

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 (p62KO) 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], 論文 4)。また、MAP キナーゼの一つ p38MAPK の阻害がメチル水銀による細胞死を抑制すること ([5], 論文 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) が MeHg 毒性の軽減に働くことを明らかにした ([6], 論文 3)。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

研究分担者 : 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 [7]。

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 [8]。

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 [2]、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 [2,3]、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 [5]。

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、p62KO 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。

最終年度である本年度は、前年度の研究項目(B-2)「メチル水銀に対する p62KO マウスの感受性およびメチル水銀の組織蓄積」について継続するとともに、研究計画通り研究項目(B-3)「p62 欠損マウスを用いた障害組織の病理組織解析」を遂行し、p62 欠損マウスがメチル水銀曝露によりどのような影響を受けるのかについて解析を行った。

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 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。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 細胞株も同様の方法で樹立した。

2. ウェスタンブロット法

マウスから臓器を摘出し PBS で洗浄した。その一部を RIPA Buffer (20 mM Tris pH7.4, 0.1% SDS, 1% Na deoxycholate, 1% NP 40, and protease/phosphatase inhibitor cocktail) でホモジナイズした。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) 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. 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、p62KO 細胞と NBR1KO 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。

4. リアルタイム RT-PCR 法

HeLa 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。

5. p62 欠損 (KO) 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. 水銀分析法

マウスから臓器を摘出し、PBS で洗浄した。その一部を RIPA Buffer でホモジナイズし、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。

7. マウスの飼育とメチル水銀の単回経口投与

雄性的 p62KO マウスと雌性マウスを交配させ、p62KO 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)。

8. 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℃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。

9. マウス肝臓の組織評価法

マウスの肝臓の病理組織は、ヘマトキシリン・エオジン染色 (以下 HE 染色) により評価した。マウスは生理食塩水で灌流後、肝臓を摘出しホルマリンで固定した。その後、パラフィンに包埋し、5 μ m 厚の薄切片にした後、HE 染色を実施した。

10. 肝臓トリグリセリド・コレステロールの測定法

肝臓中のトリグリセリド濃度は、ラボアッセイ™ トリグリセリドキット、コレステロール濃度は、ラボアッセイ™ コレステロールキットを用いた (いずれも FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation)。

(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 24-6) 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には該当しない。

III 研究結果

研究項目 (A) p62 と NBR1 の関連性 (*In vitro* 実験)

1. p62KO 細胞と NBR1KO 細胞のメチル水銀感受性

オートファジーレセプター分子である p62 と Neighbor of BRCA1 (NBR1)は相互作用し、ユビキチン化タンパク質を捕捉しオートファジーを介して分解除去に機能していると考えられている。本研究では、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 p62KO 細胞と NBR1KO 細胞を樹立した。WT 細胞、p62KO 細胞、NBR1KO 細胞に MeHg を処理し、24 時間後および 48 時間後の細胞生存率および細胞膜傷害による乳酸脱水素酵素 (Lactate Dehydrogenase; LDH) の放出量から細胞死を評価したところ、いずれの時間においても、p62KO 細胞の細胞生存率が WT 細胞と比較して有意に低下し、LDH 放出量は有意に増加した。一方、NBR1KO 細胞は、いずれの時間においても、WT 細胞と比較して細胞生存率が有意に増加し、LDH 放出量は WT 細胞と比較して有意に低下した。

2. p62KO 細胞と NBR1KO 細胞におけるユビキチン化タンパク質の蓄積と細胞内水銀濃度の推移

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。そこで、p62KO 細胞と NBR1KO 細胞の MeHg によるユビキチン化タンパク質の蓄積について検証した。WT 細胞、p62KO 細胞、NBR1KO 細胞に MeHg を処理し、24 時間後のユビキチン化タンパク質蓄積を調べたところ、p62KO 細胞は野生型細胞と比較して MeHg 処理による不溶性画分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、不溶性画分のユビキチン化タンパク質量は野生型細胞よりも減少傾向だった。

