

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 25 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2012～2014

課題番号：24249008

研究課題名(和文)メチル水銀毒性に対する感受性決定機構の解明

研究課題名(英文)Explanation of the mechanism that influence the cell sensitivity to the toxicity of methylmercury

研究代表者

永沼 章(NAGANUMA, AKIRA)

東北大学・薬学研究科(研究院)・教授

研究者番号：80155952

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 34,800,000円

研究成果の概要(和文)：我々はこれまで、細胞内の蛋白質分解システムであるユビキチン・プロテアソームシステム(UPシステム)が酵母のメチル水銀に対する感受性の決定に重要な役割を果たしていることを明らかにしてきた。本研究では、ヒトのUPシステムに関わる酵素群の中で、メチル水銀毒性に影響を与える酵素を検索した。その結果、ユビキチン転移酵素4種、脱ユビキチン酵素10種、ユビキチンリガーゼ8種、F-box蛋白質6種をそれぞれ同定することに成功した。また、UPシステムの基質となる蛋白質の中からメチル水銀毒性の発現に関与する蛋白質を数種同定し、それらの作用機構を部分的に解明した。

研究成果の概要(英文)：We have found that the ubiquitin proteasome (UP) system, which is an intracellular system involved in proteolysis, plays an important role in determination of the sensitivity of yeast cells to methylmercury. In the present study, we searched the enzymes, which affect the methylmercury toxicity, among enzymes involved in the UP system in human cells. As a result, we succeeded in identifying four kinds of ubiquitin transferases, ten kinds of de-ubiquitin enzymes, eight kinds of ubiquitin ligases and six kinds of F-box protein. In addition, we identified several kinds of proteins which participated in expression of the methylmercury toxicity from the proteins which are the substrate of the UP system.

研究分野：分子毒性学

キーワード：メチル水銀 細胞毒性 ユビキチン・プロテアソームシステム 毒性増強機構 毒性軽減機構 培養細胞

## 1. 研究開始当初の背景

我々は、メチル水銀の毒性発現機構を解明するために、メチル水銀毒性の発現に影響を与える蛋白質を遺伝子レベルで網羅的に検索し、Cdc34 がメチル水銀毒性に対する防御因子として機能することを見出した。Cdc34 は細胞内での蛋白質分解に関わるユビキチン・プロテアソームシステム (UP システム) の一員であり、UP システムは基質となる蛋白質にユビキチンを連結させ、このユビキチン鎖をプロテアソームが認識して基質蛋白質を分解する重要な細胞内機構である。我々は分子レベルでの詳細な検討により、細胞内にはメチル水銀毒性を増強させる蛋白質 (X 蛋白質) が存在し、ユビキチン化システムはメチル水銀曝露にตอบสนองしてこの X 蛋白質のユビキチン化を促進することによってプロテアソームでの分解を促し、その結果としてメチル水銀毒性が軽減されることを明らかにした。実際に酵母およびヒト由来培養細胞を用いた研究によって、X 蛋白質をこれまでに複数同定することに成功している。

## 2. 研究の目的

蛋白質のユビキチン化システムはユビキチン活性化酵素 (E1)、ユビキチン転移酵素 (E2) およびユビキチンリガーゼ (E3) の 3 酵素で構成され、それぞれ多くの分子種が存在し、その分子種の組合せによって基質特異性が決まる。そこで本研究では、メチル水銀毒性発現に関わるヒトのユビキチン化システム構成酵素群の分子種をそれぞれ特定し、UP システムによるメチル水銀毒性発現制御機構を総合的に理解するための基礎的データを蓄積する。さらに、X 蛋白質を検索し、それらの作用機構を解析することによって、メチル水銀毒性発現機構解明の糸口を得る。

## 3. 研究の方法

ヒト siRNA ライブラリーまたはヒト cDNA ライブラリーを用い、ノックダウンまたは高発現によって HEK293 細胞のメチル水銀感受性に影響を与える遺伝子群を検索した。

