

# 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、我々の生活環境、ライフスタイルおよび食生活を介した親電子物質の摂取・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。そこで、本研究では、環境中化学物質を親電子性という化学的性質で分類し、生体内RSS量を指標として、複合曝露影響を考慮したMeHgのリスク評価を行うことを最終目的とした。一方、複合曝露実験では、被験物質の組み合わせ数が膨大になる問題がある。そこで、初年度と次年度は親電子性を持つ環境汚染物質と金属を対象として、MeHgとの複合曝露影響を*in vitro*系を用いて網羅的に評価することを目的とした。最終年度は*in vitro*系の結果を元に、親電子ストレスが及ぼすMeHg毒性への影響をマウスを用いて検討することを目的とした。

【方法】**被検物質**：親電子性の環境汚染物質として、カドミウム (Cd)、鉛 (Pb)、アクリルアミド、1,2-NQ、1,4-NQ、1,4-BQおよびクロトンアルデヒドに、金属である銅 (Cu)、亜鉛 (Zn)、アルミニウム (Al)、スズ (Sn) を加えた物を被験物質とした。**RSSとの反応性解析**：RSSのモデル化合物としてNa<sub>2</sub>S<sub>2</sub>を用いて、各被験物質と反応させた後、RSS量を蛍光プローブまたは安定同位体希釈法を用いた質量分析をそれぞれ行い、その減少量の割合をRSSとの反応性として評価した。**MeHg毒性評価**：MTT試験による細胞死、タンパク質中水銀の測定によるS-水銀化の定量、ローターロッド試験による協調運動能をMeHg毒性の指標とした。**MeHg曝露による次世代高次脳機能への影響評価**：RNAseqによる胎児脳の遺伝子変化およびオープンフィールドテストによる情緒行動の変化を指標とした。

【結果・考察】親電子性を持つ環境汚染物質のRSSとの反応性を個別に測定した結果、何れも親電子性を有するが、その反応性は各物質によって異なることが明らかとなった。また、金属はsoft metalであるMeHgやCd、borderline metalであるCuやZn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。これらの結果より、生体内RSS量に対する金属複合曝露の影響はHSAB (Hard and Soft Acids and Bases) 則によって予測可能であることが示唆された。さらに、RSSと高い反応性を示したCdやCu、または1,4-NQとMeHgを複合曝露することで、MeHg単独曝露と比べRSSの消費率やMeHg毒性が増加した。このことから、MeHg単独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当該影響を生じる可能性があると考えられた。実際、CuとMeHgの複合曝露により組織中の水銀蓄積や胎児への水銀移行が亢進した。さらに、CuやCdとのMeHg胎児期複合曝露は胎児脳での遺伝子発現の変化や生育後の情緒行動の変化をもたらした。これらの結果から、MeHgと親電子性の高い金属

の複合曝露は次世代への神経障害を増悪化させる危険性があると考えられた。一連の研究成果は、これまで単独曝露によって評価されてきた環境評価基準に対して警鐘を鳴らすものであり、食生活、ライフスタイルや生活環境を考慮した MeHg リスクに対する助言及び対策を実施することが可能となり、国民の安全と安心に貢献できると考える。

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

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、それが引き金とな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。我々は平成27年度から平成29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>。

一連の結果は、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。このことはMeHgが全身を巡廻する過程において、肝臓や腎臓中のRSSがMeHg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。以上より、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、本研究では、環境中化学物質を親電子性という化学的性質で分類し、生体内RSS量を指標として、複合曝露影響を考慮したMeHgのリスク評価を行うことを目的とした。