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。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、MeHg 処理後の細胞抽出液を SDS-PAGE で分離し、切り出した分離ゲル中の水銀を測定した。その結果、p62KO 細胞の分離ゲル中の水銀量は WT 細胞の 1.83 倍と高値を示し、NBR1KO 細胞の水銀量は WT 細胞の 0.52 倍と低値を示した。

3. p62KO 細胞と NBR1KO 細胞のメチル水銀による NRF2 活性化

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。そこで、MeHg により活性化する Keap1-Nrf2 シ

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。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、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ところ、WT 細胞において MeHg 処理 8 時間後に核内の Nrf2 量増加が認められた。一方、p62KO 細胞における MeHg による核内の Nrf2 量は WT 細胞と比較して少なかった。NBR1KO 細胞では WT 細胞と比較して増加傾向だった。また、これらの細胞における Nrf2 の標的遺伝子の発現を RT-qPCR 法により評価したところ、WT 細胞における Nrf2 標的遺伝子群、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 発現は、いずれも MeHg の処理により増加したが、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。これらの結果から、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([9], 論文 1)。そこで、p62KO 細胞の Nrf2 を強制的に活性化させると、p62KO 細胞の細胞内水銀量が低下するのではないかと予想し、Nrf2 の活性化剤であるスルホラファンによる p62KO 細胞の細胞内水銀濃度への影響について検証した。その結果、予想どおり、p62KO 細胞にスルホラファンを前処理した群では、MeHg 単独処理群と比べて細胞内水銀量が低下した。

研究項目 (B) p62KO マウスを用いたメチル水銀 (*In vivo* 実験)

1. p62KO マウスにおける p62 発現の欠失

p62KO マウスにおける臓器中の p62 発現を確認するため、p62KO マウス (10 週齢の雄) の大脳、小脳、心臓、肝臓、腎臓を摘出し、各臓器のホモジネートにおける p62 発現をウエスタンブロット法により解析した。野生型マウスにおいて p62 のタンパク質発現は調べたい臓器においても確認できた。大脳、小脳、心臓、および肝臓で高く、腎臓の p62 発現はそれらの臓器より低かった。一方、p62KO マウスではいずれの臓器においても p62 の発現は検出されなかった (Fig. 1)。



Fig. 1 p62KOマウスのp62発現解析
野生型マウスおよびp62KOマウス (10週齢♂) の各臓器におけるp62発現をウエスタンブロット法により検出した。

2. p62KO マウスのメチル水銀反復投与による体重推移

我々はこれまでに、p62KO 細胞は野生型細胞より MeHg に対して脆弱であることをさまざまな培養細胞を用いた *in vitro* 実験により明らかにしてきた。p62 の欠失は個体においても MeHg に対する脆弱性をもたらすのかについて検証するため、p62KO マウス (10 週齢の雄マウス) と同系統 (C57BL/6J) の同週齢の雄マウス (野生型マウス) にメ

チル水銀を反復経口投与し、マウスの体重の推移と生存率を測定した。実験に用いたマウスは野生型マウスと p62KO マウスの体重差が少ない 10 週とした。

また、メチル水銀の投与濃度は、14 日間のメチル水銀反復経口投与により野生型マウスの半数が死亡する濃度 (12.5 mg/kg/day) とした。野生型マウス、p62KO マウス共に、メチル水銀投与開始 2 日後までは、

体重および行動に差異は認められなかったが、投与開始 3 日後に p62KO マウスの体重が減少する個体が出現しはじめた。投与開始 4 日後には p62KO マウスの体重は有意に減少し、投与開始 7 日後では 78.0% (投与開始日の体重と比較した割合) まで体重が減少した。一方、野生型マウスの体重は 7 日後で 94.5% と有意な体重減少は認められなかった (Fig. 2)。

