

## C. 結果・考察

### 1. 発現抑制によってメチル水銀感受性に影響を与える因子の検索

#### 1-1. 個々の遺伝子に対するシグナル強度の平均値をもとにした解析

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られている。また、siRNA ライブラリーには個々のヒト遺伝子について 3~5 つの siRNA 塩基配列が含まれている。まず、各々の塩基配列に対するシグナル強度を平均して個々の遺伝子のシグナル強度とし、Genespring software version 7.0 (Silicon Genetics) を用いて解析した。その結果、メチル水銀未処理のコントロールに比べて、生存率 90% ほどの低濃度 (3  $\mu$ M) の塩化メチル水銀で処理したときに 2 倍以上の高いシグナル強度を示した遺伝子 (発現が抑制されることによって細胞にメチル水銀耐性を与えると予想される遺伝子) として 155 種、1/2 倍以下の低いシグナル強度を示した遺伝子 (発現が抑制されることによってメチル水銀感受性を与えると予想される遺伝子) として 84 種が同定された (Fig. 1)。さらに、2 倍以上のシグナル強度を示した遺伝子 155 種の中で 4 倍以上のグナル強度を示し、機能

既知な遺伝子として GPR124 および PAPLN が含まれていた。同様に 1/2 倍以下のシグナル強度を示した遺伝子 84 種の中で 1/4 倍以上のグナル強度を示し、機能既知な遺伝子として FLJ10330 および PRKAA1 が含まれていた (Fig. 1)。

一方、生存率 40~50% の高濃度 (6  $\mu$ M) のメチル水銀で処理したときに 2 倍以上の高いシグナル強度を示した遺伝子として 125 種、1/2 倍以下の低いシグナル強度を示した遺伝子として 97 種が同定された (Fig. 1)。さらに、2 倍以上のシグナル強度を示した遺伝子 125 種の中で 4 倍以上のシグナル強度を示し、機能既知な遺伝子として SEZ6L、FLJ46154、C6orf166 および RECQL5 の 4 種が含まれていた。同様に 1/2 倍以下のシグナル強度を示した遺伝子 97 種の中で 1/4 倍以上のグナル強度を示し、機能既知な遺伝子として ING5 および PRKAA1 が含まれていた (Fig. 1)。

次に、低濃度と高濃度のメチル水銀で処理したときに、共通して 2 倍以上または 1/2 倍以下のシグナル強度を示した遺伝子を検索したところ、2 倍以上のシグナル強度を示した遺伝子は 37 種あり、その中でシグナル変動が特に顕著な機能既知の遺伝子には NEXN 1 (シグナル強度は 3.6 倍以上) が含まれていた (Fig. 1)。同様に、1/2

倍以下のシグナル強度を示した遺伝子は 26 種あり、その中でシグナル変動が特に顕著な機能既知の遺伝子には PRKAA1、AL137312、ZF (シグナル強度は各 3/10 倍以下) の 3 種が含まれていた (Fig. 1)。

## 1-2. siRNA 導入による遺伝子のノックダウンが細胞のメチル水銀感受性に及ぼす影響

1-1 で同定された遺伝子とメチル水銀毒性の関係を再検討するため、それぞれの遺伝子を標的とした siRNA を (8 種 ; PRKAA1、AL137312、ZF、FXR、RECQL5、ADRBK2、NEXN1) 作製し、リポフェクション法により HEK293 細胞へ導入した後に、それぞれの siRNA 導入細胞を用いてメチル水銀に対する感受性を検討した。その結果、細胞にメチル水銀高感受性を与えると予想される PRKAA1 は、対照細胞に比べて高い感受性を示した (Fig. 2-1)。しかし、それ以外の siRNA 導入細胞ではメチル水銀感受性がほとんど変動しなかった (Fig. 2-1、2-2)。PRKAA1 は AMP キナーゼの触媒サブユニット alpha 1 であり、その遺伝子ノックダウンは神経細胞における糖源枯渇による細胞死を増強させることが報告されている (Culmsee, C. et al, 2001)。AMP キナーゼは飢餓応答や解糖系などのエ

ネルギー代謝の調節 (Marsin, A. et al, 2002)、または、低酸素状態により生じる酸化ストレスによってその発現が誘導されることが知られている (Zou, M.H. et al, 2003)。これまでに、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 1 つとして酸化ストレスの関与が示されており、AMP キナーゼはメチル水銀処理により生じる酸化ストレスによる細胞毒性の軽減に何らかの役割を果たしている可能性が考えられる。

## 1-3 . siRNA 配列に対するシグナル強度をもとにした解析

個々の遺伝子に対する各々のシグナル強度の平均値をもとに解析を行い、同定された因子の発現抑制がメチル水銀感受性に与える影響を再検討したところ、ほとんどの因子の発現抑制はメチル水銀感受性に影響を与えなかった。そこで、個々の遺伝子に対する各 siRNA 塩基配列のシグナル強度を平均せず、それぞれのシグナル強度をもとに再解析したところ、低濃度 (3  $\mu$ M) と高濃度 (6  $\mu$ M) のメチル水銀で処理したときに、シグナル強度の変動が顕著である siRNA 塩基配列の上位を調べたところ、低濃度と高濃度メチル水銀処理で低いシグナル強度を示す siRNA 塩基配列の上位 3 種

は共通し、FLJ13570、SHB および PRKAA1 をそれぞれ特異的に発現抑制する siRNA 塩基配列が含まれていた (Fig. 3)。同様に、高濃度のメチル水銀で処理したときに高いシグナル強度を示し、細胞にメチル水銀耐性を与えると予想される上位 3 種には RP1-268D13、RP11-100F10 および FLJ34643 を特異的に抑制する siRNA 塩基配列が含まれ、低濃度のメチル水銀処理で高いシグナル強度を示した上位 3 種には PAPLN、TRUB1 および RP111-67H12 の siRNA 塩基配列が含まれていた (Fig. 3)。次に、低濃度と高濃度のメチル水銀で処理したときに共通して 1/6 倍以下、または、6 倍以上のシグナル強度を示した配列を検索した。その結果、低濃度と高濃度のメチル水銀処理によって共通して 1/6 倍以下のシグナル強度を示す siRNA 塩基配列には 19 種 (PRKKA1、AL137312、FLJ13570、SHB、ITCH、NDUFA4L2、Plexin D1、Calmodulin 2、RMRP、FNBP1、SIX3、FRMD6、RP11-473N2、RP11-498D10、RP11-447L10、CTD-2299I21、GINS4、IMAGE;4826992、DKFZp434B1023) 含まれていた (Fig. 3)。同様に、共通して 6 倍以上のシグナル強度を示す siRNA 塩基配列には 7 種 ( RP11-100F10、REP2、CIT987SK-A-61E3、LANL (462G18)、

ZGPAT、PTPN1、SLC35E4) が含まれていた (Fig. 3)。

#### 1-4. siRNA 導入による遺伝子のノックダウンが細胞のメチル水銀感受性に及ぼす影響

1-3 で低濃度と高濃度メチル水銀処理で低いシグナル強度を示す siRNA 塩基配列の上位 3 種の各遺伝子とメチル水銀毒性との関係を再検討するため、これらの遺伝子をそれぞれ標的とした siRNA 発現プラスミドを作製した。また、siRNA 発現プラスミドの細胞への導入効率を上げるため、siRNA 発現プラスミドの導入方法をエレクトロポレーション法に変更し、各遺伝子の siRNA 導入細胞を作製し、メチル水銀感受性を検討した。その結果、細胞にメチル水銀感受性を与えると予想される遺伝子の中では、対照細胞に比べて SHB と FLJ13570 の siRNA 導入細胞がメチル水銀に対して高い感受性を示した (Fig. 4-1)。なお、PRKKA1 の siRNA 導入細胞は高いメチル水銀感受性を示すことはすでに確認している (Fig. 2-1)。SHB は、シグナル伝達蛋白質や様々な受容体に関連するアダプター蛋白質 B を含む Src homology2 ドメインであり、アポトーシスや細胞分化 (Kriz, V., et al, 2003)、CD3 を介した IL-2 の発現 (Lindholm, C. K., et al, 1999)、ERK

