

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ブロックする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3年度概要は以下のとおりである。

[研究課題名と研究概要]

[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

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い、メチル水銀毒性に耐性を示す海馬神経細胞に特異的に発現している因子（Transthyretin, BDNF等）を見出した。また、メチル水銀以外の毒性物質（グルタミン酸等）に対する脆弱性/抵抗性についても解析し、海馬神経細胞がグルタミン酸毒性に対しては逆に脆弱性を示すことを明らかにした。以上の研究結果をまとめ、学会および研究会で発表を行うとともに論文投稿を行った。

(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

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について測定法の開発検討を行った。

(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

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の発症メカニズムについての研究をまとめ、論文投稿を行い、受理/掲載された。また、本モデルにおいて視床傷害が生じていることを発見し、薬剤（ROCK阻害剤）の治療効果とともに研究結果をまとめ、論文投稿の準備を行った。

(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、学会および研究会で発表を行うとともに論文投稿を行い、受理/掲載された。

(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い、受理/掲載された。

[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、魚介類摂食によるメチル水銀（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、小麦ふすまやフラクトオリゴ糖摂取が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してきた。

今年度はMeHgの健康リスクに対する食品成分の効果を評価するにあたり、実験条件の確立と併せて小麦ふすまの効果について検討した。また、茶成分や小麦ふすま成分とMeHgとの結合について試験管内実験を行った。その結果、緑茶及び紅茶成分とMeHgとの結合は認められなかった。一方、小麦ふすま成分であるリグニンについては、添加したMeHgの10%が結合していることを確認した。そのほか、小麦ふすまはMeHg投与後に摂取した場合においても、

糞尿への水銀排泄を促し、脳を含むマウスの組織中水銀濃度を減少する知見を論文として発表した。

[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)

鶴木隆光(基礎研究部)

高い求核性・抗酸化性を有する低分子化合物である活性イオウ分子(RSS)を介した MeHg 毒性防御機構を明らかとしてきた。その一環として脳の発達時期及び部位特異的な RSS 分布と MeHg 傷害特異性の連関を示唆する研究成果をとりまとめ、論文が受理・掲載された。

RSS 中のサルフェン硫黄はタンパク質のシステイン残基にも易転移しポリオウ化するが、神経細胞において MeHg 曝露による当該修飾変動と毒性影響に着目した研究は皆無である。これを明らかとするために本年度はポリオウ化タンパク質の定性・定量解析の要となる、アルキル化試薬を用いたプルダウンアッセイの高感度化を目指し最適化を行った。ヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞における内在レベルでのタンパク質ポリオウ化修飾が検出された。RSS モデル化合物の添加により増加する当該修飾は、MeHg の添加により減少したことから、RSS からタンパク質のシステイン残基へと転移したサルフェン硫黄が MeHg により奪取されることが示唆された。

本課題に関連した共同研究として、細胞内レドックスバランスの恒常性を維持する RSS 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。

[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。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 によるシナプスと軸索への障害作用を検証する。

(1)メチル水銀毒性のセンサーベクターの開発に関する研究

脳内にメチル水銀が曝露し神経細胞死が起こるまでの過程を捉えるため、メチル水銀毒性を簡便に見出すセンサーベクターを開発する。メチル水銀曝露による、タンパク質翻訳時のセレノシステイン挿入の障害を利用し、メチル水銀依存的な蛍光シグナルが得られるセンサーベクターを遺伝子工学的な手法で開発する。昨年度までに MeHg の毒性センサー Krab-U/Luc を開発した。本年度はセンサーの機能評価のため、既存のセンサーとの比較、他の毒性物質と MeHg の比較し、MeHg の毒性センサーとして十分なシグナルを特異的に示し、正しく機能することが明らかになった。

さらに、MeHg の毒性センサーマウス作成のための準備として、小脳顆粒細胞の初代培養モデルで MeHg に対する反応性を確認した。センサーマウスの作成に必要な1ベクター化では、センサーの反応性低下問題が発生し、Krabによるオフターゲット抑制であることをつきとめた。対策として新たなセンサーベクターの作成に成功し、今後の MeHg 毒性センサーマウス作成に筋道をつけた。

