

科学研究費助成事業（基盤研究（S））公表用資料
〔平成30年度研究進捗評価用〕

平成27年度採択分
平成30年3月16日現在

メチル水銀毒性発現の分子機構

Molecular mechanism for toxic effect of methylmercury

課題番号：15H05714

永沼 章 (NAGANUMA AKIRA)

東北大学・大学院薬学研究科・名誉教授



研究の概要

水俣病の発症から半世紀以上が経過した現在もメチル水銀による中枢神経選択的な障害機構は全く解明されていない。我々はメチル水銀毒性増強作用を有する細胞内因子として転写因子様蛋白質 tmRT1 を同定し、メチル水銀によって tmRT1 を介して合成誘導され細胞外に放出される TNF α などの細胞障害性因子が細胞毒性を発揮していることを明らかにした。マウスへのメチル水銀投与が脳組織特異的に TNF α の発現を誘導することから、本知見はメチル水銀が示す脳選択的毒性の発現機構を解明するうえでの突破口となり得るものと考えられる。そこで本研究は、メチル水銀による tmRT1 の活性化機構、tmRT1 を介した TNF α の合成誘導機構および TNF α によるメチル水銀毒性増強機構を検討することによって、本現象の総体的な機構解明を目指す。

研究分野：化学物質影響関連

キーワード：メチル水銀、毒性、転写調節、シグナル伝達、オートクライン

1. 研究開始当初の背景

水俣病の原因物質として知られるメチル水銀は重篤な中枢神経障害を引き起こす。近年、このメチル水銀の妊娠中における魚介類を介した過剰摂取が胎児の脳の発達に障害を与えると疫学研究結果が公表され世界的な社会問題となっている。一方、年間2,000トンにもものぼる水銀の環境中排出を抑制するための世界的な取り組みとして2017年8月に「水銀に関する水俣条約」が発効されている。しかし、メチル水銀が引き起こす中枢神経選択的な障害の発症機構はほとんど解明されていない。

我々はメチル水銀毒性増強作用を有する細胞内因子として転写因子様蛋白質 tmRT1（機能未知）を同定し、メチル水銀によって tmRT1 を介して合成誘導され細胞外に放出される TNF α などの細胞障害性因子が細胞死を引き起こしていることを見出した。マウスへのメチル水銀投与が脳組織特異的に TNF α の発現を誘導することも確認されていることから、本知見はメチル水銀毒性の発現機構解明のための突破口ともなり得ると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、我々が見出した上記現象の総体的な分子機構解明を目指す。

3. 研究の方法

ヒトまたはマウスの脳由来培養細胞を用いて、メチル水銀による tmRT1 の活性化、および、TNF α の tmRT1 を介した合成誘導の機構を解析し、さらに、TNF α による細胞死誘導機構またはメチル水銀毒性増強機構についても詳細に検討する。

4. これまでの成果

1. メチル水銀による tmRT1 を介した TNF α 発現誘導機構の解明

tmRT1 は定常時には TNF α プロモーター領域に僅かしか結合していないが、メチル水銀処理によりそのレベルが著しく増加することが判明した。tmRT1 は TNF α 遺伝子の転写開始点上流-1146 から-1140 の領域に結合してその発現を誘導していることも明らかになった。一方、RelB を構成因子とする転写因子 NF- κ B も tmRT1 と同様にメチル水銀による TNF α の発現誘導に関与することを見出し、この RelB は TNF α 遺伝子の転写開始点上流-1158 から-1148 の領域に結合する可能性が示唆された。現在、メチル水銀による TNF α の発現誘導における tmRT1 と RelB との関係について詳細に検討中である。

2. メチル水銀による tmRT1 の活性化機構

細胞内の tmRT1 はほとんどが核内に存在し、メチル水銀で細胞を処理してもその分布はほとんど変動しないことから、メチル水銀は

tmRT1 の細胞内分布に影響を与えることなく、TNF α の発現誘導に関与していると考えられる。メチル水銀は蛋白質中のシステイン残基に結合する性質を有している。tmRT1 中には6個のシステイン残基が存在するが、tmRT1 はメチル水銀がその構造中の100番システイン残基に結合することによって活性化され、TNF α の発現誘導に関与していることが明らかになった。

tmRT1 は定常時でも巨大な複合体を形成している可能性が示唆された。核内でtmRT1 と結合する蛋白質を検索したところ、x-ray repair cross complementing protein6 (XRCC6: DNA 修復関連因子)、heatshock protein 1A1 (HSP1A1: シャペロン分子)、histone H2B (コアヒストン)、nuclear mitotic apparatus protein 1 (NuMA1: マイクロチューブ結合蛋白質) が同定された。そして、XRCC6、HSP1A1 および histone H2B は tmRT1 の機能を負に制御する因子であり、逆に NuMA1 は tmRT1 の機能を正に制御する因子であることが判明した。

