

表8 コルクマットから放散される主なVOCsと室内空气中濃度増分予測値

	Components	Emission Rate ($\mu\text{g}/\text{m}^2/\text{h}$)	Estimated Increment
C-Mat 1	Formamide	458.9	367.1
	Ethanone, 1,1'-(1,4-Phenylene)bis-	81.2	65.0
	Benzenemethanol, α,α -Dimethyl-	52.4	41.9
	Acetone	61.4	49.1
	Ethanone, 1-[4-(1-Hydroxy-1-methylethyl)phenyl]-	53.0	42.4
	Unknown	36.7	29.3
	Heptane, 2,3,6-Trimethyl-	31.3	25.0
	tert-Butyl Carbamate	30.8	24.7
	Tetradecane	26.5	21.2
	1-Hexanol, 2-Ethyl-	25.1	20.0
	Ethanone, 1-[4-(1-Methylethyl)phenyl]-	23.2	18.6
	Benzyl alcohol, α,α -Dimethyl-p-isopropyl-	24.8	19.9
	Ethanone, 1,1'-(1,4-Phenylene)bis-	24.1	19.2
	Undecane	17.7	14.2
	1,4-Methanobenzocyclodecene, 1,2,3,4,4a,5,8,9,12,12a-Decahydro-	18.3	14.6
	Benzene, 1,3-bis(1-Methylethyl)-	15.0	12.0
	Undecane	15.5	12.4
	Dodecane	14.2	11.4
	Heptane, 2,2,4,6,6-Pentamethyl-	13.5	10.8
	Butane, 2,2,3,3-Tetramethyl-	13.0	10.4
	Benzene, 1,3-bis(1-Methylethyl)-	12.1	9.7
	Decane	12.0	9.6
	Unknown	11.3	9.0
Tridecane	9.6	7.7	
Cyclohexanone, 4-(1,1-Dimethylethyl)-	9.9	7.9	
Ethanone, 1-[4-(1-Hydroxy-1-methylethyl)phenyl]-	9.2	7.4	
C-Mat 2	2-Propenoic acid, 2-ethylhexyl ester	52.9	42.4
	Naphthalene, 1,2,4a,5,6,8a-Hexahydro-4,7-dimethyl-1-(1-methylethyl)-, (1 α ,4 α ,8 α)-	23.5	18.8
	Butylated Hydroxytoluene	16.5	13.2
C-Mat 3	Butylated Hydroxytoluene	124.1	99.3
	1,4-Methanoazulene, Decahydro-4,8,8-trimethyl-9-methylene-, [1S-(1 α ,3 α ,4 α ,8 α)-	89.5	71.6
	1,2,4-Methenoazulene, Decahydro-1,5,5,8a-tetramethyl-, [1S-(1 α ,2 α ,3 α ,4 α ,8 α ,9R*)]-	55.5	44.4
	2,5-di-tert-Butyl-1,4-benzoquinone	45.1	36.1
	Naphthalene	19.7	15.8
	1,4-Methano-1H-indene, Octahydro-1,7a-dimethyl-4-(1-methylethenyl)-, [1S-(1 α ,3 α ,4 α ,7 α)-	20.0	16.0

表8 コルクマットから放散される主なVOCsと室内空气中濃度増分予測値(続き)

	Components	Emission Rate ($\mu\text{g}/\text{m}^2/\text{h}$)	Estimated Increment
C-Mat 3	Formamide	13.3	10.6
	Undecane	11.2	9.0
	Tetradecane	8.1	6.5
C-Mat 4	2-Propenoic acid, 2-ethylhexyl ester	3260.8	2608.7
	1-Hexanol, 2-ethyl-	573.7	459.0
	Acetic acid, 2-ethylhexyl ester	431.3	345.0
	Benzenemethanol, α,α -dimethyl-	370.1	296.1
	Cyclotetrasiloxane, octamethyl-	253.5	202.8
	Cyclopentasiloxane, decamethyl-	142.6	114.1
	Acetophenone	84.7	67.8
	Acetone	34.1	27.3
C-Mat 5	Naphthalene, 1,2,4a,5,6,8a-Hexahydro-4,7-dimethyl-1-(1-methylethyl)-	177.0	141.6
	Acetic Acid	97.0	77.6
	Butylated Hydroxytoluene	56.7	45.3
	Benzene, 1,4-Dichloro-	16.7	13.3
	Naphthalene, 1,2,4a,5,6,8a-Hexahydro-4,7-dimethyl-1-(1-methylethyl)-, (1 α ,4 α ,8 α)-	8.1	6.5
C-Mat 6	Butylated Hydroxytoluene	62.7	50.1
	Naphthalene, 1,2,4a,5,6,8a-Hexahydro-4,7-dimethyl-1-(1-methylethyl)-	56.4	45.1
	Formamide	23.4	18.7

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究年度終了報告書

家庭用品から放散される揮発性有機化合物の
気道刺激性及び感作性を指標とするリスク評価

1,2-ナフトキノンに対する Nrf2-Keap1 システムの防御的役割に関する研究

研究代表者 香川(田中) 聡子 国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部 主任研究官
研究協力者 熊谷 嘉人 筑波大学大学院 人間総合科学研究科 教授
研究協力者 新開 泰弘 筑波大学大学院 人間総合科学研究科 助教

研究要旨：我々は大気中に存在する揮発性有機化合物の1つとして、1,2-ナフトキノン（1,2-NQ）を同定した。本研究では、1,2-NQ に対してリスク軽減因子として働くことが予想される Nrf2-Keap1 システムの防御的役割を明らかにすることを目的とした。1,2-NQ をマウス初代肝細胞に曝露すると Keap1 への共有結合に伴い、転写因子 Nrf2 が活性化された。また、下流の解毒酵素群の発現誘導が見られた。Nrf2 欠損マウスより単離した初代肝細胞では、1,2-NQ による細胞内タンパク質への化学修飾が野生型より増加し、その毒性も増強した。一方、Keap1 欠損細胞では 1,2-NQ による細胞内タンパク質への共有結合が野生型より減少し、その毒性も抑制された。以上より、1,2-NQ に対する毒性防御の細胞応答システムとして、Nrf2-Keap1 系が重要な役割を果たしていることを明らかにした。

A. 研究目的

本研究では、我々が大気中より同定した 1,2-ナフトキノン（1,2-NQ）を揮発性有機化合物のモデルとして、当該化合物に対する Nrf2-Keap1 システムの防御的役割を明らかにすることを目的とし、1）1,2-NQ を認識する抗体の作製およびその反応特異性の検討、2）マウス初代肝細胞を用いた細胞応答試験および毒性試験を行った。

B. 研究方法

B-1. 1,2-NQ の抗体の調製

まず、1,2-NQ-KLH 結合体の合成を行った。KLH（20 mg）を 4.0 M guanidinium chloride（3.5 ml）に溶解した後、dithiothreitol（20 mg）を加えた。アルゴンガスで置換後、遮光下で2時間攪拌した。50 mM Kpi（pH 7.0）-0.1 mM EDTA（以下、buffer A と記す）で平衡化した 10 DG カラムに付し、アルゴンガスで置換した buffer A で溶出した。得られた KLH（600 µg）と DMSO に溶解した 1,2-NQ（60 µg）と