(2)メチル水銀による毒性メカニズムに関する研究

神経細胞を構成する特徴的な構造として、シナプスと軸索に注目する。昨年度までに、MeHg への曝露によって小脳顆粒細胞の初代培養でシナプスのグルタミン酸受容体が異常な蓄積を示すことを見出していた。本年度の研究では、MeHg の投与実験から、グルタミン酸受容体の異常な蓄積には、グルタミン酸シグナルは関与しないこと、シナプス足場タンパク質の発現増大が観察されることなどを明らかにし、メカニズムの一部を解明した。また、さらに神経細胞を常時活性化する High K⁺培養との比較から成熟化したシナプスで異常な蓄積が起こること、MeHg 投与後の回復実験から受容体の異常な蓄積後細胞死に至ること、などを観察し、病理学的な意義を明らかにした。

軸索タンパク質 Tau の解析では、MeHg と他の酸化剤で毒性誘導の違いを検証し、MeHg より求核性が低く細胞毒性も弱い酸化剤 DEM が Tau に対しては MeHg より強い毒性を示すことを確認した。この結果から、MeHg や他の酸化剤が標的特異性を有すると予想される。そこで、次に酸化ストレスへの応答に機

能するKeap1に対するMeHgの作用を検証し、他の酸化剤に比較してMeHgがkeap1の特異的なCys部位に作用することを発見するなど、MeHgの毒性メカニズムについて重要な知見を得た。

■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及び治療に関する基礎研究(PJ-21-01)

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(選択的細胞傷害及び個体感受性)について、培養神経細胞及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及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⁾)及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。更に、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及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、予防及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、予防又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、これらの知見を発展させて、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。更に、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。

更に、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、論文発表及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及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。更に、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及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及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、更には神経変性疾患の病態解明にも繋がることを期待される。更に、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性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) 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。

(2) メチル水銀神経毒性の個体感受性及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、論文文化を行う。

(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、学会発表及び論文文化を行う。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。

(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、学会発表及び論文文化を行う。

2. 2021 年度

(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、学会発表及び論文文化を行う。

(2) メチル水銀神経毒性の個体感受性及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。

(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中毒モデルラットにおける神経障害性疼痛発生についての研究結果をまとめ、学会発表及び論文文化を行う。また、本薬剤(ROCK阻害剤及びガバペンチン)

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。

(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、学会発表及び論文文化を行う。

(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

(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。更に、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/抵抗性の比較及び特異的阻害剤(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。

(2) メチル水銀神経毒性の個体感受性及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) 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阻害剤及びガバペンチン)の治療効果について研究

結果をまとめ、学会発表及び論文文化を行う。

(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、学会発表及び論文文化を行う。

4. 2023 年度

(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/抵抗性の比較及び特異的阻害剤(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。以上の研究結果をまとめ、学会発表を行う。

(2) メチル水銀神経毒性の個体感受性及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) 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阻害剤及びガバペンチン)の治療効果について研究結果をまとめ、学会発表及び論文文化を行う。

(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、学会発表及び論文文化を行う。

5. 2024 年度

(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/抵抗性の比較及び特異的阻害剤(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。以上の研究結果をまとめ、学会発表を行う。以上の研究結果をまとめ、論文文化を行う。

(2) メチル水銀神経毒性の個体感受性及びバイオマーカーに関する基礎研究

臨床サンプルにおける血中タンパク質のポリチオール化について明らかにする。以上の研究結果をまとめ、学会発表及び論文文化を行う。

(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

本研究は前年度に終了予定。

(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、学会発表及び論文文化を行う。

[2021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

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い、メチル水銀毒性に耐性を示す海馬神経細胞に特異的に発現している因子(Transthyretin, BDNF等)を見出した。また、メチル水銀以外の毒性物質(グルタミン酸等)に対する脆弱性/抵抗性についても解析し、海馬神経細胞がグルタミン酸毒性に対しては逆に脆弱性を示すことを明らかにした。以上の研究結果をまとめ、学会及び研究会で発表(学会等発表⁸⁻¹¹)を行うとともに論文投稿を行った。

2. メチル水銀神経毒性の個体感受性及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について測定法の開発検

