

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：32607

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15381

研究課題名(和文)新奇メチル水銀選択的阻害薬によるメチル水銀細胞傷害性分子標的の解析

研究課題名(英文) Analysis of molecular targets of methylmercurial inhibitors

研究代表者

清野 正子 (KIYONO, MASAKO)

北里大学・薬学部・教授

研究者番号：30239842

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：メチル水銀(MeHg)は、脳神経系を障害する環境汚染物質である。本研究は抗MeHg剤としてのオレアノール酸3-グルコシド(OA3Glu)の分子標的の同定及びその機能解析を目的とした。MeHgは、ヒト腸管上皮細胞(Caco-2細胞)において、アミノ酸トランスポーターであるlat1とlat2の両発現を誘導したが、OA3Gluは、lat1のみを誘導した。一方、OA3GluとMeHgの同時処理では、lat1の発現が増強した。本研究により、OA3Gluの分子標的はLAT1であり、LAT1を介したシステムにより細胞内のMeHgが減少し、その結果として抗メチル水銀活性を発揮している可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：Methylmercury (MeHg) is known as environmental toxicant and induces neurotoxicity. We recently found oleanolic acid 3-glucoside (OA3Glu) suppresses MeHg toxicity in vitro and in vivo. The aim of this study was to evaluate the role of large amino acid transporters (LAT1 and LAT2) in Caco-2 cells. We found that exposure to MeHg induced lat1 and lat2. In addition, OA3Glu exposure induced lat1 but not lat2. These results are suggesting that OA3Glu has the potential to induce LAT1 and reduces intracellular MeHg through the LAT1 system.

研究分野：公衆衛生学

キーワード：メチル水銀 オレアノール酸3-グルコシド LAT

1. 研究開始当初の背景

メチル水銀 (MeHg) は水俣病の原因物質であり、毒性の主な標的器官は脳神経系である。現在、水俣病にみられるような高濃度ばく露は国内においては無いが、水銀は火山活動・地殻ガス・化石燃料の燃焼などにより絶えず地球環境を循環しており、海・河川・大気に放出された水銀は、海洋微生物によりメチル化されて MeHg となる。MeHg は食物連鎖を介した生物濃縮により、マグロ等の大型魚に蓄積する。我々はこれらの魚食により、低濃度ながらも継続的に MeHg にばく露されている。MeHg は小腸から吸収され、全身の臓器に分布する。特に脳神経系や胎児への影響が顕著であり、重篤な障害をもたらすことが知られている。

低濃度の MeHg による組織及び細胞への影響はほとんど解明されておらず、その分子メカニズムも不明な点が多い。また、グルタチオンや抗酸化物質等が MeHg 毒性を軽減することが知られているが、予防的観点からの抗 MeHg 薬については知られていない。

2. 研究の目的

オレアノール酸 3-グルコシド(OA3Glu) は、生薬に含まれるオレアナン系サポニンの一つである。サポニンは、トリテルペンまたはステロイド配糖体を基本骨格とし、様々な生理活性を持つ。しかし未だ多くのサポニンの生理活性の本体構造が未同定あるいは既知構造体の活性が不明である。我々は、オレアノール酸を骨格とする配糖体を複数合成し、既知物質と共に生理活性を検討してきた。その結果、ヒト腸管上皮細胞 (Caco-2 細胞) を用いた *in vitro* 実験により、OA3Glu が MeHg の細胞死抑制作用を示すことを抑制することを見出している。また、*in vivo* において OA3Glu 処理群では、MeHg 投与群で起こる運動機能障害、毒性発現を軽減する作用を有する結果を得ている。また、OA3Glu 処理群では、MeHg 投与による脳・肝臓・腎臓への蓄積が低下することを見出した。そこで本研究では、MeHg の取り込みや排出を担うことが示唆されているアミノ酸トランスポーター Large amino acid transporter (LAT) LAT1/LAT2 や薬物トランスポーターファミリー-ABC に注目し、OA3Glu の分子標的を解析すること、MeHg の細胞内新規分子標的の同定及びその機能解析を目的とした。

3. 研究の方法

(1) LAT を介したメチル水銀の取り込み及び OA3Glu の評価: Caco-2 細胞によるメチル水銀に対する細胞毒性評価系 (MTT 法) により、MeHg による細胞死と OA3Glu の毒性軽減効果について評価した。また、内在性の LAT を siRNA によりノックダウンさせ、放射標識したメチル水銀の細胞内取り込みを評価した。

(2) メチル水銀の神経系細胞におけるアミノ酸トランスポーター-LATs や薬物トランスポーターファミリー-ABCs に対する解析: ヒト神経芽細胞である SH-SY5Y 細胞を用いてメチル水銀及び OA3Glu 処理による薬物トランスポーターファミリー-ABCs、LAT1/LAT2 の発現をリアルタイム qPCR 法により解析した。さらに、OA3Glu の類似化合物による、上記トランスポーター分子群への影響を評価した。