をアルゴンガス置換した buffer A 中で反応させた後 (25°C、20 min)、2 l の 50 mM Kpi (pH 7.0, 4°C) を用いて一晚透析を行った。次に、合成したハプテンを Freund Incomplete Adjuvant (初回免疫のみ Freund Complete Adjuvant を使用) と等量混合したものをウサギ (New Zealand White 系) におよそ 80 µg ずつ、3 ヶ月間、計 6 回感作させた。ELISA 法にて抗体価を測定後、全採血を行った。得られた血清 (55 ml) に等量の 10 mM Kpi (pH 7.5)-0.15 M NaCl を加え、硫酸アンモニウムを 50% 飽和濃度になるように添加、常温にて 30 分間攪拌した。遠心分離 (27000 x g, 4°C, 15 min) を行い、沈殿を 10 mM Kpi (pH 7.5)-0.02% NaN₃ (10 ml) で溶解、同様の buffer (2 l) を用いて透析を行った。2 回の透析後、再度 buffer (10 ml) を加え遠心分離 (27000 x g, 4°C, 15 min) し、上清 (15.2 mg/ml, 25 ml) をカラムに付すまで -20°C で保存した。

カラムでの精製作業は 4°C で行った。まず、20 mM Glycine-NaOH (pH 8.7)-1 M NaCl で平衡化した Protein A-Sepharose CL-4B カラム (18 x 1.8 cm, i.d.) に、40 mM Glycine-NaOH (pH 8.7)-2 M NaCl を等量加えた上記サンプルを流速 0.33 ml/min の条件で付した。平衡化と同様の buffer を用いて 280 nm の吸収が 0.15 以下になるまでカラムを洗浄した後、0.1 M Glycine-HCl (pH 3.0) を用いて抗体を溶出させた。溶出した抗体は事前に 1 ml の 1 M Tris-HCl (pH 8.0) をチューブに加えることで pH を中性にした。得られたポリクローナル抗体を 2 l の 20 mM Kpi (pH 7.2)-0.15 M NaCl-0.02% NaN₃ で透析し、PM 10 膜を用いた限外濾過法により 10 ml まで濃縮

した。最終的に 20 mM Kpi (pH 7.2)-0.15 M NaCl-0.02% NaN₃ にて 5.0 mg/ml に調整し、-40°C にて保存した。

B-2. 肝酵素溶液の調製

マウスの肝臓を適量のホモジナイズ緩衝液 [0.25 M スクロース, 5 mM トリス-HCl (pH 7.5), 0.1 mM EDTA] 中で、ハサミを用いて細切した。その後、テフロンホモジナイザーを用いて 4 倍量のホモジナイズ緩衝液中でホモジナイズした。ホモジナイズ液を遠心分離 (600 x g, 10 min) して得られた上清を、さらに遠心分離 (9,000 x g, 10 min) して 9,000 x g 上清を得た。その後、9,000 x g 上清 (3 mL) を 50 mM リン酸カリウム (KPi) 緩衝液 (pH 7.5) で平衡化したエコノ 10DG カラムに付し、3 mL の 50 mM KPi 緩衝液 (pH 7.5) で溶出した。得られた溶液を肝臓酵素溶液とし、解析まで -80°C で保存した。タンパク質の定量は後に記載した BCA 法で行い、スタンダードには bovine serum albumin (BSA) を用いた。

B-3. 多環芳香族炭化水素類の代謝活性化反応

小試験管に 1 M KPi 緩衝液 (pH 7.4) と補酵素である 10 mM NADP(H) をそれぞれ 25 µL ずつ加えた。そこへ表 1 及び図 5 に示した PAHs (10 mM) を 2.5 µL と肝臓酵素溶液 (2 mg) を添加した後、DDW を用いて全量を 250 µL とした。この代謝活性化反応液を Bio Shaker BR-33FL (TAITEC 社) で 37°C, 1 時間振盪させた。反応後、速やかに氷上で 5 分間冷却した。冷却した反応液は、直ちに実験方法 2.5

及び 2.6 に記載した方法で解析を行なった。

B-4. 電気泳動法

サンプル (2 容量) と 3 x サンプルバッファー [62.5 mM トリス-HCl (pH 6.8), 24%グリセロール, 6% SDS, 15% 2-メルカプトエタノール, 0.015% プロモフェノールブルー] を混和し、95°C で 5 分間熱変性させた後、氷上で 3 分間冷却した。その後、サンプルを常温に戻し、1 well 当たり 0.5-15 µg のタンパク質をゲルへアプライした。ゲルは、濃縮ゲル [4% アクリルアミド, 0.1% N,N'-メチレンビスアクリルアミド (BIS), 125 mM トリス-HCl (pH 6.5), 0.1% SDS, 0.4 mg/ml ペルオキシ二硫酸アンモニウム (APS), 0.2% N,N,N',N'-テトラメチルエチレンジアミン (TEMED)] と分離ゲル [10-15% アクリルアミド, 0.27-0.4% BIS, 375 mM トリス-HCl (pH 8.8), 0.1% SDS, 0.4 mg/ml APS, 0.2% TEMED] を用いた。泳動バッファーには、25 mM トリス-192 mM グリシン-0.1% SDS 溶液を用いた。クロスパワー 500 (ATTO 社) を用いて、電気泳動 (濃縮ゲル: 10 mA/枚, 分離ゲル: 25 mA/枚) を行なった。CBB 染色をする際は、SDS-PAGE したゲルを CBB 染色液 [0.01% CBB, 50%メタノール, 7.5%酢酸] に浸し、25°C で 1 時間振盪した。その後、脱色液 [5%メタノール, 7.5%酢酸] に浸し、25°C で振盪することで、適当な濃さになるまで脱色した。脱色したゲルは DDW でよく濯いだ後、RAPIDRY-MINI (ATTO 社) を用い、ろ紙上で 60°C, 45 分間減圧乾燥した。ウエスタンブロットを

行う際は、SDS-PAGE したゲルからポリビニリデンフルオライド (PVDF) 膜へ転写を行った。すなわち、クロスパワー 500 を用い、2 mA/cm² 条件下で 1 時間転写を行なった。PVDF 膜はメタノールで 30 秒間処理した。転写は、ブロットイング 1 液 [0.3 M トリス, 10%メタノール] に浸けたろ紙 2 枚の上に 2 液 [25 mM トリス, 10%メタノール] に浸けたろ紙 1 枚、さらに PVDF 膜、電気泳動したゲル、3 液 [25 mM トリス, 10%メタノール, 40 mM 6-アミノカプロイン酸] に浸けたろ紙 3 枚の順に重ねた。ろ紙は全て ATTO 社より購入した。転写後、PVDF 膜を TTBS-5%スキムミルクに浸し、室温で 1 時間振盪することでブロッキングを行なった。ブロッキングした PVDF 膜を TTBS で 5 回洗浄した後、抗 1,2-NQ 抗体 (5 mg/mL) を TTBS -0.1% BSA で 10,000 倍に希釈し、室温で 1 時間ハイブリダイズした。再度、PVDF 膜を TTBS で洗浄した後、TTBS-0.1% BSA で 5,000 倍に希釈した HRP 標識した抗ウサギ IgG 抗体を室温で 1 時間振盪させた。再度、TTBS で洗浄後、ECL western blotting assay reagent を用いて検出を行なった。

B-5. ドットブロット法

代謝活性化反応液をサンプルとして用いた。得られた反応液のタンパク濃度が 0.1 µg/µL となるように DDW を用いて希釈した。この希釈サンプルを 2 µL ずつニトロセルロース (NC) 膜上へ滴下し、30 分間自然乾燥させた後、TTBS-5%スキムミルクに浸し、室温で 1 時間振盪することでブロッキングを行なった。ブロッキ

