

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：32607

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26893043

研究課題名(和文) 膜脂質環境におけるメチル水銀応答分子の同定および機能解析

研究課題名(英文) Identification and characterization of methylmercury responsive proteins related to lipid composition

研究代表者

高根沢 康一 (Takanezawa, Yasukazu)

北里大学・薬学部・講師

研究者番号：90345257

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、魚介類摂取によるメチル水銀摂取のリスクとDHA、EPAといった高度不飽和脂肪酸(PUFA)摂取のベネフィットを分子レベルで理解することであった。

本研究では、まず、哺乳類培養細胞においてメチル水銀をばく露時にオートファジーの活性化について調べ、オートファジー関連分子LC3とp62がメチル水銀に対し誘導されることを明らかにした。次に、オートファジーを欠失した細胞ではメチル水銀に対し脆弱性を示すこと、ユビキチンタンパク質の蓄積を明らかにした。さらに、メチル水銀とDHAの同時ばく露により、オートファジーの誘導への影響、顕著な細胞死が引き起こされることを見出した。

研究成果の概要(英文)：Methylmercury is environmental toxicant present in certain foodstuffs that adversely affects health and impairs the neuronal functions. The n-3 PUFA is a nutrient in fish, eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) have been increasingly identified as having health benefits.

We investigated the effect of MeHg for autophagy, and found that MeHg significantly upregulate LC3 and p62, an autophagy-related proteins, in mammalian cells. Next, we examined the role of autophagy in MeHg-mediated cellular damages. In autophagy-deficient cells, cell damage, apoptosis, and accumulation of ubiquitinated proteins were induced more prominently following MeHg exposure compared to wild-type cells. Finally, we found that exposure of MeHg with DHA affected on autophagy and then increased apoptotic cells.

研究分野：毒性学

キーワード：メチル水銀 膜脂質 オートファジー

### 1. 研究開始当初の背景

メチル水銀は中枢神経障害を引き起こす有害物質であり、魚介類に多く含まれる。火山活動や近くガス、化学燃料の燃焼などから排出された水銀が微生物を介したメチル化によって生じ、生物濃縮によりマグロ等の高次消費者に蓄積している。一方、魚介類にはエイコサペンタエン酸 (EPA) やドコサヘキサエン酸 (DHA) といった高度不飽和脂肪酸 (PUFA) を豊富に含んでいる。PUFA は神経保護作用や炎症抑制など様々な正の生理作用が数多く報告され、魚を中心とした食事が見直されている。しかしながら、メチル水銀の低濃度ばく露によってどのような健康被害があるのか、細胞応答機構についても不明な点が多い。さらに PUFA 摂取により変動する細胞膜の脂質成分の変化によりどのような影響を及ぼすのか、ほとんど理解されていない。

### 2. 研究の目的

魚にはミネラル、タンパク質、必須脂肪酸など栄養学的にも優れた成分を多く含有しており、世界的にも魚食が広まりつつある。一方で、近年、海洋の汚染などにより魚介類におけるメチル水銀の蓄積が懸念されている。すなわち、魚介類摂取はメチル水銀の体内蓄積のリスクと PUFA 摂取によるベネフィットの側面がある。疫学的研究が盛んになされ、メチル水銀蓄積によるリスクについてはまだ不明な点が多いが、PUFA 摂取のベネフィットが大きいとの知見が多い。メチル水銀の細胞応答については、幾つかの候補分子はあげられているものの、あまり解析が進んでいないのが現状である。さらに、同時に摂取する PUFA がメチル水銀の毒性発現及び分子機構に対し、どのような影響を及ぼすのかについての知見はほとんどない。本研究では、メチル水銀に対する応答分子機構を明らかにすることを目的とし、脂質変化の手法によりメチル水銀細胞応答分子の同定、及びその機能解析を目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) 不飽和化酵素欠損線虫を用いた解析：脂肪酸の二重結合を導入する酵素の欠損 (不飽和化酵素の欠損) 線虫を用い、アラキドン酸、EPA や DHA といった PUFA が存在しない膜環境と野生型の膜環境を比較して、メチル水銀の毒性発現を解析した。

