

## 目次

### 序論 研究の背景

1. はじめに
2. メチル水銀 (MeHg) とは
  - 2.1. 環境中における MeHg とその歴史的背景
  - 2.2. MeHg の化学的性質
  - 2.3. チオール化学
  - 2.4. Keap1/Nrf2 システム
  - 2.5. MeHg の代謝・排泄経路
3. MeHg の毒性軽減に係わるイオウ (S) を構成元素に有する鍵分子
  - 3.1. システイン (Cys)
  - 3.2. グルタチオン (GSH)
  - 3.3. 硫化水素 (H<sub>2</sub>S)
    - 3.3.1. H<sub>2</sub>S について
    - 3.3.2. H<sub>2</sub>S 産生酵素
    - 3.3.3. 活性イオウ分子
4. 本研究の目的と特色
5. 序論図表

### 方法の部

1. 試薬類
2. 化学合成およびその精製
  - 2.1. MeHg-グルタチオン結合体 (MeHg-SG)
  - 2.2. MeHg-グルタチオンモノエステル結合体 (MeHg-SGET)
  - 2.3. Bis-methylmercury sulfide ((MeHg)<sub>2</sub>S)
  - 2.4. 酸化型グルタチオンパーサルフイド (GS-S-SG)
3. 実験動物
  - 3.1. ラット
  - 3.2. マウス
4. 細胞培養
5. 細胞生存率の測定法 (MTT 法)
6. 酵素溶液の調製
  - 6.1. ラット臓器酵素溶液
  - 6.2. マウス臓器酵素溶液
  - 6.3. SH-SY5Y 細胞酵素溶液

7. タンパク質の定量法
  - 7.1. BCA 法
  - 7.2. Bradford 法
8. タンパク質の分離および検出
  - 8.1. Cibacron Blue 3GA カラムクロマトグラフィー
  - 8.2. Sephacryl S-100 カラムクロマトグラフィー
  - 8.3. SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (SDS-PAGE)
  - 8.4. ウェスタンブロット
  - 8.5. ビオチンマレイミドラベル法 (BPM 標識法)
    - 8.5.1. 精製タンパク質を用いた BPM 標識法
    - 8.5.2. 培養細胞を用いた BPM 標識法
9. 核酸の検出
  - 9.1. mRNA の抽出
  - 9.2. リアルタイム RT-PCR 法による mRNA の定量
10. 遺伝子導入法
  - 10.1. 細胞高発現用ベクターの導入
  - 10.2. Small interfering RNA (siRNA) の導入
11. 転写活性化能の測定法 (ARE-ルシフェラーゼ法)
12. 生体試料からの疎水性水銀化合物の抽出法
13. 総無機水銀の抽出法
14. タンパク質の精製
  - 14.1. 大腸菌培養培地の調製
  - 14.2. マウス Keap1 タンパク質の精製
  - 14.3. ヒト CBS タンパク質の精製
    - 14.3.1. ヒト CBS タンパク質の精製
    - 14.3.2. ヒト CBS 酵素反応溶液の組成ならびに反応条件
  - 14.4. ヒト GSTP1 タンパク質の精製
  - 14.5. ヒト GSTP1 変異体タンパク質の精製
15. (MeHg)<sub>2</sub>S 法によるタンパク質結合性活性イオウ分子の検出
16. 機器分析
  - 16.1. 高速液体クロマトグラフィー (HPLC)-多重極型電気化学検出器 (ECD) によるグルタチオンの分析
  - 16.2. 加熱気化原子吸光法 (AAS) による細胞内水銀量の測定
  - 16.3. HPLC-AAS による MeHg およびその関連化合物の測定
  - 16.4. 質量分析法 (EI-MS) による分析
  - 16.5. 超高性能液体クロマトグラフィー (UPLC)-エレクトロスプレー

イオン化質量分析計 (MS) による低分子化合物の分析

16. 6. nanoUPLC – Elevated Energy MS (MS<sup>E</sup>) による高分子の分析

17. 統計処理

## 第1章 メチル水銀のグルタチオン結合体によるタンパク質の S-トランス水銀化

1. 1. 目的

1. 2. 結果

1. 2. 1. MeHg-SG および MeHg-SG 前駆体 MeHg-SGEt の合成

1. 2. 2. MeHg-SGEt による細胞毒性

1. 2. 3. MeHg-SG によるタンパク質への S-トランス水銀化

1. 2. 4. MeHg-SGEt による Nrf2 活性化および下流タンパク質の誘導

1. 2. 5. MeHg のチオ硫酸およびテトラチオ硫酸付加体による  
S-トランス水銀化

1. 3. 考察

1. 4. まとめ

1. 5. 図表

## 第2章 メチル水銀の毒性を制御する含硫低分子の役割

2. 1. 目的

2. 2. 結果

2. 2. 1. MeHg の予想代謝物 (MeHg)<sub>2</sub>S の合成

2. 2. 2. MeHg と NaHS の化学反応で生成する (MeHg)<sub>2</sub>S の化学量論

2. 2. 3. 生体試料からの (MeHg)<sub>2</sub>S 抽出法の確立

2. 2. 4. hCBS の酵素反応により生成する (MeHg)<sub>2</sub>S

2. 2. 5. 生体試料からの新奇代謝物 (MeHg)<sub>2</sub>S の同定

2. 2. 6. (MeHg)<sub>2</sub>S の有する親電子性評価

2. 2. 7. (MeHg)<sub>2</sub>S を用いた毒性評価

2. 2. 8. マウスの各臓器における (MeHg)<sub>2</sub>S の分布

2. 2. 9. (MeHg)<sub>2</sub>S の生成を介した MeHg の無機化

2. 2. 10. 細胞レベルにおける CBS による MeHg の毒性軽減

2. 2. 11. 個体レベルにおいて MeHg の毒性を制御する CSE

2. 3. 考察

2. 4. まとめ

2. 5. 図表

## 第3章 メチル水銀の解毒を制御する活性イオウ分子結合性タンパク質 (PRSS) の プロテオミクス

### 3.1. 目的

### 3.2. 結果

3.2.1. (MeHg)<sub>2</sub>S の生成における MeHg と活性イオウ分子の反応様式

3.2.2. PRSS の生成における CSE の重要性

3.2.3. カラムクロマトグラフィーによる PRSS の単離・精製

### 3.3. 考察

### 3.4. まとめ

### 3.5. 図表

総合考察

引用文献

謝辞

参考論文

## 略語

AAS	原子吸光法
ABS	重炭酸アンモニウム溶液
Amp	アンピシリン
ARE	抗酸化応答配列
BCA	ビンシコニン酸
BSA	ウシ血清アルブミン
BPM	ビオチン-PEAC <sub>5</sub> -マレイミド
BTB	N-terminal broad complex, tramtrack, and bric-a-brac 領域
CBB	クマシーブリリアントブルー G-250
CBS	シスタチオニン $\beta$ -合成酵素
CSE	シスタチオニン $\gamma$ -リアーゼ
Cys	システイン
DDW	再蒸留水
DMEM F12-HAM	ダルベッコ変法イーグル培地 F-12 HAM
DMSO	ジメチルスルホキシド
D-PBS	ダルベッコリン酸緩衝生理食塩水
DTT	ジチオスレイトール
ECD	多重極型電気化学検出器
EDTA	エチレンジアミン四酢酸
EI-MS	電気衝撃イオン化質量分析法
ESI	エレクトロスプレーイオン化法
ESI-MS	エレクトロスプレーイオン化質量分析法
FBS	ウマ胎仔血清
GCL	グルタミン酸システイン合成酵素
GCLM	GCL 触媒サブユニット
GCLC	GCL 修飾サブユニット
GSH	還元型グルタチオン
GST	GSH S-転移酵素

<sup>1</sup> H-NMR	プロトン核磁気共鳴分光法
HO-1	ヘムオキシゲナーゼ 1
HPLC	高速液体クロマトグラフィー
HRP	西洋ワサビペルオキシダーゼ
Keap1	Kelch-like ECH-associated protein 1
LB	溶原培地
2-ME	2-メルカプトエタノール
MeHg	メチル水銀
MeHg-SG	MeHg-グルタチオン結合体
MeHg-SGEt	MeHg-グルタチオンモノエステル結合体
MRP	多剤耐性トランスポーター
MS <sup>E</sup>	網羅的 MS/MS 解析
NADH	ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド
Nrf2	nuclear factor erythroid 2-related factor 2
PAGE	ポリアクリルアミドゲル電気泳動法
pKa	酸解離定数
PVDF	ポリビニリデンフルオライド
PLP	ピリドキサルリン酸
RIPA	放射性免疫沈降法
ROS	活性酸素種
SDS	ドデシル硫酸ナトリウム
SH	チオール
siRNA	低分子干渉 RNA
TE	トリス-EDTA
TTBS	tween 20-トリス緩衝生理食塩水
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -テトラメチルエチレンジアミン
Tris	2-アミノ-2-ヒドロキシメチル 1,1,3-プロパンジオール
Triton X-100	ポリオキシエチレン (10) オクチルフェニルエーテル

## 序論 研究の背景

### 1. はじめに

我々を取り巻く環境には、多種多様な環境化学物質が存在している。大気中芳香族炭化水素キノン体や一部の重金属のようにそれ自身の反応性が高く、親電子性を有している化合物や、生体内に取り込まれた後、代謝活性化により親電子性を獲得し、より反応性の高い化合物となるものも知られている<sup>1)</sup>。また、生体は常にこれらの化学物質によるストレスに曝されているにも関わらず、環境に適応し、健康な状態を維持している。興味深いことに、生体は生命活動の中で酸化ストレスあるいは炎症時に、いくつかの内在性親電子物質を産生する。このことは、生体が親電子物質の反応性を利用する一方で、それに対し感知・応答する優れた防御・制御システムが存在することを示唆している。本研究では、親電子物質に対する生体の防御システムを解明するため、親電子物質と反応性の高いイオウ (S) を構成元素に有する生体内含硫化合物に着目した。特に、食品等に含まれる環境中親電子物質であるメチル水銀 (MeHg) をモデル化合物として、生体内イオウを利用した生体防御システムの解明を試みた。

### 2. メチル水銀 (MeHg) とは

#### 2.1. 環境中における MeHg とその歴史的背景

MeHg は有機アルキル水銀化合物の一種であり、環境中における化学形態は、モノメチル水銀 ( $\text{CH}_3\text{Hg}$ , MeHg) およびジメチル水銀 ( $(\text{CH}_3)_2\text{Hg}$ ) の二種類存在する<sup>2)</sup>。中でも、モノ体の MeHg は環境中有機水銀の主要な化学形態であり、特に魚介類中の水銀は 75-100%がモノ体の MeHg である (FAO/WHO 合同食品添加物専門家会議, 2003)。水銀の地球内循環はよく知られており、火山活動等で環境中に放出された水銀蒸気は水溶性 (例えば無機水銀 ( $\text{Hg}^0$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ) 等) となり、降雨により土壌や水域に蓄積する。水銀蒸気は 0.4-3 年間大気中に滞留するが、可溶性化合物に変化すると、その滞留期間は数週間程度と言われている。無機水銀からメチル水銀への化学形態の変換は水圏における蓄積過程の第一段階である。メチル化反応は非酵素的、あるいは微生物による生物学的なメチル化によって MeHg または  $(\text{CH}_3)_2\text{Hg}$  に変換される<sup>3)</sup>。そのため、MeHg の発生は人為的な汚染に関わらず、MeHg は環境中にユビキタスに存在している (海水中濃度が約 0.2-1 ng/L)<sup>4)</sup>。図 1 に水銀の地球内循環を示す。環境中における MeHg と硫化水素 ( $\text{H}_2\text{S}$ ) の反応については後述を参照されたい (序論 3.3.1)。

MeHg は全身的な毒性を持ち、曝露の量、期間に依存して、生体内の各種臓器や機能に影響を及ぼす。MeHg による中毒症状は脳や中枢神経に強く現れ、脳傷害に伴い、四肢の痺れ感と痛み、言語障害、運動失調、難聴及び求心性視野狭窄などの、いわゆる Hunter-Russell 症候群の症状が認められる<sup>5-7)</sup>。さらに MeHg 中毒の特徴として、経胎盤曝露による胎児への障害が挙げられる<sup>8)</sup>。例として、我が国において 1950 年代

後半に水俣湾沿岸で、化学工場の排出した MeHg で汚染された魚介類を摂取したことによって発生した水俣病や、1965 年に阿賀野川流域で水俣同様に発生した新潟水俣病、さらには 1972 年にイラクにおいて発生した小麦による集団中毒症など、世界的に大きな問題となった<sup>9,10)</sup>。現在、水銀の環境中への排出量等が国際的に規制されているため、この様な中毒症状を引き起こす程の高濃度の MeHg を摂取するとは考えにくい。しかしながら、MeHg は生物濃縮を受け易く、その濃度は大型魚類においては周辺環境の  $10^4$ - $10^5$  倍 (0.1-1 mg/kg) 蓄積されている。中でも、マグロ (1.08 mg/kg) やメカジキ (0.65 mg/kg) 等に高濃度で蓄積しているため、これらを摂取するヒトへの健康影響が現在もなお世界的に懸念されている<sup>11)</sup>。2004 年に FAO/WHO は MeHg 曝露による胎児の聴覚神経の伝達速度の低下を基準として、妊婦が摂取できる水銀量を 1.6  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{week}$  と定めた。これは妊婦の体重を 50 kg と仮定すると、水銀許容量が 11.4  $\mu\text{g}/\text{day}$  (マグロ約 11 g/day) となる。また、魚食文化である我が国の平均血中水銀濃度は約  $54 \pm 8.6 \mu\text{g}/\text{L}$ 、さらに平均 MeHg 摂取量は約 8.4  $\mu\text{g}/\text{day}$  (厚生労働省科学研究報告書) と水銀許容量に比較的近い値であり、多くのヒトが MeHg のリスクに曝されている可能性がある。このように、過去から現在にかけて広く問題となっている MeHg であるが、MeHg に対する生体の防御・応答機構の分子メカニズムについては未だ不明な点が多い。

## 2.2. MeHg の化学的性質

生体内における MeHg の挙動は、本化合物の化学的な性質から予測することが可能である。水銀原子 (Hg) は 12 族元素、第 6 周期の原子であり、満たされた 5d 殻 (5d 軌道) の外側 (6s 軌道) に 2 個の s 電子を有している。MeHg は 6s 軌道の電子の 1 つとメチル基が結合した、分子量 215 の水銀化合物である。MeHg は近紫外線・可視光における吸収はなく、本化合物の検出法としては電子捕獲型検出器 (ECD) や質量分析法 (MS)、加熱型および還元型原子吸光法 (AAS) 等が広く用いられている。MeHg には昇華性があり、蒸気圧 0.1729 Pa (20°C) と常温で昇華する (昇華性:  $\text{HgO} < \text{HgS} < \text{HgCl}_2 < \text{Hg}_2\text{Cl}_2 < \text{Hg} < \text{CH}_3\text{HgCl}$ )。また、水溶液中では  $\text{CH}_3\text{Hg}^+$  イオンは水和しており、水銀置換オキソニウムイオンを生じる反応がある<sup>12)</sup> (式参照)。



このイオンは 4 までの配位数をとることができ、イオウ (S) およびセレン (Se) に極めて強く結合する<sup>13)</sup>。これらに対する反応性の大きさは全て MeHg の持つ親電子性 (Electrophilicity) によって説明することができる。

親電子物質 (Electrophile) とは別名、求電子物質と呼ばれ、異なる物質間で電子の授受を伴いながら化学結合を形成する反応において、電子を受け取る側である。一方、

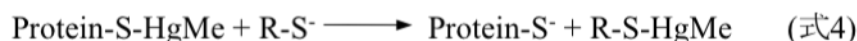
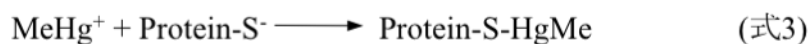


電子を渡す側を求核物質 (Nucleophile) と言う。親電子物質の反応の強弱は親電子性という言葉によって表される。ある化合物に対して「親電子性が大きい (もしくは強い)」という場合は求核物質の電子に対する親和性が高く反応速度が大きいことを意味する。この親電子性の大小は、陽荷電の強さ、電子を共有することで生成される分子軌道のエネルギー準位や分子立体構造などによって決定される。

化学物質の反応性を予測・評価できる指標として、1963年に Pearson によって提唱された Hard and Soft Acid and Base (HSAB) 則が知られている。HSAB 則は Lewis 酸 (電子対受容体) や Lewis 塩基 (電子対供与体) を Soft や Hard という表現で分類し、この酸と塩基の反応は Hard-Soft よりも Hard 同士や Soft 同士の方が、反応性が高く、複合体を形成しやすいという考えである。MeHg は Soft 酸に、チオレートイオン ( $R-S^-$ ) は Soft 塩基に属している (表 1)。MeHg のような Soft 酸塩基の特徴は最低空軌道 (lowest unoccupied molecular orbital, LUMO) エネルギーが低く、最高被占軌道 (highest occupied molecular orbital, HOMO) エネルギーは高い傾向にあるため、LUMO と HOMO のエネルギー差が小さく、分子軌道相互作用が大きくなる。つまり、Soft 同士の反応は相互作用が強く、反応速度も速いため、MeHg はチオレートイオンと容易に共有結合を形成する。加えて、MeHg とイオウ含有化合物との生成定数は、 $NH_2$  基をもつ求核物質との生成定数より約  $10^8$  倍大きい<sup>12)</sup>。従って、MeHg は生体内に存在するタンパク質中のチオール基 (Protein-SH)、グルタチオン (GSH, グルタミン酸・システイン・グリシンからなるトリペプチド)、システインなどの生体内チオール ( $R-SH$ ) が脱プロトン化した解離性チオール基 (チオレートイオン,  $R-S^-$ ) と容易に共有結合し<sup>14)</sup>、付加体 ( $R-S-HgMe$ ) を形成する (解離性チオール基の詳細は次項で述べる)。当研究室ではこのような MeHg による化学修飾を“S-水銀化”と呼ぶ。細胞内タンパク質中のチオール基は、その構造維持や酵素活性に重要な役割を担うことから<sup>15-17)</sup>、このような S-水銀化が MeHg による様々な生体影響の作用点になると考えられる。これまで当研究室では、MeHg の標的タンパク質と、その S-水銀化による生体影響を報告してきた。マンガン-スーパーオキシドジスムターゼ (Mn-SOD) や神経型一酸化窒素合成酵素 (nNOS) 等の標的タンパク質は、S-水銀化を介して酵素活性が阻害されることを明らかにした<sup>18-20)</sup>。また、MeHg の S-水銀化により不溶化する標的タンパク質群からアルギナーゼ I を同定し、*in vitro* および *in vivo* における酵素活性の低下を報告した<sup>21)</sup>。これらの酵素活性の阻害は、いずれも正常な生理機能を攪乱することで MeHg の毒性を発現すると考えられる。一方、Keap1/Nrf2 システム (後述 2.4) は、Keap1 の S-水銀化によって Nrf2 が活性化されることで、下流の解毒代謝酵素群の発現を上昇、および MeHg の排泄に関わる GSH 抱合・排泄を促進させる機能を有する。実際、我々は Keap1/Nrf2 システムが MeHg の解毒応答機構の一旦を担っていることを細胞および個体レベルで報告した<sup>22,23)</sup>。

しかしながら、従前より MeHg とチオール基の結合 (Hg-S 結合) は可逆的であり、

生体内高分子および低分子の解離性チオール基により結合が解除・交換されると言われている<sup>24-26</sup>。この解離性チオール基による *S-S* 交換反応を“*S*-トランス水銀化”と呼ぶ。*S*-トランス水銀化反応は、生体内の高分子同士や低分子同士だけでなく、高分子-低分子間の解離性チオール基でも可能な反応といわれている<sup>24-26</sup>。しかしながら *S*-トランス水銀化反応に関する知見は試験管レベルでの検討結果であり、細胞レベルで *S*-トランス水銀化反応を証明した報告はない。下記に *S*-水銀化 (式3) および *S*-トランス水銀化 (式4) の反応式を示す。



### 2.3. チオールの化学

チオール基 (SH 基) は多くの反応において、チオレートイオン ( $\text{R-S}^-$ ) の形で反応するため、SH 基の反応性は SH 基の解離がどの pH で開始するか依存する。つまり、SH 基の酸解離定数 (pKa 値) が SH 基の反応性の指標となる。タンパク質の SH 基の pKa 値は多くの因子の影響で変化する。その一つとして、タンパク質分子中での SH 基の空間的配置が挙げられる。ヒトゲノム中には約 214,000 個ものシステイン残基がコードされているが、その 80~90%はジスルフィド結合や翻訳後修飾あるいはタンパク分子内に埋没しており、タンパク質分子中の疎水的環境にあり溶媒に接触できないため、一般的に分子表面にある SH 基よりも高い pKa 値を示し、反応性が低い<sup>27</sup>。例えば、酵素の活性中心にある多くの SH 基の pKa 値は 7-9 である。二つ目の要因は、近傍に存在する荷電気 (電気陰性度) による静電効果である。タンパク質の SH 基の近傍に正に電荷した基を有するアミノ酸 (ヒスチジン, リジン, アルギニンなどの塩基性アミノ酸) が存在すると、SH 基の pKa 値は低下する。例えば、タンパク質中のシステイン残基の SH 基からの脱プロトンは、近傍の正電荷  $\text{NH}_3^+$  によって制御されている。これはプロトンを放出しやすいシステイン残基から  $\text{NH}_3^+$  が電子を吸引する誘起効果によるためである。また、亜鉛の配位にかかわるシステイン残基も pKa 値が低下しチオレートイオンとなる<sup>28</sup>。一方、近傍に負に電荷した基がある場合、SH 基の pKa 値は上昇する。このようにタンパク質中の SH 基は、近傍に存在するアミノ酸によって、SH 基の pKa 値が制御されている。

一般に低分子チオール化合物の場合、その pKa 値は 8.3-9.5 と高い値を示す。GSH は神経細胞のような特別な細胞を除いて細胞内に数 mM 単位で存在するが、GSH の pKa 値は 9.12<sup>29</sup> であり、生理条件下では約 2%しか解離していない。しかしながら、その豊富な存在量および親電子物質と GSH との結合を触媒するグルタチオン *S*-転移酵素 (GSTs) によって、GSH の pKa 値が 9.12 から約 6.5 にまで下げられることで GSH が機能する。これは、GST の GSH 結合部位 Tyr8, Arg14, Trp39, Lys45, Gln52, Leu53, Ser66 に含まれる Tyr や Ser のヒドロキシル基と GSH が水素結合し、GSH の SH 基の

プロトンを引き抜く<sup>30)</sup>, もしくは SH 基から GSH 内のカルボキシル基にプロトンを移行させることに起因する<sup>31)</sup>.

#### 2.4. Keap1/Nrf2 システム

我々は日々, 多くの親電子物質に曝されているが, 生体はこれら親電子物質を感知・応答する防御システムとして Keap1/Nrf2 システムを備えている.

Nrf2 は  $\beta$ -グロビン遺伝子発現制御領域上の nuclear factor-erythroid 2 (NF-E2) 結合配列<sup>32)</sup> に相互作用するタンパク質として, 1994 年に Moi らによって同定された転写因子である<sup>33)</sup>. 1990 年に同定された第二相異物代謝酵素の発現誘導に係わる抗酸化物質応答配列 ARE<sup>34,35)</sup> や親電子物質/抗酸化物質応答配列 EpRE/ARE<sup>36-38)</sup> に NF-E2 が類似しており, このことに注目した伊東らは 1997 年に Nrf2 が ARE を介して第二相異物代謝酵素の発現を制御することを明らかにした<sup>39)</sup>. Nrf2 はロイシンジッパー (bZip) 構造を持つ転写因子の一つであり, 小 maf 因子群とヘテロ二量体を形成する<sup>40)</sup>. Nrf2 は 6 個の Neh 領域を持ち<sup>41)</sup>, C 末端側の Neh1 領域は bZip 構造を有し, 小 maf 群との二量体形成および DNA への結合に重要である. 生物種間で保存性が高い Neh2 領域は, ETGE [5'-LDNETGE-3'] および DLG [5'-QDNDLG-3'] モチーフ<sup>42)</sup> を介して Keap1 と相互作用することで Nrf2 の分解に関与している<sup>43-45)</sup>. Neh3, Neh4 および Neh5 領域は転写活性化に関与する<sup>42,46-48)</sup>.

1999 年に Nrf2 の負の制御因子として, 親電子物質および酸化ストレスに対する感知分子 Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1) が発見された<sup>41)</sup>. Keap1 は N-末端領域 (NTR), broad complex, tramtrack, and bric-a-brac 領域 (BTB), intervening region (IVR) および c-末端 DC 領域から成り, BTB 領域を介してホモ二量体を形成し<sup>49)</sup>, DC 領域を介して Nrf2 と結合する<sup>50)</sup>. 通常, Nrf2 は細胞質において Keap1 と cullin3 を含む E3 複合体によりユビキチン化され, プロテアソームにより迅速に分解されている<sup>50)</sup>. Nrf2 の半減期は 20 分以内であり, 非常に代謝回転の速いタンパク質である. 一方, 親電子物質や活性酸素の刺激により, Keap1 による抑制から免れて安定化した Nrf2 は核内へ移行する<sup>51)</sup>. 核内へ移行した Nrf2 は小 Maf 群とヘテロ二量体を形成し, DNA 上の EpRE/ARE 領域と結合して, ヘムオキシゲナーゼ (HO-1) やペルオキシレドキシニン I (Prx1) などの抗酸化酵素群<sup>52,53)</sup>, GSH 合成に関わるシスチントランスポーター<sup>54)</sup> やグルタミルシステインリガーゼ (GCL) <sup>55,56)</sup>, GSTs <sup>57,58)</sup> などの第二相異物代謝酵素群, および多剤耐性関連タンパク質 (MRPs) <sup>59-61)</sup> などの第三相異物排泄酵素群の発現を誘導する<sup>39,52,62)</sup>. 主に, 親電子物質は Keap1 の反応性システイン残基を修飾することで Nrf2 の分解を抑制し, Nrf2 による転写活性化を誘導する. ヒト Keap1 は 27 個, マウス Keap1 は 25 個のシステイン残基を有しており, 親電子物質や活性酸素種のセンサータンパク質として知られている<sup>63)</sup>. 親電子物質によって修飾されるシステイン残基は異なり, 1,2-NQ は Cys151, Cys257, Cys273, Cys288 および Cys489 に,

TBQはCys23, Cys151, Cys226, Cys257, Cys273, Cys288, Cys368およびCys489に, MeHgはCys151を, 内在性親電子物質であるエストロゲンキノンにはCys77, Cys151, Cys257, Cys273, Cys288, Cys368, Cys434, Cys489およびCys513もしくはCys518に結合することを当研究室で明らかにした<sup>64-66</sup>。Keap1のCys151やCys273, Cys288などが高い反応性を有すること<sup>67</sup>が明らかとなっており, これら3つのシステイン残基の近傍には複数の塩基性アミノ酸存在するためpKa値が低いと想定される<sup>68,69</sup>。さらに, Cys273およびCys288は亜鉛の配位子として知られるため, このこともpKa値が低い要因と考えられる<sup>70</sup>。以上のことから明らかである様に, Keap1/Nrf2システムは異物代謝にかかわる酵素群を包括的に制御しているため, 我々を異物から防御するための重要なシステムの一つといえる。

#### 2.4. MeHgの代謝・排泄経路

マグロなどの大型魚類等の食品中に含まれるMeHgは, 我々の体内に侵入すると消化管から95-100%と高率で吸収される<sup>71</sup>。吸収される際, MeHgはチオレートイオンを有する生体内のタンパク質, システインやGSHのようなアミノ酸に結合し複合体を形成する。

システイン-MeHg複合体はメチオニンと類似した構造をもつため, 中性アミノ酸輸送系によって血液-脳関門を通過し脳に輸送される。このことが, 高濃度のMeHg曝露下において脳神経細胞の変性や脱落といった強い中毒症状を示す理由の一つであると考えられている。また, 肝臓中では, システイン-MeHg複合体およびGSH(GS<sup>-</sup>)による代謝を受けGSH抱合体(MeHg-SG)となり, 抱合反応により極性化したMeHg-SGは, MRPsにより細胞外へ排泄されると言われている<sup>72,73</sup>。MeHg-SGは胆汁中に排泄されるので, MeHg-SGは糞便が排泄経路となる。しかし, 大部分は腸管内膜に局在する $\gamma$ グルタミルトランスぺプチダーゼ( $\gamma$ -GTP)等の水解酵素の活性によりシステイン-MeHg複合体へと戻り, 再び再吸収される「腸肝循環」が生じる。このような腸肝循環による再吸収サイクルが, MeHgの生体内半減期が約45-70日という長さの要因であると考えられる。

血液中では90%以上のMeHgが赤血球中に存在する。毛髪が生成される際に, MeHgが血液に対して一定の比を持って取り込まれる。定常状態においては毛髪と血液の濃度比は250:1が代表的な値である<sup>71,74</sup>。無機水銀の曝露がなく通常の食事を摂っている人の場合, 血中および毛髪における無機水銀量は10%以下であり, 総水銀として測定される水銀の大部分はMeHgもしくはMeHgに由来するものと考えられる<sup>74</sup>。

MeHgの代謝・排泄を担う重要な因子として, イオウを構成元素とするGSHについて述べたが, イオウ(S)と同族の16族元素であるセレン(Se)化合物による相互作用にも注目が集まっている。1972年にGantherらにより, 亜セレン酸やマグロ肉に含有されているセレンを用いた検討により, MeHgの毒性が低下することが報告され

た<sup>75)</sup>。Seによる毒性軽減効果の研究はGantherらの報告を契機として数多く行われ、Seによるメチル水銀の毒性軽減機構として、MeHgとSeの直接結合<sup>75)</sup>、Seによる化学的な反応によるMeHgの脱メチル化促進作用<sup>76)</sup>、ならびにSeによる生体膜保護作用<sup>77)</sup>などの可能性が推察されている。

MeHgのその他の代謝経路として、生体内で僅かであるがMeHgの無機化(i-Hg)が起きると言われている。1990年、安武らはMeHg投与ラットにおいて、投与後7日目の脳、肝臓、腎臓において無機水銀量が増加していることを明らかにした<sup>78)</sup>。腸管内での無機化は糞便中への排泄を促進する。また、吸収され体内で無機化された水銀も主に腎臓から排泄されるが、胆汁とともに腸管に排泄されても再吸収されにくく、糞便と共に体外に排出される<sup>71,79)</sup>。これらのことから、MeHgの無機化は糞便中への排泄促進に関わる重要な機構であると考えられる。そのメカニズムとして腸内細菌説<sup>80-82)</sup>、活性酸素説<sup>83-86)</sup>による可能性が提唱されているが、その詳細は解明されていない。

### 3. MeHgの毒性軽減に関わるイオウ(S)を構成元素に有する鍵分子

MeHgなどの親電子物質は、チオレートイオンなどの求核物質と容易に共有結合を形成する。そのため、pKa値が低く、反応性の高い生体内チオレートイオンは親電子物質の標的となることが予想される。そこで、本項目ではイオウを構成元素に持つ生体内低分子について述べる。イオウは化学的にも生物学的にも活性な元素で、主要な生体構成元素である。主としてタンパク質中の含硫アミノ酸であるメチオニンおよびシステインとして体内に取り込まれる。図2に示すように、哺乳動物のシステインは同化や異化作用により細胞で産生され、細胞内タンパク質の構成に重要なアミノ酸、GSHやその他含硫低分子の合成に使用される重要な鍵分子である。

#### 3.1. システイン(Cys)

生体内のイオウを構成元素にもつ低分子化合物を述べる上で、含硫アミノ酸は非常に重要な因子である。特にメチオニンは必須アミノ酸であり、ホモシステイン、システイン、タウリンなどの他の含硫アミノ酸の供給源である。メチオニンとATPの縮合で生成するS-アデノシルメチオニンはメチル基供与体として働き、脱メチル化体としてS-アデノシルシステインを生成する。これが加水分解をうけホモシステインが産生する(図2)。ホモシステインはイオウ転移経路でcystathionine  $\beta$ -synthase (CBS)によりシスタチオニンを形成し、ついでcystathionine  $\gamma$ -lyase (CSE)によりシステインを生成する(CBS, CSEに関しては後述)。中でもイオウ転移経路で合成されるシステインは、タンパク質の構成成分として立体構造を維持するとともに、酸化還元反応による生体成分の代謝を担うなど、生理的に重要なアミノ酸である。加えて、図2に示したように親電子物質に対して求核剤として働き、反応性を低下すると予想される

GSH や H<sub>2</sub>S/HS<sup>-</sup> 産生に重要な分子であることが明らかである。Stipanuk らは、システインの 50% 近くが無機イオウ (S<sup>0</sup>) とピルビン酸に分解されることを示した<sup>87,88</sup>。S<sup>0</sup> を生成する系は非酸化的な脱硫経路と呼ばれ、生成した S<sup>0</sup> は還元されて H<sub>2</sub>S/HS<sup>-</sup> を産生するか、SO<sub>3</sub><sup>2-</sup>、CN<sup>-</sup>、RSO<sub>2</sub><sup>2-</sup>、や RS<sup>-</sup> のような受容体に転移される<sup>89,90</sup> (図 2)。これらの中でも SO<sub>3</sub><sup>2-</sup> が主要な生理的受容基質と考えられている。

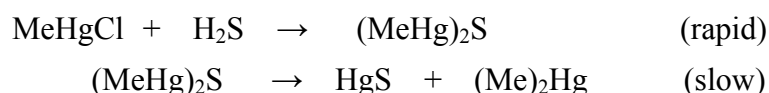
### 3.2. グルタチオン (GSH)

GSH はグルタミン酸 (Glu)、システイン (Cys)、グリシン (Gly) からなるトリペプチドである。神経細胞などの GSH 量が低い細胞や血清中を除いて、GSH は細胞内に数 mM 単位で存在し、GST による異物の抱合反応や酸化ストレスに対する防御に働くなど多彩な生理作用を有している<sup>91</sup>。細胞内において、グルタチオンは還元型の状態で維持されており、酸化型 グルタチオン (GSSG) は僅か 5% しか存在しない。細胞内の GSH は ATP 依存的に 2 段階の反応により合成される。第一段階は、グルタミルシステインリガーゼ (GCL) により、グルタミン酸とシステインをグルタミルシステインに合成する。本反応が生体内における GSH 合成の律速である。第二段階はグルタチオン合成酵素により、グルタミルシステインとグリシンを結合させ、GSH を合成する。2.3. で述べたように、GSH の pKa 値は 9.12<sup>29)</sup> であり、生理条件下では約 2% しか解離していない。しかしながら、その豊富な存在量と親電子物質と GSH との結合を触媒する GSTs によって、親電子物質と結合体 (抱合体) を形成する。

### 3.3. 硫化水素 (H<sub>2</sub>S)

#### 3.3.1. H<sub>2</sub>S について

「毒ガス」として知られる硫化水素 (H<sub>2</sub>S) は、環境中における硫黄循環の過程で、硫酸塩還元菌によって H<sub>2</sub>S が産生し、それを硫黄酸化細菌等の微生物が利用する。このような H<sub>2</sub>S は微生物の生体防御分子としても作用しており、特に水銀に着目すれば、真正細菌の *Clostridium cochlearium* T-2 株や酵母の *Saccharomyces cerevisiae* は、H<sub>2</sub>S を生産することで MeHg に対する耐性を得ていることが報告されている<sup>92,93</sup>。また、1978 年 Craig らによって環境中における H<sub>2</sub>S と MeHg の化学反応機構が明らかにされている<sup>94</sup>。



生体内におけるイオウ原子は、メチオニン、システイン、GSH、コエンザイム A などに含まれる。このことからイオウ原子は、生物において極めて重要な働きを担っていると考えられる。1950 年から 1970 年代にかけて、このイオウ原子を他の化合物へと転移させる酵素 sulfurtransferase の研究が盛んに行われたが、長らく H<sub>2</sub>S はイオ

ウを転移させる代謝経路の副産物としてしか認識されていなかった。しかしながら、1990年に哺乳類の脳に内在性のH<sub>2</sub>Sが産生されていることが報告されてから、生体内におけるH<sub>2</sub>Sの生理活性について多くの研究者が注目している。1996年に木村らは、脳でH<sub>2</sub>Sが産生され、H<sub>2</sub>Sが記憶のシナプスモデルとして知られている海馬長期増強(LTP)の誘導を促進する等、神経調節因子として機能していることを提案した<sup>95)</sup>。更に翌年、木村らはH<sub>2</sub>Sが血管平滑筋、門脈、回腸などの平滑筋組織を弛緩させることを見出した<sup>96)</sup>。また、H<sub>2</sub>Sは神経細胞を酸化ストレスから保護すると言われて<sup>97)</sup>。しかしながら、当時生体内で産生されるH<sub>2</sub>S量は100 μMレベルで存在すると言われていたが<sup>98,99)</sup>、測定法や分析機器の進歩に伴い、現在では10数nM~数μMレベルと、僅かな量しか生産されていないことが明らかとなった<sup>100-102)</sup>。上記に示した保護効果は、何れもH<sub>2</sub>Sをガス状分子として議論しており、H<sub>2</sub>Sによるこれらの生理活性に対する化学的根拠および詳細な機構は不明な点が多い。

前述したように、一般的な低分子チオール化合物のpKa値は8.3以上と高い値を示す。例えば、システインのpKa値は10.78<sup>103)</sup>である。しかしながら、H<sub>2</sub>Sは他の含硫低分子とは異なり、そのpKa値が6.76<sup>104)</sup>であるため、生体内で約80%が解離しHS<sup>-</sup>の状態が存在していると考えられる<sup>105)</sup>。さらにHS<sup>-</sup>は自動酸化を経てチオ硫酸(S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup>)を産生する。そのため、HS<sup>-</sup>に限らず、その酸化体であるS<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup>は生体内で求核剤として働き、親電子物質の標的となることが容易に予想される。

### 3.3.2. H<sub>2</sub>S 産生酵素

哺乳動物におけるH<sub>2</sub>Sの合成酵素として、CBS、CSEおよび3-mercaptopyruvate sulfurtransferase (3MST)の三つが知られている。このいずれもがピリドキサーール5'-リン酸(PLP)を補酵素とする反応である。各酵素反応は図2に示す。

CBSは多くの組織に発現しており、特に脳アストロサイト、肝臓、腎臓や膵臓に高発現している<sup>106-108)</sup>。CBSはシステインおよびホモシステインを基質として、シスタチオニンを合成する際にH<sub>2</sub>Sを生成する<sup>109)</sup>。本酵素活性はS-アデノシルメチオニン(SAM)によって増強されるため、SAMの細胞内濃度変化が、CBSによるH<sub>2</sub>S合成を調製していると考えられている<sup>106)</sup>。一方、CSEは肝臓、腎臓、膵臓、小腸や結腸など多くの組織に分布している<sup>107,110)</sup>。CSEは本来、シスタチオニンのC-S結合を切断し、システインを生成する反応を行う<sup>111)</sup>。しかしながら、生理的条件下では、CSEから産生されるH<sub>2</sub>Sの70%はシステインからセリンに変換する反応により生成する<sup>111)</sup>。

これまで、H<sub>2</sub>S合成酵素としてはCBS、CSEの二つが研究の中心であったが、2009年には3MSTによるH<sub>2</sub>S産生も見出された<sup>112)</sup>。酵素自体は、1953年Meisterらによってラット肝臓から見出された酵素で<sup>113)</sup>、生物界にも広く分布しており、哺乳動物では肝臓、腎臓で最も活性が高く、赤血球にも活性を示す。本酵素はシステインのア

ミノ基転移反応によって生成した 3-メルカプトピルビン酸をピルビン酸に変換させる反応を触媒し、その過程で H<sub>2</sub>S を産生する。

### 3.3.3 活性イオウ分子

これまで述べてきたように、H<sub>2</sub>S による生理活性に関する研究の多くは、ガス状分子としての解釈の域を超えておらず、H<sub>2</sub>S の低い pKa 値に着目した求核剤としての生理的役割に関する研究は少ない。

一般的に生体内でイオウ原子は安定型と不安定型に分類できる。最も安定な還元状態である-2 価 (GSH や Cys などの含硫アミノ酸) で取り込まれ、4 価 (スルフィン酸類: Cys-SO<sub>2</sub>H) に代謝され、最も安定な酸化状態である 6 価 (スルフォン酸類: SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) で存在している<sup>114)</sup> (表 2)。一方、不安定型イオウは還元状態 (0-1 価) を保ったまま何らかの形で蓄えられ、生体内で利用される<sup>114,115)</sup>。1973 年、Westley らは生体内に貯蓄された還元状態のイオウの役割に着目し、スルファンプルの概念を提唱した<sup>116,117)</sup> (図 3)。Westley らによると、生体内にはシアン化物イオン (CN<sup>-</sup>) と反応するのに適した電荷状態にあるイオウの生理的プールが存在し、必要に応じて CN<sup>-</sup> を SCN<sup>-</sup> として解毒排泄し、解毒に消費されないスルファンイオウの一部が、システイン等の合成や、鉄-イオウクラスタータンパク質の合成に用いられるのではないかと予想した。彼らが定義するスルファンイオウは、イオウ原子にのみ共有結合したイオウ原子を指す。しかしながら、これらの存在量は正確に測定されておらず、哺乳動物における生理的な意義については未知な点が多い。

従前の学説では、H<sub>2</sub>S/HS<sup>-</sup> は CBS や CSE から生成される主要産物として認識されていたが、東北大学・赤池らの研究により、H<sub>2</sub>S/HS<sup>-</sup> は 1 次生成物ではなく、システインパースルフィド (-S-SH, -S-SR) およびそれを起点として産生されるポリスルフィド (-S-Sn-H, -S-Sn-R, n>2) であることが見出された (赤池ら未発表データ)。この様に炭素原子に結合しない反応性の高いイオウを含有する物質を“活性イオウ分子”と呼び、生体内で主にシステインおよびグルタチオンのパースルフィド (R-S-SH) およびポリスルフィド (R-S-Sn-R) として存在して、高い抗酸化能および求核性を有する。赤池らの報告によると、特にマウスの肝臓、脳においてはグルタチオンパースルフィド (GS-SH) 濃度が約 0.1 mM と比較的高濃度で検出されており、活性イオウ分子で修飾を受けた細胞内タンパク質が複数存在することも見出されている。これら活性イオウ分子は、システイン残基にイオウ原子が付加すると、 $\alpha$  効果によりチオール基の pKa 値 (pKa = 5~6.2)<sup>118,119)</sup> は低くなることから、MeHg のような親電子物質との反応性が高くなると予想される。



#### 4. 本研究の目的と特色

MeHg の化学的性質のひとつである“親電子性”に注目し，MeHg と極めて反応性の高いGSHやH<sub>2</sub>S/HS<sup>-</sup>様活性イオウ分子などのイオウを構成元素にもつ求核物質を利用した一連の生体防御機構を解明する点が特色である．

本研究では内因性・外因性親電子物質に対する優れた細胞内制御システムを解明するため，MeHg を親電子物質のモデルとして用いて，第1章では，第一のイオウ含有低分子 GSH と MeHg の代謝物である MeHg-SG による S-トランス水銀化を介した，Keap1/Nrf2 システムの活性化に伴う生体防御応答機構を，第2章および第3章では第二のイオウ含有低分子である H<sub>2</sub>S/HS<sup>-</sup>様活性イオウ分子を利用した毒性防御機構の解明を目的とした．

表1. Hard-Soft acid-Base (HASAB) 側による分類

Lewis	Hard	Borderline	Soft
酸	$H^+$ , $Na^+$ , $K^+$ $Mg^{2+}$ , $Ca^{2+}$ , $Mn^{2+}$ $Al^{3+}$ , $Fe^{3+}$ , $Co^{3+}$	$Fe^{2+}$ , $Ni^{2+}$ $Cu^{2+}$ , $Zn^{2+}$ $Pb^{2+}$	$CH_3Hg^+$ , $Hg^+$ , $Hg^{2+}$ $Cu^+$ , $Ag^+$ , $Cd^{2+}$
塩基	$NH_3$ , $RNH_2$ , $ROH$ $H_2O$ , $PO_4^{3-}$ , $SO_a^{2-}$	Pyridine $phNH_2$ $SO_3^{2-}$	$RS^-$ , $CN^-$ , $S^{2-}$ , $S_2O_3^{2-}$

表2. 硫黄の化学形態

酸化数	名称	例
- 2	sulfide	GSH, Cys H <sub>2</sub> S / HS <sup>-</sup>
0	sulfane sulfur elemental sulfur	無機硫黄 (S <sup>0</sup> )
+ 2	sulfenic acid	チオ硫酸イオン (S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup> )
+ 4	inorganic sulfite sulfinic acid	システインスルフィン酸 (Cys-SO <sub>2</sub> H) ヒポタウリン
+ 6	inorganic sulfate sulfonic acid	システイン酸 タウリン スルフォン酸イオン (SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> )