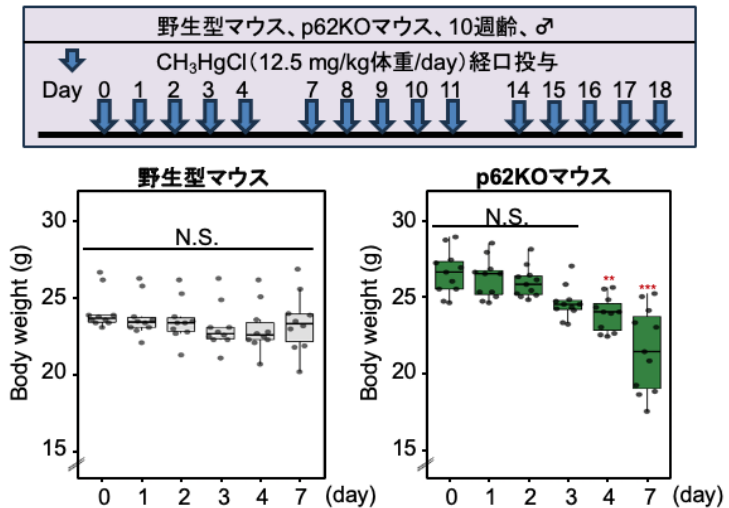


Fig. 2 メチル水銀反復投与後の体重推移

野生型マウスおよびp62KOマウスに12.5 mg/kg/dayで経口投与し、経時的に体重を測定した。**p < 0.01, ***p < 0.001

3. p62KO マウスのメチル水銀感受性

メチル水銀を 12.5 mg/kg/day で反復投与し、野生型マウスと p62KO マウスの生存率を調べた。p62KO マウスは投与開始 9 日後に死亡する個体が出現し、10 日後に約半数が死亡した。一方、野生型マウスは、投与開始 12 日後に死亡個体が出現し、半数死亡日数は 14 日だった (Fig. 3)。

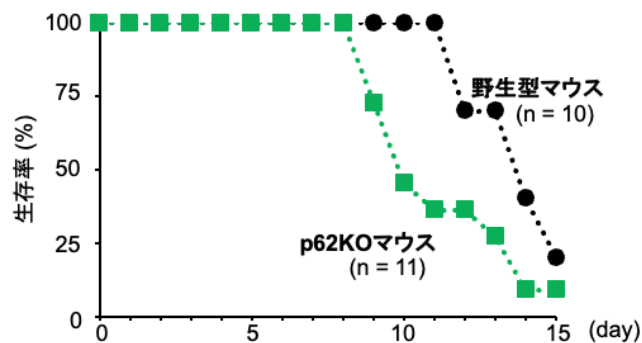


Fig. 3 p62KOマウスにおけるメチル水銀投与による生存率

野生型マウスおよびp62KOマウスに12.5 mg/kg/dayでメチル水銀を経口反復投与し、生存率を評価した。

4. p62KO マウスの体重増加と脂肪肝形成

雄の野生型マウス (10 匹) と p62KO マウス (10 匹) に普通食を与え、体重変化を調べた。p62KO マウスは、15 週齢以降野生型マウスより体重が有意に増加した。特に 20 週齢以降、p62KO マウスの体重増加は著しく、50 週齢の平均体重は野生型マウスの 34.5 g に対して、

p62KO マウスは 47.8 g だった (p62KO マウスの体重は野生型マウスの約 1.4 倍) (Fig. 4)。

この 50 週齢の野生型マウスと p62KO マウスを解剖すると、p62KO マウスの皮下脂肪および内臓脂肪は野生型マウスより顕著に多かった。また、それぞれのマウスから各臓器を摘出し重量を比較すると、p62KO マウスの肝臓重量が野生型マウスより高値だった (野生型マウスの平均肝臓重量が 1452 ± 39 mg、p62KO マウスは 1932 ± 38 mg)。これは野生型マウスの約 1.3 倍の重量に相当する (Fig. 5)。

