

1. 病態メカニズムグループ Pathomechanism Group

水銀による生体影響、毒性発現の分子メカニズムを解明し、その成果をメチル水銀中毒の初期病態の把握や毒性評価、毒性発現メカニズムに基づいた障害の防御、修復のための新たな治療法開発へと発展させることを目標とする。そのため、培養細胞系、モデル動物を用いて、メチル水銀の組織や個体の感受性差を明らかにするためのメチル水銀曝露がもたらす生体ストレス応答差やシグナル伝達系変動の差に関する検討、メチル水銀に対する生体応答差をもたらす因子に関する検討、メチル水銀による神経細胞死やメチル水銀傷害後の神経機能改善に関する検討、メチル水銀曝露後の水銀排泄に対する食物繊維の影響等を生化学的、分子生物学的、病理学的な視点から遂行する。このようにして、メチル水銀の毒性発現メカニズムを明らかにしていくとともに、メチル水銀による毒性発現を防ぐ薬剤や神経機能を改善する薬剤についても検討する。

当グループの各研究についての令和5年度概要は以下のとおりである。

[研究課題名と概要]

[1] メチル水銀による神経毒性メカニズムとその予防および治療に関する基礎研究(プロジェクト研究)

藤村成剛(基礎研究部)

1) メチル水銀神経毒性の選択的細胞傷害に関する基礎研究

海馬神経細胞に特異的に発現しているBDNFの下流経路である p44/42 MAPKが抗神経細胞死作用に関与していることが明らかになり、論文投稿を行い、筆頭著者として1報の論文が国際学術雑誌に受理された。さらに運動負荷モデルの実験を開始し、運動負荷によって脳内BDNFが増加することを確認した。

2) メチル水銀神経毒性の個体感受性およびバイオマーカーに関する基礎研究

[令和4年度-6年度 科学研究費補助金・基盤研究

(B), 課題番号 22H03768 (代表)]

バイオマーカーの開発に向けた研究として、血中タンパクのポリチオール化判別のための LC-Mass等を用いた測定法検討および細胞外小胞中のmiRNAの例数追加測定に伴う標的組織中のタンパク質解析を行った。その結果、バイオマーカーの候補miRNAを発見した。さらに、代表研究者として1報の学会発表を行った。

3) メチル水銀による神経障害性疼痛の発症およびその薬剤効果に関する基礎研究

[令和元年度-5年度 学術研究助成基金助成金・基盤研究 (C), 課題番号 19K07077 (代表)]

これまで行ってきたメチル水銀中毒モデルラットにおける神経障害性疼痛に対するガバペンチンの治療効果について代表研究者として2報の学会発表を行うとともに国際学術雑誌に論文投稿を行った。

4) 外部研究機関との共同研究

本研究センターで行っていないメチル水銀毒性の研究分野(小胞体ストレス, エピゲノム)について外部研究機関と共同研究を行い、メチル水銀曝露による嗅覚系神経の細胞傷害および小胞体ストレスにおけるCHOP経路の関与について3報の学会発表を行うとともに2報の論文が国際学術雑誌に受理された。また、当研究センターに岡山大医歯薬学総合研究科の学外講座として ”生体金属作用学講座”を設置し、学生1名を受け入れた。

[2] 食品成分によるメチル水銀の健康リスク軽減に関する研究(基盤研究)

永野匡昭(基礎研究部)

本課題は、食物の機能を利用することにより、魚介類由来メチル水銀(MeHg)の健康へのリスクを軽減することを目的としている。これまで我々は、小麦ふすま(ブラン)やフラクトオリゴ糖の摂取が MeHg 投与後の組織中水銀濃度を減少させることを明らかとってきた。

今年度は、昨年度に実験した「組織中水銀濃度に

対するフラクトオリゴ糖とブランの併用による効果」の結果について確証を得るため、糞尿中の水銀量を測定した。その結果、糞と尿を合わせた水銀排泄量は、いずれの群も対照群と比べて有意に増加したが、フラクトオリゴ糖とブランの併用による相加効果は認められなかった。この相加効果の結果は組織中水銀濃度と一致していた。最終的に、組織中水銀濃度に対するブランとフラクトオリゴ糖の併用による効果は、再現性が乏しく相加効果を示すとは言い難いという結論に至った。

[3] メチル水銀によるタンパク質機能変動とその防御因子に関する研究(基盤研究)

鵜木隆光(基礎研究部)

生体内のタンパク質の機能制御において、システイン残基のチオール基のレドックス(酸化還元)状態は重要である。近年、チオール基にサルフェン硫黄が付加し、超硫黄化されることが明らかとなった。MeHgは親電子性を有するため、システイン残基を付加修飾しタンパク質の機能を変調させる。しかしながら、チオール基の超硫黄化が担うタンパク質機能制御とそれに対するMeHg曝露の影響は明らかではない。そこで本年度は超硫黄化タンパク質特異的なブルダウン法を活用し、MeHg曝露及び非曝露ラット初代培養神経細胞より超硫黄化タンパク質の分取を行い、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曝露用量依存的に超硫黄化が減少しうる698種の候補タンパク質が同定された。同定されたタンパク質の一部につき生化学的手法による解析を行ったところ、細胞死の実行役であるプロテアーゼCaspase-3のMeHg依存的な超硫黄化の減少が確認された。Caspase-3の超硫黄化はその活性を抑制してアポトーシスを減少させることが近年報告されている。このことから、超硫黄化を介したタンパク質の機能制御がMeHg曝露によって攪乱されることが推察される。本研究課題を含め学会発表を3件行った。

[4] メチル水銀毒性センサーの開発と毒性機序の解析(基盤研究)

住岡暁夫(基礎研究部)

メチル水銀(MeHg)の曝露は、脳内で親電子ストレスを誘導し様々な過程を経て神経細胞死を引き起こす。そこで、MeHgにより神経細胞死に至る後期毒性機序について研究に取り組む。このために、MeHg毒性のセンサーベクターを開発するとともに、MeHgによる毒性メカニズムを検証する。

MeHgの毒性機序の解明にあたり、従来のMeHgと求核性物質のバランスの破綻(バランスモデル)に加え、親電子物質・求核性物質・タンパク質間で特異性を有するモデル(標的型モデル)を提唱する。そして、細胞ごとの標的タンパク質の発現分布の違いがMeHgの細胞特異性を担うのではないかと予想し、検証を行っている。

(1) MeHgによる神経細胞の毒性機序に関する研究

前年度までに、MeHgや親電子物質と対象タンパクとの特異性を確認している。本年度は、MeHgによる毒性に対する求核性物質の特異性の有無について検証を行った。MeHg毒性に対する阻害効果が報告されているEbselen, Troloxについて、初代培養小脳顆粒細胞、Cos-7細胞、HEK293細胞、SH-SY5Y細胞、N2a細胞における阻害効果を検証した。その結果、小脳顆粒細胞では、Ebselen(またはTrolox)感受性のある細胞死と感受性のない細胞死の2つの成分、Cos-7細胞ではEbselenに感受性のない細胞死、HEK293細胞、SH-SY5Y細胞、N2a細胞ではEbselen感受性のある細胞死の3パターンに分類され、阻害剤の細胞間での特異性が示された。

(2) MeHg毒性のセンサーベクターの開発に関する研究

前年度までに、MeHg毒性センサーを開発・改善し、毒性センサーとしての評価を行った。本年度は、センサーマウス作製を想定し、センサーベクターを定常発現する細胞株を作成した。その結果、MeHgへ反応性を示す細胞株が得られ、センサーベクター導入自体の毒性などの問題は見られなかった。また、センサーマウスの作製においては、センサーベクターの2つの構成因子のうち、レポーター側pCT-Lucの遺伝子導入マウスを作製中で、pCT-LucをもつF0マウスを4匹作出している。

