

Figure 18. Sod1またはSod2欠損酵母がメチル水銀感受性に与える影響
 5×10^5 cells/mLの酵母をメチル水銀存在下で、30°Cで培養し、酵母の増殖を経時敵に検討した。

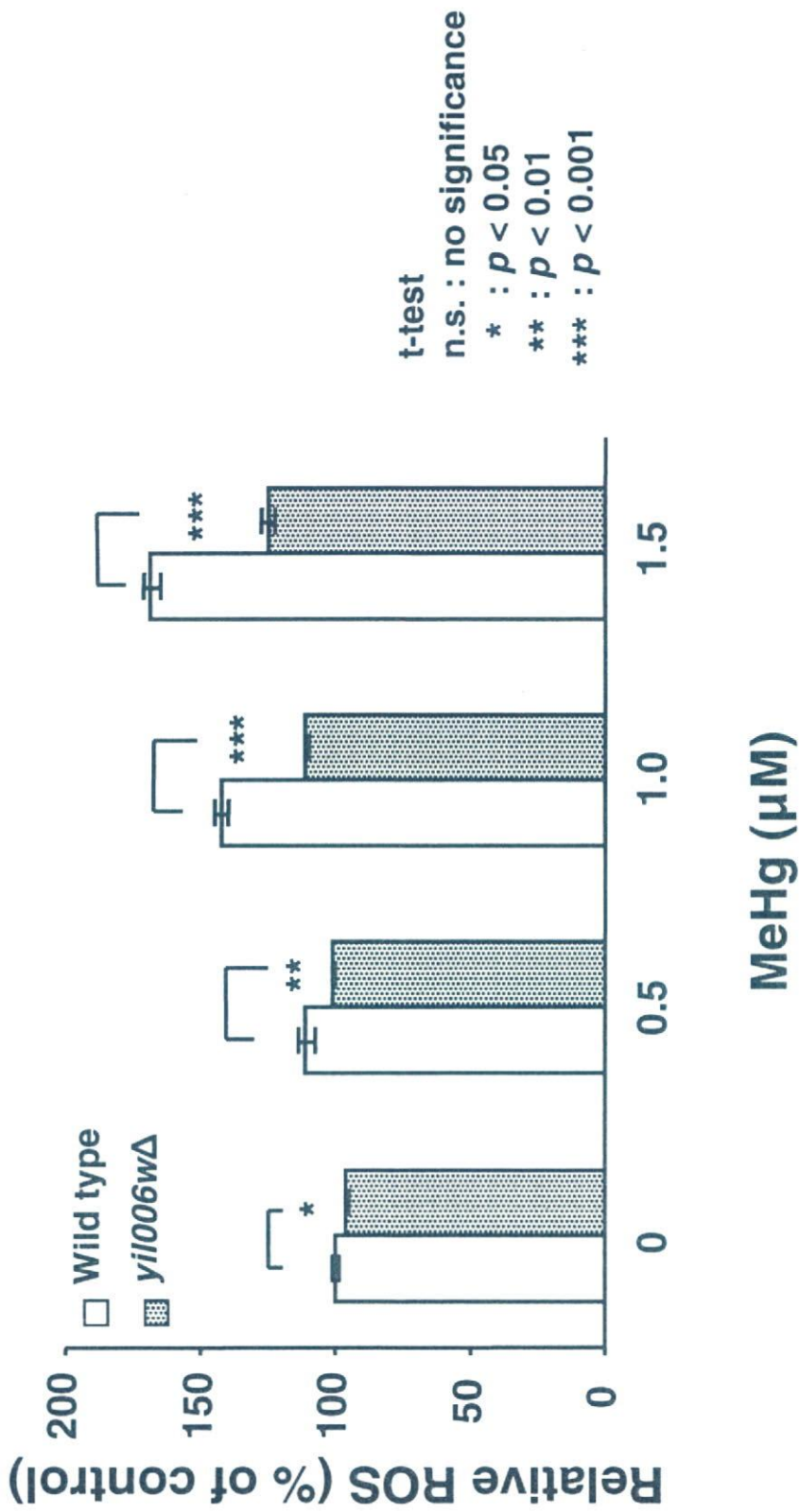


Figure 19. メチル水銀が細胞中の活性酸素種 (ROS) のレベルに与える影響

1×10^7 cells/mL の酵母を H_2DCFDA $5 \mu\text{M}$ 処理した後、メチル水銀存在下で、 30°C で 3hr 培養し、蛍光強度 (Em 490, Ex 530) により ROS 量を測定した。

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

PIGB 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

メチル水銀による毒性発現機構の解明を目指し、siRNA 発現ベクターライブラリーを導入したヒト培養細胞を用いてメチル水銀毒性発現に関わるヒト遺伝子の網羅的な検索を行い、同定された遺伝子の産物の作用機構解析を試みた。全ヒト遺伝子の中で、機能の判明している約 8500 種のヒト遺伝子の発現を個々に抑制させることができる siRNA 発現ベクターライブラリーをヒト胎児腎由来の HEK293 細胞に導入し、正常細胞は生存できない濃度のメチル水銀存在下で培養したところ、メチル水銀耐性を示す siRNA 導入細胞を 1 クローン単離することに成功した。そのクローンに導入されている siRNA の塩基配列を解析したところ PIGB 遺伝子の塩基配列であった。PIGB は小胞体膜上に存在し、蛋白質が細胞膜などと結合するために必要な GPI アンカーの合成に関与している。したがって、GPI アンカーの合成が何らかの機構によってメチル水銀毒性発現に関与しているものと考えられる。

メチル水銀毒性における GPI アンカーの役割は全く不明である。そこで、まず、遺伝学的実験操作が容易な出芽酵母を用いてメチル水銀毒性と GPI アンカーとの関係について検討した。出芽酵母において GPI アンカーの合成に関与している因子をそれぞれ欠損させた酵母のメチル水銀感受性を検討したところ、dihydrosphingosine (DHS) から GPI アンカーの構成成分の 1 つであるセラミドを合成する因子である Lag1 を欠損させた酵母が野性型酵母に比べて強いメチル水銀耐性を示した。GPI アンカーは小胞体膜上で蛋白質と結合することによって GPI アンカー結合型蛋白質の輸送に関わっているが、Lag1 はセラミドの合成を介して GPI アンカー結合型蛋白質の輸送を促進させることが知られている。したがって、Lag1 欠損酵母ではセラミドの合成が抑制されるために GPI アンカーの合成が減少し、そのためメチル水銀毒性が軽減された可能性が考えられる。また、セラミドの前駆体である DHS はストレスに対する防御や細胞の増殖など様々なシグナルに関与するのに対し、セラミドは細胞周期の停止やア