5. MeHg 投与による p62KO マウスの脂肪肝の増悪

我々は、先行研究において、前駆脂肪細胞株である 3T3-L1 細胞を用いた MeHg の細胞影響解析において、MeHg の曝露が 3T3-L1 細胞の分化を促進させ、細胞内にトリグリセリドを脂肪滴として蓄積させることを明らかにした[10]。そこで、本研究で認められた p62KO マウスの脂肪肝が MeHg の曝露によりどのような影響を受けるのかを検証するため、脂肪肝を呈する 50 週齢の p62KO マウスに MeHg を反復経口投与した。10 mg/kg/day で 4 日連続 MeHg を経口投与し、まず、臓器内の水銀濃度を測定したところ、p62KO マウスの腎臓内水

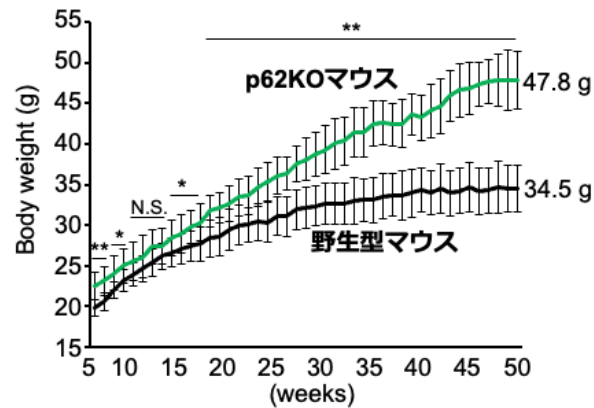


Fig. 4 p62KOマウスの体重推移
野生型マウスおよびp62KOマウスに通常食で飼育し、経時的に体重を測定した。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, N.S., Not Significant

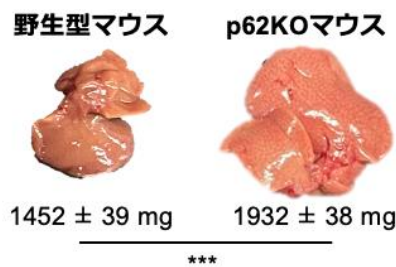


Fig. 5 p62KOマウスの肝臓重量の増加
野生型マウスおよびp62KOマウス (50週齢♂) 肝臓を摘出し、重量を測定した。写真はそれぞれ平均的な肝臓を示した。*** $p < 0.001$

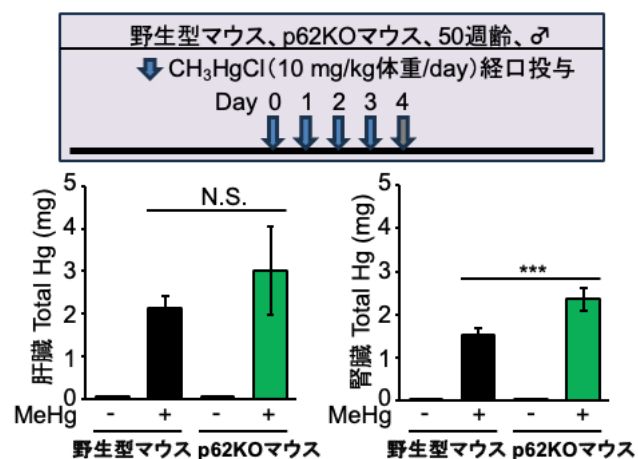


Fig. 6 p62KOマウスにおけるメチル水銀投与後の肝臓と腎臓の水銀濃度
野生型マウスおよびp62KOマウス (50週齢♂) に10 mg/kg/dayでメチル水銀を経口反復投与し、4日後の臓器中水銀濃度を測定した。*** $p < 0.001$, NS: Not Significant