次に、各種毒性センサーの標的型モデルの検証を阻害剤によって検証した。毒性センサーとして、ERストレスセンサーERAI-Luc、酸化ストレスセンサーNrf2-Luc/Keap1、MeHg 毒性センサーLuc-491Sec を利用した。その結果、MeHg による毒性に対し ERAI-Luc は細胞特異性を示し、Nrf2-Luc/Keap1 は Ebselen により阻害されたが、Luc-491Sec は Ebselen 感受性は観察されなかった。1 の結果と合わせ、小脳顆粒細胞や Cos-7 細胞で観察された MeHg による細胞死はセレノタンパクによるものと予想できる。

(3) セレノプロテインの毒性機序の解析

1、2 の結果から MeHg による毒性の標的の一つはセレノタンパクによるものと予想できる。しかしながら、セレノタンパクによる毒性の機序は機能欠損・機能獲得いずれであるかなど不明な点が多い。そこでタンパクの毒性や毒性防御機能を評価する実験系を構築した。1 つめは、RNA 干渉法による遺伝子抑制を利用する pH1-shRNA とレポーターpTK-Luc を組み込んだ shRNA-Luc で、現在までにセレノタンパク DIO3 の抑制で MeHg 毒性の低減を確認した。2 つめは、トランスポゾンによる遺伝子組み換えを利用したタンパクの長期的な毒性評価法で、現在までに特に強い毒性を示すセレノタンパクとして GPx2 を見出した。

以上の通り、MeHg の細胞特異性の問題に取り組み、標的型モデルを検証し阻害剤の特異性によって MeHg の毒性を分類することに成功した。さらにセンサーベクターの阻害剤感受性実験から、標的の一つとしてセレノタンパクに注目した。そして、セレノタンパクの毒性機序を検証する実験系を構築するなど、大きな進展が得られた。

■病態メカニズムグループ(プロジェクト研究)

[1]メチル水銀による神経毒性メカニズムとその予防および治療に関する基礎研究(PJ-23-01)

Fundamental research on neurotoxic mechanism of methylmercury and its prevention and treatment

[主任研究者]

藤村成剛(基礎研究部)

研究の総括、実験全般の実施

[共同研究者]

永野匡昭、住岡暁夫、鶴木隆光(基礎研究部)

実験全般の技術協力

中村政明(臨床部)

臨床サンプルを用いたバイオマーカー探索

中村 篤(臨床部)

メチル水銀中毒モデルにおける神経症状解析

臼杵扶佐子(鹿児島大学)

研究全般に対する助言

上原 孝(岡山大学)

神経変性疾患におけるメチル水銀毒性の関与解析

栗田尚佳(岐阜薬科大学)

神経発達期におけるメチル水銀によるエピジェネティクス変化解析

[区分]

プロジェクト研究

[重点項目]

メチル水銀曝露の健康影響評価と治療への展開

[グループ]

病態メカニズム

[研究期間]

2020年度-2024年度(5ヶ年)

[キーワード]

メチル水銀(Methylmercury)、選択的細胞傷害(Selective cytotoxicity)、個体感受性(Sensitivity of individuals)、予防及び治療(Prevention and

treatment)

[研究課題の概要]

現在まで解明されていないメチル水銀の神経毒性メカニズム(選択的細胞傷害および個体感受性)について、培養神経細胞およびメチル水銀中毒モデル動物を用いて実験的に明らかにする。

また、明らかになった神経毒性メカニズムを元に、その神経毒性を予防および治療する薬剤等の効果について実験的に検証する。

[背景]

メチル水銀の主な標的器官は脳神経系であるが、毒性感受性は脳の発達段階で異なるのみならず、同年齢層においても部位や細胞によって異なる。例えば、成人期においてメチル水銀曝露は、大脳皮質の一部、小脳の顆粒細胞、後根神経節に細胞死を引き起こすが、その他の神経細胞では病変は認められない。これまでの研究において小脳における細胞選択性に抗酸化酵素が重要な役割を果たしていること(文献¹⁾)および胎児性曝露における神経の脆弱性にシナプス形成不全が関与している事(文献²⁾)が示唆されているが、全体的な解明にまでには至っていない。さらに、個体間でメチル水銀曝露量と重症度が必ずしも相関しないことから、その感受性には個体差があると考えられる。このようなメチル水銀毒性の選択的細胞傷害および個体感受性については未だ情報が不足しており、メチル水銀中毒の診断、予防および治療を行う上での障害となっている。

メチル水銀は再生困難な神経細胞を傷害するため、重篤かつ不可逆的な神経機能障害をもたらす。しかしながら、メチル水銀毒性は、予防または早期の進行抑制によりその毒性を軽減できる可能性がある(文献³⁻⁵)。また、一旦進行した神経症状についても薬剤等の処置によってその神経症状を軽減できる可能性もある(文献³⁻⁶)。

[目的]

培養神経細胞及びメチル水銀中毒モデル動物から採取した選択的細胞傷害を示す細胞群を用いて、分子病理学的、生化学的、分子生物学的な手法により、細胞分化・細胞増殖等の細胞学的問題に関わる因子について検討し、メチル水銀の選択的細胞傷害について明らかにする。また、これらの知見を進展させて、個体のメチル水銀感受性を左右する因子を明らかにする。さらに、薬剤等のメチル水銀毒性に対する効果を実験的に検証する。以上の研究によって、メチル水銀中毒の診断、毒性防御及び治療に応用することを旨とする。

さらに、本研究では本研究センターでは行っていないメチル水銀毒性の研究領域(小胞体ストレス、次世代影響等)について、外部研究機関との共同研究を積極的に行い、論文発表および学会発表に繋げる。

[期待される成果]

メチル水銀の選択的細胞傷害メカニズムおよび個体感受性に関する知見により、メチル水銀中毒の診断への寄与が期待される。さらに、明らかになった神経毒性メカニズムを元に、その神経毒性を予防および治療する薬剤等の効果について実験的に検証することによって、メチル水銀による神経障害を予防および治療する薬剤等の開発に繋がる可能性がある。

また、選択的細胞傷害と個体感受性の問題は、メチル水銀中毒だけではなく、他の神経向性中毒物質や環境ストレス因子、さらには神経変性疾患の病態解明にも繋がること期待される。さらに、既に確立された神経毒性の評価系(文献^{1,5})においてメチル水銀以外の環境毒及び神経変成疾患原因物質に対する薬剤の改善効果についても検討し、全般的な神経機能障害の軽減に繋がることも期待できる。

[年次計画概要]

1. 2020 年度

1-1. メチル水銀神経毒性の選択的細胞傷害に関する基礎研究

メチル水銀妊娠期曝露ラットにおける母体脳のシ

ナプス変化について研究結果をまとめ、論文化を行う。また、“大脳皮質神経細胞”と“海馬神経細胞”をラット脳から分離培養し、メチル水銀毒性に対する脆弱性/抵抗性の違いについて明らかにする。

1-2. メチル水銀神経毒性の個体感受性およびバイオマーカーに関する基礎研究

ラットを用いたメチル水銀毒性の予測マーカーについての研究結果をまとめ、論文化を行う。

1-3. メチル水銀による神経障害性疼痛の発症及びその薬剤効果に関する基礎研究

ラットを用いてメチル水銀曝露による神経障害性疼痛発症メカニズムを明らかにし、その研究結果をまとめ、学会発表および論文化を行う。また、本モデルラットを用いて、薬剤(ガバペンチン)による疼痛治療効果を明らかにする。

1-4. 外部研究機関との共同研究

本研究センターで行っていないメチル水銀毒性の研究分野(小胞体ストレス、エピゲノム等)について外部研究機関と共同研究を行い、学会発表および論文化を行う。

2. 2021 年度

2-1. メチル水銀神経毒性の選択的細胞傷害に関する基礎研究

ラット脳から分離培養した“大脳皮質神経細胞”と“海馬神経細胞”の遺伝子発現について網羅的な解析を行う。以上の研究結果をまとめ、学会発表および論文化を行う。

2-2. メチル水銀神経毒性の個体感受性およびバイオマーカーに関する基礎研究

より鋭敏なメチル水銀毒性の予測マーカーの探索のため、メチル水銀中毒モデルラットにおける血中タンパク質のポリチオール化と神経症状の関係について明らかにする。

2-3. メチル水銀による神経障害性疼痛の発症 およびその薬剤効果に関する基礎研究

これまで行ってきたメチル水銀中毒モデルラットにおける神経障害性疼痛発症についての研究結果をまとめ、学会発表および論文化を行う。また、本薬剤(ROCK阻害剤およびガバペンチン)の予防/治療効果についても研究結果をまとめ、学会発表を行う。

