

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、様々なタンパク質のチオール基を介して共有結合し、変性タンパク質が細胞内に蓄積することが予想される。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、恒常性を維持している。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。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⁵。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、「平成 31 年～令和 3 年度 水俣病に関する総合的研究」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

我が国では水俣病という環境中に排出された MeHg の曝露による深刻な健康被害を経験した。現在の国内ではそのような高濃度の MeHg 曝露におかれる状況にはないが、MeHg を含む魚介類等の摂取により、微量であるが MeHg の曝露を受け続けている。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、近年、低濃度の MeHg 曝露が胎児の知能発達遅延や心疾患の潜在的なリスクとなる可能性が報告されている。さらに、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の発症リスクとなる可能性が想定される⁶。

オートファジーレセプター p62 は、神経原線維と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を抑制することが示唆されている⁷。

我々は培養細胞を用いた解析から、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明らかにし、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。近年、p62 欠損 (p62KO) 細胞を用いた解析から、p62 は MeHg 毒性を緩和すること、MeHg 曝露後の細胞内水銀濃度の低下作用にも寄与していることを見出した。

本研究の目的は、p62 による MeHg 排出機構の分子基盤の構築を目的とするとともに、「平成 31 年～令和 3 年度 水俣病に関する総合的研究」における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 MeHg 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生じる MeHg 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、MeHg 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、研究項目(A-2)「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」を遂行した。前年度から継続して検討する事項である p62 欠損細胞における MeHg 結合タンパク質の性質に違いがあるか否かについて検証するとともに、p62 欠損細胞と p62 結合分子 NBR1 欠損細胞を用いて、Nrf2 経路の活性化剤スルフォラファン処理により細胞内水銀濃度が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、プロテアソームの阻害剤 MG132 処理による細胞内水銀濃度の測定および MeHg と MG132 の共処理に対する野生型細胞と p62 欠損細胞の細胞死について評価した。また、*In vitro* 研究では、研究項目(B-2)「メチル水銀に対する p62 欠損マウスの感受性およびメチル水銀の組織蓄積」を遂行した。p62 欠損マウスの繁殖を行うとともに、MeHg 単回投与後における p62 欠損マウス臓器中の水銀濃度を測定した。

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 Lipofectamine 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 $\mu\text{g/ml}$ 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 4 μM あるいは 8 μM の MeHg を処理した。細胞は、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。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 (Thermo Fisher Scientific)、抗 Nrf2 抗体 (Proteintech)、抗ユビキチン抗体、抗ヘムオキシゲナーゼ-1 (HO-1) 抗体 (Cell Signaling Technology) を 4°C 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

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. 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。タンパク質に結合した水銀は SDS-PAGE で分離したゲルを CBB 染色にて可視化後、分子量マーカーを指標に 65kDa 以上を High、35~65kDa を Middle、10~35 kDa を Low としてゲルを切り出し、MA3 Solo を用いて水銀量を測定した。

5. p62 欠損マウスの作出

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。

6. マウスの飼育とメチル水銀の単回経口投与

雄性の p62 欠損マウスと雌性マウスを交配させ、p62 欠損仔マウスを得た。また、購入し

た野生型マウスと同じ餌 (CE-2 γ 線照射済; 日本クレア株式会社) と滅菌水を与え、床敷にはペパークリーン (日本エスエルシー株式会社) を使用して同じ環境条件下で飼育した。100 mg/mL 塩化メチル水銀溶液 10 μ L に 990 μ L の生理食塩水を加えて希釈し、1 mg/mL とし、胃ゾンデを用いてマウスに単回経口投与した。投与するマウスの体重を MeHg 投与直前に測定し、いずれのマウスも体重 25 g につき投与液が 250 μ L となるように調製した (10 mg/kg 体重)。