銀濃度は野生型マウスより有意に高かった。また、腎臓内水銀濃度も統計的な有意差は認められないものの、野生型マウスより高い傾向だった (Fig. 6)。

さらに、肝臓組織が MeHg の投与によりどのような影響を受けたかについて、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色により調べた。野生型マウスでは MeHg の投与の有無に関わらず、肝臓組織に異常は認められなかった。一方、p62KO マウスの肝臓はコントロール群においても脂肪滴が多数認められ、脂肪肝を呈していることが明らかとなった。p62KO マウスの MeHg 投与群では、コントロール群より大きい脂肪滴が多数観察された (Fig. 7)。

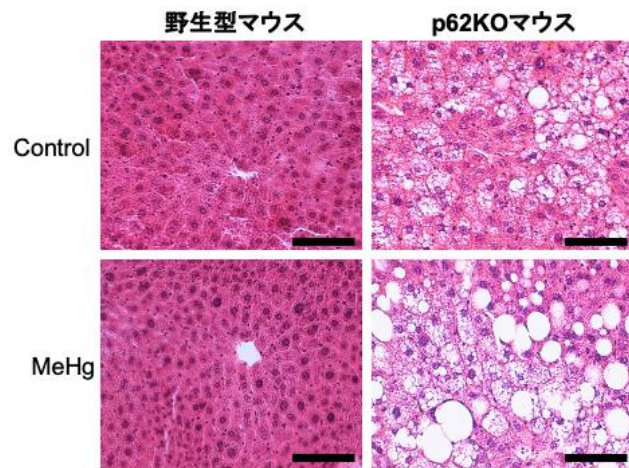


Fig. 7 メチル水銀投与によるp62KOマウスの脂肪肝の増悪
野生型マウスおよびp62KOマウス(50週齢♂)に10 mg/kg/dayでメチル水銀を経口反復投与し、4日後の肝臓を摘出し、HE染色した。
Scale bars = 100 μ m

HE 染色の結果から、p62KO マウスの肝臓において、MeHg 投与により中性脂質 (トリグリセリド) が増加することが予想された。そこで、肝臓のトリグリセリド濃度を測定したところ、野生型マウスではコントロール群と MeHg 投与群に有意差は認められなかったが、p62KO マウスでは MeHg 投与群 (平均値: 479.3 mg/dL) でコントロール群 (平均値: 289.1 mg/dL) よりも有意に増加した。一方、肝臓の総コレステロール濃度については、野生型マウスではコントロール群と MeHg 投与群に有意差は認められなかったが、p62KO マウスでは統計的な有意差はないものの、MeHg 投与群 (平均値: 8.81 mg/dL) でコントロール群 (平均値: 7.25 mg/dL) よりも増加傾向だった。 (Fig. 8)。

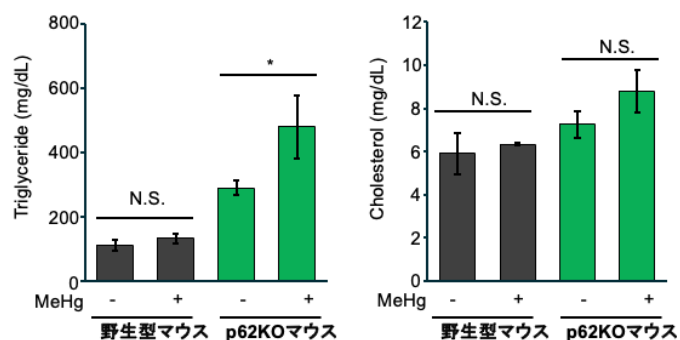


Fig. 8 メチル水銀投与によるp62KOマウスの肝臓トリグリセリド濃度の増加

野生型マウスおよびp62KOマウス(50週齢♂)に10 mg/kg/dayでメチル水銀を経口投与し、4日後の肝臓トリグリセリド濃度およびコレステロール濃度を測定した。* $p < 0.05$, N.S.: Not Significant

