

# 胎児期メチル水銀曝露が及ぼす次世代高次脳機能障害に 対する親電子ストレスの修飾効果

主任研究者 熊谷嘉人(筑波大学医学医療系教授)

## 研究要旨

【目的】メチル水銀 (MeHg) は高い親電子性を有し、タンパク質の求核基に共有結合 (S-水銀化) することで毒性を発現する。我々は、高い求核性を有する活性イオウ分子 (Reactive sulfur species, RSS) がMeHgと代償的に反応することで、イオウ付加体形成を介してMeHgを解毒・不活性化する一方で、それに伴う生体内RSS量の減少がMeHg感受性を上昇させることを報告した<sup>1</sup>。また、我々は日々の生活において、MeHg以外にも様々な親電子物質に低濃度であるが複合的に曝露されており、それらはMeHgと同様に生体内RSSを消費し、イオウ付加体を形成する可能性が高い。つまり、我々のライフスタイルに依存する親電子物質の摂取・曝露が生体内RSS量を消費させ、結果的にMeHg感受性に影響を与えることが示唆される。本年度は昨年度に続き、環境中親電子物質の複合曝露影響を*in vitro*系を用いて評価し、複合曝露に用いる親電子物質を選定することを目的とした。

【方法】被験物質候補：soft metalとしてMeHgとカドミウム (Cd)、borderline metalとして銅 (Cu) と亜鉛 (Zn)、hard metalとしてアルミニウム (Al) とスズ (Sn) の6種類を用いた。なお、カッコ内は被検物質の親電子性の強度を示す (soft > borderline > hard: HSAB 則による分類)。RSSとの反応性：各被検金属とRSSのモデル化合物であるNa<sub>2</sub>S<sub>2</sub>を反応させた後、その残存量をLC/MSを用いた安定同位体希釈法にて測定した。RSSによるMeHgの不活性化に対する複合曝露影響：ヒト血清由来アルブミン (HSA) を用いて、原子吸光分析機を用いたタンパク中の水銀量を測定した。細胞毒性試験：ヒト肝癌由来細胞株 (HepG2) に対する毒性 (細胞死) をMTT assayにより評価した。

【結果・考察】各被検物質によるRSSの消費量を測定した結果、soft metalであるMeHgやCdは効率的にRSSを消費したのに対し、hard metalであるAlやSnは殆どRSSを消費しなかった。一方、borderline metalに分類されるCuやZnはMeHgやCdと同等の高い反応性を示した。この結果は、MeHgとCdの複合曝露だけでなく、生体必須微量元素であるCuやZnも生体内RSS量を減少させ、MeHgに対する感受性の上昇を招く可能性を示唆した。実際、HepG2細胞にMeHgとCuを複合曝露させると、単独曝露に比べてS-水銀化の亢進とそれに付随した細胞毒性の増悪化が見られた。一方、ZnはCdやCuと同様にRSSを消費したのにも関わらず、MeHgとの複合曝露によるS-水銀化の亢進は見られなかった。このことはZnのイオウ付加体中の硫黄原子はサルフェン硫黄のような可動性を有しており、高い親電子性を持つ金属と反応できることを示唆している。

本研究結果より、複合的な親電子性金属の摂取・曝露が生体内RSS量を減少させ、結果

的にMeHgの感受性を増加させる可能性を示唆するものであり、生体内RSS量の変化はMeHgの複合曝露研究において有益な生体影響指標になり得ると考えられた。

キーワード: 活性イオウ分子、環境中親電子物質、複合曝露、親電子ストレス (6個以内)

研究者協力者

秋山雅博 (筑波大学医学医療系助教)、安孫子ユミ (筑波大学医学医療系助教)

## I 研究目的

日常生活において、環境中化学物質による人体への曝露は、生活環境、ライフスタイルや食生活由来の多種類かつ低濃度の複合曝露であり、複合曝露による健康影響が懸念されている。MeHgにおいても、個別曝露では生体影響が見えない曝露量であっても、複合曝露条件下では生体影響を生じる可能性がある。そのため、複合曝露影響を考慮したMeHgのリスク評価は急務な課題である。しかしその一方で、環境中化学物質は膨大かつ複雑に作用し合うため、その毒性発現機構の解明や定量的な評価は困難であり、研究進捗は混沌としている現状にある。

