p62/SQSTM1 欠損 *in vitro* および *in vivo* モデル系を用いた メチル水銀毒性防御機構の解析

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、様々なタンパク質に結合し、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。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]。MeHg のばく露によって細胞内に増加したユビキチン化タンパク質は、オートファジーレセプター分子 p62/Sequestosome1（p62）により認識・捕捉され、オートファジーやプロテアソームにより分解される。我々は、p62 欠損（p62 KO）MEF 細胞を用いた実験系において、p62 が MeHg により増加するユビキチン化タンパク質分解の鍵分子であること、MeHg 毒性に対する細胞保護に機能することを示唆した [2,3]。

「平成 31 年～令和 3 年度 水俣病に関する総合的研究」の助成により、p62 の結合分子として NEDD4 を同定し、p62 と NEDD4 の結合が MeHg 毒性の緩和に機能する可能性を示した [4]。また、タンパク質の分解システム（オートファジーおよびプロテアソーム）が MeHg 毒性の軽減に働くことを明らかにした。さらに、p62 欠損細胞は野生型細胞と比較して MeHg ばく露後の細胞内水銀濃度が高値となることを発見した。これら一連の研究成果より、p62 がどのような機序で MeHg の細胞内濃度を調節しているかを解明できれば、MeHg 毒性の理解および MeHg 毒性緩和の次なる糸口となるのではないかと考えた。

そこで本研究では、前年度までの知見を基盤に、細胞内 MeHg の調節機構を細胞レベルで解明するとともに、MeHg に対する p62 の機能を個体レベルで明らかにすることを目的とする。*In vitro* 研究は 2 項目、(1) p62 による細胞内 MeHg 濃度と制御機構の解析、(2) タンパク質の分解システム（オートファジーおよびプロテアソーム）と MeHg 代謝の関連性を検討する。さらに、*in vivo* 研究は、p62 欠損マウスを用いた p62 による MeHg 毒性防御機構の解明を目指す。

キーワード：MeHg, p62, NBR1, Autophagy, Proteasome

研究協力者：高根沢康一、中村亮介

所属施設名：北里大学薬学部公衆衛生学教室

Ⅰ研究目的

MeHg は, 水俣病の原因となった環境汚染物質である。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大型肉食魚や海棲哺乳類に蓄積し、これらを反復、継続して摂取すること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があり、MeHg の細胞毒性は発達期の神経系に留まらず、神経成熟後の疾患のリスクとなる可能性が想定される[5]。アルツハイマー症、筋萎縮性側索硬化症（ALS）、パーキンソン病などの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、神経細胞死が引き起こされる。オートファジーレセプターp62 は、この凝集物の中に一緒に沈着することが知られており、p62 は脳神経変性疾患と密接な関係にあると考えられている。p62 を欠損させたマウスの解析から、p62 を介したオートファジーがアルツハイマー病などの認知症で脳内に蓄積するタウタンパク質を分解して認知症の発症や進行に関係することが示唆されている[6]。

我々は, MeHgにより増加するユビキチン化タンパク質をp62が分解除去することを示し、このp62が「MeHg毒性緩和の鍵分子となりうるのではないか」という観点から解析を行ってきた。その結果、p62KO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だけでなく、MeHgばく露後の細胞内水銀濃度が野生型細胞より高値となることを見出した。

本研究の目的は、p62 によるメチル水銀排出機構の分子基盤の構築を目的とするとともに、前年度までの本研究評価ワーキンググループからのご指摘事項「*in vivo* における p62 の役割」を検証するため、p62 欠損マウスを作製し、p62 によるメチル水銀毒性防御機構の解明することである。*In vitro* および *in vivo* モデル系を用いる本研究の成果により、細胞内に透過した後に生じるメチル水銀結合タンパク質が p62 によって捕捉され、分解・排出に至る一連の細胞内動態が明らかとなり、メチル水銀毒性発現機序解明への貢献が期待される。本年度は、*In vitro* 研究では、項目(1) 「p62 による細胞内 MeHg 濃度と制御機構の解析」を遂行した。細胞内水銀濃度低下のメカニズムを明らかにするため、これまで報告されている細胞内水銀代謝に関わる分子群である Nrf2 経路の活性化および Nrf2 によって調節されるトランスポーターやグルタチオン合成酵素等が p62 欠損でどのような影響を受けるのかについて解析を行った。また、NBR1 は p62 結合分子であるが、NBR1-p62 複合体を形成している場合と NBR1 欠損（p62 が単独で存在している）では上述した酵素等の発現がどのようになるのかについて調べた。また、*In vitro* 研究において、p62 欠損マウスの作出を行い、p62 欠損マウスの繁殖に着手した。

