

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08042

研究課題名(和文) カドミウムの毒性防御を担う小胞体ストレス応答系と活性イオウ分子産生系の協調的役割

研究課題名(英文) Role of reactive sulfur species and ER stress response in protection against cadmium toxicity

研究代表者

新開 泰弘 (Shinkai, Yasuhiro)

筑波大学・医学医療系・助教

研究者番号：10454240

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：環境汚染重金属であるカドミウムは親電子性を有しており、細胞内タンパク質のシステイン残基を修飾することでそれらの機能障害や細胞毒性を発揮する。本研究では、高い求核性を有するパースルフィドやポリスルフィドのような活性イオウ分子と、小胞体ストレス応答系のカドミウムに対する防御的役割を明らかにすることを目的とした。その結果、細胞はカドミウムに対して活性イオウ分子の産生に関わる酵素を誘導する応答性を有していること、活性イオウ分子はカドミウムのイオウ付加体の形成を介して毒性防御に働く機能性を有することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Cadmium has electrophilic property to modify cysteine residues in cellular proteins, resulting in its dysfunction and cytotoxicity. In this study, role of reactive sulfur species such as persulfides/polysulfides and ER stress response in protection against cadmium toxicity was examined. We found that cadmium induces enzymes associated with the production of reactive sulfur species. Also, reactive sulfur species were found to be protective against cadmium toxicity via formation of sulfur adducts of cadmium.

研究分野：分子毒性学

キーワード：カドミウム 活性イオウ分子 小胞体ストレス応答

1. 研究開始当初の背景

環境中には多種多様な化学物質が存在し、生体は常にそれらのストレスに曝されている。その中でも重金属であるカドミウムはイタイタイ病の原因物質であることが知られているが、現在でも低レベルで環境中および食品中にコピキタスに存在しヒトの健康を障害する可能性が指摘されている。カドミウムの生体影響を理解するには、その毒性発現機構の解明が不可欠であり、国内外の研究者によりこれまで積極的に研究が進められてきた。カドミウムは親電子性を有する重金属であることから、求核性を有するタンパク質のシステイン残基と共有結合を形成することによりその機能障害を引き起こし、それが毒性発現の一因であると考えられている。一方、カドミウムに対する防御応答メカニズムはメタロチオネイン (MT) が中心的な役割を担っていると考えられており、MT に代わる代替的な生体防御システムに関する知見は非常に乏しい。一般に有害な化学物質に曝された細胞は、ストレスを感知し、応答・適応する防御システムを備えている。しかしながら、その曝露量が過剰な場合や曝露期間が長期に渡る場合には、生体が適応可能な閾値を超えて恒常性が破綻し、その結果として中毒症状を引き起こす。したがって、カドミウムによる毒性の表現型は、毒性発現系と生体防御系との総和であり、その意味で特に生体防御系の解明は、カドミウムの毒性を評価する上で重要である。

最近、これまで硫化水素産生酵素として考えられていたシスタチオニン リアーゼ (CSE) およびシスタチオニン シンターゼ (CBS) は、シスチンを基質としてシステインパースルフィドおよびシステインポリスルフィドを産生する酵素であることが明らかとなった (Ida T et al. *PNAS* 2014)。パースルフィドやポリスルフィドのように複数繋がったイオウ原子は他のイオウ原子に転移可能であるという特徴を持ち、システインパースルフィドを起点として様々なパースルフィド/ポリスルフィド (グルタチオンパースルフィド、タンパク質結合型のポリスルフィド等) が産生されうる。我々は、このようなパースルフィド/ポリスルフィドを有する分子を総称して活性イオウ分子と呼んでいる。活性イオウ分子の最も重要な化学的な特徴は、 pK_a 値が下がることによりチオール基と比較して非常に高い求核性 (親電子物質との反応性) を獲得する点にある。このことから、カドミウムも活性イオウ分子との反応により不活性化されるのではないかと予想した。イオウ付加体となったカドミウムは親電子性を消失していることから、カドミウムの新奇解毒代謝物であることが考えられる。

加えて、カドミウムに対する活性イオウ分子産生系の応答には小胞体ストレス応答系

が介在していることが考えられる。なぜなら、小胞体ストレス応答に伴って活性化される転写因子 ATF4 はプロモーター上の C/EBP-ATF response element (CARE) 領域に結合して活性イオウ分子の産生酵素である CSE およびシスチントランスポーターである xCT の発現を制御していることが報告されているからである。したがって、生体はカドミウムに対して、小胞体ストレス応答系の活性化を介して活性イオウ分子産生を増加させることにより、カドミウムの不活性化を促進させる応答システムを有していることが考えられる。

