

メチル水銀によるTNF受容体3を介した脳神経細胞死誘導機構

主任研究者 黄 基旭（東北医科薬科大学薬学部教授）

研究要旨

我々はこれまでに、メチル水銀によって転写因子STAT3を介して発現誘導されたオンコスタチンM（OSM: IL-6分子種の一員）が、細胞外に放出された後にTNF受容体3（TNFR3）に結合することで細胞死を誘導する可能性を示してきた。また、メチル水銀がマウス脳中のミクログリアにおいてOSMの発現を誘導することや、TNFR3中和抗体のマウスの脳室内または脳組織スライスへの添加がメチル水銀による神経細胞死を抑制することも見出している。そこで本年度は、ミクログリアでのメチル水銀によるOSMの発現誘導機構として、STAT3を介した経路およびSTAT3以外の転写因子を介した経路について検討するとともに、メチル水銀によるTNFR3を介した細胞死誘導機構についても検討した。

メチル水銀によるSTAT3のリン酸化（活性化）は、その上流のJAK1キナーゼの発現抑制によってほとんど認められなくなった。しかし、JAK1の主なリン酸化体（Tyr1034/1035）はメチル水銀によるOSM発現誘導の条件下において観察されなかったことから、メチル水銀はJAK1のTyr1034/1035リン酸化に依存することなくSTAT3を活性化させることでOSM発現を誘導している可能性が示唆された。また、転写因子cJun（AP-1の構成因子）のリン酸化もメチル水銀処理によって亢進し、その発現抑制によってメチル水銀によるOSM発現誘導が低下した。さらに、cJunのリン酸化に関わるJNKやその上流キナーゼであるASK1のリン酸化もメチル水銀処理によって亢進し、それぞれの活性を抑制することでメチル水銀によるcJunリン酸化およびOSM発現誘導がそれぞれ低下した。STAT3およびcJunに対するsiRNAを細胞に同時導入した結果、メチル水銀によるOSMの発現誘導が相加的に低下することなく、それぞれの単独発現抑制時と同程度であった。これらのことから、ミクログリアにおいてメチル水銀はSTAT3/AP-1経路を介してOSM発現を誘導している可能性が示唆された。次に、TNFR3に結合する新規蛋白質を網羅的に検索した結果、ラミニン結合蛋白質であるRPSA（40s ribosomal protein SA）がTNFR3の細胞内ドメインに結合することを見出した。また、TNFR3とRPSAをそれぞれ発現抑制することによってメチル水銀によるcaspase-3（アポトーシス実行因子）の活性化が低下したことから、TNFR3/RPSA複合体がメチル水銀によるアポトーシス誘導に関与することがはじめて明らかになった。以上のことから、メチル水銀はミクログリアでのSTAT3/AP-1の活性化を介してOSMの合成誘導を亢進し、細胞外に放出されたOSMが神経細胞膜上のTNFR3/RPSA複合体に結合することでアポトーシスを誘導している可能性が示唆された。

キーワード：メチル水銀、オンコスタチンM（OSM）、TNFR3、STAT3、AP-1

研究者協力者

星 尚志（東北医科薬科大学大学院特別研究学生）

I 研究目的

メチル水銀毒性に対する感受性には遺伝的な個体差があると考えられるが、感受性決定の分子機構はほとんど解明されていない。我々は、メチル水銀を投与したマウス脳中

のミクログリアにおいてオンコスタチンM (OSM; IL-6分子種の一員) が発現誘導されることを報告した。また、細胞外に放出されたOSMが神経細胞膜上に存在する可能性のあるTNF受容体3 (TNFR3) に結合することで細胞死を誘導することも見出している。さらに、OSMやTNFR3に対する中和抗体をマウス脳組織スライスに添加することによりメチル水銀による神経細胞死が抑制されたことから、OSMとTNFR3はメチル水銀による脳神経傷害に関与している可能性が強く示唆されている。昨年度のBV2細胞 (マウス由来ミクログリア細胞株) を用いた検討では、転写因子STAT3およびその上流キナーゼJAK1の発現抑制によってメチル水銀によるOSMの発現誘導が低下されることを報告した。そこで本年度は、メチル水銀によるOSM発現誘導機構としてのJAK1/STAT3経路の関与について詳細に検討するとともに、他の転写因子の関与についても検討した。また、マウス由来神経幹細胞株であるC17.2細胞を用いて、メチル水銀によるTNFR3を介した神経細胞死誘導機構について検討した。