(2) メチル水銀の哺乳類細胞におけるオートファジーへの影響：様々な哺乳類細胞を用いてメチル水銀及び PUFA 処理により応答現象を検討した。さらに、マウス線維芽細胞 (MEF) 細胞を用い、オートファジーへの影響を評価した。メチル水銀毒性発現に対するオートファジーの役割をオートファジー欠損細胞である ATG5 欠損 MEF 細胞を用いて解析した。

(3) メチル水銀によるユビキチン化タン

パク質の蓄積とオートファジー関連分子 p62 の機能解析：メチル水銀ばく露による細胞内ユビキチン化タンパク質の蓄積を調べ、p62 との細胞内局在を調べた。また、p62 欠損細胞を用いて、メチル水銀に対する感受性及びユビキチン化タンパク質の蓄積を解析した。

### 4. 研究成果

(1) 不飽和化酵素欠損線虫を用いた解析：

不飽和化酵素を欠損した線虫をメチル水銀含有したプレートで飼育し、その生存率の評価を行った。一部の変異体はメチル水銀に対し、強い感受性を示し、当初計画していた表現系による差別化が困難であった。そのため、線虫を用いた解析から、哺乳類培養細胞を用いた解析に重点を置き、以下の解析を行った。

(2) メチル水銀の哺乳類細胞におけるオートファジーへの影響：

①様々な哺乳類細胞に DHA を前処理し、メチル水銀をばく露後、様々なストレス応答を検討したところ、細胞内に vacuole が出現し、オートファジーに影響を及ぼしていることが示唆された。そこで、メチル水銀単独処理により、オートファジーの指標となる LC3-II が増加すること (図 1A)、LC3 の点状構造体の増加を見出した (図 1B)。

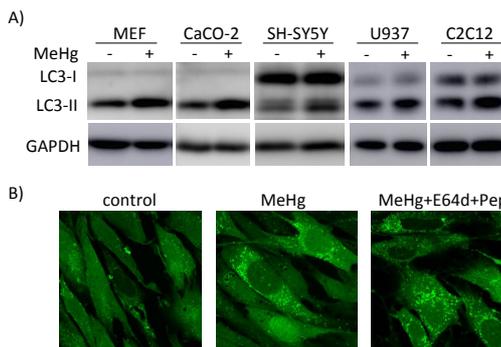


図1. A) メチル水銀によるLC3-IIの蓄積  
B) メチル水銀によるLC3のpuncta形成

②さらに、メチル水銀による LC3-II の増加がオートファジーの活性化によるものかをオートファジーの阻害剤であるバフィロマイシン A1 (BAF)、あるいはクロロキン (CQ) を用いたオートファジーフラックスアッセイにより評価した。その結果、阻害剤単独よりもメチル水銀と阻害剤の同時処理により LC3-II の増加が見られ、メチル水銀はオートファジーを活性化させることが明らかとなった (図 2)。

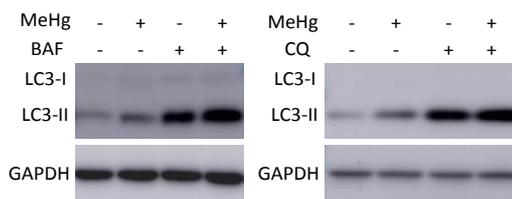


図2. オートファジーフラックスアッセイ

③オートファジーはATG 遺伝子と呼ばれる一連の分子群により隔離膜の伸長、オートファゴソーム膜の形成が行われ、成熟・進行する。ATG5 はオートファジーの初期段階に働く分子であり、この分子が欠損した細胞ではオートファジーが抑制され、LC3-II は検出されない。この ATG5 欠損細胞を用いて、メチル水銀に対する毒性感受性を WST-8 アッセイにより評価した。ATG5 欠損 MEF 細胞は、野生型 MEF 細胞よりもメチル水銀に対する細胞生存率が有意に低く、脆弱性を示した (図 3)。以上の結果から、オートファジーはメチル水銀毒性に対し防御的に働いていることが示唆された。