の活性化 (Lindholm, C. K., 2002) や  $\text{Ca}^{2+}$  の流動に寄与 ((Lindholm, C. K., et al, 1999) していることが知られている。一方、メチル水銀の毒性は重篤な中枢神経障害を起こすことが知られ、メチル水銀が神経細胞に作用すると細胞内の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度が増加し、神経毒性が惹起されることも知られている。以上のことから、SHB の発現抑制が細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度に影響を与えるために、メチル水銀の毒性が発症される可能性が考えられる。

一方、細胞にメチル水銀耐性を与えると予想される遺伝子では、RP11-100 の siRNA を導入させた細胞が対照細胞に比べて強い耐性を示し、PAPLN の siRNA 導入細胞は僅かなメチル水銀耐性を示したものの、逆に siRNA 導入することによってメチル水銀高感受性を示すもの (TRUB1) も存在した (Fig. 4-5)。また、RP1-268 の siRNA 導入によって強い細胞増殖の阻害が認められた (Fig. 4-5)。PAPLN では弱い耐性が見られたものの、他の siRNA 導入細胞ではメチル水銀耐性が認められなかった (Fig. 4-5)。PAPLN は、ADAM-ST ファミリーメンバーのメタロプロテアーゼとして知られている (Kramerova, I. A., et al, 2000)。また、メチル水銀が ADAM メタロプロテアーゼの蛋白質分解によって Notch 受容体を活性化

することが報告されている (Bland, C. and Rand, M.D., 2006)。Notch 受容体は神経細胞の運命決定に関与することが知られているため、メチル水銀による ADAM メタロプロテアーゼを介した Notch 受容体の活性化がメチル水銀の毒性(中枢神経障害)に関与していると考えられる。以上のことから、PAPLN の発現抑制によって Notch 受容体が活性化されず、メチル水銀の毒性が軽減されることによって細胞にメチル水銀耐性を与えることが予想される。

低濃度と高濃度のメチル水銀処理により共通して 1/6 倍以下または 6 倍以上のシグナル強度を示した配列とメチル水銀毒性の関係を検討するため、これらの各配列を標的とした dsRNA を作製し、エレクトロポレーション法により HEK293 細胞へ導入して各配列の siRNA 導入細胞を用いてメチル水銀毒性試験を行なった。低濃度と高濃度のメチル水銀処理により共通して 1/6 倍以下のシグナル強度を示した配列は 19 種が含まれ、その中には既にメチル水銀感受性を検討済みの配列が 4 種含まれていたため、残りの 15 種 (ITCH、NDUFA4L2、Plexin D1、Calmodulin 2、RMRP、FNBP1、SIX3、FRMD6、RP11-473N2、RP11-498D10、RP11-447L10、CTD-2299I21、GINS4、

IMAGE;4826992、DKFZp434B1023) について検討した。その結果、細胞にメチル水銀感受性を与えると予想される遺伝子では、コントロールに比べて SIX3、FRMD3、RP11-447L10 または RP11-473N2 の siRNA をそれぞれ導入させた細胞が高いメチル水銀感受性を示し (Fig. 4-3)、ITCH、GINS、IMAGE;4826992 または DKFZp434B1023 の siRNA 導入細胞は僅かにメチル水銀高感受性を示した (Fig. 4-1、4-4) が、その中には dsRNA 導入によって逆に細胞にメチル水銀耐性を与えるものも 2 種 (Plexin D1、RMRP) 存在した (Fig. 5-4)。また、NDUFA4L2 または Calmodulin 2 の siRNA を導入させた細胞は対照細胞に比べて細胞増殖が著しく抑制されたことから、これらの遺伝子のノックダウンによる細胞のメチル水銀感受性への影響は判断できなかった (Fig. 4-1、4-2)。その他の siRNA 導入細胞のメチル水銀に対する感受性はほとんど変動しなかった (Fig. 4-2、4-3、4-4)。

一方、上記と同様に、共通して 6 倍以上のシグナル強度を示した配列は 7 種が含まれ、その中には既にメチル水銀耐性を検討済みの配列が 1 種含まれていたため、残りの 6 種 (REP2、CIT987SK-A-61E3、462G18 (LANL)、ZGPAT、PTPN1、SLC35E4) につい

て検討した。その結果、462G18 (LANL) がメチル水銀耐性を示した。しかし、他の siRNA 導入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. 4-6)。

## 2. 発現抑制によってカドミウム感受性に影響を与える因子の検索

### 2-1. siRNA 配列に対するシグナル強度をもとにした解析

siRNA ライブラリーを導入した HEK293 細胞を用いてノックダウンされることによって細胞のカドミウム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た。塩化カドミウムで処理した細胞より総 RNA を抽出し、得られた総 RNA 中の siRNA を特異的な配列を有するプローブを用いた PCR により増幅させた後にマイクロアレイを行った。その結果、20  $\mu$ M 塩化カドミウム (生存率約 40%) で 48 時間処理した siRNA ライブラリー導入細胞において、対照細胞に比べて 4 倍以上シグナル強度が上昇した siRNA 塩基配列が特異的に発現抑制する遺伝子は 11 種 (NCOA2、FLJ34477、SOCS1、RBPSUHL、NASP1、STCOA、MAWAP、RP11-134C1、DKFZp686H24132、PRKX、MGC19652) が含まれていた。一方、41 種の遺伝子 (FLJ11433、OAT1、IRS3L、FLJ13189、COL4A1、

GCDH、DKFZP566F084、CDKN2B、HASPP28、GDI2、ZNF264、NADH1alpha2、HAS2、HPD、KRTHA8、S100A1、GMPPA、DAAM2、DCT、CHH1、MGC11102、KCNQ5、JOSD3、MEF、TENSIN4、GBA2、ASS1、PRR12、GPR135、OSBP1A、BTF3、ADAM、TMC5、DNAJA1、PSEN2、RSPS11、EEF1E1、ZAP70、SFRS10、LRRTM4、FLJ40660、ARPC5) を特異的にノックダウンさせる siRNA 塩基配列に対するシグナル強度が対照細胞に比べて 1/8 倍に低下していた。今回、塩化カドミウム処理によって対照細胞に比べてシグナル強度が変動した siRNA が特異的に発現抑制する遺伝子産物の中にはカドミウム毒性発現に関与している因子が含まれている可能性が考えられる。

## 2-2. dsRNA 導入による遺伝子のノックダウンが細胞のメチル水銀感受性に及ぼす影響

2-1 で塩化カドミウム処理によってシグナル強度が対照細胞に比べて上昇した siRNA が特異的に発現抑制する 11 種の遺伝子中から、ランダムに 6 種 (FLJ34477、JOSD3、MAWAP、STCOA、SOCS1、RBPSUHL) の siRNA 塩基配列を選び、それらの dsRNA (double strands RNA) を

HEK293 細胞に再導入し、カドミウムに対する感受性を検討したところ、JOSD3 および SOCS1 の dsRNA 導入細胞は対照細胞に比べてメチル水銀耐性を示した (Fig. 5-1)。しかし、MAWAP および RBPSUHL の dsRNA 導入細胞は対照細胞と同程度のメチル水銀感受性を示した。また、FLJ34477 および STCOA の dsRNA を導入させた細胞は対照細胞に比べて細胞増殖が著しく抑制されたことから、これらの遺伝子のノックダウンによる細胞のメチル水銀感受性への影響は判断できなかった (Fig. 5-1)。今回、ノックダウンされることによって細胞に顕著なメチル水銀耐性を与えた JOSD3 および STCS1 はそれぞれ細胞周期の進行 (Wang, L. et al, 2001) や JAK-STAT シグナル伝達を抑制する役割 (Cottet, S. et al, 2001) を果たしており、カドミウム感受性決定因子としてはじめて同定されたものである。一方、塩化カドミウム処理によってシグナル強度が対照細胞に比べて上昇した siRNA が特異的に発現抑制する 41 種の遺伝子中から、ランダムに 18 種の siRNA 塩基配列を選び、それらの dsRNA を HEK293 細胞に再導入し、カドミウムに対する感受性を検討した。その結果、LRRTM4 の dsRNA 導入細胞は対照細胞に比べて高いメチル水銀感受性を示したも

