

メチル水銀に対する感受性決定因子としてのユビキチン・プロテアソームシステム

黄 基 旭

A Ubiquitin-proteasome System as a Factor that Determine the Sensitivity to Methylmercury

Gi-Wook HWANG

Laboratory of Molecular and Biochemical Toxicology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences,
Tohoku University, Aramaki, Aoba-ku, Sendai 980-8578, Japan

(Received November 27, 2006)

To elucidate the mechanism of toxicity of methylmercury (MeHg), we searched for factors that determine the sensitivity of yeast cells to MeHg and found that overexpression of Cdc34 or Rad23, both proteins related to the ubiquitin-proteasome (UP) system, induces resistance to MeHg toxicity. The acquisition of resistance to MeHg in Cdc34-overexpressing yeast cells requires the ubiquitin-conjugating activity of Cdc34 and the proteolytic activity of proteasomes. Therefore, it seems likely that certain as-yet-unidentified proteins that increase MeHg toxicity might exist in cells and that the toxicity of MeHg might be reduced by the enhanced degradation of such proteins through the UP system when Cdc34 is overexpressed. Unlike Cdc34, Rad23 suppresses the degradation of ubiquitinated proteins by proteasomes. This activity of Rad23 might be involved in the acquisition of resistance to MeHg toxicity when Rad23 is overexpressed. Overexpression of Rad23 might induce resistance to MeHg by suppressing the degradation of proteins that reduce the MeHg toxicity. Moreover, when we overexpressed Cdc34 in normal and Rad23-defective yeasts, resistance to MeHg was enhanced to almost the same extent in both lines of yeast cells. Thus it is possible that the binding of Rad23 to ubiquitinated proteins might be regulated by a mechanism that involves the recognition of substrate proteins and that the functions of Rad23 might not affect the protein-degradation system in which Cdc34 is involved. Many proteins that reduce or enhance MeHg toxicity and are ubiquitinated might exist in cells. The UP system and related proteins might determine the extent of MeHg toxicity by regulating the cellular concentrations of these various proteins.

Key words—methylmercury; toxicity; ubiquitin; proteasome; Cdc34; Rad23

1. はじめに

メチル水銀は主に中枢神経毒性を示す環境汚染物質であり、水俣病の原因物質としてもよく知られている。ヒトでのメチル水銀中毒はこれまでに水俣以外にも多くの国・地域で認められている。メチル水銀は食物連鎖によって魚類中に濃縮されるが、近年、妊娠中の女性が魚類を多く摂取することによって、未発達な胎児の脳にメチル水銀が影響を与える可能性が指摘され、世界的な社会問題ともなっている。しかし、メチル水銀による毒性発現機構及びそれに対する生体の防御機構はいまだほとんど解明されていない。

これまでにわれわれは、メチル水銀毒性に対する防御機構を明らかにするために、真核単細胞生物であり、遺伝子産物の多くがヒトなどの哺乳動物と機能的に共通している出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) を用いてメチル水銀耐性獲得に係わる遺伝子の検索を行い、Bop3,¹⁾ Cdc34,²⁾ GFAT³⁾ 及び Rad23⁴⁾ などを同定することに成功している。その中で、Cdc34 はユビキチン・プロテアソーム (UP) システムに係わるユビキチン転移酵素の一種であり、Rad23 も UP システム関連因子として知られている。UP システムは真核生物に広く保存されている蛋白質分解経路で、ユビキチン活性化酵素 (E1)、ユビキチン転移酵素 (E2) 及びユビキチンリガーゼ (E3) という 3 つの酵素の連続した働きによって細胞内で蛋白質にユビキチンを連結する。そして、ここでユビキチン化された蛋白質は、最終的にプロテアソームによって認識されて分解される

東北大学大学院薬学研究科生体防御薬学分野 (〒980-8578 仙台市青葉区荒巻字青葉 6-3)

e-mail: ghwang@mail.pharm.tohoku.ac.jp

本総説は、日本薬学会第 126 年会シンポジウム S16 で発表したものを中心に記述したものである。

(Fig. 1).⁵⁾ 本稿では、選択的な蛋白質の分解経路である UP システムがメチル水銀毒性の発現機構において果たす役割について、筆者らの研究成果を中心に概説する。