Ⅱ材料と方法

1. CRISPR-Cas9 を用いた標的遺伝子改変法

p62 あるいは NBR1 ノックアウトプラスミド（Santa Cruz Biotechnology）を Liopfectamine

3000（Thermo Fisher Scientific）を用いたリポフェクション法により HeLa 細胞に導入した。24 時間後、3 μg/ml のピューロマイシン（Nacalai tesque）を加えて、ゲノム編集された細胞を選抜した。p62 KO 細胞株あるいは NBR1 KO 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エスタンブロット法により評価した。SH-SY5Y 細胞を用いた p62 KO 細胞株も同様の方法で樹立した。

2. ウエスタンブロット法

ヒト子宮頸がん由来(HeLa)細胞を 60 mm dish に播き、24 時間後 1 μM 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。Bicinchoninic Acid（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、Poly vinylidene difluoride 膜に転写した。抗 p62 抗体（Medical and Biological Laboratories）、抗 NBR1 抗体（Cell Signaling Technology）、抗ユビキチン抗体（Cell Signaling Technology）を 4℃ over night で転倒混和した。Horseradish peroxidase 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。

3. リアルタイム RT-PCR 法

HeLa 細胞を 60 mm dish に播き、24 時間後 1 μM 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。

4. 免疫染色法

カバーガラスを 6 ウェルプレートの底に入れ、p62 KO 細胞と NBR1 KO 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。Phosphate-buffered saline（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。

5. 水銀分析法

MeHg 処理後の細胞を PBS で洗浄後 RIPA Buffer で可溶化し、加熱気化水銀測定装置 (MA3 *Solo*, Nippon Instruments Corporation)にて水銀量を測定した。可溶化サンプルは一部 BCA 法でタンパク質の濃度を測定し、細胞内水銀量をタンパク質量で補正した。

6. p62KO マウスの作出

p62KO マウスの作製は、ノックアウトマウス作製サービス（サイヤジェン株式会社: Cyagen Biosciences）に委託した。遺伝子背景は C57BL/6J で、Cas9 および gRNA はエレクトロポレーションを介して受精卵へ同時に注入した。作出されたヘテロマウスを交配させ、ホモノックアウトマウスを作出した。

（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。

動物実験は，「動物の愛護及び管理に関する法律」および「実験動物の飼育及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準 (環境省)」 を尊厳するとともに，「動物実験等の実施に関する基本指針 (文部科学省)」および日本学術会議が策定した「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」に従うものであり，北里大学動物実験委員会の承認 (承認番号 20-44) を受けている。

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

1. <u>p62KO 細胞と NBR1KO 細胞の MeHg 感受性評価</u>

MeHg に対する p62 と NBR1 の機能的な差異を検証するため、野生型 HeLa 細胞 (WT 細胞) に CRISPR/Cas9 法を用いて p62 knock out 細胞 (p62KO 細胞) と Neighbor of BRCA1 (NBR1) knock out 細胞 (NBR1KO 細胞) を樹立した。WT 細胞、p62KO 細胞、NBR1KO 細胞に 4, 8, 16 μM の MeHg を処理し、24 時間後および 48 時間後の細胞生存率を CCK-8 法により調べた。また、細胞および細胞膜傷害による乳酸脱水素酵素 (Lactate Dehydrogenase; LDH) の放出量を測定し、細胞死の指標とした。その結果、4 μM の MeHg 処理では、24 時間後および 48 時間後において、いずれの細胞株においても細胞生存率に違いはなかったが、8, 16 μM の MeHg 処理では、24 時間後および 48 時間後において、p62KO 細胞の細胞生存率が WT 細胞と比較して有意に低下した。その時、p62KO 細胞の培地中における LDH 量は WT 細胞と比較して有意に増加した。一方、NBR1KO 細胞では、24 時間後および 48 時間