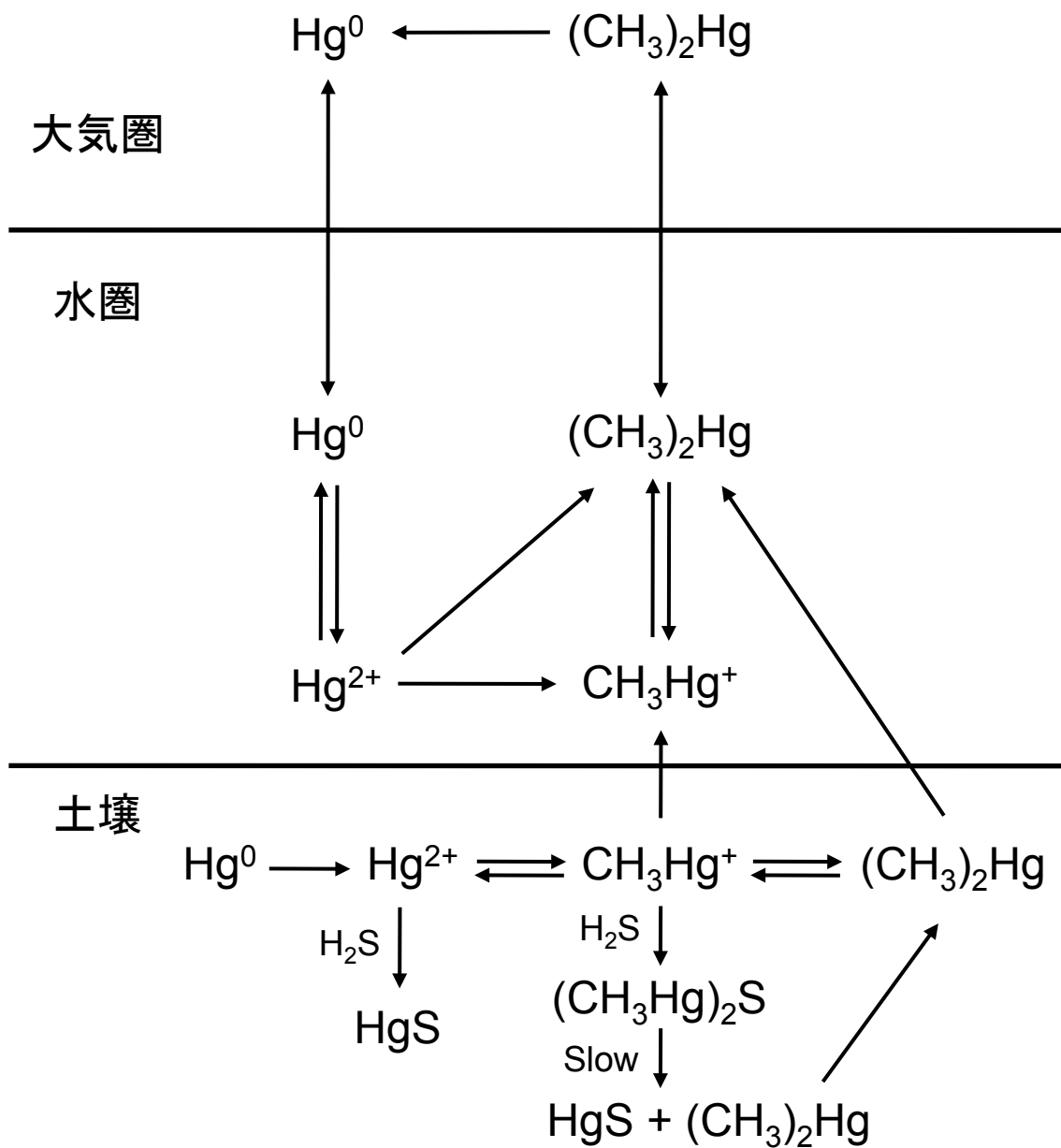


図1. 環境中における水銀動態

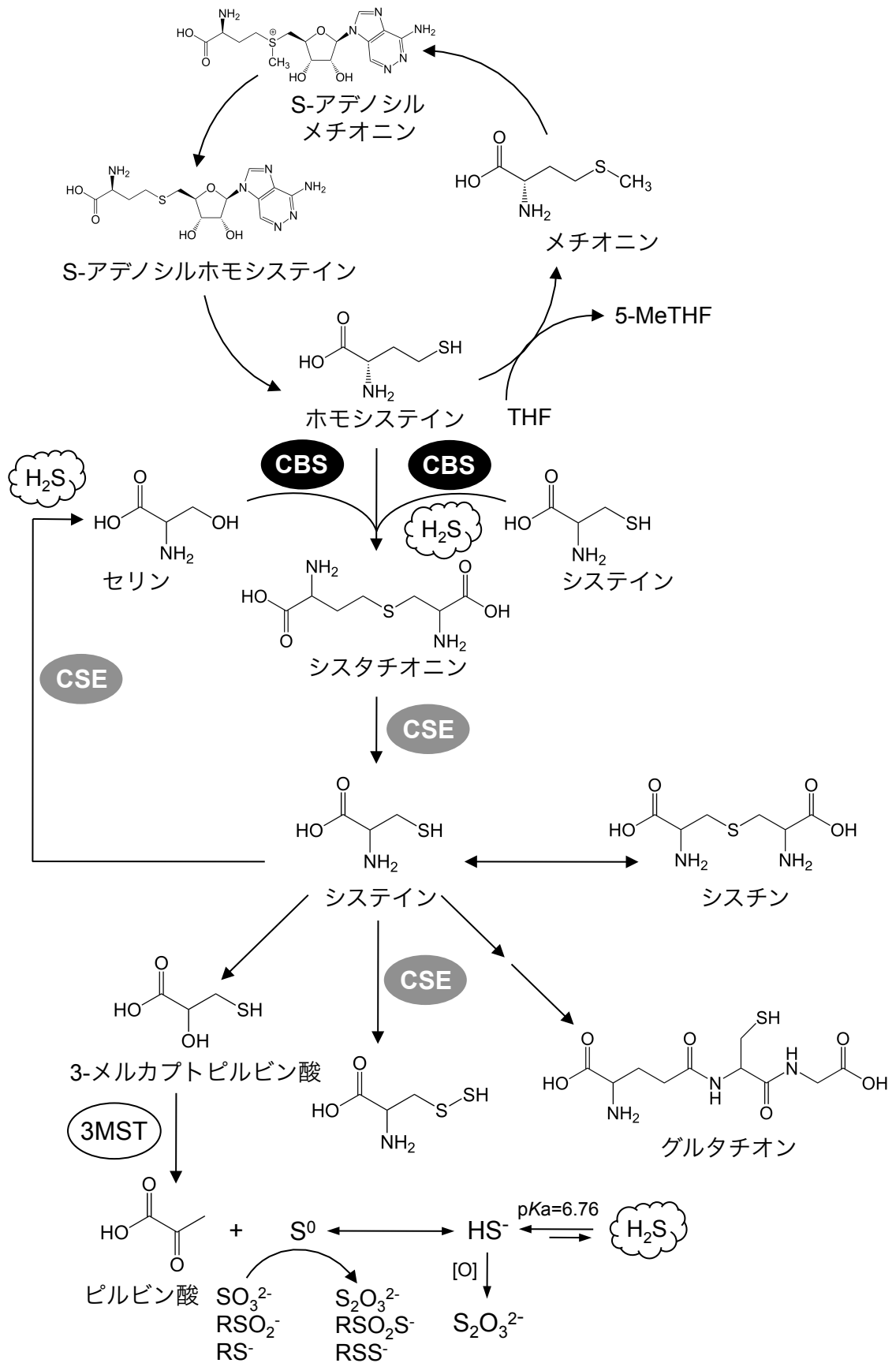


図2. 生体内におけるシステイン合成と異化作用

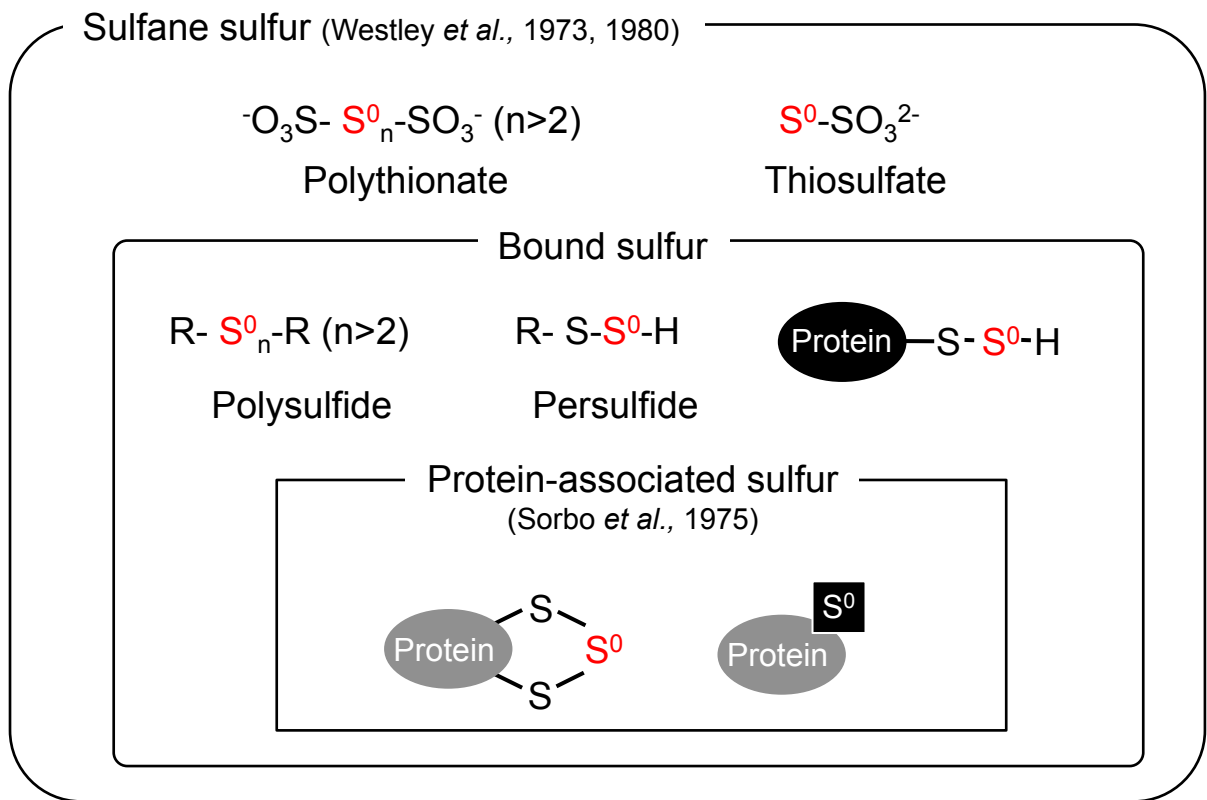


図3. 生体内におけるスルフアンプール

## 方法の部

### 1. 試薬類

本研究で使用した主な試薬は、下記の会社より購入した。特に記載のない試薬については特級試薬を用いた。試薬等の調製に用いた水は、超純水装置ナノピュアダイアモンド D12441 (Barnstead International 社, Dubuque, IA, USA) から得た比抵抗 18.2 M $\Omega$ -cm 以上の超純水 (DDW) を用いた。

#### コニカミノルタヘルスケア社 (東京)

- ・メディカルフィルム

#### 同仁化学研究所社 (熊本)

- ・臭化 3-(4,5-ジメチル-2-チアゾリル)-2,5-ジフェニル-2H-テトラゾリウム (MTT)
- ・Biotin-PEAC<sub>5</sub>-maleimide (BPM)

#### ナカライテスク社 (京都)

- ・アジ化ナトリウム(NaN<sub>3</sub>)
- ・アミノレブリン酸 (ALA)
- ・アセトニトリル [高速液体クロマトグラフ用]
- ・アンピシリン (Amp)
- ・イソプロピル- $\beta$ -チオガラクトピラノシド (IPTG)
- ・ウシ血清アルブミン (BSA)
- ・エチレンジアミン四酢酸四ナトリウム四水和物 (EDTA)
- ・乾燥酵母エキス
- ・ギ酸 [高速液体クロマトグラフ用]
- ・クマシーブリリアントブルー-G-250 (CBB)
- ・グリシン [分子生物学研究用]
- ・グリセロール
- ・クロラムフェニコール
- ・ジチオスレイトール (DTT) [分子生物学用]
- ・システイン
- ・ホモシステイン
- ・トリプトン
- ・ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NADH)
- ・ピリドキサーリン酸 (PLP)
- ・ブロモフェノールブルー (BPB)

- ・ メタノール [高速液体クロマトグラフ用]
- ・ ヨードアセトアミド [分子生物学用]
- ・ プレステインタンパク質分子量マーカー
- ・ Protein assay kit

#### 富士フィルム社 (東京)

- ・ インドール現像液
- ・ レンフィックス定着液

#### 和光純薬工業社 (大阪)

- ・ アクリルアミド [電気泳動用]
- ・ 2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-1,3-プロパンジオール (Tris)
- ・ イミダゾール
- ・ 塩化ナトリウム (NaCl)
- ・ 塩化カリウム (KCl)
- ・ 還元型グルタチオン (GSH)
- ・ 水酸化ナトリウム
- ・ スキムミルク
- ・ スクロース
- ・ ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)
- ・ 2-プロパノール
- ・ ポリオキシエチレン (10) オクチルフェニルエーテル (Triton X-100)
- ・ チオ硫酸ナトリウム
- ・ テトラ硫酸ナトリウム
- ・ ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)
- ・ 過硫酸アンモニウム (APS)
- ・ *N,N'*-メチレンビスアクリルアミド, *N,N,N',N'*-テトラメチレンジアミン (TEMED)
- ・ ジチオスレイトール (DTT)
- ・ 2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-1,3-プロパンジオール (Tris)
- ・ 酢酸
- ・ 塩化水素 (HCl)
- ・ スキムミルク
- ・ エタノール
- ・ 2-プロパノール
- ・ 2-メルカプトエタノール (生化学用)
- ・ Tween 20



- ・ ペニシリン-ストレプトマイシン
- ・ 0.25%トリプシン-EDTA

Abnova 社 (Walnut, CA, USA)

- ・ 抗 CBS 抗体

Calbiochem 社 (La Jolla, CA)

- ・ HRP 標識 Goat 二次抗体
- ・ グルタチオンモノエチルエステル

Cell Signaling Technology 社 (Danvers, MA, USA)

- ・ 西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) 標識抗ウサギ IgG 二次抗体
- ・ HRP 標識抗マウス IgG 二次抗体

Invitrogen 社 (Carlsbad, CA, USA)

- ・ マジックマーク TMXP
- ・ 牛胎児血清 (FBS)
- ・ トリパンブルー
- ・ グルタマックス™

Santa Cruz Biotechnology 社 (Santa Cruz, CA, USA)

- ・ 抗 Keap1 抗体
- ・ 抗 Nrf2 抗体
- ・ 抗 GCLM 抗体

Sigma 社 (San Diego, CA, USA)

- ・ 塩化メチル水銀 (MeHgCl)
- ・ ジメチルスルフォキシド (DMSO)
- ・ プロテアーゼインヒビターカクテル
- ・ 抗 Actin 抗体
- ・ 6-アミノカプロン酸
- ・ 西洋ワサビペルオキシダーゼ標識アビジン (HRP-アビジン)
- ・ LB agar, Miller
- ・ DMEM F12-HAM

STREM CHEMICALS 社 (Newburyport, MA, USA)

- Sodium hydrogen sulfide (NaHS)

STRESSGEN 社 (Victoria, CA)

- 抗 HO-1 抗体

## 2. 化学合成およびその精製

### 2.1. MeHg-グルタチオン抱合体 (MeHg-SG)

MeHg (125 mg) を 25 mL の蒸留水に溶解し, GSH (153 mg) を加え, 30 分間攪拌した. MeHg-GSH 結合体は Ultra Pack ODS-A-40A (40  $\mu$ m, 11 $\times$ 300 mm i.d., Yamazen Science) を用いて, 100% DDW, 流速 2 mL/min で溶出した. 溶出したフラクションは加熱気化原子吸光分析 (AAS) で水銀含有フラクションを確認し, 凍結乾燥を行い白色の粉末個体を得た. さらに, UPLC-MS<sup>E</sup> および <sup>1</sup>H-NMR 解析にて構造決定した.

### 2.2. MeHg-グルタチオンモノエステル結合体 (MeHg-SGEt)

MeHg (13.7 mg) を 5 mL の蒸留水に溶解し, GSH のモノエステル体 (GSEt, 20 mg) を加え, 30 分間攪拌した. MeHg-GSEt 結合体は Ultra Pack ODS-A-40A (40  $\mu$ m, 11 $\times$ 300 mm i.d., Yamazen Science) を用いて, 100% DDW, 流速 2 mL/min で溶出した. 溶出したフラクションは加熱気化原子吸光分析 (AAS) で水銀含有フラクションを確認し, 凍結乾燥を行い白色の粉末個体を得た. さらに, UPLC-MS<sup>E</sup> および <sup>1</sup>H-NMR 解析にて構造決定した.

### 2.3. Bis-methylmercury sulfide ((MeHg)<sub>2</sub>S)

塩化メチル水銀飽和メタノール溶液に, 3.7 M の NaHS を白色の沈殿ができるまで加えた. 得られた銀白色の沈殿をエタノールで再結晶し, DMSO で洗浄後, 質量分析 (EI-MS) および元素分析によって (MeHg)<sub>2</sub>S の生成を確認した.

### 2.4. グルタチオンパースルフィド (GS-S-SG, GS-SH)

25 mM GSSG と 25 mM NaHS を 5 mL の 20 mM Tris-HCl (pH 7.4) 中にて, 室温で 30 分間反応させた. 反応溶液は Ultra Pack ODS-A-40A (40  $\mu$ m, 11 $\times$ 300 mm i.d., Yamazen Science) を用いて, 100% DDW, 流速 1 mL/min で溶出した. 溶出したフラクションは波長 200 nm の吸光度で確認し, 凍結乾燥を行い白色の粉末個体を得た. さらに, UPLC-MS<sup>E</sup> 解析により GS-S-SG の生成を確認した. GS-SH はグルタチオンリダクターゼ (GSR) による酵素反応によって得た. 0.1 mM GS-S-SG, 0.1 mM NADPH および 0.1 U GSR を 20 mM Tris-HCl (pH 7.4) 中にて 25°C, 5 分間反応した.

### 3. 実験動物

飼育室内は、室温  $23 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度  $55 \pm 5\%$ 、明期 14 時間および暗期 10 時間に管理された室内で飼育し、固形飼料と  $5 \mu\text{m}$  のフィルターを通した無菌水を自由に摂取させた。全ての動物実験は、筑波大学が定める動物実験取扱規定に基づいて行った。

#### 3.1. ラット

Wistar 雄性ラット (6 週齢) は、日本クレア社から購入した。

#### 3.2. マウス

C57BL/6J 雄性マウス (8 - 10 週齢) は、日本クレア社から購入した。CSE 野生型 (CSE<sup>+/+</sup>)、CSE 遺伝子欠損 (CSE<sup>-/-</sup>) マウスは、慶応義塾大学薬学部石井功准教授よりご供与頂いた。

### 4. 細胞培養

細胞培養には CO<sub>2</sub> インキュベーター HERA cell (日本ケンドロ社) を用い、 $37^\circ\text{C}$ 、5% CO<sub>2</sub>/95% Air の条件下で培養した。ヒト神経芽細胞 SH-SY5Y は東北大学薬学研究科永沼章教授より譲渡して頂いたものを使用した。培地は DMEM F-12HAM 培地に非働化済みウシ胎児血清 (FBS) を 10%、2 mM L-アラニル-L-グルタミン、100 U/mL ペニシリン、100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ストレプトマイシンとなるように加えたものを基本培地として用いた。FBS の非働化は、 $56^\circ\text{C}$  で 30 分間熱処理後に 1 時間の氷上静置を行った。基本培地から FBS を除いたものを実験培地とし、さらに FBS とペニシリン、ストレプトマイシンを除いたものをトランスフェクション用培地として用いた。継代培養及び細胞サンプルの準備は、細胞が 80-90%コンフルエントの状態になり次第、培地を除去し、D-PBS で洗浄後、0.25%トリプシン-EDTA 溶液を用いて細胞を遊離させ、回収後に遠心し、細胞を基本培地で懸濁した。細胞懸濁液はトリパンブルーで染色して生細胞数をカウントし、10 cm ディッシュには継代培養用として、ウエスタンブロット用には 35 mm ディッシュ、細胞毒性試験用には 96 well プレートに適正細胞数を用意した。適正細胞数及び培地量は表 1 に示す。用意した細胞は 24 時間培養後、基本培地から実験培地に交換し、さらに 12 時間培養後実験を行った。

表 1 各ディッシュ・プレートにおける SH-SY5Y 細胞の適正細胞数

SH-SY5Y 細胞	35 mm	60 mm dish	12 well	96 well
細胞数 (cells/well)	$1 \times 10^5$	$4 \times 10^6$	$4 \times 10^5$	$4 \times 10^4$
培地量 (mL)	2	4	1	0.2

## 5. 細胞生存率の測定法 (MTT 法)

細胞生存率は Denizot らと Mosmann の方法に従い MTT 法により求めた<sup>120,121)</sup>. MTT は D-PBS で 5 mg/mL の濃度で溶解し, 0.22  $\mu$ M Millexfilter (Millipore 社) で濾過滅菌したものを使用した. 96 well プレートで培養した培養培地に対して 1/10 量の MTT を入れ, その後 30 分間培養した. 培地を除いた後, DMSO (100  $\mu$ L) を加えてマイクロプレートリーダーを用いて OD<sub>540</sub> を測定した.

## 6. 酵素溶液の調製

### 6.1. ラット臓器酵素溶液

粗酵素標品調製のために, ラットをジエチルエーテル麻酔下で開胸後, 心採血により屠殺した. 生理食塩水 (0.9%塩化ナトリウム) で十分に還流した後, 肝臓を摘出し, 肝湿重量に対して 4 倍容量の 50 mM KPi buffer (pH 7.4) を加え, テフロンホモジナイザーにより 25%ホモジネート液を調製した. これを 600 x g, 10 分, 4°C で遠心分離し, 得られた上清を 9,000 x g, 10 分, 4°C で遠心分離を行い, 9,000 x g 上清を得た. 得られた溶液は, 使用するまで-80°C で保存した.

### 6.2. マウス臓器酵素溶液

マウスをジエチルエーテル麻酔下で開胸後, 心採血により屠殺した. 生理食塩水 (0.9%塩化ナトリウム) で十分に還流した後, 脳, 心臓, 肝臓, 腎臓, 肺, 精巣を摘出し, 湿重量に対して 4 倍容量の緩衝液 (各実験に準じた緩衝液) を加え, テフロンホモジナイザーにより 25%ホモジネート液を調製した. これを 600 x g, 10 分, 4°C で遠心分離し, 得られた上清を 9,000 x g, 10 分, 4°C で遠心分離を行い, 9,000 x g 上清を得た. さらに, その上清を 105,000 x g, 60 分, 4°C で遠心分離し可溶性画分を得た. 得られた各画分の溶液は, 使用するまで-80°C で保存した.

### 6.3. SH-SY5Y 細胞溶解液

表 1 に準じて用意した細胞を 24 時間培養後, 基本培地から実験培地に交換し, さらに 12 時間培養後実験を行った. その後, SH-SY5Y 細胞を PBS にて洗浄した後, 1 mL の PBS でセルスクレイパーにより細胞を回収し, 超音波破砕機 (OUTPUT 10, DUTY 10 の条件で 5 回) を用いて細胞を破砕し, 13,000 x g, 5 分間, 4°C で遠心分離後, 得られた上清を SH-SY5Y 細胞溶解液とした.

## 7. タンパク質の定量法

### 7.1. BCA 法

試料中にドデシル硫酸ナトリウム (SDS) などの界面活性剤が含まれている場合は, BCA 法を用いた. Smith らの方法<sup>122)</sup>に従い, プロテインアッセイ ビシンコニン酸

キット (ナカライテスク社) を用いた。BCA 試薬 A と試薬 B を 50:1 で混合し、BCA 混合液を作成した。96 穴平底プレートを用いて、BCA 混合液 100  $\mu$ L と適当に希釈した試料を 5  $\mu$ L 加え、37°C で 30 分間反応させた。その後、iMark<sup>TM</sup> Microplate Reader (BIO-RAD 社) を用いて波長 540 nm おける吸光度を測定した。標準タンパク質として BSA (0-2.5 mg/mL) を用いた検量線から、各試料のタンパク質濃度を算出した。

## 7.2. Bradford 法

Bradford の方法<sup>123)</sup> に従い、プロテインアッセイ Bradford 法 (Bio-Rad 社) を用いて行った。0.01 N 水酸化ナトリウムで希釈した試料 (2 mL) に 0.4 mL のプロテインアッセイ試薬を混合し、室温で 15 分間反応させた。その後、波長 595 nm における吸光度を U-1500 spectrophotometer (日立社) で測定した。標準タンパク質として BSA (0-10  $\mu$ g/mL) を用いた検量線から、各試料のタンパク質濃度を算出した。

## 8. タンパク質の分離および検出

### 8.1. Cibacron Blue 3GA カラムクロマトグラフィー

Cibacron Blue 3GA カラムを用いたタンパク質の分離は、田口らの方法<sup>124)</sup> に従って行った。Buffer A (50 mM Tris-HCL (pH 7.2)-0.25 M スクロース) を用いて、6.2 の方法で得られたマウス肝臓可溶性画分を透析チューブに移し、buffer A (2 L) で 4°C、一晚透析した。得られた透析試料 (タンパク質 4 g) を buffer A で平衡化した Cibacron Blue 3GA カラム (100  $\times$  150 mm i.d.) に付した。波長 280 nm のタンパク質吸収ピークが消失するまで、流速 1 mL/min の buffer A でカラムを洗浄し、得られた溶出画分を B-I 画分 (分画番号 3-32) とした。次に 0.5 M 塩化カリウムを含む buffer A を用いてカラムを洗浄し、得られた画分を B-II 画分 (分画番号 35-53) とした。さらに、10 mM NADH および 0.5 M 塩化カリウムを含む buffer A を用いてカラムに親和性の高いタンパク質を溶出し、B-III 画分 (分画番号 60-80) とした。得られた各々の画分は、Ultracell-10K を用いた限外ろ過により濃縮し、3 mL (タンパク質濃度 15 mg/mL) に調製した。

### 8.2. Sephacryl S-100 カラムクロマトグラフィー

8.1 で得られた B-III 画分の 2 mL (タンパク質 10 mg) を 50 mM KPi buffer (pH 7.4) にて 5 mL に調製し Sephacryl S-100 カラム (71  $\times$  25 mm i.d.) に付した。波長 280 nm のタンパク質吸収ピークが消失するまで、流速 1 mL/min の 50 mM KPi buffer (pH 7.4) にて溶出した

### 8.3. SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (SDS-PAGE)

SDS-PAGE は Laemmli らの方法<sup>125)</sup> に従って行った。用意した細胞は PBS で 2 回洗浄後、SDS サンプルバッファー (0.05 M Tris-HCl (pH 6.8), 10% glycerol, 2% SDS) に

より可溶化した。その後 20 分間、95°C で熱処理したものをウエスタンブロット用サンプルとして-20°C で保存した。ウエスタンブロット用サンプルはタンパク質濃度を定量後、終濃度が 1 mg protein/mL となるように DDW で調製し、3x サンプルバッファ (10%グリセリン, 10% 2-ME, BPB) を加え、5 分間、95°C で熱処理したものを泳動サンプルとした。泳動バッファ (2.5 mM Tris, 19.2 mM グリシン, 0.1%SDS) を用い、マーカーには MagicMark™ XP Western Protein Standard (Invitrogen 社) を用いた。アクリルアミドゲルの分離ゲル濃度は 7.5, 10%, 12%および 15%, 濃縮ゲルは 4%とした。クロスパワー1000 (ATTO 社) を使用し、濃縮ゲル泳動中は 10 mA, 分離ゲル泳動中には 20 mA の電流で泳動を行った。

#### 8.4. ウエスタンブロット

ウエスタンブロット法は Towbin らの方法<sup>126)</sup> に従って行った。SDS-PAGE 法にて電気泳動したゲル中のタンパク質をホライズブロット (ATTO 社) を用いて、事前に 20 秒間メタノール処理し DDW 中に浸しておいたポリビニリデンフルオライド (PVDF) 膜に転写した。転写条件はクロスパワー1000 を用いて 2 mA/cm<sup>2</sup> で 1 時間とした。転写時のブロットティング液は 1 液 (0.3 M Tris, 10%メタノール), 2 液 (25 mM Tris), 3 液 (25 mM Tris, 10%メタノール, 40 mM 6-アミノカプロン酸) を用いた。転写された PVDF 膜はブロットティング液 (5%スキムミルク-TTBS [100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 2.5 M NaCl, 0.05%Tween 20]) によりブロッキングを 1 時間震盪しながら行った。ブロッキング液を除いた後、TTBS にて 10 分間の洗浄を 3 回繰り返した。条件に合わせ希釈した一次抗体を反応させ、反応後に TTBS にて 10 分間の洗浄を 3 回繰り返した。その後、HRP 標識二次抗体を 1 時間反応させた。TTBS による 10 分間の洗浄を 3 回繰り返し、ウエスタンブロットティング検出試薬 Chemi-Lumi One (ナカライテスク社) を用いて検出を行った。現像は、現像液 (レンドール溶液), 停止液 (2%酢酸), 定着液 (レンフィックス溶液) の順で行った。

#### 8.5. ビオチンマレイミドラベル法 (BPM 標識法)

BPM 標識法は外山らの方法<sup>127)</sup> に従って行った。

##### 8.5.1 精製タンパク質を用いた BPM 標識法

リコンビナント mKeap1 タンパク質 (1 μg) は、20 mM Tris-HCl (pH 8.5) 中で MeHg (100, 500 μM) および MeHg-SG (100, 500 μM), 0.25 mM の Biotin-PEAC<sub>5</sub>-maleimide (BPM) を 1 μL 加え、25°C, 30 分間反応した。2-ME 不含の 3x サンプルバッファを 10 μL と DDW を 10 μL 加えて、95°C, 5 分の加熱を行ったのち、15 μL を SDS-PAGE に供し、ウエスタンブロットを行い、アビジン-HRP にて検出した。

### 8.5.2 培養細胞を用いた BPM 標識法

RIPA バッファーで回収した細胞溶解液 (100  $\mu$ L) に 5 mM の BPM を 1  $\mu$ L 加えて、37°C で 30 分間反応させた。反応液に 25  $\mu$ L のアビジン-アガロースを加えて、4°C で一晩、沈降反応を行った。13,000 rpm, 1 分間、4°C 遠心分離で上清を取り除き、RIPA バッファーを 1 mL 加えて 2 回洗浄した。沈降したアガロースに 3×サンプルバッファー (10%グリセロール, 10% 2-ME, BPB) を 20  $\mu$ L 加えて、95°C, 5 分の加熱を行ったのち、全量を SDS-PAGE に供した。ウエスタンブロットの一次抗体には標的とするタンパク質に対する抗体を用いた。

## 9. 核酸の検出

### 9.1. mRNA の抽出

SH-SY5Y 細胞を 35 mm ディッシュに用意し、MeHg および MeHg-SGEt を 6 時間曝露した。mRNA の回収は RNeasy Mini Kit (QIAGEN 社) を用い、添付のプロトコルに従って行った。曝露後に回収した細胞を PBS で二回洗浄後、Buffer RLT Lysis buffer を 350  $\mu$ L ずつ入れて回収したサンプルに、350  $\mu$ L の 70%エタノールを加えた。各サンプル全量を RNeasy スピカラムに移し、10,000 x g, 1 分間、室温で遠心分離を行い、通過液を廃棄し、700  $\mu$ L の Buffer RW1 をカラムに添加した。10,000 x g, 1 分間、室温で遠心分離を行い、通過液を廃棄した後、カラムに 500  $\mu$ L の Buffer RPE を添加して、10,000 x g, 1 分間、室温で遠心分離を行った。エタノールを完全に除去するため、通過液を廃棄した後、再び 10,000 x g, 室温で 2 分間の遠心分離を行った。20  $\mu$ L の滅菌済み DDW をカラムに添加し、10,000 x g, 1 分間、室温で遠心分離することで mRNA を溶出した。RNA の濃度および純度は、NanoDrop ND-100 (NanoDrop Technologies) により決定した。

### 9.2. リアルタイム RT-PCR 法による mRNA の定量

RT-PCR 法による cDNA の合成には、High Capacity RNA-to-cDNA<sup>TM</sup> Kit (Applied Biosystems) を用い、添付文書に従って行った。GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems) を使用し、37°C, 60 分で逆転写反応させたのち、95°C, 5 分で反応を停止させた。得られた 0.6 ng の cDNA を、10  $\mu$ M に希釈した各プライマー (0.6  $\mu$ L, プライマー配列は表 2 に記載) および 15  $\mu$ L の Power SYBER GREEN PCR master mix と混合し DDW で 30  $\mu$ L に調製しリアルタイム RT-PCR を行った。PCR 条件は 50°C で 2 分、95°C で 10 分の初期反応後、95°C で 15 秒、60°C で 1 分を 1 サイクルとし、42 サイクル行った。リアルタイム RT-PCR および分析には Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System を用いた。mRNA 発現解析は、得られた GCLM, GCLC, HO-1, xCT の測定値を B2M の測定値で補正した。

表2 ヒト遺伝子に対するプライマーの塩基配列および増幅サイズ

遺伝子	センスプライマー (5'-3')	アンチセンスプライマー (5'-3')	PCR 産物 (bp)
<i>GCLM</i>	CCAGATGTCTTGGAATGCACTGTA	GCTGTGCAACTCCAAGGACTGA	166
<i>GCLC</i>	ATCTACGAACAGCTGTTGCAGGAA	ATTGTCTGCCAATTTGTGGACTGA	139
<i>HO-1</i>	GCCACCAAGTTCAAGCAGCTCTA	AGCAGCTCCTGCAACTCCTCAA	139
<i>xCT</i>	ATGTCCGCAAGCACACTCCTCTA	TCGAAGATAAATCAGCCCAGCAA	158
<i>B2M</i>	GGGTTTCATCCATCCGACATTG	GTTACACGGCAGGCATACTCA	165

## 10. 遺伝子導入法

### 10.1. 細胞高発現用ベクターの導入

遺伝子導入はリポフェクション法により行った。遺伝子導入試薬は Lipofectamine2000 (Invitrogen 社) を用い、付属のマニュアルに準じて行った。SH-SY5Y を  $1 \times 10^6$  cells/dish で 35 mm ディッシュ、もしくは  $2 \times 10^5$  cells/well で 96 well プレートに用意し、24 時間培養後、培地をトランスフェクション培地 (FBS, ペニシリン-ストレプトマイシン不含培地) に交換した。次に OPTI-MEM に hCBS/pcDNA3.1 を適量加えたものと、OPTI-MEM に Lipofectamine2000 を適量加えたものを用意し、5 分間室温で静置した。各ディッシュ・プレートにおける DNA および Lipofectamine2000 の量を表に示す。この 2 つの液を混ぜ合わせ 20 分間室温で静置することにより Lipofectamine-DNA 複合体溶液を形成した。これを培地に添加し、24 時間培養することで遺伝子導入した。

表3 遺伝子導入における DNA および Lipofectamine 2000 の適正量

	Medium (μL)	OPTI-MEM (μL)	Lipofectamine 2000 (μL)	1 μg/μL DNA (μL)
35 mm dish	1,500	250	10	4
96 well plate	150	25	0.5	0.2

### 10.2. Small interfering RNA (siRNA) の導入

CBS siRNA 及び対照群 siRNA は QIAGEN 社から購入した。siRNA はエンドトキシンフリーの TE 緩衝液で 20 μM となるように調製し、 $-20^{\circ}\text{C}$  で保存した。siRNA の細胞への導入は RNAi MAX (QIAGEN 社) により、付属のマニュアルに準じて行った。SH-SY5Y 細胞を  $2 \times 10^5$  cells/mL で調製し、35 mm ディッシュ、96 well プレートに用意し 12 時間培養した後、50%コンフルエントの培養細胞に siRNA を遺伝子導入した。OPTI-MEM に siRNA を適量加えたものと、OPTI-MEM に RNAi MAX を適量加えたも



のを用意し、5 分間室温で静置した。各ディッシュ・プレートにおける siRNA 及び RNAi MAX の適正量を表に示す。この 2 つの液を混ぜ合わせ 20 分間室温で静置することにより RNAi MAX-siRNA 複合体溶液を形成した。これを細胞に添加し、24 時間培養することで siRNA を細胞に遺伝子導入した。その後、実験培地に交換し 24 時間培養後、実験に用いた。

表 4 遺伝子導入における siRNA 及び RNAi MAX の適正量

	Medium ( $\mu\text{L}$ )	OPTI-MEM ( $\mu\text{L}$ )	RNAi MAX ( $\mu\text{L}$ )	siRNA ( $\mu\text{L}$ )
35 mm dish	1,500	200	6	5
96 well plate	150	50	0.6	0.5

## 11. 転写活性化能の測定 (ARE-ルシフェラーゼ法)

転写活性化能の測定は Dual-Luciferase Assay System (Promega 社) を用いて、付属のマニュアルに準じて行った。表 1 に従って SH-SY5Y 細胞を 12 well プレートに用意すると同時に、1 well あたり Ya ARE TATA-Luciferase (2  $\mu\text{g}$ ) と pRL-TK (0.2  $\mu\text{g}$ ) を Lipofectamine200 を用いて遺伝子導入し、12 時間曝露した。細胞を PBS で 2 回洗浄後、passive lysis buffer (100  $\mu\text{L}$ ) で回収し、vortex にて 15 秒攪拌し、13,000 x g, 2 分間、4°C で遠心分離を行い、20  $\mu\text{L}$  の上清を分取した。上清 20  $\mu\text{L}$  に対して 50  $\mu\text{L}$  の Luciferase assay reagent (ホタルルシフェリン) を加えピッペッティングにより混和し、TD20/20 ルミノメーター (Turner Designs 社) にてルシフェラーゼ活性を測定した。さらに、50  $\mu\text{L}$  の Stop & Glo reagent (ウミシイタケルシフェリン) を加え vortex にて攪拌し再測定した。転写活性化能はウミシイタケルシフェラーゼの値を補正值として用いた。

## 12. 生体試料からの疎水性水銀化合物の抽出法

SH-SY5Y 細胞、ラットおよびマウス肝臓等の生体試料から疎水性水銀を抽出する方法を下記に示す。方法の部 6 に記載した方法で処理することにより、細胞および肝 9,000 x g 上清を得た。上清をメスフラスコに移し全量 15 mL とし、その一部 (10 mL) を分析試料とした。分析試料と等量の 10%TCA (10 mL) を用いて除タンパクし、9,000 x g, 5 分間、4°C で遠心分離を行い、得られた上清の一部 (10 mL) を分取し、3 倍量の 1 M Tris-HCl (pH 8.0) にて分析試料の pH を調製した。その後、メタノール 5 mL、水 20 mL で前処理した Sep-Pak C<sub>18</sub> cartridge に 30 mL の分析試料を付した。これを水 5 mL で洗った後、メタノール 1.5 mL で溶出し、この溶出液にメタノールを加えて全量 2 mL とした。2 mL に調製した溶出液はエバポレーターを用いて乾固後、100  $\mu\text{L}$  の 10% メタノールに可溶化し HPLC-AAS に供し、EI-MS にて質量分析した。

### 13. 総無機水銀の抽出法

50 mM KPi (pH 7.4) 中で 1 g/mL 肝 9,000 x g 上清もしくは 50 mM KPi buffer (pH 7.4) (500  $\mu$ L), 10 mM (MeHg)<sub>2</sub>S (50  $\mu$ L)を加え, 1.5 mL に調製した. 本サンプルを 37°C で反応させ経時時間毎に回収した. 反応液 500  $\mu$ L に 6N HCl を 100  $\mu$ L 加え, ベンゼン (600  $\mu$ L) にて液-液抽出を行った. 13,000 x g で遠心分離後, 上清を回収し更にベンゼンを等量加え, 本抽出作業を 4 回繰り返した. 集めたベンゼン層は AAS に 100  $\mu$ L ずつ供し水銀量を測定した. 水層には 500  $\mu$ L の 1.71 N NaOH を加えることで中性化し AAS にて水銀量を測定した. ベンゼン層には有機水銀化合物が, 水層には無機水銀化合物が分配される.

### 14. タンパク質の精製

#### 14.1. 大腸菌用培地の調製

乾燥酵母エキス (5 g/L), トリプトン (10 g/L) および塩化ナトリウム (5 g/L)をイオン交換水に溶解し, オートクレーブ滅菌を行い, 使用前にアンピシリンを終濃度 20  $\mu$ g/mL となるように加えて Lysogeny Broth (LB 培地) とした.

LB 寒天培地は, 37 g/L の LB agar, Miller をイオン交換水に溶解し, オートクレーブ滅菌を行い, 約 50°C に冷めた後にアンピシリンを終濃度 20  $\mu$ g/mL となるように加えて, シャーレに分注した. 十分に固まったら, 遮光して 4°C で保存した.

Super Optimal broth with Catabolite repression (SOC 培地) は, 乾燥酵母エキス (5 g/L), トリプトン (20 g/L) および塩化ナトリウム (0.5 g/L) をイオン交換水に溶解し, オートクレーブ滅菌を行い, 十分に冷えた培地にフィルター滅菌済みの 1 M 塩化マグネシウム (10 mL), 1 M 硫酸マグネシウム (10 mL) および 2 M グルコース (1 mL) を添加し, 使用するまで 4°C, 遮光下で保存した.

#### 14.2. マウス Keap1 タンパク質の精製

マウス Keap1 高発現大腸菌 BL21 株を 0.01% ampicillin, 0.034% chloramphenicol を含む LB 培地 500 mL 中にて 37°C で OD<sub>600</sub> = 0.7-0.9 になるまで培養後, イソプロピル- $\beta$ -チオガラクトピラノシド (IPTG) を最終濃度 1 mM になるように加え, さらに 27°C で 72 時間培養した. 以下に示す操作は全て 4°C にて行った. 培養菌液から菌体を遠心分離 (5,000 x g, 10 分, 4°C) により回収し, 菌体沈殿物の体積と等量の破碎緩衝液 [50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.1 M 塩化ナトリウム, 5%グリセロール, 5 mM 2-メルカプトエタノール]を加えて菌体を超音波破碎して, 105,000 x g, 1 時間, 4°C で遠心分離を行った. 得られた上清を, 平衡化緩衝液 [50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.1 M 塩化ナトリウム, 5 mM 2-メルカプトエタノール] で平衡化した nickel-chelating resin カラム (50 $\times$ 10 mm i.d.) に付し, 100 mM イミダゾール含平衡化バッファーで溶出し, 波長 280 nm の吸光度および SDS-PAGE により Keap1 の単一画分を調べた. 得られた

Keap1 は、限外ろ過 (6,000 x g, 10 分, 4°C) にて精製酵素用緩衝液 [20 mM Tris-HCl (pH 8.5)] に置換し, -80°C で保存した. 得られたタンパク質溶液を方法の部 7.2 に記載した Bradford 法を用いてタンパク質濃度を測定した.

### 14.3. ヒト CBS タンパク質の精製

#### 14.3.1 ヒト CBS タンパク質の精製

大腸菌高発現システムを用いたタンパク質精製のプラスミドとして, ヒト CBS の全長が組み込まれた hCBS/pcSC<sup>128</sup>)を用いて, GST-tag 付きタンパク質発現用ベクター pGEX-6P-1 の *EcoR* I および *Xho* I の間に組み込んだ. hCBS/pGEX-6P-1 により形質転換した BL21 (DE3) 株の大腸菌を, LB-Amp 寒天培地上で, 37°C, 12 時間培養し, シングルコロニーを LB-Amp 培地で 120 rpm, 37°C, 12 時間培養した. 得られた培養液を LB-Amp 培地に培地量の 1/100 (v/v) 植え継ぎ, 37°C で OD<sub>600</sub> = 0.5 になるまで培養後, IPTG を最終濃度 0.5 mM, 7 アミノレブリン酸を 75 mg/mL になるように加え, さらに 30°C, 16 時間培養した. 発現確認は, 遠心分離で回収した菌体を滅菌水で懸濁し超音波破碎したものをサンプルとして, SDS-PAGE 後 GST-tag, CBS 抗体を用いた WB 分析にて行った. 得られた hCBS 高発現大腸菌株 (BL21-hCBS/pGEX-6-1) は, シングルコロニーを LB-Amp 培地で培養後, 培養液に等量の 30%グリセロール (グリセロールストップ) を加え, -80°C で保存した.

hCBS 高発現大腸菌株 (BL21-hCBS/pGEX-6-1) をグリセロールストックから起こし, 滅菌済みの LB-Amp 培地 10 mL に植菌し, 120 rpm, 37°C, 12 時間培養した. 培養した大腸菌を B-Amp 培地 250 mL 中にて 37°C で OD<sub>600</sub> = 0.5 になるまで培養後, IPTG を最終濃度 0.5 mM, アミノレブリン酸を 75 mg/mL になるように加え, さらに 30°C, 16 時間培養した. 以下に示す操作は全て 4°C にて行った. この培養液を 5,000 x g で 15 分間遠心分離し, 得られた菌体に 1% Triton X-100, 100 μM PLP, 5 mM DDT を含む 50 mM KPi buffer (pH 7.8) 10 ml を加え懸濁した後, 超音波処理により大腸菌細胞を破壊した. 得られたホモジネートを, 105,000 x g で 60 min 遠心分離し, その上清を大腸菌可溶性画分とした.

大腸菌可溶性画分からの発現 hGSTP1-1 の単離・精製は, 上記において調製された大腸菌画分を binding buffer [PBS (pH 7.4), 20 mM DTT] で平衡化された GSTrap 4B カラム (GE ヘルスケア) に付した. ついで 10 mL binding buffer にて同アフィニティーカラムの非吸着タンパク質を完全に洗浄後, 吸着タンパク質を PreScission protease (0.5 U/mg of protein) を含む cleavage buffer [50 mM Tris-HCl (pH 7.0), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT] にて 4°C で 12 時間反応させ, GST-tag を切断した. 20 mM GSH, 20 mM DDT を含む 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) (10 ml)にて溶出した. なお, カラムの溶出速度は 0.5 ml/min とした. 目的タンパク質を含むフラクションを限外ろ過 (6,000 x g, 10 分, 4°C) にて精製酵素用緩衝液 [50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 2 mM DTT] に置換し,

-80°C で保存した。得られたタンパク質溶液を方法の部 7.2 に記載した Bradford 法を用いてタンパク質濃度を測定し、-80°C で保存した。

#### 14.3.2 ヒト CBS 酵素反応溶液の組成ならびに反応条件

CBS の酵素反応は 2 段階の反応で行った。はじめに、CBS の基質を反応させた。反応溶液は、以下に示すようにリコンビナント hCBS, 10 mM ホモシステイン, 2 mM PLP および 50 mM KPi buffer (pH 7.0) から成り、25°C で 4 分間事前に反応させた後、10 mM システインを加え、全量を 500  $\mu$ L とし、25°C で 30 分間反応させた。

##### [反応溶液 A]

500 mM KPi buffer (pH 7.0)	50 $\mu$ L
DDW	240 $\mu$ L
0.1 $\mu$ g/ $\mu$ L リコンビナント hCBS	10 $\mu$ L
100 mM ホモシステイン	50 $\mu$ L
10 mM PLP	100 $\mu$ L
100 mM システイン	50 $\mu$ L
<hr/>	
反応溶液全量	500 $\mu$ L

反応溶液 A に 500 mM MeHg を 10  $\mu$ L 加え、25°C で 30 分間反応させた。

##### [反応溶液 B]

反応溶液 A	500 $\mu$ L
500 mM MeHg	10 $\mu$ L
<hr/>	
反応溶液全量	510 $\mu$ L

反応終了時に、10%TCA を 500  $\mu$ L 加え反応を停止させた。その後、方法の部 12 に記載した方法で(MeHg)<sub>2</sub>S を抽出した。

#### 14.4. ヒト GSTP1 タンパク質の精製

発現プラスミド hGSTP1-1/pRB269 により形質転換した大腸菌を、東京薬科大学平塚明教授らに譲渡して頂いた。発現プラスミド hGSTP1-1/pRB269 および pRB173 により形質転換した大腸菌を、0.01% アンピシリン、0.034% クロラムフェニコールを含む LB 培地 500 mL 中にて 37°C で OD<sub>600</sub> = 0.7-0.9 になるまで培養後、IPTG を最終濃度 0.1 mM になるように加え、さらに 3 時間培養した。以下に示す操作は全て 4°C に行った。この培養液を 5,000 x g で 15 分間遠心分離し、得られた菌体に 150 mM NaCl および 4 mg/ml lysozyme を含む 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5) (buffer A) 40 ml を加

え懸濁した後、再び 5,000 x g で 15 min 遠心分離した。ついで得られた菌体を buffer A (6 mL) で再懸濁し、氷中で 1 hr 放置後、超音波処理により大腸菌細胞を破壊した。得られたホモジネートを、105,000 x g で 60 min 遠心分離し、その上清を大腸菌可溶性画分とした。

大腸菌可溶性画分からの発現 hGSTP1-1 の単離・精製は、Baker らの方法<sup>129)</sup> に準拠して行った。すなわち、上記において調製された大腸菌画分を 150 mM NaCl を含む 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5) (buffer B) で平衡化された GSH Sepharose 6B カラム (1.0 x 7.5 cm) に付した。ついで buffer B にて同アフィニティーカラムの非吸着タンパク質を完全に洗浄後、吸着タンパク質を 10 mM GSH を含む buffer B (20 ml) にて溶出した。なお、カラムの溶出速度は 0.5 ml/min とした。目的タンパク質を含むフラクションを 1 L の buffer B で 6 時間、3 回透析し、精製酵素溶液中の GSH を除いた。得られたタンパク質溶液を方法の部 7.2 に記載した Bradford 法を用いてタンパク質濃度を測定し、-80°C で保存した。

#### 14.5. ヒト GSTP1 変異体タンパク質の精製

ヒト GSTP1 の各アミノ酸変異体は site-directed mutagenesis 法により塩基置換を導入した。大腸菌から得られたメチル化 hGSTP1-1/pRB269 をテンプレートとして、以下に示すプライマーを用いて変異体のプラスミドを作成した。PCR に用いたプライマーは変異を入れるアミノ酸残基の前後約 30 bp 長の相補鎖プライマーを設計した。

設計したプライマーでプラスミドの全長を、QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit (アジレント・テクノロジー社) を用いて PCR により増幅し、Dpn I 処理してメチル化テンプレート DNA を消化した PCR 産物を用いて大腸菌 XL-1 に形質転換した。得られシステイン変異体株の大腸菌も方法の部 14.4 に記載した方法でタンパク質を精製した。

表 5 ヒト GSTP1 のシステイン変異体作成に使用したプライマー

hGSTP1	プライマー
C15S	F : TTTCCCAGTTCGAGGCCCGCAGCGCGGCCCTGCGCATGCTG R : CAGCATGCGCAGGGCCGCGCTGCGGCCTCGAACTGGGAAA
C48S	F : ACTCAAAGCCTCCTCCCTATAACGGGCAGCT R : AGCTGCCCGTATAGGGAGGAGGCTTTGAGT
C102S	F : AGGACCTCCGCTCCAAATACATCTC R : GAGATGTATTTGGAGCGGAGGTCCT
C170S	F : ATGAGGTCCTAGCCCCTGGCTCCCTGGATGCGTTC R : GAACGCATCCAGGGAGCCAGGGGCTAGGACCTCAT

## 15. (MeHg)<sub>2</sub>S 法によるタンパク質結合活性イオウ分子の検出

a. カラムクロマトグラフィー各画分からの検出:各画分 450  $\mu$ L および 5 mM MeHg 50  $\mu$ L (終濃度 500  $\mu$ M, 250 nmol) からなる反応液を 25°C で 1 時間反応させた. 反応終了時に, 10%TCA を 500  $\mu$ L 加え反応を停止させた. その後, 方法の部 12 に記載した方法で(MeHg)<sub>2</sub>S を抽出した.

b. リコンビナント hGSTP1 からの検出:反応溶液は, 以下に示すようにリコンビナント hGSTP1, 8  $\mu$ M MeHg, 50 mM Tris-HCl (pH 7.4) から成り, 全量を 500  $\mu$ L とした. この反応溶液を 25°C で 1 時間反応させた. 反応終了時に, 10%TCA を 500  $\mu$ L 加え反応を停止させた. その後, 方法の部 12 に記載した方法で(MeHg)<sub>2</sub>S を抽出した.

