

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

2014

筑波大学大学院博士課程人間総合科学研究科

神田 洋紀

略号および用語の定義

- 1,2-NQ : 1,2-ナフトキノン (1,2-naphthoquinone)
- 2-ME : 2-メルカプトエタノール (2-mercaptoethanol)
- API : *Achromobacter* プロテアーゼ I (*Achromobacter* protease I)
- ASCT2 : ASC アミノ酸輸送体 2 (ASC amino acid transporter 2)
- BEST : (全米研究評議会の) 環境研究・毒性学委員会 (Board on Environmental Studies and Toxicology)
- BPB : ブロモフェノール・ブルー (bromophenol blue)
- BPM : ビオチン-PEAC₅-マレイミド (biotin-PEAC₅-maleimide)
- Ca²⁺ : カルシウムイオン (calcium ion)
- CBB : クマシーブリリアントブルー (Coomassie brilliant blue)
- CHAPS : 3-[(3-cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonate
- Chemi-Lumi One : 増強化学発光試薬
- Cu,Zn-SOD : 銅・亜鉛スーパーオキシドジスムターゼ (copper-zinc superoxide dismutase)
- Cys : システイン残基 (cysteine)
- DEME : ダルベッコ変法イーグル培地 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)
- EAAT-1 : 興奮性アミノ酸輸送体 1 (excitatory amino acid transporter-1)
- EAAT-2 : 興奮性アミノ酸輸送体 2 (excitatory amino acid transporter-2)
- FAD⁺ : フラビンアデニンジヌクレオチド (酸化型) (flavin adenine dinucleotide)
- GAPDH : グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)
- GCL : グルタミン酸システインリガーゼ (glutamate-cystein ligase)
- GFAT : L-グルタミン : D-フルクトース 6 リン酸アミドトランスフェラーゼ (glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase)
- GLAST : グルタミン酸・アスパラギン酸輸送体 (Glu/Asp transporter)
- GLT-1 : グルタミン酸輸送体 1 (Glu transporter-1)
- Gly : グリシン (glycine)
- GPx : グルタチオンペルオキシダーゼ (glutathione peroxidase)
- GSH : グルタチオン
- GSSH : グルタチオンパースルフィド
- GSSSG : グルタチオンポリスルフィドの代表例
- HCl : 塩化水素
- HRP : horseradish peroxidase
- HS⁻ : 硫化水素イオン (hydrogen sulfide ion)
- Keap1 : Kelch-like ECH-associated protein 1

KCl : 塩化カリウム

MALDI-TOF/MS : マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析計
(matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry)

MeHg : メチル水銀

(MeHg)₂S : ビスマチル水銀スルフィド

MeHg-SG (付加体) : MeHg-GSH 複合体

Mn²⁺ : マンガンイオン (manganese ion)

MnCl₂ : 塩化マンガン (manganese chloride)

Mn-SOD : マンガンスーパーオキシドジスムターゼ (manganese superoxide dismutase)

MRP : 多剤耐性関連タンパク質 (multidrug resistance-associated protein)

MT : メタロチオネイン (metallothionein)

NaCl : 塩化ナトリウム

NaOH : 水酸化ナトリウム

NAD : ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (nicotinamide adenine dinucleotide)

NAD⁺ : ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (酸化型)

NADH : ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (還元型)

NADP⁺ : ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸 (酸化型) (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate)

NEM : *N*-エチルマレイミド (*N*-ethylmaleimide)

NRC : 全米研究評議会 (United States National Research Council)

nNOS : 神経型一酸化窒素合成酵素 (neuronal nitric oxide synthase)

Nrf2 : NF-E2-related factor 2

PVDF : ポリビニリデンジフルオライド (polyvinylidene difluoride)

ROS : 活性酸素種 (reactive oxygen speacies)

SD : 標準偏差 (standard deviation)

SDH : ソルビトールデヒドロゲナーゼ (sorbitol dehydrogenase)

SDS-PAGE : ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)

SEM : 平均値の標準誤差 (standard error of the mean)

SOD : スーパーオキシドジスムターゼ (superoxide dismutase)

S⁻ : チオレートイオン

TBQ : *tert*-ブチルベンゾキノン (*tert*-butyl-1,4-Benzoquinone)

TrxR : チオレドキシソレダクターゼ (thioredoxin reductase)

Zn : 亜鉛 (zinc)

Zn²⁺ : 亜鉛イオン (zinc ion)

ZnCl₂ : 塩化亜鉛 (zinc chloride)

目次

1. 研究の背景	1
1.1 はじめに.....	1
1.2 MeHg による主要な毒性発現メカニズム.....	3
1.3 MeHg による細胞内機能および構造変化とタンパク質の S-水銀化.....	5
1.4 MeHg 毒性発現にかかわる分子機構を解明するための試み.....	11
1.5 MeHg による肝型アルギナーゼ活性と肝臓中マンガンの低下.....	13
2. 目的	17
3. 材料と方法	19
3.1 材料.....	19
3.2 ラット肝酵素溶液の調製.....	19
3.3 S-水銀化を通じて MeHg により不溶化するタンパク質を同定するためのスクリーニング法.....	20
3.4 二次元電気泳動.....	20
3.5 ペプチドマスマッピングによる 42 kDa タンパク質の同定.....	21
3.6 SDH のタンパク質発現と特定部位の変異導入.....	21
3.7 SDH の精製.....	21
3.8 SDH の活性.....	22
3.9 Zn の測定.....	22
3.10 BPM 標識アッセイ.....	22
3.11 MALDI-TOF/MS.....	22
3.12 細胞および細胞培養.....	23
3.13 統計処理.....	23
4. 結果	24
4.1 MeHg により S-水銀化を介して不溶化するタンパク質のスクリーニングおよび同定.....	24
4.2 MeHg による SDH の機能低下.....	24
4.3 SDH の S-水銀化.....	24
4.4 MeHg によって生じる SDH の不溶化に対する変異体の効果.....	25
4.5 MeHg によって生じる SDH の不溶化に対する補酵素の抑制効果.....	25
4.6 MeHg による細胞中 SDH 活性への効果.....	26

5. 考察.....	37
6. 結論.....	39
7. 総合考察.....	40
謝辞.....	45
引用文献.....	46

1. 研究の背景

1.1. はじめに

環境中親電子物質のひとつであるメチル水銀 (MeHg) による体内汚染は、私たち現代人に今現在も静かにそして確実に忍び寄っている。蛍光灯、医歯科用品、電池、温度計のような身近な生活用品だけでなく、火山活動、石炭火力発電 (日本には 60 か所の発電所)、ゴミ焼却などから日常的に水銀にさらされている。Palmer らは、石炭火力発電所から排出された水銀が健康に及ぼす影響を発達障害に関するデータとともに指摘した (Palmer *et al.*, 2006)。2010 年の時点で、水銀は、世界で汚染者を被っている人数の多い化学物質の 2 番目に位置付けられている (Blacksmith Institute, 2010) (ちなみに 1 番は鉛)。同年、人間活動に由来し、大気中に放出される水銀量は、地球規模で年間約 2000 トンと見積もられた (United Nations Environment Programme, 2013)。更にこの倍量が、過去に環境に放出された水銀が土壌や海洋に沈降したのち、再び大気中に放出されている。海水に含まれる水銀は、微生物の働きで MeHg に変換される。MeHg は生物濃縮を受けやすく、大型食用魚類に高濃度に蓄積する。一般に、魚肉中の水銀の化学形態は、ほとんどが MeHg である (農林水産省, 2012)。ヒトはこれを食することで MeHg を体内に摂取することから、MeHg の毒性の主体である中枢神経系障害をはじめとする健康への影響が心配される (Chang, 1990; Shimai and Satoh, 1985)。MeHg は、生物学的半減期が約 70 日と長いため、体内に残留する。日本人は、水銀の 8~9 割を魚介類から摂取していると考えられ、厚生労働科学研究報告によれば、1 日水銀摂取量は 8.4 μg と報告されている (厚生労働省, 2003)。内閣府食品安全委員会は、2005 年にハイリスクグループを胎児 (対象集団は妊娠している方または妊娠している可能性のある方) とした耐容週間摂取量 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (体重 50 kg で 14.3 $\mu\text{g}/\text{日}$) を答申しており (食品安全委員会, 2005)、実際と耐容摂取量との間にそれほど大きな差があるわけではない。全米研究評議会 (NRC: United States National Research Council) にいたっては 0.7 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{週}$ を限界値としており (Committee on the Toxicological of Methylmercury, 2000)、日本人の MeHg の推定摂取量はこれを超えていると言える。水俣病は、工場排水による微量の水銀が生物濃縮され、水俣湾の生物、さらにはそれを多量に摂取したヒトにも健康上の被害を及ぼした。その発症確認からすでに半世紀以上が経過したにもかかわらず、MeHg の毒性発現にはまだまだ不明な点が多く、MeHg 毒性の正体を明らかにするためのさらなる研究が必要とされている。

ヒトのゲノム中にコードされているシステイン残基は約 214,000 個であり、酵素の活性中心や機能の制御、構造の維持などに利用され、正常な生理機能を維持する上で重要な役割を担っている (Jones, 2008)。その大半は分子内に埋没しているか、高次構造維持等のための S-S 結合、あるいは亜鉛イオン (Zn^{2+}) の配位子として利用されている。

ところが、タンパク質中システイン残基の 10~20%程度はその pKa 値が低いために、生理的条件下では解離してチオレートイオン (S⁻) となり、これらが電子密度の低い部位をもつ親電子物質の標的となる。このため、外因性の親電子物質はタンパク質の予期しない化学修飾を引き起こす可能性がある (Kumagai *et al.*, 2012)。更に、MeHg とタンパク質のシステイン残基の SH 基に対する親和力 (解離定数 pK=15.7) は、他の種々のアミノ酸リガンドに対するどれよりも大きい (Simpson, 1961) (表 1)。

表 1 MeHg イオンと種々のリガンドとの親和性

リガンド	pK
SH (システイン残基)	15.7
NH ₂ (ヒスチジン残基)	8.8
NH ₃	8.4
イミダゾール	7.3

この化学的特性により、MeHg は体内に入るとタンパク質のシステイン残基に特異的に共有結合して、タンパク質を化学修飾することから、これ以降、S-水銀化と呼ぶことにする。

一般的に、親電子性物質に対する細胞応答は二相性である (Levonen *et al.*, 2014)。すなわち、低濃度で防御性のシグナル

経路が活性化され、高濃度で細胞死が引き起こされる。高濃度曝露時に観察される非意図的な S-水銀化は、タンパク質や酵素の構造や活性を変化させ、生体内恒常性の破綻、すなわち細胞内機能および構造の変化などの細胞障害に繋

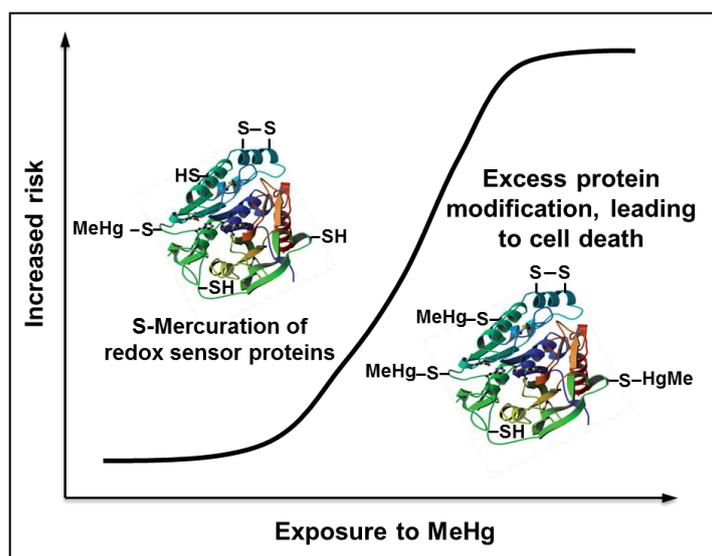


図 1 MeHg 依存的な S-水銀化によって引き起こされる非意図的な毒性発現

レドックスセンサータンパク質の S-水銀化は、細胞の生存に関連する親電子シグナル伝達経路を活性化するが、高濃度の MeHg 曝露は細胞内タンパク質の非意図的な S-水銀化ならびに細胞死を引き起こす。

がり、MeHgの毒性発現に関与すると考えられる（図1）。

MeHgの毒性学的影響を真に理解するためには、根本的な理由を見出す必要がある。しかし、上述のとおり、MeHgが細胞内タンパク質をS-水銀化することは古くからよく知られているが、その毒性学的影響を包括的に論じたものは限定的である。現在までに、MeHgによるタンパク質のS-水銀化と毒性発現との関係に関してどのようなことがわかっているのか。その手がかりの一助として、現在までに提唱されているMeHgによる主要な毒性発現メカニズムに対して、どのようなタンパク質のS-水銀化が関与している可能性があるか検討することにした（Kanda *et al.*, 2014）。

1.2. MeHgによる主要な毒性発現メカニズム

MeHgによる主要な毒性発現メカニズムを調べるために、“methylmercury”、“mechanism”および“review”の3語をキーワードとしてPubMedで論文検索した結果、2014年5月までに30報が引き出された。そのうち、MeHgによる毒性発現メカニズムの記載のある9報から、2報以上で報告されている以下の5つをMeHgによる主要な毒性発現メカニズムとして抽出した。表2に、論文内で取り上げられた要因とともに示す。

代表的なものは、①酸化ストレス、②細胞内イオン（Ca²⁺）の増加であった。他のシグナル伝達の障害では、③グルタミン酸の取り込み障害があげられた。その他、古くからよく知られている④タンパク質合成障害、⑤微小管障害があげられた。NRCの環境研究・毒性学委員会（Board on Environmental Studies and Toxicology: BEST）による教科書「Toxicological Effects of Methylmercury」（Committee on the Toxicological of Methylmercury, 2000）によれば、MeHgの毒性発現のメカニズムとして考えられるものは、ミトコンドリアの変化、脂質過酸化や酸化ストレス、微小管障害、タンパク質合成障害であり、今回抽出されたものと類似していた。論文内で取り上げられた要因では、タンパク質の障害によるものが多くみられた。

表2 抽出した MeHg 毒性発現メカニズムとその要因、ならびに S-水銀化を受ける可能性のある細胞内タンパク質

提唱されるメカニズムと特徴	取り上げられた要因	文献	S-水銀化の可能性のあるタンパク質	文献
1. 酸化ストレス [活性酸素種 (ROS) の増加、抗酸化能の低下]	<ul style="list-style-type: none"> ● グルタチオン (GSH) との反応あるいはシステイントランスポート阻害による GSH の減少・機能低下 ● 抗酸化酵素の減少・機能低下 [例: グルタチオンペルオキシダーゼ (GPx)、チオレドキシシンリダクターゼ (TrxR)] ● Ca²⁺ホメオスタシスの変化 	Fonnum and Lock, 2004; Patel and Reynolds, 2013; Shanker and Aschner, 2001	マンガンスーパーオキシドジスムターゼ (Mn-SOD)	Kumagai <i>et al.</i> , 1997; Shinyashiki <i>et al.</i> , 1996
2. 細胞内カルシウムイオン (Ca ²⁺) 濃度の増加	<ul style="list-style-type: none"> ● 細胞膜の透過性の増加 (Ca²⁺チャネルおよび Na⁺/K⁺-ATPase 阻害、ROS やリパーゼの活性化) ● 細胞内 Ca²⁺プールからの放出 (ムスカリン受容体の阻害を含む) ● タンパク質からの遊離による他の多価陽イオンの細胞内濃度の増加 [例: 亜鉛イオン (Zn²⁺)] 	Atchison and Hare, 1994; Denny and Atchison, 1996; Fonnum and Lock, 2004	Ca ²⁺ -ATPase	Freitas <i>et al.</i> , 1996
			Na ⁺ /K ⁺ -ATPase	Magour <i>et al.</i> , 1986
			ムスカリン受容体 (?) ^a	Coccini <i>et al.</i> , 2000; Limke <i>et al.</i> , 2004
			Ca ²⁺ チャネル (?) ^a	Peng <i>et al.</i> , 2002; Sirois and Atchison, 2000
3. グルタミン酸の取り込み障害	<ul style="list-style-type: none"> ● グルタミン酸トランスポーターの阻害 [興奮性アミノ酸輸送体 1 (EAAT-1) /グルタミン酸・アスパラギン酸輸送体 (GLAST) および興奮性アミノ酸輸送体 2 (EAAT-2) /グルタミン酸輸送体 1 (GLT-1)] 	Aschner, 2000; Aschner <i>et al.</i> , 2000; Fonnum and Lock, 2004	EAAT-1 (GLAST) (?) ^a	Aschner <i>et al.</i> , 2000
			EAAT-2 (GLT-1) (?) ^a	Aschner <i>et al.</i> , 2000
			ASC アミノ酸輸送体 2 (ASCT2) (?) ^a	Oppedisano <i>et al.</i> , 2010
4. タンパク質合成阻害	<ul style="list-style-type: none"> ● タンパク質合成機構への直接作用 (アミノアシル tRNA 合成酵素 (aaRS) の阻害を含む) 	Atchison and Hare, 1994; Clarkson, 1987; Miura and Imura, 1987	aaRS (?) ^a	Cheung and Verity, 1985
5. 微小管障害	<ul style="list-style-type: none"> ● チューブリンの SH 基との反応 	Clarkson, 1987; Miura and Imura, 1987	チューブリン	Vogel <i>et al.</i> , 1985; 1989

^a 暫定案

1.3. MeHg による細胞内機能および構造変化とタンパク質の S-水銀化

我々は、これらの細胞内機能および構造の変化とタンパク質の S-水銀化とがどのように関係していることが想定されるのかを、抽出に用いた論文に記載のない文献も踏まえて調査することにした。また、S-水銀化を受ける可能性のある細胞内タンパク質を表 2 にまとめるとともに、図 2 に概略図として示した。

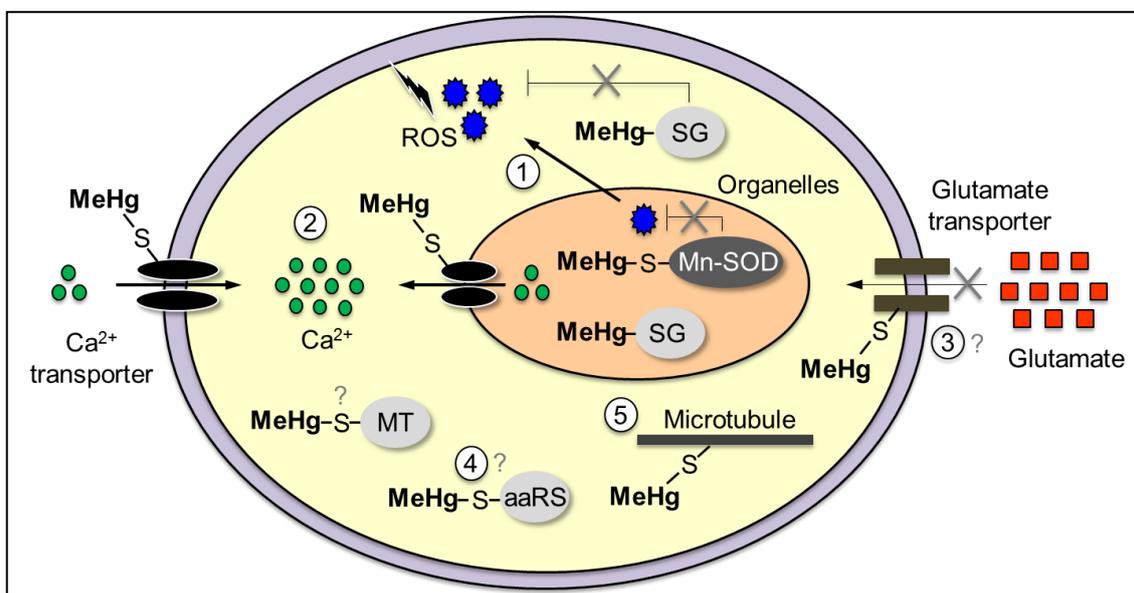


図 2 MeHg によって引き起こされる毒性に関連する可能性のある細胞内の S-水銀化タンパク質

MeHg は、①酸化ストレス、②細胞内 Ca²⁺濃度の変化、③グルタミン酸の取り込み阻害、④タンパク質合成の阻害、および⑤微小管の障害を引き起こす。これらの事象は、少なくとも一部は、①ミトコンドリア内のマンガンスーパーオキシドジスムターゼ (Mn-SOD)、②細胞膜および小胞体やミトコンドリアなどの細胞内小器官膜内の Ca²⁺トランスポーター (Ca²⁺-ATPase や Na⁺/K⁺-ATPase など)、③グルタミン酸トランスポーター、④アミノアシル tRNA 合成酵素 (aaRS)、および⑤チューブリンの S-水銀化によるものかもしれない。MeHg-SG は、MeHg と GSH の複合体を示している。MT はメタロチオネインの略である。

① 酸化ストレスと S-水銀化

酸化ストレスとは、体内の通常の酸化還元状態、つまり活性酸素 (種) と抗酸化システム (抗酸化物質および抗酸化酵素) のバランスが乱れた状態である。MeHg 曝露により、活性酸素種および過酸化脂質が形成することが明らかになっている (Ali *et al.*, 1992; Dreiem and Seegal, 2007; Garg and Chang, 2006; LeBel *et al.*, 1990; 1992; Lee *et al.*, 2009; Mori *et al.*, 2007; Yin *et al.*, 2007; Yonaha *et al.*, 1983)。通常、スーパーオキシドジスムターゼ (SOD)、カタラーゼ、グルタチオンペルオキシダーゼ (GPx) などの抗酸化酵素

は、活性酸素による損傷から細胞を防御するのに重要な役割を果たしている。特に脳は、脂質のような酸化基質を多く含み酸化代謝率が高いため、酸化的障害の影響を非常に受けやすく (Halliwell, 1992)、更に SOD および GPx の活性は他の臓器より低いことが報告されている (Mori *et al.*, 2007)。MeHg 曝露によってこれらの抗酸化酵素はどのような影響を受けているか、以下にまとめる。

