

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 26 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25281023

研究課題名(和文)オートファジー調節因子Ragulator複合体によるメチル水銀毒性軽減機構

研究課題名(英文) Mechanism underlying the reduction of methylmercury toxicity by Ragulator complex which is an autophagy regulator

研究代表者

黄 基旭 (HWANG, Gi-Wook)

東北大学・薬学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：00344680

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、メチル水銀がオートファジーを誘導することを見出し、本作用に既知のオートファジー誘導機構が関与することなく、オートファジー抑制因子であるRagulator複合体の機能低下が関与していることを明らかにした。また、メチル水銀はRagulator複合体構成蛋白質の分解を促進させることによってその機能低下に関与していることが明らかになった。さらに、オートファジー誘導関連因子の発現を抑制したところ、細胞がメチル水銀耐性を示した。これらのことは、メチル水銀がオートファジーを過剰に誘導することによって細胞毒性を引き起こしていることを示唆している。

研究成果の概要(英文)：In this study, we found that methylmercury induced the autophagy through the function-loss of Ragulator complex which suppresses autophagy induction, but not known mechanisms. In addition, methylmercury induced the function-loss by promoting the degradation of Ragulator complex. When autophagy-related gene was inhibited by RNA interference, cultured-cells showed the methylmercury resistance. Taken together, we concluded that methylmercury might be cause the cytotoxicity through the induction of excessive autophagy.

研究分野：分子毒性学

キーワード：メチル水銀 オートファジー 毒性

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 50 年以上が経過した現在も謎のままであり、解明のための手掛かりとなる情報もほとんど得られていない。本申請者は、リソソーム膜上で機能する Ragulator 複合体がメチル水銀毒性軽減において重要な役割を果たしていることを見出し、さらに、本複合体がメチル水銀によって過剰に誘導されたオートファジーを負に制御することによってその毒性を軽減している可能性を見出している。

2. 研究の目的

上記の知見は、メチル水銀毒性発現機構の核心に迫るものであり、当該機構解明のための突破口ともなり得るこれまでにない重要なものと考えられる。そこで本研究では、メチル水銀によるオートファジー誘導に関わる分子機構を解明すると共に、メチル水銀毒性発現におけるオートファジーの役割を明らかにする。また、Ragulator 複合体はメチル水銀によるオートファジーの過剰誘導を負に制御している可能性が考えられる。そこで、同複合体によるオートファジーの制御機構を分子生物学的および生化学的検討によって明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 細胞抽出液 (whole cell lysate) の調製

DMEM(10%FBS 含有)中で SK-N-SH 細胞または SH-SY-5Y 細胞を培養後、培地を除去し、1×PBS で wash を一回行い、その後 RIPA buffer を加え、氷上でスクレイパーを用いて細胞をかきとり回収した。その後 15,000 ×g, 4 度, 30 分間遠心し、その上清を細胞抽出液 (whole cell lysate) とした。なお、細胞抽出液の蛋白質濃度は DC protein assay kit (Bio-Rad) を用いて定量した。

(2) メチル水銀処理

6-well plate に 5×10^5 cells / 1.9 mL / well となるように SK-N-SH 細胞を播種し、24 時間、37 度、5% CO₂ で培養後、100 μL のメチル水銀溶液 (12 μM) を添加し、37 度、5% CO₂ で、0 ~ 8 時間培養し、上記の方法で細胞抽出液を調製した。

(3) アミノ酸欠乏培地での細胞の培養

6-well plate に 5×10^5 cells/1.9 mL とするようになり細胞を播種し、24 時間、37 度、5% CO₂ で培養後、培地を除去し、アミノ酸欠乏培地 (Cell Science & Technology Institute, Inc.) に交換し、0~8 時間、37 度、5% CO₂ で培養し、上記の方法で細胞抽出液を調製した。

(4) 細胞への siRNA の導入

5×10^5 cells/1.9 mL とするようになり細胞を播種し、そこに transfection complex (opti-MEM 80 μL に 5 μM siRNA を 4 μL 添加し、HiperFect

transfection reagent を入れた後 10~15 分間インキュベートしたものを) を添加し、24 時間、37 度、5% CO₂ で培養した。その後、培地を交換し、16 時間、37 度、5% CO₂ で培養し、上記の方法で細胞抽出液を調製した。