一方、TNF α の発現誘導には tmRT1 中の TRAF6 結合ドメインが必須であることが明らかとなった。TRAF6 は NF- κ B の転写活性化に関わるユビキチンリガーゼである。しかし、TRAF6 下流で NF- κ B の転写活性化に関与する TAK1 の活性を阻害してもメチル水銀による TNF α の発現誘導にほとんど影響しなかった。TRAF6 の発現抑制によって tmRT1 高発現による TNF α の発現誘導能が低下したことから、tmRT1 は転写因子として TNF α の発現誘導に関与するのではなく、TRAF6 と共同して何らかの機構を介して TNF α を発現誘導する可能性も否定できない。また、TRAF6 を高発現させることによって分子量が増加した tmRT1 が新たに認められた。この高分子量化した tmRT1 はユビキチンリガーゼ活性を持たない変異 TRAF6 の高発現では認められなかった。

3. TNF α によるメチル水銀毒性増強機構の解明

生体に近いメチル水銀毒性評価系としてマウス大脳皮質のスライス培養系を構築することに成功した。この大脳皮質のスライスをメチル水銀で処理することによって TNF α の発現誘導が認められ、また、TNF α とその受容体との結合を阻害する WPQ9Y の前処理によってメチル水銀が引き起こす神経細胞の脱落が抑制された。したがって、メチル水銀によって発現誘導された TNF α が細胞外に放出された後に TNF 受容体と結合することによって神経細胞死を引き起こしている可能性が考えられる。TNF α が TNF 受容体と結合するとその細胞内ドメインに RIP1 がリクルートされ、細胞死に関わるシグナルが細胞内に伝達される。RIP1 を欠損した神経幹細胞を樹立したところ、対照細胞に比べてメチル水銀耐性を示し、tmRT1 発現抑制細胞では RIP1 欠

損によるメチル水銀耐性獲得はほとんど認められなかった。このことから、RIP1 は tmRT1 と同一経路でメチル水銀毒性増強に関与すると考えられる。RIP1 は caspase-8 の活性化を介したアポトーシスや、JNK のリン酸化を介したミトコンドリア傷害によるネクロトーシスを誘導することが知られている。RIP1 欠損細胞でもメチル水銀によるアポトーシスが対照細胞と同様に誘導され、メチル水銀による JNK の活性化およびミトコンドリアからの活性酸素種の産生は RIP1 ノックアウトによって抑制された。したがって、TNF α が TNF 受容体に結合すると、その下流で RIP1/JNK を介したネクロトーシスが誘導される可能性が考えられる。

5. 今後の計画

以上の各研究をさらに推進する。さらに、我々は本研究で tmRT1 欠損マウスの作成に成功しており、TNF α 欠損マウスも保持している。そこで、tmRT1 および TNF α が示すメチル水銀毒性増強作用を各遺伝子欠損マウスを用いて個体レベルで詳細に検討する。また、メチル水銀以外の環境汚染物質と tmRT1 との関係を検討する。さらに、tmRT1 の活性を阻害する化合物が同定できればメチル水銀障害予防薬のみならず TNF α 抑制性抗炎症剤としての開発も可能であることから、東北大学が有する化合物ライブラリーを用いて当該化合物のスクリーニングを実施する。

6. これまでの発表論文等

Iwai-Shimada M., Takahashi T., Kim M.S., Fujimura M. Ito H., Toyama T. and Naganuma A. and *Hwang G.W., Methylmercury induces the expression of TNF- α selectively in the brain of mice. *Sci. Rep.*, 6:38249 (2016).

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.*, 6:21518 (2016).

Lee J.Y., Ishida Y., Kuge S., Naganuma A. and *Hwang G.W., Identification of substrates of F-box protein involved in methylmercury toxicity in yeast cells. *FEBS Lett.*, 589:2720-2725 (2015).

Toyama T., Murakami S., Kuge S., Hwang G.W. and *Naganuma A., Methylmercury induces release of a cytotoxic factor from HEK293 cells into medium. *Fundam. Toxicol. Sci.*, 2:223-226 (2015).

ホームページ等

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