の、MGC11102 の dsRNA 導入細胞は僅かなメチル水銀高感受性を示した (Fig. 5-2)。しかし、ほとんどの dsRNA を導入した細胞は対照細胞と同程度のカドミウム感受性を示し (Fig. 5-2、5-3、5-4)、その中には dsRNA 導入によって逆に細胞にメチル水銀耐性を与えるものも 2 種 (ASNSD1、GBA2) 存在した (Fig. 5-4)。今回、ノックダウンされることによって細胞に顕著なメチル水銀高感受性を与えた LRRTM4 および MGC11102 はほとんど機能不明であるが、LRRTM4 は神経接着に関与することが示されている (Lauren, J. et al, 2003)。一方、ノックダウンされることによって細胞に顕著なメチル水銀耐性を与えた ASNSD1 は機能未知であり、GBA2 は beta-glucosidase をコードすることが知られている (Matern, H. et al, 2001)。以上の結果は、カドミウム感受性の決定に関与する新たな因子として 6 種を同定することに成功したものであり、カドミウム毒性発現機構解明において重要な手掛かりを提供するものと思われる。

#### D. 参考文献

Bland, C. and Rand, M.D. (2006) Methylmercury induces activation of Notch signaling. *Neurotoxicology* 27, 982-991.

Cottet, S., Dupraz, P., Hamburger, F., Dolci, W., Jaquet, M., and Thorens, B. (2001) SOCS-1 protein prevents Janus Kinase/STAT-dependent inhibition of beta cell insulin gene transcription and secretion in response to interferon-gamma. *J Biol Chem* 276, 25862-25870.

Culmsee, C., Monnig, J., Kemp, B.E. and Mattson M.P. (2001) AMP-activated protein kinase is highly expressed in neurons in the developing rat brain and promotes neuronal survival following glucose deprivation. *J Mol Neurosci* 17, 45-58.

Kramerova, I. A., Kawaguchi, N., Fessler, L. I., Nelson, R. E., Chen, Y., Kramerov, A. A., Kusche-Gullberg, M., Kramer, J. M., Ackley, B. D., Sieron, A. L., Prockop, D. J., and Fessler, J. H. (2000) Papilin in development; a pericellular protein with a homology to the ADAMTS metalloproteinases. *Dev Suppl* 127, 5475-85.

Kriz, V., Anneren, C., Lai, C., Karlsson, J., Mares, J., and Welsh, M. (2003) The SHB adapter protein is required for efficient multilineage differentiation of mouse embryonic

stem cells. *Exp Cell Res* 286, 40-56.

Lauren, J., Airaksinen, M. S., Saarma, M., and Timmusk, T. T. (2003) A novel gene family encoding leucine-rich repeat transmembrane proteins differentially expressed in the nervous system small star, filled. *Genomics* 81, 411-421.

Lindholm, C. K., Gylfe, E., Zhang, W., Samelson, L. E., and Welsh, M. (1999) Requirement of the Src homology 2 domain protein Shb for T cell receptor-dependent activation of the interleukin-2 gene nuclear factor for activation of T cells element in Jurkat T cells. *J Biol Chem* 274, 28050-28057.

Lindholm, C. K. (2002) IL-2 receptor signaling through the Shb adapter protein in T and NK cells. *Biochem Biophys Res Commun* 296, 929-936.

Matern, H., Boermans, H., Lottspeich, F., and Matern, S. (2001) Molecular Cloning and Expression of Human Bile Acid beta -Glucosidase. *J Biol Chem* 276, 37929-37933.

Marsin, A. S., Bouzin, C., Bertrand, L., and Hue, L. (2002) The stimulation of

glycolysis by hypoxia in activated monocytes is mediated by AMP-activated protein kinase and inducible 6-phosphofructo-2-kinase. *J Biol Chem* 277, 30778-30783.

Wang, L., Bhattacharyya, N., Chelsea, D. M., Escobar, P. F., and Banerjee, S. (2004) A novel nuclear protein, MGC5306 interacts with DNA polymerase beta and has a potential role in cellular phenotype. *Cancer Res* 64, 7673-7677.

Zou, M.H., Hou, X.Y., Shi, C.M., Kirkpatrick, S., Liu, F., Goldman, M.H. and Cohen, R.A. (2003) Activation of 5'-AMP-activated kinase is mediated through c-Src and phosphoinositide 3-kinase activity during hypoxia-reoxygenation of bovine aortic endothelial cells. Role of peroxynitrite. *J Biol Chem*. 278, 34003-34010.

#### E. 研究発表

1. 論文発表  
なし。

#### 2. 学会発表

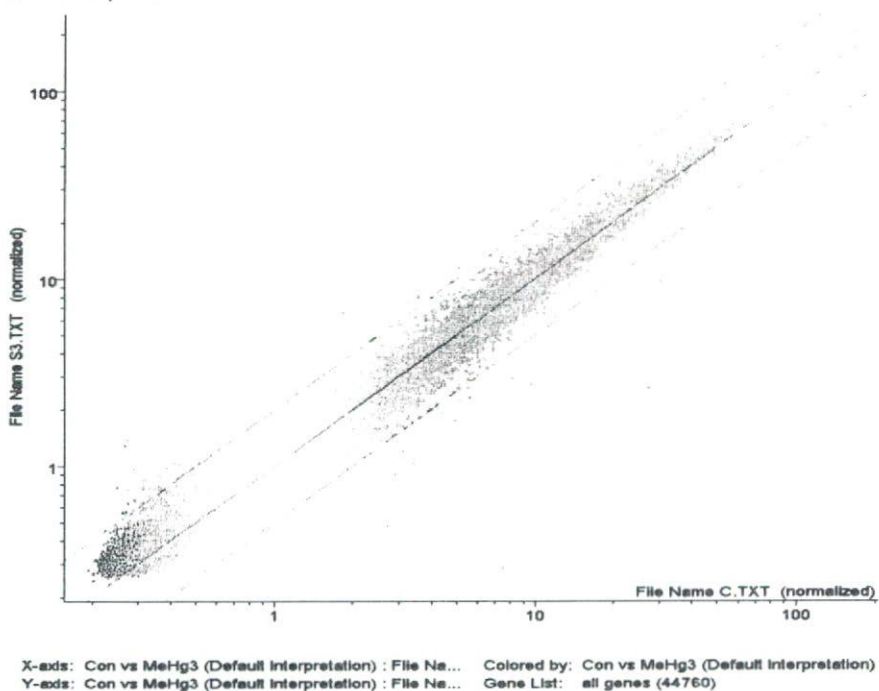
林 達也、黄 基旭、永沼 章：  
メチル水銀毒性に関わるヒト遺伝



子の siRNA ライブラリーを用いた  
検索とその作用機構. フォーラム  
2006 ; 衛生薬学・環境トキシコロ  
ジー, 2006.