Yee と Choi (1994) は、マウスに MeHg (2.5 mg/kg/day) を 7 日間曝露した結果、脳で SOD 活性が著しく低下することを報告した。真核細胞は、銅・亜鉛 SOD (Cu,Zn-SOD) とマンガン SOD (Mn-SOD)、2 種類の SOD を有しているが、本報告ではどちらのアイソザイムが活性低下に関与していたかは言及されていなかった。その後、我々の研究で、MeHg によって阻害される SOD は Mn-SOD であることを明らかにした (Shinyashiki *et al.*, 1996)。すなわち、MeHg (10 mg/kg) をマウスに単回投与したところ、Cu,Zn-SOD 活性への影響はなかったが、脳内 Mn-SOD 活性の経時的な低下が認められた。Mn-SOD はミトコンドリアに局在する。ミトコンドリアは細胞の酸素の 90% 以上を消費し、活性酸素種を産生する。永沼ら (1998) は、Mn-SOD を過剰発現することで MeHg に対する HeLa 細胞の感受性が減少することを報告した。このことは、MeHg 毒性に対する防御に Mn-SOD が重要であることを示しており、更にミトコンドリア中のスーパーオキシドの形成が MeHg の細胞毒性のメカニズムに関与している可能性を示唆している。次に我々は、MeHg によって阻害される Mn-SOD のメカニズムを調べることにした (Kumagai *et al.*, 1997; Shinyashiki *et al.*, 1996)。その結果、MeHg は Mn-SOD の mRNA あるいはタンパク質の量を減少させなかった。一方、精製酵素標品を使用して、MeHg による直接的な修飾の可能性を調べたところ、Cu,Zn-SOD 活性は低下しなかったが、Mn-SOD 活性は容易に低下した。等電点電気泳動とシンクロトロン放射光 X 線分析の組み合わせ (IFE-AGE/SR-XRF 分析) により、MeHg は Cu,Zn-SOD ではなく Mn-SOD を修飾することが明らかとなった。ヒト Mn-SOD では、システイン残基 (Cys) 140 と Cys196 の SH 基がサブユニット表面に露呈しているが、thiol-Sepharose カラムクロマトグラフィーにより、反応性のあるスルフィドリル基は Cys140 ではなく Cys196 であることが報告されている (Matsuda *et al.*, 1990)。このことから、MeHg による酸化ストレスには Mn-SOD の Cys196 を介した S-水銀化で生じる本酵素活性低下が少なからず関与している可能性が高い。

SOD に関する研究に加えて、多くの研究者は、MeHg (飲用水中に 40 mg/l の濃度で数週間) をマウスに曝露することで脳内の GPx 活性が低下することを明らかにしてきた (Carvalho *et al.*, 2007; Farina *et al.*, 2003b; Franco *et al.*, 2009; Glaser *et al.*, 2010)。また、Stringari ら (2008) は、MeHg (妊娠期間中、飲用水中に 1, 3, 10 mg/l の濃度) を妊娠マウスに曝露した結果、子の脳内 GPx 活性の発達に用量依存的かつ持続的な阻害効果がみられることを報告した。一方、*in vitro* でも MeHg による GPx の活性低下の報告は多数みられる (Farina *et al.*, 2009; Hirota *et al.*, 1980; Kromidas *et al.*, 1990)。更に、Farina ら (2009)

は、最も豊富なアイソザイムであるGPx1を過剰発現することで、MeHgによる神経細胞死を抑制することを報告し、GPx1がMeHgによる神経細胞死に関与する重要な分子標的であることを示した。彼らは、GPxがどのように阻害されるのか明らかにしていないが、チオール基よりもpKaが低い、本酵素中のセレノール基の関与が推測されている。しかし、チオール基はセレノール基よりはるかに豊富に存在している (Farina *et al.*, 2011)。セレノール基はセレノプロテインのみで見られるが、チオール基は低分子量のもの [主にグルタチオン (GSH)] から高分子量のタンパク質に至るまでみられる (Araie and Shiraiwa, 2009; Lobanov *et al.*, 2009)。それ故に、MeHgのヒトへの曝露で一番の根源となる食用魚類の筋肉では、MeHgは主にチオール基を含むタンパク質とともに存在し、セレノール基を含むタンパク質とはかなり少ない割合で存在していると考えられている (Farina *et al.*, 2011)。実際、他の抗酸化セレノプロテインであるチオレドキシシンレダクターゼ (TrxR) の活性がMeHgにより低下することが*in vivo*および*in vitro*で示され (Branco *et al.*, 2011; Carvalho *et al.*, 2011; Wagner *et al.*, 2010)、497番目のシステイン残基および498番目のセレノシステイン残基のセレノール基に影響を及ぼしている可能性があると考えられたが (Carvalho *et al.*, 2011)、亜セレン酸塩ではMeHgによるTrxRの活性低下を抑制することができていない。

様々な細胞に比較的高濃度 (>1 mM) に存在するGSHは、MeHgと結合し、MeHg-GSH複合体 (MeHg-SG) を形成して、細胞内のタンパク質のS-水銀化を抑制していることには疑いの余地がない (図3)。MeHgに対する細胞応答としては、転写因子NF-E2-related factor 2 (Nrf2) の負の調節因子であるKelch-like ECH-associated protein 1 (Keap 1) のS-水銀化により、Nrf2が活性化し、MeHg-SGの形成およびトランスporterである多剤耐性関連タンパク質 (MRP) を介した細胞外への解毒排泄を促進する (Kumagai *et al.*, 2013)。更に近年、“チオールバイオロジー”に大きな研究の進展があったことは大変興味深い。我々は、硫化水素イオン (HS⁻)、パーサルファイドおよびポリサルファイドのような活性イオン分子は、酸化還元シグナルの伝達や親電子物質の除去

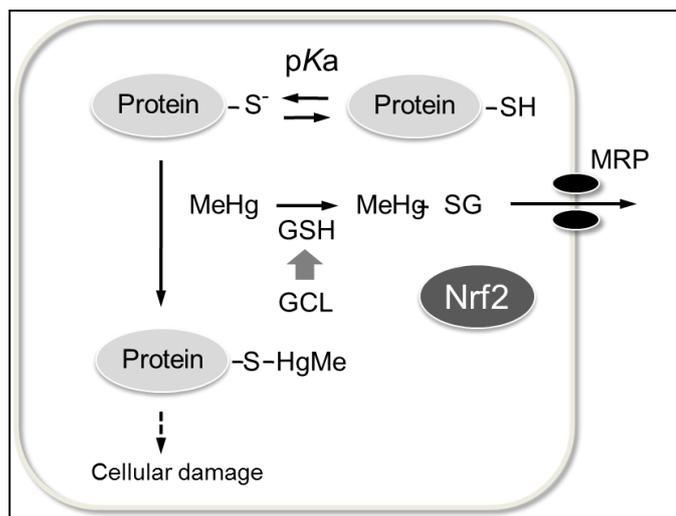


図3 MeHgによる細胞内タンパク質のS-水銀化とMeHgの解毒排泄経路

GCL: γ-グルタミルシステイン合成酵素

により、重要な制御機能を担っていることを報告した (Ida *et al.*, 2014; Nishida *et al.*, 2012)。実際、外因性の活性イオウ分子のモデルとしての HS^- (Yoshida *et al.*, 2011)、グルタチオンパーサルフイド (GSSH) およびグルタチオンポリスルフイド (代表例としてGSSSG) (E. Yoshida, 未公表) は、MeHgと反応することで、MeHgに比し細胞毒性がかなり弱くかつS-水銀化を殆ど生じないビスメチル水銀スルフイド ($(\text{MeHg})_2\text{S}$) を形成した。

メタロチオネイン (MT) も細胞防御の役割を果たすタンパク質として知られている。MTは、多くのチオール基を有しており (Oliveira *et al.*, 1998)、MeHgと非常に親和性が高いので、MeHg-MT複合体の形成がMeHgを比較的毒性が低い状態に保ち、MeHgの細胞毒性作用から細胞を防御している可能性がある (Aschner *et al.*, 1997)。GSHおよび/あるいはMTの濃度の低下は、MeHgの細胞への感受性をより高める可能性があり (Hirooka *et al.*, 2010)、細胞内シグナル伝達経路の破綻が細胞死を含む有害な事象を引き起こすものと考えられる。

② 細胞内 Ca^{2+} の増加と S-水銀化

Ca^{2+} は細胞の生死のあらゆる側面に影響を及ぼすシグナル伝達で重要な役割を果たしている (Clapham *et al.*, 2007)。通常、細胞質内の Ca^{2+} は細胞外あるいは小胞体のような細胞内の小器官に積極的に送り出すことで、細胞質内では極めて低い濃度 (細胞外の1万分の1) で維持されている。また、一部の Ca^{2+} はタンパク質と結合した状態で細胞質中に存在しており、先述の Ca^{2+} -カルモジュリンのような Ca^{2+} と結合するタンパク質の存在も細胞質中の Ca^{2+} 濃度を下げる方向に働いている。細胞の内外でこのような極端な濃度の差をもつ物質は少ないが、 Ca^{2+} はこの濃度差を利用してアポトーシスの引き金として機能している。 Ca^{2+} を二次メッセンジャーとして利用するシグナル伝達経路にシグナルが伝わってくると、細胞膜や細胞内小器官にある Ca^{2+} チャンネルがシグナルを受けて開くことによって、細胞質内の Ca^{2+} 濃度が上昇する。

MeHgによる細胞内の Ca^{2+} 濃度の増加は広く知られており、細胞外からの流入、小胞体やミトコンドリアなど細胞内小器官からの放出によるものとされている (Dreiem and Seegal, 2007; Hare *et al.*, 1993; Limke, *et al.*, 2002; 2003; Minnema *et al.*, 1989; Sarafian, 1993; Tan *et al.*, 1993)。 Ca^{2+} 動態の破綻は、最終的に細胞死を引き起こす。細胞内の Ca^{2+} 濃度の増加が起こる原因は、いずれも膜の透過性の変化によると信じられている。細胞膜および小器官を構成する生体膜は、脂質成分に加えてタンパク質で構成されているため、MeHgによるS-水銀化が Ca^{2+} などの輸送に関わるタンパク質の機能に影響を及ぼし、膜の透過性や細胞機能を変化させていることが十分に考えられる (Jacob and Jandl, 1962)。上述のとおり、1万倍の濃度差の中で Ca^{2+} を運搬する必要があり、それをカルシウムポンプである Ca^{2+} -ATPaseが担っている。Chiuら (1983) と Freitasら (1996) は、MeHgが Ca^{2+} -ATPaseのような Ca^{2+} ポンプをおそらくS-水銀化を介して阻害し、膜を通じて Ca^{2+} 流

動に影響を与えていることを報告した。Na⁺/K⁺-ATPaseは、Na⁺勾配をコントロールすることによって細胞内Ca²⁺濃度を制御している。Magour (1986) は、MeHgが脳シナプトソームのNa⁺/K⁺-ATPaseをおそらくS-水銀化を介して阻害することを見出した。ラットにMeHgを曝露すると大脳皮質中のNa⁺/K⁺-ATPase活性が阻害されることもわかった (Chuu *et al.*, 2001)。このように、MeHgが細胞内Ca²⁺のメッセンジャー機能に携わる輸送タンパク質をS-水銀化することでシグナル伝達活性を阻害している可能性が考えられる。興味深いことに、Bersteinら (1988)による研究により、ムスカリン受容体分子中のチオール基の酸化還元状態がリガンドの親和性に重要であることが示唆されている。その後、MeHgがムスカリン受容体を阻害し (Coccini *et al.*, 2000)、MeHgのムスカリン受容体との相互作用が小胞体からCa²⁺を放出させることがわかった (Limke *et al.*, 2004)。Sirois およびAtchison (2000) とPengら (2002) は、メカニズムは不明であるが、MeHgがCa²⁺チャネルの機能に影響を与えることを示した。Ca²⁺チャネルブロッカーがMeHgを投与したラットでみられる神経障害と体重減少を抑制したとの報告もあり興味深い (Sakamoto *et al.*, 1996)。小胞体中のCa²⁺のホメオスタシスのかく乱はよく知られている (Mekahli *et al.*, 2011)。これと一致して、MeHgは、小胞体ストレスのマーカーである、ラット脳皮質中 glucose-regulated protein 78の発現を誘導することが報告されている (Zhang *et al.*, 2013)。

MeHgの毒性との関連性は不明であるが、MeHgが曝露された細胞で細胞内Ca²⁺濃度の増加がみられた後、細胞内Zn²⁺の緩やかな増加が認められる (Atchison and Hare, 1994; Denny and Atchison, 1996)。通常の状態では、細胞中で遊離したZn²⁺の濃度は低く、ほとんどのZn²⁺は細胞内タンパク質と結合しているため (Cuajungco and Lees, 1997)、Zn²⁺を含むタンパク質がMeHgによりS-水銀化を受けることでZn²⁺が遊離した可能性がある。一例として、Zn²⁺含有金属酵素であるソルビトールデヒドロゲナーゼ (SDH) に対するS-水銀化およびそれに伴うZn²⁺の遊離を後述する。

このように、細胞内Ca²⁺の増加には、タンパク質へのMeHgのS-水銀化が関与している可能性があり、MeHgの毒性発現として重要な要因であることが考えられた。

③ グルタミン酸の取り込み障害

MeHgがグルタミン酸のホメオスタシスを変化させることは広く知られている (Farina *et al.*, 2003a; 2003b; Manfroi *et al.*, 2004; Yin *et al.*, 2007)。グルタミン酸は、重要な興奮性の神経伝達物質であるが、過剰に存在すると神経毒となる。MeHgは星状細胞の興奮性アミノ酸輸送体1 (excitatory amino acid transporter-1: EAAT-1) [ラットではグルタミン酸・アスパラギン酸輸送体 (Glu/Asp transporter: GLAST)] および興奮性アミノ酸輸送体2 (excitatory amino acid transporter-2: EAAT-2) [ラットではグルタミン酸輸送体1 (Glu transporter-1: GLT-1)] を阻害し、グルタミン酸の取り込みを減少させることが明らかとなっている (Aschner *et al.*, 2000)。これにより、細胞外のグルタミン酸の濃

度は上昇し、ニューロンへの興奮毒性を誘導する。

膜タンパク質中のスルフィドリル基は、膜機能を果たす上で重要な役割を担っていることが知られている (Aizenman *et al.*, 1989; Braestrup and Andersen, 1987; Kiskin *et al.*, 1986; Laube *et al.*, 1993; Ruppertsberg *et al.*, 1991; Sidhu *et al.*, 1986)。グルタミン酸の取り込みに対する MeHg の阻害メカニズムは明らかになっていないが、Trotti ら (1997a; 1997b; 1998) は、チオール酸化剤である 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic) acid およびチオール還元剤であるジチオスレイトールによるグルタミン酸トランスポーター (GLAST および GLT1 を含む) 中のシステイン残基の酸化還元相互変換がグルタミン酸の取り込み率を変化させることを見出した。また、ASC アミノ酸輸送体 2 (ASC amino acid transporter 2: ASCT2) は、MeHg の S-水銀化により阻害されることが示されている (Oppedisano *et al.*, 2010)。このように、グルタミン酸トランスポーターへの S-水銀化がグルタミン酸の取り込み障害を引き起こしている可能性が少なからず考えられた。

なお、MeHg はその他の神経伝達物質であるドーパミンやアセチルコリンの細胞外濃度も増加させることが知られており (Faro *et al.*, 2000, 2002; Minnema *et al.*, 1989)、膜タンパク質の S-水銀化が影響している可能性がある (Faro *et al.*, 2005; Fonfría *et al.*, 2001)。

④ タンパク質合成阻害

MeHg 曝露により、神経症状がみられる前にタンパク質の合成が阻害されることが古くから知られている (Cavanagh and Chen, 1971; Yoshino *et al.*, 1966)。アミノアシル tRNA 合成酵素 (aaRSs) の活性が阻害されることが影響しているものと考えられている (Cheung and Verity, 1985)。aaRS は、細胞内でのタンパク質合成の過程で、特定のアミノ酸を対応する tRNA に結合させ、合成の正確性を保証する不可欠の酵素である。aaRS の活性の阻害様式は明らかになっていないが、その活性発現に、スルフィドリル基が重要であるため (Murayama *et al.*, 1975)、MeHg による aaRSs の S-水銀化がタンパク質の合成阻害に関与している可能性が少なからず考えられた。

⑤ 微小管障害と S-水銀化

微小管は、細胞骨格に必須な要素であり、細胞分裂時だけでなく、細胞の運動や形態の維持に重要な役割を果たしている。MeHg をラットに投与した後、神経系の微小管の障害がみられた (Kinoshita *et al.*, 1999)。MeHg は、脳中の神経細胞の異常な移動を引き起こすことも知られている (Choi *et al.*, 1978)。微小管障害による G2/M 期の停止は MeHg がアポトーシスを引き起こす上で重要な因子かもしれない (Miura K *et al.*, 1999)。MeHg は微小管重合の強力な阻害剤であり、このことが MeHg の微小管への S-水銀化を介するものである可能性が古くから示されている (Abe *et al.*, 1975, Sager *et al.*, 1983; Vogel *et al.*, 1985; 1989)。微小管は主にチューブリンと呼ばれるタンパク質からなる。Vogel ら (1989) は、チューブリン中に MeHg が高い親和性を示す結合部位があること、そしてその結合

が化学量論に基づいていることを見出した。チューブリンは低い pKa のチオール基を有していることも報告されている (Britto *et al.*, 2002)。

このように、現在までに提唱されてきている MeHg による主要な毒性発現メカニズムには、Mn-SOD への S-水銀化による酸化ストレス、各種トランスポーターへの S-水銀化によるシグナル伝達障害、あるいはチューブリンへの S-水銀化による微小管障害などのタンパク質の S-水銀化が、一部あるいは複合的に関与していることがわかった。しかし、これらの因果関係は依然として混沌としていると言わざるを得ない。

1.4. MeHg 毒性発現にかかわる分子機構を解明するための試み

MeHg の毒性発現機構の解明を目指し、本金属により変動する生体内因子が検索された (Hwang *et al.*, 2011a; 2013a; Hwang and Naganuma, 2006; Kim *et al.*, 2012; 2013; Lee *et al.*, 2012; Takahashi *et al.*, 2013; Toyama *et al.*, 2011)。更に、永沼らの研究のグループは、酵母や培養細胞を用いて、MeHg に抵抗性あるいは感受性を示すタンパク質を数多く報告してきている (Hwang *et al.*, 2007; 2009; 2010a; 2010b; 2010c; 2011b; 2012a; 2012b, 2013b)。例えば、MeHg に対する感受性を左右する酵母遺伝子としてグルタミンとフルクトース 6 リン酸からグルコサミン 6 リン酸を生成する反応を触媒する必須の酵素である L-グルタミン : D-フルクトース 6 リン酸アミドトランスフェラーゼ (GFAT) を同定し、GFAT が MeHg の標的分子であることを見出した (Miura *et al.*, 1999; Naganuma *et al.*, 2000)。GFAT に対する MeHg の阻害効果と他の SH 酵素のものとを比較すると、他の SH 酵素が殆ど影響を受けない濃度の MeHg によってほぼ完全に阻害されたことから、MeHg は GFAT に対して高い親和性を有し、特異的にその活性を阻害するものと考えられた。MeHg は細胞内の生理活性物質を不特定に阻害することによって細胞毒性を発揮するとの考え方もあるが、永沼グループの知見は、酵母中に特定の標的分子が存在することを示した。

我々は、以前の研究で、Mn-SOD (Shinyashiki *et al.*, 1996)、神経型一酸化窒素合成酵素 (nNOS) (Shinyashiki *et al.*, 1998) および Keap1 (Toyama *et al.*, 2007) が MeHg の分子標的であることを明らかにしてきた (図 4)。例えば、Keap1 の Cys151、Cys368 および Cys489 が S-水銀化されていることを見出している (図 5)。前述のとおり、MeHg による Mn-SOD の Cys196 を介した共有結合修飾は、*in vivo* における酵素活性の低下を引き起こしており、MeHg が誘発する酸化ストレスと関連性があるかもしれない。このように、酵素の S-水銀化は機能の破綻を引き起こすことから、MeHg の主要な分子標的を同定し特性を評価することは、毒性の分子メカニズムの理解を深める上で、重要なステップとなると考えられた。

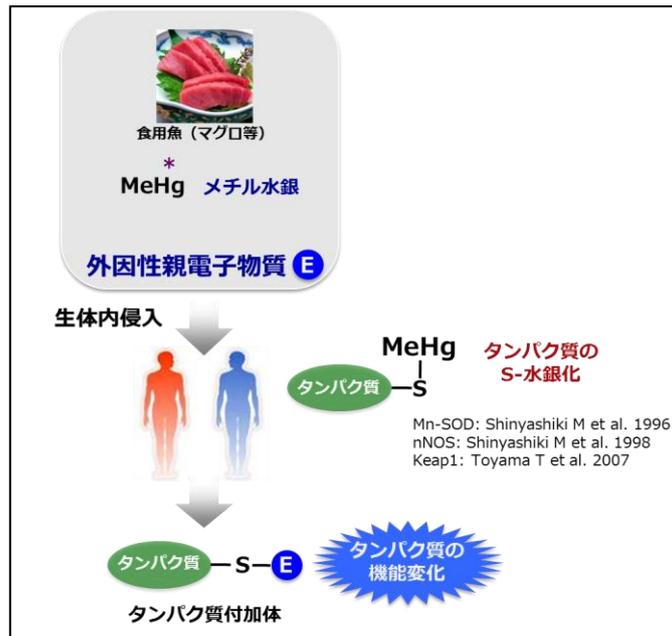


図 4 MeHg の分子標的

Cysteine residues modified	Keap1										
	NTR	BTB	IVR				DC domain				
	23	151	226	257	273	288	297	319	368	489	613
MeHg		*							*	*	
Dexamethasone 21-mesylate				*	*	*	*				*
Biotinylated iodoacetamide		*		*	*	*	*	*			*
1,2-NQ		*		*	*	*					*
TBQ	*	*	*						*		

