

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：87401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06572

研究課題名（和文）メチル水銀によるレドックス制御因子の変動を起点とした神経機能変化の素過程解明

研究課題名（英文）Neuronal cell function changes associated with methylmercury-induced variations in redox regulatory factors

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） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：MeHg毒性の一端は細胞中タンパク質のチオール基への付加修飾と考えられている。一方で近年、タンパク質のチオール基の超硫黄化によるタンパク質機能制御が報告されている。しかしながら、MeHg曝露によるタンパク質の超硫黄化変動の詳細は明らかでない。そこで神経細胞においてメチル水銀曝露依存的なタンパク質の超硫黄化変動を解析した結果、超硫黄化が減少する種々の候補タンパク質が見出された。本結果は、MeHgにより特異的なタンパク質が脱超硫黄化することを示唆し、当該タンパク質の機能変化とMeHg毒性の関連についてさらなる解析が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我が国はメチル水銀（MeHg）による公害として水俣病を経験し、多大な爪痕を残した。現代も環境中で微生物の活動により産生されるMeHgが生物濃縮を介し魚介類へ蓄積される。人々は日常的にこれを摂取するため、MeHgによる健康影響は世界的な懸念事項であり、その毒性機序の解明は重要な研究課題である。MeHgによる生体影響の引き金となる機序の解明を目指して、MeHg曝露神経細胞中のタンパク質における超硫黄化の変動を解析した。その結果、本実験条件下において特異的なタンパク質の超硫黄化が減少した。この変動がもたらす細胞機能変化を探索することはMeHg毒性機序の理解につながると期待される。

研究成果の概要（英文）：The toxicity of methylmercury (MeHg) is believed to involve the modification of thiol groups in cellular proteins. Recent studies suggest that the supersulfidation of protein thiol groups has an aspect of protein function regulator. However, the exact effects of MeHg exposure on protein supersulfidation are poorly understood. We examined the alterations in protein supersulfidation in neurons following exposure to MeHg and identified several proteins that exhibited reduced supersulfidation. This indicates that specific proteins may be reduced in supersulfidation by MeHg in neurons. Further study is required to understand the impact of these changes on MeHg toxicity.

研究分野：毒性学

キーワード：メチル水銀 超硫黄分子 レドックスバイオロジー

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、多大な爪痕を残した。現代においても産業・自然活動由来の水銀が環境中で微生物の活動により MeHg へと変換され、生物濃縮を介し魚介類へ蓄積される。人々は日常的にこれを摂取するため、MeHg による健康影響は世界的な懸念事項であり、その毒性機序の解明は重要な研究課題である。

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。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) は抱合体形成により細胞外排出を促進する。また、硫化水素 (生理的条件下で多くは 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を介しシステインへ過剰なイオウ原子がサルフェン硫黄として挿入されたシステインパルスルフィド (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の機能が示唆される (Abiko et al. Chem Res Toxicol 2015)。実際に我々は MeHg 毒性防御への RSS の重要性を個体レベルで明らかとした。

一方でこれら RSS 中のサルフェン硫黄は他のイオウ原子に可逆的に結合する特性を有し、それ故にタンパク質のシステイン残基への転移によって当該部位を超硫黄化することが明らかとなった。さらに驚くべきことに、タンパク質翻訳時に超硫黄化が行われる機序も発見された (Akaike et al. Nat Commun 2017)。このサルフェン硫黄を介した超硫黄化による修飾形態が有する生理的意義は未解明な点が多いが、過酸化や MeHg 付加を防ぐ可逆性担保機構としての重要性が示され (Dóka et al. Sci Adv 2020, Abiko et al. Chem Res Toxicol 2015)、MeHg 毒性との関連も明らかにされ始めている (Nishimura et al. Sci Signal 2019)。