500 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4)	50 $\mu$ L
DDW	350 $\mu$ L
2 $\mu$ g/ $\mu$ L リコンビナント hGSTP1 (100 $\mu$ g, 4 nmol)	50 $\mu$ L
80 $\mu$ M MeHg (終濃度 8 $\mu$ M, 16 nmol)	50 $\mu$ L
反応溶液全量	500 $\mu$ L

## 16. 機器分析

### 16.1. 高速液体クロマトグラフィー (HPLC)–多重極型電気化学検出器 (ECD) による GSH の分析

GSH 量の定量は, Vignaud らの方法<sup>130)</sup>に従って行った. 細胞を 1 mM EDTA により回収して, 超音波破碎機 (OUTPUT 3, DUTY 20, 10 回) で破碎した後, 13,000 g, 4°C で 10 分間の遠心分離を行い, 遠心上清を回収した. 得られた細胞溶解液に等量の 20 mM リン酸アンモニウム (pH 2.5)-1.8% (v/v) アセトニトリルを加え, Ultrafree-MC (5,000 NMLW, Millipore 社) を用いて, 13,000 x g, 4°C で 15 分間の遠心操作により濾液を分取し, サンプルとした. サンプル (20  $\mu$ L) は直ちに HPLC-ECD system で分析した. 移動相には, アセトニトリル—20 mM リン酸アンモニウム (pH 2.5) (0.9 : 49.1, v/v)を用い, 流速は 0.6 mL/min で行った. ECD の条件は, ガードセル (E: 800 mV), チャンネル 1 (E: 450 mV, R: 10  $\mu$ A, Filter: 10 sec), チャンネル 2 (E: 600 mV, R: 10  $\mu$ A, Filter: 10 sec) を用いた. 得られた GSH 量は, 方法 7.1 に従って求めた細胞溶解液のタンパク質量で補正した.

### 16.2. 加熱気化原子吸光法 (AAS) による水銀量の測定

生体試料中における水銀量の測定は MA-3000 加熱気化原子吸光計 (日本インスツルメンツ) により測定した. 測定は 0.4 L/min の純酸素ガス通気のもと 180°C で 120 秒の加熱後 850°C, 120 秒間加熱することで水銀元素を気化し, 水銀原子特有のスペ

クトルである 253.7 nm の波長を計測した。本測定前に、空のサンプルボードを上記条件のもと加熱することで、バックグラウンドの水銀を排除し水銀が検出されないことを確認した。なお本条件における水銀の検出限界は 0.001 ng であつた。検出量およびデータ処理は MA3 win ver1.4.2 にて行った。臓器の場合、細片した臓器を測り取り、サンプルボードにのせて AAS に供した。溶液中の水銀量の場合は、Hg を吸着させる添加剤 B を適量サンプルボードに取り、試料の水銀濃度を鑑みて 10-100  $\mu$ L のサンプル溶液を加えて AAS に供した。

### 16.3. HPLC-AAS による MeHg およびその関連化合物の測定

MeHg や (MeHg)<sub>2</sub>S などの疎水性水銀化合物は HPLC で分離した後、各分画を方法の部 16.2 に記載した AAS 法にて検出した。HPLC システムはシステムコントローラー (CBM-20A, 島津社), 送液ポンプ (LC-10AT, 島津社), フラクションコレクター (FRC-10A, 島津社) およびインジェクター (Model 7125, レオダイン社) からなる。ガードカラムは, YMC-Pack ODS-AM 用カードリッジカラム (23  $\times$  4.0 mm i.d., 5  $\mu$ M, YMC 社) を, カラムには Zorbax Eclipse XDB-C18 カラム (50 $\times$ 2.1 mm i.d., particle size 5  $\mu$ m, アジレント・テクノロジー社) を用いた。疎水性水銀を分離する際の移動相は 0.1% ギ酸-メタノール (9:1, v/v) を用いて, 流速 0.5 mL/min で分離した。1 分毎に画分 (500  $\mu$ L) を回収し, 各々の画分の水銀量を AAS にて測定した。

### 16.4. 質量分析法 (MS) による分析

(MeHg)<sub>2</sub>S の MS 解析は, 電子衝撃イオン化分析法 (EI-MS) により質量解析を行った。EI-MS では, 分析装置として GCMS-QP1100EX (島津製作所) を使用した。専用のサンプル瓶に, 試料を葉さじにひとかけら入れ, 機器にセットして測定した。MS 部分のみを使用し質量分析を行った。m/z は化合物の質量にあわせて 100-1000 の範囲で分析した。イオン源温度は 250 $^{\circ}$ C で, 10 分を目安に分析を行った。

### 16.5. 超高性能液体クロマトグラフィー (UPLC)-エレクトロスプレーイオン化質量分析計 (ESI-MS) による低分子化合物の同定

MeHg-SG, MeHg-SGEt および MeHg-S-SO<sub>3</sub>H などの低分子化合物の分析は UPLC-MS<sup>E</sup> system で行った。カラムには ACQUITY UPLC BEH C18 Column (50 $\times$ 2.1 mm i.d., Waters 社) を用いた。UPLC-MS<sup>E</sup> system の移動相は, 0.1% ギ酸 (A) とアセトニトリル (B) を用い, 流速は 0.3 mL/min で行った。移動相の濃度勾配は, はじめの 4 分間を 3% B, 4-8 分を 3% B から 95% B までの直線勾配, 1 分間を 95% B で行い, 9-10 分で 3% B に戻して 1 分間流した。カラム温度 35 $^{\circ}$ C, MS 測定範囲 m/z 50-1000, ネガティブイオンモード, キャピラリー電圧 2.8 kV, コーン電圧 25 V, コリジョンエネルギー 6 eV (MS), 20-30 eV (MS<sup>E</sup>), ソース温度 100 $^{\circ}$ C の条件下で行った。得られたデ

ータの解析は、MassLynx ver.4.1 software および ProteinLynx Global Server Browser ver.2.3 software (Waters 社) を使用した。

#### 16.6. nanoUPLC – Elevated Energy MS (MS<sup>E</sup>) による高分子の分析

20 mM Tris-HCl (pH 8.4) 中で、mKeap1 精製タンパク質 (9 μg, 4.2 μM) を 8.4 μM の MeHg または MeHg-SG と 25°C, 30 分間反応させた。反応溶液を SDS-PAGE で分離し、得られたゲル上の Keap1 タンパク質のバンドを切り取り、50 mM 重炭酸アンモニウム溶液 (ABS)-50% アセトニトリルで 10 分間洗浄し、CBB 色素が脱色されるまで洗浄を繰り返した。タンパク質同定サンプルも同様に、SDS-PAGE で分離後、目的のバンドを切り出し同様の処理を行った。ゲル内のタンパク質を 50 mM ABS-10 mM TCEP (100 μL) で 56°C, 1 時間還元し、その溶液を 50 mM ABS—55 mM ヨードアセトアミド (100 μL) に置換して 25°C, 遮光下でアルキル化反応を 45 分間行った。50 mM ABS—50%アセトニトリルで 10 分間、2 回洗浄した後、100%アセトニトリル (100 μL) でゲルを脱水し、ゲルを風乾した後、20 ng の MS grade 修飾済みトリプシン (Promega 社) を含む 50 mM ABS (10 μL) をゲルに染み込ませて、37°C で 16 時間静置してタンパク質の消化を行った。消化処理したゲルは、15 μL のアセトニトリル—トリフルオロ酢酸—DDW (50 : 0.1 : 49.9, by vol) 中でよく混和し、ペプチド断片を抽出した。得られたペプチド断片は、nanoUPLC- elevated energy MS (MS<sup>E</sup>) system で分析した。ガードカラムは、nanoACQUITY UPLC Symmetry C18 Trapping Column (20×0.18 mm i.d., Waters 社) を、カラムには nanoACQUITY UPLC BEH130 C18 Column (100×0.75 mm i.d., Waters 社) を用いた。NanoUPLC-MS<sup>E</sup> system の移動相は、0.1%ギ酸 (A) と 0.1%ギ酸含アセトニトリル (B) を用い、流速は 0.3 μL/min で行った。移動相の濃度勾配は、1 分間 1% B, 1-90 分を 40% B までの直線勾配, 90-91 分を 95% B までの直線勾配, 91-95 分は 95% B で行い、95-99 分で 1% B に戻して 1 分間流した。カラム温度 25°C, MS 測定範囲 *m/z* 200-2500, ポジティブイオンモード, キャピラリー電圧 2.8 kV, コーン電圧 25 V, コリジョンエネルギー 6 eV (MS), 15-60 eV (MS<sup>E</sup>), ソース温度 100°C の条件下で行った。得られたデータの解析は、MassLynx ver.4.1 software および ProteinLynx Global Server Browser ver.2.3 software (Waters 社) を使用した。

#### 17. 統計処理

データ解析には特に記載がない限り、3 回の実験より得られた結果の平均値を用いた。図中の各平均値には標準誤差 (SE) を併記した。有意差検定は母平均の差の検定を用い、等分散を示したものには t 検定を、そうでないものには Welch 検定を行った。また、半致死量等の統計解析には、データ解析プログラム Prism Ver. 4.0 (GraphPad Software 社) を用いた。



# 第1章 メチル水銀のグルタチオン結合体によるタンパク質の S-トランス水銀化

## 1.1. 目的

これまで環境・食品中に含まれる親電子物質である MeHg は、生体内に侵入するとグルタチオン抱合 (MeHg-SG) されることで本化合物の親電子性を消失し、解毒されると考えられてきた。しかしその一方で、MeHg-SG の Hg-S 結合は可逆的であるため、MeHg-SG はタンパク質のチオール基 (SH 基) やシステインなどの SH 基を有する低分子化合物と容易に転位反応 (S-トランス水銀化) が起こると想定されてきたが<sup>24-26)</sup>、細胞レベルにおける MeHg-SG の S-トランス水銀化を明らかにした報告は見当たらない。そこで本反応を明らかにするため、親電子物質のセンサータンパク質である Keap1 をモデルとして、MeHg-SG およびその前駆体である MeHg-SGEt を用いてタンパク質の S-トランス水銀化反応を直接証明することを本研究の目的とした。

Keap1/Nrf2 システムは、内因性および外因性親電子物質の代謝と排泄に係わる一連の生体防御タンパク質の発現を誘導することにより、親電子物質による細胞傷害に対する生体応答を制御している。その感知・応答機構は、転写因子 Nrf2 を負に制御する Keap1 の反応性の高い (pKa 値の低い) SH 基がセンサーとなり、これが親電子修飾や酸化修飾を受けると、Nrf2 が活性化され核内に移行し ARE に結合することで、下流のタンパク質の発現を誘導する。当研究室は、これまで MeHg による Keap1 への S-水銀化を介して Nrf2 が活性化され、下流タンパク質である GCLs, GSTs, HO-1 などの発現量が上昇することを報告してきた<sup>131)</sup>。したがって、MeHg-SG およびその前駆体である MeHg-SGEt は S-トランス水銀化により Keap1 の反応性の高いチオール基に MeHg が転位し、その結果細胞内の Keap1 が S-水銀化されることで転写因子である Nrf2 が活性化され、下流遺伝子群の発現が亢進すると予想した。

## 1.2. 結果

### 1.2.1. MeHg-SG および MeHg-SG 前駆体 MeHg-SGEt の合成

本研究で MeHg グルタチオン抱合体 (MeHg-SG) による S-トランス水銀化の実態を解明するため、MeHg-SG および MeHg-SG エステル体 (MeHg-SGEt) の化学合成を試みた。MeHg-SG は極性の高い化合物であることから、細胞の膜透過性を高めるため脂溶性の GSH モノエステルを用いて MeHg-SGEt を合成した。MeHg と GSH または GSH モノエステルの反応産物をカラムで精製し、それぞれを UPLC-MS<sup>E</sup> および <sup>1</sup>H-NMR にて構造決定した。UPLC-MS<sup>E</sup> で解析した結果、MeHg と GSH との反応生成物は UPLC 上で保持時間 1.35 分にピークが検出され、本ピークの MS 解析の結果、親イオンピーク  $m/z=522.07$ 、およびフラグメントピーク  $m/z=202, 306$  を示した (図 1-1)。また <sup>1</sup>H-NMR 解析の結果、<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, D<sub>2</sub>O): 4.52-4.54 (t, 1H), 3.91 (s, 2H),

3.74-3.77 (t, 1H), 3.34-2.38 (m, 2H), 3.26-3.30 (m, 2H), 2.48-2.53 (m, 2H), 2.08-2.13 (m, 2H), 0.68 (t, 3H) を示し, MeHg-SG として同定された(図 1-2). 同様に, MeHg と GSH-Et との反応生成物は UPLC 上で保持時間 2.02 分にピークが検出され, 本ピークの MS 解析の結果, 親イオンピーク  $m/z=550.08$ , およびフラグメントピーク  $m/z=128, 210, 300$  を示した (図 1-3). また  $^1\text{H-NMR}$  解析の結果,  $^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ): 4.48-4.50 (t, 1H), 4.10-4.14 (m, 2H), 3.93 (t, 2H), 3.66-3.69 (t, 1H), 3.32 (m, 1H), 3.25-3.26 (m, 1H), 2.43-2.48 (m, 2H), 2.05-2.07 (m, 2H), 1.16-1.18 (t, 3H), 0.66 (t, 3H) を示し, MeHg-SGEt として同定された (図 1-4).

### 1.2.2. MeHg-SGEt による細胞毒性

1.1.1 で合成した MeHg-SGEt を用いて, MeHg-SGEt による *S*-トランス水銀化により細胞内タンパク質が *S*-水銀化されると細胞毒性が生じると予想されたことから, SH-SY5Y 細胞を MeHg および MeHg-SGEt に 24 時間曝露し, MTT 法にて細胞生存率を評価した. その結果, MeHg-SGEt は親電子性を消失しているにも係わらず 4  $\mu\text{M}$  の MeHg-SGEt を曝露すると細胞毒性が生じた (図 1-5). また, それぞれの化合物の  $\text{LD}_{50}$  は, MeHg が  $1.46 \pm 0.1 \mu\text{M}$ , MeHg-SGEt は  $2.82 \pm 0.4 \mu\text{M}$  であった. 次に, MeHg-SG の細胞外排泄に関与するとされる MRPs の阻害剤である MK571 を前処理した細胞を MeHg-SGEt に曝露したところ, MeHg-SGEt による細胞毒性が有意に増強した (図 1-5). 本結果は, MeHg-SGEt の細胞内滞留に伴う細胞内タンパク質への *S*-トランス水銀化により, *S*-水銀化タンパク質が増加し, MeHg-SGEt による細胞毒性が上昇したことを示唆している.

### 1.2.3. MeHg-SG によるタンパク質への *S*-トランス水銀化

MeHg-SG によるタンパク質への *S*-トランス水銀化反応を検討するために, BPM 標識法<sup>127)</sup>を用いて, SH-SY5Y 細胞溶解液および mouse Keap1 (mKeap1) 精製タンパク質に対する MeHg-SG の修飾を検討した. その結果, MeHg と比較し反応性は低いものの, MeHg-SG の濃度依存的に SH-SY5Y 細胞溶解液中タンパク質およびリコンビナント mKeap1 への修飾が見られた (図 1-6A, B). 次いで, mKeap1 と MeHg-SG を反応させた後, 限外ろ過により除タンパクした反応液を HPLC-ECD に供し分析したところ, 保持時間 8.8 分にピークが得られ, 標準物質 GSH と同様の保持時間を示した (図 1-6C). これらの結果から, MeHg-SG による mKeap1 への *S*-トランス水銀化反応により GSH が解離し, 結果的に mKeap1 への *S*-水銀化が起こることを示唆している. さらに, 0.13 nmol の mKeap1 に対し 2.08 nmol の MeHg-SG を反応させると, 92%GSH の解離が検出された (図 1-6D). 本結果から, 検出された GSH のモル量から逆算すると, 1 mol のリコンビナント mKeap1 に対し約 4 mol の MeHg が修飾したことになる. mKeap1 は 25 個のシステイン残基を有することから, そのうちの反応性の高い 4 つの

システイン残基へ MeHg が修飾したと予想される。

さらに、細胞レベルにおける Keap1 への *S*-トランス水銀化を検討するため、MeHg および MeHg-SGET を SH-SY5Y 細胞に曝露し、アビジンビーズを用いた BPM 標識法にて細胞内 Keap1 タンパク質への修飾を検討した。その結果、MeHg を曝露した場合と同様に、MeHg-SGET 濃度依存的な細胞内 Keap1 タンパク質への *S*-水銀化が認められた (図 1-7)。

これらの結果から、MeHg-SG による Keap1 への *S*-水銀化が示唆されたことから、nanoUPLC-MS<sup>E</sup> 解析により、MeHg および MeHg-SG の修飾部位の同定を試みた。解析の結果、MeHg の修飾部位が Cys151、一方、MeHg-SG の修飾部位が Cys319 であることが明らかとなった (表 1-1, 1-2 および図 1-8)。

#### 1.2.4. MeHg-SGET による Nrf2 活性化および下流タンパク質の誘導

1.2.3 の結果より、MeHg-SGET 曝露により細胞内 Keap1 への修飾が認められたことから、MeHg-SGET による Nrf2 の活性化を検討した。SH-SY5Y 細胞を MeHg-SGET に曝露したところ、濃度および時間依存的な Nrf2 の蓄積が観察された (図 1-9A, B)。このとき、MeHg による Nrf2 の活性化は 6 時間曝露で対照群の約 10 倍なのに対し、MeHg-SGET による Nrf2 の活性化は 6 時間曝露で約 4 倍であった (図 1-9A, B)。この結果は、SH-SY5Y 細胞溶解液を用いた MeHg と MeHg-SG の細胞内タンパク質への *S*-水銀化反応に相関して (図 1-6A)、MeHg による *S*-水銀化よりも MeHg-SG による *S*-トランス水銀化反応の方が緩やかな反応であることに起因すると考えられる。次に、MeHg-SGET による Nrf2 の活性化に伴う ARE の転写活性化をルシフェラーゼ法で測定した。その結果、MeHg-SGET の曝露により ARE ルシフェラーゼ活性が有意に上昇していた (図 1-10)。加えて、Nrf2 活性化に伴って下流遺伝子群が発現誘導されたかを検討するために、リアルタイム RT-PCR 法を用いて検討を行った。その結果、MeHg-SGET を SH-SY5Y 細胞に 6 時間曝露したところ、GCLM、HO-1 および xCT の mRNA 量の上昇がそれぞれ観察され (図 1-11)、それに伴い下流タンパク質である GCLM および HO-1 の誘導が見られた (図 1-12)。

#### 1.2.5. MeHg のチオ硫酸およびテトラチオ硫酸付加体による

##### *S*-トランス水銀化

序論で述べたように、生体内でシステインの代謝過程で産生されるチオ硫酸イオン ( $S_2O_3^{2-}$ ,  $S-SO_3^{2-}$ ) も GSH ( $GS^-$ ) と同様、MeHg に対して求核剤として働くと予想される。しかしながら、これまでチオ硫酸イオンと MeHg についての検討はされていない。そこで、MeHg に対するチオ硫酸ナトリウム ( $Na_2S_2O_3$ ) およびテトラチオ硫酸ナトリウム ( $Na_2S_4O_6$ ) の効果を検討した。SH-SY5Y 細胞にそれぞれの化合物を 10, 50 mM を 3 時間前処理した後、MeHg を 0, 0.5, 1, 2  $\mu$ M, 24 時間曝露し、MTT 法にて細胞生

存率を評価した。その結果、 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  および  $\text{Na}_2\text{S}_4\text{O}_6$  の前処理により、MeHg の細胞毒性が有意に抑制された (図 1-13)。これにより、GSH と同様にチオ硫酸イオンおよびテトラチオ硫酸イオンも MeHg に対し求核剤として働き、本化合物の反応性低下に寄与することが示唆された。

次に、MeHg- $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  反応生成物の *S*-トランス水銀化反応を検討するため、MeHg と  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  を当モル量で  $25^\circ\text{C}$ 、1 時間反応させ、MeHg- $\text{S}_2\text{O}_3$  付加体を生成後、さらに GSH を加え  $25^\circ\text{C}$ 、30 分間反応させた。まず、GSH 非含有の反応液を UPLC-MS<sup>E</sup> で解析したところ、UPLC 上で保持時間 0.7 分のピークが検出され (図 1-14A)、MeHg と  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  の反応で生じる生成物は MeHg-S- $\text{SO}_3\text{H}$  の親イオンピーク ( $m/z=328.9$ ) およびそのフラグメントピーク ( $m/z=247, 232$ ) と完全に一致した (図 1-14C, D)。一方、MeHg-S- $\text{SO}_3\text{H}$  溶液に GSH を反応させると、UPLC 上で MeHg-S- $\text{SO}_3\text{H}$  (保持時間 0.7 分) とは異なる保持時間 1.3 分を示す新たな生成物が検出された (図 1-15A)。本生成物に関して MS<sup>E</sup> 解析を行ったところ、親イオンピークが  $m/z=522.07$ 、フラグメントイオンピークが  $m/z=306, 272$  を示し、MeHg-SG の合成標品のそれと完全に一致した (図 1-15C, D)。このとき、UPLC 上で検出された MeHg-S- $\text{SO}_3\text{H}$  付加体のピーク面積値から、GSH による *S*-トランス水銀化反応により 60% の MeHg-S- $\text{SO}_3\text{H}$  付加体が減少した (図 1-15E)。これにより MeHg と  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  の反応生成物である MeHg-S- $\text{SO}_3\text{H}$  も、細胞内で *S*-トランス水銀化反応が起こり、結果的に MeHg-SG に変換される、もしくは細胞内タンパク質を *S*-水銀化する可能性が示唆された。

### 1.3. 考察

本研究により、細胞レベルにおいて不活性化代謝物 MeHg-SG が細胞内 Keap1 と *S*-トランス水銀化反応を生じて、結果的に Keap1 を *S*-水銀化し、Nrf2 を活性化することで下流遺伝子群およびそれらのタンパク質群の発現を誘導することが明らかとなった。

一般的に、親電子物質の多くは生体内に侵入すると GSH 抱合反応を受けることで不活性化し、細胞膜上に局在する MRP トランスポーターにより細胞外へと排泄されると言われている。しかしながら、本研究から MeHg-SG は親電子性を消失しているにも係わらず、本化合物による細胞毒性が生じ (図 1-5)、MeHg-SG による濃度依存的な *S*-水銀化タンパク質の増加が認められた (図 1-6A)。本結果から予想される分子機構の一つとして、従前より示唆されている MeHg-SG とタンパク質のチオール基との間で起こる *S*-トランス水銀化反応が考えられる (図 1-16)。この反応は二分子置換反応でありシステイン側鎖間で親電子物質が転位する反応である。MeHg による *S*-トランス水銀化反応は、1983 年 Rabenstein らのヒト赤血球を用いた検討により初めて明らかにされた<sup>25)</sup>。彼らは、生体内の高分子間、低分子間、および高分子-低分子間の解離性チオール基によって MeHg の転位反応が起こることを示した。この様な *S*-トラ

ンス反応は MeHg-SG 特異的な反応ではなく、大気中親電子物質である 1,2-ナフトキノン (1,2-NQ) の GSH 抱合体 (1,2-NQ-SG) も同様に、S-トランスアリアル化反応により細胞内タンパク質への 1,2-NQ の親電子修飾が生じることを明らかにしている<sup>132)</sup>。加えて、2011 年に内田らは、親電子物質であるイソチオシアネート (6-HITC) の 2-メルカプトエタノール結合体 (6-HITC-ME) が S-トランス反応を介してチオール基を修飾する能力を有していること、および細胞への曝露により細胞内タンパク質がイソチオシアネート修飾され、その親電子修飾による Nrf2 の活性化および HO-1 の発現誘導が上昇することを示した<sup>133)</sup>。これらの知見を総合すると、MeHg や 1,2-NQ などの親電子物質は、GSH 抱合された代謝物も細胞内タンパク質を再度、親電子修飾する能力を有しているため、非意図的な親電子修飾を防ぎ、生体内濃度を減少させるという観点から考えると、GSH による抱合反応を受けた後、速やかに細胞外へ排泄することが本化合物の毒性軽減に重要であると言える。

MeHg と同様に、その代謝物である MeHg-SG も細胞内 Keap1 の S-水銀化を介して、Nrf2 を活性化し、下流遺伝子群および下流タンパク質群の発現が上昇した (図 1-7, 9, 10 および 12)。MeHg-SGEt による Nrf2 の活性化には、次の三つの可能性が考えられる。第一に Keap1 への親電子修飾 (S-水銀化)、第二にプロテアソームの阻害による分解抑制に伴う Nrf2 の蓄積、第三に活性酸素種 (ROS) の産生に依存した Keap1 への酸化修飾、が予想された。第一の可能性に関して、図 1-8 および表 1-2 から MeHg は mKeap1 の Cys151 を、MeHg-SG は異なるシステイン残基の Cys319 を S-水銀化していることが明らかになった。当研究室の先行研究により、MeHg は mKeap1 の Cys151 を介して S-水銀化することが、MALDI-TOF/MS 解析により明らかにされており<sup>134)</sup>、本研究による nanoUPLC-MS 解析の結果も同様に Cys151 への S-水銀化が同定された。MeHg による S-水銀化が検出された Keap1 の Cys151 は Cys273, Cys288 とならび、Nrf2 の活性化に重要なシステイン残基であると言われており、様々な親電子物質の修飾部位となることが知られている<sup>68,135)</sup>。例えば、1,2-NQ<sup>65)</sup>、tert-ブチル 1,4-ベンゾキノン (TBQ)<sup>64)</sup>、スルフォラファン<sup>68)</sup> およびエストロゲンキノン<sup>66)</sup> は、Keap1 の Cys151 への親電子修飾を介して Nrf2 を活性化する。Cys151 は Cullin3 と相互作用を示す BTB 領域に存在し、pKa 値が約 6.5 と低いため高い求核性を有している。つまり MeHg は Cys151 を S-水銀化することで Keap1 と Cullin3 との相互作用を低下させ、Nrf2 のユビキチン化が抑制されることで Nrf2 を活性化したと示唆される。一方、MeHg-SG により S-水銀化を受けた Cys319 は、SH 基の標識に用いられるビオチン化ヨードアセトアミドやニトロオレイン酸による修飾が知られており<sup>135,136)</sup>、Keap1 の Cys319 は、Nrf2 と直接結合する DC 領域に存在している。従って MeHg-SG による Nrf2 の活性化は、Cys319 への MeHg 転移反応により、Keap1 と Nrf2 との結合が減弱したためと推察される。このように、MeHg と MeHg-SG で構造の異なる化合物によって Keap1 への修飾部位が異なる要因として、二つの化合物の持つ分子の形状、立体構造、および疎水

性相互作用などの影響が考えられる。MeHg は細胞内に侵入するとその多くは Cys 複合体もしくは GSH 複合体として存在すると言われていることから、細胞内における Nrf2 の活性化は、MeHg そのものによる Keap1 の Cys151 を介した S-水銀化に起因するというよりは、むしろ MeHg-SG による Cys319 への S-水銀化により Nrf2 が活性化した可能性が考えられる。細胞レベルにおける Keap1 の S-水銀化部位を明らかにするためには、Keap1 欠損細胞に変異体 Keap1 を高発現させた細胞を用いて Nrf2 の活性化について検討する、もしくは MeHg を曝露した細胞から Keap1 を抽出し、修飾部位を同定する必要がある。第二の可能性として、プロテアソーム阻害に関して検討を行ったところ、MeHg および MeHg-SGEt を曝露した細胞で、濃度および時間依存的なユビキチン化タンパク質の蓄積は見られなかったことから (データ未掲載)、これらの化合物によるプロテアソームの阻害により、Nrf2 が蓄積したことによって活性化した可能性は低い。最後に第三の可能性として ROS による Keap1 の酸化修飾が挙げられる。Ni らにより初代グリア細胞を用いた検討結果では、MeHg による Nrf2 の活性化に ROS が関与すると報告されている<sup>137)</sup>。しかしながら、当研究室の外山らにより、SH-SY5Y 細胞において ROS 除去剤を処理しても、MeHg による Nrf2 の活性化が確認されたことから、ROS 産生に非依存的な Nrf2 の活性化であることが示されている<sup>138)</sup>。MeHg-SG においても MeHg と同様の結果が予想されるが、MeHg-SG による ROS 産生に依存した Nrf2 の活性化については今後の検討課題として残された。

序論 3.1 に述べたように、生体内においてシステインの代謝物として  $S-SO_3^{2-}$  ( $S_2O_3^{2-}$ ) が比較的多く産生されている (ヒトの血漿中で  $2.7 \pm 0.23 \mu\text{mol/L}$  程度<sup>139)</sup>、序論図 2)。このものは MeHg と容易に共有結合し MeHg-S- $SO_3H$  付加体を形成したが (図 1-14)、GSH により S-トランス水銀化を受け、MeHg-SG となることが示された (図 1-15)。一般的に親電子物質の S-トランス反応は、pKa 値の高いチオール基へ転移し、pKa 値の低いチオール基が脱離する。Rabenstein らは、MeHg と  $S_2O_3^{2-}$  の結合に対する pKa 値は 3.5 であり、MeHg と GSH ( $GS^-$ ) の結合に対する pKa 値は 8.5 であることを示している<sup>12)</sup>。つまり、 $S_2O_3^{2-}$  の pKa 値が GSH よりも低いために MeHg-S- $SO_3H$  付加体の MeHg が GSH 側に転移したと考えられる。従って、生体内で多く産生されている  $S_2O_3^{2-}$  やその他の含硫求核低分子が GSH よりも低い pKa 値を有する場合、容易に GSH による S-トランス水銀化を受けて、結果 MeHg-SG と同様の生体内運命を辿ると予想される。

本研究により、細胞は MeHg だけでなく MeHg-S- $SO_3H$  付加体や、それらの代謝物である GSH 抱合体によっても Nrf2 を活性化させ細胞応答・防御能を上昇させていることが明らかとなった。Nrf2 の活性化は MeHg の排泄促進に関与する下流タンパク質の発現を誘導することから、代謝物である MeHg-SG は Nrf2 を活性化させて自身の細胞外排泄を促進させているのかもしれない。また、MeHg-SG による S-トランス水銀化反応は可逆的であることから、この MeHg-SG は細胞内で何らかの生理的な応答分

子としてシグナルを制御する新たな親電子応答機構の存在が期待される。

#### 1.4. まとめ

- MeHg-SG は *S*-トランス水銀化を介して細胞内タンパク質を *S*-水銀化した。
- MeHg-SGEt は細胞内 Keap1 への *S*-トランス水銀化を介して Nrf2 を活性化させ、下流遺伝子群の上昇および下流タンパク質群の発現を誘導した。
- MeHg は Keap1 の Cys151 を *S*-水銀化，MeHg-SG は Cys319 を *S*-トランス水銀化し，異なるシステイン残基へ親電子修飾した。
- $S_2O_3^{2-}$  も MeHg に対し求核剤として働き，MeHg-S-SO<sub>3</sub>H 付加体を形成するが，容易に GSH により *S*-トランス水銀化され MeHg-SG に変換される。

表1-1. MeHgおよびMeHg-SGによるmKeap1への修飾部位

Position	Peptide sequence	Calculated MS	Observed MS	Cys
A. 151-169	C*VLHVMNGAVMYQIDSVVR	2349.04	2349.13	Cys151
B. 299-320	DYLVQIFQELTLHKPTQAVPC*R	2814.35	2814.40	Cys319

20 mM Tris-HCl (pH 8.4) 中で, mKeap1精製タンパク質 (9  $\mu$ g, 4.2  $\mu$ M) を8.4  $\mu$ MのMeHg (A) またはMeHg-SG (B) と25°C, 30分間反応させた. 反応した mKeap1タンパク質をトリプシン消化後, nanoUPLC-MSに供し解析した. 表はトリプシン消化したKeap1-MeHgから得られたペプチドのアミノ酸配列を示す. \*はMeHg付加ペプチドを示す.



表1-2. MeHgおよびMeHg-SGによるmKeap1へのMeHg修飾ペプチドのMS/MSデータ

A. MeHg

Assignment	Fragment MS	Analyte Peak MS	Analyte Modifiers
b5*	768.28	768.31	+ MeHg
b10*	1240.49	1240.45	+ MeHg
y3	373.26	373.24	
y4	460.29	460.28	
y7	816.46	816.45	
a7*	985.38	985.33	+ MeHg
a11*	1343.54	1243.59	+ MeHg
y7-H <sub>2</sub> O	798.45	798.43	

B. MeHg-SG

Assignment	Fragment MS	Analyte Peak MS	Analyte Modifiers
b2	279.09	279.08	
b3	392.18	392.17	
b5	619.30	619.28	
y8*	1087.43	1087.47	+ MeHg
a2	251.10	251.10	
b2-H <sub>2</sub> O	261.08	261.08	

20 mM Tris-HCl (pH 8.4) 中で, mKeap1精製タンパク質 (9 µg, 4.2 µM) を8.4 µMのMeHg (A) またはMeHg-SG (B) と25°C, 30分間反応させた. 反応した mKeap1タンパク質をトリプシン消化後, nanoUPLC-MSに供しMS/MS解析した. \*はMeHg付加ペプチドを示す.

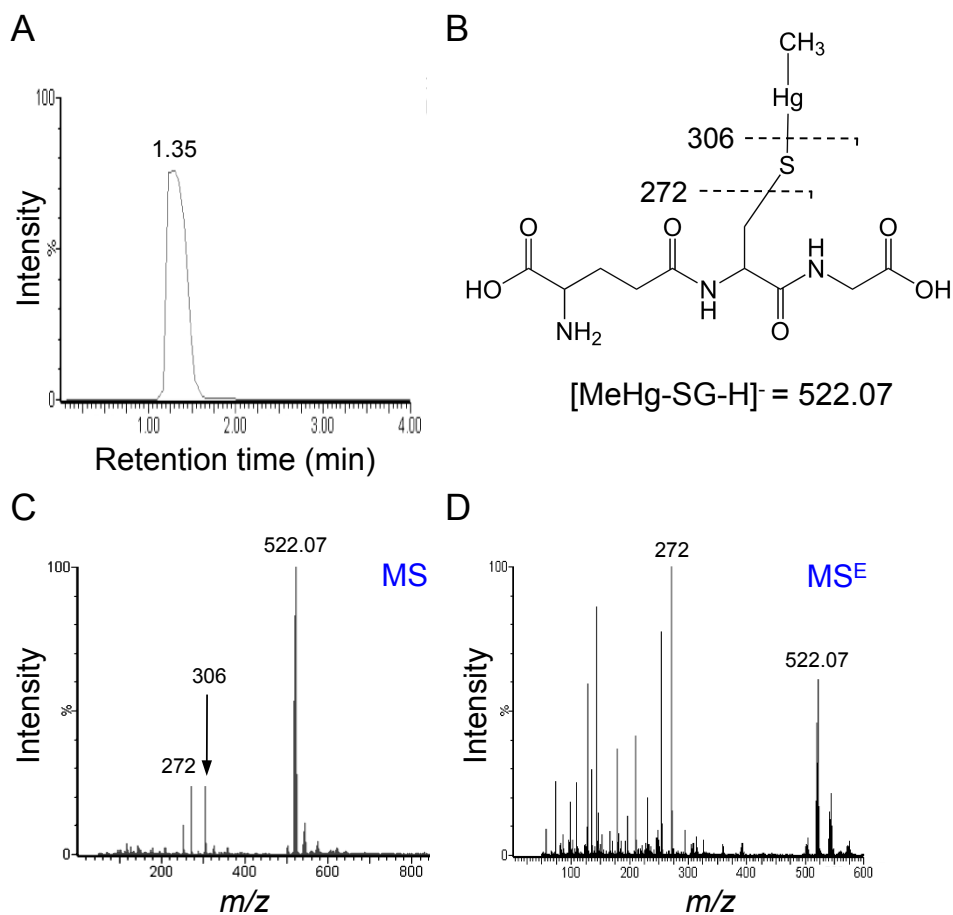


図1-1. UPLC-MS<sup>E</sup>解析によるMeHg-SGの同定

Column, Acquity UPLC C<sub>18</sub> column (2.1 mm × 50 mm i.d., 1.7 μm) ; 移動相, 0.1% FA/0.1%FA-ACN (97:3, v/v) ; 流速, 0.3 mL/min ; ESI-MS polarity, negative ion mode. 詳細は方法の部16.5.に記した. A. MeHg-SG合成標品をUPLCに供したトータルイオンクロマトグラムを示す. B. MeHg-SGの化学構造およびフラグメントを示す. C. Aで検出された保持時間 1.35 minのピークのMSスペクトルを示す. D. Aで検出された保持時間1.35 minのピークをMS<sup>E</sup>スペクトルを示す.

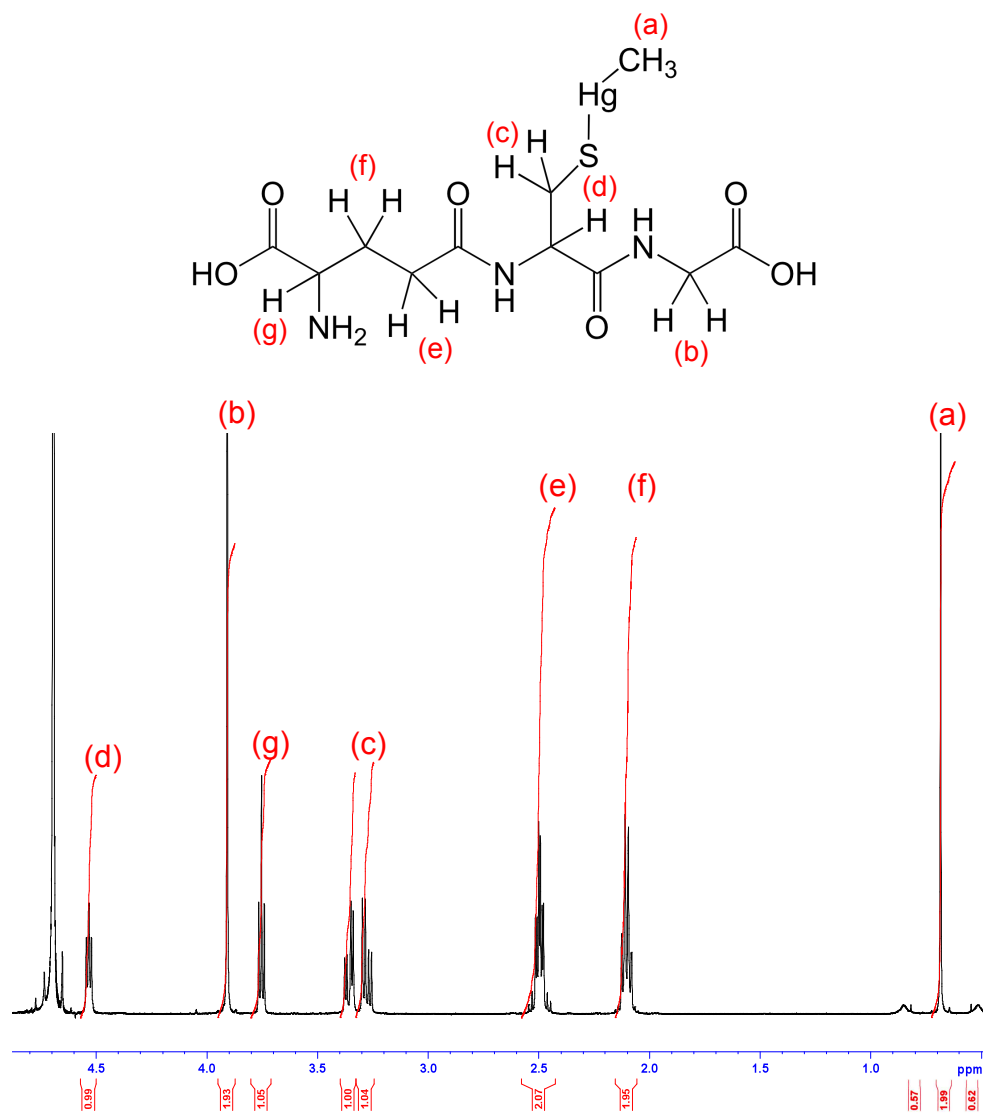


図1-2. MeHg-SG合成標品の<sup>1</sup>H-NMRスペクトル

MeHgとGSHを反応させた後、100% H<sub>2</sub>Oを展開溶媒として用い、Ultra Pack ODS-A-40Aカラム (40 μM, 11 mm x 300 mm i.d.) で精製した。MeHg-SG溶出画分を凍結乾燥機にて乾固した。MeHg-SGの一部を重水で溶解し、<sup>1</sup>H-NMR解析を行った。アルファベットは構造式と対応する<sup>1</sup>H-NMRのスペクトルを示す。

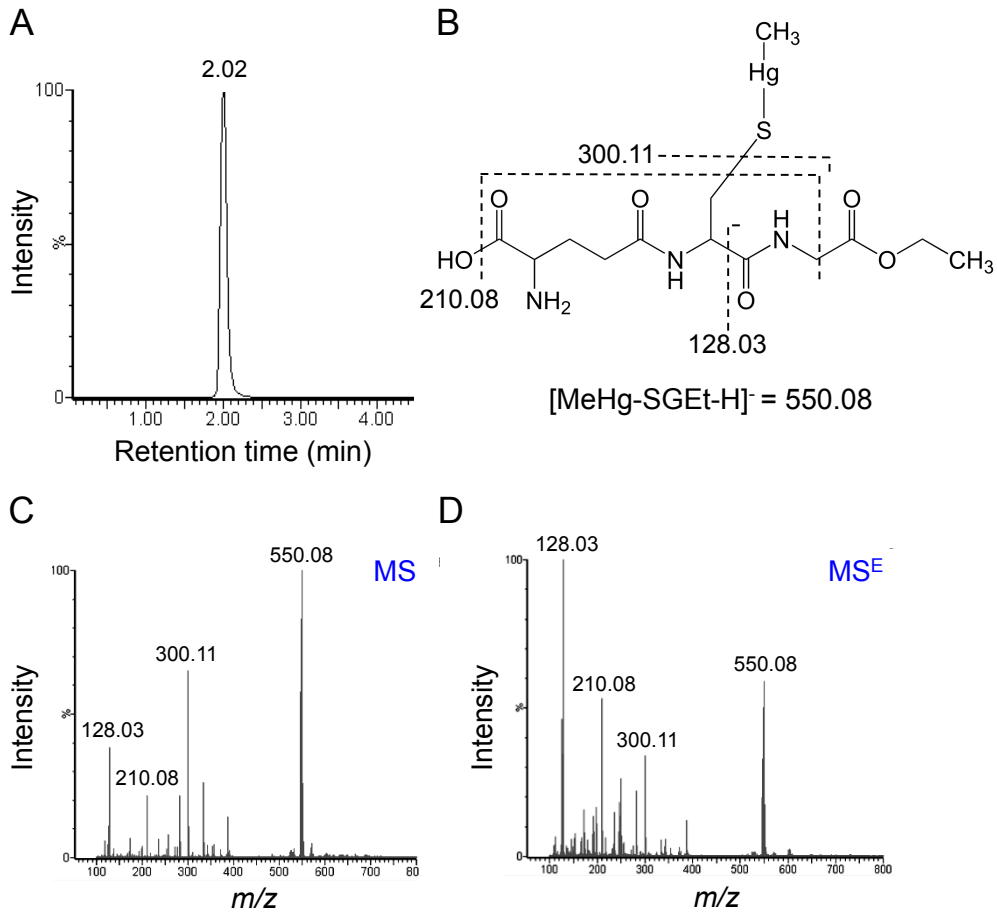


図1-3. UPLC-MS<sup>E</sup>解析によるMeHg-SGEtの同定

Column, Acquity UPLC C<sub>18</sub> column (2.1 mm × 50 mm i.d., 1.7 μm); 移動相, 0.1% FA/0.1%FA-ACN (97:3, v/v); 流速, 0.3 mL/min; ESI-MS polarity, negative ion mode. 詳細は方法の部16.5.に記した. A. MeHg-SGEt合成標品をUPLCに供したトータルイオンクロマトを示す. B. MeHg-SGEtの化学構造およびフラグメントを示す. C. Aで検出された保持時間2.02 minのピークのMSスペクトルを示す. D. Aで検出された保持時間 2.02 minのピークをMS<sup>E</sup>スペクトルを示す.