環境中親電子物質であるMeHgは高い親電子性を有し、タンパク質の求核基に共有結合することで毒性を発現する。我々はH27年度からH29年度にかけて実施した「メチル水銀の捕獲・不活性化に関わる新奇リスク軽減因子の実態解明」において、高い求核性を有するRSSがMeHgと代償的に反応することで、イオウ付加体形成を介してMeHgを捕獲・不活性化する新たな生体防御機構を見出し、生体内RSS量の低下がMeHg毒性の増加を引き起こすことを明らかにした。さらに、我々はMeHg以外の環境中親電子物質であるCd、1,2-NQおよび1,4-NQのような環境中親電子物質も、MeHgと同様にRSSを消費してイオウ付加体を形成することを報告している<sup>24</sup>。

これらの結果は、個々の環境中親電子物質の構造は異なるものの、共通な化学的性質(親電子性)を示すため、複合的な親電子物質の摂取・曝露は生体内RSS量の減少といった共通の生体影響を引き起こし、結果的にMeHg毒性が増加する可能性を示唆している。興味深いことに、我々は肝臓や腎臓など末梢組織中のRSS量の減少が、MeHg曝露で生じる運動機能障害を増悪化させることも明らかにした。この結果はMeHgが全身を巡廻する過程において、肝臓や腎臓中のRSSによって本親電子物質の捕獲・不活性化を担っていることを示唆するものであり、複合曝露影響は中枢神経系だけでなく、末梢組織においても重要であることを示している。つまり、Cdなど中枢神経組織に分布しない親電子物質であっても、複合曝露によりMeHg毒性を増加させる可能性が考えられた。

得られた研究成績より、我々はMeHgに対する複合曝露を環境中親電子物質に特化し、生体内RSS量を複合曝露影響の指標とすることで、複合曝露リスクを定量的に評価できると考えた。そこで、本研究は複数の親電子物質曝露が及ぼすMeHg毒性への影響を検討し、複合曝露影響を考慮したMeHgのリスク評価を行い、食生活、ライフスタイルや生活環境を考慮

したMeHgリスクに対する有益な情報を提供することを最終的な目的とした。

昨年度は、親電子性を持つ環境汚染物質を対象にした、MeHgとの複合曝露影響を*in vitro*系を用いて網羅的に評価した。その結果、Cdや1,2-NQおよび1,4-NQのような親電子性を有する環境汚染物質は、RSSと高い反応性を示し、MeHgとの複合曝露において、MeHgによる細胞毒性を増加させることを明らかにした。

一方、我々は食生活などを通じて様々な金属を摂取しており、その中には親電子性を有する金属も多く存在する。そこで本年度は親電子性金属による、MeHg毒性に対する複合曝露影響の検討を目的とした。被験物質とする親電子性金属は、昨年度も用いたCdをポジティブコントロールとし、生体必須微量元素であるCuやZnを中心に行った。

(構成:研究の背景・目的。環境行政の課題との関連性を含めて記載する。)

## II 研究方法

被験物質：MeHg (soft)、Cd (soft)、Cu (borderline)、Zn (borderline)、Al (hard)、Sn (hard) の6種類を用いた。なお、被検物質の親電子性の強度は soft > borderline > hard (HSAB 則による分類) で表される。

RSS との反応性の測定：Sodium disulfide ( $\text{Na}_2\text{S}_2$ ) は、サルフェン硫黄を含む分子として最も単純な構造を有するサルフェン硫黄ドナーであり、生理条件下では各 pKa に応じて RSS である hydrogen persulfide (anion) として存在することから、RSS のモデル化合物として本物質を用いた。各被検物質と  $\text{Na}_2\text{S}_2$  を反応させた後、hydrogen persulfide の量を LC/MS を用いた安定同位体希釈法にて測定し、その減少量の割合を RSS との反応性として評価した。

RSS による MeHg の不活性化に対する複合曝露影響の検討：ヒト血清由来アルブミン (HSA) を(1)  $\text{Na}_2\text{S}_2$  非存在下、(2)  $\text{Na}_2\text{S}_2$  存在下、(3)  $\text{Na}_2\text{S}_2$  と被検物質共存下の3条件下で MeHg と反応させた後、ゲルろ過カラムで低分子を除去し、原子吸光分析機にて HAS 中の Hg 量を測定した。

