
総説 シンポジウム 2**メチル水銀毒性と Rho 蛋白質**

藤村 成剛

国立水俣病総合研究センター, 基礎研究部, 毒性病態研究室

Methylmercury toxicity and Rho proteins

Masatake Fujimura

National Institute for Minamata Disease Department of Basic Medical Science, Toxicologic Pathology Section

要約

メチル水銀は、神経系に特異的な神経軸索変性および神経細胞死を引き起こす環境毒である。これまでの研究において、メチル水銀神経毒性における幾つかの分子標的が同定されてきたが、その詳細については解明できていない。本研究では、メチル水銀神経毒性の分子機構についてラット培養神経細胞を用いて検討を行った。神経軸索変性および神経細胞死の原因因子を調べるために、神経軸索機能および神経細胞死を調節することが知られている Rho ファミリー蛋白質 (RhoA, Rac1 および Cdc42) の発現レベルを調べた。ウェスタンブロット解析を用いた検討によって、メチル水銀が神経軸索伸展を制御する Rac1 蛋白質の発現レベルを選択的に低下させることが明らかになった。この結果から、Rac1 の発現低下によって誘発される神経軸索変性が、メチル水銀による神経細胞死に関与することが示唆された。さらにこれまでの結果から、メチル水銀が引き起こす神経軸索変性が、神経軸索の伸長と収縮の非均衡が原因であるという仮説を立てた。そして、この仮説に基づいて、神経軸索収縮と神経細胞死に関与することが知られている Rho-associated coiled coil-forming protein kinase (ROCK) 経路に着目した実験を行った。Rho/ROCK 経路の阻害はラット培養神経細胞およびラットメチル水銀中毒モデルにおいて、メチル水銀による神経軸索変性と神経細胞死を抑制した。以上の結果から、メチル水銀による神経細胞毒性において、軸索の伸長と収縮の非均衡が関与すること、さらに Rho/ROCK 経路の阻害がメチル水銀による神経変性の予防に有効であることが示唆された。(臨床環境 24: 79-83, 2015)

《キーワード》 メチル水銀, 神経毒性, Rho 蛋白質

Abstract

Methylmercury (MeHg) is an environmental toxicant which shows neurotoxicity including axonal degeneration and cell death specific to the nervous systems. Some molecular targets of MeHg to the

受付: 平成27年9月1日 採用: 平成27年9月5日

別刷請求宛先: 藤村成剛

〒867-0008 熊本県水俣市浜4058-18 国立水俣病総合研究センター, 基礎研究部, 毒性病態研究室

Reprint Requests to Masatake Fujimura, National Institute for Minamata Disease, Department of Basic Medical Science, Toxicologic Pathology Section, 4058-18 Hama, Minamata City, Kumamoto, 867-0008, Japan

nervous system have been identified, but little is known. In this study, the molecular mechanism underlying MeHg-induced neurotoxicity was investigated in rat cultured neuron. To investigate the factors responsible for axonal degeneration and cell death, we investigated the expression levels of Rho-family proteins (RhoA, Rac1 and Cdc42), which regulate axonal functions and cell death in neurons. Western blot analysis demonstrated that MeHg selectively downregulated the expression levels of Rac1, which regulated axonal extension. The result indicates that axonal degeneration triggered by the downregulation of Rac1 expression, contributes to MeHg-induced cell death in the nervous system. Therefore we hypothesized that MeHg-induced axonal degeneration might be caused by axonal extension/retraction incoordination. This idea brought our attention to the Rho-associated coiled coil-forming protein kinase (ROCK) pathway because it has been known to be associated with the axonal retraction and cell death. The inhibition of Rho/ROCK pathway suppressed MeHg-induced axonal degeneration and cell death in rat cultured neuron and MeHg-intoxicated rat model. This result suggests that the pathogenesis of MeHg-cytotoxicity involves an imbalance of the axonal extension/retraction system and that the inhibition of the Rho/ROCK pathway is effective in preventing MeHg-induced neuronal degeneration.

