

平成22年6月4日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20790115

研究課題名（和文）メチル水銀による中枢神経障害の発現機構の解明に向けた、
細胞外環境分子の解析研究課題名（英文）Biochemical analysis of extracellular matrices and their degradation
enzymes in methylmercury-induced neurotoxicity

研究代表者

周尾 卓也（SHUO TAKUYA）

東京大学・医科学研究所・特任研究員

研究者番号：90399006

研究成果の概要（和文）：本研究では、メチル水銀による中枢神経障害の発現機構の解明に向け、タンパク質分解酵素と細胞外基質分子の動態を解析した。研究期間内において、メチル水銀により活性化されたタンパク質分解酵素 MMP-2 が細胞外基質分子ニューロカンを分解すること、メチル水銀は神経細胞の形態変化を引き起こすことを見出した。また脳組織には細胞内領域を欠いた膜貫通型分子ニューログリカン C が存在することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）： To clarify the molecular mechanism of neurotoxicity induced by methylmercury, we investigated extracellular matrices and their degradation enzymes. In this study, we showed that methylmercury-activated matrix metalloproteinase MMP-2 cleaved neurocan, an extracellular proteoglycan. Then, we also indicated the occurrence of a soluble form of neuroglycan C, a transmembrane proteoglycan in rodent brain.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・環境系薬学

キーワード：メタロプロテアーゼ、プロテオグリカン、メチル水銀、神経細胞毒性

1. 研究開始当初の背景

メチル水銀による中枢神経障害の発現機構は水俣病の発症が確認されてから40年以上が経過した現在も不明のままである。その一方で、世界的にはメチル水銀による環境汚染が大きな社会問題となっている地域もあり、メチル水銀の中枢神経障害に関する基礎研究の発展が求められていた。

2. 研究の目的

これまでメチル水銀の毒性に関する研究は、いずれも細胞内の事象を対象として行われてきた。しかしメチル水銀毒性の中枢神経系および胎児への特異性を説明する分子機構は明らかになっていない。そこで本研究では、細胞外環境分子、タンパク質分解酵素と細胞外基質分子の動態を解析することで、メチル水銀による中枢神経障害の発現機構の解明に向け糸口を得ようと考えた。

3. 研究の方法

本研究では、メチル水銀が神経細胞の細胞外環境分子の動態に及ぼす影響を初代培養神経細胞において解析した。さらに試験管内で、メチル水銀の標的分子タンパク質分解酵素メタロプロテアーゼと神経細胞の細胞外基質分子プロテオグリカンとの相互作用を調べた。

(1) メチル水銀が細胞外環境分子の動態にどのような影響を及ぼすかを、ラット胎仔脳由来神経細胞の培養系にメチル水銀を添加し解析する。

(2) 初代培養神経細胞の観察から発現の確認されたメタロプロテアーゼが神経細胞の細胞外環境を形成するプロテオグリカンを切断する活性があるかを確かめる。

4. 研究成果

(1) メチル水銀により活性化された MMP-2 はニューロカンを分解する

有機水銀化合物はタンパク質分解酵素のメタロプロテアーゼ群を活性化する性質があることから、同様にメチル水銀もメタロプロテアーゼを活性化できるのではないかと考えた。そこで神経細胞の細胞外環境に存在するメタロプロテアーゼ MMP-2 とメチル水銀を試験管内で混合すると、メチル水銀は有機水銀化合物 APMA と同程度に MMP-2 を直接に不活性型から活性型に変換しうることをゼラチンゼイモグラフィで確認した(図1)。

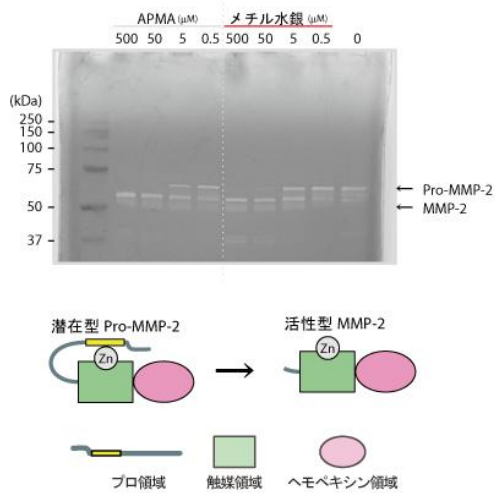


図1. メチル水銀はメタロプロテアーゼMMP-2を活性化する

中枢神経組織の細胞外環境は他の組織とは大きく異なり、細胞外基質分子プロテオグリカンが主要成分である。実際にラット脳から調製したプロテオグリカン群に試験管内であらかじめメチル水銀で活性化した MMP-2 を作用させると脳特異的プロテオグリカン