(5) 細胞へのプラスミドの導入

プラスミド導入はリポフェクション法により行った。6 well plate に 5×10^5 cells/2 mL とするようになり細胞を播種し、24 時間、37 度、5 % CO₂ で培養後、transfection complex (opti-MEM 200 μL に高発現ベクターを適量加えたものと、opti-MEM 200 μL に Lipofectamin[®] 2000 を 6 μL 加えたものをそれぞれ 5 分間室温で静置した後、この 2 つを混合し、20 分間室温で静置することにより作成したものを) を添加し、37 度、5% CO₂ で培養した。Transfection complex の添加から 6 時間後に培地を交換した。その後、さらに 37 度、5% CO₂ で 18 時間培養することで遺伝子を導入した。

(6) SDS-PAGE およびウェスタンブロット法

細胞抽出液に 4× sample buffer を加え、100 度で 5 分間加熱し、泳動用サンプルとした。ポリアクリルアミドゲルの分離ゲル濃度は 15%、濃縮ゲル濃度は 4% とした。電気泳動は 60 V で濃縮層を泳動後、200 V で分離層を泳動した。電気泳動後、ゲルの蛋白質を、ウェット型転写装置 (条件: 50V, 11 時間) またはセミドライ型転写装置 (条件: 0.9 mA/cm², 2 時間) を用いて PVDF 膜に転写した。転写後の PVDF 膜をブロッキング液に浸し、1 時間震盪させブロッキングを行い、TBS-T で 3 回、TBS で 1 回、それぞれ 5 分間震盪して洗浄した後、一次抗体に浸透させ 4 度で一晩反応させた。その後、TBS-T で 3 回、TBS で 1 回、それぞれ 5 分間震盪して洗浄した後、二次抗体を反応させた。その後、TBS-T で 3 回、TBS で 1 回、それぞれ 5 分間震盪して洗浄した後、Immobilon Western を用いて化学発光させ、ChemiDoc[™] Touch により検出した。

(7) 免疫沈降

PA タグおよび Myc タグに対する antibody beads は、1 サンプルに対し 20 μL 使用した。ビーズを懸濁して適量取り出し、8,000 g、1 分間、4 度で遠心分離し、上清を除去した。その後、protease inhibitor cocktail を含む TBS (TBS 50 mL に protease inhibitor cocktail を 1 錠溶解したものを) を 1 mL 加え、懸濁して、8,000 g、1 分間、4 度で遠心分離し、上清を除去しビーズの洗浄を行った。ビーズの洗浄を 2 回行った後、細胞抽出液 (1 μg) と混合し、2 時間、4 度でチューブを回転させながら反応させた。反応後、8,000 g、1 分間、4 度で遠心分離し、上清を除去した。その後、TBS を 1 mL 加え、懸濁して、8,000 g、1 分間、4 度で遠心分離してビーズを洗浄した。洗浄を 3 回行

った後、サンプルが 40 μ L になるように上清を除去した。2 \times sample buffer を 40 μ L 加え、100 度で 5 分間加熱した後、8,000 g、1 分間、4 度で遠心し、上清を取り出して泳動用サンプルとした。

4. 研究成果

(1) メチル水銀がオートファジーに与える影響

ヒト神経芽腫細胞 (SK-N-SH 細胞および SH-SY-5Y 細胞) を用いて、メチル水銀がオートファジーに与える影響を検討した。オートファジーの誘導は microtubule-associated protein light chain 3 (LC3) の細胞内レベルを指標として検討した。その結果、SK-N-SH 細胞および SH-SY-5Y 細胞をメチル水銀で処理したところ、オートファジー誘導時に認められる LC3-II のレベルが処理時間に依存して上昇した。また、オートファジーフラックスアッセイを行ったところ、オートファゴソームとリソソームの結合阻害剤である bafilomycin A1 存在下においても、メチル水銀による LC3-II のレベルの上昇が認められた。これらのことは、メチル水銀がオートファジーを誘導することを示している。

(2) メチル水銀が Ragulator 複合体構成因子の細胞内レベルに与える影響

Ragulator 複合体は LAMTOR1、LAMTOR2 および LAMTOR3 から構成されている。そこで、メチル水銀が Ragulator 複合体構成因子の細胞内レベルに与える影響を検討したところ、いずれの LAMTOR 蛋白質のレベルがメチル水銀処理時間に依存して低下した。一方、メチル水銀が Ragulator 複合体構成因子の mRNA レベルに与える影響について定量 PCR 法を用いて検討したところ、メチル水銀は Ragulator 複合体構成因子の mRNA レベルにはほとんど影響を与えなかった。これらのことから、メチル水銀は Ragulator 複合体構成因子の安定性を低下させる可能性が考えられる。