(Jpn J Clin Ecol 24 : 79 – 83, 2015)

《Key words》Methylmercury, Neurotoxicity, Rho proteins

I. 緒言

環境毒の中には脳神経系を標的器官として重篤な神経機能障害を引き起こすものがある。その環境毒とはメチル水銀、無機水銀、鉛、パーキンソン病外部因子説に基づくロテノン等である。その中でも特にメチル水銀は重篤かつ不可逆的な神経機能障害をもたらす。メチル水銀の主な標的器官である神経細胞は、他の細胞と異なり細胞体 (Cell body) の他に神経突起である神経軸索 (Axon) と樹状突起 (Dendrite) を有する形態学的に特殊な細胞 (図1) である。また、培養神経細胞においてメチル水銀は培養液への添加濃度の約50倍から100倍が細胞内に集積することが報告されており¹⁾、メチル水銀中毒患者の剖検脳およびメチル水銀中毒モデル動物の脳内水銀濃度から考えると、培養細胞実験における *in vivo* を反映したメチル水銀の添加濃度は1 μ M 以下での検討も必要であると考えられる。一方、Rho蛋白質は、低分子G蛋白質の一種で神経においては主に神経軸索の伸展/収縮に関わる蛋白質であり、代表的なRho蛋白質は、RhoA, Rac1, Cdc42である。Rac1とCdc42は軸索伸展を制御し、RhoAはエフェクターとしてRho-associated coiled coil-forming protein kinase (ROCK)²⁾ というリン酸

化酵素を介して軸索収縮を制御する。本報告においては、メチル水銀による神経細胞死においてこれまで注目されていなかった神経突起変性に着目し、低濃度メチル水銀と神経軸索の伸展/収縮を制御するRho蛋白質との関係について検討を行った。

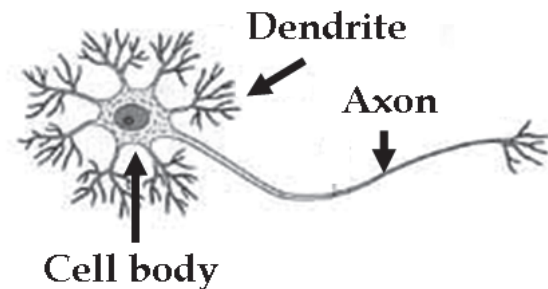


図1 神経細胞の構造

II. 培養神経細胞実験と動物実験

1. 培養神経細胞実験

妊娠17日目のSDラット胎児から大脳皮質を分離・調整し、細胞培養を行った。7日間の培養によって、十分な神経細胞への分化を行った後、メチル水銀、各種薬剤またはRho蛋白質のsiRNAを添加し、1-7日後に細胞生存率の測定、または免疫組織染色、Western blotting用のサンプルを

回収し、測定を行った³⁵⁾。なお、実験動物の使用に関しては、国立水俣病総合研究センターの動物倫理安全等委員会の承認を得た。

2. 動物実験

6週齢のSDラット雄にメチル水銀水 (20 ppm) を飲水投与し、メチル水銀中毒モデルを作成した。同時にROCK阻害剤であるFasudil (3 mg/kg/day) を皮下投与した。メチル水銀投与0, 1, 2, 3, 4週後に神経行動 (後肢交差) について測定を行い、また、メチル水銀投与4週後に解剖を行い、末梢神経組織について組織学的評価を行った⁴⁾。

III. 実験から得られた結果

1. 低濃度メチル水銀による Rac1 発現抑制を介した神経軸索変性作用および神経細胞死誘発作用

低濃度 (100 nM) のメチル水銀は、神経突起変性を引き起こした後、カスパーゼ経路を介するアポトーシス神経細胞死を誘発した (図2)。また、神経軸索の指標である Tau 陽性神経突起の変性が樹状突起の指標である MAP2陽性神経突起の変性に先行した (図3) ことから、メチル水銀の作用は神経突起の中でも神経軸索に特異的なことが判明した。さらに神経突起形成およびアポトーシス神経細胞死を規定している Rho 蛋白について解析を行った結果、メチル水銀は、RhoA (神経突起収縮因子) の発現を変化させることなく、Rac1 と Cdc42 (神経突起伸展因子) の発現を低下させ、特に Rac1 の低下が顕著であった (図4)³⁾。