のニューロカンを分解した(図2)。その一方で MMP-2 は他のプロテオグリカンであるホスファカンなどには影響しなかった。

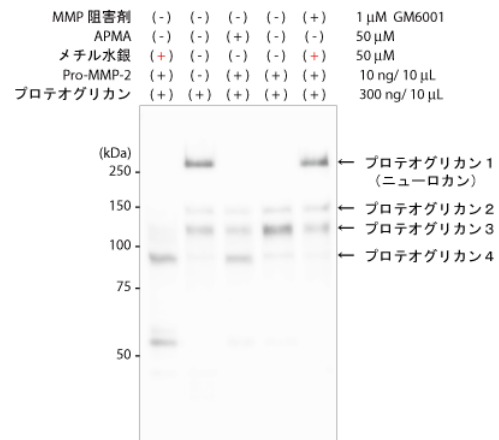


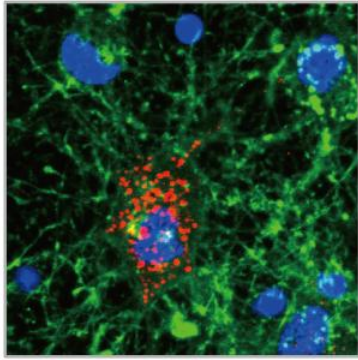
図2. メチル水銀により活性化されたMMP-2はニューロカンを分解する

これらのことからメチル水銀による中枢神経障害の発現機構に対し、つぎのような仮説を立てた。すなわち「メチル水銀は神経細胞周囲のメタロプロテアーゼを直接に過剰に活性化し、中枢神経特異的なプロテオグリカンを異常に分解し、正常な細胞外環境の形成を阻害する」という考えである。

(2) メチル水銀は神経細胞の形態変化を引き起こす

中枢神経細胞がプロテオグリカンにより構築される細胞外環境/神経細胞周囲網に取り囲まれている点に注目し、メチル水銀が神経細胞周囲網の形成に及ぼす影響を解析することを試みた。まずラット胎仔脳由来培養神経細胞における神経細胞周囲網の形成過程を、共焦点レーザー顕微鏡をもちいてプロテオグリカン結合レクチンの反応性から観察した(図3)。プロテオグリカン結合レクチンの反応は、培養7日目頃から神経細胞の周辺に現れ、培養14日、21日と徐々に強くなった。神経細胞周囲網は、ラット脳組織内では生後3週間頃までに形成されることから、培養系においても脳組織での発現パターンと類似していることがわかった。一方、同じ培養系にメチル水銀を種々の濃度で添加して、神経細胞の生存率を調べると、メチル水銀無添加の場合に比べて、0.5 μM では約50%の生存率に低下したが、0.1 μM 以下では3週間の培養期間を通じて有意な差はなかった。

以上の結果を踏まえ、現在は、顕著な細胞毒性を示さない濃度(0.1 μM 以下)のメチル水銀を培養神経細胞に添加して、神経細胞周囲網の形成過程が変化するかを調べている。



赤：プロテオグリカン / 神経細胞周囲網
 緑：神経突起
 青：細胞核

図3. プロテオグリカンによって形成される神経細胞周囲網

(3) 脳組織には細胞内領域を欠いたニューログリカンCが存在する

ニューログリカンCは脳特異的な膜貫通型プロテオグリカンである。ニューログリカンCの細胞外領域には培養神経細胞の神経突起伸長を促進する活性がある。このことからニューログリカンCは切断され、その結果生じるニューログリカンCの細胞外領域(可溶性ニューログリカンC)が生理機能を発揮していることが予想された。そこで脳組織にニューログリカンCの細胞外領域が存在することを確かめるために、ラット脳から可溶性画分と膜画分を調製した。脳の膜画分からは全長型ニューログリカンCとニューログリカンCの細胞内領域が得られた。一方、脳の可溶性画分からは細胞内領域を欠いたニューログリカンCが検出された(図4)。