F. 知的財産権の出願・登録状況  
なし。

a. 低濃度 (3  $\mu$ M)



b. 高濃度 (6  $\mu$ M)

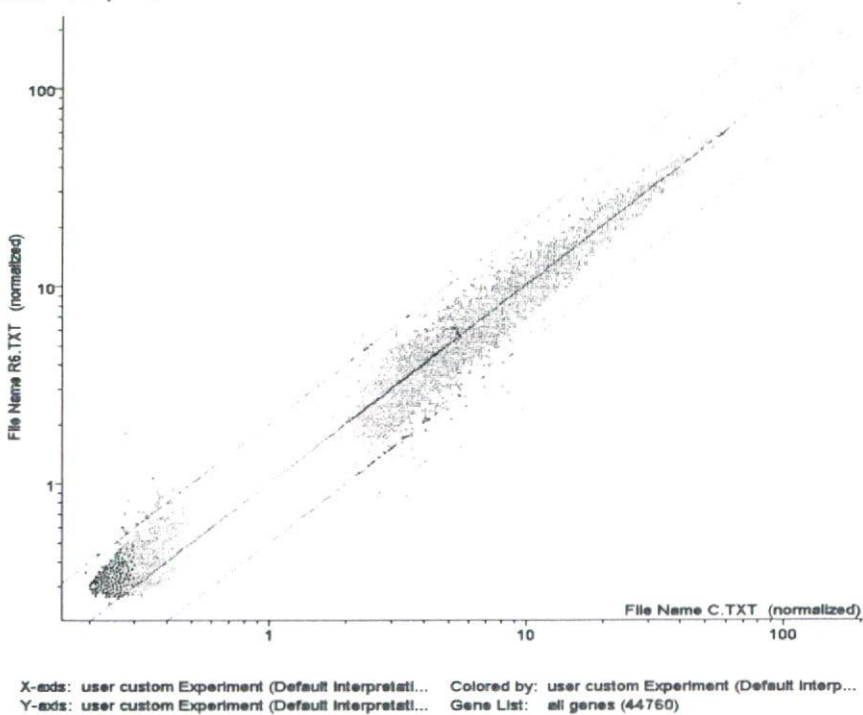


Fig. 1 メチル水銀で処理した細胞の scatter plot analysis (遺伝子に対するシグナル強度の平均値をもとに)

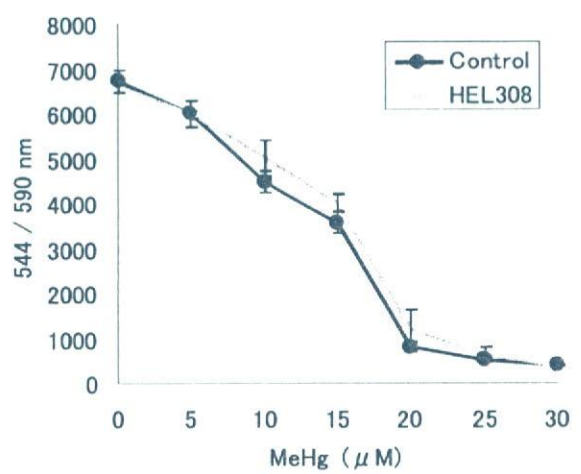
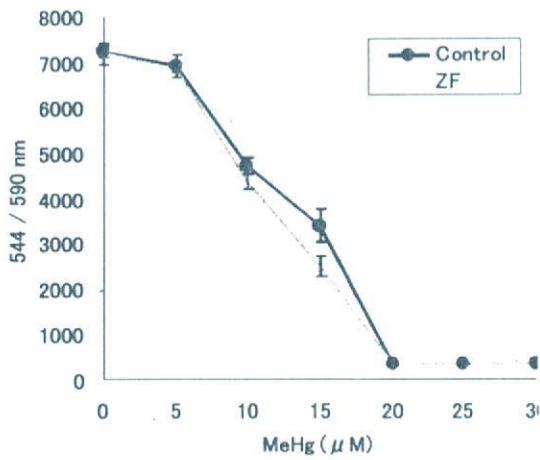
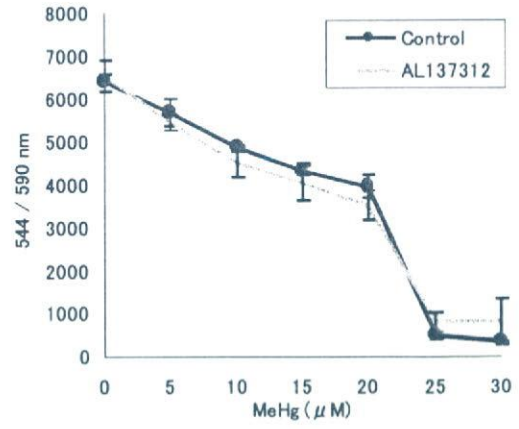
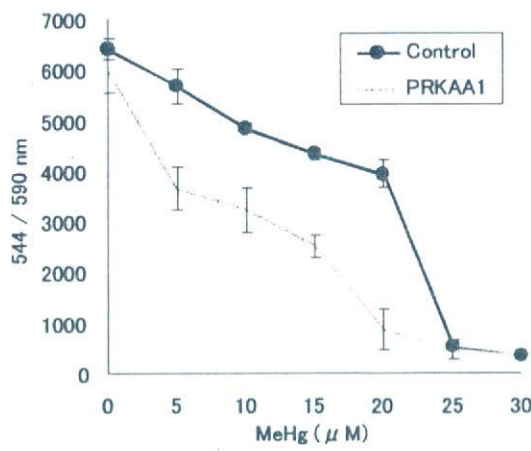


Fig. 2-1 siRNA 導入細胞のメチル水銀に対する感受性

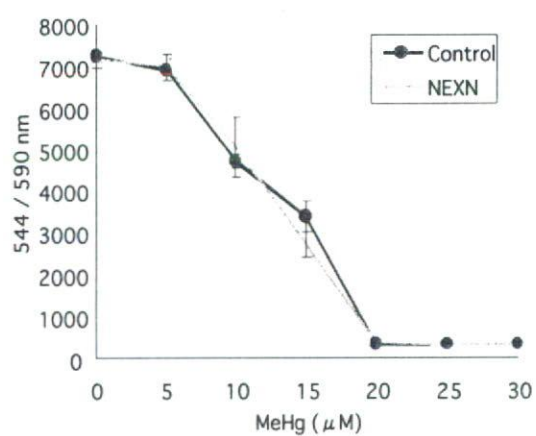
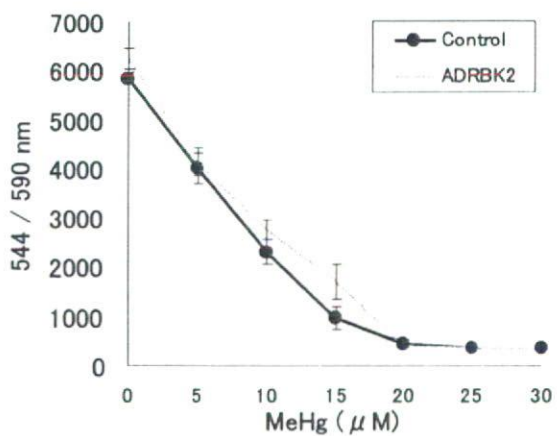
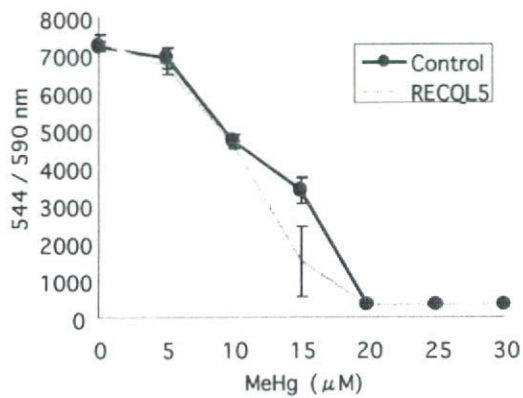
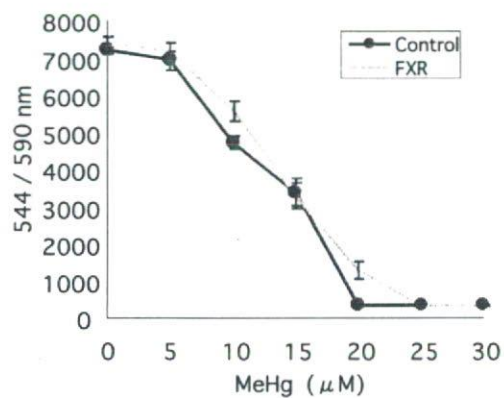
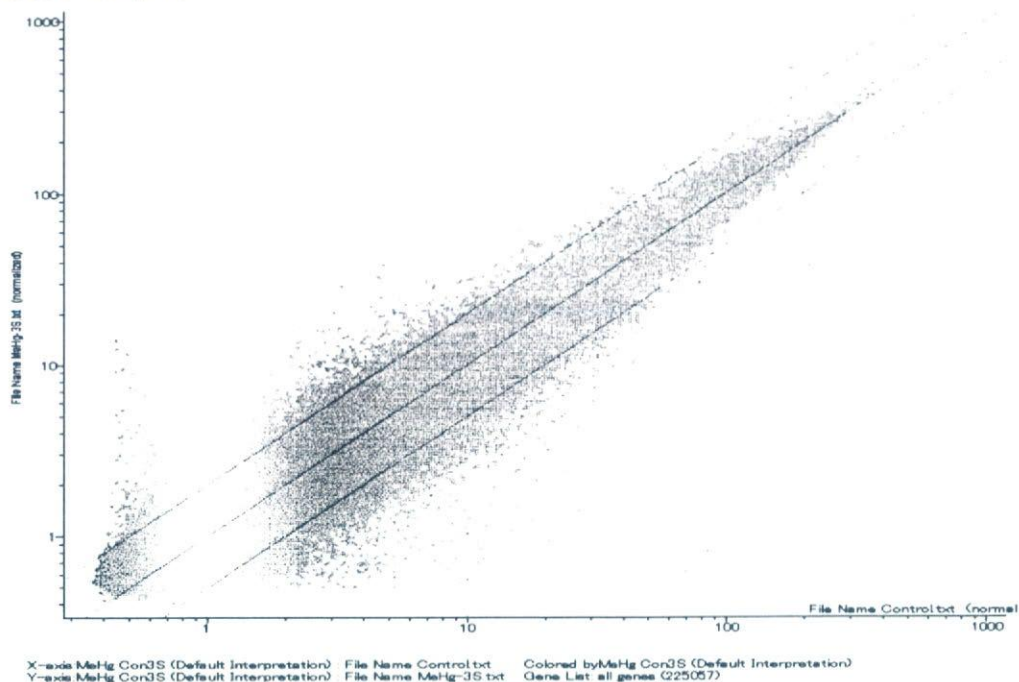