2. Rho/ROCK 経路の抑制によるメチル水銀神経毒性の抑制作用

培養神経細胞において Rho 阻害薬 (C3 toxin) および ROCK 阻害薬 (Y-27632, Fasudil) の効果を試したところ、低濃度 (100 nM) メチル水銀による神経軸索障害および細胞死を抑制することが明らかになった (図5)。さらに、siRNA によって強制的に蛋白質発現を減少させることによって Rac1 および RhoA の機能について確認を行った (図6)。Rac1 の減少は低濃度 (100 nM) メチル水銀と同様の毒性作用を示した。一方、RhoA の減少は Rho/ROCK 阻害薬と同様にメチル水銀毒性

に対して抑制作用を示した³⁾。次に末梢投与によって神経系に移行する Fasudil についてメチル水銀中毒動物モデル (20 ppm メチル水銀水の4週間飲水投与) を用いた検討を行った。Fasudil (3 mg/kg/day, 皮下投与) は、メチル水銀中毒動物モデルにおける末梢神経病変 (後根神経) (図7) および神経症状 (後肢交差) (図8) を抑制した⁴⁾。

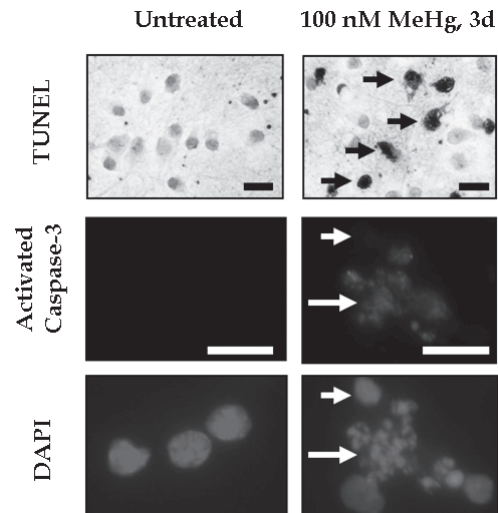


図2 培養神経細胞における低濃度メチル水銀のアポトーシス誘発作用

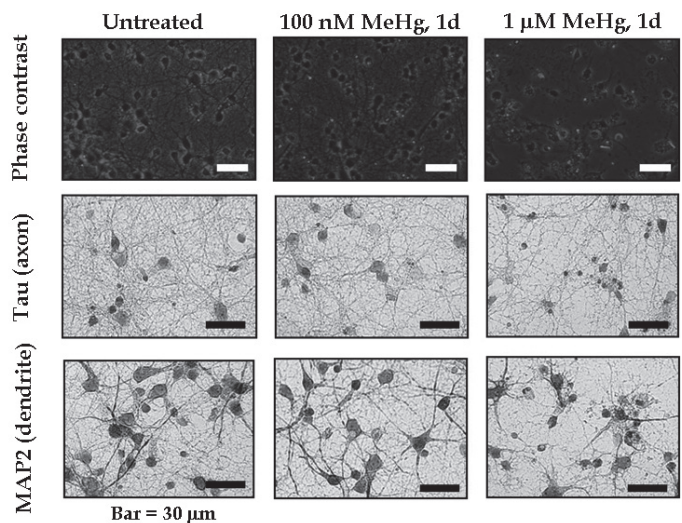
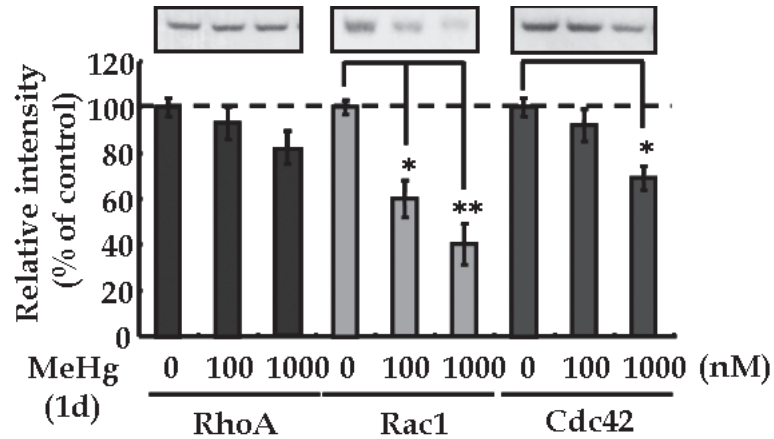
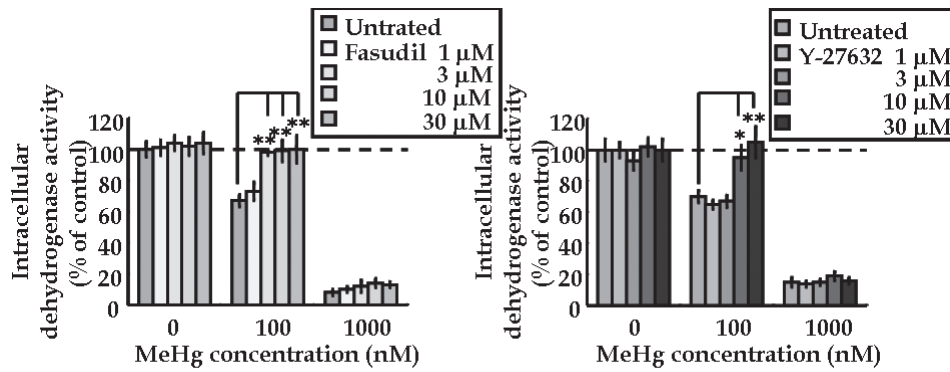


