

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^{1,2}。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³。

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。

本年度は、研究項目 (2) 及び (3) に注力し、研究を行った。

(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で分離後、候補バンドを切り出した。ゲル中でトリプシンによるペプチド消化を行い、LC-MS/MS分析によりp62結合候補タンパク質を同定した。同定したp62結合候補タンパク質の中で、ユビキチンE3リガーゼであるneural precursor cell expressed developmentally down-regulated protein 4 (NEDD4)とp62の結合性を明らかにした。

(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の共処理による細胞死、p62の発現と細胞内局在を検証した。オートファジー阻害剤とMeHgの共処理では、p62 mRNAの発現は誘導されないものの、細胞死の増加、p62タンパク質の蓄積、p62のドットが増大した。一方、プロテアソーム阻害剤とMeHgの共処理により細胞死、p62 mRNA、タンパク質の発現がそれぞれ増加した。さらに細胞内のp62のドットが増大した。したがって、オートファジーとプロテアソーム両分解系によるMeHgの毒性緩和作用及び、p62分解の可能性が示された。

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、(2) p62結合タ

ンパク質NEDD4の高発現細胞あるいは発現抑制細胞を樹立し、MeHg結合タンパク質分解に対する役割を解析し、(3) オートファジーとプロテアソームの阻害剤処理による細胞内のMeHg量の変化を調べる予定である。以上の解析により、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、NEDD4

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⁴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⁵。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^{6,7}、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⁸。

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、研究項目 (2) p62相互作用分子の同定及び結合性の解析、研究項目 (3) オートファジーとプロテアソーム阻害によるMeHg毒性影響とp62の発現及び細胞内局在を解析した。

II 研究方法

ウェスタンブロット法

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 μ 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 μ 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。

免疫染色法

カバーガラスを 6 ウェルプレート of the bottom 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 μ 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。

質量分析法

免疫沈降物を SDS-PAGE で分離後、銀染色 (Thermo Fisher Scientific) にてバンドを検出した。候補となるバンドをカッターで切り出し、in gel でトリプシン消化した。消化サンプルは LC-MS/MS (Qstar Elite hybrid LC-MS/MS system, AB Sciex) にて解析し、ペプチド質量データに合致するアミノ酸配列を Protein Pilot version 3.0 software (AB Sciex) で検索し、タンパク質を同定した。

(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。それらの実験に際し、「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、個人情報を含むアンケート調査・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

研究項目 (2) p62複合体の解析

前年度、p62結合複合体を検討するため、p62抗体を用いた免疫沈降法により共沈タンパク質を検討し、p62抗体の免疫沈降物の中にMeHg処理によりバンドの見え方が変動するいくつかの候補を見出した。本年度は、これらの候補バンドを切り出し、ゲル中でトリプシンによるペプチド分解後、LC-MS/MS解析によるタンパク質同定を行った。野生型細胞、Atg5KO細胞共において、120 kDa付近にMeHg処理で消失するバンドから、neural precursor cell expressed developmentally down-regulated protein 4 (NEDD4)、Atg5KO細胞より野生型細胞で強く検出される55 kDa付近のバンドからprotein disulfide isomerase A3 (PDIA3)、野生型細胞よりAtg5KO細胞において強く検出される25 kDa付近のバンドから14-3-3 proteinのペプチド断片をそれぞれ検出した。小胞体に局在するPDIA3を除外し、

NEDD4とp62及び14-3-3 proteinについてp62との結合性を免疫沈降法により調べた。まず、FlagタグをN末に付加したp62をpcDNA3発現ベクターに導入したコンストラクトを作製した。続いて、NEDD4あるいは14-3-3 protein のN末にHAタグを付加し、pcDNA3発現ベクターに導入したコンストラクトを作製した。Flag-p62/pcDNA3 と HA-NEDD4/pcDNA3 (あるいは HA-14-3-3 protein/pcDNA3)をリポフェクションによりHEK293細胞に共発現させた。それぞれの細胞抽出液に抗HA抗体を加え、HA-NEDD4とFlag-p62の共沈降をウエスタンブロット法で評価した。その結果、HA-NEDD4の沈降物にFlag-p62が検出され、p62とNEDD4の結合性が示唆された。一方、HA-14-3-3 proteinの沈降物にFlag-p62は検出されず、p62との結合が認められなかった。続いて、p62との結合性が認められたNEDD4について細胞内局在を細胞免疫染色により調べた。未処理の細胞ではp62とNEDD4はそれぞれ核の周辺に局在し、一部共局在が認められた。MeHg処理24時間後の細胞では、p62が核の周辺で強いドット状で検出され、その大部分にNEDD4が存在していた。

