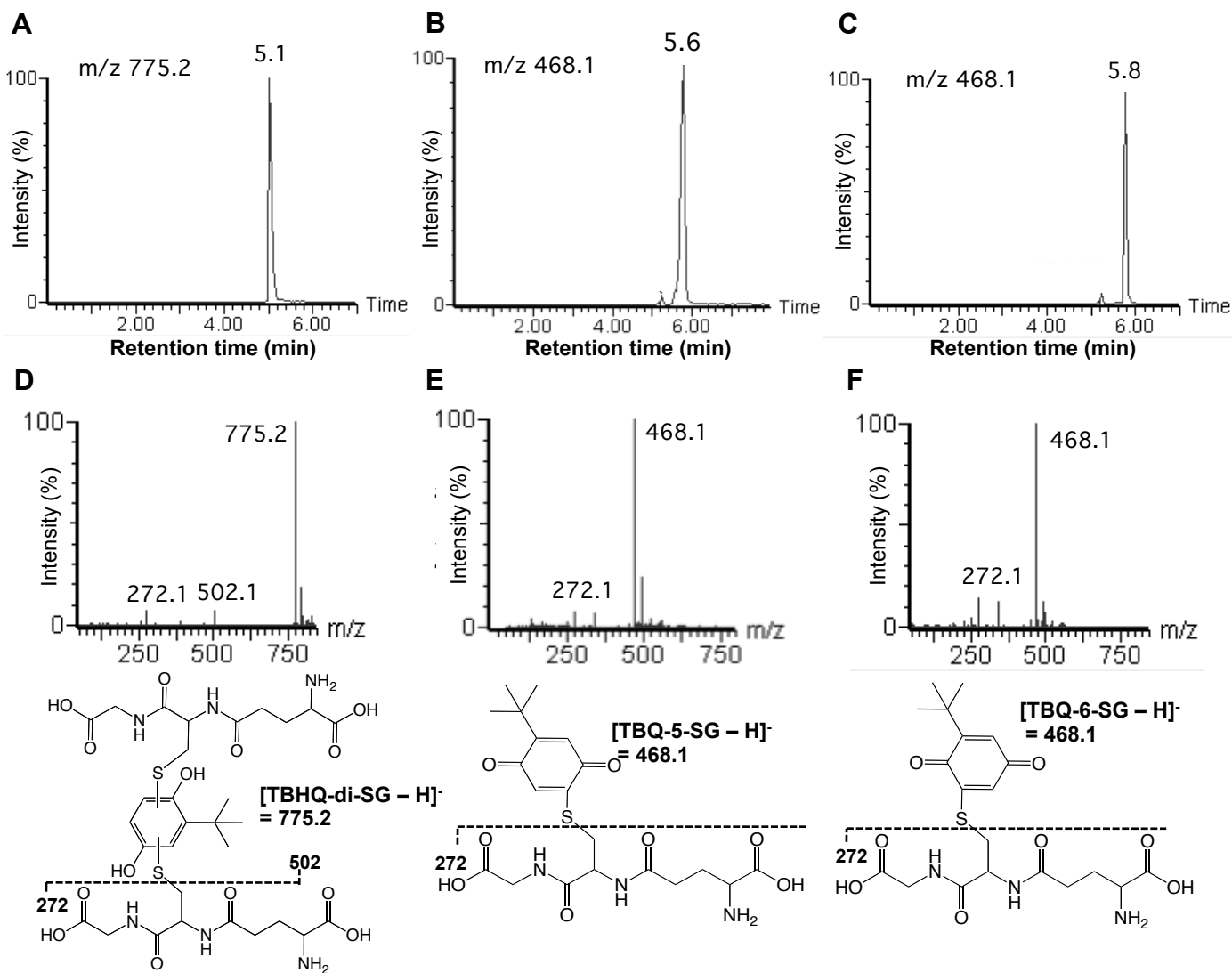


図18. UPLC-MS^E解析を用いたTBQ-GSH反応生成物の同定

TBQとGSHを反応させた後 (12.参照), 75% アセトニトリル-25% DDW溶液を展開溶媒として用い, ODS-S-50Bカラムでそれぞれの分画を分離した。エバポレーターにて濃縮後, 凍結乾燥機で乾燥した。一部をアセトニトリルで溶解してUPLC-MS^E解析を行った。A-C. UPLCにより, 保持時間5.1, 5.6, および5.8分にそれぞれ, m/z 775.2, m/z 470.1, m/z 468.1を示すピークを得た。D-F. 得られたそれぞれのピークに対してMS^E解析を行った。

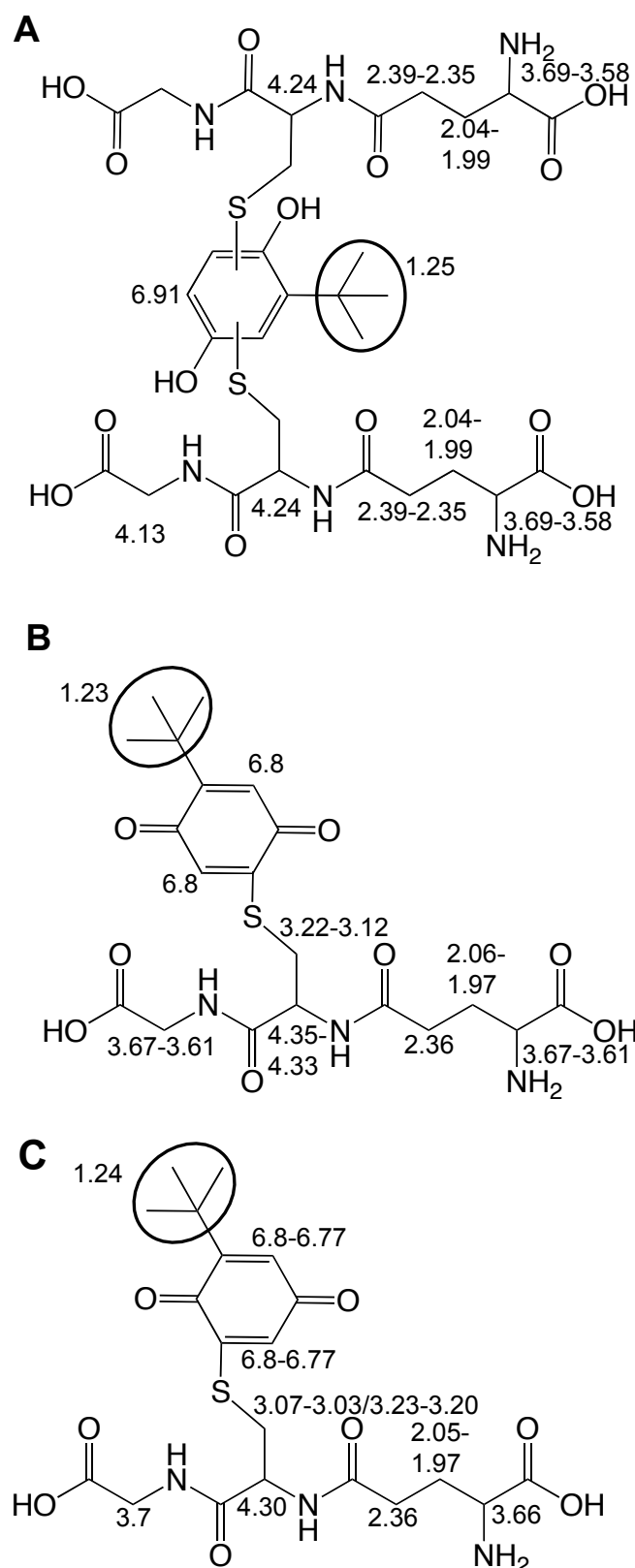


図19. NMR解析を用いたTBQ-GSH反応生成物の同定

TBQとGSHを反応させた後 (12. 参照), 75% アセトニトリル-25% DDW溶液を展開溶媒として用い, ODS-S-50Bカラムでそれぞれの分画を分離した。エバポレーターにて濃縮後, 凍結乾燥機で乾燥した。各TBQ-GSH反応生成物の一部を重水で溶解し, NMR解析を行った。A. TBQ-di-SG, B. TBQ-5-SG, C. TBQ-6-SG

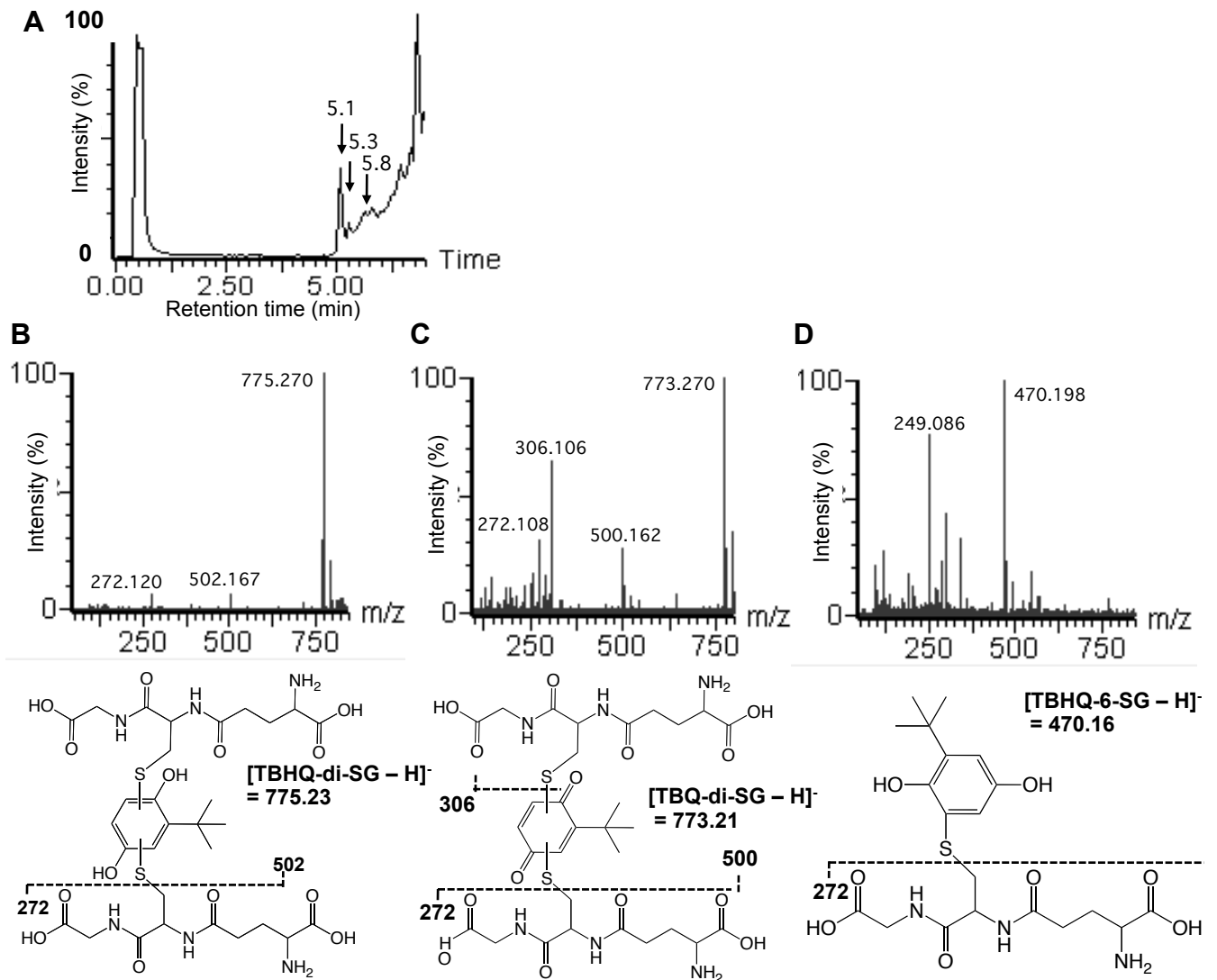


図20. GSHによるTBQ-Keap1からのS-トランスアリール化

マウス精製Keap1に25 μ M TBQを反応させ、限外濾過でTBQを取り除いた後、タンパク定量を行い、1 mMのGSHを1時間反応させた。反応後、フィルターを用いてタンパク質を除去し、UPLC-MS^E解析を行った。A.本農産物についてUPLCを行った。B-D. それぞれ保持時間5.1, 5.3, および5.8分のピークについてMS^E解析を行い、m/z 775.2, m/z 470.1, m/z 468.1を示すピークを得た。

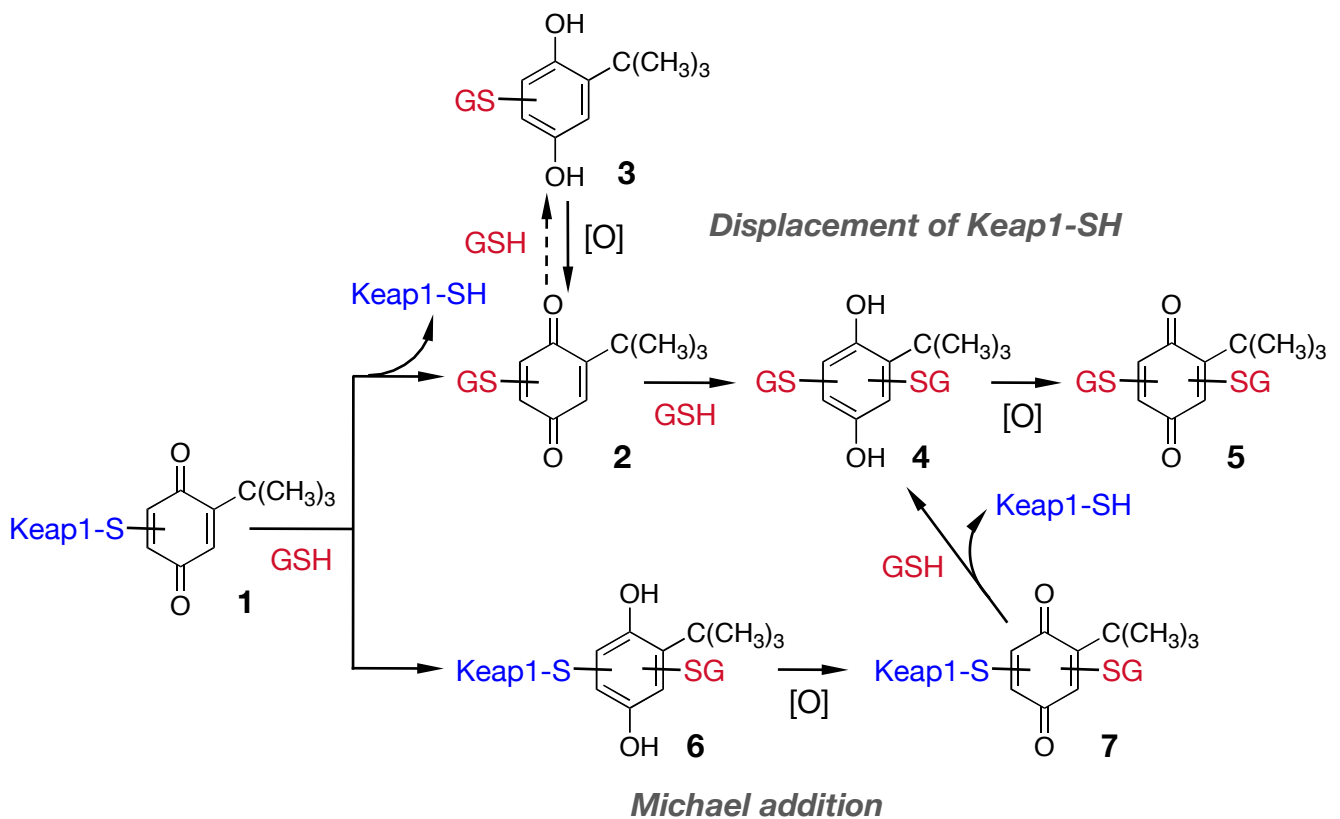


図21. Keap1-TBQのGSHを介したS-トランスアリール化

Keap1-TBQのGSHを介したS-トランスアリレーションの反応様式を示す。TBQはKeap1と結合し、Keap1-TBHQとなった後に自動酸化によりKeap1-TBQへ変換する。GSHが存在すると、GSHはマイケル付加反応によりKeap1-TBQ結合体に結合すると同時に、Keap1は逆マイケル付加反応によって遊離する。一部はKeap1-TBHQ-GSH結合体となる。生成したTBHQ-monoSGは自動酸化によりTBQ-monoSGとなり、再びGSHの標的となる。TBHQ-di-SGは自動酸化によりTBQ-di-SGとなる。

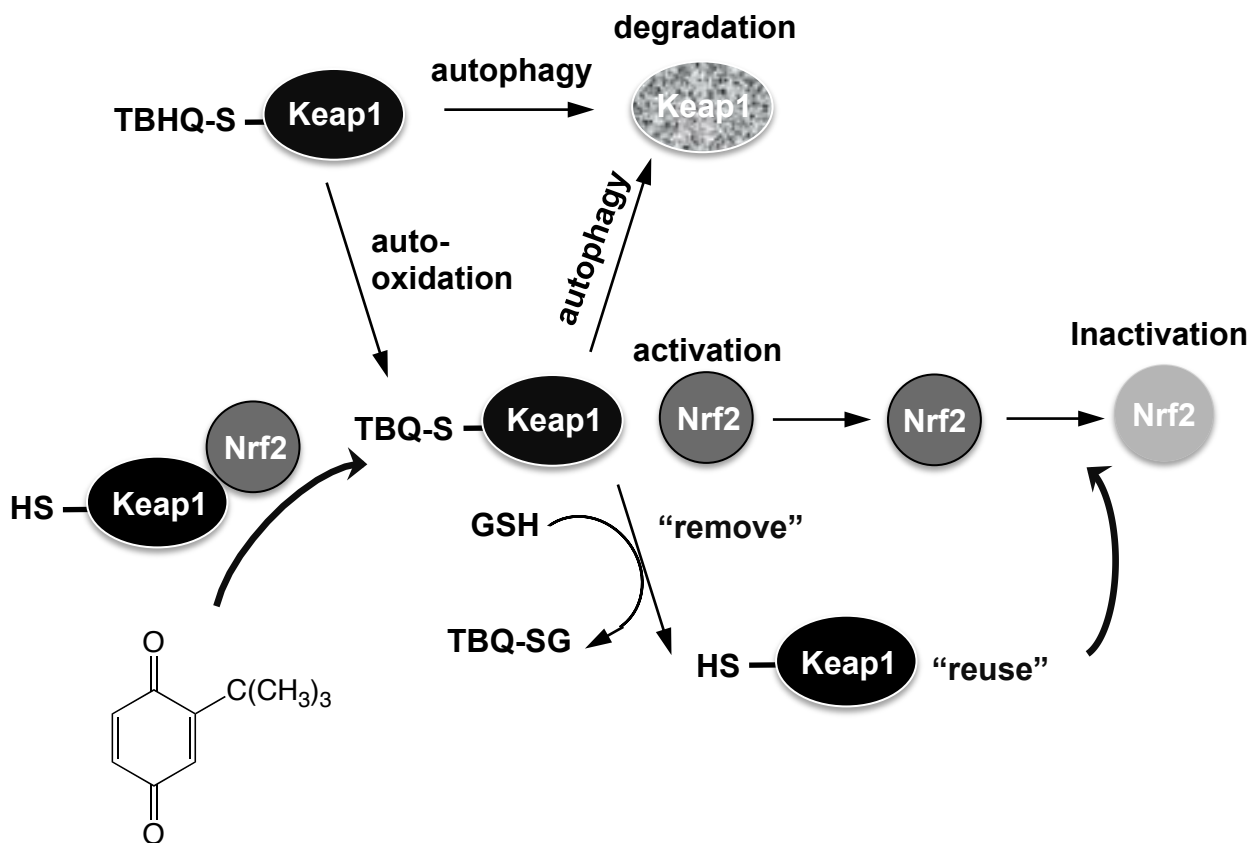


図22. GSHを介したKeap1のS-トランスアリール化によるNrf2活性化の制御における可能なメカニズム

GSHを介したKeap1のS-トランスアリレーションによるNrf2活性化の制御の仮説を示す. TBQはKeap1を修飾し, Nrf2の活性化が起こる. GSHにより, Keap1のTBQ修飾が取り除かれると, 再びKeap1はNrf2を制御し, Nrf2の活性化は修飾する. また, 田口らはTBHQがKeap1の分解を促進する結果を得たが, TBHQはTBQに自動酸化することから, TBQ-Keap1の形で分解されると示唆される.

