

## 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

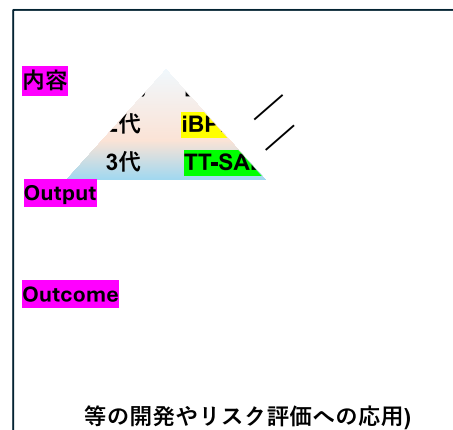
主任研究者 外山 喬士  
東北大学大学院 薬学研究科 准教授

### 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; 右図)、実際の毒性発現条件における分子標的の特定が難しい。今回申請者はシグナルを逆転させることで本問題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C57BL/6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1x Sample buffer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

$\mu$ LをSDS-PAGEで分離し、Avidin-HRPにより検出した。

3. TT-SAD:血漿サンプル (150  $\mu$ g protein) に表記濃度の塩化メチル水銀を添加し 37°C、30 min 反応させた。その後、1.5 mM GSH を添加して熱力学的平衡状態を模倣し、偽標的からメチル水銀を転移除去した後、0.25%SDS 存在下で IAA 10 mM と反応させてブロッキングを行った (37°C、30 min)。メタノールクロホルム沈殿による脱塩後、GSH 2 mM を加え残留標的からメチル水銀を置換除去し、BPM (30  $\mu$ M) を添加してビオチンラベル化を実施した。

(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) を用いたメチル水銀投与マウス脳内におけるメチル水銀の in vivo アダクトーム解析

昨年度までの検討から、メチル水銀をビオチンスイッチさせて検出する高感度なメチル水銀検出法 iBPML の確立に成功し、メチル水銀投与マウスの血漿において標的タンパク質の可視化を達成した。

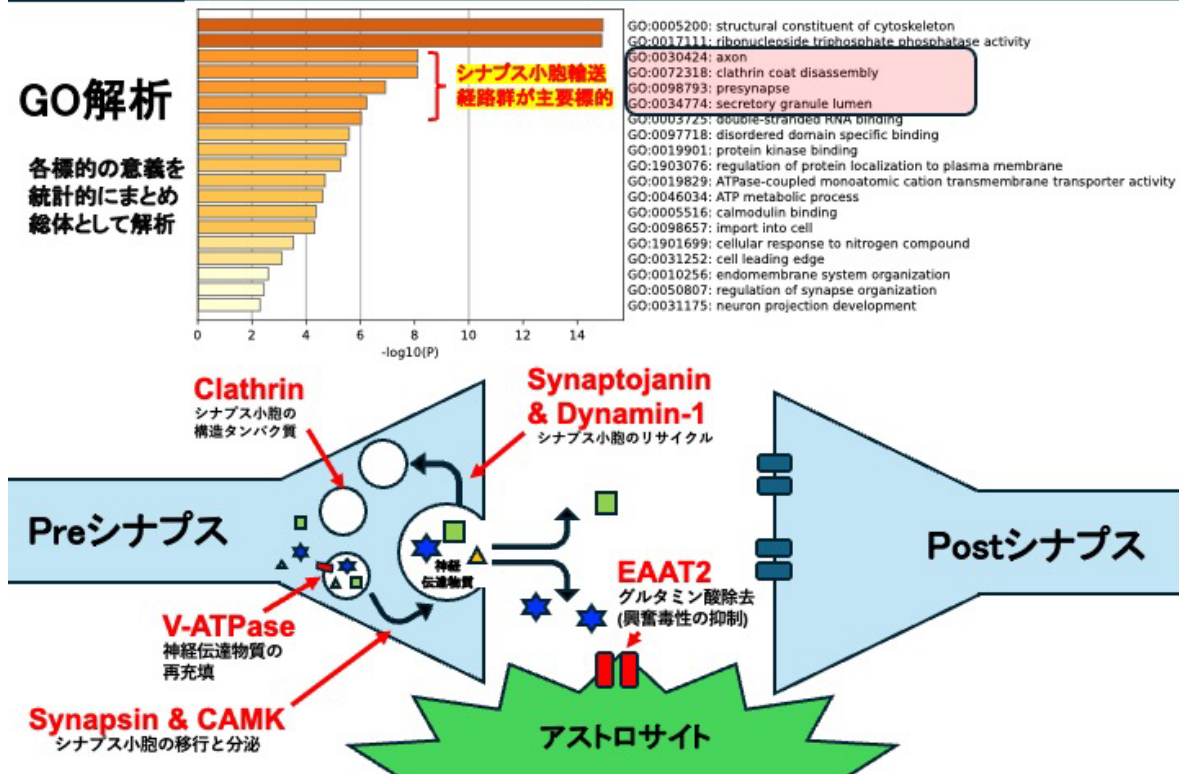
そこで本年度では、メチル水銀投与マウスの脳サンプルに対して iBPML を実施するとともに、iBPML の過程でメチル水銀結合をビオチン標識に変えたタンパク質をアビジンビーズでプルダウン (iBPMP)