7. マウスの臓器摘出と水銀測定

MeHg 投与開始 24 時間後および 72 時間後にイソフルラン (動物用イソフルラン; マイラン製薬株式会社) を用いて麻酔処理を行った。マウスを開胸し、血液を採取した後、放血により安楽死させた。PBS で灌流後、大脳、小脳、心臓、肝臓、腎臓を摘出し、PBS を満たしたシャーレ上で各臓器を洗浄し、余分な水分をキムワイプで拭き取った。各臓器は 1.5 mL チューブに入れて液体窒素で凍結させた後、-80°C で保存した。各臓器は RIPA Buffer で超音波処理後、2000 rpm で 10 分遠心し、上清を水銀測定に用いた。

(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)」および日本学会が策定した「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 21-26) および遺伝子組換え動物使実験の承認 (承認番号 : 4840) 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、個人情報に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には該当しない。

III 研究結果

1. p62KO 細胞と NBR1KO 細胞における MeHg 結合タンパク質濃度の解析

前年度において、MeHg 処理後における WT 細胞、p62KO 細胞、NBR1KO 細胞の細胞内水銀濃度を測定した結果、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 倍と高値を示した。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。本年度はこの p62KO 細胞の細胞内水銀濃度の増加、NBR1KO 細胞の細胞内水銀濃度の低下がタンパク質成分に由来するものであるか否かについて検討した。WT 細胞、p62KO 細胞、NBR1KO 細胞に 4 μM の MeHg を 8 時間曝露させ、細胞を回収後、SDS-PAGE にてタンパク質を分離した (Fig. 1 上図)。ゲルを CBB 染色にて可視化後、分子量マーカーを指標に 65kDa 以上を High、35~65kDa を Middle、10~35 kDa を Low としてゲルを切り出し、ゲル中の水銀量を測定したところ、p62KO 細胞の High、Middle、Low の合計水銀量は WT 細胞の 1.83 倍と高値を示した (Fig. 1 左図)。一方、NBR1KO 細胞のゲル中の水銀量は WT 細胞の 0.52 倍と低値を示した。それぞれの細胞における、High、Middle、Low のゲル中水銀量割合を算出したところ、それぞれの細胞間における比較において、大きな差異は認められなかった (Fig. 1 右図)。

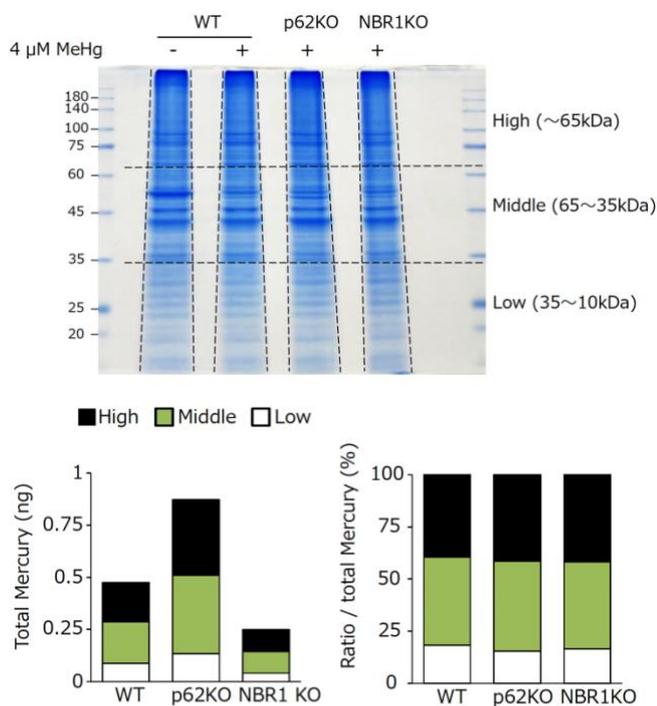


Fig. 1 p62KO 細胞とNBR1KO 細胞におけるタンパク質結合メチル水銀量 (SDS-PAGEを用いた検討) (上) CBB染色、(下左) ゲル中の水銀量、(下右) High, Middle, Lowのゲル中水銀量の割合

