

氏名（本籍） ^{ふじ} ^え ^{とも} ^や 藤江智也（東京都）
学位の種類 博士（薬学）
学位記番号 甲第346号
学位授与の日付 平成28年3月18日
学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当
学位論文題目 **Study on the mechanisms for vascular endothelial metallothionein induction using organic-inorganic hybrid molecules**
(有機-無機ハイブリッド分子を活用した血管内皮細胞メタロチオネインの誘導メカニズムに関する研究)

論文審査委員 (主査) 教授 鍛冶 利幸
教授 市原 学 教授 岡 淳一郎
教授 樋上 賀一 教授 和田 猛
筑波大学 生命環境科学研究科 持続環境学専攻
教授 熊谷 嘉人

論文内容の要旨

有機-無機ハイブリッド分子（以下ハイブリッド分子）は、分子構造に金属を導入した化合物の総称である。ハイブリッド分子は、Grignard や Wittig などの先駆的科学家によって合成試薬として分子変換反応に活用され、それを契機に有機元素化学が急速に発展した。現在では、従来の純粋な無機化合物および有機化合物ではなし得ない、多種多様な物性を有する機能性分子の創製が可能となっている。しかしながら、ハイブリッド分子を生命科学研究への活用した例はほとんど存在しない。ハイブリッド分子は有機化合物と無機化合物の両方の特性を有するので、未知の生体機能解析のための分子プローブあるいは創薬のリード化合物としての有用性が期待されるが、そのような研究戦略（バイオオルガノメタリクス）に基づいた研究例は皆無に等しい。

メタロチオネイン (MT) は、システインリッチな低分子量タンパク質である。MT には4種のアイソフォーム (MT-1, MT-2, MT-3 および MT-4) が知られているが、多くの臓

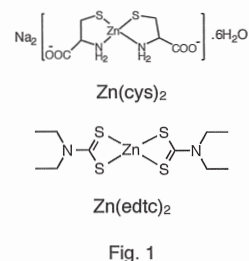
器で発現が報告されているのは MT-1 および MT-2 である。MT-1 および MT-2 は亜鉛やカドミウムにより誘導され、亜鉛代謝やカドミウムの毒性軽減に関与する。近年、MT の持つ抗酸化作用や抗炎症反応などが明らかになり、MT は生体防御タンパク質の 1 つと広く認識されるに至っている。

メタロチオネインの誘導には、転写因子 MTF-1 が活性化され重金属応答配列 MRE へリクルートされることが不可欠であるとされる。MTF-1 は、その分子中の zinc finger domain に亜鉛が結合して活性化される。亜鉛は MTF-1 を活性化する唯一の金属である。そのため、メタロチオネイン研究においては、無機亜鉛は代表的な誘導剤として汎用されてきた。一方、MT プロモーター領域には抗酸化応答配列 ARE の存在が明らかになっており、ARE には解毒酵素や酸化ストレスに対する防御遺伝子の発現を統括的に制御している転写因子 Nrf2 により制御されることが知られている。しかしながら、MT 誘導機構における Nrf2-ARE 経路の役割は不明である。

当研究室では重金属の血管毒性を研究してきたが、その過程で血管内皮細胞に無機亜鉛を曝露しても、タンパク質レベルでは MT が誘導が観察されないことが分かった。そのため、内皮細胞の MT 誘導機構を解明するためのツールが必要となっている。本研究の目的は、内皮細胞の MT 誘導機構の解析に有用なハイブリッド分子を探索し、それを活用してその誘導機構を明らかにすることである。

最初に、ウシ大動脈内皮細胞における無機亜鉛および亜鉛錯体による MT 誘導を調べた。内皮細胞を硫酸亜鉛で処理したとき、MT タンパク質は誘導されなかった。この細胞は MT-1 および MT-2 の 2 つのアイソフォームを発現しているが、MT-1 については MT-1A および MT-1E の 2 つのサブアイソフォームを発現している。この 3 つのサブアイソフォームの mRNA の発現上昇も硫酸亜鉛では認められなかった。重金属応答配列 MRE のプロモーター活性の上昇お

