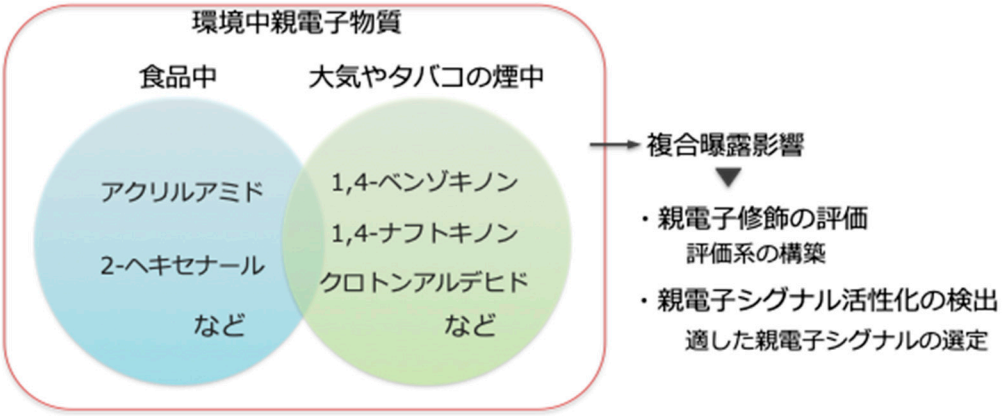
106　環境中親電子物質複合曝露による健康リスク	安孫子　ユミ

【目的】親電子物質は、タンパク質への共有結合を介して被修飾タンパク質の機能変化を引き起こし、それに伴う様々な生体応答を引き起こし得る物質である。我々は、日常生活から大気や食品中から様々な環境中親電子物質に複合的に曝露されている。しかしながら、親電子物質の複合的な曝露を考慮した研究は皆無であり、その評価方法も環境中親電子物質の複合的な曝露による細胞応答および曝露程度を推定可能な被修飾タンパク質の検出系を構築することを目的とした。

【方法】細胞はHepG2細胞、マウス由来初代肝細胞もしくはA431細胞を用いた。各親電子物質曝露による細胞毒性はMTT法にて検討した。親電子シグナルとして、Keap1／Nrf2経路、PTP1B／EGFRシグナルおよびPTEN／Aktシグナルに着目し、Nrf2、EGFRおよびAktの活性化はウエスタンブロット法で行った。チオール基に対する親電子修飾の評価はビオチンマレイミド試薬を用いたELISA（BPM-ELISA）で、アミノ基への親電子修飾はBPM-ELISAを応用し、本研究で構築したビオチンOSu試薬を用いたELISA（BAS-ELISA）で検出した。

【結果】HepG2細胞にキノン類である1, 2-ナフトキノン（1,2-NQ）、1,4-NQもしくは1, 4-ベンゾキノン（1,4-BQ）、および2-アルケナール類であるクロトンアルデヒド（CrA）もしくは2-ヘキセナールをそれぞれ曝露して得られたLD_{50}値（それぞれ56.3、41.3、533.4、389.4、もしくは463.6 μM）を基に複合曝露サンプルを調整して曝露したところ、本サンプルのLC_{50}値は120 μMであり、各LC_{50}の1／10濃度に値する濃度だった。初代肝細胞においても1,4-NQ、1,4-BQ、CrAもしくはアクリルアミドの複合曝露では、各LC_{50}の1／5濃度に値する濃度であったにも関わらず、その生存率は44%であった。これらの結果から、単独曝露では毒性が見られない濃度であっても、複合曝露では毒性が見られたことから、複合曝露によってリスクは高くなると示唆された。環境中親電子物質の曝露を評価する上で適している親電子シグナルを選定するために、EGFRが高発現している細胞であるA431細胞を1,2-NQ、1,4-NQ、1,4-BQもしくはCrAに曝露して検討した。その結果、使用した濃度域においていずれの親電子物質においても、より低濃度でNrf2が活性したことから、Nrf2の活性化が細胞への親電子物質曝露評価に適していることが示唆された。また、本研究で改良したBPM-ELISAはキノン類だけではなく、種々の親電子物質に応用可能であることが示された。BAS-ELISAと組み合わせることで、様々なサンプル中からタンパク質のアミノ基およびチオール基を修飾するような化学物質の存在を明らかにすること、およびタンパク質への修飾の程度を評価することが可能であると示唆された。