2-4. 外部研究機関との共同研究

本研究センターで行っていないメチル水銀毒性の研究分野(小胞体ストレス, エピゲノム等)について外部研究機関と共同研究を行い、学会発表および論文文化を行う。

2-5. その他

執筆依頼されている学術書(3rd Edition of Handbook of Neurotoxicity)のメチル水銀神経毒性チャプター部分について執筆を行う。

3. 2022 年度

3-1. メチル水銀神経毒性の選択的細胞傷害に関する基礎研究

論文投稿中の網羅的遺伝子発現解析について受理に向けた対応を行う。さらに、海馬神経細胞に特異的に発現している因子(Transthyretin, BDNF等)について詳細な機能解析(siRNAによる細胞からの除去等)を行い、メチル水銀毒性における役割を確定する。また、メチル水銀以外の毒性物質(酸化ストレス物質, 興奮性アミノ酸等)に対する脆弱性/抵抗性の比較および特異的阻害剤(抗酸化物質, 興奮性アミノ酸受容体拮抗剤等)の効果についても解析し、両細胞のメチル水銀毒性に対する脆弱性/抵抗性の違いについてのメカニズムを明らかにする。

3-2. メチル水銀神経毒性の個体感受性およびバイオマーカーに関する基礎研究

より鋭敏なメチル水銀毒性の予測マーカーの探索のため、LC/MSを用いてメチル水銀中毒モデルラットにおける血中タンパク質のポリチオール化と神経症状の関係について明らかにする。

3-3. メチル水銀による神経障害性疼痛の発症及びその薬剤効果に関する基礎研究

これまで行ってきたメチル水銀曝露による視床傷害とメチル水銀中毒モデルラットにおける神経障害性疼痛に対する薬剤(ROCK阻害剤およびガバペンチン)の治療効果について研究結果をまとめ、学会発表および論文文化を行う。

3-4. 外部研究機関との共同研究

本研究センターで行っていないメチル水銀毒性の研究分野(小胞体ストレス, エピゲノム)について外部研究機関と共同研究を行い、学会発表および

論文文化を行う。

4. 2023 年度

4-1. メチル水銀神経毒性の選択的細胞傷害に関する基礎研究

海馬神経細胞に特異的に発現しているBDNFの下流経路である p44/42 MAPKの抗神経細胞死作用について詳細なメカニズム解析を行う。

4-2. メチル水銀神経毒性の個体感受性およびバイオマーカーに関する基礎研究

[令和4年度-6年度 科学研究費補助金・基盤研究(B), 課題番号 22H03768(代表)]

バイオマーカーの開発に向けた研究として、血中タンパクのポリチオール化判別のための LC-Mass等を用いた測定および血中エクソソーム中の miRNAの例数追加測定を行う。

4-3. メチル水銀による神経障害性疼痛の発症及びその薬剤効果に関する基礎研究

[令和元年度-4年度 学術研究助成基金助成金・基盤研究(C), 課題番号 19K07077(代表)]

これまで行ってきたメチル水銀中毒モデルラットにおける神経障害性疼痛に対するガバペンチンの治療効果について研究結果をまとめる。

4-4. 外部研究機関との共同研究

本研究センターで行っていないメチル水銀毒性の研究分野(小胞体ストレス, エピゲノム)について外部研究機関と共同研究を行い、学会発表および論文文化を行う。

5. 2024 年度

5-1. メチル水銀神経毒性の選択的細胞傷害に関する基礎研究

運動負荷モデルにおける脳内BDNF増加のメチル水銀毒性に対する効果について実験を行う。

5-2. メチル水銀神経毒性の個体感受性およびバイオマーカーに関する基礎研究

[令和4年度-6年度 科学研究費補助金・基盤研究(B), 課題番号 22H03768(代表)]

バイオマーカーの開発に向けた研究として、血中タンパクのポリチオール化判別のための LC-Mass等を用いた測定法を確立するとともに、細胞外小胞中の miRNAについての例数追加測定およびその

機能解析を行う。

5-3. メチル水銀による神経障害性疼痛の発症およびその薬剤効果に関する基礎研究

現在投稿中の論文「メチル水銀中毒モデルラットにおける神経障害性疼痛に対するガバペンチンの治療効果」について査読対応を行い、受理を目指す。

5-4. 外部研究機関との共同研究

本研究センターで行っていないメチル水銀毒性の研究分野(小胞体ストレス, エピゲノム等)について外部研究機関と共同研究を行い、学会発表および論文化を行う。

[2023年度の研究実施成果]

1. メチル水銀神経毒性の選択的細胞傷害に関する基礎研究

海馬神経細胞に特異的に発現しているBDNFの下流経路である p44/42 MAPKが抗神経細胞死作用に関与していることが明らかにし、論文投稿を行い、筆頭著者として1報の論文が国際学術雑誌に受理された(論文発表¹²)。さらに運動負荷モデルの実験を開始し、運動負荷によって脳内BDNFが増加することを確認した。

2. メチル水銀神経毒性の個体感受性およびバイオマーカーに関する基礎研究

[令和4年度-6年度 科学研究費補助金・基盤研究(B), 課題番号 22H03768(代表)]

バイオマーカーの開発に向けた研究として、血中タンパクのポリチオール化判別のための LC-Mass等を用いた測定法検討および細胞外小胞中のmiRNAの例数追加測定に伴う標的組織中のタンパク質解析を行った。その結果、バイオマーカーの候補miRNAを発見した。さらに、代表研究者として1報の学会発表(学会等発表¹⁹)を行った。

3. メチル水銀による神経障害性疼痛の発症およびその薬剤効果に関する基礎研究

[令和元年度-4年度 学術研究助成基金助成金・基盤研究(C), 課題番号 19K07077(代表)]

これまで行ってきたメチル水銀中毒モデルラットにおける神経障害性疼痛に対するガバペンチンの

治療効果について代表研究者として2報の学会発表(学会等発表^{20,21})を行うとともに国際学術雑誌に論文投稿を行った。

3. 外部研究機関との共同研究

本研究センターで行っていないメチル水銀毒性の研究分野(小胞体ストレス, エピゲノム)について外部研究機関と共同研究を行い、メチル水銀曝露による嗅覚系神経の細胞傷害および小胞体ストレスにおけるCHOP経路の関与について3報の学会発表(学会等発表²²⁻²⁴)を行うとともに2報の論文が国際学術雑誌に受理された(論文発表^{13,14})。また、当研究センターに岡山大医歯薬学総合研究科の学外講座として“生体金属作用学講座”を設置し、学生1名を受け入れた。

[備考]

本課題研究の一部は、以下の科学研究費助成事業に採択され、外部研究費を得ている。

- ▶ 課題名「環境毒性物質による神経/筋機能障害に対する神経軸索/筋線維再生治療の実験的研究」、令和元-4年度 科学研究費・基盤研究(C)(代表), 課題番号: 19K07077
- ▶ 課題名「メチル水銀中毒に対する個体感受性の違いを客観的に判定できるバイオマーカーの開発」、令和4-6年度 科学研究費補助金・基盤研究(B)(代表)

[研究期間の論文発表]

- 1) Fujimura M, Usuki F (2020) Pregnant rats exposed to low level methylmercury exhibit cerebellar synaptic and neuritic remodeling during the perinatal period. Arch. Toxicol., 94, 1335-1347.
- 2) Fujimura M, Usuki F, Unoki T (2020) Decreased plasma thiol antioxidant capacity precedes neurological signs in a rat methylmercury intoxication model. Food. Chem. Toxicol., 146, 111810.
- 3) Fujimura M*: Usuki F* (2020) Methylmercury-mediated oxidative stress and activation of the