## 4. 研究成果

### (1) メチル水銀毒性発現に関わるユビキチン化システム構成酵素群の分子種同定

メチル水銀感受性決定蛋白質のユビキチン化反応に関わる酵素群分子種を特定するために、発現抑制によってヒト由来 HEK293 細胞のメチル水銀感受性に影響を与える分子種を検索した。

まず、E3 および特定の E3 において基質認識を担う F-box 蛋白質を検索したところ、発現抑制によって細胞にメチル水銀高感受性を与える E3 分子種として HECW2、CDC23、ITCH が、また F-box 蛋白質分子種として FBX038、FBX03、FBX010、FBXW5、FBX017 が同定された。また逆に、発現抑制によって細胞にメチル水銀耐性を与える E3 分子種として BIRC6、HERC1、

LMO7、FBXW11、CDC23 が、F-box 蛋白質分子種として FBX046 がそれぞれ同定された。さらに、E2 および脱ユビキチン化酵素についても同様の検索を行ったところ、発現抑制によって細胞にメチル水銀耐性を与える分子種として、4 種の E2 (UBE2N、UBE2Q1、UBE2I、UBE2J2) および 10 種の脱ユビキチン化酵素 (CYLD、USP33、USP35、USP37、USP28、UCHL1、USP54、USP47、USP34、STAMPB) を同定することに成功した。このように 1 つの現象に関わるユビキチン化反応関連因子を系統的に同定した例は少なく、今後メチル水銀毒性と UP システムとの関係を検討するうえで貴重な情報になると思われる。

### (2) UP システムによって細胞内レベルが調節されており、かつ、発現抑制によって細胞にメチル水銀耐性を与える因子の同定とその作用機構解析

siRNA を用いた検索によって、発現抑制によって細胞にメチル水銀耐性を与える因子として転写因子 HIF1 が同定された。HIF1 によって発現が誘導される下流因子の中で、VEGF の発現抑制が細胞にメチル水銀耐性を与えることが判明し、HIF1 発現抑制細胞では VEGF 発現抑制によるメチル水銀耐性がほとんど認められなかった。また、VEGF mRNA のレベルがメチル水銀処理濃度に依存して上昇し、その上昇は HIF1 の発現抑制によって著しく抑制されることも明らかとなった。

### (3) UP システムによって細胞内レベルが調節されており、かつ、発現抑制によって細胞にメチル水銀高感受性を与える因子の同定とその作用機構解析

#### (3-1) NF B

siRNA を用いた検索によって、発現抑制によって細胞にメチル水銀高感受性を与える因子として転写因子 NF B が同定された。メチル水銀処理によって細胞質中の I B (NF B の核移行抑制因子) レベルが減少し、それに伴い核中の NF B レベルが増加することが判明し、さらに、NF B によって発現誘導される遺伝子のレベルがメチル水銀処理によって上昇することも明らかとなった。

#### (3-2) Hsf1

我々は、ユビキチン化を受けることが報告されている転写因子 Hsf1 の発現抑制が細胞にメチル水銀高感受性を与えることを既に見出している。Hsf1 がメチル水銀によりリン酸化された後に核に移行して HSC70 および HSP90 の発現を誘導してメチル水銀毒性を軽減していることも明らかにしている。この Hsf1 について検討したところ、メチル水銀による Hsf1 のリン酸化に CaMKII が関与しており、メチル水銀が CaMKII を介して HSF1 を活性化することによってメチル水銀毒性

が軽減されることが判明した。

#### (4)UPシステムによって細胞内レベルが調節されており、かつ、高発現によって細胞にメチル水銀耐性を与える因子の同定とその作用機構解析

cDNA ライブラリーを用いた検索によって、高発現によって細胞にメチル水銀耐性を与える因子として PTEN (PI3K/AKT 経路を負に制御する脂質ホスファターゼ) および ODC (ornithine decarboxylase) が同定された。

