

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月13日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究（A）

研究期間：2009～2012

課題番号：21689005

研究課題名（和文） 蛋白質のパルミチン酸化修飾によるメチル水銀毒性軽減機構

研究課題名（英文） Reduction mechanism of methylmercury toxicity by protein palmitoylation

研究代表者

黄 基旭 (HWANG GI-WOOK)

東北大学・大学院薬学研究科・講師

研究者番号：00344680

研究成果の概要（和文）：

パルミチン酸転移酵素である Akr1 が示す酵母のメチル水銀毒性軽減作用に関わる分子機構を解析したところ、Akr1 によって Meh1 がパルミチン酸化されることによってメチル水銀毒性軽減に関与することを見出した。また、Meh1 が液胞膜上で形成される EGO 複合体の構成因子としてメチル水銀毒性軽減に関与しており、その複合体の形成にも Meh1 のパルミチン酸化が必要であることが明らかになった。さらに、EGO 複合体は、メチル水銀によって引き起こされる液胞形態の異常を抑制することでメチル水銀毒性軽減に関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

We previously showed that Akr1 is involved in the reduction of methylmercury toxicity in budding yeast. In the present study, we found that the palmitoylation of Meh1 by Akr1 is essential for the protective effect of Meh1 against methylmercury toxicity. We also found that palmitoylation of Meh1 is important for its localization into the vacuolar membrane and its function to reduce methylmercury toxicity as a component of the EGO complex. Furthermore, the EGO complex may be involved in reduction of methylmercury toxicity through suppressing the abnormal vacuoles form caused by methylmercury.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	6,700,000	2,010,000	8,710,000
2010年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
2011年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
2012年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
年度			
総計	20,800,000	6,240,000	27,040,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・放射線・化学物質影響科学

キーワード：トキシコロジー

1. 研究開始当初の背景

パルミチン酸転移酵素の1つである Akr1 が酵母のメチル水銀毒性の軽減に関与して

おり、それには Akr1 のパルミチン酸転移活性が必要であることを見出した。また、パルミチン酸転移酵素ファミリーの中で Akr1 の

みがメチル水銀毒性の軽減に関与することを見出しており、Akr1による基質蛋白質のアルミチン酸化はメチル水銀に応答する生体防御機構の1つとして機能する可能性が示唆されている。一方、Akr1結合蛋白質であるWhi2はAkr1のアルミチン酸転移活性を負に制御することによってメチル水銀毒性増強に関与する可能性が示唆されている。このように、Akr1による蛋白質のアルミチン酸化はメチル水銀毒性発現において極めて重要な役割を果たしており、Akr1によるメチル水銀毒性軽減機構を明らかにすることができれば、50年以上も謎とされてきたメチル水銀毒性の発現機構を解明する上でも重要な手がかりになると期待される。

2. 研究の目的

Akr1によって特異的にアルミチン酸化される蛋白質を同定し、その中からメチル水銀毒性発現に関与する因子を決定する。また、その蛋白質のアルミチン酸化とメチル水銀毒性との関係を生化学的に詳細に調べることによって、Akr1によるメチル水銀の毒性軽減機構を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

酵母をモデル生物として生化学的手法および分子生物学的手法を用いた研究を行う。酵母は取扱が簡単で、遺伝子の導入や欠損などが容易な真核生物モデルである。

4. 研究成果

(1) メチル水銀によるAkr1の活性化機構

Akr1の細胞内レベルおよびそのアルミチン酸転移活性に対するメチル水銀の影響を検討した。その結果、メチル水銀処理によりAkr1 mRNAのレベルがメチル水銀の濃度依存的に増加した。Akr1をGAPDH promoterの制御下で発現させた酵母ではメチル水銀処理によるAkr1の蛋白質レベルの変動は認められなかったが、Akr1をown promoterで発現させた酵母ではメチル水銀の濃度に依存したAkr1蛋白質レベルの増加が観察された。したがって、メチル水銀はAkr1の転写誘導を介してAkr1の蛋白質レベルを増加させると考えられる。メチル水銀がAkr1のアルミチン酸転移活性(Lcb4のアルミチン酸化)を増加させることも確認された。このことから、Akr1は細胞内でメチル水銀毒性に対する防御因子として機能していると考えられる。また、Akr1の活性抑制因子である可能性が示唆されたWhi2の細胞内レベルは、メチル水銀処理による影響を受けなかったが、Akr1とWhi2との結合のメチル水銀処理による低下が認められた。以上の結果から、Whi2はメチル水銀毒性軽減蛋白質であるAkr1の活性を抑制することによりメチル水

銀毒性増強作用を示し、Akr1は自身が有するアルミチン酸転移活性によって基質蛋白質を特異的にアルミチン酸化することによってメチル水銀毒性を軽減すると考えられる。また、メチル水銀はAkr1の転写を誘導すると共にAkr1とWhi2の結合を抑制することによりAkr1の活性を上昇させ、このような機構が細胞内でのメチル水銀毒性に対する防御機構として機能している可能性が示唆された。

