

X-axis: Affymetrix Experiment (Default Interpretation) : Sample Cont 24  
 Y-axis: Affymetrix Experiment (Default Interpretation) : Sample MeHg 24  
 Gene List: all genes (8793)

Fig. 2 24時間メチル水銀処理した細胞の scatter plot analysis

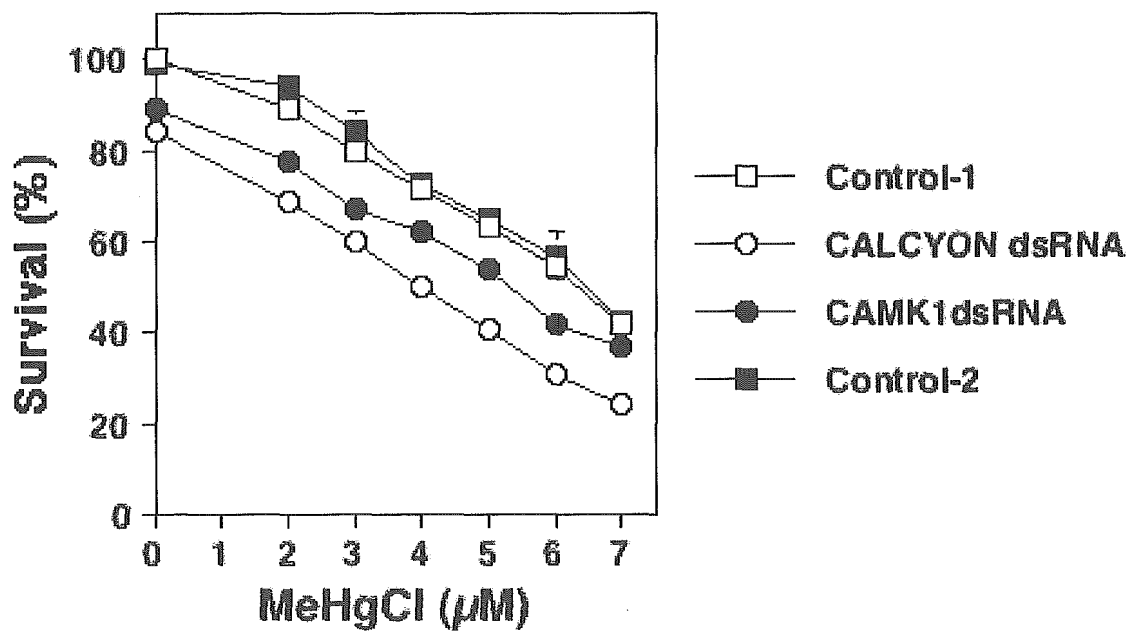
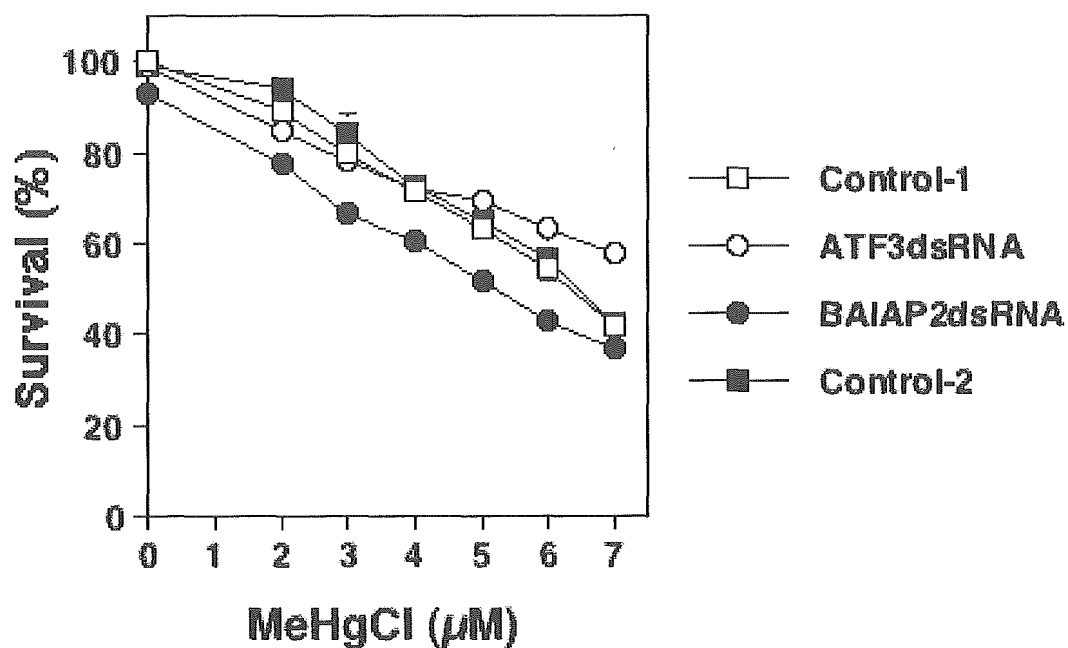


Fig. 3-1 dsRNA 導入細胞のメチル水銀に対する感受性

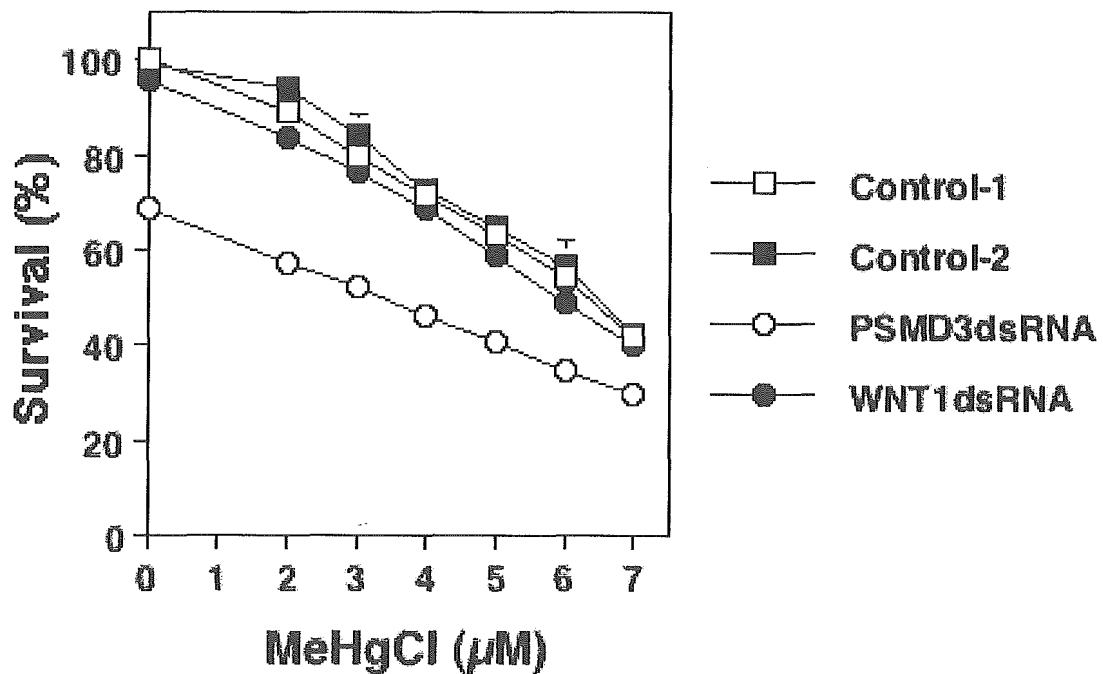
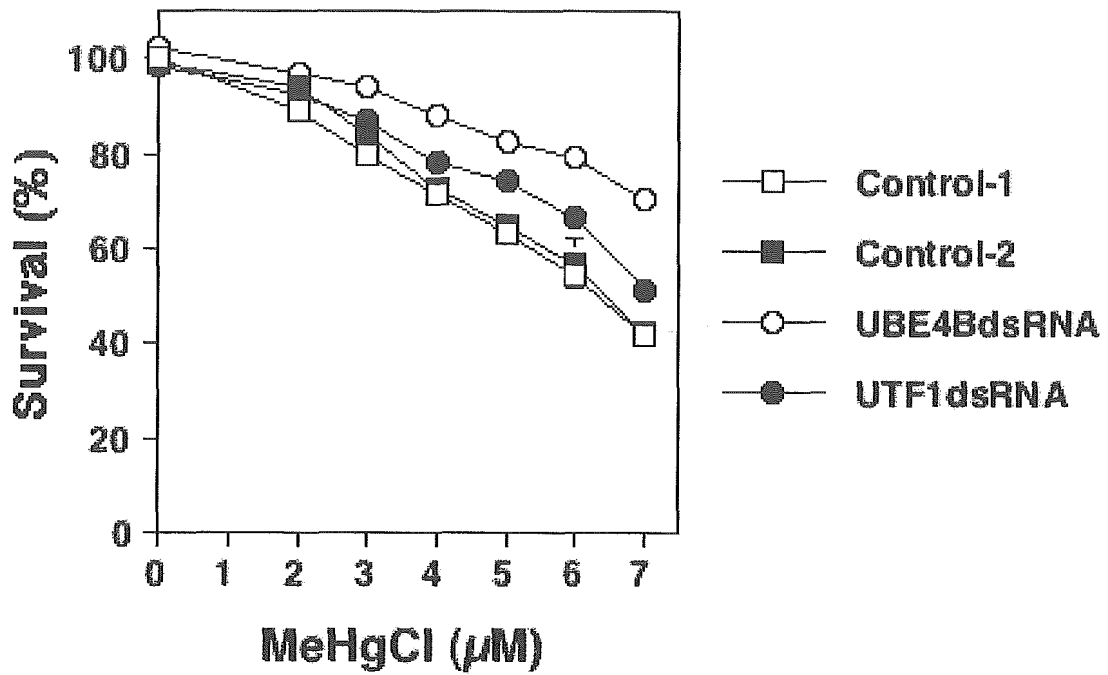