- cellular protective system. *Antioxidants* (Basel), 9, 1004. *Co-first author.
- 4) Fujimura M, Usuki F, Nakamura A: Methylmercury induces hyperalgesia/allodynia through spinal cord dorsal horn neuronal activation and subsequent somatosensory cortical circuit formation in rats. *Arch. Toxicol.* 2021; 95, 2151-2162.
- 5) Hiraoka H, Nomura R, Takasugi N, Akai R, Iwawaki T, Kumagai Y, Fujimura M, Uehara T: Spatiotemporal analysis of the UPR transition induced by methylmercury in the mouse brain. *Arch. Toxicol.* 2021; 95: 1241-1250.
- 6) Go S, Kurita H, Hatano M, Matsumoto K, Nogawa H, Fujimura M, Inden M, Hozumi I: DNA methyltransferase- and histone deacetylase-mediated epigenetic alterations induced by low-level methylmercury exposure disrupt neuronal development. *Arch. Toxicol.* 2021; 95: 1227-1239.
- 7) Fujimura M*, Usuki F*: Methylmercury and cellular signal transduction systems. In: Kostrzewa R.M. (eds) *Handbook of Neurotoxicity*. Springer, Cham., 2022; pp 16. *Co-first author.
- 8) Fujimura M*, Unoki T*: Preliminary evaluation of the mechanism underlying vulnerability/resistance to methylmercury toxicity by comparative gene expression profiling of rat primary cultured cerebrocortical and hippocampal neurons. *J. Toxicol. Sci.* 2022, 47, 211-219. *Co-first author.
- 9) Fujimura M: Fasudil, a ROCK inhibitor, prevents neuropathic pain in Minamata disease model rats. *Toxicol. Lett.* 2022, 371, 38-45.
- 10) Nomura R, Takasugi N, Hiraoka H, Iijima Y, Iwawaki T, Kumagai Y, Fujimura M*, Uehara T*: Alterations in UPR signaling via methylmercury trigger neuronal cell death in the mouse brain. *Int. J. Mol. Sci.* 2022, 23, 15412. *Co-corresponding author.
- 11) Fujimura M, Usuki F: Cellular conditions responsible for methylmercury-mediated neurotoxicity. *Mechanisms of heavy metal toxicity. Int. J. Mol. Sci.* 2022, 23, 7218.
- 12) Fujimura M, Unoki T: BDNF specifically expressed in hippocampal neurons is involved in methylmercury neurotoxicity resistance. *Environ. Toxicol.* 2024, 39, 3149-3159.
- 13) Iijima Y, Miki R, Takasugi N, Iwawaki T, Kumagai Y, Fujimura M, Uehara T: Characterization of pathological changes in the olfactory system of mice exposed to methylmercury. *Arch. Toxicol.* in press.
- 14) Iijima Y, Miki R, Fujimura M, Oyadomari S, Uehara T: Methylmercury-induced brain neuronal death in CHOP-knockout mice. *J. Toxicol. Sci.* in press.
- [研究期間の学会発表]
- 2022年度までに18報
- 19) 藤村成剛, 鶴木隆光: メチル水銀毒性に対する耐性/脆弱性診断のための血中バイオマーカーの探索研究. *メタルバイオサイエンス研究会* 2023, 2023.10.
- 20) 藤村成剛: メチル水銀曝露はラット足底部に末梢および中枢神経傷害を介した神経障害性疼痛を引き起こす. *第50回日本毒性学会*, 2023. 6.
- 21) 藤村成剛, 臼杵扶佐子, 中村篤: メチル水銀曝露ラットに生じる疼痛閾値低下に対する各種薬剤の効果. *令和5年度メチル水銀研究ミーティング*, 2023.12.
- 22) 飯島悠太, 岩脇隆夫, 熊谷嘉人, 藤村成剛, 上原孝: メチル水銀曝露による小胞体ストレス依存性アポトーシスに対する化学修飾. *第50回日本毒性学会*, 2023. 6.
- 23) Iijima Y, Iwawaki T, Kumagai Y, Fujimura M, Uehara T: Methylmercury induces ER stress and subsequent activation of apoptosis pathway leading to neuronal cell death in the mouse brain. *12th International Congress of ASIATOX*, 2023. 7.
- 24) 三木凌平, 飯島悠太, 親泊政一, 藤村成剛, 上原孝: メチル水銀毒性における小胞体ストレス誘発性CHOP発現の影響. *令和5年度メチル水銀研究ミーティング*, 2023.12.

[文献]

- 1) Fujimura M, Usuki F (2014) Low *in situ* expression of antioxidative enzymes in rat cerebellar granular cells susceptible to methylmercury. Arch. Toxicol., 88, 109-113.
- 2) Fujimura M, Cheng J, Zhao W (2012) Perinatal exposure to low dose of methylmercury induces dysfunction of motor coordination with decreases of synaptophysin expression in the cerebellar granule cells of rats. Brain Res., 1464, 1-7.
- 3) Fujimura M, Usuki F, Kawamura M, Izumo S (2011) Inhibition of the Rho/ROCK pathway prevents neuronal degeneration in vitro and in vivo following methylmercury exposure. Toxicol. Appl. Pharmacol., 250, 1-9.
- 4) Fujimura M, Usuki F (2015) Methylmercury causes neuronal cell death through the suppression of the TrkA pathway: In vitro and in vivo effects of TrkA pathway activators. Toxicol. Appl. Pharmacol., 282, 259-266.
- 5) Fujimura M, Usuki F (2015) Low concentrations of methylmercury inhibit neural progenitor cell proliferation associated with up-regulation of glycogen synthase kinase 3 β and subsequent degradation of cyclin E in rats. Toxicol. Appl. Pharmacol., 288, 19-25.
- 6) Usuki F, Tohyama S (2011) Vibration therapy of the plantar fascia improves spasticity of the lower limbs of a patient with fetal-type Minamata disease in the chronic stage. BMJ Case Rep., pii: bcr082011469.

■病態メカニズムグループ(基盤研究)

[2]食品成分によるメチル水銀の健康リスク軽減に関する研究(RS-23-01)

Study on reducing the health risk of methylmercury by food ingredients

[主任研究者]

永野匡昭(基礎研究部)

研究の総括、実験全般の実施

[共同研究者]

藤村成剛(基礎研究部)

脳の病理学的検査、研究全般に対する助言

多田雄哉(環境・保健研究部)

腸内フローラ解析及び助言

瀬子義幸(元山梨県富士山科学研究所)

腸内細菌によるメチル水銀代謝に関する助言

[区分]

基盤研究

[重点項目]

メチル水銀曝露の健康影響評価と治療への展開

[グループ]

病態メカニズム

[研究期間]

2020年度－2024年度(5ヶ年)

[キーワード]

メチル水銀(Methylmercury)、食品成分(food ingredients)、排泄(Excretion)

[研究課題の概要]

食物の機能からメチル水銀(MeHg)の健康へのリスクを軽減することを目的として、試験管内で有効な食品成分を探索し、その有効性について実験動物を用いて検証する。

[背景]

現代の MeHg 曝露は、主に魚介類の摂食によるも

のである。第 61 回 FAO/WHO 合同食品添加物専門家会議における MeHg の再評価以降、魚食文化を有する我が国においても妊婦を対象とした魚介類等の摂食に対して勧告が行われた。これらの魚介類等にはクジラ・イルカやマグロ等も含まれており、我が国にはこれらをよく食べる地域も存在する。一方、世界には海洋哺乳動物や魚の摂食を介した MeHg に対してリスクが高い集団が存在する¹⁾ことが報告されている。このように、水銀は世界規模での環境汚染物質である。水銀に特化した国際会議 International Conference on Mercury as Global Pollutant 2019 において取り上げられていたテーマの 1 つに「Genetics, gastrointestinal and nutrient factors impacting effects and uptake of mercury」があり、本研究課題はこれに当てはまる。MeHg の蓄積と排泄に対する食品成分の影響に関する先行研究として、小麦ふすま(ブラン)による水銀排泄速度の増大や組織中水銀濃度の減少²⁾がある。そのメカニズムについては腸内細菌による MeHg 代謝の活性化と推察されているが、確証が得られていない。