## II 研究方法

**被検物質**：親電子性の環境汚染物質として、Cd、Pb、アクリルアミド、1,2-NQ、1,4-NQ、1,4-BQ およびクロトンアルデヒドを用い、さらに金属である Cu、Zn、Al、Sn を加えた物を被験物

質候補とした。

**細胞培養**：細胞の培養には CO<sub>2</sub> インキュベーター-HERA cell (日本ケンドロ社) を用い、37℃、5% CO<sub>2</sub>/95% Air の条件下で培養した。培地は MEM $\alpha$  培地に、非働化したウシ胎児血清 (FBS) を 10%、2 mM L-アラニル-L-グルタミン、100 U/mL ペニシリン、100  $\mu$ g/mL ストレプトマイシンとなるように加えたものを基本培地とした。なお、FBS の非働化は 56℃で 30 分間の熱処理によって行った。実験培地は EMEM 培地を用いて行った。細胞に関しては理研セルバンクより購入したヒト肝癌由来細胞株 (HepG2 細胞) を用いた。継代培養は細胞が 80-90%コンフルエントの状態になり次第、培地を除去し、D-PBS で洗浄した。0.25%トリプシン-EDTA 溶液を用いて細胞を遊離させ、回収後に回転数で遠心を行い、沈殿した細胞塊を基本培地で懸濁した。細胞サンプルの準備には細胞懸濁液を Tali Image-Based Cytometer (Invitrogen 社) を用いて細胞数をカウントし、4 $\times$ 10<sup>5</sup> 細胞/cm<sup>2</sup> になるように基本培地にて調製した。用意した細胞は 24 時間培養後、実験培地から FBS を除いたものに交換し、さらに 24 時間培養後実験を行った。

**実験動物**：C57BL/6J 系の雌性マウス (8 週齢または妊娠 14 日目) を用いた。野生型マウスは日本クレア社から購入し、飼育室内で一定期間飼育した後に使用した。飼育室内は空調機器によって管理し、室温 24  $\pm$  1℃、湿度 55  $\pm$  5%に保ち、明期 14 時間および暗期 10 時間として飼育した。全ての動物に試料として、固形飼料と飲料水として 5  $\mu$ m のフィルターを通した水道水を自由に摂取させた。各動物実験に関しては、筑波大学が定める動物実験取扱規程に基づいて行った。

**細胞培養上清と細胞高分子サンプルの回収**：6-well ディッシュに細胞を用意して、各化合物に 1 時間曝露した。その後、この細胞上清液を回収した。その後、ディッシュを 4℃に冷却した D-PBS で 3 回洗浄し、細胞を D-PBS で回収した。9000 g で 5 分間、4℃で遠心を行い、残留した細胞塊に MeOH を加え、超音波破砕機 (Ultrasonic Disruptor UD-201) を用いて、Duty 20、Output 2 にて 20 秒間超音波処理を行った。その後、再度 9000 g で 5 分間、4℃で遠心を行い、さらに MeOH で 2 回洗浄し、1% SDS にて融解させることで細胞の高分子サンプルとした。使用の直前にはタンパク量を測定した。

**組織サンプルの調製**：8 週齢もしくは妊娠 18 日目のマウスをイソフルラン麻酔下で開胸後、心採血により安楽死を行った。PBS で十分に灌流後、脳、肺、心臓、肝臓および腎臓を摘出した。妊娠マウスでは、胎盤、胎児の脳および胎児の肝臓も摘出した。臓器をチューブ内へ一部摘出後 (脳はホモジナイズ後)、MeOH を加え、超音波破砕機を用いて、Duty 30、Output 3 にて 30 秒間超音波処理した。その後 14000 g、5 分間 4℃で遠心し、上清溶液を低分子サンプルとした。上清除去後、300  $\mu$ L の 1% SDS を加えて可溶化させ、得た溶液を高分子サンプルとした。サンプルはタンパク質濃度で補正した。

**水銀量の測定**：臓器中の水銀量は加熱気化水銀測定装置 (MA-3000, 日本インメルツ社) により測定した。サンプルを添加するサンプルボードは測定前に電気炉を用いて 750℃で 3 時間加熱を行い、放冷したものを使用した。サンプルボードに水銀を吸着させる添加剤 B を約 100 mg 添加し、その後 50  $\mu$ L 液体試料を加えた。測定は 0.4 L/min の純酸素ガス (>99.9%) 通気下で 180℃、

2分間加熱後、さらに850°C、2分間で加熱することで水銀化合物を原子化させた。生じた水銀ガスを金アマルガムとして水銀捕集管にて濃縮させることで水銀を生成した。この水銀を再度水銀ガスとして遊離させ、253.7 nmの波長を計測することで定量化した。サンプルは特に記載がない限り DDW で希釈した後、その際同時に標準水銀として水銀標準液 (0-50 ng) を用いて検量線を作成し、各サンプルの細胞高分子中水銀濃度を算出した。