Fig. 3-2 dsRNA 導入細胞のメチル水銀に対する感受性

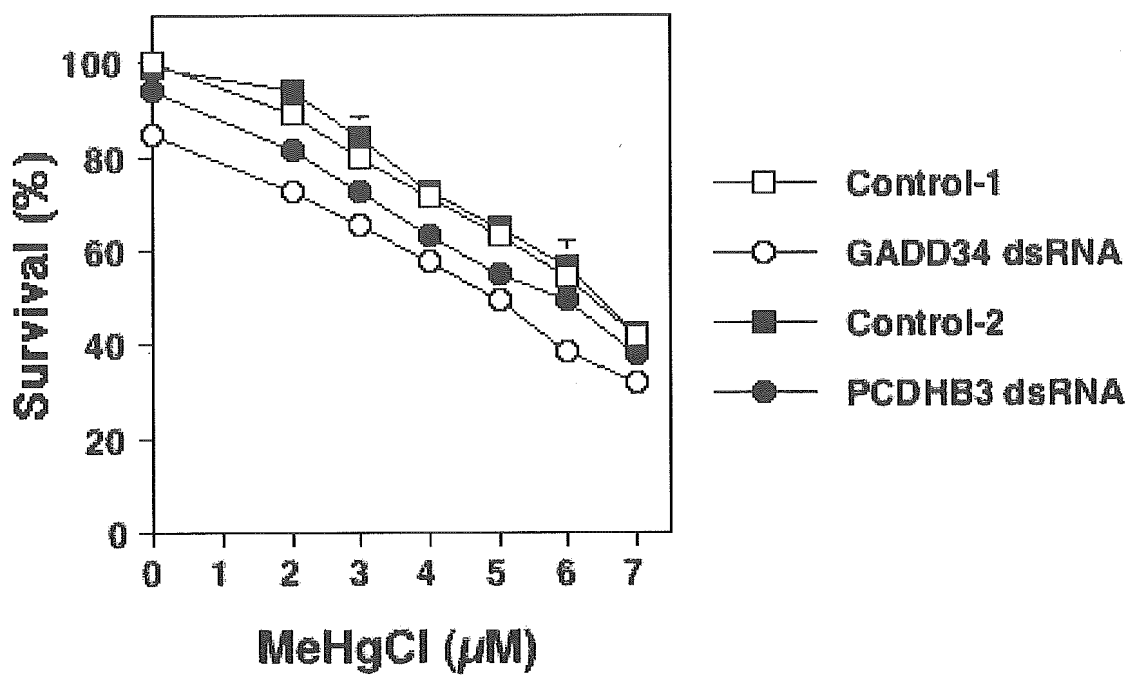


Fig. 3-3 dsRNA 導入細胞のメチル水銀に対する感受性

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）  
（分担）研究報告書

siRNA 導入細胞ライブラリーを用いたメチル水銀感受性に  
影響を与える遺伝子検索

分担研究者 黄 基旭 東北大学大学院薬学研究科助手

メチル水銀による毒性発現機構を解明するために、ノックダウンされることによってヒト培養細胞にメチル水銀耐性を与える遺伝子のスクリーニングを行ったところ、TGM4、OAT、GRM6 および ENO2 遺伝子を同定することに成功した。今回、興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸の代謝に関わる TGM4、GRM6 および OAT が同定されたことから、メチル水銀毒性発現におけるグルタミン酸の役割は非常に興味深い。一方、我々は出芽酵母を用いた検討によって、ミトコンドリアマトリクスでのピルビン酸の蓄積量の上昇がメチル水銀毒性を増強させることを見出している。今回のスクリーニングによってピルビン酸生成に関わる ENO2 のノックダウンが細胞にメチル水銀耐性を与えたことから、ピルビン酸によるメチル水銀毒性増強作用はヒト培養細胞でも同様にメチル水銀毒性増強に関わっており、メチル水銀毒性発現におけるピルビン酸の役割を検討することによってメチル水銀による毒性発現の分子メカニズムが明らかになるものと思われる。

#### A. 研究目的

マイクロアレイ法を応用したメチル水銀感受性に影響を与える遺伝子のスクリーニング法は全遺伝子を網羅的に検索することは可能であるが、多量の情報の中には非特異的なレベルの変動を示す遺伝子も多く含まれていることから、更なる再確認をとる必要があり、そのためには莫大な費用がかかる。そこで、本研究では既に

siRNA 発現ベクターライブラリーを導入した HEK293 細胞を用いて、ノックダウンすることによってヒト培養細胞にメチル水銀耐性を与えるヒト遺伝子の同定を試みる。

#### B. 研究方法

##### 1. ヒト培養細胞においてメチル水銀毒性の発現に関わる遺伝子の検索

約 8500 種のヒト遺伝子を抑制することができる siRNA 発現ベクターライブラリーを既に導入した HEK293 細胞(ヒト胎児腎臓由来の培養細胞)を用いて、正常細胞が生存出来ない塩化メチル水銀  $7 \mu\text{M}$  で 96 時間処理した。この条件下で生存可能な細胞をセレクトクシオンし、回復培養した後クローン化を行った。また、siRNA 導入細胞を塩化メチル水銀  $18 \mu\text{M}$  で 48 時間処理し、回復培養を行った後、再度塩化メチル水銀  $18 \mu\text{M}$  で 48 時間処理し、この条件下でも生存可能な細胞のセレクトクシオンを行った。

