

## メチル水銀結合標的分子の新規解析法開発による診断マーカーの探索

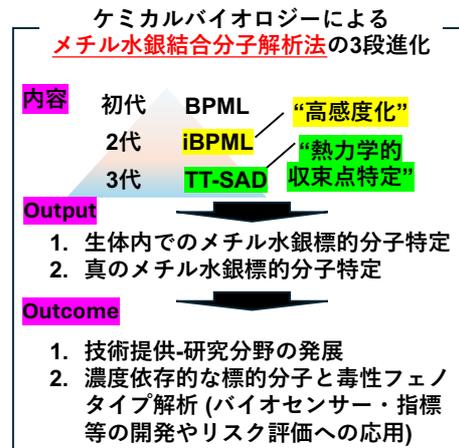
主任研究者 外山 喬士  
東北大学大学院 薬学研究科 講師

### 研究要旨

本研究では、タンパク質中のシステイン残基に共有結合するメチル水銀の高感度検出法を開発、さらに熱力学的に安定な標的分子の特定方を開発することで、メチル水銀が安定に付加体を形成する標的分子特定を目指す。これにより、診断マーカーの特定を目指すとともに、毒性標的分子の探索まで目指す。本年度ではメチル水銀結合の高感度検出法“第2世代 iBPML”を確立し、これによってマウス脳内および血漿中の新規標的分子の検出まで成功した。

### I 研究目的

親電子物質であるメチル水銀は、生体内でタンパク質のシステイン残基等と共有結合することで、その分子機能攪乱を介して毒性を発揮すると考えられる。しかし、これまでの本領域の成果発表からも明白であるように、メチル水銀結合タンパク質の解析法は限られており、中でも申請者が開発した初代 BPML 法は感度が悪く(引用文献1)、実際の毒性発現条件における分子標的の特定が難しい。今回申請者は本問題点を克服した高感度の第2世代 BPML; inverse-BPML (iBPML)法を開発するだけでなく、可逆的な付加体を形成するメチル水銀の熱力学的に安定な収束点を解明する、第3世代 Terse Thermodynamic-Stable Adduct Detection 法 (TT-SAD) の開発を目指す(右図)。



### II 材料と方法

1. 材料：マウスは日本クレア社より購入した6週齢雄性C57BL6を用いた。Biotin-PEAC5-maleimide (BPM) はDojindoより購入した。
2. iBPML：サンプル(40 μg protein)に0.25% SDSを加えインキュベートした(37°C、30 min)のち、NEM(1mM)でブロッキング反応を行った(37°C、30 min)。さらに、GSH(1.5mM)を加え37°C、30 minインキュベートすることで、メチル水銀を求核置換反応させたのち、BPM(30 μM)を加え反応させた(37°C、30 min)。その後、メタノールおよびクロロホルムを加え、遠心し(20000 g, 4°C, 10 min)、上清を除去した。沈殿物をメタノールで洗浄し、未反応のBPMを除去した。得られた残渣に1xSample butterを加え95°Cで

5分間加熱することで溶解させた。溶出液 20 μL を SDS-PAGE で分離し、Avidin-HRP により検出した。

(倫理面への配慮)

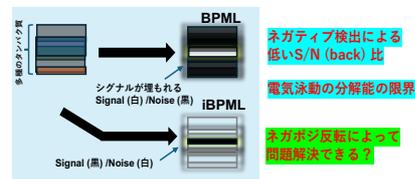
本研究の動物実験計画は、東北大学動物・遺伝子実験支援センターの審査を経て 2020 薬動-014-04 の承認番号の元実施した。

### III 研究結果

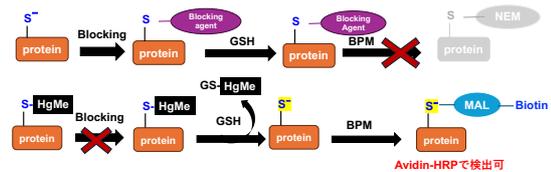
#### 1. inverse-BPML (iBPML 法) の確立

これまでの BPML 法が低感度かつ分解能が低い理由として、ネガティブ検出による高いバックグラウンドの問題や電気泳動による分解能の限界でシグナルが重なってしまい、微弱なシグナル減少を捉えられないという問題が考えられる (右図上段)。