これまでに我々は、MeHg 単回経口投与後のマウス組織中水銀濃度に対する効果について検討してきた。その結果、ブランの効果は尿及び糞中への水銀排泄促進によるものであり、糞中への水銀排泄メカニズムは腸内細菌による MeHg 代謝の活性化以外であることが示唆された。また、難消化性多糖類のうち、フラクトオリゴ糖は MeHg 単回経口投与後の糞中への水銀排泄を促し、脳を含む組織中水銀濃度を減少させる³⁾ことを明らかとした。更に、フラクトオリゴ糖による水銀排泄メカニズムは、おそらく腸内細菌の MeHg 代謝の活性化によることが示唆された。

[目的]

本研究の目的は、水銀の排泄を促す食品成分又はその排泄メカニズムを利用したメチル水銀のリスク低減について検討し、基礎的知見を得ることである。

[期待される成果]

MeHg の吸収を抑える、又は MeHg の排泄を促す成分を含む食品を摂取することにより、魚介類のメルトは生かし、魚介類摂食による MeHg の健康へのリスクを軽減させるための食べ合わせやレシピの提案に繋がることを期待される。その結果、健康の維持・増進を図るうえで食生活の助けとなり、人々の安心と安全に貢献できると考える。

[年次計画概要]

1. 2020 年度

- (1) MeHg と結合/吸着する食品成分の探索:試験管内実験
- (2) 組織中水銀濃度に対するブランとフラクトオリゴ糖の併用による効果
- (3) 前中期計画で得られた知見「MeHg 単回投与後のフラクトオリゴ糖の効果」に関する論文作成
- (4) 前中期計画 2015 で得られた糞サンプルの水銀測定

2. 2021 年度

- (1) (継続) 組織中水銀濃度に対するブランとフラクトオリゴ糖の併用による効果
- (2) MeHg の健康リスクに対するブランの効果(毒性用量):体重と後肢の協調運動を指標
- (3) 前中期計画で得られた知見「MeHg 単回投与後のブランの効果」に関する論文作成

3. 2022 年度

- (1) (継続) 組織中水銀濃度に対するブランとフラクトオリゴ糖の併用による効果
- (2) (継続) MeHg の健康リスクに対するブランの効果(毒性用量):脳病理学的検査の実施
- (3) 「ブランの水銀排泄作用」に関するデータ解析及び追加分析

4. 2023 年度

- (1) (継続) 組織中水銀濃度に対するブランとフラクトオリゴ糖の併用による効果
昨年度に得られた糞尿サンプルの水銀測定
- (2) (継続) 「ブランの水銀排泄作用」に関するデータ取り纏め、追加分析及び論文作成

- (3) 2021-2022 年度に得られた知見「MeHg の健康リスクに対するブランの効果」に関する論文作成

- (4) MeHg の健康リスクに対する食品成分の効果
被験物質の用量及び行動試験など実験条件の検討

- (5) 2020 年度 (4) で測定した「低濃度 MeHg 連続投与時のブラン又はフラクトオリゴ糖の効果」に関する論文作成

5. 2024 年度

- (1) (継続) MeHg の健康リスクに対する食品成分の効果
- (2) (継続) 「低濃度 MeHg 連続投与時のブラン又はフラクトオリゴ糖の効果」に関する論文作成

[2023 年度の研究実施成果の概要]

1. 組織中水銀濃度に対するブランとフラクトオリゴ糖の併用による効果

今年度は、昨年度報告した組織中水銀濃度の結果について確証を得るため、既存の糞尿を用いて水銀量を測定した。糞尿を合わせた累積水銀排泄量にブランとフラクトオリゴ糖の併用による相加作用は認められず(データは示していない)、これは組織中水銀濃度と一致していた。これらの結果は、ブラン単独の効果が弱いためフラクトオリゴ糖との併用による相加効果が出にくかったと考えられた。

最終的に、組織中水銀濃度に対するブランとフラクトオリゴ糖の併用による効果は、再現性が乏しく相加効果を示すとは言い難いという結論に至った。

そのほか、ブランの水銀排泄作用メカニズムについて検討を行い、さらに MeHg の健康リスクに対するブランの効果等についても学会発表を行った(学会発表 5 及び 6)。

[研究期間の論文発表]

- 1) Nagano M, Fujimura M, Tada Y, Seko Y. (2021) Dietary fructooligosaccharides reduce mercury levels in the brain of mice exposed to methylmercury. *Biol. Pharm. Bull.*, 44, 522-527.
- 2) Nagano M, Fujimura M. (2021) Intake of wheat bran after administration of methylmercury reduces

mercury accumulation in mice. *Fundam. Toxicol. Sci.*, 8, 243-248.

[研究期間の学会発表]

- 1) 永野匡昭, 藤村成剛:メチル水銀連続投与後の組織中水銀濃度に対する食品成分の影響. 生命金属に関する合同年会 (ConMetal 2020), Web meeting, 2020. 11.
- 2) 永野匡昭, 藤村成剛: メチル水銀の蓄積と排泄に対するフラクトオリゴ糖の効果. メタルバイオサイエンス研究会 2021, 横浜. 2021. 10.
- 3) 永野匡昭, 藤村成剛: メチル水銀の蓄積と毒性に対する小麦ふすまの効果. メタルバイオサイエンス研究会 2022, 京都. 2022. 10.
- 4) Nagano M: Usefulness of the Functional Food Ingredients on Reducing Methylmercury Burden: Wheat Bran and Fructooligosaccharides. NIMD Forum 2022, Minamata, 2022. 11.
- 5) 永野匡昭, 藤村成剛, 多田雄哉:小麦ふすまの水銀排泄作用メカニズムの検討. メタルバイオサイエンス研究会 2023, 岐阜, 2023. 10.
- 6) 永野匡昭, 藤村成剛:小麦ふすまによる水銀排泄とメチル水銀の毒性軽減. 令和5年度メチル水銀研究ミーティング, 東京, 2023. 12.

[文献]

- 1) United Nations Environment Programme. (2019) Global Mercury Assessment 2018, 1-58.
- 2) Rowland IR, Mallet AK, Flynn J, et al. (1986) The effect of various dietary fibres on tissue concentration and chemical form of mercury after methylmercury exposure in mice. *Arch. Toxicol.*, 59, 94-98.
- 3) Nagano M, Fujimura M, Tada Y, Seko Y. (2021) Dietary fructooligosaccharides reduces mercury levels in the brain of mice exposed to methylmercury. *Biol. Pharm. Bull.*, 44, 522-527.

■病態メカニズムグループ(基盤研究)

[3]メチル水銀によるタンパク質機能変動とその防御因子に関する研究(RS-23-02)

Research on the methylmercury-induced alteration of protein function and its protective factors

[主任研究者]

鵜木隆光(基礎研究部)

研究の総括、実験全般の実施

[共同研究者]

藤村成剛(基礎研究部)

研究全般に対する助言、動物実験のサポート

熊谷嘉人(九州大学)

研究全般に対する助言

秋山雅博(慶応義塾大学)

研究全般に対する助言

[区分]

基盤研究

[重点項目]

メチル水銀曝露の健康影響評価と治療への展開

[グループ]

病態メカニズム

[研究期間]

2020年度-2024年度(5ヶ年)

[キーワード]

メチル水銀 (Methylmercury)、レドックスバランス (Redox balance)、超硫黄分子 (Supersulfide)、活性イオウ分子 (Reactive sulfur species)、サルフェン硫黄 (Sulfane sulfur)

[研究課題の概要]

メチル水銀 (MeHg) 曝露による生体影響をサルフェン硫黄を介したレドックス制御という観点から解析し、MeHgの毒性機序及びその防御因子について明らかとする。

[背景]

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とされている。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ビスメチル水銀スルフィド [(MeHg)₂S]の生成に寄与する¹⁾。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ースルフィド (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²⁾。これら活性イオウ分子 (Reactive sulfur species; 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³⁾。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^{4,5)}。