## 2. 総 RNA の単離

$5 \times 10^6$  cell の細胞に Isogen 1 ml を加えて懸濁した後、chloroform 0.2 ml を加え、激しく攪拌した後、12,000 xg で 15 分間遠心した。得られた水層に isopropanol 0.5 ml を加え静置した後、12,000 xg で 10 分間遠心した。得られた沈殿を 70 %エタノールによりリンスし、乾燥後、TE に溶解し総 RNA 溶液とした。

## 3. 逆転写反応

RNA 500 ng に対し M-MLV RTase (50 U) , RNase (10 U) , oligo DT primer (50 pmol) , dNTP mixture (0.5 mM) ,  $5 \times$  M-MLV buffer ( $2 \mu\text{l}$ ) となるように反応溶液

を調製し、 $42^\circ\text{C}$  で 15 分間逆転写反応を行った。反応後酵素を失活させるため、 $95^\circ\text{C}$  で 2 分間加熱した。

## 4. 導入 siRNA 配列の確認

得られた cDNA を template とし、siRNA を含む配列を増幅するようなプライマーを用いて PCR 反応によって siRNA を含む配列を増幅し、得られた PCR 産物をアガロースゲル電気泳動により精製した後、pGEM-T easy vector に Ligation ver 2.1 を用いて導入した。得られたベクターを大腸菌にトランスフェクションし、24 時間後にプラスミドを plasmid miniprep kit を用いて回収し、シーケンス解析を行い、NCBI の BLAST を用いて siRNA の塩基配列を確認した。使用したプライマーは以下に示した。

siRNA	forward	:
	AATGTCTTTGGATTTGGGAATCT	
	TA	
	reverse	:
	AAAAGGGTGGACTGGGATGAGT	
	A	

## 5. siRNA 発現ベクターの作製

4 で同定された各遺伝子の発現を抑制する siRNA のプライマーを  $95^\circ\text{C}$  で 5 分間アニリングさせ、室温まで放冷した後、T4 PNK を用いてリン酸化さ

せた。リン酸化させた二本鎖 siRNA を pFIV-H1 に Ligation ver 2.1 を用いて導入し、得られたベクターを大腸菌にトランスフェクションし、24 時間後に大腸菌からプラスミドを plasmid miniprep kit を用いて回収した。使用したプライマーは以下に示した。

CCL2

forward :  
GATCCGACCAGCGGCAGGTGTC  
CCAGAGAAGCTCTTCCTG

TCAGAAGCTTCTTTGGGACACTT  
GCTGCTGGTTTTTTG

reverse :  
AATTCAAAAACCAGCAGCAAGT  
GTCCCAAAGAAGCTTCTG

ACAGGAAGAGCTTCTCTGGGACA  
CCTGCCGCTGGTCG

ENO2

forward :  
GATCCGTGGGGAGATGATTGATG  
GGATGAATGACTTCCT

GTCAGATCATTCATCCCATTAAT  
CATTTCCCCATTTTTG

reverse :  
AATTCAAAAATGGGGAAATGATT  
AATGGGATGAATGATCTGACAG

GAAGTCATTCATCCCATC  
AATCATCTCCCCACG

GRM6

forward :  
GATCCGTAATTGTGTAGACATGG  
AGTAAGCCTCCTTCCTGTCAGA

GAGGCTTATTCATGTTT  
ACACAATTATTTTTG

reverse :

AATTCAAAAATAATTGTGTAAAC  
ATGGAATAAGCCTCTCTGACAGG

AAGGAGGCTTACTCCAT  
GTCTACACAATTACG

OAT

forward :

GATCCGACTTCAACTGAGTATAG  
ATGCCGTTACCTTCCTGTCAGAG

TAATGGCATCTATATTCA  
GTTGAAGTTTTTTG

reverse :

AATTCAAAAACCTTCAACTGAAT  
ATAGATGCCATTACTCTGACAGG

A

AGGTAACGGCATCTATA  
CTCAGTTGAAGTCG

PCK1

forward :

GATCCGAACTAGTAGGTCGTCTT  
GCCCGAGATTCTTCCTGT

CAGAAATCTTGGGCAAGATGACC  
TACTAGTTTTTTTTG

reverse	:	TGM4	
AATTCAAAAAAACTAGTAGGTCA		forward	:
TCTTGCCCAAGATTTCTGA		GATCCGGCTGGTGAGCCCATGG	
		CCTGGAGATATCTTCCTGTCAG	
CAGGAAGAATCTCGGGCAAGAC			
GACCTACTAGTTCG		AATATCTTCAGGCCATGGGTTCA	
RGS1		CCAGCTTTTTG	
forward	:	reverse	:
GATCCGCAAGCAGTAGTAGCAGT		AATTCAAAAAGCTGGTGAACCCA	
GGCAATTTGACTTCCTGTCA		TGGCCTGAAGATATTCTGACAG	
GATCAAATTGCCATTGCTACTAT		GAAGATATCTCCAGGCCATGGGC	
TGCTTGTTTTTG		TCACCAGCCG	
reverse	:		
AATTCAAAAACAAGCAATAGTAG		<u>6. siRNA 発現ベクターの細胞への導入</u>	
CAATGGCAATTTGATCTGACA		5×10 <sup>5</sup> cells/2 ml/well となるように	
		に293細胞を6 well plate にまいた後、	
GGAAGTCAAATTGCCACTGCTAC		24時間後に作製した siRNA 発現ベク	
TACTGCTTGCG		ターを Lipofectamine 2000 を用い	
TAF13		て導入した。Lipofectamine 5 μg を	
forward	:	OptiMEM 125 μl に滴下し、5分後に	
GATCCGTTTCAGTGGTAAACTCTG		siRNA 発現ベクター 1 μg を	
TGACAAGATCCTTCCTGTCAG		OptiMEM 125 μl に混合させたもの	
		を滴下し、20分静置した後、培養し	
AGATCTTGTCATAGAGTTTATCA		た細胞に滴下し、24時間後に毒性試	
CTGAATTTTTG		験に用いた。	
reverse	:	<u>7. メチル水銀に対する感受性の検討</u>	
AATTCAAAAATTCAGTGATAAAC		1×10 <sup>4</sup> cells/90 μl/well または 2×	
TCTATGACAAGATCTCTGACAG		10 <sup>4</sup> cells/90 μl/well となるように細	
		胞を96 well plate にまいた後、24時	
GAAGGATCTTGTCACAGAGTTTA			
CCACTGAACG			



間後に各濃度の塩化メチル水銀で処理した。24時間または48時間後に塩化メチル水銀を含む培地からalamablue 10  $\mu$ lを含む培地 100  $\mu$ lに交換し、蛍光プレートリーダーで蛍光を測定した (excitation, 544nm; emission, 590nm)。

#### (倫理面への配慮)

本研究では動物などは使用せず、生物としてヒト培養細胞のみを用いる。したがって、倫理面での配慮を必要としない。

#### C. 結果および考察

ノックダウンされることによって培養細胞にメチル水銀耐性を与える遺伝子を検索するために、正常細胞が生存できない濃度 (9  $\mu$ M, 96時間) の塩化メチル水銀を処理し、この条件下でも生存可能な siRNA 導入細胞をクローン化し、導入されている siRNA の塩基配列を確認した。その結果、グルタミン酸代謝に関わる TGM4 (Dubbink, H. J. et al, 1996)、OAT (Wang, T. et al, 2000) および GRM6 (Fredriksson, R. et al, 2003) や、解糖系に関わる ENO2 (Oliva, D. et al, 1991) および PCK1 (Stoffel, M. et al, 1993) など8種の遺伝子をそれぞれノックダウンできる塩基配列が挿入されていた。得られた siRNA 導