**細胞生存率の測定**：細胞生存率は MTT 法により求めた。MTT は D-PBS で 5 mg/mL の濃度で溶解し、0.22 μM Millexfilter (Millipore 社) で濾過滅菌したものを用いた。96-well プレートで培養した細胞培地を除去し、実験培地と 5 mg/mL の MTT を 10:1 の割合で混合した混合液を 100 μL 添加し、その後1時間培養した。培地を除去後、100 μL の DMSO を加え、ホルマザンを可溶化し、iMark マイクロプレートリーダー (Bio Red 社) により OD<sub>540</sub> を測定した。また複合曝露による細胞毒性の複合影響について、濃度加算モデルを応用した TU<sub>sum</sub> (The sum of toxic units) を用いて評価した。金属 A および B の2種類の混合条件において、TU<sub>sum</sub> は各化合物の LC<sub>50</sub> 値 (LC<sub>50-A</sub> および LC<sub>50-B</sub>) を用いて、方程式 (1) のように表すことができる。

$$TU_{sum} = (C_{50-A})/(EC_{50-A}) + (C_{50-B})/(EC_{50-B}) \quad (1)$$

複合曝露影響は TU<sub>sum</sub> = 1.00 ± 0.20 の時相加的 (Additive)、TU<sub>sum</sub> < 0.80 のとき相乗的 (Synergistic) であると評価した。

**蛍光プローブ検出法を用いた RSS 量の測定**：Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub> (Sodium disulfide) 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る。Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub> の pK<sub>a1</sub> 値および pK<sub>a2</sub> 値はそれぞれ 5.0 および 9.7 であることから、本化合物は生理的 pH において、内因性活性イオウ分子である hydrogen persulfide (anion) として存在する。SSP4 (Sulfane Sulfur Probe 4) は、サルフェン硫黄と特異的に反応して強い蛍光を発する試薬である。本測定法は RSS のモデル化合物として Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub> を用いて、各親電子物質と反応させた後、サルフェン硫黄の量を SSP4 にて検出し、その減少量の割合を RSS との反応性として評価した。測定容器には 96 ウェルプレートを用いた。各親電子物質は HEPES buffer (pH 7.5) 溶液中において 40 μM Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub> と 37°C、15 分間反応させた後に SSP4 を加え、さらに 37°C、15 分間反応させた。反応後、515 nm における蛍光強度 (ex: 482 nm) をマイクロプレートリーダー (蛍光分光光度計) を用いて測定した。各親電子物質の測定は MeHg、Cd、1,2-NQ および 1,4-NQ は 2.5, 5, 10, 20, 40 μM、クロトンアルデヒドおよび 1,4-BQ は 5, 10, 20, 40, 80 μM、Pb は 0.002, 0.02, 0.2, 2, 20 mM、アクリルアミドは 0.04, 0.4, 4, 40, 400 mM の濃度条件で実施した。複合曝露における濃度条件は MeHg は 2.5, 5, 10, 20, 40 μM、カドミウムは 2.5, 5, 10, 12, 16 μM の組み合わせで実施した。

**LC/MS による安定同位体希釈法**：RSS 量は超高速液体クロマトグラフィー (UHPLC) - エレクトロスプレーイオン化 (ESI) - タンデム質量分析計 (MS/MS) system (Bruker 社) によって分析を行った。実験サンプル 49 μL に対して、250 mM HPE-IAM-DMSO 溶液 1 μL (最終濃度 5 mM) を加え、37°C で 30 分間反応させた。反応後、0.1%ギ酸を 50 μL 加えて反応を停止させ、HPE-IAM 反応液とした。HPE-IAM 反応液を安定同位体標準溶液と 1:1 の割合で混合させた。この HPE-IAM

反応液-安定同位体照準溶液混合液を UHPLC-ESI-MS/MS system にて分析を行った。カラムは YMC-Triart C18 (50 × 2.0 mm i.d. YMC 社) を用い、カラム温度は 40° C に設定した。移動相は 0.1%ギ酸 (A 液) とメタノール-0.1%ギ酸 (B 液) を用い、流速は 0.2 mL/min で行った。移動相の勾配は、15 分間で 5% B 液から 90 % B 液までの直線勾配で行った。RSS の定量は、得られた各安定同位体標識した HPE-AM 付加体のクロマトグラムのピーク面積を用いて、各サンプル中の RSS 濃度を算出した。

**ローターロッドテスト**：マウスの運動協調能を評価するためにローターロッド (Med Associates, USA) を用いて検討を行った。使用したローターロッドは 4 分間で 0 から 40 rpm に加速後、さらに 1 分間一定速度で回転し、計 5 分間の間にマウスが落下するまでの時間を計測した。使用するマウスは、試験開始の 3 日前から 3 回ずつトレーニングを行った。8 週齢の雌マウスはランダムにコントロール、MeHg、Cu、MeHg + Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>、MeHg + Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub> + Cu の 5 群に分け、これらのマウスに MeHg (20 mg/kg/day)、Cu (30 mg/kg/day)、Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub> (10 mg/kg/day) を試験後、3 日間強制経口投与した。試験は投与の初日から 10 日間連続して行い、落下時間の 3 回の平均時間を記録した。