そのため特に細胞ライセート等の様々なタンパク質が混在する夾雑サンプルから、親電子性物質標的分子の特定は難しい。一方で親電子物質の結合をポジティブシグナルで検出することができるようになれば、増感するとそれに伴い S/N 比も増大する。そこで、inverse-BPML 法の発案に至った (右図下段)。



すなわち、1. フリーチオール基への修飾をブロッキング剤により阻害する。2. その後 GSH の添加によりメチル水銀付加体を解除し、3. その部分に BPM が結合することでもともとメチル水銀が付加していたチオール基が BPM によって修飾を受け、4. S-水銀化をバンドの増加により検出できる。我々はこの手法を inverse-BPML (iBPML) と名付けた。

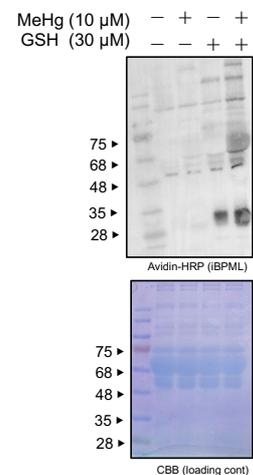


すなわち、1. フリーチオール基への修飾をブ

ロッキング剤により阻害する。2. その後 GSH の添加によりメチル水銀付加体を解除し、3. その部分に BPM が結合することでもともとメチル水銀が付加していたチオール基が BPM によって修飾を受け、4. S-水銀化をバンドの増加により検出できる。我々はこの手法を inverse-BPML (iBPML) と名付けた。

システイン残基のチオール基とマイケル付加反応を起こしチオール特異的な修飾をおこす N-エチルマレイミド (NEM) と、システインのチオール基と置換反応をおこし不可逆的にチオール基を修飾するヨードアセトアミド (IAA) をブロッキング剤の候補として用いた。それらのブロッキング能を調べたところ、IAA ではバンド強度に変化が見られなかった一方で、NEM では濃度依存的な BPM のバンド減少がみられたことから NEM が血漿サンプル中におけるフリーチオール基の修飾能が高いことが示され、以降 NEM を採用することとした。

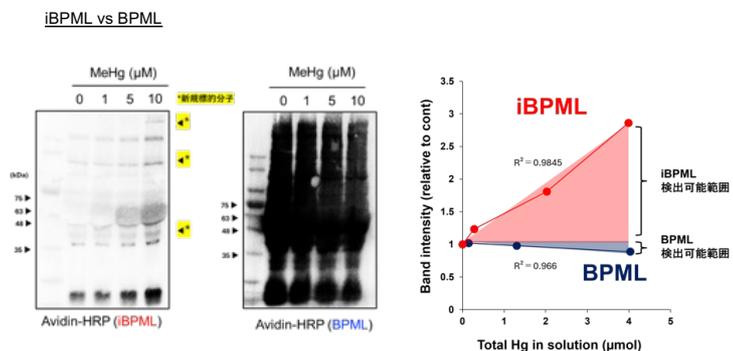
次に、S-水銀化を還元型グルタチオン (GSH) で可逆的に取り外してビオチンマレイミドに置き換える “ビオチンスイッチ” のステップが血漿サンプルで可能であるかを検討したところ、GSH 添加群でバンド強度の顕著な増加が見られ、GSH 濃度依存的の S-水銀化が解除されることが確認できた (右図)。以上より、iBPML の条件確認とコンセプトの立証がなされた。



## 2. iBPMLによるメチル水銀標的タンパク質の検出 (ヒト血漿)

前項の結果を踏まえてプロトコルを最適化し、ヒト血漿にメチル水銀を添加したサンプルでiBPMLを行った。その結果、メチル水銀濃度依存的なバンド強度の増加が確認できた。同様の結果は、マウス血漿を用いた場合でも確認できた。なおここで用いた血漿とは、ヒト血漿は市販されているもの、マウス血漿は野生型マウスの心血を採取し血漿化したものを用いている。