ポトーシスを誘導することが知られている。そこで、次に、両スフィンゴ脂質とメチル水銀毒性との関係について検討した。種々の細胞をそれぞれ DHS で処理した際には、いずれの細胞種においてもメチル水銀感受性に対する影響は認められなかった。しかし、細胞毒性を示さない濃度のセラミドで処理したところ、SH-Y5Y 細胞、HeLa 細胞および PC12 細胞でメチル水銀毒性の増強が観察された。なお、HEK293 細胞ではセラミドのこのような作用は認められなかった。これらのことから、メチル水銀の毒性発現に DHS は関与せず、細胞種による違いはあるものの DHS の代謝物であるセラミドが何らかの役割を果たしている可能性が考えられる。

細胞内のセラミドレベルは様々なストレスにより増加することが知られている。そこで、細胞内のセラミドレベルの簡易的な指標となる DKK1 mRNA の発現レベルに与えるメチル水銀の影響を調べたところ、SH-SY5Y 細胞および HeLa 細胞をメチル水銀で処理することにより、DKK1 mRNA レベルの有意な増加が認められた。これらのことから、少なくとも両細胞種では、メチル水銀処理により細胞内のセラミドレベルが増加することによってメチル水銀毒性が増強されている可能性が考えられる。

これまでに、メチル水銀毒性発現に GPI アンカーの合成およびセラミドの産生が関わるとの報告はなく、本知見はメチル水銀による毒性発現機構解明に重要な手がかりを提供するものである。今後、メチル水銀毒性における GPI アンカーとセラミドとの関わりを検討することによって、メチル水銀毒性発現機構が明らかになるものと期待される。

A. 研究目的

近年、2 本鎖 RNA を細胞内に導入することにより標的遺伝子の発現を抑制する RNA 干渉法と呼ばれる技術が確立され、遺伝子発現抑制方法として広く用いられている。導入された 2 本鎖 RNA は dicer と呼ばれる RNase III ファミリーに属する酵素によるプロセッシングを受け、siRNA (small interfering RNA) と呼ばれる 21-23

塩基の短い 2 本鎖 RNA を形成する。この siRNA が RISC (RNA-induced silencing complex) と呼ばれる siRNA・リボヌクレアーゼ複合体を形成し、siRNA 配列に対し相補的な配列を持つ mRNA を認識し、分解することで標的遺伝子の発現を抑制する。このような現象を利用して、多数のヒト遺伝子の発現を個々に抑制するように設計された siRNA プラスミドのプ

ールを siRNA 発現ベクターライブラリーという。

本研究では、メチル水銀による毒性発現機構の解明を目指して、siRNA 発現ベクターライブラリーを導入した培養細胞を用いてメチル水銀毒性発現に関わるヒト遺伝子の網羅的な検索を行い、PIGB のノックダウンがヒト由来 HEK293 細胞をメチル水銀耐性にすることが判明したことから、PIGB とメチル水銀毒性との関係を検討した。

B. 実験方法

1. 細胞培養

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. HEK293 細胞への siRNA ライブラリーウイルスの導入

HEK293 細胞を 2×10^6 cells となるように 10 cm plate に細胞を播き、37 °C、5 % CO₂ 存在下で 24 時間培養後、ウイルス液を含む 8.5×10^4 pfu/600 µl D'MEM/3%FBS を plate に添加し、ウイルスを細胞全体へ行き渡らす操作

を 10 分おき 1 時間行い、polybrene を含む D'MEM/3%FBS 培地 4.4 ml/plate を添加し(6 µg/ml)、37 °C、5 % CO₂ 存在下で 12 時間培養した。培養後、新しい D'MEM/3 %FBS に交換して 37 °C、5 % CO₂ 存在下で 60 時間培養した。siRNA 発現ベクターライブラリーには puromycin 耐性遺伝子が含まれているため、ライブラリーの導入は 2 µg/ml の puromycin で処理することにより確認した。

3. 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

Fig.1 に示すように、 5×10^5 cells/1.8 mL の siRNA 導入細胞を 6 well plate にまいた後、24 時間後に通常の HEK293 細胞では生存できない条件である塩化メチル水銀 180 µM を 6 well plate に 0.2 mL ずつ分注した(final: 18 µM となる)。48 時間処理した後、塩化メチル水銀を含まない通常の培地に戻し回復培養を行った後、再度塩化メチル水銀 18 µM 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ションを行った。

4. 耐性試験

2×10^4 cells/90 µL/well となるように細胞を 96 well plate にまいた後、24 時

間後に 0、50、100、150、200、250、300 μM にそれぞれ希釈した塩化メチル水銀を 96 well plate に 10 μL ずつ分注した (final : 0、5、10、15、20、25、30 μM となる)。処理後 24、48 時間に塩化メチル水銀を含む培地から Alama blue 10 μL を含む培地 100 μL に交換し、37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 存在下で 3 時間培養した後、蛍光マイクロプレートリーダーで蛍光を測定した (excitation, 544 nm; emission, 590 nm)。

5. RNA の単離

5×10^6 個の細胞に ISOGEN 1 mL を加えて懸濁した後、0.2 mL chloroform を加え、激しく攪拌した後、12000 $\times g$ で 15 分間遠心した。得られた水層に 0.5 mL isopropanol を加え静置した後、12000 $\times g$ で 10 分間遠心した。得られた沈殿を 70% ethanol によりリンスし、7500 $\times g$ で 15 分間遠心した後、上清を取り除き、乾燥後、TE に溶解し RNA 溶液を得た。

6. 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 μL) 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。

7. 導入 siRNA 配列の確認

得られた cDNA を siRNA を含む配列を増幅するようなプライマーを用いて PCR 法により siRNA を含む配列を増幅した。反応後、PCR 産物をアガロース電気泳動後、目的サイズの DNA 断片をゲルより切り出し、GeneClean II kit を用いて精製し、pGEM-T Easy vector に DNA kit ligation ver 2.1. を用いて導入した。Competent cell 溶液 50 μL にプラスミド溶液を加え、氷上に 30 min 静置した後、42 $^{\circ}\text{C}$ で 45 sec の熱ショックをかけ、さらに氷上に 2 min 静置した後、ampicillin sodium salt 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を含む LB 寒天培地に塗布し、37 $^{\circ}\text{C}$ で一晩培養した。形成されたコロニーを ampicillin sodium salt 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を含む LB 培地 2 mL で一晩振盪培養した後、GenEluteTM Plasmid Miniprep Kit を用いて大腸菌よりプラスミドを回収した。siRNA 塩基配列は Agentcourt CleanSEQ を用いたシーケンス解析により確認した。