よび Nrf2-ARE 経路の活性化も認められなかった。次に、MTF-1 選択的に亜鉛を供与する亜鉛錯体 $Zn(cys)_2$ (Fig. 1 上) について検討したところ、MRE の活性化は認められたが、MT タンパク質および mRNA の発現上昇は認められなかった。そこで、新たに金属錯体ライブラリーより亜鉛錯体 $Zn(edtc)_2$ (Fig. 1 下) を獲得し検討したところ、MT タンパク質および MT サブアイソフォームの mRNA の発現上昇が認められた。このとき、MRE の活性化が認められたが、Nrf2 およびその応答配列 ARE の活性化は認められなかった。これらの亜鉛錯体による結果は、内皮細胞の MT 誘導は、無機亜鉛が誘導機構解析ツールとしては不適當であること、ハイブリッド分子を活用する戦略が有効であること、内皮細



胞では他の cell type と異なり単に MTF-1-MRE 経路を活性化しただけでは MT は誘導されず、他の経路も重要であることが示唆された。

より詳細な内皮細胞のメタロチオネイン誘導機構を解析するため、解析に有用なハイブリッド分子を有機ビスマス／アンチモン化合物ライブラリーから探索した。まず、有機ビスマス化合物およびアンチモン化合物の細胞毒性を評価し、有機ビスマス化合物 PMTABi およびそのアンチモン置換体 PMTAS を獲得した (Fig. 2)。

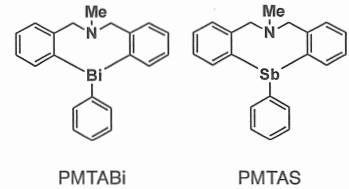


Fig. 2

PMTABi は、血管内皮細胞および血管平滑筋細胞、線維芽細胞、腎近位尿管上皮細胞のすべてに対して細胞毒性を示した。しかしながら、PMTABi のアンチモン置換体である PMTAS には細胞毒性は認められなかった。すなわち、ハイブリッド分子では、導入する中心金属によりその細胞毒性は劇的に変化すること明らかになった。そこで、有機アンチモン化合物ライブラリーから内皮細胞毒性を示さない化合物を探索し、Sb35 (Fig. 3 上) を獲得した。

PMTAS および Sb35 を含むライブラリーを構築し、ヒト脳微小血管内皮細胞の MT-1X mRNA を指標に MT 誘導能をスクリーニングした。その結果、PMTAS 処理では有意な MT-1X mRNA の発現上昇は認められなかったが、Sb35 により MT-1X mRNA 発現の上昇が認められた。ウシ大動脈血管内皮細胞に Sb35 を曝露したとき、内皮細胞の MT アイソフォームの mRNA 発現は全て上昇した。Sb35 により、MRE はわずかながら活性化されていた。MTF-1 をノックダウンしたとき、Sb35 による全ての MT アイソフォームの発現上昇は抑制された。Sb35 は Nrf2

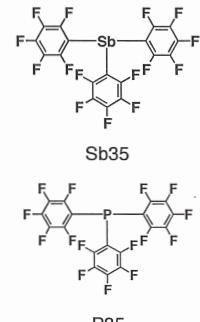


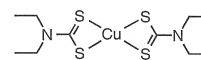
Fig. 3

を活性化し、下流タンパク質の発現誘導および ARE の活性化も確認された。そこで Nrf2 をノックダウンしたところ、MT-1A および MT-1E mRNA の発現上昇は抑制されたが、MT-2A mRNA の発現上昇は抑制せず、Sb35 による内皮細胞 MT-1 遺伝子の転写誘導が MTF-1-MRE および Nrf2-ARE の両経路の活性化を必要とするが、MT-2 遺伝子の転写誘導には Nrf2-ARE 経路は介在しないことが明らかとなった。同様の結果は Sb35 のリン置換体 P35 (Fig. 3 下) においても認められた。これらの結果は、MT 遺伝子の転写誘導機構がアイソフォーム単位で異なることを初めて示したものである。