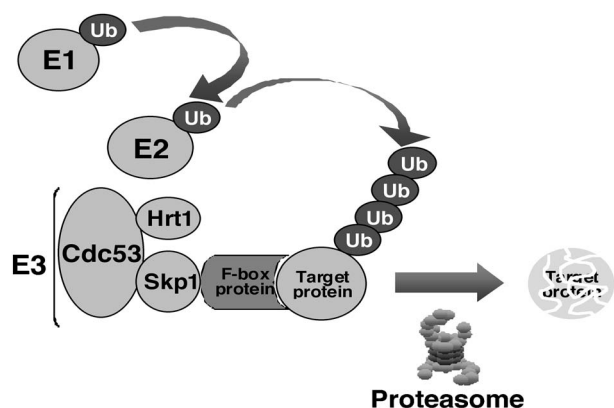


Fig. 1. Model for the SCF Complex-mediated Proteasomal Degradation

Proteins are targeted for degradation by the proteasome through the covalent attachment of ubiquitin (Ub) moieties. Ub activated by the ubiquitin-activating enzyme (E1) is transferred from E1 via ubiquitin-conjugating enzyme (E2) to the target protein. This final step is catalysed by ubiquitin ligase (E3). Multi-ubiquitinated proteins are degraded by the proteasome. Specific target recognition is the function of SCF complex, an E3. The complex is composed of a common core (Cdc53, Hrt1 and Skp1) and an F-box protein.

2. UP システムを介した蛋白質分解の亢進によるメチル水銀の毒性軽減

Cdc34 の構造中でメチル水銀耐性獲得に必要な機能ドメインを検索するために、E2 活性に関与することが報告されている数カ所のドメインに変異を有する Cdc34^{6,7)} をそれぞれ高発現する酵母を作製したところ、これらの酵母においてはメチル水銀に対する耐性は認められなかった (Fig. 2b).⁸⁾ また、正常な Cdc34 を高発現させた酵母では総ユビキチン化蛋白質量の増加が認められたが、変異 Cdc34 を高発現させた酵母ではこのような現象も認められなかった (Fig. 2c).⁸⁾ これらの結果は、Cdc34 高発現によるメチル水銀耐性に Cdc34 が示すユビキチン転移活性が必須であることを示している。

Cdc34 を介する蛋白質のユビキチン化には、E1 である Uba1 及び E3 複合体の 1 つである SCF (Skp1, Cdc53/cullin, F-box protein) が関与し、この E3 複合体は 4 つの subunit (Cdc53, Skp1, Hrt1, F-box protein) からなることが知られている (Fig. 1).⁹⁾ しかし、この酵素群の各構成因子を高発現させても E1 高発現酵母でわずかなメチル水銀耐性が認められたものの、Cdc34 高発現時に認められたよ

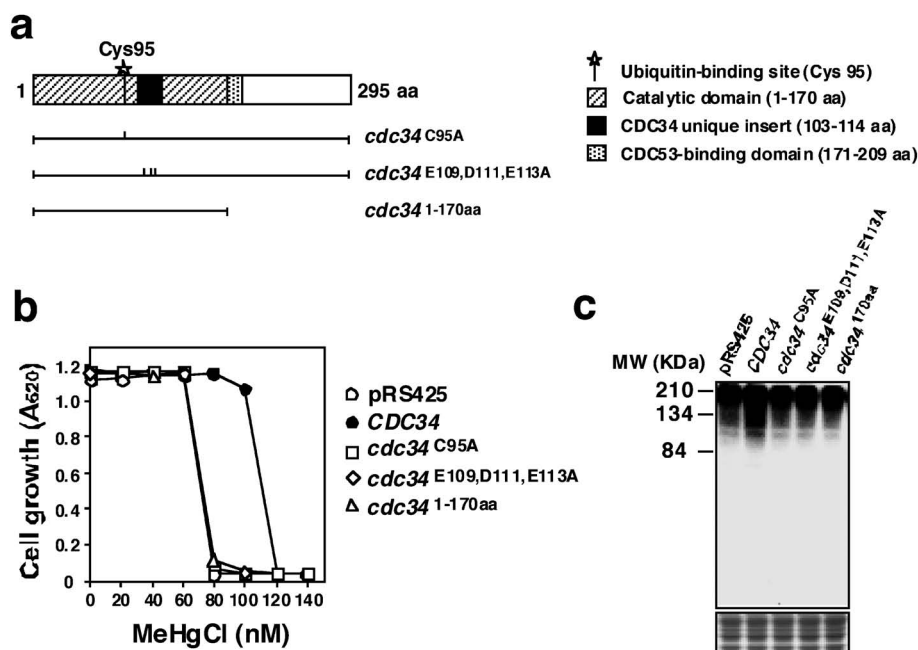


Fig. 2. Effects of the Overexpression of Cdc34 on the Sensitivity of Yeast Cells to Methylmercury

