

## 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。

本年度は、研究項目 (1) 及び (2) に注力し、研究を行った。

(1) HeLa細胞を用いて、p62KO細胞およびNBR1KO細胞を樹立した。p62KO細胞は野生型細胞と比較してMeHgに対する感受性が高く、NBR1KO細胞は野生型細胞とほぼ同等のMeHg感受性を示した。p62KO細胞はMeHgにより増加するLC3-IIが野生型細胞と比べて低下した。一方、NBR1KO細胞はMeHgにより増加するp62のタンパク質量が野生型細胞より増加した。これらの細胞株におけるp62とNBR1の細胞内局在をそれぞれの特異的抗体を用いた免疫蛍光染色を行った結果、p62の細胞内局在はMeHgにより核周辺に集積するが、NBR1KO細胞では細胞質全体に局在することがわかった。一方、NBR1は未処理の細胞とMeHg処理細胞における細胞内局在変化は僅かであったが、p62KO細胞ではNBR1のドットが野生型細胞より増大していた。

(2) 昨年度までにp62を用いた免疫沈降法によりp62共沈タンパク質としてneural precursor cell expressed developmentally down-regulated protein 4 (NEDD4)を同定し、p62との結合性を明らかにした。本年度は、さまざまな細胞にMeHgを処理し、p62とNEDD4のタンパク質発現を調べたところ、p62はいずれの細胞においてもMeHg処理24時間後タンパク質発現が増加したのに対し、NEDD4タ

ンパク質発現はMeHg処理により減少傾向を示した。p62とNEDD4の関連性を調べるため、神経系細胞株SH-SY5Y細胞を用いてp62KO細胞を樹立し、MeHgに対するNEDD4のタンパク質発現を検証した。その結果、野生型細胞ではMeHgによりNEDD4が減少するのに対し、p62KO細胞では野生型細胞と比較してMeHgによるNEDD4の減少が僅かであり、p62とNEDD4の機能的な関連性が示唆された。p62のNEDD4結合領域についてp62のさまざまな欠損変異体を用いたプルダウンアッセイを行い検証した結果、p62のPB1ドメインに続く領域がNEDD4との結合に必要であることがわかった。

本研究により、(1) オートファジーレセプター分子であるp62とNBR1はそれぞれMeHgばく露において異なる応答性を示すことが明らかとなった。また、p62KO細胞とNBR1KO細胞を用いた解析により、MeHgの毒性の軽減にはNBR1よりもp62が重要な分子であることが明らかとなった。

(2) p62結合タンパク質としてNEDD4の同定に成功した。NEDD4はp62の発現依存的にMeHgばく露によりタンパク質レベルが低下することがわかった。p62のNEDD4結合領域はLC3, Keap1, ユビキチン鎖やNBR1の結合領域と異なることがわかった。(3) MeHgとオートファジー阻害剤あるいはプロテアソーム阻害剤を共処理するとそれぞれの単独処理よりも細胞死が増強し、オートファジーとプロテアソームの両タンパク質分解系がMeHg毒性の軽減に機能していることがわかった。また、両分解系を阻害するとp62の大きな凝集塊が出現し、MeHg毒性との関連性が示唆された。以上、p62が関与するMeHg応答機構について新しい知見を得ることができた。

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<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、研究項目（1）において、HeLa細胞を用いてp62KO細胞株とNBR1KO細胞株を樹立することに成功し、MeHgに対する細胞毒性を調べた。また、研究項目（2）において、SH-SY5Y細胞を用いてp62KO細胞株を樹立し、MeHgばく露によるNEDD4の発現を解析した。また、p62とp62結合分子NEDD4の結合領域を決定した。

## 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  $\mu$ 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。

### 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。

### 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。

### CRISPR-Cas9 を用いた標的遺伝子改変法

Lioplectamine 3000 (Thermo Fisher Scientific) を用いたリポフェクション法により, p62 あるいは NBR1 ノックアウトプラスミド (Santa Cruz Biotechnology) を HeLa 細胞に導入した。24 時間後, 3  $\mu$ g/ml のピューロマイシン (Nakarai) を加えて, 細胞を選抜した。p62KO 細胞株あるいは NBR1KO 細胞株は 96 well plate を用いた限外希釈法によるサブクローン化を行い, 標的タンパク質の発現の有無をウェスタンブロット法により評価した。SH-SY5Y 細胞を用いた p62KO 細胞株の樹立も同様の方法で行った。

(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。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