**オープンフィールドテスト**：本試験は実験動物の自発運動量や活動性、一般行動を測定する場合に汎用されるが、動物の不安や恐怖などの情動機能を評価する試験系としても利用が可能であり最も簡便な方法である。四方形のフィールドに格子状に直線を引いた区画を作り、ビデオカメラを用いて動物の行動軌跡を自動解析し、運動量の数値化と動物が移動した区画への進入頻度を定量化した。

**遺伝子解析**：採取した胎児の全脳サンプルを RNAiso Plus にて total RNA を抽出した。抽出された RNA は RNA nano kit を用いて、RNA Integrity Number により品質を定量的に評価し、分解が生じていないことを確認した。RNA-seq ライブラリーは NEBNext Poly (A) mRNA Magnetic Isolation Module と NEBNext Ultra II RNA Library Prep Kit for Illumina を用いて構築され、Bioanalyzer (Agilent Technology, Santa Clara, CA, USA) を使用し、サイズ分布と濃度を決定した。ライブラリーDNA からのシーケンス解析には NextSeq 500/550 High Output Kit v2.5 を使用し、次世代シーケンサー NextSeq500 を用いて実施した。2 群間における各遺伝子は  $p < 0.05$  であったものを発現変動遺伝子 (DEGs) とした。それぞれの DEGs は DAVID Bioinformatics Resources 6.8 (<https://david.ncifcrf.gov/tools.jsp>) を用いてクラスタリング処理を行った。

**統計解析**：データ解析には特に記載がない限り、3 回の実験により得られた結果の平均値を用い、標準誤差 (SEM) を求めた。有意差検定は ANOVA 検定を用いた。等分散を示すものには t 検定を用いた。統計解析は、データ解析プログラム GraphPad Prism 8 (GraphPad Software 社) を用いた。

(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。

### III 研究結果

#### 平成30年度（初年度）

環境中親電子物質は何れも親電子性を有するが、その反応性は異なることが予想された。そこでまず、MeHgおよび7種類の親電子性を持つ環境汚染物質（Cd、Pb、アクリルアミド、1,2-NQ、1,4-NQ、1,4-BQおよびクロトンアルデヒド）とRSSの反応性を個別に測定した。測定方法として、簡便にRSSとの反応性を測定できる蛍光プローブ検出法を開発した。蛍光プローブ検出法は、RSS検出蛍光プローブであるSSP4とRSSモデル化合物であるNa<sub>2</sub>S<sub>2</sub>およびマルチウェルプレートを組み合わせることで、簡便且つ複数条件同時に親電子物質のRSSとの反応性（消費率）を測定することができる。LC/MSによる安定同位体希釈法は定量性に優れるが測定時間およびコストが高いため、多数検体の測定には不向きである、一方、蛍光プローブ検出法は定量性は低いが、簡便かつ低コストでの測定が可能のため、多数検体を比較検討する実験に有用である。本蛍光プローブ検出法による測定の結果、Cd、1,2-NQおよび1,4-NQはMeHgと同程度の反応性を示した。一方、クロトンアルデヒドおよび1,4-BQはMeHgと比べ低い反応性を示した。また、Pbおよびアクリルアミドは本測定範囲内において、ほとんどRSSと反応しなかった。次にMeHgと被験物質の複合曝露がRSS量に及ぼす影響を検討した。MeHgとCdの複合曝露は、個別曝露に比べRSSの消費率を増加させた。複合曝露によるRSSの消費率は上記の蛍光プローブ検出法に加え、LC/MSによる安定同位体希釈法を用いてより定量的に測定した。その結果、蛍光プローブ検出法と同様に複合曝露によるRSS消費率の有意な増加が示された。次に複合曝露によるMeHg毒性への影響についてHepG2細胞を用いて確認した。その結果、個別曝露では毒性を示さない濃度のCdとMeHgを複合曝露（2種混合）することでMeHg濃度依存的な細胞毒性はMeHg個別曝露と比べ有意に増加した。興味深いことに、Cdに加え、個別曝露では毒性を示さない濃度の1,4-NQを合わせた複合曝露（3種混合）は2種混合の複合曝露に比べより強い細胞毒性を示した。一方、同濃度条件でのCdと1,4-NQの複合曝露（MeHgを含まない）は各単独曝露と同様に細胞毒性を示さなかった。