表3. TBQによるKeap1の修飾

Peptide No.	Position	Peptide sequence	Calculated MS	Observed MS	Cys	Keap1 domain
1	13–39	SSQFLPLWSKC*PEGAGDAVMYASTECK	3123.39	3123.45	Cys23	NTR
2	151–169	C*VLHVMNGAVMYQIDSVVR	2295.11	2295.12	Cys151	BTB
3	217–234	QEEFFNLSHC*QLATLISR	2297.11	2297.08	Cys226	IVR
4	255–260	YDC*PQR	942.38	942.41	Cys257	IVR
5	270–279	AVRC*HALTPR	1284.67	1284.67	Cys273	IVR
6	288–296	C*EILQADAR	1179.55	1179.54	Cys288	IVR
7	363–380	SGLAGC*VVGGLLYAVGGR	1809.94	1809.94	Cys368	Kelch
8	471–494	LLYAVGGFDGTNRLNSAEC*YYPER	2869.33	2869.41	Cys489	Kelch
9	484–498	LNSAEC*YYPERNEW	2090.91	2090.96	Cys489	Kelch

マウス精製Keap1タンパク質を50 μ MのTBQと25°Cで30分間反応させた。反応したKeap1タンパク質をトリプシン消化して、UPLC-MS解析に供した。表はトリプシン消化したKeap1-TBQから得られたペプチドのアミノ酸配列を示す。

表4. GSHによるKeap1へのTBQ修飾の解除

A

Position	Peptide sequence	Calculated MS (Da)	Observed MS (Da)	% Modified	Modified cysteine
13-32	SSQFLPLWSKCPEGADAVM	2238.04	2237.99	100	Cys23
62-84	QAFGVMNELRLSQQLCDVTLQVK	2781.41	2781.38	78.9	Cys77
72-93	LSQQLCDVTLQVKYEDIPAAQF	2624.31	2624.25	100	Cys77
151-169	CVLHVMNGAVMYQIDSVVR	2295.11	2295.1	51.9	Cys151
270-279	AVRCHALTPR	1446.71	1446.75	55.9	Cys273
297-312	CKDYLVQIFQELTLHK	2093.09	2093.04	100	Cys297
355-380	LADLQVPRSLAGCVVGGLLYAVGGR	2702.45	2702.37	100	Cys368
602-615	SGVGVAVTMEPCRK	1594.78	1594.76	63.4	Cys613
615-624	KQIDQQNCTC	1503.62	1503.66	100	Cys622, Cys624

B

Position	Peptide sequence	Calculated MS (Da)	Observed MS (Da)	% Modified	Modified cysteine
292-298	QADARCK	952.44	952.43	100	Cys297
602-615	SGVGVAVTMEPCRK	1594.78	1594.76	94.4	Cys613
615-624	KQIDQQNCTC	1503.62	1503.64	83.7	Cys622, Cys624

A. マウス精製Keap1タンパク質を25 μ MのTBQと25°Cで30分間反応させた。B. Aのサンプルに1 mM GSHを60分間反応させた。反応したKeap1タンパク質をトリプシン消化して、UPLC-MS解析に供した。表はトリプシン消化したKeap1-TBQから得られたペプチドのアミノ酸配列を示す。修飾されたペプチドの割合を示す%Modifiedが50%以上のペプチドを表に示した。

第2章 環境中親電子物質による芳香族炭化水素受容体活性化機序

2.1. 目的

芳香族炭化水素受容体 (AHR) は、主に CYP1A1 等の第一相異物代謝酵素を誘導し、異物の酸化的代謝に寄与する。AHR のリガンドは、多環で、かつ比較的平面構造をとる化学物質とされている (101)(図 2 および 23A)。しかしながら、Gharavi ら (103, 104) は、TBHQ が CYP1A1 を誘導することを示した。初期的な検討により、TBQ に応答する転写因子を探索することを目的に A549 細胞を用いたマイクロアレイ解析を行ったところ、CYP1A1 の誘導が見られたことから (表 5)、Gharavi らによって観察された TBHQ による CYP1A1 誘導は TBQ が原因である可能性が考えられた (図 23B)。第 1 章において、TBQ は Keap1 の親電子修飾を介して Nrf2 を活性化することを明らかにしたが、TBQ が単機能的な化合物であるか二機能的であるか未だ解明されていない。これらのことから第 2 章では、AHR は多環芳香族炭化水素だけではなく、親電子物質に応答し得る転写因子であると仮定し (図 23)、AHR 活性化における親電子物質の関与を明らかにすることを試みた。

2.2. 結果

2.2.1. TBQ により発現が変動する mRNA 群

A549 細胞を TBQ に 6 時間曝露し、マイクロアレイ解析を行ったところ、TBQ 曝露では対照群と比較して AHR の下流タンパク質である CYP1A1 が 27.9 倍、CYP1B1 が 17.5 倍上昇していた (表 5、特に mRNA の変動が大きかった遺伝子について表 4 に記載した)。

2.2.2. 環境中親電子物質による CYP1A1 の発現誘導

A549 細胞を TBQ に 6 時間曝露したところ、TBQ による CYP1A1 の発現誘導が見られた (図 24)。TBQ を 30 分間曝露すると、AHR-ARNT 間相互作用の亢進が免疫沈降法により検出された (図 25A)。A549 細胞に XRE-ルシフェラーゼベクターを導入し、TBQ による XRE の活性化を検討した。その結果、TBQ 曝露 (6 時間) により、ルシフェラーゼ活性が有意に上昇した (図 25B)。MG132 で 3 時間前処理をした後に、TBQ を 1 時間曝露して BPM 標識アッセイを行ったところ、TBQ の濃度依存的に AHR の修飾が検出された (図 26)。

Hep1 細胞に芳香族親電子物質であるキノン化合物を 4 および 8 時間曝露したところ、TBQ による CYP1A1 の発現誘導が検出された (図 27A)。しかしながら、脂肪族親電子物質である (E)-2-decenal による CYP1A1 の誘導は、本条件下では検出されなかった (図 27B)。TBQ, 1,4-ベンゾキノ (1,4-BQ), 1,2-NQ および 1,4-NQ の親化合物である BHA, TBHQ, ベンゼン, 1,4-ベンゾジオールおよびナフタレンでは CYP1A1 の誘導は見られなかった (図 28A)。

HepG2 細胞でも TBQ 曝露による CYP1A1 の誘導は検出された (図 29 および 図 30)。

さらに、他の親電子物質による CYP1A1 の誘導を調べたところ、1,2-NQ, 1,4-NQ および 1,4-BQ でも認められた (図 31)。しかしながら、Hepa1 細胞と同様に親化合物では CYP1A1 の誘導は見られなかった (図 28B)。

2.2.3. 環境中親電子物質による CYP1A1 発現誘導に対する AHR の関与
AHR の競合阻害剤である 2-methyl-2H-pyrazole-3-carboxylic acid(2-methyl-4-o-tolylazo-phenyl)-amide (CH223191, 10 μ M) で 1 時間前処理した後、TBQ に曝露した。CH223191 による前処理は、親電子物質による CYP1A1 の誘導を抑制した(図 32A)。また、HepG2 細胞においても同様な結果が得られた (図 32B)。さらに、Hepa1 細胞において CYP1A1 の誘導が認められた条件にも関わらず、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 CYP1A1 の誘導は認められなかった (図 33)。

2.2.4. 環境中親電子物質による AHR の核内移行と ARNT 相互作用亢進
Hepa1 細胞を TBQ, 1,2-NQ, 1,4-BQ, および 1,4-NQ に曝露したところ、蛍光免疫染色において、DMSO 曝露群では AHR は細胞質に均一に存在するのに対して、当該芳香族親電子物質に曝露すると、AHR は細胞質から核に移行した。ウエスタンブロット分析でも AHR の核移行が見られた (図 34 および 36A)。免疫沈降法により、AHR-ARNT 間の相互作用および 1,2-NQ の AHR への結合を検討した結果、抗 ARNT 抗体を用いた免疫沈降反応では AHR が検出され、抗 AHR 抗体を用いた反応では ARNT が検出された (図 37A)。抗 1,2-NQ 抗体を用いた反応において、1,2-NQ の濃度依存的に AHR への 1,2-NQ の結合が見られた (図 37A)。HepG2 細胞においても同様な結果を得た (図 35 および 36B)。また、HepG2 細胞を用いた免疫沈降法では TBQ の濃度依存的に AHR-ARNT 間の相互作用の亢進が確認された (図 37B)。

2.2.5. 環境中親電子物質による XRE 転写活性化
Hepa1 細胞を TBQ, および 1,2-NQ に 90 分間曝露した後、Chip アッセイを行い、TBQ による AHR の CYP1A1 プロモーター領域 (XRE) への結合および XRE の活性化を検討した。その結果、CYP1A1 転写開始点から -1.3 kbp の XRE 領域に AHR の結合が見られ、-0.1 kbp であるプロモーターには XRE の転写活性化を示す RNA ポリメラーゼ II (pol II) の結合が検出された (図 38)。

2.3. 考察

第 1 章は TBQ が Keap1 の親電子修飾を介して Nrf2 を活性化することを示し、本章では、TBQ が AHR を活性化し CYP1A1 を誘導することを明らかとした。本研究により、TBQ は第一相薬物代謝酵素および第二相薬物代謝酵素を誘導する二機能的な化合

物であることが示された (図 4).

A549細胞を用いたマイクロアレイ解析の結果は、TBQによってCYP1A1やCYP2B1などのAHR下流タンパク質が誘導されることを示した(表5). TBQの前駆物質であるTBHQを用いたGharaviらの報告では、HepG2細胞に対して100 μM TBHQ曝露でCYP1A1の誘導が検出された(104). これに対して、TBQを用いた本研究では10 μMの曝露でCYP1A1の誘導がみられ(図30), TBQと同濃度のTBHQもしくはBHAの曝露では検出されなかった(図27-29)(65). これらの結果は、TBHQというよりむしろ、親電子代謝物であるTBQがCYP1A1を誘導することを示唆している. AHRを欠損した細胞において、典型的なリガンドであるTCDD曝露および典型的なリガンドでないヒ素の曝露でCYP1A1は誘導されないこと(28, 137), TBQによるAHR-ARNT相互作用の亢進およびXREの転写活性化の結果から(図25, 表5), このA549細胞で観察されたTBQによるCYP1A1等の誘導はAHRを介した誘導と示唆された. 一連の事実は、TBQがNrf2およびAHRを活性化して異物代謝酵素群を誘導する二機能的な化合物であることを強く示唆している.

次に、Hepal細胞における当該親電子物質によるCYP1A1の誘導は、AHRの活性化を介するか否か検討した. AHRに対する競合阻害剤は当該親電子物質によるCYP1A1の誘導を阻害したこと、および活性を持たないAHRを有するC35細胞ではCYP1A1の誘導が認められないことから、当該親電子物質によるCYP1A1の誘導はAHRに依存することが明らかとなった(図32および33). さらに、AHR活性化の指標であるAHRの核移行やCYP1A1プロモーター領域への結合が検出された(図34-38). 以上の結果から、本研究で用いたキノン化合物は親電子性によりAHR活性化能を有することが示された.

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には、1) 脂溶性であること、2) 多環芳香族で、かつ平面構造を有すること(101), 3) 12 Å程度の長さが必要であるが、リガンドのサイズは14×12×5 Å以下であることが明らかにされている(138). 分子サイズをAvogadro ver 1.1.0を用いて算出すると、AHRに対して高い親和性を示すTCDDは11×4.9×3 Åであることがわかる. 一方、今回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、それぞれ、8.3×6.5×3.8 Å, 7.8×6.2×3.1 Å, 7.3×4.9 Åおよび5.2×4.4 Åであった. したがって、AHR活性およびCYP1A1誘導能のないこれらの化合物の長さは、TCDDのそれと比較して小さい. おそらく、ベンゼンやナフタレンのような2環以下の芳香族炭化水素が、AHRのリガンドにならない原因のひとつがこのようなサイズと関係するのかもしれない(100). 一方、BHA, TBHQ, ナフタレンおよびベンゼン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ず、むしろ極性が増大するにもかかわらず、TCDDのようなAHR活性およびCYP1A1誘導能を示すことが明らかとなった. 本知見はこれまでの概念を覆す事

実であるが、従前の典型的な特徴を有さない AHR リガンド (図 3) の構造を化学的に観察すると、面白い事実が存在する。すなわち、carbaryl 以外の 3 つの AHR リガンドとして見出された化学物質は、何れも構造は異なるものの、分子内に電子密度の低い炭素元素を有しており、親電子性を示すことである。

ところで、マウス AHR は分子内に 17 個のシステイン残基を有し (図 39)、これらの何れかが TBQ のような芳香族親電子物質により化学修飾を受ける可能性が考えられた。さらに興味深いことは、AHR のリガンドポケット内に Cys327 が存在することである (139)。ヒトの AHR は 18 個のシステイン残基を有し、Cys347 がマウス AHR の Cys327 に相当する。図 26 に示すとおり、TBQ は濃度依存的に AHR を *S*-アリール化することが示唆され、1,2-NQ においても同様な結果を得た (図 37A)。本研究では、TBQ による AHR のシステイン残基の *S*-アリール化部位の同定には至らなかったが、上記した知見および今回の実験成績を基にして考察すると、以下のようなことが考えられた (図 40)。すなわち、BHA、TBHQ、ベンゼンやナフタレンのような芳香族炭化水素は分子サイズが小さいために AHR に対して親和性が低く、TCDD のようにリガンド活性を示さない。ところが、それぞれの親電子代謝物は Cys327 に対して共有結合する化学的性質を有するため、結果的に生じた *S*-アリール化反応により、AHR 活性化に係る本転写因子の高次構造の変化が生じるのかもしれない。

一方、脂肪族親電子物質である (*E*)-2-decenal は AHR 活性化能だけでなく、CYP1A1 誘導能も示さなかった (図 27B)。Avogadro ver 1.1.0 を用いて算出された (*E*)-2-decenal の分子サイズは $12.9 \times 4.9 \times 3 \text{ \AA}$ であり、TCDD のそれと殆ど変わらなかった。一般に炭素同士の単結合は自由に回転する事が可能であり、TCDD のような平面構造をとる化合物と異なり、自由に回転できることが AHR のリガンドにならない原因かもしれない。あるいは、芳香族親電子物質と脂肪族親電子物質では標的とするシステイン残基が異なる可能性も考えられる。例えば、Keap1 タンパク質においては、化合物によって修飾部位が異なる (122)。TBQ、エストロゲンキノン、1,2-NQ は Keap1 の重要とされているシステイン残基 (Cys151, Cys273, Cys288) のうち少なくとも Cys151 に結合するが (80, 81, 131)、直鎖構造を持つ PGJ2 やニトロ脂肪酸は Cys151 ではなく Cys273 に親和性が高い (122, 140)。

以上のことから、本転写因子は、古典的なリガンドだけではなく、キノン化合物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。Hepal 細胞における各親電子物質の活性化の強さは $1,4\text{-BQ} < \text{TBQ} < 1,2\text{-NQ} = 1,4\text{-NQ}$ であり、二環の分子のほうが強い活性化剤であると考えられる。Hepal, HepG2 もしくは A549 細胞だけではなく、正常細胞であるマウス由来初代肝細胞においても同様なキノン化合物による CYP1A1 の誘導が見られる (データ未掲載) ことから、当該親電子物質による CYP1A1 の誘導は種、臓器、およびがん細胞特異的な現象ではないことが示唆される。

2.4. まとめ

- ・ BHA, TBHQ, ナフタレンおよびベンゼンは CYP1A1 を誘導しない.
- ・ 親電子化合物である TBQ, 1,2-NQ, 1,4-NQ, および 1,4-BQ は AHR を活性化する.

2.5. 図表 図 2 および図 23-40, 表 5

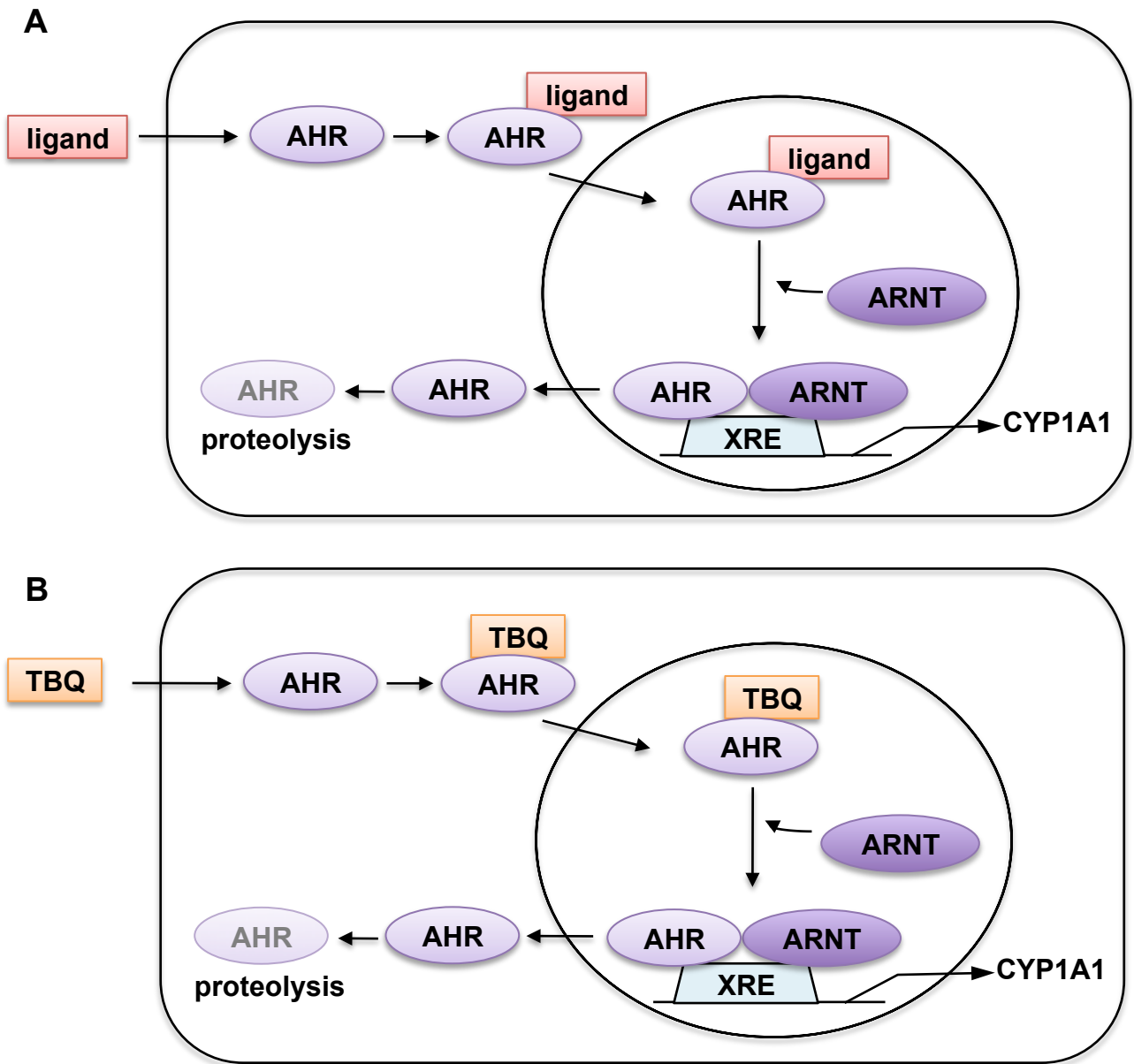


図23. AHR活性化機構

簡略化したAHRの活性化機構を示す. A. AHRに多環芳香族炭化水素に代表されるリガンドが結合するとAHRは核へ移行し, ARNTとヘテロダイマーを形成して, 異物応答領域 (XRE) に結合する. それに伴い, CYP1A1等の下流タンパク質が誘導される. B. TBQはリガンドとなりえないと想定されるが, AHRは本化合物を感知し, 同様な機序でCYP1A1を誘導するのではないかと想定した.

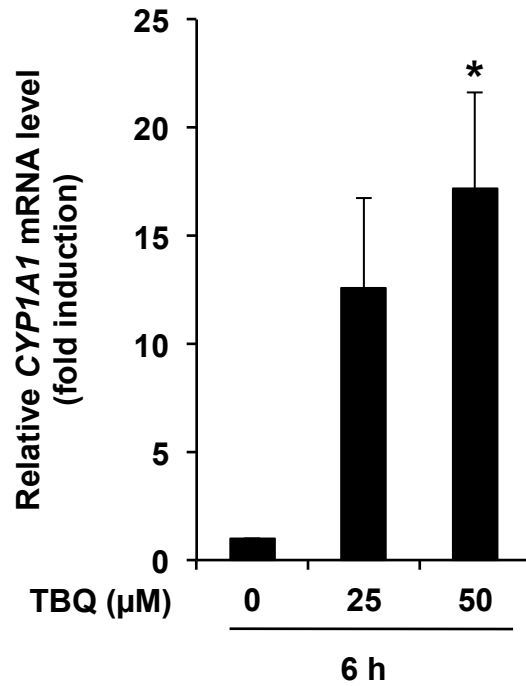


図24. A549細胞におけるTBQによるCYP1A1 mRNAの発現誘導

TBQ (0-50 μM) にA549細胞を6時間曝露した. 曝露後, 本細胞を回収してRT-PCRによりCYP1A1のmRNAの誘導を検討した. 同様の検討を3回行った平均値±標準誤差 (SE) として示す. *, $p < 0.05$ vs. control.

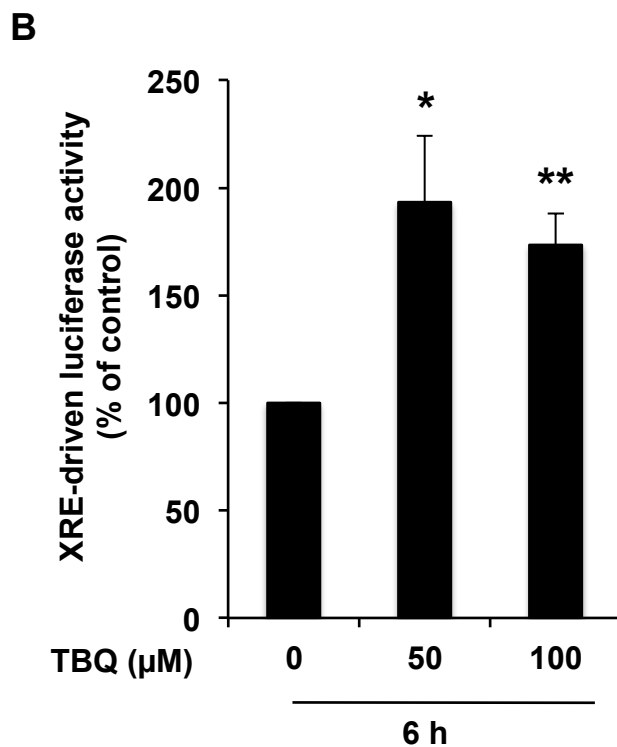
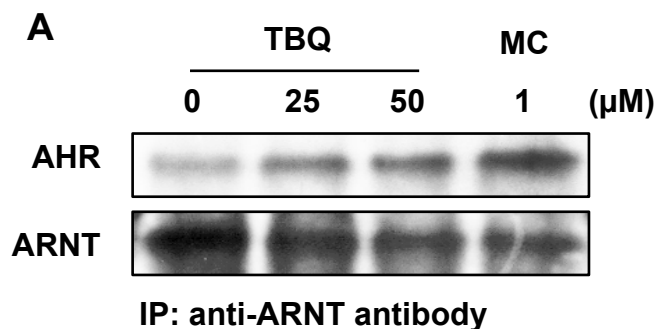


図25. A549細胞におけるTBQによるAHRの核移行およびXREの活性化

A. A549細胞をMG132にを3時間曝露した後、TBQに30分間曝露した。曝露後、本細胞を回収して、4.3.に従い、免疫沈降反応を行った。3-メチルコランズレン (MC) は陽性コントロールとして用いた。

B. A549細胞にXRE-Luciferaseベクターを導入し、12時間後に実験培地に交換し、さらに12時間後に実験に用いた。0-100 μM のTBQに曝露し、6時間後に回収して、6.2.に示した方法でルシフェラーゼ活性測定を行った。同様の検討を3回行った平均値 \pm 標準誤差 (SE) として示す。*, $p < 0.05$. **, $p < 0.01$ vs. control.