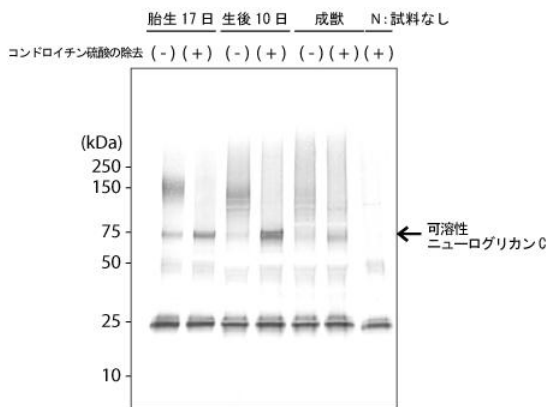


図4. 脳組織には細胞内領域を欠いたニューログリカンCが存在する

ラット胎仔から得た神経細胞の初代培養系では、全長型ニューログリカンCは細胞層

に、低分子量の可溶性ニューログリカンCは培養上清に回収された。この培養系に各種プロテアーゼ阻害剤を添加したところ、可溶性ニューログリカンCの遊離は、メタロプロテアーゼ阻害剤 TAPI-1, 組織性メタロプロテアーゼ阻害因子 TIMP-2, および TIMP-3 で効果的に阻害されたが、TIMP-1 では阻害されなかった。プロテアーゼ阻害剤の特異性から、この切断には膜型メタロプロテアーゼ MT-MMP の関与が考えられた。そこで、ラット脳から精製したニューログリカンCに MT-MMP 触媒領域の組換え酵素を作用させると、ニューログリカンCは二つのタンパク質断片に分断され、その切断点はラット、マウス、ヒトで保存されていることが明らかとなった(図5)。

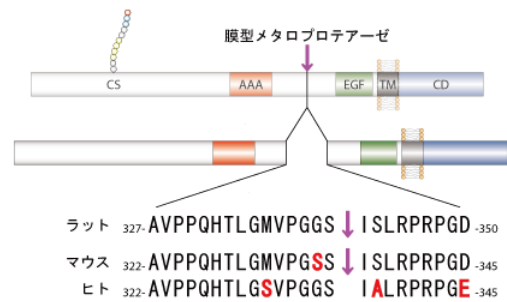


図5. 膜型メタロプロテアーゼによるニューログリカンCの切断部位

以上の結果から、ニューログリカンCは神経細胞表面に細胞膜貫通型として発現した後に、膜型メタロプロテアーゼ MT-MMP によって切断されることでその構造を変化させると考えられる(図6)。現在は、可溶性ニューログリカンC、および細胞膜に残存するタンパク質断片の生理活性を細胞、および動物個体で調べている。

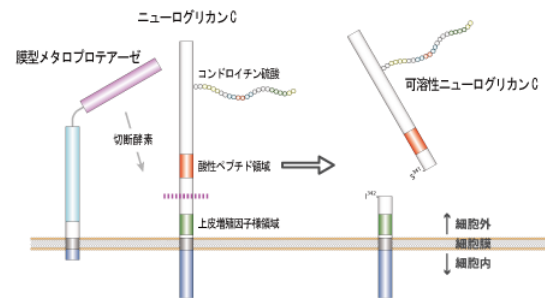


図6. ニューログリカンCは神経細胞表面において膜型メタロプロテアーゼにより切断される

中枢神経系における膜型メタロプロテアーゼの役割についての報告は極めて少ない。今後もニューログリカンCを膜型メタロプロテアーゼの新規基質として、精力的に解析を進めていきたい。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 2 件)

- ① 周尾卓也、脳特異的プロテアーゼ MT5-MMP によるニューログリカン C の細胞外領域の切り出し機構の解析、第 82 回日本生化学大会、平成 21 年 10 月 24 日、兵庫県神戸市
- ② 周尾卓也、脳特異的プロテアーゼ MT5-MMP によるニューログリカン C の細胞外領域の切り出し機構の解析、第 58 回 FCCA セミナー グライコサイエンス若手フォーラム 2009、平成 21 年 8 月 28 日、愛知県名古屋市

[その他]

受賞：第 82 回日本生化学会大会優秀プレゼンテーション賞、日本生化学会、平成 21 年 10 月

6. 研究組織

(1) 研究代表者

周尾 卓也 (SHUO TAKUYA)

東京大学・医科学研究所・特任研究員

研究者番号：90399006