

論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（薬科学）	氏名	石田 慶士
学位授与の条件	学位規則第 4 条第①・2 項該当		
論文題目			
有機スズの新規ターゲット因子 NRF-1 に関する毒性研究			
論文審査担当者			
主査	教授	小澤 孝一郎	印
審査委員	教授	森岡 徳光	
審査委員	准教授	樋木 薫	
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p>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、これまでに、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が知られている。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。</p> <p>まず、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。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ノックダウン効率の高い細胞を選別し、shNRF-1/293T 細胞とした。この細胞株を用いて NRF-1 の活性低下による毒性影響を評価した。NRF-1 ノックダウン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ところ、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 ノックダウン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、<i>lamp1</i> に加えてリソソーム膜上 H⁺ ポンプ (<i>atp6v1h</i>)、リソソーム内加水分解酵素 (<i>ctsb</i>, <i>ctsd</i>, <i>gba</i>)、およびリソソーム膜タンパク質 (<i>mcoln1</i>) 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。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 ノックダウン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 ノックダウンにより引き起こされることが示唆された。NRF-1 ノックダウンによ</p>			

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。NRF-1 ノックダウンにより 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。

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。よって、審査委員会委員全員は、本論文が著者に博士（薬科学）の学位を授与するに十分な価値があるものと認めた。

別記様式第7号（第16条第3項関係）

最終試験の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（薬科学）	氏名	石田 慶士
学位授与の条件	学位規則第4条第①・2項該当		
論文題目			
有機スズの新規ターゲット因子 NRF-1 に関する毒性研究			
最終試験担当者			
主査	教授	小澤 孝一郎	印
審査委員	教授	森岡 徳光	
審査委員	准教授	樋木 薫	
〔最終試験の結果の要旨〕			
判定 合格			
<p>上記3名の審査委員会委員全員が出席のうえ、平成29年12月12日の第36回広島大学研究科発表会（薬学系）及び平成30年2月5日、本委員会において最終試験を行い、主として次の諮問を行った。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1 培養細胞におけるリソソーム活性の評価方法について 2 NRF-1 ノックダウンによるリソソーム活性低下の原因 3 トリブチルスズの神経毒性における <i>in vitro</i> と <i>in vivo</i> の結果の比較 4 トリブチルスズが NRF-1 二量体形成量を低下させるメカニズムについて <p>これらに対して極めて適切な解答をなし、本委員会が本人の学位申請論文の内容及び関係事項に関する本人の学識について試験した結果、全員一致していずれも学位を授与するに必要な学識を有するものと認めた。</p>			