

# 低濃度メチル水銀ばく露によるオートファジーとプロテアソームを 制御するp62の役割

主任研究者 清野正子(北里大学薬学部公衆衛生学・教授)

## 研究要旨

メチル水銀 (MeHg) は、チオール基に結合する性質を有している。MeHgは、様々なタンパク質に結合し、その機能を失活させる。その結果、変性タンパク質が細胞内に蓄積する。生体はこれらの蓄積を防ぐため、変性タンパク質の分解系を働かせている。細胞内の主要な分解系の一つとしてオートファジーがあり、様々な環境ストレスに対応し細胞内の品質管理に重要な役割を果たしている。我々は、これまでに低濃度MeHgがオートファジーを活性化すること、オートファジーがMeHgに対する防御機構であることを報告した<sup>1,2</sup>。オートファジーによって分解されるタンパク質はユビキチン化を受け、オートファゴソームに包括された後、リソソームと融合して分解される。この過程において、オートファジーレセプターp62/Sequestosome1 (p62) が、ユビキチン化タンパク質を認識し、それをオートファゴソームに内包させる。近年、我々は、p62欠損 (p62KO) MEF細胞を用いて、MeHgによる細胞影響を検証した結果、p62がMeHgにより増加するユビキチン化タンパク質の分解の鍵分子であること、MeHgに対する保護分子として機能することを示唆した<sup>3</sup>。

p62は分子内にユビキチン鎖と結合する部位を有し、ユビキチン化タンパク質の凝集体やオルガネラ等をオートファゴソームに導く。また、p62自身も (microtubule light chain-3) LC3との結合を介して、オートファジーによって選択的に分解される。一方、p62はシグナル伝達を担う多彩な分子群と相互作用することが知られている。細胞内におけるp62の役割は多岐に渡るが、その調節機構はほとんど明らかになっていない。そこで本研究では、p62が関与するMeHg応答機構の分子基盤を構築することを目的とし、p62が介在するMeHg結合タンパク質の細胞内動態解明を試みる。研究項目は (1) MeHgにより誘導されるオートファジーにおけるp62とNeighbor of BRCA1 gene 1 (NBR1) の役割、(2) MeHgにより誘導されるオートファジーにおけるp62複合体形成の新規分子の同定、(3) ユビキチン化タンパク質の分解におけるオートファジーとプロテアソームの寄与度の検討、に大別して研究を遂行する。

(1) p62に類似したドメイン構造を有し、p62と同様にオートファジーの基質の一つとして知られるNBR1に注目した。NBR1とp62の機能的な差異を検証するため、p62欠損 (p62KO) MEF細胞にNBR1あるいはp62を安定発現させた細胞株 (GFP-p62/p62KO細胞及びmCherry-Nbr1/p62KO細胞) を用いて、MeHgに対する感受性を調べた。その結果、GFP-p62/p62KO細胞、mCherry-Nbr1/p62KO細胞は共にp62KO細胞と比較して、細胞生存率が高かった。これら

の細胞株はMeHg処理後のユビキチン化タンパク質の量が、p62KO細胞と比較して低かった。

次に、内在性NBR1のMeHg応答性を検討した。野生型マウス胎児線維芽 (MEF)細胞に1  $\mu$ MのMeHgを処理したところ、NBR1のmRNA発現誘導レベルはp62とほぼ等しく、それぞれ増加した。一方、タンパク質レベルではMeHgに対する応答性が異なり、p62タンパク質は増加したが、NBR1タンパク質は減少した。

(2) MeHgばく露時のp62複合体中の新規分子を同定するために、MeHgを野生型MEF細胞、ATG5KO MEF細胞それぞれに処理し、p62を用いた免疫沈降法により共沈タンパク質を解析した。免疫沈降物をSDS-PAGEで分離し、銀染色で染色したところ、いくつかのp62結合タンパク質の候補となるバンドを認め、現在解析を進めているところである。

(3) MeHg毒性に対するオートファジーとプロテアソームの寄与度を検証するため、それぞれの阻害剤とMeHgによる共処理による細胞死について、野生型MEF細胞、p62KO MEF細胞を用いて検討した。MeHgとそれぞれの阻害剤を共処理すると、MeHg単独処理と比較して野生型、p62KO細胞共に細胞生存率が有意に低下し、オートファジーとプロテアソームの両分解系がMeHgの毒性緩和に寄与している可能性が示された。