(2) メチル水銀毒性発現に関わるAkr1の基質蛋白質の同定

メチル水銀毒性軽減に関与するAkr1の基質(アルミチン酸化される蛋白質)を検索したところ、Meh1を欠損させた酵母が野生型酵母に比べ高いメチル水銀感受性を示した。そこで、Akr1・Meh1二重欠損酵母を作成しメチル水銀感受性を検討したところ、Akr1単独欠損酵母と同程度であった。また、Akr1を欠損させることによってMeh1のアルミチン酸化レベルが著しく減少した。これらのことから、Akr1によるメチル水銀毒性軽減作用には、少なくとも一部はMeh1のアルミチン酸化が関与している可能性が考えられる。Meh1欠損酵母が示すメチル水銀高感受性は同酵母に野生型Meh1を導入することによってほとんど認められなくなったが、アルミチン酸化される部位を置換した変異Meh1の導入はMeh1欠損酵母のメチル水銀感受性に影響を与えなかった。このことから、Meh1によるメチル水銀毒性軽減作用にはMeh1のアルミチン酸化が必要であると考えられる。

(3) Meh1によるメチル水銀毒性軽減機構

Meh1は液胞膜上でオートファジーの調節に関わるEGO複合体の構成蛋白質の一員である。EGO複合体を構成するGtr2またはEgo3をそれぞれ欠損させた酵母はMeh1単独欠損酵母と同程度のメチル水銀高感受性を示し、Meh1単独欠損酵母にGtr2またはEgo3をさらに欠損させても相加的なメチル水銀感受性度の上昇は認められなかった。これらのことから、Meh1はEGO複合体の一員としてメチル水銀毒性軽減に関与していると考えられる。Meh1のC末端にGFPを融合したMeh1-GFPは液胞膜上に局在するが、この局在はAkr1を欠損させることによって認められなくなりそのほとんどが細胞質に分布した。また、アルミチン酸化されない変異Meh1-GFP(変異Meh1-GFP)も液胞膜上への局在ができず細胞質に分布したことから、Meh1のアルミチン酸修飾はMeh1の液胞膜上へのリクルートに関与していると考えられる。以上のことから、Akr1によってアルミチン酸化されたMeh1は液胞膜上にリクルートされ、EGO複合体の一員としてメチル水銀毒性軽減に関与してい

る可能性が考えられる。

Ego3 を欠損させても Meh1 は依然と液胞膜上に分布したことから、Meh1 はパルミチン酸修飾を受けることで液胞膜上にリクルートされた後に、Ego3 と結合することによって EGO 複合体を形成すると考えられる。一方、Meh1 の構造中にはミリスチン酸修飾を受ける部位も存在する。ミリスチン酸修飾されない変異 Meh1 が液胞膜上に分布したことから、Meh1 の液胞膜への局在にミリスチン酸修飾は関与しないことが判明した。しかし、興味深いことに、本変異体はその蛋白質レベルが著しく低下したにも関わらず野生型 Meh1 と同程度のメチル水銀毒性の軽減作用を示すと共に、パルミチン酸修飾のレベルも野生型 Meh1 に比べて高値を示した。このことは、Meh1 のミリスチン酸修飾がパルミチン酸修飾を負に制御している可能性を示唆する初めてのものであり、今後、更なる検討が必要である。

(4) メチル水銀毒性と EGO 複合体との関わり

EGO 複合体はパルミチン酸化されて液胞膜に存在する Meh1 に Ego3 が、次に Gtr2 が順々に結合することによって形成されると予想されていることから、メチル水銀が Meh1 と Ego3 との結合に与える影響を検討した。その結果、メチル水銀処理濃度に依存して両蛋白質間の結合が著しく抑制され、この際に Ego3 の蛋白質レベルの減少も認められた。そこで、Meh1 の高発現がメチル水銀による Ego3 蛋白質のレベル低下に与える影響を検討したところ、メチル水銀処理の濃度および時間に依存して認められた Ego3 蛋白質のレベル低下が Meh1 の高発現によって何れも抑制された。また、Meh1 または Ego3 の高発現が酵母のメチル水銀感受性に与える影響を検討したところ、Meh1 高発現は酵母にメチル水銀耐性を与えたのに対し、Ego3 高発現酵母は対照酵母と同程度のメチル水銀感受性を示した。これらのことから、Meh1 は Ego3 を液胞膜にリクルートすることによってその安定性の増加に関与していることが示唆され、Meh1 高発現は EGO 複合体の形成を促進させることによって酵母にメチル水銀耐性を与えたと考えられる。

EGO 複合体は液胞膜でオートファジーを負に制御しているとの報告がある。オートファジー阻害剤である 3-MA の添加は酵母のメチル水銀感受性を軽減させ、3-MA 存在下では Meh1 欠損酵母が示すメチル水銀高感受性がほぼ完全に認められなくなり、3-MA 処理した野生型酵母と同程度のメチル水銀耐性を示した。以上の結果から、パルミチン酸化された Meh1 が EGO 複合体の一員としてメチル水銀によるオートファジーの誘導を負に制御することでその細胞毒性の軽減に関与して