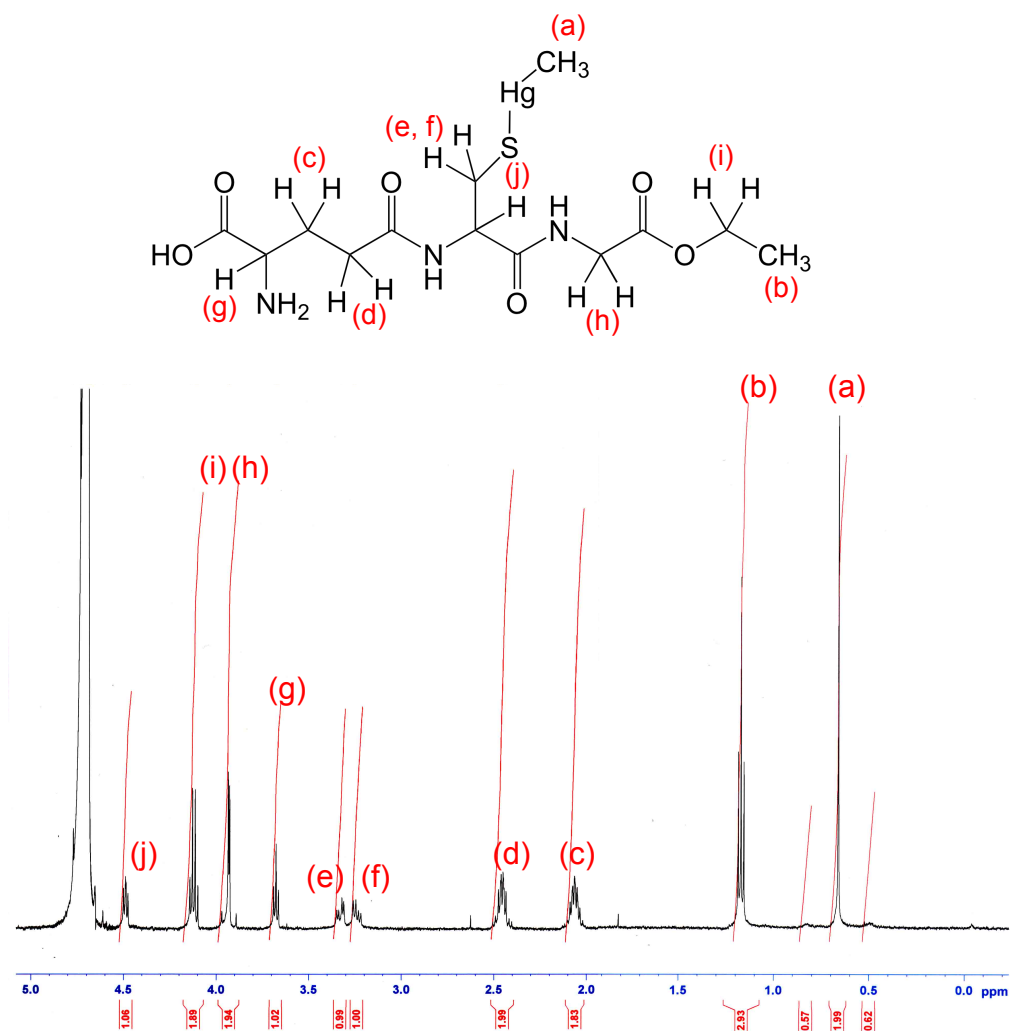


図1-4. MeHg-SGET合成標品の $^1\text{H-NMR}$ スペクトル

MeHとGSMEtを反応させた後、100%  $\text{H}_2\text{O}$ を展開溶媒として用い、Ultra Pack ODS-A-40Aカラム (40  $\mu\text{M}$ , 11 mm x 300 mm i.d.) で精製した。MeHg-SGET溶出画分を凍結乾燥機にて乾固した。MeHg-SGETの一部を重水で溶解し、 $^1\text{H-NMR}$ 解析を行った。アルファベットは構造式と対応する $^1\text{H-NMR}$ のスペクトルを示す。

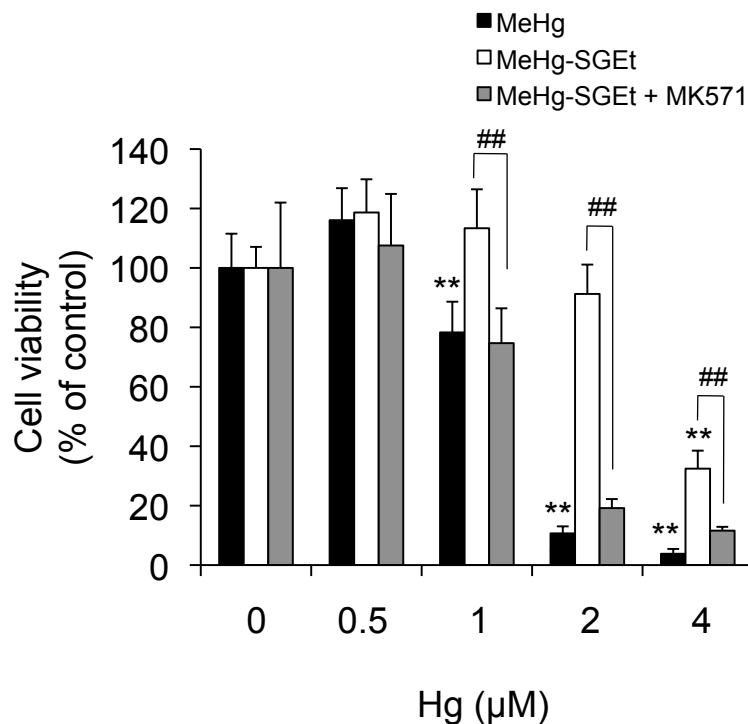


図1-5. SH-SY5Y細胞におけるMeHg-SGEtによる細胞毒性およびMRPs阻害剤による毒性増強

SH-SY5Y細胞にMeHgおよびMeHg-SGEtを24時間曝露した。また、MRPs阻害剤であるMK571 (100 μM) を1時間前処理した後、MeHg-SGEtを24時間曝露した。細胞生存率は方法の部5に示したようにMTT法にて測定した。同様の検討を3回行った平均値±標準誤差 (SE) として示す。  
 \*\* $p < 0.01$  vs. Control, ## $p < 0.01$  vs. MeHg-SGEt.

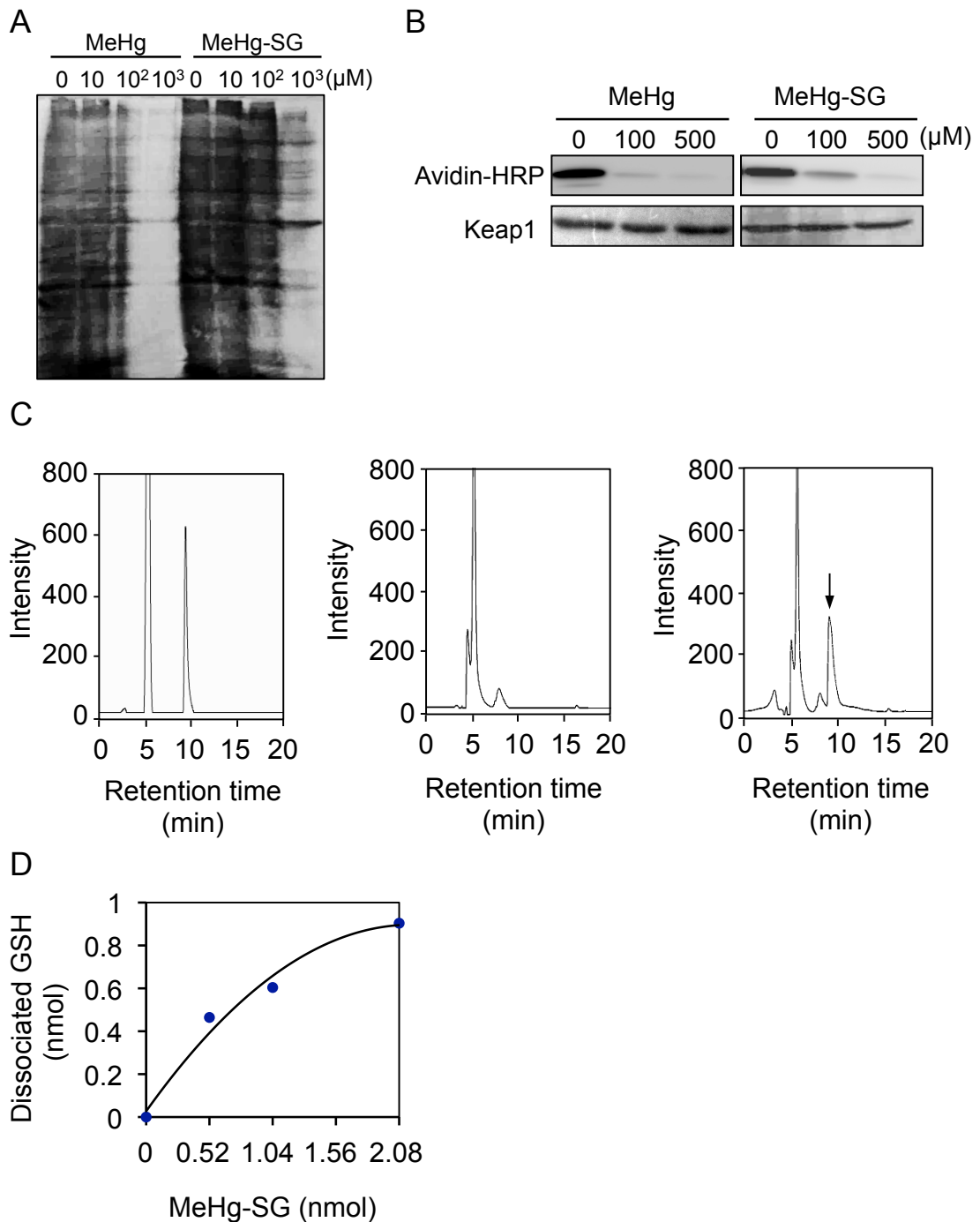


図1-6. MeHg-SGのmKeap1精製タンパク質へのS-トランス水銀化およびそれに伴うGSHの解離

A. SH-SY5Y細胞細溶解液にMeHgおよびMeHg-SGを25°C, 30分間反応させ、方法の部8.5.1に示した方法でBPM標識法を行った。B. 20 mM Tris-HCL (pH8.2) 中で、mKeap1精製タンパク質 (1 μg) にMeHgおよびMeHg-SGを25°C, 30分間反応させ、方法の部8.5.1に示した方法でBPM標識法を行った。C. 20 mM Tris-HCL (pH8.2) 中で、mKeap1精製タンパク質 (9 μg, 0.13 nmol) にMeHg-SG (0.52-2.08 nmol) を25°C, 1時間反応させ、限外ろ過で除タンパクし、HPLC-ECDに供しGSHを検出した。GSH標準品 (左図) mKeap1 (中央図) mKeap1とMeHg-SGを1 : 16で反応させた反応溶液 (右図)。D. C (右図) で検出されたGSHをプロットした。

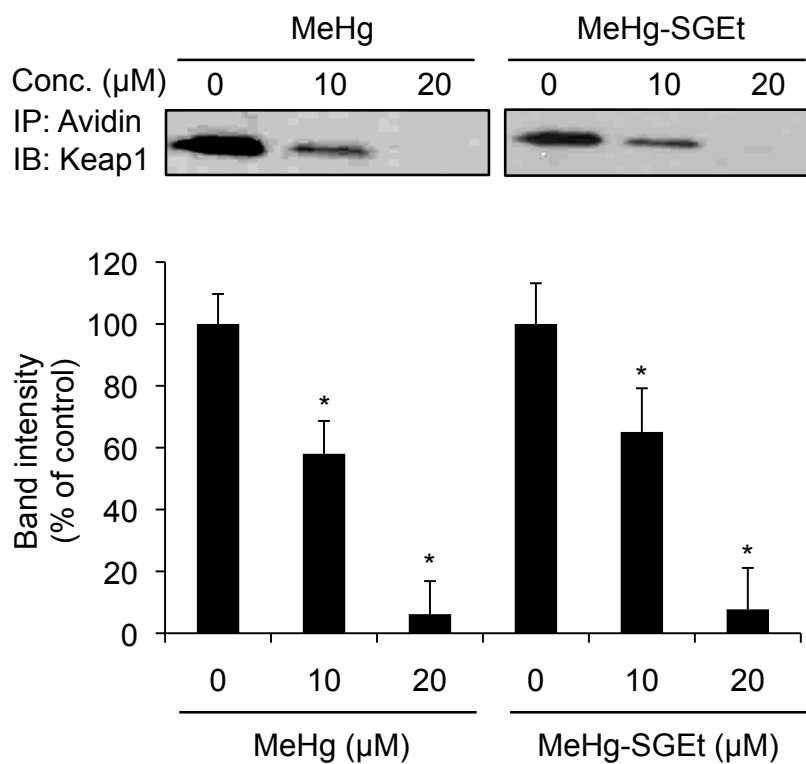


図1-7. MeHgおよびMeHg-SGEtによる細胞内Keap1タンパク質への修飾

SH-SY5Y細胞に0, 10, または20 μMのMeHgおよびMeHg-SGEtを曝露し, 3時間後に回収し, 方法の部8.6.2に示した方法でBPM標識法を行った. 下図はImage J softwareを用いてバンド強度を定量した結果を示す. 同様の検討を3回行った平均値±標準誤差 (SE) として示す. \* $p < 0.05$  vs. Control.



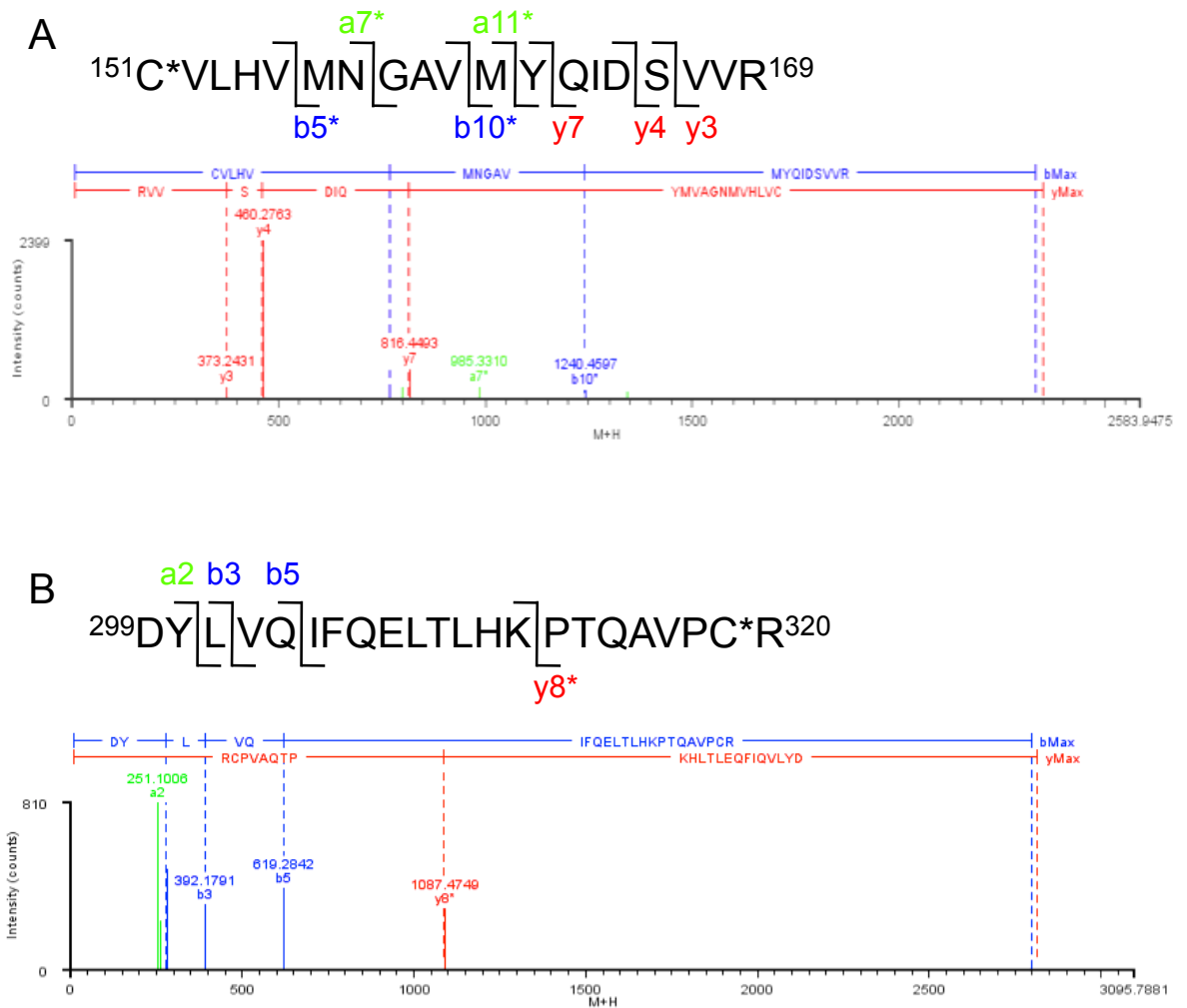


図1-8. nanoUPLC-MS<sup>E</sup>解析によるmKeap1へのMeHgおよびMeHg-SGET修飾部位の同定

20 mM Tris-HCl (pH8.2) 中で、mKeap1精製タンパク質 (9  $\mu\text{g}$ , 4.2  $\mu\text{M}$ ) を8.4  $\mu\text{M}$ のMeHg (A) またはMeHg-SG (B) と25°C, 30分間反応させた。反応したmKeap1タンパク質をトリプシン消化後、nanoUPLC-MS<sup>E</sup>に供し解析した。対応するMS<sup>E</sup>データを表1-2に示す。

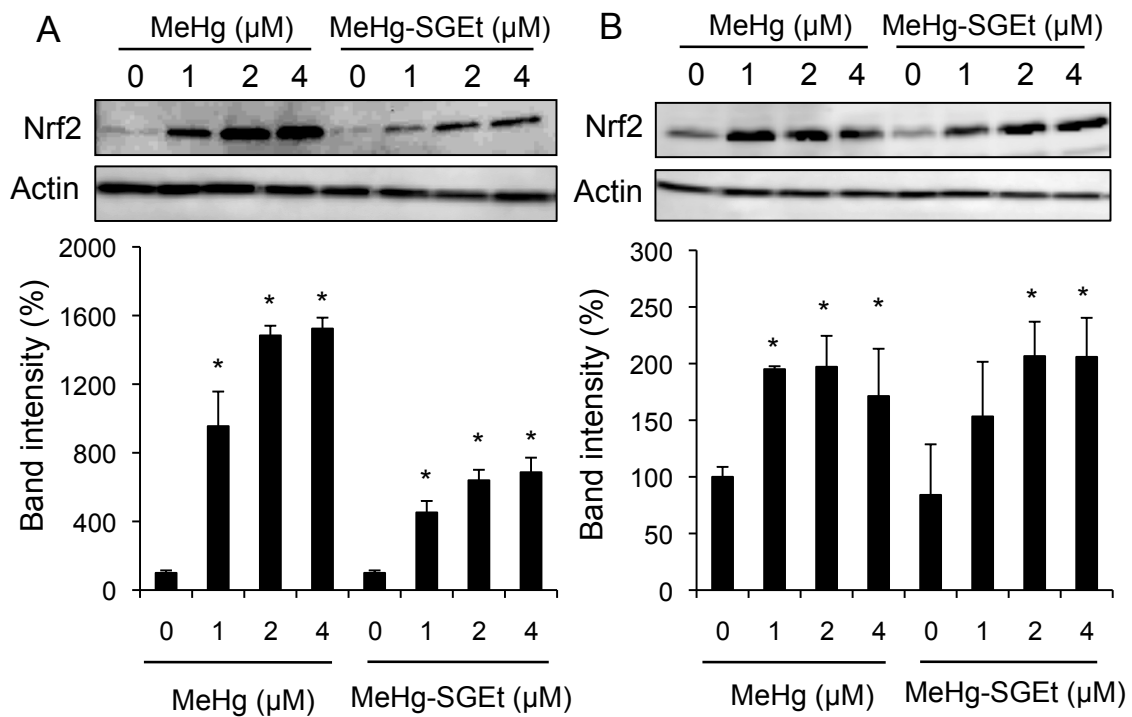


図1-9. MeHgおよびMeHg-SGEtによるNrf2の活性化

A-B. SH-SY5Y細胞にMeHgまたはMeHg-SGEtを、6時間 (A)、または12時間 (B) 曝露し、ウエスタンブロットによりNrf2の誘導を検出した。下図はImage J softwareを用いてバンド強度を定量した結果を示す。同様の検討を3回行った平均値±標準誤差 (SE) として示す。\* $p < 0.05$  vs control.

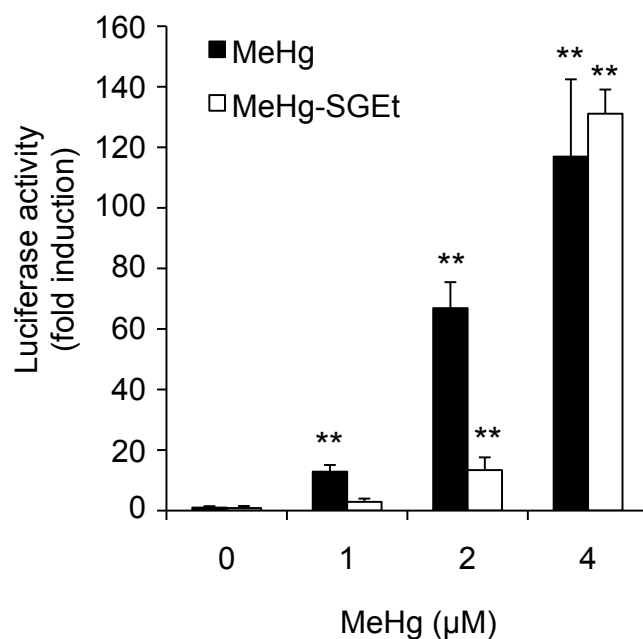


図1-10. MeHgおよびMeHg-SGETによるARE活性化

SH-SY5Y細胞にARE-Luciferaseベクターを導入し、12時間後に実験培地に交換し実験に用いた。MeHg (0-4 μM) およびMeHg-SGET (0-4 μM) を曝露し、6時間後に回収し、方法の部11に示した方法でルシフェラーゼ活性を測定した。同様の検討を3回行った平均値±標準誤差 (SE) として示す。 \*\* $p < 0.01$  vs control.

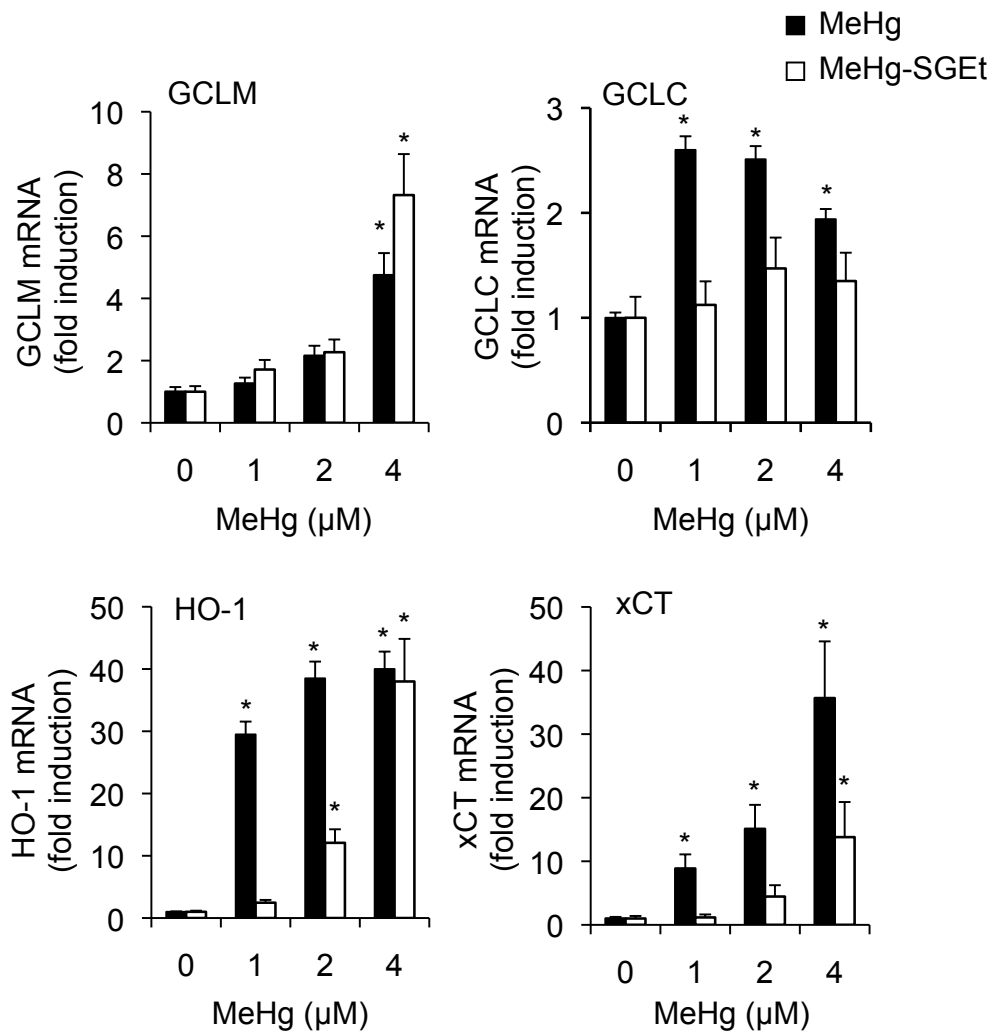


図1-11. MeHgおよびMeHg-SGEtによるNrf2下流遺伝子群の誘導

MeHg (0-4 μM) およびMeHg-SGEtをSH-SY5Y細胞に6時間曝露した。曝露後、細胞を回収し、リアルタイム-PCRによりNrf2下流遺伝子群のmRNAの誘導を検討した。同様の検討を3回行った平均値±標準誤差 (SE) として示す。\* $p < 0.01$  vs control.

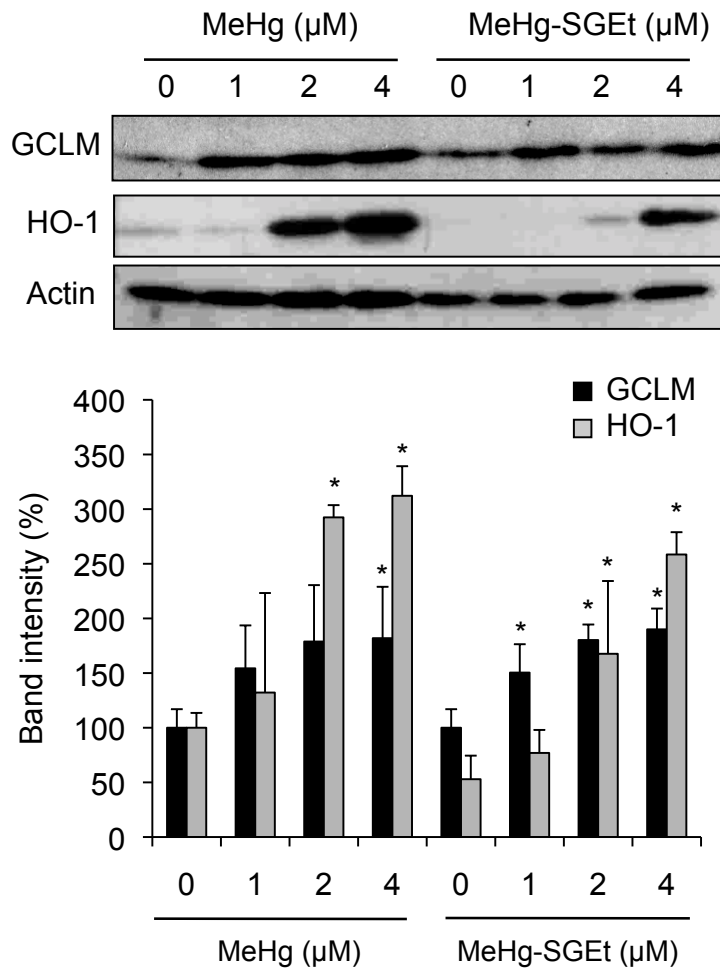


図1-12. MeHgおよびMeHg-SGEtによる下流タンパク質の発現誘導

SH-SY5Y細胞にMeHgまたはMeHg-SGEtを24時間曝露し、ウエスタンブロットにて各タンパク質を検出した。同様の検討を3回行った平均値±標準誤差 (SE) として示す。\* $p < 0.05$  vs control.

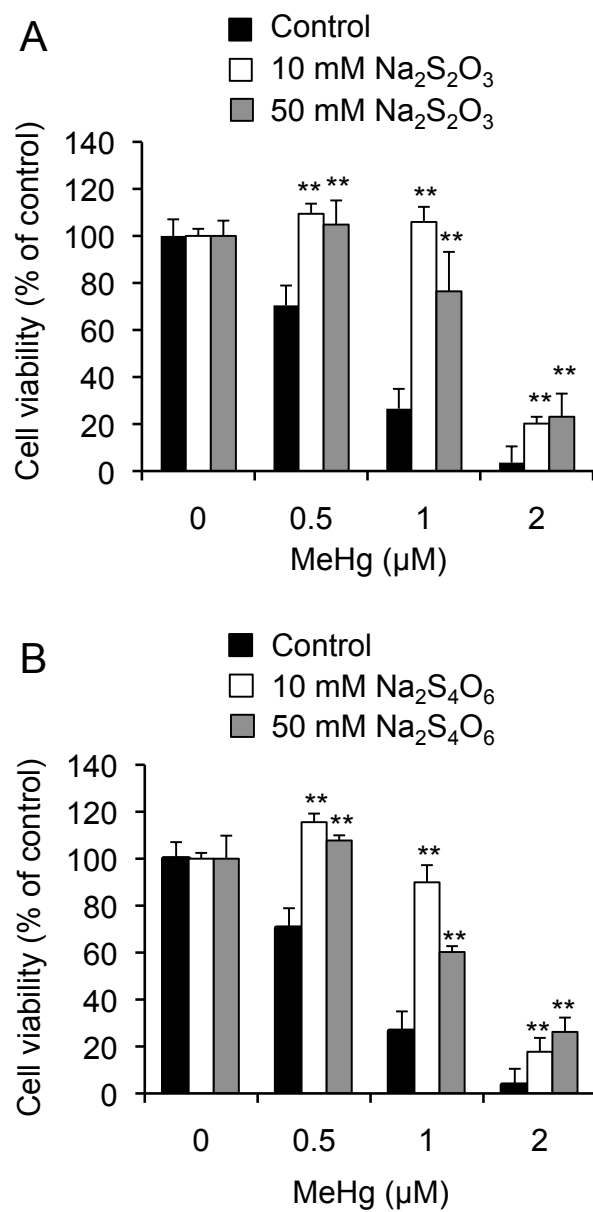


図1-13. SH-SY5Y細胞におけるチオ硫酸およびテトラチオ硫酸によるMeHg毒性の軽減

SH-SY5Y細胞にNa<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>およびNa<sub>2</sub>S<sub>4</sub>O<sub>6</sub>を3時間曝露した後、細胞をPBSで洗浄し、MeHgを24時間曝露した。方法の部5に示したようにMTT法にて細胞生存率を測定した。同様の検討を4回行った平均値±標準誤差 (SE) として示す。 \*\**p*<0.01 vs. Control.

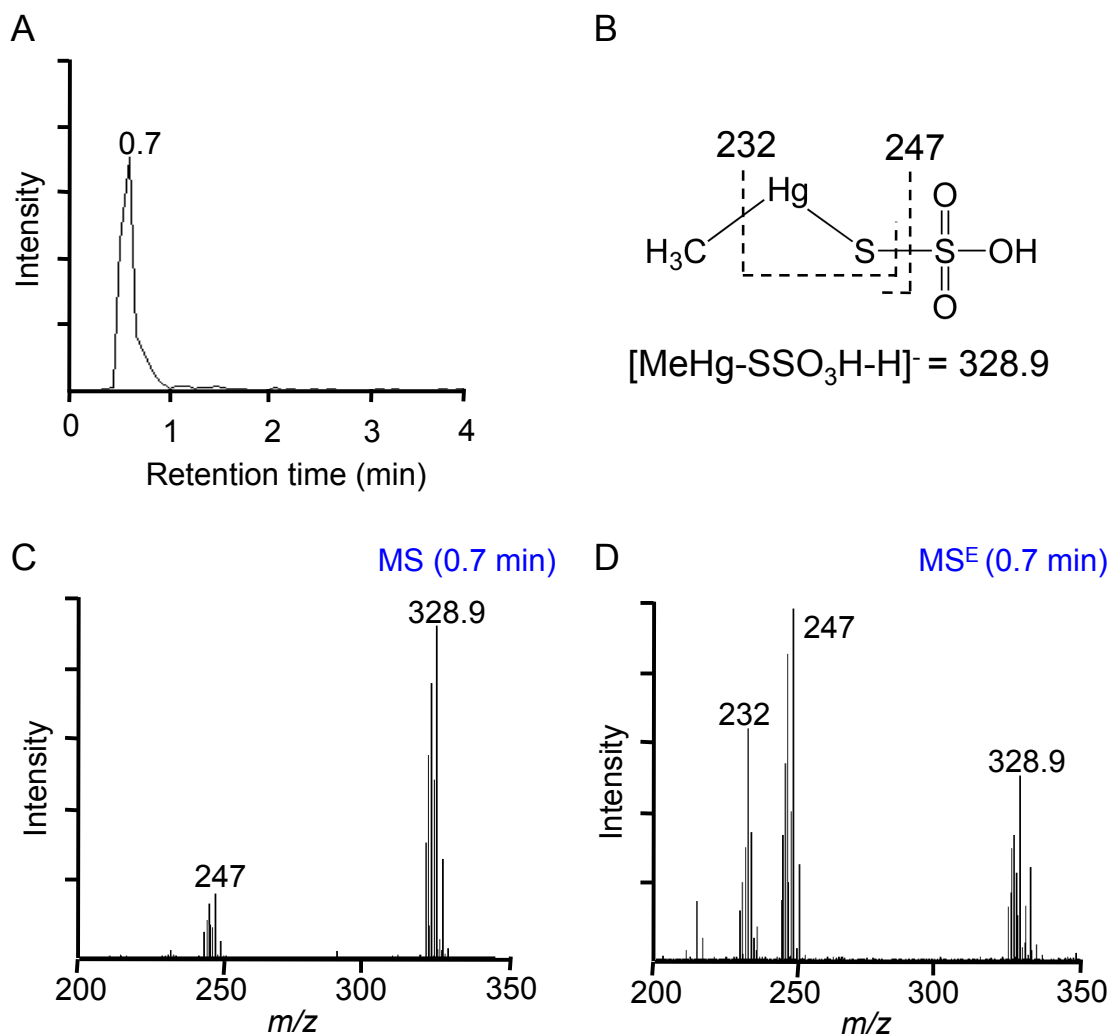


図1-14. UPLC-MS<sup>E</sup>解析によるMeHg-Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>反応生成物の同定

Column, Acquity UPLC C<sub>18</sub> column (2.1 mm × 50 mm i.d., 1.7 μm); 移動相, 0.1% FA/0.1%FA-ACN (97:3, v/v); 流速, 0.3 mL/min; ESI-MS polarity, negative ion mode. 詳細は方法の部16.5に記した. A. MeHg-Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>反応生成物をUPLCに供したセレクトイオンクロマト ( $m/z=328.9$ )を示す. B. Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>反応生成物の化学構造およびフラグメントを示す. C. Aで検出された保持時間0.7 minのピークをMS解析した. D. Aで検出された保持時間0.7 minのピークをMS<sup>E</sup>解析した.

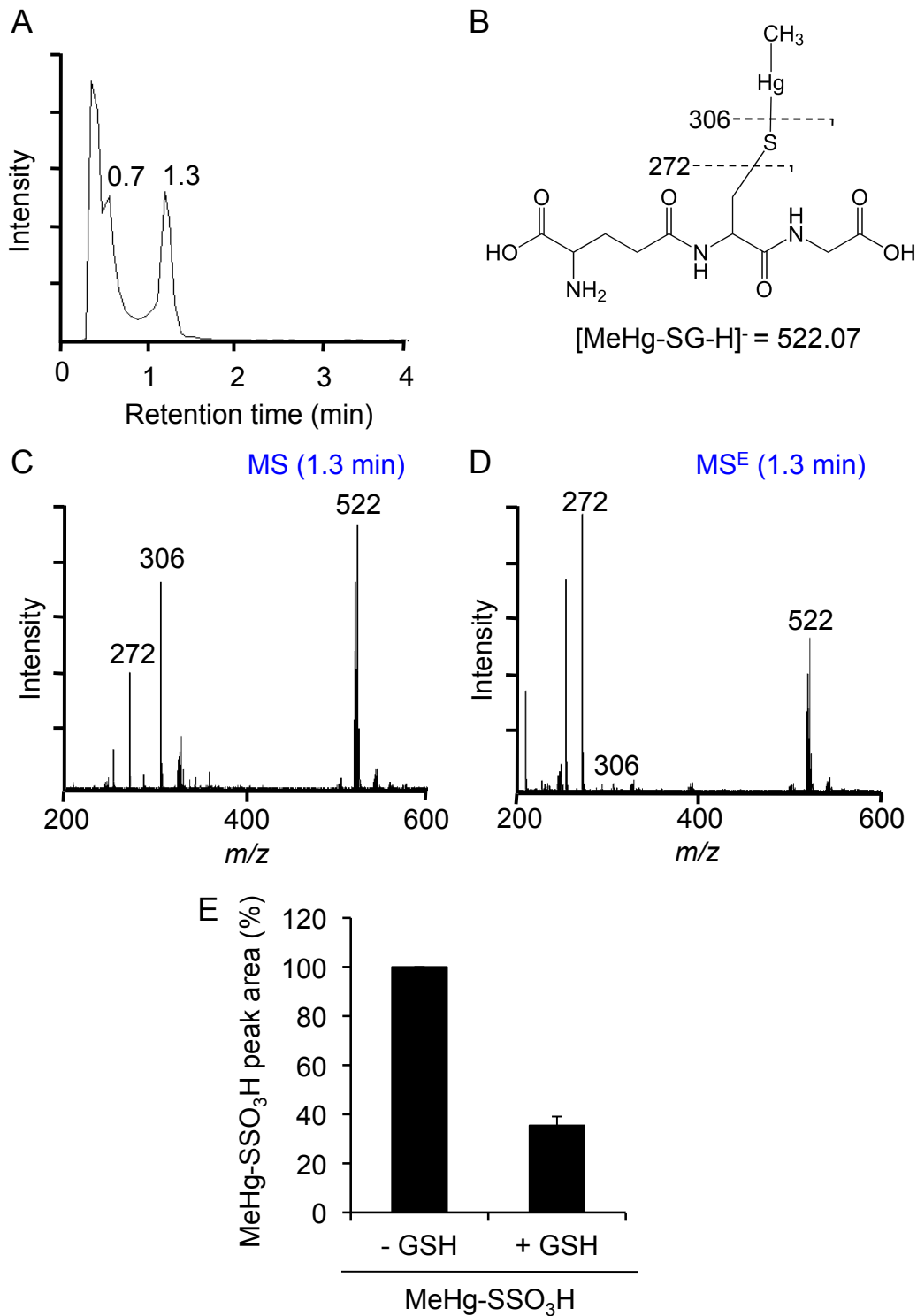


図1-15. GSHによるMeHg-SSO<sub>3</sub>H結合体のS-トランス水銀化

Column, Acquity UPLC C<sub>18</sub> column (2.1 mm × 50 mm i.d., 1.7 μm); 移動相, 0.1% FA/0.1%FA-ACN (97:3, v/v); 流速, 0.3 mL/min; ESI-MS polarity, negative ion mode. 詳細は方法の部16.5に記した. A. MeHg (100 μM) とNa<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (100 μM) を25°C, 1時間反応後, GSH (100 μM) を加え25°C, 30分間反応させた溶液をUPLCに供したトータルイオンクロマトを示す. B. MeHg-SGの化学構造およびフラグメントを示す. C. Aで検出された保持時間1.3 minの未知ピークをMS解析した. D. Aで検出された保持時間1.3 minの未知ピークをMS<sup>E</sup>解析した. E. MeHg-SSO<sub>3</sub>Hのピーク面積値を平均した結果を示す. 同様の検討を3回行った平均値±標準誤差(SE)として示す.



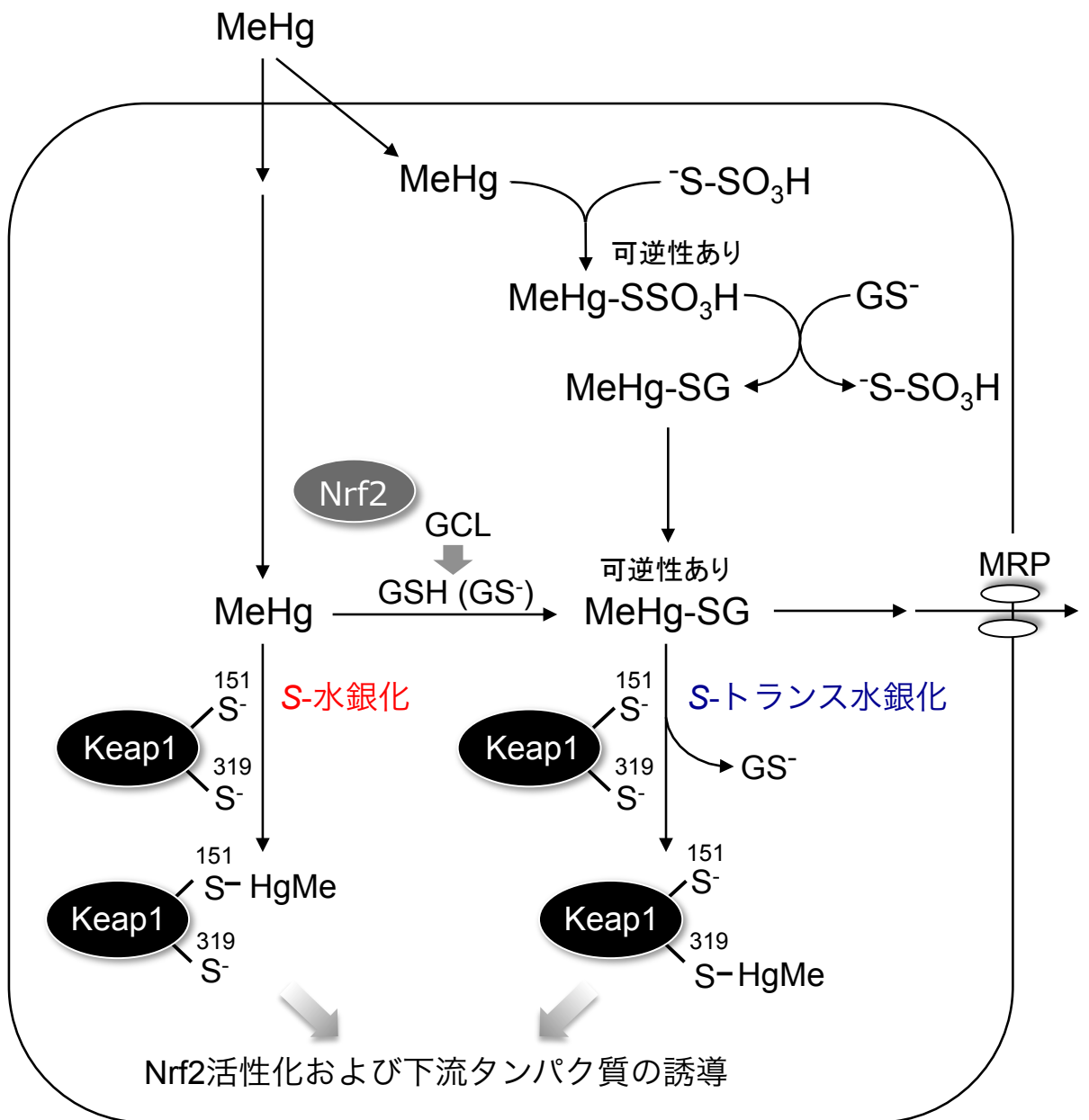


図1-16. Keap1へのS-トランス水銀化に伴うNrf2の活性化

## 第2章 メチル水銀の毒性軽減に係わる硫化水素の役割

### 2.1. 目的

MeHg が生体内に侵入すると、細胞内タンパク質のシステイン残基を介した S-水銀化が起こる。神経細胞等の特例を除いて、細胞内には数 mM 単位で GSH が存在しており、本分子が MeHg の S-水銀化の制御、および解毒・排泄に密接に関わっている。これまで、MeHg は Nrf2 に制御された GSH 抱合により親電子性を消失した後、細胞外に排泄されることが知られている<sup>22,140)</sup>。これは 40 年程前から明らかにされてきた唯一の MeHg 解毒代謝経路である。しかしながら、第 1 章で述べてきた通り、GSH 抱合により親電子性を消失すると言われてきた MeHg-SG は、再度細胞内タンパク質へ S-トランス水銀化し、結果的に細胞内タンパク質を S-水銀化することが証明された。加えて、GSH の pKa 値は 9.12 であり、生理的条件下ではその 2%程度しか解離 (GS<sup>-</sup>) していないことから、GSH による MeHg の毒性軽減機構は数 mM レベルの GSH 量で補われている点と、GSH 抱合反応後の細胞外への排泄が律速であると言える。

そこで、我々は GSH よりも pKa 値が低い生体内で産生され、かつ活性イオウ分子のひとつである H<sub>2</sub>S/HS<sup>-</sup>に着目した。近年、生体内で cystathionine β-synthase (CBS) や cystathionine γ-lyase (CSE) から産生される H<sub>2</sub>S は、循環器疾患や神経疾患に有効なガス状シグナル分子として注目されてきた。しかしながら、東北大学の赤池らにより CBS/CSE は H<sub>2</sub>S/HS<sup>-</sup>を産生するというよりも、生体内低分子や高分子として存在するパースルフィド (R-S-SH, R-S-SR) /ポリスルフィド (R-S-Sn-H, R-S-Sn-R) のような“活性イオウ分子 (Reactive Sulfur Species, RSS)”を産生する酵素であることが示された。これら H<sub>2</sub>S/HS<sup>-</sup>様活性イオウ分子も H<sub>2</sub>S 同様 (pKa=6.76), 低い pKa 値 (pKa=5~6.2) を有しているため、とても反応性が高く MeHg と容易に反応することが予想される。下記に、環境中で明らかになっている H<sub>2</sub>S/HS<sup>-</sup> と MeHg の反応を示す<sup>94)</sup> (式 5, 6 参照)。



そこで、我々は H<sub>2</sub>S/HS<sup>-</sup>様活性イオウ分子と MeHg の化学反応により生じると予想される代謝物 (MeHg)<sub>2</sub>S を細胞および個体レベルで同定し、CBS および CSE 由来 H<sub>2</sub>S/HS<sup>-</sup> 様活性イオウ分子が関与する MeHg の未知解毒代謝経路を立証することを目的とした。

### 2.2. 結果

#### 2.2.1. MeHg の予想代謝物 (MeHg)<sub>2</sub>S の合成

活性イオウ分子と MeHg の化学反応により、最終的に (MeHg)<sub>2</sub>S を生成することが予想された。そこで目的代謝物である (MeHg)<sub>2</sub>S を合成し、HPLC-AAS, 元素分析およ

び質量分析にて分析した。塩化メチル水銀飽和メタノール溶液に、3.7 M の NaHS を銀黒色の沈殿ができるまで加えた (図 2-1A)。得られた沈殿をエタノールで再結晶し、DMSO で洗浄後、HPLC-AAS, EI-MS および元素分析によって生成物の同定を行った。HPLC-AAS の結果、合成標品は保持時間 12 分に単一のピークが検出された (2-1B)。元素分析の結果、(MeHg)<sub>2</sub>S 標品の元素比は理論値と実測値が一致した (図 2-1C)。また、EI-MS の結果、(MeHg)<sub>2</sub>S の分子量と同様のフラグメント ( $m/z=462$ ) 及び、その分解生成物のフラグメント ( $m/z=248,449$ ) が検出された (図 2-1D)。

### 2.2.2. MeHg と NaHS および Na<sub>2</sub>S<sub>4</sub> との化学反応で生成する (MeHg)<sub>2</sub>S の化学量論

まず、H<sub>2</sub>S/HS<sup>-</sup>の発生剤である NaHS を用いて MeHg と反応させ、HPLC-AAS 解析した結果、MeHg (保持時間 4 分) とは異なる保持時間 12 分の生成物が認められた (図 2-2A)。本ピークを回収し、EI-MS に供し合成標品と比較した結果、この物質は親イオンピーク ( $m/z=464$ ) およびフラグメントピーク ( $m/z=248,449$ ) 共に (MeHg)<sub>2</sub>S の合成標品と完全に一致し、(MeHg)<sub>2</sub>S であることが同定された。また、0.25, 0.5, 1 のモル比で NaHS を MeHg と反応させると、化学量論に応じて (MeHg)<sub>2</sub>S の生成量が増加した (表 2-1)。

次に、ポリスルフィドのモデル化合物として Na<sub>2</sub>S<sub>4</sub> を用いて、MeHg と Na<sub>2</sub>S<sub>4</sub> の反応溶液を HPLC-AAS 解析したところ、(MeHg)<sub>2</sub>S 合成標品同様の保持時間 (12 分) を示す生成物が認められ (図 2-3)、EI-MS に供し合成標品と比較した結果、この物質は親イオンピーク ( $m/z=464$ ) およびフラグメントピーク ( $m/z=248,449$ ) 共に (MeHg)<sub>2</sub>S の合成標品と完全に一致し、(MeHg)<sub>2</sub>S であると同定された。また、0.25, 0.5, 1 のモル比で Na<sub>2</sub>S<sub>4</sub> を MeHg と反応させると、化学量論に応じて (MeHg)<sub>2</sub>S の生成量が増加し、等モル量の反応では 90%以上が (MeHg)<sub>2</sub>S に変換された (表 2-2)。

### 2.2.3. 生体試料からの (MeHg)<sub>2</sub>S 抽出法の確立

2.2.1 および 2.2.2 の結果から、MeHg は H<sub>2</sub>S/HS<sup>-</sup> やパースルフィド/ポリスルフィドなどの活性イオン分子との化学反応により (MeHg)<sub>2</sub>S を生成することが示された。したがって、細胞および個体レベルにおいて MeHg が (MeHg)<sub>2</sub>S に代謝されることが予想された。そこで、細胞および生体試料から新奇代謝物として (MeHg)<sub>2</sub>S を同定するため、生体試料からの (MeHg)<sub>2</sub>S 抽出方法を検討した。リン酸緩衝液, SH-SY5Y 細胞, マウス肝 9,000 x g 上清, およびマウス脳 9,000 x g 上清に (MeHg)<sub>2</sub>S を添加し、方法の部 11 に従って (MeHg)<sub>2</sub>S を抽出した後、HPLC-AAS 分析により回収率を算出した。本法による (MeHg)<sub>2</sub>S の回収率は、それぞれ  $99.8 \pm 1.89\%$  (リン酸緩衝液),  $66.5 \pm 12.7\%$  (SH-SY5Y 細胞),  $92.3 \pm 1.3\%$  (肝 9,000 x g 上清),  $75.3 \pm 16.3\%$  (脳 9,000 x g 上清) と高収率であった (図 2-4A)。さらに、最も効率よく (MeHg)<sub>2</sub>S が回収された肝 9,000 x g 上

清を用いて、生体試料中の(MeHg)<sub>2</sub>Sを定量するための検量線を作成した。肝 9,000 x g 上清に 0.4-8 ng の(MeHg)<sub>2</sub>S を添加し、(MeHg)<sub>2</sub>S を抽出後、HPLC-AAS 分析に供した。その結果、x 軸を(MeHg)<sub>2</sub>S (ng)、y 軸を AAS の検出強度でプロットすると、(MeHg)<sub>2</sub>S の検量線として  $y=0.8291x + 0.3005$  ( $R^2=0.99862$ ) が得られた (図 2-4B)。

#### 2.2.4. hCBS の酵素反応により生成する(MeHg)<sub>2</sub>S

hCBS を用いた酵素反応系に MeHg を添加すると、(MeHg)<sub>2</sub>S 合成標品と同様の保持時間 12 分の生成物が認められた (図 2-5A 中央図)。本ピークを回収し、EI-MS に供し合成標品と比較した結果、この物質は親イオンピーク ( $m/z=464$ ) およびフラグメントピーク ( $m/z=248, 449$ ) 共に(MeHg)<sub>2</sub>S の合成標品と完全に一致し、(MeHg)<sub>2</sub>S であることが同定された (図 2-5B)。一方、CBS の基質であるシステインを除いた酵素反応溶液に MeHg を加えても(MeHg)<sub>2</sub>S の産生は認められなかった (図 2-5A 右図)。これにより、(MeHg)<sub>2</sub>S の生成に少なくとも CBS が関与していることが示された。

#### 2.2.5. 生体試料からの新奇代謝物(MeHg)<sub>2</sub>S の同定

MeHg (20 μM) を一時間曝露した 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、方法の部 12 に従って疎水性水銀画分を抽出し、HPLC-AAS 解析した。これら生体試料中には MeHg や MeHg-SG 抱合体以外の未知の代謝物の存在が認められた (図 2-6A)。この代謝物は HPLC 上で合成標品である (MeHg)<sub>2</sub>S と同様の保持時間 (12 分) を有し、EI-MS においても親イオンピークとして  $m/z=464$ 、フラグメントピークとして  $m/z=248, 449$  が検出され、共に本標品と完全に一致した (図 2-6B)。また、HPLC-AAS により定量した結果、MeHg を曝露したラット肝臓中には 1 g 臓器あたり 1.04 pmol の (MeHg)<sub>2</sub>S が検出された。

#### 2.2.6. (MeHg)<sub>2</sub>S の有する親電子性評価

従前より MeHg の解毒に関わる代謝物として知られている MeHg-SG は、第 1 章により S-トランス水銀化能を有することが示され、再度細胞内タンパク質を S-水銀化することが明らかとなった。MeHg による毒性発現の一つとして、細胞内タンパク質への S-水銀化が関与することから、新奇代謝物として 2.2.4 で同定された (MeHg)<sub>2</sub>S の S-トランス水銀化能を細胞内低分子 GSH および SH-SY5Y 細胞を用いて検討した。はじめに、(MeHg)<sub>2</sub>S 合成標品と GSH を反応させ、S-トランス水銀化反応により MeHg-SG が生成するか検討した。(MeHg)<sub>2</sub>S-GSH 反応溶液を HPLC-AAS 分析した結果、(MeHg)<sub>2</sub>S 合成標品と同様の保持時間 12 分にピークが検出され、MeHg-SG 合成標品と同様の保持時間を示すピークは検出されなかった (図 2-7A)。次に、SH-SY5Y 細胞を用いて、細胞内タンパク質への S-水銀化を検討したところ、MeHg (100 μM) に SH-SY5Y 細胞を処理すると、複数の細胞内タンパク質の S-水銀化が生じたが、

(MeHg)<sub>2</sub>S による S-水銀化は認められなかった (図 2-7B). これにより (MeHg)<sub>2</sub>S は親電子性を消失した低反応性化合物であることが示され, MeHg と比較し (MeHg)<sub>2</sub>S は毒性の低い代謝物である可能性が示唆された.