II 研究方法

1. BV2 細胞での NF- κ B、AP-1 または STAT3 の単独または二重ノックダウンがメチル水銀による OSM mRNA レベルの増加に与える影響

BV2 細胞を 1×10^5 cells/well になるように 12-well plate に播種し、24 時間培養した。その後、Lipofectamine RNAiMAX (Thermo Fisher) 試薬を用いて NF- κ B (RelA)、AP-1 (cJun) および STAT3 に対する siRNA を単独または二重に導入し、さらに 24 時間培養した後に塩化メチル水銀で処理した。培養終了後 Isogen II (Nippon Gene) 試薬により総 RNA を回収し、逆転写反応後、qPCR により OSM mRNA レベルを検討した。なお、OSM mRNA レベルは各サンプル中の GAPDH mRNA レベルで補正した。

2. BV2 細胞からの核画分の抽出

BV2 細胞を 4×10^5 cells/1.8 mL/well となるように 6-well plate に播種し、24 時間後に 200 μ L の塩化メチル水銀 (最終濃度 20 μ M) で処理した。2 時間まで培養した後、培地を完全に除去し、あらかじめ氷冷した PBS で 1 回洗浄した。各 well に核抽出用バッファー (320 mM sucrose、3 mM CaCl₂、2 mM MgCl₂、0.1 mM EDTA、1 mM DTT、0.5% NP-40) を 200 μ L ずつ添加し、スクレイパーを用いて細胞を回収し、1.5 mL チューブに移し、氷冷しながら 20 分間培養した。その後、1000 \times g で 3 分間 4 $^{\circ}$ C の条件で遠心分離し、上清を細胞質画分として回収した。得られた沈殿に 100 μ L の 2% SDS buffer を加え、ピペッティングで可溶化し、95 $^{\circ}$ C で 10 分加熱することによって粘性を除去したものを核画分として回収した。

3. BV2 細胞への各種阻害剤の処理

BV2 細胞を 1×10^5 cells/0.9 mL/well となるように 12-well plate に播種し、24 時間培養した。各種キナーゼ阻害剤を指定最終濃度になるように 1 時間前に添加した後、最終濃度 20 μ M の塩化メチル水銀で処理した。

4. TNFR3 と結合する蛋白質の探索

HEK293 細胞を 6×10^6 cells/dish になるように 10 cm dish に播種した (総 10 枚)。24 時間培養した後、polyethylenimine を用いて C 末端に V5 タグを付加した TNFR3 (TNFR3-V5) を発現するプラスミドベクターを導入した。24 時間培養した後、20 μ M の塩化メチル水

銀で6時間処理した。培養終了後 IP buffer (20 mM Tris-HCl (pH 7.2)、150 mM NaCl、1% Triton X-100、1 mM EDTA、protease inhibitor cocktail) を用いて蛋白質を回収し 0.45 μ m フィルターで濾過して得られた抽出物を抗 V5 タグ抗体ビーズで免疫沈降を行った。次に、V5 タグペプチド (500 ng/ μ L、1 mL/sample) により抗 V5 タグ抗体ビーズから蛋白質を溶出し、TCA/アセトンを用いて蛋白質を沈殿させた後、sample buffer (8 M urea、50 mM DTT、2% CHAPS、0.2% バイオライト (pH 3-10)、0.001% BPB) に溶解した。固定化 pH 勾配ストリップゲル (pH 3-10) で等電点電気泳動を行った後、平衡化バッファー I (6 M urea、2% SDS、0.375 M Tris-HCl (pH 8.8)、2% DTT) および平衡化バッファー II (6 M urea、2% SDS、0.375 M Tris-HCl (pH 8.8)、2.5% ヨードアセトアミド) で平衡化した。その後 12.5% ポリアクリルアミドゲルで SDS-PAGE を行い、電気泳動終了後のゲルをクマシーブリリアントブルーにより染色した。