入細胞は特定の遺伝子の発現が抑制され、それによって通常では生存できないメチル水銀濃度においても生存可能になっている可能性が考えられる。しかし、これらの中には突然変異などによってメチル水銀耐性を示した細胞も含まれている可能性が考えられる。そこで、これらの遺伝子をそれぞれノックダウンさせる siRNA 発現ベクターを作成し、HEK293細胞に導入しメチル水銀に対する感受性を検討した。その結果、TGM4、OAT、ENO2 および GRM6 をノックダウンさせた細胞はメチル水銀に対して耐性を示したものの、他の4種の遺伝子に対する siRNA をそれぞれ導入した細胞は対照細胞と同程度のメチル水銀感受性を示した (Fig. 1)。このことから、TGM4、OAT、GRM6 および ENO2 遺伝子由来の産物がメチル水銀の毒性発現に何らかの関与をしている可能性が考えられる。特に、TGM4、OAT および GRM6 はグルタミン酸代謝に関わる因子であり、グルタミン酸は哺乳類中枢神経系において重要な興奮神経伝達物質として知られている。また、過剰なグルタミン酸は神経細胞障害作用をもち、様々な神経変性疾患の原因と考えられている。したがって、メチル水銀による毒性発現におけるグルタミン酸の役割は非常に興味深い。しかし、これら

のノックダウン細胞が示すメチル水銀耐性度は対照細胞に比べて僅かであったことから、更なる検索が必要であると思われる。そこで、塩化メチル水銀によるセレクションの条件を 9  $\mu\text{M}$ 、96 時間という低濃度長時間処理から 18  $\mu\text{M}$ 、48 時間という高濃度短時間処理の条件に変更した。さらに塩化メチル水銀によるセレクションを 2 度行うことによって、突然変異などによる自然耐性の獲得や僅かなメチル水銀耐性を示す細胞の割合を減少させることができるものと考えられる。2 度の塩化メチル水銀処理によって生存可能な siRNA 導入細胞を検索したところ、対照細胞に比べて明らかなメチル水銀耐性を示す siRNA 導入細胞群 (No. 27 および No. 36) を見出すことに成功した (Fig. 2)。今後、これらの細胞群をクローン化しシーケンス解析を行うことにより挿入されている siRNA の配列を決定するとともに、実際に同定された遺伝子の発現がメチル水銀感受性決定に関与しているかを検討する予定である。本研究はヒト培養細胞でのメチル水銀の感受性決定に関わるヒト遺伝子を同定することによって、これまで全く不明であったメチル水銀毒性発現機構を解明するための突破口となり、関連研究の発展をもたらすものと期待される。

#### D. 参考文献

Dubbink, H. J., Verkaik, N. S., Faber, P. W., Trapman, J., Schroder, F. H., and Romijn, J. C. (1996) Tissue specific and androgen-regulated expression of human prostate-specific transglutaminase. *Biochem J* 315, 901-908

Fredriksson, R., Lagerstrom, M. C., Lundin, L. G., and Schioth, H. B. (2003) The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol Pharmacol* 63, 1256-1572

Kittler R., Putz G., Pelletier L., Poser I., Heninger A.K., Drechsel D., Fischer S., Konstantinova I., Habermann B., Grabner H., Yaspo M.L., Himmelbauer H., Korn B., Neugebauer K., Pisabarro M.T. and Buchholz F. (2004) An endoribonuclease-prepared siRNA screen in human cells identifies genes essential for cell division. *Nature* 432, 1036-40

Oliva, D., Cali, L., Feo, S., and Giallongo, A. (1991) Complete structure of the human gene encoding neuron-specific enolase. *Genomics* 10, 157-165

Stoffel, M., Xiang, K. S., Espinosa, R. 3d, Cox, N. J., Le Beau, M. M., and Bell, G. I. (1993) cDNA sequence and localization of polymorphic human cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase gene (PCK1) to chromosome 20, band q13.31: PCK1 is not tightly linked to maturity-onset diabetes of the young. *Hum Mol Genet* 2, 1-4

Wang, T., Steel, G., Milam, A. H., and Valle, D. (2000) Correction of

ornithine accumulation prevents retinal degeneration in a mouse model of gyrate atrophy of the choroid and retina. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 1224-1229

E. 研究発表

1. 論文発表

なし。

2. 学会発表

なし。

F. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

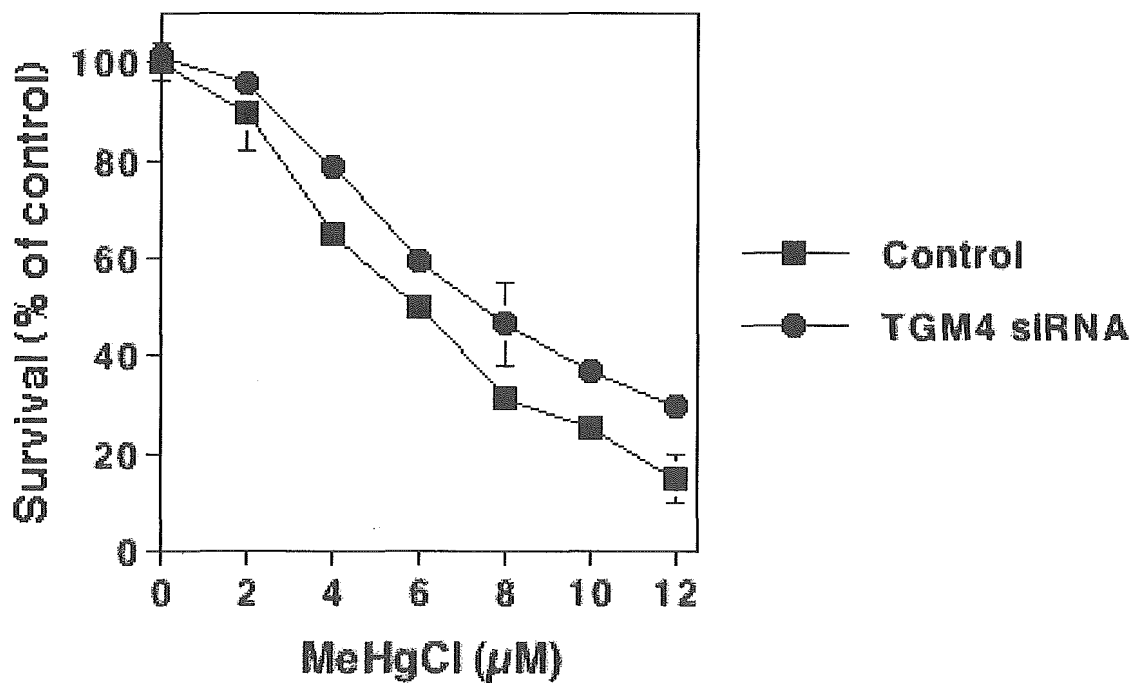
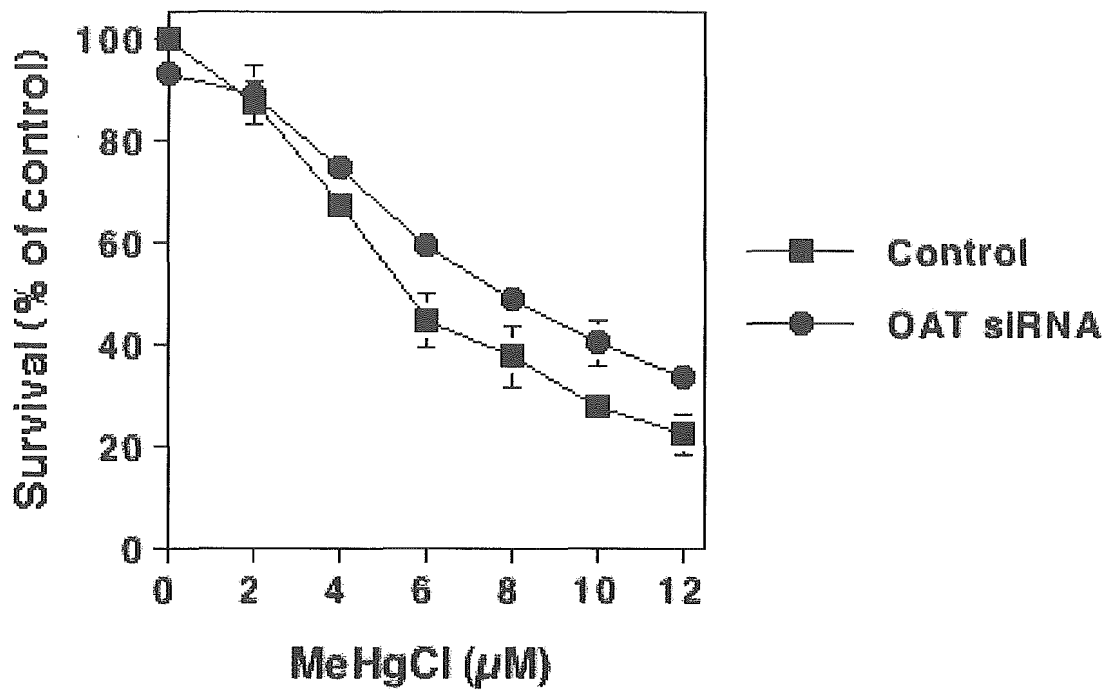