(3) 蛋白質分解系の阻害がメチル水銀による Ragulator 複合体構成因子のレベル減少に与える影響

蛋白質はプロテアソームおよびリソソームで分解されることが知られている。メチル水銀による Ragulator 複合体構成因子のレベル減少に関わる分解系を特定するため、細胞をプロテアソーム阻害剤またはリソソーム阻害剤で前処理したところ、これらの阻害剤存在下ではメチル水銀処理による Ragulator 複合体構成因子のレベル減少がそれぞれ一部抑制された。この結果は、Ragulator 複合体構成因子のレベル減少にユビキチン・プロテアソーム系およびオートファジー・リソソーム系が関与している可能性を示唆している。

(4) メチル水銀がプラスミド由来 LAMTOR

蛋白質のレベルに与える影響

細胞に LAMTOR1-PA、LAMTOR2-Myc および LAMTOR3-V5 を発現する三種類のプラスミドを同時に導入し、メチル水銀処理した後、それぞれのタグの抗体を用いたウェスタンブロット法により検討した。その結果、LAMTOR1-PA および LAMTOR2-Myc のレベルは内在性 LAMTOR 蛋白質と同様にメチル水銀処理時間に依存して減少した。しかし、LAMTOR3-V5 のレベルはメチル水銀処理によって逆に増加した。このことから、少なくとも LAMTOR1-PA および LAMTOR2-Myc は内在性 LAMTOR 蛋白質と同様の挙動を示すことが明らかとなった。

(5) メチル水銀が LAMTOR1-PA および LAMTOR2-Myc のユビキチン化に与える影響

これまでの検討により、プラスミド由来の外來性 LAMTOR1-PA および LAMTOR2-Myc も、内在性 LAMTOR 蛋白質と同様に、メチル水銀処理によってプロテアソームでの分解が促進される可能性が考えられる。そこで、PA および Myc 抗体による免疫沈降後のユビキチン抗体を用いたウェスタンブロット法により LAMTOR1-PA および LAMTOR2-Myc のユビキチン化を調べたところ、両蛋白質ともにユビキチン化されることが確認された。

ポリユビキチン鎖の結合様式は多様であり、ユビキチン分子内に存在する 7 個のリジン残基と別のユビキチンの C 末端のグリシン残基を介したユビキチン間の結合が報告されている。そのうち代表的なものは、リジン残基 48 (K48) およびリジン残基 63 (K63) を介したポリユビキチン化であり、蛋白質は K48 ポリユビキチン化を介してプロテアソームによる分解を受け、K63 ポリユビキチン化を介して刺激伝達や DNA 修復の働きを担うことが知られている。そこで、上記と同様の操作を行った後に、K48 ポリユビキチンおよび K63 ポリユビキチンを認識する抗体を用いてウェスタンブロットを行った。その結果、メチル水銀処理によって LAMTOR1-PA の K48 ポリユビキチン化のレベルが僅かに増加したのに対し、K63 ポリユビキチン化のレベルはほとんど変化しなかった。また、LAMTOR2-Myc のユビキチン化も LAMTOR1-PA と同様に、K48 ポリユビキチン化のレベルのみがメチル水銀処理によって増加した。これらのことから、メチル水銀は LAMTOR 蛋白質の K48 を介したポリユビキチン化を亢進させることによってプロテアソームでの分解を促進していると考えられる。

(6) Ragulator 複合体構成因子の発現抑制がオートファジーに与える影響

Ragulator 複合体構成因子の発現抑制がオートファジーに与える影響について検討した。LAMTOR 複合体構成因子をそれぞれ発現

抑制させたところ、いずれの構成因子の発現を抑制させても LC3- のレベル増加が認められた。したがって、メチル水銀は Ragulator 複合体構成因子の細胞内レベルを低下させることによって mTORC1 を不活性化し、その結果としてオートファジーを誘導している可能性が考えられる。

