

reverse	:	TGM4	
AATTCAAAAAAAGTAGTAGGTCA		forward	:
TCTTGCCCAAGATTTCTGA		GATCCGGCTGGTGAGCCCATGG	
		CCTGGAGATATCTTCCTGTCAG	
CAGGAAGAATCTCGGGCAAGAC			
GACCTACTAGTTTCG		AATATCTTCAGGCCATGGGTTC	
RGS1		CCAGCTTTTTG	
forward	:	reverse	:
GATCCGCAAGCAGTAGTAGCAGT		AATTCAAAAAGCTGGTGAACCCA	
GGCAATTTGACTTCCTGTCA		TGGCCTGAAGATATTCTGACAG	
GATCAAATTGCCATTGCTACTAT		GAAGATATCTCCAGGCCATGGGC	
TGCTTGTTTTG		TCACCAGCCG	
reverse	:		
AATTCAAAAACAAGCAATAGTAG		<u>6. siRNA 発現ベクターの細胞への導入</u>	
CAATGGCAATTTGATCTGACA		5×10 ⁵ cells/2 ml/well となるよう	
		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 ⁴ cells/90 μl/well または 2×	
TCTATGACAAGATCTCTGACAG		10 ⁴ 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 μ lを含む培地 100 μ 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 μ 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 μM 、96 時間という低濃度長時間処理から 18 μM 、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。

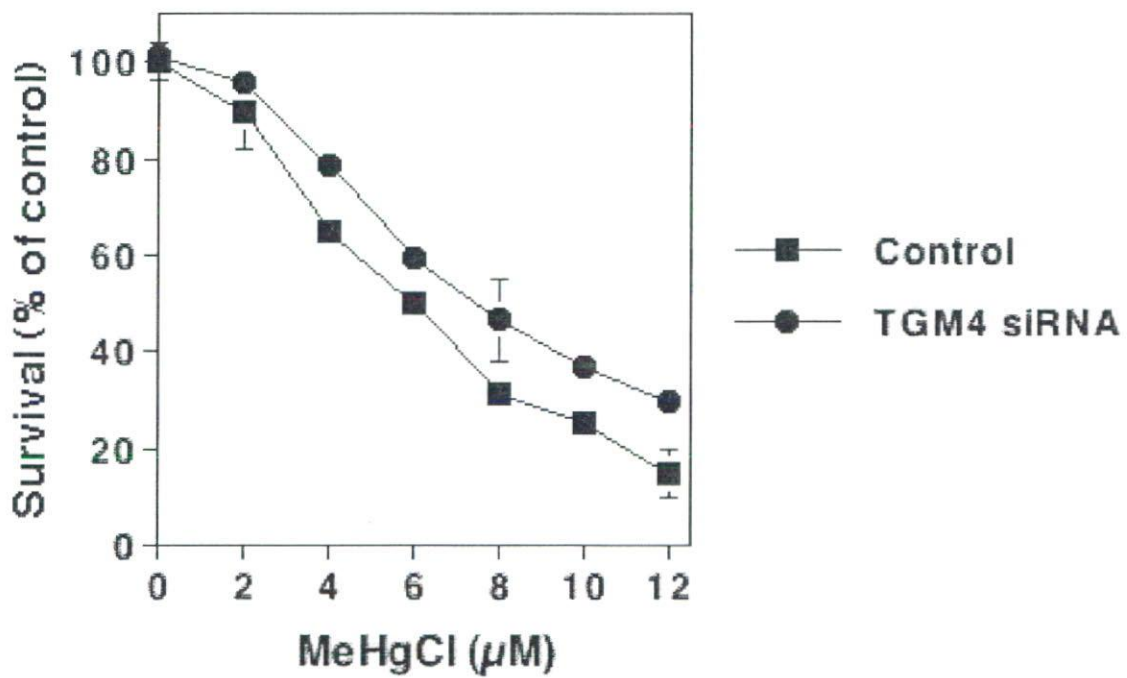
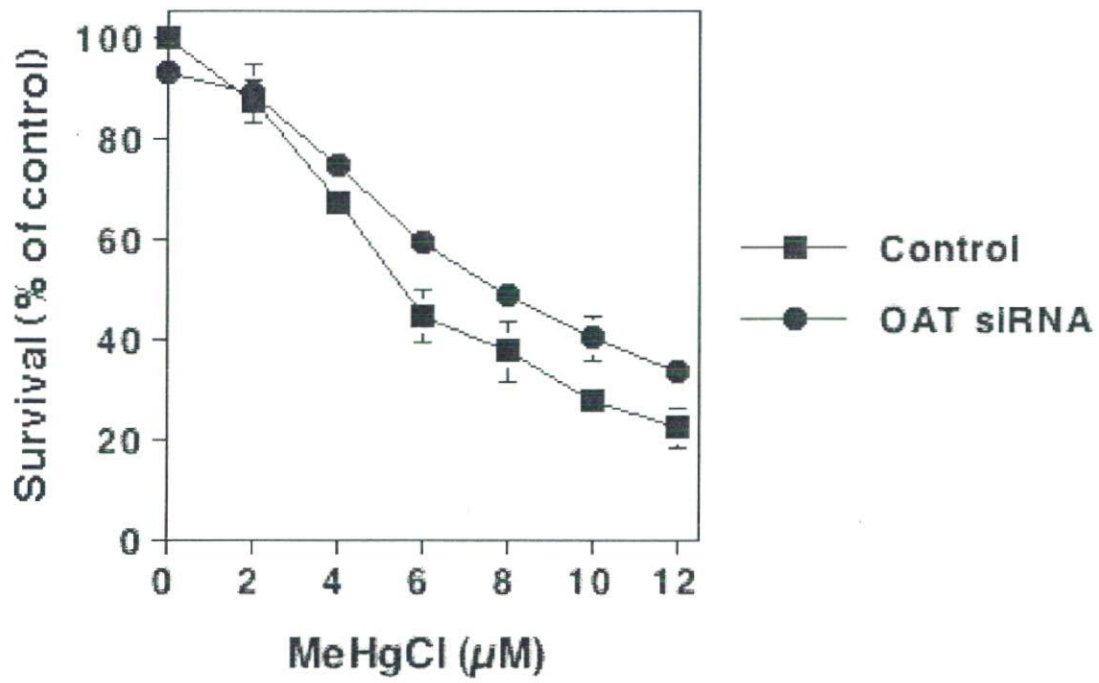