複合曝露による細胞毒性評価：96 ウェルプレートで培養した HepG2 細胞と SH-SY5Y 細胞に対し、MeHg (0、5、10、20、40  $\mu\text{M}$ ) を単独および、Cd (0.5  $\mu\text{M}$ ) または Cu (20  $\mu\text{M}$ ) と複合的に曝露し、24 時間後の生存率を MTT assay を用いて測定した。

(構成:研究・調査・実験・解析に関する手法の記述および資料・材料の集め方について、実施経過が分かるように具体的に記載する。)

### (倫理面への配慮)

倫理面への配慮としてマウスを用いた動物実験に関して、筑波大学が定める動物実験取扱規定にそって動物実験を計画し、動物福祉、安全性、倫理的及び科学的観点からその妥当性を審査する筑波大学動物実験委員会による審査を受け、学長の承認を受けた後に、適切な飼養保管施設内において苦痛の軽減に関する基準に従い、適正に実施した。特に毒性実験など苦痛の程度の高い実験に対しては、実験用動物の使用数を最小限に抑えるために、*in vitro*

(試験管内実験)への代替、重複実験の排除を考慮して実験計画を作成した。(当該研究を行った際に実施した倫理面への配慮の内容及び方法について、記入する。また、倫理面の問題がないと判断した場合には、その旨を記入するとともに必ず理由を明記する。)

### III 研究結果

まず、borderline metal である Cu や Zn が soft metal である MeHg や Cd と同様に、RSS を消費するかを検討した。その結果、RSS に対して、Cu や Zn は MeHg や Cd と同等の消費率(反応性)を示した。一方、親電子性の低い hard metal である Al や Sn は、ほとんど RSS と反応しなかった。MeHg は高い親電子性を有し、タンパク質のチオール基に共有結合(S-水銀化)することで毒性を発現する。一方、RSS は MeHg と代償的に反応してイオウ付加体を産生し、イオウ付加体は殆ど親電子性を有さないため、タンパク質の S-水銀化は抑制される。実際、ヒト血清由来アルブミン(HSA)と MeHg を Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub> 存在下および非存在下で反応させた結果、Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub> 存在下において S-水銀化は有意に抑制された。また、Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub> 存在下の HSA に対して、Cd や Cu を MeHg と複合曝露した結果、S-水銀化量は MeHg 単独曝露と比べ増加した。一方、hard metal に分類される Al や Sn などは影響を与えなかった。次に、Cu との複合曝露による MeHg 毒性への影響を検討した。HepG2 細胞に対する MeHg 曝露による LC<sub>50</sub> 値は、単独曝露での 29.14±2.12 μM から、Cu との複合曝露により 8.07±1.39 μM へと有意に低下した。Cu の LC<sub>50</sub> 値は 161.5±21.0 μM であり、複合曝露には毒性を示さない濃度域である 20 μM の Cu を用いた。Cu との複合曝露は MeHg 曝露による細胞内の S-水銀化量を有意に更新させた。その一方で、Zn は Cd や Cu と同様に RSS を消費したのにも関わらず、MeHg との複合曝露による S-水銀化に影響を与えなかった。

(構成:研究等の結果・成績・当該年度の研究成果が明らかになるよう具体的に記入する。)

### IV 考察

Hard metal である Al や Sn は、ほとんど RSS を消費しないのに対して、borderline metal である Cu や Zn は soft metal である MeHg や Cd と同様に RSS を消費した。このことは、被験金属との反応によって見られた RSS の消費は、金属が持つ親電子性に起因することを示唆している。また、我々は MeHg や Cd が RSS と反応し、イオウ付加体形成を介して不活性化される一方で、それに伴う生体内 RSS 量の減少を引き起こすことを報告している。そのため、Cu や Zn による RSS の消費も、MeHg や Cd と同様に、イオウ付加体形成を介している可能性が考えられた。Cu や Zn が RSS を消費する結果は、MeHg と Cd の複合曝露だけでなく、生体必須微量元素である Cu や Zn も生体内 RSS 量を減少させ、MeHg に対する感受性の上昇を招く可能性を示唆するものである。また、我々は MeHg 毒性の指標の一つとして、MeHg 曝露によるタンパク質への S-水銀化量を用いた。Cd や Cu などの RSS を消費する金属との複合曝露は、MeHg 単独曝露に対して、MeHg 曝露による S-水銀化量を有意に増加させた一方、RSS を消費しなかった Al や Sn との複合曝露では、有意な増加は見られなかった。このことは、親電子性金属と MeHg の複合曝露は、RSS によるイオウ付加体形成を介した MeHg の捕獲・不活性化を減少させ、S-水