#### 研究項目(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

オートファジーレセプター分子であるp62とNBR1は相互作用しユビキチン化タンパク質をオートファゴソームに輸送する役割を担っていると考えられている。本研究では、まず、両者のMeHgに対する応答性をmRNAレベルおよびタンパク質レベルで検証した。MEF細胞を用いた実験から、p62はmRNAおよびタンパク質レベルでMeHg処理時間依存的に発現が増加し、20~24時間で最も発現レベルが高く、タンパク質は未処理の細胞と比較して約6~8倍に増加した。一方、MeHg処理により、NBR1 mRNA発現は増加するものの、NBR1タンパク質の発現レベルは減少し、p62と逆相関を示した。p62KOMEF細胞にNBR1を安定発現させたmcherry-NBR1/p62KO細胞はp62KO細胞が示すMeHgに対する脆弱性をキャンセルし、MeHg処理によるユビキチン化タンパク質の蓄積も抑制される結果を得た。さらに、p62とNBR1の機能的な差異を検討するため、HeLa細胞を用いてCRISPR-Cas9システムによりp62あるいはNBR1を欠損させたp62KO細胞およびNBR1 KO細胞を樹立した。MeHgに対する細胞生存率をCCK-8法により調べた結果、全ての細胞株でMeHgの用量依存的に細胞生存率が減少したが、野生型細胞のIC<sub>50</sub>は約21 μM、p62KO細胞のIC<sub>50</sub>は約16 μMを示し、p62KO細胞はMeHg処理により野生型細胞と比較して、細胞生存率が有意に低下した。一方、NBR1KO細胞は野生型細胞と細胞生存率にほとんど差異がなかった。このp62KO細胞はMeHgにより増加するLC3-IIが野生型細胞と比べて低下した。また、p62KO細胞では、細胞内のMeHg(水銀)量が野生型細胞よりも増加していた。一方、NBR1 KO細胞のMeHg(水銀)量は野生型細胞よりも低下していた。

#### 研究項目(2) p62複合体の解析

p62複合体形成の新規分子の同定を目指し、p62結合複合体をp62抗体を用いた免疫沈降法により沈降させ、共沈タンパク質の中から候補バンドを切り出し、LC-MS/MS解析によるタンパク質同定を行った。その結果、neural precursor cell expressed developmentally down-regulated protein 4(NEDD4)をp62複合体形成の新規分子として同定した。ヒトNEDD4をHeLa細胞よりクローニングし、pcDNA3に導入したHA-NEDD4/pcDNA3を作製した。このNEDD4発現ベクターとp62発現ベクター(Flag-p62/pcDNA3)をリポフェクションによりHEK293細胞に共発現させ、免疫沈降法による結合性を検討した。共発現細胞を可溶化し、抽出液に抗HA抗体を加え、HA-NEDD4を免疫沈降させ、共沈するp62をFlag抗体で評価した。その結果、HA-NEDD4の沈降物にFlag-p62が検出され、p62とNEDD4の結合性が認められた。MeHgに対するNEDD4の応答性を調べるため、ヒト神経芽由来細胞SH-SY5Y細胞、ヒト乳がん由来細胞MCF-7細胞、ヒト肝癌由来細胞HepG2細胞、ヒト子宮頸癌由来細胞HeLa細胞にMeHgを処理し、NEDD4のタンパク質発現を調べた。その結果、いずれの細胞においてもNEDD4タンパク質はMeHg処理により僅かに減少した、一方、p62タンパク質発現



は逆相関性を示し、MeHg処理により発現が増加した。続いて、p62とNEDD4の関連性を調べるため、SH-SY5Y細胞を用いてp62KO細胞を樹立し、MeHgに対するNEDD4のタンパク質発現を検証した。その結果、野生型細胞ではMeHgによりNEDD4が減少するのに対し、p62KO細胞では野生型細胞と比較してMeHgによるNEDD4の減少が僅かであった。p62のNEDD4結合領域について、p62のさまざまな欠損変異体を用いたプルダウンアッセイを行い検証した結果、p62のPB1ドメインに続く領域がNEDD4との結合に必要であることがわかった。

#### 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A<sub>1</sub> (Bafilomycin A<sub>1</sub>; Baf-A<sub>1</sub>)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-A<sub>1</sub>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-A<sub>1</sub>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-A<sub>1</sub>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-A<sub>1</sub>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-A<sub>1</sub>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-A<sub>1</sub>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 (1) において、p62とNBR1の関係性及び機能的な差異を検証した。p62とNBR1は相互作用しオートファジーレセプターとして機能していることが推測されている。p62KOにm-cherry-NBR1を発現させた細胞株は、GFP-p62を発現させた細胞株と同様にMeHgにより増加するユビキチン化タンパク質の増加を抑制した。さらにMeHgに対する細胞毒性も抑制した。これらの結果から、p62とNBR1はユビキチン化タンパク質の除去において、互いに相補する役割を担っていると考えられる。しかし、p62KO細胞およびNBR1KO細胞を用いたMeHgに対する感受性を調べた結果、p62KO細胞はMeHgに対し高い感受性を示したが、NBR1KO細胞は野生型細胞とほぼ同等のMeHg感受性を示したことから、MeHgに対する防御因子としてNBR1よりp62が重要であることが示唆された。この理由は不明であるが、p62KO細胞では、細胞内のMeHg (水銀) 量が野生型細胞よりも増加していることが原因である可能性が挙げられる。なぜ、p62KO細胞で細胞内のMeHg (水銀) 量が増加するのであろうか。仮説の一つとして、p62欠損によるMeHg-グルタチオン付加体の低下が考えられる。p62は転写因子Nrf2の負の制御因子Keap1の分解に寄与しているため、p62欠損はNrf2の活性化を抑制する。Nrf2はグルタチオン付加体の生成に寄与しているため、p62欠損の結果、MeHg-グルタチオン付加体の量が低下し、細胞外へのMeHg排出が低下した可能性が考えられる。あるいは、MeHgに応答して増加するLC3-IIがp62KO細胞で減少しており、オートファジーの活性化能という点でp62とNBR1の機能的な差異があり、MeHgに対する感受性をもたらすのかもしれない。MeHgに対するNBR1の機能は明らかになっていないが、MeHgに応答して増加するp62がNBR1KO細胞で増加しており、NBR1がp62の負の制御因子である可能性が考えられる。その