討を行った。

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-3年度 科学研究費補助金・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の発症メカニズムについての研究をまとめ、論文投稿を行い、受理/掲載された(論文発表⁴)。また、本モデルにおいて視床傷害が生じていることを発見し、薬剤(ROCK阻害剤)の治療効果とともに研究結果をまとめ、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、学会及び研究会で発表(学会等発表^{12,13})を行うとともに論文投稿を行い、受理/掲載された(論文発表^{5,6})。

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い、受理/掲載された(論文発表⁷)。

[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」、令和元年-3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), 課題番号: 22H03768

[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.
- [研究期間の学会発表]
- 1) Fujimura M, Usuki F, Nakamura A: Methylmercury induces allodynia through activation of inflammatory microglia in spinal cord and subsequent stimulation in somatosensory cortex of rats. 60th Society of Toxicology, Virtual event, 2021. 3.
- 2) 藤村成剛, 臼杵扶佐子: メチル水銀による神経細胞過剰活性化と部位特異的な神経変性. 第 47 回日本毒性学会学術年会, Web meeting, 2020. 6.
- 3) 藤村成剛, 臼杵扶佐子, 中村篤: メチル水銀曝露はラット足底部に神経障害性疼痛の 1 種である疼痛閾値低下 (アロディニア) を引き起こす. メタルバイオサイエンス研究会 2020, Web meeting, 2020. 11.
- 4) 藤村成剛, 臼杵扶佐子, 中村篤, 中野治郎, 沖田実, 樋口逸郎: 局所振動刺激はラットにおいてメカノストレス因子を誘導し筋萎縮からの回復を促進する. 令和 2 年度メチル水銀研究ミーティング, Web meeting, 2021.1.
- 5) 平岡秀樹, 岩脇隆夫, 熊谷嘉人, 藤村成剛, 上原孝: メチル水銀による部位特異的神経障害における小胞体ストレスの寄与. 第 47 回日本毒性学会学術年会, Web meeting, 2020. 6.
- 6) 野川斐奈, 郷すずな, 栗田尚佳, 藤村成剛, 位田雅俊, 保住功: 環境化学物質曝露の神経分化に及ぼす影響と DNA メチル化の関与. メタルバイオサイエンス研究会 2020, Web meeting, 2020. 11.
- 7) 野村亮輔, 平岡秀樹, 藤村成剛, 熊谷嘉人, 上原孝: *in vivo* メチル水銀曝露による中枢小胞体ストレス応答変化. 令和 2 年度メチル水銀研究ミーティング, Web meeting, 2021.1.
- 8) 藤村成剛, 鶴木隆光: 培養大脳皮質神経細胞と海馬神経細胞の遺伝子発現プロファイリングの比較 -メチル水銀毒性に対する脆弱性/抵抗性に関する考察-. メタルバイオサイエンス研究会 2021, 2021. 10.
- 9) 藤村成剛, 鶴木隆光: 培養大脳皮質神経細胞と海馬神経細胞を用いたメチル水銀毒性の比較検討. 第 44 回日本分子生物学会, 2021. 12.
- 10) 藤村成剛, 鶴木隆光: 培養大脳皮質神経細胞と海馬神経細胞を用いたメチル水銀毒性と遺伝子発現プロファイルの比較検討. 令和 3 年度メチル水銀研究ミーティング, 2022. 2.
- 11) Fujimura M, Unoki T: BDNF specifically expressed in hippocampal neurons is involved in its resistance to methylmercury neurotoxicity. 61st Society of Toxicology, Virtual event, 2022. 3.
- 12) 野村亮輔, 藤村成剛, 熊谷嘉人, 上原孝: 高濃度メチル水銀曝露によるマウス中枢小胞体ストレス惹起. 令和 3 年度メチル水銀研究ミーティング,

2022. 2.

- 13) 栗田尚佳, 郷すずな, 藤村成剛, 位田雅俊, 保住功: メチル水銀曝露の神経分化に及ぼす影響と DNA メチル化の関与. フォーラム 2021 衛生薬学・環境トキシコロジー, 2021. 9.

[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: bcr0820114695.