Fig. 1-1 siRNA 導入細胞のメチル水銀に対する感受性

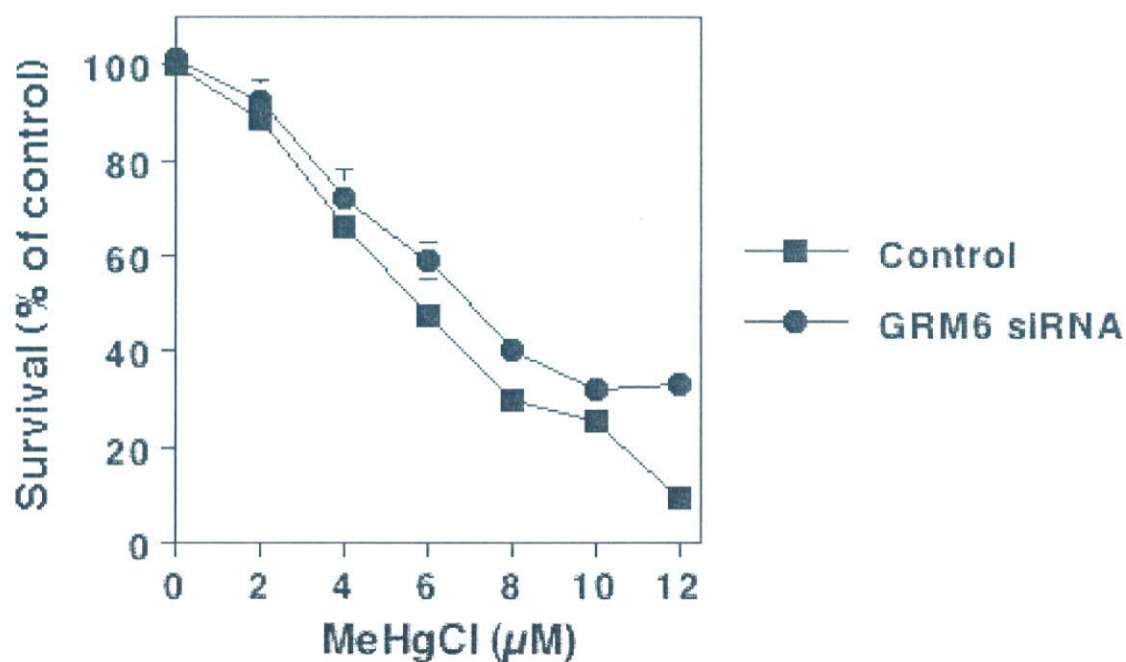
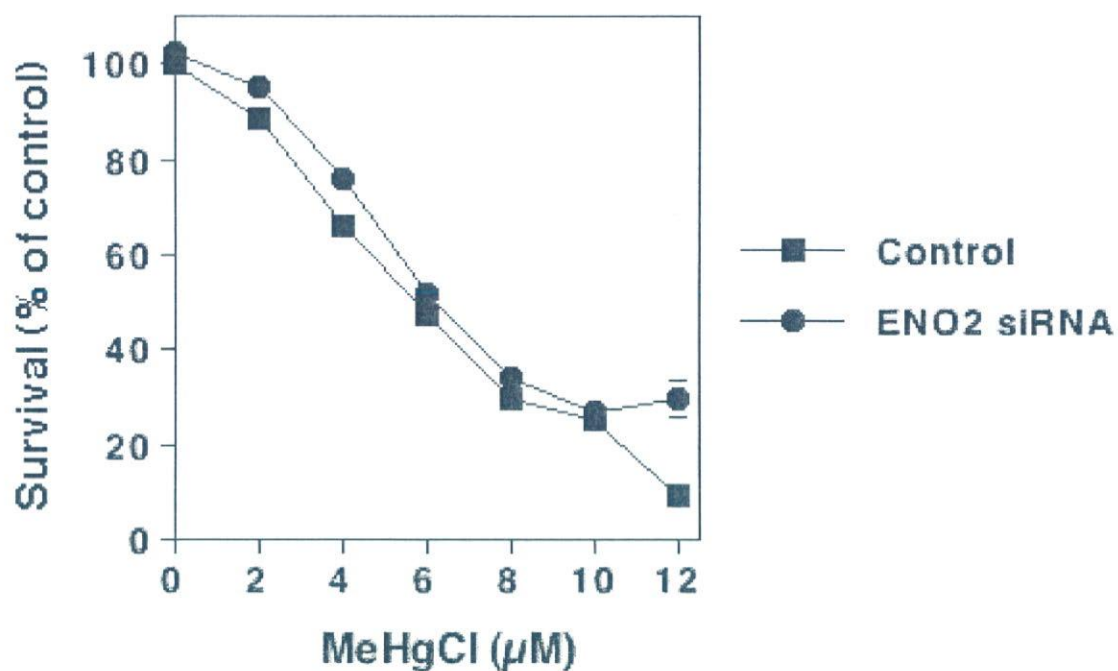