図 5 親電子物質による Keap1 システイン残基の共有結合修飾

1,2-NQ : 1,2-ナフトキノン (1,2-naphthoquinone)

TBQ : tert-ブチルベンゾキノン (tert-butyl-1,4-Benzoquinone)

1.5. MeHg による肝型アルギナーゼ活性と肝臓中マンガン量の低下

多くのタンパク質は溶解した状態が本来の姿であるが、一般に立体構造が崩れた変性状態では不溶化する。これは、本来の立体構造ではタンパク質の分子内に埋もれて水と接していなかった疎水性（非極性）のアミノ酸（側鎖）が変性に伴い露出することで、変性タンパク質の分子間の疎水相互作用が強まり不溶化の凝集塊になるためであると考えられる。特に、SH 基は極性基であるため、タンパク質の S-水銀化は、タンパク質の構造変化だけでなく、不溶化をもたらすことが考えられる（図 6）。実際、いくつかの報告では、水銀は主に不溶性の画分で見出されることが知られているが（Bebianno *et al.*, 2007; Das *et al.*, 2006; Decataldo *et al.*, 2004）、MeHg の標的となる不溶化分子は把握されていない。興味深いことに、他の病態では、アルツハイマー病でのアミロイドベータペプチドとタウタンパク質（LaFeria *et al.*, 2008）、あるいは白内障での水晶体を構成するクリスタリンなどのタンパク質（Das *et al.*, 2011）の不溶化が報告されている。

更に、ヒトの酵素全体の 30%には金属が含まれており、活性中心として生命活動に重要な役割を果たしている（Martin *et al.*, 2014）。例えば、亜鉛（Zn）は必要不可欠な元素で、ヒトは 100 種類を超える酵素が Zn^{2+} によって活性を高めることがわかっている。従って、金属を含むタンパク質であれば、S-水銀化による金属補欠分子の活性部位からの遊離が考えられる（図 6）。

MeHg は、脳と同様、肝臓に高濃度に蓄積することが知られているため（Rodrigues *et al.*, 2010; Yasutake *et al.*, 1997）、肝臓に対する毒性の影響を調べる目的で研究を開始することにした。

アルギナーゼは、アルギニンをオルニチンと尿素に加水分解する酵素であり、ふたつのアイソザイム（肝型および非肝型）が存在する。非肝型アルギナーゼは、腎臓や肝臓以外の他の多くの臓器に発現している（Gotoh *et al.*, 1996; Miyanaka *et al.*, 1998）。一方、肝型アルギナーゼ（アルギナーゼ I）は、肝臓に局限しており、尿素サイクルにおいてアンモニア解毒の主役を演じる必須の酵素である。また、興味深いことに、アルギナーゼ I は、触媒活性の最大化および安定性に必要な二核マンガングラスタを形成しており（Hirsch-Kolb *et al.*, 1971; Kanyo *et al.*, 1996; Reczkowski and Ash, 1992; Scolnick *et al.*,

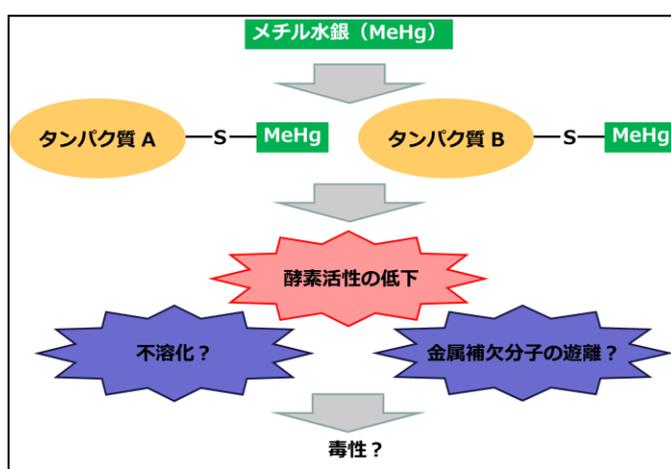


図 6 仮説

1997)、肝臓中の主要なマンガン結合タンパクとして知られている (図 7)。

我々は、無機水銀をラットに曝露することで腎臓中のアルギナーゼ活性が著しく低下することを明らかにした

(Kanda *et al.*, 2008a)。このことから、MeHg をラットに投与した結果、MeHg がアルギナーゼ I に共有結合することにより、酵素活性の変化だけでなく、肝臓中のマンガン量も変動させるのではないかと考えた。我々は、MeHg のアルギナーゼ I 活性とマンガン量への影響を MeHg 急性中毒モデルラット

(Shinyashiki *et al.*, 1996; 1998) および *in vitro* で検討した。

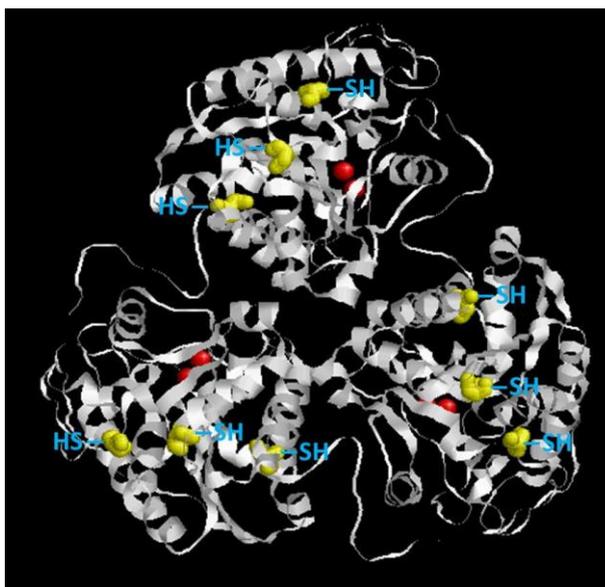


図 7 アルギナーゼ I

MeHg を 10 mg/kg/day の用量でラットに 8 日間皮下投与したところ、最初の投与から 6 日後の肝臓中の水銀濃度は約 200 μM であった。本条件下、肝臓中のアルギナーゼ I 活性およびマンガン量は対照群の約 50%に低下した (図 8) (Kanda *et al.*, 2008b)。低下したアルギナーゼ I 活性は、マンガン量の減少と有意に相関していた ($r = 0.72, P < 0.05$)。 *In vitro* では、MeHg とアルギナーゼ I を反応させると、10~200 μM の濃度の際に、濃度依存的に当該タンパク質の不溶化が観察された。同様の現象は、システイン残基のアルキル化剤である *N*-エチルマレイミド (NEM) でも観察されたことから、我々の仮説である MeHg によるアルギナーゼ I の *S*-水銀化は支持された。また、活性低下が観察され、更に個体レベルで観察されたように、10~200 μM の濃度の際にマンガンイオン (Mn^{2+}) の遊離もみられた。 Mn^{2+} は、アルギナーゼ I の活性を最大限発揮するためにとって大切であるため (Hirsch-Kolb *et al.*, 1971; Reczkowski and Ash, 1992)、*in vivo* における MeHg の投与によって引き起こされたアルギナーゼ I の活性低下は、少なくとも部分的には、アルギナーゼ I からの Mn^{2+} の遊離に起因している可能性があると考えられた。

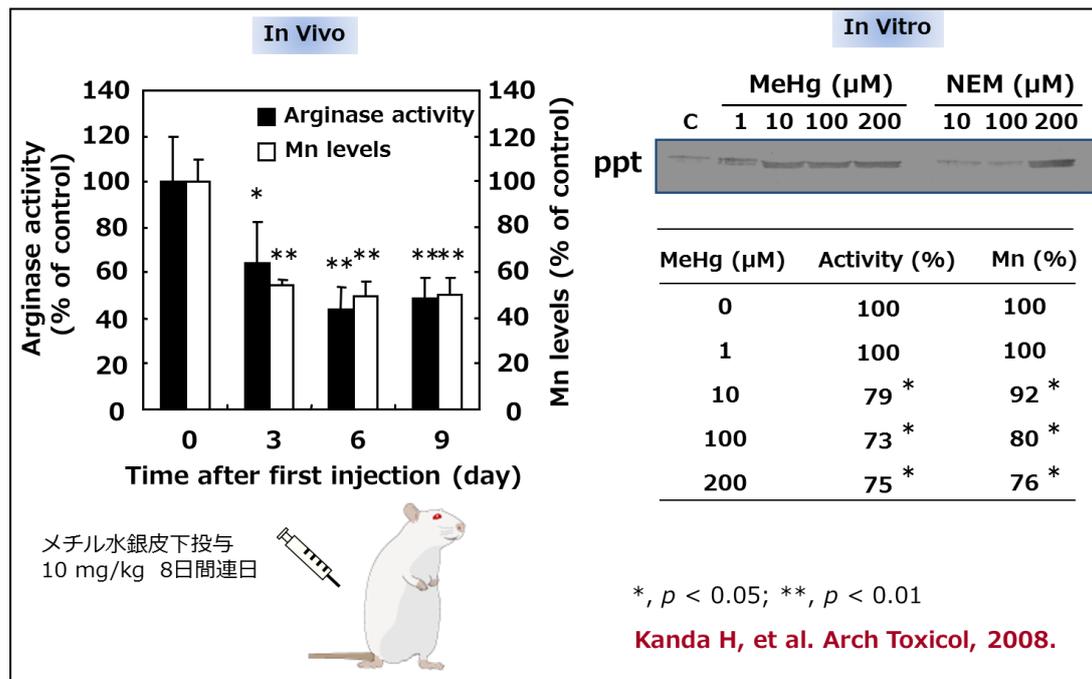


図8 MeHgとアルギナーゼIとの相互作用

前述のとおり、一連の現象は、NEMでも起こることから、S-水銀化によるものであることが示唆されたため、それを証明するために、有機水銀カラムクロマトグラフィーを用いてアルギナーゼIの溶出挙動を調べた(図9)。精製したアルギナーゼIを有機水銀が結合したAffi-Gel 501樹脂を充填したカラムに付すと、本タンパク質は結合し、0.5 MのNaCl、10 mMのヒスチジンおよび0.05%のTween 20では溶出されなかった。このことは、アルギナーゼIと有機水銀との作用が非特異的な結合、疎水的な結合あるいはイミダゾールを介した共有結合によるものではないことを示唆している。一方、アルギナーゼIは2-メルカプトエタノール(2-ME)(10 mM)により効率良く溶出されたことから、アルギナーゼIがS-水銀化を受けることが示唆された。

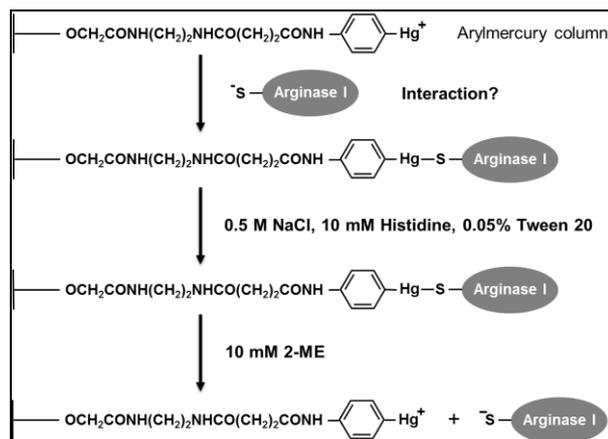


図9 アリル水銀カラムでのアルギナーゼIの溶出

精製したアルギナーゼIを有機水銀カラム(Affi-Gel 501; 2.0×1.0 cm, i.d.)に注入し、結合したタンパク質は0.5 Mの塩化ナトリウム、10 mMのヒスチジン、0.05%のTween 20、そして最終的には10 mMの2-メルカプトエタノール(2-ME)で溶出を試みた。

ラット肝臓中のアルギナーゼ I のヒスチジンおよびアスパラギン酸残基は、 Mn^{2+} のリガンドとして重要な役割を担っていることが報告されている (Kanyo *et al.*, 1996)。一方、ラット肝臓中のアルギナーゼ I は、1 ユニットに 3 つのシステイン残基 (Cys119, Cys168, Cys303) を有しており (Kawamoto *et al.*, 1987)、MeHg はこれらと反応する可能性がある。このように、MeHg のアルギナーゼ I への共有結合が活性部位からの Mn^{2+} の遊離や構造変化を引き起こしている可能性が考えられた。

このように、*in vivo* で観察された MeHg 曝露によるラット肝臓で生じるアルギナーゼ I の活性低下、不溶化およびマンガン濃度の減少には、少なくとも MeHg による本酵素の S-水銀化が一部関与することが示唆された。

2. 目的

前述のとおり、MeHgの毒性発現の本体は、タンパク質のS-水銀化である可能性が示されたが、一方でその実体解明のために必要と考えられるケミカルバイオロジー的なアプローチは少ない。その理由のひとつとしては、MeHgのS-水銀化を同定する手法が確立していなかったことがあげられる。近年まで、それを同定する手法はシステイン残基のアルキル化剤であるNEMで間接的に検出する方法や放射性標識化合物による検出などに限られていた。

従来の研究とは異なったアプローチにより新たなメカニズムの発見をもたらす可能性がある。そこで本研究では、タンパク質の不溶化に着目し、アルギナーゼI以外にもMeHgによるS-水銀化で不溶化するタンパク質が存在するのではないかと考え、アルギナーゼIの粗精製酵素液を用いて検討することにした。前述のとおり、MeHgの毒性の主体は中枢神経系障害であり、肝臓での毒性学的影響のエビデンスが多く蓄積されているわけではないが、MeHgは脳と同様、肝臓に高濃度に蓄積されることが知られている。そこで、まず肝臓を対象に新たなタンパク質のS-水銀化の検出を試みることにした。

我々は、タンパク質の生化学的特性に着目し、MeHgによってS-水銀化を介して不溶化するタンパク質を同定するスクリーニング法を確立した(図10)。すなわち、あるタンパク質のシステイン残基の全てあるいは一部がMeHgに結合することができるチオールイオンとして存在しているならば、SH基を介してMeHgと共有結合して複合体を形成する(Eq. 1)。その後、容易に不溶化するのであれば、そのようなタンパク質はその後緩やかな遠心分離の過程で沈殿を生じやすくなることが考えられる。更に、MeHgと硫黄との共有結合は多量のチオール化合物存在下では可逆性があるために、沈殿したMeHg結合タンパク質は、GSHのようなチオール化合物を過剰量添加することで、溶解することが予想された(Eq. 2)。

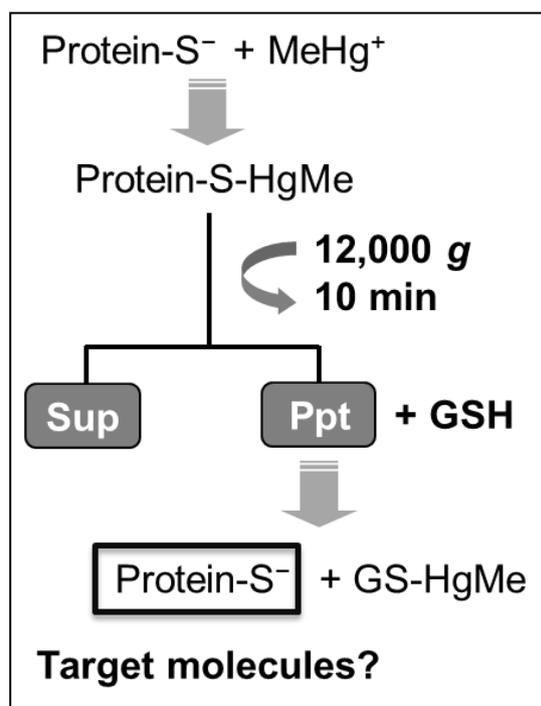
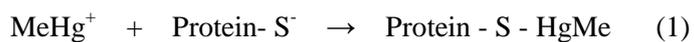


図10 MeHgによるS-水銀化を介して不溶化するタンパク質のスクリーニング法

ラット肝酵素溶液をMeHgと37°Cで1時間反応させた後、12,000×gで10分間遠心させた。沈殿を1mM GSHで溶解させた。



本法を用いて、アルギナーゼ I の粗精製酵素液中から MeHg と容易に共有結合修飾し不溶化するアルギナーゼ I 以外のタンパク質の存在を見出した。そこで本研究では、このタンパク質を二次元電気泳動によって分離し、マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析計 (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法によって同定した。加えて、新たなタンパク質の S-水銀化の検出方法として、ビオチン-PEAC₅-マレイミド (BMP) 標識アッセイ、MALDI-TOF/MS 法および大腸菌の高発現系での変異体の作成により、タンパク質の S-水銀化の部位および S-水銀化とタンパク質の不溶化との関係を調べた。

3. 材料と方法

3.1 材料

主な試薬類の入手先を以下に示す。なお、特に記載のない場合には特級試薬を用いた。

◆ ナカライテスク社

2-ME、 α -イソニトロソプロピオフェノン、塩化メチル水銀、クマシーブリリアントブルー (CBB)、グリシン、Tween20、尿素、ブロモフェノール・ブルー (BPB)、硫酸アンモニウム、Chemi-Lumi One、Sepasol-RNA I super reagent

◆ 和光純薬工業株式会社

アセトン、イミダゾール、グリセロール、コラゲナーゼ、スキムミルク、ストレプトマイシン、ペニシリン、HCl、HEPES、KCl、MnCl₂、NaCl、NEM、SDS (ドデシル硫酸ナトリウム)、Tris

◆ Sigma 社

ソルビトール、DEME/HamF12、FAD、GSH、HRP アビジン、NAD、NADP、Williams Medium E

◆ Novagen 社

pET15b ベクター、*Escherichia coli* BL21 細胞

◆ タカラバイオ社

Prim Script、Prime Script RT

◆ Stratagene 社

StrataClone Bluent PCR Cloning Kit、Quickchange Site-Directed Mutagenesis Kit

◆ Invitrogen 社

ウシ胎児血清、Ni-IDA ProBond 樹脂

◆ GE Healthcare (旧 Amersham Biosciences) 社

Immobiline DryStrip

◆ 同仁化学研究所

BPM

◆ Promega 社

MS グレード修飾トリプシン

◆ Bio-Rad 社

Econo-Pac 10DG カラム

3.2 ラット肝酵素溶液の調製

MeHg による S-水銀化を介して不溶化するタンパク質のスクリーニングでは、CM-52 カラムによって部分的に精製したラット肝酵素溶液 (以下、ラット肝酵素溶液) を使用することにした。ラット肝酵素溶液の調製は、Schimke の方法 (Schimke, 1970) を一部

改良し、アルギナーゼ I を精製する手順を採用した。すなわち、肝臓 (107.4g) に対し、3 倍容量の 10 mM Tris-HCl (pH 7.5)-50 mM MnCl₂-10 mM KCl を加え、ホモジネート液を調製した。これを 15,000 g で 15 分間遠心分離し、得られた上清に、予め-20 °C で保存しておいた 1.5 倍容量のアセトンをゆっくり滴下した。4 °C で 10 分間放置した後、15,000 g で 5 分間遠心分離した。得られた沈殿に、肝重量に対し 0.7 倍容量の 10 mM Tris-HCl (pH 7.5)-50 mM MnCl₂ を加え懸濁した後、15,000 g で 10 分間遠心分離した。得られた上清を 2,000 ml の 10 mM Tris-HCl (pH 7.5) で二回、計 4 時間透析した。60 °C で 25 分間熱処理し、その溶液を氷冷した後、15,000 g で 10 分間遠心分離した。得られた上清に、硫酸アンモニウムを 50% 飽和濃度になるように加え、室温で 30 分間攪拌した。30,000 g で 15 分間遠心分離し、得られた上清をさらに硫酸アンモニウムを 70% 飽和濃度になるように加え、室温で 30 分間攪拌した。更に、30,000 g で 15 分間遠心分離し、得られた沈殿を約 3 ml の 10 mM Tris-HCl (pH 7.0) で溶解した。同バッファーで二回、一晚透析を行った。その透析液を 10 mM Tris-HCl (pH 7.0) で平衡化した CM-52 カラム (2.5 × 10 cm, i.d.) に付した。流速 42 ml/h の条件下、10 mM Tris-HCl (pH 7.0) でカラムを洗浄後、KCl 濃度 0 から 0.5 M (各 300 ml) までの直線濃度勾配によりタンパク質を溶出させた。

3.3 S-水銀化を通じて MeHg により不溶化するタンパク質を同定するためのスクリーニング法

S-水銀化を通じて MeHg により不溶化するタンパク質を同定するために、我々は先に定めたスクリーニング (Kanda *et al.*, 2008b) を実施した。ラット肝酵素溶液は、様々な濃度の MeHg (1-200 μM) とともに 37 °C で 1 時間反応させた。反応液は、12,000 g で 10 分間遠心分離した。沈殿は、1 mM の GSH によって溶解され、上清を 12% の電気泳動あるいは二次元電気泳動に供した。本スクリーニング法が S-水銀化に基づいたものであることを確認するために、チオール修飾試薬である NEM (10-1,000 μM) についても同手法を実施した。

3.4 二次元電気泳動

二次元電気泳動は、一次元目のゲルには Immobiline DryStrip pH 3-10 NL を、二次元目のゲルには SDS ポリアクリルアミドゲルを用い、Multiphor II システム (GE Healthcare (旧 Amersham Biosciences)) により行った。一次元目では、25 μl のタンパク質試料と 100 μl の 8M 尿素、2% の CHAPS、BPB を混合し、14 時間、等電点電気泳動のゲルに浸した。ゲルから水分を取り除いた後、20 °C で 155 分間 (0-90 分間は 200V、90-155 分間は 3,500V)、電気泳動を行った。その後、ゲルを 50 mM Tris-HCl (pH 8.8)、6 M 尿素、30% グリセロール、2% SDS および BPB により室温で 15 分間平衡化し、水で洗浄した。ゲルから水分を取り除いた後、12% SDS-PAGE を行った。

