

氏名（本籍）	吉田 映子（山梨県）		
学位の種類	博士（医学）		
学位記番号	博甲第 7021 号		
学位授与年月	平成26年 3月25日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
審査研究科	人間総合科学研究科		
学位論文題目	環境中親電子物質メチル水銀の不活性化を制御する細胞 内含硫低分子の実態解明		
主査	筑波大学教授	博士（医学）	土屋 尚之
副査	筑波大学教授	医学博士	青沼 和隆
副査	筑波大学講師	博士（理学）	小林 麻己人
副査	筑波大学講師	博士（農学）	蕨 栄治

論文の内容の要旨

(目的)

環境中にユビキタスに存在する親電子物質であるメチル水銀(MeHg)に対する生体防御・応答の分子機構には未だ不明の点が多い。吉田氏は、本研究において、MeHg と高い反応性を有するグルタチオン(GSH)や生体内で産生される硫化水素(H₂S)/HS 様活性イオウ分子(reactive sulfur species, RSS)など、イオウを構成元素にもつ求核物質を利用した生体防御機構の解明を目的に研究を行った。

これまで、生体内に侵入した MeHg は、GSH 抱合され、MeHg-SG となることで親電子性を消失し、解毒されると考えられてきた。一方、MeHg-SG と SH 基を有するタンパク質や低分子化合物との間でも、容易に転移反応 (S-トランス水銀化) が起こると想定されていたが、細胞レベルでこれを明らかにした報告は見られなかった。吉田氏は、第一の目的として、親電子物質感知・応答システムである Keap1/Nrf2 系をモデルとして、この点の解明を試みた。

吉田氏は次に、GSH 抱合以外の毒性防御機構として、RSS を利用した未知の毒性防御機構の存在を、細胞・個体レベルで検証した。RSS は主に cysteine や GSH のように、低分子化合物に結合した形で存在するが、一部はタンパク質に結合している可能性が考えられる。吉田氏はさらに、RSS を結合した未知のタンパク質(PRSS)の同定を試みた。

(対象と方法)

MeHg-SGによる S-トランス水銀化の検討においては、ヒト神経芽細胞腫由来SH-SY5Y細胞を、

MeHg、および、細胞膜透過性を高めるために MeHg-SG をエステル化して合成した MeHg-SGEt に 24 時間曝露し、細胞生存率および細胞内タンパク質の S-トランス水銀化、その結果としての Nrf2 による転写活性化について検討した。

RSS を利用した毒性防御機構の検証においては、MeHg と NaHS、Na₂S₄ との化学反応による (MeHg)₂S の生成を解析した。また、MeHg(20μM)を 1 時間曝露した SH-SY5Y 細胞および 0.04 mmol/kg を 8 日間皮下投与したラット肝臓中から疎水性水銀画分を抽出し、HPLC-AAS (高速液体クロマトグラフィー原子吸光法)解析により (MeHg)₂S を同定した。次に、MeHg および (MeHg)₂S の毒性の比較を細胞レベルで行うとともに、C57BL/6J マウスへの腹腔内投与により、個体レベルでも検討した。

さらに、RSS の産生に寄与する酵素 cystathionine β-synthase (CBS)、cystathionine γ-lyase (CSE) の MeHg 毒性における役割を、細胞レベルでは SH-SY5Y への強制発現および CBS siRNA による silencing により、個体レベルでは 6 週齢の C57BL/6J 野生型および遺伝子欠損 (CSE^{-/-}) マウスに、MeHg (5mg/kg) を連続 12 日間経口投与し、MeHg 中毒症状を観察することにより検討した。

PRSS の同定は、マウス肝可溶性画分より、RSS が含まれる低分子画分を除去後、高分子画分に残存する (MeHg)₂S 生成活性を指標に、プロテオーム解析を施行した。

(結果)

MeHg-SGEt は親電子性を喪失しているにもかかわらず、SH-SY5Y 細胞に濃度依存的な細胞毒性を示し、Keap1 を含む複数の細胞内タンパク質の S-トランス水銀化を誘導した。これに伴い、Keap1 による抑制から解除された Nrf2 の蓄積と転写活性化、Nrf2 下流遺伝子群の発現誘導が観察された。また、MeHg はマウス Keap1 Cys151 の S-水銀化を介して Nrf2 を活性化するのに対し、MeHg-SG は Cys319 の S-水銀化を介して Nrf2 を活性化することが明らかになった。