Fig. 1-2 siRNA 導入細胞のメチル水銀に対する感受性

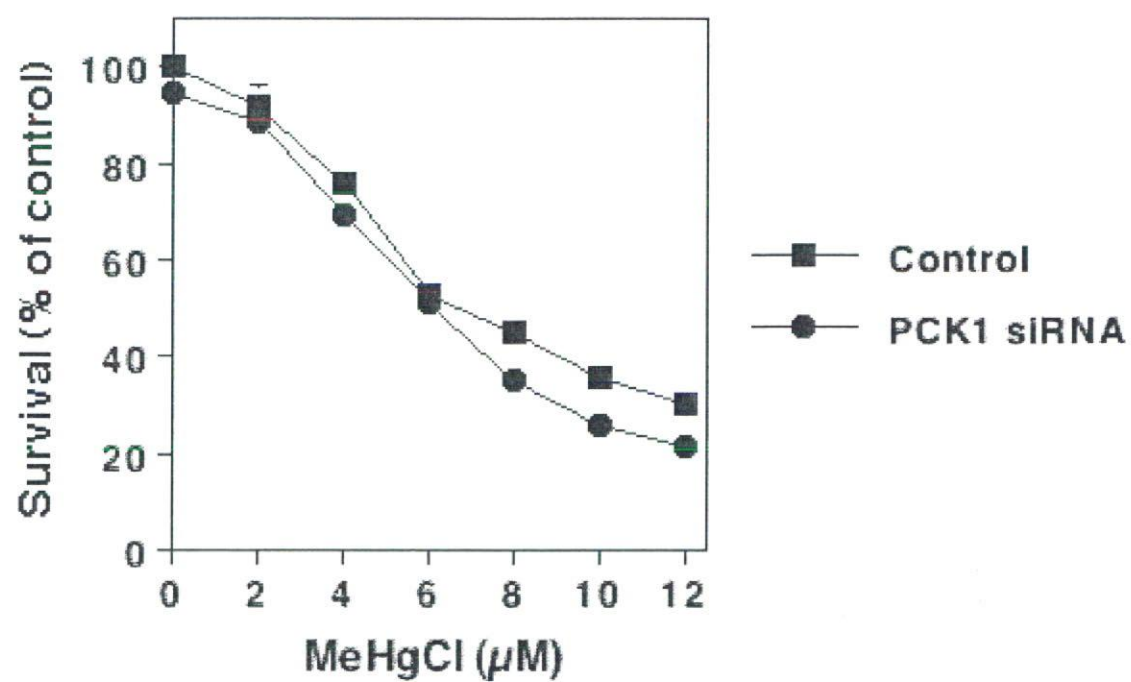
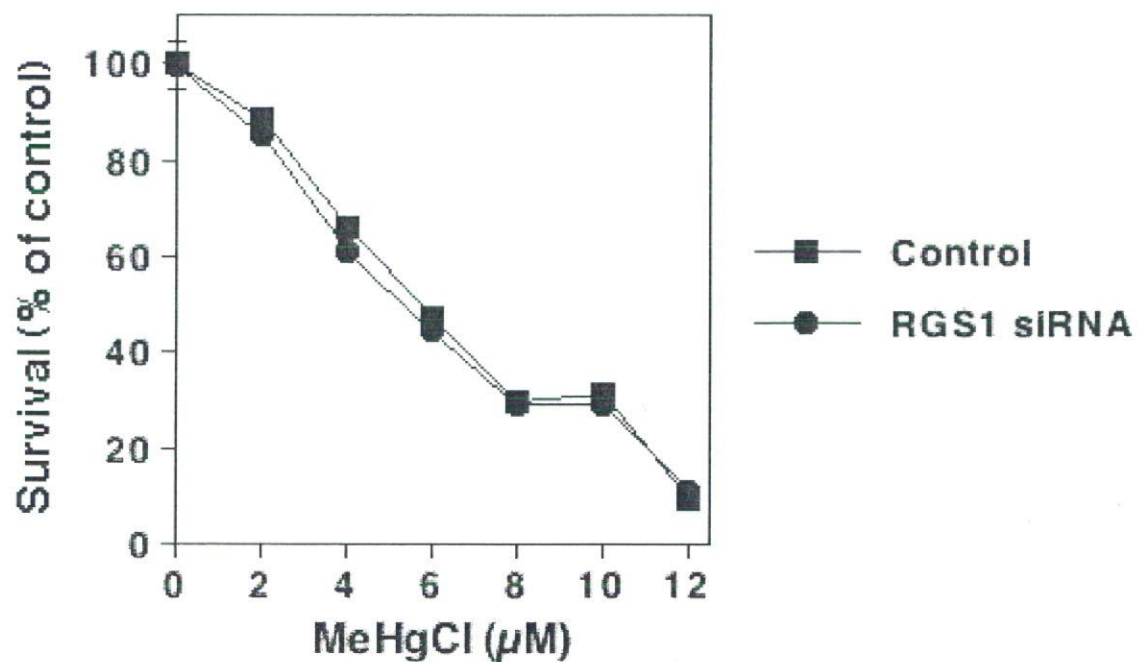