5. 免疫沈降

C17.2 細胞 (1.6×10^5 cells/1.8 mL/well) を 6-well plate に播種し、37°C、5% CO₂、95%室内空気下で 24 時間培養した。その後 DNA transfection complex (plasmid DNA 3 μ g、polyethylenimine 10 μ g、Opti-MEM を合計 200 μ L になるよう混和し、室温で 15 分間静置したものを) を添加し、6 時間培養した後 transfection complex を含まない培地に交換し、さらに 18 時間培養した。細胞を PBS で 2 回洗浄した後、Cell-LyEX MP (Toyo Ink Group, 10 mL の Cell-LyEX に対して protease inhibitor cocktail (cOmplete、EDTA-free) 一錠を溶解したものを) を用いた 200 μ L を添加し細胞を溶解した。細胞抽出液を 15 分間室温で振盪した後、蛋白質濃度を DC protein assay kit を用いて定量した。1% BSA 含有 PBS 中で 2 時間ブロッキングした抗 V5 タグ抗体ビーズまたは抗 DYKDDDDK タグ抗体ビーズ (Wako) 20 μ L を細胞抽出液に添加し、4°C で回転させながら 3 時間反応させた。その後ビーズを 0.1% NP-40 含有 PBS で 3 回、PBS で 2 回洗浄し、2 \times sample buffer 40 μ L を添加し 95°C で 5 分間加熱した後、上清を SDS-PAGE 用のサンプルとした。

6. TNFR3 結合蛋白質のプラスミド作製

C17.2 細胞から cDNA を単離し、それを鋳型として PrimeSTAR HS (Takara Bio) を用いて PCR 反応を行い、それぞれの C 末端に FLAG タグ配列を融合した塩基配列を増幅した。その後 pcDNA3.1 (+) を BamH I および EcoR I を用いて切断し、In-fusion HD Cloning Kit (Takara Bio) を用いて PCR 断片を導入した。プラスミドは大腸菌 (DH5 α 株) に導入し、NucleoBond Xtra Midi (Takara Bio) により精製した。HSPD1 および RPSA は精製後に一塩基の欠損が認められたため、作製したプラスミドを鋳型として inverse PCR を行い、欠損していた塩基を導入した。その後 Ligation high (Toyobo) を用いてライゲーション反応を行い、上記と同様にプラスミドを精製した。

7. 免疫染色

10 週齢の雄性マウスから脳を摘出し、10%ホルマリンで固定した後パラフィンで包埋した。その後厚さ 4 μ m の切片を作製し、免疫染色に用いた。作製した切片をキシレンに浸漬してパラフィンを除き、100%、95%、70%のエタノールに順番に浸漬し再水和を行った。TE buffer (pH 9.0)、Antigen Decloaker (Biocare Medical)、HistoVT One (Nacalai Tesque) または HistoReveal (Abcam) による抗原賦活化を行った後、3% H₂O₂ に 10 分間浸漬した。10% goat serum または 0.1% BSA で 30 分間ブロッキングし、50 倍、200 倍または 1000 倍

に希釈した一次抗体と4℃で一晩反応させた。PBSにより切片を洗浄した後、1000倍に希釈した2次抗体と室温で1時間反応させた。再度切片をPBSにより洗浄し、DAB染色を行った後ヘマトキシリンで核を染色した。70%、95%、100%のエタノールおよびキシレンに順番に浸漬し脱水した後封入し、顕微鏡で観察した。

(倫理面への配慮)