2. p62KO 細胞と NBR1KO 細胞における MeHg 結合タンパク質の性状解析

p62KO 細胞、NBR1KO 細胞における MeHg 結合タンパク質の性状を調べるため、WT 細胞、p62KO 細胞、NBR1KO 細胞に 4 μM あるいは 8 μM の MeHg を処理し、4, 8, 24 時間後に細胞を回収し、界面活性剤 Triton X-100 による可溶性と不溶性画分に分け、水銀量を測定した。4 μM MeHg 処理では p62KO 細胞における、総水銀量が 4 時間、8 時間において、野生型細胞より高値を示し、可溶性画分、不溶性画分共に、同様の傾向を示した (Fig. 2 上図)。一方、8 μM MeHg 処理では、4

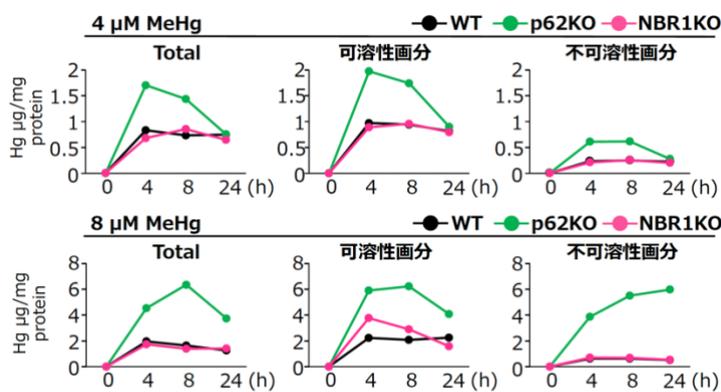


Fig. 2 p62KO 細胞とNBR1KO 細胞における細胞内メチル水銀 (Triton X-100を用いた検討)

μM MeHg 処理と同様に p62KO 細胞の可溶性画分、不溶性画分共に野生型細胞より高値を示した。特に p62KO 細胞の不溶性画分における水銀量が 4, 8, 24 時間後と経時的に野生型細胞に比べ高値を示した (Fig. 2 下図)。一方、NBR1KO 細胞の可溶性画分、不溶性画分の MeHg 量は野生型細胞とほぼ同等だった。

3. p62KO 細胞と NBR1KO 細胞における MeHg 濃度に対するスルフォラファンの影響

前年度までの解析において、MeHg による Nrf2 の活性化の程度が p62KO 細胞では野生型細胞より低く、NBR1KO 細胞では野生型細胞より高いことが示唆された。そこで、p62KO 細胞の Nrf2 を活性化させると、

p62KO 細胞の細胞内水銀量が低下するか否かについて調べる目的で、Nrf2 の活性化剤であるスルフォラファンを用いて検証した。野生型細胞、p62KO 細胞、NBR1KO 細胞にそれぞれスルフォラファンを前処理し、MeHg 処理 8 時間後の細胞内水銀濃度を測定した。p62KO 細胞における MeHg 処理群の細胞内水銀量は、野生型細胞より高値を示した。一

