

令和 5 年 6 月 1 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19837

研究課題名（和文）肝－脳連関によるリソソーム内レドックス制御機構とメチル水銀による攪乱

研究課題名（英文）Lysosomal redox control via hepatic-brain crosstalk and its disruption by methylmercury

研究代表者

外山 喬士（Toyama, Takashi）

東北大学・薬学研究科・講師

研究者番号：50720918

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、セレノプロテインP（SeP）によるリソソーム活性上昇とメチル水銀による攪乱作用について、その機構解析を進めた。まず、培養細胞 SHSY-5Y細胞に精製SePを添加するとリソソーム酸性度の増加が認められた。リソソーム内超硫黄はその活性を抑制的に調節する因子であり、SePがその還元を担当することで、リソソーム活性調節に寄与していることを新たに見出した。また、メチル水銀はリソソームの酸性度にほとんど影響を与えなかったが、SePはメチル水銀の毒性を細胞内の動態と蓄積する箇所を大きく変え、これが毒性の変化につながることも見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞内シグナル伝達や飢餓応答、またある種のがん細胞などにおいてリソソームが活性化することはよく知られており、免疫細胞では感染症に対するフロンティアになることも知られている。一方、このリソソームが、細胞外から取り込まれた因子によって活性調節されることはほとんど知られておらず、学術的新規性が非常に高い。

更に、酸性条件という過酷な細胞内環境においてのレドックス調節機構はほとんど理解されていないが、セレノシステムを有する酵素が、その調節因子であることを示しており、リソソームに起因する病態を改善する創薬のヒントになると考えられる。

研究成果の概要（英文）： In this study, we proceeded to analyze the mechanism of the increase in lysosomal activity by selenoprotein P (SeP) and its disturbing effect by methylmercury. First, an increase in lysosomal acidity was observed when purified SeP was added to cultured SHSY-5Y cells. We newly found that intralysosomal supersulfur is an inhibitory regulator of lysosomal activity, and that SeP contributes to the regulation of lysosomal activity by being responsible for its reduction. We also found that methylmercury had little effect on lysosomal acidity, but SeP significantly altered the intracellular dynamics of methylmercury toxicity and where it accumulated, leading to changes in toxicity.

研究分野：毒性学

キーワード：セレノプロテインP メチル水銀 リソソーム

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

リソソームは代表的な酸性オルガネラであり、その中には酸性に至適 pH を持つ多様な加水分解酵素群が存在し、タンパク質分解とアミノ酸供給を担う。一方、リソソーム内外で産生された活性酸素種 (ROS) は、リソソーム内のシステインプロテアーゼを酸化・失活して、細胞機能を障害する。しかし、それらをリソソーム内酸性環境で戻す還元酵素は未発見である。

我々は、10 残基のセレノシステイン (Sec) を保持する SeP が肝臓で合成され、脳へセレンを輸送する輸送体であることを見出した。血液脳関門をトランスサイトシスで通過し、エンドサイトシスで神経細胞内に取り込まれた SeP は、リソソームへと輸送された後、24 時間と非常に緩慢に分解されてセレン源として利用される。一方、セレン運搬作用とは別に、SeP は N 末端ドメインに存在する 1 残基の Sec を活性中心として、グルタチオン (GSH) 存在下で酸化タンパク質を還元する酵素活性を有することも発見したが、血漿中に GSH はあまり存在しないため、どこでその酵素活性を発揮するかは謎であった。SeP の Sec (pKa5 付近) は酸性条件でも問題なく解離するため、リソソーム内還元酵素として活性を発揮可能である。そこで、SeP は既知のような単なるセレン輸送体ではなく、リソソーム内でタンパク質還元酵素として真価を発揮する多機能タンパク質であると考え、本機構の解明に挑戦する。

一方、最近申請者は独自に開発した Sec に対する化学修飾の特異的検出法 (aBMPL 法) により、血漿中 SeP の Sec が比較的低濃度のメチル水銀で選択的に修飾 (Se-水銀化) されることを見出した。そのため、メチル水銀は SeP の還元活性を阻害する可能性が高い。これまで申請者は、メチル水銀は神経細胞においてオートファジー/リソソーム経路を阻害することが毒性発現機構の一端であることを見出してきたが (Unoki et al., Sci., Rep. 2016. 一部未発表)、詳細は不明であった。そこで、SeP の Se-水銀化が、リソソーム活性調節不全を介し、肝臓-脳のクロストーク (連関) を攪乱して神経障害に関与するか解明する。