銀化の亢進を引き起こし、MeHg毒性を増加させる可能性を示唆している。実際、HepG2細胞にMeHgとCuを複合曝露させると、単独曝露に比べて、S-水銀化の亢進とそれに付随した細胞毒性の増悪化が見られた。これらのことは、複合的な親電子性金属の摂取・曝露が生体内RSS量を減少させ、結果的にMeHgの感受性を増加させる可能性を示唆している。一方、興味深いことに、ZnはCdやCuと同様にRSSを消費したのにも関わらず、MeHgとの複合曝露によるS-水銀化に影響を与えなかった。このことはZnのイオウ付加体中の硫黄原子はサルフェン硫黄のような可動性を有しており、高い親電子性を持つ金属と反応できることを示しており、親電子性の金属であっても、そのイオウ付加体の形態が異なり、そのことがRSSの消費を介した複合曝露影響に対して、異なる結果をもたらす可能性があることを示唆している。

## V 結論

本年度の研究結果は、Cdのような環境汚染物質だけでなく、生体必須微量元素であるCuなどの親電子性を持つ金属の過剰摂取・曝露も生体内RSS量を減少させ、結果的にMeHg毒性を増加させる可能性を示した。本年度の研究結果は、複合曝露影響を考慮したMeHgのリスク評価の必要性を示す重要な知見であると結論付ける。

## VI 次年度以降の計画

本年度の研究を通して、環境中親電子物質との複合曝露条件下では、RSS量の低下に伴い、MeHg毒性が増加することを*in vitro*の実験系により示した。次年度以降は、*in vivo*において複数の親電子物質曝露（親電子ストレス）が及ぼすMeHg毒性への影響を検討する。複合曝露に用いる親電子物質として、MeHgと同程度のRSSとの反応性を示したCdおよび1,4-NQに加えて、生体必須微量元素であるCuを初期検討候補とする。*In vivo*における検討は低濃度のMeHg曝露影響が懸念される、胎児およびその母親を重点的に行う。胎児期MeHg曝露に対する複合曝露が及ぼす影響は次世代脳機能の障害を指標とする。本研究ではオープンフィールドテスト等の行動実験を用いて脳機能を評価する。上記の行動解析に必要な設備は既に当研究室に整っており、次年度以降も円滑な実験遂行が可能である。

（構成：次年度以降の研究内容・方法について本年度の成果とのつながりをもたせながら簡潔に記入する。）

### この研究に関する現在までの研究状況、業績

- 1) Kumagai Y, Akiyama M, Unoki T. Adaptive responses to electrophilic stress and reactive sulfur species as their regulator molecules. *Toxicol Res* 2019; 35: 303-310.
- 2) Nishimura A, Shimoda K, Tanaka T, Toyama T, Nishimura K, Shinkai Y, Numaga-Tomita T, Yamazaki D, Kanda Y, Akaike T, Kumagai Y, Nishida M. Depolysulfidation of Drp1 induced by low-dose methylmercury exposure increases cardiac vulnerability to hemodynamic overload.