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ポリイオウ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ポリイオウ化が行われる機序も発見された⁶⁾。このサルフェン硫黄を介したポリイオウ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、システイン残基の過酸化やMeHg付加を防ぐ可逆性担保機構としての重要性が示され^{3,7)}、MeHg毒性との関連も明らかにされ始めている⁸⁾。

[目的]

ポリオウ化を介したタンパク質の機能制御に焦点を当て、神経細胞における特異的分子のポリオウ化被修飾状態の変動がもたらす機能変化をシグナル毒性や細胞機能と紐づける試みにより、MeHg 毒性機序とその防御因子の解明を目指す。

[期待される成果]

サルフェン硫黄を介したレドックス制御という新たな観点から知見を得ることでMeHgによる毒性機序の理解に貢献するとともに、リスク評価及び毒性防御への寄与が期待される。

[年次計画概要]

1. 2020 年度

- (1) ポリオウ化タンパク質の定性的解析
タンパク質のポリオウ化修飾状態をゲルシフトアッセイにより解析する。
- (2) ポリオウ化タンパク質の定量的解析
タンパク質のポリオウ化修飾状態をプルダウンアッセイにより解析する。
- (3) 外部研究機関との共同研究
外部研究機関との共同研究を円滑に進めて、論文発表及び学会発表に繋げる。

2. 2021 年度

- (1) ポリオウ化タンパク質解析系の改良
細胞内在性レベルでのポリオウ化タンパク質の検出が可能となるよう解析系を改良する。
- (2) 細胞内在性タンパク質のポリオウ化変動解析
培養株化細胞をサルフェン硫黄ドナーや MeHg に曝露し、細胞内在性タンパク質のポリオウ化修飾変動を解析する。
- (3) 外部研究機関との共同研究
外部研究機関との共同研究を円滑に進めて、論文発表及び学会発表に繋げる。

3. 2022 年度

- (1) 脳内ポリオウ化タンパク質の探索
実験動物脳及びその初代培養神経細胞等を試料とし、プルダウンアッセイにより得たポリオウ化タンパク質の同定を行う。

- (2) ポリオウ化タンパク質への MeHg 曝露影響
脳内ポリオウ化タンパク質の MeHg 標的部位を同定し、タンパク質機能に与える影響を考察する。

- (3) 外部研究機関との共同研究

外部研究機関との共同研究を円滑に進めて、論文発表及び学会発表に繋げる。

4. 2023 年度

- (1) 脳内ポリオウ化タンパク質の機能解析

脳内ポリオウ化タンパク質の疑似ポリオウ化変異体を用い、MeHg 曝露による神経細胞機能変動への影響を解析する。

- (2) タンパク質のポリオウ化と MeHg 毒性防御解析
RSS 投与や RSS 産生酵素の発現により培養神経細胞におけるポリオウ化タンパク質の増加を解析する。併せて MeHg 曝露による細胞機能変動および細胞死の軽減を解析する。

- (3) 外部研究機関との共同研究

外部研究機関との共同研究を円滑に進めて、論文発表及び学会発表に繋げる。

5. 2024 年度

- (1) 前年度の解析を継続し、知見を整理する。

- (2) 外部研究機関との共同研究

外部研究機関との共同研究を円滑に進めて、論文発表及び学会発表に繋げる。

[2023 年度の研究実施成果]

神経細胞中のタンパク質のうち、MeHg 曝露依存的にポリオウ化変動するものを同定するため、MeHg 曝露又は未曝露のラット胎児大脳由来初代培養神経細胞を試料としてプルダウンアッセイを行い、ポリオウ化タンパク質を分取した。本分取試料を DIA 法によるプロテオミクスに供してタンパク質の同定と半定量解析を行った。その結果、MeHg 曝露用量依存的にポリオウ化が減少しうる 698 種の候補タンパク質が同定された。同定されたタンパク質の一部につき生化学的手法による解析を行ったところ、細胞死の実行役であるプロテアーゼ Caspase-3 の MeHg 依存的なポリオウ化の減少が確認された。Caspase-3 のポリオウ化はその活性を抑制してアポトーシスを減少させることが近年報告されている^{9,10)}。このことか

ら、ポリイオウ化を介したタンパク質の機能制御が MeHg 曝露によって攪乱されることが推察され、より詳細な解析を行いたい。本研究に関する学会発表を 2 件行った(学会発表^{10,11})。

種々の RSS の定量方法として、 β -(4-hydroxyphenyl) ethyl iodoacetamide を用いて付加体とした後に高速液体クロマトグラフ質量分析計(LC-MS)での検出が有用である。本年度は安定同位体標識内部標準物質(ISTD)の合成と精製を行い、被験物及び対応する ISTD を包括して定性・定量する LC-MS メソッドの構築を行った。

共同研究として RSS の細胞内量調整機構とその破綻による細胞死の誘導を明らかとした知見について学会発表を 1 件行った(学会発表⁹)。

[備考]

本研究の一部は日本学術振興会 科学研究費助成事業において基盤研究(C)(研究課題名: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, 2021-2023 年度)及び若手研究(課題名:活性イオウ分子に着目したメチル水銀の選択的細胞傷害に関する研究, 2019-2022 年度)に採択され、研究費を得ている。

[研究期間の論文発表]

- 1) Akiyama M, Unoki T, Kumagai Y (2020) Combined exposure to environmental electrophiles enhances cytotoxicity and consumption of persulfide. *Fundam. Toxicol. Sci.* 7, 161-166.
- 2) Akiyama M, Unoki T, Yoshida E, Ding Y, Yamakawa H, Shinkai Y, Ishii I, Kumagai Y (2020) Repression of mercury accumulation and adverse effects of methylmercury exposure is mediated by cystathionine γ -lyase to produce reactive sulfur species in mouse brain. *Toxicol. Lett.* 330, 128-133.
- 3) Fujimura M, Usuki F, Unoki T (2020) Decreased plasma thiol antioxidant capacity precedes neurological signs in a rat methylmercury intoxication model. *Food Chem. Toxicol.* 146, 111810.

4) Unoki T, Akiyama M, Shinkai Y, Kumagai Y, Fujimura M (2022) Spatio-temporal distribution of reactive sulfur species during methylmercury exposure in the rat brain. *J. Toxicol. Sci.* 47, 31-37.

5) Akiyama M*, Unoki T*, Aoki H, Nishimura A, Shinkai Y, Warabi E, Nishiyama K, Furumoto Y, Anzai N, Akaike T, Nishida M, Kumagai Y (2022) Cystine-dependent antiporters buffer against excess intracellular reactive sulfur species-induced stress. *Redox Biol.* 57, 102514.

*共同第一著者

[研究期間の学会発表]

- 1) 鵜木隆光, 秋山雅博, 新開泰弘, 熊谷嘉人, 藤村成剛: 活性イオウ分子を介した新電子ストレス防御. 第 47 回日本毒性学会学術年会, Web 開催, 2020. 7.
- 2) 鵜木隆光, 秋山雅博, 熊谷嘉人, 藤村成剛: 活性イオウ分子の脳内分布とメチル水銀感受性の連関. 生命金属に関する合同年会 2020, Web 開催, 2020. 11.
- 3) 鵜木隆光, 秋山雅博, 新開泰弘, 石井功, 熊谷嘉人: 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. 第 48 回日本毒性学会学術年会, 神戸/Web ハイブリッド開催, 2021. 7.
- 4) 鵜木隆光, 秋山雅博, 新開泰弘, 石井功, 熊谷嘉人: 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. フォーラム 2021 衛生薬学・環境トキシコロジー, Web 開催, 2021. 9.
- 5) 鵜木隆光, 秋山雅博, 熊谷嘉人, 藤村成剛: メチル水銀曝露における細胞内サルフェン硫黄の遷移. 第 49 回日本毒性学会学術年会, 札幌, 2022. 7.
- 6) 鵜木隆光, 秋山雅博, 熊谷嘉人, 藤村成剛: メチル水銀曝露による細胞内サルフェン硫黄の遷移. フォーラム 2022: 衛生薬学・環境トキシコロジー, 熊本, 2022. 8.
- 7) 鵜木隆光, 秋山雅博, 熊谷嘉人, 藤村成剛: メチ

ル水銀によるタンパク質結合性超硫黄分子の変動。
メタルバイオサイエンス研究会 2022, 京都, 2022.
10.