3.5 ペプチドマスマッピングによる 42 kDa タンパク質の同定

二次元電気泳動によって得られたタンパク質は、ポリビニリデンジフルオライド (PVDF) 膜に転写して、0.1%の Ponceau S で染色を行った。42 kDa のタンパク質は、*Achromobacter* プロテアーゼ I (API) によって消化した (Iwamatsu and Yoshida-Kubomura, 1996)。消化後の断片の質量分析は、PerSeptive Biosystems Voyager-DE/RP を用いた MALDI-TOF/MS により行った。42 kDa のタンパク質は、MALDI-TOF/MS で得られた分子量と NCBI nr (10.04.99) に登録されたタンパク質からの理論的なペプチド分子量との比較により同定した (Henzel *et al.*, 1993)。

3.6 SDH のタンパク質発現と特定部位の変異導入

RNA は、ラット肝臓から Sepasol-RNA I super reagent で抽出し、cDNA は Prime Script RT を用いて合成した。SDH は、Prim Script を用いて PCR で増幅した。

Sense primer は、5'- ATCTCGAGATGGCAGCTCCTGCTAAGGGCGAGAACC-3'、

Anti-sense primer は、5'- GCGGATCCTTAGGGGTTCTGGTCATTGGGGTCACAC-3'

であった。

ラット SDH に対応する cDNA は、StrataClone Bluent PCR Cloning Kit によってクローニングした。クローニングした SDH cDNA は、pET15b ベクター内の phage T7 RNA ポリメラーゼプロモータの下流である XhoI および BamHI 部位に導入した。

システイン残基からセリン残基への変異体は、Quickchange Site-Directed Mutagenesis Kit に付随するプロトコルに従い、以下のような sense primer とその相補的な anti-sense primer を用いて作成した。

C44S: 5'-CATTCGGTGGGGATCAGTGGCTCGGATGTTC-3';

C119S: 5'-CCATCTTCTTCAGTGCCACGCCCCAGATG-3';

C129S: 5'-GGGAACCTCAGCCGCTTCTACAAGCACAGC-3';

C164S: 5'-GTGGGGATCTATGCCTCCCGTCGAGGTTCG-3'

変異体の DNA 配列は、ABI310DNA sequencer (Applied Biosystems) によって検証した。これらのプラスミドは、タンパク質を発現させるために、*E. coli* BL21 細胞で形質転換した。

3.7 SDH の精製

発現ベクターで形質転換した *Escherichia coli* BL21 細胞は、LB 培地で、OD₆₀₀ = 0.6 になるまで、37 °C、120 rpm (TAITEC) で振とう培養した。培養物は、0.5 mM の isopropyl-thio- D-galactopyranoside を添加して誘導し、25 °C で 24 時間放置した。精製の全ての過程は、4 °C で行った。発現ベクターで形質転換した *E. coli* 細胞は、遠心分離により採取し、50 mM 2-ME、0.1 M NaCl および 5% グリセロールを含む 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) で再懸濁の上、超音波処理 (Ultrasonic Disruptor UD-201, TOMY) を行った。超

音波処理された細胞溶解物は、100,000 g で1時間遠心分離し、上清を 50 mM 2-ME および 0.1 M NaCl を含む 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) で平衡化した Ni-IDA ProBond 樹脂で満たされたカラム (4 × 1 cm 内径) に供した。アポ SDH は、0–200 mM のイミダゾールの直線勾配によって溶出し、5 mM 2-ME および 50 μM ZnCl₂ を含む 50 mM HEPES (pH 8.0) で透析した。過剰な Zn²⁺ と 2-ME は、Econo-Pac 10DG で取り除いた。

3.8 SDH の活性

SDH 活性は、Maret と Auld の方法 (Maret and Auld, 1988) を一部改良して測定した。反応液 (1.5 ml) の内訳は、50 mM ソルビトール、40 mM Gly-NaOH (pH 10.0) および酵素液であった。反応は、NAD⁺ (1 mM) の添加によって開始した。NAD⁺ の減少は、吸光係数 6.22 mM⁻¹cm⁻¹ を用いて、340 nm の分光光度法で測定した。タンパク質の濃度は、標準をウシ血清アルブミンとして、Bradford の方法 (Bradford, 1976) によって測定した。

3.9 Zn の測定

ラット SDH 組み換え体を、1.2 ml の硝酸 (60%) と 0.4 ml の過酸化水素 (30%) によって溶解した。次に、全量が 5 ml になるようにサンプルに水を加え、130 °C で二晩加熱した。サンプル中の Zn の量は、ICP-MS (ELAN DRC II, Perkin Elmer) によって測定した。

3.10 BPM 標識アッセイ

BPM 標識アッセイ (Toyama *et al.*, 2013) により、タンパク質中の MeHg が共有結合していない SH 基の有無を調べた。ラット SDH 組み換え体は、100 mM Tris-HCl (pH 7.5) の下、37 °C で1時間、MeHg と反応させ、次に 15 μM の BPM と 37 °C で30分間反応させた。反応液は、SDS-PAGE に供し、PVDF 膜に転写した。膜は 5% スキムミルクで1時間ブロッキングし、Tween (20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM 塩化ナトリウム, 0.5% Tween 20) を含むトリス緩衝生理食塩水で洗浄した。ビオチンが結合したタンパク質は、Chemi-Lumi One (増強化学発光試薬) を利用した HRP 標識ストレプトアビジンで検出し、LAS-4000 (富士フィルム) でイメージングを行った。BPM 結合量の減少は、MeHg が共有結合可能な SH 基の減少を反映した。

3.11 MALDI-TOF/MS

MeHg によって修飾を受けた部位を決定するために、ラット SDH 組み換え体 (0.3 mg/ml) を MeHg (25 μM) と 37 °C で1時間、100 mM Tris-HCl (pH 7.5) の下で反応させ、その後 37 °C で一晩、MS グレード修飾トリプシンと反応させた。トリプシン消化した SDH は、50% アセトニトリルと 0.1% トリフルオロ酢酸を含む α-cyano-4-hydrozycinnamic acid (5 mg/ml) と反応させ、ステンレス鋼板で室温・室内圧力下乾燥させた。分析は、

MALDI-TOD/MS (AXIMA-TOF², 島津製作所) を用いて、窒素レーザー、reflectron mode にて行った。

未消化のタンパク質の分析には、ラット SDH 組み換え体 (0.3 mg/ml) を MeHg (25 μ M) と 37 °C で 1 時間、100 mM Tris-HCl (pH 7.5) の下で反応させたものを用いた。サンプルは、50% アセトニトリルと 0.1% トリフルオロ酢酸を含む 50% シナピン酸 (5 mg/ml) と反応させ、ステンレス鋼板で室温・室内圧力下乾燥させた。MALDI-TOD/MS 分析は、linear mode にて行った。

全ての分析は、ポジティブイオンモードで行った。また、それぞれの測定直前に装置の調整を行った。

3.12 細胞および細胞培養

初代肝細胞は、6~10 週齢の C57BL/6J 雄マウスから二段階コラゲナーゼ灌流法により単離した (Shinkai *et al.*, 2009)。細胞は、10% ウシ胎児血清、2 mM L-アラニル-L-グルタミン、抗生物質 (100 U/ml ペニシリンおよび 100 μ g/ml ストレプトマイシン) を含む Williams Medium E で 4.0×10^5 細胞/ml の細胞濃度に調製、懸濁した。細胞培養プレートに、 8.0×10^4 細胞/cm² の細胞密度となるように培養細胞を播種した。ヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞は永沼章教授 (東北大学) から譲渡いただいたものを使用した。SH-SY5Y 細胞は、10% ウシ胎児血清、2 mM L-アラニル-L-グルタミン、抗生物質 (100 U/ml ペニシリンおよび 100 μ g/ml ストレプトマイシン) を含む DEME/HamF12 混合培地で培養した。細胞培養プレートに、 1×10^5 細胞/cm² の細胞密度となるように培養細胞を播種した。培養細胞は、37 °C、5% CO₂、95% Air の条件下でインキュベーター内に保持した。MeHg 処置前に、細胞は無血清培地で一夜培養し、MeHg の効果が血清成分への結合により失われるのを避けるために無血清培地で MeHg を曝露した。

3.13 統計処理

データは、3 つの独立した実験から平均値 \pm 標準偏差あるいは標準誤差で示した。有意差検定は Tukey の多重比較を行い、 $P < 0.05$ を有意とした。バンド強度は、ImageJ ソフトウェア version 1.37 (Rasband, 1997) によって定量化した。

4. 結果

4.1 MeHg により S-水銀化を介して不溶化するタンパク質のスクリーニングおよび同定

ラット肝酵素溶液を MeHg と反応させた時、濃度依存的にアルギナーゼ I (39 kDa の位置のタンパク質) の不溶化が観察された (Kanda *et al.*, 2008b) (図 11A)。これらの条件下、我々はサブユニットで 42 kDa の分子量である二つ目の不溶化タンパク質を見出した (図 11A)。このような現象は、チオール修飾試薬である NEM を用いた際にも観察されたことから、MeHg による 42 kDa のタンパク質の不溶化は、反応性を有する SH 基の共有結合修飾によって生じたことが示唆された。

42 kDa のタンパク質を同定するために、我々は、二次元電気泳動によってタンパク質を分離し、MALDI-TOF/MS によるペプチドマスマッピングを行った。42 kDa のタンパク質は、二次元電気泳動によって、 α と β の二つのスポットに分離された (図 11B)。これらのタンパク質の等電点は、7.7 および 7.5 であった。ペプチドマスマッピングにより、両スポットからの 26 個のペプチド断片のうち、12 個の質量が SDH を API で消化した断片の理論的な質量とほぼ同じであった (表 3)。このように、42 kDa のタンパク質は、 NAD^+ を補酵素として、ソルビトールをフルクトースに触媒する Zn^{2+} 含有金属酵素である、ソルビトールデヒドロゲナーゼ (SDH) であることが明らかとなった。

4.2 MeHg による SDH の機能低下

SDH が MeHg によって容易に S-水銀化が生じるか否かを確認するために、ラット SDH 組み換え体を用いて実験を行った。精製 SDH 標品と MeHg を反応させた結果、緩やかな遠心分離 (15,000g, 10 分間) により、タンパク質の不溶化が生じたことを確認した。SDH の殆どは、25 μM の MeHg との反応で沈殿した (図 12A)。これらの条件下、MeHg は濃度依存的に SDH 活性を阻害した ($\text{IC}_{50} = 25.3 \pm 3.2 \mu\text{M}$) (図 12B)。興味深いことに、SDH と MeHg をモル比 1:2 の割合で反応した際に、SDH 活性に重要な Zn^{2+} の顕著な遊離も観察された (図 12C)。しかしながら、MeHg によって引き起こされるこのような SDH 活性の低下と不溶化は、GSH (100 μM) の添加によって十分に回復した。このことは、触媒活性を阻害した、MeHg による SDH の不溶化と活性部位からの Zn^{2+} の遊離が、GSH の S-水銀化の解除によって可逆的であることを示唆している。

4.3 SDH の S-水銀化

BPM 標識アッセイは、SDH の S-水銀化を評価するために行われた。SDH に結合した BPM のバンド強度は、MeHg (25 μM) の存在で減少した (図 13)。このことから、反応性システイン残基は、MeHg による S-水銀化を受けたことを示した。同じ条件下、MeHg 処理の SDH の MALDI-TOF/MS 分析により、対照サンプルに比し、質量の増加が

みられた (図 14A)。増加後の分子量は 762.4 であり、3 つか 4 つの MeHg (215 Da) が付加した状態に対応していた。

次に、MeHg の化学修飾 (*S*-水銀化) 部位を決定するために、野生型と MeHg 処理後の SDH はトリプシンによって消化し、その後 MALDI-TOF/MS によって分析した。修飾を受けていないペプチドの理論上の質量と比較し、MeHg 処理の SDH サンプルで 4 つのピークが得られた (図 14B)。それらの配列と質量は、次のようであった (表 4)。

P-1 (MHSVIGICGSDVHYWEHGR, $m/z = 2285.7$)、

P-2 (YNLTPSIFFCATPPDDGNLCR, $m/z = 2559.31$)、

P-3 (YNLTPSIFFCATPPDDGNLCR, $m/z = 2775.34$)、および

P-4 (LPDSVTFEEGALIEPLSVGIYACR, $m/z = 2794.58$)

ペプチド P-1 と P-4 は、配列が異なり、MeHg の特定の標的である、システイン残基一つを有していた。逆に、ペプチド P-2 と P-3 は、二つのシステイン残基を有する、同じ配列であった。P-3 の両システイン残基は MeHg によって修飾を受けた一方、P-2 の一つのシステイン残基は、修飾していた。これらの結果は、MeHg がラット SDH と Cys44、Cys119、Cys129 および Cys164 で共有結合修飾していることを示唆している (図 15)。

4.4 MeHg によって生じる SDH の不溶化に対する変異体の効果

MeHg による Cys44、Cys119、Cys129 および Cys164 の共有結合修飾が SDH の不溶化に関連しているならば、これらのアミノ酸を置換することで MeHg による不溶化を抑制するのではないかと考えた。そこでこの可能性を検討するために、それぞれのシステイン残基をセリン残基に置換した (C44S, C119S, C129S, C164S)。なお、C164S については、大腸菌で発現させる際に封入体を形成したため、検討を行うことができなかった。C44S は 10 および 25 μM の MeHg の存在下、野生型のものに比し、十分な不溶化はみられなかった (図 16)。なお、C44S は MeHg 非存在下、過半数の Zn^{2+} が遊離したが不溶化しなかった (データ未掲載)。また、C129S は 10 μM の MeHg の存在下、野生型のものに比し、十分な不溶化はみられなかった (図 16)。対照的に、C119S は不溶化を抑制しなかった (図 16)。

4.5 MeHg によって生じる SDH の不溶化に対する補酵素の抑制効果

我々は、別の研究で、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) が別の環境中の親電子リガンドである 1,2-ナフトキノンによって、活性部位である Cys152 を介して容易に *S*-アリアル化を引き起こし、活性を阻害することを見出している (Miura *et al.*, 2011a)。更に、ピリジンヌクレオチドの結合ドメインは Cys152 に近接していることから、MeHg との反応前に、補酵素である NAD(H) を GAPDH の反応混合液に加えておくことで、活性低下を抑制した (Miura *et al.*, 2011b)。哺乳類の SDH の補酵素は NAD^+ であるため (Jeffery and Jörnvall, 1988)、 NAD^+ の有無により、MeHg によって引き起こ

される SDH の不溶化へ及ぼす効果を調べた。ラット SDH 組み換え体と MeHg (25 μM) の反応混合液に NAD^+ を加えた時、濃度依存的に SDH の不溶化を抑制した (図 17)。一方、SDH の補酵素としては機能しない、 NADP^+ および FAD^+ ではこのような抑制効果はみられなかった。

4.6 MeHg による細胞中 SDH 活性への効果

非細胞系で MeHg による SDH の機能変化が明らかになったため、細胞系での SDH の機能変化の検討を行うことにした。マウス初代肝細胞を用いて、25 μM の MeHg を 3 時間曝露した後の SDH 活性を測定した。その結果、予想に反し、活性の変化は殆ど認められなかった (図 18A)。また、SH-SY5Y 細胞を用いて、10 μM の MeHg を 6 時間曝露した後の SDH 活性を測定したが、初代肝細胞と同様、活性の変化は殆ど認められなかった (図 18B)。これらの結果より、細胞中の何らかの因子が MeHg による SDH への攻撃を防御していることが考えられた。

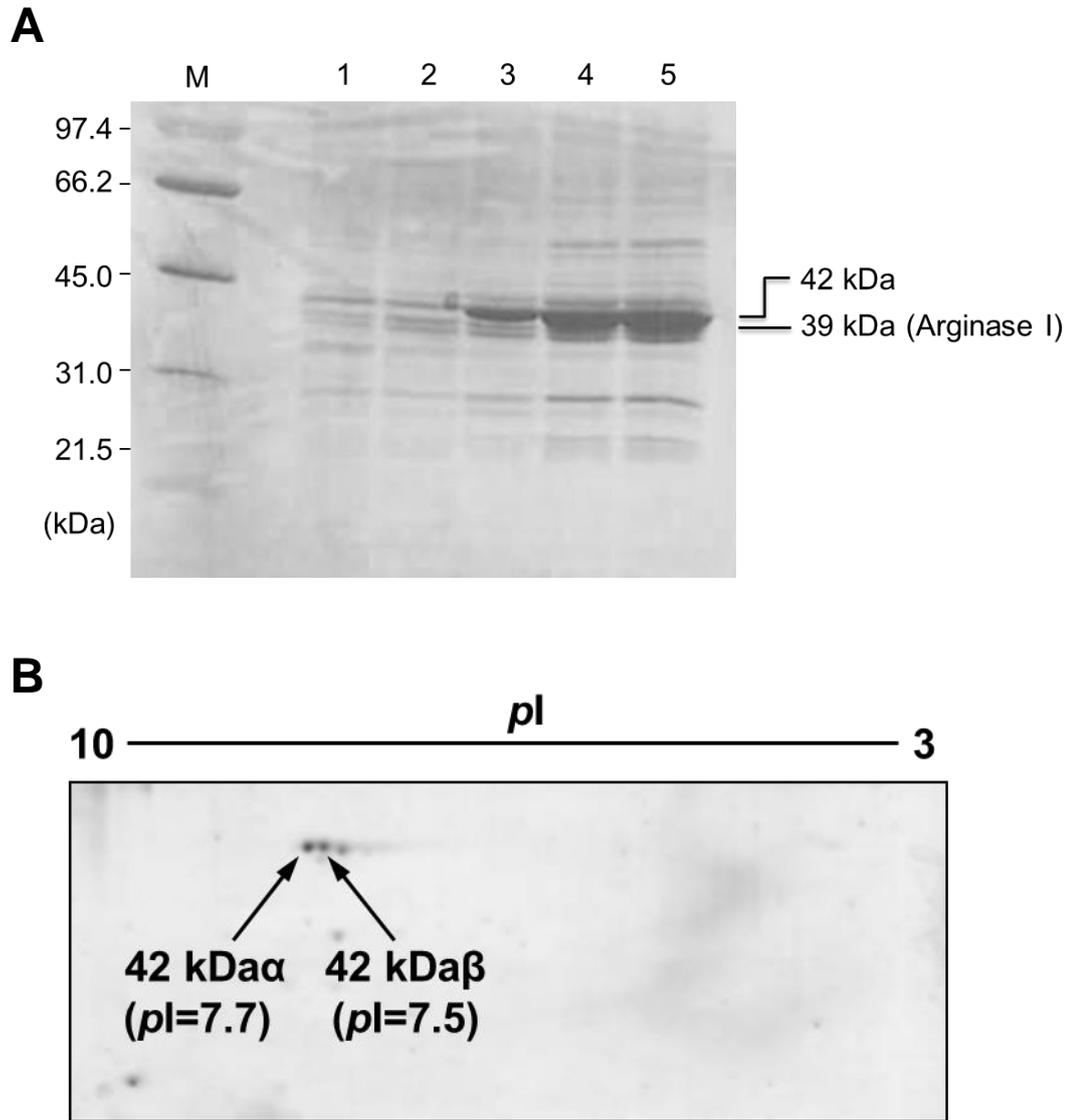


図 11 ラット肝酵素溶液から得られた標的分子

A: ラット肝酵素溶液を MeHg と反応させ (37°C 1 時間)、遠心分離後の沈殿を SDS-PAGE で分析した。タンパク質は銀染色で検出した。レーン M はマーカを示し、レーン番号 1、2、3、4 および 5 はそれぞれ MeHg 濃度 0、1、10、100 および 200 μM を示している。B: A で MeHg 濃度 100 μM の時の沈殿を二次元電気泳動に供し、銀染色で検出した。等電点は上方に示した。

表 3 分子質量分析を用いて決定した 42 kDa タンパク質の断片配列

Fragment	Observed Mass	Theoretical Mass	Δ^a	Sequences from Database
AP-1	818.37	818.46	-0.09	VESVLGSK
AP-3	910.42	910.46	-0.04	ETPHDIAK
AP-6	965.45	965.49	-0.04	AVEAFETAK
AP-9	1028.39	1028.41	-0.02	HSADFCYK
AP-14	1277.67	1277.67	0.00	EVGADFTIQVAK
AP-15	1336.76	1336.77	-0.01	PLVTHRFPLEK
AP-17	1538.82	1538.84	-0.02	KPMVLGHEAAGTVTK
AP-19	1915.97	1916.06	-0.09	AMGASQVVVIDLSASRLAK
AP-21	2218.98	2219.04	-0.06	GVFRYCNTWPMAVSMLASK
AP-23	2285.13	2285.12	+0.01	PGDRVAIEPGVPREIDFCK
AP-25	2886.29	2886.35	-0.06	MHSVGICGSDVHYWEHGRIGDFVVK
AP-26	3467.81	3467.85	-0.04	GENLSLVVHGPGDIRLENYPIPELGPNDVLLK