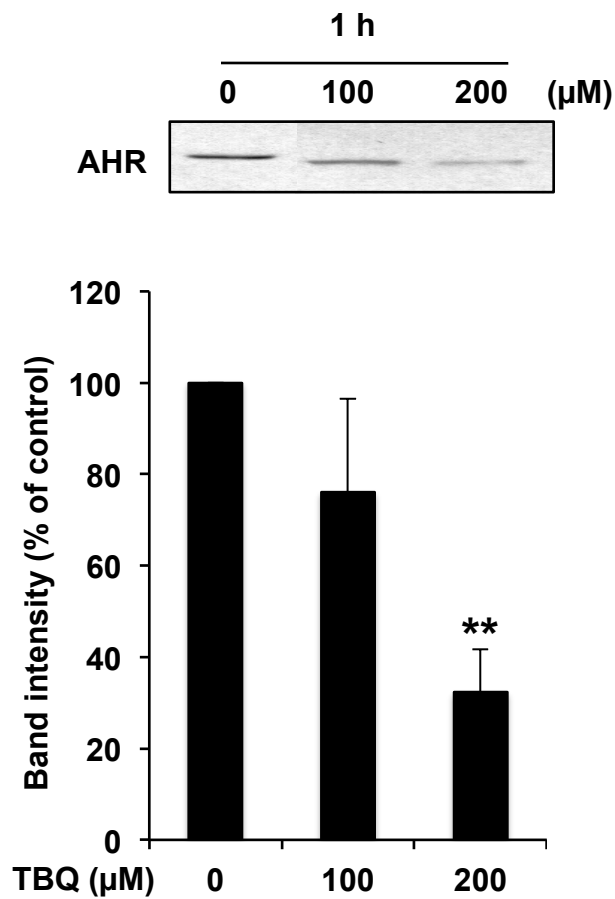


図26. TBQによる細胞内AHRの修飾

A549細胞にMG132を3時間前処理し, 0-200 μMのTBQに1時間曝露した後に回収して, BPM標識アッセイを行った. バンド強度をImageJ softwareで定量化した(下図). 同様の検討を3回行った平均値±標準誤差 (SE) として示す. **, $p < 0.01$ vs. control.

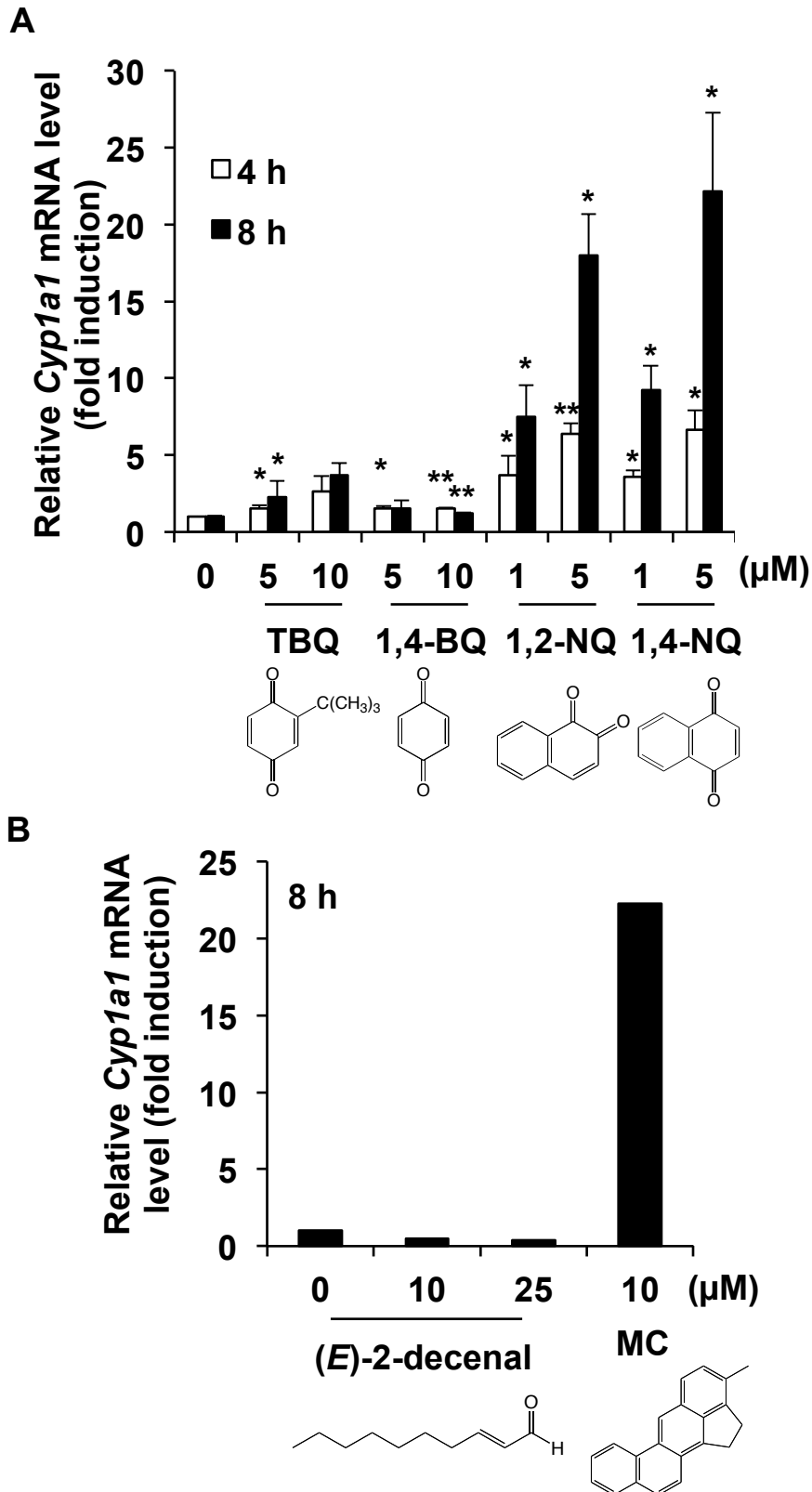


図27. 親電子物質によるCYP1A1mRNAの発現変動

A. Hepa1細胞をキノン化合物に4および8時間曝露した. 本細胞を回収してリアルタイムPCRによりCYP1A1の誘導を検討した. B. Hepa1細胞を(E)-2-decenalに8時間曝露した. 本細胞を回収してリアルタイムPCRによりCYP1A1の誘導を検討した. MCは陽性コントロールとして用いた. 同様の検討を3回行った平均値±標準誤差 (SE) として示す. *, $p < 0.05$. **, $p < 0.01$ vs. control.

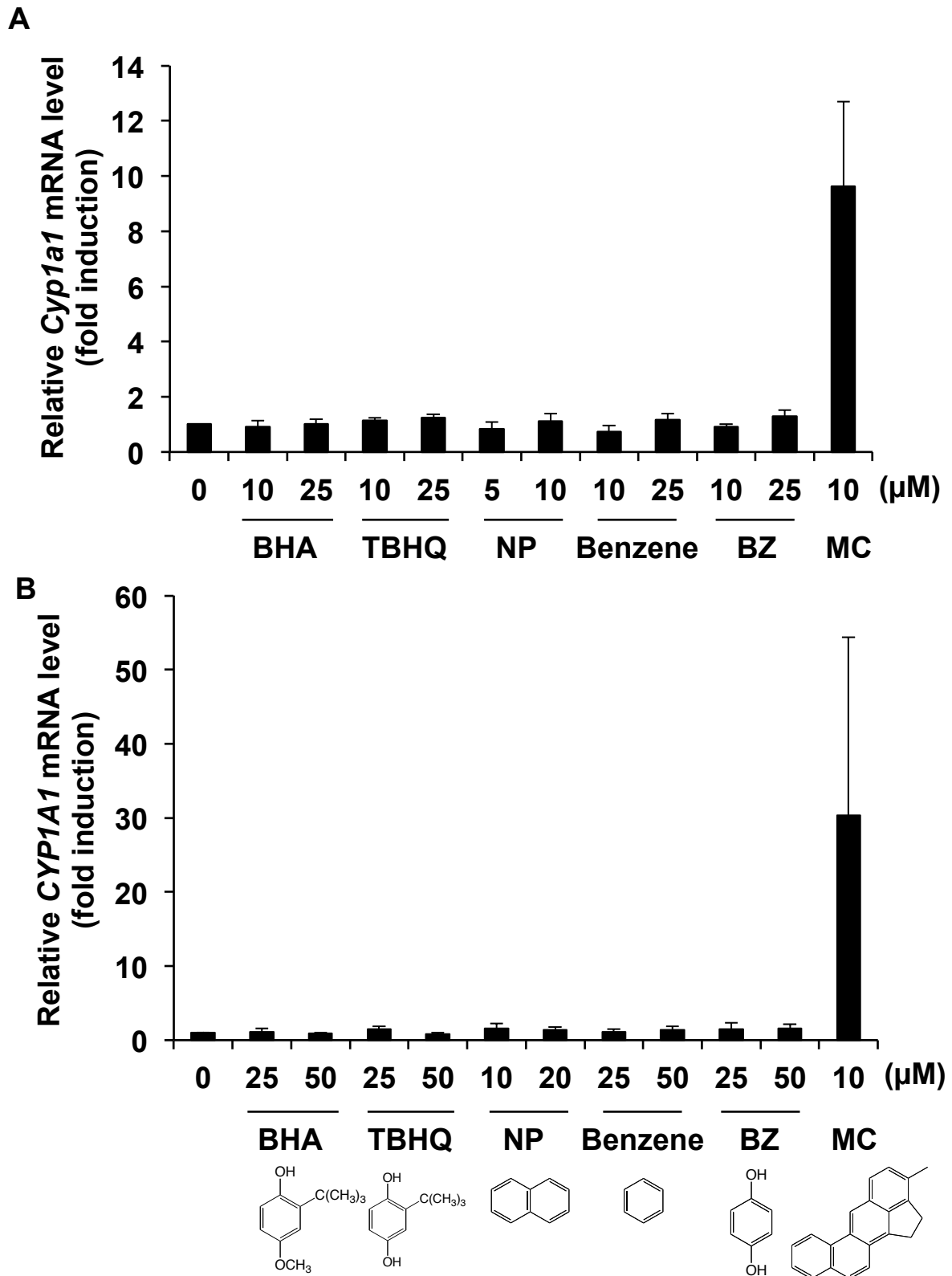


図28. 親電子前駆物質によるCYP1A1mRNAの発現変動

A. Hepa1細胞を親電子前駆物質に4時間曝露した。本細胞を回収してリアルタイムPCRによりCYP1A1の誘導を検討した。B. HepG2細胞を親電子前駆物質に4時間曝露した。本細胞を回収してリアルタイムPCRによりCYP1A1の誘導を検討した。同様の検討を3回行った平均値±標準誤差 (SE) として示す。NP=Naphthalene, BZ=1,4-Benzodiol

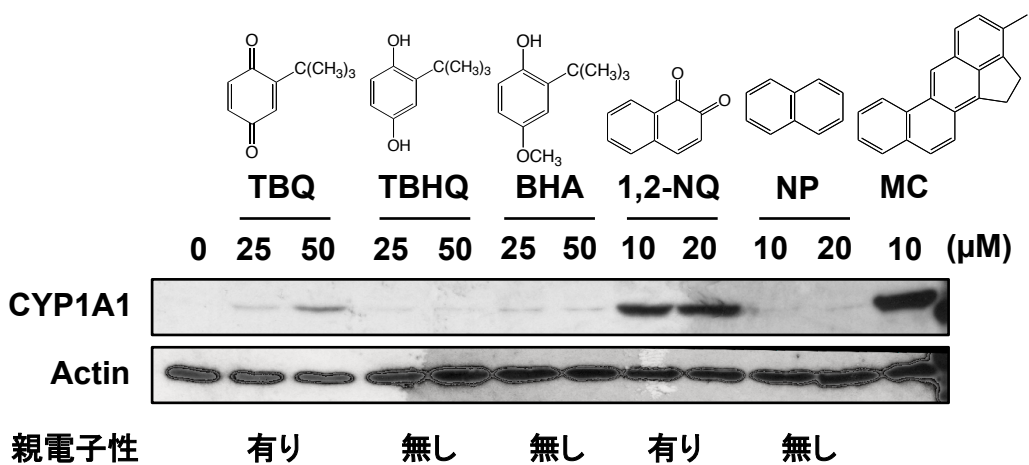


図29. HepG2細胞における環境中親電子物質によるCYP1A1タンパク質の発現変動

TBQ, TBHQ, BHA, 1,2-NQ, naphthalene (NP), および陽性コントロールとしてMCにHepG2を8時間曝露した。曝露後、細胞を回収してウエスタンブロットを行った。

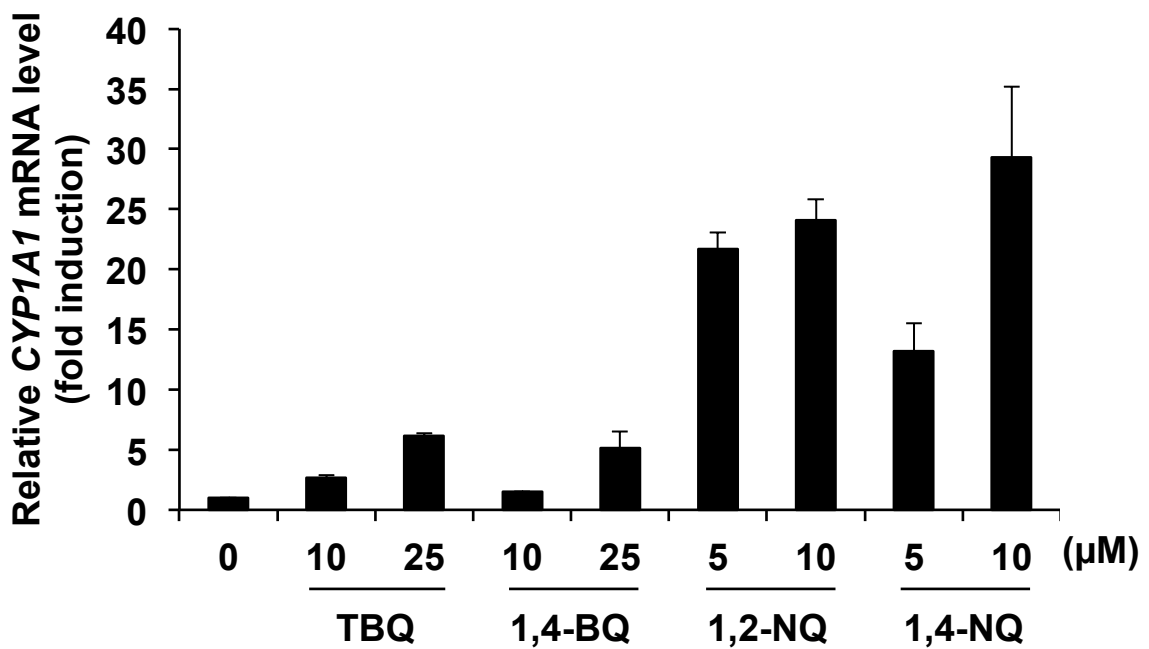


図30. HepG2細胞における親電子物質によるCYP1A1mRNAの発現変動

HepG2細胞にキノン化合物を4時間曝露した. 細胞を回収してリアルタイムPCRによりCYP1A1の誘導を検討した. 同様の検討を3回行った平均値±標準誤差 (SE) として示す.

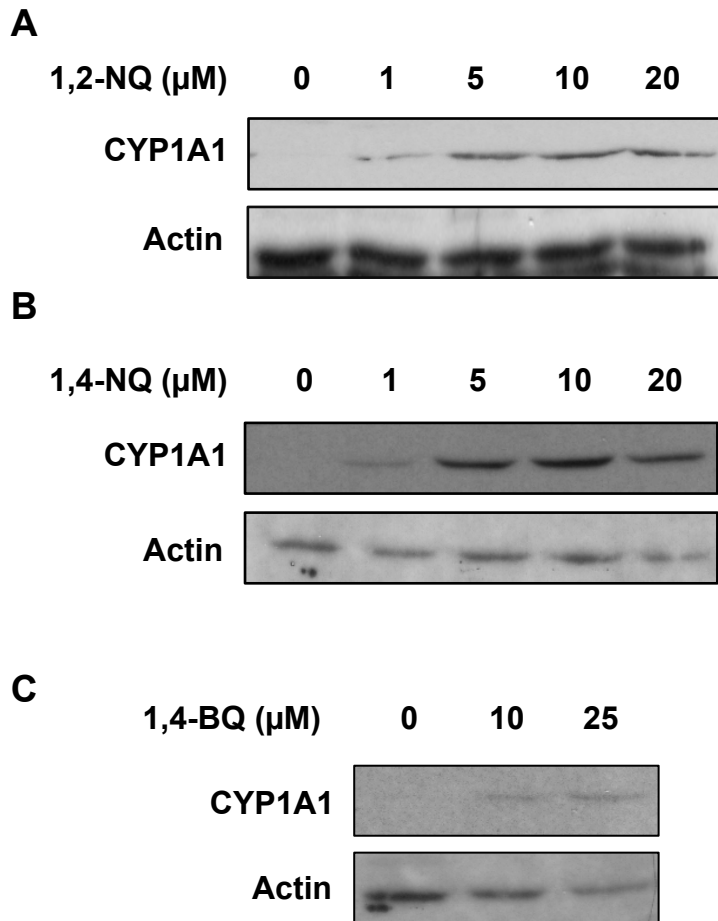


図31. HepG2細胞における1,2-NQ, 1,4-NQ, および1,4-BQによるCYP1A1タンパク質の発現誘導

A. 1,2-NQ (0-20 μM) をHepG2細胞に8時間曝露した後、細胞を回収してウエスタンブロットによりCYP1A1の誘導を検討した。B. 1,4-NQ (0-20 μM) をHepG2細胞に8時間曝露した。曝露後、細胞を回収してウエスタンブロットによりCYP1A1の誘導を検討した。C. 1,4-BQ (0-25 μM) をHepG2細胞に8時間曝露した。曝露後、細胞を回収してウエスタンブロットによりCYP1A1の誘導を検討した。

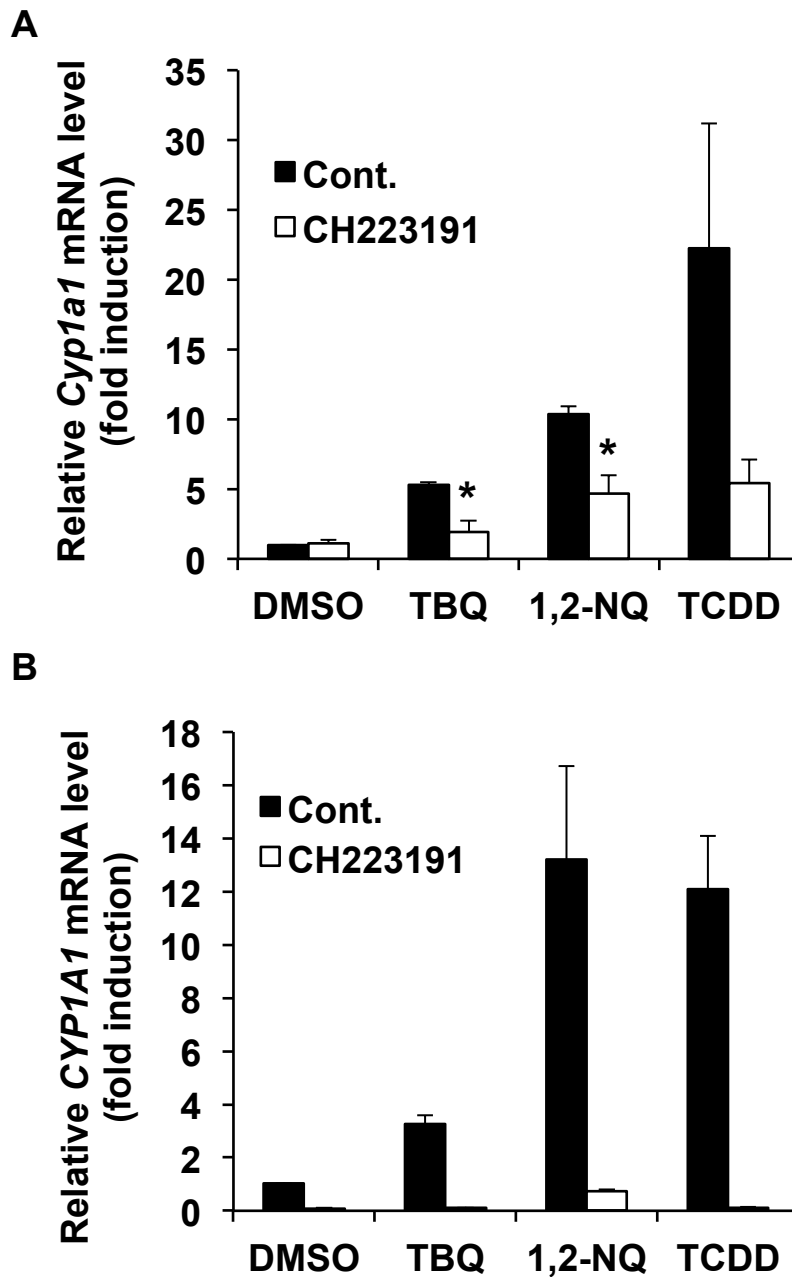


図32. TBQによるCYP1A1の発現誘導におけるAHR競合阻害剤の影響

A. Hepa1細胞に10 μ MのCH223191を1時間曝露した後に、TBQおよび1,2-NQを4時間曝露した。B. HepG2細胞に10 μ MのCH223191を1時間曝露した後に、TBQおよび1,2-NQを4時間曝露した。TCDDは阻害剤の効果に対する陽性コントロールとして用いた。曝露後、細胞を回収してリアルタイムPCRによりCYP1A1の誘導を検討した。同様の検討を3回行った平均値 \pm 標準誤差 (SE) として示す。*, $p < 0.05$ vs. control.