2. 研究の目的

本研究では、肝臓から血漿に分泌され、血液脳関門を通過して脳にセレンを輸送するセレノプロテイン P (SeP) が、ブラックボックスであったリソソーム内還元酵素であり、肝臓から脳のリソソーム活性を調節する非常にユニークな臓器間クロストークの実行因子である可能性について解明する。

他方、申請者は環境化学物質であるメチル水銀が低濃度でも血漿中で SeP と選択的かつ強固に結合することを見出したことから、メチル水銀が SeP の上記活性を阻害し、肝-脳連関の攪乱により神経障害を惹起する可能性について解明する。

3. 研究の方法

本研究では SeP を効率的に取り込むヒト培養神経細胞 SH-SY5Y を用いる。リソソーム内の主要なプロテアーゼであるカテプシン類は、レドックスセンシティブなシステインを活性中心とする。本部位が酸化修飾を受けた場合プロテアーゼ活性は阻害されリソソーム機能が低下する。そこで、*in vitro* で酸化されたカテプシンに対し、精製 SeP と GSH をリソソームと同様の酸性条件下で添加することで、カテプシンが還元されて活性が復活するか検討する。申請者の別の先行研究から精製 SeP を培養肝細胞の培地に添加すると、リソソームの酸性度が顕著に上昇することも判明している。リソソーム膜上のカルシウムチャネルである TRPML はシステイン残基が ROS で酸化されることで活性化し、リソソーム内酸性度を低下させるためことが知られている。そこで、これらの関与について、検証する。

4. 研究成果

今回行った検討から、SeP は細胞に取り込まれた後リソソームへと運ばれるが、通常時にはリソソーム量、酸性度、基質の分解などに与える影響はあまり無いことが示唆された。一方で、内在的にも酸性される超硫黄がリソソームの酸性度を低下させ、かつカテプシンなどのシステインプロテアーゼの活性を阻害するが、SeP が本作用を打ち消すことが初めて明らかになった。これは SeP が超硫黄を還元する活性を示しており、全く新しいリソソーム制御系を発見する鍵となる可能性がある。

SeP のリソソームへの蓄積は、FBS+ の条件ではほとんど認められなかった。GPx1 の誘導はセレン供給依存的に増加するため、SeP によるセレン供給の指標として用いられるが、FBS- と比較し FBS+ のほうで、より低濃度の SeP での GPx1 の誘導が認められた。また、本 GPx1 の誘導は Baf A1 によってほとんど抑制されたことから、詳細は不明であるが、FBS+ の場合 SeP がリソソーム内で速やかに分解されている可能性が考えられる。

超硫黄化で失活したパピンの還元には、SeP に加えて還元因子として DTT が必要であった。一方、生体内には DTT が存在しないため、本活性を発揮するためには DTT に代わる内在性の還元因子が必須であると考えられる。SeP は DTT 同様にジチオールを有するチオレドキシンを還元因子として用いることが可能である。リソソーム内にはチオレドキシ様タンパク質 IFI30 が存在するため、このような因子と協働して超硫黄還元を行っている可能性がある。また、GSH を還

