

200736010A

別添 1 厚生労働科学研究費補助金研究報告書表紙

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

化学物質感受性の個人差を決定する遺伝子的
要因の検索とその作用機構解析

(H17-化学-010)

平成19年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 永沼 章

平成 20 (2008) 年 4 月

目次

I. 総括研究報告	
化学物質感受性の個人差を決定する遺伝子的要因の検索とその作用機構解析	1
永沼 章	
II. 分担研究報告	
1. siRNAライブラリーを用いたメチル水銀に対する感受性決定因子の網羅的検索	11
黄 基旭、永沼 章	
2. AMP-activated protein kinase (AMPK) の触媒サブユニットPRKAA1の欠損によるメチル水銀耐性獲得機構	27
黄 基旭	
3. メチル水銀毒性を増強する因子Whi2の作用機構	67
黄 基旭	
4. 細胞内蛋白質輸送システムによるメチル水銀毒性増強機構	103
黄 基旭	
5. Protein phosphatase type 1の機能低下による亜ヒ酸毒性増強機構	139
久下周佐	
6. アドリアマイシン毒性の発現における脱ユビキチン化酵素の役割	167
久下周佐	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	181
IV. 研究成果の刊行物・印刷物	183

1. 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

（総括）研究報告書

化学物質感受性の個人差を決定する遺伝子的要因の検索とその作用機構解析

主任研究者 永沼 章 東北大学大学院薬学研究科教授

本研究の目的は、健康影響が懸念されている化学物質や重金属類に対する感受性決定遺伝子を網羅的に検索・同定することである。昨年度までに、siRNA発現プラスミドライブラリーを用いた方法により、ノックダウンすることによってメチル水銀に対するHEK293細胞（ヒト由来細胞）の感受性に影響を与えるヒト遺伝子群の検索方法を確立し、本細胞をメチル水銀耐性にする遺伝子をいくつか同定することに成功したが、本年度はより確実な検索法の確立を目指し、siRNA発現プラスミドライブラリーではなく、合成siRNA断片を一つずつ細胞に導入するという方法を検討し、発現抑制によって細胞にメチル水銀高感受性を与える遺伝子として10種、逆に、発現抑制によって細胞にメチル水銀耐性を与える遺伝子として13種の遺伝子を同定することに成功した。また、これまでに本研究において同定された遺伝子の一部については作用機構解析を行い、興味深い新知見が多数得られた。本研究の成果は、今後の化学物質毒性に関する研究の進展にも大きく貢献するものと期待される。

分担研究者

久下周佐

（東北大学大学院薬学研究科・准教授）

黄 基旭

（東北大学大学院薬学研究科・助教）

障害が生じると考えられる。原因不明とされている疾病の中に、化学物質が高感受性個体に引き起こした症例が含まれている可能性も否定できない。化学物質に対して遺伝的に高感受性を示す人々の特定は、化学物質による健康被害を最小限に抑えるためにも、また、より正確なリスク評価を行う上でも極めて重要な厚生労働行政課題と考えられる。しかしながら、感受性の個体差に関わる遺伝子が解明されている化学物質はほとんど存在しない。我々はこれまで、

A. 研究目的

遺伝的ハイリスクグループと呼ばれる化学物質に対する感受性が遺伝的に高い人々の存在が示唆されており、これらの人々は比較的少量の化学物質摂取によって健康に

哺乳動物に先駆けて全遺伝子配列が決定された酵母を真核細胞生物のモデルとして用い、無作為かつ網羅的な遺伝子スクリーニング法を種々開発して感受性決定遺伝子の同定に挑んできた。酵母の遺伝子の多くはヒトにも類似のものが存在するため、この方法によっていくつかの新規ヒト感受性決定遺伝子の同定に成功したが、本法では酵母で得られた知見をヒト培養細胞で確認する作業に多くの時間が費やされた。

この問題を解決するために、本研究では、最近急速な発展を遂げたsiRNA法を利用し、欠損することによって培養細胞の化学物質感受性に影響を与えるヒト遺伝子群を検索する方法を新たに開発することを第一の目的とする。この方法は、主要なヒト遺伝子をsiRNAライブラリーを用いて一つずつノックダウンするという画期的な手法を取り入れたものであり、この検索方法を用いればヒトの遺伝子を直接同定することができるばかりでなく、対象となる化学物質に対する感受性決定遺伝子群のほとんどが一気に同定されるので、その化学物質の毒性の発現程度を調節する細胞内機構の全容解明も夢ではない。本研究では最終的に、siRNAライブラリーを利用した遺伝子ノックダウン法により、代表的な化学物質に対する感受性決定に関与するヒト遺伝子群を網羅的に同定し、それらの作用機構解明をめざす。さらに本研究では、酵母を用いた信頼性の高い機能遺伝子検索法による感受性決定遺伝子の検索も行う。本研究によって、目的