8. siRNA 発現ベクターの作製

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 DNA polynucleotide kinase を用いてリン酸化させた。リン酸化させた二本鎖 siRNA をヒト発現ベクターである pFIV-H1 に DNA ligation kit ver 2.1. を用いて導入した。得られたプラスミドを大腸菌に導入し、大腸菌から plasmid miniprep kit を用いてプラスミドを回収した。大腸菌へのプラスミドの導入および大腸菌からのプラスミドの回収は上記 5 で示す方法で行った。

9. siRNA 発現ベクターの導入

Lipofectamine 2000 5 μ L を OPTIMEM 125 μ L に滴下し、5 分後に siRNA 発現ベクター 1 μ g と OPTIMEM 125 μ L とを混合させたものを滴下し、20 分静置した後、24 時間前にあらかじめ 5×10^5 cells/2 mL/well となるように細胞を 6 well plate にまいておいたものに滴下した。siRNA 発現ベクター導入細胞は、2 μ g/mL の puromycin で処理することにより、siRNA 安定発現細胞とした。

10. 定量 PCR

cDNA 2 μ L (20 ng) に対し、SYBR Permixon Ex Taq 10 μ L、forward primer 4 μ M、reverse primer 4 μ M、MilliQ 7.2 μ L となるように反応溶液を調製し、定量 PCR 法を行った。用いたプライマー、

PCR 反応条件は以下に示した。定量 PCR 法は iCycler iQ Detection System で行い、経時的に蛍光の変化の検出を行った。mRNA 量は内標準対照遺伝子として一般的に発現量が一定であると考えられている GAPDH mRNA を用いて標準化した。

11. スフィンゴ脂質で処理したヒト培養細胞の耐性試験

2×10^4 cells/80 μ L/well (HEK293 細胞、PC12 細胞)、 5×10^4 cells/80 μ L/well (SH-SY5Y 細胞)、および 1×10^4 cells/80 μ L/well (HeLa 細胞)となるように細胞を 96 well plate にまいた後、24 時間後に 0、50、100、150、200、250、300 μ M (HEK293 細胞、HeLa 細胞)および 0、20、40、60、80、100、120 μ M (SH-SY5Y 細胞、PC12 細胞)にそれぞれ希釈した塩化メチル水銀を 96 well plate に 10 μ L ずつ分注した。メチル水銀処理と同時に 0、100、200、400 μ M に希釈した dihydrosphingosine または 0、100、200、300 μ M (HEK293 細胞、HeLa 細胞、PC12 細胞)、0、500、750 μ M (SH-SY5Y 細胞)にそれぞれ希釈したセラミドを 10 μ L ずつ分注した。処理後 48 時間に塩化メチル水銀を含む培地から alama blue 10 μ L を含む培地 100 μ L に交換し、37、5% CO₂ 存在

下で3時間培養した後、蛍光マイクロプレートリーダーで蛍光を測定した (excitation, 544 nm; emission, 590 nm)。

1.2. DKK1 mRNA レベルの測定

1×10^6 cells/1.8 mL/well となるように細胞を6 well plate にまいた後、24時間後に0、150、300 μ M セラミド (final: 0、15、30 μ M) (HEK293 細胞、SH-SY5Y 細胞) 0.2 mL を添加し48時間培養後 RNA を抽出した。また0、300 μ M 塩化メチル水銀 (final: 0、30 μ M) (HEK293 細胞)、0、50、100 μ M 塩化メチル水銀 (final: 0、5、10 μ M) (SH-SY5Y 細胞)、0、100、200、300 μ M 塩化メチル水銀 (final: 0、10、20、30 μ M) (HeLa 細胞) 0.2 mL を添加し6時間培養後 RNA を抽出した。その後、DKK1 mRNA レベルを定量 PCR 法により確認した。RNA の抽出および定量 PCR 法は上述した実験方法と同様に行い、mRNA 量は内標準物質として GAPDH を用いて標準化した。

1.3. メチル水銀処理時のセラミド産生酵素をコードする遺伝子の mRNA レベルの測定

1×10^6 cells/1.8 mL/well となるように細胞を6 well plate にまいた後、24時間後に0、150、300 μ M 塩化メチル水

銀 (final: 0、15、30 μ M) (HEK293 細胞、HeLa 細胞)、0、100、200 μ M 塩化メチル水銀 (final: 0、10、20 μ M) (SH-SY5Y 細胞) 0.2 mL を添加し2時間培養後 RNA を抽出した。その後、ヒト培養細胞においてセラミド産生に関わる因子である LASS1、LASS2、SMPD1 および SMPD2 の mRNA レベルを定量 PCR 法により確認した。RNA の抽出および定量 PCR 法は上述した実験方法と同様に行い、mRNA 量は内標準物質として GAPDH を用いて標準化した。

(倫理面への配慮)

本研究では動物等は使用せず、生物として酵母およびヒト培養細胞のみを用いる。したがって、倫理面への配慮を必要としない。

C. 結果・考察

1. メチル水銀毒性に関わる遺伝子の検索

ヒト遺伝子は約3万種存在することが知られているが、その中で機能の判明している約8500種のヒト遺伝子の発現を抑制させることができる siRNA 発現ベクターライブラリーをヒト胎児腎由来の HEK293 細胞に導入した。そしてこの siRNA 導入細胞中からメチル水銀に対して耐性を示す細胞を次のように検索した(Fig.1)。まず、

正常細胞は生存できないメチル水銀 18 μ M、48 時間という条件で siRNA 導入細胞を処理し、この条件下でも生存可能な細胞を回復培養した後、再びメチル水銀(18 μ M)で 48 時間処理し、生育してきた細胞をメチル水銀耐性の siRNA 導入細胞とした。ここで得られた細胞は、siRNA 導入により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濃度のメチル水銀条件下においても生存可能になったと考えられる。したがって、この細胞中で発現が抑制されている遺伝子がメチル水銀の毒性発現に関わる因子であると考えられる。そこで本研究ではメチル水銀耐性を示す siRNA 導入細胞が 1 クローン得られたので、そのクローン(No.36)から全 RNA を単離し、逆転写反応により cDNA を得た後に、それを template として siRNA 配列の上流を認識する primer を用いたシーケンス解析により導入されている siRNA の塩基配列を解析した。その結果、本クローンには GCTTGAAATTAGGAAAGCGCTTAT TTC という塩基配列が siRNA 配列として挿入されており、これは phosphatidylinositol glycan class B (PIGB) の 1519-1555 までの塩基配列であった(Fig.2)。しかし、自然耐性および突然変異などによって細胞がメチル水銀耐性を獲得した可能性や、導入