- 8) Unoki T: Protective function of supersulfides against methylmercury toxicity. NIMD Forum 2022, Minamata, 2022. 11.
- 9) 鶴木隆光, 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: Cystine-dependent antiporters prevent sulfur stress by excreting surplus supersulfide from cells. 第 50 回日本毒性学会学術年会, 横浜, 2023. 6.
- 10) 鶴木隆光, 秋山雅博, 熊谷嘉人, 藤村成剛: メチル水銀曝露による細胞内タンパク質超硫黄化の変動. フォーラム 2023: 衛生薬学・環境トキシコロジー, 広島, 2023. 9.
- 11) 鶴木隆光, 秋山雅博, 熊谷嘉人, 藤村成剛: 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. メタルバイオサイエンス研究会 2023, 岐阜, 2023. 10.

[文献]

- 1) Yoshida E, Toyama T, Shinkai Y, Sawa T, Akaike T, Kumagai Y (2011) Detoxification of Methylmercury by Hydrogen Sulfide-Producing Enzyme in Mammalian Cells. *Chem. Res. Toxicol.*, 24, 1633-1635.
- 2) Ida T, Sawa T, Ihara H, Tsuchiya Y, Watanabe Y, Kumagai Y, Suematsu M, Motohashi H, Fujii S, Matsunaga T, Yamamoto M, Ono K, Devarie-Baez NO, Xian M, Fukuto JM, Akaike T (2014) Reactive cysteine persulfides and S-polythiolation regulate oxidative stress and redox signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 111, 7606-7611.
- 3) Abiko Y, Yoshida E, Ishii I, Fukuto JM, Akaike T, Kumagai Y (2015) Involvement of Reactive Persulfides in Biological Dimethylmercury Sulfide Formation. *Chem. Res. Toxicol.*, 28, 1301-1306.
- 4) Akiyama M, Unoki T, Shinkai Y, Ishii I, Ida T, Akaike T, Yamamoto M, Kumagai Y (2019) Environmental electrophile-mediated toxicity in mice lacking Nrf2, CSE, or both. *Environ. Health Perspect.*, 127, 67002.
- 5) Unoki T, Akiyama M, Kumagai Y (2020) Nrf2 Activation and Its Coordination with the Protective Defense Systems in Response to Electrophilic Stress. *Int. J. Mol. Sci.*, 21, 545.
- 6) Akaike T, Ida T, Wei FY, Nishida M, Kumagai Y, Alam MM, Ihara H, Sawa T, Matsunaga T, Kasamatsu S, Nishimura A, Morita M, Tomizawa K, Nishimura A, Watanabe S, Inaba K, Shima H, Tanuma N, Jung M, Fujii S, Watanabe Y, Ohmuraya M, Nagy P, Feelisch M, Fukuto JM, Motohashi H (2017) Cysteinyl-tRNA synthetase governs cysteine polysulfidation and mitochondrial bioenergetics. *Nat. Commun.*, 8, 1177.
- 7) Dóka É, Ida T, Dagnell M, Abiko Y, Luong NC, Balog N, Takata T, Espinosa B, Nishimura A, Cheng Q, Funato Y, Miki H, Fukuto JM, Prigge JR, Schmidt EE, Arnér ESJ, Kumagai Y, Akaike T, Nagy P (2020) Control of protein function through oxidation and reduction of persulfidated states. *Sci. Adv.*, 6, eaax8358.
- 8) Nishimura A, Shimoda K, Tanaka T, Toyama T, Nishiyama K, Shinkai Y, Numaga-Tomita T, Yamazaki D, Kanda Y, Akaike T, Kumagai Y, Nishida M (2019) Depolysulfidation of Drp1 induced by low-dose methylmercury exposure increases cardiac vulnerability to hemodynamic overload. *Sci. Signal.*, 12, 587.
- 9) Braunstein I, Engelman R, Yitzhaki O, Ziv T, Galardon E, Benhar M (2020) Opposing effects of polysulfides and thioredoxin on apoptosis through caspase persulfidation. *J. Biol. Chem.*, 295, 3590-3600.
- 10) Ye X, Li Y, Lv B, Qiu B, Zhang S, Peng H, Kong W, Tang C, Huang Y, Du J, Jin H (2022) Endogenous Hydrogen Sulfide Persulfidates Caspase-3 at Cysteine 163 to Inhibit Doxorubicin-Induced Cardiomyocyte Apoptosis. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, 2022, 6153772.

■病態メカニズムグループ(基盤研究)

[4]メチル水銀毒性センサーの開発と毒性機序の解析(RS-23-03)

Development of sensor for methylmercury toxicity and research on the mechanism of methylmercury neurotoxicity

[主任研究者]

住岡暁夫(基礎研究部)

研究の総括、実験全般の実施

[共同研究者]

藤村成剛(基礎研究部)

研究全般に対する助言とサポート

[区分]

基盤研究

[重点項目]

メチル水銀曝露の健康影響評価と治療への展開

[グループ]

病態メカニズム

[研究期間]

2020 年度－2024 年度(5 年)

[キーワード]

メチル水銀(Methylmercury)、生体イメージング(Bioimaging)

[研究課題の概要]

メチル水銀(MeHg)の曝露は神経細胞死を引き起こすが、脳組織内での細胞特異性や発達時期による違いを担うメカニズムは不明である。しかし、個体へのMeHg曝露実験では、MeHgが脳に到達し神経細胞死にいたるまでの時期を捉え解析を行うことは困難である。そこで、MeHg毒性のセンサーベクターを開発し、毒性を可視化するとともに、MeHgによる神経細胞への障害作用を検証する。

[背景]

MeHgの毒性機序は、酸化ストレス傷害をトリガーとする。しかし、酸化ストレス傷害の作用は多岐にわたるため、MeHg曝露が中枢神経系で神経細胞死をもたらす経路や、MeHgの病変部位の特異性を説明する分子メカニズムなど、未だ不明な点が多い(図1)。

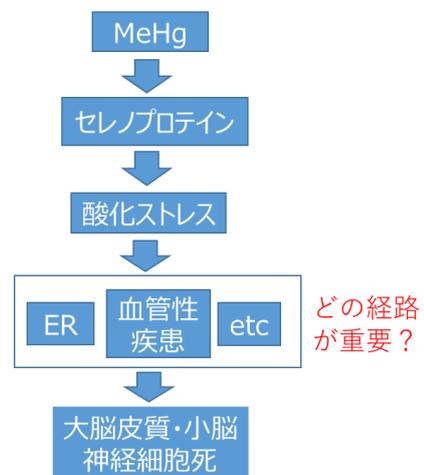


図1. MeHgの毒性経路の概念図

脳内のMeHgはセレノプロテインに作用し、酸化ストレスを誘導し、様々な過程を経て神経細胞死を引き起こす。

MeHg曝露が神経細胞死をもたらす経路を解析するにあたり、MeHgが脳に移行してから神経細胞死にいたるまでの適切な時期に観察する必要がある。しかし、動物実験においてMeHgの作用には個体差があり、MeHgの脳への移行は採取した組織中のHg量を測定し評価するため、煩雑な手間と時間的・空間的分解能の低さが問題になる。そこで、MeHgによるセレノシステインの翻訳障害¹⁾を利用して、MeHgによる障害を可視化するセンサーベクターを開発する。

脳の高次機能は神経回路網による情報伝達で維持されている。この情報伝達は、軸索と神経細胞間を繋ぐシナプスで行われる。そこで、MeHgによる神経細胞への毒性の解析にあたって、神経細胞の機能を担うシナプスと軸索に注目して解析を行う。