研究項目 (3) ユビキチン化タンパク質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

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。MeHgが細胞内の様々なタンパク質に結合することによりユビキチン化タンパク質が増加すると予想される。本年度は昨年のデータに基づき、オートファジーとプロテアソームそれぞれの阻害剤処理によるMeHg感受性をトリパンブルー色素排除法とMTT法により確認した。オートファジー阻害剤であるバフィロマイシンA₁ (Bafilomycin A₁; Baf-A₁)とMeHgの共処理群ではそれぞれの単独処理群と比較して生存細胞数が減少した。一方、プロテアソーム阻害剤であるMG132とMeHgの共処理においてもオートファジー阻害剤処理時と同様にそれぞれの単独処理群と比較して生存細胞数が減少し、Baf-A₁とMeHg共処理群よりも顕著であった。次にオートファジーあるいはプロテアソーム阻害剤とMeHg処理によるp62の発現影響について検討した。MG132処理によりp62mRNA発現は強く誘導され、MeHgの共処理によりさらにp62mRNA発現が増強した。一方、Baf-A₁処理群のp62mRNA発現はコントロールとほぼ同等であり、MeHgの共処理においてもp62mRNA発現はコントロールとほぼ同等であった。しかしながら、p62タンパク質レベルはMG132処理群とBaf-A₁処理群両群でそれぞれ増加し、MeHgの共処理によりそれぞれさらに増加した。続いて、Baf-A₁あるいはMG132とMeHgの共処理群におけるp62細胞内局在について、p62特異的抗体を用いた細胞免疫染色により調べた。MG132、Baf-A₁処理により共にp62のドット数および染色強度が未処理細胞と比較して細胞質中に増加したが、その程度はMG132処理でより顕著であった。さらにMG132あるいは Baf-A₁とMeHgを共処理した細胞では、それぞれの阻害剤単独処理と比較してp62のドットのサイズが増大した。

IV 考察

研究項目 (2) において、質量分析解析の結果、p62免疫沈降物の中からNEDD4を同定した。NEDD4はユビキチン化の反応プロセスにおいて、基質にユビキチンを付加する役割を担うE3リガーゼの一つでHECT (homologous to E6AP carboxy terminus) 型ユビキチンリガーゼに属する。NEDD4は酵母からヒトまで広く保存されており、マウス初期胚の中樞神経に高発現している。E3リガーゼはユビキチン化の基質認識を司る酵素であり、現在までにp62⁹、 α -シヌクレイン¹⁰やPTEN¹¹などを基質とすることが報告されている。したがって、NEDD4は様々な基質のユビキチン化を介して基質の分解を促進し、特定のシグナルを制御していると考えられる。しかし、MeHgばく露においてNEDD4がどのような細胞機能を担っているのか、どのような基質をユビキチン化しているのかについては、全く不明であり、今後の検討課題である。

研究項目 (3) において、プロテアソーム阻害時のp62mRNA発現を調べた結果、コントロールに比べ、顕著に発現が増加し、MeHg共処理によりさらなる発現増加を認めた。プロテアソームの阻害は小胞体ストレスを惹起することが知られており¹²、本実験におけるp62mRNA発現誘導において小胞体ストレスの活性化が関与している可能性が考えられる。プロテアソーム阻害剤と

MeHg共処理においてp62のドットがそれぞれの単独処理と比較して大きく、p62の凝集塊の形成が示唆された。一方、オートファジー阻害剤とMeHg共処理においても、p62の大きなドットが核の周囲に形成された。現時点では、このプロテアソーム阻害時とオートファジー阻害時におけるp62凝集塊の質的な差異は不明であるが、このp62凝集塊形成がMeHg代謝に関わっているのではないかと推察している。

本成果により、MeHgによるユビキチン化タンパク質の蓄積において、NEDD4が特定の分子をユビキチン化していることが示唆された。特定の分子がユビキチン化を受けどのような細胞影響がもたらされるのか不明であるが、オートファジーあるいはプロテアソームによるユビキチン化タンパク質の分解において、p62とNEDD4が重要な役割を担っていると考えている。

V 結論

本年度の研究結果は、p62に結合するタンパク質としてNEDD4を同定し、p62との結合性を明らかにした。また、p62と細胞内の主要な分解系であるプロテアソーム及びオートファジーの関わりについての解析では、プロテアソームの阻害によりp62 mRNAの発現が誘導されること、MeHgの共処理によりその発現が増強し、細胞内のp62のドットが増大することを明らかにした。一方、オートファジーの阻害によりp62 mRNAの発現は誘導されないものの、MeHgの共処理によりp62のドットが増大し、オートファジーとプロテアソームの両分解系とp62がMeHgの毒性緩和に寄与している可能性が示された。今後、MeHg結合タンパク質分解に対するNEDD4の役割、及びオートファジーとプロテアソームの役割を検証すると共にp62によるそれらの制御機構について解析する予定である。