されていた siRNA 配列が PIGB 以外の遺伝子の発現を抑制することでメチル水銀耐性を獲得した可能性も考えられることから、スクリーニングにより得られた塩基配列と同じ siRNA の塩基配列およびそれとは異なる siRNA の塩基配列(1159-1167)を挿入した発現ベクターをそれぞれ HEK293 細胞に再導入しメチル水銀感受性を検討した。その結果、いずれの PIGB の siRNA を導入した細胞も対照細胞と比べメチル水銀に対して耐性を示し、さらに、これら細胞中で PIGB の発現が siRNA 導入により約 50 %程度減少していることが定量 PCR 法により確認された(Fig.3)。これらのことから、PIGB の発現抑制が HEK293 細胞に強いメチル水銀耐性を与えることが明らかとなった。

PIGB は小胞体膜上で蛋白質が細胞膜などと結合するために必要な glycosylphosphatidylinositol (GPI) アンカーの合成に関与している。GPI アンカーの合成機構(Fig.4)は、①小胞体膜上にあるホスファチジルイノシトール・セラミドにグルコサミンが結合し、そこにマンノースとエタノールアミンリン酸が結合する。②PIGB などの因子の作用によって、さらに 2 つのマンノースが結合した後、エタノールアミンリン酸がマンノースの先に結合することで GPI アンカーが完成する。

③翻訳が完了した蛋白質の一部が GPI アンカーのエタノールアミンリン酸のアミド基に結合して GPI アンカー結合型蛋白質となる。PIGB と同様に GPI アンカーの合成に関わる因子として phosphatidylinositol glycan class V (PIGV) が存在することから、PIGV の siRNA(1079-1097)を導入した細胞を複製し、メチル水銀感受性を検討した。その結果、PIGV siRNA 導入細胞は PIGB siRNA 導入細胞と同様にメチル水銀耐性を示した(Fig.5)。この細胞での PIGV の発現は siRNA 導入により 40%程度減少していることが定量 PCR 法により確認された。以上のことから、GPI アンカーの合成は何らかの機構によってメチル水銀毒性発現に関与しており、siRNA によってその発現を抑制することで細胞はメチル水銀耐性を獲得するものと考えられる。

2. メチル水銀毒性と GPI アンカーとの関係

2-1.GPI アンカーの合成に関わる遺伝子の欠損が酵母のメチル水銀感受性に与える影響

前章の検討において、PIGB や PIGV の siRNA 導入による GPI アンカーの合成抑制がヒト培養細胞にメチル水銀耐性を与えることを見出した。そこ

で、出芽酵母を用いてメチル水銀毒性発現における GPI アンカーの役割について検討した。PIGB の酵母ホモログである Gpi10 はヒトと同様に GPI アンカーの合成に関わっているが、その欠損によって酵母は生存不能になることが知られている。酵母においては、GPI アンカーの合成に関わる Gpi10 以外の因子も、Lag1 (Longevity Assurance Gene 1) および Lac1 (Longevity Assurance Gene Cognate 1) を除いて、すべてが酵母の生存に必須であることが知られている。Lag1 および Lac1 はいずれも DHS (dihydrospingosine) から GPI アンカーの構成成分の一つであるセラミド(N-acylsphingosine)を合成する因子である。Lag1 および Lac1 をそれぞれ欠損させた酵母のメチル水銀感受性を検討したところ、Lag1 欠損酵母は野性型酵母に比べて強いメチル水銀耐性を示したのに対し、Lac1 欠損酵母は野性型酵母と同程度のメチル水銀感受性を示した(Fig.6)。GPI アンカーは小胞体膜上で蛋白質と結合することによって GPI アンカー結合型蛋白質の輸送に関わっているが、Lag1 はセラミドの合成を介して GPI アンカー結合型蛋白質の輸送を促進させることが知られている。したがって、Lag1 欠損酵母ではセラミドの合成が抑制されるために GPI アンカーの合成が減少し、そのためメチル水銀

毒性が軽減された可能性が考えられる。また、Lag1 と同じくセラミドの合成に関わる Lac1 は欠損による影響が見られなかったが、Lag1 はセラミドの合成において Lac1 よりも大きな働きを担っていることが知られており、このため Lac1 欠損は酵母のメチル水銀感受性に影響を与えなかった可能性が考えられる。

2-2. スフィンゴ脂質処理がヒト培養細胞のメチル水銀感受性に与える影響

DHS からセラミドを合成する因子である Lag1 を欠損させた酵母は野生型酵母と比べて強いメチル水銀耐性を示した。セラミドの前駆体である DHS はストレスに対する防御や細胞の増殖など様々なシグナルに関与するのに対し、セラミドは細胞周期の停止やアポトーシスを誘導することが知られている。そこで、両スフィンゴ脂質とメチル水銀毒性との関係について検討した。まず、ヒト由来の HEK293 細胞、SH-SY5Y 細胞、HeLa 細胞およびラット由来の PC12 細胞をそれぞれセラミドの前駆体である DHS で処理したところ、いずれの細胞においても細胞毒性を示さない濃度の DHS 処理ではメチル水銀感受性に対する影響は認められなかった(Fig.7)。一方、細

胞毒性を示さない濃度のセラミド処理は SH-SY5Y 細胞、HeLa 細胞および PC12 細胞が示すメチル水銀毒性を増強させた(Fig.8)。HEK293 細胞はほかの細胞種と比べてセラミドに対する感受性が高く、また、セラミド処理によるメチル水銀感受性の変動もほとんど認められなかった。これらのことから、メチル水銀の毒性発現に DHS は関与せず、細胞種による違いはあるものの DHS の代謝物であるセラミドが何らかの役割を果たしている可能性が考えられる。

2-3. メチル水銀処理が DKK1 mRNA レベルに与える影響

細胞内のセラミドレベルは heat shock や紫外線照射などにより増加されることが知られており、メチル水銀処理でも細胞内のセラミドレベルの増加が起こり、それによってメチル水銀毒性が増強される可能性が考えられる。そこで、細胞内のセラミドレベルの簡易的な指標となる DKK1(dickkopf homolog 1) mRNA の発現レベルに与えるメチル水銀の影響を調べた。DKK1 mRNA は細胞内セラミドレベルの増加によって、その発現レベルが上昇することが知られている。セラミドによるメチル水銀毒性増強作用が認められなかった HEK293 細胞の場合

は、セラミド処理によって DKK1 mRNA レベルは変動しなかったが、神経腫細胞である SH-SY5Y 細胞をセラミドで処理することにより DKK1 mRNA レベルは有意に増加した(Fig.9)。次に、メチル水銀が DKK1 mRNA レベルに及ぼす影響について調べたところ、HEK293 細胞ではセラミド処理時と同様にメチル水銀処理による DKK1 mRNA レベルの変動は認められなかったものの、SH-SY5Y 細胞および HeLa 細胞では有意な DKK1 mRNA レベルの増加が認められた(Fig.10)。これらのことから、SH-SY5Y 細胞および HeLa 細胞では、メチル水銀処理により細胞内のセラミドレベルが増加することによってメチル水銀毒性が増強されている可能性が考えられる。なお、HEK293 細胞ではセラミド処理によるメチル水銀毒性の増強作用や、メチル水銀処理による DKK1 mRNA レベルの増加が認められなかったが、HEK293 細胞は他のヒト培養細胞と比べセラミドの basal レベルが高いのかもしれない。