Fig. 1-3 siRNA 導入細胞のメチル水銀に対する感受性

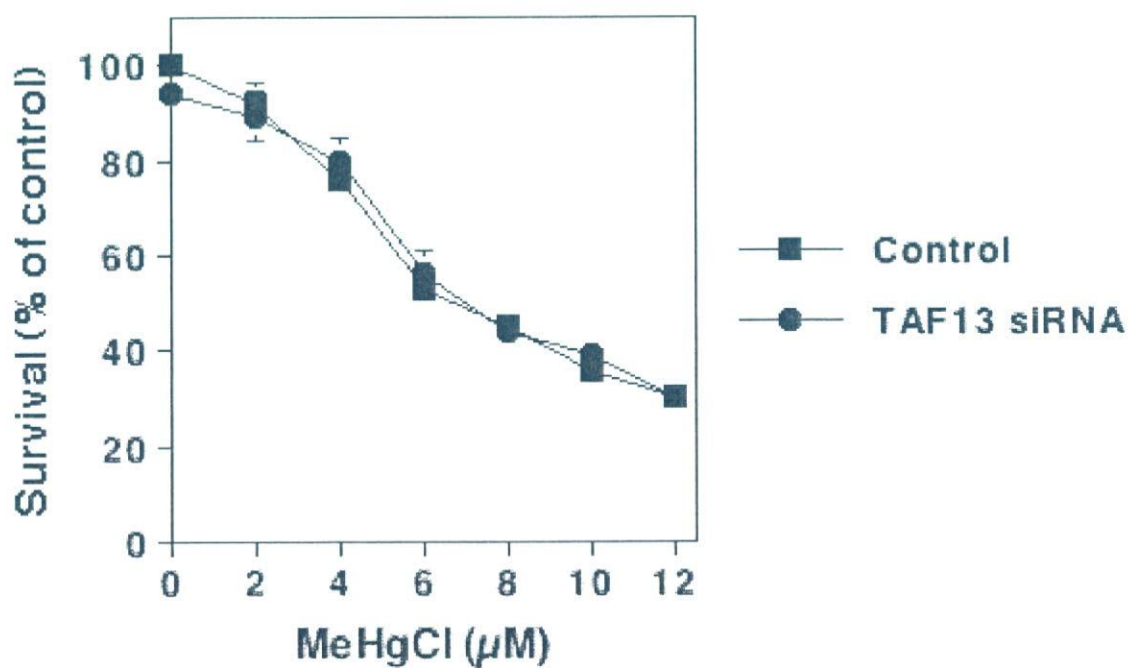
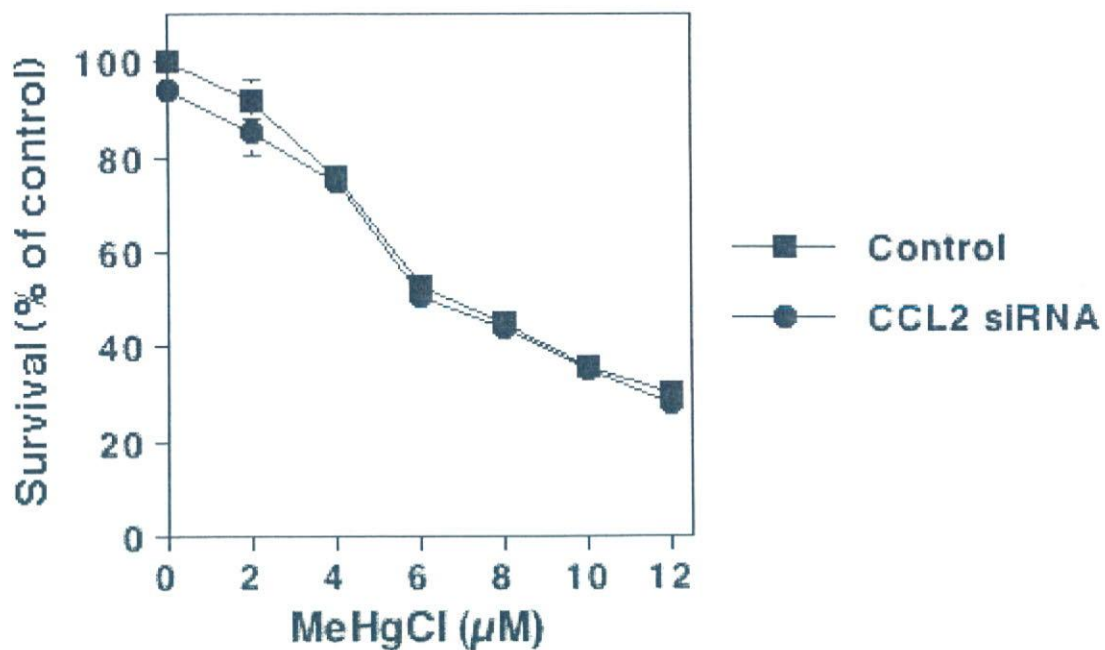


