

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18919

研究課題名(和文)メチル水銀感受性を制御する生体内活性イオウ分子の実態解明

研究課題名(英文) Role of reactive sulfur species as a key molecule to diminish toxicity of methylmercury in mice

研究代表者

秋山 雅博 (Akiyama, Masahiro)

筑波大学・医学医療系・助教

研究者番号：60754570

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではMeHg感受性制御に対する活性イオウ分子の役割を検証するために、活性イオウ分子の産生酵素の一つであるCSEの遺伝子欠損マウスや活性イオウ分子含有植物成分を用いて、生体内活性イオウ分子の量を変化させ、MeHg曝露における用量反応関係を調べた。その結果、CSEによる活性イオウ分子の産生が解毒代謝物である(MeHg)₂Sの形成を介して保護的役割を果たすことを示し、生体内活性イオウ分子の量の低下がMeHg感受性の上昇を引き起こすことを明らかにした。さらに、外因性活性イオウ分子であるニンニク抽出物やNa₂S₄が(MeHg)₂S形成を介してMeHg毒性を減少させる結果を得た。

研究成果の概要(英文)：Methylmercury (MeHg) is an environmental electrophile that readily modifies protein thiols, causing toxicity. MeHg is inactivated by sulfur nucleophiles such as cysteine (CysSH), glutathione (GSH) and its related reactive persulfides (RSS) through the formation of GSH adduct (MeHg-SG) and dimethylmercury sulfide ((MeHg)₂S), respectively. Cystathionine γ-lyase (CSE) catalyzes production of CysSH and RSS. Previously, we revealed that CSE deletion in mice caused decreased levels of sulfur nucleophiles including GSH and RSS due to the disruption of CysSH metabolism, resulting in increased sensitivity to MeHg.

研究分野：環境生物学

キーワード：メチル水銀 活性イオウ分子

1. 研究開始当初の背景

現在、先進諸国ではメチル水銀(MeHg)の高濃度曝露の心配はないが、未だ魚介類などを介して低濃度ながら慢性的に曝露されている現状にあり、低濃度曝露による健康リスクには常に社会的な関心が寄せられている。環境中親電子物質である MeHg は分子中に電子密度の低い(親電子性)部位を持つため、電子密度の高い(求核性)タンパク質のチオール基(-SH 基)に容易に共有結合し、付加体を形成する(親電子修飾)。MeHg 曝露量の増加によりタンパク質の親電子修飾が過剰に行われると、被修飾タンパク質の担う細胞機能が破綻し、これが MeHg による毒性発現の主因と考えられている。一方、MeHg は求核低分子であるグルタチオン(GSH)により抱合され(フェーズ 2 反応)、その極性代謝物は多剤耐性関連タンパク質(MRP)を介して細胞外に排泄(フェーズ 3 反応)されることにより細胞内の恒常性維持されている(MeHg は酸化されないためフェーズ 1 反応は関与しない)。さらに、フェーズ 2 および 3 反応に関与する遺伝子群を統括的に制御する NF-E2-related factor 2 (Nrf2)が MeHg のリスク軽減に重要な役割を担っていることを我々は報告しており、MeHg に対する生体防御は求核低分子である GSH を主としたフェーズ 2 および 3 反応が重要な役割を担っている事は論を俟たない。しかしそれ故、他の求核性分子による生体防御の可能性は殆ど検証されていない現状にある。最近、我々のグループは東北大学・赤池教授との共同研究により、これまで硫化水素(H₂S/HS-)を生成するとされていた Cystathionine γ -lyase (CSE)が、実は非常に高い求核性/抗酸化性を有するシステインパースルフィド(Cys-SSH)および、その可動性イオウ原子が転移したグルタチオンパースルフィド(GS-SH)、またそれらから派生するポリスルフィド(例えば、GS-S-SG)という活性イオウ分子(Reactive sulfur species, RSS)を産生する酵素であることを発見した。さらに我々は RSS は低分子だけでなく高分子であるタンパク質にも結合していることを見出した。