IV 考察

前年度までの本研究課題において、MeHg 曝露後の細胞内水銀濃度は、野生型細胞 (HeLa 細胞) より p62KO 細胞で高値を示し、MeHg 曝露に対する感受性が高いことを示した。p62 欠損による MeHg の高感受性は、SH-SY5Y 細胞、MEF 細胞でも同様だった。したがって、p62 は *in vitro* において MeHg 毒性から生体を防御する重要な因子であることが示唆された。しかし、p62 が生体における MeHg 曝露においてどのような機能を持つのか、*in vitro* と同様に MeHg の毒性に対する生体保護機能を発揮するのかについては不明であった。そこで、前年度までに p62KO マウスを作製し、MeHg 単回投与後の臓器内水銀濃度の測定により、p62KO マウスの複数の臓器において野生型マウスより水銀濃度が高いことを示した。本年度は、引き続き p62KO マウスを用いた *in vivo* 解析を進め、p62KO マウスの MeHg 感受性、p62KO マウスの長期飼育による表現系解析、および MeHg 投与による障害組織の病理解析を遂行し、個体における p62 の MeHg の毒性に対する機能を検証した。

p62 は脳や肝臓に発現していることが報告されているが、その他の臓器における発現の報告は少ない。そこで、マウス臓器における p62 発現について抗 p62 抗体を用いたウェスタンブロット法により調べた。その結果、大脳、小脳、心臓、肝臓で発現が認められ、また、腎臓ではそれらの発現と比較して p62 発現は低かった。一方、p62KO マウスの臓器では p62 のシグナルは消失しており、全身性の p62 の消失が確認できた (Fig. 1)。

前年度までの本研究課題の解析から、p62KO 細胞は野生型細胞より MeHg に対する感受性が高いことから、p62KO マウスの MeHg 高感受性が推察された。そこで、野生型マウスと体重差の少ない 10 週齢の p62KO マウスを用いて、MeHg に対する感受性を検証した。その結果、予想どおり、MeHg 反復投与による p62KO マウスの体重減少は野生型マウスより著しく (Fig. 2)、生存日数も短かった (Fig. 3)。以上、p62KO は *in vitro* 実験および *in vivo* 実験においても MeHg に対する感受性を増加させることが示された。したがって、p62 は MeHg に対する生体防御因子であることが強く示唆された。

p62KO マウスは、正常に出生し、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。その後も特に目立った表現系は認められず、15 週齢までは野生型マウスとほとんど見分けがつかない。しかし、15 週齢以降、野生型マウスより体重が増加しはじめ、20 週齢以降では著しい体重の増加が認められた (Fig. 4)。p62KO マウスはいくつかの研究グループにおいて作製され、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[11–13]。p62KO は食欲抑制ホルモンであるレプチンの発現を低下させ、過食によって肥満が引き起こされる可能性が報告されているが、その分子メカニズムはまだ解明されていない。また、p62KO は肥満に伴い脂肪肝を呈する (Fig. 5)。我々は、前駆脂肪細胞である 3T3-L1 を用いた先行研究において、MeHg の曝露が脂肪細胞の分化を促進し、その結果、細胞内の脂肪滴の増加、トリグリセリドの高蓄積となることを示した [10]。そこで、MeHg の曝露は脂肪肝に何らかの影響をもたらすのではないかと予想し、50 週齢の肥満マウスに MeHg を投与した結果、肝臓、腎臓の水銀濃度が野生型マウスより高く (Fig.

6)、脂肪肝の悪化が観察された (Fig. 7)。さらに、p62KO マウスの肝臓内のトリグリセリド濃度は MeHg の曝露により有意に増加した (Fig. 8)。この結果は、MeHg の曝露による 3T3-L1 のトリグリセリド蓄積量の増加を支持する結果であった。