ように仮定すると、MeHgのばく露により細胞内のNBR1がp62よりも積極的に減少することにより、相対的にp62の増加に繋がる。さらに、p62の増加によるNrf2の活性化、MeHg-グルタチオン付加体の増加によるMeHgの細胞外への排出をもたらす、MeHgに対する毒性緩和に繋がる可能性が考えられる。

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p62<sup>9</sup>、 $\alpha$ -シヌクレイン<sup>10</sup>やPTEN<sup>11</sup>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。本研究の結果から、MeHgのばく露によりNEDD4の発現量が低下することがわかった。また、p62の存在の有無がMeHgによるNEDD4の発現量や細胞内の局在に影響を及ぼすことから、p62-NEDD4の複合体がMeHgによって活性化するオートファジーの基質となり分解される可能性が考えられた。しかし、オートファジーの阻害剤であるクロロキンをを用いた実験では、MeHgによるNEDD4の発現減少は阻害できず（データ未掲載）、MeHgによるNEDD4の発現減少機構については今後の検討課題である。p62におけるNEDD4の結合領域は、興味深いことに、これまで報告されている分子群との結合領域と異なっており、特定の分子と競合する可能性は低いと考えられる。現時点では、MeHgばく露に対して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<sup>12</sup>、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を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。

以上、研究項目（1）～（3）を通して、p62はメチル水銀に対する生体防御において鍵となる分子であることが示唆された。今後は、メチル水銀ばく露に対する個体レベルでのp62の役割を明らかにすることでヒトへの応用性について深く議論できると思われる。

## 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。

#### この研究に関する現在までの研究状況、業績

##### 学会発表

(2019年)

- 1 第63回日本薬学会関東支部大会「メチル水銀ばく露におけるオートファジーレセプターp62とNbr1の役割」  
杉本拓郎, 高根沢康一, 中村亮介, 大城有香, 浦口晋平, 清野正子
- 2 第63回日本薬学会関東支部大会「低濃度メチル水銀に対するオートファジーおよびERストレス応答」  
高根沢康一, 杉本拓郎, 中村亮介, 大城有香, 浦口晋平, 清野正子

(2020年)

- 3 第92回日本生化学会「オートファジーレセプターp62とNbr1によるメチル水銀防御機構の解析」  
高根沢康一, 杉本拓郎, 中村亮介, 大城有香, 浦口晋平, 清野正子
- 4 第47回日本毒性学会学術年会「メチル水銀毒性発現機序の解明に向けた挑戦 メチル水銀毒性とオートファジー」  
清野正子, 中村亮介, 大城有香, 浦口晋平, 高根沢康一

(2021年)

- 5 第141年会日本薬学会「メチル水銀による小胞体ストレスはp62により緩和される」  
高根沢康一, 中村亮介, 大城有香, 浦口晋平, 清野正子

##### 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 USA* **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, 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. p62-deficient MEFs exhibited higher sensitivity to MeHg exposure compared to their wild-type (WT) counterparts. However, the underlying mechanism and role of this protein has not been explored in regard to MeHg toxicity. We focused on following three studies;

1) Functional comparison p62 and neighbor of BRCA gene 1 protein (NBR1) - We found that overexpression of NBR1, a functional homolog of p62, compensate p62 functions including protection of MeHg-induced cell death and ubiquitinated protein accumulation. In addition, we established p62 or NBR1 KO HeLa cells and investigated MeHg sensitivity and intracellular mercury concentrations. The viability of MeHg-exposed p62KO cells was significantly lower than that found in WT and NBR1KO cells. The concentration of mercury in p62KO cells after MeHg treatment was higher than in WT cells, whereas NBR1KO cells had a lower mercury concentration than in WT.

2) Analysis of p62 complex - We identified a neural precursor cell expressed developmentally down-regulated protein 4 (NEDD4), a HECT E3 ubiquitin ligase, as a p62-interacting protein. The region of p62 where NEDD4 binds was located at Proline-Arginine rich region (amino acid: 102-119), at C-terminal extension of the Phox and Bem1 (PB1) domain.

3) The role of autophagy and proteasome in MeHg-exposed cells - we have studied the effects of inhibitors of autophagy (chloroquine; CQ) or proteasome (MG132) on MeHg-induced cell toxicity. Combined treatment of MeHg and CQ decreased cell viability relative to either agent alone. Similar results were obtained using MG132. Together, these results suggest that autophagy and proteasome play a pivotal role in protection cells against MeHg toxicity.