2-4. メチル水銀処理がセラミド産生酵素をコードする遺伝子の mRNA レベルに与える影響

上記の検討により、メチル水銀処理によって細胞内のセラミドレベルが

増加する可能性が示唆された。ヒト培養細胞におけるセラミド合成には、LASS1 や LASS2 などの因子を介してセリンとパルミトイル CoA から合成される経路と、SMPD1 や SMPD2 などの因子を介したスフィンゴミエリンの分解による経路が存在する。そこで、メチル水銀処理がこれらセラミド産生に関わる因子の発現に対する影響を調べたところ、メチル水銀処理によって HEK293 細胞の LASS1 mRNA および SMPD1 mRNA レベルは増加したのに対し、LASS2 mRNA および SMPD2 mRNA レベルは変動しなかった(Fig.11)。また、SH-SY5Y 細胞ではメチル水銀処理によって LASS1 mRNA レベルが増加し(Fig.12)、HeLa 細胞では LASS1 および SMPD1 の mRNA レベルが増加した(Fig.13)。このことから、メチル水銀処理によって LASS1 や SMPD1 の発現が誘導され、細胞内のセラミドレベルを増加させている可能性が考えられる。Fig.9 の結果では、セラミドレベルの増加によってその発現レベルが上昇する DKK1 mRNA のレベルが HEK293 細胞ではメチル水銀による影響を受けなかったが、HEK293 細胞ではセラミドの代謝回転がほかの細胞種に比べて早いなどの理由でセラミドレベルが変動しにくい可能性も考えられる。現在、他のヒト培養細胞においても同様にメ

チル水銀処理がセラミド産生酵素をコードする遺伝子の mRNA レベルに与える影響について検討中である。

D. 研究発表

1. 論文発表

なし。

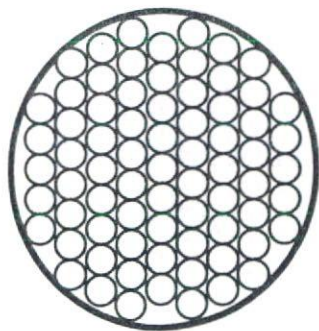
2. 学会発表

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.

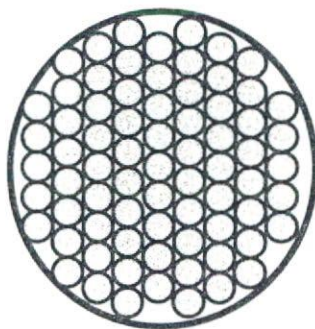
E. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

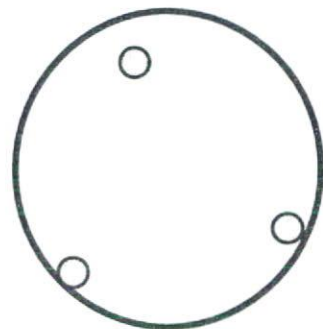


HEK293細胞

↑
siRNA
発現ベクター
ライブラリー
(約8500種)



↑
MeHg
18 μM



↓
クローン化
毒性試験



↓
siRNA塩基配列
の解析

メチル水銀毒性発現に
関わる因子

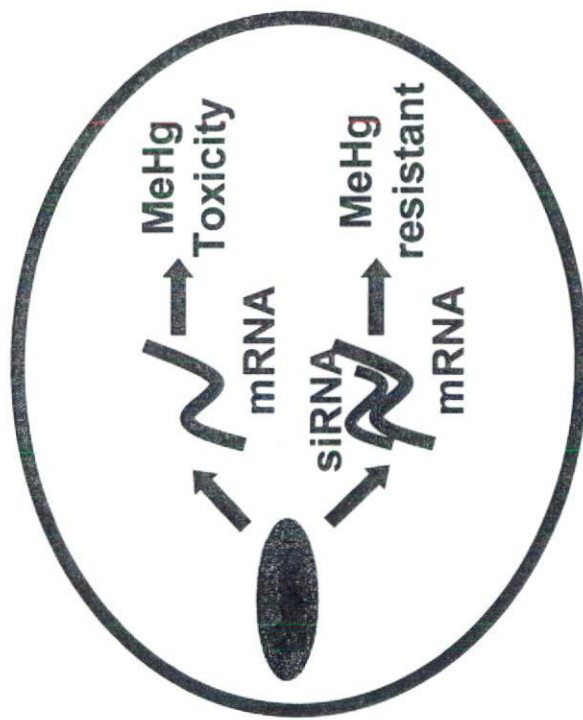


Fig.1 siRNAライブラリーを用いたメチル水銀毒性に関わる因子の検索方法

5×10⁵ cells/1.8 mL のsiRNA導入細胞を6 well plateにまいた後、24 時間後に塩化メチル水銀18μMで処理した。48 時間処理した後、塩化メチル水銀を含まない通常の培地に戻し回復培養を行った後、再度塩化メチル水銀18 μM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ションを行った。