2. 研究の目的

本研究では環境汚染重金属であるカドミウムを用い、小胞体ストレス応答系を介した活性イオウ分子産生系の応答とその防御的役割を分子レベルで明らかにすることを目的とする。また、活性イオウ分子がカドミウムを不活性化する機能性についても検討し、カドミウムに対する生体防御システムとしての活性イオウ分子の役割とその応答機構の一端が明らかとなることが期待できる。

3. 研究の方法

カドミウムの主要な標的臓器は腎臓であるが、1) 肝臓にも蓄積すること、2) 血管内皮細胞にも障害を与えることから、本研究ではマウス初代肝臓細胞および血管内皮細胞を用いた。mRNA 量はリアルタイム PCR、タンパク質量はウエスタンブロットで検出した。活性イオウ分子量は蛍光プローブである SSP4 を用いて測定した。また、親電子プローブである p -(4-Hydroxyphenyl)ethyl iodoacetamide (HPE-IAM) と安定同位体を用いた LC-MRM-MS 法を確立して測定した。細胞内カドミウムの蓄積量は ICP-MS 法にて測定し、カドミウムのイオウ付加体は ESI-MS 法にて検出した。細胞毒性は MTT アッセイで検討し、インビボにおける急性肝毒性は血中 AST および ALT 量にて評価した。

4. 研究成果

カドミウムに対する活性イオウ分子産生酵素群の細胞応答性について検討したところ、カドミウムに曝露したマウス初代肝細胞において、活性イオウ分子の産生酵素の 1 つである CSE の遺伝子発現の誘導が観察されたが、小胞体ストレス応答性の転写因子 ATF4 の活性化は観察されなかった。肝細胞における CSE の発現誘導には、小胞体ストレス応答系とは別の因子が介在しているのかもしれない。一方、カドミウムの曝露濃度依存的に CBS タンパク質の発現量の増加が観察された。そこで、野生型マウスと CSE 欠損マウスの初代肝細胞におけるカドミウムの細胞毒性を検討したところ、CSE 欠損型の初代肝細胞

胞はカドミウムに対して有意に高い感受性を示した。このとき、細胞内における活性イオウ分子の量は確かに低下していた。次に、ウシ大動脈血管内皮細胞 (BAEC) において、CBS および CSE をノックダウンしたときの細胞内活性イオウ分子量を測定したところ、特に CSE のノックダウンにより活性イオウ分子の量が低下し、同条件下においてカドミウムの細胞毒性は増強した。これらのことから、細胞はカドミウムに対して活性イオウ分子の産生に関わる酵素群の誘導に働く応答性を有していること、そして活性イオウ分子はカドミウムの毒性に対して防衛的に働いていることが示唆された。

次に、活性イオウ分子を増加させるようなサプリメントの処理によりカドミウムの毒性を化学防御できる可能性について検討した。ポリスルフィドのモデル化合物である Na_2S_4 をマウス初代肝細胞に処理すると、確かに細胞内における活性イオウ分子の量は増加した。また、 Na_2S_4 の処理によりカドミウムの細胞毒性は軽減された。このとき、細胞内のカドミウム蓄積量は低下していたことから、 Na_2S_4 はカドミウムの不活性化および細胞内への取り込みの阻害を介して化学防御に働くことが分かった。また、野生型マウスと CSE 欠損マウスを用いてインビボにおける急性肝毒性を指標にカドミウムに対する感受性を比較したところ、CSE 欠損マウスは野生型マウスと比較して高い感受性を示した。更に、 Na_2S_4 の処理により、カドミウムの急性肝毒性は軽減された。MS 解析により、 Na_2S_4 との反応により生成されたカドミウムのイオウ付加体として、硫化カドミウム (CdS) とチオ硫酸カドミウム (CdS_2O_3) を同定したが、前者は安定な付加体であるのに対して後者は不安定な付加体であるために、CdS が少なくともカドミウムの不活性化・解毒に寄与することが示唆された。以上より、細胞レベルおよび個体レベルにおいて、活性イオウ分子はカドミウムの毒性防御に重要な役割を果たしていることを明らかにした。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 10 件)