次年度は、(1) NBR1欠損細胞を樹立し、p62とNBR1によるMeHg結合ユビキチン化タンパク質の認識、及びオートファジーとプロテアソームへの指向性について解析を進める、

(2) MeHgにより誘導される新規p62結合タンパク質を同定する、(3) p62KO細胞とNBR1KO細胞を用いて、オートファジーとプロテアソームの寄与度を解析する。以上の知見により、p62が関与するMeHg応答機構について新しい見解を考察したい。

キーワード: メチル水銀、p62、NBR1、オートファジー、プロテアソーム

研究者協力者

高根沢 康一 (北里大学薬部公衆衛生学 准教授)

中村 亮介 (北里大学薬部公衆衛生学 助教)

## I 研究目的

水俣病は、工場排水中のメチル水銀 (MeHg) に汚染された魚介類の摂取によって引き起こされたMeHg中毒である。現在では水俣病の様な高濃度MeHgの汚染はないが、環境中に幅広く存在するMeHgは食物連鎖を介した生物濃縮によりマグロ等の高次捕食者に蓄積し、これらの日常的な摂取によるヒトへのばく露が懸念されている。食事由来の低濃度MeHgによるばく露影響は不明な点が多いが、パーキンソン病などの脳神経変性疾患の発症率を増加させるという報告<sup>4</sup>があり、MeHgの細胞毒性は神経系の発達期の影響に留まらず、神経成熟後の疾患のリスクとなる可能性が想定される。アルツハイマー症、筋萎縮性側索硬化症 (ALS)、パーキンソン病に代表される脳神経変性疾患では、共通して脳内にタンパク質の異常な凝集物が形成され、これが神経細胞死を引き起こす主要原因である<sup>5</sup>。これらタンパク質凝集物形成はオートファジーやプロテアソームの分解活性の低下と密接な関係にある。

脳内のプロテアソーム活性が加齢とともに低下していくことや、プロテアソーム阻害剤の長期的な投与によって神経変性疾患を発症すること<sup>6,7</sup>、オートファジー不全マウスの解析からも脳内に脳神経変性疾患に特徴的なタンパク質凝集物が認められる<sup>8</sup>。

近年我々は、MeHgによるタンパク質凝集物の主成分であるユビキチン化タンパク質の増加を示し、このユビキチン化タンパク質が「MeHg毒性の原因となりうるのか」という点に着目して解析を行った結果、オートファジー不全細胞は、MeHgに対して感受性が高く、オートファジーによるユビキチン化タンパク質の除去がMeHg毒性の軽減に繋がることを示した。さらにユビキチン化タンパク質のオートファジーへの輸送を担うp62を欠失した細胞においても、MeHgに対する感受性は高く、ユビキチン化タンパク質の除去不全がMeHg毒性の一要因となりうることを実証した。

本研究の目的は、MeHgばく露により増加するユビキチン化タンパク質の細胞内動態を制御する分子p62の分子基盤を明らかにすること、これらの分子基盤の解明を通してMeHgが結合したユビキチン化タンパク質の細胞内動態を明らかにすることを目指している。本年度は（1）p62と類似した機能が想定されるNBR1の機能解析およびp62との機能の相関性、NBR1のMeHg応答性、（2）p62抗体を用いた免疫沈降によるp62相互作用分子の解析、（3）オートファジーとプロテアソームの阻害によるMeHg毒性影響について検討した。

## II 研究方法

### ウエスタンブロット法

野生型マウス胎児線維芽 (MEF)細胞を 60 mm dish に播き、24 時間後 1  $\mu$ M の MeHg を処理した。細胞は、経時的に RIPA Buffer (20 mM Tris pH7.4, 0.1% SDS, 1% Na deoxycholate, 1% NP 40, and protease/phosphatase inhibitor cocktail)で可溶化し、回収した。BCA 法によるタンパク質定量後、総タンパク質を SDS-PAGE にて分離後、PVDF 膜に転写した。抗 p62 抗体 (MBL)、抗 NBR1 抗体 (CST)、抗ユビキチン抗体 (CST) を 4°C, over night で転倒混和した。HRP 標識 2 次抗体を室温で 1 時間反応させ、化学発光を Amersham Imager 680 を用いて検出した。