^a 実測質量と理論質量間の差

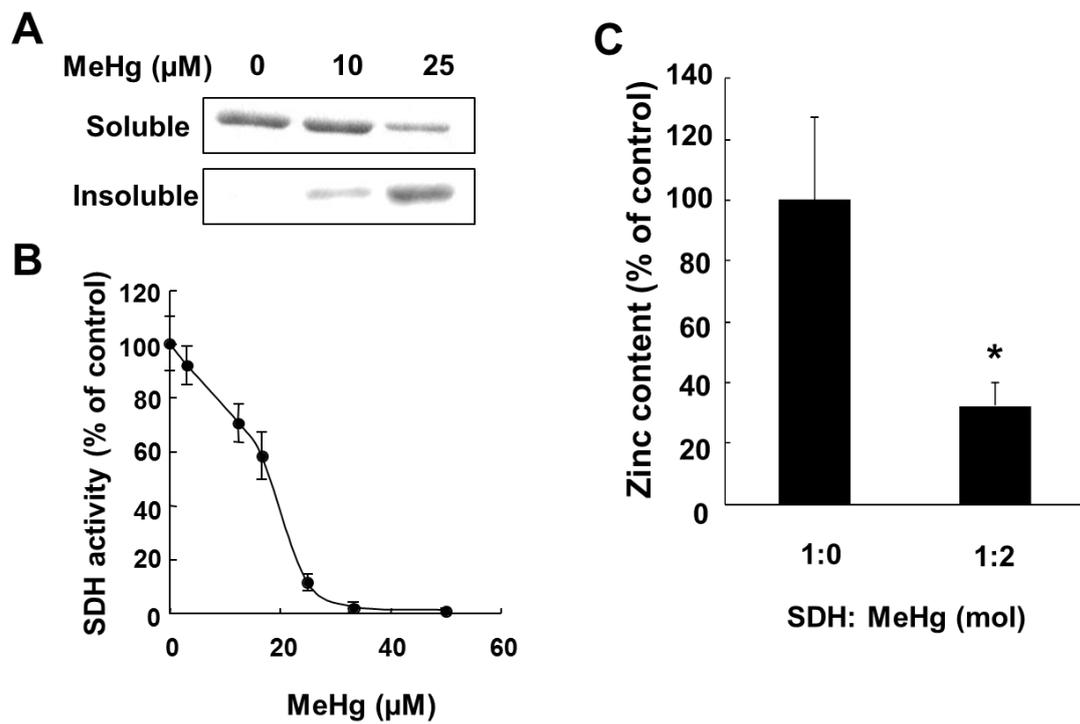


図 12 MeHg による SDH の不溶化、活性および Zn 含量への効果

A: ラット SDH 組み換え体 (0.3 mg/ml) を各濃度の MeHg と 37°C で 1 時間反応させ、遠心離し、不溶化画分は 1 mM GSH で可溶化した。SDS-PAGE に供し、クマシーブリリアントブルー (CBB) 染色を行った。B: A と同様に反応させ、活性を測定した。各々の値は、3 回の測定の平均値±SD を示している。C: ラット SDH 組み換え体と MeHg を 1:2 のモル比で 37°C で 1 時間反応させ、Zn 量を ICP-MS で測定した。各々の値は、3 回の測定の平均値±SD を示している。また、*は $P < 0.05$ を示している。

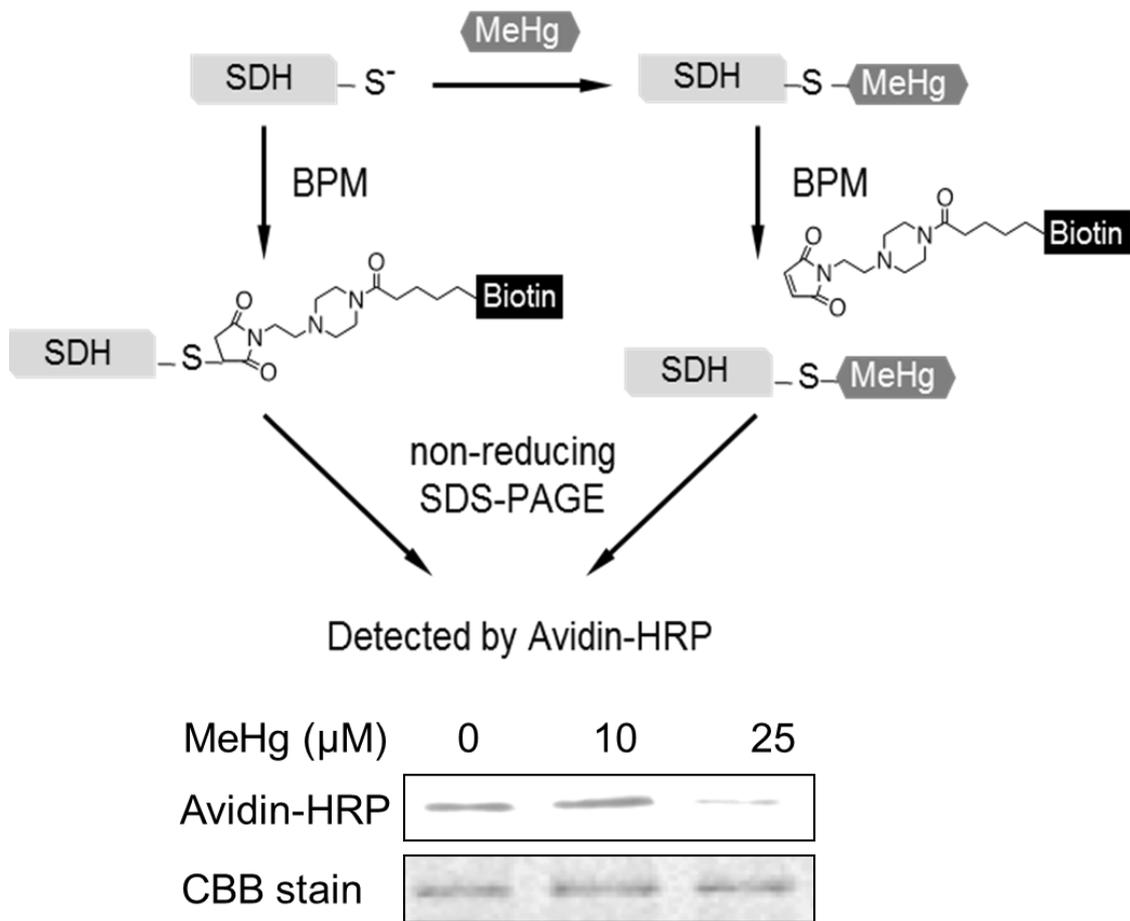


図 13 MeHg によるラット SDH の共有結合修飾

ラット SDH 組み換え体 (0.3 mg/ml) を各濃度の MeHg と 37°C で 1 時間反応させ、BPM 標識アッセイを行った。CBB 染色を対照に用いた。

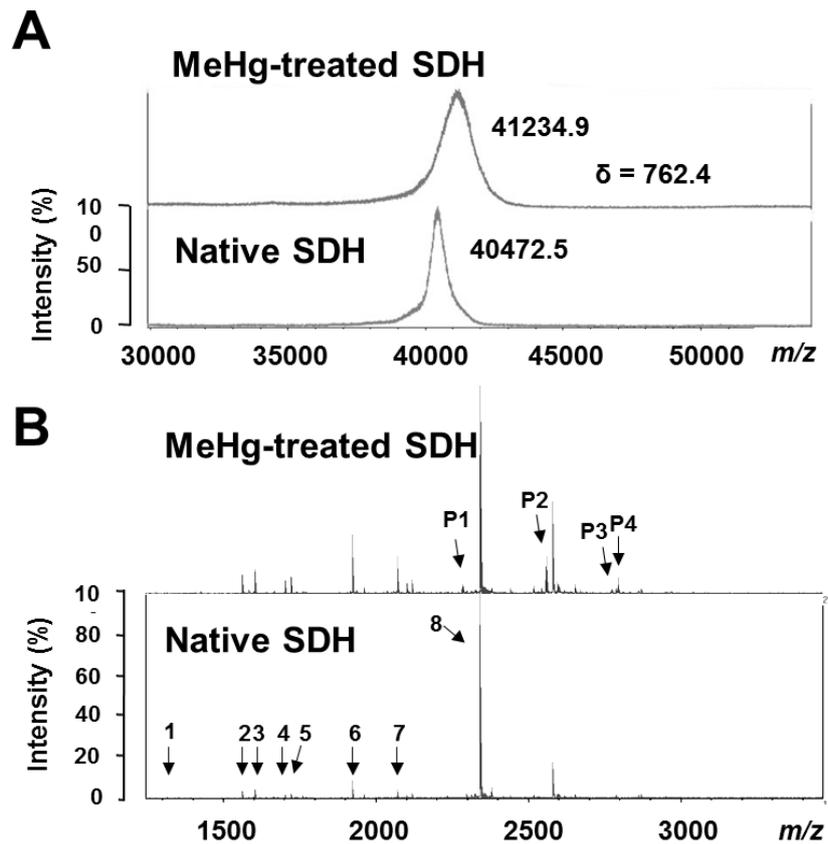


図 14 MeHg によるラット SDH の共有結合修飾

A: ラット SDH 組み換え体 (0.3 mg/ml) を MeHg (25 μ M) と 37°C で 1 時間反応させ、linear mode にて MALDI-TOF/MS による分析を行った。B: A と同様の方法で SDH を MeHg と反応させた後、トリプシン消化し、reflectron mode にて MALDI-TOF/MS による分析を行った。

表 4 MeHg によるラット SDH の化学修飾 (S-水銀化) 部位

Position	Peak No.	Observed Mass	Theoretical Mass	Δ^a	Peptide Sequence
314-324	1	1277.74	1277.67	+0.07	TLNVKPLVTHR
6-20	2	1563.01	1562.83	+0.18	GENLSLVVHGPGDIR
193-208	3	1603.87	1603.85	+0.02	AMGASQVVVIDLSASR
299-313	4	1701.8	1701.78	+0.02	YCNTWPMAVSMLASK
175-192	5	1723.08	1723.06	+0.02	VLVCGAGPIGIVTLLVAK
21-37	6	1924.06	1924.04	+0.02	LENYPIPELGPNDVLLK
38-55	7	2069.95	2069.91	+0.04	MHSVGICGSDVHYWEHGR
38-55	P-1	2285.7	2285.51	+0.19	MHSVGICGSDVHYWEHGR + MeHg
110-130	8	2344.12	2344.07	+0.05	YNLTPSIFFCATPPDDGNLCR
110-130	P-2	2559.31	2559.67	-0.36	YNLTPSIFFCATPPDDGNLCR + MeHg
110-130	P-3	2775.34	2775.27	+0.07	YNLTPSIFFCATPPDDGNLCR + 2(MeHg)
142-165	P-4	2794.58	2794.9	-0.32	LPDSVTFEEGALIEPLSVGIYACR + MeHg

^a 実測質量と理論質量間の差

本表は、MeHg により修飾を受けたラット SDH をトリプシン消化した際のペプチドのアミノ酸配列を示している。“Position” は、ラット SDH のアミノ酸配列に対応している。“Peak No.” は、図 14B のピークナンバー（矢印）に対応している。

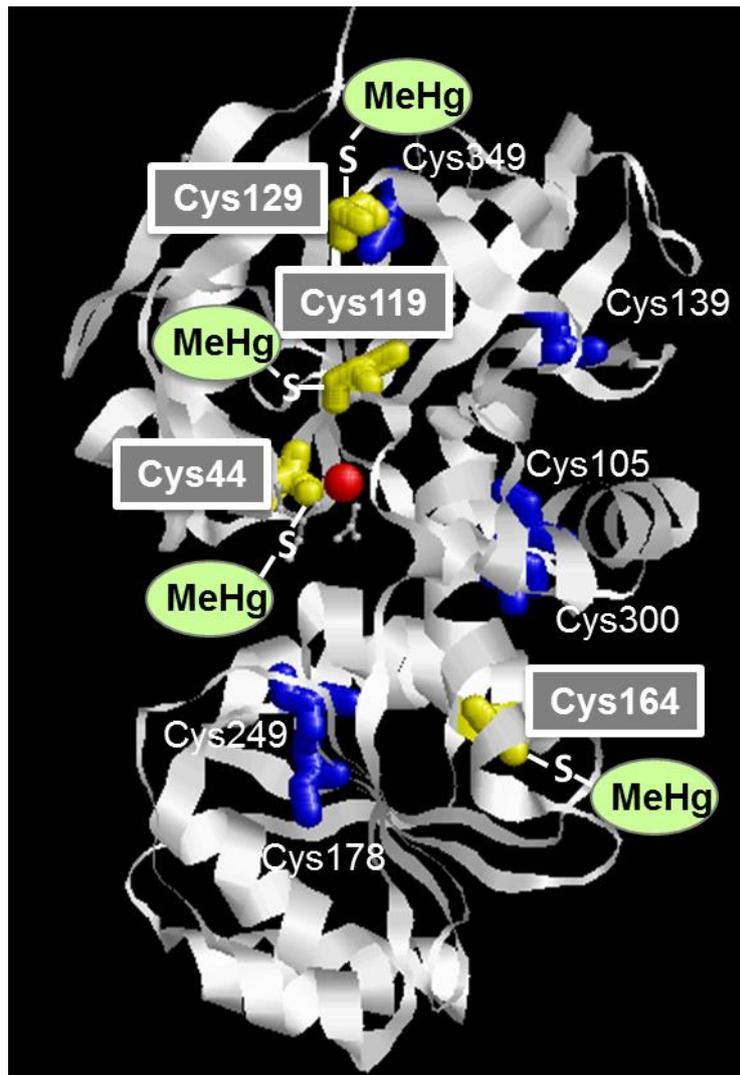


図 15 MeHg によるラット SDH の化学修飾 (S-水銀化) 部位

3次元構造はヒツジ肝臓 SDH を示している (PROTEIN DATA BANK より)。システイン残基を表すために、RasMol を用いてイメージと色調を変更した。黄色のシステイン残基は MeHg により修飾された部位、青色はそれ以外のシステイン残基を表している。アミノ酸配列の相同性を基に、ラット肝 SDH のシステイン残基番号を付けた。赤色の原子は Zn^{2+} を示している。

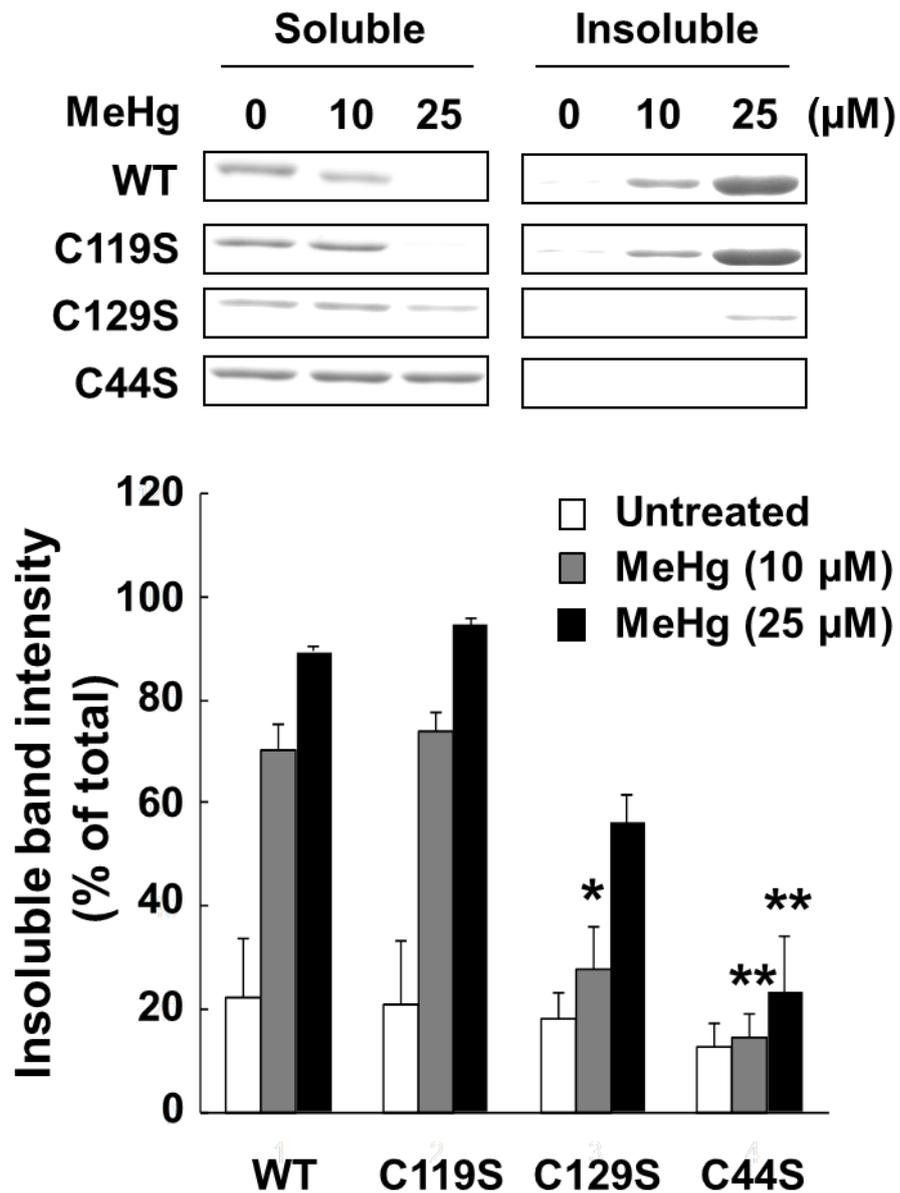


図 16 MeHg 修飾システイン部位の変異による SDH 不溶化に対する効果

SDH とその変異体 (0.3 mg/ml) を各濃度の MeHg と 37°C で 1 時間反応させた。遠心分離後、不溶化画分は 1 mM GSH によって溶解した。サンプルを SDS-PAGE に供し、CBB により染色した。強度は ImageJ ソフトウェアで定量化した。各々の値は、3 回の測定の平均値±SEM を示している。また、*は野生型に対する $P < 0.05$ を、**は $P < 0.01$ を示している。

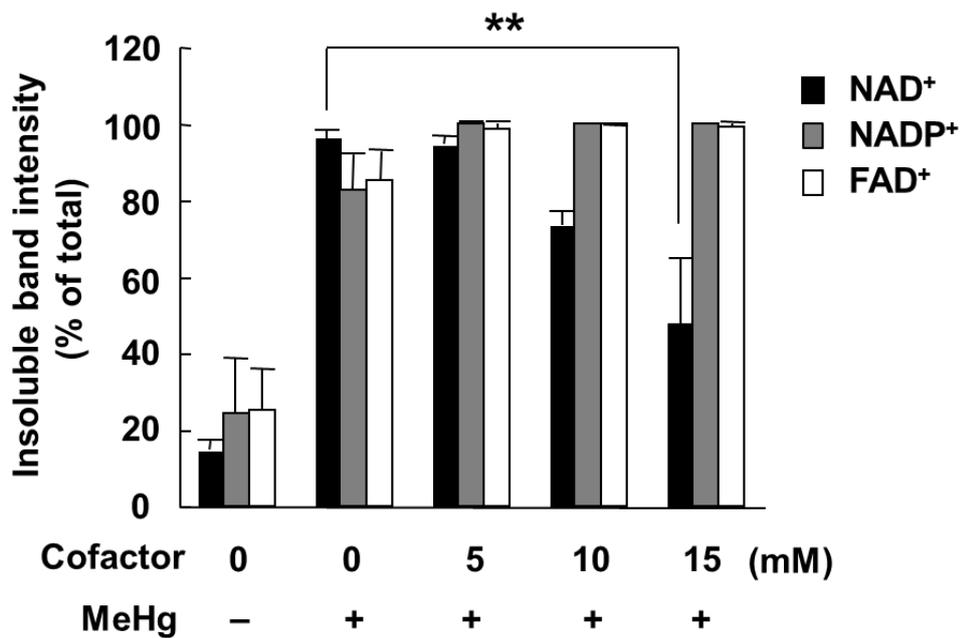
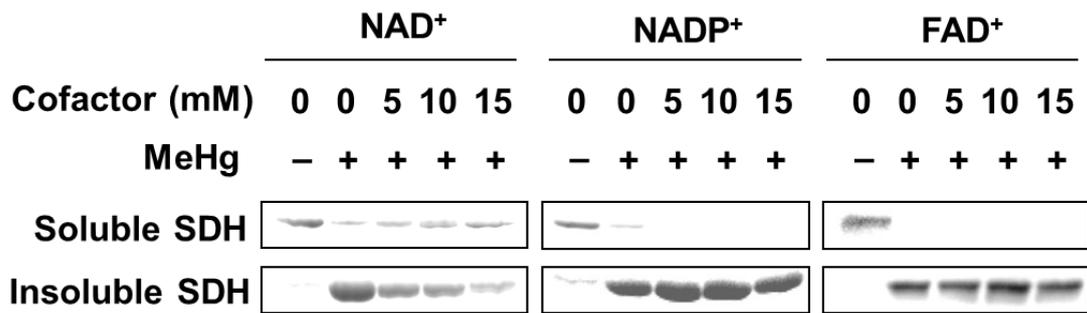


図 17 MeHg による SDH の不溶化に対する NAD⁺ 依存的な抑制

各補酵素の存在・非存在下、ラット SDH 組み換え体 (0.3 mg/ml) を 25 μ M の MeHg と 37°C で 1 時間反応させた。遠心分離後、不溶化画分は 1 mM GSH によって溶解した。サンプルを SDS-PAGE に供し、CBB により染色した。強度は ImageJ ソフトウェアで定量化した。各々の値は、3 回の測定の前平均値 \pm SEM を示している。また、**は $P < 0.01$ を示している。

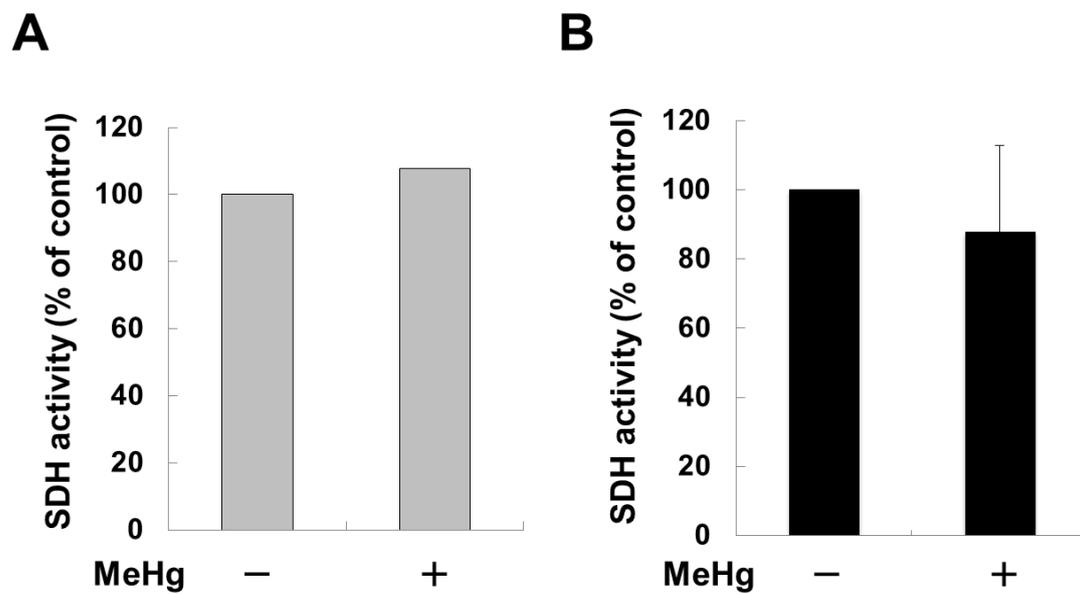


図 18 MeHg による細胞中 SDH 活性への効果

A: マウス初代肝細胞に 25 μM の MeHg を 3 時間曝露し、SDH 活性を測定した。B: SH-SY5Y 細胞に 10 μM の MeHg を 6 時間曝露し、SDH 活性を測定した。各々の値は、3 回の測定の平均値 \pm SD を示している。