Fig. 1-4 siRNA 導入細胞のメチル水銀に対する感受性

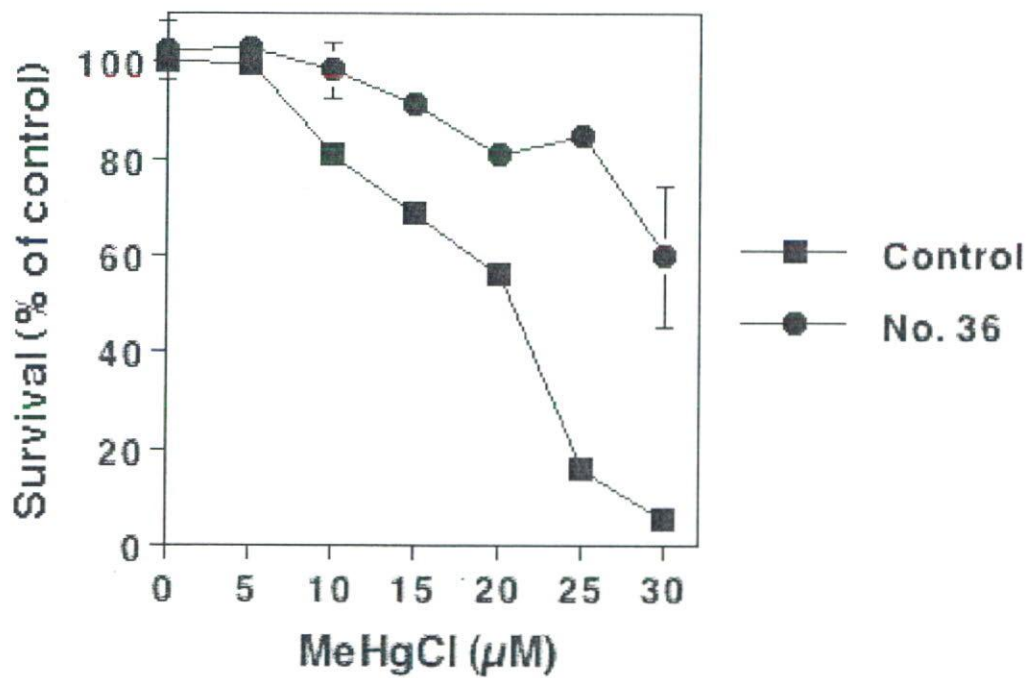
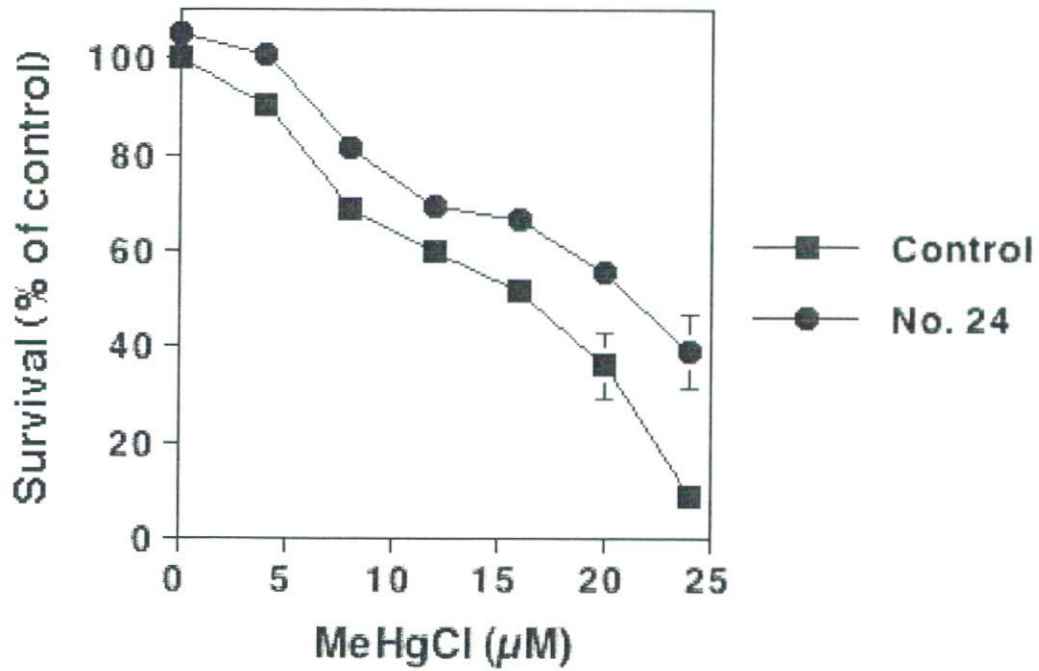