4. 研究成果

(1) LAT を介したメチル水銀の取り込み及び OA3Glu の評価:

ヒトにおける MeHg の取り込みは主に小腸の細胞を介して行われる。そこで、Caco-2 細胞を用いて、LAT を介した MeHg の取り込み活性について検討した。ウエスタンブロット法及びリアルタイム qPCR 法による発現解析の結果、Caco-2 細胞の LAT の発現は LAT1 が主であったため、内在性の LAT1 を siRNA により発現抑制し、MeHg の細胞内取り込みを検討した。LAT1 siRNA 処理後、放射標識した MeHg を添加し、24 時間後の細胞内放射活性を評価した。その結果、LAT1 siRNA 群ではコントロール細胞群と比較して有意に細胞内の放射活性が減少した。次に、OA3Glu を前処理し、MeHg の取り込みに対する OA3Glu の影響を調べたところ、OA3Glu の濃度依存的に MeHg の細胞内の放射活性が減少した。すなわち、MeHg が LAT1 を介して取り込みあるいは排出を行っていることが示唆された。さらに、OA3Glu の MeHg の取り込み阻害あるいは MeHg の排出促進活性が示唆された。

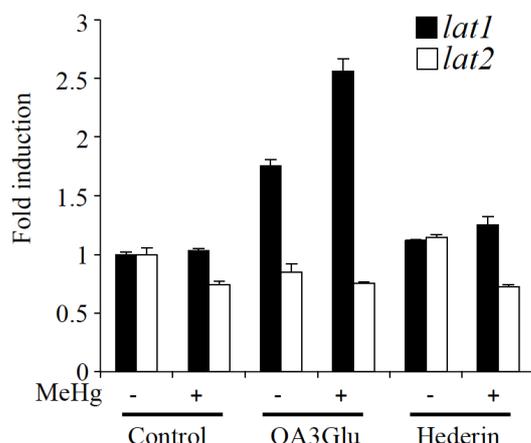
(2) メチル水銀の神経系細胞におけるアミノ酸トランスポーター-LAT1/LAT2 や薬物トランスポーターファミリー-ABC に対する解析:

ヒト神経芽細胞株である SH-SY5Y に MeHg を処理し、リアルタイム-qPCR によりアミノ酸トランスポーター-LAT の発現誘導の比較解析を行った。その結果、*lat1* が MeHg 処理後 6 時間に発現が誘導され、*lat2* は 9 時間をピークに発現が誘導された。

さらに、MeHg と OA3Glu を同時に処理すると、LAT1 の発現誘導が増強した。OA3Glu の類似化合物である hederin (オレアノール酸の 3 位に糖鎖が 2 つ結合) 処理では *lat1* の発現誘導が認められなかった。一方、*lat2* の発現は、OA3Glu、hederin の処理により影響がなかった (図 1)。このことから、OA3Glu は *lat1* の発現誘導作用を有していること、MeHg による *lat1* の発現誘導増強作用を有していることが示唆された。また、この *lat1* の発現誘導作用はステロイド配糖体を基本骨格とし、単糖が 3 位に結合していることが重要であることが示唆された。

図 1

続いて、SH-SY5Y に MeHg を処理し、



薬物トランスポーターファミリーABC 群の発現を解析した。Multidrug-resistance related protein (MRP)のうち、*mrp2* が MeHg 処理後 6 時間に発現が誘導され、*lat1* の発現誘導パターンと類似していた。さらに *mrp3* は MeHg 処理後 24 時間に発現が最も誘導された。一方、*mrp1* 及び *mrp4* はほとんど影響を示さなかった。この結果から、LAT だけでなく一部の MRP 分子が MeHg ばく露に対し、発現誘導することが明らかとなった。これらの分子の発現を介し MeHg の細胞外への排出がなされている可能性が考えられた。

以上のように、本研究から MeHg ばく露により LAT が発現誘導することが明らかになった。また、LAT が、MeHg の取り込みあるいは細胞内の MeHg の排出に重要な役割を果たしていることが示唆された。OA3Glu の直接的な標的を明らかにすることは出来なかったが、OA3Glu 処理により *lat1* の発現が誘導されることを見出した。また、MeHg と OA3Glu の同時ばく露により相乗的に *lat1* の発現が増加することが示された。これらの研究成果は、OA3Glu の分子標的の解明と低濃度 MeHg の解毒薬・予防薬の展開のための分子基盤になることが期待される。

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) Y. Takanezawa, R. Nakamura, R. Harada, Y. Sone, S. Uraguchi, K. Kobayashi, H. Tomoda, M. Kiyono. Atg5-dependent autophagy plays a protective role against methylmercury-induced cytotoxicity. 査読有
Toxicol. Lett. 2016, 262, 135-141.
- 2) Y. Takanezawa, R. Nakamura, R. Harada, Y.