ングしたNC膜をTTBSで5回洗浄した後、抗1,2-NQ抗体 [5 mg/mL] をTTBS-0.1% BSAで10,000倍に希釈し、室温で1時間ハイブリダイズした。再度、NC膜をTTBSで洗浄した後、TTBS-0.1% BSAで5,000倍に希釈したHRP標識した抗ウサギIgG抗体を室温で1時間振盪させた。再度、TTBSで洗浄後、ECL western blotting assay reagentを用いて検出を行なった。

B-6. 2段階反応

4 μ Lの抗1,2-NQ抗体 (5 mg/mL) を40 mLのTTBSで10,000倍に希釈し、15 mLチューブに10 mLずつ分注した。それぞれにDMSOまたはDMSOに溶解した10 mMのナフトキノン化合物を5 μ L添加し、遮光下で1時間振盪した後、BSA(最終濃度0.1%)を加え、1次抗体とした。肝臓酵素溶液 (2 mg) とDMSOに溶解した1,2-NQ (100 μ M) とを1時間反応させたものをサンプルとして、SDS-PAGEし、PVDF膜に転写した後、TTBS-5%スキムミルクでブロッキングした。そして、ハサミを用いて4等分した膜を、上述の1次抗体とそれぞれ1時間ハイブリダイズした。それぞれの膜をTTBSで洗浄した後、同一容器に集め、TTBS-0.1% BSAで5,000倍に希釈したHRP標識した抗ウサギIgG抗体を室温で1時間振盪させた。再度、TTBSで洗浄後、ECL western blotting assay reagentを用いて検出を行なった。

B-7. 初代肝細胞の単離

コラゲナーゼを用いた2段階灌流法にて肝細胞を単離した。また、肝非実質細胞を除去するためにPercoll緩衝液を用い

て遠心分離を行った。最終的に得られた肝実質細胞をコラーゲンコート (タイプ1) されたディッシュもしくはプレートに 8×10^4 cells/cm²で播種し、Willam's medium E (10%FBS、2 mM L-アラニル-L-グルタミン、100 U/mL ペニシリン、100 μ g/mL ストレプトマイシン含有) にて培養した。

B-8. MALDI-TOF/MS

20 mM Tris-HCl (pH8.5) 緩衝液中において、マウスの野生型 Keap1 (10 μ g) を1,2-NQと25°Cで30分間反応させた。Econo-Pac 10 DG カラムにて未反応の1,2-NQを除去した後、Keap1をトリプシンで消化した。ペプチドフラグメントにdithiothreitolとtrifluoroacetic acidを加えた後、更に50%アセトニトリルと0.1% trifluoroacetic acidに溶解させた α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (2.5 mg/mL) を混ぜて室温で乾燥させた。分析は窒素レーザーを備えたShimadzu AXIMA-TOF² mass spectrometerを用いて行った。

B-9. 細胞内オキシダントの測定

H₂DCFDA法を用いた。すなわち、肝細胞にH₂DCFDA (20 μ M) を37°Cで1時間前処理し、1,2-NQ (10 μ M) を37°Cで20分間曝露した後、その蛍光度を蛍光顕微鏡DMIRE-2にて測定した。

B-10. 毒性試験法

MTTアッセイを行った。96 well プレートに初代肝細胞を播種して3日間培養し、無血清培地で更に一晚培養してから

1,2-NQ を 24 時間曝露した。その後、MTT 溶液 (5 mg/ml) を培地量の 20 分の 1 量加えて、37°C で 4 時間反応させた。培地をすべて除去した後、DMSO を 100 μ l/well 加えて MTT ホルマザンを完全に溶解させて 540 nm の吸光度をプレートリーダーで測定した。

B-11. 統計処理

スチューデントの t 検定を行い、有意差の有無を判定した。

C. 研究結果

C-1. 1,2-NQ を認識する抗体の作成およびその反応特異性の検討

C-1-1. 1,2-NQ を認識する抗体の作成

1,2-NQ は揮発性有機化合物であるナフタレンの代謝産物として生じることも報告されている。図 1 にナフタレンの代謝経路について示した。そこで本研究では、1,2-NQ を認識する特異的な抗体の作製を行った。1,2-NQ-KLH 結合体を感作させたウサギの血清の抗体価を ELISA 法によって確認したところ、1,2-NQ-KLH に対する抗体の力価は、KLH よりも非常に高かった (図 2A)。また、この抗血清は 1,2-NQ-SDH に対して高い力価を示したが、SDH に対しては全く反応性を示さなかった (図 2B)。このことから、作製した抗血清はハプテンである 1,2-NQ に対して非常に高い親和性を有することが示唆された。

C-1-2. 抗 1,2-NQ 抗体の抗原特異性の検討

図 3 には種々の多環芳香族炭化水素の

構造式を示し、表 1 には抗 1,2-NQ ポリクローナル抗体の多環芳香族炭化水素とそのキノン体に対する交差性について示した。37 個の化合物を ICR マウスの肝臓の酵素溶液と反応させウエスタンブロットで解析したところ、NADP⁺ および NADPH 非存在下で代謝反応を行わない条件下では、抗体は 1,2-NQ だけに反応性を示した。異なる数のベンゼン環を持つオルトキノンに対する反応の交差性は全く見られなかった。また、NADP⁺ および NADPH 存在下で代謝反応を行った場合、ナフタレンおよび 1,2-ジヒドロキシナフタレンにおいても抗体は反応性を示した。このことから、この抗体はナフトキノンにおけるナフタレン骨格を認識していることが分かる。さらに、抗 1,2-NQ 抗体に対してナフトキノン化合物を 2 段階反応させたところ、1 段階目に 1,2-NQ または 1,2-NQ-4-sulfonate を反応させた抗体では、2 段階目で 1,2-NQ 結合タンパク質の検出が著しく減少した。一方、1,4-NQ と反応させた抗体は、DMSO と反応させたものとほぼ同様であった (図 4)。これらの結果から、抗 1,2-NQ 抗体は、1,2-NQ を極めて特異的に認識することが示された。また、ICR マウスの肝臓酵素溶液と cofactor 存在下でナフタレン (100 μ M) を反応させたところ、抗 1,2-NQ 抗体によりナフタレン由来の 1,2-NQ と結合したタンパク質が検出された (図 5)。

C-1-3. ナフタレン代謝活性化反応により生成された 1,2-NQ の定量

補酵素を含む肝臓酵素溶液と 1,2-NQ (0-100 μ M) とを反応させたサンプルをス

タンダードとして用いて、ナフタレン (100 μM) から生成された 1,2-NQ 量についてドットプロット法及びウエスタンブロット法により定量した (図 6)。その結果、ドットプロット法では 45.6 μM 、ウエスタンブロット法では 37.0 μM の 1,2-NQ が検出された。

C-1-4. 培養細胞中におけるナフタレンから 1,2-NQ への代謝活性化と 1,2-NQ 結合タンパク質の検出

マウスの初代肝細胞にナフタレン (250-750 μM) を 1 時間曝露し、細胞中での 1,2-NQ の代謝活性化についてウエスタンブロット法で検討したところ、1,2-NQ により化学修飾されたタンパク質が濃度依存的に検出された (図 7)。1,2-NQ によって共有結合が見られたタンパク質の内、約 14, 28 および 32 kDa のタンパク質が主要な 1,2-NQ 結合タンパク質として同定された。