環境中親電子物資複合曝露影響評価を目的とした本研究の概略図



106. 環境中親電子物質複合曝露による健康リスク

安孫子　ユミ

筑波大学 医学医療系 環境生物学研究室

Key words：親電子物質，チオール基，複合曝露，親電子シグナル，化学修飾

緒　言

国内外での先行研究により、酸化ストレスおよび炎症時において、8-ニトロ-cGMP やニトロ脂肪酸などの内在性親電子物質が産生された結果、解毒代謝および抗酸化に関わる遺伝子群の転写誘導が生じることが報告され、親電子物質による生体応答に関わる研究が発展した。親電子物質は、タンパク質のチオール基に代表される生体内求核置換基へ共有結合（親電子修飾）して被修飾タンパク質の機能変化を引き起し、それに伴う親電子シグナル伝達を介した様々な生体応答を引き起こし得る。我々のゲノムには約 214,000 個のシステイン残基がコードされており、その 10～20%が比較的反応性の高い遊離のチオール基であるとされていることから［1］、このようなタンパク質が親電子物質のターゲットとなる可能性がある。筆者は、親電子物質が化学物質の中でも反応性が高いこと、および様々な化学物質が生体内で親電子物質へ代謝活性化されることから、親電子性に着目して研究を行っている。

我々は、日常生活を通して様々な環境中親電子物質に曝露されている。例えば、マグロ等の大型魚類に含まれるメチル水銀（MeHg）、米等に含まれるカドミウム、タバコの煙や大気に含まれるキノン類およびアルデヒド類、アルコールの代謝物であるアセトアルデヒド、フライドポテトやコーヒー等の加熱調理品に含まれるアクリルアミド（Acr）、および植物に含まれる 2-アルケナール類等が挙げられる。これらの親電子物質は、内在性親電子物質を模倣し、本細胞応答を撹乱することが予想される。この仮説を基に、これまで筆者らは環境中親電子物質である MeHg や 1,4-ナフトキノン（1,4-NQ）等を用いて、低濃度域では親電子シグナル伝達を介して親電子物質曝露に対する細胞防御応答を亢進し、高濃度域では本細胞応答が破綻して毒性を生じることを報告してきた［2］。これらのことは、環境中親電子物質の曝露が健康リスクの一つとなり得ることを示しているが、我々が様々な当該物質に曝露されているにも係わらず、親電子物質の複合的な曝露を考慮した研究は皆無なのが現状である。また、HASB 則より、ソフトな酸はソフトな塩基と、ハードな酸はハードな塩基と反応しやすく、例えば、比較的ハードとされるアルデヒド類はハードな求核剤であるアミノ基と反応しやすい傾向がある［3］。そのため、環境中親電子物質の生体影響を評価する上で、チオール基への親電子修飾だけでなく、リジンやヒスチジンのような求核性アミノ基への親電子修飾も考慮すべきといえよう。2005 年に元国際癌研究機関 IARC 所長の Christopher P. Wild が、“人が生涯にわたって相互作用する環境（Exposome）”という概念を提唱して以降、環境化学物質曝露による健康影響を評価することの重要性が再認識されており、我が国においても最近注目を集めている概念である。我々が親電子物質に曝露されることは避けられない事実であるため、筆者は、ケミカルバイオロジーを駆使して複合曝露による応答を細胞レベルから個体レベルまで検討し、本曝露を評価する指標を探索することで、国民の安全と安心の確保に貢献することを目指している。