### 2.2.7. (MeHg)<sub>2</sub>S を用いた毒性評価

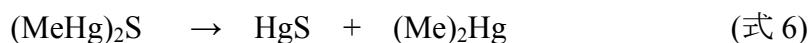
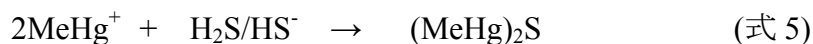
新奇 MeHg 代謝物として 2.2.4 で同定された (MeHg)<sub>2</sub>S が解毒代謝物であるかを検討するため, (MeHg)<sub>2</sub>S 合成標品を細胞および個体に曝露し, 本化合物の毒性を評価した. (MeHg)<sub>2</sub>S による細胞毒性を MTT 法にて検討した結果, MeHg は濃度依存的な細胞毒性が生じたが, (MeHg)<sub>2</sub>S による細胞毒性は顕著に低下した (図 2-8). この時, SH-SY5Y 細胞における MeHg の LC<sub>50</sub> は 2.4567 ± 0.0925 μM, (MeHg)<sub>2</sub>S の LC<sub>50</sub> は 4.313 ± 0.075 μM となり, MeHg と比較し, (MeHg)<sub>2</sub>S の毒性は有意に低いことが明らかとなった. 次に, 個体レベルにおける (MeHg)<sub>2</sub>S の毒性を評価した. MeHg (0.1 mmol/kg) をマウスに腹腔内投与すると, 24 時間以内にその 80% が死亡するのに対し, 同用量の (MeHg)<sub>2</sub>S (0.05 mmol/kg) を投与しても, 臓器内水銀蓄積量に有意な差が見られないにも関わらず, 全く急性致死効果を示さなかった (図 2-8B, C). 以上の結果から, 細胞および個体レベルで MeHg の新奇代謝物として同定された (MeHg)<sub>2</sub>S は, 親電子性を消失した解毒代謝物であることが明らかとなった.

### 2.2.8. マウスの各臓器における (MeHg)<sub>2</sub>S の分布

新奇解毒代謝物 (MeHg)<sub>2</sub>S の臓器分布を検討するため, MeHg および (MeHg)<sub>2</sub>S 投与マウスの各臓器における経時時間的な疎水性水銀代謝物の分布を HPLC-AAS にて分析した. まず, MeHg を投与した 24 時間後のマウスでは, 脳, 心臓, 腎臓, 精巣と幅広く (MeHg)<sub>2</sub>S の分布が認められた (図 2-9). しかしながら驚くことに, 24 時間後における (MeHg)<sub>2</sub>S 蓄積量と比較し 72 時間後では心臓特異的に約 10 倍量の (MeHg)<sub>2</sub>S が蓄積していた (図 2-9B). 一方, (MeHg)<sub>2</sub>S 投与マウスでは, 脳, 心臓, 腎臓への分布が認められるものの, 経時時間的な (MeHg)<sub>2</sub>S の蓄積に有意な差は見られなかった (図 2-9). 加えて, (MeHg)<sub>2</sub>S を投与したマウスの各臓器に分布した総水銀量が (MeHg)<sub>2</sub>S 投与量との収支と相関しない結果であった.

### 2.2.9. (MeHg)<sub>2</sub>S の生成を介した MeHg の無機化

2.2.8. の結果から, (MeHg)<sub>2</sub>S を投与したマウスの各臓器における (MeHg)<sub>2</sub>S の蓄積量が (MeHg)<sub>2</sub>S 投与量との収支と相関しないことから, 生体内において (MeHg)<sub>2</sub>S が分解し無機化した可能性が考えられた (式参照).



そこで、リン酸緩衝液および肝酵素溶液中における経時的な $(\text{MeHg})_2\text{S}$  の分解を検討した。その結果、それぞれの試料中の総水銀量は反応後 7 日目まで殆ど変動せず、各試料中に残存していたが、 $(\text{MeHg})_2\text{S}$  は緩やかに分解反応が進行し、リン酸緩衝液中では反応開始から 5 日目で対照値の約 50%、マウス肝臓ホモジネート液中では 100% が消失した (表 2-3)。また、両条件下において、本分解反応の生成物として微量の無機水銀が検出されたが、 $\text{MeHg}$  への変換は全く観察されなかった (表 2-4)。

#### 2.2.10. 細胞レベルにおける CBS による $\text{MeHg}$ の毒性軽減

$\text{MeHg}$  の毒性に対する CBS/CSE 由来  $\text{H}_2\text{S}/\text{HS}^-$  様活性イオウ分子の効果を検討するため、細胞レベルでは CBS を特異的に発現している SH-SY5Y 細胞を用いて、CBS を高発現および CBS の発現量を抑制し、細胞内  $\text{H}_2\text{S}/\text{HS}^-$  および活性イオウ量を変動させ、 $\text{MeHg}$  の細胞毒性に対する感受性を検討した。CBS の発現変動はウエスタンブロットにより検討した (図 2-11A)。細胞生存率は MTT 法を用いて評価した。

まず、SH-SY5Y 細胞に CBS/pcDNA の遺伝子導入により CBS が高発現している条件下 (細胞内  $\text{H}_2\text{S}/\text{HS}^-$  様活性イオウ量の増加) における  $\text{MeHg}$  (0.5, 1, 2  $\mu\text{M}$ ) の細胞毒性を MTT 法にて検討したところ、対照の SH-SY5Y 細胞と比較し、 $\text{MeHg}$  の毒性が有意に軽減された (図 2-11B)。または CBS siRNA の導入によって発現を抑制した細胞 (細胞内  $\text{H}_2\text{S}/\text{HS}^-$  様活性イオウ量の減少) では、対照細胞に比べ  $\text{MeHg}$  の細胞毒性が有意に増強した (図 2-11C)。このことから、細胞レベルにおいて  $\text{MeHg}$  の毒性を軽減する因子として、CBS 由来  $\text{H}_2\text{S}/\text{HS}^-$  様活性イオウ分子の関与が示唆された。

#### 2.2.11. 個体レベルにおいて $\text{MeHg}$ の毒性を制御する CSE

2.2.4, 5, 8 の結果から、生体内で産生される  $\text{H}_2\text{S}/\text{HS}^-$  および活性イオウ分子は  $\text{MeHg}$  を  $(\text{MeHg})_2\text{S}$  に変換し、不活性化することで本化合物の毒性を軽減することが明らかとなった。そこで、個体レベルにおいて  $\text{MeHg}$  毒性の感受性に  $\text{H}_2\text{S}/\text{HS}^-$  および活性イオウ分子産生酵素である CSE が関与するか否か検討した。6 週齢の野生型および CSE 遺伝子欠損マウスに  $\text{MeHg}$  (5 mg/kg) を連続 12 日間経口投与し、 $\text{MeHg}$  中毒症状である Hind limb flaccid (両後肢の交差, 弛緩, 接触) を検討した<sup>141)</sup>。本条件では野生型マウスは  $\text{MeHg}$  による特徴的な行動障害は認められなかった。一方、CSE 遺伝子欠損マウスでは、 $\text{MeHg}$  投与終了後から両後肢の交差および振戦が見られ、それに伴い体重も 25%程度減少し、最終的に  $\text{MeHg}$  投与開始から 20 日以内に全ての CSE 遺伝子欠損マウスが死亡した (図 2-12)。

CSE 遺伝子欠損マウスにおける  $\text{MeHg}$  の毒性に対する感受性の増強は、生体内  $\text{H}_2\text{S}/\text{HS}^-$  および活性イオウ分子産生量の低下に伴い、 $(\text{MeHg})_2\text{S}$  生成量が減少したためと予想される。そこで、個体レベルにおける  $(\text{MeHg})_2\text{S}$  生成に対する CSE 由来  $\text{H}_2\text{S}/\text{HS}^-$

および活性イオウ分子の重要性を明らかにするため、MeHg を投与した野生型マウスと CSE 遺伝子欠損マウスの各臓器 (脳, 心臓, 肝臓, 腎臓, 肺, 精巣) における(MeHg)<sub>2</sub>S 生成量を HPLC-AAS にて解析した。その結果, MeHg 投与野生型マウスの脳, 心臓, 肝臓, 腎臓において(MeHg)<sub>2</sub>S の産生が認められ, 特に脳, 心臓では(MeHg)<sub>2</sub>S の生成が顕著であった (図 2-13A, B)。一方, MeHg 投与 CSE 遺伝子欠損マウスの臓器中から, (MeHg)<sub>2</sub>S の生成は殆ど検出されなかった (図 2-13)。

以上の結果から, CSE が個体レベルにおける(MeHg)<sub>2</sub>S 生成の主役を司るだけでなく, 本酵素により産生される活性イオウ分子が MeHg の有害性防御に重要な因子であることが明らかとなった。

### 2.3. 考察

本研究により, 少なくとも CBS および CSE 由来の H<sub>2</sub>S/HS<sup>-</sup>様活性イオウ分子と MeHg の化学反応により生成される新奇代謝物(MeHg)<sub>2</sub>S を細胞および個体レベルで同定した (図 2-6)。さらに, 本代謝物の合成標品をマウスに投与しても MeHg のような急性致死効果は認められず, (MeHg)<sub>2</sub>S は解毒代謝物であることが明らかとなった (図 2-8)。

これまで MeHg などの外因性親電子物質による毒性を制御する生体内含硫低分子化合物として GSH が機能しているということは, 序論および第 1 章で述べてきた通り, 周知の事実である。当研究室の外山らの先行研究により, 細胞および個体レベルで, MeHg の GSH 抱合反応や MRP による排泄に関与する一連のタンパク質群を統括的に制御する転写因子 Nrf2 が MeHg の毒性防御に重要な役割を担っていることを明らかにした<sup>22)</sup>。しかしながら, GSH の pKa 値が 9.12 であることから, 生理的条件下では 2%程度しか解離 (GS<sup>-</sup>) していないため, MeHg と反応することが可能な GSH の量は少ないと考えられる。

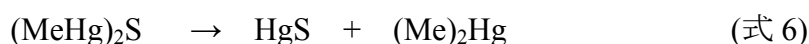
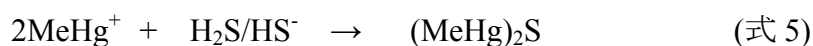
そこで, GSH よりも pKa 値の低い含硫低分子化合物である活性イオウ分子に着目した。MeHg を曝露した細胞およびラット肝臓中より MeHg-SG とは異なる新奇代謝物として, (MeHg)<sub>2</sub>S を同定した (図 2-6)。本代謝物はタンパク質への S-水銀化が見られず, GSH による S-トランス水銀化反応が認められない化合物であった (図 2-7)。また細胞レベルの検討で, CBS の発現変動により細胞内 GSH 量や水銀蓄積量に変化しないことが明らかとなった (データ未掲載)。このことは, CSE/CBS 由来活性イオウ分による MeHg の毒性軽減効果は, 従前より MeHg の解毒機構として知られている単純な細胞内 GSH 濃度の上昇により, MeHg の細胞外排泄を促進する毒性軽減機構とは異なる機構の存在を支持するものである。以上のことから, 細胞内に取り込まれた MeHg に対し, 細胞内の H<sub>2</sub>S/HS<sup>-</sup>様活性イオウ分子は速やかに MeHg と結合し, 本化合物を不活性化することで細胞内タンパク質の S-水銀化を抑制し, 毒性を軽減するという新奇解毒代謝経路を世界に先駆け立証した。

2012年西田らにより、内因性および外因性親電子物質と  $\text{H}_2\text{S}/\text{HS}^-$  の反応が示され、これにより細胞内タンパク質への親電子修飾が制御されることが報告された<sup>142)</sup>。本論文では、親電子物質により  $\text{H}_2\text{S}/\text{HS}^-$  との反応性が異なり、その生成物は大きく三つに分けられることが示されている。酸化ストレスや炎症時に生じる ROS や一酸化窒素 (NO) により産生される内因性親電子物質である 8-ニトロ-cGMP や 15d-プロスタグランジン  $\text{J}_2$  (15d-PG $\text{J}_2$ ) などの化合物は SH 付加体が生成する (Group I)。ニトロオレイン酸や環境中親電子物質である 1,2NQ, 1,4-NQ および TBQ などは  $\text{H}_2\text{S}/\text{HS}^-$  と反応し二量体 (E-S-E) を形成する (Group II)。不飽和アルデヒドを有するヒドロキシノネナールやアクロレインは  $\text{H}_2\text{S}/\text{HS}^-$  との反応により分解される (Group III)。このことから MeHg は Group II に属し、他の環境中親電子物質と同様の結果となった。

MeHg を曝露したマウスの各臓器における経時的な  $(\text{MeHg})_2\text{S}$  生成の分布について調べたところ、MeHg を曝露したマウスの 24 時間後の脳、心臓および腎臓から  $(\text{MeHg})_2\text{S}$  生成が認められた。しかしながら、72 時間後の各臓器分布を調べると、心臓特異的に  $(\text{MeHg})_2\text{S}$  が蓄積しており (24 時間後の心臓蓄積量の約 10 倍)、脳および腎臓の  $(\text{MeHg})_2\text{S}$  は検出限界以下であった。心臓へ特異的に  $(\text{MeHg})_2\text{S}$  が蓄積した可能性として、 $(\text{MeHg})_2\text{S}$  生成の鍵となる分子、つまり活性イオウ分子の濃度が高いことが予想される。まず、心臓における活性イオウ分子の濃度についてであるが、他の臓器と比較し心臓における活性イオウ分子産生酵素 CBS, CSE, 3MST の発現量は低い<sup>142)</sup>。このことから、心臓で産生される活性イオウ分子は少ないと予想される。しかしながら、東北大学の赤池らは心臓における活性イオウ分子種であるシステインパースルフィド (CysS-SH) およびグルタチオンパースルフィド (GS-SSH) 濃度が肝臓、脳と比較して 2, 3 倍程高いことを見出した (赤池ら投稿準備中)。それぞれの基質となる Cys や GSH 量は肝臓および脳内の濃度が高く、 $\text{H}_2\text{S}$  産生酵素 CBS, CSE, 3MST の発現も見られることから、これらの臓器で産生された CysS-SH および GS-SSH がなんらかの要因で心臓に運ばれ、MeHg と反応し  $(\text{MeHg})_2\text{S}$  を蓄積した可能性が考えられる。さらに、詳細は第 3 章で述べるが、肝臓と比較し心臓では、タンパク質結合活性イオウ分子 (PRSS) の量が低いことから、心臓における  $(\text{MeHg})_2\text{S}$  の蓄積は CysS-SH や GS-SSH と言った低分子、あるいはこれらのタンパク質結合体 (第 3 章を参照) に由来することが強く示唆される。

一方、 $(\text{MeHg})_2\text{S}$  投与マウスでは、脳、心臓、腎臓への分布が認められるものの、経時的な  $(\text{MeHg})_2\text{S}$  の蓄積に有意な差は見られなかった (図 2-9)。加えて、 $(\text{MeHg})_2\text{S}$  を投与したマウスの各臓器における水銀量の分布が  $(\text{MeHg})_2\text{S}$  投与量との収支と相関しない結果であった。このことから、生体内において  $(\text{MeHg})_2\text{S}$  が分解し無機化した可能性が考えられた<sup>94)</sup> (式参照)。





MeHg の代謝経路として、生体内で僅かであるが MeHg の無機化 (i-Hg) が起きると言われている。腸管内での無機化は糞便中への排泄を促進する<sup>71)</sup>。また、吸収され体内で無機化された水銀も主に腎臓から排泄されるが、胆汁とともに腸管に排泄されても再吸収されにくく、糞便と共に体外に排出される。これらのことから、MeHg の無機化は糞便中への排泄促進に関わる重要な機構であると考えられる。リン酸緩衝液およびマウス肝ホモジネート液中における経時的な $(\text{MeHg})_2\text{S}$  の安定性を密閉系で検討したところ、緩衝溶液中において $(\text{MeHg})_2\text{S}$  は比較的安定に存在しているが、肝可溶性画分中では $(\text{MeHg})_2\text{S}$  の分解が早まっていることから、可溶性画分中の酵素もしくは低分子等により分解が促進された可能性が示唆された。1978年に Craig らによって、反応は緩やかであるが<sup>94)</sup>、環境中で生成した $(\text{MeHg})_2\text{S}$  は無機水銀である HgS および有機水銀の $(\text{Me})_2\text{Hg}$  に分解されることが報告されている。 $(\text{Me})_2\text{Hg}$  は揮発性が高く、体内に取り込まれた場合、その大半が呼気として排出されると言われている<sup>143)</sup>。今後、 $(\text{MeHg})_2\text{S}$  の生成を介した一連の MeHg 無機化機構の解明が期待される。以上より、MeHg と活性イオウ分子との反応で生じた $(\text{MeHg})_2\text{S}$  は親電子性を消失し暫定的に解毒された後、徐々に分解反応が進行し、有害性に係る未同定代謝物に変換され、一部は無毒な無機水銀に変換されることが明らかとなった。このことは、従前から示唆されていた MeHg の無機化に一部 $(\text{MeHg})_2\text{S}$  が中間体として関与していることを示唆している。

水俣病発生から 60 年、MeHg の解毒機構に関して多くの研究が成されてきたが、本研究により初めて CSE/CBS により産生される活性イオウ分子を利用した解毒代謝経路として  $(\text{MeHg})_2\text{S}$  の生成による MeHg の毒性軽減機構を提示することができた。

#### 2.4. まとめ

- MeHg と活性イオウ分子モデル化合物 NaHS および  $\text{Na}_2\text{S}_4$  との化学反応により  $(\text{MeHg})_2\text{S}$  が生成した。
- MeHg を曝露した細胞および個体より新奇代謝物として $(\text{MeHg})_2\text{S}$  を同定した。
- $(\text{MeHg})_2\text{S}$  は親電子性を消失しており、細胞毒性および個体への急性致死効果も見られなかったことから、解毒代謝物であることが明らかとなった。
- CBE および CSE 由来の活性イオウ分子が MeHg の毒性軽減および生体内における $(\text{MeHg})_2\text{S}$  生成に重要であることが示された。

表2-1. MeHgとNaHSとの化学反応で生成する(MeHg)<sub>2</sub>Sの化学量論

NaHS added (nmol)	MeHg added (nmol)	(MeHg) <sub>2</sub> S formed		
		Predicted (nmol)	Observed (nmol)	Yield (%)
1.25	5.0	1.25	0.2 ± 0.13	15 ± 3
2.5	5.0	2.5	1.3 ± 0.05	52 ± 5
5.0	5.0	2.5	2.3 ± 0.02	92 ± 2

50 mM Kpi (pH 7.5) 中にて、上記のモル比でMeHgとNaHSを25°C、1時間反応した後、方法の部12に従って(MeHg)<sub>2</sub>Sを抽出し、HPLC-AASに供した。同様の検討を3回行った平均値±標準誤差 (SE) として示す。

表2-2. MeHgとNa<sub>2</sub>S<sub>4</sub>との化学反応で生成する(MeHg)<sub>2</sub>Sの化学量論

Na <sub>2</sub> S <sub>4</sub> added (nmol)	MeHg added (nmol)	(MeHg) <sub>2</sub> S formed		
		Predicted (nmol)	Observed (nmol)	Yield (%)
1.25	5.0	1.25	0.1 ± 0.04	7 ± 4
2.5	5.0	2.5	1.3 ± 0.11	52 ± 4
5.0	5.0	2.5	2.3 ± 0.12	93 ± 5

50 mM Kpi (pH 7.5) 中にて、上記のモル比でMeHgとNa<sub>2</sub>S<sub>4</sub>を25°C、1時間反応した後、方法の部12に従って(MeHg)<sub>2</sub>Sを抽出し、HPLC-AASに供した。同様の検討を3回行った平均値±標準誤差 (SE) として示す。

表2-3. リン酸バッファーおよび肝酵素溶液中における(MeHg)<sub>2</sub>Sの安定性

Days	Detected (MeHg) <sub>2</sub> S (%)				
	0	1	3	5	7
50 mM KPi buffer	100	97	106	57	20
Liver homogenate	92	76	56	0	0

表2-4. (MeHg)<sub>2</sub>Sの分解により生じる無機水銀

Days	Detected inorganic Hg (%)				
	0	1	3	5	7
50 mM KPi buffer	0.3	0.6	0.9	0.9	4
Liver homogenate	3	2	5	6	14

マウス肝酵素溶液9,000 x g 上清の調製は方法の部6.2.に記した。反応液 (1.5 mL) は各反応溶液 (1.485 mL) および10 mM (MeHg)<sub>2</sub>S (0.015 mL) からなる。反応溶液は37°Cで反応させ、経時時間的な(MeHg)<sub>2</sub>S残存量および総無機水銀量を測定した。(MeHg)<sub>2</sub>S残存量は方法の部12に、総無機水銀量の測定は13に従って測定した。同様の検討を2回行った平均値を示す。

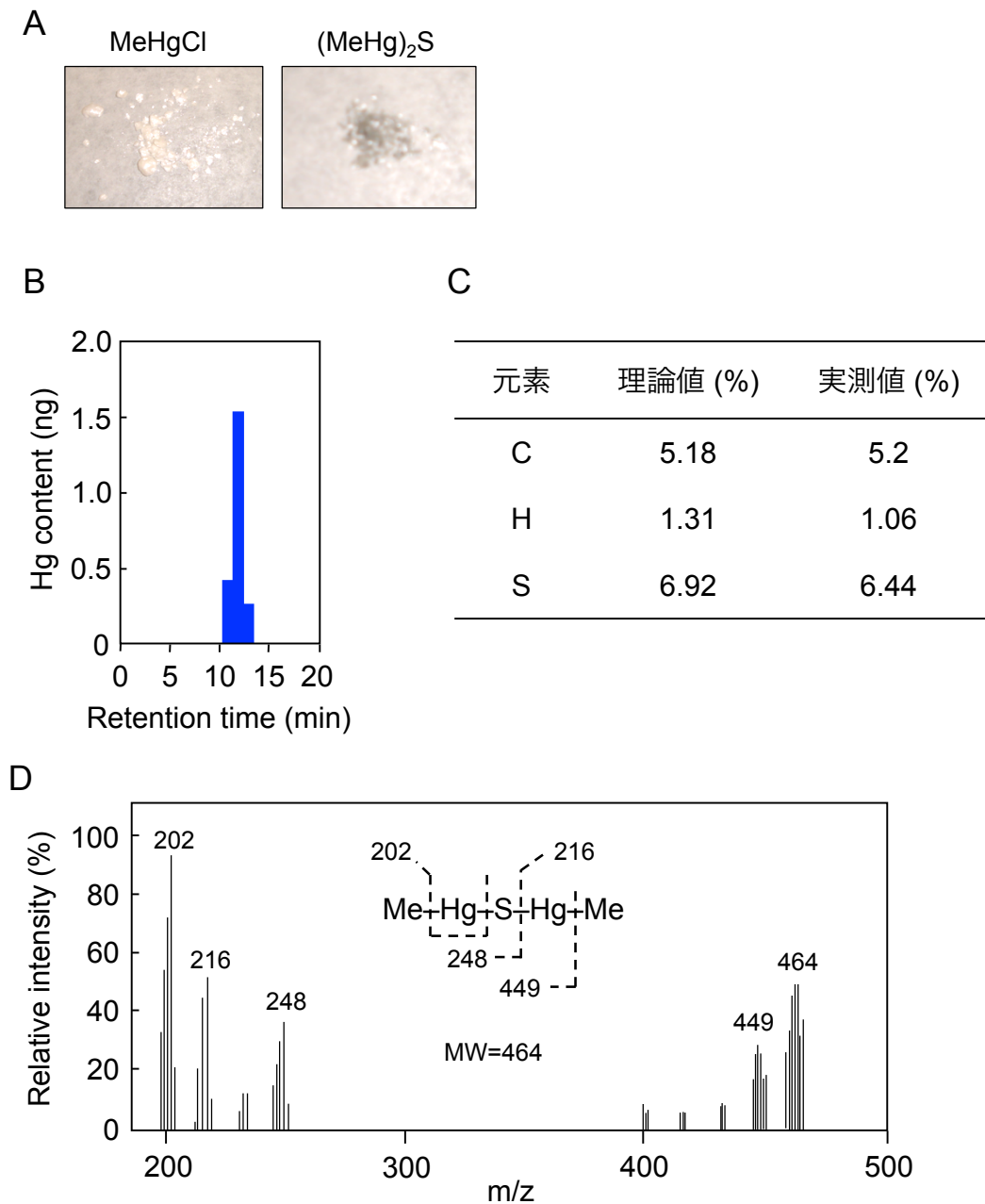


図2-1. (MeHg)<sub>2</sub>S合成標品

MeHgとNaHSを反応させた後、HPLC-AAS、元素分析およびEI-MSにて同定した。A. MeHg (左図) および合成して得られた(MeHg)<sub>2</sub>S標品の結晶 (右図) を示す。B. MeHg-NaHS反応生成物をHPLC-AASに供した。Column, ZORBAX Eclipse XDB-C18 (50 mm x 2.1 mm i.d., 5 μM); 移動相, 0.1% FA/MeOH (9:1, v/v); 流速, 0.5 mL/min。C. MeHg-NaHS反応生成物を元素分析した結果を示す。D. MeHg-NaHS反応生成物をEI-MSに供し、得られたMSスペクトルを示す。

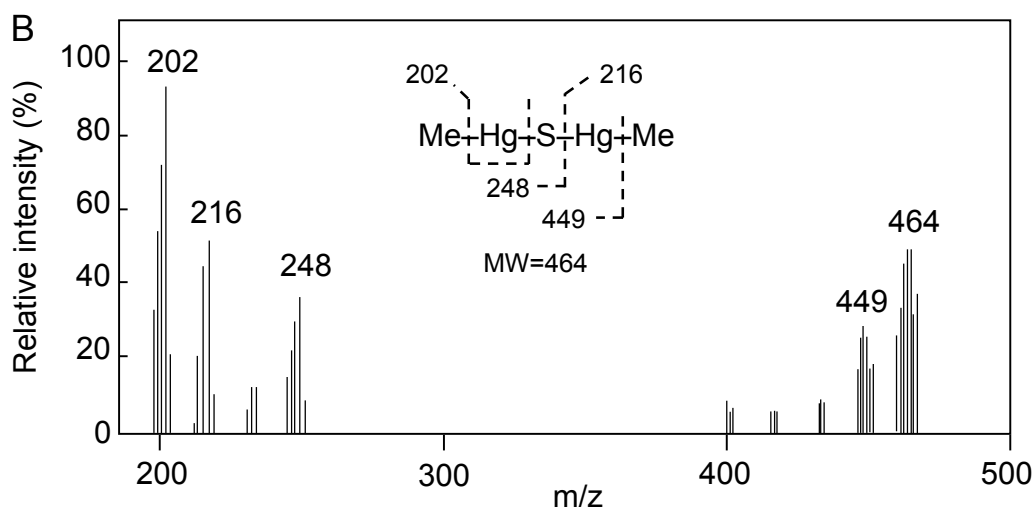
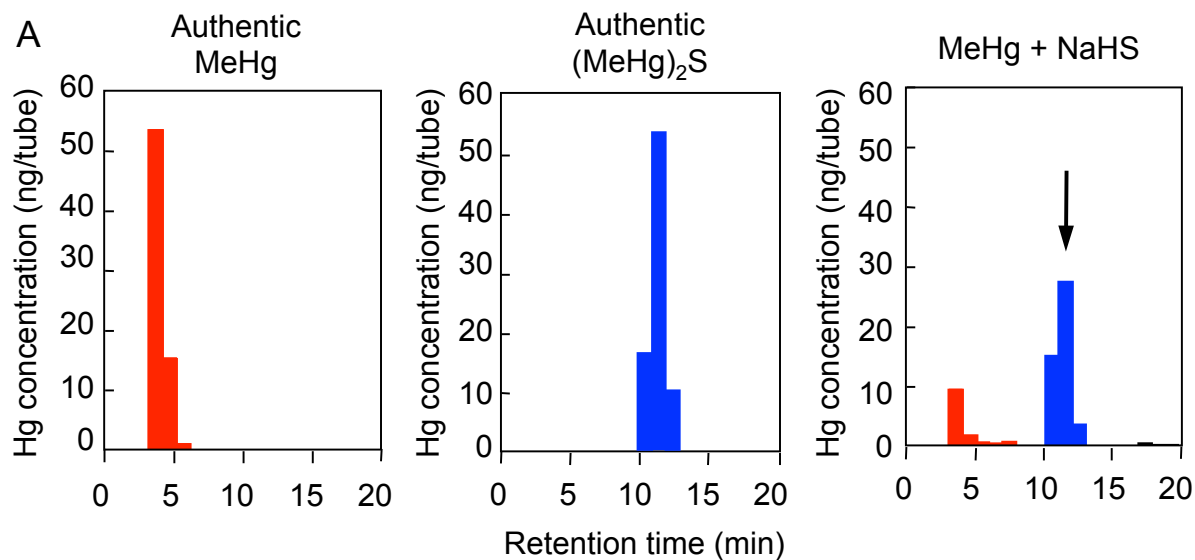


図2-2. MeHg-NaHS反応生成物の同定

50 mM Kpi (pH 7.5) 中にて、MeHg (100  $\mu$ M) とNaHS (25, 50, 100  $\mu$ M) を 25°C, 1時間反応させた後、HPLC-AASおよびEI-MSに供し、未知反応生成物 (矢印) を同定した。Column, ZORBAX Eclipse XDB-C18 (50 mm x 2.1 mm i.d., 5  $\mu$ m); 移動相, 0.1% FA/MeOH (9:1, v/v); 流速, 0.5 mL/min. MeHg標品 (左図), (MeHg)<sub>2</sub>S合成標品 (中央図), およびMeHg-NaHS反応生成物 (左図) をHPLC-AASに供した結果を示す。B. Aで検出された保持時間12 minのピークをEI-MSに供し、得られたMSスペクトルを示す。

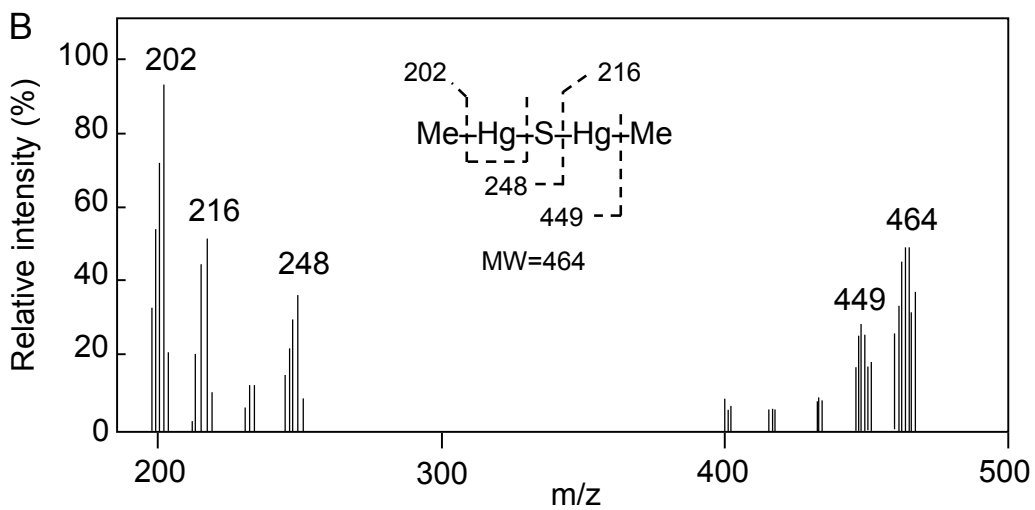
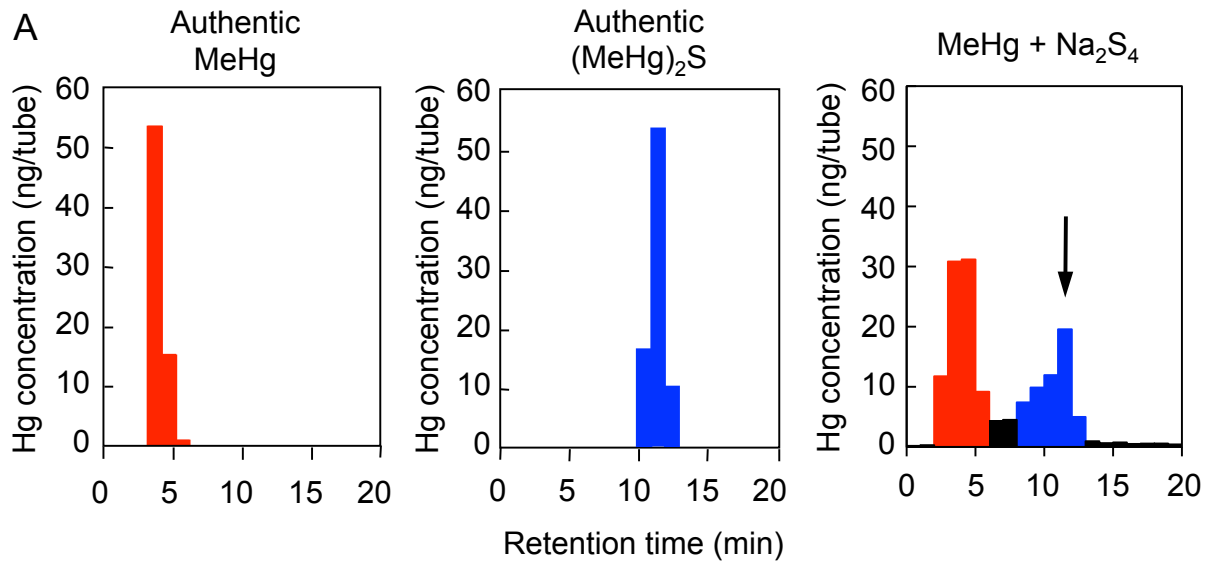


図2-3. MeHgとNa<sub>2</sub>S<sub>4</sub>との化学反応により生成する(MeHg)<sub>2</sub>S

50 mM Kpi (pH 7.5) 中にて, MeHg (100 μM) とNa<sub>2</sub>S<sub>4</sub> (25, 50, 100 μM)を25°C, 1時間反応させた後, HPLC-AASにて(MeHg)<sub>2</sub>Sを検出した. 反応生成物を矢印で示す. Column, ZORBAX Eclipse XDB-C18 (50 mm x 2.1 mm i.d., 5 μM); 移動相, 0.1% FA/MeOH (9:1, v/v); 流速, 0.5 mL/min. MeHg標品 (左図), (MeHg)<sub>2</sub>S合成標品 (中央図), およびMeHg-Na<sub>2</sub>S<sub>4</sub>反応生成物 (右図) をHPLC-AASに供した結果を示す.

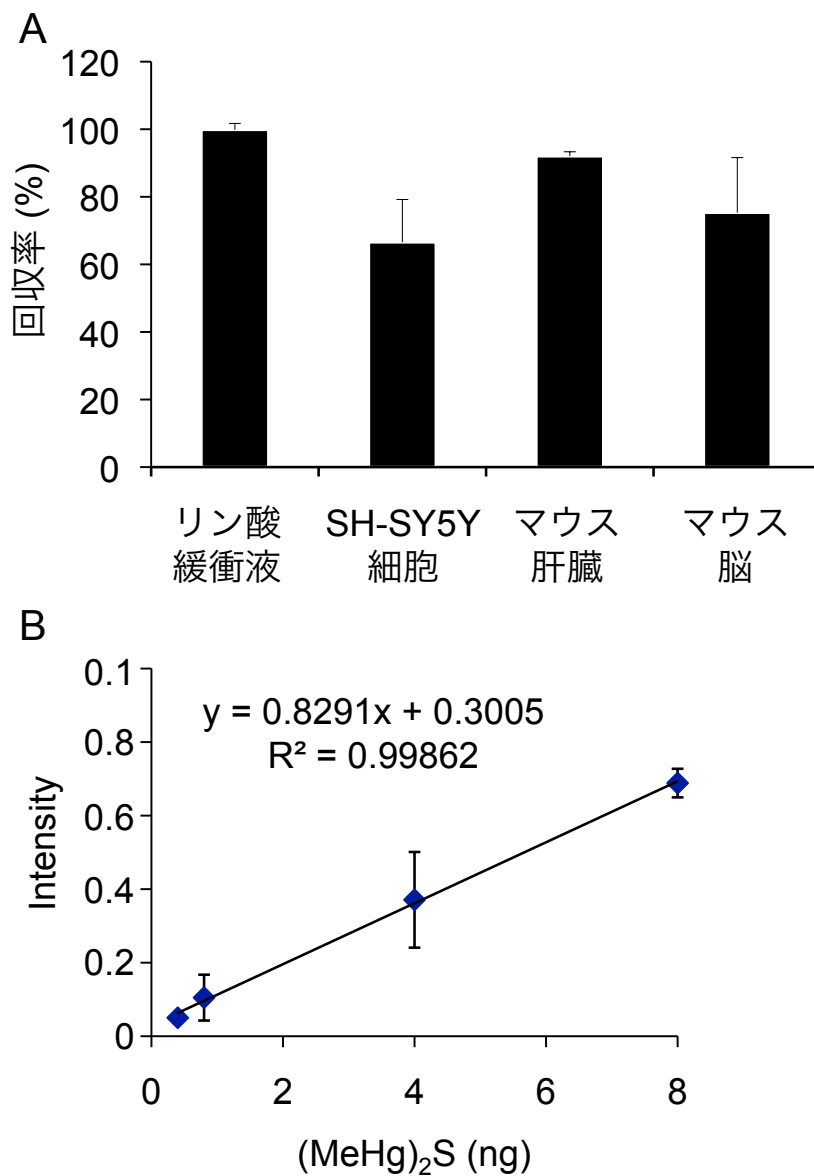


図2-4. 生体試料からの(MeHg)<sub>2</sub>Sの回収率

A. 50 mM Kpi (pH 7.5), 方法の部6.2および6.3に記載した方法で得られた各生体試料の9,000 x g 上清に, (MeHg)<sub>2</sub>Sを添加し, 方法の部12に従って (MeHg)<sub>2</sub>Sを抽出し, HPLC-AAS分析により回収率を算出した. B. マウス肝臓の9,000 x g 上清に, 0.4-8 ngの(MeHg)<sub>2</sub>Sを添加し, 方法の部12に従って (MeHg)<sub>2</sub>Sを抽出し, HPLC-AAS分析により検量線を作成した. 同様の検討を3回行った平均値±標準誤差 (SE) として示す.