培養細胞の遺伝子組み換え体を用いた研究は、東北医科薬科大学遺伝子組換え実験安全専門委員会の承認を得た研究の一環として実施したものであり、遺伝子組み換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律を遵守し、P2指定実験室で作業を行った。動物実験についても、東北医科薬科大学動物実験専門委員会の承認を得て、「東北医科薬科大学における動物実験等に関する規程」に従って実施した。

III 研究結果と考察

(1) ミクログリアにおけるメチル水銀によるOSMの発現誘導機構

OSMの発現誘導に関わる可能性のある転写因子(NF- κ B、AP-1およびSTAT3)の発現抑制がメチル水銀によるOSMの発現誘導に与える影響を検討し、本誘導がSTAT3およびその上流キナーゼJAK1の発現抑制によって低下することを報告した。そこで両者のリン酸化を調べたところ、メチル水銀によるOSMの発現誘導が認められた条件下においてリン酸化STAT3のレベルが増加し、これはJAK1の発現抑制によってほとんど認められなくなった。しかし本条件下において、JAK1の主なリン酸化体であるTyr1034/1035のリン酸化は検出されることなくその蛋白質レベルのみが増加していた。これらのことから、メチル水銀はJAK1のTyr1034/1035リン酸化に依存することなくSTAT3を活性化させることでOSMの発現を誘導している可能性が考えられる。次に、p65(NF- κ B構成因子)の発現を抑制したところ、メチル水銀によるOSMの発現誘導が依然として認められ(昨年度の成果)、また、p65のリン酸化やその核移行(活性化)も観察されなかった。このことから、少なくともBV2細胞において、NF- κ Bはメチル水銀によるOSMの発現誘導には関与しないことが示唆された。一方で、cJun(AP-1構成因子)はメチル水銀処理によってリン酸化が亢進し、さらにその発現抑制によってメチル水銀によるOSMの発現誘導が低下した。cJunのリン酸化に関与するMAPキナーゼであるJNK、ERKおよびp38のリン酸化について調べた結果、p38およびJNKのリン酸化レベルがメチル水銀処理によって増加したのに対し、ERKのリン酸化レベルは逆に低下した。一方で、p38阻害剤(SB203580)の前処理ではメチル水銀によるcjunのリン酸化が依然として認められたのに対し、JNK阻害剤(SP600125)ではcjunのリン酸化が抑制された。また、JNKの発現を抑制することによってメチル水銀によるcjunのリン酸化およびOSM発現誘導がともに低下した。次に、JNKの上流キナーゼであるASK1の発現を抑制したところ、ASK1発現抑制の程度と相関してJNKのリン酸化レベルが減少し、さらにリン酸化cjunのレベルも同様に減少していた。また、ASK1がメチル水銀によるOSM発現誘導に関与するかを検討した結果、ASK1の発現抑制によってメチル水銀によるOSMの発現誘導も一部低下した。これらのことから、メチル水銀はASK1によるJNK/AP-1経路の活性化を介してOSMの発現を誘導していることが示唆された。これらのことから、メチル水銀によるOSM発現誘導にはSTAT3およびAP-1(cJun)が転写因子として機能していると考えられる。最後に、メチル水銀によるOSMの発現誘導におけるSTAT3とAP-1の関わりを調べるため、BV2細胞にSTAT3およびcJunに対するsiRNAを同時に導入した結果、メチル水銀によるOSMの発現誘導が相

加的に低下されることなく、それぞれの単独発現抑制と同程度であった。以上のことから、メチル水銀によって活性化されたSTAT3およびAP-1 (cJun) が共役してOSMの発現誘導に関与している可能性が示唆された。

