

# 論文内容要旨

## 有機スズの新規ターゲット因子 NRF-1に関する毒性研究

主指導教員：杉山 政則 教授  
(医歯薬保健学研究科 未病・予防医学)

副指導教員：太田 茂 教授  
(医歯薬保健学研究科 生体機能分子動態学)

副指導教員：熊谷 孝則 准教授  
(医歯薬保健学研究科 微生物医薬品開発学)

石田 慶士

(医歯薬保健学研究科 薬科学専攻)

## 【序論】

我々の身の回りにはヒトや生態系に対して有害な影響を及ぼす化学物質が少なからず存在し、その毒性メカニズムを明らかにすることは化学物質を適切に使用する上で非常に重要である。船底塗料として使用されてきたトリブチルスズ (TBT) に代表される有機スズ化合物は海洋生物に対する内分泌かく乱作用が報告されて以降、特定化学物質に指定され、使用が制限されているにもかかわらず、未だに魚介類や海底堆積物から検出される。

TBT の主な毒性の一つとして神経毒性が報告されており、我々はそのメカニズムを調べる過程で、既知の毒性発現濃度より低い濃度の TBT が AMPA 型グルタミン酸受容体 GluR2 サブユニットの発現を減少させ、神経細胞を脆弱化することを明らかにした (Nakatsu et al., 2009)。しかしながら、TBT による GluR2 発現量減少の詳細なメカニズムは不明なままである。本研究では TBT が GluR2 発現に関わる転写因子に与える影響を評価した結果、TBT 曝露によって核呼吸因子-1 (nuclear respiratory factor-1: NRF-1) が阻害されることを見出した。NRF-1 は幅広い種類の遺伝子のプロモーターに結合部位を有し、その遺伝子数は 900 以上と推測される。そのため、NRF-1 機能低下は GluR2 に加えそれらの遺伝子発現量にも影響し、関連する毒性を誘発する可能性が考えられるが、NRF-1 の具体的な機能はほとんど明らかになっていない。さらに本研究では TBT 曝露で NRF-1 が阻害された際の毒性影響を詳細に理解することを目的とし、NRF-1 の機能解析を行った。

## 【実験結果・考察】

### 1. TBT による転写因子活性評価

GluR2 の発現調節に関わる転写因子の DNA 結合活性をゲルシフトアッセイおよびクロマチン免疫沈降法で評価したところ、TBT 曝露によりラット大脳皮質初代神経細胞における NRF-1 結合活性が特異的に低下することが明らかとなった。また、NRF-1 はホモ二量体として機能するため、NRF-1 二量体形成量を評価したところ、TBT 曝露によりラット大脳皮質初代神経細胞における NRF-1 二量体形成の阻害が認められた。

### 2. Doxycycline (Dox) 誘導性 NRF-1 knockdown (K.D.) 細胞株の作製

HEK293T 細胞のゲノム DNA に NRF-1 に対する shRNA をレンチウイルスベクターを用いて組み込んだ。薬剤選択後、シングルセルクローニングにより K.D. 効率の高い細胞を選別し、shNRF-1/293T cells とした。本細胞株を用いて NRF-1 の活性低下による毒性影響を評価した。

### 3. NRF-1 K.D. によるリソソーム関連遺伝子発現量に対する影響

NRF-1 K.D. による細胞影響を評価するためにオルガネラの形態を観察した。その結果、リソソーム特異的プローブである Lyso Tracker を用いた観察において NRF-1 K.D. によりリソソーム数の増加が認められ、またリソソーム膜タンパク質である Lysosome-associated membrane protein 1 (LAMP1) の発現上昇も認められた。さらにリソソーム関連遺伝子の mRNA 発現量を評価したところ、*lamp1* に加えてリソソーム膜上 H<sup>+</sup> ポンプ (*atp6v1h*)、リソソーム内加水分解酵素 (*ctsb*, *ctsd*, *gba*)、およびリソソーム膜タンパク質 (*mcoln1*) の遺伝子発現量が軒並み上昇することが明らかとなった。

#### 4. NRF-1 K.D. によるリソソーム活性評価

リソソームは生体高分子のバルク分解に関わるオルガネラであり、長命タンパク質の分解に関与する。そこで長命タンパク質の分解率を評価したところ、NRF-1 K.D. により分解率低下が認められた。以上の結果から、リソソームの活性低下が NRF-1 K.D. により引き起こされることが示唆された。NRF-1 K.D. によるリソソーム遺伝子発現上昇はリソソーム活性低下に応答して働いた代償機構であると考えられる。

#### 5. TBT による初代神経細胞の LAMP1 タンパク質発現に対する影響

NRF-1 K.D. により LAMP1 発現上昇が認められたことから、TBT も同様に LAMP1 発現上昇を引き起こすか否かを検討した。その結果、TBT 曝露により初代神経細胞の LAMP1 発現上昇が認められた。

##### **【総括】**

本研究により、TBT は NRF-1 を阻害することで GluR2 発現減少を介した神経脆弱化に加え、リソソーム機能の低下を引き起こすことが明らかとなった。リソソーム機能低下はタンパク質の異常蓄積を引き起こし、最終的に細胞死を誘導すると考えられる。本研究で用いた TBT の濃度は既知の毒性発現濃度より低く、NRF-1 阻害は低濃度 TBT の毒性メカニズムを考える上で重要な知見であると考えられる。

NRF-1 は統合失調症患者の死後脳で発現量が低いことや、パーキンソン病等の神経変性疾患との関連が報告されている。また、リソソームの機能低下は様々な神経系疾患に関与することが指摘されている。本研究で得られた結果は、NRF-1 とリソソーム機能を関連付けた初めての研究であり、未だ十分に原因が明らかになっていない神経系疾患の原因解明の一助になることも期待される。