C-2. マウス初代肝細胞を用いた細胞応答試験および毒性試験

C-2-1. Keap1 の対する 1,2-NQ の共有結合

次に、作製した 1,2-NQ に対する特異的抗体を用いて、1,2-NQ に対する Nrf2-Keap1 システムを介した細胞応答について検討した。マウスの初代肝細胞において、ビオチンマレイミド沈降法で細胞内への Keap1 に対する 1,2-NQ の結合を検討したところ、25 μM の 1,2-NQ を 1 時間曝露した条件において Keap1 の化学修飾が検出された (図 8A)。また、リコンビナントのマウス Keap1 に対する 1,2-NQ の結合を 1,2-NQ の抗体で検出したところ、

濃度依存的な共有結合の増加が観察された (図 8B)。

C-2-2. 1,2-NQ の Keap1 に対する修飾部位の同定

Keap1 タンパク質には反応性の高いシステイン残基が多く含まれているが、1,2-NQ が Keap1 のどの部位を修飾するかは不明である。そこで、MALDI-TOF/MS 方法にて 1,2-NQ を用いて Keap1 の修飾部位の同定を行った。その結果、1,2-NQ はリコンビナントマウス Keap1 の Cys151, Cys257, Cys273, Cys288 および Cys489 に共有結合することが示唆された (図 9, 表 2)。

C-2-3. 1,2-NQ による転写因子 Nrf2 の活性化

Keap1 の化学修飾により転写因子 Nrf2 が活性化されることが報告されている。マウス初代肝細胞に 1,2-NQ を曝露すると、Nrf2 の活性化が生じた (図 10)。同条件下において、細胞内オキシダントの生成が観察された。しかし、PEG-CAT の前処理によって細胞内過酸化水素を消去しても 1,2-NQ による Nrf2 の活性化は抑制されなかった。このことから、1,2-NQ による Nrf2 の活性化は、活性酸素種 (ROS) の産生というよりむしろ、Keap1 への共有結合に起因することが示唆された。また Nrf2 の活性化に伴って、下流タンパク質である、GCLC、GCLM、GSTA1、GSTA4、GSTM1、UGT1A、NQO1 の発現上昇が見られた (図 11)。

C-2-4. 1,2-NQ の毒性に対する Keap1/Nrf2

システムの防御的役割

次に、遺伝子改変マウスより単離した培養細胞を用いて、1,2-NQの毒性防御機構におけるKeap1/Nrf2系の役割について検討した。まず、肝臓特異的Keap1欠損マウスおよびNrf2欠損マウスより単離した初代肝細胞における異物解毒酵素群の発現量についてウエスタンブロット法で比較・検討した。その結果、GCLC、GCLM、GSTA1、GSTA4、GSTM1、UGT1A、NQO1、MRP1およびMRP2の発現量は、野生型と比較してNrf2の欠損により低下し、Keap1の欠損により増加していた(図12)。これらの細胞に1,2-NQを曝露してその細胞内タンパク質への共有結合の度合いをウエスタンブロット法で比較したところ、野生型と比較して、Nrf2の欠損によって1,2-NQの共有結合量は顕著に増加した。一方、Keap1の欠損によってタンパク質への1,2-NQの共有結合量は顕著に低下した(図13A)。更にこれらの細胞を用いて、1,2-NQの毒性をMTT法で比較した。その結果、Nrf2の欠損によって1,2-NQの毒性は顕著に増加した。一方、Keap1の欠損によってタンパク質への1,2-NQの共有結合量は顕著に低下した(図13B)。これらのことから、1,2-NQに対する毒性防御の細胞応答系として、Nrf2-Keap1システムが重要な役割を果たしていることが示唆された。

C-2-5. 1,2-NQの毒性防御に関わる酵素群

最後に、各種阻害剤を用いて1,2-NQの毒性防御に関わる酵素群について調べた。その結果、グルタチオン(GSH)合成の律速酵素であるグルタミルシステインリガ

ーゼの阻害剤であるBSOやNQO1の阻害剤であるDicumarolの前処理によって1,2-NQの細胞毒性は殆ど変化しなかったが、UGTの阻害剤であるDiclofenacや、MRPの阻害剤であるMK-571の前処理によって1,2-NQの細胞毒性は有意に増強した。これらのことから、Nrf2下流の酵素群のうち、グルクロン酸転移酵素やその抱合体の排泄に関わるMRPトランスポーターの働きが重要であることが示唆された。

D. 考察

D-1. 抗1,2-NQ抗体の抗原特異性の検討

表1及び図5より、抗1,2-NQ抗体がナフタレン骨格とオルトキノン化合物の2つの条件を満たす化合物を特異的に認識することが示唆された。さらに図6において、1段階目で1,2-NQ及び1,2-NQ-4-sulfonateが抗原として認識され、2段階目で1,2-NQ結合タンパク質の検出能力が著しく減少したのに対して、1,4-NQと反応した抗体では2段階目での1,2-NQ検出能力がDMSOとほとんど変わらなかったことから、抗1,2-NQ抗体は1,2-NQに極めて特異的で、1,4-NQとは全く反応性を示さないことが明らかとなった。そこで、この抗体を用いてナフタレン代謝活性化反応について検討した。先行研究によって、ナフタレンから1,2-NQが生成される代謝経路は、ナフタレンがCYPsによりエポキシド体となった後、1) EHによりジヒドロジオール体を経て、AKRにより1,2-ジヒドロキシナフタレンになる。または、2) 転位反応により1-ナフトールとなり、再度CYPsによって1,2-

ジヒドロキシナフタレンになる。そして、酸化修飾によって1,2-NQが生成されると考えられていた。本研究でもナフタレン及び1,2-ジヒドロキシナフタレンから1,2-NQが生成されることを検出した(表1, No. 3 及び 9)。これらの結果より、上述のナフタレン代謝経路のうち、1) を経て1,2-NQが生成されることが確認された。一方、本研究では代謝経路の2) で考えられている1-ナフトールからの1,2-NQ生成は検出されなかった(表1, No. 4)。このことから、ナフタレン代謝経路は1) の経路のみであることが明らかとなった(図17)。更に、ナフタレンの代謝活性化による1,2-NQの産生はマウス初代肝細胞においても観察された。一方、肺酵素溶液を用いて、肝臓と同様の検討を行なったところ、ナフタレンの代謝活性化反応による1,2-NQの生成を検出することはできなかった(データ未掲載)。この原因として、肺には1,2-NQ生成に必要な酵素量が肝臓よりも著しく少ないことが予想された。

D-2. 1,2-NQに対するNrf2-Keap1システムの防御的役割

本研究により、1,2-NQは他の親電子物質と同じくKeap1の反応性の高いチオール基と共有結合を形成することが明らかとなった。このような修飾はマウス初代肝細胞においても観察された。更に、初代肝細胞に1,2-NQを曝露すると転写因子Nrf2が活性化されその下流の遺伝子産物の発現が誘導された。また、Nrf2は1,2-NQの細胞内タンパク質への共有結合の減少および1,2-NQの毒性軽減に働く因子であることも示された。

1,2-NQはリコンビナントマウスKeap1のCys151, Cys257, Cys273, Cys288 およびCys489に共有結合することが明らかとなった。Keap1のCys151, Cys257, Cys273は特に反応性の高いシステイン残基であることが知られているが、Cys288やCys489に関しても種々の親電子物質によって共有結合を受けてNrf2の活性化に繋がることが示されている。一方、初代肝細胞において、PEG-CATの前処理により1,2-NQによるNrf2の活性化は抑制されなかった。このことから1,2-NQのレドックスサイクルで生じたROSに起因する過酸化水素の産生はNrf2の活性化の主要な因子ではないことが示唆された。