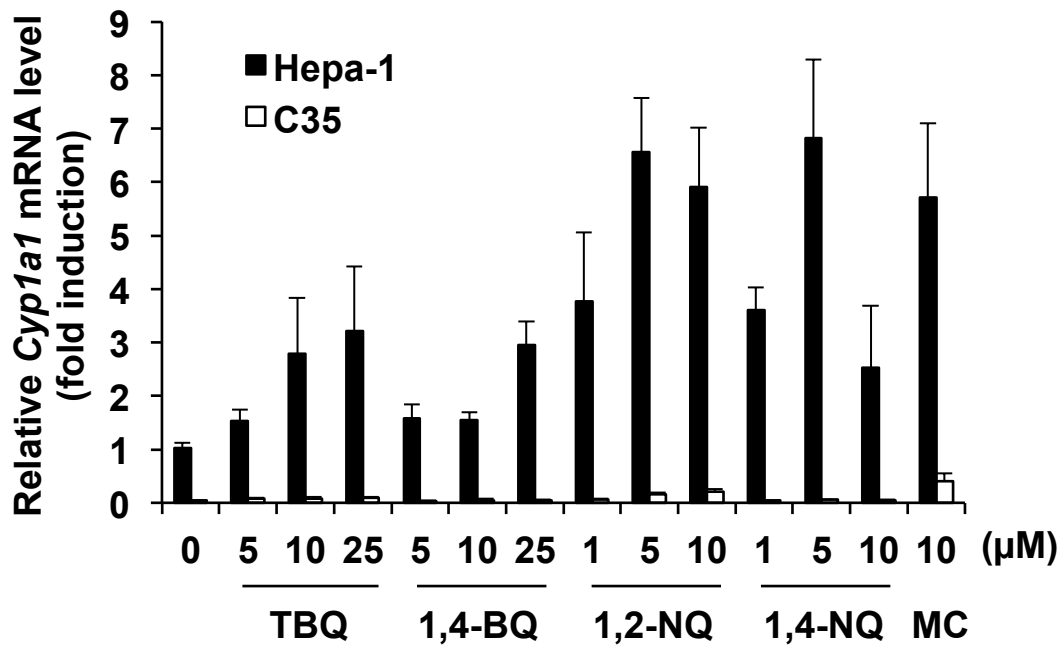


図33. TBQによるCYP1A1の発現誘導におけるAHRの関与

Hepa1細胞およびC35細胞に各濃度のキノン化合物を4時間曝露した。MCは陽性コントロールとして用いた。曝露後、細胞を回収してリアルタイムPCRによりCYP1A1の誘導を検討した。同様の検討を3回行った平均値±標準誤差 (SE) として示す。

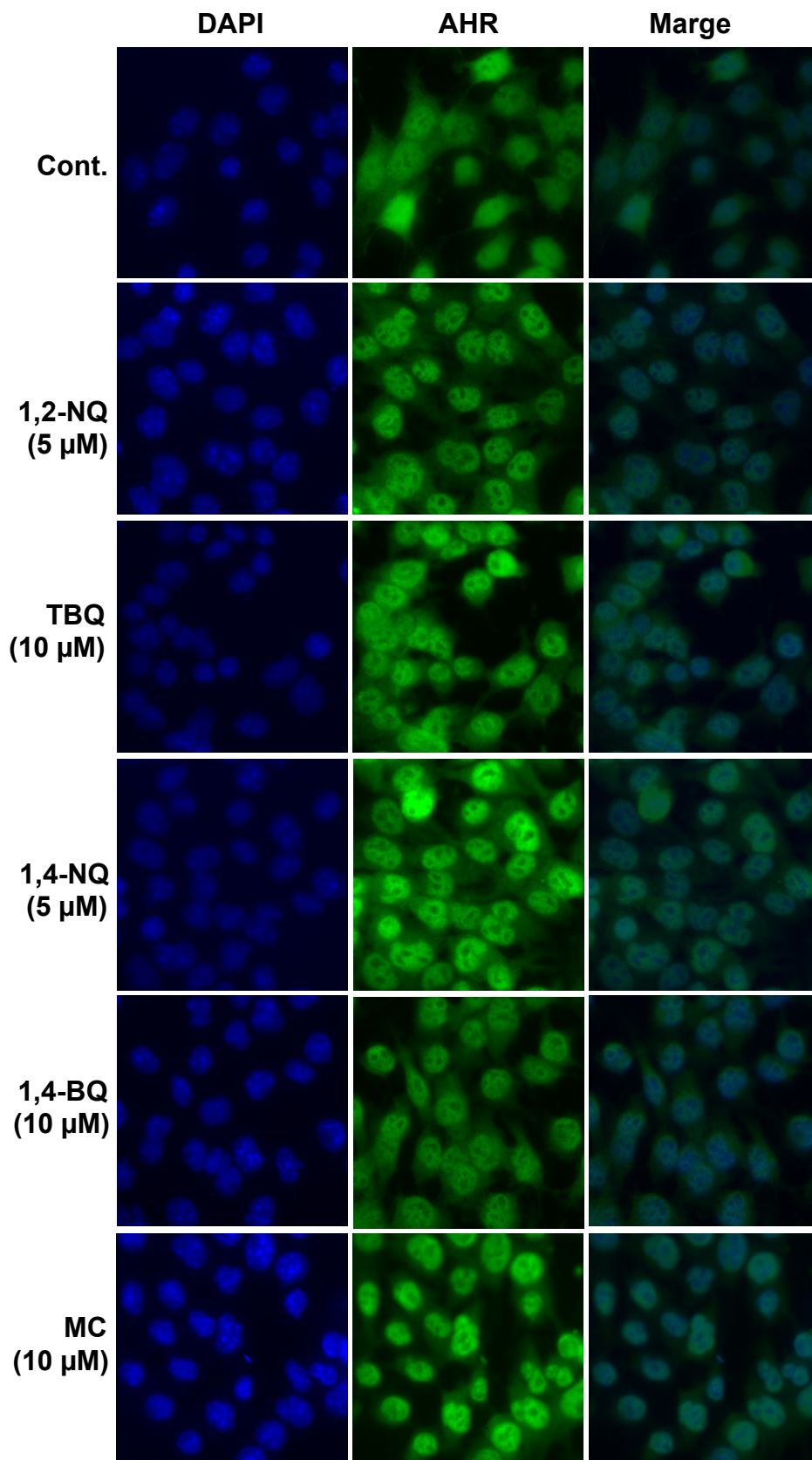


図34. Hepa1細胞におけるキノン化合物によるAHRの核移行

Hepa1細胞に1,2-NQ, TBQ, 1,4-NQもしくは、1,4-BQを60分間曝露した。曝露後、細胞を回収して、5.5.に従い、蛍光免疫染色を行った。青: DAPI, 核; 緑: Alexa488, AHR.

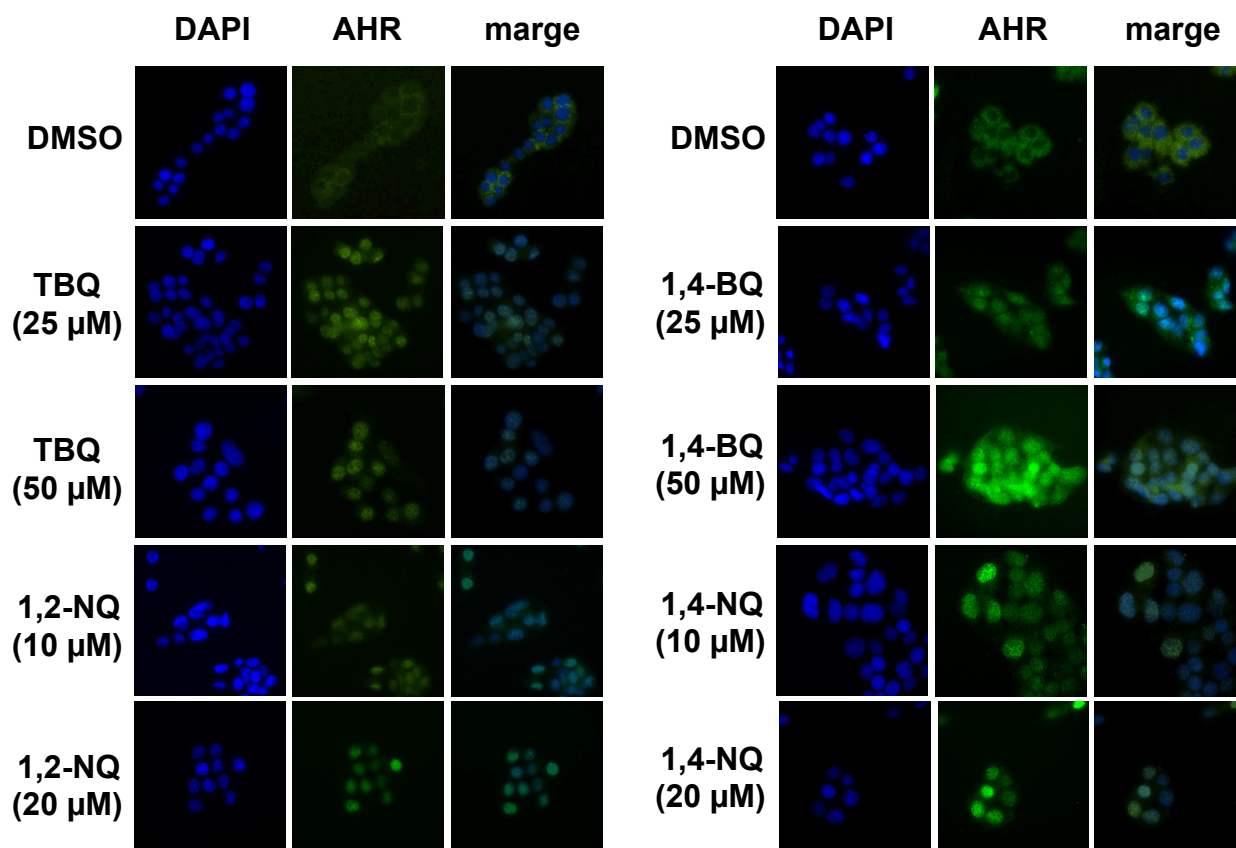


図35. HepG2細胞におけるTBQおよび1,2-NQによるAHRの核移行

HepG2細胞にTBQ, 1,2-NQ, 1,4-BQ, もしくは1,4-NQを60分間曝露した。曝露後, 細胞を回収して, 5.5.に従い, 蛍光免疫染色を行った。
青: DAPI, 核; 緑: Alexa488, AHR.

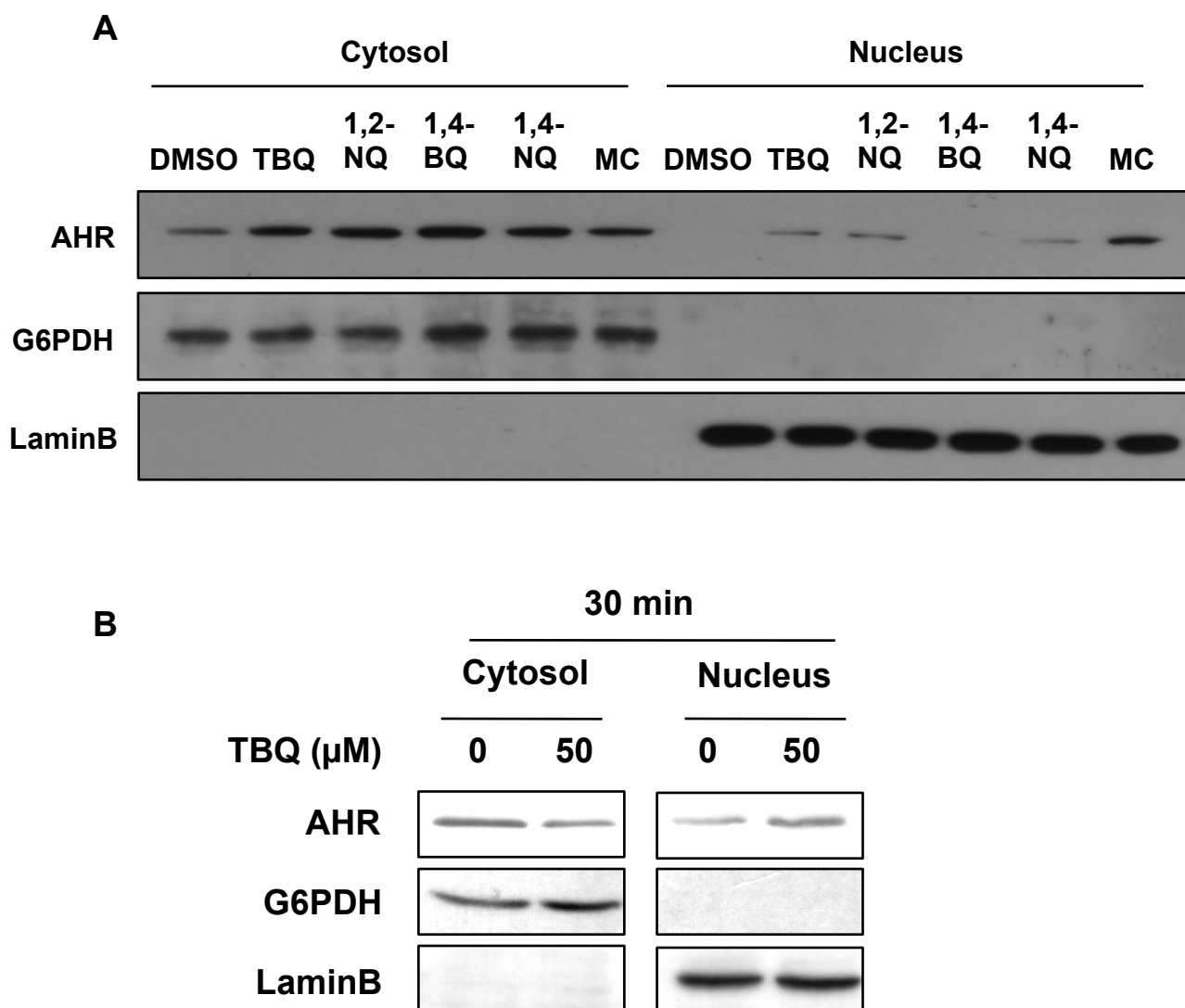


図36. キノン化合物によるAHRの核移行

A. Hepa1細胞に1,2-NQ, TBQ, 1,4-NQもしくは, 1,4-BQを60分間曝露した. 曝露後, 細胞を回収してウエスタンブロットによりCYP1A1の誘導を検討した. B. HepG2細胞に10 μMのMG132を3時間曝露した後に, TBQを30分間曝露した. 曝露後, 細胞を回収して, 5.1.に従い核分画を抽出し, ウエスタンブロットによりCYP1A1の誘導を検討した.

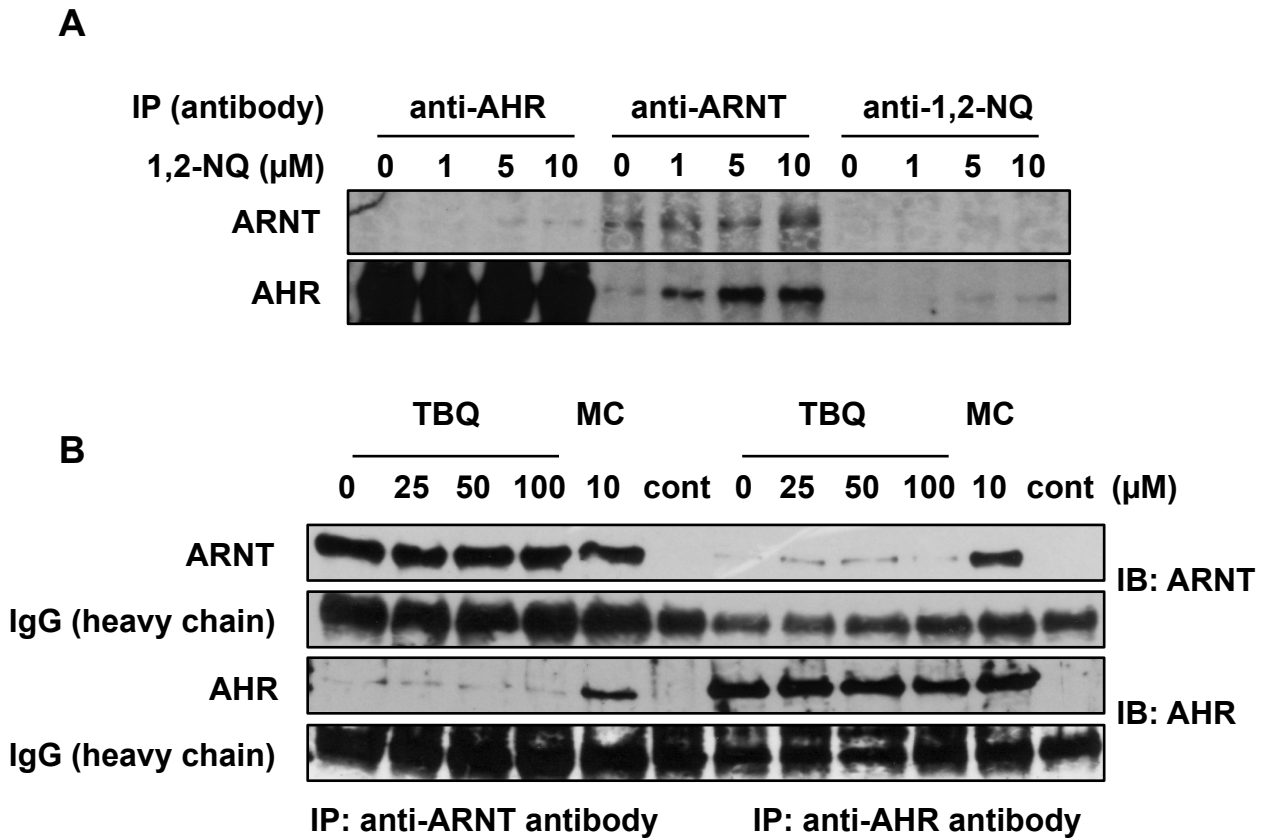


図37. TBQもしくは1,2-NQによるAHRとARNT相互作用の亢進

A. Hepa1細胞に1,2-NQを60分間曝露し、細胞を回収して、9.に従い、免疫沈降反応を行った。B. HepG2細胞に10 μM のMG132を3時間曝露した後に、TBQを30分間曝露した。曝露後、細胞を回収して、9.に従い、免疫沈降反応を行った。

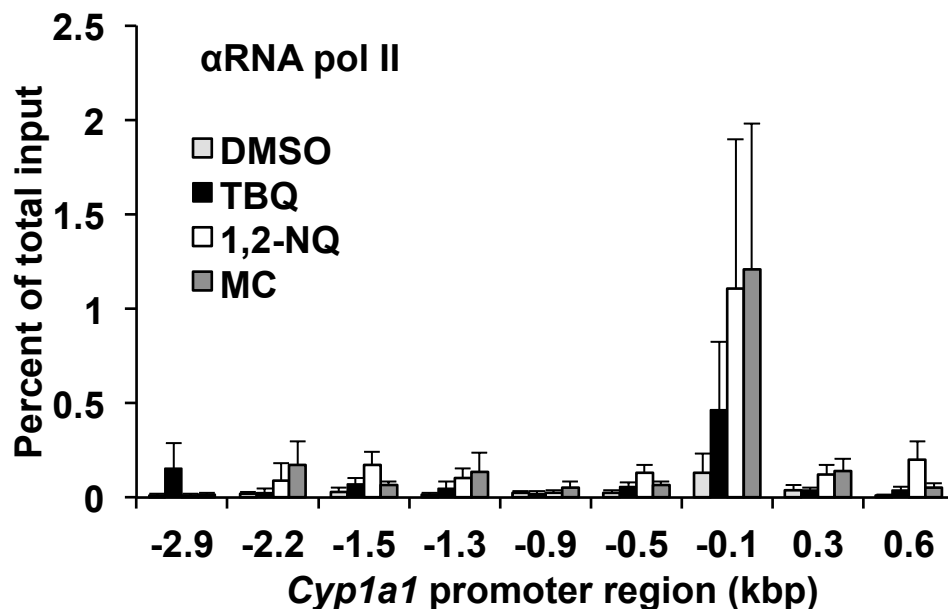
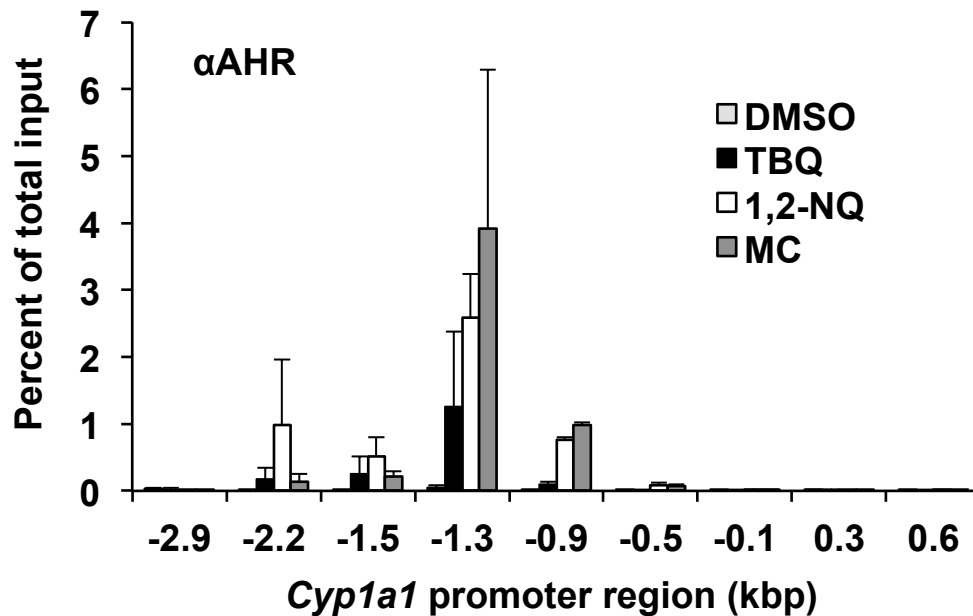
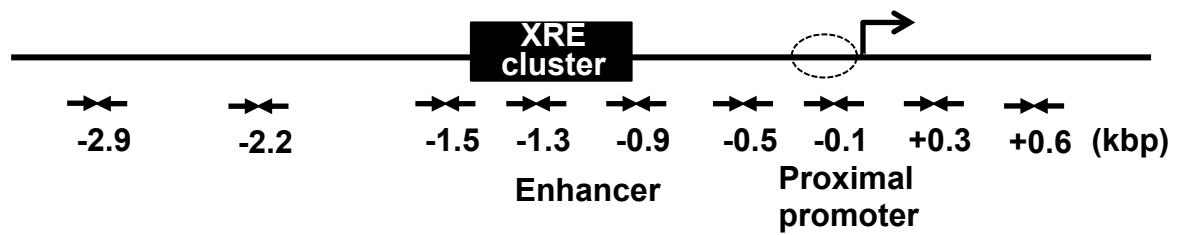


図38. TBQおよび1,2-NQによるAHRのXRE領域への結合

Hepa1細胞にTBQ,もしくは1,2-NQを90分間曝露した. 曝露後, 細胞を回収して実験方法9に従い, CYP1A1プロモーター領域についてChipアッセイを行った. MCは陽性コントロールとして用いた. 同様の検討を3回行った平均値±標準誤差 (SE) として示す.