とする遺伝子群が非常に効率良く同定されるものと期待され、得られる成果はこれまで世界中の研究者が集積してきた知見をも凌駕する極めて画期的なものとなり、化学物質に対する遺伝的ハイリスクグループの同定やこれを考慮したリスク評価の実現化、さらには中毒治療法の開発などに大きく貢献することになる。

B. 研究方法

ヒトsiRNAライブラリーを用い、ノックダウンによってHEK293細胞の化学物質感受性に影響を与える遺伝子群を検索した。また、これまでの検索で得られた遺伝子の一部について、その作用機構を様々な生化学的手法を用いた解析により検討した。

(倫理面への配慮)

倫理面での配慮が必要な実験は含まれていない。なお、遺伝子組み換え実験は、所属長の承認を得て、指定実験室で作業を行った。

C. 結果・考察

(1) siRNAによる遺伝子ノックダウン法を用いた化学物質感受性決定に関わるヒト遺伝子の網羅的検索法の樹立：

平成17年度に、ヒト遺伝子のうち機能の判明している約8,500の遺伝子に対応するsiRNA発現プラスミドライブラリーをレンチウイルス感染法を用いてヒト胎児腎由来培養細胞(HEK293細胞)に導入して各遺伝子をそれぞれノックダウンするという方法で、化学物質感受性に影響を与える遺伝子

をスクリーニングする基本的な方法を確立した。本法は、化学物質処理した際の、各 siRNA 導入細胞の存在割合を DNA マイクロアレイで解析することによって、細胞をメチル水銀耐性または高感受性にする siRNA を検索するものであり、理論的に優れた方法である。平成 18 年度には更に本法を改良し、ヒトの全遺伝子をほとんど網羅する約 50,000 の遺伝子をそれぞれノックダウンさせるスクリーニング法を確立した。しかし、本法は 1 回のスクリーニングにかかる費用が 400 万円と高額であることが問題となることから、より低費用で実施可能なシステムの構築も行い、1/4 以下の費用で実施可能な独自システムの開発にも成功した。ただし、本検索系は導入した siRNA ライブラリーの発現レベルがあまり高くなく、一次スクリーニングにおいてはメチル水銀毒性に実際は関与しない遺伝子も比較的多く選択された。そこで、この問題を解決するために、平成 19 年度には、siRNA 発現プラスミドではなく、合成 siRNA 断片そのもの (17,000 種のヒト遺伝子に対応する siRNA を準備した) を 1 つずつ細胞内に確実に導入する方法も検討した。その結果、発現抑制によって細胞にメチル水銀高感受性を与える遺伝子として 10 種、逆に、発現抑制によって細胞にメチル水銀耐性を与える遺伝子として 13 種の遺伝子を同定することに成功した。本法はより確実性の高い、優れたスクリーニング方法であると考えられる。

(2) AMP-activated protein kinase (AMPK) の触媒サブユニット PRKAA1 の欠損による

メチル水銀耐性獲得機構：

前年度の約 50,000 種のヒト遺伝子転写産物を標的とした siRNA ライブラリーを用いた検索において、発現抑制によって細胞をメチル水銀高感受性にする遺伝子として 12 種、逆に、細胞にメチル水銀耐性を与える遺伝子として 2 種が同定された。その中に含まれていた PRKAA1 は、細胞のエネルギー制御や代謝に関わる AMP-activated protein kinase (AMPK) の触媒サブユニットである。AMPK はキナーゼ活性を有し、グルコース飢餓などのストレスにより活性化されることが知られている。PRKAA1 の発現抑制によるメチル水銀感受性の上昇の程度は高グルコース存在下の方が顕著であり、PRKAA1 のアイソフォームである PRKAA2 の siRNA を導入した細胞では、PRKAA1 の siRNA 導入細胞で観察されたようなメチル水銀感受性の増強は認められなかった。AMPK の活性化に関わるキナーゼとして LKB1 や CaMKK β が報告されているが、細胞のメチル水銀に対する感受性は LKB1 の発現抑制によってのみ増強され、その程度は高グルコース存在下の方が高かった。一方、活性化された AMPK を脱リン酸化して不活性化させる因子として知られている protein phosphatase 2C (PP2C) の発現抑制の効果は僅かであったが、高グルコース存在下では非常に強い耐性を与え、PP2C がメチル水銀毒性を増強させる働きを有することが示唆された。