2. 研究の目的

未だ低濃度曝露による健康リスクが懸念されるメチル水銀(MeHg)は高い親電子性を有し、タンパク質の求核基に共有結合することで毒性を示す。この共有結合に対する生体防御機構として求核低分子であるグルタチオン(GSH)による抱合反応が従来より知られている。しかし、近年 GSH よりも求核性の高い活性イオウ分子(Reactive sulfur species, RSS)が発見され、細胞内外で MeHg と代償的に反応することで、その親電子性を消失(不活性化)させる事が明らかとなった。このことは、従来の GSH による防御系の前段階に RSS による初期生体防御機構が存在し、低濃度

MeHg 曝露に対する感受性を制御している可能性を示唆している。そこで、本研究では RSS による初期生体防御機構の実態を明らかにし、低濃度 MeHg 曝露による健康リスクの軽減に貢献する事を目指す。

3. 研究の方法

MeHg 低濃度曝露における生体内 RSS の役割

CSE 遺伝子欠損マウスに対し、野生型マウスでは急性中毒症状が全く見られない低濃度の MeHg を曝露し、中毒症状を示すか否かを検討した。症候の指標として体重の減少や生存率に加え、MeHg 毒性が引き起こす障害の 1 つである運動失調をローターロッドテストを用いて評価した。

また、MeHg 毒性が運動失調を引き起こすことから、その標的組織は脳(中枢神経系)または、末梢組織(骨格筋や末梢神経系)であると考えられ、RSS がこれら組織での MeHg 毒性防御に関与しているかを検証するため、上記実験時の各マウスに対し生化学/病理解析学的手法を用いて MeHg 曝露による影響を解析した。

MeHg による毒性の評価および水銀蓄積量の測定

神経系組織の病理学的所見として GFAP 染色による解析を行った。神経損傷時に、アストロサイトは GFAP 強陽性となり、突起の形状も変化した反応性アストロサイトとなることが知られる。そのため、GFAP 染色は GFAP 発現の増強が特徴の一つである反応性アストロサイトの検出に用いた。また、各臓器での水銀蓄積量は、原子吸光分析法にて測定した。

植物由来 RSS によるメチル水銀に対するリスク軽減効果の検証

植物中にも多種多様な RSS の存在が示唆されているため、植物由来の RSS と MeHg を混ぜて野生型マウスに投与し、毒性を引き起こす投与量を MeHg 単体投与時と比較した。

ニンニクヘキササン抽出の調整および投与

ジュースーミキサーを用いて、Allium sativum(ニンニク)のジュースのみを搾取し、その二倍容量のヘキササンと混和して二時間攪拌した。そのヘキササン層のみを分取し、乾固させたものをヘキササン抽出物とした。コーンオイルに溶解した本抽出物(50 mg/mL)をマウスに胃ゾンデを用いて投与した。

生体内 RSS 量と MeHg 感受性との相関関係の実証

CSE 欠損マウスの各臓器での RSS 量を測定し、CSE による RSS 量の変化を確認した。さらに、MeHg 曝露時における生体内 RSS 量を経時的に測定し、生体内 RSS 量と MeHg 曝露量および MeHg 中毒症状との相関関係を

調べた。

CysSH、GSH および RSS の定量

LC/MS による安定同位体希釈法を用い、野生型および CSE 欠損マウスの臓器および初代肝細胞中 CysSH、GSH および RSS (CysSSH、GSSH および HSSH) を定量した。

RSS を介した MeHg 初期防御の実証とその作用機構の解明

Nrf2 欠損マウスではフェーズ 2 および 3 反応を介した MeHg の解毒 / 排出能が低下しているため、MeHg 毒性の閾値が低くなる。この Nrf2 欠損マウスに CSE 欠損マウスを交配させ、毒性の閾値の変化を検討した。