BR/HLH

1 MSSGANITYA SRKRRKPVQK TVKPIAEGI KSNPSKRHRD RLNTELDRLA

51 SLLPFPQDVI NKLDKLSVLR LSVSYLRAKS FFDVALKSTP ADRNGGQDQC

PAS A

101 RAQIRDWQDL QEGEFLLQAL NGFVLVVTAD ALVFIASSTI QDYLGFGQSD

151 VIHQSVYELI HTEDRAEFQR QLHWALNPDS AQGVDEAHGP PQAAYVYTPD

201 QLPPENASFM ER**C**FR**C**RLR**C** LLDNSSGFLA MNFQGRLKYL HGQNKKGKDG

PAS B

251 ALLPPQLALF AIATPLQPPS ILEIRTKNFI FRTKHKLDFT PIG**C**DAKGQL

301 ILGYTEVEL**C** TRGSGYQFIH AADILH**C**AES HIRMIKTGES GMTVFRLLAK

351 HSRWRWVQSN ARLIYRNGRP DYIATQRPL TDEEGREHLQ KRSTSLPFMF

401 ATGEAVLYEI SSPFSPIMDP LPIRTKSNTS RKDWAPQSTP SKDSFHPSSL

451 MSALIQQDES IYL**C**PPSSPA LLDSHFLMGS VSK**C**GSWQDS FAAAGSEAAL

C末端領域

501 KHEQIGHAQD VNLALSGGPS ELFPDNKNND LYSIMRNLGI DFEDIRSMQN

551 EEFFRTDSTA AGEVDFKIDIT DEILTYVQ DSLNNSTLLN SAC**C**QQQPVTQ

601 HLS**C**MLQERL QLEQQQLQ PPQALEPQQ QL**C**QM**V****C**PQQ DLGPKHTQIN

651 GTFASWNPTP PVSFN**C**PQQE LKHYQLFSSL QGTAQEFPYK PEVDSVPYTQ

701 NFAP**C**NQPLL PEHSKSVQLD FPGRDFEPLS HPTTSNLDFV **S**CLQVPENQS

751 HGINSQSAMV SPQAYYAGAM SMYQ**C**QPGPQ RTPVDQTQYS SEIPGSQAFL

801 SKVQS

図39. AHRアミノ酸配列

mus musculus AHR (accession No. BAA07469)のアミノ酸配列を示す。Basic1, 2, と二つのhelixはbasic region/helix-loop-helix (BR/HLH) モチーフを構成する。PAS AはAHR translocator (ARNT) と二量体を形成するための結合部位, PAS Bはリガンドおよび熱ショックタンパク質 (Hsp) 90との結合部位である。Q-richドメインはAHRの転写活性化に参与する。(0.4.2. 参照)

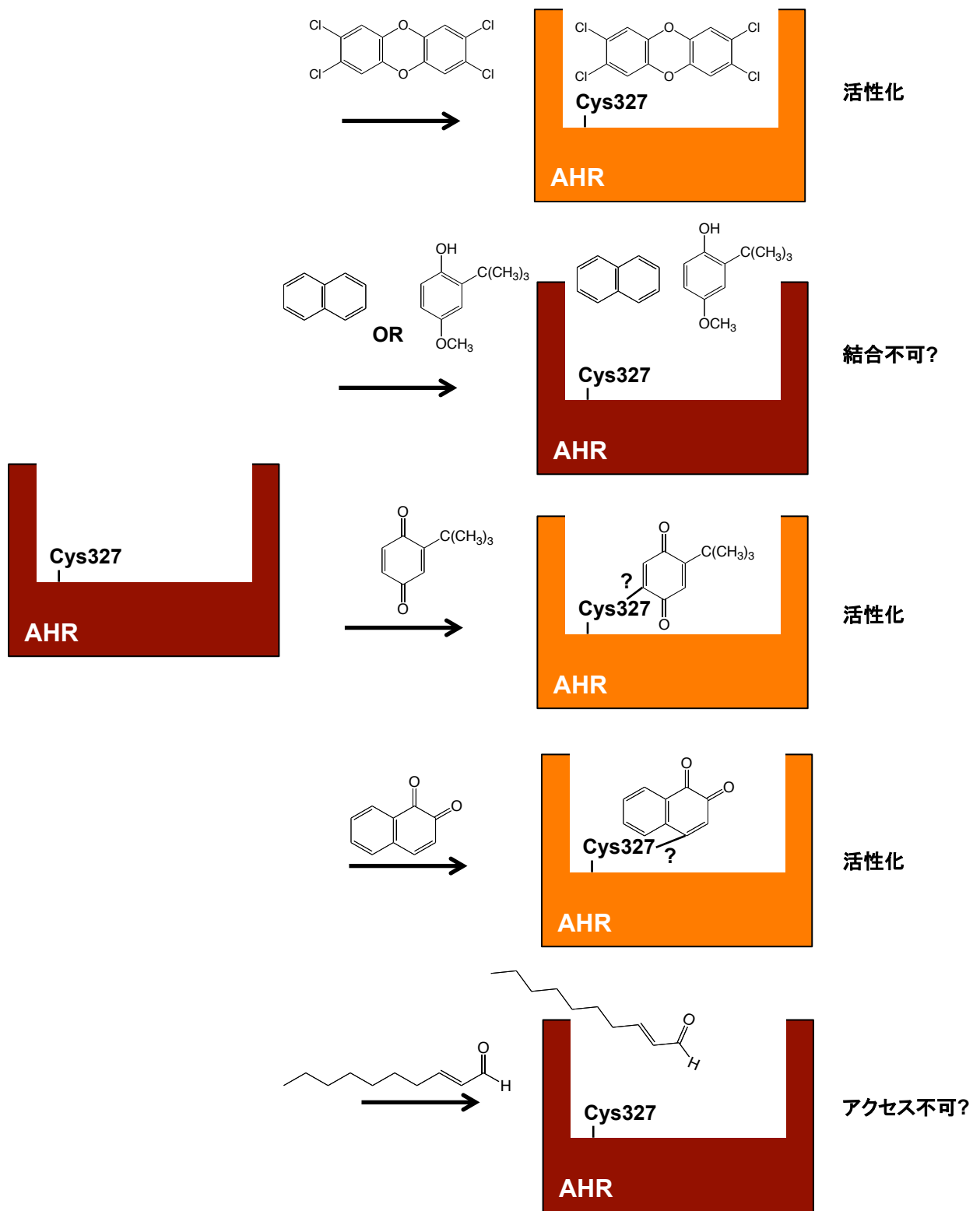


図40. AHR活性化とリガンド

キノン化合物によるAHR活性化の想定される模式図を示す。ナフタレンやTBHQ等はサイズが小さすぎる等の理由からリガンド結合部位に親和性を持たない。TBQや1,2-NQ等のキノン化合物はポケット中のシステイン残基へ共有結合することで活性化する。(E)-2-decenalはリガンド結合部位にアクセスできない、もしくは活性化に関与しない部位に結合するためにAHRを活性化しない。

表5. A549細胞におけるTBQにより増減したmRNA量の解析

Gene	Ratio
Early growth response 1 (EGR1)	39.4
Cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 1 (CYP1A1)	27.9
Matrix metalloproteinase 1 (interstitial collagenase) (MMP1)	26
Cytochrome P450, family 1, subfamily B, polypeptide 1 (CYP1B1)	17.5
Heat shock 70kDa protein 6 (HSP70B') (HSPA6)	15.9
Protein Ag2 homolog (AG2)	15.8
Early growth response 2 (EGR2)	12.6
Apoptosis-associated tyrosine kinase (AATK)	9.9
Lymphocyte antigen 6 complex, locus K (LY6K)	9.1
FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog B (FOSB)	9.0

Gene	Ratio
Semenogelin I (SEMG1)	0.05
CCCTC-binding factor (zinc finger protein)-like (CTCF1)	0.06
Chemokine (C-C motif) ligand 13 (CCL13)	0.07
Zinc finger protein 642 (ZNF642)	0.07
Corneodesmosin (CDSN)	0.08
NIMA (never in mitosis gene a)- related kinase 10 (NEK10)	0.08
Cerebellin 2 precursor (CBLN2)	0.08
Mannosyl (alpha-1,3-)-glycoprotein beta-1,4-N-acetylglucosaminyltransferase, isozyme C (putative) (MGAT4C)	0.09
Phosphodiesterase 11A (PDE11A)	0.09
Leukocyte cell-derived chemotaxin 2 (LECT2)	0.09

TBQ (50 μ M) をA549細胞に6時間曝露した。曝露後、mRNAを抽出し、マイクロアレイを行った (n=1)。対照群と比較して発現の増減が大きかった10個の遺伝子名を示す。

総合考察

化学物質は環境中に広く存在し、生活環境 (大気, 水および土壌) での曝露, 食物の摂食等により我々の体内に侵入する. 一部の化合物は生体内で代謝活性化を受けて, 反応性の高い親電子物質へ変換される (1). 本研究では, 生体防御システムに重要な環境化学物質に応答する転写因子に注目して, 親電子物質の関与を明らかにすることを目的とした. BHA は単機能的な化合物に分類されているが, その代謝物である TBHQ に関しては, AHR の活性化および CYP1A1 の誘導が報告されている (26, 103, 104). 本研究では, 親電子性を有する TBQ が TBHQ の二機能的な働きに貢献しているのではないかと仮定して, Nrf2 および AHR 両転写因子に対する TBQ の関与を検討した.

TBQ は親電子性とレドックスサイクルを介した ROS 産生能を有する化合物であるが, Keap1 の酸化修飾ではなく親電子修飾が TBQ による Nrf2 の活性化に重要であることを明らかにした. この結果を支持するように, 1,2-NQ やエストロゲンキノン等のキノン化合物もしくはメチル水銀などの親電子物質は, TBQ と同様に ROS 産生能を有するが, Keap1 の親電子修飾を介して Nrf2 を活性化する (データ未掲載)(80, 81). さらに, Keap1 の TBQ 修飾による本転写因子活性化が GSH によって一部制御されていることを明らかにした. Keap1 は親電子物質に応答するセンサーであるが, Nrf2 の活性化が主に注目されており, 修飾された Keap1 はどのような運命をたどるのかに関する報告は希有であった. 本研究では TBQ をモデルとして, GSH を介した S-トランスアリアル化反応によって Keap1 の親電子修飾が解除されることを見いだした. GSH は, タンパク質が修飾される前に親電子物質を抱合すると理解されているが, 今回明らかにした修飾後のタンパク質に作用し親電子物質を抱合する本反応は GSH の新しい機能の一つといえよう.

親電子物質による細胞内タンパク質の修飾は, 被修飾タンパク質の構造変化と細胞毒性に関与する (141-144). IAB は S_N2 反応を介してタンパク質のシステイン残基を不可逆的に修飾する親電子物質であるため, 高い細胞毒性を示す (143). しかしながら, 親電子物質による Keap1 への親電子修飾は, Nrf2 を活性化して親電子物質に対する防御作用を発揮する (4, 63, 131, 145). BHA や TBHQ は Nrf2 活性化を介した化学予防的作用を持つ化合物とされている (146, 147). ブロッコリースプラウトに含有されているスルフォラファンは, Nrf2 活性化能を呈する植物中親電子物質として知られているが (16), Keap1 のシステイン残基との共有結合は可逆的である (148, 149). 最近の統一の見解によると, タンパク質修飾の可逆性が担保されている化学物質は, そうでない物質より有害性は低いことが示唆されている (56, 143). 親電子物質によるタンパク質修飾の可逆性について予測できるシステムが構築されれば, 化学物質の安全評価に有益な情報を提供することが期待される. これまでの研究により, BHA および TBHQ の Nrf2 活性化経路は複数あることが報告されているが (63, 66, 150, 151), 本研

究より、BHA や TBHQ の代謝物である TBQ が Keap1 を可逆的に修飾する Nrf2 活性化剤であるという新たな知見を示したことになる。

第 2 章では、AHR が親電子物質に応答するという報告がないことから、TBQ だけではなく、1,2-NQ 等の環境中親電子物質も用いて検討した。本研究で用いたキノン化合物は TBQ と同様に CYP1A1 を誘導するが、親電子性を持たない母化合物では CYP1A1 の誘導が見られなかったことから、AHR は親電子物質に応答する転写因子であることを示すことができた (図 27-29, および 40)。興味深いことに、高濃度の TBQ 曝露 (100 μ M) では CYP1A1 の誘導および AHR 核移行はむしろ抑制された (図 41A, 一部未掲載)。このことは、高濃度のキノン化合物曝露は、AHR による応答システムを破綻させることを示唆している (図 41B)。AHR の活性化が抑制されるような濃度の TBQ 曝露であっても、Nrf2 の活性化および下流タンパク質 (HO-1) の誘導は見られることから (図 41A)、AHR の方がキノン化合物濃度に対する応答能が高いと考えられた (図 41B)。一方、脂肪族アルデヒドである (*E*)-2-decenal は CYP1A1 誘導しなかったことから (図 27B)、第二相および第三相異物代謝酵素のみを誘導する単機能的な化合物であることが示された (データ未掲載)。第 2 章で考察したように AHR 修飾部位の違いや活性部位へのアクセスし易さの違いに加えて、以下のことも考えられる。すなわち、(*E*)-2-decenal と似た構造の hydroxynonenal は、AHR のパートナータンパク質の一つであり AHR の安定化に関与する HSP90 を修飾し、そのシャペロン活性を阻害する (152, 153)。HSP90 活性阻害剤 (17-allylaminodemethoxygeldanamycin 等) は、HSP90 の阻害を介して AHR を不安定化し、BaP 等による CYP1A1 の誘導を抑制する (154)。よって、hydroxynonenal 等の HSP90 への親電子修飾は、AHR を不安定化することが示唆される。*(E)*-2-decenal も同様に、HSP90 を修飾することにより CYP1A1 を誘導できないのかもしれない。AHR は HSP90 以外に、XAP2 (AIP) および p23 のようなタンパク質と結合している (110)。XAP2 は AHR の核移行や転写活性化を抑制するとされ、HSP90 のコシャペロンである p23 は AHR の安定化に関与するとされているが、それらのタンパク質の関与については未だ不明な点が多い (95, 96, 155)。

ところで、親電子前駆物質である BHA やナフタレンは、序章でも記載したように、CYPs により代謝された後に酸化され、より反応性の高い親電子物質へと変換される。生じたキノン化合物は、細胞内の GSH 等により一部抱合されて排泄されるが、一部は AHR や Keap1 のようなタンパク質と共有結合する (図 42A)。AHR は、キノン化合物の修飾で活性化して第一相異物代謝酵素を誘導し、親化合物の代謝を促進することが予測される (図 42A)。例えば、AHR の下流遺伝子産物である CYP1A1 はナフタレンをナフタレン-1,2-oxide へと代謝し (156)、ナフトキノンへ変換される。代謝により親電子物質の局所濃度が高くなると、Nrf2 の活性化により解毒・排泄を促進する (図 42)。1,2-NQ の GSH 抱合体も一部 Nrf2 を活性化する (掛橋ら, フォーラム 2012, 衛生薬学・環境トキシコロジー, O7-2, 2012)。AHR が高濃度の親電物質の存在下でも活

性化するならば、さらに代謝を促進して親電子物質の局所濃度が細胞防御応答の閾値以上に高くなり、細胞内恒常性が破綻すると予想される。よって、本研究によって得られた、AHR と Nrf2 の応答の差異は理にかなっていると言える。これらのことを総合すると、“なぜ毒性の高い親電子物質を中間体として生成するのか”に対する一つの答えは、親電子物質に変換することで GSH 抱合を可能にすることであり、加えて、親電子物質を利用したさらなる防御応答を導くためと考えられるのではないだろうか。

親電子物質は生体内高分子と容易に結合するために、環境化学物質の曝露により、どの程度の親電子物質が生体内で変換されているかについて正確な報告はない。環境化学物を環境中から摂取することで、本研究で使用した濃度に生体内で到達し得るか否かは明らかにしていない。しかしながら、環境中親電子物質をモデルとした本研究で得られた知見は、生体内には親電子修飾を制御する仕組みや、様々な応答分子が存在することを示唆している。AHR に対する内在性リガンドとしてキヌレインが発見され注目されているが (157), AHR の役割については未だ未開な点が多い。AHR は TBQ のようなキノン骨格を持つ親電子物質に応答するという本研究で得られた新奇知見が、例えば化合物の毒性評価等、少しでも研究の発展に貢献できれば幸いである。また、親電子物質に応答する転写因子がさらに発見され、内在性親電子物質の意義が解明されることを期待する。

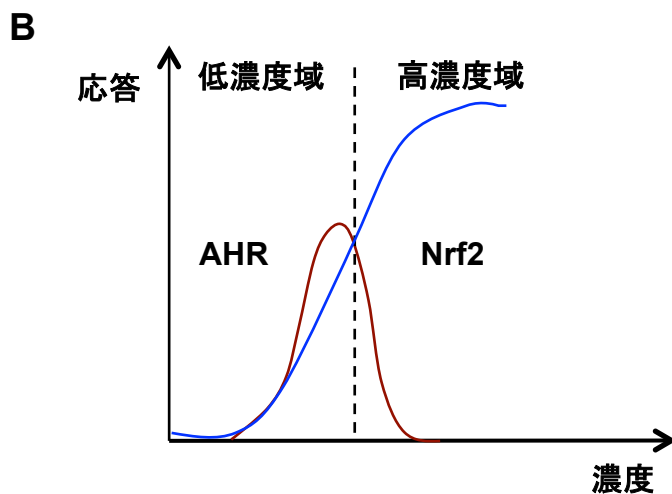
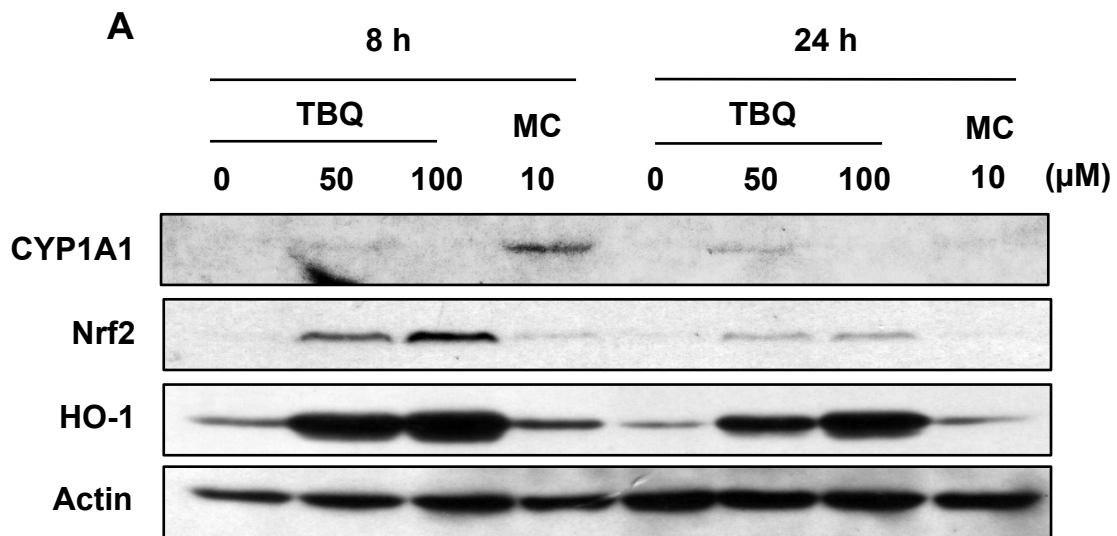


図41. TBQ24時間曝露によるCYP1A1の発現誘導およびNrf2の活性化

A. TBQ (50および100 μM) をHepG2細胞に8および24時間曝露した。曝露後、細胞を回収してウエスタンブロットによりCYP1A1, Nrf2およびHO-1の誘導を検討した。B. 予想されるTBQ曝露濃度とAHRおよびNrf2活性化のピーク。AHRはTBQのようなキノン化合物の比較的low濃度曝露で応答のピークを迎える。一方で、Nrf2はAHRが応答しなくなる濃度でも機能し、化合物の解毒排泄に寄与すると考えられる。

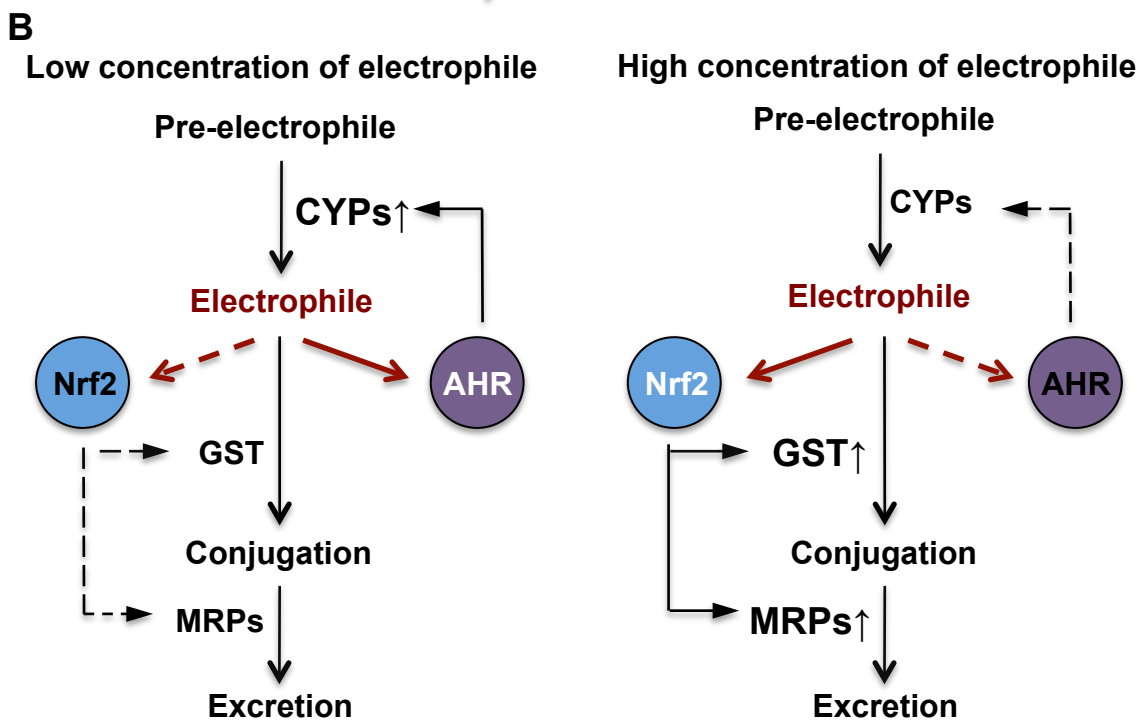
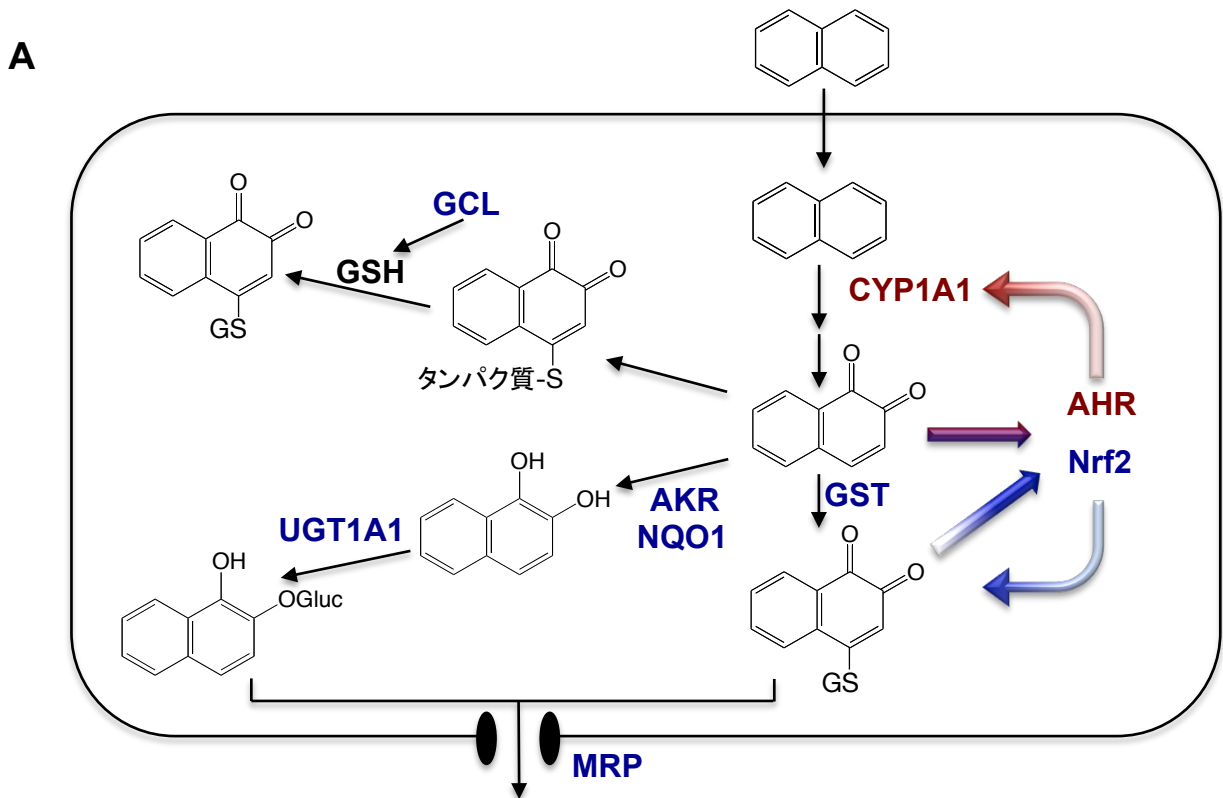