■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-21-01)

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)

研究全般に対する助言

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(bran)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、bran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(FOS)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、FOS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、魚介類のメリットは生かし、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 と結合する食品成分の探索を試験管内で実施する。
- (2) 組織中水銀濃度に対する bran と FOS の併用効果
- (3) 前中期計画で得られた知見「MeHg 単回投与後の bran 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 bran と FOS の併用効果
- (2) MeHg の健康リスクに対する bran 又は FOS の効果(毒性用量)
体重と脳組織病理を指標とし、MeHg の健康リスクに対する bran 又は FOS の効果について実験動物を用いて検討する。
- (3) (継続)前中期計画で得られた知見「MeHg 単回投与後の bran 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 bran と FOS の併用効果
- (2) (継続)MeHg の健康リスクに対する bran の効果(毒性用量)
脳病理学的検査を行う。
- (3) 2020 年度 (4) で測定した「低濃度 MeHg 連続投与時の bran 又は FOS の効果」に関する論文作成
- (4) 「組織中水銀濃度に対する bran と FOS の併用効果」に関する論文作成

4. 2023 年度

- (1) (継続)「組織中水銀濃度に対する bran と FOS の併用効果」に関する論文作成
- (2) 2021-2022 年度に得られた知見「MeHg の健康リスクに対する bran の効果」に関する論文作成
- (3) MeHg の蓄積と排泄/健康リスクに対する食品成分の効果を検討する。

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を検討するとともに、論文を作成する。
- (2) 「小麦ふすま前投与による水銀排泄作用」に関する論文作成

[2021 年度の研究実施成果の概要]

1. 組織中水銀濃度に対する FOS と bran との併用効果

糞尿サンプルを得る目的で再度実験を行ったところ、昨年度認められた FOS と bran の併用摂取による相加効果は確認できなかった。結果の相違原因を考え、来年度、再確認したい。

2. MeHg の健康リスク(毒性)に対する bran の効果

体重及び小脳性運動失調の評価試験⁴⁾を指標として、標記の実験条件を検討し確立した。今後は、このモデルを用いて MeHg 毒性に対する食品成分の効果について検討を行う。

3. 茶成分と MeHg の結合実験

試験管内実験において、紅茶及び緑茶の浸出液乾燥粉末が MeHg の bioaccessibility(ある化学物質を含む食べ物を模擬的に消化させた後、食物から人工消化液に放出され、その結果、腸管粘膜で吸収される量)を減少させる^{5,6)}ことが報告されている。そこで、飲用する濃度の茶成分と MeHg が結合し不溶性塩を形成するのか検討を行った。緑茶飲料又は紅茶浸出液に MeHg 溶液を添加し(最終濃度は 5.21 µg Hg/ml)上清中水銀濃度を測定したところ、対照液と茶液中の水銀濃度は変わらなかった(データは示していない)。以上の結果から、飲用する濃度では緑茶又は紅茶成分と MeHg の不溶性塩は形成されないこ

とがわかった。

4. リグニン(bran 成分)と MeHg の結合実験

最近、我々は bran が MeHg 投与後に摂取した場合でも、脳中水銀濃度を有意に減少することを報告した⁷⁾。そのメカニズムは糞尿への水銀の排泄促進であり、排泄への寄与は糞便の方が大きい。Bran にはリグニンが約 5%含まれており⁸⁾、リグニンは試験管内実験において Hg(II)を吸着する⁹⁾ ことが明らかとなっている。そこで、マウス 1 匹が摂餌した 30% bran 配合飼料に含まれるリグニン量を含む人工腸液に MeHg (マウス 1 匹に投与した量)を添加し、リグニンが MeHg を吸着するか検討した。その結果、添加した MeHg の 10%がリグニンと吸着している可能性が示唆された(図 1)。

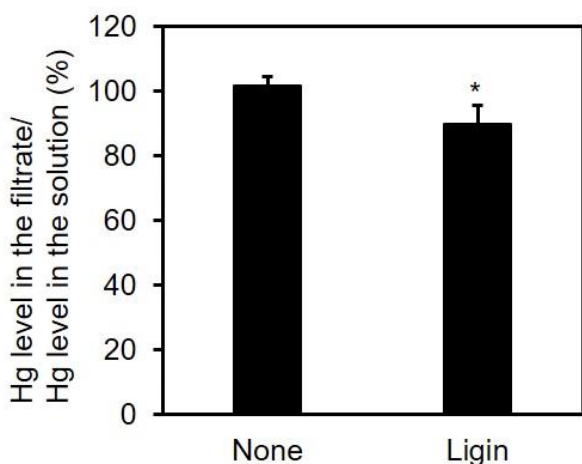


図 1. リグニンと MeHg の結合実験。

データは平均値±標準偏差、none に対する有意差
(* $p < 0.05$ by Student's t -test)

[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.

