

研究種目：基盤研究（S）
研究期間：2007～2011
課題番号：19101003
研究課題名（和文）メチル水銀毒性の発現とその調節に関わる細胞内機構の解明
研究課題名（英文）Cellular systems involved in development and regulation of toxicity of methylmercury
研究代表者
永沼 章（NAGANUMA AKIRA）
東北大学・大学院薬学研究科・教授
研究者番号：80155952

研究代表者の専門分野：分子毒性学
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. 研究計画の概要

メチル水銀毒性の発現機構は水俣病の発症から半世紀が経過した現在も不明のままであり、解明のための糸口さえほとんど得られていない。我々は、出芽酵母を用いた研究によって、ユビキチン・プロテアソームシステム（UP システム）がメチル水銀毒性に対して防御的に機能することを初めて見出した。UP システムはメチル水銀毒性の増強と軽減に関与する蛋白質の分解に関わっており、これら蛋白質の作用機構と分解機構を明らかにすることによって永年の謎であったメチル水銀毒性発現機構のみならず、UP システムによるメチル水銀毒性制御機構も解明されるものと期待される。

そこで本研究は、UP システムによって分解が促進されるメチル水銀毒性増強蛋白質およびメチル水銀毒性軽減蛋白質を同定し、それら蛋白質のメチル水銀毒性に対する作用機構を解明すると共に、UP システムによるそれら蛋白質の分解調節機構を明らかにすることを目的とする。

2. 研究の進捗状況

遺伝子スクリーニングによりメチル水銀感受性に影響を与えるヒトおよび酵母蛋白質を数多く同定することに成功した。これらの中から、細胞内でユビキチン化を受ける酵母蛋白質を 8 種見出した（ヒト蛋白質については現在検討中）。同定された酵母蛋白質の中で、Dld3 および Eno2（共にピルビン酸合成に関わる酵素）はミトコンドリアへのピルビン酸の取り込みを増加させることによって、また、Whi2 はメチル水銀毒性軽減作用を有する Akr1 と結合してその活性を抑制する

ことによって、それぞれメチル水銀毒性を増強させることが判明し、さらに、これら蛋白質のユビキチン化に関わる蛋白質の一部を明らかにした。同定されたヒト蛋白質については、細胞をメチル水銀処理することによって HSF1 は核に移行し、RELA は活性化されることが判明した（両蛋白質とも、メチル水銀毒性を増強する）。また、TEX27 はポリユビキチンと共同してメチル水銀毒性を軽減し、MRAP2 は melanocortin 経路を介したシグナル伝達によってメチル水銀毒性を増強させることが明らかとなった。

一方、メチル水銀毒性関連蛋白質のユビキチン化反応に関わる酵母酵素分子種を検索し、ユビキチン転移酵素は 13 種中 7 種、F-box 蛋白質は 17 種中 3 種、脱ユビキチン化酵素は 17 種中 7 種の分子種がそれぞれ同定された。同定されたユビキチン転移酵素は 2 グループ（A、B）に分類され、A グループは上述の Whi2 の細胞内レベルを低下させ、B グループは逆に上昇させることが判明した。同定された F-box 蛋白質についてはメチル水銀毒性に影響を与える基質蛋白質をそれぞれ同定することに成功した。また、同定された脱ユビキチン化酵素の中で、Ubp6 はユビキチン化された Whi2 のプロテアソームでの分解を抑制することによってメチル水銀増強作用を示すことが明らかとなった。

3. 現在までの達成度

②「おおむね順調に進展している」

UP システムによって分解が促進され、かつ、メチル水銀毒性の発現程度に影響を与える

遺伝子を多数同定することに成功し、さらにそれら遺伝子産物のメチル水銀毒性修飾機構について有用な知見を数多く蓄積している。また、蛋白質ユビキチン化に関わる酵素群の中でメチル水銀毒性発現調節に関わる分子種の特定も順調に進行している。したがって、当初の目標に向けて順調に研究が進展していると判断でき、予定どおりの成果が見込まれる。