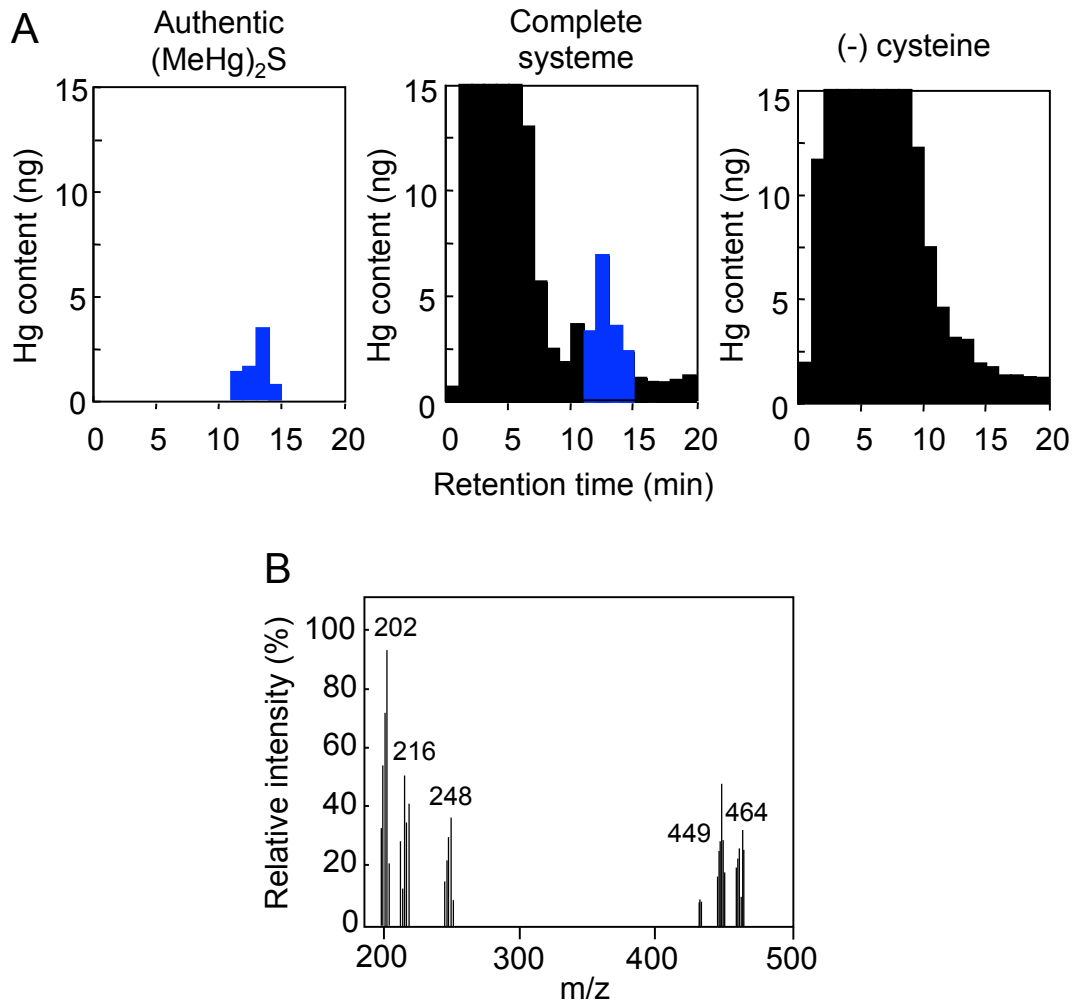


図2-5. hCBS精製酵素反応系における(MeHg)<sub>2</sub>Sの生成

hCBS精製酵素反応系(方法の部14.3.3)にMeHg (10 mM)を加え、25°C、30分間反応させた後、10%TCAにて酵素反応系を停止した。酵素反応溶液は、方法の部12に従って(MeHg)<sub>2</sub>Sを抽出し、HPLC-AASに供した。A. HPLC-AASに(MeHg)<sub>2</sub>S標準品(左図)、コンプリート酵素反応溶液(中央図)、システインを除いた酵素反応溶液(右図)、を供した。B. Aでコンプリート酵素反応溶液に検出された保持時間12-15 minの画分を回収し、エバポレーターで濃縮後、EI-MSに供し得られたMSスペクトルを示す。

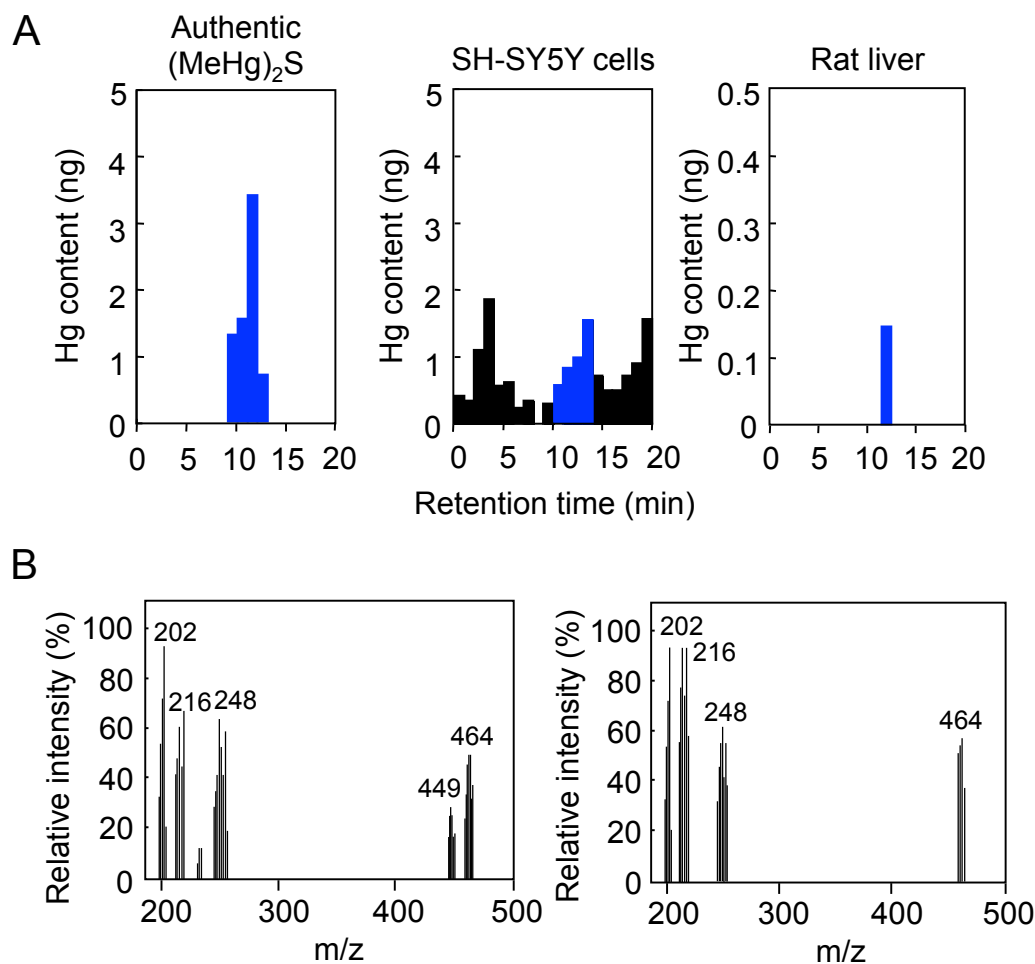


図2-6. SH-SY5Y細胞およびラット肝臓におけるMeHg新奇代謝物の同定

A. HPLC-AASにてMeHgおよびそれに関連するMeHg代謝物を検出した。(MeHg)<sub>2</sub>S標準品(左図), SH-SY5Y細胞にMeHg (20 μM) を1時間曝露した(中央図), ラットは0.04 mmol/kg, 8日間連続皮下投与した(右図), 各々の生体試料から方法の部11.に従ってMeHgおよびその関連化合物を抽出し, HPLC-AASに供した。B. A. SH-SY5Y細胞およびラット肝臓で検出された保持時間12 – 15 minの画分を回収し, エバポレーターで濃縮後, EI-MSに供し得られたMSスペクトルを示す。

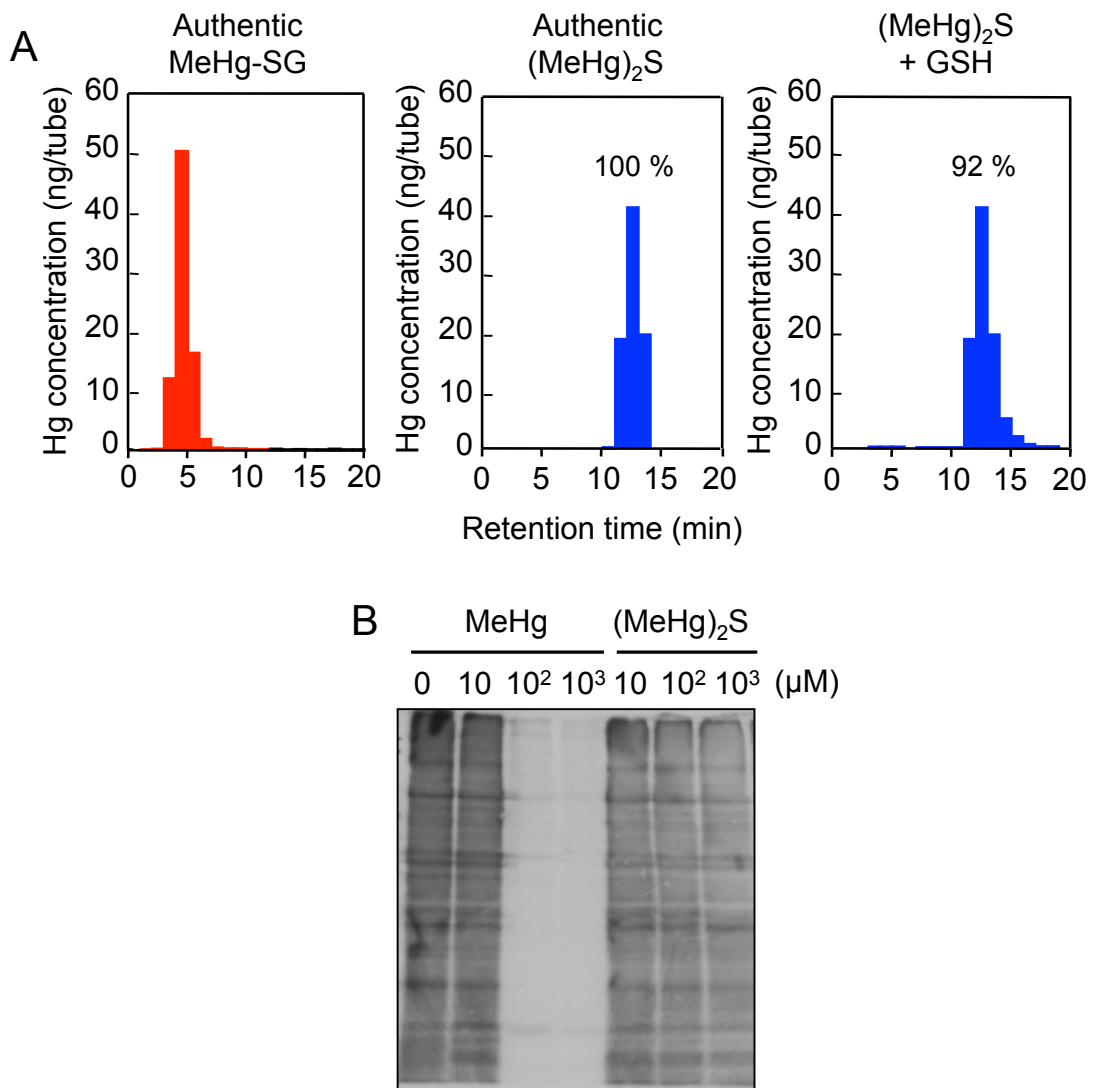


図2-7. MeHgの新奇代謝物(MeHg)<sub>2</sub>SによるS-トランス水銀化の検討

A. 50 mM Kpi (pH 7.5) 中にて, (MeHg)<sub>2</sub>S (100 μM) とGSH (200 μM) を25°C, 1時間反応させた後, HPLC-AASにて(MeHg)<sub>2</sub>Sを検出した (n=2). Column, ZORBAX Eclipse XDB-C18 (50 mm x 2.1 mm i.d., 5 μM); 移動相, 0.1% FA/MeOH (9:1, v/v); 流速, 0.5 mL/min. MeHg-SG合成標品 (左図), (MeHg)<sub>2</sub>S合成標品 (中央図), および(MeHg)<sub>2</sub>SとGSHの反応液 (右図) をHPLC-AASに供した結果を示す.

B. SH-SY5Y細胞細溶解液にMeHgおよび(MeHg)<sub>2</sub>Sを25°C, 30分間反応させ, 方法の部8.5.2に示した方法でBPM標識法を行った.

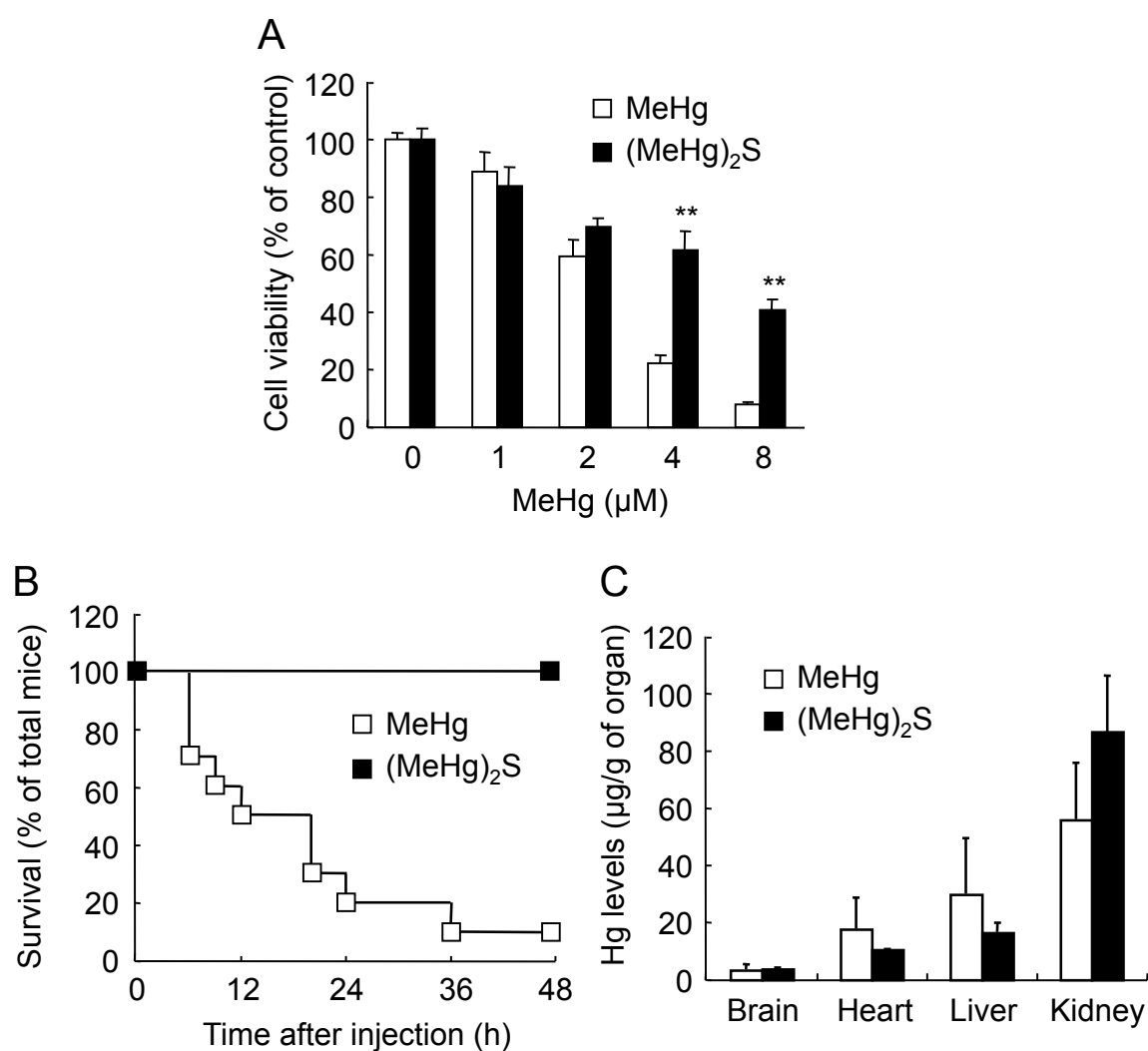


図2-8. MeHgの新奇代謝物(MeHg)<sub>2</sub>SがSH-SY5Y細胞およびマウスに与える影響

A. SH-SY5Y細胞にMeHgまたは(MeHg)<sub>2</sub>Sを24時間曝露した。方法の部5に示したようにMTT法にて細胞生存率を測定した (n=3)。 B. MeHg (0.1 mmol/kg) および(MeHg)<sub>2</sub>S (0.05 mmol/kg) をマウスに腹腔内投与し死亡率を測定した (n=10)。 C. Bと同様の条件でマウスに各水銀化合物を腹腔内投与し、24時間後における各臓器の水銀蓄積量をAAS (方法の部16.3.) に供し測定した (n=3)。 平均値±標準誤差 (SE) として示す。 \*\**p*<0.01 vs. Control.

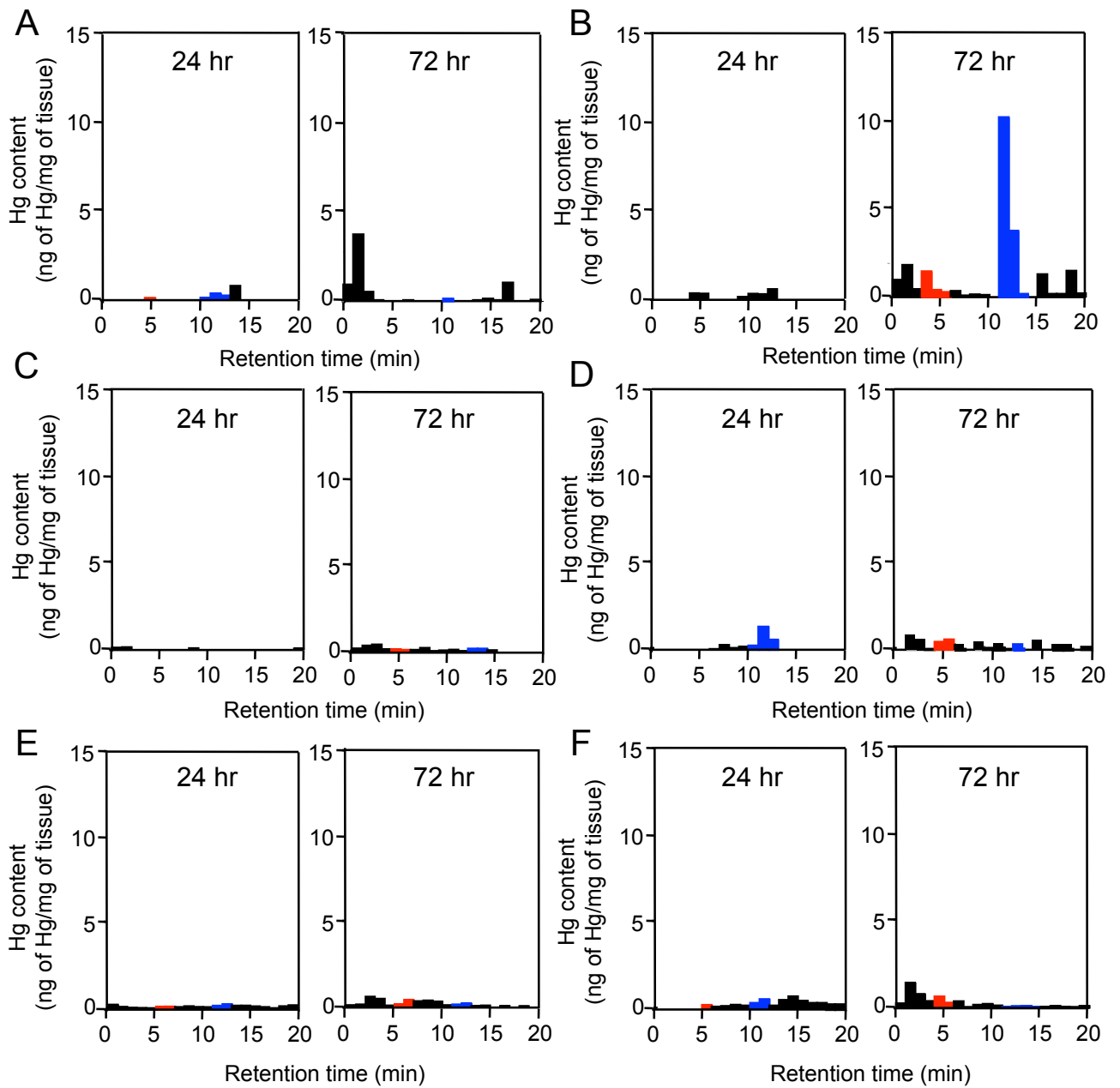


図2-9. MeHg投与マウスの各臓器における(MeHg)<sub>2</sub>Sの分布

MeHg (0.05 mmol/kg) を野生型マウスに腹腔内投与し、24時間後および72時間後の各臓器における(MeHg)<sub>2</sub>Sの生成をHPLC-AASにて測定した。MeHgの保持時間を赤色、(MeHg)<sub>2</sub>Sの保持時間を青色、未知疎水性水銀代謝物を黒色で示した。詳細な(MeHg)<sub>2</sub>S検出方法は、方法の部11.に示す。脳(A)、心臓(B)、肝臓(C)、腎臓(D)、肺(E)、精巢(F)のそれぞれHPLC-AASの結果を示す。

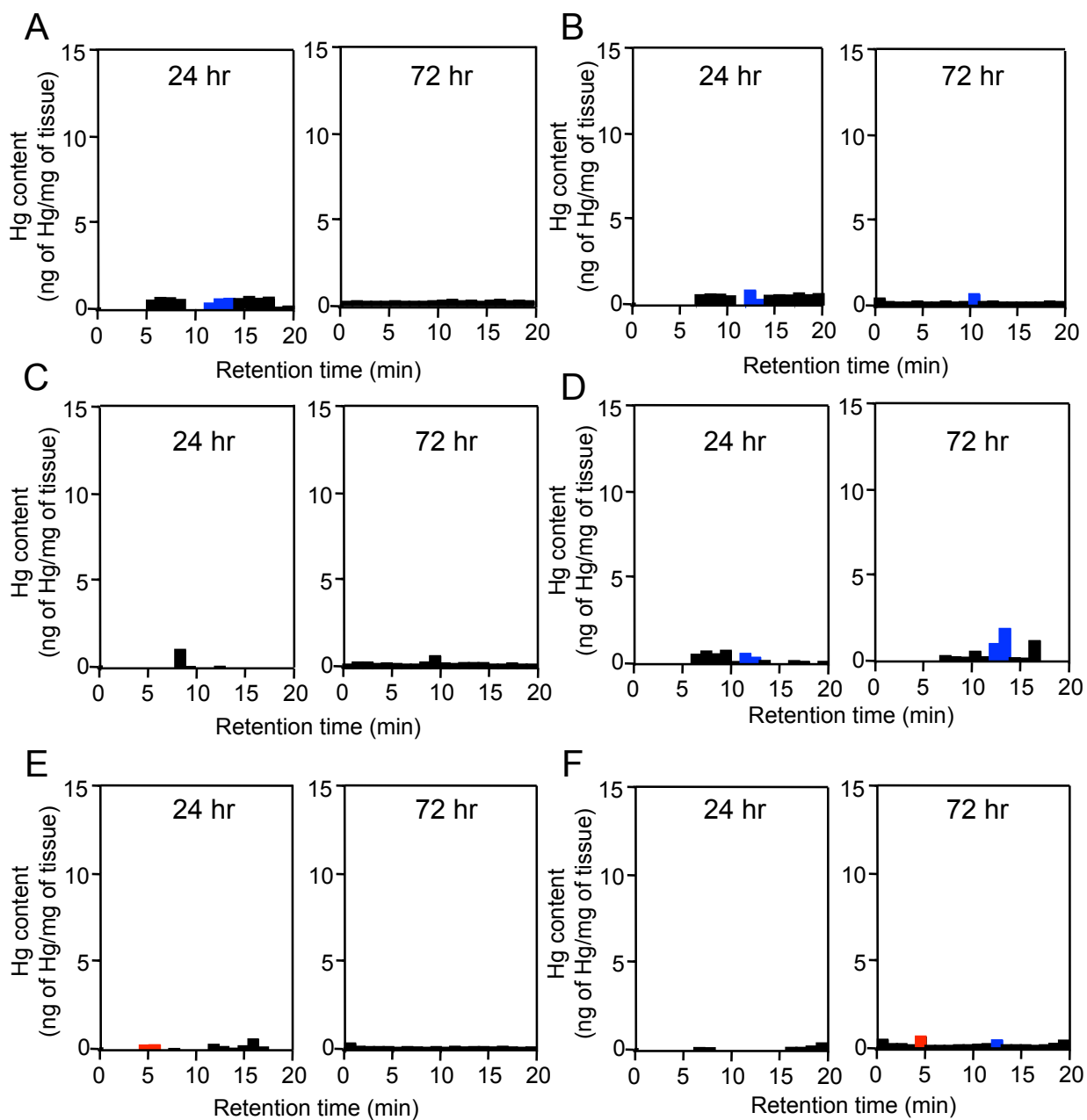


図2-10. (MeHg)<sub>2</sub>S投与マウスの各臓器における(MeHg)<sub>2</sub>Sの分布

(MeHg)<sub>2</sub>S (0.025 mmol/kg) を野生型マウスに腹腔内投与し、24時間後および72時間後の各臓器における(MeHg)<sub>2</sub>Sの生成をHPLC-AASにて測定した。MeHgの保持時間を赤色、(MeHg)<sub>2</sub>Sの保持時間を青色、未知疎水性水銀代謝物を黒色で示した。詳細な(MeHg)<sub>2</sub>S検出方法は、方法の部11に示す。脳(A)、心臓(B)、肝臓(C)、腎臓(D)、肺(E)、精巣(F)のそれぞれHPLC-AASの結果を示す。

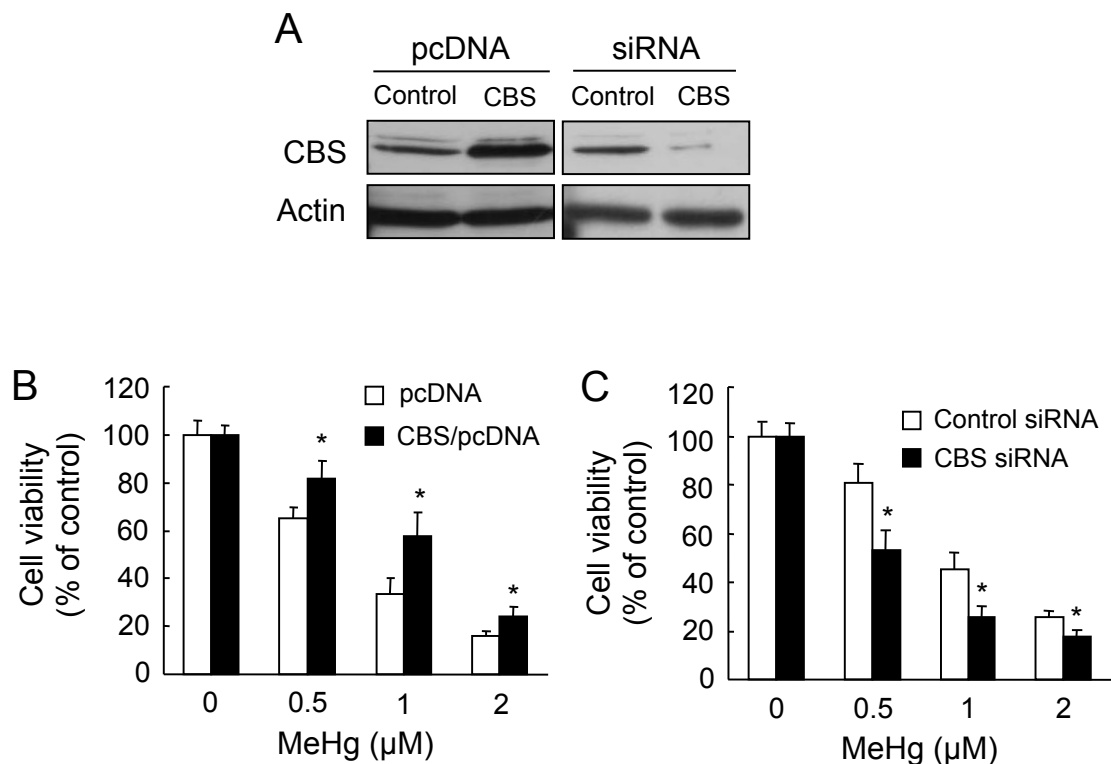


図2-11. SH-SY5Y細胞におけるCBSによるMeHgの毒性軽減

A. SH-SY5Y細胞にpcDNAまたはpcDNA/CBSを24時間、control siRNAまたはCBS siRNAを48時間導入した。その後、細胞を回収し、ウェスタンブロットにてCBSの発現が変動されたことを確認した。SH-SY5Y細胞にpcDNAおよびpcDNA/CBSを24時間導入 (B) SH-SY5Y細胞にcontrol siRNAおよびCBS siRNAを48時間導入 (C) した後、MeHgを24時間曝露した。方法の部5に示したようにMTT法にて細胞生存率を測定した。同様の検討を4回行った平均値±標準誤差 (SE) として示す。\* $p < 0.05$  vs. Control.

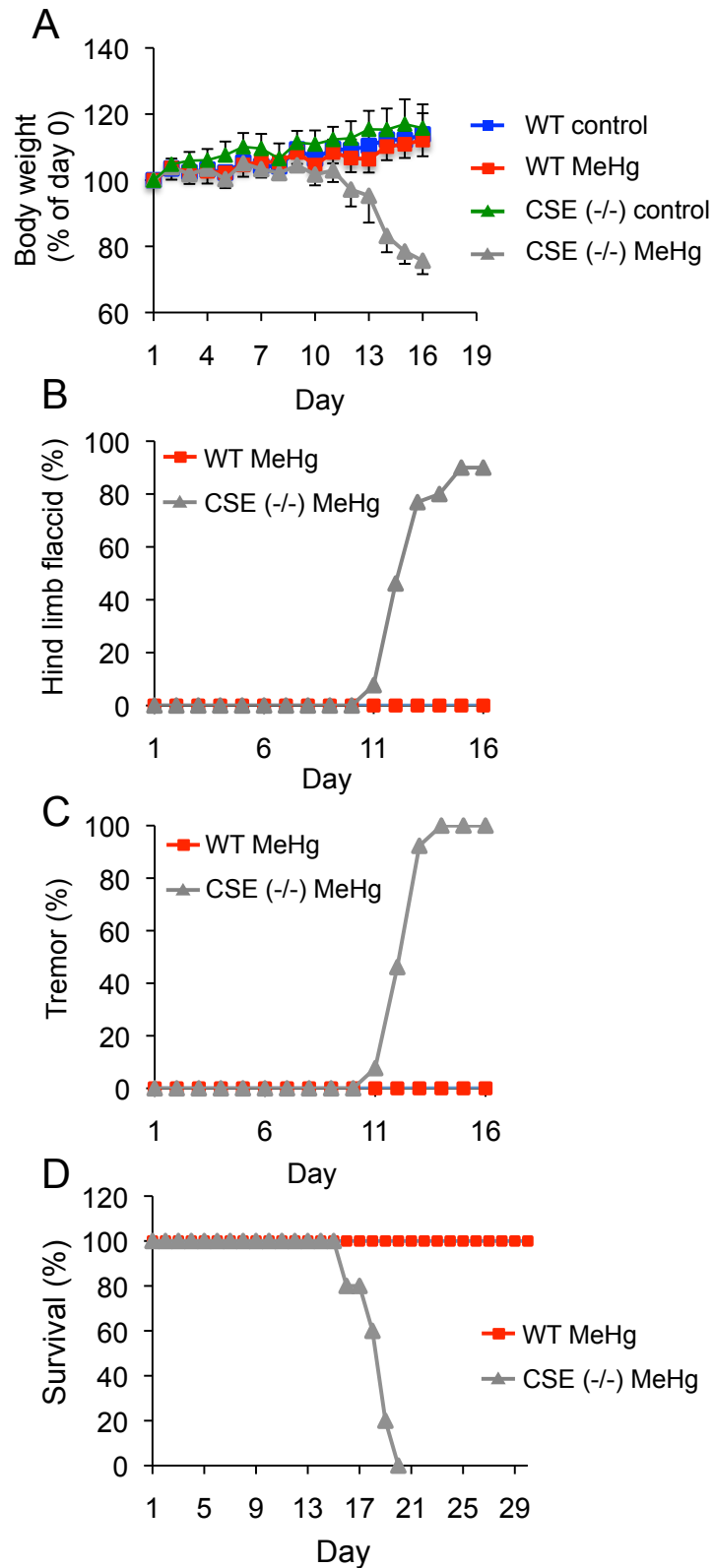


図2-12. マウス個体におけるMeHgの感受性に関与するCSE

MeHg (5 mg/kg/day) を野生型マウスおよびCSE遺伝子欠損マウスに12日間連続経口投与し、体重減少 (A)、後肢交差 (B)、振戦 (C)、死亡率 (D) を測定した (n=8).



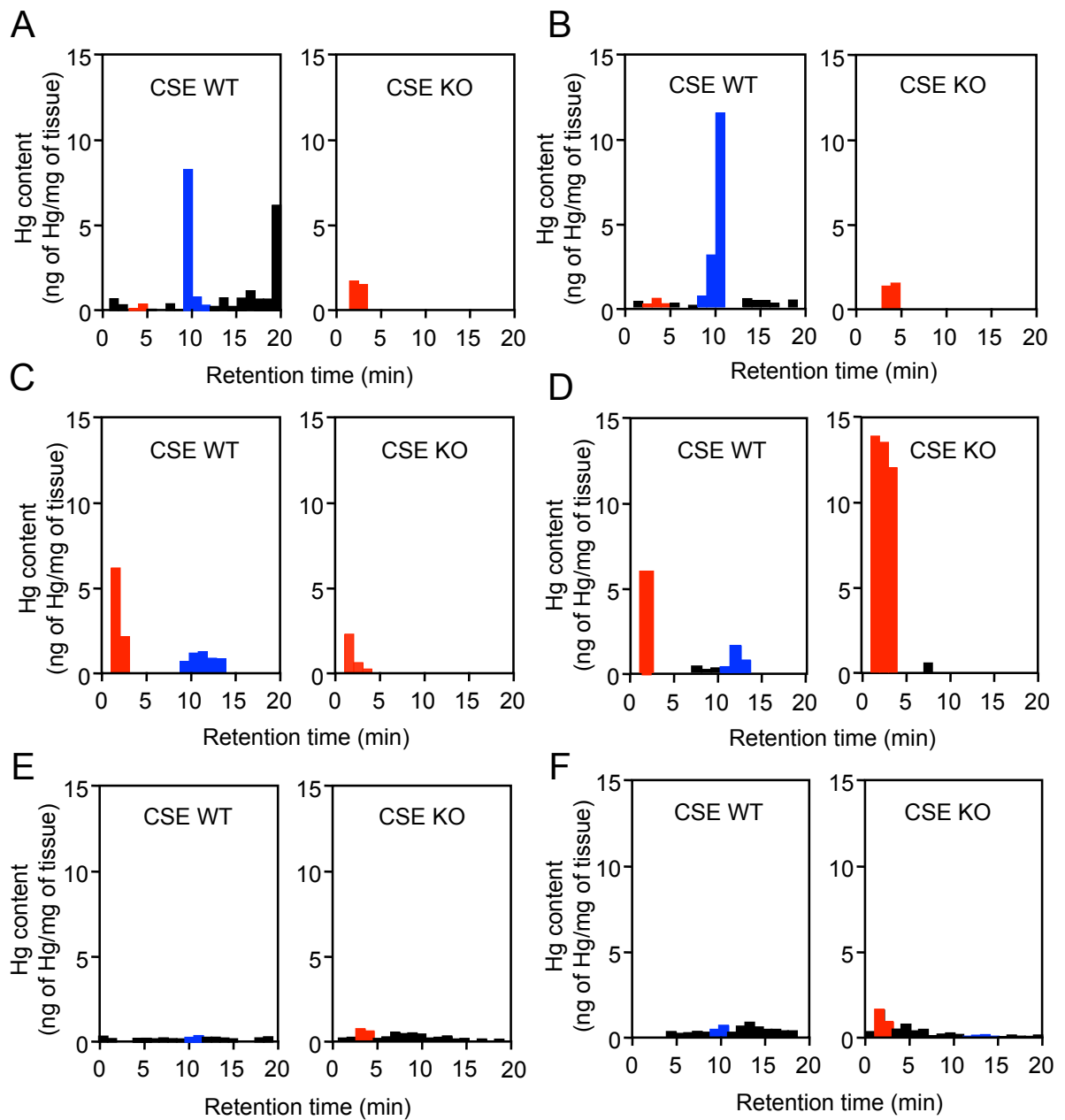


図2-13. 個体レベルでの(MeHg)<sub>2</sub>Sの生成におけるCSEの役割

MeHg (10 mg/kg) を野生型マウスおよびCSE遺伝子欠損マウスに経口投与し、72時間後の各臓器における(MeHg)<sub>2</sub>Sの生成をHPLC-AASにて測定した。MeHgの保持時間を赤色、(MeHg)<sub>2</sub>Sの保持時間を青色、未知疎水性水銀代謝物を黒色で示した。詳細な(MeHg)<sub>2</sub>S検出方法は、方法の部12に示す。脳 (A)、心臓 (B)、肝臓 (C)、腎臓(D)、肺 (E)、精巣 (F) のそれぞれHPLC-AASの結果を示す。

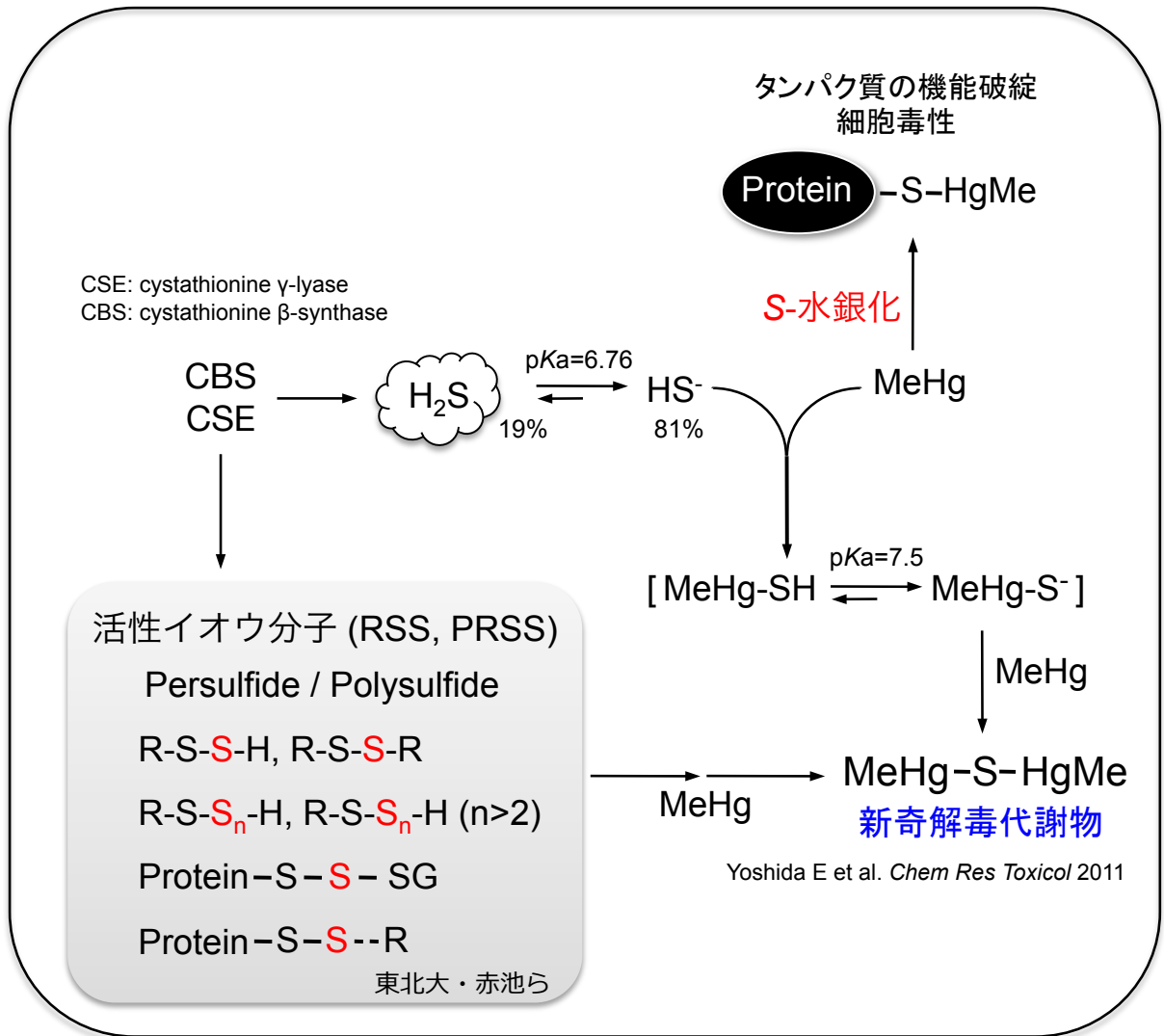
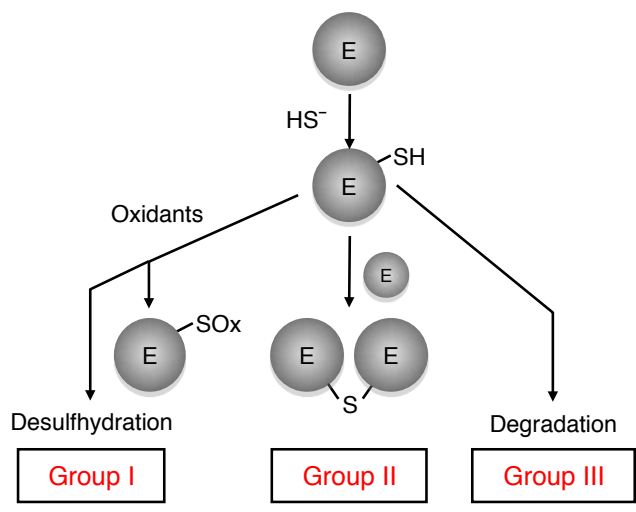
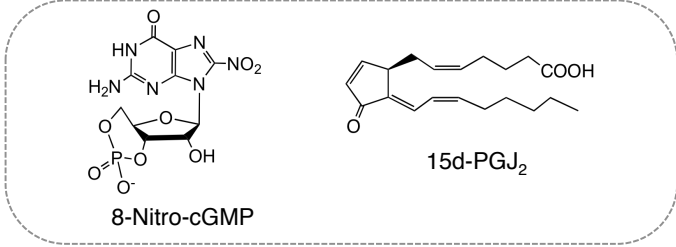


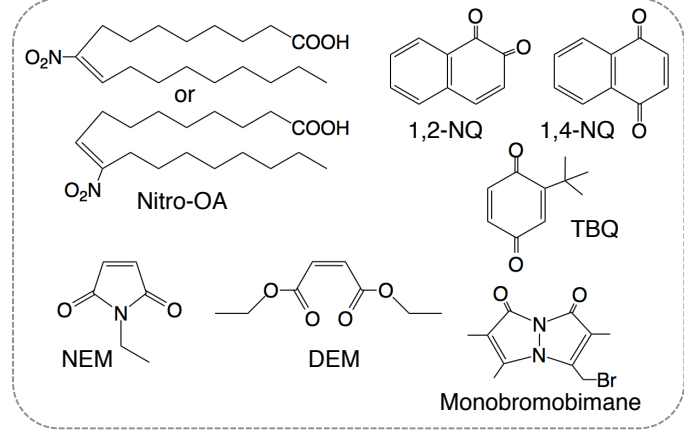
図2-14. 第2章研究概要



Group I



Group II



Group III

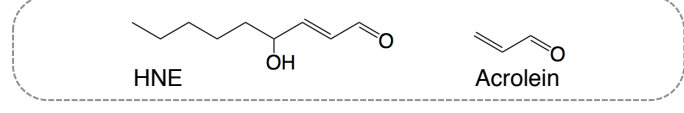


図2-15. 内因性・外因性親電子物質とH<sub>2</sub>S/HS<sup>-</sup>の反応生成物に関するグループ分け

西田らの図 (Nishida *et al.*, 2011) を引用した。

## 第3章 メチル水銀の毒性を制御する活性イオウ分子結合タンパク質 (PRSS) のプロテオミクス

### 3.1. 目的

第2章で、我々は MeHg を曝露した SH-SY5Y 細胞およびラット肝臓組織中から、MeHg の新奇解毒代謝物として (MeHg)<sub>2</sub>S を同定し、MeHg の新奇解毒代謝経路を明らかにした。本代謝物の構造から想定して、(MeHg)<sub>2</sub>S のイオウ原子は CSE などから産生されるパーサルフィド (R-S-SH, R-S-S-R) /ポリサルフィド (R-S-Sn-H, R-S-Sn-R) のような低い pKa 値を有する活性イオウ分子に由来する可能性が示唆された。事実、MeHg は NaHS だけでなく、Na<sub>2</sub>S<sub>4</sub> との反応により (MeHg)<sub>2</sub>S が生成された。Na<sub>2</sub>S<sub>4</sub> との反応により、MeHg-S-S-S-S-HgMe の産生は検出されないことから、4つのイオウ原子の何れかに求核性を有するイオウ原子が存在し、それに対して MeHg が反応して1原子のイオウを引き抜いていると考えられた。序論でも述べたように、このような活性イオウ分子 (Reactive Sulfur Species, RSS) は、生体内で主にシステインおよびグルタチオンのパーサルフィド (R-S-SH) およびポリサルフィド (R-S-Sn-R) として低分子化合物に保存され存在している。また、RSS は、計算上 H<sub>2</sub>S よりも低い pKa 値 (pKa = 5~6.2) を有しているため、とても反応性が高く、その一部はタンパク質のシステイン残基に結合して安定化することで、生体内のタンパク質に保存されていることが予想された。そこで本章では、実際に生体内で高濃度産生されているグルタチオンのパーサルフィド (GS-SH, GS-S-SG) の合成標品を用いて、(MeHg)<sub>2</sub>S 生成における GSH パーサルフィドの関与を検討すること、さらに (MeHg)<sub>2</sub>S 産生を指標とした“活性イオウ分子結合タンパク質 (Protein-bound RSS, PRSS)”を単離・精製することを目的とした。

### 3.2. 結果

#### 3.2.1. 酸化型 GSH パーサルフィド (GS-S-SG) の合成

本研究では (MeHg)<sub>2</sub>S の生成における、GSH パーサルフィド (GS-SH, GS-S-SG) と MeHg の反応性を検討するため、GS-S-SG および GS-SH の化学合成を試みた。GSSG と NaHS の反応産物をカラムで精製し、それぞれを UPLC-MS<sup>E</sup> にて同定した。その結果、GSSG と NaHS の反応生成物は UPLC 上で保持時間 1.3 分にピークが検出され、本ピークの MS 解析の結果、親イオンピーク  $m/z=645.1$  を示した (図 3-2)。また、GS-S-SG はグルタチオンリダクターゼ (GSR) の基質となることから、GSR 酵素反応系を用いて GS-SH を生成した。

#### 3.2.2. (MeHg)<sub>2</sub>S の生成における MeHg と GSH パーサルフィドの反応性 (MeHg)<sub>2</sub>S の生成に活性イオウ分子 GSH パーサルフィド (GS-SH) およびその酸化

型 (GS-S-SG) が関与するか検討した. MeHg と GS-SH の反応溶液を HPLC-AAS 解析したところ, (MeHg)<sub>2</sub>S 合成標品同様の保持時間 (12 分) を示す生成物が認められた (図 3-3). 本ピークを回収し, EI-MS に供し合成標品と比較した結果, この物質は親イオンピーク ( $m/z=464$ ) およびフラグメントピーク ( $m/z=248,449$ ) 共に (MeHg)<sub>2</sub>S の合成標品と完全に一致し, (MeHg)<sub>2</sub>S と同定された. 同様に, MeHg と GS-S-SG の反応溶液を HPLC-AAS 解析したところ, (MeHg)<sub>2</sub>S 合成標品同様の保持時間 (12 分) を示す生成物が認められ (図 3-4), 本生成物を EI-MS に供し合成標品と比較した結果, この物質は親イオンピーク ( $m/z=464$ ) およびフラグメントピーク ( $m/z=248,449$ ) 共に (MeHg)<sub>2</sub>S の合成標品と完全に一致した. 以上の結果は, GS-SH の様な側鎖が解離したイオウ原子だけでなく, MeHg が GS-S-SG の求核性を示すイオウ原子への親電子攻撃を介してイオウ原子を引き抜き, (MeHg)<sub>2</sub>S を生成した可能性を示唆している.

### 3.2.3. PRSS の生成における CSE の重要性

(MeHg)<sub>2</sub>S 生成に関与するタンパク質由来の活性イオウ分子 (PRSS) を調べる目的で, 野生型および CSE 欠損型のマウス肝可溶性画分を用いて検討した. PRSS 由来の活性イオウ分子を検出するため, 低分子画分の活性イオウ分子をエコノカラムにて除去した. 野生型マウスから得た肝臓および心臓高分子画分と 500  $\mu$ M MeHg (250 nmol) を反応させると, 肝臓高分子画分では 3.19%, 心臓高分子画分では 0.47%が (MeHg)<sub>2</sub>S に変換された (図 3-5A). 一方, CSE 欠損マウスのそれら酵素溶液を用いた場合, 著しく (MeHg)<sub>2</sub>S 生成量が減少した (図 3-5B). 以上のことから, CSE から産生される活性イオウ分子が細胞内タンパク質のいずれかに結合し, 保存されていることを示唆している.

### 3.2.4. カラムクロマトグラフィーによる PRSS の単離・精製

3.2.4よりマウス肝臓高分子画分において, PRSS の存在が示唆された. そこで (MeHg)<sub>2</sub>S の産生を指標とし, (1) Cibacron Blue 3GA カラムクロマトグラフィーにより PRSS 画分を分離, (2) 得られた PRSS 画分をさらに Sephacryl S-100 ゲルろ過カラムを用いて単離・精製し, (3) nanoUPLC-MS<sup>E</sup> を用いて標的タンパク質の同定を試みた.