##### (4-1) PTEN

PTEN の細胞内レベルが UP システムによって調節されていることが知られている。メチル水銀は PTEN の蛋白質レベルを減少させたが、その減少にプロテアソーム活性は必要ではなかった。メチル水銀が PTEN の溶解性に与える影響を 0.1%SDS 可溶性画分と不溶性画分に分けて調べたところ、不溶性画分中の PTEN レベルは可溶性画分中の PTEN レベルの減少に伴って逆に増加した。このことから、メチル水銀による PTEN レベルの減少は、メチル水銀が引き起こす PTEN の不溶性化促進によると考えられる。また、メチル水銀による PTEN の不溶化が認められた際に、AKT の Thr308 リン酸化が亢進されるという興味深い現象が観察された。PTEN の活性部位の Cys を Ala に置換した際にはメチル水銀による PTEN の不溶化が一部抑制されたが、Met への置換はほとんど影響を与えなかった。このことから、メチル水銀が PTEN の活性部位の Cys 残基に直接作用することによってその不溶化を促進しているわけではなく、別の作用によることが判明した。

##### (4-2) ODC

メチル水銀をマウスに皮下投与したところ、大脳および小脳中でプトレシンレベルおよび ODC 酵素活性の増加が認められ、同様の結果が、マウス神経幹細胞由来である C17.2 細胞においても確認された。このメチル水銀によるプトレシンレベルの増加は、ODC 活性阻害剤で細胞を前処理することによってほとんど認められなくなったことから、メチル水銀が ODC 活性を上昇させることによってプトレシンレベルを増加させていることが明らかとなった。ODC は、その活性が合成誘導非依存的にメチル水銀処理によって上昇することが明らかとなり、ODC がメチル水銀曝露に应答して稼働する生体防御因子の 1 つである可能性が示唆された。

#### (5)メチル水銀によって発現誘導される UP システム関連因子の同定とその作用機構解析

メチル水銀によって発現誘導されるユビキチン関連因子を検索し RFPL4A が同定された。検討の結果、RFPL4A の発現抑制が細胞にメチル水銀耐性を与えることが判明した。ま

た、メチル水銀による RFPL4A の発現誘導に転写因子 H0XB13 が関与している可能性が示唆された。

#### (6)メチル水銀毒性発現におけるピルビン酸の関与機構

我々は、ピルビン酸合成に関わる 2 種の酵母蛋白質が UP システムによって分解促進され、かつ、メチル水銀毒性増強作用を示すことを明らかにし、さらに、ミトコンドリア中へのピルビン酸流入の促進がメチル水銀毒性の増強に関わることも見出している。本現象はヒト細胞でも同様に認められることから、ヒト細胞におけるメチル水銀毒性発現機構において重要な役割を果たすものと考えられる。そこで、ヒト由来培養細胞を用いてミトコンドリア中へのピルビン酸流入によるメチル水銀毒性増強機構を検討した。その結果、ピルビン酸によるメチル水銀毒性増強作用が電子伝達系複合体 I または III の siRNA を用いた活性抑制によって有意に軽減されること、さらに、メチル水銀によるカスパーゼ 3 の活性化がピルビン酸の添加によって増強されることが判明し、ピルビン酸がメチル水銀によるミトコンドリア機能障害を促進する可能性が明らかになった。

#### 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12件)

1. Hwang G.W., Murai Y., Takahashi T., Naganuma A.: The protein transportation pathway from Golgi to vacuoles via endosomes plays a role in enhancement of methylmercury toxicity. *Scientific Reports*, 4, 5888 (2014) [査読有り] DOI: 10.1038/srep05888