a: Structural domains of Cdc34 and construction of mutant proteins. b: Yeast strains carrying pRS425 (control), pRS425-*CDC34*, pRS425-*cdc34*^{C95A}, pRS425-*cdc34*^{E109, D111, E113A} or pRS425-*cdc34*^{1-170aa} were grown in SD (-leucine) medium in the presence of various concentrations of methylmercury. c: Lysates of each strain of yeast cells, cultured in control medium, were subjected to immunoblotting analysis with multiubiquitin-specific antibody. Staining with coomassie blue (lower panel) is shown as an indication of the amount of total protein loaded.

うな顕著な耐性は認められなかった。また、これら酵母の総ユビキチン化蛋白質量も正常酵母と同程度であった。⁸⁾

一方、E2は遺伝子ファミリーを形成しており、出芽酵母ではメチル水銀耐性因子として見出したCdc34以外にも、12個のE2分子種が同定されている。¹⁰⁾そこで、これらのうちのいくつかのE2の分子種を高発現する酵母を作製したところ、Cdc34を高発現させた酵母よりもその程度は劣るものの、Ubc4, 5又は7を高発現させた酵母もメチル水銀耐性が示し、これら酵母内のユビキチン化蛋白質量も正常酵母に比べて高値を示した。⁸⁾ここで認められた耐性度の差は、恐らく各E2分子種の基質特異性の違いによるものと考えられる。以上の結果から、E2はユビキチン化反応の律速酵素であり、本酵素群の高発現は細胞内における蛋白質のユビキチン化を促進させることによってメチル水銀毒性に対して防御的に作用するものと考えられる。

ユビキチン化された標的蛋白質は最終的にプロテアソームに認識されて速やかに分解される。Cdc34高発現によるメチル水銀耐性はプロテアソーム阻害剤存在下では認められず (Fig. 3)、また、遺伝子変異によって低プロテアソーム活性を示す酵母が対照酵母に比べて高いメチル水銀感受性を示すことも確認されたことから、Cdc34高発現によるメチル水銀耐性にはプロテアソームによるユビキチン化蛋白質の分解が必須であると考えられる。

以上の結果から、細胞内にはメチル水銀毒性の増

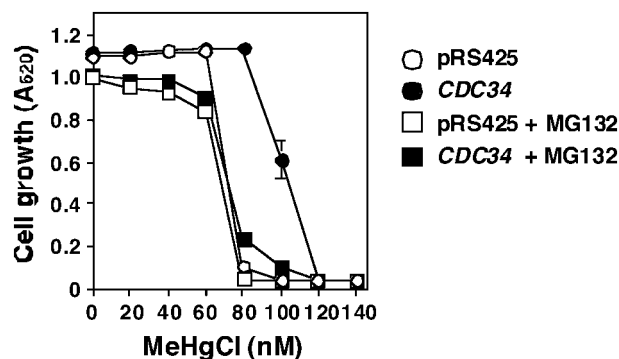


Fig. 3. Effects of a Proteasome Inhibitor on the Cdc34-mediated Resistance of Yeast Cells to Methylmercury

Yeast *erg6* cells that harbored pRS425 (control) or pRS425-*CDC34* were grown in SD (-uracil) liquid medium, with or without the proteasome inhibitor MG132 (50 μ M), which had been dissolved in DMSO, and methylmercury at the indicated concentration.