Fig. 2-2 siRNA 導入細胞のメチル水銀に対する感受性

a. 低濃度 (3  $\mu$ M)



b. 高濃度 (6  $\mu$ M)

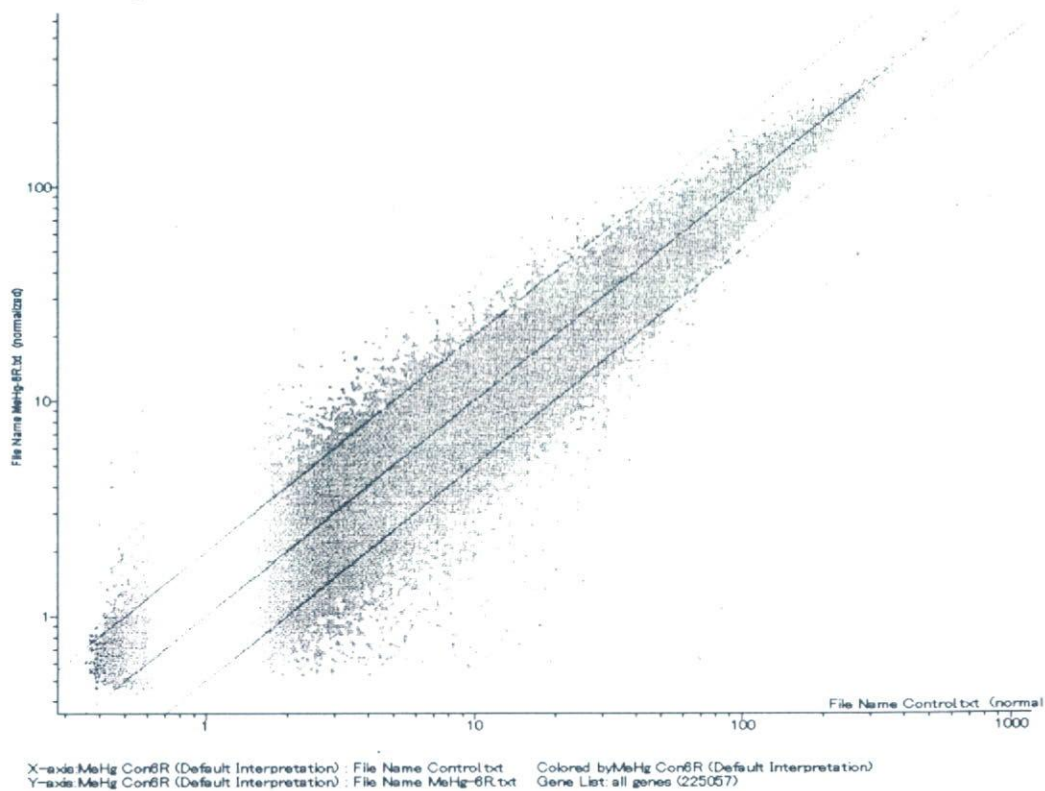


Fig. 3 メチル水銀で処理した細胞の scatter plot analysis (siRNA の塩基配列に対するシグナル強度をもとに)