#### 令和1年度（次年度）

RSSと金属イオンの反応はHSAB則に基づいた親電子性に起因する可能性を考え、被験金属をsoft metal、borderline metal とhard metal に分類し、RSSのモデル化合物である二硫化二ナトリウム（Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>）との反応性を解析した。その結果、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RSS消費能を有した。

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。

近年、我々はRSSの一つであるCysSSHが細胞外へと排出されることを明らかにしており、本研究においても肝がん由来細胞であるHepG2細胞がCysSSHを細胞外である培地中に放出することを確認した。このHepG2細胞から細胞外へ放出されたCysSSHの消費はMeHg単独曝露時と比べ、Cuとの複合曝露により亢進し、それに伴い細胞中タンパク質のS-水銀化量も増加した。一方、RSSとの反応が生じないAlとの複合曝露では、Cuのような複合曝露影響は見られなかった。

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細胞に対する金属個別曝露におけるLC<sub>50</sub>はMeHgで28.17 ± 2.15 μM、Cuで181.8 ± 21.7 μM、Alで≥1200 μMであった。また、MeHgに対して有害性を示さない20 μMのCuを同時に曝露させた際のLC<sub>50</sub>は7.24 ± 0.76 μMであり、Cuの濃度依存的にLC<sub>50</sub>値は減少した。これらの毒性に対する複合曝露影響を濃度加算モデルを応用したTUsumで評価した結果、全てのCuの濃度 (2.5-20 μM) 下において「相乗的」と判定された。一方、20 μMのAlを曝露させてもLC<sub>50</sub>値には変化は見られなかった。

## 令和2年度（最終年度）

これまでの*in vitro*系を用いた解析により、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曝露も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。そこで、最終年度はCu曝露が及ぼすMeHg毒性への影響をマウスを用いて検討した。

まず、MeHgによる神経障害を評価するためにローターロッドを用いて検討を行った。マウスへのMeHg単独曝露で観察された協調運動障害は、RSSモデル化合物であるNa<sub>2</sub>S<sub>2</sub>を同時に投与することで軽減された。Cu単独曝露では神経毒性や生存率の低下は見られなかったが、MeHgとCuを複合曝露させると、Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>投与によるMeHg曝露に対する神経毒性の軽減効果は消失した。

次にCu曝露による生体内RSS量への影響を調べるため、8週齢の雌マウスに12時間ごとに50 mg/kgのCuを計3回投与し、初回の投与から48時間後に解剖を行い、組織および血漿中のRSS量を測定した。コントロール群と比べてCu曝露群において、RSSのひとつであるCysSSHの血漿中で有意な減少が確認された。一方で、肝臓におけるCysSSHはCuの曝露によって有意に増加した。

また、MeHg曝露による臓器中水銀蓄積に対するCu複合曝露影響を検討するために、8週齢の雌マウスにMeHg (5 mg/kg) を投与後、12時間ごとにCu (50 mg/kg) を計3回投与し、初回の投与から48時間後に解剖を行い、組織と血中の水銀量を測定した。その結果、MeHg単独曝露群と比べて、MeHg とCuの複合曝露群において脳と肝臓で有意な水銀蓄積量の増加が確認された。

さらに、MeHg胎児期曝露による臓器中水銀蓄積に対するCu複合曝露影響を明らかにするために、妊娠15日目のマウスにMeHg (5 mg/kg) とCu (30 mg/kg) を交互に12時間ごとに3回ずつ経口投与し、初回の投与から72時間後に解剖を行い、母体と胎児の組織中の水銀量を測定した。MeHg単独曝露群と比べて、MeHg とCuの複合曝露群において胎盤および胎児の肝臓において有意な水銀蓄積量の増加が認められた。また、胎児の脳は水銀の蓄積の増加傾向が見られた。この際の胎児の全脳に対してRNA Seq解析を実施した結果、19,199の遺伝子が検出された。このうちCuとの複合曝露によってMeHg単独曝露と比較して、有意に増加した遺伝子数は112で、有意に減少した遺伝子は207であった。有意に変動したDEGsに対して複合曝露影響を受けるトランスクリプトーム経路を特定するためにGene Ontology (GO) 解析を行った。その結果、6つのbehaviorに関連するpathway (visual learning, locomotory behavior, feeding behavior, grooming behavior, associative learning, behavioral fear response) が有意に変動していた。

