

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年4月20日現在

機関番号：11301

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  
の解明する研究研究課題名（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

研究成果の概要（和文）：

遺伝子レベルでの検索を行い、細胞内でユビキチン化を受け、かつ、メチル水銀毒性を増強または軽減する酵母およびヒトの蛋白質をそれぞれ数種ずつ同定することに成功した。それら蛋白質の作用機構およびユビキチン・プロテアソームシステムによる分解調節機構についても、これまで知られていなかった多くの新事実が判明し、細胞内では多くの因子が複雑に関係した機構によってメチル水銀毒性が決定されていることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

In the present study, we successfully identified several proteins which ubiquitinated in cells and have enhancing or reducing effects against methylmercury toxicity. We also found many new facts which had not been known until now by experiments examining both mechanisms of action of these proteins and the regulation mechanisms of decomposition of these proteins by ubiquitin proteasome system. From these results, it was suggested that methylmercury toxicity is determined by the mechanism intricately related to many factors within the cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	18,000,000	5,400,000	23,400,000
2008年度	16,600,000	4,980,000	21,580,000
2009年度	16,600,000	4,980,000	21,580,000
2010年度	16,600,000	4,980,000	21,580,000
2011年度	16,600,000	4,980,000	21,580,000
総計	84,400,000	25,320,000	109,720,000

研究分野：複合新領域

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. 研究開始当初の背景

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。

## 2. 研究の目的

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。

## 3. 研究の方法

主として酵母を用いて研究を行う。酵母は取扱が容易で、遺伝子の導入や欠損が確実にできることから、有用な真核生物モデルである。また、一部の検討にはヒト由来細胞を用いる。

## 4. 研究成果

(1) UP システムによって分解が促進される「メチル水銀毒性増強蛋白質」および「メチル水銀毒性軽減蛋白質」の同定

### 1. 酵母蛋白質の検索・同定

遺伝子欠損酵母ライブラリーを用いたスクリーニングにより、欠損によって酵母のメチル水銀感受性に影響を与える遺伝子を約60種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メチル水銀毒性増強蛋白質として Dld3, Grs1, Eno2, Whi2, Hom3, Rps3 を、また、ユビキチン化を受けるメチル水銀毒性軽減蛋白質として Png1, Sis1 を見出すことができた。

### 2. ヒト蛋白質の検索・同定

siRNA によるノックダウンによってメチル水銀毒性に影響を与える遺伝子として、UP システムに関与する遺伝子である BIRC6, CDC23, USP30, USP35, USP45, USP15, TEX27 が、また、それ以外の機構に関与する遺伝子として HOXB13, NPAS2, CRSP3, HSF1, STAT5B, NEUROD6, RELA (以上は転写因子) および MRAP2, PRKAA1, PIGB が同定された。これらは全て、メチル水銀毒性に関与することが初めて明らかになった遺伝子である。なお、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 (後述)、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も明らかとなった。

(2) UP システムにより分解が促進される「メチル水銀毒性増強蛋白質」の作用機構

### 1. ピルビン酸合成とメチル水銀毒性

Dld3 および Eno2 はピルビン酸合成に関わる酵素である。培地中へのピルビン酸の添加 (無毒性濃度) が酵母およびヒト細胞のメチル

ル水銀感受性を顕著に増強させ、これがミトコンドリアへのピルビン酸の取り込み量の増加に起因すること、また、酵母ではメチル水銀がトランスポーターの発現を誘導してミトコンドリア中へのピルビン酸の取り込みを促進させることが判明し、この現象がメチル水銀毒性発現機構の一部である可能性が示された。また、ピルビン酸はミトコンドリア中で代謝されることなくメチル水銀毒性を増強することが明らかとなった。電子伝達系やその他のミトコンドリア機能に関わる因子の中では Rip1 のみがメチル水銀毒性に影響を与えた。Rip1 は欠損によりメチル水銀毒性を増強するが、これがメチル水銀による活性酸素産生の亢進に起因することが示唆された。

### 2. パルミチン酸転移酵素とメチル水銀毒性

Whi2 はパルミチン酸転移酵素 Akr1 の作用 (メチル水銀毒性を軽減する作用) を抑制することによってメチル水銀毒性増強作用を示す。Whi2 は Akr1 と結合することで Akr1 の活性を抑制しており、Whi2 を基質とするユビキチン転移酵素 Cdc34 の高発現は Whi2 の分解を促進させることによって遊離の Akr1 を増加させ Akr1 のパルミチン酸転移活性を上昇させることが明らかとなった。また、メチル水銀毒性軽減作用を有する Akr1 基質蛋白質として Meh1 と Yck1 が同定された。

(3) UP システムにより分解が促進される「メチル水銀毒性軽減蛋白質」の作用機構

### 1. 脱 N-グリコシル化酵素 Png1 とメチル水銀毒性

メチル水銀毒性を軽減し、かつ、ユビキチン・プロテアソームシステムによって分解される酵母蛋白質として同定された脱 N-グリコシル化酵素 Png1 は小胞体での蛋白質分解に関与することが知られている。この Png1 がメチル水銀によって誘発される小胞体ストレスを抑制することによってメチル水銀毒性を軽減していることが示唆された。