2. 研究の目的

申請者は若手研究課題 (JP19K16368) において、MeHg 曝露は脳内 RSS を減少させることを明らかとした。これは脳内レドックスバランス維持のために RSS が消費され、過剰な RSS の減少に至ると MeHg 毒性が生じることを示唆している。RSS 中のサルフェン硫黄は易転移しタンパク質を超硫黄化することが明らかとされてきた。予備検討により、脳試料高分子画分からタンパク質超硫黄化由来のサルフェン硫黄が検出された。また、脳試料を RSS モデル化合物と混合すると、広範な分子量に渡り脳タンパク質の超硫黄化が見られ、これらは MeHg 等親電子物質により量変動する。このことは MeHg 曝露による RSS 消費が脳タンパク質の超硫黄化量を減少させることを示しており、タンパク質の機能変動が MeHg 毒性へと至るのではないかと着想した。本研究の目的は、(1)サルフェン硫黄による超硫黄化修飾を介したタンパク質のレドックス制御に着目し、被修飾分子を同定する。(2)さらにメチル水銀曝露による当該分子の修飾状態の変遷を機能変動と共に明らかとし、(3)下流分子そして細胞機能に与える変動を解明することで、MeHg 曝露影響の起点 (フロントエンド) から終点 (バックエンド) に至る素過程を立証することである。したがって本研究は、ケミカルバイオロジーに立脚した解析手法を駆使し、サルフェン硫黄を介したタンパク質のレドックス制御の生理的意義を、神経細胞における MeHg 毒性機序において詳細に解き明かし、MeHg 毒性の統合的理解に資すると共に近年急速に発展するイオウ生物学に貢献する。

3. 研究の方法

超硫黄分子の検出法が様々に生み出されており、タンパク質の超硫黄化に関してはヨードアセトアミドによるチオール基(超硫黄化されたものを含む)のアルキル化を用いた検出系が報告されている。生体試料中のタンパク質をビオチン標識ヨードアセトアミドとアビジンビーズを用いたプルダウンの後、還元剤処理によって超硫黄化タンパク質を単離するにあたり、実験系の最適化を行った。ラット由来血漿、ヒト由来培養細胞、ラット胎児大脳皮質由来初代培養神経細胞を試料として高分子画分を分取後、試験管内または培養液中への RSS モデル化合物または MeHg 曝露を行い、上記方法によりタンパク質超硫黄化の変化を解析した。また、ラット胎児大脳皮質由来初代培養神経細胞を試料とし、上記方法と DIA プロテオミクスまたは生化学的を組み合わせ、超硫黄化タンパク質の同定と MeHg 曝露による超硫黄化変動を解析した。

4. 研究成果

はじめに超硫酸化タンパク質の定性・定量解析の要となるゲルシフトアッセイとプルダウンアッセイの条件検討を行った。本解析系を用い検出されるラット血漿中アルブミンの超硫酸化は、RSS モデル化合物処理により増強された。また、RSS モデル化合物で処理したラット脳試料を MeHg 等種々の親電子物質で処理すると、電気泳動度に変化を示す複数のタンパク質が検出された。これらは RSS からタンパク質のシステイン残基へと転移したサルフェン硫黄が MeHg により奪取されることを示唆する。プルダウンアッセイ系においては、ビオチン標識アルキル化剤を介して還元型チオール基および超硫酸化を受けたチオール基を有するいずれのタンパク質もアビジンビーズへとプルダウンされる。その後、還元剤処理 (DTT) により超硫酸化タンパク質を溶出させる (溶出されたタンパク質は還元型チオール基を有した状態となる)。用いるアビジンビーズは、一部の先行研究において超常磁性酸化鉄高分子ポリマー製のストレプトアビジンビーズが用いられている。しかしながら、本ビーズを用いた際には還元剤処理により上清中にストレプトアビジンが溶出した。これは結果として超硫酸化タンパク質の特異的な単離を成立させず、擬陽性を生じさせる。このため、本解析法においてアビジンビーズの選定は注意を要することを記しておきたい。アガロースビーズを保持単体とするニュートラアビジンビーズにおいてこの問題は生じず、本プルダウンアッセイ系に用いた。