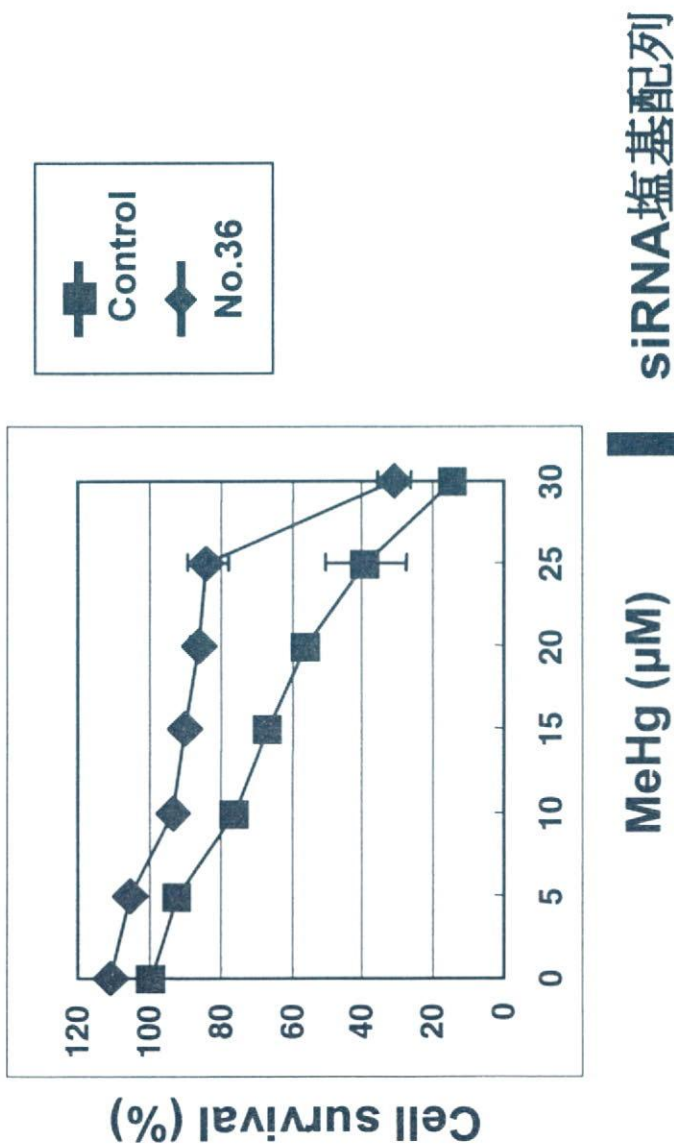


Fig.2 siRNAの導入が細胞のメチル水銀感受性に与える影響

2×10^5 cells/ $90 \mu\text{L}$ の細胞を96 well plateにまいた後、24 時間後に塩化メチル水銀で処理した。48 時間処理した後、alama blue を含む培地に交換し、 37°C 、5% CO_2 存在下で3 時間培養した後、蛍光マイクロプレートリーダーによる蛍光測定(excitation, 544 nm; emission, 590 nm)により細胞生存率を求めた。

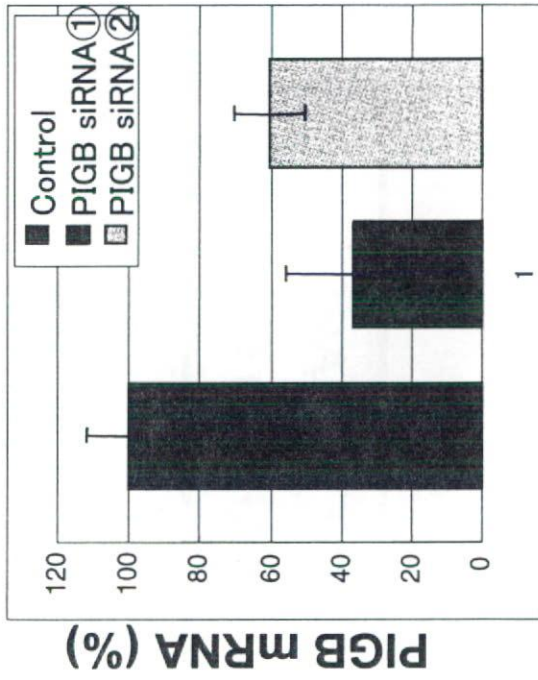
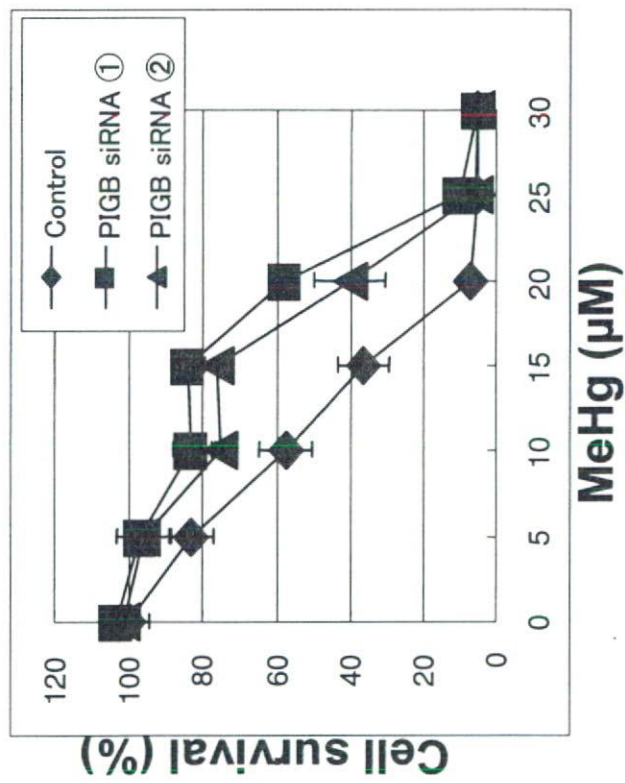
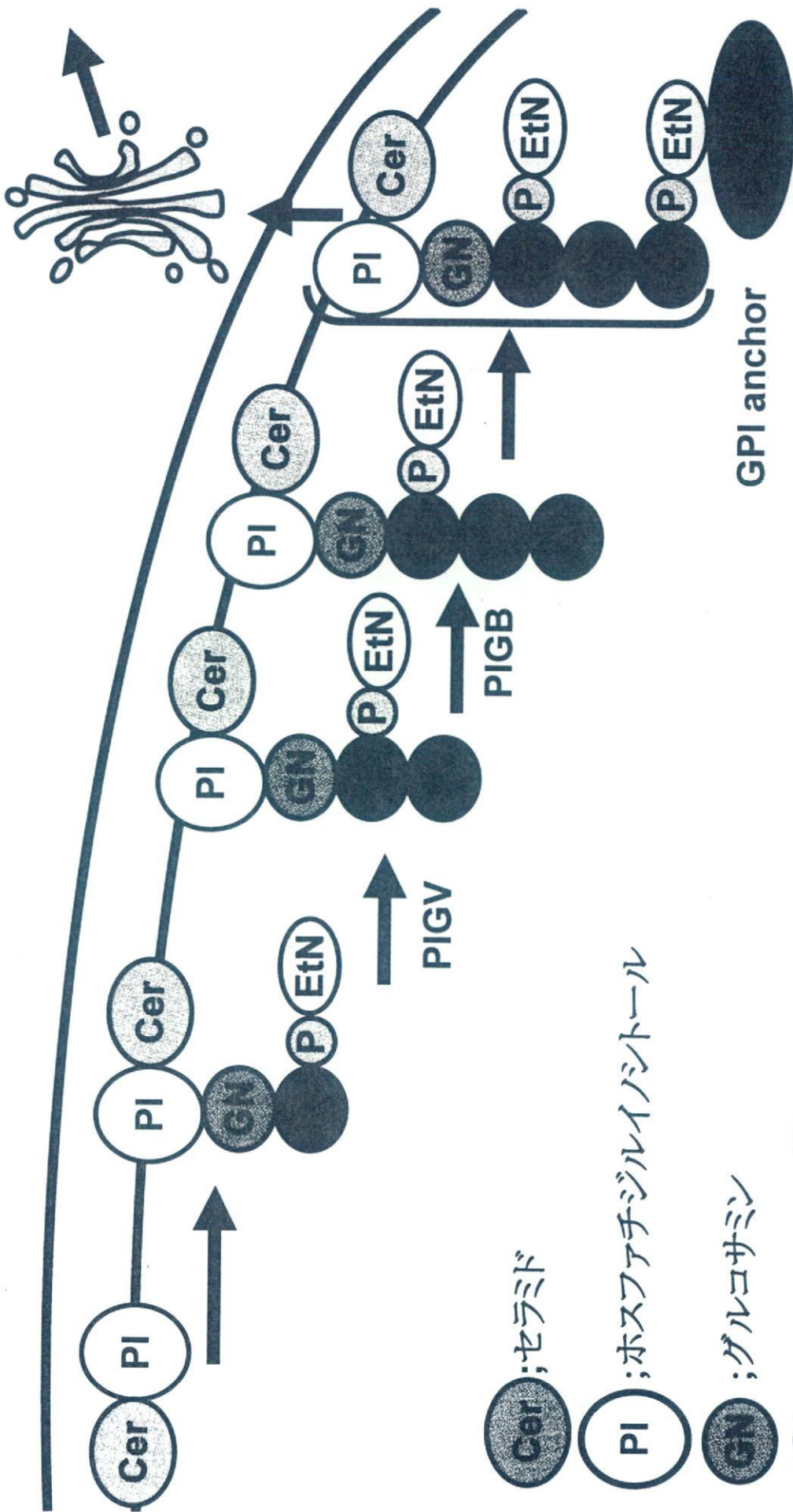