Sone, S. Uraguchi, K. Kobayashi, H. Tomoda, M. Kiyono.

Variation in the activity of distinct cytochalasins as autophagy inhibitors in human lung A549 cells.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 2017, 494, 641-647. 査読有

- 3) Y. Takanezawa, R. Nakamura, R. Harada, Y. Sone, S. Uraguchi, M. Kiyono.

Sequestosome1/p62 protects mouse embryonic fibroblasts against low-dose methylmercury-induced cytotoxicity and is involved in clearance of ubiquitinated proteins. 査読有

Scientific reports, 2017, 7, 16735-16746.

- 4) Y. Takanezawa, R. Nakamura, R. Harada, Y. Sone, S. Uraguchi, K. Kobayashi, H. Tomoda, M. Kiyono.

Cytochalasin E increased the sensitivity of human lung cancer A549 cells to bortezomib via inhibition of autophagy.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 2018, 498, 603-608. 査読有

[学会発表](計 12 件)

- 1) 中村亮介、高根沢 康一、曾根有香、浦口 晋平、白畑辰弥、小林義典、清野正子、メチル水銀の神経毒性に対するオレアノール酸 3-グルコシドの効果、衛生薬学・環境トキシコロジー、2016.9.11、昭和大学旗の台キャンパス(東京)
- 2) 高根沢 康一、中村亮介、曾根有香、浦口 晋平、清野正子、Atg5 依存的オートファジーによるメチル水銀毒性防御、衛生薬学・環境トキシコロジー、2016.9.10、昭和大学旗の台キャンパス(東京)
- 3) 高根沢 康一、中村亮介、曾根有香、浦口 晋平、清野正子、メチル水銀によるオートファジーの活性化と p62 の誘導、日本生化学会、2017.9.26、仙台国際センター(仙台)
- 4) Y. Takanezawa, R. Nakamura, Y. Sone, S. Uraguchi, M. Kiyono. The role of autophagy against methylmercury toxicity, NIMD Forum 2016, 2016.12.6、国立水俣病総合研究センター、(水俣)
- 5) 中村亮介、高根沢 康一、曾根有香、浦口 晋平、白畑辰弥、岩井孝志、小林義典、田辺光男、清野正子、メチル水銀による神経障害に対する OA3Glu の効果、日本薬学会、2017.3.27、仙台国際センター(仙台)
- 6) 高根沢 康一、中村亮介、曾根有香、浦口 晋平、清野正子、メチル水銀の毒性に対する Atg5 依存的オートファジーによる防御機構、日本薬学会、2017.3.27、仙台国際センター(仙台)
- 7) 高根沢 康一、中村亮介、曾根有香、浦口 晋平、清野正子、メチル水銀毒性防御としてのオートファジー、日本毒性学会学

- 術年会、2017.7.11、パシフィコ横浜（横浜）
- 8) 高根沢 康一、原田遼平、中村亮介、曾根有香、浦口晋平、清野正子、メチル水銀毒による MAP キナーゼの活性化とオートファジー誘導、生命科学系学会合同年次大会、2017.12.8、神戸ポートアイランド（神戸）
 - 9) 原田遼平、高根沢 康一、中村亮介、曾根有香、浦口晋平、清野正子、メチル水銀によるユビキチン結合蛋白質 p62 の発現誘導と防御機構の解析、生命科学系学会合同年次大会、2017.12.8、神戸ポートアイランド（神戸）
 - 10) Y. Takanezawa, R. Nakamura, Y. Sone, S. Uraguchi, M. Kiyono, Autophagy and sequestosome1/p62 play a protective role against low-dose methylmercury-induced cytotoxicity、Society of Toxicology、2018.3.12、San Antonio、(USA)
 - 11) 中村亮介、高根沢 康一、曾根有香、浦口晋平、白畑辰弥、小林義典、清野正子、オレアノール酸サポニン誘導体による抗メチル水銀活性の評価、日本薬学会、2018.3.26、石川県立音楽堂、(金沢)
 - 12) 高根沢 康一、原田遼平、中村亮介、曾根有香、浦口晋平、清野正子、低濃度メチル水銀毒性制御における Sequestosome1/p62 の役割とユビキチン化タンパク質クリアランス、日本薬学会、2018.3.26、石川県立音楽堂、(金沢)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 1 件)

特許第 6 3 2 3 9 0 0 号 発明の名称：抗水銀剤 特許権者：東京都港区白金 5 丁目 9 番 1 号 学校法人北里研究所 発明者：清野正子、小林義典、白畑辰弥、中村亮介 出願番号：特願 2 0 1 4 - 0 0 7 2 2 6 出願日：平成 2 6 年 1 月 1 7 日 登録日：平成 3 0 年 4 月 2 0 日

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.pharm.kitasato-u.ac.jp/kouei/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

清野 正子 (Kiyono, Masako)

北里大学・薬学系研究科・教授

研究者番号：3 0 2 3 9 8 4 2