1. Akiyama M*, Shinkai Y*, Unoki T, Shim I, Ishii I, Kumagai Y. The capture of cadmium by reactive polysulfides attenuates cadmium-induced adaptive response and hepatotoxicity. *Chemical Research in Toxicology* 2017; 30: 2209-2217. (*equal contribution) doi: 10.1021/acs.chemrestox.7b00278.
2. Abiko Y*, Shinkai Y*, Unoki T, Hirose R, Uehara T, Kumagai Y. Polysulfide Na_2S_4 regulates the activation of PTEN/Akt/CREB signaling and cytotoxicity mediated by 1,4-naphthoquinone through formation of sulfur adducts. *Scientific Reports* 2017; 7: 4814. (*equal contribution) doi: 10.1038/s41598-017-04590-z.
3. Abiko Y, Sha L, Shinkai Y, Unoki T, Luong NC, Tsuchiya Y, Watanabe Y, Hirose R, Akaike T, Kumagai Y. 1,4-Naphthoquinone activates the HSP90/HSF1 pathway through the S-arylation of HSP90 in A431 cells: Negative regulation of the redox signal transduction pathway by persulfides/polysulfides. *Free Radical Biology & Medicine* 2017; 104: 118-128. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.12.047.
4. Shinkai Y, Masuda A, Akiyama M, Xian M, Kumagai Y. Cadmium-mediated activation of the HSP90/HSF1 pathway regulated by reactive persulfides/polysulfides. *Toxicological Sciences*. 2017; 156: 412-421. doi: 10.1093/toxsci/kfw268.
5. Hara T, Yoshida E, Shinkai Y, Yamamoto C, Fujiwara Y, Kumagai Y, Kaji T. Biglycan Intensifies ALK5-Smad2/3 Signaling by TGF- β 1 and Downregulates Syndecan-4 in Cultured Vascular Endothelial Cells. *Journal of cellular biochemistry*. 2017; 118: 1087-1096. doi: 10.1002/jcb.25721.
6. Nishina T, Deguchi Y, Miura R, Yamazaki S, Shinkai Y, Kojima Y, Okumura K, Kumagai Y, Nakano H. Critical contribution of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (NRF2) to electrophile-induced Interleukin-11 production. *Journal of Biological Chemistry*. 2017; 292: 205-216. doi: 10.1074/jbc.M116.744755.
7. Shinkai Y, Kimura T, Itagaki A, Yamamoto C, Taguchi K, Yamamoto M, Kumagai Y, Kaji T. Partial contribution of the Keap1-Nrf2 system to cadmium-mediated metallothionein expression in vascular endothelial cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2016; 295: 37-46. doi: 10.1016/j.taap.2016.01.020.
8. Shinkai Y, Nishihara Y, Amamiya M, Wakayama T, Li S, Kikuch T, Nakai Y, Shimojo N, Kumagai Y. NADPH-cytochrome P450 reductase-mediated denitration reaction of 2,4,6-trinitrotoluene to yield nitrite in mammals. *Free Radical Biology and Medicine*. 2016; 91: 178-187. doi:

10.1016/j.freeradbiomed.2015.09.011.

9. **Shinkai Y**, Li S, Kikuchi T, Shimojo N, Kumagai Y. Health survey of workers in a 2,4,6-trinitrotoluene explosives factory in Fuxin, China. *Fundamental Toxicological Sciences*. 2015; 2: 171-175. <https://doi.org/10.2131/fts.2.171>
10. **Shinkai Y**, Li S, Kikuchi T, Kumagai Y. Participation of metabolic activation of 2,4,6-trinitrotoluene to 4-hydroxylamino-2,6-dinitrotoluene in the hematotoxicity. *Journal of Toxicological Sciences*. 2015; 40: 597-604. doi: 10.2131/jts.40.597.

〔学会発表〕(計 34 件)