Fig. 2 siRNA 導入細胞群のメチル水銀に対する感受性

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% CO₂ 存在下で培養した。

2. ρ⁰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 ρ^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 で一晩振盪培養した後、 1×10^6 cells を SD 培地 920 μ L に植菌した後、滅菌水または 10 μ M のメチル水銀を 80 μ 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 μ 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。 ρ^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、 ρ^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、 ρ^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 Δ*) 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。

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

IMR-32 細胞でのメチル水銀に対する遺伝子発現のプロファイリング

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とそれに対する防御機構を解明することを目的として、DNA マイクロアレイ法を用いてメチル水銀によって発現量が変動する遺伝子の検索を行った。その結果、メチル水銀処理により発現量が上昇する遺伝子が 74 種、また発現量が減少する遺伝子が 86 種見つかった。その中にはシグナル伝達、腫瘍形成、ストレス応答および神経変性疾患に関わる遺伝子が多く含まれていた。特にメチル水銀処理によって抗酸化酵素やシグナル伝達に関わる因子をコードする遺伝子や、アルツハイマー病の神経変性過程に関わる calpain/p35/Cdk5 カスケードの関連遺伝子および APBA2 などの発現量が顕著に上昇したことはメチル水銀による特異的な神経細胞死を引き起こす機構の解明において非常に興味深い。

A. 研究目的

メチル水銀で細胞を処理すると、細胞内ではこれに反応した様々な反応が生じ、その結果の一つとして特定の遺伝子の発現量の変動が引き起こされると予想される。そこで、メチル水銀に対する細胞応答を検討するうえでの手がかりを得ることを目的として、神経腫細胞（IMR-32）を用いてメチル処理により発現量の変動する遺伝子を DNA マイクロアレイ法により検索した。

B. 研究方法

1. メチル水銀で処理した IMR-32 細胞から総 RNA の抽出

IMR32 細胞を 5×10^6 cells/900 μ l/well になるように 6-well plate に播き、37°C、5% CO₂ 存在下で 24 時間培養後、塩化メチル水銀（final 1 μ M）を含む滅菌水をそれぞれ 100 μ l/well ずつ添加して 6 時間または 24 時間培養した。培養終了後、各 well の培地を取り除き、TRIzol (Invitrogen) 1 ml を加えて細胞を回収した。得られた細胞混合液に 0.2 ml のクロロホルムを加えて激しく攪拌し、室温で 3 分間放置後、12,000 xg

で 15 分間遠心分離した。分離した水層 0.5 ml に同量のイソプロパノールを加えて混和後、室温で 10 分間放置し、12,000 xg で 10 分間遠心分離し、沈殿した総 RNA 画分を得た。この沈殿を 75%エタノール溶液で洗浄し、乾燥後 molecular grade water に溶解し、260 nm の吸光度値から RNA 濃度を算出した。

2. DNA マイクロアレイ法

プローブの作製

総 RNA 250 μg より OligotexTM-dT30 <Super> mRNA Purification kit (From Total RNA) (Takara)を用いて mRNA を精製した。この精製した mRNA 1 μg と 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ oligo の dT primer (Gibco-BRL) 1 μl を混合し RNase (ribonuclease) free の滅菌蒸留水を加え、全量を 7 μl にし、70°C で 5 分間処理した後に 42°C で 2 分間インキュベートした。この溶液に 5 x Super Script II Reverse Transcriptase (以下 SSII と略す) buffer (Gibco-BRL) を 4 μl 、dNTP mixture (2 mM dTTP, 5 mM dATP, dGTP, dCTP) (Gibco-BRL) を 2 μl 、100 mM DDT (Gibco-BRL) を 2 μl 、40 U RNase Inhibitor (東洋紡) を 2.5 μl 、1 mM Fluorilink Cy3-dUTP あるいは Fluorilink Cy5-dUTP (Amersham

pharmacia biotech) を 2 μl を加え、RNase free の滅菌蒸留水で全量を 19.5 μl にし、SSII (200 U) を 1 μl 加え、42°C で 40 分間インキュベートした。その後さらに SSII を 1 μl 加えて再度 42°C で 40 分間インキュベートした。インキュベート終了後、滅菌蒸留水を 20 μl 、0.5 M EDTA 5 μl 、1 M NaOH 10 μl を加え 65°C で 1 時間インキュベートし、1 M Tris-HCl (pH 7.5) 25 μl を加えて中和した。この蛍光標識 cDNA プローブを Microcon-30 (Millipore) で 10~20 μl に濃縮した。この溶液に 250 μl の TE buffer (pH 8.0) を加え、さらに 10~20 μl に濃縮した。この操作を 3 回繰り返して最終的に 18.5 μl になるように調整した。

ハイブリダイゼーション

上記で調整したプローブに 20 x SSC 6.25 μl (最終濃度 5 x SSC) を加え、95°C で 2 分間加熱して変性させた後に、室温で 10 分間放置した。その後、最終濃度が 0.2% になるように SDS を加え、Affymetrix Human Genome Focus 上に溶液をのせ、カバーガラスを被せて湿度の高い状態で 65°C、14 時間インキュベートした。この DNA チップを 2 x SSC-0.1% SDS 溶液に浸し、カバーガラスをはずした。2 x SSC-0.1% SDS 溶液に浸し室温で 20 分間、次いで 0.1% SDS 溶液に浸して室温で 20 分間、0.2 x SSC-0.1% SDS