5. 考察

生体内において、MeHg は、肝臓に高濃度で蓄積する (Rodrigues *et al.*, 2010; Yasutake *et al.*, 1997)。それにもかかわらず、肝臓中の MeHg の標的分子はあまり知られていない。本研究は、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 Zn^{2+} 含有金属酵素である SDH であることを同定した (表 3)。S-水銀化したタンパク質の構造変化とそれに続く不溶化に着目した研究方法は、MeHg の新奇の分子標的を見つけ出す取り組みとしては新たなものであった。

ラット SDH 組み換え体による実験で、MeHg は、(1) タンパク質の不溶化を引き起すこと、(2) 活性部位から Zn^{2+} を遊離すること、(3) 活性を阻害することを見出した (図 19)。これらの MeHg 依存的な現象は、GSH の添加によって抑制したことから、SDH の S-水銀化が影響しているものと考えられた。同時に、BPM 標識アッセイにより、SDH が MeHg によって容易に修飾を受けることを確認した (図 13)。

ラット SDH は、サブユニット中にひとつの Zn^{2+} と 10 個のシステイン残基を有していることが報告されている (Karlsson *et al.*, 1991)。MALDI-TOF/MS による分析により、ラット SDH は、Cys44、Cys119、Cys129、Cys164 の 4 つのシステイン残基を介して、MeHg によって S-水銀化を生じることが示唆された (図 14B; 表 4)。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 (図 16)。また予想どおり、アルギナーゼ I と同様、S-水銀化により金属補欠分子の活性部位からの遊離がみられた。Cys44 は、活性部位の Zn^{2+} を保持するリガンドとして機能しているため (Johansson *et al.*, 2001)、Cys44 の S-水銀化が主に Zn^{2+} の遊離に関与していると考えられた。一方、Cys44 の変異体では Zn^{2+} が遊離するが不溶化しなかったため、 Zn^{2+} の遊離が不溶化の直接的な原因ではないことが示された。

図 16 に示したとおり、Cys44 および Cys129 のセリンへの変異体は、MeHg によるラット SDH の不溶化を顕著に抑制した。このことから、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不溶化を促している可能性が考えられた。例えば、MeHg は、Cys44 の周辺の分子環境と活性部位の柔軟性を変化させることが、不可溶化の誘因

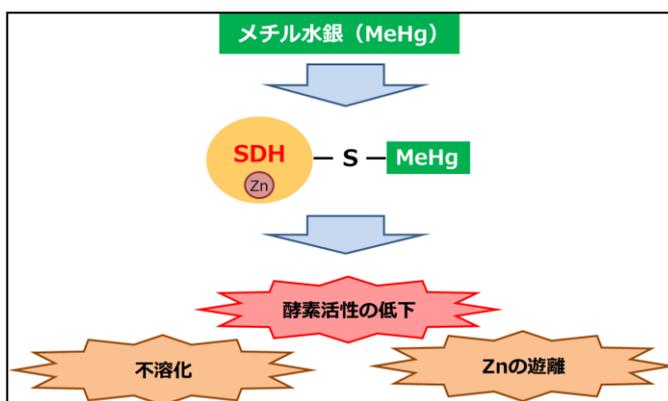


図 19 MeHg により S-水銀化する新たなタンパク質 (SDH) の不溶化と金属 (Zn^{2+}) の遊離

となっているのかもしれない。活性部位のシステイン残基の共有結合修飾によって活性部位の柔軟性に変化が生じ、タンパク質の不溶化を引き起すことは別の酵素で報告されている (Zou *et al.*, 2009)。一方、哺乳類の SDH では、90~110 および 120~140 番残基の 2 つの領域が安定性とサブユニットの結合に重要であることが報告されている (Hellgren *et al.*, 2007)。このことは、MeHg による Cys129 の共有結合修飾が不溶化を引き起していることの原因かもしれない。

図 17 のとおり、NADP⁺や FAD⁺ではなく、NAD⁺を前もって加えておくことで、MeHg の SDH の不可溶化を濃度依存的に抑制した。SDH の NAD⁺の結合部位は Cys44 の近傍にあるため (Johansson *et al.*, 2001)、NAD⁺は MeHg が SDH の SH 基に近づくことを妨げている可能性がある。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 (図 18)。このことは、MeHg による細胞中 SDH の共有結合修飾に対する細胞中の NAD⁺の予防効果によるものかもしれない

(図 20)。加えて、細胞中の GSH は、MeHg-SG 付加体を形成することで (Rabenstein and Fairhurst, 1975)、MeHg による細胞中 SDH の共有結合修飾を抑制する可能性がある。このようなことから、細胞で GSH と NAD⁺を取り除いた条件下にすれば、MeHg は SDH 活性を阻害することが推測される。

GSH は様々な種類の組織で 1 mM 以上の濃度で存在しているが (Kosower and Kosower, 1978)、本

研究により、GSH に加え、細胞中の NAD(H)も *in vivo* における MeHg による SDH の Cys44 の S-水銀化を少なくとも部分的に防御している可能性が示唆された。

現在までにわれわれは、Mn-SOD およびアルギナーゼ I が MeHg により *in vivo* でも酵素活性が低下することを明らかにしてきたが、SDH はそれらとは異なり、細胞系でも活性低下を伴わないことを明らかにした。しかしながら、本研究で示したとおり、S-水銀化タンパク質を同定する様々な手法が利用可能になってきていることから、今後、MeHg による毒性発現に対してどのように S-水銀化が関与しているか、ひいては毒性発現のキーとなる細胞内タンパク質が明らかとなる可能性がある。

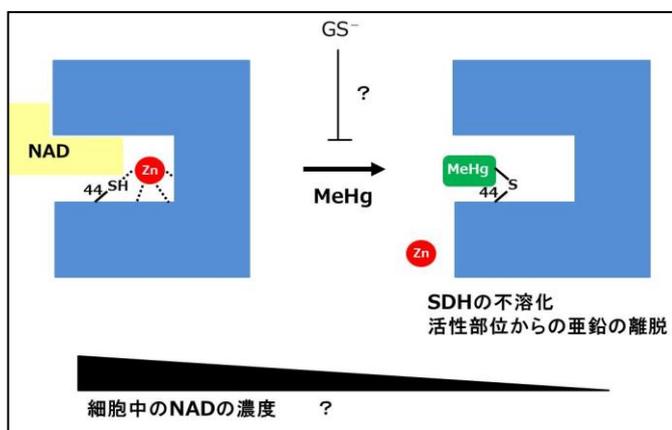


図 20 SDH の不溶化に対する NAD⁺の抑制効果

6. 結論

本研究では、ラット肝酵素溶液を用いて、MeHgのS-水銀化によって不溶化する、42 kDaのサブユニットをもつタンパク質について調べた結果、以下のような知見が得られた (Kanda *et al.*, 2012)。

- 1) 二次元電気泳動およびそれに続くMALDI-TOF/MSを用いたフィンガープリンティング法により、42 kDaのタンパク質は、NAD依存的なソルビトールデヒドロゲナーゼ (SDH) であることが明らかとなった。
- 2) ラット組み換えSDHを用いた実験により、MeHgはSDHに、Cys44、Cys119、Cys129、Cys164を介して共有結合し、その結果、活性を阻害すること、Zn²⁺が遊離すること、タンパク質を容易に不溶化させることが明らかとなった。
- 3) 変異体を用いた実験により、活性部位のZn²⁺の配位子であるCys44とCys129がMeHgによるSDHの不溶化にとっても重要な役割を果たしていることが明らかとなった。
- 4) NAD⁺を事前処理することにより、MeHgによるSDHの不溶化を顕著に抑制した。
- 5) 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。

7. 総合考察

研究の背景に記したとおり、我々は日々比較的多くの水銀を摂取している。しかし、MeHgの毒性およびその発現機構には、まだまだ不明な点が多く、その正体をあきらかにするための研究が必要である。現在までに、MeHgの毒性発現には、抗酸化酵素、各種トランスポーターあるいはチューブリンなどのタンパク質へのS-水銀化が一部あるいは複合的に関与していることが報告されているが、新たな分子標的を同定し、その特性を評価することは、毒性の分子メカニズムの理解を深める上で重要なステップと考えた。

MeHgの毒性の主体は、中枢神経系の障害である。一方、MeHgは肝臓にも障害を与えるとされているが、毒性学的影響の研究成績が十分とは言えない。MeHgは、その大部分を口から摂取しているため、図21に示すとおり、腸管から吸収され、門脈を経て

肝臓などに移行する。肝臓では、1 mM以上の高濃度で存在するGSHと反応して付加体を形成する一方で、タンパク質とも付加体を生成することが示唆されている。これは一見不可解な現象であるが、Hg-S結合の不安定さに起因する。事実、当研究室の吉田らによるMeHg-SG付加体のモノエチル誘導体を用いた

最近の検討より、その実態が初めて証明されている(Yoshida *et al.*, 2014)。MeHg-SG付加体は胆汁中に比較的効率よく排泄されるが、排泄後、 γ -グルタミルトランスペプチダーゼによって水解され、システインとの複合体となって腸管から再吸収される(腸肝循環)。このため、MeHgは糞中には殆ど排泄されない。実際、MeHgは脳と同様、肝臓に高濃度に蓄積されることが知られている(Rodrigues *et al.*, 2010; Yasutake *et al.*, 1997)。我々は、この知見をヒントにして、肝臓を対象に研究を開始し、肝臓に局在しかつ主要なマンガン結合タンパク質であるアルギナーゼIがMeHg曝露により*in vivo*および*in vitro*で活性低下すること、不溶化を呈することなどを明らかにした(Kanda *et al.*, 2008b)。

MeHgの毒性発現の実体を解明するためには、従来の研究とは異なるアプローチが必要と判断して、本研究では、これまでに積み上げてきたアルギナーゼに関する研究成果を基盤として、タンパク質の不溶化という現象に着目し、ケミカルバイオロジー的なアプローチを駆使して標的タンパク質を探索することにした。このようなことから、まずひとつの例として、アルギナーゼIの粗精製酵素液を用いて、図22に示す順序で研究

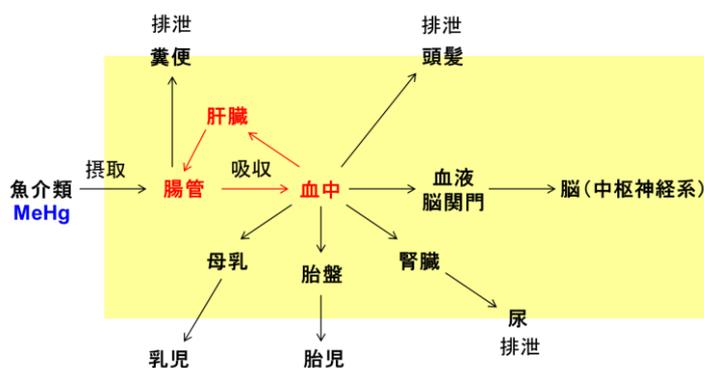


図21 MeHgの体内動態

を進めた。なお、アルギナーゼで得られた知見以外に、不溶化に着目した理由は、以下のとおりである。

- 多くのタンパク質は溶解した状態が本来の姿であるが、一般に立体構造が崩れた変性状態では、分子内に埋もれていた疎水性（非極性）のアミノ酸（側鎖）が露出するため、分子間の疎水相互作用が強まり不溶化することが考えられる。
- SH 基は弱い酸性基であるため、タンパク質の S-水銀化は、タンパク質の構造変化だけでなく、等電点の変化に伴う不溶化をもたらすことが考えられる。
- 水銀は主に不溶性の画分で見出されることが知られている (Bebiano *et al.*, 2007; Das *et al.*, 2006; Decataldo *et al.*, 2004) が、MeHg の標的となる不溶化分子は把握されていない。
- 他の病態では、アルツハイマー病でのアミロイドベータペプチドとタウタンパク質 (LaFeria *et al.*, 2008)、あるいは白内障での水晶体を構成するクリスタリンなどのタンパク質 (Das *et al.*, 2011) の不溶化が報告されている。これらのタンパク質の不溶化が生成されるメカニズムはまだ解明されていないが、タンパク質の化学修飾および構造変化（変性）が原因と考えられている。

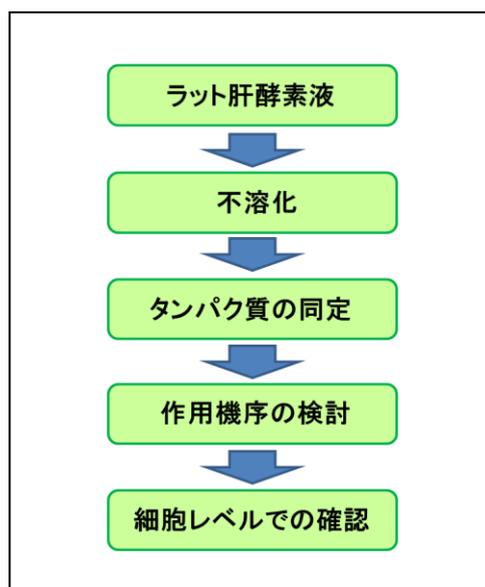


図 22 研究戦略

急性毒性では慢性毒性に比し、神経毒性が強いと言えるが、それらの毒性の違いは厳密には定義されていない。本研究は、100 μM の MeHg とラット肝酵素溶液を反応させて、S-水銀化で不溶化するタンパク質をスクリーニングした。これは、ラットに 10 mg/kg の MeHg を 8 日間皮下投与した急性中毒モデルの 6 日目の肝臓中濃度 (200 μM) (Kanda *et al.*, 2008b) の約半分の濃度である。研究の背景に記したように、日本人の 1 日水銀摂取量は 8.4 μg と報告されており (厚生労働省, 2003)、日々の生活を営む上では肝臓中の MeHg の濃度が 100 μM という濃度になることは考えにくいですが、MeHg は体内に残留することを考慮すると、慢性毒性を反映する実験系ではないと断定することはできない。更に、組み換え体を用いた実験では、実験に用いた 10 μM という最低濃度でも MeHg は SDH を不溶化することが明らかであったことから (図 12A)、いつ何時 MeHg の不溶化による慢性毒性が惹起されないとも限らない。

研究の背景でも記したとおり、一般的に、親電子性物質に対する細胞応答は二相性である (Levonen *et al.*, 2014)。すなわち、低濃度で防御性のシグナル経路が活性化され、高濃度で細胞死が引き起こされる。高濃度曝露時に観察される非意図的な S-水銀化は、

pKa 値の高い SH 基を有するタンパク質や酵素の構造やその活性をも変化させ、結果的に生体内恒常性の破綻を引き起こす (図 1)。以上より、この度の研究は、比較的高濃度曝露時の影響を評価したものと言えよう。

MeHg により S-水銀化を介して不溶化するタンパク質として、新たに SDH が同定された。SDH は、糖代謝の副経路として知られるポリオール代謝経路で、ソルビトールをフルクトースに変換する酵素である。組み換え体による実験で、MeHg はタンパク質の活性を阻害し、不溶化を引き起こすことを見出した。研究の背景に記したとおり、現在までに提唱されている MeHg による主要な毒性発現メカニズムは、酸化ストレス、細胞内 Ca^{2+} の増加、グルタミン酸の取り込み障害、タンパク質合成阻害、微小管障害があげられたが、そのいずれにも関係しないタンパク質であると考えられた。ヒトでの SDH 欠損症は知られていないが、高血糖状態が持続すると、SDH の働きが追い付かず、ソルビトールが細胞内に大量に蓄積されるようになる。これにより細胞内の浸透圧が高くなり、細胞内に水分が取り込まれ、細胞の機能が障害される。更に、SDH の代わりとなる酵素の存在も報告されていない。興味深いことに、MeHg による毒性には、一部浮腫形成が関与している可能性 (浮腫説) が提唱されている。従って、MeHg が SDH の機能破綻を引き起こし、同様の状態になっているのではないかと考えた。しかし予想に反して、細胞を使った検討では、MeHg は SDH 活性に影響を及ぼさなかった (図 18)。そこでなぜ MeHg は SDH に対しては影響を及ぼさず、同じ肝臓中酵素であるアルギナーゼ I には影響を及ぼしたのか、各々を比較して考察することにした。表 5 に主な違いをまとめる。

表 5 ラット肝 SDH とアルギナーゼ I の特徴の比較

特徴	SDH	アルギナーゼ I
機能	触媒作用	触媒作用
触媒	ソルビトール+NAD ⁺ → フルクトース+NADH+H ⁺ (ポリオール代謝経路)	アルギニン+H ₂ O→ オルニチン+尿素 (尿素サイクル)
構成アミノ酸数	356 個	323 個
システイン残基数	10 個	3 個
分子量	38~42 kDa	35~39 kDa
複合タンパク質	金属タンパク質 (Zn ²⁺)	金属タンパク質 (Mn ²⁺)
金属イオンへのシステイン残基の配位	あり	なし
細胞内局在	細胞質	細胞質
補酵素	NAD 要求性	不要

特徴	SDH	アルギナーゼ I
サブユニット	4つ	3つ
欠損症（ヒト）	知られていない（但し、高血糖状態持続で SDH の働きが追い付かず、細胞機能障害を誘発）	アルギナーゼ欠損症（アルギニン血症、運動神経障害、精神遅延、高アンモニア血症を誘発）
代償	知られていない	非肝型アルギナーゼ（?）
個体あるいは細胞レベルでの MeHg の影響	なし	あり

両タンパク質ともに、細胞質に存在し、大きさもそれほど大きな違いがあるわけではない。また、システイン残基数はアルギナーゼ I よりもむしろ SDH の方が多く、構造や機能維持に重要な役割を果たしている金属イオンへのシステイン残基の配位も SDH のみみられた。一連の情報によると、SDH の方が MeHg への感受性が高いように思えるが、細胞や個体レベルではその逆の結果であった。これに関しては、実験でも明らかにしたとおり、NAD⁺の関与が最も大きいと考えられた。アルギナーゼ I では補酵素を必要としないのに対して、SDH では NAD⁺を必要とし、NAD⁺結合ドメインが S-水銀化を受ける Cys44 の近傍に存在する。また、GAPDH を含めた我々の報告 (Miura *et al.*, 2011b) 以外にも、NEM などによる脱水素酵素の SH 基修飾を補酵素が保護したことが報告されている (Okamura-Ikeda *et al.*, 1985; Latruffe *et al.*, 1980)。細胞および個体レベルでは、エネルギー代謝等により NAD⁺が常に数 mM 存在することから、MeHg による親電子攻撃から本ピリジンヌクレオチドは SDH を保護していることが想定される。一方、肝臓で合成されるべき NAD⁺が欠乏した場合の疾患としてはペラグラがあげられるが、このように細胞中の NAD⁺が不足した状態では、十分な SDH 活性が発揮されないだけでなく、MeHg による SDH 活性の阻害を受けることが考えられる。昨今の食生活からビタミン欠乏は考えにくい、嗜好品の過剰摂取や生活環境等に由来する近代型ビタミン欠乏症は少なくなく、ヒトでの MeHg による感受性の個体差を考察する上で重要かもしれない。

NAD あるいは NADP 依存性の生体反応は 400 種類以上と言われている (Kirkland, 2012)。また、生体内の酵素は少なくとも約 4000 種類の生化学反応を触媒することから (Bairoch, 2000)、おおよそ 10%もの酵素が NAD あるいは NADP 依存性である可能性がある。従って、細胞あるいは個体レベルで、何らかの NAD 依存性酵素が MeHg の影響を受けていても不思議ではない。しかし、現在までに提唱されている主要な MeHg 毒性発現メカニズムに関連する可能性がある S-水銀化タンパク質 (表 2) には、NAD 依存性酵素はみられなかった。更に、NAD⁺は脱水素酵素の補酵素として働いていることがよく知られているため、細胞あるいは個体レベルで MeHg によって活性に影響を受ける脱水素酵素があるかどうか調査した結果、わずか 2 つの報告 [3β-ヒドロキシ-Δ5-

ステロイドデヒドロゲナーゼ (Vachhrajani *et al.*, 1990) および乳酸脱水素酵素 (軽度の活性低下) (Matsuoka *et al.*, 1992)] があるのみであった。一方、MeHg 曝露の影響を受けない脱水素酵素の報告は数多くみられた。それらは、SDH と同じタンパク質ファミリーであるアルコールデヒドロゲナーゼ (Ohmiya and Nakai, 1977; Sano *et al.*, 1990)、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ (Donaldson and Gubler, 1978; Grundt *et al.*, 1982)、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ (Fowler and Woods, 1977) および乳酸脱水素酵素 (Vendrell, *et al.*, 2007) であった。このように、MeHg の影響を受けない酵素群が数多く報告されていることは、重要な意味をもっていると考えられた。

本研究では、細胞内に数 mM で存在する GSH で同様の検討は行わなかったが、前述のとおり、MeHg は肝臓に移行した後、一部は GSH と結合して存在するため、GSH も親電子性物質の重要なリスク軽減因子のひとつと考えられてきた。しかし、上述したとおり、我々は最近、MeHg-SG 付加体は Nrf2 活性化の負の制御タンパク質である Keap1 を始めとする細胞内タンパク質の SH 基と反応する “S-トランス水銀化” の実態を明らかにした (Yoshida *et al.*, 2014)。このことは、MeHg が MeHg-SG 付加体を形成し、速やかに MRP を介して本付加体が細胞外へ排泄されることが細胞内での毒性低下に重要であることを示唆している。それ故、GSH 合成の律速酵素である γ -グルタミルシステイン合成酵素 (GCL)、および MRP の転写誘導を一括制御している転写因子 Nrf2 は、MeHg のリスク軽減因子であることが示唆される。これに一致して、MeHg およびその GSH 付加体は Keap1 の SH 基をそれぞれ化学修飾 (S-水銀化および S-トランス水銀化) して Nrf2 を活性化した (Toyama *et al.*, 2007; 2011; Yoshida *et al.*, 2014)。

本研究では、先行研究であるアルギナーゼに関する研究成果を基盤として、アルギナーゼ I の粗精製酵素液を用いて新たな不溶化タンパク質を探索することに成功した。しかしその一方で、SDH の補酵素 NAD⁺ が MeHg の標的となるシステイン残基への S-水銀化を抑制するという知見も得られた。したがって、ピリジンヌクレオチドを補酵素として、かつ本結合部位近傍に MeHg と反応する SH 基を有する酵素タンパク質は、MeHg に対する抵抗性を有することが少なからず考えられる。

謝辞

本研究は実に多くの人の支えのもとで行われました。

筑波大学人間総合科学研究科教授の熊谷嘉人先生には、1998年に修士学位を取得した後、社会人として医薬品の研究開発に従事する中、筑波大学大学院での研究を継続することをご指導いただきました。生涯にわたり医療に貢献するために、自身を益々磨く取り組みとして、仕事以外でも基礎科学に触れ、国際的な論文公表や発表を通じて論理展開の能力を高めることを目標としてきました。その結果、本研究を含め、その間の成果を世界で特に権威ある毒性学領域の医学雑誌である *Archives of Toxicology* に3編の刊行を行うことができました。また、日本毒性学会が発行する *The Journal of Toxicological Sciences* へ2013年以降で最初の総説を執筆させていただきました。現在の私があるのは、一重に熊谷先生のご指導ご鞭撻の所以であると感じております。心より深く御礼申し上げます。

筑波大学の新開泰弘助教、外山喬士博士、菊島真博士には、本当に多くのことをご指導とご助言を頂き、実務の面でも大変お世話になりました。これら3人の先生方がいらっしゃらなければ、本研究は成し遂げられることはありませんでした。長年に渡り支えていただきましたこと、厚く御礼申し上げます。

また、本研究を遂行するにあたり、分析、有益なご助言、貴重な試料のご提供を頂いた以下の先生方に、この書面をお借りして謹んで御礼申し上げます。

麒麟麦酒株式会社 岩松明彦先生、神田あづさ先生 ・機器分析

東京理科大学 鍛冶利幸教授 ・ご助言

徳島文理大学 角大悟准教授 ・ご助言

国立水俣病総合研究センター 安武章博士 ・ご助言

東北大学 永沼章教授 ・細胞のご提供

熊本大学 森正敬博士、後藤知己博士 ・抗体のご提供

筑波大学 下條信弘博士 ・奨励

最後に、研究室を支えてくださった、秘書の広瀬玲子氏をはじめ、研究室の全メンバーに心から感謝申し上げます。

引用文献

Abe, T., Haga, T. and Kurokawa, M. (1975): Blockage of axoplasmic transport and depolymerisation of reassembled microtubules by methyl mercury. *Brain Res.*, **86**, 504-508.