4. 今後の研究の推進方策

目的とする蛋白質の検索・同定はほぼ終了したので、これら蛋白質の作用機構解析および UP システムによる分解調節機構に関する検討を継続して実施し、本研究目的の確実な達成を目指す。

(1) UP システムによって分解が促進されるメチル水銀毒性関連蛋白質の作用機構解析

①ピルビン酸合成に関わる蛋白質とメチル水銀毒性の関係：メチル水銀によるミトコンドリア中へのピルビン酸取り込み促進機構およびメチル水銀誘発性の活性酸素産生および膜電位低下に対してピルビン酸が示す促進作用機構の解明を行う。また、ユビキチン化反応関連因子がミトコンドリア中ピルビン酸濃度に与える影響についても検討する。

②Png1：UP システムによって分解されるメチル水銀毒性軽減蛋白質として同定された Png1 を対象として、同酵素が有する脱 N-グリコシル化作用とメチル水銀毒性との関係について検討し、その機構を解明する。

③その他の蛋白質：その他の蛋白質についても、作用機構解析を可能な限り実施する。

(2) メチル水銀毒性関連蛋白質のユビキチン化反応に関わる酵素分子種によるメチル水銀毒性調節機構解析

メチル水銀毒性発現に関与する酵素分子種が同定されたので、これら分子種の作用機構解析とその特異性について詳細に検討する。

(3) メチル水銀毒性に影響を与える各蛋白質のユビキチン化システムによる認識機構の解明

メチル水銀によってユビキチン化が促進される蛋白質として、メチル水銀毒性増強蛋白質 Rps3 を同定した。Rps3 のユビキチン化促進機構およびユビキチン化システムによる認識機構について検討する。

(4) メチル水銀毒性軽減に関わるユビキチン化酵素を高発現するトランスジェニックマウスの作成

ヒト細胞でメチル水銀毒性軽減作用を確認したユビキチン転移酵素 Cdc34 を脳特異的に高発現するマウスの作成に成功したので、今後は同マウスにメチル水銀を投与してメチル水銀感受性等を正常マウスと比較検討

する。

(5) メチル水銀毒性軽減に関わるユビキチン化システムの特異的阻害剤の検索

既に、スクリーニング用の化合物を約 1,000 種類確保した。ヒト由来培養細胞を用いて、これら化合物の中からメチル水銀毒性軽減に関わるユビキチン化システムの特異的阻害剤および促進剤の候補を検索する。

(6) UP システムによる分解を受けないメチル水銀毒性関連蛋白質の作用機構解明

本研究で同定されている対象蛋白質の一部について、その作用機構を検討する。

5. 代表的な研究成果

[雑誌論文] (計 19 件)

1. Hwang, G. W., Tobita, M., Takahashi, T., Kuge, S., Kita, K. and Naganuma, A.: siRNA-mediated AMPK1 subunit gene PRKAA1 silencing enhances methylmercury toxicity in HEK293 cells. *J. Toxicol. Sci.*, 34, (査読有り) in press (2010).

2. Lee, J. Y., Hwang, G. W. and Naganuma, A.: Rip1 enhances methylmercury toxicity through production of reactive oxygen species (ROS) in budding yeast. *J. Toxicol. Sci.*, 34, (査読有り) 715-717 (2009).

3. Hwang, G. W., Wada, N., Kuge, S. and Naganuma, A.: Overexpression of the novel F-box protein Ymr258c confers resistance to methylmercury in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Toxicol. Sci.*, 34, (査読有り) 413-416 (2009).

[学会発表] (計 27 件)

1. 木村幸由、黄 基旭、永沼 章 (2010): メチル水銀感受性決定因子としての脱ユビキチン化酵素 Ubp6 の役割、日本薬学会第 130 年会、平成 22 年 3 月 30 日、岡山。

2. 松山藤王、黄 基旭、永沼 章 (2008): メチル水銀感受性に決定におけるユビキチン転移酵素分子種間相互作用の関与。フォーラム 2008: 衛生薬学・環境トキシコロジー、平成 20 年 10 月 17 日、熊本。