

令和 5 年 6 月 23 日現在

機関番号：87401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K16368

研究課題名(和文) 活性イオウ分子に着目したメチル水銀の選択的細胞傷害に関する研究

研究課題名(英文) Research on methylmercury-induced selective cytotoxicity focusing on reactive sulfur species

研究代表者

鷓木 隆光 (Unoki, Takamitsu)

国立水俣病総合研究センター・その他部局等・主任研究員

研究者番号：00742868

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：メチル水銀(MeHg)への感受性はヒトとげっ歯類いずれの脳においても発達時期および部位に特異的であるが、その要因は不明な点が多い。活性イオウ分子(RSS)はMeHgと反応して毒性の低い代謝産物であるビスメチル水銀スルフィドを形成し、解毒に寄与する。本研究では、ラット脳におけるRSS量とMeHgに対する感受性との関係性を評価した。その結果、RSS量の僅少さはMeHgに脆弱な脳領域とよく符合した。MeHg曝露により脳中のRSSが消費される結果と考え併せると、RSSは脳におけるMeHg脆弱性の特異性を規定する要因となることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

メチル水銀による中枢神経系の細胞傷害は部位・細胞種や発達段階で異なるが、その特異性が生じる要因については全容の解明には至っていない。本研究は、活性イオウ分子を介したレドックスバランス制御の観点からこの疑問にアプローチすることで、メチル水銀毒性機序の解明を通りリスク評価への寄与が期待される。また、近年急速に発展しつつあるイオウ生物学において、活性イオウ分子の有する生理的意義付けに新たな知見を提供できる。

研究成果の概要(英文)：Brain sensitivity to methylmercury (MeHg) is developmentally and site-specific in both humans and rodents, but the mechanism is not well understood. Reactive sulfur species (RSS) are known to react with MeHg to form a less toxic metabolite, dimethylmercury sulfide, which exerts cytoprotective effects. In this study, we evaluated changes in RSS contents in rat brains and their relationships to sensitivity to MeHg. Analysis of fetal and juvenile rat brains revealed that RSS content was low in early development. Site-specific analysis of adult rat brains revealed that RSS levels in the cerebellum were lower than those in the hippocampus. In the cerebellum, the RSS levels in the granule cell layer were lower than those in the molecular layer. Thus, lower RSS levels corresponded to brain regions vulnerable to MeHg. Taken together with the result that brain RSS is consumed during MeHg exposure, RSS is a factor that defines the specificity of MeHg vulnerability in the brain.

研究分野：毒性学

キーワード：メチル水銀 活性イオウ分子

1. 研究開始当初の背景

我が国はメチル水銀 (MeHg) 曝露による公害として水俣病を経験し、大きな爪痕を残した。現代においても、水銀含有廃棄物の燃焼や金採掘現場で用いられるアマルガムといった産業活動由来や自然活動由来の水銀が環境中で細菌の活動を経て MeHg へと変換され、生物濃縮を介して魚介類へと蓄積される。我々は日常的にこれを摂取することから、特に MeHg に高感受性を示す胎児期の曝露影響を含め、MeHg による健康影響は現代においても世界的な懸念事項となっている。

MeHg は化学的に親電子性を有し、タンパク質や核酸の求核置換基と容易に共有結合するため、MeHg による生体高分子の化学修飾が毒性発現に寄与するとされている。また、MeHg 曝露に際し、酸化ストレスを伴う細胞内レドックス (酸化還元) バランスの破綻が細胞傷害をもたらす。このような MeHg 毒性に対し、細胞内に豊富に存在するグルタチオン (GSH) は抱合体形成を通じ、その細胞外への排出を促進する。また、神経疾患の防御因子として知られる硫化水素 (H_2S 、生理的条件下で多くは脱プロトン化し HS^- として存在すると考えられる) は解毒代謝物として $(MeHg)_2S$ の生成に寄与する (Yoshida et al. Chem Res Toxicol 2011)。一方で近年、生体内ではイオウ転移酵素等を介しシステイン (CysSH) へ過剰なイオウ原子が挿入されたシステインパーサルフィド (CysSSH) が産生され、CysSSH を起点とし GSSH といった多彩な分子群が産生されることが明らかとなった (Ida et al. Proc Natl Acad Sci USA 2014)。これら活性イオウ分子 (RSS) と称される分子群は高い求核性・抗酸化性を有し、 $(MeHg)_2S$ 生成を介した不活化や細胞内レドックスバランスの維持を通じて MeHg による細胞傷害の防御因子として機能を発揮することが示唆されている (Abiko et al. Chem Res Toxicol 2015) が、中枢神経系におけるその局在量は詳細に解明されていない。