図15に1,2-NQの生体内変換反応とそれに関連する細胞毒性についてまとめた。我々は以前、A431細胞において1,2-NQがPTP1BをCys121への共有結合を介して不活性化し、EGFRを活性化させることを報告している。1,2-NQによる細胞内タンパク質への共有結合は、親電子シグナルだけでなくタンパク質の機能かく乱や毒性の発現に繋がることが予想される。実際、初代肝細胞において1,2-NQの細胞内タンパク質への共有結合はその毒性発現と相関性が見られた(データ未掲載)。このことは、1,2-NQの細胞内タンパク質への共有結合の減少はその毒性の軽減に繋がることが示唆している。これと一致して、Nrf2が常に活性化しているKeap1欠損の初代肝細胞においては野生型と比較して1,2-NQの細胞内タンパク質への共有結合が減少し、その毒性が低下した。

キノン化合物は、チトクロムP450還元酵素によって一電子還元反応を受けてセ

ミキノンラジカルへと変換され、それが分子状酸素と反応して活性酸素を産生する。この活性酸素は不均化反応により、過酸化水素と酸素を産生する。また、過酸化水素は銅や鉄といった遷移金属の存在下でヒドロキシルラジカルに変換される。キノン化合物による細胞内での酸化ストレスの惹起は、少なくとも ROS の産生が一部関与している。オルトキノンの 2 電子還元反応によるヒドロキノンへの変換は必ずしも解毒反応ではない事が示唆される。なぜなら、キノンとヒドロキノンの不均化反応によりセミキノンラジカルが生じ、ROS を産生してしまうからである。この考えに一致して、Dicumarol 前処理によって NQO1 活性を低下させた条件下でも 1,2-NQ の毒性に変化は見られなかった。1,2-NQ の GSH による抱合反応は、細胞内での当該親電子物質の量を減少させる重要な経路であるが、BSO によって GSH の産生を低下させても 1,2-NQ の細胞毒性には変化がなかった。キノン化合物の GSH 抱合は一般的に解毒経路ではあるが、GSH 抱合体となったキノン化合物はレドックスサイクルによる ROS 産生能を有している。まとめると、1,2-NQ の GSH 抱合よりもむしろ、1,2-NQH₂ の産生を介したグルクロン酸抱合が初代肝細胞においては最終的な解毒経路であることが示唆された。実際、UGT の阻害剤である Diclofenac や MRP の阻害剤である MK571 の前処理によって 1,2-NQ の毒性は増強された。

E. 結論

1) 本研究にて我々が作製した抗 1,2-NQ 抗体は、非常に特異性の高い抗体である。

2) 1,2-NQ による Nrf2 の活性化は、ROS の産生を介してというよりもむしろ、1,2-NQ の Keap1 への共有結合に起因している。

3) 1,2-NQ に対する毒性防御の細胞応答システムとして、Nrf2-Keap1 系が重要な役割を果たしている。

F. 研究発表

F-1. 論文発表

1) Miura T, Kumagai Y.

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, 2010

2) Miura T, Shinkai Y, Jiang HY, Iwamoto N, Sumi D, Taguchi K, Yamamoto M, Jinno H, Tanaka-Kagawa T, Cho AK, Kumagai Y. Initial response and cellular protection through the Keap1/Nrf2 system during exposure of primary mouse hepatocytes to 1,2-naphthoquinone. *Chem. Res. Toxicol.* 2011, in press.

F-2. 学会発表

Yasuhiro Shinkai, Yoshito Kumagai, Tomoki Kimura, Chika Yamamoto, Masayuki Yamamoto, Hideto Jinno,

Toshiko Tanaka-Kagawa, Toshiyuki
Kaji : The Keap1-Nrf2 system regulates
metallothionein expression and protects
vascular endothelial cells from cadmium
cytotoxicity. Society of Toxicology 50th
Annual Meeting. 2011.