Fig.3 PIGBの発現抑制がHEK293細胞のメチル水銀感受性に与える影響

PIGBの発現を抑制する2種類のsiRNA(siRNA①, siRNA②)を導入した細胞についてFig.2と同様の方法でメチル水銀感受性を検討した。また、それらの細胞から全RNAを単離し、逆転写反応を行い、そのcDNAをtemplateとした定量PCR法により遺伝子発現抑制効果を確認した。(** ; p<0.01)

Golgi apparatus



Endoplasmic reticulum

Cer ; セラミド

PI ; ホスファチジルイノシトール

Glc ; グルコサミン

P ; マンノース EtN ; エタノールアミン

Fig.4 GPI (glycosylphosphatidylinositol)アンカーの合成機構

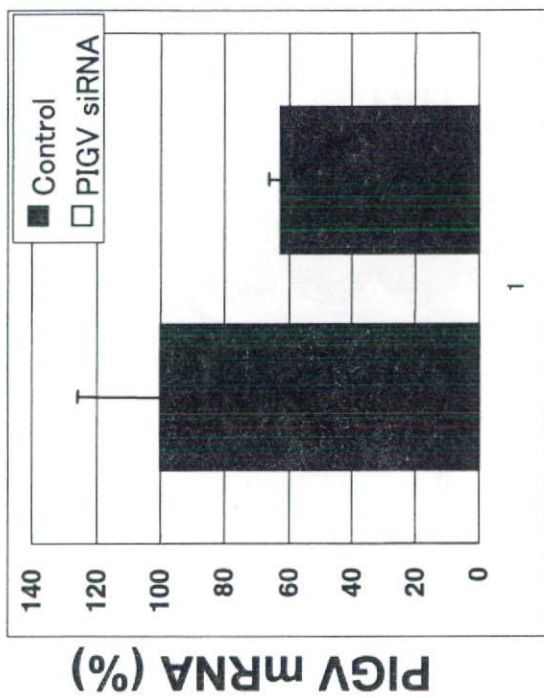
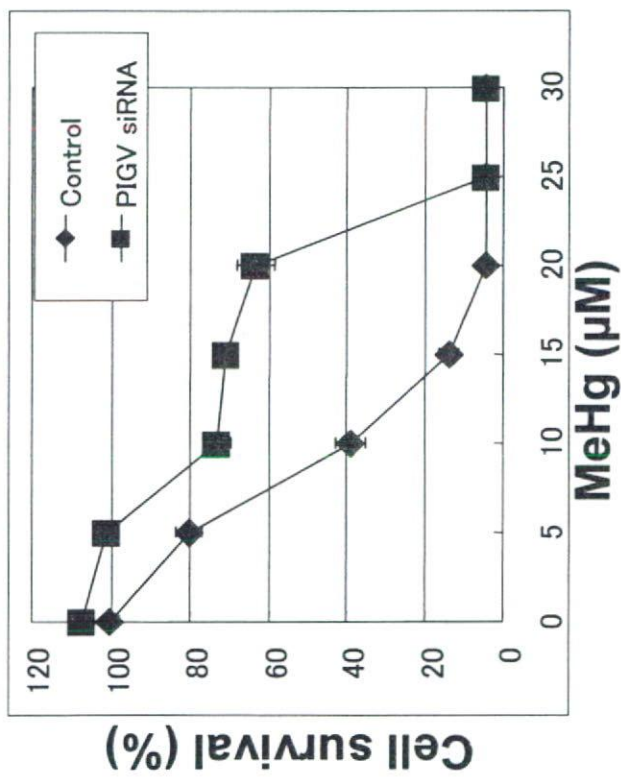


Fig.5 PIGVの発現抑制がHEK293細胞のメチル水銀感受性に与える影響

PIGVの発現を抑制するsiRNAを導入した細胞についてFig.2と同様の方法でメチル水銀感受性を検討した。また、それらの細胞から全RNAを単離し、逆転写反応を行い、そのcDNAをtemplateとした定量PCR法により遺伝子発現抑制効果を確認した。(*; p<0.05)

Yeast

GPIアンカーの合成に関わる因子

Dpm1, Eri1, Gaa1, Gab1, Gpi1, Gpi2, Gpi8, Gpi10, Gpi11, Gpi12, Gpi13, Gpi14, Gpi15, Gpi16, Gpi17, Gpi18, Gpi19, Gwt1, Lac1, Lag1, Mcd4, Pbn1, Smp3, Spt14

(Lag1およびLac1のみ欠損可能。そのほかの因子は増殖に必須)

MeHg (μM)