興奮毒性によるシナプスの異常は酸化ストレスとの関連性が報告されている²⁾。興味深いことに、興奮毒性の主要な因子であるグルタミン酸受容体は、サブユニット毎に特異的な脳内の発現分布・発生時期を示し³⁾ており、MeHgの細胞選択性と関連する可能性がある。そこで、MeHgによるシナプスの興奮毒性経路への作用を検証する。

神経細胞内で情報伝達を担う軸索のマーカータンパク質として微小管重合タンパク質 Tau が知られている。Tau の病変は ALS やアルツハイマー病などの様々な神経変性疾患の原因と考えられている。興味深いことに、MeHg は微小管の重合を阻害し、マウスへの MeHg 曝露は Tau 蛋白質のリン酸化修飾の増大を引き起こす^{4,5)}。そこで、MeHg による軸索のタンパク質への作用を検証する。

本計画は 2018-2019 年度に実施した「メチル水銀による中枢神経系における後期毒性機序の研究」で提案した研究案から、成果の得られた計画を中心に発展させた継続課題である。

[目的]

MeHg の細胞選択性や発達時期依存性のメカニズムを明らかにしたい。その際に適切な解析時期を把握する必要があり、この問題を解決するため MeHg 毒性のセンサーベクターを開発する。並びに、神経細胞の情報伝達を担うシナプスと軸索に注目し、MeHg の神経細胞への毒性機序を研究する。

[期待される成果]

MeHg 毒性のセンサーベクターの開発によって、これまで困難であった細胞やマウスの生体を用いたりアルタイムの MeHg 障害の観察が可能になる。このセンサーベクターを利用した MeHg 毒性の可視化マウスによって、神経細胞死へ至るまでのメカニズムの理解とこれまで見落とされていた障害の発見などが期待できる。

MeHg と神経細胞の興奮毒性の主要な因子であるグルタミン酸受容体のサブユニット発現との関連を明らかにすることで、MeHg の選択的神経傷害メカニズムへの知見が得られる。そして、Tau 蛋白質を代表と

する軸索タンパク質の異常を観察することで、MeHg による神経機能障害への知見が得られると期待できる。

[2023 年度の研究実施成果]

本研究では MeHg の細胞特異的な毒性機序の解明にあたり、従来の MeHg と求核性物質のバランスの破綻による親電子ストレス(バランスモデル)に加え、親電子物質・求核性物質・タンパク質間で特異性を有するモデル(標的型モデル)を提唱する。そして、細胞ごとの標的タンパク質の発現分布の違いが MeHg の細胞特異性を担うのではないかと予想し、検証を行っている。

1. MeHg による神経細胞の毒性機序に関する研究

前年度までに、MeHg や親電子物質と対象タンパク質との特異性を確認している。本年度は、MeHg による毒性に対する求核性物質の特異性の有無について検証を行った。MeHg 毒性に対する阻害効果が報告されている Ebselen, Trolox について、初代培養小脳顆粒細胞、Cos-7 細胞、HEK293 細胞、SH-SY5Y 細胞、N2a 細胞における阻害効果を検証した。その結果、小脳顆粒細胞では、Ebselen(または Trolox)感受性のある細胞死と感受性のない細胞死の 2 つの成分、Cos-7 細胞では両者に感受性のない細胞死、HEK293 細胞、SH-SY5Y 細胞、N2a 細胞では Ebselen 感受性のある細胞死の 3 パターンに分類され、阻害剤の細胞間での特異性が示された。

2. MeHg 毒性のセンサーベクターの開発に関する研究

前年度までに、MeHg 毒性センサーを開発・改善し、毒性センサーとしての評価を行った。本年度は、センサーマウス作製を想定し、センサーベクターを定常発現する細胞株を作成した。その結果、MeHg へ反応性を示す細胞株が得られ、センサーベクター導入自体の毒性などの問題は見られなかった。また、センサーマウスの作製においては、センサーベクターの 2 つの構成因子のうち、レポーター側 pCT-Luc の遺伝子導入マウスを作製中で、pCT-Luc をもつ F0 マウスを 4 匹作出している。

次に、各種毒性センサーの標的型モデルの検証を阻害剤によって検証した。毒性センサーとして、ER ストレスセンサーERAI-Luc、酸化ストレスセンサーNrf2-Luc/Keap1、MeHg 毒性センサーLuc-491Sec を利用した。その結果、MeHg による毒性に対し ERAI-Luc は細胞特異性を示し、Nrf2-Luc/Keap1 は Trolox により阻害されたが、Luc-491Sec は Ebselen、Torlox 感受性は観察されなかった。1 の結果と合わせ、小脳顆粒細胞や Cos-7 細胞で観察された MeHg による細胞死はセレノタンパクによるものと予想できる。

3. セレノプロテインの毒性機序の解析

1. 2. の結果から MeHg による毒性の標的の一つはセレノタンパクによるものと予想できる。しかしながら、セレノタンパクによる毒性の機序は機能欠損・機能獲得いずれであるかなど不明な点が多い。そこでタンパクの毒性や毒性防御機能を評価する実験系を構築した。1 つめは、RNA 干渉法による遺伝子抑制を利用する pH1-shRNA とレポーターpTK-Luc を組み込んだ shRNA-Luc で、現在までにセレノタンパク DIO3 の抑制で MeHg 毒性の低減を確認した。2 つめは、トランスポゾンによる遺伝子組み換えを利用したタンパクの長期的な毒性評価法で、現在までに特に強い毒性を示すセレノタンパクとして GPx2 を見出した。

以上の通り、MeHg の細胞特異性の問題に取り組み、標的型モデルを検証し阻害剤の特異性によって MeHg の毒性を分類することに成功した。さらにセンサーベクターの阻害剤感受性実験から、標的の一つとしてセレノタンパクに注目した。そして、セレノタンパクの毒性機序を検証する実験系を構築するなど、大きな進展が得られた。

[研究期間の論文発表]

なし

[研究期間の学会発表]

1) Sumioka A. Methylmercury induces abnormal localization of AMPA-type Glutamate receptor.

Annual meeting of MBSJ, Fukuoka, 2020. 12.

- 2) Sumioka A. Methylmercury induces abnormal localization of AMPA-type Glutamate receptor. Methylmercury meeting, online, 2021. 1.
- 3) Sumioka A, Fujimura M and Usuki F Development of sensors for methylmercury toxicity. Annual meeting of JSOT, online, 2021. 7.
- 4) Sumioka A, and Fujimura M Development of sensors for methylmercury toxicity. Methylmercury meeting, online, 2022. 2.
- 5) Sumioka A, Development of a sensor for the methylmercury toxicity. NIMD forum, Minamata, 2022. 11.
- 6) Sumioka A, Research on the cell-specificity of methylmercury toxicity. Methylmercury meeting, Tokyo, 2023. 12.

[文献]

- 1) Usuki F, Yamashita A, and Fujimura M. (2011) Post-transcriptional defects of antioxidant selenoenzymes cause oxidative stress under methylmercury exposure. J Biol Chem. 286, 6641-6649.
- 2) Bondy S C, and LeBel C P. (1993) The relationship between excitotoxicity and oxidative stress in the central nervous system. Free Radic Biol Med. 14, 633-642. Review.
- 3) Tomita S, Chen L, Kawasaki Y, Petralia R S, Wenthold R J, Nicoll R A and Brecht D S. (2003) Functional Studies and Distribution Define a Family of Transmembrane Ampa Receptor Regulatory Proteins. Journal of Cell Biology 161, 805-816.
- 4) Fujimura M, Usuki F, Sawada M and Takashima A (2009) Methylmercury Induces Neuropathological Changes with Tau Hyperphosphorylation Mainly through the Activation of the C-Jun-N-Terminal Kinase Pathway in the Cerebral Cortex, but Not in the Hippocampus of the Mouse Brain. Neurotoxicology 30, 1000-1007.
- 5) Miura K, Inokawa M, and Imura N (1984) Effects of methylmercury and some metal ions on microtubule

networks in mouse glioma cells and in vitro tubulin polymerization. *Toxicology and Applied Pharmacology* 73, 218-231.