4. 研究成果

生体内 RSS が MeHg に対する新奇リスク軽減因子であることを証明するために、生体内 RSS の産生酵素のひとつである CSE 遺伝子欠損 (CSE KO) マウスに対し、野生型マウスでは急性中毒症状が全く見られない低濃度の MeHg (5 mg/kg/day) を 12 日間経口投与し、中毒症状を示すか否かを検討した。症候の指標として、体重の減少や生存率に加え、MeHg 毒性が引き起こす障害の 1 つである運動機能障害をローターロッドテストや後肢伸張および振戦の有無によって評価した。

その結果、曝露後 10 日以降から有意な協調運動能の低下を呈し、マウスでの MeHg 中毒症状の指標である後肢伸張 (ラットは後肢交叉) や振戦が観察された。曝露後 12 日以降から徐々に後肢麻痺による歩行不良の症状が見え始めた。しかし、このような条件下において、ヘマトキシリン・エオジン染色を用いて脳の組織学的変化を調べた結果、脳組織構造に顕著な変化は認められなかった。しかし、運動機能を司る小脳に対して、免疫染色法を用いて細胞単位での解析を行った結果、顆粒細胞およびプルキンエ細胞の数やその形態に異常は認められなかったものの、反応性アストロサイトの増加が見られた。さらに野生型マウスと比べて、CSE 欠損マウスの小脳では MeHg 曝露による水銀蓄積量が野生型と比べて有意に増加していた。CSE KO マウスは MeHg 曝露後 13 日目に野生型と比して体重減少が見られ、最終的に殆どのマウスが死亡した。以上より、MeHg が野生型マウスで有害性を示さない低濃度曝露時において、CSE の欠損により健康リスクが生じることが明らかとなり、RSS が MeHg に対する新奇リスク軽減因子であることが示された。

CSE は低い基質特異性を有する酵素として知られ、シスタチオンを基質とする際は CysSH を産生し、シスチンを基質とした際は CysSSH を産生する。CysSH は GSH 合成の律速アミノ酸であることから、CSE によるシステイン代謝は生体内での GSH および CysSSH を介した RSS の産生に重要であることが想

定された。また、CSE 欠損マウスが MeHg 曝露に対し、野生型に比べ高い感受性を示すことから、CSE による CysSH、GSH およびそれに係る RSS の産生が、(MeHg)₂S や MeHg-SG の解毒代謝物形成を介して、MeHg 曝露に対して保護的役割を果たしていることを示唆していた。以上より、CSE を介したシステイン代謝が生体内の活性イオウ分子を含むイオウ含有求核低分子量の維持に重要な役割を有し、その生体内量が MeHg 毒性防御制御における重要な要因であるという作業仮説を立てた。

本仮説を証明するため親電子プローブを用いた LC-MS による安定同位体希釈法にて、野生型および CSE 欠損マウスの肝臓、腎臓、小脳での RSS を含むイオウ含有求核低分子量を測定した。その結果、CSE 欠損により肝臓や腎臓では CysSH や GSH 量の減少と共に、それぞれの RSS である CysSSH や GSSH 量の低下が見られた。しかし、小脳では野生型と CSE 欠損マウス間でのイオウ含硫求核低分子量に殆ど差は見られなかった。これらの結果から、CSE を介したシステイン代謝は、少なくとも肝臓や腎臓における GSH や RSS 量の維持に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

CSE の発現レベルは肝臓および腎臓では高いが、脳では低いことが報告されている。活性イオウ分子産生酵素として、CSE の他に cystathionine γ -synthase や 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase が知られており、中枢神経系に豊富であることが報告されている。これらのことから、野生型マウスと比較して CSE 欠損マウスでは肝臓および腎臓における RSS 量は低値を示し、脳内の RSS 量の大幅な変動はみられないことが推測された。この仮説と一致して、CSE 欠損が肝臓および腎臓における RSS 量を低下させるのに対して、小脳における RSS 量の有意な低下は認められなかった。

本研究において、CSE の欠損は CysSH の生体内レベルの低下に伴い、GSH、CysSSH および GSSH の産生もすることが示唆された。このようなイオウ含有求核低分子量の減少が MeHg-SG 付加体および (MeHg)₂S 産生低下を生じて、MeHg 曝露に対する感受性を上昇させる一因であることが考えられた。