し、プロテオミクスによる標的タンパク質特定を目指した。まず、脳サンプルの iBPML によって、50 mg/kg を単回皮下投与し 2 日間通常飼育したマウスの脳サンプルにおいて、新しいバンドが認められた。これをアビジンビーズによって単離し (iBPMP)、ビーズからの溶出物を SDS-PAGE した結果、CBB 染色レベルではっきりとしたバンドが検出された (上図)。特に 60 kDa 以上のタンパク質は Control でバックグラウンドが低く、非特異的な標的が無いことが期待されたため、それらをゲル内トリプシン消化して LC/MS/MS によるプロテオミクスに供した。その結果、29 の標的タンパク質が同定され、GAPDH、Actin、Tubulin、プロトンポンプのような、既知のメチル水銀標的分子を含んでいた (次ページ図)。新規に同定されたタンパク質群に対して Gene-ontology (GO) 解析を実施した。その結果、メチル水銀は細胞体および神経分泌小胞の構造タンパク質、および神経小胞分泌関連タンパク質を中心として結合することが示された。

これまで、メチル水銀によって神経分泌が阻害されること、および神経細胞のグルタミン酸興奮毒性が惹起されることが知られる。そのため今回特定したタンパク質解析から得られた結果から予期される新規性は低いものの、開発したアッセイ系としては信頼性が高いことが裏付けられる。本結果は、メチル水銀がどのような標的に結合して神経小胞分泌を阻害するか、といった未解明な分子機構を説明し、高解像度でメチル水銀毒性発現機構を理解することに貢献する成果であり、本点において一定の新規性があるだろう。しかしながら、本課題であるマーカー探索という主旨

的から逸脱してしまうため、次年度では最低限、細胞レベルで再構成系の構築が容易であると考えられる EAAT2 に対し、メチル水銀が阻害作用を示すか、そして、活性に責任を担う Cys 残基の特定について進め、論文化をすることで研究の完結を目指す。

## メチル水銀の *in vivo* アダクトーム解析 (脳) の解釈



## 2. TT-SAD によるメチル水銀の熱力学的収束点の検出 (ヒト血漿)

TT-SAD は、GSH によって外れるメチル水銀の結合を除外し、標的タンパク質に残留し続けて求核置換反応に耐性を示すメチル水銀の結合標的を特定する方法である (右図)。条件検討の結果、NEM でのブロッキングが複数の実験ステップで外れ (レトロマイケル反応であると予想される)、バックグラウンドの増加に繋がることが示された。

そこで、ヨードアセトアミド (IAA) をブロッキング剤として用い、検証を行った。ヒト血漿に対して、BPML、iBPML および TT-SAD を実施した結果、BPML (次ページ図; 右端) に対して感度と解像度が大幅に改善し