### リアルタイム RT-PCR 法

MEF 細胞を 60 mm dish に播き、24 時間後 1  $\mu$ M の MeHg を処理した。NucleoSpin RNA kit (Macherey-Nagel)を用いて Total RNA を抽出後、PrimeScript RT Master Mix (Thermo Fisher Scientific)を用いて逆転写反応を行った。qPCR 反応は PowerUp SYBR Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific)を用いて CFX-96 (Bio-Rad)にて検出した。

### 細胞株の樹立法

レトロウイルスベクター-pMXs/GFP-p62, mcherry-NBR1 (Addgene) をレトロウイルスパッケージング細胞である GP2-293 細胞 (Clontech) に Lipofectamine2000 (Thermo Fisher Scientific) を用いて導入した。4 日後、培地中に放出されたウイルス粒子を回収し、p62KO MEF 細胞にポリブレンを用いてウイルスを感染させた。それぞれの発現細胞株は、限外希釈法によりクローン化し、ウエスタンブロット法により発現を確認した。

### 免疫染色法

カバーガラスを 6 ウェルプレートの中に入れ、p62KO/GFP-p62 と p62KO/mcherry-NBR1 細胞を播き、24 時間後に 4% パラホルムアルデヒドで固定した。PBS で洗浄後、カバーガラスを ProLong Diamond (Thermo Fisher Scientific)を用いて封入した。蛍光は共焦点レーザー顕微鏡 (FV3000, Olympus) を用いて検出した。

#### 免疫沈降法

野生型 MEF 細胞と Atg5KO 細胞を 60 mm dish に播き、1  $\mu$ M MeHg を 24 時間処理し、コントロール処理細胞と共に RIPA Buffer (20 mM Tris pH7.4, 0.1% SDS, 1% Na deoxycholate, 1% NP 40, and protease/phosphatase inhibitor cocktail)で可溶化した。可溶性画分に抗 p62 抗体を添加し、2 時間 4°C で転倒混和した。その後、プロテイン A ビーズを加え、さらに 1 時間 4°C で転倒混和し、免疫沈降物を得た。SDS-PAGE にて免疫沈降物を分離後、銀染色を行った。

#### (倫理面への配慮)

本研究は、哺乳類培養細胞への遺伝子導入等、遺伝子組換えDNA実験が含まれる。これらの実験に際し、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物多様性の確保に関する法律 (カルタヘナ法) 」 (平成15年法律第97号) と研究開発等に係わる遺伝子組換え生物等の第二種使用等に当たって執るべき拡散防止措置等を定める省令 (平成16年文部科学省・環境省令第1号) 」に従い実施する。さらに、これらに基づく、北里大学における遺伝子組換え実験の実施に際し遵守すべき安全確保に関する基準「北里大学遺伝子組換え実験安全管理規程」(平成20年4月改正) を遵守し、実験を行う。また、本研究は、人を対象とした研究ではないため、人権の保護への対応が必要な研究には該当しない。また、個人情報に伴うアンケート調査・インタビュー調査・行動調査 (個人履歴・映像を含む)、提供を受けた試料の使用、ヒト遺伝子解析研究、動物実験には該当しない。

### III 研究結果

#### (1) MeHgにより誘導されるオートファジーにおけるp62とNeighbor of BRCA1 gene 1 (NBR1)の役割

p62とNBR1のMeHgに対する機能的差異を検証するために、p62KO MEF細胞を用いて、p62あるいはNBR1を外来的に発現させ、MeHgに対する感受性およびMeHgばく露によるユビキチン化タンパク質の蓄積性について調べた。p62KO細胞は2  $\mu$ Mメチル水銀処理により、24時間後、細胞生存率は約40%に低下した。一方、p62発現細胞 (GFP-p62/p62KO) では80%程度の細胞が生存した。同様にNBR1発現細胞