### 2. Type II HSP40 co-chaperone である Sis1 とメチル水銀毒性

メチル水銀毒性を軽減し、かつ、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 Sis1 が同定された。リニアポリユビキチン Ubi4 が単体のユビキチンにプロセシングされることなくリニアポリユビキチンとして Sis1 のユビキチン化に関与することが示唆された。プロセシングを受けていない Ubi4 のレベルが増加すると酵母の増殖が抑制され、リニアポリユビキチン蛋白質としての Ubi4 のレベルがメチル水銀濃度依存的に増加することも判明し、メチル水銀毒性の発現に Ubi4 レベルの上昇が関与する可能性

が示唆された。また、ヒトのリニアポリユビキチンである UBB および UBC の発現抑制がそれぞれ細胞に高いメチル水銀耐性を与えることが明らかとなった。さらに、機能未知蛋白質 TEX27 の発現抑制も細胞に高いメチル水銀感受性を与えることが判明し、TEX27 が UBB または UBC と同一の経路でメチル水銀毒性の軽減に関与している可能性が示唆された。TEX27 はその構造中に Zn-finger ドメインを有しているが、メチル水銀処理によって TEX27 が核へ移行することが明らかとなったことから TEX27 は核中でメチル水銀毒性軽減に関与していると考えられる。

#### (4) 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群の分子種の特定

##### 1. ユビキチン転移酵素 (E2) 分子種の特定

酵母が有する 13 種の E2 分子種のうち Ubc1, Cdc34, Ubc4, Ubc5, Ubc11 の 5 種 (A グループ) の高発現および Ubc2, Ubc13 (B グループ) の欠損がそれぞれ酵母にメチル水銀耐性を与えることが判明した。A グループの E2 は Whi2 の細胞内レベルを低下させ、B グループの E2 は逆に上昇させることが判明し、B グループが A グループの機能を負に制御することによってメチル水銀毒性を増強することが示唆された。

メチル水銀毒性の増強に関わることが判明した Ubc2 の基質蛋白質を検索したところ、メチル水銀毒性を増強させる蛋白質として既に我々が同定している Dld3 が見付き、Dld3 の細胞内レベルが Ubc2 の欠損によって低下することが判明した。

##### 2. F-box 蛋白質分子種の特定

ユビキチンリガーゼ (E3) SCF 複合体中で基質認識を担う F-box 蛋白質 (17 種の分子種が存在) の分子種を検索したところ、Hrt3, Ylr224w, Ymr258c がメチル水銀毒性を軽減することが判明した。また、Hrt3 はメチル水銀毒性増強蛋白質である Grs1, Dld3 を、Ylr224w は同じく Eno2 を基質とすることも明らかとなった。

##### 3. 脱ユビキチン化酵素の特定

酵母の脱ユビキチン化酵素の分子種の中で、Ubp2, Ubp4, Ubp6 および Ubp14 がメチル水銀毒性増強作用を示し、Ubp7, Ubp13 および Ubp15 がメチル水銀毒性軽減作用を示すことが明らかになった。一方、タンデムユビキチンである Ubi4 がエンドソームを介した液胞への蛋白質輸送を亢進することによってメチル水銀毒性増強作用を示すことも判明した。Ubp7, Ubp13 および Ubp15 は共にこの Ubi4 のモノユビキチンへのプロセッシングを亢進することによって蛋白質の液胞への輸送系を負に制御することによってメチル水

銀毒性を軽減し、Ubp6 はプロテアソーム上で機能してユビキチン化された Whi2 (我々が見出したメチル水銀毒性増強蛋白質) 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になった。さらに、ユビキチン化 Whi2 はシャトル蛋白質 Rad23 によってプロテアソームへ運搬され、Rpn10 (ポリユビキチン鎖レセプター) に認識された後に分解されことも判明し、Ubp6 はプロテアソームに運搬されてきたユビキチン化 Whi2 からユビキチンを解離させることによって Whi2 の Rpn10 を介したプロテアソームによる分解を負に制御していることが示唆された。

ヒトの脱ユビキチン化酵素についても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高感受性を与える脱ユビキチン化酵素として USP15, USP45 が、また逆にメチル水銀耐性を与える脱ユビキチン化酵素として USP30, USP35 が同定された。USP45 によって脱ユビキチン化される蛋白質の中でグルタミン合成酵素 GLUL の発現を抑制すると細胞がメチル水銀高感受性を示すことが判明し、GLUL 阻害剤がメチル水銀毒性を顕著に増強させ、その効果が USP45 発現抑制細胞では減弱することも明らかとなった。また、無毒性濃度のグルタミン酸 (GLUL の基質) の培地への添加がメチル水銀毒性を増強させることも確認され、USP45 が GLUL の分解を抑制してグルタミン酸のグルタミンへの変換を促進させる (グルタミン酸濃度を低下させる) ことによってメチル水銀毒性を軽減している可能性が示唆された。