1. **新開泰弘**: カドミウムの毒性を制御する活性イオウ分子. 日本薬学会第 138 年会、2018 年 3 月
2. **Shinkai Y**, Masuda A, Akiyama M, M Xian, Kumagai Y. Cadmium-Mediated Activation of the HSP90/ HSF1 Pathway Regulated by Reactive Persulfides and Polysulfides. Society of Toxicology 57th Annual Meeting (San Antonio, USA) 2018 年 3 月
3. **新開泰弘**, 秋山雅博, 鶴木隆光, 石井功, 熊谷嘉人. 活性イオウ分子はカドミウムの不活性化を介して生体応答および肝毒性の惹起を負に制御する. フォーラム 2017: 衛生薬学・環境トキシコロジー、2017 年 9 月
4. 鶴木隆光, 安孫子ユミ, **新開泰弘**, 広瀬玲子, 上原孝, 熊谷嘉人. ポリスルフィド Na₂S₄ はイオウ付加体形成を通じて 1,4-NQ による PTEN/ Akt/CREB シグナルの活性化と細胞毒性を抑制する. フォーラム 2017: 衛生薬学・環境トキシコロジー、2017 年 9 月
5. 秋山雅博, 藤栄治, 鶴木隆光, **新開泰弘**, 赤池孝章, 熊谷嘉人. CSE 欠損による親電子ストレスに対する感受性増強と CSE 高発現による還元 ストレスに対する生体応答. フォーラム 2017: 衛生薬学・環境トキシコロジー、2017 年 9 月
6. **新開泰弘**, 秋山雅博, 鶴木隆光, 石井功, 熊谷嘉人. 活性イオウ分子によるカドミウムの不活性化を介した肝毒性および生体応答の制御. 第 44 回日本毒性学会学術年会、2017 年 7 月
7. 鶴木隆光, **新開泰弘**, 増田章, 秋山雅博, Ming XIAN, 熊谷嘉人. カドミウムによる HSP90 の化学修飾を介した転写因子 HSF1 の活性化と活性イオウ分子によるその制御. 第 44 回日本毒性学会学術年会、2017 年 7 月
8. 仁科隆史, 出口裕, 三浦亮介, 山崎創, **新開泰弘**, 小島裕子, 奥村康, 熊谷 嘉人. 親電子リガンドによる IL-11 産生機構とその生体における役割の解明. 第 44 回日本毒性学会学術年会、2017 年 7 月
9. **新開泰弘**, 秋山雅博, 鶴木隆光, 石井功, 熊谷嘉人. 活性イオウ分子を介したカドミウムの肝毒性の防御機構. 第 70 回日本酸化ストレス学会、2017 年 6 月
10. 安孫子ユミ, **新開泰弘**, 鶴木隆光, 広瀬玲子, 上原孝, 熊谷嘉人. 1,4-NQ 曝露による PTEN/Akt/CREB シグナルの活性化はポリサルファイドモデル化合物 Na₂S₄ により抑制される. 第 70 回日本酸化ストレス学会、2017 年 6 月
11. 鶴木隆光, **新開泰弘**, 増田章, 秋山雅博, Xian Ming, 熊谷嘉人. カドミウムによる HSP90 の化学修飾を介する転写因子 HSF1 の活性化と活性イオウ分子によるその制御. 第 70 回日本酸化ストレス学会、2017 年 6 月
12. **新開泰弘**, 熊谷嘉人. NADPH-チトクロム P450 還元酵素による 2,4,6- トリニトロトルエンの脱ニトロ化代謝反応. 環境ホルモン学会第 19 回研究発表会、2016 年 12 月
13. Unoki T, **Shinkai Y**, Sha L, Hirose R, Kumagai Y. 1,4-Naphthoquinone-mediated activation of the HSP90/HSF1 signal transduction pathway and its negative regulation by reactive sulfur species in human A431 cells. IUTOX2016 XIV International Congress of Toxicology and X Mexican Congress of Toxicology (Merida, Mexico) 2016 年 10 月
14. **新開泰弘**, 熊谷嘉人: カドミウムによるレドックスシグナル伝達経路の活性化とその制御系. 第 89 回日本生化学会大会 (仙台) 2016 年 9 月
15. **新開泰弘**, 秋山雅博, 鶴木隆光, 井田智章, 赤池孝章, 熊谷嘉人. 親電子プローブを用いた MRM-MS による生体試料中の活性イオウ分子の定量法の構築. フォーラム 2016 衛生薬学・環境トキシコロジー、2016 年 9 月