CSE は低い基質特異性を有する酵素として知られ、シスチンを基質とする際は CysSSH のような RSS を産生する一方で、シスタチオンからシステイン (CysSH) を産生する酵素でもある。CysSH は GSH 合成の律速アミノ酸であることから、CSE による CysSH 代謝は生体内での GSH および RSS の産生に重要であることが想定された。実際、親電子プローブを用いた LC-MS による安定同位体希釈法により、野生型および CSE 欠損マウスの肝臓での RSS を含む求核低分子量を測定した結果、CSE 欠損により CysSH や GSH 量の減少と共に、RSS である CysSSH や

GSSH 量が低下することを明らかにした。また、同時に CSE 欠損マウスが MeHg 曝露に対し、野生型に比べ高い感受性を示すことを見出した。つまり、CSE による CysSH、GSH および活性イオウ分子の産生が、MeHg-SG や (MeHg)₂S の解毒代謝物形成を介して MeHg 曝露に対して保護的役割を果たしていることが示唆されている。

一方、CSE による CysSH 代謝が生体において、GSH による MeHg-SG および RSS による (MeHg)₂S 形成の両方に重要な役割をもつため、CSE 欠損マウスを用いた解析では GSH による解毒・排出機構 (フェーズ 2 および 3 反応) と RSS による捕獲・不活性化機構の役割を分けて評価することが困難であった。

そこで、GSH を主としたフェーズ 2 および 3 反応に関連する遺伝子群を統括的に制御する Nrf2 の欠損マウスと CSE 欠損マウスを掛け合わせた CSE/Nrf2 両欠損マウスを用いることで、RSS による捕獲・不活性化機構の役割を評価することができると考えた。つまり、GSH による MeHg-SG を介した解毒・排出機構とは別に、RSS による (MeHg)₂S 形成を介した捕獲・不活性化機構が MeHg 曝露に対する感受性の制御に重要であれば、CSE/Nrf2 両欠損はそれぞれの単独欠損に比べ、MeHg 曝露に対する感受性が高くなると予想された。さらに、RSS による (MeHg)₂S 形成を介した捕獲・不活性化機構が MeHg 曝露に対する感受性の制御に重要であるならば、生体内 RSS 量の低下は MeHg 曝露に対するリスク要因となる。先行研究において、我々は外因性 RSS (ニンニク抽出物や Na₂S₄ など) が生体内の CysSH や GSH などと反応して CysSSH や GSSH などの生体内 RSS を産生することを見出している。そこで、CSE 欠損によって低下した細胞内 RSS 量を外因性 RSS 投与により回復できるのでないかと考えた。

MeHg に対する RSS の役割をより明確に評価するために、GSH による MeHg の解毒・排泄を統括的に制御している転写因子 Nrf2 の欠損マウスと CSE 欠損マウスを掛け合わせた、CSE/Nrf2 両欠損マウスを用いて、MeHg 毒性に対する感受性の変化を検討した。野生型マウスにおいて中毒症状が見られない濃度の MeHg (5 mg/kg/day、12 日間経口投与) に CSE 欠損および Nrf2 欠損マウスを曝露すると、投与後 11 日以降から運動失調や振戦といった中毒症状を呈し、14 日目以降より生存率が低下し、投与後 21 日目で全てのマウスが死亡した。一方、Nrf2/CSE 両欠損マウスでは、投与後 7 日目以降から中毒症状を呈し、11 日目以降より生存率が低下し、その後 14 日目で全てのマウスが死亡した。

次に、CSE 欠損によって減少した細胞内 RSS 量を外因性 RSS の投与によって補完できるか否かを検討した。CSE 欠損初代肝細胞に対し Na₂S₄ (細胞内外で CysSH や GSH と反応して内因性 RSS を生成するポリスルフィド) を投与した結果、投与後 1 時間で細胞内