まず, 本高分子画分を得るため, マウス肝可溶性画分の透析を行った. これにより高分子画分の (MeHg)<sub>2</sub>S 生成活性が 42%に低下した (表 3-1). このことは肝可溶性画分における RSS の約 60%が低分子由来であることを示唆している. 次に, 得られた本高分子画分を Cibacron Blue 3GA カラムで分離した結果, NADH 溶出画分中 (B-III 画分) にはカラムに付したタンパク質の僅か 1%程度しか回収されていないにも関わらず, (MeHg)<sub>2</sub>S 生成活性として決定した PRSS は, 全体の 50%が本溶出画分に含まれていた (表 3-1 および図 3-6). また, B-III 画分での主要なタンパク質は, 25 kDa, 42 kDa, 47 kDa および 117 kDa であった. さらに, Sephacryl S-100 カラムで分離を行

った結果、各溶出画分に $(\text{MeHg})_2\text{S}$  生成活性が認められ (表 3-2, 図 3-7A), SDS-PAGE 上でサブユニット分子量 25 kDa の PRSS が単一バンドとして精製された (図 3-7B). 本画分で nanoUPLC-MS<sup>E</sup> を用いたプロテオミクス解析の結果, PRSS の一つとして, 親電子物質の抱合反応を担うグルタチオン S-転移酵素 P1 (GSTP1) であることが明らかとなった (表 3-3 および図 3-8). さらに, リコンビナント hGSTP1 の精製標品と MeHg を反応させると $(\text{MeHg})_2\text{S}$  の生成が見られ, 1 mol hGSTP1 あたり 0.01 mol の RSS が検出された (図 3-9). また, 活性イオウ分子を特異的に検出することが可能である蛍光プローブ SSP4 および “Tag-Switch-Tag” アッセイにより, hGSTP1 の分子中にポリスルフィドが存在することが示された (新開ら, 未発表データ).

次に, 反応性の高い RSS はタンパク質のシステイン残基に保存されていると示唆されることから, hGSTP が有する 4 つのシステイン残基 Cys15, Cys48, Cys102, Cys170 の変異体を用いて, RSS との結合に重要なシステイン残基の同定を試みた. 野生型 hGSTP1 の $(\text{MeHg})_2\text{S}$  生成活性は  $0.061 \pm 0.01$  nmol ( $100 \pm 9\%$ ) であった (表 3-4). 一方, システイン変異体の C48S および C170S の $(\text{MeHg})_2\text{S}$  生成活性はそれぞれ, C48S が  $0.053 \pm 0.02$  nmol ( $96 \pm 22\%$ ), C107S は  $0.070 \pm 0.01$  nmol ( $120 \pm 15\%$ ) と野生型と同様の $(\text{MeHg})_2\text{S}$  生成活性を有し, 有意な差は認められなかった. しかしながら, C15S および C102S の $(\text{MeHg})_2\text{S}$  生成活性を検討したところ, C15S が  $0.022 \pm 0.01$  nmol ( $38 \pm 5\%$ ) と野生型と比較し $(\text{MeHg})_2\text{S}$  の生成活性が約 60%低下し, C102S に関しては,  $(\text{MeHg})_2\text{S}$  生成活性は検出限界以下であった (表 3-4).

以上の結果から, マウス肝臓高分子画分には複数の PRSS の存在が明らかとなった. 特に, 全 $(\text{MeHg})_2\text{S}$  生成活性の 50%が NADH に親和性の高いタンパク質であった. 加えて, 4 種の hGSTP システイン変異体を用いた検討から, PRSS として同定した GSTP1 は少なくとも C15 および Cys102 に RSS が結合していることが示唆された. さらに, PRSS と MeHg との反応により解毒代謝物である $(\text{MeHg})_2\text{S}$  を生成することから, PRSS として同定した hGSTP1 は MeHg の毒性を制御するタンパク質であることも示された.

### 3.3. 考察

本研究により, 生体内で産生される低分子活性イオウ分子である GS-SH/GS-S-SG およびタンパク質由来の活性イオウ分子が $(\text{MeHg})_2\text{S}$  の生成に関与していることが示唆された (図 3-3, 3-4). また, 生体内においてタンパク質結合活性イオウ分子 (PRSS) の産生に CSE が重要な役割を果たしていることが示された (図 3-5). 複数存在する PRSS の中から, SDS-PAGE 上でサブユニット分子量 25 kDa の PRSS が単一バンドとして精製され, 本酵素はグルタチオン S-転移酵素 P1 (GSTP1) であった.

序論でも述べたように, Westley ら, Sorbo らによってスルファンプルの概念が提唱された (序論図 3 参照). これらの一部がタンパク質もしくは鉄-イオウクラスタータンパク質に結合しているのではないかとされていた<sup>116,117</sup>. 1994 年田邊らによって,

イオウ結合タンパク質が複数存在することが報告されているが<sup>144)</sup>、何れもそのタンパク質を同定するまでに至っていない。これまでタンパク質に結合したイオウの検出方法は、DTTによる還元により遊離したイオウをメチレンブルー比色定量法<sup>145)</sup>やモノブロモビマンにより誘導体化しHPLCにて誘導体を分析する方法<sup>146)</sup>が主であった。我々は、生体内で(MeHg)<sub>2</sub>Sが同定されたこと(第2章)、加えてMeHgとRSSのモデル化合物であるNaHSおよびNa<sub>2</sub>S<sub>4</sub>の反応により効率良く(MeHg)<sub>2</sub>Sに変換されたことから(表2-1, 2-2)、MeHgが活性イオウ分子を捕獲するのに有効なプローブであり、(MeHg)<sub>2</sub>Sの生成を指標としてPRSSを検出する本法は、極めて有用な手法であると考えられる。

マウス肝臓高分子画分をCibacron Blue 3GAカラムで分離した結果、NADH溶出画分中(B-III画分)にはカラムに付したタンパク質の僅か1%程度しか回収されていないにも係わらず、(MeHg)<sub>2</sub>S生成活性は全体の50%が本溶出画分に含まれていた(表3-1および図3-6)。また、B-III画分での主要なタンパク質は、25 kDa, 42 kDa, 47 kDaおよび117 kDaであった。この結果から、RSSはNADHに親和性のある、つまりNADH結合ドメインを有するタンパク質特異的に保存されている可能性が示唆される。これを支持する結果として、東北大学の赤池らによってRSS検出プローブを用いて同定されたPRSSの多くは、Cibacron Blue 3GAカラムに親和性があることが明らかになっているタンパク質であり、NADH結合ドメインを有するものであった(赤池ら投稿準備中)。その一部を紹介すると、エノラーゼ(47 kDa)、アルドラーゼ(39 kDa)、ホスホグリセリン酸キナーゼ(44 kDa)、グリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素(36 kDa)、およびリンゴ酸脱水素酵素(35 kDa)とB-III画分の主要なタンパク質と比較的近い分子量のタンパク質が同定された。さらにB-III画分をSephacryl S-100カラムで分離を行った結果、SDS-PAGE上でサブユニット分子量25 kDaの単一バンドとして精製されたPRSSは、親電子物質の抱合反応を担うグルタチオンS-転移酵素P1(GSTP1)であった(表3-3および図3-8)。本研究で見出された、他の42 kDa, 47 kDaおよび117 kDa PRSSを同定し、詳細に検討することでPRSSの生理的意義が示されることが期待される。

GSTsは動物、植物、細菌などに広く分布し、主に細胞質に局在するが、小胞体膜、核膜、ミトコンドリアなどにも存在している。細胞質のGST分子種はアミノ酸配列の類似により、種を超えて、Alpa (GSTA), Mu (GSTM), Pi (GSTP), Theta (GSTT), Sigma (GSTS), Zeta (GSTZ), Omega (GSTO)の七クラスに分類される<sup>147)</sup>。GSTsは同じクラスのサブユニット間でホモあるいはヘテロ二量体を形成する。さらにGSTsは肝臓可溶性画分の5-10%を占めている。GSTsは多機能酵素であり、種々の薬剤や親電子物質に対するグルタチオン抱合活性、脂質や核酸の過酸化物に対するグルタチオンペルオキシダーゼ活性<sup>148)</sup>およびジスルフィド結合に対するグルタレドキシニン活性(特にGSTOで高い)<sup>149,150)</sup>等の酵素活性を示す。GSTP1がCibacron Blue 3GAカラム

に親和性があったことから、NADH 結合ドメインを有していると予想されたが、そのような報告はなされていない。そこで、GSTP1 タンパク質のアミノ酸配列から、NADH 結合ドメインと言われている GXGXX(G/A) の配列が保存されているか検索したところ、<sup>206</sup>GNGKQ<sup>210</sup> と NADH 結合様ドメインを有していることが明らかとなった。本配列はタンパク質の立体構造的に比較的 G-site, H-site, Cys15 および Cys102 の近傍であることが示唆された (図 3-10)。GSTP1 の 4 種類のシステイン変異体を用いた検討から、GSTP1 の少なくとも Cys15 および Cys102 に RSS が結合していることが示された (表 3-4)。Cys48 は親電子物質の標的となる反応性の高いシステインとして報告されており、親電子修飾により酵素活性が阻害される<sup>151)</sup>。一方、Cys102 も Cys48 と同様に親電子物質の標的となり親電子修飾を受けると言われているが、その親電子修飾は酵素活性に影響しない<sup>151,152)</sup>。つまり、RSS は GSTP1 の酵素活性に影響しないシステイン残基に保存され、RSS が結合した Cys102 の方へ親電子物質を引き寄せることで、本来の酵素活性の維持に重要な Cys48 への親電子修飾を防御しているのかもしれない。

以上の結果から、Cys102 の近傍には親電子物質を引き寄せる H-site, GSH が結合する G-site, および PRSS に共通する NADH 結合ドメインが存在することから、Cys102 に結合した RSS が親電子物質と反応することが可能である環境が整っていると推察される。生体内では GS-SH が高濃度で検出されていることから、GSH および GS-SH を利用した、GSTP1 への RSS 結合に関して予想される反応機構を図 3-11 に示す。まず、GSTP1 の解離性チオール基が酸化され、GSTP1-S-OH (スルフェン酸) となる。スルフェン酸は不安定で、GSH との脱水反応により結果的にグルタチオン化 (GSTP1-S-SG) される。その結果、GSTP1-S-SG のジスルフィド結合に対して GS-SH が反応し、S<sup>0</sup> が転移して GSTP1 のイオウ化 (thiolation) が生じて、同時に GSH が生成する。その後、また酸化されたタンパク質のシステイン残基に反応し、ポジティブフィードバックすると予想される。同様な反応が繰り返し進行すると、GSTP1 のシステイン残基のイオウ基の伸張反応に伴い、ポリスルフィド化が生じることになる。本研究および赤池らにより明らかとなった PRSS の多くは NADH に親和性の高いタンパク質であることから、RSS の保持に NADH がどのように関与するか、今後の検討により詳細な機構の解明が待たれる。



### 3.4. まとめ

- 低分子活性イオウ分子 GS-SH/GS-S-SG と MeHg 反応は, (MeHg)<sub>2</sub>S の生成に関与する事が示唆された.
- MeHg は生体内で産生されるパースルフィド/ポリスルフィドに対し親電子攻撃し分子内のイオウ原子を引き抜き, 結果的に(MeHg)<sub>2</sub>S を生成する.
- マウス肝臓高分子画分には複数の PRSS の存在が認められた. 特に, 全(MeHg)<sub>2</sub>S 生成活性の約 50%が NADH に親和性の高いタンパク質であった.
- PRSS の 1 つとして GSTP1 を同定した.
- GSTP1 シス테인変異体を用いた検討から, GSTP1 の少なくとも Cys15 および Cys102 に活性イオウ分子が結合していることが示唆された.

表3-1. Cibacron Blue 3GAカラムクロマトグラフィーによる  
S-sulfurationタンパク質の分離

Fraction	Volume	Protein	(MeHg) <sub>2</sub> S formed		Yield
	(mL)	(mg)	(ng/fraction)	(ng/mg of protein)	(%)
Mouse liver cytosol	36	4200	7360 (100)	4	
Dialysis	35	3990	3085 ( 42)	2	100
B-I	105	1266	327	0.3	11
B-II	72	908	224	0.2	7
B-III	60	33	1598	48	51

表3-2. Sephacryl S-300カラムクロマトグラフィーに  
よるS-sulfurationタンパク質の分離

Fraction	Protein	(MeHg) <sub>2</sub> S formed		Yield
	(mg)	(ng/fraction)	(ng/mg of protein)	(%)
B-III	15	1707 (100)	115	
B-III	10	1095 ( 64)	110	100
No. 39	1.5	126	81	12
No. 45	0.6	104	149	10
No. 49	0.7	116	124	11
No. 63	0.04	107	2822	10
No. 69	0.1	84	634	8

マウス肝酵素溶液9,000 x g 上清の調製は方法の部6.2に記した。各カラムクロマトグラフィーで得られた溶出画分 (450 µL) にMeHg (500 µM, 250 nmol) を25°C, 1時間反応させた。反応溶液は方法の部12に従って (MeHg)<sub>2</sub>Sを抽出し, HPLC-AASに供した。

表3-3. nanoUPLC-MSによる25 kDaタンパク質のペプチドフラグメント解析

Position	Peptide sequence	Calculated MS	Observed MS
1-12	MPPYTIVYFPVR	1498.78	1498.77
20-30	MLLADQGQSWK	1292.61	1292.63
56-71	FEDGDLTYQSNAILR	1854.90	1854.92
76-82	SLGLYGK	737.42	737.42
86-101	EAAQMDMVNDGVEDLR	1808.78	1808.77
86-103	EAAQMDMVNDGVEDLRGK	1959.89	1959.88
90-103	MDMVNDGVEDLRGK	1578.72	1578.72
104-116	YVTLIYTNYENGK	1577.77	1577.78
104-121	YVTLIYTNYENGKNDYVK	2197.08	2197.08
122-141	ALPGHLKPFETLLSQNQGGK	2135.17	2135.16

ペプチドマスフィンガープリンティング解析およびMS/MS解析はProteinLynx Global Server (PLGS) Browser ver.2.3 softwareを用いた。PLGS scores 100以上で有意に ( $P < 0.05$ ) 同定されるが、25 kDaタンパク質とGSTP1のPLGS scoreは1260であった。

表3-4. (MeHg)<sub>2</sub>S法によるヒトGSTP1精製タンパク質に保存されたPRSSの検出

hGSTP1	(MeHg) <sub>2</sub> S formed	
	(nmol)	(%)
WT	0.054 ± 0.01	0.71 ± 0.1
C15S	0.022 ± 0.01	0.27 ± 0.04
C48S	0.053 ± 0.02	0.68 ± 0.2
C102S	0	0
C170S	0.070 ± 0.01	0.85 ± 0.1

50 mM Tris-HCl (pH7.5) 中で、ヒトGSTP1精製タンパク質 (100 µg, 4 nmol) に、MeHg (8 µM, 16 nmol) を加え、25°C、1時間反応した。詳細な反応溶液の組成は方法の部15に示した。方法の部12に従って(MeHg)<sub>2</sub>Sを抽出し、HPLC-AASに供した。同様の検討を3回行った平均値±標準誤差 (SE) として示す。

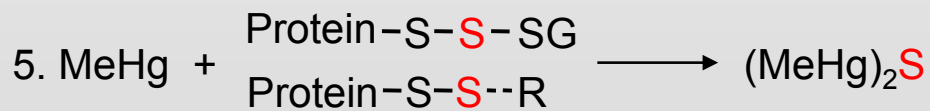
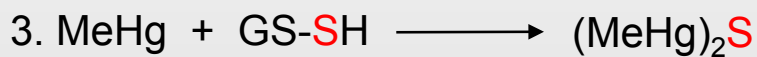
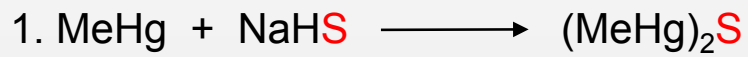


図3-1. 予想されるMeHgと活性イオウ分子の反応様式

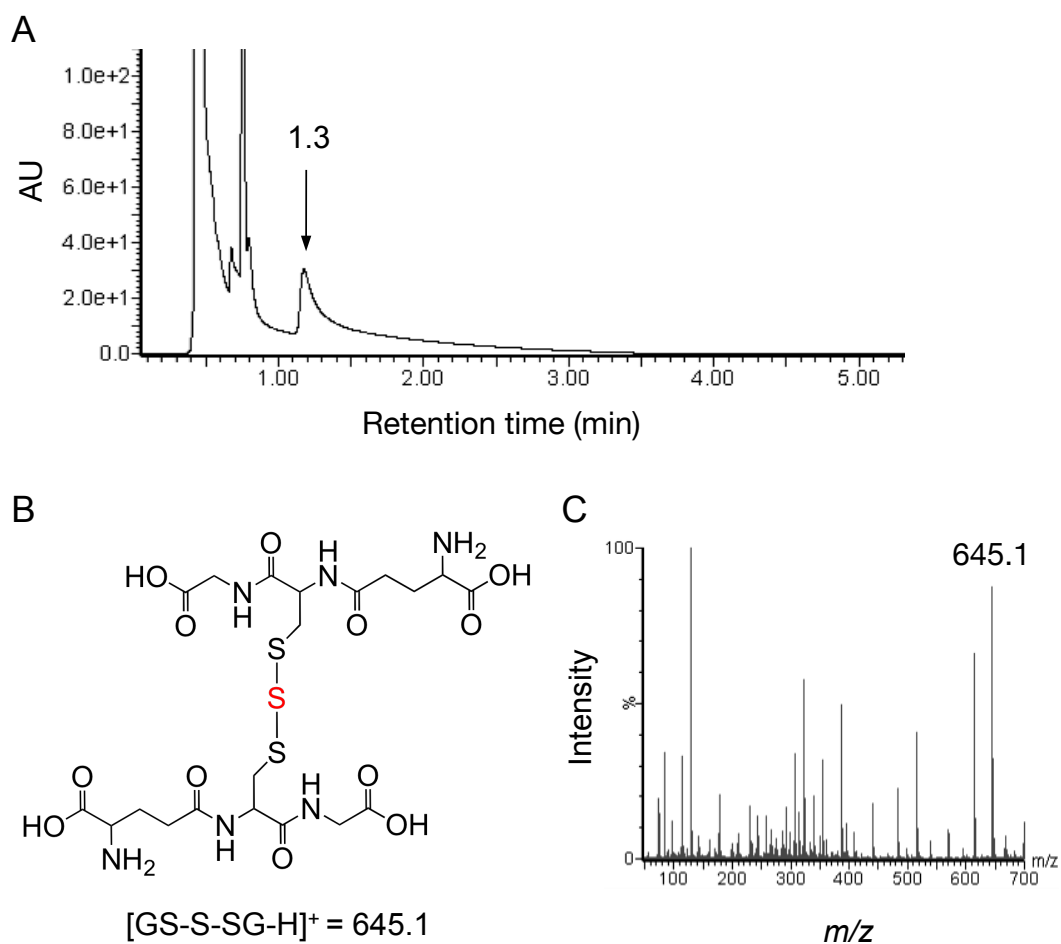


図3-2. UPLC-MS<sup>E</sup>解析によるGS-S-SGの同定

Column, Acquity UPLC C<sub>18</sub> column (2.1 mm × 50 mm i.d., 1.7 μm) ; 移動相, 0.1% FA/0.1%FA-ACN (99.9:0.1, v/v) ; 流速, 0.3 mL/min ; ESI-MS polarity, negative ion mode. 詳細は方法の部16.5.に記した. A. GS-S-SG合成標品をUPLCに供したトータルイオンクロマトグラムを示す. B. GS-S-SGの化学構造およびフラグメントを示す. C. Aで検出された保持時間 1.3 minのピークのMSスペクトルを示す.

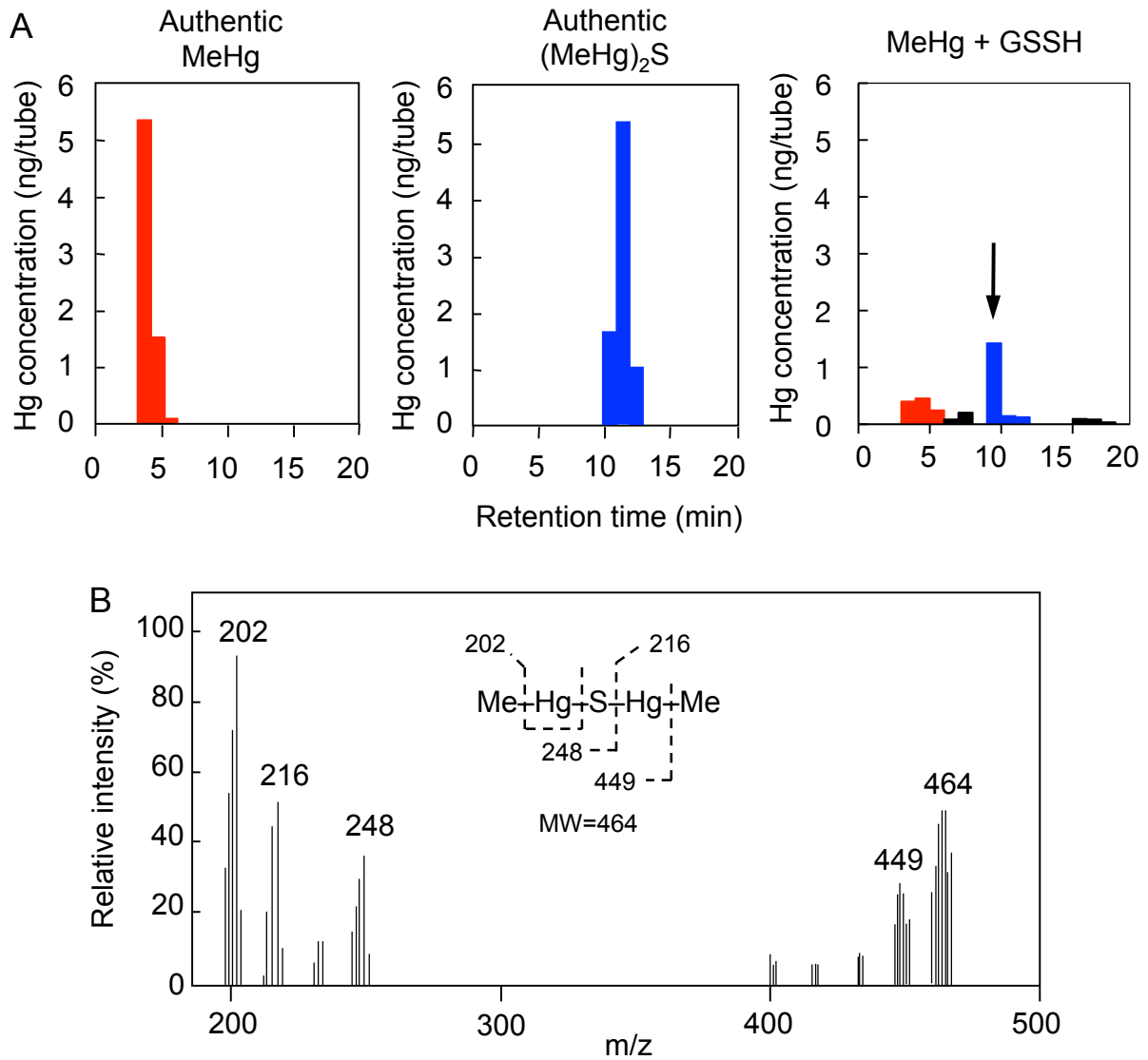


図3-3. MeHgとGSSHとの化学反応により生成する(MeHg)<sub>2</sub>S

20 mM Kpi (pH 7.5) 中にて, GSSSG (0.1 mM), GSR (0.1 U) および NADPH (0.2 mM) を25°C, 5分間反応させた後, MeHg (5 mM) を加え, 37°C, 15分間反応させた. 反応溶液をHPLC-AASに供し, (MeHg)<sub>2</sub>Sを検出した. 反応生成物を矢印で示す. Column, ZORBAX Eclipse XDB-C18 (50 mm x 2.1 mm i.d., 5 μm); 移動相, 0.1% FA/MeOH (9:1, v/v); 流速, 0.5 mL/min. MeHg標品 (左図), (MeHg)<sub>2</sub>S合成標品 (中央図), およびMeHg-GSSH反応生成物 (右図) をHPLC-AASに供した結果を示す.

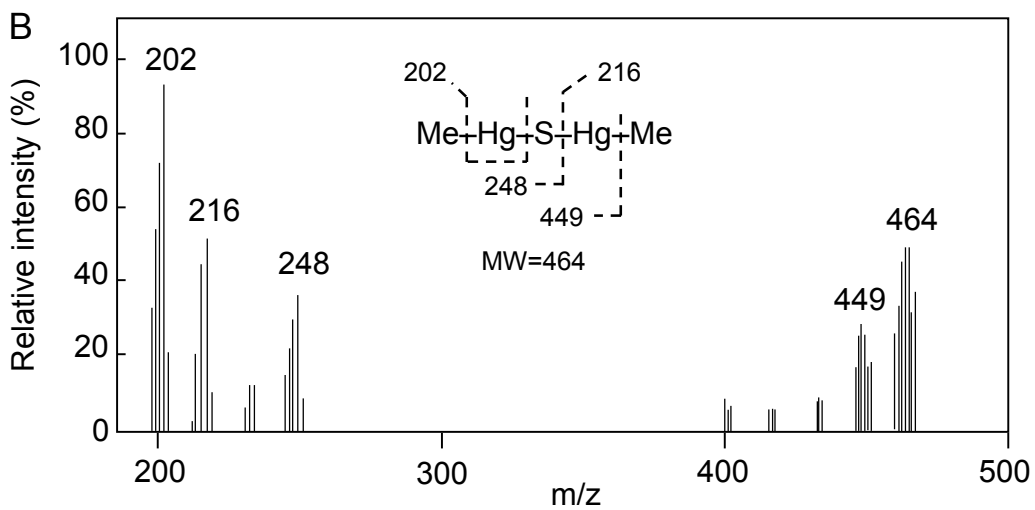
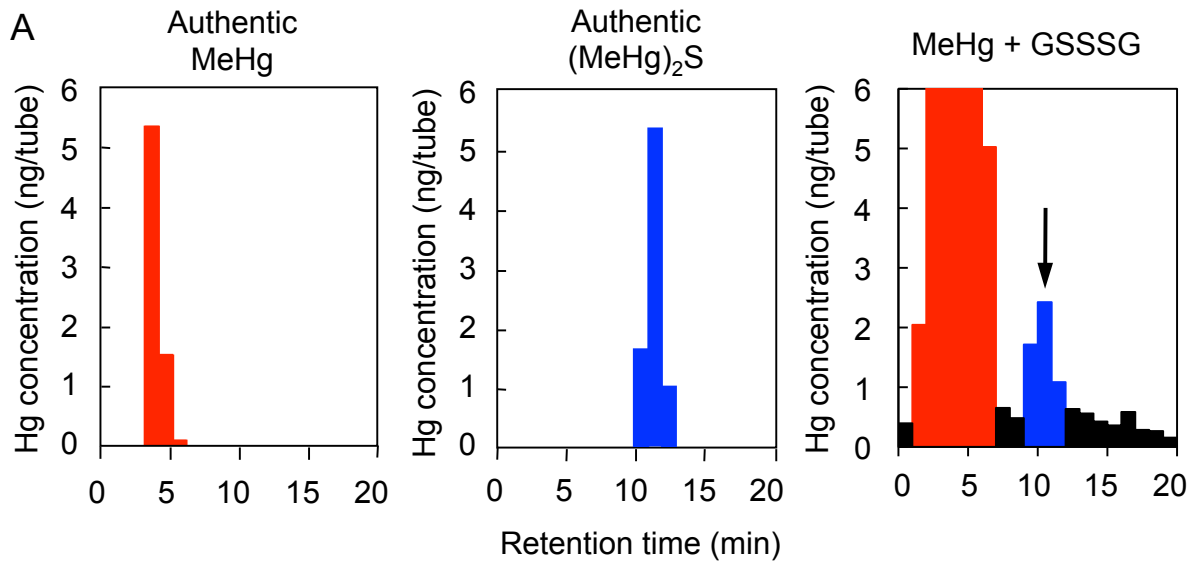


図3-4. MeHgとGSSSGとの化学反応により生成する (MeHg)<sub>2</sub>S

20 mM Kpi (pH 7.5) 中にて、GSSSG (0.1 mM) およびMeHg (5 mM) を加え、37°C、15分間反応させた。反応溶液をHPLC-AASに供し、(MeHg)<sub>2</sub>Sを検出した。反応生成物を矢印で示す。Column, ZORBAX Eclipse XDB-C18 (50 mm x 2.1 mm i.d., 5 μM) ; 移動相, 0.1% FA/MeOH (9:1, v/v) ; 流速, 0.5 mL/min. MeHg標品 (左図), (MeHg)<sub>2</sub>S合成標品 (中央図), およびMeHg-GSSSG反応生成物 (右図) をHPLC-AASに供した結果を示す。



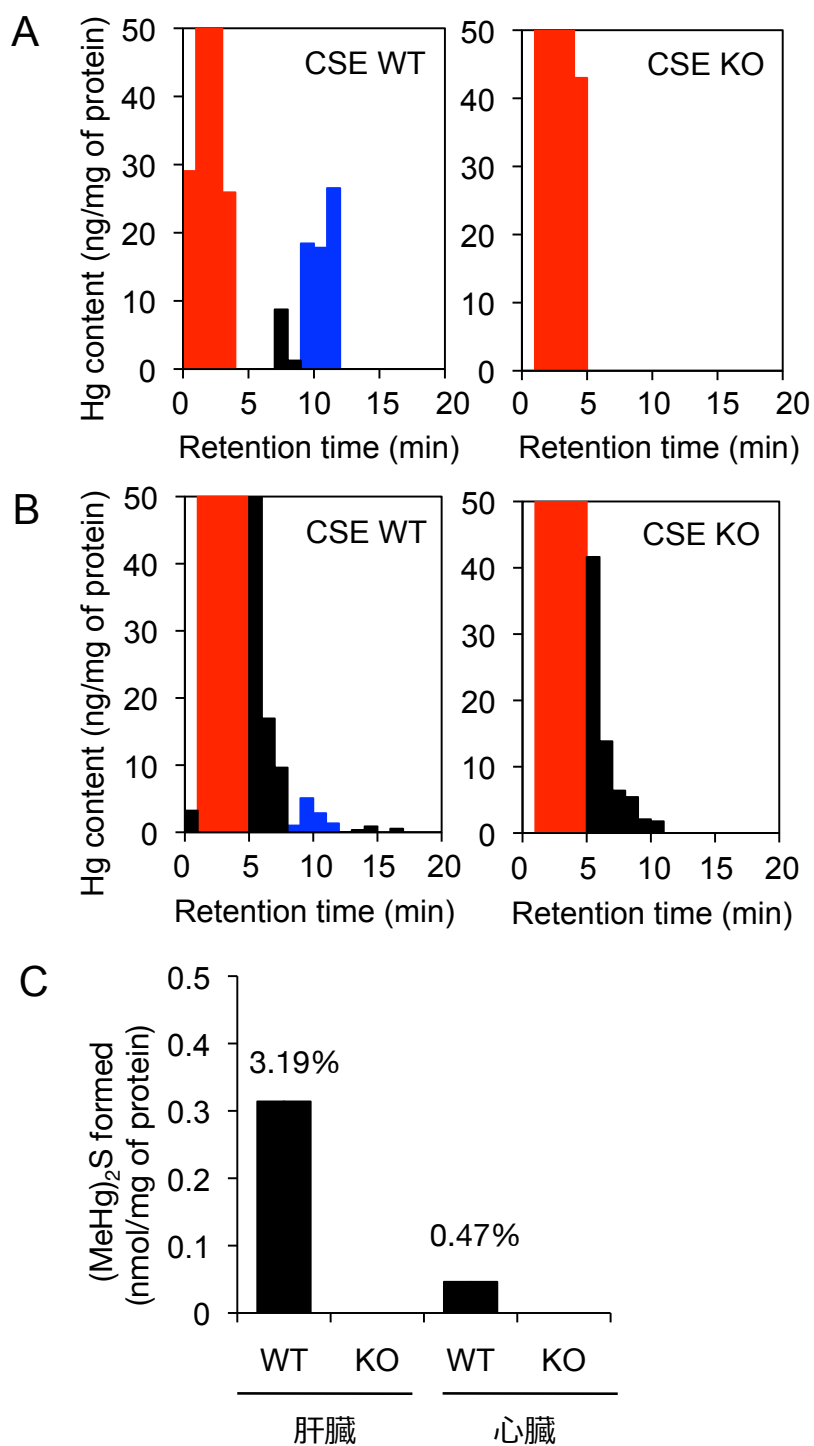


図3-5. タンパク質結合性活性イオウ分子の生成におけるCSEの重要性

方法の部15に記載した方法で得られたマウス肝臓高分子画分 (A), マウス心臓高分子画分 (B) に, MeHg (500  $\mu$ M) を加え, 25°C, 1時間反応した. 方法の部12に従って(MeHg)<sub>2</sub>Sを抽出し, HPLC-AASに供した. MeHgの保持時間を赤色, (MeHg)<sub>2</sub>Sの保持時間を青色で示した. C. AおよびBのHPLC-AAS分析で得られた, タンパク質結合性活性イオウ分子由来(MeHg)<sub>2</sub>S生成量をグラフで示す.

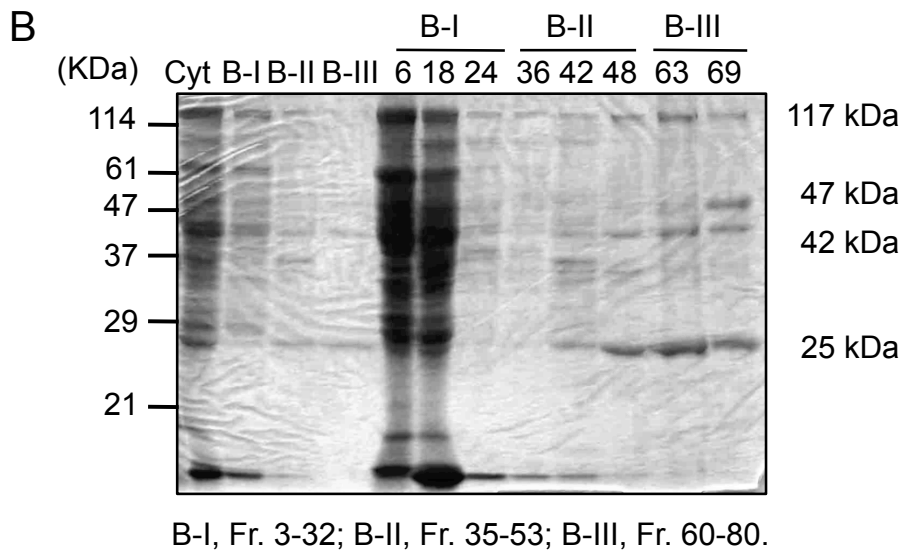
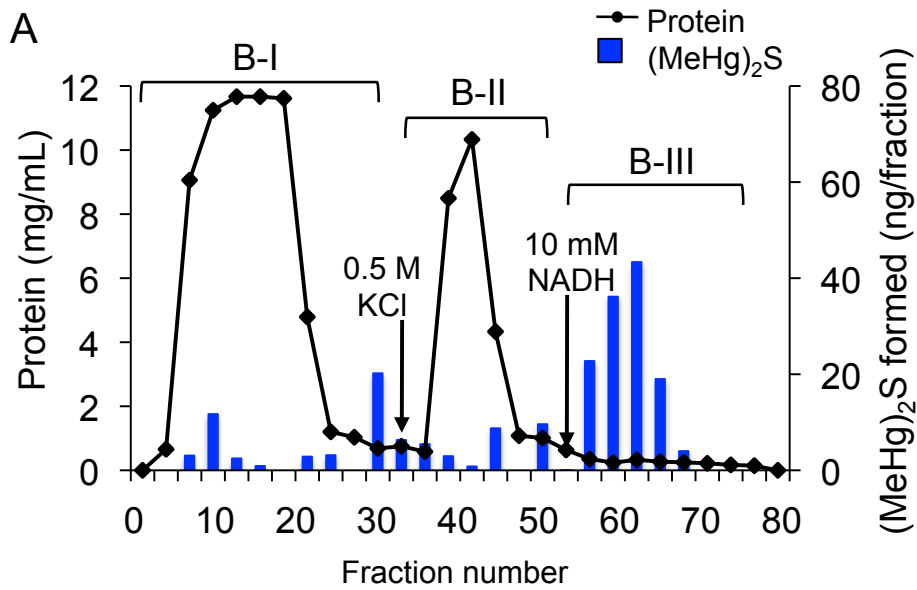


図3-6. Cibacron Blue 3GAカラムクロマトグラフィーによる (MeHg)<sub>2</sub>Sの生成を指標としたRPSSの分離

A. Cibacron Blue 3GAカラムクロマトグラフィーによるマウス肝臓酵素液高分子画分 (4 g of protein) の分離は、方法の部7.1に記載した。Fraction B-I (initial pass through fraction, Nos. 3-32, 1266 mg), B-II (0.5 M KCl-eluted fraction, Nos. 35-53, 908 mg) およびB-III (0.5 M KCl-10 mM NADH-eluted fraction, Nos. 60-80, 33 mg) が得られた。B. 得られた画分をSDS-PAGE後、CBB染色を行った。

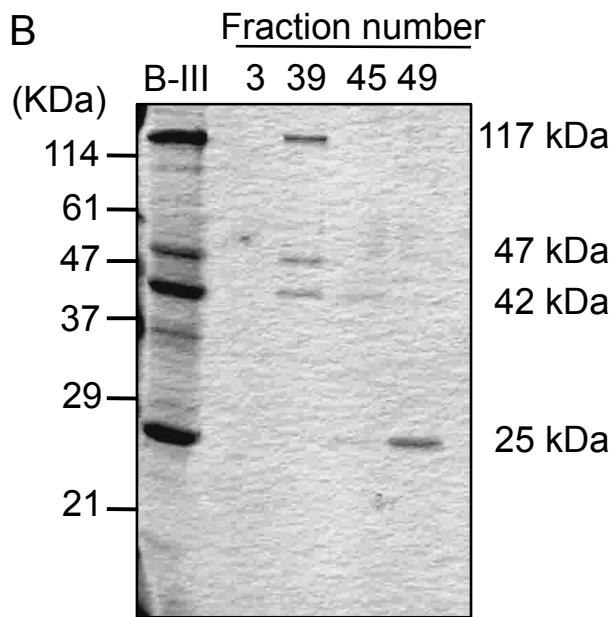
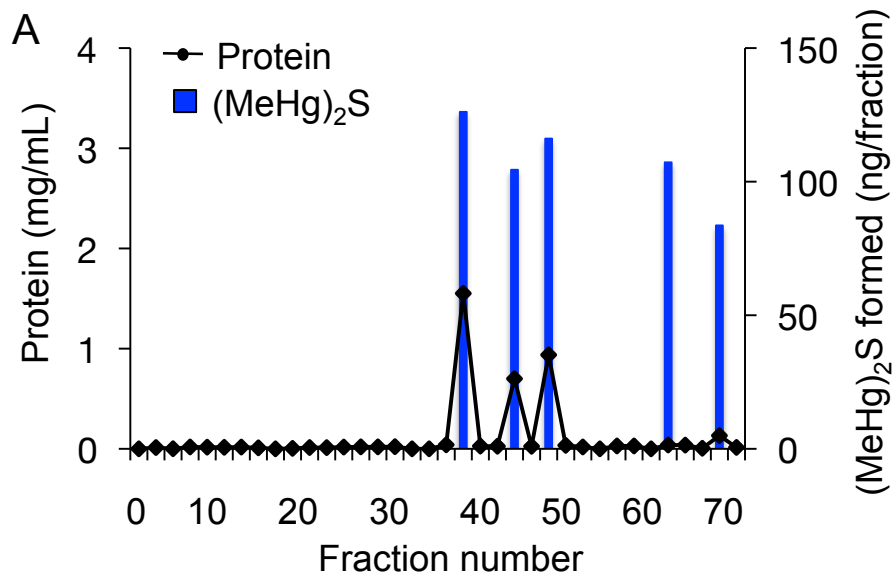


図3-7. Sephacryl S-100 カラムクロマトグラフィーによる (MeHg)<sub>2</sub>Sの生成を指標としたRPSSの単離・精製

A. Sephacryl S-100カラムクロマトグラフィーによるB-III画分 (10 mg of protein) の分離は、方法の部7.2に記載した。B. (MeHg)<sub>2</sub>Sが検出された画分を SDS-PAGE後、CBB染色を行った。

**MPPYTIVYFPVRGRCEAMRMLLADQGQSWKEEVVTIDTWMQGLLK**  
**PTCLYGQLPKFEDGDLTYQSNAILRHLGRSLGLYGKNQREAAQMD**  
**MVNDGVEDLRGKYVTLIYTNYENGKNDYVKALPGHLKPFETLLSQ**  
**NQGGKAFIVGDQISFADYNLLDLLLIHQVLAPGCLDNFPLLSAYVARLS**  
ARPKIKAFLLSSPEHVNRPINGNGKQ

図3-8. マウスGSTP1のsequence coverage map

得られたペプチドフラグメントは、Universal Protein Resource (UniProt) [accession number P19158] のGlutathione S-transferase P1 (GSTP1) のペプチドマップと48.6%一致した。

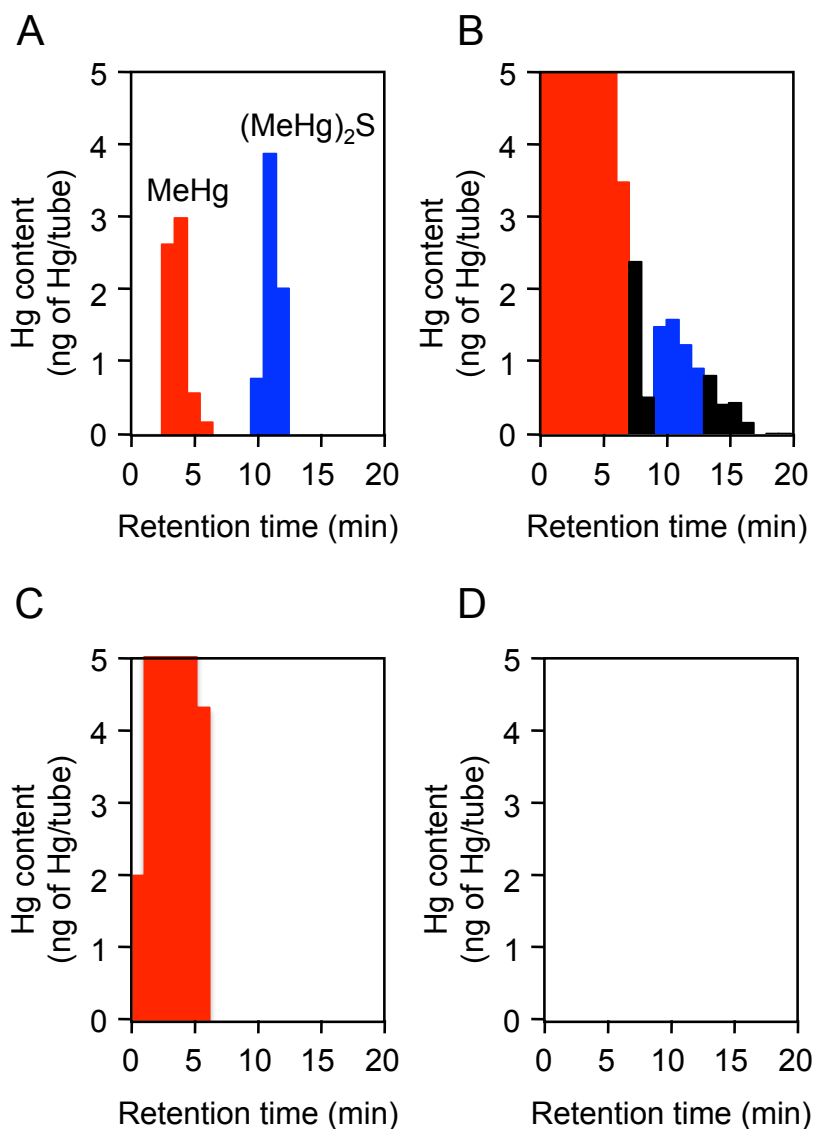


図3-9. (MeHg)<sub>2</sub>S法によるhGSTP1精製タンパク質に保存されたPRSSの検出

A, MeHgおよび(MeHg)<sub>2</sub>S標準物質; B, hGSTP1とMeHgの反応溶液; C, B-hGSTP1; D, B-MeHg. 50 mM Tris-HCl (pH7.5) 中で, ヒトGSTP1精製タンパク質 (100 μg, 4 nmol) に, MeHg (8 μM, 16 nmol) を加え, 25°C, 1時間反応した. 詳細な反応溶液の組成は方法の部15に示した. 方法の部12に従って(MeHg)<sub>2</sub>Sを抽出し, HPLC-AASに供した. MeHgの保持時間を赤色, (MeHg)<sub>2</sub>Sの保持時間を青色で示した. . 同様の検討を3回行った.