次に、H₂S/HS⁻ ドナーである NaHS および RSS のモデル化合物である Na₂S₄ と MeHg との反応により (MeHg)₂S が生成すること、MeHg に曝露後、細胞・個体レベルで (MeHg)₂S が検出されることが見出された。(MeHg)₂S は親電子性を喪失しており、MeHg と比較して細胞毒性が顕著に低下し、個体レベルにおいてもマウス腹腔内投与による致死効果が見られなかった。

SH-SY5Y 細胞に CBS を強制発現すると、MeHg による毒性は顕著に軽減し、逆に CBS の silencing により、MeHg の毒性は有意に増強した。個体レベルでは、野生型マウスにおいて神経症状が出現しない投与量において、CSE 欠損マウスでは、MeHg による特徴的な神経症状の出現後、すべてのマウスの死亡が見られた。野生型マウスでは (MeHg)₂S が各臓器に検出されたのに対し、CSE 欠損マウスではほとんど検出されなかった。

最後に吉田氏は、生体内において (MeHg)₂S 生成に寄与する分子の同定を試みた。まず、生体内に高濃度産生されている GSH persulfide と MeHg の反応により、(MeHg)₂S が生成することが見出された。次に、(MeHg)₂S 生成に寄与する高分子化合物を探索し、マウス肝可溶性高分子画分に複数の PRSS を検出した。全 (MeHg)₂S 生成活性の約 50% が NADH に親和性の高いタンパク質であり、うち一つが、グルタチオン S-転移酵素 P1 (GSTP1) として同定された。変異体を用いた解析により、GSTP1 の Cys15、Cys102 が RSS 結合部位であることが明らかになった。

(考察)

本研究により、MeHgのみならず、これまで不活性化代謝物と考えられていた MeHg-SG によっても Keap1 は S-水銀化され、Nrf2 活性化による細胞応答・防御能の誘導が見られることが明らかになった。吉田氏は、Nrf2 活性化により、MeHg の細胞外排泄に関与する多剤耐性関連タンパク質(MRPs)等が誘導されることが毒性軽減に重要である可能性を考察している。

次に、GSH に次ぐ第二の生体内イオウ元素として、CBS および CSE 由来の H₂S/HS-様 RSS に着目し、これと MeHg の化学反応により (MeHg)₂S が生成すること、細胞レベル、個体レベルにおいて、MeHg と比較して (MeHg)₂S には顕著な毒性の軽減が見られることを見出し、(MeHg)₂S が解毒代謝物であることを明らかにした。吉田氏は、H₂S/HS-様 RSS は MeHg 以外の親電子物質に対する防御機構においても重要である可能性を考察している。

さらに吉田氏は、(MeHg)₂S 生成において、GSH persulfide が関与することを示すとともに、(MeHg)₂S 生成を指標とする PRSS 同定法を確立し、PRSS が生体内に複数存在すること、その一つが GSTP1 であることを示した。吉田氏は、様々なタンパク質に RSS 蓄積能が存在することは、親電子物質に対する防御機構において重要である一方で、閾値を超える親電子物質の負荷があった場合には、本来のタンパク質の機能低下により、病態に結びつく可能性もあると考察している。

最後に、CBS および CSE により産生される H₂S は、これまで、ガス状シグナル分子としての認識が主流であったが、本研究による (MeHg)₂S 生成の発見が、MeHg の生体内変換のパラダイムシフトにつながるであろうと考察している。

審査の結果の要旨

(批評)

本研究は、環境中に広く存在する MeHg に対する生体防御機構として、イオウを含む低分子化合物およびタンパク質に注目した、独創的な研究である。学位論文は、明確な目的を持った複数の研究から構成されており、それぞれの研究は論理的にデザインされ、厳密なケミカル・バイオロジーの方法により進められた結果、多数の興味深い新知見が見出されている。これまで生体防御の面からあまり検討されてこなかったイオウについての新たな生理的役割を示す研究として、当該研究分野に大きく貢献するものである。また、吉田氏は、関連分野の研究動向に関する広い知識と、本研究の意義に関する深い洞察を有することが、質疑応答により確認された。

平成 25 年 12 月 26 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文について説明を求め、関連事項について質疑応答を行い、最終試験を行った。その結果、審査委員全員が合格と判定した。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認める。