- Science Signaling 2019; 12:eaaw1920.
- 3) Akiyama M, Unoki T, Shinkai Y, Ishii I, Ida T, Akaike T, Yamamoto M, Kumagai Y. Environmental Electrophile-Mediated Toxicity in Mice Lacking Nrf2, CSE, or Both. *Environ Health Perspect* 2019; 127:67002.
  - 4) Shinkai Y, Kumagai Y. Sulfane sulfur in toxicology: A novel defense system against electrophilic stress. *Toxicol Sci* 2019; 170: 3-9
  - 5) Abiko Y, Nakai Y, Luong NC, Bianco CL, Fukuto JM, Kumagai Y. Interaction of quinone-related electron acceptors with hydropersulfide Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>: Evidence for one-electron reduction reaction. *Chem Res Toxicol* 2019; 32: 551-556.
  - 6) Lin J, Akiyama M, Bica I, Long F, Henderson C, Goddu R, Suarez V, Baker B, Ida T, Shinkai Y, Nagy P, Akaike T, Fukuto J, Kumagai Y. The Uptake and Release of Polysulfur Cysteine Species by Cells: Physiological and Toxicological Implications. *Chem Res Toxicol* 2019; 32: 447-455.
  - 7) Bianco CL, Akaike T, Ida T, Nagy P, Bogdandi V, Toscano JP, Kumagai Y, Henderson CF, Goddu RN, Lin J, Fukuto JM. The Reaction of Hydrogen Sulfide with Disulfides: Formation of a Stable Trisulfide and Implications to Biological Systems. *Br J Pharmacol* 2019; 176: 671-683.
  - 8) Unoki T, Akiyama M, Kumagai Y, Goncalves FM, Farina M, Telxelra Da Rocha JB, Ashner M. Molecular pathways associated with methylmercury-induced Nrf2 modulation. *Front Genet* 2018; 9: 373.
  - 9) Fukuto JM, Ignarro LJ, Nagy P, Wink DA, Kevil CG, Feelisch M, Cortese-Krott MM, Bianco CL, Kumagai Y, Hobbs AJ, Lin J, Ida T, Akaike T. Biological Hydropersulfides and Related Polysulfides: A New Concept and Perspective in Redox Biology. *FEBS Lett* 2018; 592: 2140-2152.
  - 10) Akiyama M, Shinkai Y, Unoki T et al. Capture of cadmium by reactive polysulfides attenuates cadmium-induced adaptive response and hepatotoxicity. *Chem Res Toxicol* 2017; 30: 2209-2217.
  - 11) Yoshida E, Kurita M, Eto K et al. Methylmercury promotes prostacyclin release from cultured human brain microvascular endothelial cells via induction of cyclooxygenase-2 through activation of the EGFR-p38 MAPK pathway by inhibiting protein tyrosine phosphatase 1B activity. *Toxicology* 2017; 392: 40-46.
  - 12) Akaike T, Ida T, Fan-Yan et al. Cysteinyl-tRNA synthetase governs cysteine polysulfidation and mitochondrial bioenergetics. *Nat Commun* 2017; 8: 1177.
  - 13) Hiraoka H, Nakahara K, Kaneko Y et al. Modulation of unfolded protein response by methylmercury. *Biol Pharm Bull* 2017; 40: 1595-1598.
  - 14) Ihara H, Kasamatsu S, Kitamura A et al. Exposure to electrophiles impairs reactive persulfide-dependent redox signaling in neuronal cells. *Chem Res Toxicol* 2017; 30: 1673-1684.
  - 15) Sawa T, **Kumagai Y**, Akaike T. Regulation of redox signaling by nitrated nucleotide and reactive cysteine persulfides. In: *Nitric Oxide: Biology and Pathobiology* 2017; 3: 231-235.
  - 16) 熊谷嘉人、安孫子ユミ. 環境中親電子物質のレドックスシグナル伝達変動および毒性発