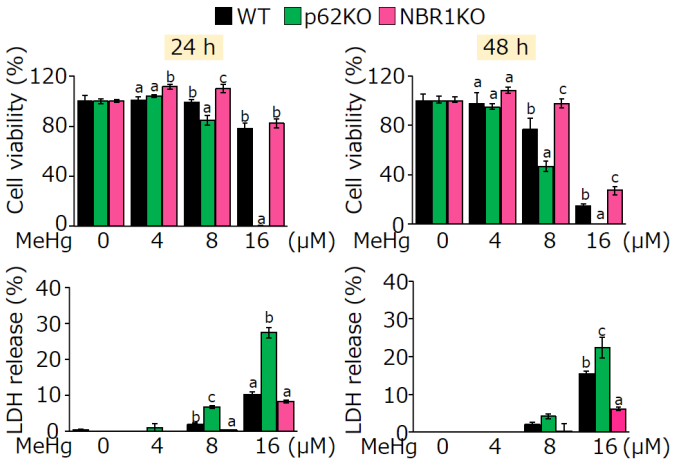

Fig. 1

後において、8 μM の MeHg 処理において、WT 細胞と比較して細胞生存率が有意に増加し、培地中の LDH 量は WT 細胞と比較して有意に低下した **(Fig. 1)**。

2. <u>p62KO 細胞と NBR1KO 細胞における MeHg ばく露後のユビキチン化タンパク質の蓄積の解析</u>

p62 と NBR1 はそれぞれ Ubiquitin-associated (UBA)ドメインを有しており、ユビキチン化タンパク質をオートファジーやプロテアソームへ輸送するシャトル分子として機能することが知られている。我々は先行研究において、p62KO/MEF 細胞は、MeHg ばく露後のユビキチン化タンパク質が野生型 MEF 細胞より多く蓄積することを明らかにしている。したがって、p62 は MeHg により増加するユビキチン化タンパク質の分解・除去に重要な分子であると予想される。p62KO/HeLa 細胞は、p62KO/MEF 細胞と同様に MeHg によるユビキチン化タンパク質の蓄積が野生型細胞より多くなるのか、NBR1KO 細胞は p62KO 細胞と同様の結果となるのかについて検証した。WT 細胞、p62KO 細胞、NBR1KO 細胞に 8 μM の MeHg を処理し、24 時間後のユビキチン化タンパク質蓄積をウエスタンブロットにより調べた。ユビキチン化タンパク質は凝集体となると Triton X-100 不溶性となるため、細胞を Triton X-100 を含む Buffer で可溶化し、可溶性画分（sol）と不溶性画分（ins）に遠心分離した。野生型細胞に MeHg を処理すると ins 画分にユビキチン化タンパク質が蓄積しており、MeHg によるユビキチン化タンパク質の蓄積が確認された。一方、p62KO 細胞は野生型細胞と比較して MeHg 処理による ins のユビキチン化タンパク質の蓄積量が増加した。一方、NBR1KO 細胞では予想に反し、ユビキチン化タンパク質量（ins）が野生型細胞よりも減少した **(Fig. 2)**。

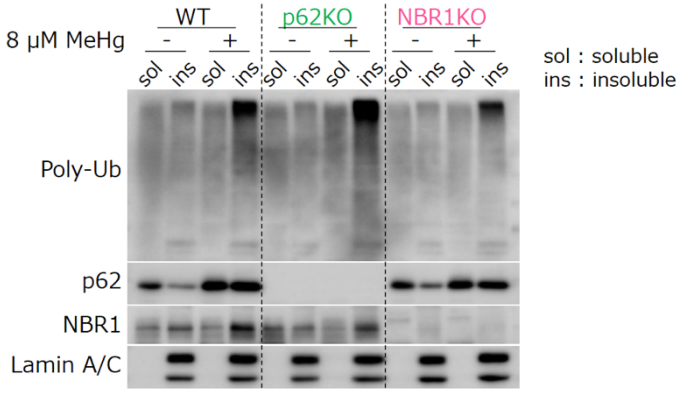

Fig. 2

3. <u>p62KO 細胞と NBR1KO 細胞における MeHg ばく露後の細胞内水銀濃度の解析</u>

p62KO 細胞、NBR1KO 細胞における MeHg 感受性変化の要因を探るために、MeHg 処理後の p62KO 細胞、NBR1KO 細胞における細胞内水銀濃度を経時的に測定し、MeHg 処理後の WT 細胞における細胞内水銀濃度推移と比較した。WT 細胞、p62KO 細胞、NBR1KO 細胞に 8 μM の MeHg を処理し、4, 8, 24 時間後の細胞内水銀濃度を測定したところ、p62KO 細胞における MeHg 処理 4 時間後の細胞内水銀濃度は WT 細胞より 1.48 倍、8 時間後では 1.33 倍上昇した。一方、NBR1KO 細胞における MeHg 処理 4 時間後の細胞内水銀濃度は、WT 細胞と比較して 0.81 倍、8 時間後では 0.79 倍と低値を示した。しかし、24 時間後には