(7) メチル水銀によるオートファジー誘導機構の解析

栄養飢餓や様々なストレスによるオートファジー誘導には、mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) の不活性化が関与することが知られている。メチル水銀がオートファジー抑制因子である mTORC1 の活性に与える影響を p70S6k (mTORC1 の基質) のリン酸化レベルを指標に検討したところ、メチル水銀によって p70S6k のリン酸化レベルが低下することも判明した。また、Ragulator 複合体構成因子の発現抑制によっても mTORC1 の活性が低下した。したがって、メチル水銀が Ragulator 複合体の細胞内レベルを低下させることによって mTORC1 を不活性化し、オートファジーを誘導する可能性が考えられる。mTORC1 の活性調節に PI3K-Akt 経路および AMPK 経路が関与していることが知られている。そこで、メチル水銀が PI3K-Akt 経路および AMPK 経路に与える影響も検討した。その結果、メチル水銀処理によって mTORC1 を正に制御する Akt はリン酸化が促進され、mTORC1 を負に制御する AMPK はリン酸化レベルが低下した。したがって、メチル水銀による mTORC1 の不活性化に PI3K-Akt 経路と AMPK が関与していないことを示唆している。

アミノ酸は Ragulator 複合体の活性化を介して mTORC1 をリソソーム膜上に局在させることによってオートファジーを負に制御することが知られている。細胞をアミノ酸欠乏培地で培養したところ、mTORC1 の不活性化およびオートファジーの誘導が確認された。なお、アミノ酸欠乏は Akt のリン酸化を亢進し、AMPK のリン酸化を低下させたことから、アミノ酸欠乏によるオートファジーに PI3K-Akt 経路と AMPK が関与していないと考えられる。一方、アミノ酸欠乏が LAMTOR 複合体に与える影響を検討したところ、アミノ酸欠乏は Ragulator 複合体構成因子の細胞内レベルにほとんど影響を与えなかった。したがって、アミノ酸欠乏によるオートファジーの誘導には Ragulator 複合体の減少は関与していないと考えられる。

(8) オートファジー関連因子 p62 とメチル水銀毒性との関わり

p62 はオートファゴソーム膜上の LC3 に直接結合し、オートファジーにより選択的に分解されることが報告されている。また、p62 の C 末端にユビキチン会合ドメインを有することから、p62 によるユビキチン・プロテア

ソーム分解系とオートファジーとのクロストークが示唆されている。種々のストレスによってプロテアソーム機能が低下すると、細胞内の変性蛋白質を取り囲むように不溶性凝集体 (アグリソーム) が形成される。p62 はアグリソーム内でユビキチン化蛋白質と結合し、オートファゴソームへのリクルートに関与することが知られている。メチル水銀処理によって可溶性画分中の p62 レベルが減少し、それに伴って不溶性画分中の p62 のレベルが増加した。また、p62 の発現を抑制させた細胞はメチル水銀耐性を示した。これらのことから、メチル水銀は p62 を介した選択的なオートファジーの誘導を促進させることによって細胞毒性を引き起こしている可能性が考えられる。

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5件)

1. Hwang G.W., Fukumitsu T., Ogiwara Y., Takahashi T., Miura, N., Kuge S. and Naganuma A., Whi2 enhances methylmercury toxicity in yeast via inhibition of Akr1 palmitoyltransferase activity. *Biochim. Biophys. Acta.*, 査読有, 1800:1326-1333 (2016) doi: 10.1016/j.bbagen.2016.03.026.
2. Ogiwara Y., Miura N., Kuge S., Naganuma A. and Hwang G.W., Overexpression of palmitoyl transferase HIP14 confers resistance to methylmercury in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *Fundam. Toxicol. Sci.*, 査読有, 3:75-77 (2016) doi: 10.1038/srep21518.
3. Lee J.Y., Ishida Y., Takahashia T., Naganuma A. and Hwang G.W., Transport of pyruvate into mitochondria is involved in methylmercury toxicity. *Sci. Rep.*, 査読有, 6:21518 (2016) doi: 10.2131/fts.3.75.
4. Hwang G.W., Murai Y., Takahashi T. and Naganuma A., The protein transportation pathway from Golgi to vacuoles via endosomes plays a role in enhancement of methylmercury toxicity. *Sci. Rep.*, 査読有, 4:5888 (2014) doi: 10.1038/srep05888.
5. Hwang G.W., LEE J.Y., Kim M.S., Sato M., Takahashi T. and Naganuma A., Changes in the levels of low molecular weight metabolites in the mouse cerebellum following treatment with methylmercury. *J. Toxicol. Sci.*, 査読有, 38: 703-706 (2013) doi: 10.2131/jts.38.703.