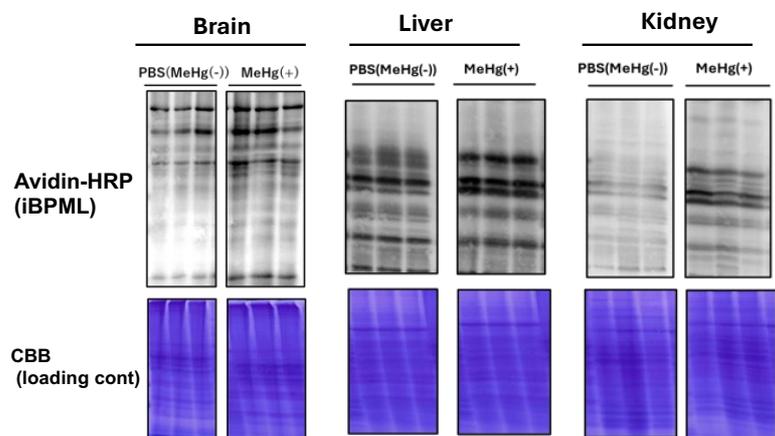
メチル水銀を添加したヒト血漿において原子吸光法によるサンプル中水銀の実測値とバンド強度の増加を比較して感度を定量化したところ、iBPMLでは1 μMのMeHg(試料中総水銀量 1.1 ng)から検出が可能であり、かつシグナルの直線性(相対定量性)が認められた。全体のバンド強度(35 kDa以上の)を定量し、原子吸光法のデータと合わせて解析したところiBPMLとBPMLの感度差は約23倍であり、iBPMLがBPMLよりも高感度な検出系であることが示された(右図)。加えてiBPMLではBPMLで検出した際にはバックグラウンドに埋もれていたシグナル(未同定のS-水銀化標的)も新たに検出され、新規メチル水銀標的タンパク質の検出に成功したと考えられる。



## 3. iBPMLによるメチル水銀標的タンパク質の検出 (メチル水銀投与マウス脳)

我々の先行研究では、25 mg/kgメチル水銀をマウスに投与したところ大脳および小脳において5日後にメチル水銀蓄積量がピークに達した(引用文献2)。そこで、塩化メチル水銀中のメチル水銀量として25 mg/kgをマウスに皮下投与し、5日後に脳およびメチル水銀の蓄積が顕著な臓器である

肝臓と腎臓を摘出してサンプル化しiBPMLを行った。その結果、メチル水銀投与の条件ではコントロール群と比較してシグナルの増加が見られた(右図。プロットが分かれているが、これらは同一メンブレンで同一現像条件である)



#### IV 考察

本研究では高感度なメチル水銀結合分子解析法である iBPML の確立に成功した。また、本方法を用いることで、メチル水銀投与マウス脳内における結合標的の検出に成功した。今後、このような標的分子の同定と結合影響解析から、メチル水銀の網羅的アダクトーム解析が可能になるとともに、診断マーカーの探索や毒性発現機構にアプローチが可能となった。

今回、メチル水銀結合解除に GSH を用いたが、一方、GSH の代わりに DTT や TCEP-HCl でメチル水銀取り外し反応を検討した際には、GSH よりもバックグラウンドも高くなった(データ不掲載)。これらの還元力は GSH よりも高く、タンパク質内部のジスルフィド結合まで切断する作用を示したからであると考えられる。このため、ビオチンスイッチのための BPM の反応時にジスルフィド還元から生成したフリーチオールが BPM ラベル化されてしまい、非特異的検出の増加に繋がったのだろう。そのため、より分子が小さい低還元力の求核剤によって、現在よりも非特異的バンドの抑制が期待できるため、今後検討したい。

#### V 結論

1. メチル水銀結合を従来の BPML の 23 倍高感度で検出する iBPML を開発した
2. iBPML 解析からヒト血漿でメチル水銀標的タンパク質を検出した (マーカー候補)
3. メチル水銀投与マウスの iBPML 解析から標的タンパク質を検出した (毒性標的候補)