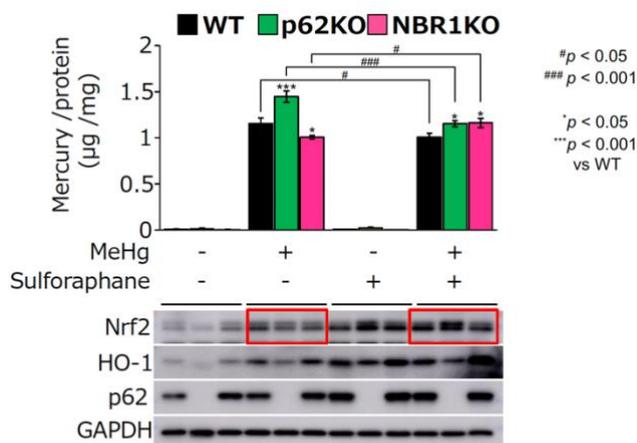


Fig. 3 p62KO 細胞とNBR1KO 細胞におけるスルフォラファン処置による細胞内水銀濃度 (上) 細胞内水銀濃度、(下) ウェスタンブロット解析

方、p62KO 細胞にスルフォラファンを前処理した群では、MeHg 処理群と比べて細胞内水銀量が低下した (Fig. 3 上図)。実際、スルフォラファンを前処理した群では、いずれの細胞株においても Nrf2 の活性化 (発現増加) が認められた (Fig. 3 下図)。

4. p62KO マウスにおける MeHg 単回投与後の臓器水銀濃度 (大脳・小脳)

p62KO 細胞は野生型細胞と比較して MeHg 処理後の細胞内水銀濃度が一過的に増加する (*in vitro*)。そこで、p62 を欠損したマウス (p62KO マウス) を作製し、MeHg 投与後の臓器水銀濃度が野生型マウスと比較して増加するの否かについて検証した (*in vivo*)。p62 欠損マウス (10 週令の雄マウス) と同系統

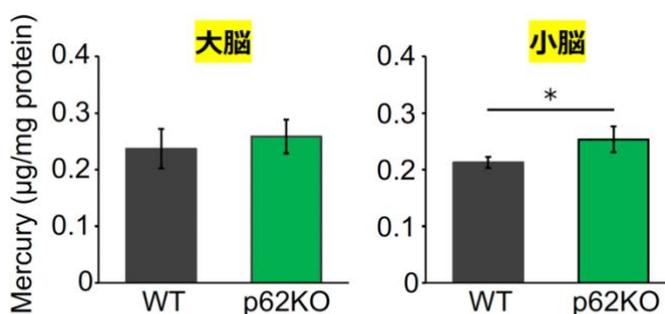


Fig. 4 p62欠損マウスにおけるメチル水銀単回投与後の臓器水銀濃度 (大脳・小脳) 10 mg/kg CH₃HgCl 経口単回投与24時間後の大脳 (左) および小脳 (右) の水銀濃度, *p<0.05

(C57BL/6J) の同週令の雄マウス (野生型マウス) に 10 mg/kg 体重のメチル水銀を単

回経口投与後し、投与1日後の p62 欠損マウスと野生型マウスの臓器中の水銀量を測定した。いずれのマウスもコントロール処理群と比較して行動に異常は認められなかった。大脳と小脳における水銀濃度を測定した結果、p62 欠損マウスの小脳において野生型マウスより有意に高い水銀濃度を示した（野生型マウス; 0.011 $\mu\text{g}/\text{mg protein}$, p62 欠損マウス; 0.013 $\mu\text{g}/\text{mg protein}$, $p\text{-value} = 0.0457258$ ）。また、統計的な有意差はないものの、p62 欠損マウスの大脳の水銀濃度も野生型マウスより増加を示した (Fig. 4)。

さらに、心臓、肺、肝臓、腎臓における水銀濃度を測定したところ、p62 欠損マウスの腎臓において野生型マウスより有意に高い水銀濃度が認められた（野生型マウス; 0.421 $\mu\text{g}/\text{mg protein}$, p62 欠損マウス; 0.475 $\mu\text{g}/\text{mg protein}$, $p\text{-value} = 0.0410412$ ）。一方、統計的な有意差は認められないものの、p62 欠損マウスの心臓においても野生型マウスより水銀濃度が高い傾向を示した。一方、肝臓では有意差はないものの僅かに低い値を示した (Fig. 5)。