そこで本研究では、環境中親電子物質の細胞生物学的および分析化学的手法を用いて、複合的な曝露を評価するために低濃度で起こる細胞応答および曝露程度を推定可能な被修飾タンパク質の検出系を構築することを目的とした。

方法および結果

1. 複合曝露による細胞毒性の評価

ヒト肝細胞がん由来 HepG2 細胞株（HepG2 細胞、RIKEN BRC、茨城）に 1,4-NQ（大気）、1,4-ベンゾキノン（1,4-BQ、大気およびタバコ煙）、クロトンアルデヒド（CrA、大気およびタバコ煙）、もしくは 2-ヘキセナール（Hex、植物）を 24 時間曝露した後に、3-(4,5-di-methylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide（MTT）を用いた細胞毒性試験を行ったところ、LD_{50} 値はそれぞれ 56.3、41.3、533.4、389.4 もしくは 463.6 μM であった。本 LD_{50} 値を基に複合曝露サンプルを調製して曝露したところ、本サンプルの LC_{50} 値は 120 μM（各親電子物質の合計）であり、各 LC_{50} の約 1／10 の濃度に値する濃度だった（データ未掲載）。C57BL6 マウスから採取した初代肝細胞における 1,4-NQ、1,4-BQ、CRA、Hex もしくは Acr（加熱調理品）の LD_{50} 値は、それぞれ 15.1、97.8、25.5、27.9 もしくは 2 mM 以上であった（図 1）。1,4-NQ、1,4-BQ、CRA および Acr の複合曝露では、各 LC_{50} の 1／5 濃度に値する濃度であったにも関わらず、その生存率は 44%であった。これらのことから、複合曝露では単独曝露と比較して、より毒性が亢進することが示唆された。

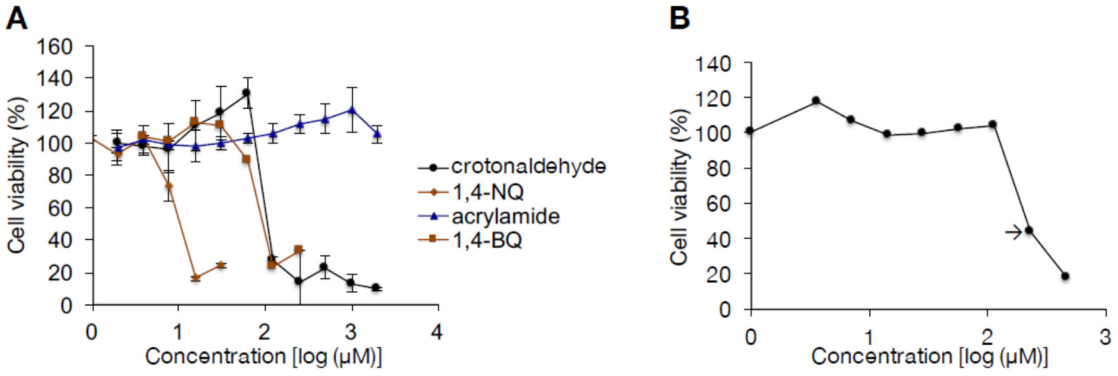


図 1. 親電子物質複合曝露による細胞毒性の亢進

マウス由来初代肝細胞をクロトンアルデヒド、1,4-ナフトキノン、アクリルアミドもしくは 1,4-ベンゾキノン（A）および 得られた各 LC_{50} 値の 2／5 ずつを混和したカクテルの希釈系列。（B）を 24 時間曝露し、MTT 法にて細胞生存率を求めた。矢印は各化合物をそれぞれの LC_{50} 値の 1／5 ずつを混和した濃度を示す（平均値±SE）。