(3) メチル水銀毒性を増強する因子 Whi2

の作用機構：

我々は、細胞内での蛋白質分解システムの一つである、ユビキチン・プロテアソームシステムにおいてユビキチン転移酵素として機能する Cdc34 の高発現が酵母およびヒト細胞にメチル水銀耐性を与えることを見出し、細胞内に存在するメチル水銀毒性増強蛋白質のユビキチン・プロテアソームシステムによる分解の促進によってメチル水銀毒性が軽減されることを明らかにしている。このメチル水銀毒性を増強させる蛋白質を同定することによって、メチル水銀毒性の発現機構を解明するうえでの重要な手がかりが得られるものと思われる。そこで酵母遺伝子欠損株ライブラリーを用いてユビキチン・プロテアソームシステムによって分解されるメチル水銀毒性増強蛋白質の検索を行ったところ、Hom3 および Whi2 を同定することに成功し、そのうち、Whi2 が Cdc34 依存的にユビキチン化された後にプロテアソームで分解される可能性が示された。Whi2 と結合することが報告されている蛋白質の中で、Akr1 が欠損によって酵母にメチル水銀高感受性を与えることが判明し、Whi2 は Akr1 が示すメチル水銀毒性軽減作用を阻害している可能性を示唆する結果が得られた。正常酵母で認められる Cdc34 高発現によるメチル水銀耐性獲得が Akr1 の欠損によって認められなくなったことから、Cdc34 高発現による酵母のメチル水銀耐性獲得機構には Akr1 が必要であり、Cdc34 が高発現すると Whi2 の細胞レベルが減少し、Whi2 による Akr1 の活性抑制の程度が低下

するために、Akr1 のメチル水銀毒性軽減作用が十分に発揮されるようになると考えられる。Akr1 によるメチル水銀毒性軽減には Akr1 が有するパルミトイルトランスフェラーゼ活性が必須であることも判明したことから、Akr1 の基質を検索したところ、Yck1 および Yck2 を同時に欠損した酵母が Akr1 を欠損した酵母と同程度の高いメチル水銀感受性を示し、この二重欠損酵母に Cdc34 を高発現させてもメチル水銀耐性は認められなかった。以上の結果から、Cdc34 の高発現は Yck1 および Yck2 が関与するシグナル伝達を亢進させることによってメチル水銀毒性を軽減している可能性が考えられる。

(4) 細胞内蛋白質輸送システムによるメチル水銀毒性増強機構：

欠損によって酵母のメチル水銀感受性に影響を与える遺伝子の検索を行い、合計 50 種を同定することに成功した。この中には、酵母細胞内における液胞への蛋白質輸送に関わる因子をコードする遺伝子が 7 種含まれていた。そこで、液胞への蛋白質輸送に関わる因子が知られている各因子とメチル水銀毒性との関係を検討した。その結果、ゴルジ体からエンドソームを介した液胞への一連の蛋白質輸送経路がメチル水銀毒性増強に深く関与していることが判明した。エンドソーム内に取り込まれる蛋白質はまず、細胞質中でモノユビキチン化（一つのユビキチンと結合）され、これがシグナルとなってエンドソーム膜上に存在する Vps27-Hse1 複合体により認識される。そこ

で、Vps27 または Hse1 と結合することが報告されている蛋白質の中からメチル水銀毒性を増強する蛋白質を検索したところ、Ynr005c (機能未知) および Ubi4 (ポリユビキチン) が見出された。Ynr005c は細胞内でユビキチン化を受けることが確認された。一方、Ubi4 の発現は通常状態においては非常に低く、heat shock などのストレスによって誘導されて様々なストレスに対して防御的に働くことが知られている。本研究においても、メチル水銀によって Ubi4 の発現が誘導されることが確認された。メチル水銀はこの Ubi4 の発現を誘導することによって、ある種の蛋白質のモノユビキチン化を介したエンドソーム内への取り込みを亢進し、その結果としてメチル水銀の細胞毒性が引き起こされている可能性も考えられる。

(5) Protein phosphatase type 1 の機能低下による亜ヒ酸毒性増強機構：

昨年度実施した検索によって、欠損により出芽酵母の亜ヒ酸に対する感受性を増強させる細胞内因子として Reg1 が同定された。Reg1 はホスファターゼ活性を持つ Glc7 と protein phosphatase type 1 (PP1) complex を形成しており、Reg1 欠損により PP1 complex の活性が低下することが知られている。PP1 complex は出芽酵母の糖代謝を司る Ser/Thr キナーゼである Snf1 kinase complex の脱リン酸化を促進することによって、その kinase 活性を抑制する。Snf1 高発現が酵母の亜ヒ酸感受性に与える