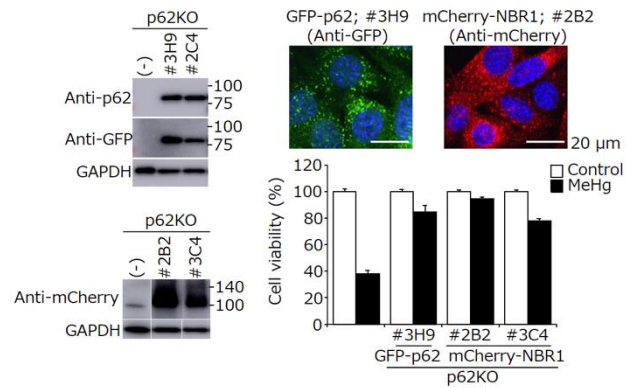


Fig. 1

(mcherry-NBR1/p62KO) においても80-90%程度の細胞が生存した(Fig. 1)。さらに細胞内ユビキチン化タンパク質の蓄積をウエスタンブロット法で調べたところ、p62KO細胞ではMeHg処理8時間後にユビキチン化タンパク質の蓄積が顕著に認められたが、GFP-p62/p62KO細胞及びmCherry-Nbr1/p62KO細胞ではユビキチン化タンパク質の蓄積は僅かであった。また、p62KO細胞におけるNBR1はMeHg処理24時間後に顕著に減少したが、GFP-p62/p62KO細胞及びmCherry-Nbr1/p62KO細胞ではNBR1はほとんど変化がなかった (Fig. 2)。

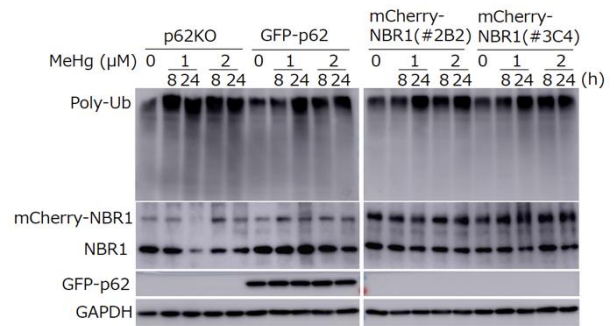


Fig. 2

続いて、内在性のNBR1のMeHg応答性を検討した。野生型MEF細胞に1  $\mu$ MのMeHgを処理し、24時間後のNBR1 mRNA発現を測定した結果、コントロール細胞と比較して約2倍に増加した。しかし、NBR1タンパク質の発現レベルはmRNA発現と一致せず、MeHg処理後8~16時間において一過的な増加を認めるものの20~24時間ではMeHg処理前のNBR1タンパク質発現レベルより低下した。一方、p62タンパク質はMeHg処理時間依存的に増加し、20~24時間で最も発現レベルが高く、約6~8倍に増加した (Fig. 3)。

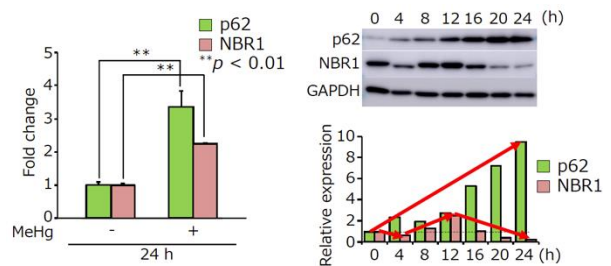


Fig. 3

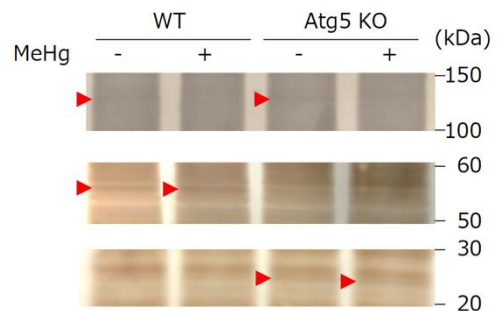


Fig. 4

#### (2) MeHgにより誘導されるオートファジーに

### おけるp62複合体形成の新規分子の同定

p62はオートファゴソームにアンカーされるLC3-IIやユビキチン化タンパク質だけでなく様々なタンパク質との結合性を持つシグナリングハブとしての機能が示唆されている。MeHgばく露時、あるいはオートファジー不全細胞におけるp62結合複合体を検討するため、MeHgを野生型MEF細胞、ATG5KO MEF細胞に処理し、p62を用いた免疫沈降法により共沈タンパク質の同定を試みた。免疫沈降物をSDS-PAGEで分離し、銀染色で染色したところ、120 kDa付近にMeHg処理で消失するバンドが認められた。また、55 kDa付近には野生型MEF細胞で、25 kDa付近にはATG5KO MEF細胞において強く検出されるバンドを認めた (Fig. 4)。