2. 研究の目的

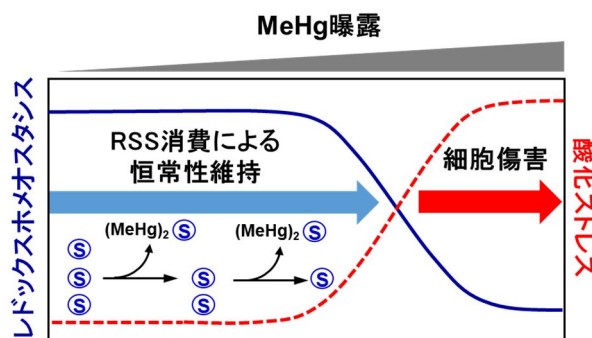
MeHg による中枢神経系の細胞傷害は部位、細胞種および発達段階で異なる。その特異性の一因は抗酸化酵素の発現量に起因すると考えられるが、全容の解明には至っておらず、MeHg による毒性発現機構の理解、リスク評価への情報が不足している。

一方、高い求核性・抗酸化性から MeHg 曝露への防御因子となる RSS の中枢神経系における時空間的な局在量は詳細に解明されておらず、RSS の分布特異性が MeHg 曝露においてもたらす影響は明らかではない。

従前より知られる GSH、 H_2S/HS^- に加え、高い求核性・抗酸化性から MeHg 毒性防御に寄与 (言い換えればその不足がリスクとなる) する RSS といった含イオウ求核低分子群の中枢神経系における含有量を部位、細胞種、発達段階、さらに MeHg 曝露の有無をもって網羅的に解析し、当該分子群の存在量の差異が MeHg による細胞傷害に特異性をもたらす一因子であるかを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

MeHg の胎児期曝露において脳はびまん性の細胞傷害を伴い、また成熟脳に比し感受性が高いことが知られる。成熟脳への MeHg 曝露においては、小脳顆粒細胞や大脳皮質の一部に顕著な細胞傷害を示す一方、海馬神経細胞の抵抗性は高いことが知られる。メタボローム解析を駆使し、MeHg 毒性防御に寄与する RSS の中枢神経系における存在量を時空間的に解析し、その差異が MeHg による細胞傷害に特異性をもたらすかを明らかにする。また、MeHg 曝露時の RSS 量の変動を解析し、MeHg 曝露に伴う RSS の消費とそれに次ぐレドックスバランス破綻の結果、酸化ストレスなどを介した細胞傷害に至るモデルの提案につなげる (図 1)。



(図 1) 作業仮説

4. 研究成果

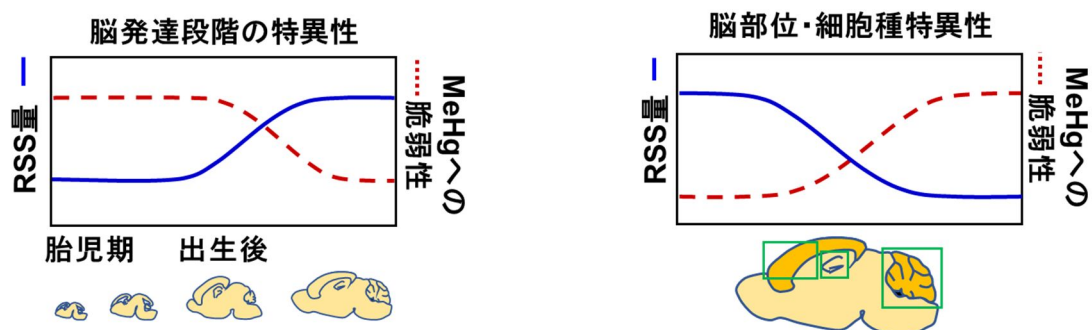
ラット脳における胎生期から出生後を通じての含イオウ求核低分子の経時的な量変動を解析した。E (胎生日数) 14、E20、P (出生後日数) 1、P10、P20 ラットより全脳及び大脳、海馬、小

脳の各ホモジネートを調製し、限外ろ過に供して低分子画分を得た。本画分中の含イオウ求核低分子をチオールアルキル化試薬により標識し、安定同位体標識した既知濃度の標準物質と共に LC-MS/MS-MRM に供して定量を行った。その結果、CysSH に加え、RSS である CysSSH 及び H₂S 量の脳発達段階依存的な増加が見られた。一方、GSH においては解析した発達段階を通じて顕著な量変動を示さなかった。

低濃度 MeHg の胎生期曝露（母体への 5 ppm MeHg の飲水曝露）を行った E20 及び P1 ラット脳において同様に含イオウ求核低分子量を解析したところ、未曝露群に比し CysSH 及び GSH 量は変動を示さなかった一方、RSS である CysSSH 及び H₂S 量の減少が見られた。また、本曝露系では P21 における脳内水銀量は僅少量まで減少するが、これに符合するように P20 での CysSSH 及び H₂S 量は未曝露群と同等であった。