図42. Nrf2およびAHRによる、親電子前駆物質に対する細胞応答

A. ナフタレンがCYPsにより代謝されナフトキノンを生じると、ナフトキノンは第一相異物代謝酵素を活性化し、さらにナフタレンは代謝される。するとナフトキノンをよりNrf2は活性化し第二相・第三相異物代謝酵素が誘導され、抱合・排泄が促進する。

B. 低濃度の親電子物質存在下では、より反応性の高い転写因子が働く。AHRの方がNrf2に比べて感受性が高いように思われる(TBQより1,2-NQの方が、その傾向が顕著に見受けられる)。高濃度域では、転写因子Nrf2が働いて解毒・排泄を促進する。

引用文献

- (1) Miller, J. A., and Miller, E. C. (1947) The metabolism and carcinogenicity of p-dimethylaminoazobenzene and related compounds in the rat. *Cancer Res*, 7, 39-41.
- (2) Talalay, P., Fahey, J. W., Holtzclaw, W. D., Prester, T., and Zhang, Y. (1995) Chemoprotection against cancer by phase 2 enzyme induction. *Toxicol Lett*, 82-83, 173-179.
- (3) Shinkai, Y., Sumi, D., Fukami, I., Ishii, T., and Kumagai, Y. (2006) Sulforaphane, an activator of Nrf2, suppresses cellular accumulation of arsenic and its cytotoxicity in primary mouse hepatocytes. *FEBS Lett*, 580, 1771-1774.
- (4) Toyama, T., Sumi, D., Shinkai, Y., Yasutake, A., Taguchi, K., Tong, K. I., Yamamoto, M., and Kumagai, Y. (2007) Cytoprotective role of Nrf2/Keap1 system in methylmercury toxicity. *Biochem Biophys Res Commun*, 363, 645-650.
- (5) Toyama, T., Shinkai, Y., Yasutake, A., Uchida, K., Yamamoto, M., and Kumagai, Y. (2011) Isothiocyanates reduce mercury accumulation via an Nrf2-dependent mechanism during exposure of mice to methylmercury. *Environ Health Perspect*, 119, 1117-1122.
- (6) Muller, P. H. (1948) Dichloro-diphenyl-trichloroethane and newer insecticides.
- (7) Dodds, E. C., and Lawson, W. (1936) Synthetic estrogenic agents without the phenanthrene nucleus. *Nature*, 137, 996.
- (8) Nakanishi, T., Kohroki, J., Suzuki, S., Ishizaki, J., Hiromori, Y., Takasuga, S., Itoh, N., Watanabe, Y., Utoguchi, N., and Tanaka, K. (2002) Trialkyltin compounds enhance human CG secretion and aromatase activity in human placental choriocarcinoma cells. *J Clin Endocrinol Metab*, 87, 2830-2837.
- (9) Waldron, H. A. (1983) On the history of scrotal cancer. *Ann R Coll Surg Engl*, 65, 420-422.
- (10) Waldron, H. A. (1983) A brief history of scrotal cancer. *Br J Ind Med*, 40, 390-401.
- (11) Yamagiwa, K., and Ichikawa, K. (1915) Experimentelle studie uber die pathogenese der epithelialgeschwulste. *Mitt Med Fak Kaiserl Univ Tokio*, 15, 295-344.
- (12) Kennaway, E. L., and Hieger, I. (1930) Carcinogenic Substances and Their Fluorescence Spectra. *Br Med J*, 1, 1044-1046.
- (13) Cook, J. W., Hewett, C. L., and Hieger, I. (1933) The isolation of a cancer-producing hydrocarbon from coal tar. Parts I, II, and III. *J chem Soc*, 395-405.
- (14) Kumagai, Y., Arimoto, T., Shinyashiki, M., Shimojo, N., Nakai, Y., Yoshikawa, T., and Sagai, M. (1997) Generation of reactive oxygen species during interaction of diesel exhaust particle components with NADPH-cytochrome P450 reductase and involvement of the bioactivation in the DNA damage. *Free Radic Biol Med*, 22,

- 479-487.
- (15) Kikuno, S., Taguchi, K., Iwamoto, N., Yamano, S., Cho, A. K., Froines, J. R., and Kumagai, Y. (2006) 1,2-Naphthoquinone activates vanilloid receptor 1 through increased protein tyrosine phosphorylation, leading to contraction of guinea pig trachea. *Toxicol Appl Pharmacol*, 210, 47-54.
 - (16) Surh, Y. J. (2003) Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nat Rev Cancer*, 3, 768-780.
 - (17) Ingold, C. K. (1929) The principles of aromatic substitution, from the standpoint of the electronic theory of valency. *Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas*, 48, 797-812.
 - (18) Jones, D. P. (2008) Radical-free biology of oxidative stress. *Am J Physiol Cell Physiol*, 295, C849-868.
 - (19) Lindley, H. (1960) A study of the kinetics of the reaction between thiol compounds and chloroacetamide. *Biochem J*, 74, 577-584.
 - (20) Dudev, T., and Lim, C. (2002) Factors governing the protonation state of cysteines in proteins: an Ab initio/CDM study. *J Am Chem Soc*, 124, 6759-6766.
 - (21) O'Neil, M. J., Smith, A., and Heckelman, P. E. (2001) Glutathione, In *The Merck index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals-13th Edition*, Merck Research Laboratories Division of MERCK & Co., INC., Whitehouse Station, NJ.
 - (22) Rudolph, V., Schopfer, F. J., Khoo, N. K., Rudolph, T. K., Cole, M. P., Woodcock, S. R., Bonacci, G., Groeger, A. L., Golin-Bisello, F., Chen, C. S., Baker, P. R., and Freeman, B. A. (2009) Nitro-fatty acid metabolome: saturation, desaturation, beta-oxidation, and protein adduction. *J Biol Chem*, 284, 1461-1473.
 - (23) Miura, T., Kakehashi, H., Shinkai, Y., Egara, Y., Hirose, R., Cho, A. K., and Kumagai, Y. (2011) GSH-mediated S-transarylation of a quinone glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase conjugate. *Chem Res Toxicol*, 24, 1836-1844.
 - (24) Mimura, J., and Fujii, Y. (2003) 蛋白質核酸酵素. Vol. 48.
 - (25) Voet, D., Voet, J. G., and Pratt, C. W. (2003) ヴォート基礎生化学. 東京化学同人, 東京都文京区.
 - (26) Nioi, P., and Hayes, J. D. (2004) Contribution of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 to protection against carcinogenesis, and regulation of its gene by the Nrf2 basic-region leucine zipper and the arylhydrocarbon receptor basic helix-loop-helix transcription factors. *Mutat Res*, 555, 149-171.
 - (27) Joseph, P., and Jaiswal, A. K. (1998) NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 reduces the mutagenicity of DNA caused by NADPH:P450 reductase-activated metabolites of benzo(a)pyrene quinones. *Br J Cancer*, 77, 709-719.

- (28) Kann, S., Huang, M. Y., Estes, C., Reichard, J. F., Sartor, M. A., Xia, Y., and Puga, A. (2005) Arsenite-induced aryl hydrocarbon receptor nuclear translocation results in additive induction of phase I genes and synergistic induction of phase II genes. *Mol Pharmacol*, 68, 336-346.
- (29) Ito, N., Fukushima, S., Hagiwara, A., Shibata, M., and Ogiso, T. (1983) Carcinogenicity of butylated hydroxyanisole in F344 rats. *J Natl Cancer Inst*, 70, 343-352.
- (30) Yu, R., Tan, T. H., and Kong, A. N. (1997) Butylated hydroxyanisole and its metabolite tert-butylhydroquinone differentially regulate mitogen-activated protein kinases. The role of oxidative stress in the activation of mitogen-activated protein kinases by phenolic antioxidants. *J Biol Chem*, 272, 28962-28970.
- (31) Clayson, D. B., Iverson, F., Nera, E. A., and Lok, E. (1990) The significance of induced forestomach tumors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 30, 441-463.
- (32) 化学物質評価機構. 有害性評価書, In ブチルヒドロキシアニソール, 経済産業省.
- (33) Ishiwata, H., Nishijima, M., and Fukasawa, Y. (2003) Estimation of inorganic food additive (nitrite, nitrate and sulfur dioxide), antioxidant (BHA and BHT), processing agent (propylene glycol) and sweetener (sodium saccharin) concentrations in foods and their daily intake based on official inspection results in Japan in fiscal year 1998. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*, 44, 132-143.
- (34) Verhagen, H., Thijssen, H. H., ten Hoor, F., and Kleinjans, J. C. (1989) Disposition of single oral doses of butylated hydroxyanisole in man and rat. *Food Chem Toxicol*, 27, 151-158.
- (35) Bolton, J. L., Trush, M. A., Penning, T. M., Dryhurst, G., and Monks, T. J. (2000) Role of quinones in toxicology. *Chem Res Toxicol*, 13, 135-160.
- (36) Taguchi, K., Fujii, S., Yamano, S., Cho, A. K., Kamisuki, S., Nakai, Y., Sugawara, F., Froines, J. R., and Kumagai, Y. (2007) An approach to evaluate two-electron reduction of 9,10-phenanthraquinone and redox activity of the hydroquinone associated with oxidative stress. *Free Radic Biol Med*, 43, 789-799.
- (37) Daisy, B. H., Strobel, G. A., Castillo, U., Ezra, D., Sears, J., Weaver, D. K., and Runyon, J. B. (2002) Naphthalene, an insect repellent, is produced by *Muscodor vitigenus*, a novel endophytic fungus. *Microbiology*, 148, 3737-3741.
- (38) Preuss, R., Angerer, J., and Drexler, H. (2003) Naphthalene--an environmental and occupational toxicant. *Int Arch Occup Environ Health*, 76, 556-576.
- (39) Chu, S. N., Sands, S., Tomasik, M. R., Lee, P. S., and McNeill, V. F. (2010) Ozone oxidation of surface-adsorbed polycyclic aromatic hydrocarbons: role of PAH-surface

- interaction. *J Am Chem Soc*, *132*, 15968-15975.
- (40) Kautzman, K. E., Surratt, J. D., Chan, M. N., Chan, A. W., Hersey, S. P., Chhabra, P. S., Dalleska, N. F., Wennberg, P. O., Flagan, R. C., and Seinfeld, J. H. (2010) Chemical composition of gas- and aerosol-phase products from the photooxidation of naphthalene. *J Phys Chem A*, *114*, 913-934.
- (41) Miura, T., and Kumagai, Y. (2010) Immunochemical method to detect proteins that undergo selective modification by 1,2-naphthoquinone derived from naphthalene through metabolic activation. *J Toxicol Sci*, *35*, 843-852.
- (42) Zheng, J., Cho, M., Jones, A. D., and Hammock, B. D. (1997) Evidence of quinone metabolites of naphthalene covalently bound to sulfur nucleophiles of proteins of murine Clara cells after exposure to naphthalene. *Chem Res Toxicol*, *10*, 1008-1014.
- (43) Cho, T. M., Rose, R. L., and Hodgson, E. (2006) In vitro metabolism of naphthalene by human liver microsomal cytochrome P450 enzymes. *Drug Metab Dispos*, *34*, 176-183.
- (44) Sims, P., and Grover, P. L. (1974) Epoxides in polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism and carcinogenesis. *Adv Cancer Res*, *20*, 165-274.
- (45) Deutsch, J., Leutz, J. C., Yang, S. K., Gelboin, H. V., Chiang, Y. L., Vatsis, K. P., and Coon, M. J. (1978) Regio- and stereoselectivity of various forms of purified cytochrome P-450 in the metabolism of benzo[a]pyrene and (-) trans-7,8-dihydroxy-7,8-dihydrobenzo[a]pyrene as shown by product formation and binding to DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *75*, 3123-3127.
- (46) Yang, S. K., McCourt, D. W., Roller, P. P., and Gelboin, H. V. (1976) Enzymatic conversion of benzo(a)pyrene leading predominantly to the diol-epoxide r-7,t-8-dihydroxy-t-9,10-oxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo(a)pyrene through a single enantiomer of r-7, t-8-dihydroxy-7,8-dihydrobenzo(a)pyrene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *73*, 2594-2598.
- (47) Levin, W., Wood, A. W., Yagi, H., Dansette, P. M., Jerina, D. M., and Conney, A. H. (1976) Carcinogenicity of benzo[a]pyrene 4,5-, 7,8-, and 9,10-oxides on mouse skin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *73*, 243-247.
- (48) Miner, D. J., and Kissinger, P. T. (1979) Evidence for the involvement of N-acetyl-p-quinoneimine in acetaminophen metabolism. *Biochem Pharmacol*, *28*, 3285-3290.
- (49) Dahlin, D. C., Miwa, G. T., Lu, A. Y., and Nelson, S. D. (1984) N-acetyl-p-benzoquinone imine: a cytochrome P-450-mediated oxidation product of acetaminophen. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *81*, 1327-1331.
- (50) Asanuma, M., Miyazaki, I., and Ogawa, N. (2003) Dopamine- or L-DOPA-induced neurotoxicity: the role of dopamine quinone formation and tyrosinase in a model of

- Parkinson's disease. *Neurotox Res*, 5, 165-176.
- (51) Emdadul Haque, M., Asanuma, M., Higashi, Y., Miyazaki, I., Tanaka, K., and Ogawa, N. (2003) Apoptosis-inducing neurotoxicity of dopamine and its metabolites via reactive quinone generation in neuroblastoma cells. *Biochim Biophys Acta*, 1619, 39-52.
- (52) Abul-Hajj, Y. J., and Cisek, P. L. (1986) Regioselective reaction of thiols with catechol estrogens and estrogen-O-quinones. *J Steroid Biochem*, 25, 245-247.
- (53) Chen, Y., Morrow, J. D., and Roberts, L. J., 2nd. (1999) Formation of reactive cyclopentenone compounds in vivo as products of the isoprostane pathway. *J Biol Chem*, 274, 10863-10868.
- (54) Sawa, T., Zaki, M. H., Okamoto, T., Akuta, T., Tokutomi, Y., Kim-Mitsuyama, S., Ihara, H., Kobayashi, A., Yamamoto, M., Fujii, S., Arimoto, H., and Akaike, T. (2007) Protein S-guanylation by the biological signal 8-nitroguanosine 3',5'-cyclic monophosphate. *Nat Chem Biol*, 3, 727-735.
- (55) Batthyany, C., Schopfer, F. J., Baker, P. R., Duran, R., Baker, L. M., Huang, Y., Cervenansky, C., Branchaud, B. P., and Freeman, B. A. (2006) Reversible post-translational modification of proteins by nitrated fatty acids in vivo. *J Biol Chem*, 281, 20450-20463.
- (56) Rudolph, T. K., and Freeman, B. A. (2009) Transduction of redox signaling by electrophile-protein reactions. *Sci Signal*, 2, re7.
- (57) Mignotte, V., Wall, L., deBoer, E., Grosveld, F., and Romeo, P. H. (1989) Two tissue-specific factors bind the erythroid promoter of the human porphobilinogen deaminase gene. *Nucleic Acids Res*, 17, 37-54.
- (58) Moi, P., Chan, K., Asunis, I., Cao, A., and Kan, Y. W. (1994) Isolation of NF-E2-related factor 2 (Nrf2), a NF-E2-like basic leucine zipper transcriptional activator that binds to the tandem NF-E2/AP1 repeat of the beta-globin locus control region. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91, 9926-9930.
- (59) Rushmore, T. H., King, R. G., Paulson, K. E., and Pickett, C. B. (1990) Regulation of glutathione S-transferase Ya subunit gene expression: identification of a unique xenobiotic-responsive element controlling inducible expression by planar aromatic compounds. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87, 3826-3830.
- (60) Rushmore, T. H., and Pickett, C. B. (1990) Transcriptional regulation of the rat glutathione S-transferase Ya subunit gene. Characterization of a xenobiotic-responsive element controlling inducible expression by phenolic antioxidants. *J Biol Chem*, 265, 14648-14653.
- (61) Friling, R. S., Bensimon, A., Tichauer, Y., and Daniel, V. (1990) Xenobiotic-inducible

- expression of murine glutathione S-transferase Ya subunit gene is controlled by an electrophile-responsive element. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87, 6258-6262.
- (62) Wasserman, W. W., and Fahl, W. E. (1997) Functional antioxidant responsive elements. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 5361-5366.
- (63) Itoh, K., Chiba, T., Takahashi, S., Ishii, T., Igarashi, K., Katoh, Y., Oyake, T., Hayashi, N., Satoh, K., Hatayama, I., Yamamoto, M., and Nabeshima, Y. (1997) An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochem Biophys Res Commun*, 236, 313-322.
- (64) Motohashi, H., Shavit, J. A., Igarashi, K., Yamamoto, M., and Engel, J. D. (1997) The world according to Maf. *Nucleic Acids Res*, 25, 2953-2959.
- (65) Motohashi, H., and Yamamoto, M. (2004) Nrf2-Keap1 defines a physiologically important stress response mechanism. *Trends Mol Med*, 10, 549-557.
- (66) Itoh, K., Wakabayashi, N., Katoh, Y., Ishii, T., Igarashi, K., Engel, J. D., and Yamamoto, M. (1999) Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes Dev*, 13, 76-86.
- (67) Kobayashi, M., Itoh, K., Suzuki, T., Osanai, H., Nishikawa, K., Katoh, Y., Takagi, Y., and Yamamoto, M. (2002) Identification of the interactive interface and phylogenetic conservation of the Nrf2-Keap1 system. *Genes Cells*, 7, 807-820.
- (68) McMahon, M., Itoh, K., Yamamoto, M., and Hayes, J. D. (2003) Keap1-dependent proteasomal degradation of transcription factor Nrf2 contributes to the negative regulation of antioxidant response element-driven gene expression. *J Biol Chem*, 278, 21592-21600.
- (69) McMahon, M., Thomas, N., Itoh, K., Yamamoto, M., and Hayes, J. D. (2004) Redox-regulated turnover of Nrf2 is determined by at least two separate protein domains, the redox-sensitive Neh2 degron and the redox-insensitive Neh6 degron. *J Biol Chem*, 279, 31556-31567.
- (70) Zhang, Y., and Gordon, G. B. (2004) A strategy for cancer prevention: stimulation of the Nrf2-ARE signaling pathway. *Mol Cancer Ther*, 3, 885-893.
- (71) Katoh, Y., Itoh, K., Yoshida, E., Miyagishi, M., Fukamizu, A., and Yamamoto, M. (2001) Two domains of Nrf2 cooperatively bind CBP, a CREB binding protein, and synergistically activate transcription. *Genes Cells*, 6, 857-868.
- (72) Nioi, P., Nguyen, T., Sherratt, P. J., and Pickett, C. B. (2005) The carboxy-terminal Neh3 domain of Nrf2 is required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol*, 25, 10895-10906.
- (73) Zhang, J., Hosoya, T., Maruyama, A., Nishikawa, K., Maher, J. M., Ohta, T.,