V 結論

「平成 31 年～令和 3 年度 水俣病に関する総合的研究」の助成において、メチル水銀毒性に対するオートファジー細胞防御機能に加えて、p62 の結合分子 NEDD4 の同定とプロテアソームの MeHg 毒性軽減作用を明らかにした。これらの知見を基盤に遂行した本研究課題の p62KO 細胞を用いた *in vitro* 解析から、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 点において重要な機能を果たすことが明らかになった。一方、p62KO マウスを用いた *in vivo* 実験により、p62 が臓器内水銀濃度を低下させること、p62 が個体における MeHg の毒性を緩和することが明らかとなった。さらに、MeHg が脂肪肝を悪化させることを新たに見出し、MeHg の潜在的な毒性であると推察された。

本研究により、p62 は MeHg に対する生体防御因子であることが細胞および個体レベルにおいて明らかになり、p62KO 細胞・マウスは MeHg に高感受性を示すモデル系であると示唆することができた。したがって、今後これらのモデル系を用いることによって、これまで明らかにすることが困難であった MeHg の潜在的な毒性を明らかにすることができる有益なツールとなると考えられる。

VI 今後の課題

本研究課題において p62KO マウスの樹立および MeHg に対する感受性を明らかにすることができた。しかし、この MeHg に対する防御機能が減弱した p62KO マウスを用いた解析は十分ではなく、妊娠マウスへの MeHg 投与による胎児への影響や出生後仔マウスがどのような影響を受けるのか、MeHg に対する防御系が減弱した個体を調べる必要がある。また、MeHg により p62KO マウスの脳内でどのような悪影響がもたらされるのか、についても検証する必要がある。さらに、MeHg による脂肪肝の増悪化に関する新しい知見から、MeHg による脂質代謝への影響という生活習慣の中で曝露される MeHg の潜在的な毒性という新たな展開につながる可能性を見出した。今後、非アルコール性脂肪性肝疾患 (Nonalcoholic fatty liver disease: NAFLD) モデル細胞を用いた *in vitro* の実験系を立ち上げ、MeHg による NAFLD への影響について *in vitro/vivo* 実験系に向けた準備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】

論文 1)

The predominant role of p62/SQSTM1 over NBR1 in methylmercury-induced cytotoxicity and

cellular defense. 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 **Biochem. Biophys. Res. Commun., 2025** に発表した。

論文 2)

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。

論文 3)

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。

論文 4)

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】

学会発表 1)

「オートファジーレセプターp62 欠損マウスのメチル水銀感受性の解析」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「メタルバイオサイエンス研究会 2024: ポスター」にて発表した。

学会発表 2)

「メチル水銀に対するオートファジーレセプターp62 と NBR1 の機能的差異に関する検証」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「日本薬学会第144年会 (2024) : ポスター」にて発表した。

学会発表 3)

「p38MAPK 阻害剤は SH-SY5Y 細胞におけるメチル水銀毒性を緩和する」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 2023 衛生薬学・環境トキシコロジー: ポスター」にて発表した。

学会発表 4)

「オートファジーレセプターp62 によるメチル水銀毒性の制御」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「メタルバイオサイエンス研究会 2022: シンポジウム」にて発表した。

学会発表 5)