影響を検討したところ、Snf1 高発現によって酵母が亜ヒ酸に対して高い感受性を示すことが明らかになった。また、Reg1 欠損による亜ヒ酸毒性増強作用が Snf1 同時欠損により軽減され、Reg1 欠損による亜ヒ酸毒性増強に Snf1 kinase complex が深く関与していることが示唆された。Snf1 kinase complex が有するキナーゼ活性が亜ヒ酸毒性増強に必要であることも確認された。また、Reg1 欠損により Snf1 のリン酸化の亢進が認められたことから、Reg1 欠損による亜ヒ酸毒性増強は Snf1 kinase complex のキナーゼ活性の過剰な亢進による可能性が示唆された。また、Snf1 kinase complex の下流因子の中で、Mig1 の欠損が酵母の亜ヒ酸感受性を上昇させることが明らかとなった。Mig1 は、Snf1 kinase complex によるリン酸化によってその活性が抑制される転写因子である。Reg1 欠損酵母の Mig1 をさらに欠損させても、Reg1 欠損酵母の亜ヒ酸感受性はほとんど影響を受けなかったことから、Mig1 と Reg1 の欠損は同一の経路を介して亜ヒ酸の毒性を増強していると考えられる。また、Mig1 の高発現酵母は亜ヒ酸耐性を示したが、Reg1 欠損酵母に Mig1 を高発現させた場合には Mig1 高発現による亜ヒ酸耐性はほとんど認められなかった。Reg1 欠損酵母では、Snf1 kinase complex のキナーゼ活性が亢進しており、Mig1 の活性が抑制されているため、Mig1 高発現による亜ヒ酸耐性が認められないと考えられる。さらに、ヒト細胞において、PP1 の阻害剤である tautomycin が亜ヒ酸感受性を増大させることが明らかとなった。したがって、

酵母細胞のみならずヒト細胞においても PP1 complex が亜ヒ酸発現機構に関与している可能性が考えられる。

(6) アドリアマイシン毒性の発現における脱ユビキチン化酵素の役割：

平成 17 年度に実施した検索において、欠損によって酵母にアドリアマイシン耐性を与える細胞内因子として三種の脱ユビキチン化酵素 (Ubp2, Ubp6, Ubp14) が同定されている。そこで、アドリアマイシン耐性と脱ユビキチン化酵素の関係について検討した。出芽酵母に存在する 17 種類の脱ユビキチン化酵素をそれぞれ欠損させた酵母のアドリアマイシン感受性を調べた結果、スクリーニングによって同定されている Ubp2, Ubp6, Ubp14 に加えて、Ubp4 の欠損も酵母にアドリアマイシン耐性を与えることが明らかとなった。一方、欠損によりアドリアマイシン毒性を増強させる脱ユビキチン化酵素として Ubp3, Ubp7, Ubp13 が同定された。欠損により酵母にアドリアマイシン耐性を与える各脱ユビキチン化酵素 (Ubp2, Ubp6, Ubp4 および Ubp14) を二種類同時に欠損させた酵母 (*ubp2Δ ubp4Δ*, *ubp2Δ ubp6Δ*, *ubp4Δ ubp14Δ*) のアドリアマイシン感受性を検討したところ、各二重欠損酵母はそれぞれの単独欠損酵母と比べ、相加的なアドリアマイシン耐性の増強を示した。したがって、これらの脱ユビキチン化酵素は、それぞれ異なる経路を介してアドリアマイシン毒性に関与している可能性が考えられる。脱ユビキチン化酵素の欠損によって、細胞内ユビキチン量が低下することが

報告されているが、脱ユビキチン化酵素欠損酵母 (*ubp2Δ*, *ubp6Δ*) にポリユビキチン Ubi4 を高発現させてもアドリアマイシン感受性に変化がなかったことから、Ubp2 の欠損および Ubp6 の欠損によるアドリアマイシン耐性獲得には、細胞内ユビキチン量の低下は関与しないと考えられる。さらに、脱ユビキチン化酵素欠損によるアドリアマイシン耐性獲得には既知のアドリアマイシン耐性獲得機構である細胞内抗酸化機構の亢進やアドリアマイシンの細胞外への排出の促進は関与していないことから、脱ユビキチン化酵素欠損によるアドリアマイシン耐性獲得機構は、これまで知られていない全く新しい耐性獲得機構である可能性が考えられる。

D. 結論

新しい高効率の感受性決定遺伝子検索法が確立され、これによって多くの化学物質感受性決定遺伝子を同定することに成功した。本知見は、今後の化学物質感受性決定因子に関する研究の発展に大きく寄与するものと期待される。

E. 健康危険情報

特になし。

F. 研究発表

1. 論文発表

Hwang GW, Furuchi T, Naganuma A, Ubiquitin-conjugating enzyme Cdc34 mediates cadmium resistance in budding

yeast through ubiquitination of the transcription factor Met4. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007; 363: 873-878.

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

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

Hwang GW, Ubiquitin-proteasome system as a factor that determine the sensitivity to methylmercury. *Yakugaku Zasshi.* 2007; 127: 463-468.

Kimura A, Ohashi K, Naganuma A, Cisplatin upregulates *Saccharomyces cerevisiae* genes involved in iron homeostasis through activation of the iron insufficiency-responsive transcription factor Aft1. *J Cell Physiol.* 2007; 210: 378-384.