次に脳部位特異的な含イオウ求核低分子の分布解析を行った。成体ラット脳を試料とし、全脳及び大脳、海馬、小脳の各ホモジネートを調製し、限外ろ過に供して低分子画分を得た。本画分中の含イオウ求核低分子をチオールアルキル化試薬により標識し、安定同位体標識した既知濃度の標準物質と共に LC-MS/MS-MRM に供して定量を行った。その結果、MeHg 曝露に脆弱性を示す小脳では、抵抗性を示す海馬に比して CysSSH、GSSH 及び H₂S といった RSS の存在量が僅少であることが明らかとなった。20 ppm MeHg の飲水曝露下においては、いずれの脳部位においても RSS の経時的な減少が認められたが、海馬は小脳に比して高い存在量を維持していた。より微視的な検討のため、小脳急速切片を試料とし、その層構造を特異的に単離する手技を確立して同様の解析を行った。その結果、MeHg 傷害部位である顆粒細胞層では分子層に比して MeHg 曝露下における RSS 量が僅少となることが明らかとなった。

本研究によりラット胎児期脳への低濃度 MeHg 曝露において、CysSSH や H₂S といった RSS の減少が確認された。本曝露条件は細胞死を引き起こさない低用量であることを鑑みると、これらの RSS が高い反応性をもって MeHg を捕獲・不活性化すること、また MeHg 曝露により惹起される酸化ストレスを防ぎ細胞のレドックスバランスの維持に寄与していることが示唆される。これらの RSS は胎生期から出生後を通じ発達段階に応じ脳内量が増加したことから、MeHg への抵抗性獲得に寄与していることが示唆される。また、脳部位ごとの RSS の分布特異性を明らかとし、MeHg 曝露下での脆弱部位における RSS の僅少さを示す知見を得た。これらの知見から、当該分子群の存在量の差異が MeHg による選択的細胞傷害をもたらす一因子であることが示唆された（図 2）。



(図 2) 脳における RSS 量と MeHg への脆弱性を示すモデル

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Unoki Takamitsu, Akiyama Masahiro, Shinkai Yasuhiro, Kumagai Yoshito, Fujimura Masatake	4. 巻 47
2. 論文標題 Spatio-temporal distribution of reactive sulfur species during methylmercury exposure in the rat brain	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Toxicological Sciences	6. 最初と最後の頁 31 ~ 37
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2131/jts.47.31	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Akiyama Masahiro, Unoki Takamitsu, Shinkai Yasuhiro, Ishii Isao, Ida Tomoaki, Akaike Takaaki, Yamamoto Masayuki, Kumagai Yoshito	4. 巻 127
2. 論文標題 Environmental Electrophile-Mediated Toxicity in Mice Lacking Nrf2, CSE, or Both	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Environmental Health Perspectives	6. 最初と最後の頁 067002 ~ 067002
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1289/EHP4949	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Kumagai Yoshito, Akiyama Masahiro, Unoki Takamitsu	4. 巻 35
2. 論文標題 Adaptive Responses to Electrophilic Stress and Reactive Sulfur Species as their Regulator Molecules	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Toxicological Research	6. 最初と最後の頁 303 ~ 310
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5487/TR.2019.35.4.303	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Unoki Takamitsu, Akiyama Masahiro, Kumagai Yoshito	4. 巻 21
2. 論文標題 Nrf2 Activation and Its Coordination with the Protective Defense Systems in Response to Electrophilic Stress	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 545 ~ 545
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21020545	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 鶴木隆光, 秋山雅博, 新開泰弘, 石井功, 熊谷嘉人
2. 発表標題 RSS産生酵素CSEはマウスへのメチル水銀曝露による脳中水銀蓄積と中毒症状を抑制する
3. 学会等名 第48回 日本毒性学会学術年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鶴木隆光, 秋山雅博, 新開泰弘, 石井功, 熊谷嘉人
2. 発表標題 メチル水銀曝露による脳中水銀蓄積と中毒症状は活性イオウ分子産生酵素CSEにより抑制される
3. 学会等名 フォーラム2021 衛生薬学・環境トキシコロジー
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鶴木隆光, 秋山雅博, 新開泰弘, 熊谷嘉人, 藤村成剛
2. 発表標題 活性イオウ分子を介した親電子ストレス防御
3. 学会等名 第47回 日本毒性学会学術年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鶴木隆光, 秋山雅博, 熊谷嘉人, 藤村成剛
2. 発表標題 活性イオウ分子の脳内分布とメチル水銀感受性の連関
3. 学会等名 生命金属に関する合同年会2020 (メタルバイオサイエンス研究会2020)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鶴木隆光, 秋山雅博, 熊谷嘉人, 藤村成剛
2. 発表標題 メチル水銀の細胞傷害特異性に対する含イオウ求核低分子の影響
3. 学会等名 第46回日本毒性学会学術年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鶴木隆光, 秋山雅博, 熊谷嘉人, 藤村成剛
2. 発表標題 メチル水銀の細胞傷害特異性に対する活性イオウ分子の影響
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鶴木隆光
2. 発表標題 メチル水銀の細胞傷害特異性に対する活性イオウ分子の影響
3. 学会等名 環境省「重金属等による健康影響に関する総合的研究」メチル水銀研究ミーティング
4. 発表年 2019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
---------	---------