p62KO 細胞では細胞内水銀濃度が WT 細胞より低く、一方、NBR1KO 細胞の細胞内水銀濃度は WT 細胞とほぼ同等であった。また、WT 細胞、p62KO 細胞、NBR1KO 細胞に 2, 4, 8 μM の MeHg を処理し、8 時間後における細胞内水銀濃度の濃度依存性を測定した。その結果、いずれの濃度においても細胞内の水銀濃度は WT 細胞と比較して p62KO 細胞で高値を、NBR1KO 細胞で低値を示した (**Fig. 3**)。

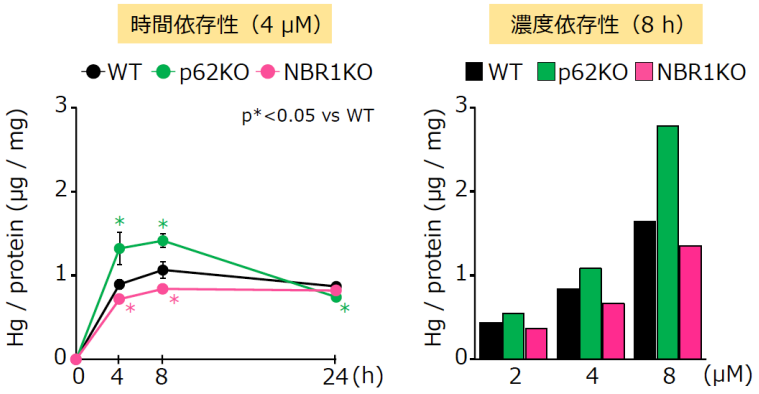

Fig. 3

4. <u>p62KO 細胞と NBR1KO 細胞における MeHg ばく露後の Nrf2 活性化の解析</u>

細胞内水銀濃度は細胞内のグルタチオン合成系、あるいは、多剤耐性トランスポーターの発現レベルにより調節されており、これらの発現は Keap1-Nrf2 システムが深く関与することが知られている。また、MeHg は Nrf2 の活性化を引き起こすが、p62 と Keap1 の相互作用による Nrf2 の活性化も示唆されている。前述のように、p62KO 細胞における細胞内水銀濃度が WT 細胞と比較して高値を示す結果は Keap1-Nrf2 システムに支配されている可能性が考えられた。そこで、MeHg により活性化する Keap1-Nrf2 システムに対する p62 および NBR1 の関連性について検証した。WT 細胞、p62KO 細胞、NBR1KO 細胞に 8 μM の MeHg を処理し、経時的に Nrf2 の標的遺伝子の発現を RT-qPCR 法により評価した。Nrf2 標的遺伝子である Heme oxygenase 1 (HO-1)、NAD(P)H quinone oxidoreductase 1 (NQO1)、Glutamate-Cysteine ligase modifier subunit (GCLM)、Multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2)の mRNA 発現を RT-qPCR 法で調べた。MeHg の処理により、いずれの遺伝子発現レベルも増加したが、いずれの遺伝子発現レベルも WT 細胞より p62KO 細胞で低く、NBR1KO 細胞で高い傾向だった (**Fig. 4 左図**)。また、HO-1 と NQO1 のタンパク質の発現についてウエスタンブロット法により調べたところ、