2. 細胞生物学的手法による親電子シグナル伝達の検討

本研究では、我々の先行研究において、親電子物質により活性化すると明らかにした Keap1/Nrf2 経路、PTP1B／EGFR シグナルおよび PTEN／Akt シグナルに着目した［1］。A431 細胞を 1,4-NQ に曝露すると、5 μM から Nrf2 および Akt の活性化が認められ、Nrf2 の活性化は 10 μM をピークに、Akt の活性化は 25 μM をピークにして抑制された（図 2）。本条件下において、EGFR は 25 μM 以上で活性化した。1,4-NQ の構造異性体である 1,2-NQ でも同様に、EGFR および Akt の活性化が見られた濃度よりも低濃度から Nrf2 が活性化した。1,2-NQ（5 μM）もしくは 1,4-NQ（10 μM）の単独曝露において EGFR リン酸化の閾値以下の濃度にも関わらず、当該化合物の複合曝露では EGFR のリン酸化が検出された（データ未掲載）。一方、5～200 μM の CrA もしくは 1,4-BQ に曝露すると、CrA は 50 μM から、1,4-BQ は 25 μM から有意な Nrf2 の活性化が認められ、100 μM 以上では本活性化は逆に抑制された（データ未掲載）。

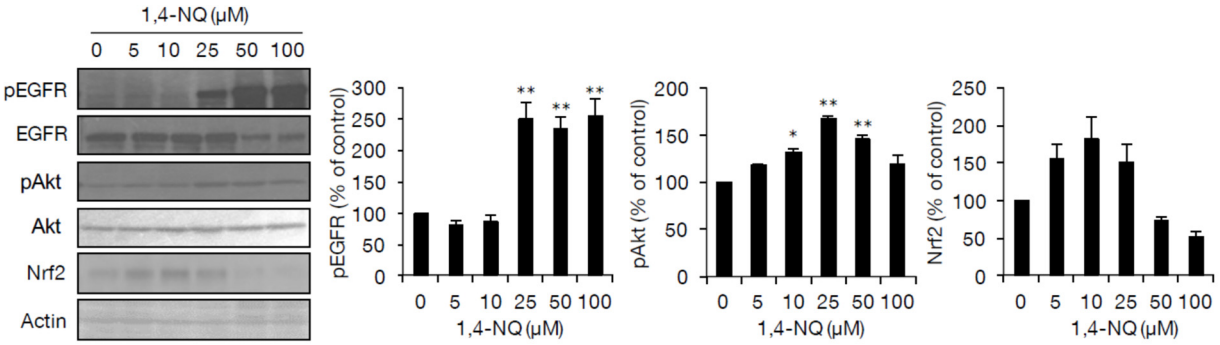


図 2. 1,4-ナフトキノンによる親電子シグナルの活性化

A431 細胞を 1,4-ナフトキノンを 30 分間曝露し、ウエスタンブロット法にて親電子シグナルの活性化を検討した。ImageJ software で各ブロットを定量し、Prism ver. 6 を用いて多重比較検定を行った。（平均値±SE、*p < 0.05、**p < 0.01、右図）。

3. 分析化学的手法による曝露評価系の検討

細胞内のタンパク質のチオール基への親電子修飾は、ビオチン PEAC5 マレイミド（BPM、Dojindo、熊本）とアビジンアガロースを用いた沈降法で検討した。各親電子物質に HepG2 細胞を曝露し、RIPA バッファーで調整した細胞溶解液（300 μg）に 300 μM BPM を 37℃で 30 分間反応させ、BPM 標識されたタンパク質をアビジンアガロースで沈降したサンプルについてウエスタンブロット法を行った。その結果、1,2-NQ、1,4-NQ、1,4-BQ、hex もしくは CrA が細胞内 Keap1 を修飾していることを示す結果を得た。