RSS 量は劇的に上昇したが、24 時間後にはその量は野生型の定常レベルと同等量まで減少した。また、RSS 産生酵素の基質であるシスチンを野生型、CSE 欠損マウスより作製した初代肝細胞に投与した結果、CSE 欠損によって減少していた細胞内 RSS 量がシスチン投与により野生型の定常レベルと同等量まで上昇した。

我々の初期検討より、ニンニク中に RSS を含有する低分子の存在が示唆されたことから、ニンニクのヘキササン抽出物を RSS 含有植物成分サプリメントとして用いた。ニンニクのヘキササン抽出物投与による RSS 補完効果を検証するために、ニンニクのヘキササン抽出物をマウスへ経口投与したところ、血漿中 RSS 量は有意に増加した。本抽出物と MeHg を混合投与した結果、MeHg 単体投与で見られた体重の減少や生存率の低下が有意に改善された。

CSE/Nrf2 両欠損はそれぞれの単独欠損に比べ、MeHg 曝露に対する感受性が高くなることが明らかとなった。本結果は従来の GSH による MeHg-SG を介した解毒・排出機構とは別に、RSS による (MeHg)₂S 形成を介した捕獲・不活性化機構が MeHg 曝露に対する感受性の制御に重要であることを示している。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 8 件)

(1) Masahiro Akiyama, Yasuhiro Shinkai, Isao Ishii, Takaaki Akaike, Kumagai, Yoshito. Cystathionine Gamma-Lyase Is a Key Protein Repressing Methylmercury Poisoning Symptoms in Mice. Society of Toxicology 57th Annual Meeting (San Antonio, USA). 2018 年 3 月

(2) 片山優助, 安孫子ユミ, 秋山雅博, 熊谷嘉人. メチル水銀を低毒性化する食用植物中生理活性物質としての per/polysulfides. 日本毒性学会学術年会 (横浜、神奈川県). 2017 年 7 月

(3) Yunjie DING, 安孫子ユミ, 秋山雅博, 熊谷嘉人. ビスメチル水銀スルフィドの生成を介したニンニクのヘキササン抽出成分によるメチル水銀の毒性軽減. 日本毒性学会学術年会 (横浜、神奈川県). 2017 年 7 月

(4) 秋山雅博. システイン代謝酵素によるメチル水銀毒性制御に関する研究. 平成 28 年度メチル水銀研究ミーティング (東京) 2016 年 12 月

(5) 新開泰弘, 秋山雅博, 鶴木隆光, 井田智章, 赤池孝章, 熊谷嘉人. 親電子プローブを用いたMRM-MSによる生体試料中の活性イオウ分子の定量法の構築. フォーラム 2016 衛生薬学・環境トキシコロジー (東京). 2016年9月

(6) 秋山雅博, 安孫子ユミ, 新開泰弘, 鶴木隆光, Ding Yunjie, 外山喬土, 吉田映子, 熊谷嘉人. Cystathionine gamma-lyase はメチル水銀中毒症状を抑制する鍵分子である. フォーラム 2016 衛生薬学・環境トキシコロジー (東京). 2016年9月

(7) 秋山雅博, 外山喬土, 吉田映子, 鶴木隆光, 安孫子ユミ, 新開泰弘, 熊谷嘉人. メチル水銀曝露による健康リスクを制御する活性イオウ分子の役割. 第43回日本毒性学会学術年会 (名古屋, 愛知県) 2016年6月

(8) Akiyama M, Toyama T, Yoshida E, Unoki T, Abiko Y, Shinkai, Y, Kumagai Yoshito. Role of reactive sulfur species as a key molecule to diminish toxicity of the environmental electrophile in mice. The 9th International Conference on the Biology, Chemistry, and Therapeutic Applications of Nitric Oxide. Satellite Symposium on Chemical Biology of Reactive Persulfide (仙台, 宮城県). 2016年5月

〔その他〕

ホームページ等

環境生物学研究室 - 筑波大学医学医療系

http://www.md.tsukuba.ac.jp/environmental_medicine/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

秋山雅博 (Akiyama Masahiro)

筑波大学・医学医療系・助教

研究者番号：60754570