(2) メチル水銀による脳神経損傷におけるOSMとTNFR3の関係

昨年度に実施した*in situ* hybridizationの検討により、TNFR3発現細胞は脳全体的に広く分布しているが、特にメチル水銀による神経損傷が認められる大脳皮質や線条体などで多く存在することが判明している。一方で、脳中でのTNFR3発現細胞を特定するため、マウス脳の凍結切片を作製し5種の市販抗体を用いて免疫染色を行ったが、その発現を観察することはできなかった。そこで本年度は、マウス脳のパラフィン切片を作製し、上記のTNFR3抗体の5種に新たに2種を加えて総7種の市販抗体を用いて免疫染色を再度行ったが、マウス脳中でTNFR3を発現している細胞の特定には至らなかった。これまでに、TNFR3は主要臓器の中で脳に最も高く発現していることがWestern blotの結果から判明している。現在、抗原賦活化の条件などを詳細に検討することでTNFR3発現細胞の特定を行っている。一方で、代表研究者の所属先変更に伴ってTNFR3欠損マウスを用いた検討に大幅な遅延が生じていたが、11月末にSPF化したTNFR3ノックアウトマウスを現所属先の動物飼育施設に搬入することができ、繁殖を開始した。今後、マウス個体レベルでTNFR3がメチル水銀による中枢神経傷害に与える影響について至急に検討する予定である。

(3) メチル水銀によるTNFR3経路を介した神経細胞死誘導の分子機構

これまでの検討により、神経細胞膜上に存在するTNFR3は未知の経路を介してメチル水銀による細胞死に関与することを報告している。また、TNFR3に結合する新規蛋白質の同定を目的とし、TNFR3のC末端にV5タグを融合したTNFR3-V5を発現するプラスミドを導入したHEK293細胞から得られた抽出物を用いてV5抗体による免疫沈降と二次元電気泳動を行い、複数の蛋白質(PCDH17、TLL1など)が同定されたことを報告した。そこで本年度は、これらの結合蛋白質を発現するプラスミドを作製してTNFR3-V5との結合を免疫沈降により調べたが、いずれもTNFR3との結合は認められなかった。そこで、細胞膜蛋白質と細胞質蛋白質を同時に効率よく可溶化する条件を詳細に検討し、得られた細胞抽出物を用いて免疫沈降を行った結果、TNFR3に結合することが知られているTRAF分子種との結合が認められた。次に、本条件を用いて大量培養したTNFR3-V5発現細胞から蛋白質を抽出し、免疫沈降と二次元電気泳動で分離し得られたスポットを回収し質量分析を行ったところ、HNRNPK、HSPD1、TFGおよびRPSAが同定された。そこでまず、これらの蛋白質のC末端にFLAGタグを融合したものを発現するプラスミドを作製しC17.2細胞に導入した後にTNFR3-V5との結合を調べた。その結果、RPSA-FLAGのみがTNFR3-V5の細胞内ドメインとの結合が認められたものの、両者間の結合レベルはメチル水銀で処理してもほとんど変動しなかった。しかし、TNFR3の蛋白質レベルはRPSAの発現抑制によって減少し、逆にRPSAの蛋白質レベルはTNFR3の発現抑制によって減少した。これらのことは、TNFR3とRPSAは互いに複合体を形成することで安定化する可能性を示唆している。なお、RPSA (40s ribosomal protein SA) は、細胞外マトリックスの基底膜を構成する巨大な蛋白質であるラミニンに結合する蛋白質の一種である。C17.2細胞をメチル水銀で処理するとアポトーシス実行因子であるcaspase-3の活性化が認められたが、本活性化はTNFR3の発現抑制によって減弱した。また、RPSAの発現を抑制してもTNFR3と同様に

caspase-3の活性化が抑制されたことから、TNFR3はRPSAと複合体を形成することでメチル水銀によるアポトーシス誘導に関与していることが示唆された。

IV 結論

メチル水銀は脳内のミクログリアにおいてSTAT3およびAP-1 (cJun) の活性化を介してOSMを発現誘導し、細胞外に放出されたOSMが神経細胞膜上に存在するTNFR3/RPSA複合体に結合することでアポトーシスを誘導する可能性が示唆された。これまで得られた研究成果は、メチル水銀による中枢神経傷害に関わる全く新しい分子機構であり、OSM/TNFR3経路を介したメチル水銀毒性発現機構を詳細に検討することで中枢神経特異的なメチル水銀毒性発現機構が明らかになると期待される。