いることが始めて明らかになった。

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)

[雑誌論文] (計 4 件)

1. Hwang G.W., Matsuyama F., Takahashi T., LEE J.Y. and Naganuma A.: Deletion of the ubiquitin-conjugating enzyme Ubc2 confers resistance to methylmercury in budding yeast by promoting Whi2 degradation. *J. Toxicol. Sci.*, 査読有, 38:301-303 (2013).
<http://dx.doi.org/10.2131/jts.38.3012>.
2. Hwang G.W., Ogiwara Y., Takahashi T. and Naganuma A.: Ubiquitin-conjugating enzyme Cdc34 mediates methylmercury resistance in *Saccharomyces cerevisiae* by increasing Whi2 degradation. *J. Toxicol. Sci.*, 査読有, 37:1283-1286 (2012).
<http://dx.doi.org/10.2131/jts.37.1283>
3. Hwang G.W., Kimura Y., Takahashi T., LEE J.Y. and Naganuma A.: Identification of deubiquitinating enzymes involved in methylmercury toxicity in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Toxicol. Sci.*, 査読有, 37:1287-1290 (2012).
<http://dx.doi.org/10.2131/jts.37.1287>
4. Hwang G.W.: Role of the ubiquitin-proteasome system in methylmercury toxicity in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Health Sci.*, 査読有, 57:129-133 (2011).
<http://dx.doi.org/10.1248/jhs.57.129>

[学会発表] (計 28 件)

1. 黄基旭、張智婷、永沼章、The palmitoylation of Meh1, a component of EGO complex, has an important role in the reduction of methylmercury toxicity in budding yeast、52th Annual Meeting of the Society of Toxicology、2013年3月12日、San Antonio (米国)
2. 黄基旭、メチル水銀毒性におけるパルミチン酸転移酵素群の役割、第2回重金属毒性機構解明に関する研究会、2013年2月18日、十和田
3. 張智婷、黄基旭、永沼章、EGO complex のメチル水銀毒性軽減作用における Meh1 パルミチン酸化の関与、第51回日本薬学

- 会東北支部大会、2012年10月7日、青森
4. 張 智婷、黄 基旭、永沼 章、The molecular mechanism underlying the reduction of methylmercury toxicity through the palmyoylation of Mehl by Akr1 in budding yeast、The 6th International Congress of Asian Society of Toxicology、2012年7月20日、仙台
 5. 張 智婷、黄 基旭、永沼 章、酵母における Akr1 による Mehl のパルミチン酸化を介したメチル水銀毒性軽減作用に関わる分子機構の解明、第39回日本毒理学学会学術年会、2012年7月18日、仙台
 6. 黄 基旭、メチル水銀毒性と蛋白質のパルミチン酸化、平成23年度メチル水銀研究ミーティング、2011年12月21日、東京
 7. 黄 基旭、パルミチン酸転移酵素 Akr1 が示すメチル水銀毒性軽減作用に関わる細胞内因子の同定およびその役割、第8回メタロチオネインおよびメタルバイオサイエンス研究会、2011年12月9日、名古屋
 8. 吳 成恩、黄 基旭、永沼 章、Identification of new factors involved in reduction of methylmercury toxicity using whole-genome siRNA library、The 27th Annual Meeting of KSOT/KEMS、2011年11月4日、Jeju (韓国)
 9. 黄 基旭、Involvement of the post-translational modification of protein in methylmercury toxicity、NIMD Forum 2011、2011年1月27日、水俣
 10. 伊藤 悠一、黄 基旭、永沼 章、パルミチン酸転移酵素 Akr1 によるメチル水銀毒性軽減における Mehl の関与、フォーラム2010；衛生薬学・環境トキシコロジー、2010年9月10日、東京
 11. 黄 基旭、蛋白質の翻訳後修飾によるメチル水銀感受性の決定、平成22年度日本薬学会東北支部学術講演会、2010年7月10日、仙台
 12. 黄 基旭、木村幸由、永沼 章、メチル水銀毒性増強蛋白質 Whi2 の分解調節によるメチル水銀感受性決定機構、第80回日本衛生学会、2010年5月10日、仙台
 13. 黄 基旭、メチル水銀毒性発現に関わる細胞内因子、第7回メタロチオネインおよびメタルバイオサイエンス研究会、2009年10月16日、東京
 14. 黄 基旭、Identification and functional analysis of novel genes involved in methylmercury toxicity、KSEH International Conference 2009、2009

年6月5日、Daegu (韓国)

[その他]
ホームページ等
<http://www.pharm.tohoku.ac.jp/~seitai/seitai-index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

黄 基旭 (HWANG GI-WOOK)
東北大学・大学院薬学研究科・講師
研究者番号：00344680