16. 秋山雅博、安孫子ユミ、新開泰弘、鷓木隆光、Ding Yunjie、外山喬士、吉田映子、熊谷嘉人. Cystathionine gamma-lyase はメチル水銀中毒症状を抑制する鍵分子である. フォーラム 2016 衛生薬学・環境トキシコロジー、2016年9月
17. Hirose R, Unoki T, Abiko Y, Shinkai Y, Sha R, Kumagai Y. An atmospheric electrophile activates heat shock factor 1 through S-arylation of heat shock protein 90. The 52nd European Congress of the European Societies of Toxicology (Seville, Spain) 2016年9月
18. 新開泰弘、秋山雅博、鷓木隆光、熊谷嘉人. カドミウムの肝毒性に対する活性イオウ分子の防御的役割. オルガネラ研究会 2016、2016年7月
19. 新開泰弘、増田章、熊谷嘉人. カドミウムによる HSP90 の化学修飾を介した転写因子 HSF1 の活性化とその防御的役割. 第 43 回日本毒性学会学術年会、2016年6月
20. 鷓木隆光、新開泰弘、沙亮、広瀬玲子、熊谷嘉人. 1,4-ナフトキノンによる HSF90/HSF1 経路の活性化と活性イオウ分子によるその制御. 第 43 回日本毒性学会学術年会、2016年6月
21. Shinkai Y, Kikuchi T, Kumagai Y. NADPH-cytochrome P450 reductase as a denitrase of 2,4,6-trinitrotoluene. The 9th International Conference on the Biology, Chemistry, and Therapeutic Applications of Nitric Oxide. The 16th Annual Scientific Meeting of the Nitric Oxide Society of Japan (仙台) 2016年5月
22. Akiyama M, Toyama T, Yoshida E, Unoki T, Abiko Y, Shinkai Y, Kumagai Y. Role of reactive sulfur species as a key molecule to diminish toxicity of the environmental electrophile in mice. The 9th International Conference on the Biology, Chemistry, and Therapeutic Applications of Nitric Oxide. The 16th Annual Scientific Meeting of the Nitric Oxide Society of Japan (仙台) 2016年5月
23. Unoki T, Shinkai Y, Abiko Y, Hirose R, Kumagai Y. Sodium tetrasulfide, a reactive sulfur species, protects cells from 1,4-naphthoquinone induced cytotoxicity through sulfur adduct formation. The 9th International Conference on the Biology, Chemistry, and Therapeutic Applications of Nitric Oxide. The 16th Annual Scientific Meeting of the Nitric Oxide Society of Japan (仙台) 2016年5月
24. Shinkai Y, Kikuchi T, Kumagai Y. NADPH-cytochrome P450 reductase-mediated denitration reaction of 2,4,6-trinitrotoluene to yield nitrite in mammals. Society of Toxicology 55th Annual Meeting (New Orleans, USA) 2016年3月
25. 鷓木隆光、新開泰弘、秋山雅博、熊谷嘉人. 活性イオウ分子によるカドミウムの毒性防御. 第 32 回臨床フリーラジカル会議、2016年1月
26. 安孫子ユミ、新開泰弘、熊谷嘉人. 親電子・活性イオウ分子付加体の化学と解析法. 新学術領域研究「酸素生物学」第 3 技術支援セミナー、2016年1月
27. 新開泰弘、中井由実、熊谷嘉人. トリニトロトルエンの脱ニトロ化反応における NADPH-チトクロム P450 還元酵素の役割. 第 88 回日本生化学会大会、2015年12月
28. 新開泰弘. 環境化学物質の生体内運命とそれに対する防御応答の分子機構. 衛生薬学・環境トキシコロジー、2015年9月
29. 新開泰弘、中井由美、熊谷嘉人. NADPH-チトクロム P450 還元酵素による 2,4,6-トリニトロトルエンの脱ニトロ化反応機構の解明. フォーラム 2015: 衛生薬学・環境トキシコロジー、2015年9月
30. 増田章、新開泰弘、熊谷嘉人. カドミウムの防御応答に関わる HSP/HSF1 経路の活性化と活性イオウ分子によるその制御. フォーラム 2015: 衛生薬学・環境トキシコロジー、2015年9月
31. 新開泰弘、鷓木隆光、鍛冶利幸、熊谷嘉人. カドミウムによる親電子シグナル伝達経路の活性化と活性イオウ分子による修飾. 第 10 回メタルバイオサイエンス研究会、2015年8月
32. 新開泰弘、三浦高、掛橋秀直、赤池孝章、熊谷嘉人. 活性イオウ分子と酸化ストレスが介在する 1,2-ナフトキノンによる可逆的な Keap1-Nrf2 経路の活性化. 第 42 回日本毒性学会学術年会、2015年6月
33. 鷓木隆光、新開泰弘、熊谷嘉人. 活性イ

オウ分子 Na₂S₄ はイオウ付加体形成を通じて 1,4-NQ による細胞毒性を軽減する.
第 42 回日本毒性学会学術年会、2015 年 6 月

34. Shinkai Y, Miura T, Kakehashi H, Akaike T, Kumagai Y. Reactive sulfur species and reactive oxygen species-mediated reversible activation of the Keap1-Nrf2 pathway by 1,2-naphthoquinone. The 7th International Congress of Asian Society of Toxicology (Jeju, Korea) 2015 年 6 月

〔その他〕

ホームページ等

筑波大学医学医療系環境生物学研究室
http://www.md.tsukuba.ac.jp/environmental_medicine/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

新開 泰弘 (SHINKAI, Yasuhiro)

筑波大学・医学医療系・助教

研究者番号：10454240