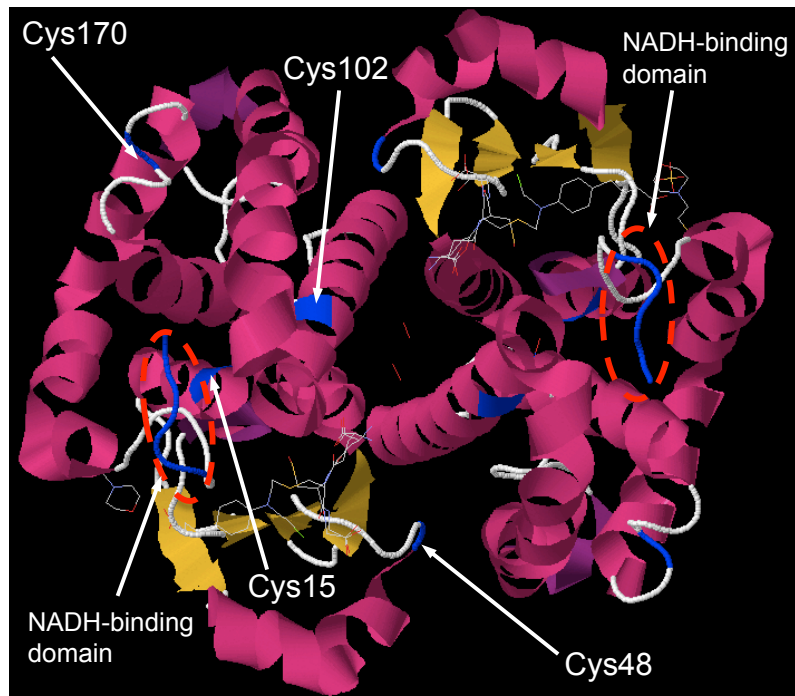


図3-10. hGSTP1タンパク質立体構造

hGSTP1の有する4つのシステイン残基を記した。また、hGSTP1の<sup>206</sup>GNGKQ<sup>210</sup>がNADH結合ドメイン [GXGXX (G/A)] と同様の機能を有すると予想される。Xは任意のアミノ酸を示し、赤い点線で示した青色の部分が予想されるNADH結合ドメインを示す。

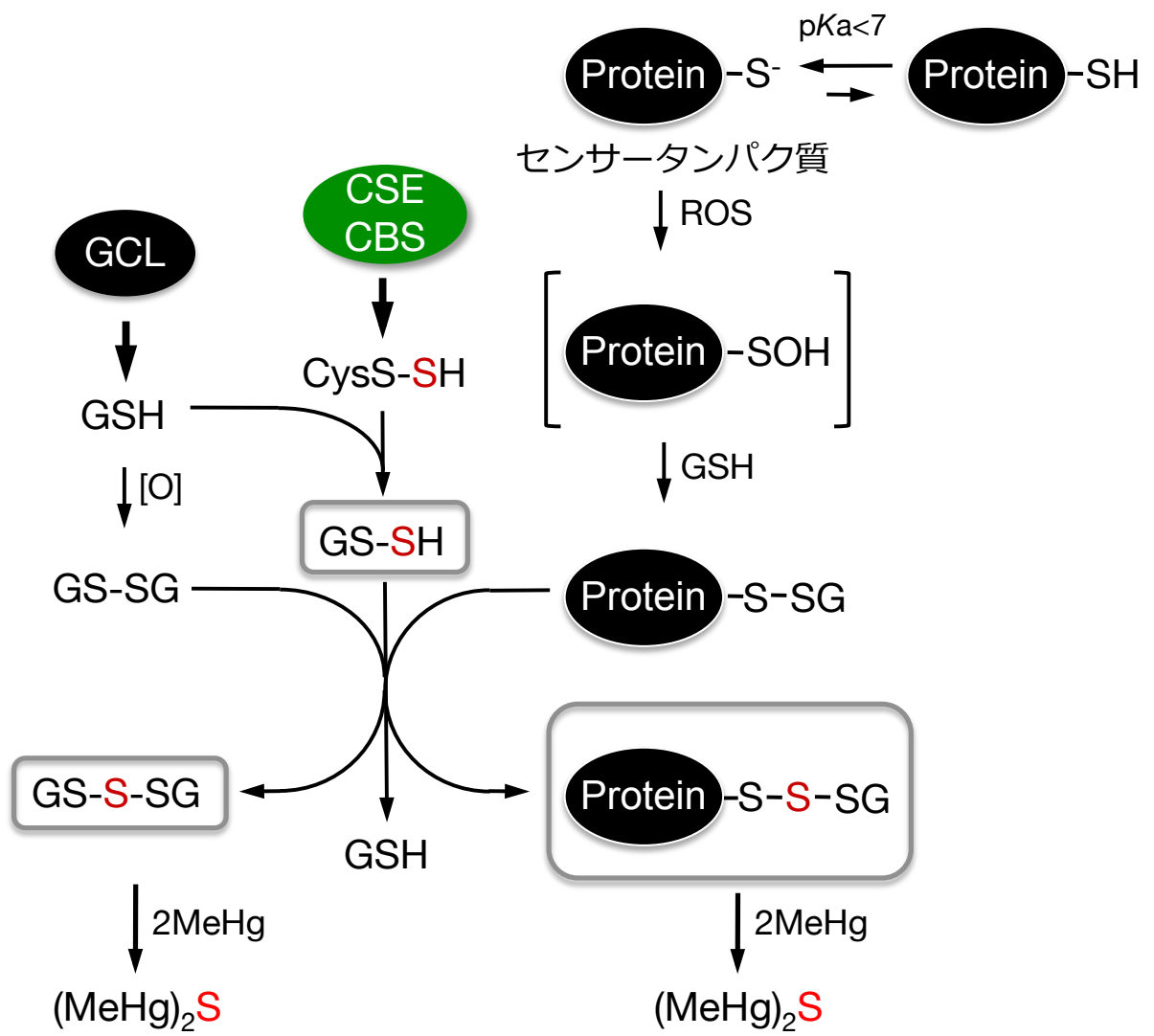


図3-11. 第3章研究概要

## 総合考察

環境中には多くの環境化学物質が存在しており，中でも MeHg の様にそれ自身の反応性が高く，親電子性を有している化合物に着目し，研究を行ってきた．最近では，酸化ストレスあるいは炎症時に，生体は内在的にタンパク質のシステイン残基に共有結合するような親電子物質を生産することが知られ，本内在性親電子物質によるタンパク質の化学修飾を介したシグナル伝達（親電子シグナル）の存在が注目を集めている．本研究では，親電子物質に対する防御システムを解明するため，親電子物質と反応性の高いイオウ (S) を構成元素に有する生体内含硫化合物に着目し，食品等に含まれる環境中親電子物質である MeHg をモデル化合物として，生体内イオウ元素 (S) を利用した生体防御システムの解明を試みた．

これまで MeHg の不活性代謝物とされていた MeHg-SG の S-トランス水銀化により，細胞内タンパク質を S-水銀化することを本研究により初めて細胞レベルで明らかにした．本反応は MeHg-SG だけでなく，1,2-NQ-SG<sup>132)</sup> や 6-HITC-2ME<sup>133)</sup> においても同様の反応を示し，加えて S-トランス反応により Nrf2 が活性化することを見出している．MeHg だけでなくその代謝物である MeHg-SG についても Keap1/Nrf2 システムを活性化したことから，この MeHg-SG も細胞内で何らかのシグナル分子としての機能を果たしている可能性を想起させる．したがって，Nrf2 の活性化は MeHg の排泄促進に関与する下流タンパク質の発現を誘導することから，MeHg-SG は S-トランス水銀化反応により更に Nrf2 を活性化させて自身の細胞外排泄を促進させているのかもしれない．事実，MeHg-SG の排泄に関与すると言われる MRPs を阻害すると，MeHg-SG の毒性は増強したことから，MeHg-SG の細胞内滞留により恒常性の維持に重要なタンパク質をも非意図的に S-水銀化し，細胞毒性が生じる可能性が示唆された．以上のことから，MeHg などの親電子物質は GSH 抱合反応を受けた後，速やかに細胞外へ排泄することが本化合物の毒性軽減に重要であると言える．

第2章および第3章では，GSH に次ぐ第二の生体内イオウ元素 (S) として，H<sub>2</sub>S/HS<sup>-</sup> 様活性イオウ分子に着目した．水俣病発生以来，60 年にもおよぶ MeHg 研究の歴史の中で，本研究により初めて，生体内で産生する CBS/CSE 由来の H<sub>2</sub>S/HS<sup>-</sup> 様活性イオウ分子を利用した MeHg の新奇代謝物として (MeHg)<sub>2</sub>S を個体レベルで同定した．本代謝物は親電子性を消失しており，個体レベルで本代謝物による致死効果が見られなかったことから解毒代謝物であることが示された．これまで，MeHg の解毒・排泄に関する研究は MeHg を如何に水溶性代謝物にすることで細胞外へ排泄するかといった点に注目が集まっており，MeHg-SG や MeHg-Cys など水溶性代謝物に関する研究が盛んに行われてきた．そのため，疎水性水銀代謝物に関する研究は未解明な点が多く，本研究分野の発展が遅れた要因とも言える．約 30 年前に，井村らにより微生物において H<sub>2</sub>S が MeHg の有害性を抑制することが報告されている<sup>153)</sup>．また時期を同



じくして Craig らが土壌中に  $\text{H}_2\text{S}$  を生成する微生物が存在することに着目し、環境中における MeHg と  $\text{H}_2\text{S}$  の反応性を見出している<sup>94b</sup>。それにも係わらず、哺乳類の細胞を用いた検討は皆無に等しい。このことは、 $\text{H}_2\text{S}$  の“毒ガス”としての認識が本研究の妨げになったのかもしれない。さらに驚くことに、本代謝物は MeHg の無機化に関わる可能性が示唆され、さらなる検討により MeHg の体内動態において不明であった無機化機構の解明に繋がることを期待される。加えて、CSE 遺伝子欠損マウスは MeHg に対し高感受性であることが示され、他の外因性親電子物質および内因性親電子物質に対しても同様に高感受性を示すと予想されることから、このマウスを用いた検討により、CSE 由来  $\text{H}_2\text{S}/\text{HS}^-$  様活性イオウ分子の親電子物質に対する生理的・防御的役割が解明されることを期待する。

また、 $(\text{MeHg})_2\text{S}$  生成に関わるイオウ元素が、タンパク質のシステイン残基に保存されたパースルフィド、ポリスルフィド由来であることが示唆され、活性イオウ分子結合タンパク質 (PRSS) は生体内に多く存在していた。本研究や赤池らの研究グループによって PRSS として同定されたタンパク質の大半が共通して、NADH 結合ドメインを有していたことから、NADH が親電子物質と活性イオウ分子の反応を触媒している可能性があり、NADH の意義および反応機構の解明が急がれる。様々なタンパク質に RSS を貯蓄することで、PRSS 本来の酵素活性を維持し、外因性・内因性親電子物質による非意図的な細胞内タンパク質への修飾を抑制していると考えられる。しかしながら、PRSS は  $(\text{MeHg})_2\text{S}$  を生成することで MeHg を解毒する一方で、本来タンパク質に結合した RSS が酵素活性や構造の維持に重要であった場合、MeHg がそれらのタンパク質から RSS を枯渇させることで、タンパク質の機能破綻を導く可能性が示唆される。つまり、生体内に取り込まれる MeHg 量が RSS による防御・応答の閾値を越え、生体内の RSS とのバランスが崩れることが、MeHg の毒性発現の一因となるのかもしれない。

これまでの研究で CBS および CSE により産生される  $\text{H}_2\text{S}$  は、その物性および生理作用からガス状シグナル分子としての認識が主流であったと言える。しかしながら、本研究による  $(\text{MeHg})_2\text{S}$  生成の発見は MeHg の生体内変換のパラダイムシフトに繋がるであろうと考えられる。以上のことから、生体内のイオウ原子を利用した MeHg の毒性軽減作用に対する生体応答として三つの機構が示唆された。第 1 章より、MeHg の代謝物である MeHg-SG により再度細胞内タンパク質を S-水銀化し、Nrf2 を活性化することで防御機構を上昇させること。第 2 章では、MeHg が CBS/CSE 由来  $\text{H}_2\text{S}/\text{HS}^-$  様活性イオウ分子との反応により  $(\text{MeHg})_2\text{S}$  を生成することで MeHg を不活性化し、MeHg の毒性を軽減する新奇解毒代謝経路を明らかにした。第 3 章では、解毒代謝物である  $(\text{MeHg})_2\text{S}$  の産生に関わる PRSS の存在を提示し、PRSS が  $\text{H}_2\text{S}/\text{HS}^-$  様活性イオウ分子の貯蔵庫であることが示された。生体は常に内因性・外因性の親電子物質に曝されているため、これらの機構が相補的に働き、GSH をサポートする含硫化合物と

して親電子修飾による毒性発現を巧みに制御していると考えられる.

## 引用文献

- (1) Miller, J. A. and Miller, E. C. (1947) The metabolism and carcinogenicity of p-dimethylaminoazobenzene and related compounds in the rat. *Cancer Res* 7, 468-480.
- (2) Wood, J. M. (1974) Biological cycle for toxic elements in the environment. *Science* 183, 1049-1052.
- (3) Hintelmann, H. (2010) Organomercurials. Their formation and pathways in the environment. *Met Ions Life Sci* 7, 365-401.
- (4) Fujita, M. and Iwashima, K. (1981) Estimation of organic and total mercury in seawater around the Japanese archipelago. *Environ Sci Technol* 15, 929-933.
- (5) Merigan, W. H., Maurissen, J. P., Weiss, B., Eskin, T. and Lapham, L. W. (1983) Neurotoxic actions of methylmercury on the primate visual system. *Neurobehav Toxicol Teratol* 5, 649-658.
- (6) Hunter, D. and Russell, D. S. (1954) Focal cerebellar and cerebellar atrophy in a human subject due to organic mercury compounds. *J Neuro Psychiat* 17, 235-241.
- (7) Sato, T. and Nakamura, Y. (1991) In advances in mercury toxicology. *Eds. Plenum. press.*
- (8) Harada, M. (1978) Congenital Minamata disease: intrauterine methylmercury poisoning. *Teratology* 18, 285-288.
- (9) Harada, M. (1995) Minamata disease: methylmercury poisoning in Japan caused by environmental pollution. *Crit Rev Toxicol* 25, 1-24.
- (10) Bakir, F., Damluji, S. F., Amin-Zaki, L., Murtadha, M., Khalidi, A., al-Rawi, N. Y., Tikriti, S., Dahahir, H. I., Clarkson, T. W., Smith, J. C. and Doherty, R. A. (1973) Methylmercury poisoning in Iraq. *Science*. 181, 230-241.
- (11) Chapman, L. and Chan, H. M. (2000) The influence of nutrition on methyl mercury intoxication. *Environ Health Perspect* 108 Suppl 1, 29-56.
- (12) Rabenmstein, D. L. (1978) The Aqueous Solution Chemistry of Methylmercury and Its Complexes *Acc Chem Res* 11, 100-107.
- (13) Pearson, R. G. and Songstad, J. (1967) Application of principle of hard and soft acids and bases to organic chemistry. *J Am Chem Soc* 89, 1827-1838.
- (14) Simpson, R. B. (1961) Assosiation constants of methylmercury with sulfhydryl and other bases. *J Am Chem Soc* 83, 4711-4717.
- (15) Chiancone, E., Currell, D. L., Vecchini, P., Antonini, E. and Wyman, J. (1970) Kinetics of the reaction of the "masked" and "free" sulfhydryl groups of human hemoglobin with p-mercuribenzoate. *J Biol Chem* 245, 4105-4111.
- (16) Himes, R. H. and Rabinowitz, J. C. (1962) Formyltetrahydrofolate synthetase. III. Studies on the mechanism of the reaction. *J Biol Chem* 237, 2915-2925.

- (17) Smith, G. D. and Schachman, H. K. (1971) A disproportionation mechanism for the all-or-none dissociation of mercurial-treated glyceraldehyde phosphate dehydrogenase. *Biochemistry* 10, 4576-4588.
- (18) Shinyashiki, M., Kumagai, Y., Nakajima, H., Nagahune, J., Homma-Takeda, S., Sagai, M. and Shimojo, N. (1996) Selective inhibition of the mouse brain Mn-SOD by methylmercury. *Environ Toxicol and Pharmacol* 8, 359-366.
- (19) Shinyashiki, M., Kumagai, Y., Nakajima, H., Nagafune, J., Homma-Takeda, S., Sagai, M. and Shimojo, N. (1998) Differential changes in rat brain nitric oxide synthase in vivo and in vitro by methylmercury. *Brain Res* 798, 147-155.
- (20) Kumagai, Y., Homma-Takeda, S., Shinyashiki, M. and Shimojo, M. (1997) Alterations in Superoxide Dismutase Isozymes by Methylmercury. *Appl Organo Chem* 11, 635-643.
- (21) Kanda, H., Sumi, D., Endo, A., Toyama, T., Chen, C. L., Kikushima, M. and Kumagai, Y. (2008) Reduction of arginase I activity and manganese levels in the liver during exposure of rats to methylmercury: a possible mechanism. *Arch Toxicol* 82, 803-808.
- (22) Toyama, T., Shinkai, Y., Yasutake, A., Uchida, K., Yamamoto, M. and Kumagai, Y. (2011) Isothiocyanates Reduce Mercury Accumulation via an Nrf2-Dependent Mechanism during Exposure of Mice to Methylmercury. *Environ Health Perspect*.
- (23) Toyama, T., Sumi, D., Shinkai, Y., Yasutake, A., Taguchi, K., Tong, K. I., Yamamoto, M. and Kumagai, Y. (2007) Cytoprotective role of Nrf2/Keap1 system in methylmercury toxicity. *Biochem Biophys Res Commun* 363, 645-650.
- (24) Rabenstein, D. L., Isab, A. A. and Reid, R. S. (1982) A proton nuclear magnetic resonance study of the binding of methylmercury in human erythrocytes. *Biochim Biophys Acta* 720, 53-64.
- (25) Rabenstein, D. L., Reid, R. S. and Isab, A. A. (1983) <sup>1</sup>H-NMR study of the effectiveness of various thiols for removal of methylmercury from hemolyzed erythrocytes. *J Inorg Biochem* 18, 241-251.
- (26) Rabenstein, D. L., Arnold, A. P. and Guy, R. D. (1986) <sup>1</sup>H-NMR study of the removal of methylmercury from intact erythrocytes by sulfhydryl compounds. *J Inorg Biochem* 28, 279-287.
- (27) Jones, D. P. (2008) Radical-free biology of oxidative stress. *Am J Physiol Cell Physiol* 295, C849-868.
- (28) Dudev, T. and Lim, C. (2002) Factors governing the protonation state of cysteines in proteins: an Ab initio/CDM study. *J Am Chem Soc* 124, 6759-6766.
- (29) O'Neil, M. J., Smith, A. and Heckelman, P. E. (2001) Glutathione, In *The Merck index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals-13th Edition*, Merck Research Laboratories Division of MERCK & Co., INC., Whitehose Station, NJ.

- (30) Armstrong, R. N. (1997) Structure, catalytic mechanism, and evolution of the glutathione transferases. *Chem Res Toxicol* 10, 2-18.
- (31) Caccuri, A. M., Antonini, G., Board, P. G., Parker, M. W., Nicotra, M., Lo Bello, M., Federici, G. and Ricci, G. (1999) Proton release on binding of glutathione to alpha, Mu and Delta class glutathione transferases. *Biochem J* 344 Pt 2, 419-425.
- (32) Mignotte, V., Wall, L., deBoer, E., Grosveld, F. and Romeo, P. H. (1989) Two tissue-specific factors bind the erythroid promoter of the human porphobilinogen deaminase gene. *Nucleic acids research* 17, 37-54.
- (33) Moi, P., Chan, K., Asunis, I., Cao, A. and Kan, Y. W. (1994) Isolation of NF-E2-related factor 2 (Nrf2), a NF-E2-like basic leucine zipper transcriptional activator that binds to the tandem NF-E2/AP1 repeat of the beta-globin locus control region. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 9926-9930.
- (34) Rushmore, T. H., King, R. G., Paulson, K. E. and Pickett, C. B. (1990) Regulation of glutathione S-transferase Ya subunit gene expression: identification of a unique xenobiotic-responsive element controlling inducible expression by planar aromatic compounds. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 3826-3830.
- (35) Rushmore, T. H. and Pickett, C. B. (1990) Transcriptional regulation of the rat glutathione S-transferase Ya subunit gene. Characterization of a xenobiotic-responsive element controlling inducible expression by phenolic antioxidants. *J Biol Chem* 265, 14648-14653.
- (36) Talalay, P., Fahey, J. W., Holtzclaw, W. D., Prester, T. and Zhang, Y. (1995) Chemoprotection against cancer by phase 2 enzyme induction. *Toxicol Lett* 82-83, 173-179.
- (37) Friling, R. S., Bensimon, A., Tichauer, Y. and Daniel, V. (1990) Xenobiotic-inducible expression of murine glutathione S-transferase Ya subunit gene is controlled by an electrophile-responsive element. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 6258-6262.
- (38) Wasserman, W. W. and Fahl, W. E. (1997) Functional antioxidant responsive elements. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 5361-5366.
- (39) Itoh, K., Chiba, T., Takahashi, S., Ishii, T., Igarashi, K., Katoh, Y., Oyake, T., Hayashi, N., Satoh, K., Hatayama, I., Yamamoto, M. and Nabeshima, Y. (1997) An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochem Biophys Res Commun* 236, 313-322.
- (40) Motohashi, H., Shavit, J. A., Igarashi, K., Yamamoto, M. and Engel, J. D. (1997) The world according to Maf. *Nucleic acids research* 25, 2953-2959.
- (41) Itoh, K., Wakabayashi, N., Katoh, Y., Ishii, T., Igarashi, K., Engel, J. D. and Yamamoto, M. (1999) Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes Dev* 13, 76-86.

- (42) Kobayashi, M., Itoh, K., Suzuki, T., Osanai, H., Nishikawa, K., Katoh, Y., Takagi, Y. and Yamamoto, M. (2002) Identification of the interactive interface and phylogenetic conservation of the Nrf2-Keap1 system. *Genes Cells* 7, 807-820.
- (43) McMahon, M., Itoh, K., Yamamoto, M. and Hayes, J. D. (2003) Keap1-dependent proteasomal degradation of transcription factor Nrf2 contributes to the negative regulation of antioxidant response element-driven gene expression. *J Biol Chem* 278, 21592-21600.
- (44) McMahon, M., Thomas, N., Itoh, K., Yamamoto, M. and Hayes, J. D. (2004) Redox-regulated turnover of Nrf2 is determined by at least two separate protein domains, the redox-sensitive Neh2 degron and the redox-insensitive Neh6 degron. *J Biol Chem* 279, 31556-31567.
- (45) Zhang, Y. and Gordon, G. B. (2004) A strategy for cancer prevention: stimulation of the Nrf2-ARE signaling pathway. *Mol Cancer Ther* 3, 885-893.
- (46) Katoh, Y., Itoh, K., Yoshida, E., Miyagishi, M., Fukamizu, A. and Yamamoto, M. (2001) Two domains of Nrf2 cooperatively bind CBP, a CREB binding protein, and synergistically activate transcription. *Genes Cells* 6, 857-868.
- (47) Nioi, P., Nguyen, T., Sherratt, P. J. and Pickett, C. B. (2005) The carboxy-terminal Neh3 domain of Nrf2 is required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol* 25, 10895-10906.
- (48) Zhang, J., Hosoya, T., Maruyama, A., Nishikawa, K., Maher, J. M., Ohta, T., Motohashi, H., Fukamizu, A., Shibahara, S., Itoh, K. and Yamamoto, M. (2007) Nrf2 Neh5 domain is differentially utilized in the transactivation of cytoprotective genes. *Biochem J* 404, 459-466.
- (49) Ogura, T., Tong, K. I., Mio, K., Maruyama, Y., Kurokawa, H., Sato, C. and Yamamoto, M. (2010) Keap1 is a forked-stem dimer structure with two large spheres enclosing the intervening, double glycine repeat, and C-terminal domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 2842-2847.
- (50) Tong, K. I., Katoh, Y., Kusunoki, H., Itoh, K., Tanaka, T. and Yamamoto, M. (2006) Keap1 recruits Neh2 through binding to ETGE and DLG motifs: characterization of the two-site molecular recognition model. *Mol Cell Biol* 26, 2887-2900.
- (51) Kwak, M. K., Itoh, K., Yamamoto, M. and Kensler, T. W. (2002) Enhanced expression of the transcription factor Nrf2 by cancer chemopreventive agents: role of antioxidant response element-like sequences in the nrf2 promoter. *Mol Cell Biol* 22, 2883-2892.
- (52) Ishii, T., Itoh, K., Takahashi, S., Sato, H., Yanagawa, T., Katoh, Y., Bannai, S. and Yamamoto, M. (2000) Transcription factor Nrf2 coordinately regulates a group of oxidative stress-inducible genes in macrophages. *J Biol Chem* 275, 16023-16029.

- (53) Ishii, T., Itoh, K., Ruiz, E., Leake, D. S., Unoki, H., Yamamoto, M. and Mann, G. E. (2004) Role of Nrf2 in the regulation of CD36 and stress protein expression in murine macrophages: activation by oxidatively modified LDL and 4-hydroxynonenal. *Circ Res* 94, 609-616.
- (54) Sasaki, H., Sato, H., Kuriyama-Matsumura, K., Sato, K., Maebara, K., Wang, H., Tamba, M., Itoh, K., Yamamoto, M. and Bannai, S. (2002) Electrophile response element-mediated induction of the cystine/glutamate exchange transporter gene expression. *J Biol Chem* 277, 44765-44771.
- (55) Moinova, H. R. and Mulcahy, R. T. (1999) Up-regulation of the human gamma-glutamylcysteine synthetase regulatory subunit gene involves binding of Nrf-2 to an electrophile responsive element. *Biochem Biophys Res Commun* 261, 661-668.
- (56) Wild, A. C., Moinova, H. R. and Mulcahy, R. T. (1999) Regulation of gamma-glutamylcysteine synthetase subunit gene expression by the transcription factor Nrf2. *J Biol Chem* 274, 33627-33636.
- (57) Chanas, S. A., Jiang, Q., McMahon, M., McWalter, G. K., McLellan, L. I., Elcombe, C. R., Henderson, C. J., Wolf, C. R., Moffat, G. J., Itoh, K., Yamamoto, M. and Hayes, J. D. (2002) Loss of the Nrf2 transcription factor causes a marked reduction in constitutive and inducible expression of the glutathione S-transferase Gsta1, Gsta2, Gstm1, Gstm2, Gstm3 and Gstm4 genes in the livers of male and female mice. *Biochem J* 365, 405-416.
- (58) Hayes, J. D., Flanagan, J. D. and Jowsey, I. R. (2005) Glutathione transferases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 45, 51-88.
- (59) Hayashi, A., Suzuki, H., Itoh, K., Yamamoto, M. and Sugiyama, Y. (2003) Transcription factor Nrf2 is required for the constitutive and inducible expression of multidrug resistance-associated protein 1 in mouse embryo fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 310, 824-829.
- (60) Maher, J. M., Cheng, X., Slitt, A. L., Dieter, M. Z. and Klaassen, C. D. (2005) Induction of the multidrug resistance-associated protein family of transporters by chemical activators of receptor-mediated pathways in mouse liver. *Drug Metab Dispos* 33, 956-962.
- (61) Vollrath, V., Wielandt, A. M., Iruretagoyena, M. and Chianale, J. (2006) Role of Nrf2 in the regulation of the Mrp2 (ABCC2) gene. *Biochem J* 395, 599-609.
- (62) Itoh, K., Tong, K. I. and Yamamoto, M. (2004) Molecular mechanism activating Nrf2-Keap1 pathway in regulation of adaptive response to electrophiles. *Free Radic Biol Med* 36, 1208-1213.

- (63) Dinkova-Kostova, A. T., Holtzclaw, W. D., Cole, R. N., Itoh, K., Wakabayashi, N., Katoh, Y., Yamamoto, M. and Talalay, P. (2002) Direct evidence that sulfhydryl groups of Keap1 are the sensors regulating induction of phase 2 enzymes that protect against carcinogens and oxidants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 11908-11913.
- (64) Abiko, Y., Miura, T., Phuc, B. H., Shinkai, Y. and Kumagai, Y. (2011) Participation of covalent modification of Keap1 in the activation of Nrf2 by tert-butylbenzoquinone, an electrophilic metabolite of butylated hydroxyanisole. *Toxicol Appl Pharmacol* 255, 32-39.
- (65) Miura, T., Shinkai, Y., Jiang, H. Y., Iwamoto, N., Sumi, D., Taguchi, K., Yamamoto, M., Jinno, H., Tanaka-Kagawa, T., Cho, A. K. and Kumagai, Y. (2011) Initial response and cellular protection through the Keap1/Nrf2 system during the exposure of primary mouse hepatocytes to 1,2-naphthoquinone. *Chem Res Toxicol* 24, 559-567.
- (66) Sumi, D., Numasawa, Y., Endo, A., Iwamoto, N. and Kumagai, Y. (2009) Catechol estrogens mediated activation of Nrf2 through covalent modification of its quinone metabolite to Keap1. *J Toxicol Sci* 34, 627-635.
- (67) Zhang, D. D. and Hannink, M. (2003) Distinct cysteine residues in Keap1 are required for Keap1-dependent ubiquitination of Nrf2 and for stabilization of Nrf2 by chemopreventive agents and oxidative stress. *Mol Cell Biol* 23, 8137-8151.
- (68) Kobayashi, M., Li, L., Iwamoto, N., Nakajima-Takagi, Y., Kaneko, H., Nakayama, Y., Eguchi, M., Wada, Y., Kumagai, Y. and Yamamoto, M. (2009) The antioxidant defense system Keap1-Nrf2 comprises a multiple sensing mechanism for responding to a wide range of chemical compounds. *Mol Cell Biol* 29, 493-502.
- (69) McMahon, M., Lamont, D. J., Beattie, K. A. and Hayes, J. D. (2010) Keap1 perceives stress via three sensors for the endogenous signaling molecules nitric oxide, zinc, and alkenals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 18838-18843.
- (70) Dinkova-Kostova, A. T., Holtzclaw, W. D. and Wakabayashi, N. (2005) Keap1, the sensor for electrophiles and oxidants that regulates the phase 2 response, is a zinc metalloprotein. *Biochem* 44, 6889-6899.
- (71) 食品安全委員会. (2004) 化学物質・汚染物質評価書, 魚介類等に含まれるメチル水銀について.
- (72) Ballatori, N. (2002) Transport of toxic metals by molecular mimicry. *Environ Health Perspect* 110 Suppl 5, 689-694.
- (73) Madejczyk, M. S., Aremu, D. A., Simmons-Willis, T. A., Clarkson, T. W. and Ballatori, N. (2007) Accelerated urinary excretion of methylmercury following administration of its antidote N-acetylcysteine requires Mrp2/Abcc2, the apical multidrug resistance-associated protein. *J Pharmacol Exp Ther* 322, 378-384.



- (74) Mathis, B. (1979) Handbook on the Toxicology of Metals, Chapter 30 Mercury. *Elsevier/North-Holland Biomedical Press*, 519-521.
- (75) Ganther, H. E., Goudie, C., Sunde, M. L., Kopecky, M. J. and Wagner, P. (1972) Selenium: relation to decreased toxicity of methylmercury added to diets containing tuna. *Science* 175, 1122-1124.
- (76) Khan, M. A. and Wang, F. Chemical demethylation of methylmercury by selenoamino acids. *Chem Res Toxicol* 23, 1202-1206.
- (77) Kasuya, M. (1976) Effect of selenium on the toxicity of methylmercury on nervous tissue in culture. *Toxicol Appl Pharmacol* 35, 11-20.
- (78) Yasutake, A. and Hirayama, K. (1990) Selective Quantification of Inorganic Mercury in Tissues of Methylmercury-Treated Rats. *Bull Environ Contam Toxicol* 45, 662-666.
- (79) Ishihara, N. (2000) Excretion of methyl mercury in human feces. *Arch Environ Health* 55, 44-47.
- (80) Rowland, I. R., Davies, M. J. and Grasso, P. (1978) Metabolism of methylmercuric chloride by the gastro-intestinal flora of the rat. *Xenobiotica* 8, 37-43.
- (81) Rowland, I. R., Robinson, R. D. and Doherty, R. A. (1984) Effects of diet on mercury metabolism and excretion in mice given methylmercury: role of gut flora. *Arch Environ Health* 39, 401-408.
- (82) Rowland, I. R., Mallett, A. K., Flynn, J. and Hargreaves, R. J. (1986) The effect of various dietary fibres on tissue concentration and chemical form of mercury after methylmercury exposure in mice. *Arch Toxicol* 59, 94-98.
- (83) Yasutake, A., Hirayama, K. and Inoue, M. (1989) Mechanism of urinary excretion of methylmercury in mice. *Arch Toxicol* 63, 479-483.
- (84) Winterbourn, C. C. and Sutton, H. C. (1986) Iron and xanthine oxidase catalyze formation of an oxidant species distinguishable from OH.: comparison with the Haber-Weiss reaction. *Arch Biochem Biophys* 244, 27-34.
- (85) Younes, M., Eberhardt, I. and Lemoine, R. (1989) Effect of iron overload on spontaneous and xenobiotic-induced lipid peroxidation in vivo. *J Appl Toxicol* 9, 103-108.
- (86) Hirayama, K., Yasutake, A. and Suda, I. (1994) Involvement of Reactive Oxygens in Demethylation of Methylmercury in vivo. *Jpn J Toxicol Environ Health* 40, 30.
- (87) de la Rosa, J., Drake, M. R. and Stipanuk, M. H. (1987) Metabolism of cysteine and cysteinesulfinate in rat and cat hepatocytes. *J Nutr* 117, 549-558.
- (88) Drake, M. R., De La Rosa, J. and Stipanuk, M. H. (1987) Metabolism of cysteine in rat hepatocytes. Evidence for cysteinesulphinat-independent pathways. *Biochem J* 244, 279-286.

- (89) Hannestad, U., Martensson, J., Sjodahl, R. and Sorbo, B. (1981) 3-mercaptolactate cysteine disulfiduria: biochemical studies on affected and unaffected members of a family. *Biochem Med* 26, 106-114.
- (90) Sorbo, B. (1975) "Metabolic Pathways" (D. M. Greenberg, Ed.). *Academic Press, New York*, 7, 433-456.
- (91) Jefferies, H., Coster, J., Khalil, A., Bot, J., McCauley, R. D. and Hall, J. C. (2003) Glutathione. *ANZ J Surg* 73, 517-522.
- (92) Pan-Hou, H. S. and Imura, N. (1981) Role of hydrogen sulfide in mercury resistance determined by plasmid of *Clostridium cochlearium* T-2. *Arch Microbiol* 129, 49-52.
- (93) Ono, B., Ishii, N., Fujino, S. and Aoyama, I. (1991) Role of hydrosulfide ions (HS-) in methylmercury resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol.* 57, 3183-3186.
- (94) Craig, P. J. and Bartlett, P. D. (1978) The role of hydrogen sulphide in environmental transport of mercury. *Nature* 275, 635-637.
- (95) Abe, K. and Kimura, H. (1996) The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator. *J Neurosci* 16, 1066-1071.
- (96) Hosoki, R., Matsuki, N. and Kimura, H. (1997) The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous smooth muscle relaxant in synergy with nitric oxide. *Biochem Biophys Res Commun* 237, 527-531.
- (97) Kimura, Y. and Kimura, H. (2004) Hydrogen sulfide protects neurons from oxidative stress. *FASEB J* 18, 1165-1167.
- (98) Goodwin, L. R., Francom, D., Dieken, F. P., Taylor, J. D., Warenycia, M. W., Reiffenstein, R. J. and Dowling, G. (1989) Determination of sulfide in brain tissue by gas dialysis/ion chromatography: postmortem studies and two case reports. *J Anal Toxicol* 13, 105-109.
- (99) Warenycia, M. W., Goodwin, L. R., Benishin, C. G., Reiffenstein, R. J., Francom, D. M., Taylor, J. D. and Dieken, F. P. (1989) Acute hydrogen sulfide poisoning. Demonstration of selective uptake of sulfide by the brainstem by measurement of brain sulfide levels. *Biochem Pharmacol* 38, 973-981.
- (100) Furne, J., Saeed, A. and Levitt, M. D. (2008) Whole tissue hydrogen sulfide concentrations are orders of magnitude lower than presently accepted values. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 295, R1479-1485.
- (101) Levitt, M. D., Abdel-Rehim, M. S. and Furne, J. (2011) Free and acid-labile hydrogen sulfide concentrations in mouse tissues: anomalously high free hydrogen sulfide in aortic tissue. *Antioxid Redox Signal* 15, 373-378.

- (102) Wintner, E. A., Deckwerth, T. L., Langston, W., Bengtsson, A., Leviten, D., Hill, P., Insko, M. A., Dumpit, R., VandenEkart, E., Toombs, C. F. and Szabo, C. (2010) A monobromobimane-based assay to measure the pharmacokinetic profile of reactive sulphide species in blood. *Br J Pharmacol* 160, 941-957.
- (103) MERCK co., I. (2001) THE MERCK INDEX 13th Edition. 486.
- (104) Hughes, M. N., Centelles, M. N. and Moore, K. P. (2009) Making and working with hydrogen sulfide: The chemistry and generation of hydrogen sulfide in vitro and its measurement in vivo: a review. *Free Radic Biol Med* 47, 1346-1353.
- (105) Reiffenstein, R. J., Hulbert, W. C. and Roth, S. H. (1992) Toxicology of hydrogen sulfide. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 32, 109-134.
- (106) Abe, K. and Kimura, H. (1996) The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator. *J Neurosci* 16, 1066-1071.
- (107) Stipanuk, M. H. and Beck, P. W. (1982) Characterization of the enzymic capacity for cysteine desulphhydration in liver and kidney of the rat. *Biochem J* 206, 267-277.
- (108) Enokido, Y., Suzuki, E., Iwasawa, K., Namekata, K., Okazawa, H. and Kimura, H. (2005) Cystathionine beta-synthase, a key enzyme for homocysteine metabolism, is preferentially expressed in the radial glia/astrocyte lineage of developing mouse CNS. *FASEB J* 19, 1854-1856.
- (109) Chen, X., Jhee, K. H. and Kruger, W. D. (2004) Production of the neuromodulator H<sub>2</sub>S by cystathionine beta-synthase via the condensation of cysteine and homocysteine. *J Biol Chem* 279, 52082-52086.
- (110) Cavallini, D., Mondovi, B., De Marco, C. and Scioscia-Santoro, A. (1962) The mechanism of desulphhydration of cysteine. *Enzymologia* 24, 253-266.
- (111) Chiku, T., Padovani, D., Zhu, W., Singh, S., Vitvitsky, V. and Banerjee, R. (2009) H<sub>2</sub>S biogenesis by human cystathionine gamma-lyase leads to the novel sulfur metabolites lanthionine and homolanthionine and is responsive to the grade of hyperhomocysteinemia. *J Biol Chem* 284, 11601-11612.
- (112) Shibuya, N., Mikami, Y., Kimura, Y., Nagahara, N. and Kimura, H. (2009) Vascular endothelium expresses 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase and produces hydrogen sulfide. *J Biochem* 146, 623-626.
- (113) Meister, A. (1953) Conversion of the  $\alpha$ -keto analog of cysteine to pyruvate and sulfur *Fed Proc* 12.
- (114) Tanabe, S. (2007) Development of assay methods for endogenous inorganic sulfur compounds and sulfurtransferases and evaluation of the physiological functions of bound sulfur. *Yakugaku Zasshi* 128, 881-900.

- (115) Stipanuk, M. H. (1986) Metabolism of sulfur-containing amino acids. *Annu Rev Nutr* 6, 179-209.
- (116) Westley, J. (1973) Rhodanese. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 39, 327-368.
- (117) Westley, J. (1980) "Enzymatic Basis of Detoxication, vol. 2, Rodanese and the Sulfane Pool in Enzymatic Basis of Detoxication" *Academic Press, New York*, , 245-260.
- (118) Everett, S. A., Folkes, L. K., Wardman, P. and Asmus, K. D. (1994) Free-radical repair by a novel perthiol: reversible hydrogen transfer and perthiyl radical formation. *Free Radic Res* 20, 387-400.
- (119) Gates, K. S. (2000) Mechanisms of DNA damage by leinamycin. *Chem Res Toxicol* 13, 953-956.
- (120) Denizot, F. and Lang, R. (1986) Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Methods* 89, 271-277.
- (121) Mosmann, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65, 55-63.
- (122) Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J. and Klenk, D. C. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150, 76-85.
- (123) Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.
- (124) Taguchi, K., Fujii, S., Yamano, S., Cho, A. K., Kamisuki, S., Nakai, Y., Sugawara, F., Froines, J. R. and Kumagai, Y. (2007) An approach to evaluate two-electron reduction of 9,10-phenanthraquinone and redox activity of the hydroquinone associated with oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 43, 789-799.
- (125) Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- (126) Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 4350-4354.
- (127) Toyama, T., Shinkai, Y., Kaji, T. and Kumagai, Y. (2013) A convenient method to assess chemical modification of protein thiols by electrophilic metals. *J Toxicol Sci* 38, 477-484.
- (128) 吉田映子. (2010) メチル水銀の細胞毒性に対する内在性ガス状物質硫化水素の役割. 平成21年度修士(環境科学)学位論文.

- (129) Baker, R. T., Smith, S. A., Marano, R., McKee, J. and Board, P. G. (1994) Protein expression using cotranslational fusion and cleavage of ubiquitin. Mutagenesis of the glutathione-binding site of human Pi class glutathione S-transferase. *J Biol Chem* 269, 25381-25386.
- (130) Vignaud, C., Rakotozafy, L., Falguieres, A., Potus, J. and Nicolas, J. (2004) Separation and identification by gel filtration and high-performance liquid chromatography with UV or electrochemical detection of the disulphides produced from cysteine and glutathione oxidation. *J Chromatogr A* 1031, 125-133.
- (131) Toyama, T., Sumi, D., Shinkai, Y., Yasutake, A., Taguchi, K., Tong, K. I., Yamamoto, M. and Kumagai, Y. (2007) Cytoprotective role of Nrf2/Keap1 system in methylmercury toxicity. *Biochem Biophys Res Commun* 363, 645-650.
- (132) 掛橋秀直. (2013) マウス初代肝細胞における環境中親電子リガンド 1,2-ナフトキノンのグルタチオン抱合体の細胞内運命. 平成24年度修士(医科学) 学位論文.
- (133) Shibata, T., Kimura, Y., Mukai, A., Mori, H., Ito, S., Asaka, Y., Oe, S., Tanaka, H., Takahashi, T. and Uchida, K. (2011) Transthiocarbamylation of proteins by thiolated isothiocyanates. *J Biol Chem* 286, 42150-42161.
- (134) Kumagai, Y., Kanda, H., Shinkai, Y. and Toyama, T. (2013) The role of the Keap1/Nrf2 pathway in the cellular response to methylmercury. *Oxid Med Cell Longev* 2013, 848279.
- (135) Taguchi, K., Motohashi, H. and Yamamoto, M. (2011) Molecular mechanisms of the Keap1-Nrf2 pathway in stress response and cancer evolution. *Genes Cells* 16, 123-140.
- (136) Kansanen, E., Bonacci, G., Schopfer, F. J., Kuosmanen, S. M., Tong, K. I., Leinonen, H., Woodcock, S. R., Yamamoto, M., Carlberg, C., Yla-Herttuala, S., Freeman, B. A. and Levonen, A. L. (2011) Electrophilic nitro-fatty acids activate NRF2 by a KEAP1 cysteine 151-independent mechanism. *J Biol Chem* 286, 14019-14027.
- (137) Ni, M., Li, X., Yin, Z., Jiang, H., Sidoryk-Wegrzynowicz, M., Milatovic, D., Cai, J. and Aschner, M. (2010) Methylmercury induces acute oxidative stress, altering Nrf2 protein level in primary microglial cells. *Toxicol Sci* 116, 590-603.
- (138) 外山喬士. (2011) Keap1-Nrf2 システムによるメチル水銀の毒性軽減効果. 平成22年度博士(医学) 学位論文.
- (139) Kawanishi, T., Togawa, T., Ishigami, A., Tanabe, S. and Imanari, T. (1984) Determination of thiosulfate in human urine and plasma by high performance liquid chromatography with a dual electrochemical detector. *BUNSEKI KAGAK* 33, 295-300.
- (140) Rabenstein, D. L. and Fairhurst, M. T. (1975) Nuclear magnetic resonance studies of the solution chemistry of metal complexes. XI. The binding of methylmercury by sulfhydryl-containing amino acids and by glutathione. *J Am Chem Soc* 97, 2086-2092.

- (141) Su, M., Wakabayashi, K., Kakita, A., Ikuta, F. and Takahashi, H. (1998) Selective involvement of large motor neurons in the spinal cord of rats treated with methylmercury. *J Neurol Sci* 156, 12-17.
- (142) Nishida, M., Sawa, T., Kitajima, N., Ono, K., Inoue, H., Ihara, H., Motohashi, H., Yamamoto, M., Suematsu, M., Kurose, H., van der Vliet, A., Freeman, B. A., Shibata, T., Uchida, K., Kumagai, Y. and Akaike, T. (2012) Hydrogen sulfide anion regulates redox signaling via electrophile sulfhydration. *Nat Chem Biol* 8, 714-724.
- (143) Östland, K. (1969) Studies on the metabolism of methyl mercury and dimethyl mercury in mice. *Acta Pharmacol Toxicol* 27, Suppl 1.
- (144) Ogasawara, Y., Isoda, S. and Tanabe, S. (1994) Tissue and subcellular distribution of bound and acid-labile sulfur, and the enzymic capacity for sulfide production in the rat. *Biol Pharm Bull* 17, 1535-1542.
- (145) Yang, G., Yang, W., Wu, L. and Wang, R. (2007) H<sub>2</sub>S, endoplasmic reticulum stress, and apoptosis of insulin-secreting beta cells. *J Biol Chem* 282, 16567-16576.
- (146) Wintner, E. A., Deckwerth, T. L., Langston, W., Bengtsson, A., Leviten, D., Hill, P., Insko, M. A., Dumpit, R., VandenEckart, E., Toombs, C. F. and Szabo, C. A monobromobimane-based assay to measure the pharmacokinetic profile of reactive sulphide species in blood. *Br J Pharmacol* 160, 941-957.
- (147) Hayes, J. D. and Pulford, D. J. (1995) The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 30, 445-600.
- (148) Yang, Y., Cheng, J. Z., Singhal, S. S., Saini, M., Pandya, U., Awasthi, S. and Awasthi, Y. C. (2001) Role of glutathione S-transferases in protection against lipid peroxidation. Overexpression of hGSTA2-2 in K562 cells protects against hydrogen peroxide-induced apoptosis and inhibits JNK and caspase 3 activation. *J Biol Chem* 276, 19220-19230.
- (149) Kodym, R., Calkins, P. and Story, M. (1999) The cloning and characterization of a new stress response protein. A mammalian member of a family of theta class glutathione s-transferase-like proteins. *J Biol Chem* 274, 5131-5137.
- (150) Ishikawa, T., Casini, A. F. and Nishikimi, M. (1998) Molecular cloning and functional expression of rat liver glutathione-dependent dehydroascorbate reductase. *J Biol Chem* 273, 28708-28712.
- (151) Lo Bello, M., Parker, M. W., Desideri, A., Polticelli, F., Falconi, M., Del Boccio, G., Pennelli, A., Federici, G. and Ricci, G. (1993) Peculiar spectroscopic and kinetic properties of Cys-47 in human placental glutathione transferase. Evidence for an atypical thiolate ion pair near the active site. *J Biol Chem* 268, 19033-19038.

- (152) Stella, L., Nicotra, M., Ricci, G., Rosato, N. and Di Iorio, E. E. (1999) Molecular dynamics simulations of human glutathione transferase P1-1: analysis of the induced-fit mechanism by GSH binding. *Proteins* 37, 1-9.
- (153) Pan-Hou, H. S., Nishimoto, M. and Imura, N. (1981) Possible role of membrane proteins in mercury resistance of *Enterobacter aerogenes*. *Arch Microbiol* 130, 93-95.

## 謝辞

本研究は実に多くの方々からの御指導、御協力のもとで行われました。ここに厚く御礼申し上げます。研究の真髄、研究に対する姿勢を厳しくも熱心に御指導頂き、研究者としての道へ導いて下さった、筑波大学医学医療系 熊谷嘉人教授に深甚なる謝意を示します。また、日々の研究に関することをサポートして頂き、御指導、御助言を賜りました筑波大学医学医療系 新開泰弘助教に深く感謝致します。

また、修士過程の頃より水銀研究グループを牽引して下さった日本学術振興会 PD 特別研究員の外山喬士さんには、基本技術の指導やアイデア、そして何よりも研究への情熱と楽しさを教えて頂きました。心より感謝致します。そして、本研究課題を遂行する機会を頂いた筑波大学大学院人間総合科学研究科 (現、徳島文理大学薬学部) 角大悟准教授に心より万謝致します。

本研究を遂行するにあたり、様々な試料や素材を提供し便宜を測って下さった先生方に、この書面をもって謹んで御礼申し上げます。

東北大学	永沼章教授	• SH-SY5Y 細胞
弘前大学	伊東健教授	• ARE-luciferase plasmid
慶応義塾大学	石井功准教授	• CSE 遺伝子欠損マウス
東京薬科大学	平塚明教授、西山貴仁講師	• ヒト GSTP1 plasmid

また、6年間にわたる研究生生活・学生生活を共に過ごし、研究面以外でも支えて頂いた、研究室の卒業生および在校生に感謝致します。特に、同期の安孫子ユミ博士とは互いに切磋琢磨し合い、研究生活面では苦楽を共にしてきました。とても充実した6年間を過ごすことができたことに心より感謝申し上げます。また、実務面でサポートし続けて頂いた、秘書の広瀬玲子氏に感謝致します。

最後に研究室の垣根を超えて、厳しくも暖かく見守って下さった諸先生、諸先輩方、そして互いに切磋琢磨し合い、心の支えでもある友人、さらに経済的、精神的に支えてくれた家族に心より深く感謝致します。