2. Du K., Takahashi T., Iwai-Shimada M., Miura N., Naganuma A., Hwang G.W.: CDC23 knockdown reinforces methylmercury sensitivity in HEK293 cells. *Fundam. Toxicol. Sci.*, 1, 161-164 (2014) [査読有り] URL: [http://www2.e-kenkyu.com/fts\\_journal/papers/23?number=4&volume=1&year=2014](http://www2.e-kenkyu.com/fts_journal/papers/23?number=4&volume=1&year=2014)

3. Takahashi T., Kim M.S., Saito T., Lee J.Y., Hwang G.W., Naganuma A.: Brain-specific induction of expression of secretoglobin 3A1 in mice treated with methylmercury. *J. Toxicol. Sci.*, 38, 963-965 (2013) [査読有り] DOI: <http://dx.doi.org/10.2131/jts.38.963>

4. Watanabe J., Nakamachi T., Ohtaki H., Naganuma A., Nakajo S.: Low dose of methylmercury (MeHg) exposure induces

caspase mediated-apoptosis in cultured neural

progenitor cells. *J. Toxicol. Sci.*, 38, 931-935 (2013) [ 査読有り ] DOI: <http://dx.doi.org/10.2131/jts.38.931>

5. Kim M.S., Takahashi T., Lee J.Y., Hwang G.W., Naganuma A.: Global chemokine expression in methylmercury-treated mice: methylmercury induces brain-specific induction of expression of CCL3 and CCL4. *J. Toxicol. Sci.*, 38, 925-929 (2013) [ 査読有り ] DOI: <http://dx.doi.org/10.2131/jts.38.925>

6. Nakano R, Takahashi T., Naganuma A., Hwang G.W.: Knockdown of the gene for homeobox protein HOXB13 reduces toxicity of oxidative-stress inducers in HEK293 cells. *J. Toxicol. Sci.*, 38, 821-822 (2013) [ 査読有り ] DOI:<http://dx.doi.org/10.2131/jts.38.821>

7. Hwang G.W., Lee J.Y., Kim M.S., Sato M., Takahashi T., Naganuma A.: Changes in the levels of low molecular weight metabolites in the mouse cerebellum following treatment with methylmercury. *J. Toxicol. Sci.*, 38, 703-706 (2013) [ 査読有り ] DOI: <http://dx.doi.org/10.2131/jts.38.703>

8. Hwang G.W., Mastuyama F., Takahashi T., Lee J.Y., Naganuma A.: Deletion of the ubiquitin-conjugating enzyme Ubc2 confers resistance to methylmercury in budding yeast by promoting Whi2 degradation. *J. Toxicol. Sci.*, 38, 301-303 (2013) [ 査読有り ] DOI: <http://dx.doi.org/10.2131/jts.38.301>

9. Hwang G.W., Naganuma A.: Identification of deubiquitinating enzymes involved in methylmercury toxicity in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Toxicol. Sci.*, 37, 1287-1290 (2012) [ 査読有り ] DOI: [DN/JST.JSTAGE/jts/37.1287](http://dx.doi.org/10.2131/jts.37.1287)

10. Hwang G.W., Naganuma A.: Ubiquitin-conjugating enzyme Cdc34 mediates methylmercury resistance in *Saccharomyces cerevisiae* by increasing Whi2 degradation. *J. Toxicol. Sci.*, 37, 1283-1286 (2012) [ 査読有り ] DOI: [DN/JST.JSTAGE/jts/37.1283](http://dx.doi.org/10.2131/jts.37.1283)

11. Lee J.Y., Naganuma A.: Methylmercury induces a brain-specific increase in chemokine CCL4 expression in mice. *J. Toxicol. Sci.*, 37, 1279-1282 (2012) [ 査

読有り ] DOI: [DN/JST.JSTAGE/jts/37.1279](http://dx.doi.org/10.2131/jts.37.1279)

12. Kim M.S., Naganuma A.: Methylmercury induces CCL2 expression through activation of NF-kappaB in human 1321N1 astrocytes. *J. Toxicol. Sci.*, 37, 1275-1278 (2012) [ 査読有り ] DOI: [DN/JST.JSTAGE/jts/37.1275](http://dx.doi.org/10.2131/jts.37.1275)