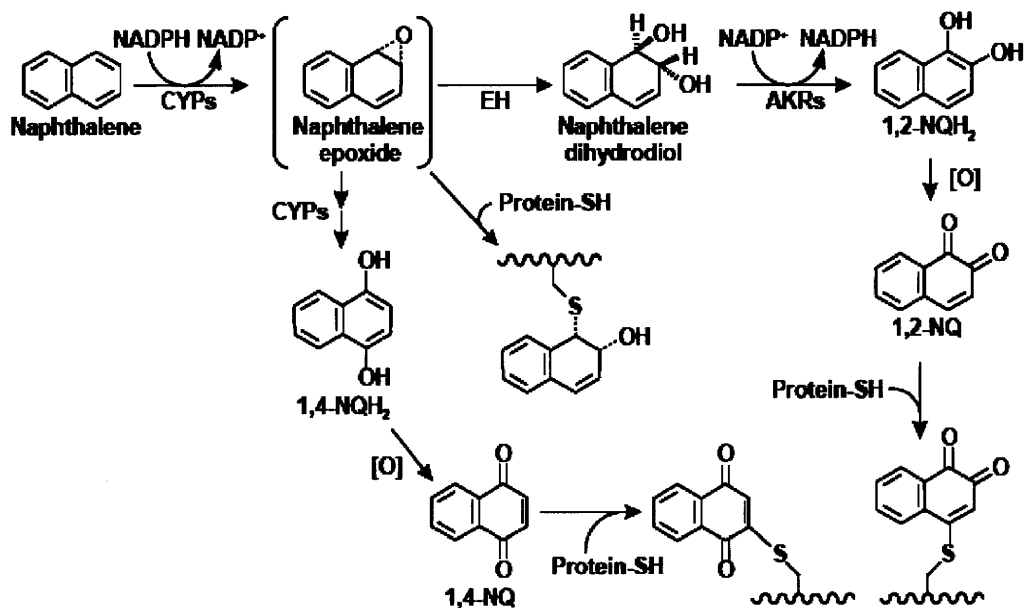
G. 知的所有権の取得状況

G-1. 特許取得

なし

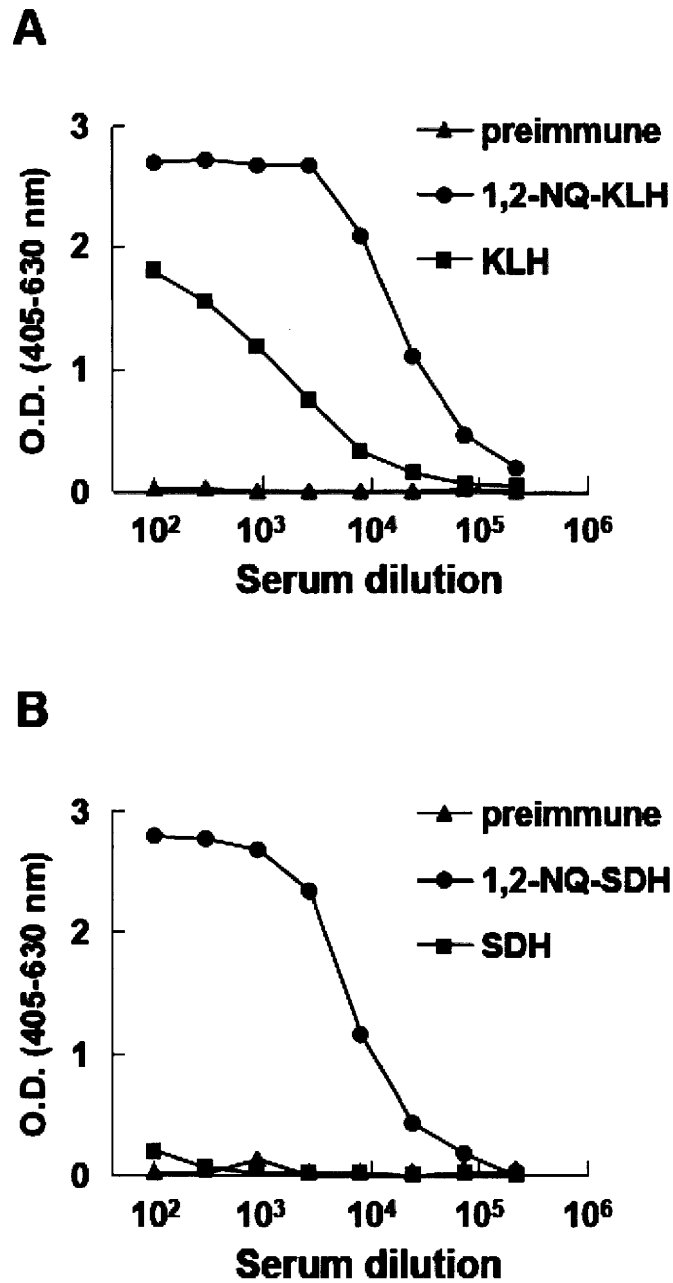
G-2. 実用新案登録

なし



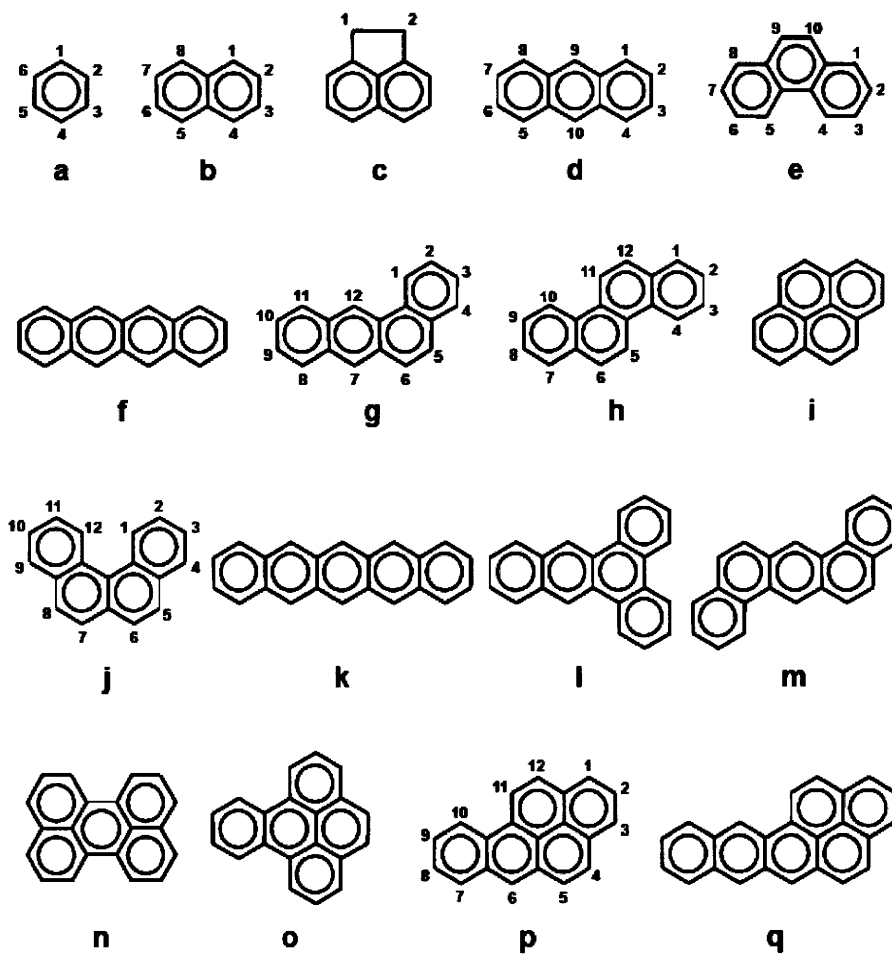
☒ 1 Metabolism of naphthalene

NADPH, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, reduced form; NADP⁺, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, oxidized form; CYPs, cytochrome P450 isozymes; EH, epoxide hydrolase; AKRs, aldo-keto reductase isozymes; 1,2-NQH₂, 1,2-dihydroxynaphthalene; 1,2-NQ, 1,2-naphthoquinone.



⊠ 2 Titration curves of rabbit antiserum raised against 1,2-NQ

The titer of the serum obtained from rabbits was determined by measuring serial dilution of antiserum (1/100 to 1/243000) to plates coated with 1,2-NQ modified protein (●), and native protein (■). 1,2-NQ modified proteins were KLH (A) and SDH (B). For a negative control, rabbit pre-immune IgG (▲) was substituted for the primary antibody.



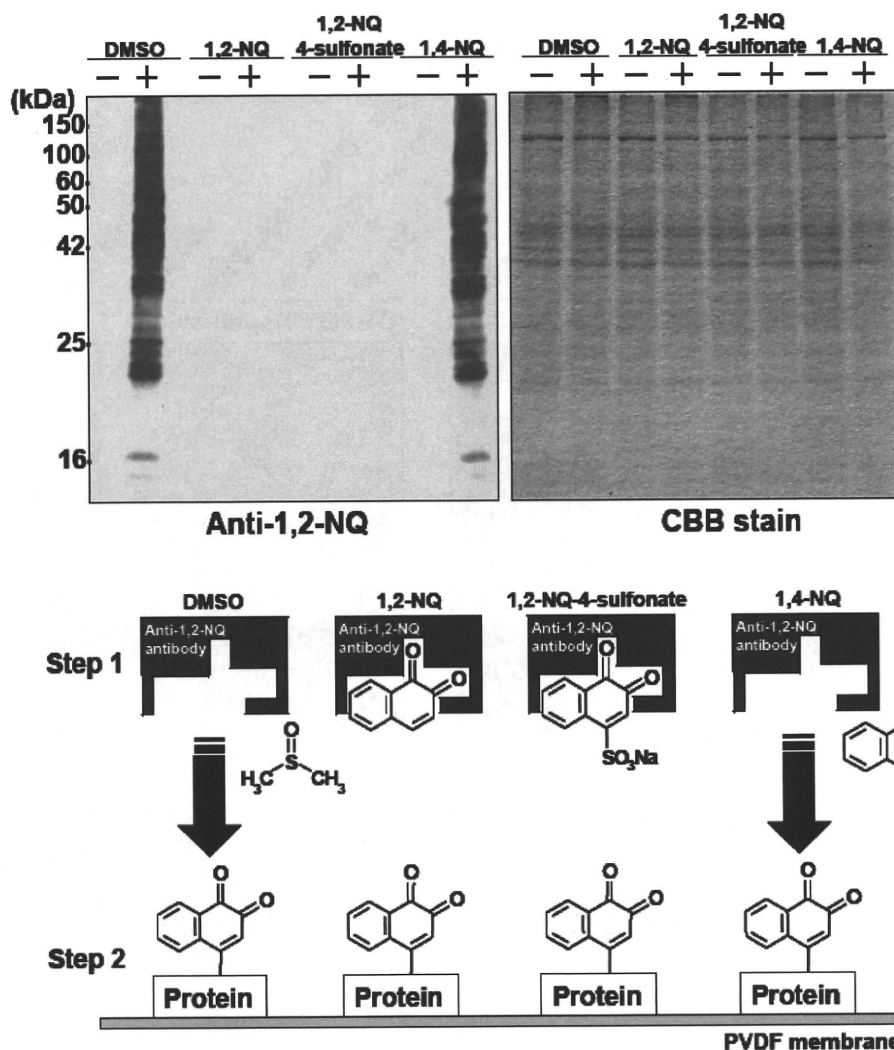
☒ 3 Structures of aromatic hydrocarbons

(a) benzene, (b) naphthalene, (c) acenaphthalene, (d) anthracene, (e) phenanthrene, (f) benz(b)anthracene, (g) benz(a)anthracene, (h) chrysene, (i) pyrene, (j) benz(c)phenanthrene, (k) pentacene, (l) dibenz[a,c]anthracene, (m) dibenz[a,h]anthracene, (n) perylene, (o) benzo[e]pyrene, (p) benzo[a]pyrene, (q) naphtho[2,3-a]pyrene.