強に関与し、かつ、UPシステムによって分解される蛋白質が存在し、Cdc34はこの蛋白質のプロテアソームでの分解を亢進させることによってメチル水銀毒性に対して防御的に作用するものと考えられる。⁹⁾

一方、ヒトなどの高等動物においても多くのE2分子種が存在することが知られている。ヒトのCdc34を高発現させたHEK293細胞もメチル水銀に対して耐性を示すことから、ヒトにおいてもCdc34が関与するUPシステムがメチル水銀の毒性軽減機構として重要な役割を果たしている可能性が考えられる。したがって、メチル水銀毒性を増強させる蛋白質をヒト細胞中で同定することによって、ヒトにおけるメチル水銀の細胞内標的分子が明らかになるものと期待される。

3. メチル水銀の毒性軽減に係わる F-box 蛋白質の検索

SCF複合体 (E3) を構成する因子の中には、分解される基質蛋白質と直接結合する F-box 蛋白質が存在し、酵母では17種類が知られている。¹¹⁾この F-box 蛋白質を酵母に高発現させると、ユビキチン化される標的蛋白質と F-box 蛋白質を介した SCF 複合体との結合割合が増加し、標的蛋白質のユビキチン化とそれに続くプロテアソームでの分解が促進されると考えられる。したがって、メチル水銀毒性を増強させる蛋白質の分解に関与する F-box 蛋白質が高発現すると、その酵母はメチル水銀に対して耐性を示すと予想される。そこで、17種の F-box 蛋白質をそれぞれ高発現する酵母を作製したところ、Hrt3 又は Ylr224w の高発現酵母が対照酵母に比べて強いメチル水銀耐性を示した。¹²⁾ F-box ドメインを欠失させた両 F-box 蛋白質の変異体を高発現させた酵母はメチル水銀耐性を示さず、また、プロテアソーム阻害剤の存在下では、Hrt3 又は Ylr224w の高発現酵母が示すメチル水銀耐性が認められないことから (Figs. 4 (a), (b)),¹²⁾ Hrt3 及び Ylr224w 高発現による酵母のメチル水銀耐性獲得には F-box ドメインを介した SCF 複合体の形成とユビキチン化された蛋白質のプロテアソームでの分解が必要であると考えられる。

以上のことから、Cdc34 又は F-box 蛋白質が高発現すると、F-box 蛋白質 (Hrt3 又は Ylr224w) が認識する蛋白質のユビキチン化の亢進によってそれ

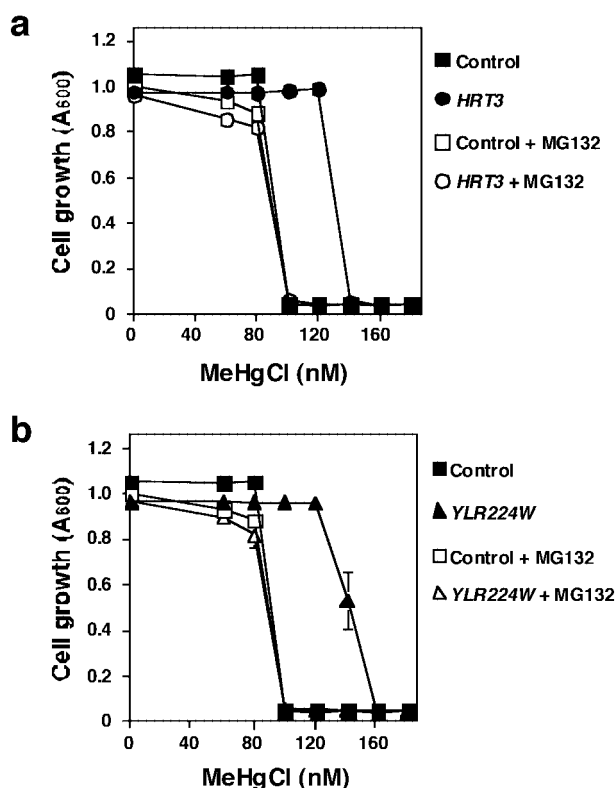


Fig. 4. Effects of a Proteasome Inhibitor on the Hrt3- and Ylr224w-mediated Resistance of Yeast Cells to Methylmercury

Yeast *erg6Δ* cells that harbored pKT10 or pKT10-*HRT3* (a) or pKT10 or pKT10-*YLR224W* (b) were grown in SD (-uracil) liquid medium, with or without the proteasome inhibitor MG132 (50 μM), which had been dissolved in DMSO, and methylmercury at the indicated concentration.