溶液にて45°C、10分間洗浄した後、0.2 x SSC、0.05 x SSCで軽く洗浄し、100 x g、20秒間遠心した後に、室温で乾燥した。このDNAチップの解析は受託した。

(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・考察

1. 短時間(6時間)のメチル水銀処理により発現量の変動する遺伝子

DNA マイクロアレイを用いて、IMR-32 細胞を塩化メチル水銀(1 μM)で6時間(生存率ほぼ100%)処理した際に発現量の変動する遺伝子の検索を行った。その結果、6時間のメチル水銀処理によって発現量がメチル水銀未処理時に対して250%以上上昇する遺伝子が43種、また発現量が50%以下に減少する遺伝子が43種見つかった(Tables 1~4)。短時間のメチル水銀処理によって発現量が顕著に上昇した遺伝子の中には、様々なストレスに対して防御作用を示すGCLM、HMOX1およびNQO1や、シグナル伝達に関わるETV5、CDKN1AおよびFZD1、遺伝子の転写調節に関わるID4およびSFRS11

などが含まれていた(Table 2)。生体は様々な抗酸化酵素やシグナル伝達に関わる因子の発現量を誘導することによってメチル水銀毒性に対して防御作用を示すと思われる。また、メチル水銀によって引き起こされる細胞毒性発現機構の一つとして酸化的ストレスの関与が示されており(Yee s. and Choi B.H., 1996; Naganuma A. et al, 1998)、それによる細胞死はアポトシスによるものであることが知られている(Dare E. et al, 2000)。今回のDNA マイクロアレイの結果でもメチル水銀処理によって多くの抗酸化酵素やシグナル伝達に関わる因子をコードする遺伝子の発現量が上昇しており、メチル水銀毒性発現への酸化ストレスの関与を強く支持している。一方、様々な神経変性疾患に関わるいくつかの遺伝子の発現量がメチル水銀処理によって上昇することが認められた。特にその中には、アルツハイマー病の神経変性過程に関わるcalpain/p35/Cdk5カスケードの活性化因子であるCDK5およびその結合因子であるPLXNA2が含まれていた。坂上らによって小脳の初代培養細胞系においてcalpain/p35/Cdk5カスケードがメチル水銀毒性発現に関わっている可能性(Sakaue M. et al; 2005)が示されており、calpain/p35/Cdk5カスケードがメ

チル水銀によって活性化されるならば、メチル水銀による神経細胞に特異的に細胞死を引き起こす機構が説明できる可能性が考えられる。

次に、メチル水銀処理によって発現量が顕著に減少した遺伝子の中には DNA 損傷の修復などに関わる RPGR、OGG1、EZH1 および LIG1 や、神経変性疾患などに関わる CASP6 および BCHE や、シグナル伝達に関わる MPP2 および WIG1 が含まれていた

(Table 4)。酸化ストレスは DNA 損傷を引き起こすことが知られており、メチル水銀による酸化ストレス誘導は DNA 損傷を伴う可能性が考えられる。一方、生体には DNA 損傷に対する多様な修復機構が存在するが、メチル水銀は DNA 損傷の修復に関与する因子の発現を抑制することで細胞毒性を引き起こしている可能性が考えられる。また、生体には様々なストレスより生体を防御するためのシグナル伝達機構が存在する。特に我々は酵母を用いたメチル水銀毒性発現機構の解析を行い、パルミトイル基結合酵素の Akr1 を介したシグナル伝達経路がメチル水銀毒性の軽減に関与していることが明らかにしている。短時間のメチル水銀処理によって発現量の減少が認められた遺伝子の中にはパルミトイル化を介してシグナル伝達に関わる MPP2 や MPP5 が含まれて

いた (Table 3)。このことから、メチル水銀毒性発現においてパルミトイル化によるシグナル伝達経路は何らかの役割を果たしていると思われる。また、短時間のメチル水銀処理によって発現量が減少した遺伝子の中には細胞内での蛋白質輸送システム関わる遺伝子 (BET1、EDH1、GOLGA2、STX10、STX4A) が多く存在した (Table 3)。以前、我々は酵母でのエンドソームを介した液胞への蛋白質輸送システムがメチル水銀毒性を増強していることを報告した。このことより、細胞内での蛋白質輸送システムがヒト培養細胞でも酵母と同様にメチル水銀毒性に関与しているかも知れない。

2. 長時間 (24 時間) のメチル水銀処理により発現量が変動する遺伝子

IMR-32 細胞を塩化メチル水銀 (1 μM) で 24 時間 (生存率ほぼ 90%) 処理した際に発現量が変動する遺伝子の検索を行った。その結果、24 時間のメチル水銀処理によって発現量がメチル水銀未処理時に対して 200% 以上上昇する遺伝子が 31 種、また発現量が 50%以下に減少する遺伝子が 43 種見つかった (Tables 5~8)。長時間のメチル水銀処理によって発現量が顕著に上昇した遺伝子の中には神経系の形成や伝達に関わる VGF、