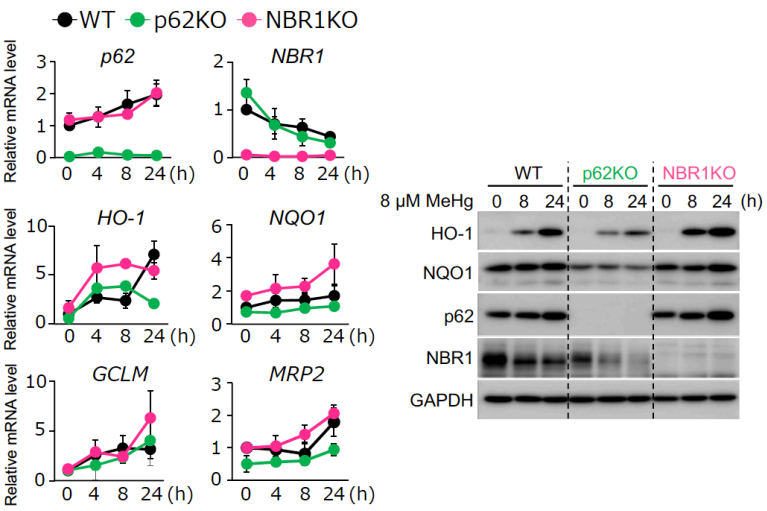

Fig. 4

HO-1 と NQO1 のタンパク質発現は、WT 細胞と比較して p62KO 細胞では低く、NBR1KO 細胞では高く、mRNA 発現レベルを反映した結果となった(**Fig. 4 右図**)。Nrf2 は活性化すると核内に移行し、転写因子として標的遺伝子の転写を活性化する。そこで、WT 細胞、

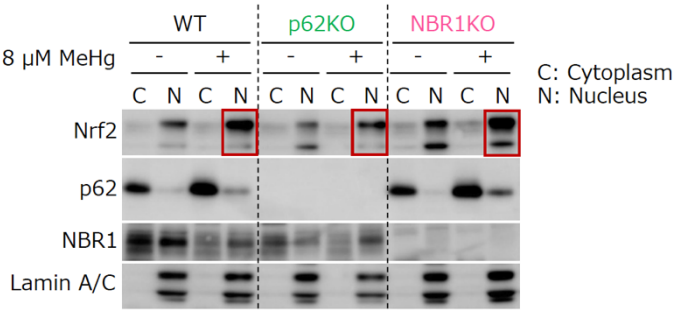

Fig. 5

p62KO 細胞、NBR1KO 細胞における MeHg による Nrf2 の核内移行量をウエスタンブロット法により評価した。WT 細胞に 8 μM の MeHg を処理し、8 時間後における Nrf2 のタンパク質量を調べたところ、MeHg により核画分（N）の Nrf2 量が増加した。この MeHg による Nrf2 量の増加レベルは WT 細胞と比較して、p62KO 細胞では低下した。一方、NBR1KO 細胞は WT 細胞と比較して増加した (**Fig. 5**)。興味深いことに、WT 細胞において MeHg 処理により核内の p62 が増加するが、NBR1KO 細胞では、WT 細胞よりさらに核内 p62 量が増加した。

5. <u>p62KO マウスの作出</u>

p62KO マウスは、ノックアウトマウス作製サービス（サイヤジェン株式会社: Cyagen Biosciences）に委託し作出した。納品されたホモ p62 ノックアウトマウスを 8 週齢まで飼育後、交配を行った。交配させた 2 ペアからそれぞれ 3 匹と 8 匹の仔マウスが得られた。次年度の実験に必要な個体数を確保するため、現在、離乳後の親マウスを再び交配させ、繁殖を進めている。

Ⅳ考察

本年度における *in vitro* の研究結果において、p62KO 細胞と NBR1KO 細胞の MeHg に対する感受性、ユビキチン化タンパク質の蓄積、細胞内水銀濃度、Keap1-Nrf2 経路の活性化について検証した。p62 と NBR1 はそれぞれ類似ドメインを有する分子であるが、予想外に p62KO 細胞と NBR1KO 細胞の MeHg に対する感受性は相反していたことから、MeHg 毒性に対する p62 と NBR1 の機能が異なると推察された (**Fig. 1**)。p62 と NBR1 はオートファジーレセプター分子であるため、オートファジーを介したユビキチン化タンパク質の除去に機能する [7]。p62 と NBR1 は分子内にユビキチン鎖を認識する UBA ドメインを共通して有している。また、PB1 ドメインを共通して有しており、この領域を介して p62 と NBR1 結合し、ユビキチン化タンパク質の除去に協調して働いていると考えられている [8]。我々の先行研究において、p62KO MEF 細胞は、WT MEF 細胞より MeHg 処理後のユビキチン化タンパク質の蓄積量が多いことを明らかにしている [2]。本研究においても、MEF 細胞と同様に、p62KO HeLa 細胞は WT 細胞より MeHg 処理後のユビキチン化タンパク質の蓄積量が増加