[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.
- 4) Guyenet SJ, Furrer SA, Damian VM, et al. (2010) A simple composite phenotype scoring system for evaluating mouse models of cerebellar ataxia. *J. Vis. Exp.* Doi: 10.3791/1787.
- 5) Shim SM, Ferruzzi MG, Kim YC, et al. (2009) Impact of phytochemical-rich foods on bioaccessibility of mercury from fish. *Food Chem.*, 112, 46-50.
- 6) Girard C, Charette T, Leclerc M, et al. (2018) Cooking and co-ingested polyphenols reduce *in vitro* methylmercury bioaccessibility from fish and may alter exposure in humans. *Sci. Total Environ.*, 616-617, 863-874.
- 7) Nagano M, Fujimura M. (2021) Intake of wheat bran after administration of methylmercury reduces mercury accumulation in mice. *Fundam. Toxicol. Sci.*, 8, 243-248.
- 8) Kamal-Eldin A, Laerke HN, Knudsen KE, et al. (2009) Physical, microscopic and chemical

characterization of industrial rye and wheat brans from the Nordic countries. *Food Nutr. Res.*, 53. Doi: 10.3402/fnr.v53i0.1912.

- 9) Lv J, Luo L, Zhang J, et al. (2012) Adsorption of mercury on lignin: combined surface complexation modeling and X-ray absorption spectroscopy studies. *Environ. Pollut.*, 162, 255-261.

■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-21-02)

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

[主任研究者]

鷗木隆光(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(筑波大学)

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)、酸化ストレス (Oxidative stress)、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、得られた知見を整理する。

(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。

[2021 年度の研究実施成果]

解析系の最適化のためにアルキル化試薬、バッファー組成、脱塩過程等の至適化を行った。ヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞抽出液を試料とし、脱塩処理にて分取した高分子画分を得た。これを RSS モデル化合物 Na_2S_3 にて処理し脱塩後、MeHg と反応させ再度脱塩した。得られた画分中のチオールをビオチン標識アルキル化試薬 [(+)-Biotinyl-iodoacetamidyl-3,6-dioxaoctanediamine] により標識した。脱塩後、ストレプトアビジン付加超常磁性ビーズにて被標識タンパク質をプルダウンし、還元剤処理によりポリオウ化タンパク質を回収した。回収した総ポリオウ化タンパク質は SDS-PAGE 後に蛍光染色により検出した。その結果、内在レベルでのタンパク質

ポリオウ化修飾が検出され、 Na_2S_3 の添加により増加する当該修飾は、 MeHg の添加により減少したことから、RSS からタンパク質のチオール基へと転移したサルフェン硫黄が MeHg により奪取されることが示唆された。培地中への Na_2S_3 又は MeHg の添加により曝露を行った SH-SY5Y 細胞を用いて同様の解析を行った。その結果、細胞内ポリオウ化タンパク質の蛍光染色強度は Na_2S_3 曝露により増加した一方、 MeHg 曝露による明確な減少は認められなかった。しかし被ポリオウ化修飾が報告されている GAPDH をウェスタンブロットにより検出したところ、 MeHg 曝露細胞についてそのポリオウ化の減少が確認された。このことは MeHg によりサルフェン硫黄を奪取されるポリオウ化タンパク質には特異性が存在する可能性を示唆するものの、さらなる解析が必要である。

本課題に関連し、活性イオウ分子を含めサルフェン硫黄を介した MeHg からの生体防御機構について得られた知見をとりまとめ、論文発表及び学会発表を行った(論文発表⁴、学会発表^{3,4})。また、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。即ち、RSS は高い求核性から MeHg 等環境中親電子物質による毒性の防御に寄与する一方、過剰な RSS はトランスポーターを介して細胞外へと排出され、その細胞内量が厳密に制御されることでレドックスバランスの恒常性が維持されることが示唆された。

[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, 2019-2021 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.