[学会発表](計16件)

1. 長谷川 貴, 松田 健人, 永沼 章, 黄 基 旭, メチル水銀によるオートファジー誘

- 導機構の解析. 日本薬学会第 136 回年会, 2016 年 3 月 29 日, 横浜
2. Lee J.Y., Ishida Y., Naganuma A. and Hwang G.W., Methylmercury induces cytotoxicity through transport of pyruvate into mitochondria. 55th Annual Meeting of the Society of Toxicology, 2016 年 3 月 14 日, New Orleans (米国)
 3. Lee J.Y., Ishida Y., Naganuma A. and Hwang G.W., Pyruvate incorporated into the mitochondria is involved in enhancement of methylmercury toxicity through mitochondrial membrane potential damage. The 31th Annual Meeting of KSOT/KEMS, 2015 年 11 月 12 日, ソウル (韓国)
 4. 佐藤昌幸, 永沼 章, 黄 基旭, メチル水銀が引き起こすアポトーシスとポリアミンとの関わり. メタルバイオサイエンス 2015, 2015 年 8 月 28 日, 名古屋
 5. 佐藤昌幸, 永沼 章, 黄 基旭, メチル水銀によるアポトーシス誘導におけるプロテシンの役割. 第 42 回日本毒性学会学術年会, 2015 年 6 月 30 日, 金沢
 6. Zhang Z.T., Naganuma A. and Hwang G.W., The role of EGO complex in methylmercury-induced abnormal vacuolar morphology in yeast cells. The 7th International Congress of Asian Society of Toxicology, 2015 年 6 月 24 日, Jeju (韓国)
 7. 佐藤昌幸, 永沼 章, 黄 基旭, 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 27 日, 神戸
 8. Hwang G.W., Zhang Z.T. and Naganuma A., Methylmercury Induces Abnormal Vacuolar Morphology through the Dissociation of EGO Complex in Yeast. 54th Annual Meeting of the Society of Toxicology, 2015 年 3 月 25 日, San Diego (米国)
 9. Hwang G.W., Zhang Z.T. and Naganuma A., EGO complex attenuates methylmercury toxicity through the inhibition of vacuole dysfunction in budding yeast. The 29th Annual Meeting of KSOT/KEMS, 2014 年 11 月 6 日, Muju (韓国)
 10. 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
 11. 松田健人, 高橋 勉, 黄 基旭, 永沼 章, メチル水銀によるオートファジー誘導における LAMTOR 複合体の関与. フォーラム 2014 : 衛生薬学・環境トキシコロジー, 2014 年 9 月 19 日, つくば
 12. 黄 基旭, メチル水銀毒性とオートファジー抑制因子 EGO 複合体との関わり. フォーラム 2014 : 衛生薬学・環境トキシコロジー, 2014 年 9 月 19 日, つくば
 13. Kim M.S., Lee J.Y. and Hwang G.W., Takahashi T. and Naganuma A., Involvement

- of NF-κB Signaling Pathway in Methylmercury-induced CCL4 Expression in Mouse Neural Progenitor Cells. The 29th Annual Meeting of KSOT/KEMS, 2013 年 11 月 1 日, Buyeo (韓国)
14. Hwang G.W., Investigation of the mechanisms involved in cadmium-induced endoplasmic reticulum stress. The 29th Annual Meeting of KSOT/KEMS, 2013 年 11 月 1 日, Buyeo (韓国)
 15. 佐藤昌幸, 黄 基旭, 永沼 章, メチル水銀毒性に影響を与える低分子代謝産物の同定およびその作用機序解析. 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, 福岡
 16. Sato M., Hwang G.W. and Naganuma A., Metabolomic analysis in cerebellum of mice treated with methylmercury and elucidation of toxicological significance of identified metabolites. The XIII International Congress of Toxicology, 2013 年 7 月 2 日, ソウル (韓国)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

〔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
黄 基旭 (HWANG, GI-WOOK)
東北大学・大学院薬学研究科・准教授
研究者番号 : 00344680
 - (2) 研究分担者
高橋 勉 (TAKAHASHI, TSUTOMU)
東北大学・大学院薬学研究科・助教

研究者番号：00400474

外山 喬士 (TOYAMA, TAKASHI)
東北大学・大学院薬学研究科・助教
研究者番号：50720918