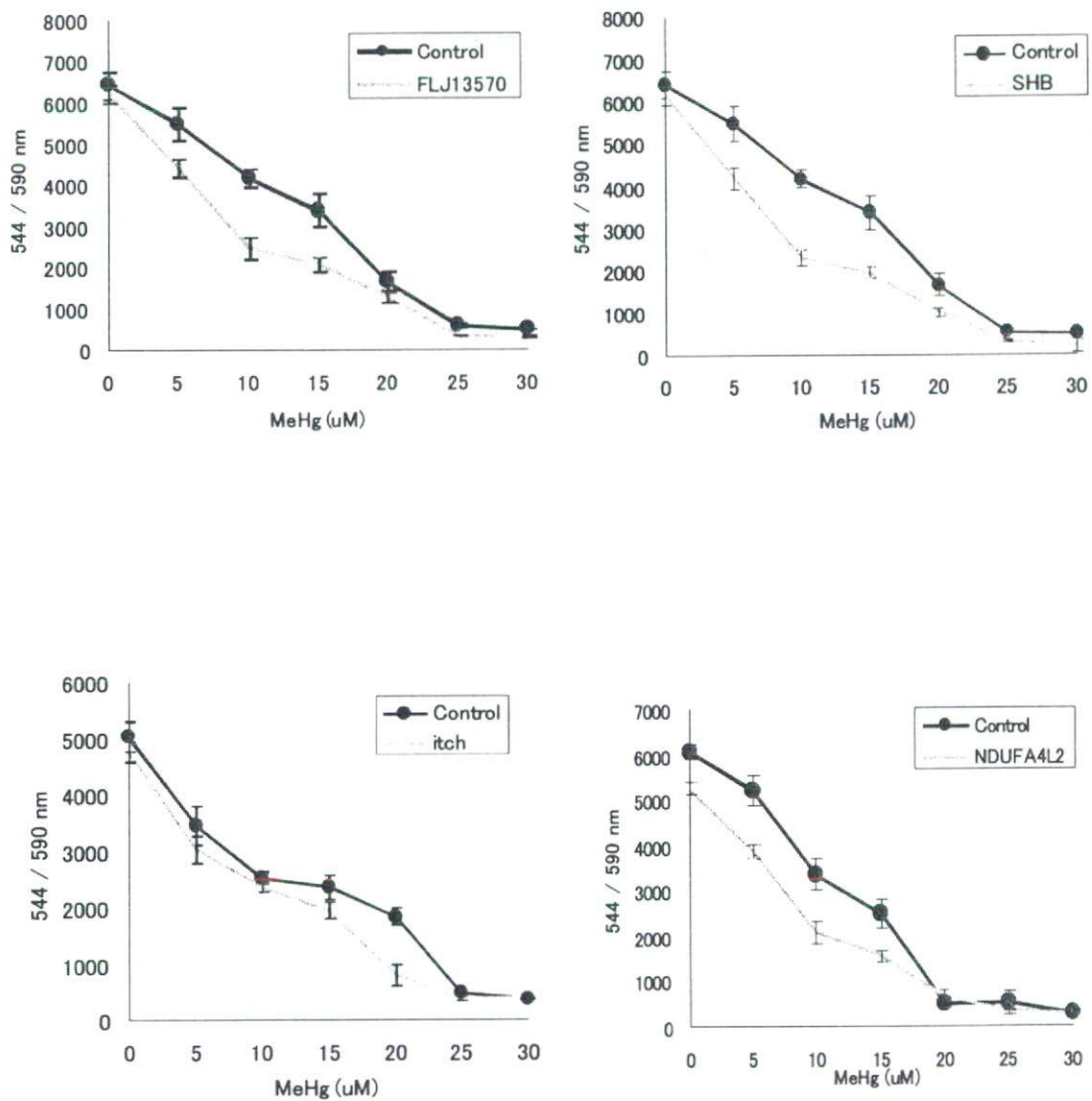


Fig. 4-1 siRNA 導入細胞のメチル水銀に対する感受性

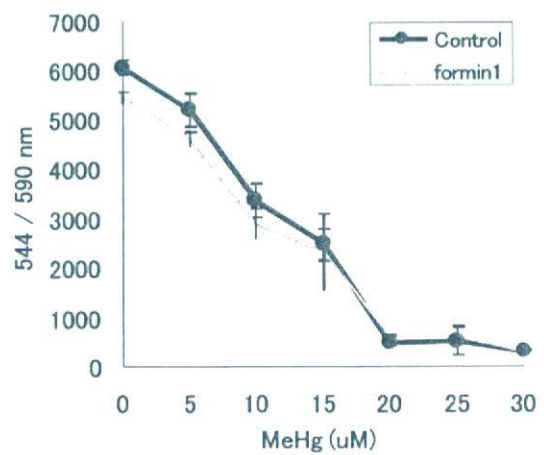
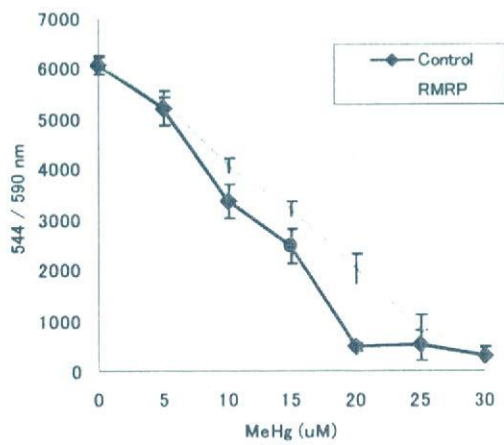
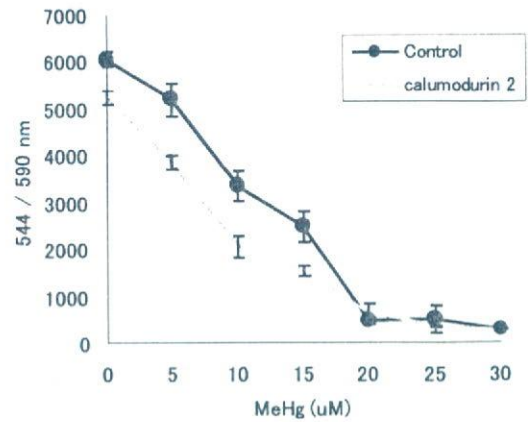
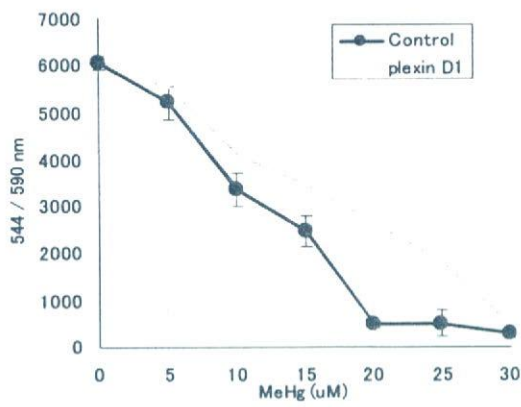


Fig. 4-2 siRNA 導入細胞のメチル水銀に対する感受性

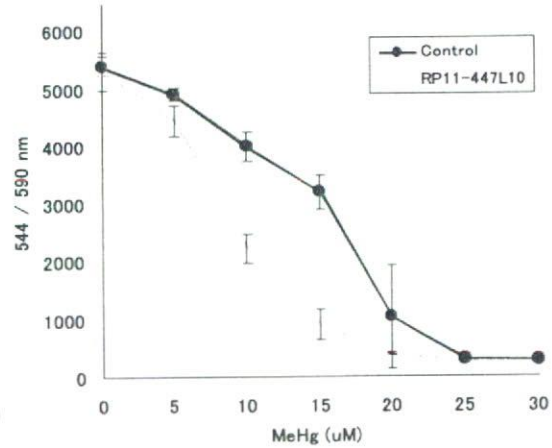
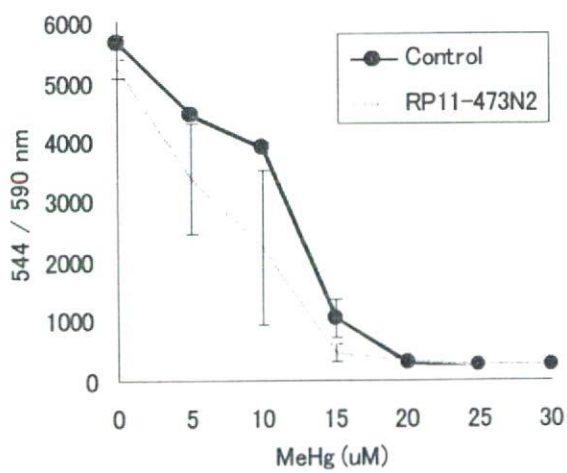
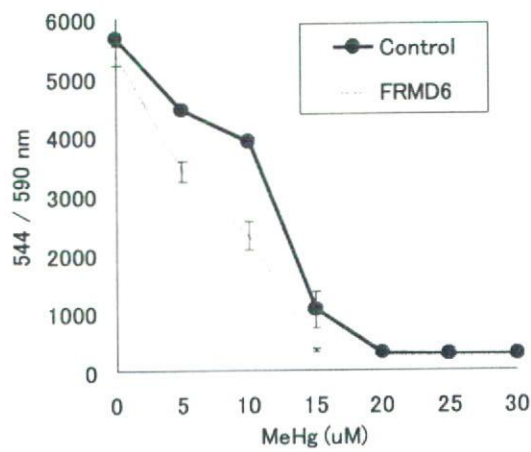
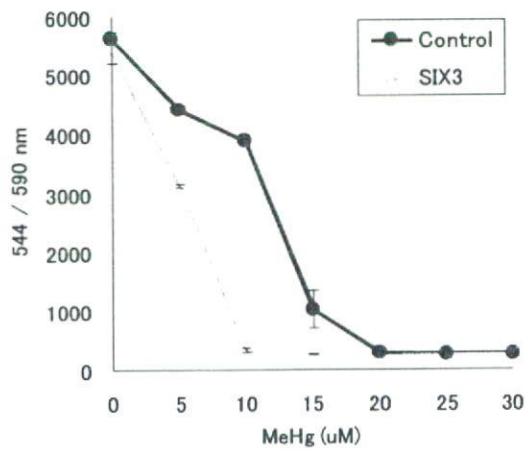