[ 学会発表 ] (計 24 件)

1. 佐藤昌幸、黄基旭、永沼章: メチル水銀毒性発現における細胞内ポリアミン代謝系の関与。日本薬学会第 135 年会。2015 年 3 月 26 日 ~ 2015 年 3 月 28 日, 神戸市。

2. 佐藤昌幸、黄基旭、永沼章: ポリアミン合成系によるメチル水銀毒性軽減機構の解析。第 53 回日本薬学会東北支部大会, 2014 年 10 月 5 日, いわき市。

3. Kim M. S., Takahashi T., Lee J. Y., Hwang G.W., Naganuma A.: Brain-specific induction of expression of Ccl4 and Scgb3a1 by methylmercury in mice. 53th Annual Meeting of the Society of Toxicology, 2014 年 3 月 23 日 ~ 2014 年 3 月 26 日, Phoenix (USA) .

4. 金ミンソク、李 辰竜、黄基旭、高橋 勉、永沼章: マウス脳神経由来細胞におけるメチル水銀によるケモカイン CCL4 の発現誘導。第 52 回日本薬学会東北支部大会, 2013 年 10 月 20 日, 仙台市。

5. 仲野 亮、黄基旭、永沼章: TNF- /TNFR3 シグナル伝達系を介したホメオボックス蛋白質 HOXB13 によるメチル水銀毒性増強機構。フォーラム 2013 : 衛生薬学・環境トキシコロジー, 2013 年 9 月 13 日 ~ 2013 年 9 月 14 日, 福岡市。

6. Naganuma A.: Screenings for Proteins that Influence Sensitivity of Cells to Methylmercury. The XIII International Congress of Toxicology, 2013 年 7 月 1 日 ~ 2013 年 7 月 3 日, Seoul (Korea) .

7. Oh S. E., Hwang G.W., Naganuma A.: The function of TEX27 on reduction of methylmercury toxicity. The XIII International Congress of Toxicology, 2013 年 7 月 1 日 ~ 2013 年 7 月 3 日, Seoul (Korea) .

8. Nakano R., Hwang G.W., Naganuma A.: Molecular mechanism by which homeobox protein HOX-B13 augments methylmercury toxicity in HEK293 cells. The XIII International Congress of Toxicology, 2013 年 7 月 1 日 ~ 2013 年 7 月 3 日, Seoul (Korea) .

9. Kim M. S., Lee J. Y., Takahashi T., Hwang G.W., Naganuma A.: Methylmercury Induces a Brain-Specific Increase in Chemokine CCL3 and CCL4 Expression in Mice. The XIII International Congress of Toxicology, 2013年7月1日～2013年7月3日, Seoul (Korea) .

10. 金 ミンソク、齊藤隆寛、高橋 勉、李 辰竜、黄 基旭、永沼 章: メチル水銀によってマウス脳特異的に発現誘導される遺伝子群. 第40回日本毒性学会学術年会, 2013年6月17日～2013年6月19日, 千葉市.

11. 仲野 亮、福澤啓睦、黄 基旭、永沼 章: ホメオボックス蛋白質HOX-B13が示すメチル水銀毒性増強におけるTNF- $\alpha$  の役割. 第40回日本毒性学会学術年会, 2013年6月17日～2013年6月19日, 千葉市.

〔図書〕(計2件)

1. 永沼 章、黄 基旭(分担執筆): 毒性の科学, 東京大学出版会, 2014. 総頁数 200.

2. 黄 基旭、永沼 章(分担執筆): 魚食と健康 メチル水銀の生物影響, 恒星社厚生閣, 2014. 総頁数 151.

〔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

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

### (2)研究分担者

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  
高橋 勉 (TAKAHASHI TSUTOMU)  
東北大学・大学院薬学研究科・助教  
研究者番号: 50186376