[研究期間の学会発表]

- 1) 鶴木隆光, 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) 鶴木隆光, 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) 鶴木隆光, 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) 鶴木隆光, 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.

[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.

■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-21-03)

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発展

[グループ]

病態メカニズム

[研究期間]

2020 年度－2024 年度(5 ㄱ年)

[キーワード]

メチル水銀(Methylmercury)、シナプス(Synapse)、軸索(Axon)、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)。

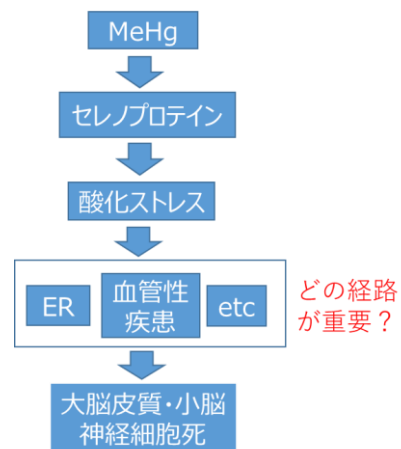


図 1. MeHg の毒性経路の概念図

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。

[年次計画概要]

1. 2021 年度

2020 年度までの計画で、MeHg 依存的に蛍光シグナルを増大させる毒性センサー Krab-U/Luc を開発した。(図 1)。センサーベクターの機能評価と、毒性センサーマウス作成のための準備を進める。センサーベクターの機能評価では、他の毒性センサーベクターとの比較や、他の毒物曝露時のセンサーベクターの反応性の評価を行う。毒性センサーマウス作成のための準備では、現在の転写因子とルシフェラーゼ発現の2つのベクターから、マウス作成のための選択遺伝子を含む 1 ベクターへの統合や、小脳顆粒細胞での遺伝子発現系で MeHg への反応性を評価する。

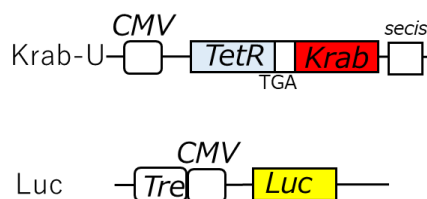


図1 MeHg 毒性センサーKrab-U/Luc

平常時は転写抑制因子 Krab によって Luc 遺伝子の発現は抑制される。MeHg への曝露でセレノシステインの挿入が障害を受け Krab が欠損し、Luc 遺伝子の発現が誘導される。

2020 年度までの計画で、軸索に注目した研究では軸索のマーカー蛋白質 Tau の毒性評価系を確立したので、MeHg や他の酸化剤の毒性誘導能を評価する。シナプスに注目した研究では、小脳顆粒細胞を用いた実験で MeHg への曝露によって興奮性シナプスへの AMPA 型グルタミン酸受容体の異常な蓄積が観察されたのでこのメカニズムを解析する。

[2021 年度の研究実施成果]

1. メチル水銀毒性のセンサーベクターの開発に関する研究

昨年度までに MeHg の毒性センサー Krab-U/Luc を開発した。センサーベクターを遺伝子導入した細胞

へMeHgの投与量と時間をふったところ、高い直線的な用量依存性と曝露時間依存性が確認できた(図2)。センサーの機能評価では、ERストレスセンサー・酸化ストレスセンサーと比較し、既存のセンサーに比べてKrab-U/Lucで強いシグナルとバック比が示された。また、他の毒性物質として、tunicamycin (ER ストレス)、H₂O₂、DEM、4-HNE、PGJ2 (酸化剤)、Mn²⁺、Pb²⁺、Co²⁺、Cd²⁺ (金属イオン)と比較し、Krab-U/LucがMeHgで特異的なシグナルをしめすことを確認し、MeHgの毒性センサーとして正しく機能することが明らかになった。