親電子物質の半定量的な評価系を確立するために BPM-ELISA を応用した。アルブミンを固相化した 96 ウェルプレートをジチオスレイトールで還元し、洗浄した後、各化学物質を加えて 37℃で 30 分間反応させた。BPM を 37℃で 30 分間反応させ、PBS で洗浄した。HRP 結合ストレプトアビジンと 37℃で 30 分間反応させた後に TTBS で洗浄し、ABTS 試薬でビオチン標識されたチオール基を検出した。親電子物質を広範に検出できることを確認するべく、筑波大学ケミカルパネルプロジェクトに供与された化合物 22 種類を用いた。その結果、22 種類中 2 種類が顕著にチオール基を修飾しており、そのどちらも親電子物質（クルクミンおよびオーラノフィン）であった（図 3）。また、環境中親電子物質への曝露量を反映した BPM-ELISA を構築するために、アルブミン（1 mg/mL）と 1,4-NQ、1,4-BQ、CrA もしくは Hex とをそれぞれ反応させた後に、固相化して BPM-ELISA を行った。その結果、いずれの親電子物質においても濃度依存的なアルブミンのチオール基への修飾が認められた（データ未掲載）。

CrA および 1,4-BQ のアミノ基への修飾は、アミノ基の標識試薬であるビオチン AC5-OSu（BAS、Dojindo）を用いた BAS-ELISA で検討した。アルブミンを固相化した 96 ウェルプレートに各化学物質を加えて 37℃で 30 分間反応させた。ビオチン AC5-OSu（BAS、Dojindo）を 37℃で 2 時間反応させ、PBS で洗浄し、HRP 結合ストレプトアビジンと 37℃で 30 分間反応させた。TTBS で洗浄し、ABTS 試薬でビオチン標識されたアミノ基を検出した。その結果、CrA および 1,4-BQ の濃度依存的に BAS のタンパク質への結合が減少した。

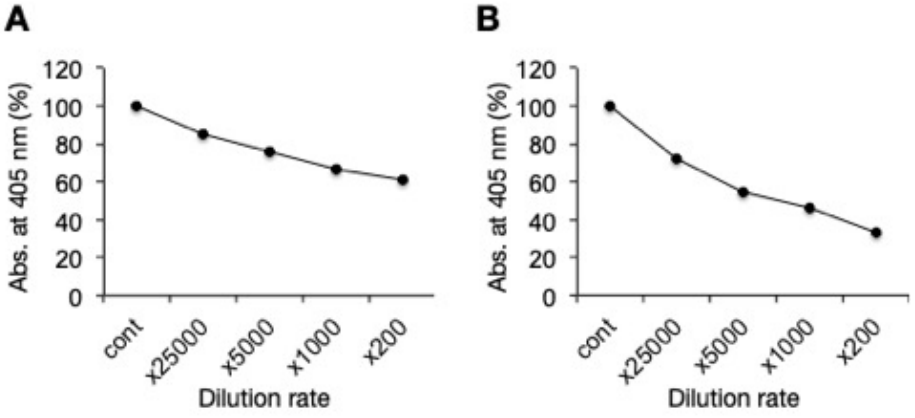


図 3. BPM-ELISA による親電子物質の検出

オーラノフィン（A）およびクルクミン（B）を固相化したアルブミンと反応させた後に、ビオチン PEAC5 マレイミドでアルブミンのチオール基を修飾し、HRP 結合ストレプトアビジンを用いた化学発色法でその吸光度を測定した。

考　察

環境中親電子物質の単独曝露では毒性もしくは細胞応答の閾値以下であった濃度においても、複合曝露では毒性を発揮することが明らかとなった。このことから、複合曝露下では毒性に対するリスクが高まるために、複合曝露を鑑みた毒性および細胞応答の検討が必要であるといえよう。本研究では、親電子物質の複合曝露による影響を評価する指標になり得る応答として、親電子シグナルである Keap1／Nrf2 経路、PTP1B／EGFR シグナルおよび PTEN／Akt シグナルに着目した［1］。本条件下において、1）CrA もしくは 1,4-BQ では EGFR および Akt のリン酸化が認められなかったこと、2）1,4-NQ、1,2-NQ、CrA もしくは 1,4-BQ のいずれの化合物でも Nrf2 が活性したことから、親電子物質によって活性化する親電子シグナルに差異があること、および Keap1／Nrf2 経路は親電子物質の曝露を反映する指標となり得ることが示唆された。