##### 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 15 件)

1. Hwang, G. W., Ryoke, K., Lee, J. Y., Takahashi, T. and Naganuma, A.: siRNA-mediated silencing of the gene for heat shock transcription factor 1 causes hypersensitivity to methylmercury in HEK293 cells. *J. Toxicol. Sci.*, 査読有, 36:851-853 (2011). <http://dx.doi.org/10.2131/jts.36.851>
2. Hwang, G. W., Du, K., Takahashi, T. and Naganuma, A.: Inhibition of F-box protein FBXO6 gene expression by RNA interference enhances cadmium toxicity in HEK293 cells. *J. Toxicol. Sci.*, 査読有, 36:847-849 (2011). <http://dx.doi.org/10.2131/jts.36.847>
3. Hwang, G. W., Tobita, M., Takahashi, T. Kuge, S., Kita, K. and Naganuma, A.: siRNA-mediated AMPK $\alpha$ 1 subunit gene PRKAA1 silencing enhances methylmercury toxicity in HEK293 cells. *J. Toxicol. Sci.*, 査読

- 有, 35:601-604(2010).  
<http://dx.doi.org/10.2131/jts.35.601>
4. 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.*, 査読有, 34:715-717 (2009).  
<http://dx.doi.org/10.2131/jts.34.715>
  5. 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.*, 査読有, 34:413-416 (2009).  
<http://dx.doi.org/10.2131/jts.34.413>
  6. Watanabe, J., Nakamachi, T., Ogawa, T., Naganuma, A., Nakamura, M., Shioda, S. and Nakajo, S.: Characterization of antioxidant protection of cultured neural progenitor cells (NPC) against methylmercury (MeHg) toxicity. *J. Toxicol. Sci.*, 査読有, 34, 315-325 (2009).  
<http://dx.doi.org/10.2131/jts.34.315>
  7. Hwang, G. W., Sasaki, K., Takahashi, T., Yamamoto, R. and Naganuma, A.: Overexpression of Ycg1 or Ydr520c confers resistance to cadmium in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Toxicol. Sci.*, 査読有, 34, 441-443 (2009).  
<http://dx.doi.org/10.2131/jts.34.441>
  8. Hwang, G. W., Hayashi, T., Kita, K., Takahashi, T., Kuge, S. and Naganuma, A.: siRNA-mediated inhibition of phosphatidylinositol glycan class B (PIGB) confers resistance to methylmercury in HEK293 cells. *J. Toxicol. Sci.*, 査読有, 32, 581-583 (2007).  
<http://dx.doi.org/10.2131/jts.32.581>

[学会発表] (計 68 件)

1. 石川円華、黄 基旭、永沼 章、新規メチル水銀毒性増強機構としての細胞内蛋白質輸送系の役割、第 50 回日本薬学会東北支部大会、2011 年 10 月 30 日、仙台
2. 李 辰竜、黄 基旭、永沼 章、メチル水銀によるミトコンドリア機能障害に対するピルビン酸の増強作用、フォーラム 2011：衛生薬学・環境トキシコロジー、2011 年 10 月 27 日、金沢
3. 領家克典、黄 基旭、永沼 章、熱ショック転写因子 HSF1 が示すメチル水銀毒性軽減機構の解析、第 10 回次世代を担う若手フューチャーマ・バイオフィォーラム 2011、2011 年 10 月 8 日、仙台
4. 永沼 章、薬毒物に対する生体内防御機構に関する研究、第 38 回日本トキシコロジー学会、2011 年 7 月 11 日、横浜
5. 呉 成恩、黄 基旭、永沼 章、機能未知蛋白質 TEX27 が示すメチル水銀毒性軽減作

- 用の機構、第 38 回日本トキシコロジー学会、2011 年 7 月 11 日、横浜
6. 黄 基旭、メチル水銀毒性発現における細胞内小胞輸送の役割、第 6 回トランスポーター研究会年会、2011 年 6 月 11 日、仙台
  7. 呉 成恩、黄 基旭、永沼 章、新規メチル水銀毒性軽減因子 TEX27 の機能解析、フォーラム 2010；衛生薬学・環境トキシコロジー、2010 年 9 月 9 日、東京
  8. 伊藤 悠一、黄 基旭、疋田晃典、永沼 章、パルミチン酸転移酵素 Akr1 によるメチル水銀毒性軽減における Meh1 の関与、フォーラム 2010；衛生薬学・環境トキシコロジー、2010 年 9 月 9 日、東京
  9. Hwang, G. W., and Naganuma, A., Overexpression of Rad23 confers resistance to methylmercury in yeast cells via inhibition of degradation of Png, XII International Congress of Toxicology, 2010 年 7 月 22 日、Barcelona (Spain)
  10. 黄 基旭、蛋白質の翻訳後修飾によるメチル水銀感受性の決定、平成 22 年度日本薬学会東北支部学術講演会、2010 年 7 月 10 日、仙台

[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

久下 周佐 (KUGE SHUSUKE)  
 東北大学・大学院薬学研究科・准教授  
 研究者番号：50186376

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