表 1 Cross-reactivity of the polyclonal antibody against 1,2-NQ toward aromatic hydrocarbons

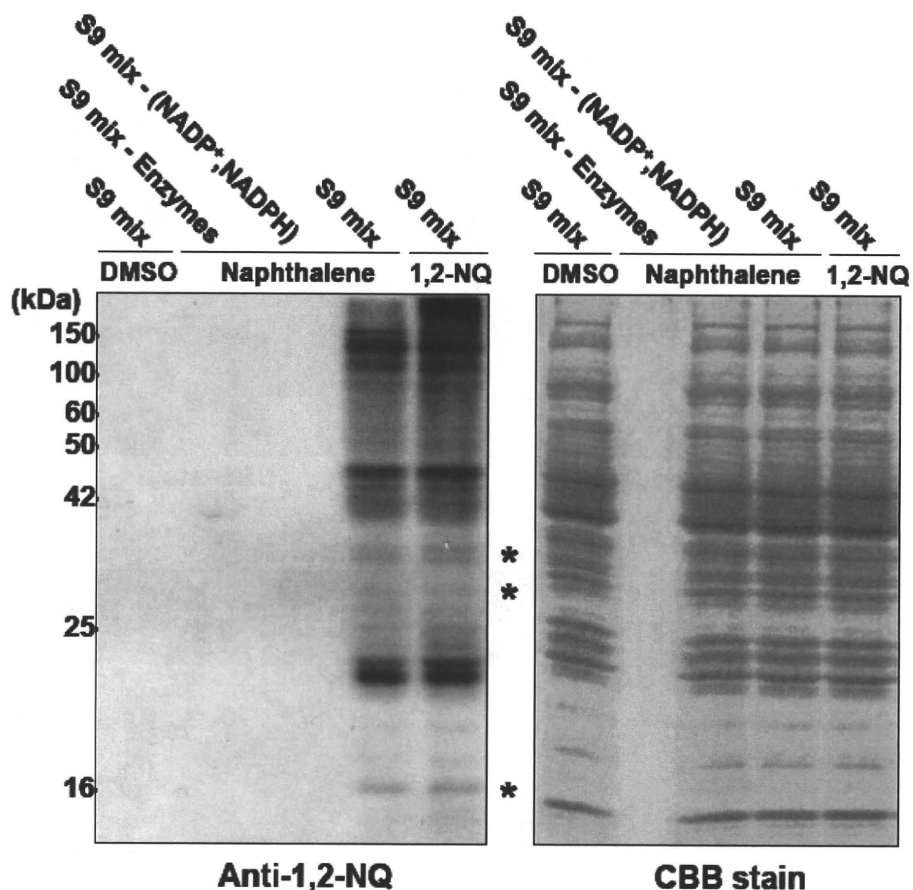
Compound	Structure	Substituent	Reactivity to anti-1,2-NQ	
			without metabolism	with metabolism
Benzene	a	None	No	No
Catechol	a	1, 2 : -OH	No	No
Naphthalene	b	None	No	Yes
1-Naphthol	b	1 : -OH	No	No
1-Naphthalene sulfonic acid sodium salt	b	1 : -SO ₃ Na	No	No
1-Methylnaphthalene	b	1 : -CH ₃	No	No
1-Ethynaphthalene	b	1 : -C ₂ H ₅	No	No
2-Methylnaphthalene	b	2 : -CH ₃	No	No
1,2-Dihydroxynaphthalene	b	1, 2 : -OH	No	Yes
1,2-Naphthoquinone	b	1, 2 : =O	Yes	Yes
Acenaphthoquinone	c	1, 2 : =O	No	No
Anthracene	d	None	No	No
1,4-Anthraquinone	d	1, 4 : =O	No	No
9,10-Anthraquinone	d	9, 10 : =O	No	No
Phenanthrene	e	None	No	No
1,4-Phenanthraquinone	e	1, 4 : =O	No	No
9,10-Phenanthraquinone	e	9, 10 : =O	No	No
Benz[b]anthracene	f	None	No	No
Benz[a]anthracene	g	None	No	No
Benz[a]anthracene-7, 12-dione	g	7, 12 : =O	No	No
Chrysene	h	None	No	No
1,4-Chrysenequinone	h	1, 4 : =O	No	No
Pyrene	i	None	No	No
1,4-Benz[c]phenanthraquinone	j	1, 4 : =O	No	No
5,6-Benz[c]phenanthraquinone	j	5, 6 : =O	No	No
Perilacene	k	None	No	No
Dibenz[a,c]anthracene	l	None	No	No
Dibenz[a,h]anthracene	m	None	No	No
Perylene	n	None	No	No
Benzo(e)pyrene	o	None	No	No
Benzo(a)pyrene	p	None	No	No
Benzo(a)pyrene[6,12]quinone	p	6, 12 : =O	No	No
Benzo(a)pyrene[7,8]quinone	p	7, 8 : =O	No	No
Benzo(a)pyrene[7,10]quinone	p	7, 10 : =O	No	No
Benzo(a)pyrene[11,12]quinone	p	11, 12 : =O	No	No
Naphtho[2,3-a]pyrene	q	None	No	No

The reaction mixture (250 μ l) containing 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4), 1 mM NADP⁺, 1 mM NADPH, 100 μ M aromatic hydrocarbons, and enzyme preparation (8 mg/ml) was incubated for 1 hr at 37°C (with metabolism). When the incubation was carried out without metabolism, no NADP⁺ or NADPH was present.