Fig. 1-1 siRNA 導入細胞のメチル水銀に対する感受性

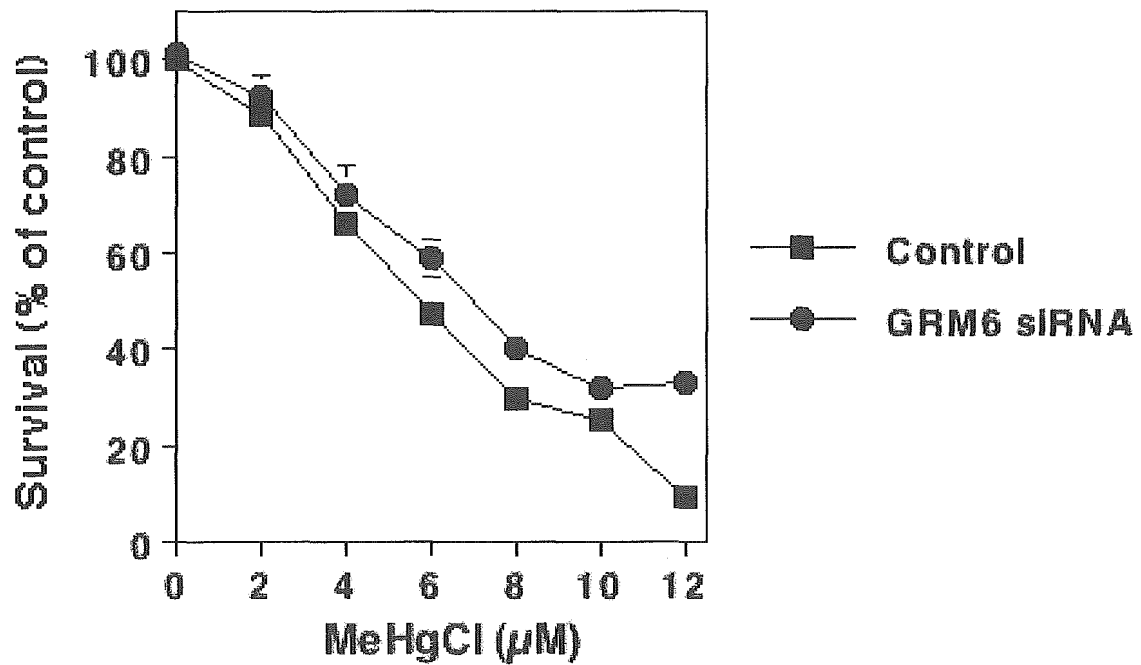
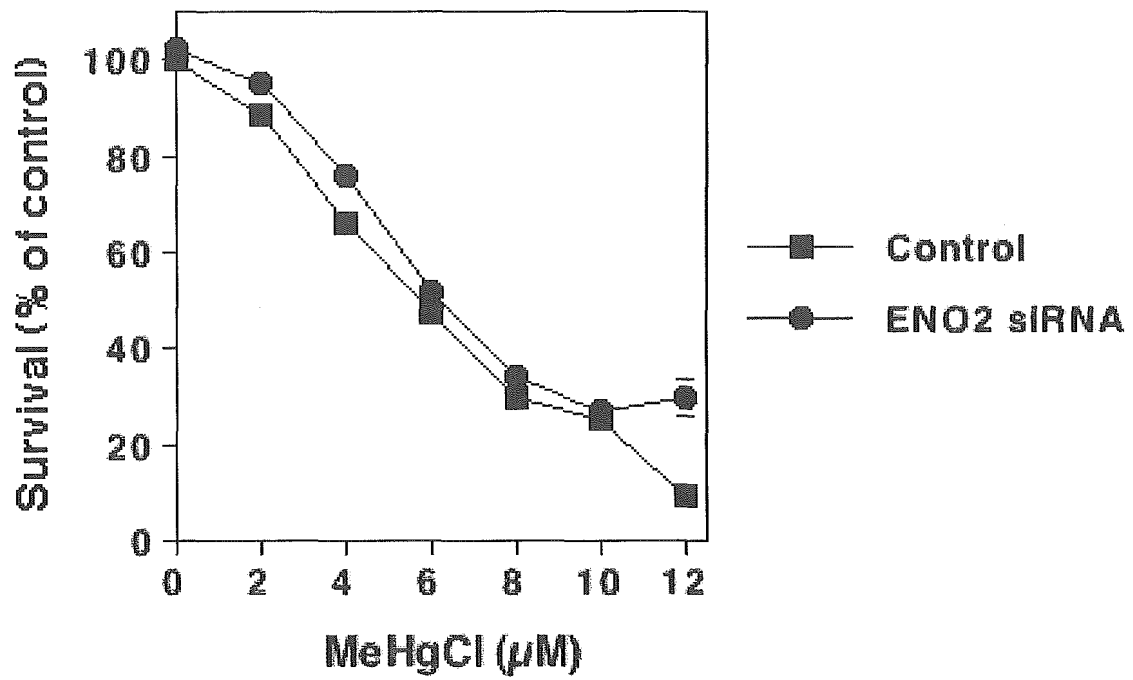


