

氏名（本籍）	神田 洋紀		
学位の種類	博士（医学）		
学位記番号	博甲第	7422	号
学位授与年月	平成 27 年 3 月 25 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
審査研究科	人間総合科学研究科		
学位論文題目	メチル水銀による S-水銀化を介したタンパク質の化学修飾に関する研究		
主査	筑波大学教授	博士（薬学）	本間 真人
副査	筑波大学准教授	医学博士	内田 和彦
副査	筑波大学講師	博士（農学）	蕨 栄治
副査	筑波大学准教授	医学博士	野上 晴雄

## 論文の内容の要旨

### （目的）

メチル水銀（MeHg）は、蛍光灯、医歯科用品、電池、温度計のような生活用品や、火山活動、石炭火力発電、ゴミ焼却、生物濃縮を介してマグロ等の大型食用魚類の摂取により体内に侵入する。本環境中親電子物質はタンパク質の求核置換基と共有結合するが、システイン残基の SH 基に対する親和力（解離定数  $pK=15.7$ ）が他のアミノ酸リガンドよりも強い。従って、MeHg が体内に入るとタンパク質のシステイン残基を特異的に化学修飾する（S-水銀化）。このことが、MeHg による毒性の主因であると考えられるが、その実態は明らかではなかった。申請者らは MeHg によるタンパク質の S-水銀化の研究の中で、MeHg と共有結合することで容易に不溶化するタンパク質（サブユニット分子量：42 kDa）の存在を見出し、その単離・精製と同定、およびその変異体等を用いた標的タンパク質の機能変化を検討し、MeHg による毒性の分子メカニズムの解明を試みた。

### （結果）

ラット肝臓の粗精製画分に MeHg (100  $\mu$ M) を添加後、容易に不溶化するタンパク質を遠心分離 (12,000 g、10 分) により回収した。残渣をグルタチオン (GSH) (1 mM) で可溶化し、二次元電気泳動後の MALDI-TOF/MS を用いたペプチドマスフィンガープリンティングで化学構造を同定した。その結果、ラット肝酵素溶液中の 42 kD のタンパク質が MeHg によって容易に S-水銀化を生じること、およびこのタンパク質は亜鉛金属酵素である NAD 要求性ソルビトール脱水素酵素 (SDH) であることが確認された。ラット SDH 組み換え体を MeHg と反応させた結果、タンパク質の不溶化、活性部位からの亜鉛イ

オンの遊離および酵素活性の低下が観察された。これらの現象は、GSH の添加によって回復した。

ビオチン標識マレイミド標識アッセイにより、SDH が MeHg によって S-水銀化を受けることを確認した。MALDI-TOF/MS 分析を行った結果、SDH の Cys44、Cys119、Cys129 および Cys169 が修飾部位として同定された。SDH の変異体を用いた実験により、各部位のセリン置換体のうち、C119S では不溶化に変化はみられなかったが、C44S および C129S では不溶化が抑制された。

ラット SDH 組み換え体と MeHg の反応混合液に NAD<sup>+</sup>を加えた時、濃度依存的に SDH の不溶化が抑制されたのに対して、NADP<sup>+</sup>および FAD<sup>+</sup>では抑制効果はみられなかった。初代肝細胞および SH-SY5Y 細胞に MeHg を曝露した結果、細胞中の SDH 活性の変化は殆ど認められなかった。

#### (考察)

本研究は、MeHg の新規の分子標的を探索するために、S-水銀化したタンパク質の構造変化と不溶化に着目した新たな試みである。SDH 組み換え体による実験で確認された MeHg 依存的な一連の現象（不溶化、亜鉛の遊離、活性阻害）は、MeHg による S-水銀化の影響と考えられた。実際、MALDI-TOF/MS を用いた分析により、ラット SDH は、10 個のシステイン残基のうち Cys44、Cys119、Cys129 および Cys169 を介して S-水銀化を受けることが確認された。また、変異体を用いた検討により、Cys44 および Cys129 が不溶化に重要であることが示された。S-水銀化がもたらす本タンパク質の三次元立体構造の変化が、分子環境、活性部位の柔軟性の変化、安定性あるいはサブユニット間の結合状態の変化などを引き起こし、不溶化を促している可能性が考えられた。更に、Cys44 は、活性部位の亜鉛イオンを保持するリガンドとして機能しているため、その S-水銀化が主に亜鉛イオンの遊離に関与しているが示唆されたが、亜鉛の遊離が不溶化の直接的な原因ではなかった。

興味深いことに、NAD<sup>+</sup>を前処置すると MeHg による SDH の不溶化は顕著に抑制された。SDH は NAD<sup>+</sup>を補酵素として要求し、本結合ドメインが S-水銀化を受ける Cys44 の近傍に存在する。したがって、細胞および個体レベルにおいて、MeHg 曝露時に SDH 活性が変動しない理由のひとつとして、mM オーダーで存在する NAD が MeHg による親電子攻撃から SDH を保護している可能性が示唆された。

## 審査の結果の要旨

#### (批評)

本研究は、MeHg 曝露によって体内に水銀が蓄積する機序としてタンパク質の S-水銀化に着目し、S-水銀化タンパクとして SDH(補酵素として NAD を要求する)の同定と修飾部位の特定に成功している。S-水銀化された SDH は活性低下を示すが、MeHg を曝露した細胞では SDH 活性の低下は認められない。この理由として生体内では NAD が SDH の S-水銀化を抑制している可能性がある。MeHg 曝露による酵素活性の変動に NAD を要求するか否かが関係していることを指摘した点は水銀毒性を考える上で有用であり、学術的な価値が高いと判断される。

平成 26 年 12 月 18 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文について説明を求め、関連事項について質疑応答を行い、最終試験を行った。その結果、審査委員全員が合格と判定した。

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