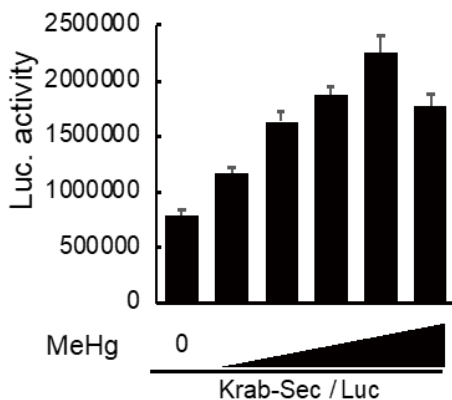


図2 Krab-U/LucのMeHg投与量依存性
MeHgへの曝露量をふったところ、Krab-U/Lucは直線的なシグナル増大を示した。

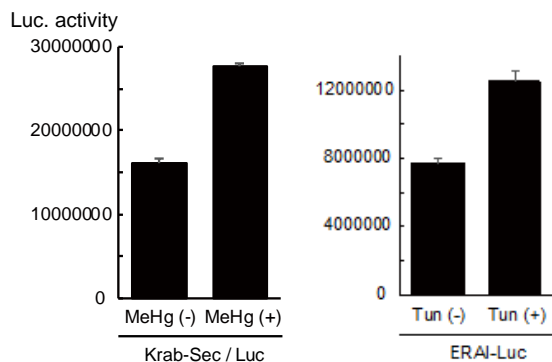


図3 Krab-U/LucとERAI-Lucの比較
培養細胞系で、Krab-U/Lucセンサーと小胞体ストレスセンサーERAI-Lucを比較した。既存のセンサーと比べて十分なシグナル強度とバック比がKrab-U/Lucで観察された

MeHgの毒性センサーマウス作成のための準備と

して、小脳顆粒細胞の初代培養モデルでセンサーベクターを遺伝子導入し、MeHgに対する反応性を確認した。センサーマウスの作成に必要な1ベクター化では、作成したベクターの培養細胞での発現系でMeHgへの反応性が失われていた。原因を調査したところ、1ベクターによる発現系では、Krab (転写抑制因子)の発現の顕著な抑制が観察された。さらに、欠損変異体を利用した検証から、Luciferaseの発現制御用に使用したTreとKrabによるオフターゲット抑制であることが分かった。対策として、オフターゲット抑制の阻害または利用、別のセンサーベクターの設計を試み、新たなセンサーベクターの作成に成功した。以上の通り、今後のMeHg毒性センサーマウス作成に筋道をつけた。

2. メチル水銀による神経細胞の興奮毒性経路に対する作用に関する研究

2020年度までの計画で、軸索に注目した研究では軸索のマーカー蛋白質Tauの毒性評価系を確立した。そこで、MeHgや他の酸化剤による毒性誘導能を検証したところ、酸化剤DEMはTau依存的な毒性を誘導したが、MeHgによる毒性誘導は観察されなかった。この結果は、MeHgの求電子性の高さで矛盾するもので、MeHgの標的特異性を示唆している。そこで、酸化ストレス応答因子であるNrf2/keap1経路のkeap1変異体を用いてMeHgの標的特異性を検証したところ、既存の酸化剤に分類されない特異性が観察された。以上の通り、MeHgの細胞特異性を担うメカニズムにつながると期待できる知見が得られた。

シナプスに注目した研究では、2020年度までの計画で、小脳顆粒細胞を用いた実験でMeHgへの曝露によって興奮性シナプスへのAMPA型グルタミン酸受容体の異常な蓄積が観察された。本年度の研究では、MeHgの投与実験から、グルタミン酸受容体の異常な蓄積には、グルタミン酸シグナルは関与しないこと、シナプス足場タンパク質の発現増大が観察されることなどを明らかにし、メカニズムの一部を解明した。また、さらに神経細胞を常時活性化するHigh K⁺培養との比較から成熟化したシナプスで異常な蓄積が起こること、MeHg投与後の回復実験から受容体の異常

な蓄積後細胞死に至ること、などを観察し、病理学的な意義を明らかにした。

[備考]

なし

[研究期間の論文発表]

なし

[研究期間の学会発表]

- 1) Sumioka A, Fujimura M and Usuki F (2021) Development of sensors for methylmercury toxicity. Annual meeting of JSOT, online
- 2) 住岡暁夫, 藤村成剛 (2021) メチル水銀毒性センサーの開発. メチル水銀研究ミーティング, オンライン

[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.