最後に、Cuと同様に親電子性を有するCdを用いて、MeHgとCdの母体複合曝露が及ぼす次世代への神経障害影響を検討した。妊娠7日目から生後7日まで、母体マウスをMeHg (4 ppm), Cd (40 ppm)およびMeHgとCd混合水を自由飲水で曝露させ、出生後の雄マウスは8週齢になるまで飼育した。生育後、オープンフィールドテストを用いて行動解析を行った。その結果、MeHgやCd単独曝露群では異常は観察されなかったが、MeHgとCdの複合曝露群ではオープンフィールド装置中央部での探索時間が増加していた。

#### IV 考察

MeHgに加えて、Cd、Pb、アクリルアミド、1,2-NQ、1,4-NQ、1,4-BQおよびクロトンアルデヒドなどの親電子性を持つ環境汚染物質のRSSとの反応性を個別に測定した結果、何れも親電子性を有するが、その反応性は各物質によって異なることが明らかとなった。また、CdとMeHgの複合曝露により、RSSの消費率はMeHg個別曝露時に比べ増加することが明らかとなった。さらに、HepG2細胞において、MeHgとCuまたは1,4-NQの複合曝露は単独曝露に比べ細胞毒性が増加した。興味深いことに、2種混合に比べ3種混合の複合曝露でより細胞毒性が増加した。これらの結果より、MeHg単独では影響の出ない低濃度の曝露であっても、親電子物質に複合的に曝露されることで、MeHg以外の親電子物質がMeHgと同様にRSSを消費し、MeHg毒性を引き起こす可能性が示された。

HSAB則は、酸 (電子対受容体) と塩基 (電子対供与体) の相性をhardとsoftで分類したものである。一般的にhardな酸はhardな塩基と結合しやすく、逆にsoftな酸はsoftな塩基と結合しやすい。また、この2つの中間として、borderlineの酸が設定されており、これらは一般的にhardの塩基より電気陰性度が小さく、softな塩基より大きい。これらの関係性を用いることで、親電子性物質と求核置換基の相互作用が発生するか否かは、ある程度HSAB理論による推定が可能であり、無機化学における反応結果の予測に用いられる。また、ほぼすべての金属イオンにおいても、本法則を用いることができる。そこで本研究では、被験金属をsoft metal、borderline metal とhard metalに分類し解析を行なった。その結果、soft metalであるMeHgやCdやborderline metalであるCuやZnは有意にRSSを消費したのに対し、hard metalであるAlやSnはほとんどRSSを消費しなかった。このことは、RSSの消費は金属が持つ親電子性に起因することを示しており、生体内RSS量に対する金属複合曝露影響はHSAB則に従う可能性が示された。また、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との複合曝露では、有意な増加は見られなかった。さらに、HepG2細胞にMeHgとCuを複合曝露させると、単独曝露に比べて、RSSの消費の増大とそれに付随した細胞内のS-水銀化の亢進が見られた。この結果と相関して、MeHgのLC<sub>50</sub>もCuとの複合曝露により相乗的に低下した。MeHgはRSSにより捕獲・不活性化されることで細胞中タンパク質へのS-水銀化が抑制され、細胞毒性は軽減される。これらの結果から、Cuとの複合曝露によりMeHgを捕獲・不活性化するRSSが消費され、その結果として細胞タンパク質へのS-水銀化量が増加し、細胞毒性が増悪化したと考えられた。実際、マウスを用いた研究でも、RSSのモデル化合物であるNa<sub>2</sub>S<sub>2</sub>投与によるMeHg毒性の軽減は、Cuとの複合曝露により見られなくなった。

また、我々はこれまでにRSS産生酵素の一つであるCSEの欠損マウスを用いて、生体内RSS量の減少がMeHg曝露による脳への水銀蓄積を促進することを報告している<sup>5</sup>。つまり、MeHgとCuの複合曝露による生体内RSS量の減少は、脳への水銀蓄積量を増加させる可能性が考えられた。