ら蛋白質のプロテアソームでの分解が促進され、その結果としてメチル水銀毒性が軽減されると考えられる。両 F-box 蛋白質の基質となる蛋白質は同定されていないが、両 F-box 蛋白質の基質蛋白質の中にメチル水銀毒性の増強に係わる蛋白質が含まれる可能性が高い。最近、われわれは両 F-box 蛋白質と特異的に結合し、かつ、メチル水銀の毒性増強に係わる蛋白質の同定に成功している。今後、これらの蛋白質がメチル水銀毒性の発現に果たす役割を検討することで、まだ不明な点が多いメチル水銀毒性発現機構の解明に重要な手掛かりが得られるものと期待される。

4. UP システムを介した蛋白質分解の抑制によるメチル水銀の毒性軽減

われわれは、高発現によって酵母にメチル水銀耐性を与える Cdc34 以外の UP システム関連因子として Rad23 を見出した。⁴⁾ Rad23 は UP システムによる蛋白質分解の促進及び抑制という相反する 2 つ

の機能によって UP システムによる蛋白質分解を調節していると考えられている。¹³⁾ Rad23 が示す蛋白質分解抑制作用は、Rad23 が有する 2 つの ubiquitin-associated (UBA) ドメインによるものであり、このドメインを介して Rad23 はユビキチン化蛋白質のユビキチン部分と結合し、それ以上ユビキチン鎖が伸長するのを阻害することによってその蛋白質の分解を抑制する。¹⁴⁾ 一方、Rad23 はユビキチン化蛋白質をプロテアソームに運搬する機能を有しており、これによって蛋白質の分解を促進させる。¹⁵⁾ この機能に必要な Rad23 中の領域は N 末端に存在する ubiquitin-like (UbL) ドメインであり、このドメインはユビキチンと相同性が高く、Rad23 はこのドメインを介してプロテアソームと結合することによってユビキチン化蛋白質の分解を亢進する役割を果たすと考えられている。¹⁶⁾

Rad23 が有する 2 つの機能とメチル水銀毒性との関係を明らかにするために、Rad23 の UbL 及び 2 つの UBA ドメインをそれぞれ欠失させた truncation mutants を作製したところ、UbL ドメインを欠失した Rad23 を高発現させた酵母 (Δ UbL) は、正常な Rad23 を高発現させた酵母よりも強いメチル水銀耐性を示し、両 UBA ドメインを欠失させた Rad23 を高発現させた酵母 (Δ UBA1+ Δ UBA2) はメチル水銀耐性をほとんど示さなかった (Fig. 5(b)).⁴⁾ すなわち、Rad23 の UbL ドメインはメチル水銀毒性を増強させる作用を有し、逆に UBA ドメインはメチル水銀耐性に係わっていると考えられる。正常な Rad23 を高発現させた酵母はメチル水銀耐性を示すことから、これらの結果は、少なくとも Rad23 高発現時には UbL ドメインに由来する機能よりも UBA ドメインに由来する機能の方が優位に作用していることを示している。また、正常な Rad23 を高発現させた酵母では総ユビキチン化蛋白質量の顕著な増加が認められたが、UbL ドメインを欠失した Rad23 を高発現させた際には総ユビキチン化蛋白質量がさらに著しく増加した。⁴⁾ 一方、両 UBA ドメインを欠失した Rad23 を高発現させた際には、総ユビキチン化蛋白質量の顕著な減少が認められた。⁴⁾ この結果は、Rad23 が有する UbL ドメインはユビキチン化蛋白質の細胞内濃度を減少させ、UBA ドメインは逆に増加させる機能を担っていることを示している。