「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] Y. Takanezawa, R. Nakamura, Y. Sone, S. Uraguchi, M. Kiyono, Atg5-dependent autophagy plays a protective role against methylmercury-induced cytotoxicity, *Toxicology Letters* 262 (2016) 135–141.
- [2] Y. Takanezawa, R. Nakamura, R. Harada, Y. Sone, S. Uraguchi, M. Kiyono, Sequestosome1/p62 protects mouse embryonic fibroblasts against low-dose methylmercury-induced cytotoxicity and is involved in clearance of ubiquitinated proteins, *Scientific Reports* 7 (2017) 1–11.
- [3] Y. Takanezawa, R. Nakamura, T. Sugimoto, Y. Ohshiro, S. Uraguchi, M. Kiyono, p62/sequestosome 1 attenuates methylmercury-induced endoplasmic reticulum stress in mouse embryonic fibroblasts, *Toxicology Letters* 353 (2021) 93–99.
- [4] Y. Takanezawa, R. Harada, Y. Shibagaki, Y. Kashiwano, R. Nakamura, Y. Ohshiro, S. Uraguchi, M. Kiyono, Protective function of the SQSTM1/p62-NEDD4 complex against methylmercury toxicity, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 609 (2022) 134–140.
- [5] Y. Takanezawa, K. Sakai, R. Nakamura, Y. Ohshiro, S. Uraguchi, M. Kiyono, Inhibition of p38 Mitogen-Activated Protein Kinases Attenuates Methylmercury Toxicity in SH-SY5Y Neuroblastoma Cells, *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 46 (2023) 1203–1210.
- [6] Y. Takanezawa, R. Nakamura, Y. Ohshiro, S. Uraguchi, M. Kiyono, Proteasome and p62/SQSTM1 are involved in methylmercury toxicity mitigation in mouse embryonic fibroblast cells, *The Journal of Toxicological Sciences* 48 (2023) 355–361.
- [7] N. Auger, O. Kofman, T. Kosatsky, B. Armstrong, Low-level methylmercury exposure as a risk factor for neurologic abnormalities in adults, *Neurotoxicology* 26 (2005) 149–157.
- [8] M. Ono, M. Komatsu, B. Ji, Y. Takado, M. Shimojo, T. Minamihisamatsu, E. Warabi, T. Yanagawa, G. Matsumoto, I. Aoki, Central role for p62/SQSTM1 in the elimination of toxic tau species in a mouse model of tauopathy, *Aging Cell* 21 (2022) e13615.
- [9] Y. Takanezawa, K. Sakai, R. Nakamura, Y. Ohshiro, S. Uraguchi, M. Kiyono, The predominant role of p62/SQSTM1 over NBR1 in methylmercury-induced cytotoxicity and cellular defense, *Biochemical and Biophysical Research Communications* (2025) 151461.
- [10] Y. Takanezawa, Y. Kashiwano, R. Nakamura, Y. Ohshiro, S. Uraguchi, M. Kiyono, Methylmercury drives lipid droplet formation and adipokine expression during the late stages of adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells, *Toxicology* (2023) 153446.

- [11] A. Rodriguez, A. Durán, M. Selloum, M.-F. Champy, F.J. Diez-Guerra, J.M. Flores, M. Serrano, J. Auwerx, M.T. Diaz-Meco, J. Moscat, Mature-onset obesity and insulin resistance in mice deficient in the signaling adapter p62, *Cell Metabolism* 3 (2006) 211–222.
- [12] R. Sugimoto, E. Warabi, S. Katayanagi, S. Sakai, J. Uwayama, T. Yanagawa, A. Watanabe, H. Harada, K. Kitamura, N. Noguchi, H. Yoshida, R.C.M. Siow, G.E. Mann, T. Ishii, Enhanced neointimal hyperplasia and carotid artery remodelling in sequestosome 1 deficient mice, *J Cellular Molecular Medi* 14 (2010) 1546–1554. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2009.00914.x>.
- [13] H. Harada, E. Warabi, T. Matsuki, T. Yanagawa, K. Okada, J. Uwayama, A. Ikeda, K. Nakaso, K. Kirii, N. Noguchi, Deficiency of p62/Sequestosome 1 causes hyperphagia due to leptin resistance in the brain, *Journal of Neuroscience* 33 (2013) 14767–14777.

英文要約 (Abstract)

Our research indicated that p62 is essential for the proteolysis of ubiquitinated proteins, playing a protective role against methylmercury (MeHg) toxicity. Additionally, p62 knockout (p62KO) cells showed higher intracellular mercury levels compared to wild-type cells after MeHg exposure. These findings suggest that elucidating the mechanism by which p62 modulates intracellular MeHg levels could enhance our understanding of MeHg toxicity and its mitigation. 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 p62KO mice. Findings from our *in vitro* and *in vivo* analyses in this study imply that p62 plays a role in the mechanism that facilitates the elimination of mercury from cells and organs, functioning as a protective agent against MeHg toxicity in cellular and biological systems.