図3 培養神経細胞におけるメチル水銀の神経軸索および樹状突起に対する変性作用



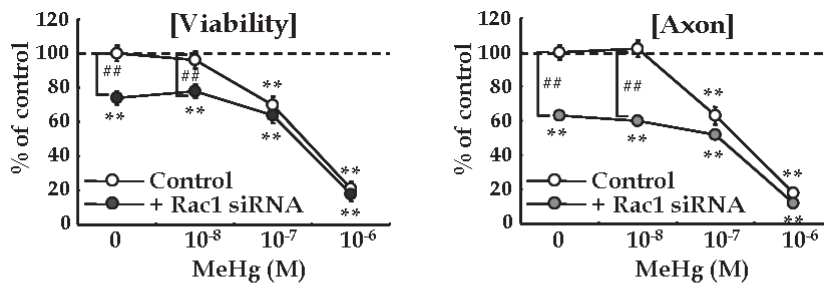
Mean ± SEM, *p<0.05, **p<0.01 vs basal by Dunnett method, n=6

図4 培養神経細胞におけるメチル水銀の Rho 蛋白質発現に対する作用



Mean ± S.E., *p<0.05, **p<0.01 by Dunnett method, n=6

図5 培養神経細胞における ROCK 阻害薬 (Y-27632, Fasudil) のメチル水銀細胞死抑制作用



Mean ± SEM, **p<0.01 vs basal by Dunnett method, ##p<0.01 by student's t-test, n=6