元因子として用いることも可能であると考えられるため、その分子実態の解明を目指したい。リソソームの pH は、主に V 型 ATPase (プロトンポンプ) によるプロトンのリソソーム内取り込み、カウンターイオンチャネル (クロライドイオンの流入か Na⁺, K⁺の流出) によるプロトンポンプ機能の補助、またはプロトンリーク (Na⁺/H⁺交換輸送体; NHE) によって制御されている。また、リソソームに発現する Ca²⁺チャネルである TRPML はリソソーム内 Ca²⁺を細胞質へ放出することで、カウンターイオンチャネル様に作用してリソソーム酸性化の亢進に寄与することや、Ca²⁺の放出を介してリソソームエキソサイトーシス (リソソーム膜と細胞膜を融合させて、リソソーム内容物を放出する) に寄与することが知られている。V 型 ATPase は哺乳類、酵母、および植物と幅広い生命体でレドックス調節を受けることが知られており、A サブユニットの触媒部位に保存されたシステイン残基間でのジスルフィド結合形成がその阻害に寄与することが報告されている。そのため、超硫黄分子によるリソソーム酸性度の低下には、本システイン残基の修飾とジスルフィド結合形成の促進、または超硫黄分子による架橋 (ブリッジ) の形成が寄与した可能性が考えられる。システイン修飾剤である N-ethylmaleimide によって V 型 ATPase は失活することからもシステイン残基の超硫黄修飾が阻害に寄与した可能性がある。TRPML はリソソーム内の活性酸素種 (ROS) センサーとして知られているが、チオール修飾剤・酸化剤である DTNB、4-HNE および NO ドナーなどは TRPML の活性には影響しないことが報告されており、ROS は TRPML 中のチオールの酸化修飾とは異なる機構で、本チャネルを活性化する機構が提唱されている。したがって、TRPML 中チオールの超硫黄化が直接活性化に関わる可能性は考えにくい。超硫黄分子はチオール同士をブリッジで架橋する作用もあるため、既知の酸化修飾と作用が全く異なる可能性も想定される。しかしながら、超硫黄ドナーで処理した細胞において、V-ATPase および TRPML の超硫黄化は確認できなかった。単離リソソームを用いた再酸性化アッセイを行ったところ、超硫黄ドナーは *in vitro* でリソソームの酸性化を阻害しなかったことから、細胞内因子との交絡によって、酸性度の低下が引き起こされていると考えられる。

今回、超硫黄分子ドナー添加で認められたリソソーム活性の変化に対して SeP が作用することを明らかにしてきたが、生理的にどのような意義があるかは不明であり、引き続きの検討が必要である。少なくとも超硫黄分子は組織・細胞内外に数 10-100 μM ほど存在することが示唆されており、今回使用した超硫黄分子ドナー濃度 (最大 50 μM) は比較的高い濃度条件の可能性がある。最近、オートファジーの誘導に伴い細胞内超硫黄分子の量が増加することが報告された。今回我々の検討を合わせて考えると、このように増加した超硫黄分子はリソソームの活性を抑制することで、活性化したオートファジーを抑制するフィードバック調節機構の一種である可能性が考えられる。一方、サルモネラなど細胞感染性を示す硫化水素産生菌は、細胞内で超硫黄分子を産生し、オートファジーを阻害して自身の消化を防御することが明らかとなっている。このため、このような病原生物の感染に対して、SeP は過剰超硫黄分子を打ち消すことで保護的に作用する可能性も考えられる。

また、メチル水銀は、SeP と結合することで、その毒性が軽減されることが示された。メチル水銀単体およびメチル水銀結合 SeP によってリソソームの酸性化は変わらなかったことから、リソソーム機能の攪乱という点においては、メチル水銀の寄与は低いのもかもしれない。しかしながら、SeP によって本来細胞質に入るはずのメチル水銀がリソソームに集積される可能性が新たに考えられ、これは、メチル水銀の細胞内動態を制御する新規機構であると思われる。そこで、SeP のリソソーム調節機能攪乱としてではなく、SeP はむしろメチル水銀の生体影響の文脈においては、細胞内動態調節因子として作用するほうがメジャーであり、この機能の詳細な解明が必要と考えている。

以上、本研究より明らかになった知見は、SeP はただのセレン輸送体だけでなく、リソソーム制御における未知の生理的・病理的な役割だけでなく、メチル水銀の細胞内動態制御を司るムーンライティングプロテインである可能性を示唆している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 池田 峻也、外山 喬士、斎藤 芳郎
2. 発表標題 セレノプロテインPによるリソソーム機能の調節機構
3. 学会等名 メタルバイオサイエンス研究会2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 外山 喬士
2. 発表標題 メチル水銀による セレン代謝攪乱を防御する 超硫黄の意義
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 工藤 琉那、水野 彩子、外山 喬士、斎藤 芳郎
2. 発表標題 メチル水銀がもたらすセレン利用攪乱機構と活性硫黄を利用した生体内防御機構
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 市川 敦也、水野 彩子、外山 喬士、斎藤 芳郎
2. 発表標題 細胞内セレン貯蔵における SeP/ApoER2 システム
3. 学会等名 メタルバイオサイエンス研究会2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 外山 喬士、工藤 琉那、斎藤 芳郎
2. 発表標題 メチル水銀の解毒代謝におけるグルタチオンと超硫黄の異なる役割
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------