た iBPML (次ページ図; 中央)で、アルブミンに対するメチル水銀の結合が主要に認められた。

一方、TT-SAD が示すように GSH 添加によってアルブミンのメチル水銀はほとんど解除され (右図;左端)、25 kDa 付近に結合が残り続けるタンパク質が認められた。現在、本タンパク質に対してプロテオミクスを実施中であり、次年度には、本タンパク質の特定、機能解析、そして、マーカーとしての有用性について検討を続ける。

#### 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。本年度では、メチル水銀の網羅的アダクトーム解析を実施し、これまでメチル水銀毒性の表現型として知られる神経分泌阻害、そしてグルタミン酸興奮毒性に関わる分子がメチル水銀の標的となることが新たに明らかとなった。また、TT-SAD の条件検討と確立を達成し、ヒト血漿においてメチル水銀が残留し続ける標的分子の検出に成功した。

TT-SAD をメチル水銀投与マウス脳に適用した結果、高いバックグラウンドによりシグナルが得られなかった。血漿とは異なり、高い GSH で解除されるジスルフィド結合が多くこのような結果になったと考えられ、ジスルフィド結合を解除しない GSH 処理条件を検証する。今後 TT-SAD を脳組織解析に展開し、メチル水銀による毒性発現機構の解明として検討をしたい。

水俣病を示すマーカーの探索としては、一部のタンパク質が GSH による求核置換耐性を示した。現在 *in vitro* での高濃度メチル水銀処理条件であることが限界点となっている。そこで、濃度を低下させるとともにメチル水銀投与マウス血漿に対して TT-SAD を行い、*in vivo* に適用できることを示すことで、アッセイとしての信頼性が増すと考えられる。

#### 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. TT-SAD 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 を応用したアダクトーム解析からメチル水銀の神経障害機構を説明する分子標的の網羅的検出に成功した。

#### VI 今後の課題

1. 血漿中においてメチル水銀が安定的に残留する標的分子の特定
2. 特定した標的分子の機能解析 (水銀測定に頼らず生化学的アッセイによってメチル水銀曝露の評価可能性、感度、残留性)
3. 毛髪水銀量等、他の曝露マーカーとの比較、有用性と限界点の整理

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

英文要約 (Abstract)

Methylmercury (MeHg) is an electrophilic toxicant that exerts its neurotoxicity through covalent binding to protein cysteine residues, thereby disrupting protein function. However, comprehensive identification of MeHg-binding target proteins under biologically relevant conditions has been hampered by the limited sensitivity of existing analytical methods. In this study, we established a highly sensitive second-generation detection method, inverse-BPML (iBPML), and developed a novel approach termed TT-SAD (Terse Thermodynamic-Stable Adduct Detection) to identify thermodynamically stable MeHg-protein adducts.

The iBPML method converts MeHg-bound cysteine residues into positively detectable biotin-labeled thiols via glutathione-mediated nucleophilic substitution, enabling sensitive visualization of S-mercuration. This method demonstrated approximately 23-fold higher sensitivity than the original BPML. Application of iBPML to brains of mice subcutaneously administered methylmercury chloride (50 mg/kg) enabled *in vivo* adductome analysis. Avidin pull-down combined with LC-MS/MS identified 29 MeHg-binding proteins, including known targets such as GAPDH, actin, tubulin, and proton pump-related proteins. Gene ontology analysis revealed preferential targeting of proteins associated with neuronal cell bodies and synaptic vesicle secretion, supporting mechanistic links between MeHg exposure and impaired neurotransmission and excitotoxicity.

To identify stable MeHg-binding proteins resistant to glutathione-mediated exchange, we optimized TT-SAD using iodoacetamide (IAA) as a blocking reagent to reduce background derived from reversible thiol reactions. In human plasma, albumin-bound MeHg was largely removed by glutathione treatment, whereas a ~25 kDa protein retained MeHg binding, suggesting the presence of thermodynamically stable adducts and a potential biomarker candidate. Proteomic identification of this protein is currently underway.

Collectively, iBPML enables high-resolution *in vivo* MeHg adductome analysis, while TT-SAD provides a strategy to detect stable MeHg-binding proteins that may serve as diagnostic markers. These methodologies advance our understanding of MeHg toxicodynamics and offer a foundation for biomarker discovery in methylmercury exposure.