V 次年度以降の計画

上述したように、OSM/TNFR3経路を介したミクログリア/神経細胞間のクロストークは、メチル水銀による中枢神経傷害に関わる重要な分子機構であることが示唆されている。今後、ホモ接合体のTNFR3ノックアウトマウスを作製してメチル水銀毒性発現におけるOSM/TNFR3経路の役割を検討する。また、新規TNFR3結合蛋白質として同定されたRPSAとTNFR3との関わりを詳細に検討することでメチル水銀が示す中枢神経傷害に関わる分子機構の解明を目指す。

本研究に関する現在までの研究状況、業績

- 1) Toyama T Wang Y Kim MS Takahashi T Naganuma A Hwang GW. Increased expression of TCF3, transcription factor 3, is a defense response against methylmercury toxicity in mouse neuronal C17.2 cells. *Toxicol Res* 2021; in press: <https://doi.org/10.1007/s43188-021-00087-0>.
- 2) Sato M Toyama T Kim MS Lee JY Hoshi T Miura N Naganuma A Hwang GW. Increased putrescine levels due to ODC1 overexpression prevents mitochondrial dysfunction-related apoptosis induced by methylmercury. *Life Sci* 2020; 256:118031.
- 3) Lee JY Hwang GW Naganuma A Satoh M. Methylmercury toxic mechanism related to protein degradation and chemokine transcription. *Environ Health Prev* 2020; 25:30.
- 4) Toyama T Xu S Nakano R Hasegawa T Endo N Takahashi T Lee JY Naganuma A Hwang GW. The nuclear protein HOXB13 enhances methylmercury toxicity by inducing oncostatin M and promoting its binding to TNFR3 in cultured cells. *Cells* 2020; 9:45.
- 5) Takahashi T Kim MS Lee JY Iwai-Shimada M Hoshi T Fujimura M Toyama T Fujiwara Y Naganuma A Hwang GW. Induction of chemokine CCL3 by NF- κ B reduces methylmercury toxicity in C17.2 mouse neural stem cells. *Environ Toxicol Pharmacol* 2019; 71:103216.
- 6) Kim MS Takahashi T Lee JY Toyama T Hoshi T Kuge S Fujiwara Y Naganuma A Hwang GW. Methylmercury induces the expression of chemokine CCL4 via SRF activation in C17.2 mouse neural stem cells. *Sci Rep* 2019; 9: 1: 4631.
- 7) Hoshi T Toyama T Naganuma A Hwang GW. Methylmercury causes neuronal cell death via M1-microglial activation in organotypic slices prepared from mouse cerebral cortex. *Fundam Toxicol Sci* 2019; 6:167-170.
- 8) Hoshi T Toyama T Shinozaki Y Koizumi S Lee JY Naganuma A Hwang GW. Evaluation of M1-microglial activation by neurotoxic metals using optimized organotypic cerebral slice cultures. *J Toxicol Sci* 2019; 44:471-479.