### (3) ユビキチン化タンパク質の分解におけるオートファジーとプロテアソームの寄与度の検討

研究目的の項で述べたように、ユビキチン化タンパク質の分解は2大分解系であるオートファジーとプロテアソームの寄与が大きい。ユビキチン化タンパク質の蓄積がMeHgの毒性の一端を担っているというこれまでの研究結果を踏まえ、オートファジー阻害剤クロロキン (chloroquine; CQ) あるいはプロテアソーム阻害剤MG132とMeHgによる細胞死について、野生型MEF細胞、p62KO MEF細胞を用いて検討した。CQある

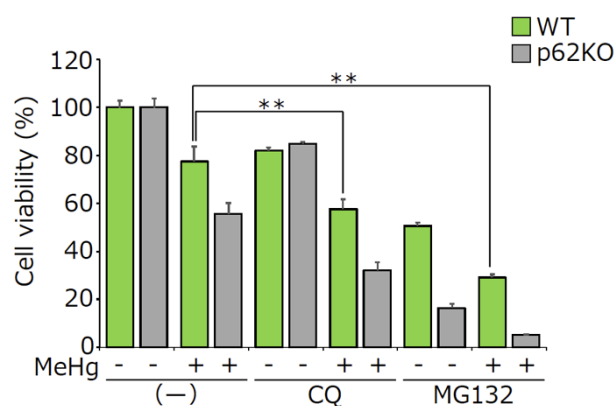


Fig. 5

いはMG132とMeHgを共処理すると、MeHg単独処理と比較して、野生型、p62KO細胞共に細胞生存率が有意に低下した。CQ単独処理では野生型、p62KO細胞共に細胞生存率にほとんど差がなかったものの、MG132単独処理ではp62KO細胞が野生型細胞と比較して、細胞生存率が低下し、MeHgとの共処理の結果、細胞生存率は僅かであった (Fig. 5)。

## IV 考察

(1) MeHgにより誘導されるオートファジーにおけるp62とNBR1の役割を検討するため、p62KO MEF細胞にp62あるいはNBR1を外来的に発現させた細胞株を樹立し、MeHgに対する感受性を調べた。p62発現細胞 (GFP-p62/p62KO) はp62KO細胞が示すMeHg高感受性が緩和され、p62のMeHg保護機能が認められた。一方、NBR1発現細胞 (mcherry-NBR1/p62KO) においてもGFP-p62/p62KO細胞と同様にMeHg高感受性が緩和され、NBR1によるp62の機能的相補性が示唆された。この細胞生存率の結果と一致して、mcherry-NBR1/p62KO細胞、GFP-p62/p62KO細胞におけるMeHgばく露の細胞内ユビキチン化タンパク質の蓄積量も減少した。以上より、NBR1はp62が有するユビキチン化タンパク質除去 (クリアランス) 能を相補した。この結果は、ユビキチン化タンパク質のクリアランスがMeHg毒性を緩和する一因となることを強く示唆しており、今後、p62とNBR1によるプロテアソームとオートファジーの使い分けについて着目し、機能的差異を検証していく予定である。

野生型MEF細胞において、24時間ばく露により細胞死がほとんど引き起こされない濃度である1  $\mu$ M MeHg処理でNBR1のmRNA発現量の増加が認められた。p62はNrf2の活性化を介した発現誘導機構が報告されているが、NBR1のストレス応答に関する先行研究はほとんどなく、発現誘導機構は不明である。MeHg処理によるNBR1タンパク質の発現量はmRNAの発現誘導にも関わらず、24時間後では減少した。この結果は、MeHgによるオートファジーあるいはプロテアソームの活性化により、分解基質としてNBR1タンパク質が分解されたのではないかと考えられた。免疫細胞染色の結果、NBR1のほとんどがp62と共局在しており、この結果は、先行研究におけるp62とNBR1の結合性を強く示唆するものである。しかしながら、p62タンパク質の発現量はNBR1とは対称的に時間依存的な増加が認められ、両者の量的なバランスがMeHg処理によりp62側に傾く結果となった。これらの結果から、NBR1はp62よりも積極的に分解系される可能性、あるいはp62の発現誘導量がNBR1と比べて多い可能性等が推察された。オートファジー阻害剤であるCQとMeHgを共処理するとMeHgによる細胞死が増強した。この細胞死増強作用は、野生型MEF細胞とp62KO MEF細胞に共通して認められ、MeHg毒性の緩和にオートファジーが保護的に働いていることが示唆された。しかしながら、p62KO細胞と野生型細胞の比較のみではMeHg毒性の緩和におけるNBR1の機能を明らかにすることができないため、現在NBR1欠損細胞の樹立を試みている。