Fig. 1-2 siRNA 導入細胞のメチル水銀に対する感受性

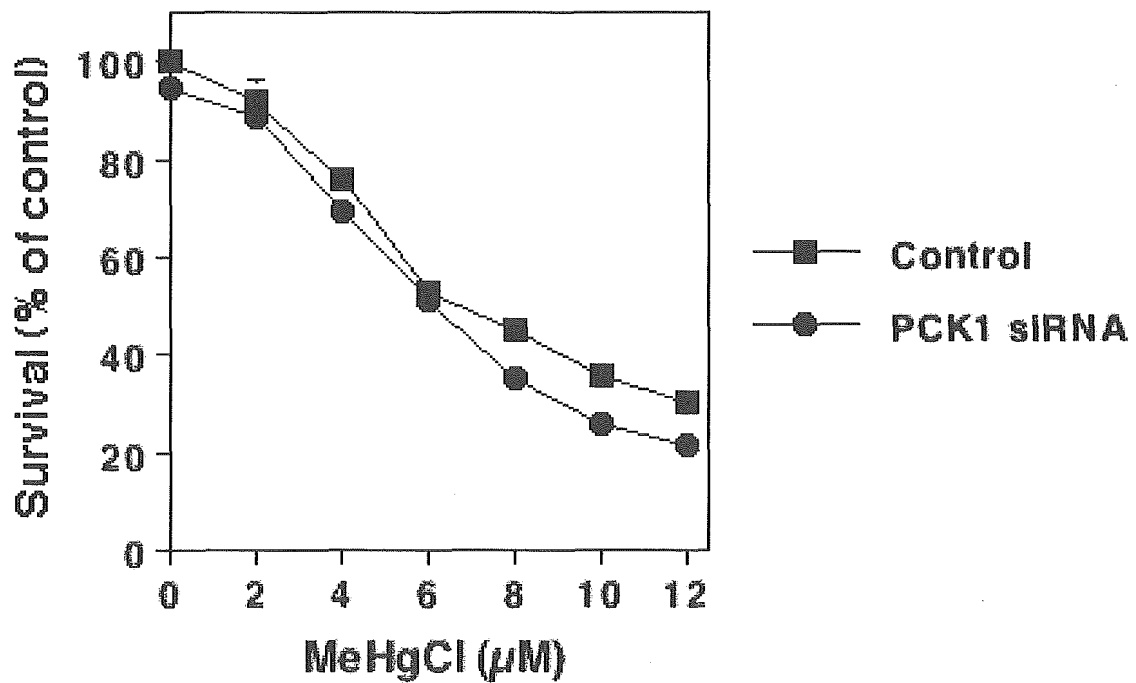
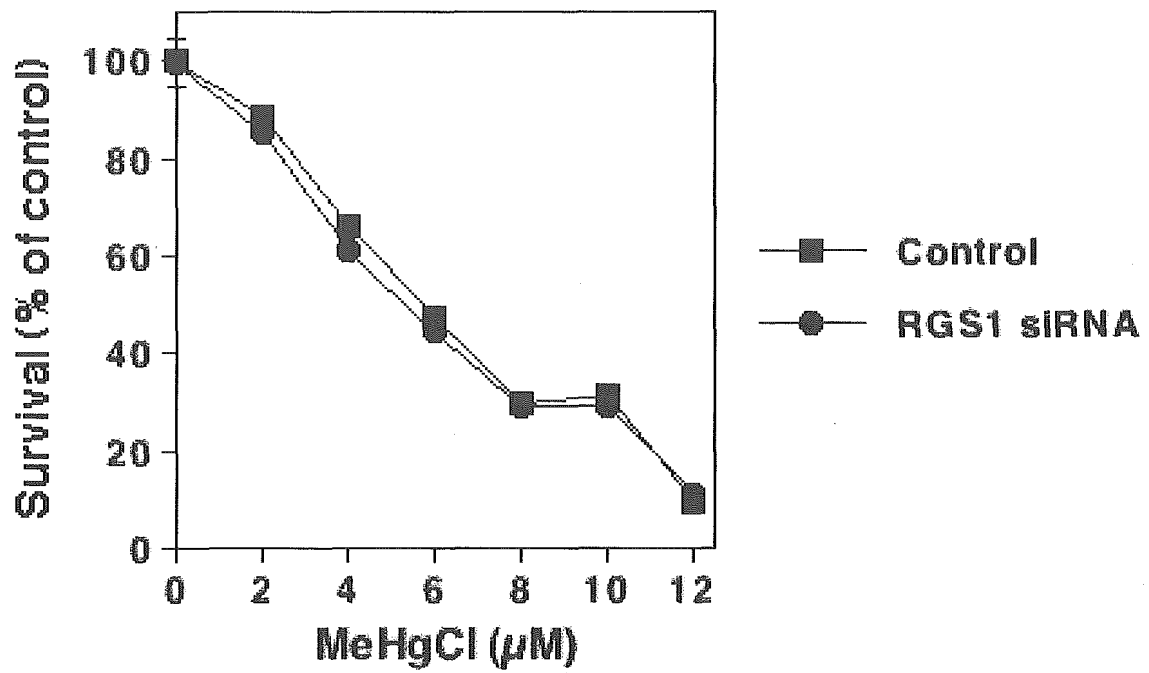


Fig. 1-3 siRNA 導入細胞のメチル水銀に対する感受性

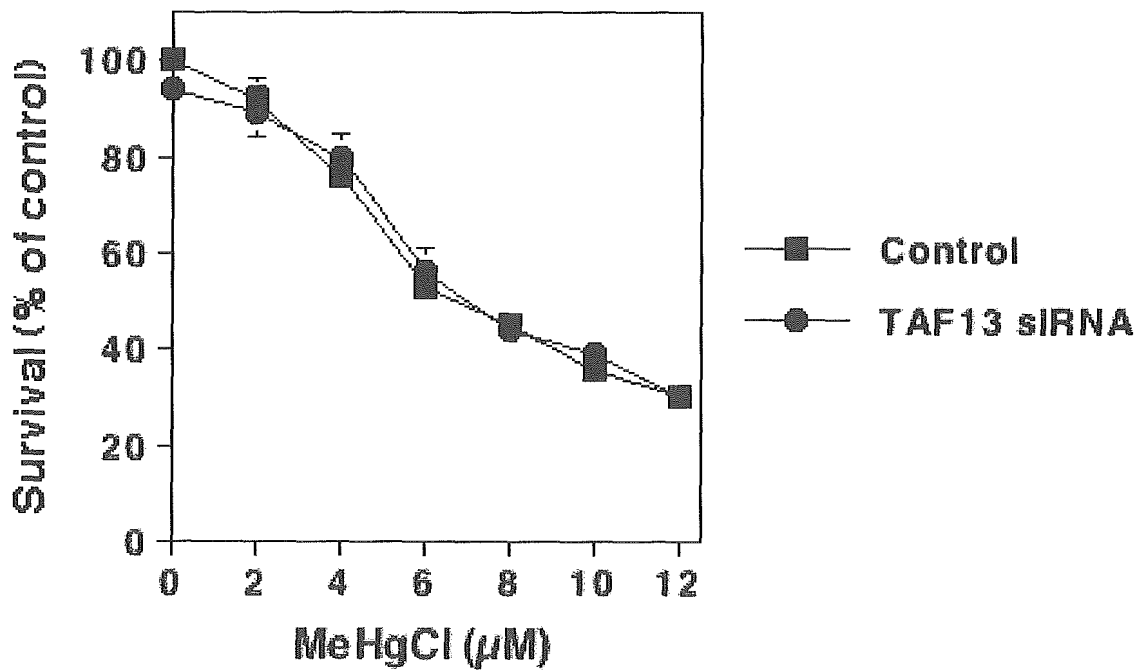
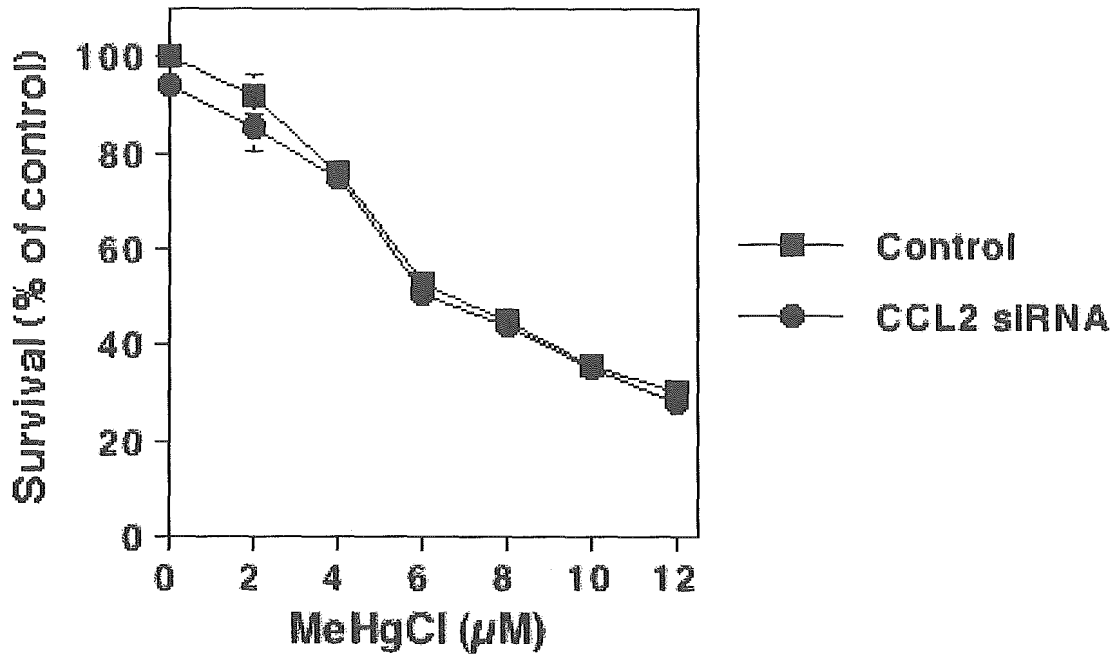