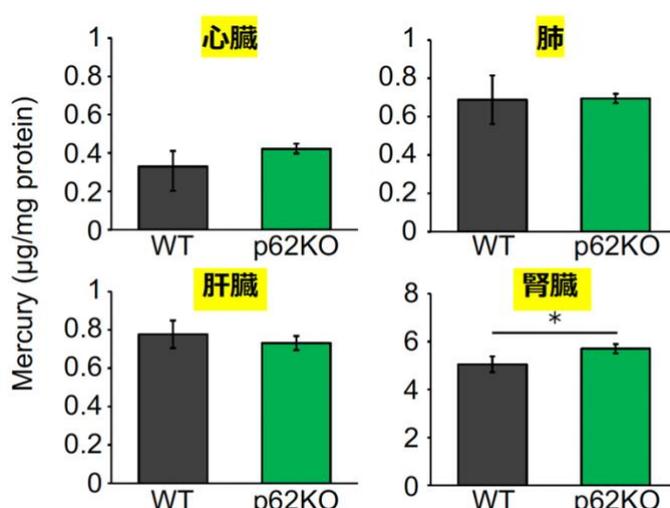


Fig. 5 p62欠損マウスにおけるメチル水銀単回投与後の臓器水銀濃度 (心臓・肺・肝臓・腎臓) 10 mg/kg CH_3HgCl 経口単回投与24時間後の心臓、肺、肝臓、腎臓の水銀濃度, * $p < 0.05$

IV 考察

前年度までの研究において、MeHg 曝露後の細胞内水銀濃度は、野生型細胞より p62KO 細胞で高値を示し、NBR1KO 細胞では低値を示した。しかし、p62KO 細胞における細胞内の水銀濃度の増加が MeHg 結合タンパク質の増加によるものか否かについては不明であった。そこで、本年度における *in vitro* 研究として、p62KO 細胞と NBR1KO 細胞の MeHg 結合タンパク質の蓄積、MeHg 結合タンパク質の性状解析、Keap1-Nrf2 経路の活性化剤スルホラファンによる Nrf2 の活性化、および p62KO 細胞と NBR1KO 細胞の細胞内水銀濃度を検証した。

本研究において、p62KO 細胞の MeHg 結合タンパク質は野生型細胞より増加していることから、p62 は MeHg 結合タンパク質をオートファジー、あるいはプロテアソームを介して分解し、細胞内水銀濃度の減少に寄与していることが示唆された。また、NBR1 KO 細胞の MeHg 結合タンパク質は野生型細胞より低下しており、p62 と NBR1 は MeHg 結合タンパク質の分解において機能が異なることが推察された (Fig. 1)。p62 と NBR1 はお互いに類似したドメインを持つオートファジーレセプター分子であり、それぞれの N 末領域に存在する

PB1 ドメインを介して互いに結合することが知られている。p62 と NBR1 はそれぞれ独自の機能を持つことが示唆されているが、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協調して働いていると考えられている⁸。しかし、前年度までの本研究課題において、p62KO HeLa 細胞は野生型細胞より MeHg 処理後のユビキチン化タンパク質の蓄積量が高いこと、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野生型細胞よりも低いことがわかり、MeHg 曝露後のユビキチン化タンパク質の除去において、p62 と NBR1 の機能が相反する可能性が考えられた。また、p62KO 細胞では MeHg により増加したユビキチン化タンパク質の多くが 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予想された。高濃度の MeHg を処理すると、p62KO 細胞の Triton X-100 不溶性画分の水銀濃度が野生型細胞より顕著に高くなり、Triton X-100 不溶性のユビキチン化タンパク質に MeHg が結合していることが示唆された (Fig. 2)。以上の結果から、p62 は MeHg 曝露によって増加した (MeHg 結合) ユビキチン化タンパク質の分解に寄与し、細胞内の水銀量を低下させる機能を持つことが示唆された。

