

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

Cellular Systems Involved in Development and Regulation of Toxicity of Methylmercury

永沼 章 (NAGANUMA AKIRA)

東北大学・大学院薬学研究科・教授



研究の概要

我々は蛋白質分解機構の1つであるユビキチン・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。そこで、UPシステムによって分解されるメチル水銀毒性関連蛋白質を同定し、それらの作用機構とUPシステムによる分解調節機構を明らかにすることによって、メチル水銀毒性発現機構の解明を目指す。

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. これまでの成果

(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係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、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) 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

1. ユビキチン転移酵素 (E2) 分子種の特

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。

2. F-box蛋白質分子種の特

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

メチル水銀毒性発現に関わる脱ユビキチン化酵素の中で Ubp2, Ubp4, Ubp6, Ubp14 がメチル水銀毒性増強作用を示し、Ubp7, Ubp13,

Ubp15 がメチル水銀毒性軽減作用を示すことが判明した。このうち、Ubp6 は、ユビキチン化された Whi2 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も明らかになった。

5. 今後の計画

UP システムで分解されるメチル水銀毒性関連蛋白質の作用機構解明継続すると共に、それら蛋白質の UP システムによる分解調節機構を明らかにするための研究を重点的に実施する。

6. これまでの発表論文等

Hwang, G. W., Tobita, M., Takahashi, T., Kuge, S., Kita, K. and Naganuma, A.: siRNA-mediated AMPK1 subunit gene PRKAA1 silencing enhances methylmercury toxicity in HEK293 cells. *J. Toxicol. Sci.*, 34, in press (2010).

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.*, 34, 715-717 (2009).

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.*, 34, 413-416 (2009).

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.*, 34, 315-325 (2009).

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.*, 34, 441-443 (2009).

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.*, 32, 581-583 (2007).

受賞：黄基旭 (分担研究者) 日本薬学会環境衛生部会賞 (2008 年) および日本トキシコロジー学会奨励賞 (2008 年) 受賞ホームページ等

<http://www.pharm.tohoku.ac.jp/~seitai/seitai-index.html>