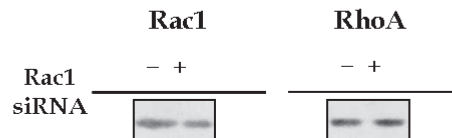


図6 培養神経細胞におけるメチル水銀と Rac1 siRNA の神経毒性作用

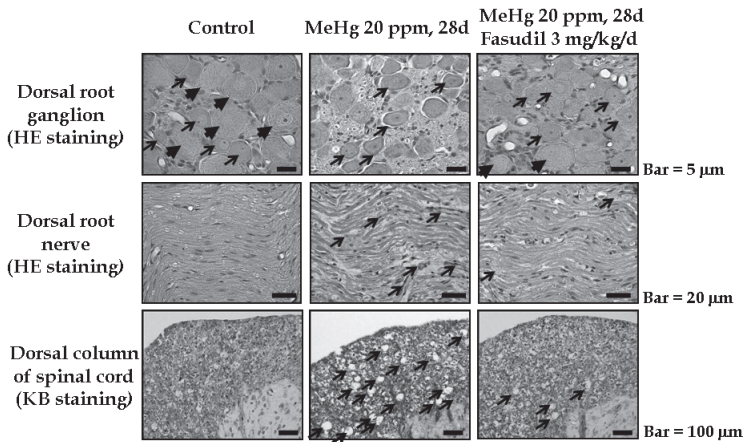


図7 メチル水銀中毒モデルにおける ROCK 阻害薬 (Fasudil) の末梢神経病変抑制作用

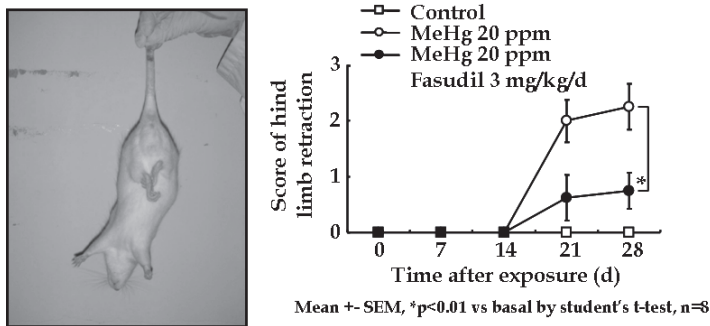


図8 メチル水銀中毒モデルにおける ROCK 阻害薬 (Fasudil) の神経症状抑制作用

IV. 考察

本研究では、メチル水銀神経毒性の分子機構について検討を行った。Rhoファミリー蛋白質の発現レベル解析によって、メチル水銀が神経軸索伸展を制御する Rac1蛋白質の発現レベルを選択的に低下させることが明らかになった。この結果から、Rac1の発現低下によって誘発される神経軸索変性が、メチル水銀による神経細胞死に関与することが示唆された。さらに、神経軸索収縮と神経細胞死に関与することが知られている Rho-associated coiled coil-forming protein kinase (ROCK) 経路に着目した実験を行った結果、Rho/ROCK 経路の阻害はラット培養神経細胞お

よびラットメチル水銀中毒モデルにおいて、メチル水銀による神経軸索変性と神経細胞死を抑制した。以上の結果から、Rac1とは逆に軸索収縮に関与する Rho/ROCK 経路の抑制によってメチル水銀の毒性軽減が可能であることが示唆された。

[謝辞]

本研究において助言を頂いた国立水俣病総合研究センターの白杵扶佐子先生、および実験実施に貢献して頂いた鬼塚歩さん、測上倫子さんに感謝いたします。

[引用文献]

- 1) Meacham CA, Freudenrich TM, et al. Accumulation of methylmercury or polychlorinated biphenyls in vitro models of rat neuronal tissue. *Toxicol Appl Pharmacol* 205: 177-187, 2005
- 2) Fujisawa K, Fujita A, et al. Identification of the Rho-binding domain of p160ROCK, a Rho-associated coiled-coil containing protein kinase. *J Biol Chem* 271: 23022-23028, 1996
- 3) Fujimura M, Usuki F, et al. Methylmercury exposure downregulates the expression of Rac1, leads to neuritic degeneration and ultimately apoptosis in cerebrocortical neurons. *Neurotoxicology* 30: 16-22, 2009
- 4) Fujimura M, Usuki F, et al. Inhibition of the Rho/ROCK pathway prevents neuronal degeneration in vitro and in vivo following methylmercury exposure. *Toxicol Appl Pharmacol* 250: 1-9, 2011
- 5) Fujimura M, Usuki F. Differing effects of toxicants (methylmercury, inorganic mercury, lead, amyloid b and rotenone) on cultured rat cerebrocortical neurons: differential expression of Rho proteins associated with neurotoxicity. *Toxicol Sci*, 126: 506-514, 2012

[COI]

本論文内容には、COI(利益相反)に関する事項は無い。