Tokuda E, Ono S, Ishige K, Naganuma A, Ito Y, Suzuki T, Metallothionein proteins expression, copper and zinc concentrations, and lipid peroxidation level in a rodent model for amyotrophic lateral sclerosis. *Toxicology.* 2007; 229: 33-41.

2. 学会発表

永沼 章：ユビキチン・プロテアソームシステムが関わるメチル水銀感受性決定機構. 第78回日本衛生学会総会, 2008.

宮永直幸、丹羽貴子、高橋 勉、永沼 章：酵母の糖代謝因子 Snf1 活性と亜硫酸毒性の関わり. 日本薬学会第128年会, 2008.

中島晶子、黄 基旭、村井康高、永沼 章：酵母 Ubi4 によるメチル水銀毒性増強機構の解析. 日本薬学会第128年会, 2008.

木村幸由、黄 基旭、永沼 章：メチル水銀毒性と脱ユビキチン化酵素群との関わり. 日本薬学会第128年会, 2008.

Takahashi T, Naganuma A : Role of endocytic Ark/Prk kinases in adriamycin resistance. 47th Annual Meeting of the Society of Toxicology, 2008.

Hwang GW, Naganuma A : Overexpression of F-box protein, Hrt3 or Ylr224w, confers

resistance to methylmercury in yeast cells. 47th Annual Meeting of the Society of Toxicology, 2008

岩井健太、永沼 章、久下周佐：ペルオキシレドキシシン Ahp1 による有機過酸化物質シグナルの感知と伝達. 第 30 回日本分子生物学会年会, 2008

久下周佐、久保田直子、金澤知博：HSP90 阻害剤による C 型肝炎ウイルスコア蛋白質の機能阻害. 第 55 回日本ウイルス学会学術集会, 2007.

高橋 勉、永沼 章：リン酸化を介したエンドサイトーシスの制御システムが関わるアドリアマイシン耐性獲得機構の解析. 第 29 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム, 2007

廣瀬健一郎、高橋 勉、永沼 章：エンドサイトーシス経路に関わる蛋白質群とアドリアマイシン毒性との関係. フォーラム 2006 ; 衛生薬学・環境トキシコロジー, 2007.

李 辰竜、黄 基旭、永沼 章：メチル水銀がミトコンドリア中のピルビン酸の取り込みに及ぼす影響. フォーラム 2007 ; 衛生薬学・環境トキシコロジー, 2007.

福光 徹、黄 基旭、荻原庸介、永沼 章：

パルミトイルトランスフェラーゼ Akr1 によるメチル水銀毒性軽減における Whi2 の関与. フォーラム 2007 ; 衛生薬学・環境トキシコロジー, 2007.

高橋 勉、永沼 章：出芽酵母における新生ポリペプチド輸送に関わる NAC の機能低下によるドキシソルビシン毒性の増強. 第 66 回日本癌学会学術総会, 2007.

晴山聖子、廣瀬健一郎、高橋 勉、永沼 章：酵母におけるアドリアマイシン耐性獲得機構における脱ユビキチン化酵素の関与. 第 46 回日本薬学会東北支部大会, 2007

飛田真由美、黄 基旭、永沼 章：siRNA ライブラリーを用いたメチル水銀感受性決定因子の検索. 第 46 回日本薬学会東北支部大会, 2007

福光 徹、黄 基旭、永沼 章：メチル水銀毒性軽減におけるパルミトイルトランスフェラーゼ Akr1 の役割. 第 46 回日本薬学会東北支部大会, 2007

高橋 勉、永沼 章：酵母の金属トランスポーター Smf2 とアドリアマイシン毒性との関係. メタロチオネインおよびメタルバイオサイエンス研究会 2007, 2007

黄 基旭、松尾拓洋、山本玲子、永沼 章：酵母の遺伝子欠損株ライブラリーを用いた

カドミウム感受性決定因子の検索. メタロチオネインおよびメタルバイオサイエンス研究会 2007, 2007

高橋 勉、永沼 章：エンドサイトーシス制御に関わる Ark/Prk kinase family のアドリアマイシン耐性獲得機構における役割. 第 33 回日本トキシコロジー学会学術年会, 2007.

丹羽貴子、黄 基旭、大橋一晶、永沼 章：ストレス感知受容体 Slg1 (CD43) の亜硫酸毒性軽減における役割. 第 33 回日本トキシコロジー学会学術年会, 2007.

李 辰竜、黄 基旭、永沼 章：ミトコンドリア内ピルビン酸レベルに及ぼすメチル水銀の影響. 第 33 回日本トキシコロジー学会学術年会, 2007.

黄 基旭、佐々木大祐、永沼 章：ユビキチン・プロテアソームシステム関連因子 Rad23 によるメチル水銀毒性軽減作用の分子メカニズム. 第 33 回日本トキシコロジー学会学術年会, 2007.