この考えと一致して、我々は最終年度の研究において、Cu曝露がマウス血漿中のRSSを減少させ、MeHgとの複合曝露時において、脳への水銀蓄積量を増加させる事を示した。さらに、妊娠マウスへのMeHg曝露による胎盤への水銀蓄積量がCuとの複合曝露により増加し、胎児へ移行する水銀量も増することを明らかにした。また、胎児へと移行が増加したMeHgによって胎児の脳中にどのような変化が生じるかを検討するため、RNA-seqを実施した結果、多くの遺伝子の変動が確認された。これらには脳高次機能に関連する遺伝子が多数含まれ、Cuを複合曝露させることで、次世代の行動に何らかの異常が見られる可能性が考えられた。実際、本研究において、Cuと同様に親電子性を有するCdを用いて、CdとMeHgの母体複合曝露が及ぼす次世代への神経障害の影響をオープンフィールドテストで評価した。その結果、MeHgとCdに複合曝露された母体より生まれたマウスは、オープンフィールド装置中央部での探索時間が増加していた。一方で、MeHgやCd単独曝露では、これらの異常行動は見られなかった。通常、動物には広い新奇環境下に曝された場合、探索行動を行うが、この時、壁に触れ装置内の周辺部をより好んで歩行する“接触走性”という行動パターンを示す。すなわち、装置内をまんべんなく歩行するのではなく、装置中央部への探索行動は極めて少ない。一方で、抗不安薬を動物に投与すると装置中央部での探索行動量は増加する。その為、装置中央部へ探索行動の亢進作用は、新奇環境下での不安や恐怖に基づく行動抑制が解除された状態であると考えられている。つまり、装置中央部での探索時間の増加は情緒機能の変化を示しており、MeHg単独曝露では生体影響が見えない曝露量であっても、Cdとの複合曝露により次世代脳高次機能障害が引き起こされるたことが示唆された。これら一連の結果から、MeHgと親電子性の高い金属の複合曝露は次世代への神経障害を増悪化させる危険性があると考えられた。

## V 結論

本研究結果は環境中親電子物質の摂取が生体内RSS量を減少させ、結果的にMeHg曝露による健康リスクを高める可能性を示した。特に妊娠中のCdやCuとの複合曝露が次世代に対するMeHgによる神経障害を増悪化させる可能性が本研究により示された。我々は食生活、ライフスタイルや生活環境を通じて、MeHg以外にも複数の環境中親電子物質に曝露されており、MeHg単独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ことが本研究で示された。一連の研究成果は、これまで単独曝露によって評価されてきた環境評価基準に対して警鐘を鳴らすものであり、食生活、ライフスタイルや生活環境を考慮したMeHgリスクに対する助言及び対策を実施することが可能となり、国民の安全と安心に貢献できると結論づける。

## VI 次年度以降の計画

CuやCd以外の環境中親電子物質による複合曝露影響もマウスで検討し、食生活、ライフスタイルや生活環境を考慮したMeHgリスクに対する助言及び対策の提言を目指す。

上述のとおり、MeHgの単独あるいは親電子性金属との複合曝露で生じる生体内RSSの消費がMeHgの有害性の一因となることが示唆されたことから、MeHgの解毒代謝物(MeHg)<sub>2</sub>Sの産生ならびに生体内RSS量の増加に係る植物由来低分子の探索を検討した。これまで、MeHgの毒性をニンニク成分の同時投与により軽減されることが報告されているが、そのメカニズムについては明らかにされていない。我々はニンニク中には(MeHg)<sub>2</sub>S生成を促すようなサルフェン硫黄を含有する化

学成分が存在すると考えた。方法は(MeHg)<sub>2</sub>S生成をサルフェン硫黄含有画分として行った (MeHg + ニンニク成分 → (MeHg)<sub>2</sub>S)。得られた知見を下記に概説する (Abiko Y et al. Food Chem Toxicol, in press 2021)。

- 1) ニンニク破砕で得られた野菜汁を各種有機溶媒で抽出した結果、脂肪族炭化水素類を効率良く分配できるヘキサン抽出画分中に主要なサルフェン硫黄含有成分が存在していた。
- 2) 分取用シリカゲルカラムによりニンニクヘキサン抽出画分を分離した結果、TLCの移動度およびHPLCの保持時間の差異から、単素数の異なる脂肪族炭化水素がサルフェン硫黄を含有していることが示された。一方、得られたフラクションの濃縮画分を逆相カラムで分離した結果、水系溶媒中でサルフェン硫黄含有成分は不安定で、(MeHg)<sub>2</sub>S活性は殆ど消失した。
- 3) マウスにニンニクヘキサン抽出画分を投与すると、臓器中RSS量は有意に増加した。このことは当該抽出画分のサルフェン硫黄が生体内のCysSHやGSHに転移した可能性を示唆している。
- 4) マウスにMeHgおよびニンニクヘキサン抽出画分を同時投与すると、MeHg単独で観察される体重減少や致死効果は有意に抑制された。

以上の結果より、MeHgのリスク軽減にニンニク中サルフェン硫黄含有脂肪族炭化水素類が重要であることが示されたので、MeHgの投与量や曝露時間に応じたニンニクヘキサン抽出画分の処置量を検討して、MeHgの毒性軽減の最適条件を調べる。