実験系を最適化したプルダウンアッセイ系を用い、タンパク質の超硫酸化を解析した。ヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞抽出液のポリスルフィドモデル化合物 (Na_2S_3) 処理により増加するタンパク質の超硫酸化は MeHg の添加により減少したことから、RSS からタンパク質のチオール基へと転移したサルフェン硫黄が MeHg により奪取されることが示唆された。培地に Na_2S_3 または MeHg を添加して曝露を行った SH-SY5Y 細胞を用いて同様の解析を行った。その結果、細胞内超硫酸化タンパク質の総量を SDS-PAGE 上で示す蛍光染色強度は Na_2S_3 曝露により増加した一方、MeHg 曝露による明確な減少は認められなかった。しかし超硫酸化修飾が報告されているグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼを特異的に検出したところ、MeHg 曝露細胞についてその超硫酸化の減少が確認されたことから、MeHg によりサルフェン硫黄を奪取される超硫酸化タンパク質には特異性が存在することが示唆された。

MeHg 曝露または未曝露のラット大脳皮質初代培養神経細胞より、ビオチン標識アルキル化剤を用いたプルダウンアッセイ系にて超硫酸化タンパク質を特異的に単離し、DIA プロテオミクスによる同定と半定量解析を行った。その結果、MeHg 曝露依存的に超硫酸化が減少する種々の候補タンパク質が見出された。このものの一部につき生化学的解析も行ったところ、超硫酸化が既に報告されているプロテアーゼのほか、セリンスレオニンキナーゼなど新奇分子にて超硫酸化と MeHg による超硫酸化減少が確認された。これらの結果は、MeHg により特異的なタンパク質が脱超硫酸化することを示唆しており、当該タンパク質の機能変化と MeHg 毒性の関連についてさらなる解析が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Akiyama Masahiro, Unoki Takamitsu, Aoki Hanako, Nishimura Akiyuki, Shinkai Yasuhiro, Warabi Eiji, Nishiyama Kazuhiro, Furumoto Yuka, Anzai Naohiko, Akaike Takaaki, Nishida Motohiro, Kumagai Yoshito	4. 巻 57
2. 論文標題 Cystine-dependent antiporters buffer against excess intracellular reactive sulfur species-induced stress	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Redox Biology	6. 最初と最後の頁 102514 ~ 102514
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.redox.2022.102514	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, 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 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 鷓木 隆光, 秋山 雅博, 青木 はな子, 西村 明幸, 新開 泰弘, 西田 基弘, 熊谷 嘉人
2. 発表標題 Cystine-dependent antiporters prevent sulfur stress by excreting surplus supersulfide from cells
3. 学会等名 第50回日本毒性学会学術年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 鷓木 隆光, 秋山 雅博, 熊谷 嘉人, 藤村 成剛
2. 発表標題 メチル水銀曝露による細胞内タンパク質超硫酸化の変動
3. 学会等名 フォーラム2023: 衛生薬学・環境トキシコロジー
4. 発表年 2023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 メチル水銀によるタンパク質超硫黄化変動の網羅的解析
3. 学会等名 メタルバイオサイエンス研究会2023
4. 発表年 2023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 メチル水銀曝露における細胞内サルフェン硫黄の遷移
3. 学会等名 第49回日本毒性学会学術年会
4. 発表年 2022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 メチル水銀曝露による細胞内サルフェン硫黄の遷移
3. 学会等名 フォーラム2022: 衛生薬学・環境トキシコロジー
4. 発表年 2022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 メチル水銀によるタンパク質結合性超硫黄分子の変動
3. 学会等名 メタルバイオサイエンス研究会2022
4. 発表年 2022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 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

〔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
---------	---------