G. 知的財産権の出願・登録状況
なし。

II. 分担研究報告

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 ライブラリーを用いたメチル水銀に対する感受性決定因子の網羅的検索

分担研究者 黄 基旭 東北大学大学院薬学研究科助教

（協力研究者 高橋 勉 東北大学大学院薬学研究科助教）

siRNA ライブラリーを用いてメチル水銀感受性に影響を与える遺伝子群を検索したところ、発現抑制によって細胞のメチル水銀感受性に影響を与える遺伝子として 23 種を新たに同定することに成功した。その中には、発現抑制によって細胞にメチル水銀高感受性を与える遺伝子として 10 種 (CNTNAP2、USP15、SQRDL、GNB4、CXCL14、IL13RA2、STC1、GDF5、CPZ、CFI)、逆に、発現抑制によって細胞にメチル水銀耐性を与える遺伝子として 13 種 (STX5、CCL27、LOC91664、AKR1B1、PSMD2、LONRF1、AKR1CL1、KIAA1833、HEMK1、LOC124446、WISP1、RP3-340N1.3、CLEC1A) が含まれていた。今回得られた遺伝子群がコードする蛋白質はその全てがメチル水銀毒性に関与することがはじめて示されたものであり、メチル水銀の細胞毒性発現機および生体の防御機構の解明に重要な手がかりを提供するものと思われる。本法は従来のスクリーニング法に比べてより確実に目的とする遺伝子群を同定することが可能であり、今後、本システムによって種々の化学物質に対する感受性に影響を与えるヒト遺伝子群が同定されるものと期待される。

A. 研究目的

これまで、我々は siRNA 発現プラスミドのライブラリー (SBI 社) をレンチウイルス感染法によってヒト培養細胞 (HEK293 細胞) に導入し、発現抑制によって細胞のメチル水銀感受性に影響を及ぼす遺伝子群のスクリーニングを行ってきた。しかし、メチル水銀処理とは関係なくそのシグナル

強度が変動する遺伝子が多く見られるなど、確実にメチル水銀感受性に影響を与えるヒト全遺伝子を網羅的にスクリーニングするためには、更なる実験系の構築が必要であった。また、SBI 社の siRNA ライブラリーは Affymetrix 社のマイクロアレイのチップの oligonucleotide と同じ塩基配列を siRNA 塩基配列として用いること

から、その siRNA 導入によって標的となる遺伝子の発現が十分に抑制されなかった場合も頻繁に認められた。そこで、より確実に遺伝子の発現を抑制するようにデザインされた Qiagen 社の siRNA ライブラリーを用いて、メチル水銀感受性に影響を与える遺伝子群を網羅的にスクリーニングした。

B. 実験方法

1. 細胞培養

ヒト胎児腎由来 HEK293 細胞は Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) に 0.06 % L-glutamine、100 U/ml penicillin G sodium、100 µg/ml streptomycin sulfate および 10 % fetal bovine serum を添加した培地を用いて、37 °C、5 % CO₂ 存在下で培養した。

2. siRNA ノックダウン法を用いたメチル水銀感受性に影響を及ぼす遺伝子群の網羅的検索

96 well plate の各 well に 400 nM siRNA 混合溶液 2.5 µL (最終濃度 10 nM) および 3% HiPerFect reagent を含有する OptiMEM 溶液 12.5 µL を添加し、室温で 10 分間インキュベートした後、各 well に 1×10^4 cells/75 µL の HEK293 細胞を播種し、37°C、5% CO₂ 存在下で 24 時間培養した。その後、

10 µL の塩化メチル水銀溶液 (最終濃度 3 µM) を添加し、さらに 48 時間培養した。細胞の生存率は、10% alamar blue を含有する DMEM 培地 70 µL 中で 2~3 時間培養した後、各 well 中の蛍光強度 (excitation; 544 nm, emission; 590 nm) を蛍光プレートリーダーで測定することによって調べた。

3. siRNA 再導入によるメチル水銀感受性の検討

上記 2 と同様に、siRNA を導入した HEK293 細胞を 24 時間培養した後に、各濃度 (最終濃度 0, 1, 2, 3, 4 µM) の塩化メチル水銀を添加した。メチル水銀処理 48 時間後に、塩化メチル水銀を含む培地から 10% alamar blue を含有する DMEM 培地 70 µL に交換し 2~3 時間培養した。その後、各 well 中の蛍光強度 (excitation; 544 nm, emission; 590 nm) を蛍光プレートリーダーで測定することによって調べた。