#### この研究に関する現在までの研究状況、業績

- 1) 熊谷嘉人. エクスポゾーム. *実験医学増刊号* 2020; 38: 14-19.
- 2) Akiyama M, Unoki T, Yoshida E, Ding Y, Yamakawa H, Shinkai Y, Ishii I, Kumagai Y. Repression of mercury accumulation and adverse effects of methylmercury exposure is mediated by cystathionine gamma-lyase to produce reactive sulfur species in mouse brain. *Toxicology Lett* 2020; 330:128-133.
- 3) Akiyama M, Unoki T, Kumagai Y. Combined exposure to environmental electrophiles enhances cytotoxicity and consumption of persulfide. *Fund Toxicol Sci* 2020; 7: 161-166.
- 4) 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.
- 5) 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. *Sci Signal* 2019; 12:eaaw1920.
- 6) 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.
- 7) Shinkai Y, Kumagai Y. Sulfane sulfur in toxicology: A novel defense system against electrophilic stress. *Toxicol Sci* 2019; 170: 3-9
- 8) 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.
- 9) 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.
- 10) 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.
  - 11) 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.
  - 12) 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.
  - 13) 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.
  - 14) 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.
  - 15) Akaike T, Ida T, Fan-Yan et al. Cysteinyl-tRNA synthetase governs cysteine polysulfidation and mitochondrial bioenergetics. *Nat Commun* 2017; 8: 1177.
  - 16) Hiraoka H, Nakahara K, Kaneko Y et al. Modulation of unfolded protein response by methylmercury. *Biol Pharm Bull* 2017; 40: 1595-1598.
  - 17) 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.
  - 18) Sawa T, Kumagai Y, Akaike T. Regulation of redox signaling by nitrated nucleotide and reactive cysteine persulfides. In: *Nitric Oxide: Biol Pathobiol* 2017; 3: 231-235.
  - 19) 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ウ分子. *硫酸と工業* 2017; 70: 9-16.
  - 20) 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「エピジェネティックスと環境科学」* 2017; 72: 77-81.
  - 21) 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.
  - 22) 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.
  - 23) 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.
  - 24) 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.
  - 25) 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.
- 26) Kumagai Y, Abiko Y. Environmental electrophiles: protein adducts, modulation of redox signaling and interaction with persulfides/polysulfides. *Chem Res Toxicol* 2017; 30: 203-219.
  - 27) 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.
  - 28) 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.
  - 29) 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.
  - 30) 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.
  - 31) 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.
  - 32) 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.
  - 33) 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.
  - 34) Abiko Y, Yoshida E, Ishii I et al. Involvement of reactive persulfides in biological bismethylmercury sulfide formation. *Chem Res Toxicol* 2015; 28: 1301-1306.
  - 35) 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*「活性イオン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.
  - 36) 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.
  - 37) 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.
  - 38) 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.
  - 39) 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.
  - 40) 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.
  - 41) 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.
- 42) 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.
  - 43) 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.
  - 44) 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.
  - 45) Kanda H, Shinkai Y, Kumagai Y. S-Mercuration of cellular proteins by methylmercury and its toxicological implications. *J Toxicol Sci* 2014; 39: 687-700.
  - 46) 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.
  - 47) 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

- 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.
- 5) Akiyama M, Unoki T, Yoshida E, Ding Y, Yamakawa H, Shinkai Y, Ishii I, Kumagai Y. Repression of mercury accumulation and adverse effects of methylmercury exposure is mediated by cystathionine gamma-lyase to produce reactive sulfur species in mouse brain. *Toxicol Lett* 2020; 330:128-133.

# Potential of methylmercury toxicity by combined exposure to environmental electrophiles

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, whereas this electrophilic metal is inactivated by reactive sulfur species (RSS) through sulfur adduct formation. While we are daily exposed to other environmental electrophiles that are able to consume RSS, the health effects of the combined exposure to MeHg and other environmental electrophile remain unexplored.

We found that combined exposure to MeHg and environmental electrophiles such as cadmium, copper, and 1,4-NQ increased the consumption of RSS and exacerbated MeHg-induced cell toxicity. In non-pregnant or pregnant mice, combined exposure to MeHg with copper increased mercury accumulation in the mouse brain or the placenta and fetus. Our study suggests that combined exposure to environmental electrophiles increase the sensitivity to MeHg because of the consumption of RSS. In particular, combined exposure of MeHg and copper during pregnancy has a risk of exacerbating the MeHg-induced damage to the next generation.