細胞内水銀濃度は Keap1-Nrf2 の活性化により低下することが報告されている⁹。p62 は Keap1 と直接結合し Nrf2 の活性化を促すことが示唆され¹⁰、MeHg 曝露において p62 は Nrf2 の活性化、すなわち Nrf2 の核内移行を促進する可能性が考えられる。前年度の結果より、p62KO 細胞における細胞内水銀濃度の増加は、MeHg 曝露による 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と推察された。一方、NBR1KO 細胞は MeHg 曝露後の細胞内水銀濃度、グルタチオン合成系や MRP2 等の発現、Nrf2 の活性化いずれも p62KO 細胞と相反した結果を示した。そこで、野生型細胞と比較した場合の p62KO 細胞や NBR1KO 細胞の細胞内水銀濃度の増減が、Nrf2 の活性化の程度に起因するか否かについて、Nrf2 の活性化剤スルフォラファンによる Nrf2 活性化後におけるそれぞれの細胞株の細胞内水銀濃度を検証した。その結果、予想どおり、p62KO 細胞の細胞内水銀濃度の増加はスルフォラファン処理により低下した。一方、NBR1KO 細胞の細胞内水銀濃度の低下はスルフォラファン処理により野生型細胞と同等まで増加した (Fig. 3)。これらの結果から、p62KO 細胞における MeHg の曝露後の細胞内水銀濃度の増加は、p62 の欠損による Nrf2 の活性化レベルの低下が要因であることが明らかになった。また、NBR1KO 細胞の細胞内水銀濃度の低下は、Nrf2 活性化の低下が要因であると考えられた。

前年度において作製した p62 欠損 (p62KO) マウスは、正常に生まれ、出生から離乳時まで外見上目立った表現型は認められなかった。p62 KO マウスはいくつかの研究グループから報告されているが¹¹⁻¹³、いずれの p62 KO マウスにおいても成長に伴い肥満の表現型を示すことが共通している。作製した p62KO マウスも 20 週以降、加齢に伴い肥満の表現型を呈した。そこで本研究では、著しい体重増加が認められない 10 週令の雄マウスを MeHg 単回投与実験に用いた。p62KO マウスは、野生型マウスと比較して MeHg 単回投与

後の水銀濃度が増加傾向を示す臓器が多く、小脳および腎臓で有意な水銀濃度増加が認められた (Figs. 4 and 5)。これらの結果は、p62KO 細胞で見出されたメチル水銀の一過的な増加を支持する結果であった。p62KO 細胞の知見を合わせて、p62KO マウスの臓器中の水銀濃度の増加メカニズムを考察すると、p62KO マウスの臓器中では MeHg 曝露による Nrf2 の活性化が十分に起こらない可能性が考えられた。

V 結論

本研究の *in vitro* 解析の結果から、p62 は Nrf2 経路の活性化を介して MeHg の細胞外排出を促進し、MeHg 毒性から細胞を防御する鍵分子であることが明らかになった。また、p62 KO 細胞は野生型細胞と比較して MeHg 曝露後の MeHg 結合タンパク質量が多く、p62 は MeHg 結合タンパク質の分解に関与していることが示唆された。一方、NBR1 KO 細胞は MeHg 結合タンパク質の蓄積量が野生型細胞より少なく、p62KO 細胞と相反した機能が推察された。さらに、p62 欠損マウスは野生型マウスより MeHg 投与後の臓器中の水銀濃度が増加傾向であり、p62 は *in vivo* においても MeHg の排出に関わる分子であることが示唆された。

VI 今後の課題

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) MeHg 結合タンパク質を分解する、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が明らかになった。一方、p62 と協調して機能すると予想された NBR1 は MeHg 結合タンパク質の分解においても p62 の負の制御因子として働く可能性を見出した。次年度は、当初の計画通り、「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」を中心に研究を推進する予定である。現在、p62KO マウスを用いた MeHg 反復投与実験に向けて準備を進めている。*In vitro* 実験に関しては、プロテアソームと細胞内水銀濃度及び p62 の関係性について、さらに解析を進める予定である。