VI 次年度以降の計画

本年度は、p62結合タンパク質としてNEDD4を同定しp62との結合性を明らかにした。

次年度における研究項目（1）では、NBR1欠損細胞について着手し、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解析を行い、p62との機能的差異について検証する。

研究項目（2）では、p62のNEDD4結合領域を明らかにすると共に、NEDD4高発現細胞あるいは発現抑制細胞を樹立し、それら細胞株のMeHgに対する感受性を評価する。また、MeHgばく露の細胞系でp62抗体免疫沈降物の量が非ばく露群に比べて増えているのかについて、p62と共沈降するNEDD4の量的な変化をMeHgばく露群と非ばく露群を比較すること、細胞免疫染色におけるp62と共局在するNEDD4を数値化することで明らかにする。MEF細胞で明らかになった点については、神経系の培養細胞であるSH-SY5Y細胞を用いて随時検証し、MeHg結合タンパク質とオートファジーが神経細胞障害性において、どのように作用しているかについて検討する。

研究項目（3）では、MeHg結合タンパク質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、及びp62-NEDD4系の寄与について検証する。タンパク質分解系を介してMeHgがどう処理されるのかについては、オートファジーやプロテアソームの阻害剤を処理した細胞や、各種欠損細胞におけるMeHg濃度を経時的に解析し検証する。また、p62の役割がMeHgに特異的なものであるかについては、ヒ素、クロム、カドミウム等のばく露におけるユビキチン化タンパク質の量的な違い、p62の発現やp62による保護作用等を解析し明らかにする。

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., Uraguchi, 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., Uraguchi, 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 Lin, Q. *et al.* The HECT E3 ubiquitin ligase NEDD4 interacts with and ubiquitylates SQSTM1 for inclusion body autophagy. *J Cell Sci* **130**, 3839-3850, doi:10.1242/jcs.207068 (2017).
- 10 Mund, T., Masuda-Suzukake, M., Goedert, M. & Pelham, H. R. Ubiquitination of alpha-synuclein filaments by Nedd4 ligases. *PLoS One* **13**, e0200763, doi:10.1371/journal.pone.0200763 (2018).
- 11 Hsia, H. E. *et al.* Ubiquitin E3 ligase Nedd4-1 acts as a downstream target of PI3K/PTEN-mTORC1 signaling to promote neurite growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, 13205-13210, doi:10.1073/pnas.1400737111 (2014).
- 12 Ding, W. X. *et al.* Linking of autophagy to ubiquitin-proteasome system is important for the regulation of endoplasmic reticulum stress and cell viability. *The American journal of pathology* **171**, 513-524, doi:10.2353/ajpath.2007.070188 (2007).

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

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

Department of Public Health, School of Pharmacy, Kitasato University

Keywords: Methylmercury; p62; Autophagy; Proteasome; NEDD4

Abstract

p62/Sequestosome 1 (p62) is a master regulator of ubiquitinated proteins, shuttling them to the proteasome or autophagic machinery for degradation. p62 also functions in diverse signaling pathways such as amino-acid sensing, DNA damage response, and oxidative stress. However, much remains to be elucidated with regards to its function and the regulatory mechanisms under methylmercury (MeHg)-exposed conditions. In the present study, to better understand the molecular mechanisms in MeHg-exposed cells, we investigated the potential binding partner proteins in basal and/or MeHg-exposed cells. To identify binding-partner of p62, we immunoprecipitated the p62 protein and analysed co-immunoprecipitated proteins with p62 in MEF cell extracts. Using liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) analysis, we identify neuronal precursor cell-expressed developmentally downregulated 4 (NEDD4), an E3 ubiquitin ligase enzyme, known to be involved in the pathway protein ubiquitination and protein modification. We constructed plasmids expressing Flag-tagged p62 and HA-tagged NEDD4 and confirmed the interaction of p62 and NEDD4 in cells by co-transfection experiments. In addition, we performed co-localization studies using immunofluorescence confocal microscopy and observed partial colocalization of endogenous NEDD4 with p62 in both control and MeHg-exposed cells. Therefore, we propose that NEDD4 is a potential binding partner for p62, and that NEDD4 regulates the p62 levels by promoting ubiquitination of the p62, which is required for proteasome or autophagic degradation of complex of p62 and MeHg-induced ubiquitinated proteins.