Aizenman, E., Lipton, S.A. and Loring, R.H. (1989): Selective modulation of NMDA responses by reduction and oxidation. *Neuron*, **2**, 1257-1263.

Ali, S.F., LeBel, C.P. and Bondy, S.C. (1992): Reactive oxygen species formation as a biomarker of methylmercury and trimethyltin neurotoxicity. *Neurotoxicology*, **13**, 637-648.

Araie, H. and Shiraiwa, Y. (2009): Selenium utilization strategy by microalgae. *Molecules*, **14**, 4880-4891.

Aschner, M. (2000): Astrocytic swelling, phospholipase A2, glutathione and glutamate: interactions in methylmercury-induced neurotoxicity. *Cell. Mol. Biol.*, **46**, 843-854.

Aschner, M., Cherian, M.G., Klaassen, C.D., Palmiter, R.D., Erickson, J.C. and Bush, A.I. (1997): Metallothioneins in brain—the role in physiology and pathology. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **142**, 229-242.

Aschner, M., Yao, C.P., Allen, J.W. and Tan, K.H. (2000): Methylmercury alters glutamate transport in astrocytes. *Neurochem. Int.*, **37**, 199-206.

Atchison, W.D. and Hare, M.F. (1994): Mechanisms of methylmercury-induced neurotoxicity.

FASEB J., **8**, 622-629.

Bairoch, A. (2000): The ENZYME database in 2000. *Nucleic Acids Res.*, **28**, 304-305.

Bebianno, M.J., Santos, C., Canário, J., Gouveia, N., Sena-Carvalho, D., and Vale, C. (2007): Hg and metallothionein-like proteins in the black scabbardfish *Aphanopus carbo*. *Food Chem. Toxicol.*, **45**, 1443-1452.

Berstein, G., Haga, K., Haga, T. and Ichiyama, A. (1988): Agonist and antagonist binding of muscarinic acetylcholine receptors purified from porcine brain: interconversion of high- and low-affinity sites by sulfhydryl reagents. *J. Neurochem.*, **50**, 1687-1694.

Blacksmith Institute (2010): World's Worst Pollution Problems Report 2010.

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.

Braestrup, C. and Andersen, P.H. (1987): Effects of heavy metal cations and other sulfhydryl reagents on brain dopamine D1 receptors: evidence for involvement of a thiol group in the conformation of the active site. *J. Neurochem.*, **48**, 1667-1672.

Branco, V., Canário, J., Holmgren, A. and Carvalho, C. (2011): Inhibition of the thioredoxin system in the brain and liver of zebra-seabreams exposed to waterborne methylmercury. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **251**, 95-103.

Britto, P.J., Knipling, L. and Wolff, J. (2002): The local electrostatic environment determines cysteine reactivity of tubulin. *J. Biol. Chem.*, **277**, 29018-29027.

Carvalho, M.C., Franco, J.L., Ghizoni, H., Kobus, K., Nazari, E.M., Rocha, J.B., Nogueira, C.W., Dafre, A.L., Müller, Y.M. and Farina, M. (2007): Effects of 2,3-dimercapto-1-propanesulfonic acid (DMPS) on methylmercury-induced locomotor deficits and cerebellar toxicity in mice. *Toxicology*, **239**, 195-203.

Carvalho, C.M., Lu, J., Zhang, X., Arnér, E.S. and Holmgren, A. (2011): Effects of selenite and chelating agents on mammalian thioredoxin reductase inhibited by mercury: implications for treatment of mercury poisoning. *FASEB J.*, **25**, 370-381.

Cavanagh, J.B. and Chen, F.C. (1971): Amino acid incorporation in protein during the "silent phase" before organo-mercury and *p*-bromophenylacetylurea neuropathy in the rat. *Acta Neuropathol.*, **19**, 216-224.

Chang, L.W. (1990): The neurotoxicology and pathology of organomercury, organolead, and organotin. *J. Toxicol. Sci.*, **15**, 125-151.

Cheung, M.K. and Verity, M.A. (1985): Experimental methyl mercury neurotoxicity: locus of mercurial inhibition of brain protein synthesis *in vivo* and *in vitro*. *J. Neurochem.*, **44**, 1799-1808.

Chiu, V.C., Mouring, D. and Haynes, D.H. (1983): Action of mercurials on the active and passive transport properties of sarcoplasmic reticulum. *J. Bioenerg. Biomembr.*, **15**, 13-25.

Choi, B.H., Lapham, L.W., Amin-Zaki, L. and Saleem, T. (1978): Abnormal neuronal migration, deranged cerebral cortical organization, and diffuse white matter astrocytosis of human fetal brain: a major effect of methylmercury poisoning in utero. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, **37**, 719-733.

Chuu, J.J., Liu, S.H. and Lin-Shiau, S.Y. (2001): Effects of methyl mercury, mercuric sulfide and cinnabar on active avoidance responses, Na^+/K^+ -ATPase activities and tissue mercury contents in rats. *Proc. Natl. Sci. Counc. Repub. China B*, **25**, 128-136.

Clapham, D.E. (2007): Calcium signaling. *Cell*, **131**, 1047-1058.

Clarkson, T.W. (1987): Metal toxicity in the central nervous system. *Environ. Health Perspect.*, **75**, 59-64.

Coccini, T., Randine, G., Candura, S.M., Nappi, R.E., Prockop, L.D. and Manzo, L. (2000): Low-level exposure to methylmercury modifies muscarinic cholinergic receptor binding characteristics in rat brain and lymphocytes: physiologic implications and new opportunities in biologic monitoring. *Environ. Health Perspect.*, **108**, 29-33.

Committee on the Toxicological Effects of Methylmercury (2000): Toxicological effects of methylmercury, National Academy Press, Washington, DC.

Cuajungco, M.P. and Lees, G.J. (1997): Zinc metabolism in the brain: relevance to human neurodegenerative disorders. *Neurobiol. Dis.*, **4**, 137-169.

Das, K., De Groof, A., Jauniaux, T., and Bouquegneau, J.M. (2006): Zn, Cu, Cd and Hg binding to metallothioneins in harbour porpoises *Phocoena phocoena* from the southern North Sea. *BMC Ecol.*, **6**, 2.

Das, P., King, J.A. and Zhou, R. (2011): Aggregation of γ -crystallins associated with human cataracts via domain swapping at the C-terminal β -strands. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **108**, 10514-10519.

Decataldo, A., Leo, A.D., Giandomenico, S., and Cardellicchio, N. (2004): Association of metals (mercury, cadmium and zinc) with metallothionein-like proteins in storage organs of stranded dolphins from the Mediterranean sea (Southern Italy). *J. Environ. Monit.*, **6**, 361-367.

Denny, M.F. and Atchison, W.D. (1996): Mercurial-induced alterations in neuronal divalent cation homeostasis. *Neurotoxicology*, **17**, 47-61.

Donaldson, M.L. and Gubler, C.J. (1978): Biochemical effects of mercury poisoning in rats. *Am. J. Clin. Nutr.*, **31**, 859-864.

Dreiem, A. and Seegal, R.F. (2007): Methylmercury-induced changes in mitochondrial function in striatal synaptosomes are calcium-dependent and ROS-independent. *Neurotoxicology*, **28**,

720-726.

Farina, M., Aschner, M. and Rocha, J.B. (2011): Oxidative stress in MeHg-induced neurotoxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **256**, 405-417.

Farina, M., Campos, F., Vendrell, I., Berenguer, J., Barzi, M., Pons, S. and Suñol, C. (2009): Probucol increases glutathione peroxidase-1 activity and displays long-lasting protection against methylmercury toxicity in cerebellar granule cells. *Toxicol. Sci.*, **112**, 416-426.

Farina, M., Dahm, K.C., Schwalm, F.D., Brusque, A.M., Frizzo, M.E., Zeni, G., Souza, D.O. and Rocha, J.B. (2003a): Methylmercury increases glutamate release from brain synaptosomes and glutamate uptake by cortical slices from suckling rat pups: modulatory effect of ebselen. *Toxicol. Sci.*, **73**, 135-140.

Farina, M., Frizzo, M.E., Soares, F.A., Schwalm, F.D., Dietrich, M.O., Zeni, G., Rocha, J.B. and Souza, D.O. (2003b): Ebselen protects against methylmercury-induced inhibition of glutamate uptake by cortical slices from adult mice. *Toxicol. Lett.*, **144**, 351-357.

Faro, L.R., do Nascimento, J.L., Alfonso, M. and Durán, R. (2002): Mechanism of action of methylmercury on *in vivo* striatal dopamine release. Possible involvement of dopamine transporter. *Neurochem. Int.*, **40**, 455-465.

Faro, L.R., do Nascimento, J.L., Campos, F., Vidal, L., Alfonso, M. and Durán, R. (2005): Protective effects of glutathione and cysteine on the methylmercury-induced striatal dopamine

release *in vivo*. Life Sci., **77**, 444-451.

Faro, L.R., do Nascimento, J.L., San José, J.M., Alfonso, M. and Durán, R. (2000): Intrastriatal administration of methylmercury increases *in vivo* dopamine release. Neurochem. Res., **25**, 225-229.

Fonfría, E., Rodríguez-Farré, E. and Suñol, C. (2001): Mercury interaction with the GABA(A) receptor modulates the benzodiazepine binding site in primary cultures of mouse cerebellar granule cells. Neuropharmacology, **41**, 819-833.

Fonnum, F. and Lock, E.A. (2004): The contributions of excitotoxicity, glutathione depletion and DNA repair in chemically induced injury to neurones: exemplified with toxic effects on cerebellar granule cells. J. Neurochem., **88**, 513-531.

Fowler, B.A. and Woods, J.S. (1977): The transplacental toxicity of methyl mercury to fetal rat liver mitochondria. Morphometric and biochemical studies. Lab. Invest., **36**, 122-130.

Franco, J.L., Posser, T., Dunkley, P.R., Dickson, P.W., Mattos, J.J., Martins, R., Bainy, A.C., Marques, M.R., Dafre, A.L. and Farina, M. (2009): Methylmercury neurotoxicity is associated with inhibition of the antioxidant enzyme glutathione peroxidase. Free Radic. Biol. Med., **47**, 449-457.

Freitas, A.J., Rocha, J.B., Wolosker, H. and Souza, D.O. (1996): Effects of Hg²⁺ and CH₃Hg⁺ on Ca²⁺ fluxes in rat brain microsomes. Brain Res., **738**, 257-264.

Garg, T.K. and Chang, J.Y. (2006): Methylmercury causes oxidative stress and cytotoxicity in microglia: attenuation by 15-deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J2. *J. Neuroimmunol.*, **171**, 17-28.

Glaser, V., Nazari, E.M., Müller, Y.M., Feksa, L., Wannmacher, C.M., Rocha, J.B., de Bem, A.F., Farina, M. and Latini, A. (2010): Effects of inorganic selenium administration in methylmercury-induced neurotoxicity in mouse cerebral cortex. *Int. J. Dev. Neurosci.*, **28**, 631-637.

Gotoh, T., Sonoki, T., Nagasaki, A., Terada, K., Takiguchi, M., and Mori, M. (1996): Molecular cloning of cDNA for nonhepatic mitochondrial arginase (arginase II) and comparison of its induction with nitric oxide synthase in a murine macrophage-like cell line. *FEBS Lett.*, **395**, 119-122.

Grundt, I.K., Roux, F., Treich, I., Loriette, C., Raulin, J., Fournier, E. (1982): Effects of methyl mercury and triethyllead on Na⁺K⁺ATPase and pyruvate dehydrogenase activities in glioma C6 cells. *Acta Pharmacol. Toxicol.*, **51**, 6-11.

Halliwell, B. (1992): Reactive oxygen species and the central nervous system. *J. Neurochem.*, **59**, 1609-1623.

Hare, M.F., McGinnis, K.M. and Atchison, W.D. (1993): Methylmercury increases intracellular concentrations of Ca⁺⁺ and heavy metals in NG108-15 cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **266**,

1626-1635.

Hellgren, M., Kaiser, C., de Haij, S., Norberg, A. and Höög, J.O. (2007): A hydrogen-bonding network in mammalian sorbitol dehydrogenase stabilizes the tetrameric state and is essential for the catalytic power. *Cell Mol. Life Sci.*, **64**, 3129-3138.

Henzel, W.J., Billeci, T.M., Stults, J.T., Wong, S.C., Grimley, C. and Watanabe, C. (1993): Identifying proteins from two-dimensional gels by molecular mass searching of peptide fragments in protein sequence databases. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **90**, 5011-5015.

Hirooka, T., Fujiwara, Y., Shinkai, Y., Yamamoto, C., Yasutake, A., Satoh, M., Eto, K. and Kaji, T. (2010): Resistance of human brain microvascular endothelial cells in culture to methylmercury: cell-density-dependent defense mechanisms. *J. Toxicol. Sci.*, **35**, 287-294.

Hirota, Y., Yamaguchi, S., Shimojoh, N. and Sano, K.I. (1980): Inhibitory effect of methylmercury on the activity of glutathione peroxidase. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **53**, 174-176.

Hirsch-Kolb, H., Kolb, H.J., and Greenberg, D.M. (1971): Nuclear magnetic resonance studies of manganese binding of rat liver arginase. *J. Biol. Chem.*, **246**, 395-401.

Hwang, G.W., Hayashi, T., Kita, K., Takahashi, T., Kuge, S. and Naganuma, A. (2007): siRNA-mediated inhibition of phosphatidylinositol glycan Class B (PIGB) confers resistance to methylmercury in HEK293 cells. *J. Toxicol. Sci.*, **32**, 581-583.

Hwang, G.W., Kimura, Y., Takahashi, T., Lee, J.Y. and Naganuma, A. (2012a): Identification of deubiquitinating enzymes involved in methylmercury toxicity in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Toxicol. Sci.*, **37**, 1287-1290.

Hwang, G.W., Lee, J.Y., Kim, M.S., Sato, M., Takahashi, T. and Naganuma, A. (2013a): Changes in the levels of low molecular weight metabolites in the mouse cerebellum following treatment with methylmercury. *J. Toxicol. Sci.*, **38**, 703-706.

Hwang, G.W., Lee, J.Y., Ryoke, K., Matsuyama, F., Kim, J.M., Takahashi, T. and Naganuma, A. (2011a): Gene expression profiling using DNA microarray analysis of the cerebellum of mice treated with methylmercury. *J. Toxicol. Sci.*, **36**, 389-391.

Hwang, G.W., Mastuyama, F., Takahashi, T., Lee, J.Y. and Naganuma, A. (2013b): Deletion of the ubiquitin-conjugating enzyme Ubc2 confers resistance to methylmercury in budding yeast by promoting Whi2 degradation. *J. Toxicol. Sci.*, **38**, 301-303.

Hwang, G.W. and Naganuma, A. (2006): DNA microarray analysis of transcriptional responses of human neuroblastoma IMR-32 cells to methylmercury. *J. Toxicol. Sci.*, **31**, 537-538.

Hwang, G.W., Ogiwara, Y., Takahashi, T. and Naganuma, A. (2012b): Ubiquitin-conjugating enzyme Cdc34 mediates methylmercury resistance in *Saccharomyces cerevisiae* by increasing Whi2 degradation. *J. Toxicol. Sci.*, **37**, 1283-1286.

Hwang, G.W., Oh, S.E., Takahashi, T., Lee, J.Y. and Naganuma, A. (2010a): siRNA-mediated knockdown of the melanocortin 2 receptor accessory protein 2 (MRAP2) gene confers resistance to methylmercury on HEK293 cells. *J. Toxicol. Sci.*, **35**, 947-950.

Hwang, G.W., Ryoike, K., Lee, J.Y., Takahashi, T. and Naganuma, A. (2011b): siRNA-mediated silencing of the gene for heat shock transcription factor 1 causes hypersensitivity to methylmercury in HEK293 cells. *J. Toxicol. Sci.*, **36**, 851-853.

Hwang, G.W., Ryoike, K., Takahashi, T. and Naganuma, A. (2010b): Silencing of the gene for homeobox protein HOXB13 by siRNA confers resistance to methylmercury on HEK293 cells. *J. Toxicol. Sci.*, **35**, 941-944.

Hwang, G.W., Tobita, M., Takahashi, T., Kuge, S., Kita, K. and Naganuma, A. (2010c): siRNA-mediated AMPK α 1 subunit gene PRKAA1 silencing enhances methylmercury toxicity in HEK293 cells. *J. Toxicol. Sci.*, **35**, 601-604.

Hwang, G.W., Wada, N., Kuge, S. and Naganuma, A. (2009): Overexpression of the novel F-box protein Ymr258c confers resistance to methylmercury in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Toxicol. Sci.*, **34**, 413-416.

Ida, T., Sawa, T., Ihara, H., Tsuchiya, Y., Watanabe, Y., Kumagai, Y., Suematsu, M., Motohashi, H., Fujii, S., Matsunaga, T., Yamamoto, M., Ono, K., Devarie-Baez, N.O., Xian, M., Fukuto, J.M. and Akaike, T. (2014): Reactive cysteine persulfides and S-polythiolation regulate oxidative stress and redox signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **111**, 7606-7611.

Iwamatsu, A. and Yoshida-Kubomura, N. (1996): Systematic peptide fragmentation of polyvinylidene difluoride (PVDF)-immobilized proteins prior to microsequencing. *J. Biochem.*, **120**, 29-34.

Jacob, H.S. and Jandl, J.H. (1962): Effects of sulfhydryl inhibition on red blood cells. I. Mechanism of hemolysis. *J. Clin. Invest.*, **41**, 779-792.

Jeffery, J. and Jörnvall, H. (1988): Sorbitol dehydrogenase. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.*, **61**, 7-106.

Johansson, K., El-Ahmad, M., Kaiser, C., Jörnvall, H., Eklund, H., Höög, J. and Ramaswamy, S. (2001): Crystal structure of sorbitol dehydrogenase. *Chem. Biol. Interact.*, **130-132**, 351-358.

Jones, D.P. (2008): Radical-free biology of oxidative stress. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **295**, C849-868.

Karlsson, C., Jörnvall, H. and Höög, J.O. (1991): Sorbitol dehydrogenase: cDNA coding for the rat enzyme. Variations within the alcohol dehydrogenase family independent of quaternary structure and metal content. *Eur. J. Biochem.*, **198**, 761-765.

Kanyo, Z.F., Scolnick, L.R., Ash, D.E., and Christianson, D.W. (1996): Structure of a unique binuclear manganese cluster in arginase. *Nature* **383**, 554-557.

Kanda, H., Kikushima, M., Homma-Takeda, S., Sumi, D., Endo, A., Toyama, T., Miura, N., Naganuma, A. and Kumagai, Y. (2008a): Downregulation of arginase II and renal apoptosis by inorganic mercury: overexpression of arginase II reduces its apoptosis. *Arch. Toxicol.*, **82**, 67-73.

Kanda, H., Shinkai, Y. and Kumagai, Y. (2014): S-Mercuration of cellular proteins by methylmercury and its toxicological implications. *J. Toxicol. Sci.*, **39**, 687-700.