- 現とそれらを制御する活性イオン分子. 硫酸と工業 2017; 70: 9-16.
- 17) 熊谷嘉人. 環境中親電子物質に対する生体応答と捕獲・不活性化因子. 最新医学「エピジェネティクスと環境科学」2017; 72: 77-81.
  - 18) Abiko Y, Shinkai Y, Unoki T et al. Polysulfide Na<sub>2</sub>S<sub>4</sub> regulates the activation of PTEN/Akt/CREB signaling and cytotoxicity mediated by 1,4-naphthoquinone through formation of sulfur adducts. *Sci Rep* 2017; 7: 4814.
  - 19) Abiko Y, Sha L, Shinkai Y et al. 1,4-Naphthoquinone activates the HSP90/HSF1 pathway through the S-arylation of HSP90 in A431 cells: Negative regulation of the redox signal transduction pathway by persulfides/polysulfides. *Free Radic Biol Med* 2017; 104: 118-128.
  - 20) Shinaki Y, Masuda A, Akiyama M et al. Cadmium-mediated activation of the HSP90/HSF1 pathway regulated by reactive persulfides/polysulfides. *Toxicol Sci* 2017; 156: 412-421.
  - 21) Abiko Y, Sha L, Shinkai Y et al. 1,4-Naphthoquinone activates the HSP90/HSF1 pathway through the S-arylation of HSP90 in A431 cells: Negative regulation of the redox signal transduction pathway by persulfides/polysulfides. *Free Radic Biol Med* 2017; 104: 118-128.
  - 22) Unoki T, Abiko Y, Toyama T et al. Methylmercury, an environmental electrophile capable of activation and disruption of the Akt/CREB/Bcl-2 signal transduction pathway in SH-SY5Y cells. *Sci Rep* 2016; 6: 28944, doi: 10.1038/srep28944.
  - 23) Kumagai Y, Abiko Y. Environmental electrophiles: protein adducts, modulation of redox signaling and interaction with persulfides/polysulfides. *Chem Res Toxicol* 2017; 30: 203-219.
  - 24) Kumagai Y, Abiko Y, Luong CN. Chemical toxicology of reactive species in the atmosphere: two decades of progress in an electron acceptor and an electrophile. *J Toxicol Sci* 2016; 41: SP37-SP47.
  - 25) Millikin R, Bianco CL, White C et al. The chemical biology of protein hydropersulfides: Studies of a possible protective function of biological hydropersulfide generation. *Free Radic Biol Med* 2016; 97: 136-147.
  - 26) Nishida M, Kumagai Y, Ihara H et al. Redox signaling regulated by electrophiles and reactive sulfur species. *J Clin Biochem Nut* 2016; 58: 91-98.
  - 27) Toyama T, Abiko Y, Katayama Y et al. S-Mercuration of ubiquitin C-terminal hydrolase L1 through Cys152 by methylmercury causes inhibition of its catalytic activity and reduction of monoubiquitin levels in SH-SY5Y cells. *J Toxicol Sci* 2015; 40: 887-893.
  - 28) Ishii I, Kamata S, Hagiya Y et al. Protective effects of hydrogen sulfide anions against acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice. *J Toxicol Sci* 2015; 40: 837-841.
  - 29) Saund SS, Sosa V, Henriquez S et al. The chemical biology of hydropersulfides (RSSH): Chemical stability, reactivity and redox roles. *Arch Biochem Biophys* 2015; 588: 15-24.
  - 30) Abiko Y, Ishii I, Kamata S et al. Formation of sulfur adducts of N-acetyl-p-benzoquinoneimine, an electrophilic metabolite of acetaminophen in vivo: Participation of reactive persulfides. *Chem Res Toxicol* 2015; 28: 1796-1802.
  - 31) Abiko Y, Yoshida E, Ishii I et al. Involvement of reactive persulfides in biological

- bismethylmercury sulfide formation. *Chem Res Toxicol* 2015; 28: 1301-1306.
- 32) 熊谷嘉人、内田浩二. RSS による環境中親電子物質の解毒代謝. 細胞工学「活性イオウ分子種の生理機能に迫るチオールバイオロジーの新たなステージ」 2015; 34: 358-363.
- 33) Abiko Y, Luong CN, Kumagai Y. A biotin-PEAC<sub>5</sub>-maleimide labeling assay to detect electrophiles. *J Toxicol Sci* 2015; 40: 405-411.
- 34) Shinkai Y, Abiko Y, Ida T et al. Reactive sulfur species-mediated activation of the Keap1-Nrf2 pathway by 1,2-naphthoquinone through sulfenic acids formation under oxidative stress. *Chem Res Toxicol* 2015; 28: 838-847.
- 35) Nakano S, Ishii I, Shinmura K et al. Hyperhomocysteinemia abrogates fasting-induced cardioprotection against ischemia/reperfusion by limiting bioavailability of hydrogen sulfide anions. *J Mol Med* 2015; 93: 879-889.
- 36) Hagiya Y, Kamata S, Mitsuoka S et al. Hemizygoty of transsulfuration genes confers increased vulnerability against acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 2015; 282: 195-206.
- 37) Makino K, Okuda K, Sugino E et al. Correlation between attenuation of protein disulfide isomerase activity through S-mercuration and neurotoxicity induced by methyl mercury. *Neurotoxicol Res* 2015; 27: 99-105.
- 38) 西田基宏、外山喬士、熊谷嘉人、富田拓郎. 活性硫黄種によるレドックス恒常性維持機構に基づいた新規心不全治療戦略の構築. *YAKUGAKAU ZASSHI* 2014; 134: 1239-1243.
- 39) Ono K, Akaike T, Sawa T et al. The redox chemistry and chemical biology of H<sub>2</sub>S, hydropersulfides and derived species: Implication to their possible biological activity and utility. *Free Radic Biol Med* 2014; 77: 82-94.
- 40) 澤智裕、熊谷嘉人、赤池孝章. たくさん繋がる S. 実験医学「驚愕の代謝システム」2014; 32: 46-50.
- 41) Yoshida E, Abiko Y, Kumagai Y. Glutathione adduct of methylmercury activates the Keap1-Nrf2 pathway in SH-SY5Y cells. *Chem Res Toxicol* 2014; 27: 1780-1786.
- 42) Kanda H, Shinkai Y, Kumagai Y. S-Mercuration of cellular proteins by methylmercury and its toxicological implications. *J Toxicol Sci* 2014; 39: 687-700.
- 43) Ida T, Sawa T, Ihara H et al. Reactive cysteine persulfides and S-polythiolation regulate oxidative stress and redox signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014; 111: 7606-7611.
- 44) Asahi M, Kawai M, Toyama T et al. Identification and quantification of in vivo metabolites of 9,10-phenanthrenequinone in human urine associated with producing reactive oxygen species. *Chem Res Toxicol* 2014; 27: 76-85