していることが認められ、p62 は MeHg により増加するユビキチン化タンパク質の除去に重要な分子であることが明らかとなった。また、MeHg により増加したユビキチン化タンパク質は、Triton X-100 不溶性画分に検出され、MeHg によりユビキチン化された異常タンパク質の凝集体が蓄積していると考えられた。一方、NBR1KO 細胞は、MeHg 処理後のユビキチン化タンパク質の蓄積量が WT 細胞よりも低く、p62KO 細胞と相反する結果を示した (**Fig. 2**)。現時点では、NBR1KO 細胞における MeHg 処理後のユビキチン化タンパク質蓄積の低下のメカニズムは不明であるが、NBR1 と p62 からなる複合体と比較して NBR1 を含まない p62 複合体はユビキチン化タンパク質を効率的に分解することができる可能性が考えられる。あるいは、MeHg 処理後の NBR1KO 細胞の細胞内水銀濃度が WT 細胞より低値であることが、細胞内ユビキチン化タンパク質の蓄積低下の要因であるかもしれない。

p62KO 細胞における MeHg 処理 4~8 時間後の細胞内水銀濃度は WT 細胞より高値を示した (**Fig. 3**)。細胞内の水銀濃度は、細胞内のグルタチオンの枯渇や MRP2 の阻害により上昇することが知られている [9]。実際、p62KO 細胞は、MeHg 処理により増加するグルタチオン合成系や MRP2 等の発現が WT 細胞より低下した (**Fig. 4**)。MeHg の排出を担う MRP2 および MRP2 の基質となる MeHg とグルタチオンの付加体が減少することにより、MeHg の細胞外排出が阻害され、細胞内の水銀濃度が増加する可能性が考えられる。グルタチオン合成系や MRP2 等の発現は、Keap1-Nrf2 システムにより制御されている [10]。通常、Nrf2 は Keap1 によるユビキチン化により、プロテアソーム分解による抑制制御を受けている。Keap1 のシステイン残基に MeHg が結合すると、Keap1 と Nrf2 の結合が障害され、Nrf2 は分解されずに安定化し、Nrf2 は核に移行する。p62KO 細胞では MeHg のばく露による Nrf2 の活性化レベル（Nrf2 の核内移行量）が野生型細胞より低く、Nrf2 標的遺伝子の発現レベルと正の相関を示した (**Fig. 5**)。したがって、p62KO 細胞における細胞内水銀濃度の増加は、MeHg ばく露による Nrf2 の活性化の低下、Nrf2 による細胞内グルタチオン合成系酵素、MRP2 の発現誘導の低下が起因していることが示唆された。さらに、p62 は Keap1 と直接結合し、Nrf2 の活性化、すなわち Nrf2 の核内移行を助けていると考えられている。したがって、p62KO 細胞において MeHg のばく露による Nrf2 の活性化レベルが低い一要因として、p62 による Nrf2 の活性化が働かないことが推察される。一方、NBR1KO 細胞は MeHg ばく露後の細胞内水銀濃度、グルタチオン合成系や MRP2 等の発、Nrf2 の活性化いずれも p62KO 細胞と相反した結果を示した。MeHg ばく露後の Nrf2 活性化に対する NBR1 の機能は現時点では不明であるが、p62 による過剰な Nrf2 の活性化を NBR1 が負に調節している可能性が考えられ、今後の検討課題の一つである。

Ⅴ結論

本研究の結果から、p62 は Nrf2 経路の活性化による MeHg 排出の制御、および MeHg により生じたユビキチン化タンパク質の除去に重要な分子であることが明らかとなり、MeHg 毒性から細胞を防御する鍵分子であることが示唆された。一方、NBR1 の機能についてはま

だ不明な点が多いが、NBR1KO 細胞は Nrf2 経路の活性化およびユビキチン化タンパク質の除去において p62KO 細胞と相反した結果が得られたことから、MeHg ばく露において、NBR1 は p62 の機能を負に調節している可能性が考えられた。

VI次年度の課題

p62 欠損細胞を用いた *in vitro* 実験により、p62 が 1) 細胞内水銀濃度を低下させる、2) MeHg による Nrf2 の活性化を促進する、3) 凝集したユビキチン化タンパク質を分解除去する、の 3 点において機能し、MeHg に対する細胞防御因子として重要な機能を果たすことを明らかにした。一方、p62 と協調して機能すると予想された NBR1 は p62 の負の制御因子として働く可能性を新たに見出した。次年度は、当初の計画通り、オートファジーあるいはプロテアソームの阻害時の細胞内水銀濃度及び p62 の役割について解析を進める予定である。また、p62 と NBR1 のタブル KO 細胞を樹立し、MeHg に対する p62 と NBR1 の機能について検証する予定である。さらに、次年度からの主要な研究課題である「MeHg 毒性に対する p62 の機能について個体レベルで明らかにする」を推進する。現在、p62KO マウスを用いた解析に向けて予定通り準備を進めているところである。