- Motohashi, H., Fukamizu, A., Shibahara, S., Itoh, K., and Yamamoto, M. (2007) Nrf2 Neh5 domain is differentially utilized in the transactivation of cytoprotective genes. *Biochem J*, 404, 459-466.
- (74) Ogura, T., Tong, K. I., Mio, K., Maruyama, Y., Kurokawa, H., Sato, C., and Yamamoto, M. (2010) Keap1 is a forked-stem dimer structure with two large spheres enclosing the intervening, double glycine repeat, and C-terminal domains. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 2842-2847.
- (75) Tong, K. I., Katoh, Y., Kusunoki, H., Itoh, K., Tanaka, T., and Yamamoto, M. (2006) Keap1 recruits Neh2 through binding to ETGE and DLG motifs: characterization of the two-site molecular recognition model. *Mol Cell Biol*, 26, 2887-2900.
- (76) Kwak, M. K., Itoh, K., Yamamoto, M., and Kensler, T. W. (2002) Enhanced expression of the transcription factor Nrf2 by cancer chemopreventive agents: role of antioxidant response element-like sequences in the nrf2 promoter. *Mol Cell Biol*, 22, 2883-2892.
- (77) Itoh, K., Tong, K. I., and Yamamoto, M. (2004) Molecular mechanism activating Nrf2-Keap1 pathway in regulation of adaptive response to electrophiles. *Free Radic Biol Med*, 36, 1208-1213.
- (78) Ishii, T., Itoh, K., Takahashi, S., Sato, H., Yanagawa, T., Katoh, Y., Bannai, S., and Yamamoto, M. (2000) Transcription factor Nrf2 coordinately regulates a group of oxidative stress-inducible genes in macrophages. *J Biol Chem*, 275, 16023-16029.
- (79) Dinkova-Kostova, A. T., Holtzclaw, W. D., Cole, R. N., Itoh, K., Wakabayashi, N., Katoh, Y., Yamamoto, M., and Talalay, P. (2002) Direct evidence that sulfhydryl groups of Keap1 are the sensors regulating induction of phase 2 enzymes that protect against carcinogens and oxidants. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 11908-11913.
- (80) Miura, T., Shinkai, Y., Jiang, H. Y., Iwamoto, N., Sumi, D., Taguchi, K., Yamamoto, M., Jinno, H., Tanaka-Kagawa, T., Cho, A. K., and Kumagai, Y. (2011) Initial response and cellular protection through the Keap1/Nrf2 system during the exposure of primary mouse hepatocytes to 1,2-naphthoquinone. *Chem Res Toxicol*, 24, 559-567.
- (81) Sumi, D., Numasawa, Y., Endo, A., Iwamoto, N., and Kumagai, Y. (2009) Catechol estrogens mediated activation of Nrf2 through covalent modification of its quinone metabolite to Keap1. *J Toxicol Sci*, 34, 627-635.
- (82) Zhang, D. D., and Hannink, M. (2003) Distinct cysteine residues in Keap1 are required for Keap1-dependent ubiquitination of Nrf2 and for stabilization of Nrf2 by chemopreventive agents and oxidative stress. *Mol Cell Biol*, 23, 8137-8151.
- (83) Kobayashi, M., Li, L., Iwamoto, N., Nakajima-Takagi, Y., Kaneko, H., Nakayama, Y., Eguchi, M., Wada, Y., Kumagai, Y., and Yamamoto, M. (2009) The antioxidant

- defense system Keap1-Nrf2 comprises a multiple sensing mechanism for responding to a wide range of chemical compounds. *Mol Cell Biol*, 29, 493-502.
- (84) McMahon, M., Lamont, D. J., Beattie, K. A., and Hayes, J. D. (2010) Keap1 perceives stress via three sensors for the endogenous signaling molecules nitric oxide, zinc, and alkenals. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 18838-18843.
- (85) Dinkova-Kostova, A. T., Holtzclaw, W. D., and Wakabayashi, N. (2005) Keap1, the sensor for electrophiles and oxidants that regulates the phase 2 response, is a zinc metalloprotein. *Biochemistry*, 44, 6889-6899.
- (86) Lee, A. C., and Murray, M. (2010) Up-regulation of human CYP2J2 in HepG2 cells by butylated hydroxyanisole is mediated by c-Jun and Nrf2. *Mol Pharmacol*, 77, 987-994.
- (87) Yuan, X., Xu, C., Pan, Z., Keum, Y. S., Kim, J. H., Shen, G., Yu, S., Oo, K. T., Ma, J., and Kong, A. N. (2006) Butylated hydroxyanisole regulates ARE-mediated gene expression via Nrf2 coupled with ERK and JNK signaling pathway in HepG2 cells. *Mol Carcinog*, 45, 841-850.
- (88) Poland, A., Glover, E., and Kende, A. S. (1976) Stereospecific, high affinity binding of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin by hepatic cytosol. Evidence that the binding species is receptor for induction of aryl hydrocarbon hydroxylase. *J Biol Chem*, 251, 4936-4946.
- (89) Poland, A., Clover, E., Kende, A. S., DeCamp, M., and Giandomenico, C. M. (1976) 3,4,3',4'-Tetrachloro azoxybenzene and azobenzene: potent inducers of aryl hydrocarbon hydroxylase. *Science*, 194, 627-630.
- (90) Poland, A., Glover, E., Ebetino, F. H., and Kende, A. S. (1986) Photoaffinity labeling of the Ah receptor. *J Biol Chem*, 261, 6352-6365.
- (91) Poland, A., Glover, E., Ebetino, H., and Kende, A. (1986) Photoaffinity labelling of the Ah receptor. *Food Chem Toxicol*, 24, 781-787.
- (92) Burbach, K. M., Poland, A., and Bradfield, C. A. (1992) Cloning of the Ah-receptor cDNA reveals a distinctive ligand-activated transcription factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89, 8185-8189.
- (93) Soshilov, A., and Denison, M. S. (2008) Role of the Per/Arnt/Sim domains in ligand-dependent transformation of the aryl hydrocarbon receptor. *J Biol Chem*, 283, 32995-33005.
- (94) Kumar, M. B., Ramadoss, P., Reen, R. K., Vanden Heuvel, J. P., and Perdew, G. H. (2001) The Q-rich subdomain of the human Ah receptor transactivation domain is required for dioxin-mediated transcriptional activity. *J Biol Chem*, 276, 42302-42310.
- (95) Meyer, B. K., Pray-Grant, M. G., Vanden Heuvel, J. P., and Perdew, G. H. (1998)

- Hepatitis B virus X-associated protein 2 is a subunit of the unliganded aryl hydrocarbon receptor core complex and exhibits transcriptional enhancer activity. *Mol Cell Biol*, 18, 978-988.
- (96) Kazlauskas, A., Poellinger, L., and Pongratz, I. (1999) Evidence that the co-chaperone p23 regulates ligand responsiveness of the dioxin (Aryl hydrocarbon) receptor. *J Biol Chem*, 274, 13519-13524.
- (97) Sogawa, K., Fujisawa-Sehara, A., Yamane, M., and Fujii-Kuriyama, Y. (1986) Location of regulatory elements responsible for drug induction in the rat cytochrome P-450c gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83, 8044-8048.
- (98) Fujisawa-Sehara, A., Sogawa, K., Yamane, M., and Fujii-Kuriyama, Y. (1987) Characterization of xenobiotic responsive elements upstream from the drug-metabolizing cytochrome P-450c gene: a similarity to glucocorticoid regulatory elements. *Nucleic Acids Res*, 15, 4179-4191.
- (99) Ikuta, T., Eguchi, H., Tachibana, T., Yoneda, Y., and Kawajiri, K. (1998) Nuclear localization and export signals of the human aryl hydrocarbon receptor. *J Biol Chem*, 273, 2895-2904.
- (100) Genter, M. B., Marlowe, J., Kevin Kerzee, J., Dragin, N., Puga, A., Dalton, T. P., and Nebert, D. W. (2006) Naphthalene toxicity in mice and aryl hydrocarbon receptor-mediated CYPs. *Biochem Biophys Res Commun*, 348, 120-123.
- (101) Denison, M. S., Pandini, A., Nagy, S. R., Baldwin, E. P., and Bonati, L. (2002) Ligand binding and activation of the Ah receptor. *Chem Biol Interact*, 141, 3-24.
- (102) Noda, S., Harada, N., Hida, A., Fujii-Kuriyama, Y., Motohashi, H., and Yamamoto, M. (2003) Gene expression of detoxifying enzymes in AhR and Nrf2 compound null mutant mouse. *Biochem Biophys Res Commun*, 303, 105-111.
- (103) Gharavi, N., Haggarty, S., and El-Kadi, A. O. (2007) Chemoprotective and carcinogenic effects of tert-butylhydroquinone and its metabolites. *Curr Drug Metab*, 8, 1-7.
- (104) Gharavi, N., and El-Kadi, A. O. (2005) tert-Butylhydroquinone is a novel aryl hydrocarbon receptor ligand. *Drug Metab Dispos*, 33, 365-372.
- (105) Shimizu, Y., Nakatsuru, Y., Ichinose, M., Takahashi, Y., Kume, H., Mimura, J., Fujii-Kuriyama, Y., and Ishikawa, T. (2000) Benzo[a]pyrene carcinogenicity is lost in mice lacking the aryl hydrocarbon receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 779-782.
- (106) Poland, A., and Glover, E. (1974) Comparison of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin, a potent inducer of aryl hydrocarbon hydroxylase, with 3-methylcholanthrene. *Mol Pharmacol*, 10, 349-359.
- (107) Hankinson, O. (1995) The aryl hydrocarbon receptor complex. *Annu Rev Pharmacol*

- Toxicol*, 35, 307-340.
- (108) Barouki, R., Coumoul, X., and Fernandez-Salguero, P. M. (2007) The aryl hydrocarbon receptor, more than a xenobiotic-interacting protein. *FEBS Lett*, 581, 3608-3615.
- (109) Bock, K. W., and Kohle, C. (2006) Ah receptor: dioxin-mediated toxic responses as hints to deregulated physiologic functions. *Biochem Pharmacol*, 72, 393-404.
- (110) Puga, A., Ma, C., and Marlowe, J. L. (2009) The aryl hydrocarbon receptor cross-talks with multiple signal transduction pathways. *Biochem Pharmacol*, 77, 713-722.
- (111) Denizot, F., and Lang, R. (1986) Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Methods*, 89, 271-277.
- (112) Mosmann, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods.*, 65, 55-63.
- (113) Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72, 248-254.
- (114) Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner F.H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., and Klenk, D. C. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*, 150, 76-85.
- (115) Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- (116) Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76, 4350-4354.
- (117) Ellman, G. L. (1958) A colorimetric method for determining low concentrations of mercaptans. *Arch Biochem Biophys*, 74, 443-450.
- (118) Vignaud, C., Rakotozafy, L., Falguieres, A., Potus, J., and Nicolas, J. (2004) Separation and identification by gel filtration and high-performance liquid chromatography with UV or electrochemical detection of the disulphides produced from cysteine and glutathione oxidation. *J Chromatogr A*, 1031, 125-133.
- (119) Kahl, R., Weinke, S., and Kappus, H. (1989) Production of reactive oxygen species due to metabolic activation of butylated hydroxyanisole. *Toxicology*, 59, 179-194.
- (120) Imhoff, B. R., and Hansen, J. M. (2010) Tert-butylhydroquinone induces mitochondrial oxidative stress causing Nrf2 activation. *Cell Biol Toxicol*, 26, 541-551.
- (121) Nioi, P., and Nguyen, T. (2007) A mutation of Keap1 found in breast cancer impairs its ability to repress Nrf2 activity. *Biochem Biophys Res Commun*, 362, 816-821.

- (122) Sekhar, K. R., Rachakonda, G., and Freeman, M. L. (2010) Cysteine-based regulation of the CUL3 adaptor protein Keap1. *Toxicol Appl Pharmacol*, 244, 21-26.
- (123) Hong, F., Freeman, M. L., and Liebler, D. C. (2005) Identification of sensor cysteines in human Keap1 modified by the cancer chemopreventive agent sulforaphane. *Chem Res Toxicol*, 18, 1917-1926.
- (124) Dinkova-Kostova, A. T., and Wang, X. J. (2011) Induction of the Keap1/Nrf2/ARE pathway by oxidizable diphenols. *Chem Biol Interact*, 192, 101-106.
- (125) Wang, X. J., Hayes, J. D., Higgins, L. G., Wolf, C. R., and Dinkova-Kostova, A. T. (2010) Activation of the NRF2 signaling pathway by copper-mediated redox cycling of para- and ortho-hydroquinones. *Chem Biol*, 17, 75-85.
- (126) Ramos-Gomez, M., Kwak, M. K., Dolan, P. M., Itoh, K., Yamamoto, M., Talalay, P., and Kensler, T. W. (2001) Sensitivity to carcinogenesis is increased and chemoprotective efficacy of enzyme inducers is lost in nrf2 transcription factor-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 3410-3415.
- (127) Peters, M. M., Rivera, M. I., Jones, T. W., Monks, T. J., and Lau, S. S. (1996) Glutathione conjugates of tert-butyl-hydroquinone, a metabolite of the urinary tract tumor promoter 3-tert-butyl-hydroxyanisole, are toxic to kidney and bladder. *Cancer Res*, 56, 1006-1011.
- (128) Konig, J., Nies, A. T., Cui, Y., Leier, I., and Keppler, D. (1999) Conjugate export pumps of the multidrug resistance protein (MRP) family: localization, substrate specificity, and MRP2-mediated drug resistance. *Biochim Biophys Acta*, 1461, 377-394.
- (129) Song, Y., Wagner, B. A., Witmer, J. R., Lehmler, H. J., and Buettner, G. R. (2009) Nonenzymatic displacement of chlorine and formation of free radicals upon the reaction of glutathione with PCB quinones. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 9725-9730.
- (130) Slaughter, D. E., and Hanzlik, R. P. (1991) Identification of epoxide- and quinone-derived bromobenzene adducts to protein sulfur nucleophiles. *Chem Res Toxicol*, 4, 349-359.
- (131) Abiko, Y., Miura, T., Phuc, B. H., Shinkai, Y., and Kumagai, Y. (2011) Participation of covalent modification of Keap1 in the activation of Nrf2 by tert-butylbenzoquinone, an electrophilic metabolite of butylated hydroxyanisole. *Toxicol Appl Pharmacol*, 255, 32-39.
- (132) Iwamoto, N., Sumi, D., Ishii, T., Uchida, K., Cho, A. K., Froines, J. R., and Kumagai, Y. (2007) Chemical knockdown of protein-tyrosine phosphatase 1B by 1,2-naphthoquinone through covalent modification causes persistent transactivation of

- epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem*, 282, 33396-33404.
- (133) Endo, A., Sumi, D., Iwamoto, N., and Kumagai, Y. (2011) Inhibition of DNA binding activity of cAMP response element-binding protein by 1,2-naphthoquinone through chemical modification of Cys-286. *Chem Biol Interact*, 192, 272-277.
- (134) Kobayashi, M., and Yamamoto, M. (2006) Nrf2-Keap1 regulation of cellular defense mechanisms against electrophiles and reactive oxygen species. *Adv Enzyme Regul*, 46, 113-140.
- (135) Taguchi, K., Fujikawa, N., Komatsu, M., Ishii, T., Unno, M., Akaike, T., Motohashi, H., and Yamamoto, M. (2012) Keap1 degradation by autophagy for the maintenance of redox homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109, 13561-13566.
- (136) Kumagai, Y., Shinkai, Y., Miura, T., and Cho, A. K. (2012) The chemical biology of naphthoquinones and its environmental implications. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 52, 221-247.
- (137) Yeager, R. L., Reisman, S. A., Aleksunes, L. M., and Klaassen, C. D. (2009) Introducing the "TCDD-inducible AhR-Nrf2 gene battery". *Toxicol Sci*, 111, 238-246.
- (138) Waller, C. L., and McKinney, J. D. (1995) Three-dimensional quantitative structure-activity relationships of dioxins and dioxin-like compounds: model validation and Ah receptor characterization. *Chem Res Toxicol*, 8, 847-858.
- (139) Li, F., Li, X., Liu, X., Zhang, L., You, L., Zhao, J., and Wu, H. (2011) Docking and 3D-QSAR studies on the Ah receptor binding affinities of polychlorinated biphenyls (PCBs), dibenzo-p-dioxins (PCDDs) and dibenzofurans (PCDFs). *Environ Toxicol Pharmacol*, 32, 478-485.
- (140) Kansanen, E., Bonacci, G., Schopfer, F. J., Kuosmanen, S. M., Tong, K. I., Leinonen, H., Woodcock, S. R., Yamamoto, M., Carlberg, C., Yla-Herttuala, S., Freeman, B. A., and Levonen, A. L. (2011) Electrophilic nitro-fatty acids activate NRF2 by a KEAP1 cysteine 151-independent mechanism. *J Biol Chem*, 286, 14019-14027.
- (141) Marnett, L. J., Riggins, J. N., and West, J. D. (2003) Endogenous generation of reactive oxidants and electrophiles and their reactions with DNA and protein. *J Clin Invest*, 111, 583-593.
- (142) Liebler, D. C. (2008) Protein damage by reactive electrophiles: targets and consequences. *Chem Res Toxicol*, 21, 117-128.
- (143) Lin, D., Saleh, S., and Liebler, D. C. (2008) Reversibility of covalent electrophile-protein adducts and chemical toxicity. *Chem Res Toxicol*, 21, 2361-2369.
- (144) Evans, D. C., Watt, A. P., Nicoll-Griffith, D. A., and Baillie, T. A. (2004) Drug-protein adducts: an industry perspective on minimizing the potential for drug bioactivation in drug discovery and development. *Chem Res Toxicol*, 17, 3-16.

- (145) Dinkova-Kostova, A. T., Holtzclaw, W. D., and Kensler, T. W. (2005) The role of Keap1 in cellular protective responses. *Chem Res Toxicol*, *18*, 1779-1791.
- (146) Buetler, T. M., Gallagher, E. P., Wang, C., Stahl, D. L., Hayes, J. D., and Eaton, D. L. (1995) Induction of phase I and phase II drug-metabolizing enzyme mRNA, protein, and activity by BHA, ethoxyquin, and oltipraz. *Toxicol Appl Pharmacol*, *135*, 45-57.
- (147) Satoh, T., Saitoh, S., Hosaka, M., and Kosaka, K. (2009) Simple ortho- and para-hydroquinones as compounds neuroprotective against oxidative stress in a manner associated with specific transcriptional activation. *Biochem Biophys Res Commun*, *379*, 537-541.
- (148) Hu, C., Egglar, A. L., Mesecar, A. D., and van Breemen, R. B. (2011) Modification of keap1 cysteine residues by sulforaphane. *Chem Res Toxicol*, *24*, 515-521.
- (149) Hu, C., Nikolic, D., Egglar, A. L., Mesecar, A. D., and van Breemen, R. B. (2012) Screening for natural chemoprevention agents that modify human Keap1. *Anal Biochem*, *421*, 108-114.
- (150) Huang, H. C., Nguyen, T., and Pickett, C. B. (2000) Regulation of the antioxidant response element by protein kinase C-mediated phosphorylation of NF-E2-related factor 2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *97*, 12475-12480.
- (151) Nguyen, T., Sherratt, P. J., Huang, H. C., Yang, C. S., and Pickett, C. B. (2003) Increased protein stability as a mechanism that enhances Nrf2-mediated transcriptional activation of the antioxidant response element. Degradation of Nrf2 by the 26 S proteasome. *J Biol Chem*, *278*, 4536-4541.
- (152) Carbone, D. L., Doorn, J. A., Kiebler, Z., Ickes, B. R., and Petersen, D. R. (2005) Modification of heat shock protein 90 by 4-hydroxynonenal in a rat model of chronic alcoholic liver disease. *J Pharmacol Exp Ther*, *315*, 8-15.
- (153) Connor, R. E., Marnett, L. J., and Liebler, D. C. (2011) Protein-selective capture to analyze electrophile adduction of hsp90 by 4-hydroxynonenal. *Chem Res Toxicol*, *24*, 1275-1282.
- (154) Hughes, D., Guttenplan, J. B., Marcus, C. B., Subbaramaiah, K., and Dannenberg, A. J. (2008) Heat shock protein 90 inhibitors suppress aryl hydrocarbon receptor-mediated activation of CYP1A1 and CYP1B1 transcription and DNA adduct formation. *Cancer Prev Res (Phila)*, *1*, 485-493.
- (155) Flaveny, C., Perdew, G. H., and Miller, C. A., 3rd. (2009) The Aryl-hydrocarbon receptor does not require the p23 co-chaperone for ligand binding and target gene expression in vivo. *Toxicol Lett*, *189*, 57-62.
- (156) Greene, J. F., Zheng, J., Grant, D. F., and Hammock, B. D. (2000) Cytotoxicity of 1,2-epoxynaphthalene is correlated with protein binding and in situ glutathione

- depletion in cytochrome P4501A1 expressing Sf-21 cells. *Toxicol Sci*, 53, 352-360.
- (157) Opitz, C. A., Litzemberger, U. M., Sahm, F., Ott, M., Tritschler, I., Trump, S., Schumacher, T., Jestaedt, L., Schrenk, D., Weller, M., Jugold, M., Guillemin, G. J., Miller, C. L., Lutz, C., Radlwimmer, B., Lehmann, I., von Deimling, A., Wick, W., and Platten, M. (2011) An endogenous tumour-promoting ligand of the human aryl hydrocarbon receptor. *Nature*, 478, 197-203.