- 9) Sato M Toyama T Lee JY Miura N Naganuma A Hwang GW. Activation of ornithine decarboxylase protects against methylmercury toxicity by increasing putrescine. *Toxicol and Appl pharmacol* 2018; 356:120-126.
- 10) Takahashi T Kim MS Iwai-Shimada M Fujimura M Toyama T Naganuma A Hwang GW. Induced chemokine CCL4 has a protective role against methylmercury toxicity. *Toxics* 2018; 6:36.
- 11) Sato M Lee JY Kim MS Takahashi T Naganuma A Hwang GW. Putrescine selectively alleviates methylmercury toxicity in C17.2 mouse neural stem cells. *Fundam Toxicol Sci* 2018; 5:71-73.
- 12) Kobayashi T Toyama T Lee JY Miura N Kuge S Naganuma A Hwang GW. Methylmercury Enhances Cytotoxicity through Inhibition of Its Activity by a Decrease in PTEN Solubility BPB report 2018; 1:1-5.
- 13) Takahashi T Wang Y Toyama T Kim MS Kuge S Hwang GW Naganuma A. Small interfering RNA-mediated knockdown of the transcription factor TCF3 enhances sensitivity to methylmercury in mouse neural stem cells. *Fundam Toxicol Sci* 2017; 4:41-43.
- 14) Kim MS Takahashi T Lee JY Miura N Asanuma M Hwang GW Naganuma A., Identification of transcription factors activated by methylmercury in mouse brain. *Fundam Toxicol Sci* 2017; 4:37-39.
- 15) Iwai-Shimada M Takahashi T Kim MS Fujimura M Ito H Toyama T Naganuma A Hwang GW. Methylmercury induces the expression of TNF- α selectively in the brain of mice, *Sci Rep* 2016; 6: 38294.
- 16) Hwang GW Fukumitsu T Ogiwara Y Takahashi T Miura N Kuge S Naganuma A. Whi2 enhances methylmercury toxicity in yeast via inhibition of Akrl palmitoyltransferase activity, *Biochim Biophys Acta* 2016; 1860: 1326-133.
- 17) Lee JY Ishida Y Takahashia T Naganuma A Hwang GW. Transport of pyruvate into mitochondria is involved in methylmercury toxicity, *Sci Rep* 2016; 6:21518.
- 18) Ogiwara Y Miura N Kuge S Naganuma A Hwang G.W. Overexpression of palmitoyl transferase HIP14 confers resistance to methylmercury in SH-SY5Y human neuroblastoma cells, *Fundam Toxicol Sci* 2016; 3:75-77.

Mechanism of neuronal cell death induction via TNF receptor 3 by methylmercury

Gi-Wook Hwang

*Faculty of Pharmaceutical Sciences,
Tohoku Medical and Pharmaceutical University, Sendai 981-8558, Japan*

Keywords: Methylmercury; Oncostatin M; TNF receptor 3; STAT3; AP-1

Abstract

We have previously shown that methylmercury (MeHg) increases oncostatin M (OSM, a member of the IL-6 family cytokines) expression via the transcription factor STAT3, and that extracellular OSM binds to TNF receptor 3 (TNFR3), causing cell death. We have also found that MeHg induces OSM expression in microglia, and that addition of TNFR3 neutralizing antibodies to mouse ventricles or brain slices suppresses MeHg-induced neuronal cell death. In this study, we have examined mechanisms involved in OSM induction in microglia, and TNFR3-mediated neuronal cell death induced by MeHg.

STAT3 phosphorylation in response to MeHg was almost abolished by suppression of JAK1 kinase expression. However, JAK1 phosphorylation (Tyr1034/1035) in response to MeHg was not observed, suggesting that MeHg may induce OSM expression by activating STAT3 independently of JAK1 (Tyr1034/1035) phosphorylation. Phosphorylation of cJun, a component of the AP-1 transcription factor, was enhanced by MeHg, and cJun knockdown reduced OSM induction by MeHg. Furthermore, phosphorylation of JNK and its upstream kinase ASK1, which are involved in cJun phosphorylation, were enhanced by MeHg, and suppression of their activities reduced MeHg induced cJun phosphorylation and OSM expression. Even when cells were simultaneously transfected with siRNAs against STAT3 and cJun, the degree of OSM induction by MeHg was the same as that in cells in which STAT3 or cJun expression was individually suppressed. These results suggest that MeHg may induce OSM expression in microglia via the STAT3/AP-1 pathway.

We next conducted a comprehensive search for novel TNFR3-binding proteins, and found that RPSA (40s ribosomal protein SA), a laminin-binding protein, binds to the intracellular domain of TNFR3. We also found that MeHg-induced caspase-3 (an apoptosis-inducing factor) activation was reduced by suppressing expression of TNFR3 and RPSA in a mouse neuronal cell line, indicating that the TNFR3/RPSA complex may be involved in apoptosis induction by MeHg. These results suggest that MeHg enhances OSM induction by activating STAT3/AP-1 in microglia, and that OSM released from microglia may induce apoptosis by binding to the TNFR3/RPSA complex on neuronal cell membranes.