Fig. 1-4 siRNA 導入細胞のメチル水銀に対する感受性

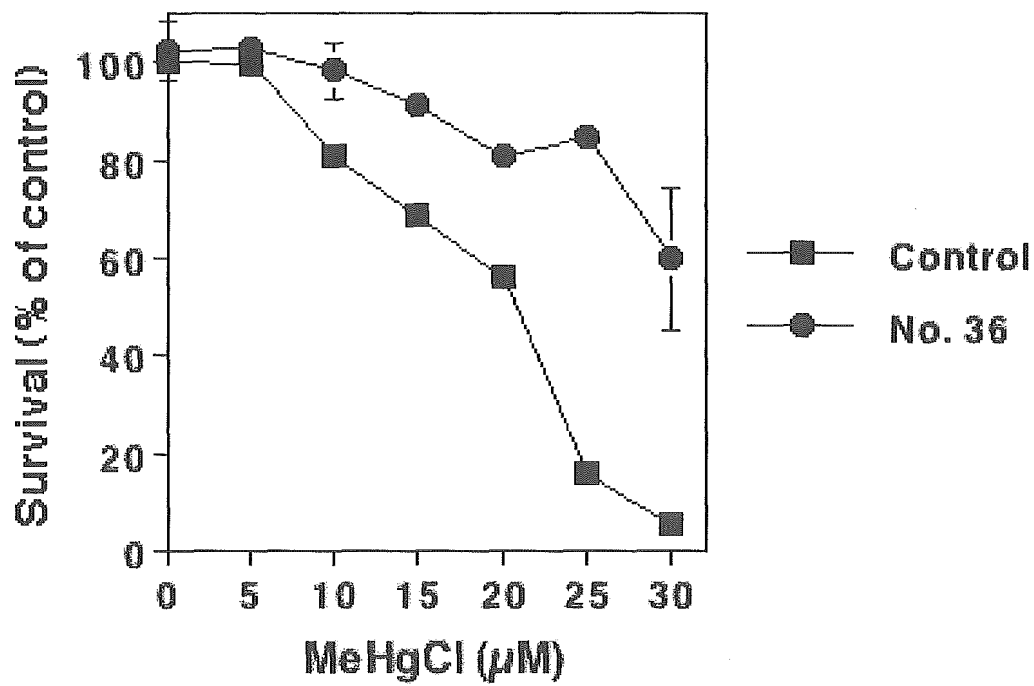
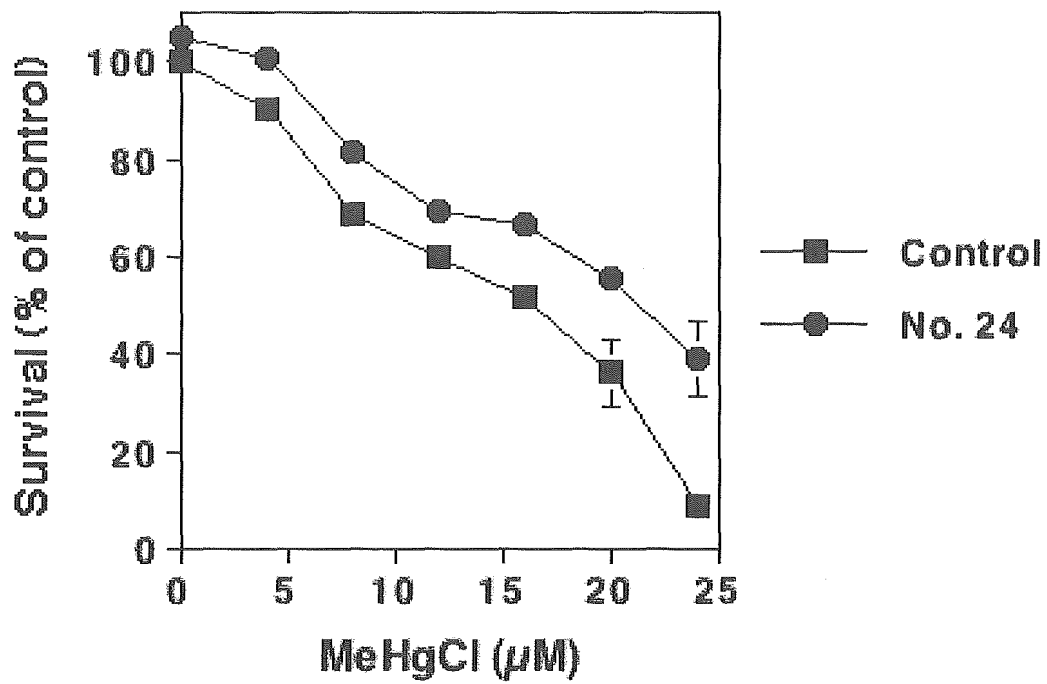