(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・考察

1. 発現が抑制されることによって細胞にメチル水銀感受性に与える遺伝子の検索

Qiagen 社の siRNA ライブラリーは、機能がよく知られている遺伝子産物（約 7000 種）を標的とする合成二本鎖 RNA が 96-well plate の各々の well に 2 つずつ入っている。まず、その siRNA 混合溶液（最終濃度 10 nM）をそれぞれ導入した HEK293 細胞を約 50～60%の細胞毒性を示すメチル水銀（3 μ M）で処理し、48 時間後に生存率を調べた。各 siRNA 導入細胞のメチル水銀に対する生存率は、siRNA 導入によるメチル水銀感受性の度合い（メチル水銀処理群の gene siRNA 導入細胞の蛍光強度 / メチル水銀処理群の control siRNA 導入細胞の蛍光強度）を siRNA 導入による細胞増殖抑制率（mock 処理群の gene siRNA 導入細胞の蛍光強度 / mock 処理群の control siRNA 導入細胞の蛍光強度）で割り算することで算出した。すなわち、生存率 1 を基準にその値が 1 以上になるとその細胞はメチル水銀耐性を、逆に、1 以下になるとその細胞は高いメチル水銀感受性を示したことになる。約 7000 種の siRNA 混合溶液をそれぞれ導入した HEK293 細胞のメチル水銀毒性に対する生存率を調べたところ、0.5 以下の生存率を示した siRNA 導入

細胞を 146 種同定することに成功した（データ示さず）。これらの細胞に導入されている siRNA の標的遺伝子は、発現抑制されることによって HEK293 細胞にメチル水銀高感受性を与える遺伝子と考えられる。しかし、導入された siRNA に関係なく、自然耐性や突然変異などによってメチル水銀耐性を獲得した細胞が含まれる可能性も否定できない。そこで、今回同定された 146 種の siRNA の中から、細胞に最も高いメチル水銀感受性を与えた上位 15 種（Table 1）の siRNA 混合溶液をそれぞれ HEK293 細胞に再導入した際の各細胞のメチル水銀に対する感受性を検討した。その結果、15 種のうち 10 種（CNTNAP2、USP15、SQRDL、GNB4、CXCL14、IL13RA2、STC1、GDF5、CPZ、CFI）の siRNA の導入が HEK293 細胞にメチル水銀高感受性を与えることが確認された（Figures 1-1～1-4）。特に、10 種の siRNA 導入細胞の中、USP15、GNB4、GDF5、CXCL14 または IL13RA2 の発現抑制は HEK293 細胞に非常に高いメチル水銀感受性を与えたことから、これら蛋白質が有する機能が示す役割がメチル水銀毒性に何らかの影響を与える可能性が考えられる。

2. 発現が抑制されることによって細胞にメチル水銀耐性に与える遺伝子の検索

上記1と同様に、siRNA導入細胞のメチル水銀毒性に対する生存率を検討したところ、2以下の生存率を示したsiRNA導入細胞を37種同定することに成功した(データ示さず)。そこで、2以上の生存率を細胞に与えたsiRNAの中で特に高い上位15種のsiRNAを選択した(Table 2)。これらsiRNAの標的遺伝子は、発現抑制されることによってHEK293細胞にメチル水銀耐性を与える遺伝子と考えられる。これら15種のsiRNAをそれぞれHEK293細胞に再導入してメチル水銀感受性を検討したところ、15種のうち13種(STX5、CCL27、LOC91664、AKR1B1、PSMD2、LONRF1、AKR1CL1、KIAA1833、HEMK1、LOC124446、WISP1、RP3-340N1.3、CLEC1A)のsiRNAの導入がHEK293細胞にメチル水銀耐性を与えることが確認された(Figures 2-1~2-4)。その中には、aldo-keto reductaseをコードしtestosteroneの合成に関与するAKR1CL1およびAKR1B1が含まれていた。Testosteroneは腎臓へのメチル水銀の取り込みに関与するgamma-glutamyltranspeptidaseの活性が上昇させることが知られており(Tanaka, T. et al, 1992)、aldo-keto reductaseの発現抑制は何らかの形でメチル水銀感受性に関与しているかも知れない。また、リン脂質であるアラキドン酸を細胞膜から解離させる

活性を有するホスホリパーゼA2(PhospholipaseA2, PLA2)をコードするRP3-340N1.3の発現抑制が細胞に強いメチル水銀耐性を与えることが明らかになった。メチル水銀はPLA2の発現を誘導し、細胞膜からのアラキドン酸の遊離を亢進させることで細胞毒性を引き起こすことが知られており(Shanker, G. et al, 2002)、PLA2の発現抑制は細胞膜からのアラキドン酸の遊離を抑制することでメチル水銀耐性獲得に関与している可能性が考えられる。

今回得られた遺伝子群がコードする蛋白質はその全てがメチル水銀毒性に関与することがはじめて示されたものであり、メチル水銀の細胞毒性発現機および生体の防御機構の解明に重要な手がかりを提供するものと思われる。

D. 参考文献

- Shanker, G., Mutkus, L. A., Walker, S. J. and Aschner, M. (2002) Methylmercury enhances arachidonic acid release and cytosolic phospholipase A2 expression in primary cultures of neonatal astrocytes. *Brain Res Mol Brain Res* 106, 1-11.