謝辞

本研究は多くの人々の支えのもとで行われました。修士課程から現在まで5年間、筑波大学人間総合科学研究科教授の熊谷嘉人先生は、私達を研究者の卵として扱い、厳しい指導および激励により育てて下さいました。深く御礼申し上げます。同研究科助教の新開泰弘先生にも助言および激励をいただき、心より感謝しております。転出された徳島文理大学薬学部（元、筑波大学人間総合科学研究科准教授）角大悟先生は、私が研究の右も左も分からない修士時代、研究の楽しさについて熱心に指導して下さいました。この書面を借りて御礼申しあげます。

私の短期留学を快く受け入れて下さり、転写因子 AHR の研究を遂行するにあたって、優しく厳しく指導して下さいました、シンシナティ大学の Alvaro Puga 教授に心から御礼申し上げます。この留学は、組織的な若手研究者海外派遣事業の援助がなければ行えませんでした。本事業に携わった加藤光保先生および MECC に代表される関係者の皆様に深く感謝致します。また、本論文には記載していませんが、コリアンダー研究のきっかけとなるベトナム実習に参加する機会を与えて下さった、大根田修先生を始めとする関係者の方々に、この書面を借りて御礼申しあげます。

学生生活を共にし、研究面および精神面で支えて下さった研究室メンバー全員に深く感謝しております。特に、同期である吉田映子氏に深く感謝致します。吉田氏がいないければ、精神的に健康なまま学生生活を終えられていないと思います。また、様々な面において影で支えて下さった、秘書の広瀬玲子氏に深く御礼申し上げます。

皆様、本当にありがとうございました。

参 考 论 文

地球規模におけるヒ素汚染の現状

安孫子ユミ

Yumi ABIKO

筑波大学大学院人間総合科学研究科
生命システム医学専攻大学院生

熊谷嘉人

Yoshito KUMAGAI

筑波大学大学院人間総合科学研究科
生命システム医学専攻教授

As

1 はじめに

ヒ素は自然界に広範に存在する半金属(メタロイド)である。特に地下水への汚染がヒ素による健康被害の主な原因であり、井戸水を介した有害性の高い無機ヒ素による慢性ヒ素中毒は、東アジア地域で多発している。世界保健機構(WHO)の環境基準値(10 μ g/L)を上回る井戸水を摂取している人々は数千万人に及ぶとされており、社会問題となっている。

本稿では、我々が行った中国内モンゴル自治区でのフィールドサイエンス及び衛生薬学的立場から行った実験化学の研究成果を紹介する。

2 ヒ素による地下水汚染

ヒ素(As)の化学形態は、無機ヒ素、アルキルヒ素及び揮発性のアルシンガスに大別される。無機ヒ素には主に3価と5価が存在し、3価の無機ヒ素の方が高い毒性を有する。¹⁾ ヒ素は産業活動や火山活動によって、大気にもごく僅かであるが存在する。天然に単体として存在することはまれで、硫ヒ鉄鉱(FeAsS)等として地殻中に存在する場合が多い。一般に、このような複合体は安定であるが、地殻中のpH、温度や酸化還元状態の変化により、無機ヒ素が遊離して近傍の地下水に混入することがヒ素の地下水汚染の主因と考えられている。²⁾

地下水を介したヒ素汚染は世界中で認められている(表1)。高濃度のヒ素地下水汚染地域として、南米ではアルゼンチン、チリ、及びメキシコが知られている。アジアでは、中国、バングラデシュ、インド西ベンガル地方、ベトナム、タイ、台湾等が挙げられる。^{3,4)} 特に中国における地下水の飲用による地

表1 世界各地の地下水中ヒ素濃度

国/地域	ヒ素濃度 (μ g/L)
バングラデシュ	<1~2,500
インド(西ベンガル地方)	<10~3,200
ベトナム	1~3,050
タイ	1~5,000
台湾	10~1,820
内モンゴル	<1~2,400
新疆, 山西	40~750
アルゼンチン	<1~9,900
チリ	100~1,000
ブラジル	0.4~350
メキシコ	8~620
ドイツ	<10~150
ハンガリー, ルーマニア	<2~176
スペイン	<1~100
イギリス	<1~80

文献3より一部改変。

域性ヒ素中毒は深刻で、ヒ素曝露人口は200万人以上であると推定されており、1990年初めには重点的な予防・治療対象の地方病の1つとして指定されている。地域性ヒ素中毒のうち、内モンゴル自治区、山西省や新疆ウイグル自治区では、井戸水の飲用に起因するヒ素中毒が多い。中国では文化大革命後に、感染症防止や農業用水の確保を目的とした各家庭での井戸掘削により、慢性ヒ素中毒の発症にかかわるヒ素汚染が拡大したとされる。バングラデシュでは、独立などの影響による急激な人口流入に伴う水需要の増加がヒ素汚染の原因とみなされている。一部の地域では、汚染された井戸水の飲水を避けるために、池などの水を利用している。

一方、我が国では上水道の普及率平均値が98%と高いために、ヒ素の地下水汚染に起因する慢性ヒ素中毒の事例はほとんどないが、2003年に上水道普及率が70%を下回る茨城県神栖市(旧神栖町)に



において、ジフェニルアルシン酸という合成有機ヒ素の地下水への混入による住民の健康被害が起きた。当時は、旧日本軍の毒ガス兵器成分の地下水への混入が疑われたが、後の詳細な調査により、原因は当該有機ヒ素の不法投棄によると断定された。汚染された土壌は掘削除去され、主に焼却処理された。また、専用の浄化装置を用いた化学抽出により、有機ヒ素を浄化する技術の開発が急速に進められた。

汚染発覚から6年経過した2009年の段階でも、地下水中にWHOの飲料水基準値である $10\mu\text{g/L}$ を大幅に越えるヒ素が検出されている。対策として、汚染地下水を汲み上げて粉末活性炭に吸着させ、ヒ素を取り除く作業が行われている。

3 慢性ヒ素中毒の毒性メカニズムの 解明及び介入研究

無機ヒ素の中毒症状は、急性時と慢性時では顕著に異なる。急性時では悪心、嘔吐、腹痛、更には胃腸障害が観察されるが、慢性時では色素沈着、色素脱着、手のひら及び足の裏の角質変性のような皮膚疾患、レイノー症候群のような末梢血管障害、台湾に代表される重度の動脈硬化症である烏脚病、高血圧症等の循環器疾患や種々のがんが生じる。^{1,5)}しかし、毒性発現メカニズムの詳細はまだまだ不明な点が多い。

1. 断面調査

慢性ヒ素曝露で見られる循環器疾患の症状は、神経伝達や血管調節に重要な働きを担うガス状シグナル分子である一酸化窒素(NO)^{6,7)}の産生低下で観察される疾患の症状に酷似している。また、生体内NO産生が低下すると、活性酸素種(ROS)の濃度が上昇して酸化ストレスが惹起されることが示唆されている。⁸⁾そこで当研究室は、「慢性ヒ素中毒で観察される末梢血管障害や循環器疾患は生体内NO産生の低下によるのではないか」という作業仮説(図1)を構築し、生体内ヒ素濃度とNOとの量-反応関係を明らかにすることを目的として、中国の地域性慢性ヒ素汚染地域において断面調査を行った。⁹⁾

筑波大学、旭川医科大学、聖マリアンナ医科大学、岡山大学、東海大学及び中国医科大学からなる共同研究グループは、中国内モンゴル自治区五原県住人に対してインフォームドコンセントを得た上で、井

戸の使用期間(平均18年間)、生活環境が類似している当該住民の中から、慢性ヒ素曝露患者として33名(男性21名、女性12名)及び対照として10名(男女各5名)を抽出した。慢性ヒ素曝露患者群は年齢13~73歳(平均年齢42歳)で、色素沈着、色素脱着、手足の角質変性、末梢血管障害等の症状が認められた。汚染が深刻な中国でのヒ素の飲料水基準値は $50\mu\text{g/L}$ であるのに対して、調査した住民が使用している井戸水のヒ素濃度は $410\pm 110\mu\text{g/L}$ であり、その80%以上が5価の無機ヒ素であった。対照群は年齢23~68歳(平均年齢37歳)からなり、慢性ヒ素中毒症状が認められなかった。彼らが使用している井戸水のヒ素濃度は、 $20\pm 10\mu\text{g/L}$ と中国の飲料水基準値を下回っていた。

慢性ヒ素曝露群の血液中ヒ素濃度の平均値は、対照群の約6倍高い値を示した。生体内で産生される一酸化窒素(NO)は血管圧調節を担うガス状物質であることから、NO産生量の低下は循環器疾患の一つの指標として捉えることができる(図1)。驚くべきことに、ヒ素曝露群の血清中NO代謝物濃度は対照群のその約半分まで低下しており、図2に示すとおり、血清中NO代謝物濃度は血中ヒ素濃度に逆相関した。⁹⁾また、酸化ストレスを示す指標である血清中過酸化脂質(LPO)値は、ヒ素曝露群の方が対照群より有意に高い値を示した。¹⁰⁾以上より、ヒトが慢性的にヒ素に曝露されると、酸化ストレスが生じているだけでなく、生体内NO産生が低下するという興味ある事実が明らかとなった。

2. 実験動物を用いた検証

内モンゴル自治区での断面調査で得た知見を確認

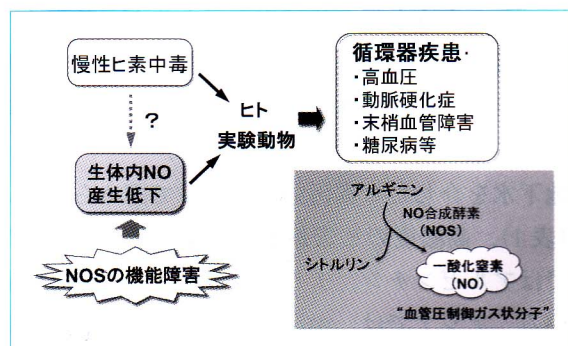


図1 慢性ヒ素中毒及び血管内皮からのNO産生低下によって観察される循環器疾患の類似性

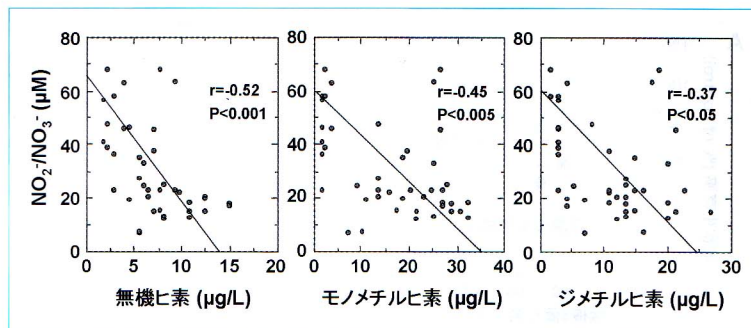


図2 慢性ヒ素中毒地域住民の血液中ヒ素濃度と血清中NO代謝物濃度との相関性

無機ヒ素は生体内でメチル化されてモノメチルヒ素及びジメチルヒ素に代謝される。生体内で産生されるNOは、不安定で容易に酸化されてNO₂及びNO₃に変換される。文献9より一部改変。

する目的で、ヒトとヒ素代謝の酷似しているウサギを用いて、長期ヒ素曝露(5 mg/L 無機5価ヒ素を自由飲水)実験を行った。ヒ素曝露後18週間目において、慢性ヒ素中毒患者と同様にNO産生の低下及び酸化ストレスが観察された。^{11,12)} このような条件下において、NO合成酵素(NOS)の基質となるアルギニンの臓器濃度に差異は認められなかったが、NOSの補酵素の1つであるテトラヒドロbiopterinの臓器濃度が対照群の約60%まで減少していることが明らかとなった。¹¹⁾ 定常時において、NOSは補酵素の1つであるNADPHの電子伝達により、アルギニンからNO及びシトルリンを産生する(図1)。ところが、何らかの要因により組織中アルギニンあるいはテトラヒドロbiopterin量が減少すると、NOSは“NADPH酸化酵素”として働き、NO産生低下に伴い酸素を活性化してROSを産生する。¹¹⁾ このことは、慢性ヒ素曝露によって生じるROSの産生増加には、一部NOSの機能障害が関与することを示唆している。

3. 介入研究

井戸水を介した慢性ヒ素中毒患者の生体内ヒ素濃度は、ある程度維持されていることが考えられる。そこで、慢性的に高濃度のヒ素を含んだ井戸水を飲水した住民に対して、井戸水を改水することで慢性ヒ素中毒が改善するか否かを調べる介入研究を行った。¹³⁾

井戸水中ヒ素濃度が中国の環境基準値を下回る37 μg/Lの井戸を見だし、1年間慢性ヒ素中毒患者に供給した。井戸の改水前にヒ素濃度として180

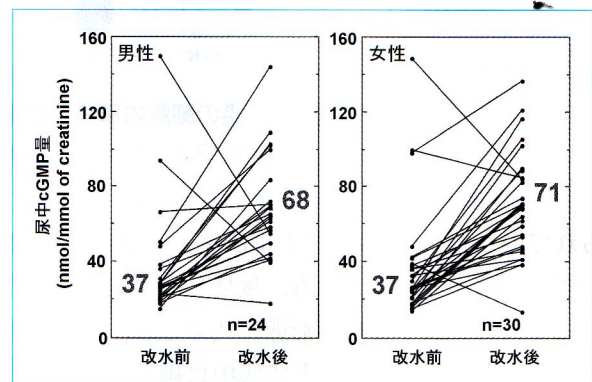


図3 井戸水改善による慢性ヒ素中毒患者の生体内NO産生低下の改善

NOはグアニシル酸シクラーゼの活性化を通してcGMP産生を増加させる。改水により尿中cGMP量が増加したことから、慢性ヒ素曝露によって低下したNO産生低下が改水により改善したことを示している。文献13より一部改変。

±60 μg/Lを飲水していた研究対象患者の血中及び尿中ヒ素濃度は、改水後には顕著に低い値を示した。このような条件下において、慢性ヒ素曝露により低下した生体内NO産生(この場合は尿中cGMP量を指標)は有意に増加した(図3)。また末梢血管障害の軽減だけでなく、¹³⁾ 手のひらの角質変性も改善された。これらの介入研究の成果は、慢性ヒ素汚染地域での中毒症状の改善と予防対策に貢献できることを示唆している。

4 ヒ素に対する細胞応答と転写因子 Nrf2 の役割

細胞をヒ素に曝露すると、PI3K/Akt, NF-κB及びERK1/2等のシグナル伝達が生じることが知

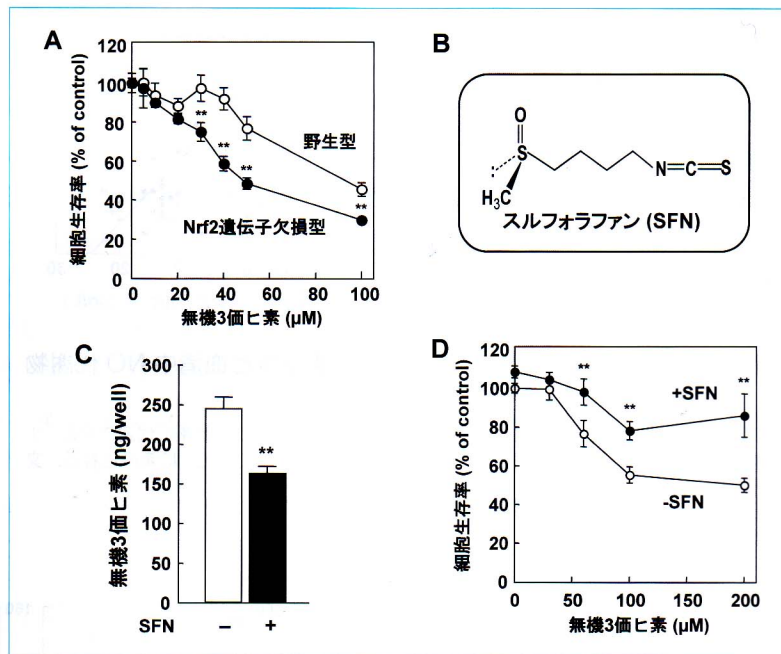


図4 ヒ素の細胞内蓄積及び細胞毒性における転写因子 Nrf2 の役割

SFN : スルフォラファン. 文献 14, 22 より一部改変.

られていた。これらのシグナル伝達の感知には、ROS の関与が考えられる。一方、無機ヒ素は細胞内に取り込まれると様々な化学形態に代謝され、還元と酸化メチル化を受けることで尿中に排泄される。^{14,15} また3価のヒ素はグルタチオン抱合され、多剤耐性関連タンパク質(MRP)のようなトランスポーターを介して細胞外に排泄される。^{14,16,17} しかしながら、ヒ素によって生じる酸化ストレスの抑制並びにヒ素の解毒・排泄に関わる遺伝子産物を統括的に制御している転写因子は、知られていなかった。そこで当研究室では、酸化ストレスや親電子性物質に対する細胞応答に重要な役割を示す、転写因子“Nrf2”¹⁸ *に着目した。

種々の培養細胞を用いて検討した結果、無機ヒ素はNrf2を活性化し、ヘムオキシゲナーゼ-1(HO-1)などの抗酸化タンパク質や、無機ヒ素の細胞外排泄亢進に係るグルタチオン合成律速酵素のグルタミルシステインリガーゼ(GCL), グルタチオン-S-転移酵素(GST)及びMRPのような下流遺伝子群の転写活性化を生じた。^{14,19,20} 同様なNrf2の活性化は、茨城県神栖市で見いだされたジフェニルアルシンの

ような有機ヒ素でも観察された。²¹ ヒ素曝露によるNrf2活性化には、少なくともROSの細胞内産生増加が関係する。¹⁹

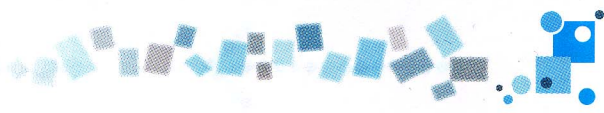
Nrf2欠損マウスの初代肝細胞を用いて実験した結果、無機ヒ素曝露で見られたGCL, GST及びMRPの発現誘導能は消失し、ヒ素に対する感受性は増大した(図4A)。¹⁴ 一方、ブロッコリースプラウトに含まれているNrf2活性化剤スルフォラファン(図4B)で事前に処理してGCL, GST及びMRPを発現誘導しておくと、無機ヒ素単独曝露と比較して細胞内ヒ素濃度は低下し、細胞毒性は軽減された(図4C, D)。²²

以上の知見は、Nrf2が無機ヒ素で生じる酸化ストレスや解毒・排泄に重要な役割を演じていることを強く示唆している。さらに、我々は最近HepG2細胞を用いて、Nrf2制御タンパク質であるHO-1が無機ヒ素の毒性軽減だけでなく、Nrf2のポジティブフィードバック因子として働くことも見いだしている。²³

5 おわりに

慢性ヒ素汚染地域での介入研究において、生体内

* Nrf2 についての用語解説は、641 頁参照。



ヒ素濃度を低下させると慢性ヒ素曝露による中毒症状は改善されるという事実を示した。現状では、ヒ素汚染地域のすべての井戸水を改水することは水源や費用等の諸問題を考慮すると不可能に近く、ヒ素汚染の問題は継続して世界的な課題である。生体は無機ヒ素の生体内侵入に対して、転写因子 Nrf2 の活性化を介して本メタロイドの細胞外排泄を亢進するシステムを有していることが考えられる。我々が行った培養細胞の結果からすると、食材に含まれている Nrf2 活性化剤の摂取により、個体レベルにおいても本メタロイドに対する感受性は制御できるかもしれない。これまで、スルフォラファンをはじめとする様々な Nrf2 活性化能を有する植物由来成分は見いだされており、これらを使用した動物実験並びに慢性ヒ素汚染地域での介入研究が期待される。

参考文献

- 1) Ratnaike R. N., *Postgrad. Med. J.*, 79, 391-396 (2003).
- 2) Smedley P. L. et al., *Appl. Geochem.*, 17, 517-568 (2002).
- 3) Nordstrom D. K., *Science*, 296, 2143-2145 (2002).
- 4) Shinkai Y. et al., *J. Health Sci.*, 53, 344-346 (2007).
- 5) Engel R. R. et al., *Epidemiol. Rev.*, 16, 184-209 (1994).
- 6) Nathan C., *FASEB J.*, 6, 3051-3064 (1992).
- 7) Umans J. G. et al., *Annu. Rev. Physiol.*, 57, 771-790 (1995).
- 8) Higashi Y. et al., *Circ. J.*, 73, 411-418 (2009).
- 9) Pi J. B. et al., *Free Radic. Biol. Med.*, 28, 1137-1142 (2000).
- 10) Pi J. B. et al., *Environ. Health Perspect.*, 110, 331-336 (2002).
- 11) Pi J. B. et al., *Free Radic. Biol. Med.*, 35, 102-113 (2003).
- 12) Nikaïdo M. et al., *Environ. Toxicol.*, 18, 306-311 (2003).
- 13) Pi J. B. et al., *Environ. Health Perspect.*, 113, 339-341 (2005).
- 14) Kumagai Y. et al., *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 47, 243-262 (2007).
- 15) Shinkai Y. et al., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 237, 232-236 (2009).
- 16) Kala S. V. et al., *J. Biol. Chem.*, 275, 33404-33408 (2000).
- 17) Leslie E. M. et al., *J. Biol. Chem.*, 279, 32700-32708 (2004).
- 18) Motohashi H. et al., *Trends Mol. Med.*, 10, 549-557 (2004).
- 19) Pi J. B. et al., *Exp. Cell. Res.*, 290, 234-245 (2003).
- 20) Aono J. et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 305, 271-277 (2003).
- 21) Sumi D. et al., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 223, 218-224 (2007).
- 22) Shinkai Y. et al., *FEBS Lett.*, 580, 1771-1774 (2006).
- 23) Abiko Y. et al., *J. Toxicol. Sci.*, 35, 419-423 (2010).

薬学 昔むかし

下山順一郎(帝大教授・薬学会副会頭)
現役のまま急死

薬学雑誌 1912年度 2月号巻頭と204頁

東京大学製薬本科，明治11年の第1回卒業生・首席にして，同20年新生帝国大学薬学科の初代教授に就任，21年私立薬学校(のち東京薬学校)初代校長，22年薬学会・初代会頭，32年には正親町伯爵に次いで薬剤師会・第2代会長となる。明治45年2月はこれらすべてが在任中で，まさに当時の薬学をリードしていた。

当時は若死が多かったから薬誌は訃報が多いのだが，彼は特別で，追悼関連記事は14頁に亘る。「先生は先ごろより糖尿病の症候あり。しかし差たることもなく日夜諸種の研究に耽られ，現に薨去の前日にありても客を迎え，その研究業績を語り，なお之によりて財を獲たらんには以って薬学専門学校設立の費となさん，などと楽しみに物語られつつ在りしに，その翌日(2月12日)朝の4時，例の如く目覚められたるも，風邪の気味ありとて起床せられず，6時ごろ急に身体違和を感じ嘔吐，昏睡に陥れり。(略) 急報に接し駆けつけた池口夫妻，丹羽，高橋(順)，三浦，橋本3医学士らが見守る中，

あらゆる手当てを講ぜしも，急性脳溢血にして予後不良なりとの診断に，一同悲嘆の涙に暮れつつも，なお万一の僥倖を祈り看護に尽くせしも，午後1時終に起つべからざるに至れり」。

この急変はたちまち諸方に伝わり，薬界の巨星は全部，下根岸の同邸に集まり，京浜薬界，朝野の人士の見舞い，引きも切らず，夕方5時には薬学会事務所理事会が開かれ，先生を名誉会員に推薦することが決まる。興味深いのはこの間，生きているかのように扱われたことだ。13日は市内各紙がこぞりて先生の危篤を報じ，肖像を掲げ略歴功績を列挙，哀れみたり。

凶報は天聴にも達し，14日特旨を以って位一級被進，叙従三位，授旭日重光章。大学は「賜本俸一級俸」という辞令を出した。14日夜10時薨去正式発表。15日午後，両陛下の御思召により勅使として侍従伯爵清水谷實英を差遣せられ，白絹2疋を下賜せらる。宮内省からは祭資金700円を賜れり。このようなことは「医薬界を通じて殆ど空前のことに属す。もって先生の偉勲を証するに足るべし」とある。嘉永6年生まれ，旧犬山藩士，東京府士族，享年60歳。

小林 力

やくがく むかしむかし

参考論文 2～4 については学術雑誌掲載論文から構成されていますが、著作権者(出版社、学会等)の許諾を得ていないため、筑波大学では電子化・公開しておりません。
なお、電子ジャーナルとして出版社から公開されていますので、契約している場合は全文を読むことができます。詳しくは下記のリンク先をご覧ください。

論文 2) <http://dx.doi.org/10.2131/jts.35.419>

論文 3) <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041008X1100192X>

論文 4) <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/tx400085h>