(2) 前述したようにp62はLC3-IIやユビキチン化タンパク質に結合するだけでなく様々なタンパク質と結合する。p62のN末領域であるPB1ドメインを介してp62、NBR1、aPKCやERKと、TBドメインを介してTRAF6と、KIRドメインを介してKeap1と結合する<sup>9,10</sup>。しかしp62がMeHgにより誘導されるオートファジーにおいてどのような複合体を形成しているのかについては、ほとんど明らかになっていない。そこで、MeHgにより誘導されるオートファジーにおけるp62複合体形成の新規分子の同定を目的とした。MeHgを野生型MEF細胞、オートファジー不全細胞であるATG5KO MEF細胞に処理し、p62を用いた免疫沈降法により共沈タンパク質の同定を試みた。免疫沈降物をSDS-PAGEで分離し、銀染色で染色したところ、120 kDa付近にはMeHg処理で消失するバンドが野生型、ATG5KO両細胞で認められた。また、55 kDa付近には野生型MEF細胞のみに、25 kDa付近にはATG5KO細胞において強く検出されるバンドを認めた。55 kDa付近のバンドはKeap1の分子量付近にあるものの、120, 25 kDaのバンドは、上述分子群と分子量が異なる。現在、これらのバンドを切り出し、質量分析による同定を進めているところである。

(3) ユビキチン化タンパク質の分解におけるオートファジーとプロテアソームの寄与度を検討するため、オートファジー阻害剤クロロキン (chloroquine; CQ) あるいはプロテアソーム阻害剤MG132とMeHgによる細胞死について検証した。p62KO MEF細胞は、CQ単独処理において野生型とほぼ同等の細胞生存率を示したが、MG132単独処理では野生型細胞と比較して、細胞生存率が有意に低下した。この結果は、定常状態においてp62がプロテアソームを介して恒常性を維持している割合が高いことを示唆している。一方、野生型MEF細胞、p62KO MEF細胞共に、CQあるいはMG132とMeHgを共処理すると、MeHg単独処理と比較して細胞生存率が有意に低下した。以上のことから、MeHgによる細胞死において、オー

トファジーとプロテアソームの分解系がそれぞれ細胞の生存に寄与する可能性が示された。

## V 結論

p62KO細胞は野生型細胞と比べてMeHgにより増加するユビキチン化タンパク質の蓄積が顕著である。本年は、p62と類似した機能的なドメインを持つNBR1をp62KO細胞に発現させ、MeHg ばく露に対するp62とNBR1の機能的な違いを検証した。p62KO細胞が示すMeHgに対する高い感受性はNBR1の外来的な発現によって軽減されると共に、細胞内のユビキチン化タンパク質の蓄積が軽微となった。この結果から、NBR1によるp62の機能的相補性が示唆された。一方、MeHg ばく露に対するp62とNBR1のタンパク質発現パターンは異なり、MeHg ばく露時間依存的にp62とNBR1の存在比はp62側に傾いた。したがってp62とNBR1は共通したMeHgに対する細胞保護作用を示す一方で、それぞれ独自にMeHgに対する機能を持つことが示唆された。p62KO細胞は野生型細胞と比較してMG132に対する感受性が高く、一方、CQに対する感受性はほとんど変化がなかった。この結果は、定常状態において、p62がプロテアソームに一定量のユビキチン化タンパク質の分解を依存していることを示唆している。今後、NBR1KO細胞の樹立と解析により、MeHgばく露時のユビキチン化タンパク質分解のプロテアソームとオートファジーの意義について検討を進める予定である。

## VI 次年度以降の計画

本年度はp62がユビキチン化タンパク質のクリアランスに重要であること、その機能の一部をNBR1が相補する可能性が示された。来年度はMeHgに対するp62とNBR1の機能的差異をより明確に評価するためNBR1欠損細胞を確立し、MeHgに対する細胞の感受性、ユビキチン化タンパク質のクリアランスについて検証を行う。

また、本年度の研究成果より、p62結合タンパク質の候補分子をいくつか見出した。次年度はp62結合タンパク質を質量分析解析により同定し、その結合性を評価する。さらに同定分子の欠損細胞あるいは高発現細胞を樹立し、MeHgによるオートファジー活性化への影響とMeHg毒性に対する機能性を評価する。