Tanaka, T., Naganuma, A., Miura, N.
and Imura, N. (1992) Role of
testosterone in
gamma-glutamyltranspeptidase-depe
ndent renal methylmercury uptake in
mice. Toxicol Appl Pharmacol 112,
58-63.

なし。

2. 学会発表

なし。

F. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

E. 研究発表

1. 論文発表

Gene name	Accession number	Fuction of gene product	Survival rate
MRPL3	NM_007208	mitochondrial ribosomal protein L3	0.112
ACADS	NM_000017	acyl-Coenzyme A dehydrogenase, C-2 to C-3 short chain	0.115
CNTNAP2	NM_014141	contactin associated protein-like 2	0.235
USP15	NM_006313	ubiquitin specific peptidase 15	0.239
SQRDL	NM_021199	sulfide quinone reductase-like (yeast)	0.253
CXCL14	NM_004887	chemokine (C-X-C motif) ligand 14	0.255
GNB4	NM_021629	guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 4	0.282
IL13RA2	NM_000640	interleukin 13 receptor, alpha 2	0.284
TXNDC6	NM_178130	thioredoxin domain containing 6	0.290
STC1	NM_003155	stanniocalcin 1	0.292
GDF5	NM_000557	growth differentiation factor 5	0.292
ACADM	NM_000016	acyl-Coenzyme A dehydrogenase, C-4 to C-12 straight chain	0.293
PDE10A	NM_006661	phosphodiesterase 10A	0.298
CFI	NM_000204	complement factor I	0.312
CPZ	NM_001014447	carboxypeptidase Z	0.313

Table 1. 発現抑制によりヒト培養細胞にメチル水銀高感受性を与えると予想される上位 15 種の遺伝子

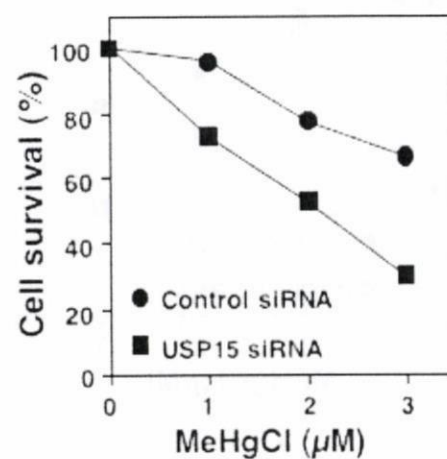
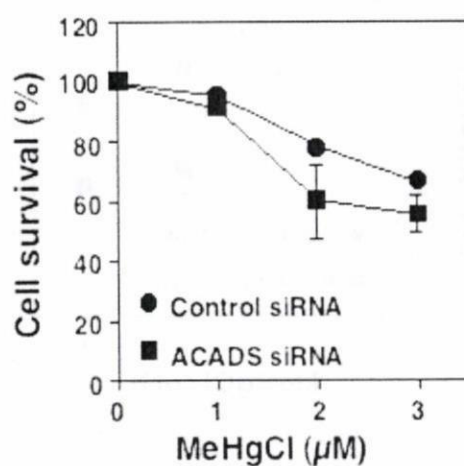
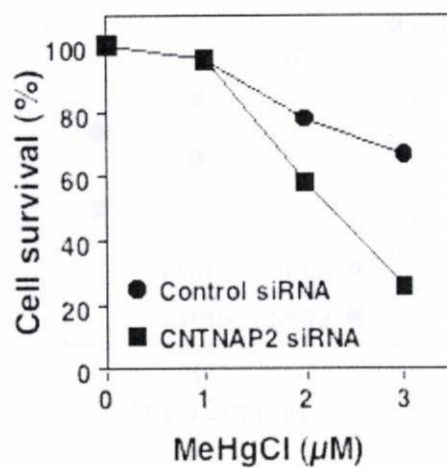
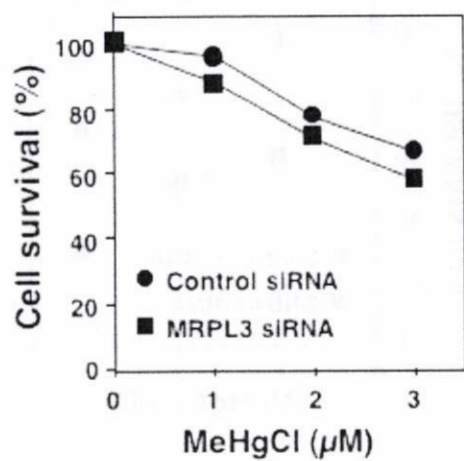


Figure 1-1. 遺伝子発現抑制が HEK293 細胞のメチル水銀感受性に与える影響