MT 誘導機構に対する Nrf2 の関与をより詳細に調べるため、Nrf2 を活性化するハイブリッド分子を探索し、その活性化機構を解析した。Nrf2 は Keap1 タンパク質によりその活性を負に制御されている。Keap1 は反応性チオール基を有するセンサータンパク質であることから、求電子を有する銅を中心金属としたライブラリーから Nrf2 を活性化する化合物をスクリーニングし、内皮細胞の Nrf2 を活性化するハイブリッド分子として銅錯体

Cu10 (Fig. 4) を獲得した。Cu10 は ARE を活性化した。硫酸銅、配位子、Cu10 の亜鉛および鉄置換体、ならびに Cu10 とは異なる配位子を持った銅錯体では、Nrf2 の活性化は認められなかった。すなわち、Cu10 による Nrf2 の活性化には、中心金属が銅であること、および特定の分子構造を持つ配位子が重要であることが示唆された。Cu10 の Nrf2 活性化機構を解析した。Cu10 は Keap1 リコンビナントタンパク質のチオール基を修飾した。Cu10 は内皮細胞のプロテアソームを阻害した。すなわち、Cu10 は Keap1 の修飾とプロテアソーム阻害によって Nrf2 を活性化・安定化することが明らかになった。

次に、Cu10 による MT の誘導とその機構について解析した。Cu10 の処理により、内皮細胞の MT の誘導が認められた。このとき、MRE の活性化が認められた。MTF-1 をノックダウンしたとき、全ての MT アイソフォーム mRNA の発現上昇が抑制された。Nrf2 をノックダウ



Cu10

Fig. 4

ンしたとき、Cu10 による MT-1A/E mRNA の発現上昇は抑制されたが、MT-2A 遺伝子の発現上昇は抑制されなかった。すなわち、Cu10 は内皮細胞の MT を誘導するが、その MT-1 の発現誘導は MTF-1-MRE および Nrf2-ARE 経路の両経路の活性化を必要とするが、MT-2 の発現誘導には Nrf2-ARE 経路は介在しないことが示唆された。

本研究は、ハイブリッド分子を活用して内皮細胞のメタロチオネイン誘導機構の一端の解明に成功したものである。すなわち、(1) 内皮細胞の MT 誘導は、MTF-1-MRE 経路だけでなく、Nrf2-ARE 経路も調節に関与すること、(2) 内皮細胞 MT の誘導機構はアイソフォーム単位で異なり、MT-1 の発現誘導には MTF-1-MRE および Nrf2-ARE 経路の両経路の活性化を必要とするが、MT-2 の発現誘導には Nrf2-ARE 経路は介在しないことが明らかになった。これまで MT アイソフォームの機能分化はないと考えられてきた。本研究の結果は、誘導に Nrf2-ARE 経路の活性化を必要とする MT-1 は主に重金属や酸化ストレスに対する解毒に寄与し、Nrf2-ARE 経路の活性化を介さない MT-2 は細胞内の亜鉛イオンの代謝に寄与することを示唆している。無機亜鉛では解析が困難であった内皮細胞の MT 誘導機構の解析に成功したことは、ハイブリッド分子を活用したバイオロジー、バイオオルガノメタリクス研究戦略の有効性を示している。

論文審査の結果の要旨

動脈硬化病変は心筋梗塞や脳梗塞の基礎病変として衛生薬学の重要な研究対象となっている。この病変の進展メカニズムはきわめて多様で複雑であるが、血管内皮細胞の機能障害、血管平滑筋細胞の過剰な増殖と細胞外マトリックスの過剰形成、およびマクロファージの浸潤と泡沫化などは共通した