## この研究に関する現在までの研究状況、業績

特になし

## 引用文献

- 1 Takanezawa, Y., Nakamura, R., Sone, Y., Uruguchi, S. & Kiyono, M. Atg5-dependent autophagy plays a protective role against methylmercury-induced cytotoxicity. *Toxicol Lett* **262**, 135-141, doi:10.1016/j.toxlet.2016.09.007 (2016).
- 2 Takanezawa, Y., Nakamura, R., Sone, Y., Uruguchi, S. & Kiyono, M. An autophagy deficiency promotes methylmercury-induced multinuclear cell formation. *Biochem*



- Biophys Res Commun* **511**, 460-467, doi:10.1016/j.bbrc.2019.02.084 (2019).
- 3 Takanezawa, Y. *et al.* Sequestosome1/p62 protects mouse embryonic fibroblasts against low-dose methylmercury-induced cytotoxicity and is involved in clearance of ubiquitinated proteins. *Sci Rep* **7**, 16735, doi:10.1038/s41598-017-17112-8 (2017).
- 4 Palacios, N. *et al.* A prospective analysis of airborne metal exposures and risk of Parkinson disease in the nurses' health study cohort. *Environ Health Perspect* **122**, 933-938, doi:10.1289/ehp.1307218 (2014).
- 5 Zhang, Z., Miah, M., Culbreth, M. & Aschner, M. Autophagy in Neurodegenerative Diseases and Metal Neurotoxicity. *Neurochem Res* **41**, 409-422, doi:10.1007/s11064-016-1844-x (2016).
- 6 Albornoz, N., Bustamante, H., Soza, A. & Burgos, P. Cellular Responses to Proteasome Inhibition: Molecular Mechanisms and Beyond. *Int J Mol Sci* **20**, doi:10.3390/ijms20143379 (2019).
- 7 Rao, G., Croft, B., Teng, C. & Awasthi, V. Ubiquitin-Proteasome System in Neurodegenerative Disorders. *J Drug Metab Toxicol* **6**, doi:10.4172/2157-7609.1000187 (2015).
- 8 Hara, T. *et al.* Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature* **441**, 885-889, doi:10.1038/nature04724 (2006).
- 9 Lippai, M. & Low, P. The role of the selective adaptor p62 and ubiquitin-like proteins in autophagy. *Biomed Res Int* **2014**, 832704, doi:10.1155/2014/832704 (2014).
- 10 Bitto, A. *et al.* P62/SQSTM1 at the interface of aging, autophagy, and disease. *Age (Dordr)* **36**, 9626, doi:10.1007/s11357-014-9626-3 (2014).

# Role of p62 as a key regulator of autophagy and proteasome in low-dose methylmercury-exposed cells

Masako Kiyono, Ryosuke Nakamura, Yuka Ohshiro, Shimpei Uraguchi, Yasukazu Takanezawa

*Department of Public Health, School of Pharmacy, Kitasato University*

*Keywords:* Methylmercury; p62; NBR1; Autophagy; Proteasome

## ※ Abstract

p62/Sequestosome 1 (p62) is a master regulator of ubiquitinated proteins, shuttling them to the proteasome or autophagic machinery for degradation. In the present study, we investigated whether overexpression of neighbor of BRCA gene 1 protein (NBR1), a functional homolog of p62, compensate p62 functions including protection of MeHg-induced cell death and ubiquitinated protein accumulation. Depletion of p62 in murine embryonic fibroblast (MEF) cells (p62KO cells) dramatically enhanced ubiquitinated protein accumulation by methylmercury (MeHg) treatment compared to wild-type (WT) cells. The total amount of ubiquitinated protein in mCherry-NBR1/p62KO cells (overexpression of NBR1 in p62KO cells) following MeHg treatment was less than that found in p62KO cells. The viability of MeHg-exposed mCherry-NBR1/p62KO cells was significantly higher than that found in p62KO cells. Next, we asked whether MeHg up-regulates endogenous p62 and NBR1 at mRNA and protein levels in MEF cells. The mRNA and protein levels of p62 were up-regulated following MeHg exposure. Like p62, the level of NBR1 mRNA was increased, whereas the expression level of NBR1 protein was decreased following MeHg exposure. Taken together, our findings suggest that NBR1 together with p62 promotes autophagic degradation of MeHg-induced ubiquitinated proteins and that p62 and NBR1 can either work independently following MeHg exposure.