Fig. 2 siRNA 導入細胞群のメチル水銀に対する感受性



厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

（分担）研究報告書

## Eno2 ノックダウンによるメチル水銀耐性獲得機構の解析

分担研究者 黄 基旭 東北大学大学院薬学研究科助手

Eno2 のノックダウンがヒト胎児由来培養細胞をメチル水銀耐性にすることから、メチル水銀毒性とピルビン酸との関係を検討した。その結果、ヒト脳由来細胞である IMR32 のメチル水銀感受性をピルビン酸が顕著に増強させることが判明した。また、同様の現象が酵母でも認められた。酵母を用いてその機構を検討したところ、ピルビン酸のミトコンドリアへの流入促進がメチル水銀毒性を増強させることが明らかとなった。ミトコンドリア中に蓄積したピルビン酸はアセチル CoA への変換およびそれに続く TCA サイクルでの代謝を受けることなくメチル水銀毒性を増強することも示唆され、ピルビン酸による TCA サイクル非依存的なメチル水銀毒性増強機構の存在が考えられる。

### A. 研究目的

siRNA ライブラリーを用いたメチル水銀感受性を決定する因子の検索によって、Eno2 のノックダウンがヒト胎児由来培養細胞をメチル水銀耐性にすることが判明した。Eno2 は細胞内での pyruvate の生成経路に関わる酵素の一つであり、Eno2 のノックダウンによって、細胞内での pyruvate の生成が抑制されると考えられる。そこで、細胞内での pyruvate 生成とメチル水銀毒性との関係を検討した。

### B. 研究方法

#### 1. IMR-32 細胞の培養

ヒト脳由来の神経細胞である IMR32 細胞を plate に播き、37℃、5% CO<sub>2</sub> 存在下で培養した。

#### 2. ρ<sup>0</sup>細胞の作製

酵母 BY4742 株を 10 μg/μL EtBr を含む 2mL SD 培地で 1 晩、アルミ箔で遮光しながら 30℃で振とう培養し、その培養液 10 μL を新たな 10 μg/μL EtBr を含む 2mL SD 培地に植菌し、再度 1 晩培養した。この培養液 10 μL を、YPAD 寒天培地に塗布し、2 晩、30℃で静置培養し、形成されたコロニーを、それぞれグルコースを含

む YPAD 寒天培地とグルコースでなくグリセロールを含む寒天培地 (YPAG) に塗布し、グルコースを含む YPAD 寒天培地では生育できるが、グリセロールを含む YPAG 寒天培地では生育できないものを  $\rho^0$  細胞とする。

### 3. Colony 形成を指標とした耐性試験

空ベクター pKT10 のみを導入した株、もしくは何らかの蛋白質をコードする遺伝子を組み込んだ pKT10 を導入した株、それぞれの株を SD 培地 2 mL に植菌し 30°C で一晚振盪培養した後、 $1 \times 10^6$  cells を SD 培地 920  $\mu$ L に植菌した後、滅菌水または 10  $\mu$ M のメチル水銀を 80  $\mu$ L 加えた (final : 0, 800 nM となる)。30°C で 3hr 静置培養した後、超音波処理し、200  $\mu$ L を YPAD 寒天培地に塗布し、30°C で培養した後、顕微鏡で colony 形成の有無を観察した。

(倫理面への配慮)

本研究では動物などは使用せず、生物としてヒト培養細胞のみを用いる。したがって、倫理面での配慮を必要としない。

## C. 結果および考察

### (1) IMR32 細胞のメチル水銀感受性に与えるピルビン酸の影響

ヒト脳由来の神経細胞である

IMR32 を用いて、メチル水銀毒性に対するピルビン酸の影響を検討した。その結果、ピルビン酸 (細胞増殖に影響を与えない濃度で添加) がメチル水銀毒性を顕著に増強させることが確認された。この結果は、ミトコンドリアに取り込まれたピルビン酸がメチル水銀毒性の発現に大きく関わっている可能性を示唆しており、ピルビン酸によるメチル水銀毒性増強の機構を解明することによって、これまで全く不明であったメチル水銀の毒性発現機構が解明されるものと期待される。

### (2) ピルビン酸によるメチル水銀毒性増強機構の解析

ピルビン酸によるメチル水銀毒性増強現象はヒト細胞のみならず、酵母でも観察された。そこで、ヒト細胞よりも単純で検討が容易な酵母を用いてピルビン酸によるメチル水銀毒性増強機構を解析した。

機構解糖系は glucose の代謝経路であり、glucose は何段階かの反応を経て glycerate-2-phosphate となり、Eno1 および Eno2 により phospho-enol-pyruvate となる。この phospho-enol-pyruvate はさらに、Cdc19 によって pyruvate に変換される。そこでまず、Eno2 または Cdc19 の高発現が酵母のメチル水銀感受性に与える影響を検討した。その結果、Eno2 または Cdc19 を高発現する酵母は共にメチル水銀に対して高い感

受性を示した。

解糖系によって glucose より生成された pyruvate は、ミトコンドリアの膜に存在するトランスポーターを介してミトコンドリアへ運ばれ、クエン酸回路で代謝されるが、そのトランスポーターとして Yil006w が同定されている。そこで、pyruvate のミトコンドリアへの運搬とメチル水銀毒性との関係を検討するために、*yil006w* 欠損酵母のメチル水銀毒性に対する感受性を検討したところ、この欠損酵母はメチル水銀に対して耐性を示した。これらの結果より、ミトコンドリアの中により多くの pyruvate が流入することによってメチル水銀毒性発現が増強される可能性が考えられる。

ミトコンドリアの中により多くの pyruvate が流入することがメチル水銀毒性が増強される可能性が考えられたので、ミトコンドリアの機能が欠失した酵母はメチル水銀毒性に対して耐性を示すと考えられる。 $\rho^0$  細胞はミトコンドリア機能を欠失した酵母であり、呼吸鎖が存在しないために、エネルギー供給を完全に解糖系に依存する酵母である。そこで、 $\rho^0$  細胞のメチル水銀毒性に対する感受性を検討したところ、 $\rho^0$  細胞はメチル水銀に対して耐性を示した。この結果は、ミトコンドリア中での pyruvate 利用がメチル水銀毒性の発現に重要な役

割を果たしていることを示唆している。

ミトコンドリアに取り込まれたピルビン酸は TCA サイクルによって代謝されることから、アセチル CoA を出発物質とする TCA サイクル構成酵素群の遺伝子欠損がメチル水銀毒性に与える影響を検討したところ、どの酵素の遺伝子を欠損させてもメチル水銀毒性はほとんど影響を受けなかった。そこで、ピルビン酸のアセチル CoA への変換に関与する酵素である dihydrolipoyl dehydrogenase (LPD1) を欠損させた酵母のメチル水銀感受性を検討したところ、LPD1 欠損酵母 (*lpd $\Delta$* ) は正常酵母に比べて高いメチル水銀感受性を示し、ピルビン酸添加によるメチル水銀毒性増強の程度も高いことが判明した。ピルビン酸をミトコンドリア中に取り込むトランスポーターである Yil006w を欠損した酵母がメチル水銀に対して高い耐性を示すことから、ピルビン酸によるメチル水銀毒性増強作用が発現するためには、ピルビン酸がミトコンドリア中に取り込まれる必要があると考えられる。したがって、これらの結果は、ミトコンドリア中に蓄積したピルビン酸が、アセチル CoA への変換およびそれに続く TCA サイクルでの代謝を受けることなくメチル水銀毒性を増強することを示唆してい

る。我々が調べた限りでは、アセチル CoA への変換を逃れたピルビン酸がミトコンドリア中で示す作用についての知見は乏しい。メチル水銀毒性とミトコンドリア中へのピルビン酸取り込み量との関係を詳細に検討することによって、メチル水銀毒性発現機構のみならず、ミトコンドリア中でのピルビン酸の役割についても新しい知見が得られると思われる。

D. 研究発表

3. 論文発表

なし。

4. 学会発表

なし。

E. 知的財産権の出願・登録状況

なし。