本研究に関する現在までの研究状況、業績

１）フォーラム 2022 衛生薬学・環境トキシコロジー ： シンポジウム演題タイトル「メチル水銀毒性に対するオートファジーレセプターp62 の細胞保護機構」にて、本研究の成果を発表した。

２）Biochem. Biophys. Res. Commun., 2022, 134-140. Protective function of the SQSTM1/p62-NEDD4 complex against methylmercury toxicity にて、重金属等による健康影響に関する総合的研究「平成 31 年～令和 3 年度 水俣病に関する総合的研究」の助成による研究成果を国際誌に発表した。

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. *Toxicology letters* **262**, 135–141 (2016).

2. Takanezawa, Y. *et al.* Sequestosome1/p62 protects mouse embryonic fibroblasts against low-dose methylercury-induced cytotoxicity and is involved in clearance of ubiquitinated proteins. *Scientific reports* **7**, 1–11 (2017).

3. Takanezawa, Y. *et al.* p62/sequestosome 1 attenuates methylmercury-induced endoplasmic reticulum stress in mouse embryonic fibroblasts. *Toxicology Letters* **353**, 93–99 (2021).

4. Takanezawa, Y. *et al.* Protective function of the SQSTM1/p62-NEDD4 complex against methylmercury toxicity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **609**, 134–140

(2022).
5. Auger, N., Kofman, O., Kosatsky, T. & Armstrong, B. Low-level methylmercury exposure as a risk factor for neurologic abnormalities in adults. *Neurotoxicology* **26**, 149–157 (2005).
6. Ono, M. *et al.* Central role for p62/SQSTM1 in the elimination of toxic tau species in a mouse model of tauopathy. *Aging Cell* **21**, e13615 (2022).
7. Lamark, T., Kirkin, V., Dikic, I. & Johansen, T. NBR1 and p62 as cargo receptors for selective autophagy of ubiquitinated targets. *Cell Cycle* **8**, 1986–1990 (2009).
8. Kirkin, V., Lamark, T., Johansen, T. & Dikic, I. NBR1 co-operates with p62 in selective autophagy of ubiquitinated targets. *Autophagy* **5**, 732–733 (2009).
9. Toyama, T. *et al.* Isothiocyanates reduce mercury accumulation via an Nrf2-dependent mechanism during exposure of mice to methylmercury. *Environmental health perspectives* **119**, 1117–1122 (2011).
10. Baird, L. & Yamamoto, M. The molecular mechanisms regulating the KEAP1-NRF2 pathway. *Molecular and cellular biology* **40**, e00099-20 (2020).

英文要約（Abstract）

Methylmercury (MeHg) binds to various proteins, causing denatured proteins to accumulate in the cells. To prevent this accumulation, a degradation system for denatured proteins is activated. We have previously reported that low concentrations of MeHg activate autophagy, which is a defense mechanism against MeHg. Ubiquitinated proteins whose intracellular levels increased after MeHg exposure are recognized and trapped by the autophagy receptor molecule, p62/Sequestosome1 (p62), and degraded by autophagy and proteasomes. We previously studied an experimental system utilizing with p62-deficient (p62 KO) MEF cells and suggested that p62 is a key molecule in ubiquitinated proteolysis and functions in cytoprotection against MeHg toxicity. We further found that p62 KO cells had higher intracellular mercury concentrations after MeHg exposure than wild-type cells. Based on these results of these studies, we hypothesized that elucidation of the mechanism by which p62 regulates intracellular concentrations of MeHg would enhance our understanding of MeHg toxicity and its mitigating.

Therefore, the purpose of this study is to determine the regulatory mechanism of intracellular MeHg at the cellular level and to clarify the function of p62 for MeHg at the individual level, thereby building on previous findings. We will perform two main *in vitro* studies: (1) analysis of intracellular MeHg concentrations and regulation mechanisms of p62 and (2) analysis of the linkage between protein degradation systems (autophagy and proteasomes) and MeHg metabolism. Additionally, *in vivo* studies will be conducted to describe the MeHg toxicity defense mechanisms of p62 using p62 deficient mice.