Kanda, H., Sumi, D., Endo, A., Toyama, T., Chen, C.L., Kikushima, M. and Kumagai, Y. (2008b): 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.

Kanda, H., Toyama, T., Shinohara-Kanda, A., Iwamatsu, A., Shinkai, Y., Kaji, T., Kikushima, M. and Kumagai, Y. (2012): S-Mercuration of rat sorbitol dehydrogenase by methylmercury causes its aggregation and the release of the zinc ion from the active site. *Arch. Toxicol.*, **86**, 1693-1702.

Kawamoto, S., Amaya, Y., Murakami, K., Tokunaga, F., Iwanaga, S., Kobayashi, K., Saheki, T., Kimura, S. and Mori, M. (1987): Complete nucleotide sequence of cDNA and deduced amino acid sequence of rat liver arginase. *J. Biol. Chem.*, **262**, 6280-6283.

Kim, M.S., Takahashi, T., Lee, J.Y., Hwang, G.W. and Naganuma, A. (2012): Methylmercury induces CCL2 expression through activation of NF- κ B in human 1321N1 astrocytes. *J. Toxicol. Sci.*, **37**, 1275-1278.

Kim, M.S., Takahashi, T., Lee, J.Y., Hwang, G.W. and Naganuma, A. (2013): Global chemokine expression in methylmercury-treated mice: methylmercury induces brain-specific expression of CCL3 and CCL4. *J. Toxicol. Sci.*, **38**, 925-929.

Kinoshita, Y., Ohnishi, A., Kohshi, K. and Yokota, A. (1999): Apparent diffusion coefficient on rat brain and nerves intoxicated with methylmercury. *Environ. Res.*, **80**, 348-354.

Kirkland, J.B. (2012): Niacin requirements for genomic stability. *Mutat. Res.*, **733**, 14-20.

Kiskin, N.I., Krishtal, O.A., Tsyndrenko, A.Ya and Akaike, N. (1986): Are sulfhydryl groups essential for function of the glutamate-operated receptor-ionophore complex? *Neurosci. Lett.*, **66**, 305-310.

Kosower, N.S. and Kosower, E.M. (1978): The glutathione status of cells. *Int. Rev. Cytol.*, **54**, 109-160.

Kromidas, L., Trombetta, L.D. and Jamall, I.S. (1990): The protective effects of glutathione against methylmercury cytotoxicity. *Toxicol. Lett.*, **51**, 67-80.

Kumagai, Y., Homma-Takeda, S., Shinyashiki, M. and Shimojo, N. (1997): Alterations in Superoxide Dismutase Isozymes by Methylmercury. *Appl. Organomet. Chem.*, **11**, 635-643.

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.

Kumagai, Y., Shinkai, Y., Miura, T. and Cho, A.K. (2012): The chemical biology of naphthoquinones and its environmental implications. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **52**, 221-247.

Kumagai, Y. and Sumi, D. (2007): Arsenic: signal transduction, transcription factor, and biotransformation involved in cellular response and toxicity. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **47**, 243-262.

LaFeria, F.K. (2008): Amyloid- β and tau in Alzheimer's disease. *Nat. Rev. Neurosci.*

Laube, B., Kuryatov, A., Kuhse, J. and Betz, H. (1993): Glycine-glutamate interactions at the NMDA receptor: role of cysteine residues. *FEBS Lett.*, **335**, 331-334.

LeBel, C.P., Ali, S.F. and Bondy, S.C. (1992): Deferoxamine inhibits methyl mercury-induced increases in reactive oxygen species formation in rat brain. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **112**, 161-165.

LeBel, C.P., Ali, S.F., McKee, M. and Bondy, S.C. (1990): Organometal-induced increases in oxygen reactive species: the potential of 2',7'-dichlorofluorescein diacetate as an index of neurotoxic damage. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **104**, 17-24.

Lee, J.Y., Hwang, G.W., Kim, M.S., Takahashi, T. and Naganuma, A. (2012): Methylmercury

induces a brain-specific increase in chemokine CCL4 expression in mice. *J. Toxicol. Sci.*, **37**, 1279-1282.

Lee, J.Y., Hwang, G.W. and Naganuma, A. (2009): Rip1 enhances methylmercury toxicity through production of reactive oxygen species (ROS) in budding yeast. *J. Toxicol. Sci.*, **34**, 715-717.

Latruffe, N., Brenner, S.C. and Fleischer, S. (1980): Essential sulfhydryl for reduced nicotinamide adenine dinucleotide binding in D-beta-hydroxybutyrate dehydrogenase. *Biochemistry*, **19**, 5285-5290.

Levonen, A.L., Hill, B.G., Kansanen, E., Zhang, J. and Darley-Usmar, V.M. (2014): Redox regulation of antioxidants, autophagy, and the response to stress: Implications for electrophile therapeutics. *Free Radic. Biol. Med.*, **71C**, 196-207.

Limke, T.L. and Atchison, W.D. (2002): Acute exposure to methylmercury opens the mitochondrial permeability transition pore in rat cerebellar granule cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **178**, 52-61.

Limke, T.L., Bearss, J.J. and Atchison, W.D. (2004): Acute exposure to methylmercury causes Ca²⁺ dysregulation and neuronal death in rat cerebellar granule cells through an M3 muscarinic receptor-linked pathway. *Toxicol. Sci.*, **80**, 60-68.

Limke, T.L., Otero-Montañez, J.K. and Atchison, W.D. (2003): Evidence for interactions

between intracellular calcium stores during methylmercury-induced intracellular calcium dysregulation in rat cerebellar granule neurons. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **304**, 949-958.

Lobanov, A.V., Hatfield, D.L. and Gladyshev, V.N. (2009): Eukaryotic selenoproteins and selenoproteomes. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1790**, 1424-1428.

Magour, S. (1986): Studies on the inhibition of brain synaptosomal Na⁺/K⁺-ATPase by mercury chloride and methyl mercury chloride. *Arch. Toxicol. Suppl.*, **9**, 393-396.

Manfroi, C.B., Schwalm, F.D., Cereser, V., Abreu, F., Oliveira, A., Bizarro, L., Rocha, J.B., Frizzo, M.E., Souza, D.O. and Farina, M. (2004): Maternal milk as methylmercury source for suckling mice: neurotoxic effects involved with the cerebellar glutamatergic system. *Toxicol. Sci.*, **81**, 172-178.

Maret, W. and Auld, D.S. (1988): Purification and characterization of human liver sorbitol dehydrogenase. *Biochemistry*, **27**, 1622-1628.

Martin D.P., Puerta D.T. and Cohen S.M. (2014): 14. Metalloprotein Inhibitors. *Ligand Design in Medicinal Inorganic Chemistry*, John Wiley & Sons, Ltd.

Matsuda, Y., Higashiyama, S., Kijima, Y., Suzuki, K., Kawano, K., Akiyama, M., Kawata, S., Tarui, S., Deutsch, H.F. and Taniguchi, N. (1990): Human liver manganese superoxide dismutase. Purification and crystallization, subunit association and sulfhydryl reactivity. *Eur. J. Biochem.*, **194**, 713-720.

Matsuoka, M., Inoue, N. and Igisu, H. (1992): Effects of methylmercury chloride on creatine kinase activity in the rat brain. *J. UOEH.*, **14**, 77-81.

Mekahli, D., Bultynck, G., Parys, J.B., De Smedt, H. and Missiaen, L. (2011): Endoplasmic-reticulum calcium depletion and disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **3**, 1-30.

Minnema, D.J., Cooper, G.P. and Greenland, R.D. (1989): Effects of methylmercury on neurotransmitter release from rat brain synaptosomes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **99**, 510-521.

Miura, K. and Imura, N. (1987): Mechanism of methylmercury cytotoxicity. *Crit. Rev. Toxicol.*, **18**, 161-188.

Miura, K., Koide, N., Himeno, S., Nakagawa, I. and Imura, N. (1999): The involvement of microtubular disruption in methylmercury-induced apoptosis in neuronal and nonneuronal cell lines. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **160**, 279-288.

Miura, N., Kaneko, S., Hosoya, S., Furuchi, T., Miura, K., Kuge, S. and Naganuma, A. (1999): Overexpression of L-glutamine:D-fructose-6-phosphate amidotransferase provides resistance to methylmercury in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.*, **458**, 215-218.

Miura, T., Kakehashi, H., Shinkai, Y., Egara, Y., Hirose, R., Cho, A.K. and Kumagai, Y. (2011a): GSH-mediated S-transarylation of a quinone glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

conjugate. *Chem. Res. Toxicol.*, **24**, 1836-1844.

Miura, T., Shinkai, Y., Hirose, R., Iwamoto, N., Cho, A.K. and Kumagai, Y. (2011b): Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase as a quinone reductase in the suppression of 1,2-naphthoquinone protein adduct formation. *Free Radic. Biol. Med.*, **51**, 2082-2089.

Miyataka, K., Gotoh, T., Nagasaki, A., Takeya, M., Ozaki, M., Iwase, K., Takiguchi, M., Iyama, K.I., Tomita, K., and Mori, M. (1998): Immunohistochemical localization of arginase II and other enzymes of arginine metabolism in rat kidney and liver. *Histochem. J.*, **30**, 741-751.

Mori, N., Yasutake, A. and Hirayama, K. (2007): Comparative study of activities in reactive oxygen species production/defense system in mitochondria of rat brain and liver, and their susceptibility to methylmercury toxicity. *Arch. Toxicol.*, **81**, 769-776.

Murayama, A., Raffin, J.P., Remy, P. and Ebel, J.P. (1975): Yeast phenylalanyl-tRNA synthetase: properties of the sulfhydryl groups; evidence for -SH requirement in tRNA acylation. *FEBS Lett.*, **53**, 15-22.

Naganuma, A., Miura, N., Kaneko, S., Mishina, T., Hosoya, S., Miyairi, S., Furuchi, T. and Kuge, S. (2000): GFAT as a target molecule of methylmercury toxicity in *Saccharomyces cerevisiae*. *FASEB J.*, **14**, 968-972.

Naganuma, A., Miura, K., Tanaka-Kagawa, T., Kitahara, J., Seko, Y., Toyoda, H. and Imura, N. (1998): Overexpression of manganese-superoxide dismutase prevents methylmercury toxicity in

HeLa cells. *Life Sci.*, **62**, PL157-161.

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.

Ohmiya, Y. and Nakai, K. (1977): Effect of methylmercury on the ethanol elimination from the blood and the activity of alcohol dehydrogenase. *Jpn. J. Pharmacol.*, **27**, 545-551.

Okamura-Ikeda, K., Ikeda, Y. and Tanaka, K. (1985): An essential cysteine residue located in the vicinity of the FAD-binding site in short-chain, medium-chain, and long-chain acyl-CoA dehydrogenases from rat liver mitochondria. *J. Biol. Chem.*, **260**, 1338-1345.

Oliveira, R.B., Gomes-Leal, W., do-Nascimento, J.L. and Picanço-Diniz, C.W. (1998): Methylmercury intoxication and histochemical demonstration of NADPH-diaphorase activity in the striate cortex of adult cats. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, **31**, 1157-1161.

Oppedisano, F., Galluccio, M. and Indiveri, C. (2010): Inactivation by Hg²⁺ and methylmercury of the glutamine/amino acid transporter (ASCT2) reconstituted in liposomes: Prediction of the involvement of a CXXC motif by homology modelling. *Biochem. Pharmacol.*, **80**, 1266-1273.

Palmer, R.F., Blanchard, S., Stein, Z., Mandell, D. and Miller, C. (2006): Environmental mercury release, special education rates, and autism disorder: an ecological study of Texas.

Health Place, **12**, 203-209.

Patel, E. and Reynolds, M. (2013): Methylmercury impairs motor function in early development and induces oxidative stress in cerebellar granule cells. *Toxicol. Lett.*, **222**, 265-272.

Peng, S., Hajela, R.K. and Atchison, W.D. (2002): Effects of methylmercury on human neuronal L-type calcium channels transiently expressed in human embryonic kidney cells (HEK-293). *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **302**, 424-432.

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.

Rasband, W.S. (1997): ImageJ. U.S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA.

<http://imagej.nih.gov/ij/>. Accessed 6 October 2006

Rodrigues, J.L., Serpeloni, J.M., Batista, B.L., Souza, S.S., Barbosa, F. Jr. (2010): Identification and distribution of mercury species in rat tissues following administration of thimerosal or methylmercury. *Arch. Toxicol.*, **84**, 891-896.

Reczkowski, R.S., and Ash, D.E. (1992): EPR evidence for binuclear Mn (II) centers in rat liver arginase. *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 10992-10994.

Ruppersberg, J.P., Stocker, M., Pongs, O., Heinemann, S.H., Frank, R. and Koenen, M. (1991):

Regulation of fast inactivation of cloned mammalian IK(A) channels by cysteine oxidation. *Nature*, **352**, 711-714.

Sager, P.R., Doherty, R.A. and Olmsted, J.B. (1983): Interaction of methylmercury with microtubules in cultured cells and *in vitro*. *Exp. Cell Res.*, **146**, 127-137.

Sakamoto, M., Ikegami, N. and Nakano, A. (1996): Protective effects of Ca²⁺ channel blockers against methyl mercury toxicity. *Pharmacol. Toxicol.*, **78**, 193-199.

Sano, K., Shimojo, N. and Yamaguchi, S. (1990): Effects of methylmercury on ethanol-induced sleeping time of mice. *Nihon Eiseigaku Zasshi.*, **45**, 717-722.

Sarafian, T.A. (1993): Methyl mercury increases intracellular Ca²⁺ and inositol phosphate levels in cultured cerebellar granule neurons. *J. Neurochem.*, **61**, 648-657.

Schimke, R.T. (1970): Arginase (rat liver). *Methods Enzymol.*, **17A**, 313-317.

Scolnick, L.R., Kanyo, Z.F., Cavalli, R.C., Ash, D.E., and Christianson, D.W. (1997) : Altering the binuclear manganese cluster of arginase diminishes thermostability and catalytic function. *Biochemistry* **36**, 10558-10565.

Shanker, G. and Aschner, M. (2001): Identification and characterization of uptake systems for cystine and cysteine in cultured astrocytes and neurons: evidence for methylmercury-targeted disruption of astrocyte transport. *J. Neurosci. Res.*, **66**, 998-1002.

Shinkai, Y., Sumi, D., Toyama, T., Kaji, T., Kumagai, Y. (2009): Role of aquaporin 9 in cellular accumulation of arsenic and its cytotoxicity in primary mouse hepatocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **237**, 232-236.

Shimai, S. and Satoh, H. (1985): Behavioral teratology of methylmercury. *J. Toxicol. Sci.*, **10**, 199-216.

Shinyashiki, M., Kumagai, Y., Homma-Takeda, S., Nagafune, J., Takasawa, N., Suzuki, J., Matsuzaki, I., Satoh, S., Sagai, M. and Shimojo, N. (1996): Selective inhibition of the mouse brain Mn-SOD by methylmercury. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, **2**, 359-366.

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.

Sidhu, A., Kassis, S., Keabian, J. and Fishman, P.H. (1986): Sulfhydryl group(s) in the ligand binding site of the D-1 dopamine receptor: specific protection by agonist and antagonist. *Biochemistry*, **25**, 6695-6701.

Simpson, R.B. (1961): Association constants of methylmercury with sulfhydryl and other bases. *J. Am. Chem. Soc.*, **83**, 4711-4717.

Sirois, J.E. and Atchison, W.D. (2000): Methylmercury affects multiple subtypes of calcium

channels in rat cerebellar granule cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **167**, 1-11.

Stringari, J., Nunes, A.K., Franco, J.L., Bohrer, D., Garcia, S.C., Dafre, A.L., Milatovic, D., Souza, D.O., Rocha, J.B., Aschner, M. and Farina, M. (2008): Prenatal methylmercury exposure hampers glutathione antioxidant system ontogenesis and causes long-lasting oxidative stress in the mouse brain. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **227**, 147-154.

Takahashi, T., Kim, M.S., Saito, T., Lee, J.Y., Hwang, G.W. and Naganuma, A. (2013): Brain-specific induction of secretoglobin 3A1 expression in mice treated with methylmercury. *J. Toxicol. Sci.*, **38**, 963-965.

Tan, X.X., Tang, C., Castoldi, A.F., Manzo, L. and Costa, L.G. (1993): Effects of inorganic and organic mercury on intracellular calcium levels in rat T lymphocytes. *J. Toxicol. Environ. Health*, **38**, 159-170.

Toyama, T., Shinkai, Y., Kaji, T. and Kumagai, Y. (2013): Convenient method to assess chemical modification of protein thiols by electrophilic metals. *J. Toxicol. Sci.*, **38**, 477-484.

Toyama, T., Shinkai, Y., Yasutake, A., Uchida, K., Yamamoto, M., Kumagai, Y. (2011): Isothiocyanates reduce mercury accumulation via an Nrf2-dependent mechanism during exposure of mice to methylmercury. *Environ. Health Perspect.*, **119**, 1117-1122.

Toyama, T., Sumi, D., Shinkai, Y., Yasutake, A., Taguchi, K., Tong, K.I., Yamamoto, M., Kumagai, Y. (2007): Cytoprotective role of Nrf2/Keap1 system in methylmercury toxicity.

Biochem. Biophys. Res. Commun., **363**, 645-650.

Toyama, T., Yoshida, E., Shinkai, Y. and Kumagai, Y. (2011): DNA microarray analysis of human neuroblastoma SH-SY5Y cells exposed to methylmercury. *J. Toxicol. Sci.*, **36**, 843-845.

Trotti, D., Danbolt, N.C. and Volterra, A. (1998): Glutamate transporters are oxidant-vulnerable: a molecular link between oxidative and excitotoxic neurodegeneration? *Trends Pharmacol. Sci.*, **19**, 328-334.

Trotti, D., Nussberger, S., Volterra, A. and Hediger, M.A. (1997a): Differential modulation of the uptake currents by redox interconversion of cysteine residues in the human neuronal glutamate transporter EAAC1. *Eur. J. Neurosci.*, **9**, 2207-2212

.

Trotti, D., Rizzini, B.L., Rossi, D., Haugeto, O., Racagni, G., Danbolt, N.C. and Volterra, A. (1997b): Neuronal and glial glutamate transporters possess an SH-based redox regulatory mechanism. *Eur. J. Neurosci.*, **9**, 1236-1243.

United Nations Environment Programme (2013): Global mercury assessment 2013. Sources, emissions, releases, and environmental transport., pp.42.

Wagner, C., Sudati, J.H., Nogueira, C.W. and Rocha, J.B. (2010): *In vivo* and *in vitro* inhibition of mice thioredoxin reductase by methylmercury. *Biometals*, **23**, 1171-1177.

Yasutake, A., Nakano, A., Miyamoto, K. and Eto, K. (1997): Chronic effects of methylmercury

in rats. I. Biochemical aspects. *Tohoku J. Exp. Med.*, **182**, 185-196.

Yee, S. and Choi, B.H. (1994): Methylmercury poisoning induces oxidative stress in the mouse brain. *Exp. Mol. Pathol.*, **60**, 188-196.

Yin, Z., Milatovic, D., Aschner, J.L., Syversen, T., Rocha, J.B., Souza, D.O., Sidoryk, M., Albrecht, J., and Aschner, M. (2007): Methylmercury induces oxidative injury, alterations in permeability and glutamine transport in cultured astrocytes. *Brain Res.*, **1131**, 1-10.

Yonaha, M., Saito, M. and Sagai, M. (1983): Stimulation of lipid peroxidation by methyl mercury in rats. *Life Sci.*, **32**, 1507-1514.

Yoshida, E., Toyama, T., Shinkai, Y., Sawa, T., Akaike, T. and Kumagai, Y. (2011): Detoxification of methylmercury by hydrogen sulfide producing enzyme in mammalian cells. *Chem. Res. Toxicol.* **24**, 1633-1635.

Yoshida, E., Abiko, Y. and Kumagai, Y. (2014): Glutathione Adduct of Methylmercury Activates the Keap1-Nrf2 Pathway in SH-SY5Y Cells. *Chem. Res. Toxicol.*, **27**, 1780-1786.

Yoshino, Y., Mozai, T. and Nakao, K. (1966): Biochemical changes in the brain in rats poisoned with an alkylmercury compound, with special reference to the inhibition of protein synthesis in brain cortex slices. *J. Neurochem.*, **13**, 1223-1230.

Vachhrajani, K.D. and Chowdhury, A.R. (1990): Distribution of mercury and evaluation of

testicular steroidogenesis in mercuric chloride and methylmercury administered rats. *Indian J. Exp. Biol.*, **28**, 746-751.

Vendrell, I., Carrascal, M., Vilaró, M.T., Abián, J., Rodríguez-Farré, E., Suñol, C. (2007): Cell viability and proteomic analysis in cultured neurons exposed to methylmercury. *Hum. Exp. Toxicol.*, **26**, 263-272.

Vogel, D.G., Margolis, R.L. and Mottet, N.K. (1985): The effects of methyl mercury binding to microtubules. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **80**, 473-486.

Vogel, D.G., Margolis, R.L. and Mottet, N.K. (1989): Analysis of methyl mercury binding sites on tubulin subunits and microtubules. *Pharmacol. Toxicol.*, **64**, 196-201.

Zhang, Y., Lu, R., Liu, W., Wu, Y., Qian, H., Zhao, X., Wang, S., Xing, G., Yu, F. and Aschner, M. (2013): Hormetic effects of acute methylmercury exposure on grp78 expression in rat brain cortex. *Dose Response*. **11**, 109-120.

Zou, H.C., Lü, Z.R., Wang, Y.J., Zhang, Y.M., Zou, F. and Park, Y. D. (2009): Effect of cysteine modification on creatine kinase aggregation. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **152**, 15-28.

厚生労働省. (2003) : 水銀を含有する魚介類等の摂取に関する注意事項.

内閣府食品安全委員会. (2005) : 魚介類等に含まれるメチル水銀について.

農林水産省. (2012) : 有害化学物質含有実態調査結果データ集., pp.168-169.