Fig. 4-3 siRNA 導入細胞のメチル水銀に対する感受性



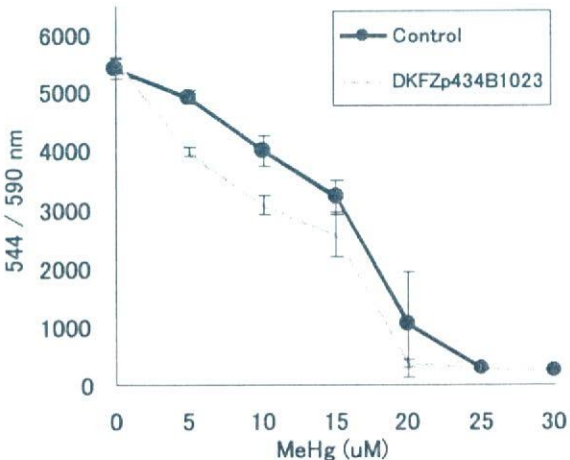
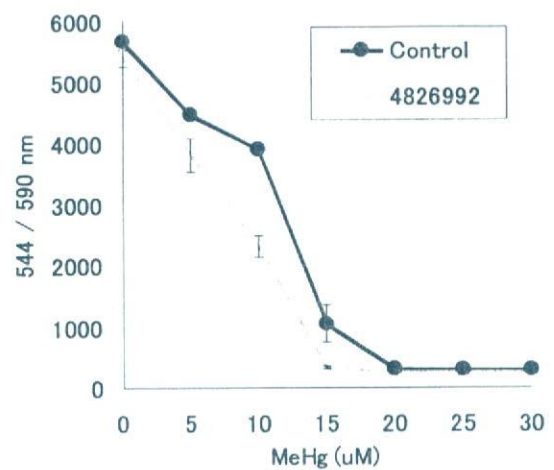
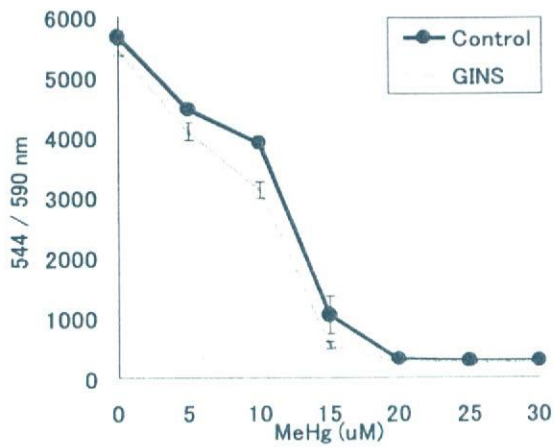
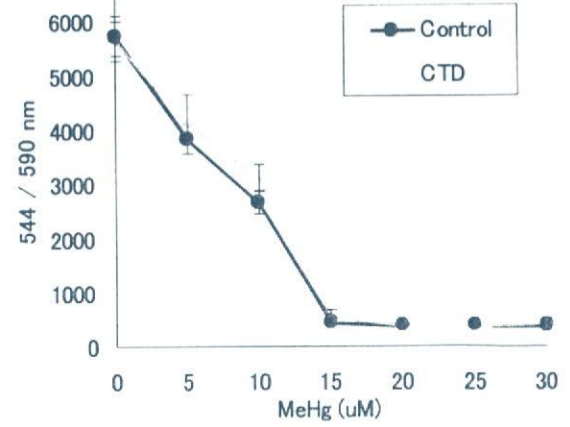
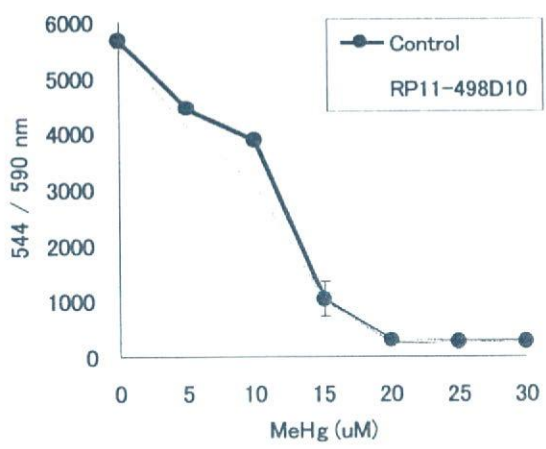


Fig. 4-4 siRNA 導入細胞のメチル水銀に対する感受性

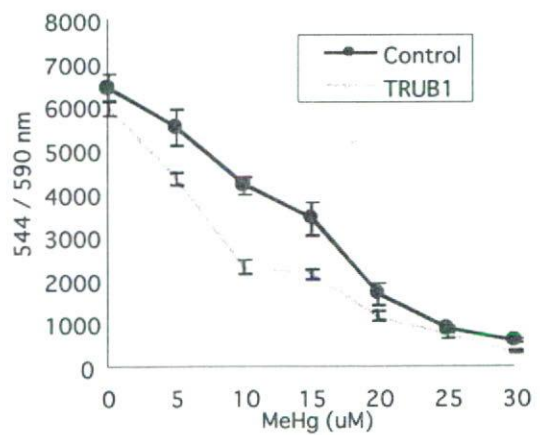
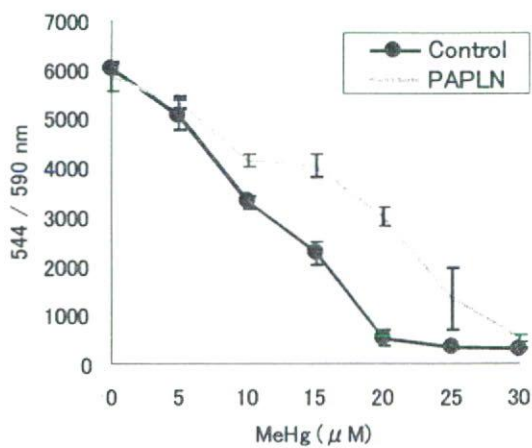
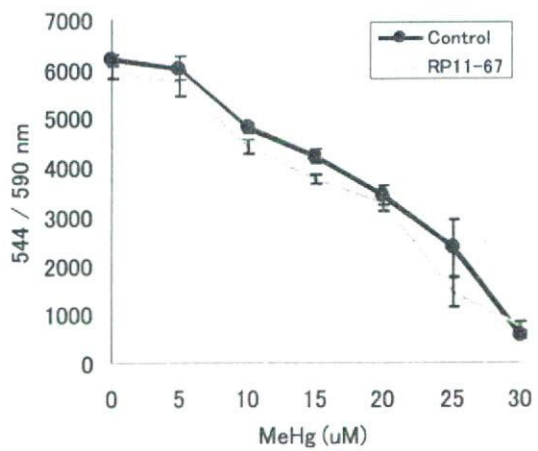
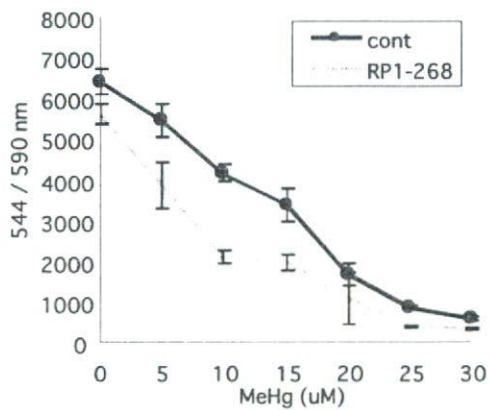
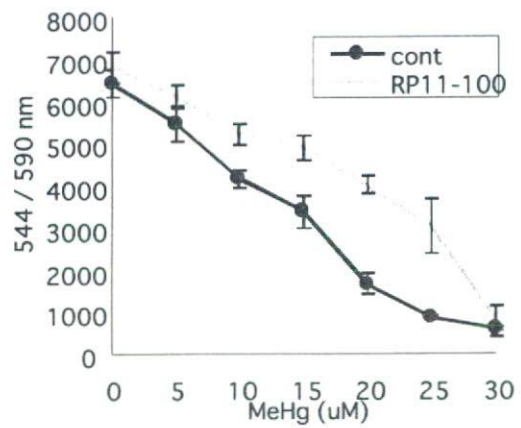
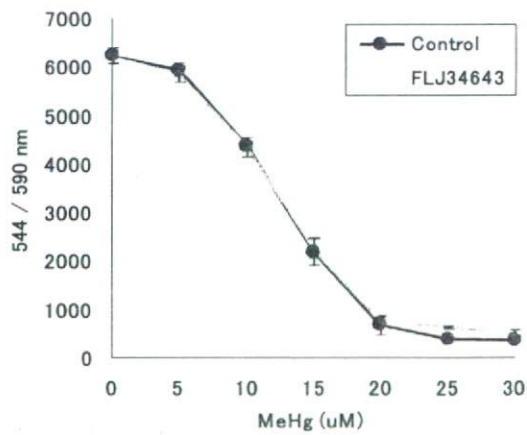