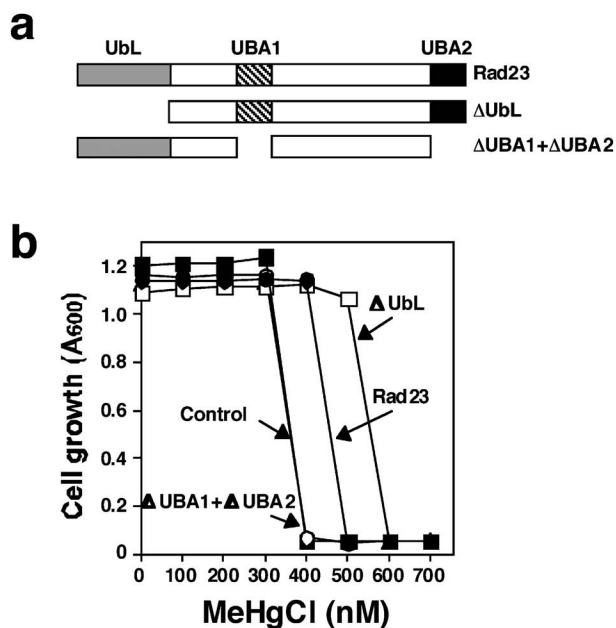


Fig. 5. Effects of Overexpression of Mutant Forms of Rad23 on the Sensitivity of Yeast Cells to Methylmercury
 a: Schematic representation of the structural domains of Rad23 and the mutant proteins generated in this study. Rad23 contains a ubiquitin-like (UbL) domain and two ubiquitin-associated (UBA) domains. b: Yeast cells that overexpressed FLAG-Rad23 or mutant derivatives were cultured in SD (-uracil) liquid medium that contained methylmercury at the indicated concentrations.

以上の結果から、Rad23 が有する 2 つの機能のうち、UBA ドメインを介したユビキチン化蛋白質の分解抑制作用はメチル水銀毒性を軽減し、UbL ドメインを介したユビキチン化蛋白質の分解促進作用はメチル水銀毒性を増強するが、Rad23 高発現酵母中では、ユビキチン化蛋白質の分解抑制作用の方が分解促進作用を凌いでいるために、Rad23 高発現酵母はメチル水銀に対して耐性を示すと考えられる。したがって、細胞内にはメチル水銀毒性の軽減に関与し、かつ、UP システムによって分解される蛋白質が存在し、Rad23 はこの蛋白質の分解を抑制することによってメチル水銀毒性に対して防御的に作用していると考えられる。

5. メチル水銀毒性発現における Cdc34 と Rad23 との係わり

Rad23 は、Cdc34 とは逆に、メチル水銀毒性を軽減する蛋白質の分解を抑制することによってメチル水銀毒性を軽減する可能性が示された。しかし、Cdc34 は蛋白質のユビキチン化に関与し、Rad23 はユビキチン化蛋白質のユビキチン鎖と結合することから、Cdc34 と Rad23 がメチル水銀毒性に間接的に係わる同一の蛋白質を基質として認識する可能性も否定できない。そこで、正常酵母と Rad23 欠損