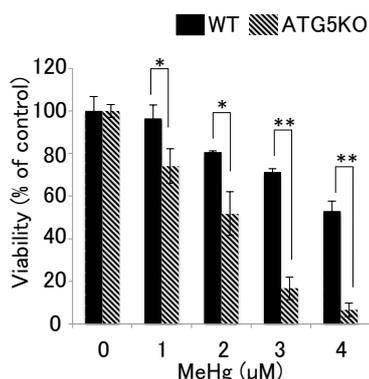


図3. ATG5KO細胞におけるメチル水銀に対する感受性

(3) メチル水銀によるユビキチン化タンパク質の蓄積とオートファジー関連分子 p62 の機能解析:

①メチル水銀による様々なオートファジー関連分子の変動について検討を行った。オートファジー関連分子の中で、p62 と呼ばれる分子がメチル水銀により発現増加することを見出した。p62 は LC3 と結合する分子として同定され、オートファゴソームに局在し様々なシグナル伝達への関与が示唆されている分子である。p62 の継時的な発現をウェスタンブロット法により調べたところ、p62 はメチル水銀処理後から継続的に増加し、LC3 よりも早期に増加が見られた (図 4)。また、RT-PCR 法により p62 の mRNA を調べると、メチル水銀による発現増加が確認された。

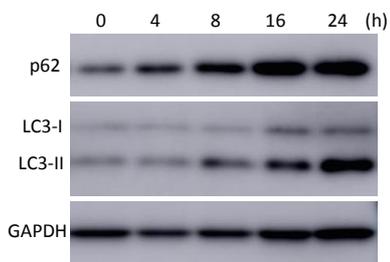


図4. メチル水銀によるp62の発現

②p62 は分子内にユビキチン化タンパク質と結合する領域を有する。そこで、メチル水銀による細胞内のユビキチン化タンパク質への影響をウェスタンブロット法により調べ

ると、メチル水銀ばく露により継時的な増加を認めた。さらに細胞染色により、ユビキチン化タンパク質と p62 はそのほとんど共局在していた。

③p62 欠損 MEF 細胞のメチル水銀に対する感受性は野生型 MEF 細胞と比較して脆弱性を示した。さらにメチル水銀による細胞内のユビキチン化タンパク質の増加が野生型 MEF 細胞と比較し、顕著であった。このことから、p62 はメチル水銀によるユビキチン化タンパク質の蓄積を抑制し、防御因子として働いていることが示唆された。

④メチル水銀による細胞死は DHA を前処理した MEF 細胞ではメチル水銀単独処理の MEF 細胞よりも顕著に亢進することがわかった。この細胞死は EPA の前処理では引き起こされなかった。また、p62 の mRNA の増加も DHA とメチル水銀処理の細胞では顕著であった。

(4) 今後は本研究期間において得られた成果をもとに DHA とメチル水銀による細胞死のメカニズムについて解析を進めてく予定である。

## 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 0 件)

[学会発表] (計 4 件)

(1) 高根沢 康一、中村亮介、曾根有香、内田龍児、供田洋、清野正子、メチル水銀ばく露による小胞体ストレスとオートファジー誘導、日本薬学会、2015. 3. 28、神戸サンボーホール (神戸)

(2) 中村亮介、曾根有香、高根沢 康一、白畑辰弥、小林義典、清野正子、オレアノール酸およびその配糖体による抗メチル水銀作用に関する研究、日本薬学会、2015. 3. 28、神戸サンボーホール (神戸)

(3) 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 3-グルコシドによる抗メチル水銀作用に関する研究、環境トキシコロジー、2015. 9. 17、神戸学院大学ポートアイランドキャンパス (神戸)

(4) 高根沢 康一、中村亮介、曾根有香、浦口晋平、清野正子、p62 の発現誘導とメチル水銀毒性防御機構の解析、日本薬学会、2016. 3. 29、パシフィコ横浜 (横浜)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[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

高根沢 康一 (Takanezawa, Yasukazu)

北里大学・薬学系研究科・講師

研究者番号：90345257