Fig. 4-5 siRNA 導入細胞のメチル水銀に対する感受性

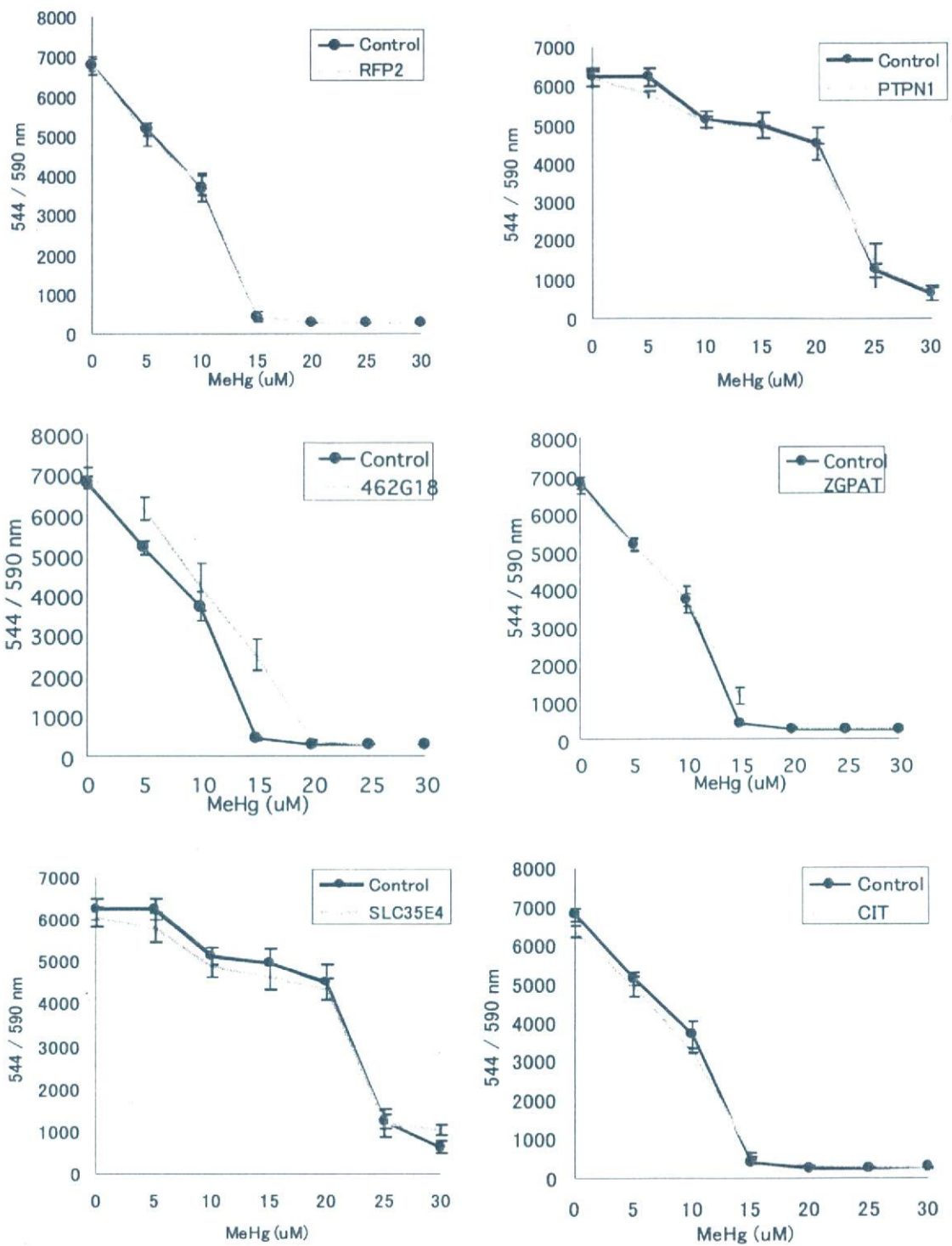


Fig. 4-6 siRNA 導入細胞のメチル水銀に対する感受性

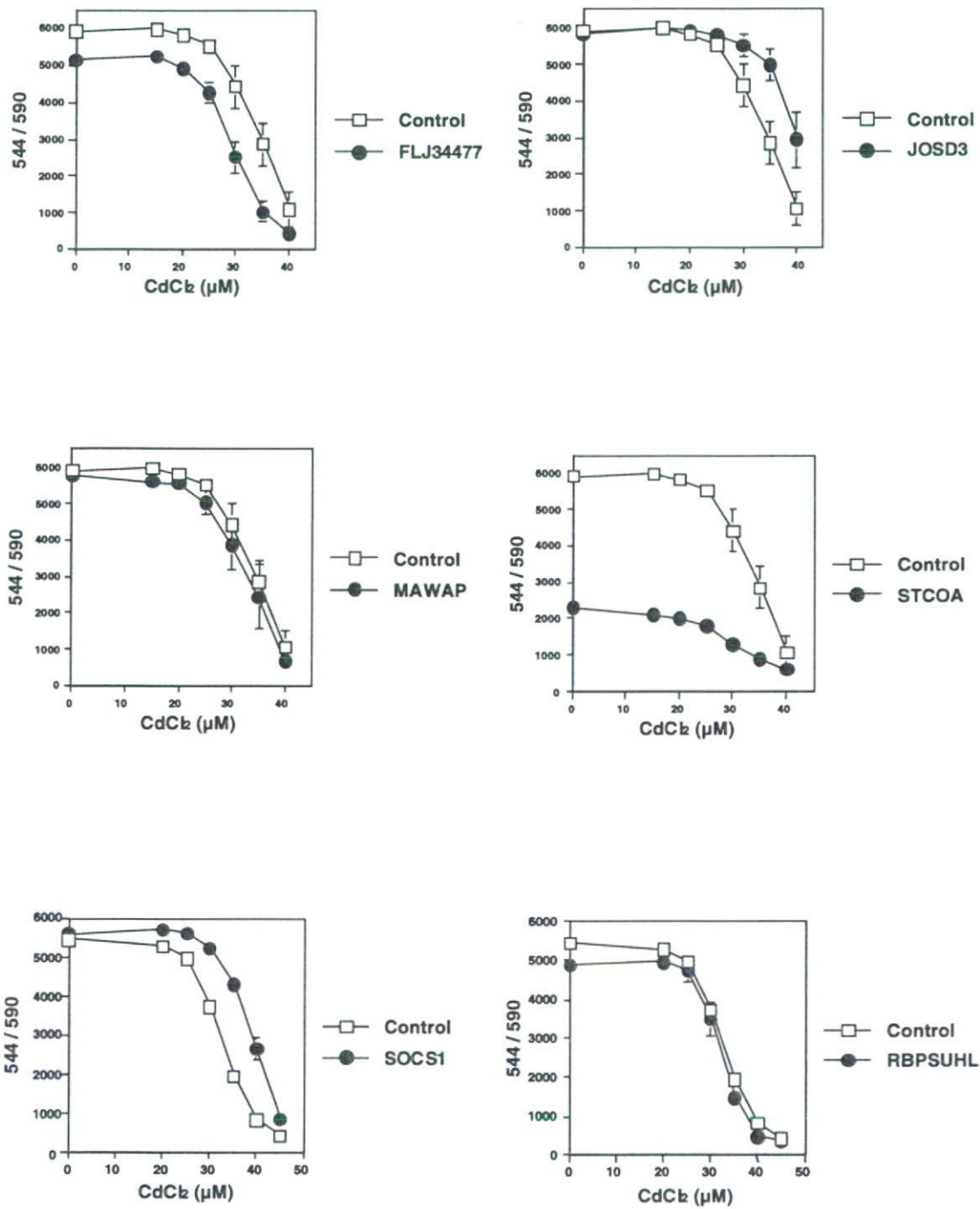


Fig. 5-1 dsRNA 導入細胞のカドミウムに対する感受性