我々を取り巻く環境中には 1,4-NQ、1,4-BQ、CrA、Acr および Hex だけではなく様々な化学物質が溢れており、それらの物質に日々曝露されているのが現状であるため、様々な親電子物質について網羅的に評価するアッセイ系が必要である。これまでに構築した BPM-ELISA では［4］、マウス肝臓 9,000 g 上清中のタンパク質を固相化し、1,4-NQ および 1,4-BQ のようなキノン化合物のみを用いて、当該アッセイ系がタンパク質のチオール基への修飾を反映しているか否かに関する評価を行った。本研究では、より一般化するためにアルブミンを固相化することで改良を試みた。本法は、キノンだけでなく、チオール基を修飾する種々の化合物の存在を評価できることが示唆された。また、予め環境中親電子物質と反応したアルブミンを固相化しても、濃度依存的なアルブミンのチオール基への修飾が認められたことから、親電子物質に曝露された細胞および個体サンプルへの応用の可能性が示唆された。親電子物質は求核性アミノ基にも結合することが知られている。当研究室の先行研究において、1,4-NQ の構造異性体である 1,2-NQ は UCHL-1 のシステイン残基を可逆的に修飾するが、リジン残基への 1,2-NQ の結合は不可逆的であることが明らかとなった［5］。本結果から、タンパク質の求核性アミノ基への親電子修飾も検出可能なアッセイを構築する必要がある。そこで、BAS-ELISA で CrA もしくは 1,4-BQ のアミノ基への修飾を検討したところ、各親電子物質の濃度依存的なアミノ基への修飾が検出されたことから、BPM-ELISA 同様に、BAS-ELISA は親電子物質の求核性アミノ基への結合を評価可能であることが示唆された。

細胞生物学的手法により環境中親電子物質の濃度依存的な Keap1／Nrf2 経路の活性化を検出すること、および分析化学的手法による BPM-および BAS-ELISA を組み合わせにより、種々のサンプル中からタンパク質の求核性アミノ基およびチオール基を修飾するような化学物質の存在、もしくはタンパク質への修飾の程度を明らかにすることが、当該物質によるリスクを評価する指標の一部として有用であろう。

共同研究者・謝辞

本研究は、上原記念生命科学財団の助成を受けたものである。

文　献

1) Jones DP. Radical-free biology of oxidative stress. Am J Physiol Cell Physiol. 2008 Oct;295(4):C849-68. Epub 2008 Aug 6. PMID: 18684987 DOI: 10.1152/ajpcell.00283.2008

2) Kumagai Y, Abiko Y. Environmental Electrophiles: Protein Adducts, Modulation of Redox Signaling, and Interaction with Persulfides/Polysulfides. Chem Res Toxicol. 2017 Jan 17;30(1):203-219. Epub 2016 Dec 16. PMID: 27981839 DOI: 10.1021/acs.chemrestox.6b00326.

3) Lopachin RM, Gavin T, Decaprio A, Barber DS. Application of the Hard and Soft, Acids and Bases (HSAB) theory to toxicant--target interactions. Chem Res Toxicol. 2012 Feb 20;25(2):239-51. Epub 2011 Nov 16. PMID: 22053936 DOI: 10.1021/tx2003257.

4) Abiko Y, Luong, NC, Kumagai Y, A Biotin-PEAC5-maleimide labeling assay to detect electrophiles. J Toxicol Sci. 2015 Jun;40(3):405-11. PMID: DOI: 25972200 10.2131/jts.40.405.

5) Toyama T, Shinkai Y, Yazawa A, Kakehashi H, Kaji T, Kumagai Y. Glutathione-mediated reversibility of covalent modification of ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 by 1,2-naphthoquinone through Cys152, but not Lys4. Chem Biol Interact. 2014 May 5;214:41-8. Epub 2014 Feb 28. PMID: 24582816 DOI: 10.1016/j.cbi.2014.02.008.