#### 引用文献

(記載方法は、上記の「本研究に関する現在までの研究状況、業績の例」に従う。)

- 1) Akiyama M, Unoki T, Shinkai Y, Ishii I, Ida T, Akaike T, Yamamoto M, Kumagai Y.



Environmental Electrophile-Mediated Toxicity in Mice Lacking Nrf2, CSE, or Both. *Environ Health Perspect* 2019; 127:67002.

- 2) Akiyama M, Shinkai Y, Unoki T et al. Capture of cadmium by reactive polysulfides attenuates cadmium-induced adaptive response and hepatotoxicity. *Chem Res Toxicol* 2017; 30: 2209-2217.
- 3) Kumagai Y, Akiyama M, Unoki T. Adaptive responses to electrophilic stress and reactive sulfur species as their regulator molecules. *Toxicol Res* 2019; 35: 303-310.
- 4) Abiko Y, Shinkai Y, Unoki T et al. Polysulfide Na<sub>2</sub>S<sub>4</sub> regulates the activation of PTEN/Akt/CREB signaling and cytotoxicity mediated by 1,4-naphthoquinone through formation of sulfur adducts. *Sci Rep* 2017; 7: 4814.

# Effect of combined exposure to environmental electrophilic metals on dysfunction of postnatal development of the brain function in mice prenatally exposed to methylmercury

Masahiro Akiyama<sup>1</sup>, Yumi Abiko<sup>1</sup>, Yoshito Kumagai<sup>1</sup>

*\*1 Faculty of Medicine, University of Tsukuba*

*Keywords:* Reactive sulfur species; dimethylmercury sulfide; electrophilic stress

## **Abstract**

Methylmercury (MeHg) is an environmental electrophile that readily modifies protein thiols, leading to cell damage and toxicity. MeHg is inactivated by sulfur nucleophiles such as cysteine (CysSH), glutathione (GSH) and its related reactive persulfides through the formation of GSH adduct (MeHg-SG) and dimethylmercury sulfide ((MeHg)<sub>2</sub>S), respectively. Our previous study showed that not only GSH adduct formation but also sulfur adduct formation regulated by reactive persulfides play a critical role in protection against MeHg. On the other hand, we are also exposed to a variety of environmental electrophiles other than MeHg through dietary habits, life style and life environment on a daily basis. We found that reactive persulfides/polysulfides are also able to capture environmental electrophilic metals such as cadmium (Cd), resulting in formation of their sulfur adducts with less electrophilicity. These findings suggest that combined exposure to environmental electrophilic metals would lead to exacerbation of MeHg toxicity due to the consumption of endogenous reactive persulfides. In the present study, we demonstrated that combined exposure to environmental electrophilic metals such as Cd and/or and copper lower the threshold for toxicity of MeHg alone *in vitro*.