ADARB1 および CTDPI、腫瘍形成に関わる APBA2 および EGFR、シグナル伝達に関わる ETV5 および DKK1 などが含まれていた (Table 6)。メチル水銀は中枢神経障害を引き起こすことが知られており、神経系の形成や伝達に関わる遺伝子の発現量の上昇はメチル水銀による毒性発現機構の解明のうえで非常に興味深い。また、長時間のメチル水銀処理によって著しく発現量の上昇が認められた APBA2 および EGFR 以外にも腫瘍形成に関わる CDKN1A、IL1A、TNFRSF6B、WIG1 の発現量の上昇が認められた。これらの遺伝子は様々なストレスによる腫瘍形成において重要な役割を果たしており、特にその中 CDKN1A および WIG1 は発癌抑制因子の一つである p53 を介して腫瘍形成を抑制することが知られている (Israeli, D. et al, 1997 ; Kim, T. H. et al, 2000)。一方、メチル水銀処理で顕著な発現量の上昇が認められた APBA2 はアルツハイマー病の原因物質として知られている amyloid beta の前駆体に結合する蛋白質をコードし、アルツハイマー病の誘発に関与する可能性が示されている (Taru, H. and Suzuki, T., 2004)。メチル水銀による APBA2 の発現量の上昇はメチル水銀による中枢神経障害の発症において何らかの影響を与える可能性

が考えられる。さらに、長時間のメチル水銀処理によって発現量が増加した遺伝子の中には短時間のメチル水銀処理時でもその発現量の上昇が認められた遺伝子が含まれていた。その中には、シグナル伝達に関わる ETV5、DKK1、FZD1 および CDKN1A や、遺伝子の転写調節に関わる ID4 および SFRS11 の発現量が増加し、そのレベルは 24 時間まで高く維持されていた (Table 9)。

一方、長時間のメチル水銀処理によって、細胞内での蛋白質輸送に関わる SEC24D、ホルモン調節に関わる PGRMC2、抗酸化酵素の一つである GLRX、metabolic pathway に関わる FPGT など多様な機能を示す各々の遺伝子の発現量の減少が顕著に認められた (Table 8)。その中でも、FPGT を含む metabolic pathway に関わる多くの遺伝子 (C14orf1、C1orf13、FABP6、GALNS、HIBCH、NAGK、SIAT9) の発現量が増加した (Table 7)。メチル水銀処理で metabolic pathway に関わる多くの遺伝子の発現量が低下されたことによって、メチル水銀による細胞毒性が引き起こされているかも知れない。しかし、長時間でメチル水銀を処理した細胞は対照細胞に比べて生存率が既に 10%程度低下している

ことから、メチル水銀処理によって細胞毒性が引き起こされた結果、多くの metabolic pathway に関わる遺伝子の発現が低下された可能性も否定できない。

一方、今回の検討によって短時間および長時間でのメチル水銀処理によって発現量の減少が認められた遺伝子として chromatin silencing に関わる EZH1、腫瘍形成に関わる CPO などが見出された (Table 9)。さらに、発癌抑制因子の一つである p53 を介して腫瘍形成を抑制することが知られている WIG1 は短時間のメチル水銀処理ではその発現量の減少が認められたのに対し、長時間のメチル水銀処理ではその発現量の上昇が認められた。このことから、メチル水銀毒性の発現において WIG1 が何らかの役割を果たしており、p53 を介した WIG1 の抗腫瘍作用もしくは抗apoptosis作用がメチル水銀毒性の軽減に何らかの関わりがあるかも知れない。

D. 参考文献

Dare E., Gotz M.E., Zhivotovsky B., Manzo L. and Ceccatelli S. (2000) Antioxidants J811 and 17beta-estradiol protect cerebellar granule cells from methylmercury-induced apoptotic cell death. *J Neurosci Res.* 62,

557-565

Israeli, D., Tessler, E., Haupt, Y., Elkeles, A., Wilder, S., Amson, R., Telerman, A., and Oren, M. (1997) A novel p53-inducible gene, PAG608, encodes a nuclear zinc finger protein whose overexpression promotes apoptosis. *EMBO J* 16, 4384-4392.

Kim, T. H., Zhao, Y., Barber, M. J., Kuharsky, D. K., and Yin, X. M. (2000) Bid-induced cytochrome c release is mediated by a pathway independent of mitochondrial permeability transition pore and Bax. *J Biol Chem* 275, 39474-39481.

Naganuma A., Miura K., Tanaka-Kagawa T., Kitahara J., Seko Y., Toyoda H. and Imura N. (1998) Overexpression of manganese-superoxide dismutase prevents methylmercury toxicity in Hela cells. *Life Sciences*, 62, 157-161

Sakaue M., Okazaki M. and Hara S. (2005) Very low levels of methylmercury induce cell death

- | | |
|---|--|
| of cultured rat cerebellar neurons via calpain activation. Toxicology, 213, 97-106 | effects of methylmercury poisoning. Neurotoxicology, 17, 17-26 |
| Taru, H. and Suzuki, T. (2004) Facilitation of stress-induced phosphorylation of beta-amyloid precursor protein family members by X11-like/Mint2 protein. J Biol Chem 279, 21628-21636. | E. 研究発表
1. 論文発表
なし。
2. 学会発表
なし。 |
| Yee S. and Choi B.H. (1996) Oxidative stress in neurotoxic | F. 知的財産権の出願・登録状況
なし。 |