細胞レベルの変化として認識されている。そのうち、血管内皮細胞の機能障害は、動脈硬化病変初期の理解に特に重要であるとされる。メタロチオネイン (MT) はウマの腎臓からカドミウム結合タンパク質として発見されたという歴史的経緯とカドミウムや亜鉛などの重金属によって誘導され結合し無毒化するという特性から、重金属の毒性を軽減する防御タンパク質として研究されてきた。しかしながら、研究の発展によって、このタンパク質が紫外線や放射線に至る幅広い細胞傷害性因子に対して活性酸素、特にヒドロキシルラジカルの消去によって細胞の防御システムの中で重要な役割を果たしていることが明らかになってきた。

本論文著者は、疾病予防と健康増進を目指す衛生薬学の観点から、血管内皮細胞の MT に着目した。MT の誘導機構には全体として不明な点が多く、内皮細胞の培養系を用いてこれを解析した。内皮細胞の MT 誘導の最も重要な特徴は、代表的な誘導因子であり解析ツールでもある無機亜鉛による誘導が認められないことである。そこで著者は有機-無機ハイブリッド分子をツールとして活用することを着想した。ハイブリッド分子は Grignard などの先駆的科学家が分子変換反応に利用して以来、合成試薬として広く活用され、有機元素科学は飛躍的な発展を遂げているが、生命科学への貢献は皆無に等しい状態が続いていた。東京理科大学ではバイオ元素戦略—バイオオルガノメタリクス—を開始し、ハイブリッド分子のバイオロジーを展開していることがその着想を助けた。

第 1 章では、3 つの問題が解決された。第一に、内皮細胞において無機亜鉛が MT を誘導しないメカニズムとして、亜鉛によって活性化される転写因子 MTF-1 が活性化されないためにその応答配列 MRE が活性化されないだけでなく、MT 遺伝子のプロモーターに存在するもう一つのコンセンサス配列 ARE も活性化されないことを明らかにした。第二に、MTF-1 を選択的に活性化する亜鉛錯体 Bis(L-cysteino)zincate(II) は確かに MTF-1-MRE 経路を特異的に活性化するが、それだけでは内皮細胞の MT は起こらないことを明らかにした。第三に、同じく MTF-1-MRE 経路を活性化する亜鉛錯体 Zinc(II)bis(diethyldithiocarbamate) を見出し、これが内皮細胞の MT を誘導することを明らかにした。

続いて、第 2 章で有機ニクトゲン化合物について探索を行い、MT 遺伝子の発現を誘導する有機アンチモン化合物 Tris(pentafluorophenyl)stibane を獲得した。これを用い、第 3 章で MT のサブアイソフォーム—MT-1A および MT-2A—の遺伝子発現について検討し、MT-1A の発現には MTF-1-MRE 経路および Nrf2-ARE 経路が関与するのに対し、MT-2A の発現には Nrf2-ARE 経路は関与せず MTF-1-MRE 経路の活性化のみが関与することを示すことに成功した。この結果は、MT アイソフォームには機能分化は存在しないとする従前の仮説を覆すものであった。

しかしながら、Tris(pentafluorophenyl)stibane はタンパク質レベルでは MT を誘導しない。そこで第 4 章では銅錯体ライブラリーを探索し、MTF-1-MRE 経路および Nrf2-ARE 経路を活性化し、内皮細胞の MT をタンパク質レベルでも誘導する Copper(II)bis(diethyldithiocarbamate) を見出した。第 5 章ではこれを用いて解析を行い、Tris(pentafluorophenyl)stibane で得られた知見が正しいことを確認した。

以上の本論文の内容は、MT アイソフォームに機能分化が存在し得ること、すなわち MT-1 が亜鉛などの必須重金属の細胞内代謝を重要な役割としているのに対し、MT-2 は重金属の毒性軽減や活性酸素の消去などを司っている可能性を示唆するものである。本論文の内容はこの意味で MT 研究を大き

く発展させるものである。また、有機-無機ハイブリッド分子を活用するユニークな研究戦略でこれを成し遂げたことも重要な発展である。化学と生物学の接点で展開された本研究は、その視点が血管病変の予防であることも含め、衛生薬学の発展に貢献するものと考えられる。従って、本論文は、博士（薬学）の学位を与えるのに十分な価値を有するものと認める。