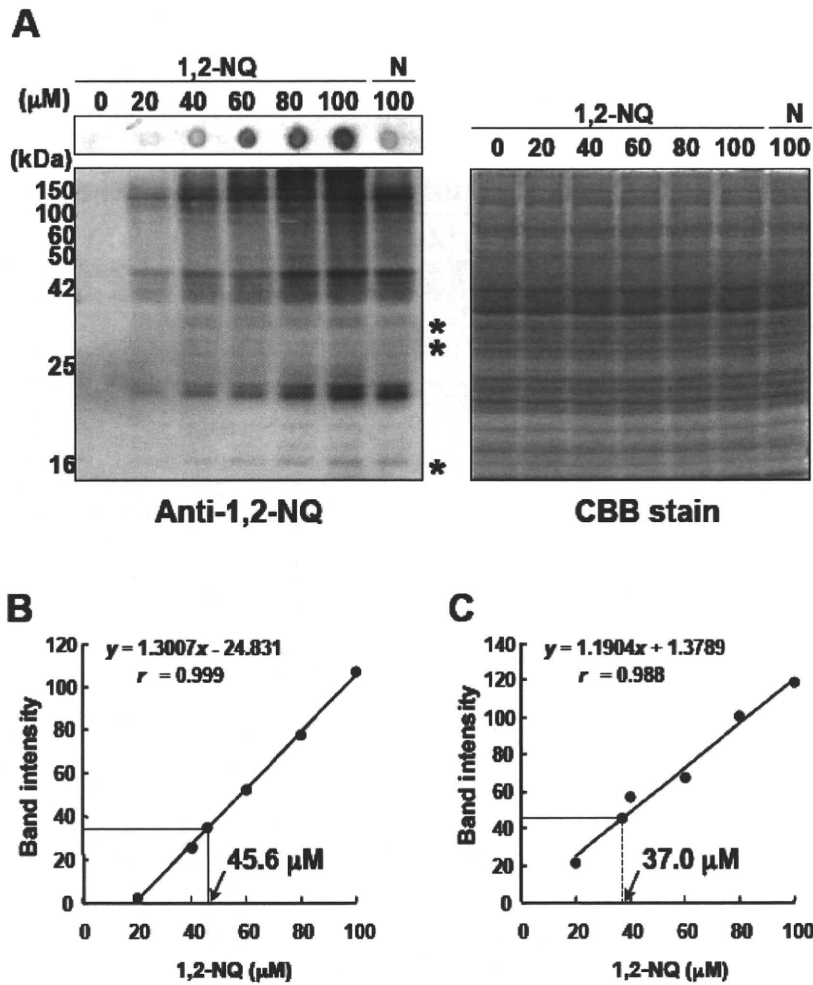
⊗ 4 Regiochemical recognition of NQ by the antibody against 1,2-NQ

Anti-1,2-NQ (50 $\mu\text{g/ml}$) was pre-incubated with dimethyl sulfoxide (DMSO), 1,2-NQ, 1,2-NQ-4-sulfonate, or 1,4-NQ (each 500 μM) for 1 hr at 37°C. Then tris-buffered saline Tween-20 containing 0.1% bovine serum albumin was mixed with the incubation mixture to bring the final concentration to 0.5 μg of anti-1,2-NQ/ml. For detection of proteins that cross-reacted with the antibody against 1,2-NQ, the 9000 \times g supernatant of mouse liver (8 mg/ml) was allowed to react in the absence (-) or presence (+) of 100 μM 1,2-NQ for 1 hr at 37°C. These samples were subjected to SDS-PAGE and then transferred to a poly(vinylidene fluoride) (PVDF) membrane, which was analyzed with the pre-incubated anti-1,2-NQ antibody. Total protein load per lane is 10 μg for immunoblot analysis and CBB stain.



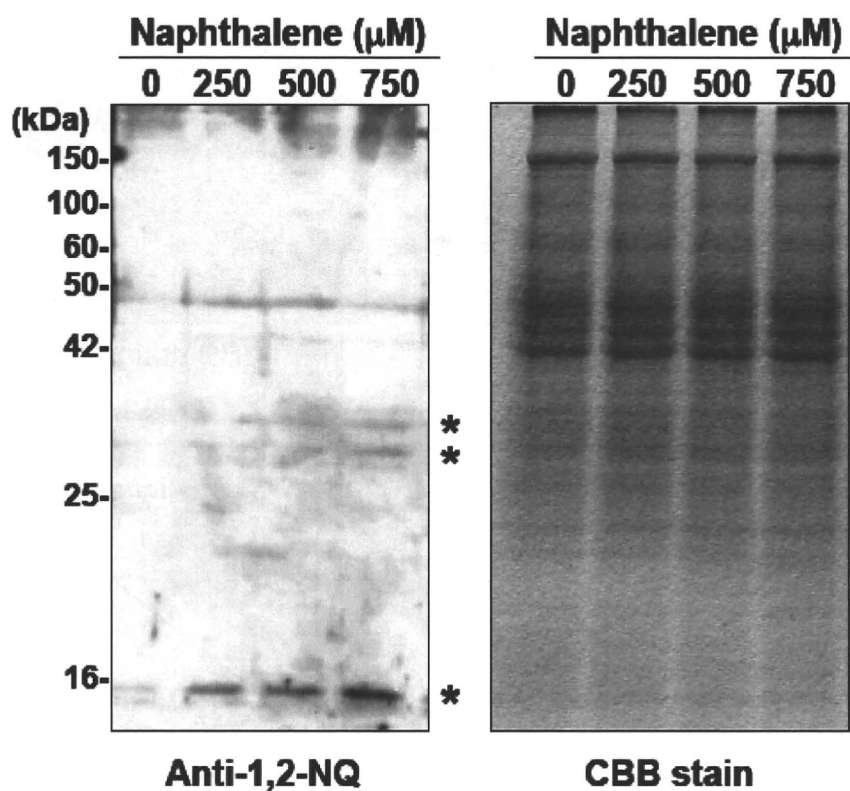
⊠ 5 Immunochemical detection of the hepatic protein of mouse modified by 1,2-NQ during metabolism of naphthalene by mouse hepatic enzyme preparation in the presence of pyridine nucleotides

Naphthalene or 1,2-NQ (100 μ M) was incubated with the reaction mixture for 1 hr at 37°C. Each reaction mixture described as follows: S9 mix consisted of 9000 \times g supernatant of mouse liver (8 mg/ml), 1 mM NADP⁺, 1 mM NADPH, and 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4); S9 mix - Enzymes was derived from S9 mix by loss of 9000 \times g supernatant of mouse liver; S9 - (NADP⁺, NADPH) was derived from S9 mix by loss of NADP⁺ and NADPH. As a control experiment, dimethyl sulfoxide (DMSO) was incubated under the same conditions. Each lane was loaded with 10 μ g of protein sample for immunoblot analysis and 20 μ g of protein sample for CBB stain. Asterisks indicate dominant proteins (14, 28, and 32 kDa) modified by 1,2-NQ during exposure of primary mouse hepatocytes to naphthalene.



⊠ 6 Immunochemical quantitation of 1,2-NQ bound to 9000×g supernatant protein from mouse liver

A, Dot blot analysis (upper) and Western blot analysis (lower). B, Calibration curves of 1,2-NQ bound to protein as determined by Dot blot analysis. Two μl of sample spot (0.2 μg of protein) was applied to a nitrocellulose membrane. C, Calibration curves of 1,2-NQ bound to protein as determined by Western blot analysis. For metabolic activation, naphthalene (N, 100 μM) was incubated with S9 mix (8 mg/ml) for 1 hr at 37°C in 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4). 1,2-NQ (20–100 μM) was mixed with each protein preparation, and then immunoblot analyses were carried out with antibody against 1,2-NQ as described in Materials and Methods. Total protein load per lane is 10 μg for immunoblot analysis and 20 μg for CBB stain. Asterisks indicate dominant proteins (14, 28, and 32 kDa) modified by 1,2-NQ during exposure of primary mouse hepatocytes to naphthalene.



☒ 7 Cellular proteins modified by 1,2-NQ during exposure of primary mouse hepatocytes to naphthalene

Mouse primary hepatocytes were exposed to 250–750 μM naphthalene (The final concentration of DMSO was 5% in cell culture media) at 37°C for 1 hr. Exposed cells were lysed with 2% SDS solution, and the whole cell lysates (10 $\mu\text{g}/\text{lane}$) were loaded onto the SDS-polyacrylamide gel. Western blot analysis with anti-1,2-NQ antibody was performed. The asterisks indicate the dominant proteins (14, 28, and 32 kDa) modified by 1,2-NQ.