本研究に関する現在までの研究状況、業績

【論文】

- 1) **Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinases attenuates methylmercury toxicity in SH-SY5Y neuroblastoma cells.** 重金属等による健康影響に関する総合的研究「令和 4 年～令和 6 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 **Biol. Pharm. Bull., 2023** に発表した。
- 2) **Proteasome and p62/SQSTM1 are involved in methylmercury toxicity mitigation in mouse embryonic fibroblast cells.** 重金属等による健康影響に関する総合的研究「令和 4 年～令和 6 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 **J. Toxicol. Sci., 2023** に

発表した。

- 3) **Protective function of the SQSTM1/p62-NEDD4 complex against methylmercury toxicity.** 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 **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, **2022** に発表した。

【学会】

- 1) 「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」重金属等による健康影響に関する総合的研究「令和 4 年～令和 6 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「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」にて発表した。

引用文献

- 1) Takanezawa, Y. *et al.* Atg5-dependent autophagy plays a protective role against methylmercury-induced cytotoxicity. *Toxicology letters* **262**, 135–141 (2016).
- 2) Takanezawa, Y. *et al.* Sequestosome 1/p62 protects mouse embryonic fibroblasts against low-dose methylmercury-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) Takanezawa, Y. *et al.* Proteasome and p62/SQSTM1 are involved in methylmercury toxicity mitigation in mouse embryonic fibroblast cells. *The Journal of Toxicological Sciences* **48**, 355–361 (2023).
- 6) Auger, N. *et al.* Low-level methylmercury exposure as a risk factor for neurologic abnormalities in adults. *Neurotoxicology* **26**, 149–157 (2005).
- 7) 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).
- 8) Kirkin, V. *et al.* NBR1 co-operates with p62 in selective autophagy of ubiquitinated targets. *Autophagy* **5**, 732–733 (2009).
- 9) Kumagai, Y. *et al.* The role of the Keap1/Nrf2 pathway in the cellular response to methylmercury. *Oxidative medicine and cellular longevity* **2013**, (2013).
- 10) Komatsu, M. *et al.* The selective autophagy substrate p62 activates the stress responsive transcription factor Nrf2 through inactivation of Keap1. *Nature cell biology* **12**, 213–223 (2010).

- 11) Rodriguez, A. *et al.* Mature-onset obesity and insulin resistance in mice deficient in the signaling adapter p62. *Cell metabolism* **3**, 211–222 (2006).
- 12) Sugimoto, R. *et al.* Enhanced neointimal hyperplasia and carotid artery remodelling in sequestosome 1 deficient mice. *J Cellular Molecular Medi* **14**, 1546–1554 (2010).
13. Harada, H. *et al.* Deficiency of p62/Sequestosome 1 causes hyperphagia due to leptin resistance in the brain. *Journal of Neuroscience* **33**, 14767–14777 (2013).

英文要約 (Abstract)

We have previously demonstrated that low levels of methylmercury (MeHg) trigger autophagy, a protective response against MeHg, by activating a degradation mechanism for denatured proteins, thereby preventing their accumulation within in cells. Ubiquitinated proteins whose intracellular levels increased after MeHg exposure are recognized by the autophagy receptor molecule, p62/Sequestosome1 (p62), and degraded by autophagy and proteasomes. Our investigation revealed that p62 plays a crucial role in ubiquitinated proteolysis, functioning to protect cells against MeHg toxicity. Furthermore, we found that p62KO cells had higher intracellular mercury concentrations after MeHg exposure than wild-type cells. Based on these results of these studies, we postulated that uncovering the mechanism through which p62 regulates the intracellular concentrations of MeHg could deepen our comprehension of MeHg toxicity and its alleviation.

Therefore, the purpose of this study is to clarify the regulatory mechanism of intracellular MeHg *in vitro* and function of p62 on MeHg *in vivo*. We will perform two main *in vitro* studies: (1) analysis of intracellular MeHg concentrations and the roles of p62 and NBR1, (2) analysis of the linkage between protein degradation systems (autophagy and proteasomes) and MeHg metabolism. Additionally, we will conduct *in vivo* studies on the defense mechanism of p62 against MeHg using p62-deficient mice.