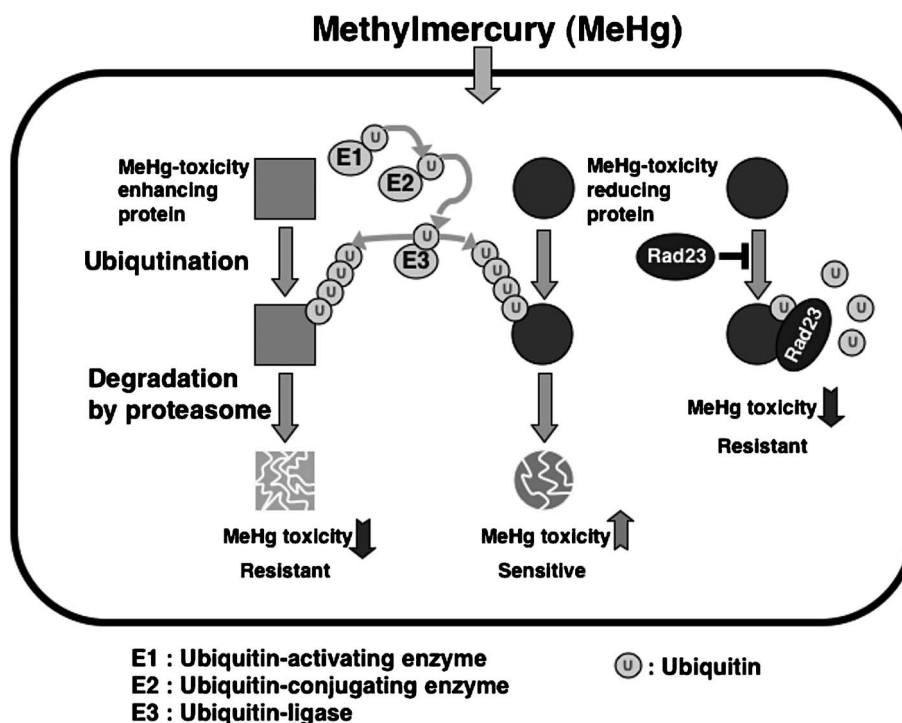


Fig. 6. Regulation of Methylmercury Toxicity by Ubiquitin-proteasome System

酵母にそれぞれ Cdc34 を高発現させたところ、両酵母のメチル水銀に対する耐性はほぼ同程度に上昇した。このことから Rad23 とユビキチン化蛋白質のユビキチン鎖との結合は何らかの厳密な基質蛋白質認識機構によって調節されており、Cdc34 が E2 として関与する蛋白質分解システムに Rad23 の機能はほとんど影響を与えないと考えられる。細胞内にはメチル水銀毒性を軽減又は増強し、かつ、ユビキチン化を受ける複数の蛋白質が存在し、UP システム及び関連蛋白質はそれら蛋白質の細胞内濃度を複雑に調節することによってメチル水銀毒性の発現程度を規定していると考えられる (Fig. 6)。

6. おわりに

近年、様々な神経変性疾患の発症に UP システムが関わっていることが多く報告されており、UP システムの異常は脳機能に大きな障害をもたらすものと考えられる。一方、メチル水銀も主に中枢神経障害を引き起こすことから、UP システムとメチル水銀毒性との関係も注目すべき事実と考えられる。これまでに筆者らが得た知見は、メチル水銀に対する感受性決定機構として UP システムが重要な役割を果たしている可能性を強く示唆するものである。これらの知見はメチル水銀細胞毒性の発現機構及びそれに対する防御機構の解明に有用な手掛かりを与えるだけでなく、UP システムの新しい役割の解明にも大きく貢献し得るものと思われる。今後、Cdc34 及び Rad23 の基質となる蛋白質の中からメチル水銀毒性に係わる蛋白質を同定することによって、UP システムによるメチル水銀毒性調節機構が解明されるものと期待される。

謝辞 本総説に関するすべての研究は東北大学大学院薬学研究科において永沼 章教授の指導の下、多くの大学院生等の協力によって実施されたものであり、この場を借りてそれらの方々に心から感謝申し上げます。

REFERENCES

- 1) Hwang G. W., Furuoya Y., Hiroshima A., Furuchi T., Naganuma A., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **330**, 378–385 (2005).
- 2) Furuchi T., Hwang G. W., Naganuma A., *Mol. Pharmacol.*, **61**, 738–741 (2002).
- 3) Naganuma A., Miura N., Kaneko S., Mishina T., Hosoya S., Miyairi S., Furuchi T., Kuge S., *FASEB J.*, **14**, 968–972 (2000).
- 4) Hwang G. W., Sasaki D., Naganuma A., *Mol. Pharmacol.*, **68**, 1074–1078 (2005).
- 5) Hershko A., Ciechanover, A., *Annu. Rev. Biochem.*, **67**, 425–479 (1998).
- 6) Mathias N., Steussy C. N., Goebel M. G., *J. Biol. Chem.*, **273**, 4040–4045 (1998).
- 7) Pitluk Z. W., McDonough M., Sangan P., Gonda D. K., *Mol. Cell. Biol.*, **15**, 1210–1219 (1995).
- 8) Hwang G. W., Furuchi T., Naganuma A., *FASEB J.*, **16**, 709–711 (2002).
- 9) Deshaies R. J., *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **15**, 435–467 (1999).
- 10) VanDemark A. P., Hill C. P., *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **12**, 822–830 (2002).
- 11) Craig K. L., Tyers M., *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, **72**, 299–328 (1999).
- 12) Hwang G. W., Ishida Y., Naganuma A., *FEBS Lett.*, **580**, 6813–6818 (2006).
- 13) van Laar T., van der Eb A. J., Terleth C., *Mutat. Res.*, **499**, 53–61 (2002).
- 14) Raasi S., Pickart C. M., *J. Biol. Chem.*, **278**, 8951–8959 (2003).
- 15) Elsasser S., Gali R. R., Schwickart M., Larsen C. N., Leggett D. S., Muller B., Feng M. T., Tubing F., Dittmar G. A., Finley D., *Nat. Cell. Biol.*, **4**, 725–730 (2002).
- 16) Chen L., Madura K., *Mol. Cell. Biol.*, **22**, 4902–4913 (2002).