#### VI 今後の課題

1. iBPML のバックグラウンド低減とメチル水銀標的タンパク質の網羅的解析
2. 第三世代 "TT-SAD" の開発

本研究に関する現在までの研究状況、業績

- 1) フォーラム 2024 衛生薬学・環境トキシコロジー「可逆的付加体の高感度検出法“inverse-BPML”の開発」 牧野 玲子, 外山 喬士, 斎藤 芳郎. 【実行委員長賞】
- 2) メタルバイオサイエンス研究会 2024 「メチル水銀付加体の高感度検出法の開発と応用」 牧野 玲子, 外山 喬士, 斎藤 芳郎. 【学生ポスター賞】

#### 引用文献

- 1) A convenient method to assess chemical modification of protein thiols by electrophilic metals. Takashi Toyama, Yasuhiro Shinkai, Toshiyuki Kaji, Yoshito Kumagai. *Journal of Toxicological Sciences*, 38(3) 477-484, 2013 年
- 2) Methylmercury induces the expression of TNF- $\alpha$  selectively in the brain of mice. Miyuki Iwai-Shimada, Tsutomu Takahashi, Min-Seouk Kim, Mastake Fujimura, Hitoyasu Ito, Takashi Toyama, Akira Naganuma, Gi-Wook Hwang. *Scientific Reports*, 6 38294, 2016 年.

## 英文要約 (Abstract)

Methylmercury is an electrophilic substance that exerts toxicity by covalently binding to protein cysteine residues, thereby disrupting molecular functions. However, previous methods for analyzing methylmercury-binding proteins have shown limitations in sensitivity. The first-generation BPML method had poor sensitivity, making it difficult to identify molecular targets under actual conditions. To overcome this limitation, the study aimed to develop a second-generation high-sensitivity detection method, inverse-BPML (iBPML), and a third-generation detection method called TT-SAD (Terse Thermodynamic-Stable Adduct Detection) to identify thermodynamically stable adducts formed by reversible methylmercury binding.

The low sensitivity and poor resolution of the original BPML method were attributed to high background noise and signal overlap during electrophoresis. The detection relied on a negative signal, making it challenging to identify electrophilic substance target molecules in complex samples like cell lysates. The iBPML method was developed to address these issues. The approach involves blocking free thiol groups, releasing methylmercury adducts with GSH, and labeling the newly exposed thiol groups with BPM, resulting in positive detection of S-mercuration. Blocking agents NEM and IAA were tested. NEM showed dose-dependent inhibition of BPM band intensity, demonstrating higher free thiol-blocking efficiency in plasma samples. Therefore, NEM was selected for further studies. The biotin switch step using GSH successfully reversed S-mercuration and allowed BPM labeling in plasma samples. Band intensity increased with GSH concentration, confirming the release of S-mercuration.

The iBPML protocol was optimized for human plasma samples with methylmercury. Band intensity increased in a methylmercury concentration-dependent manner. Similar results were obtained with mouse plasma samples. Commercially available human plasma and plasma from wild-type mice were used. Sensitivity assessment with atomic absorption spectroscopy showed that iBPML detected 1  $\mu\text{M}$  methylmercury (1.1 ng total mercury) with linear signal intensity. The iBPML sensitivity was approximately 23 times higher than the BPML method. Newly detected signals, previously obscured by background noise in BPML, indicated the detection of novel methylmercury target proteins. Prior research indicated that methylmercury accumulates in the cerebrum and cerebellum of mice 5 days after administration (25 mg/kg). Mice were subcutaneously administered methylmercury chloride (25 mg/kg), and the brain, liver, and kidneys were collected 5 days later for iBPML analysis. Signal intensity increased in the methylmercury-treated group compared to the control group, indicating the detection of methylmercury-bound target proteins in the brain.

Taken together, the iBPML method was successfully established as a high-sensitivity detection technique for methylmercury-binding molecules. Using this method, target molecules were detected in the brains of methylmercury-exposed mice. This approach facilitates comprehensive adductome analysis and the exploration of diagnostic markers and toxicological mechanisms.