0 0.2 0.3 0.4 0.5 0.6

Wild type

lac1 Δ

lag1 Δ

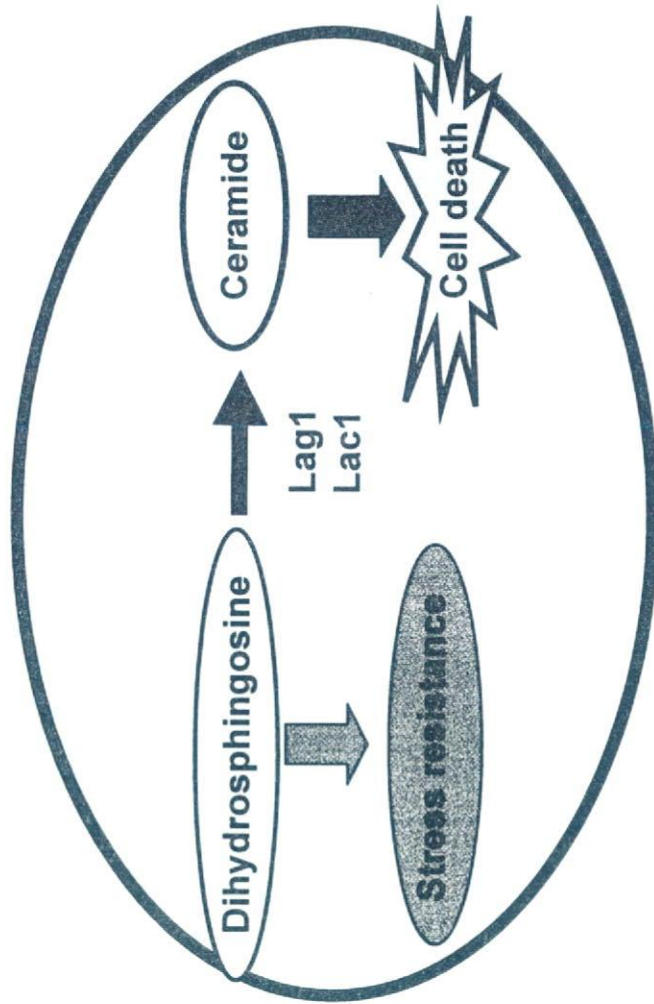
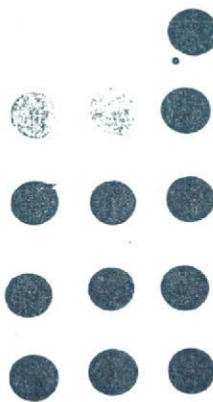
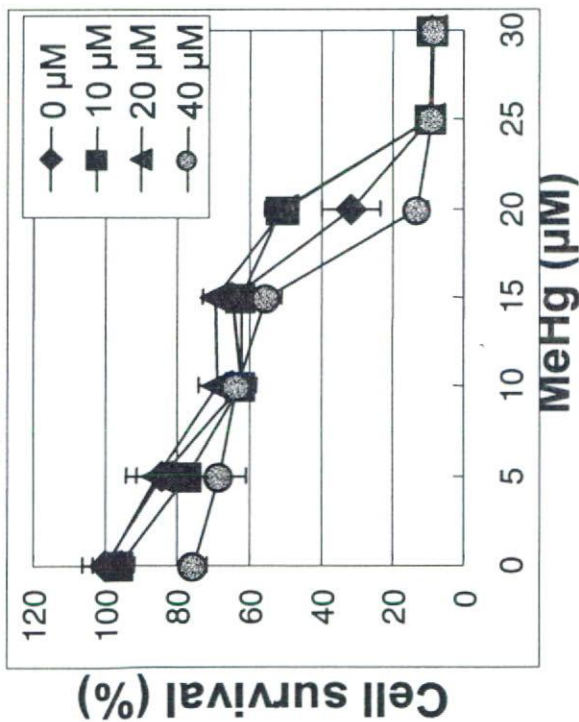


Fig.6 GPIアンカーの合成に関わる因子Lac1またはLag1の欠損が

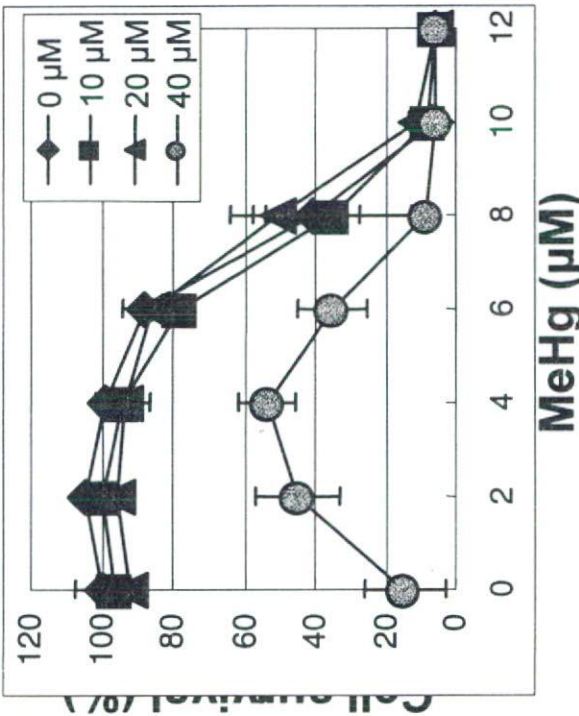
酵母のメチル水銀感受性に与える影響

1×10^6 cells/mLの酵母を0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6 μM の塩化メチル水銀存在下、30°Cで3時間静置培養した後、 5×10^4 cells/spotとなるようにスポットティングして、30°Cで培養後、観察した。

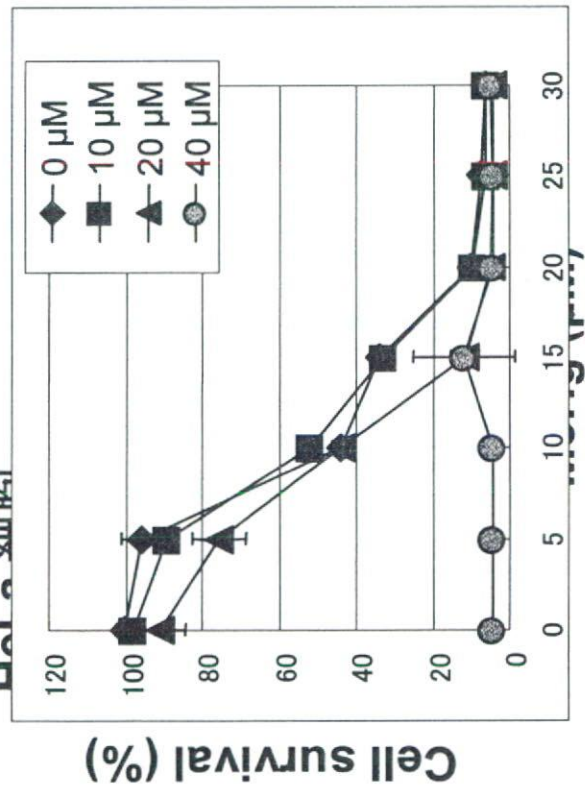
HEK293細胞



SH-SY5Y細胞



HeLa細胞



PC12細胞

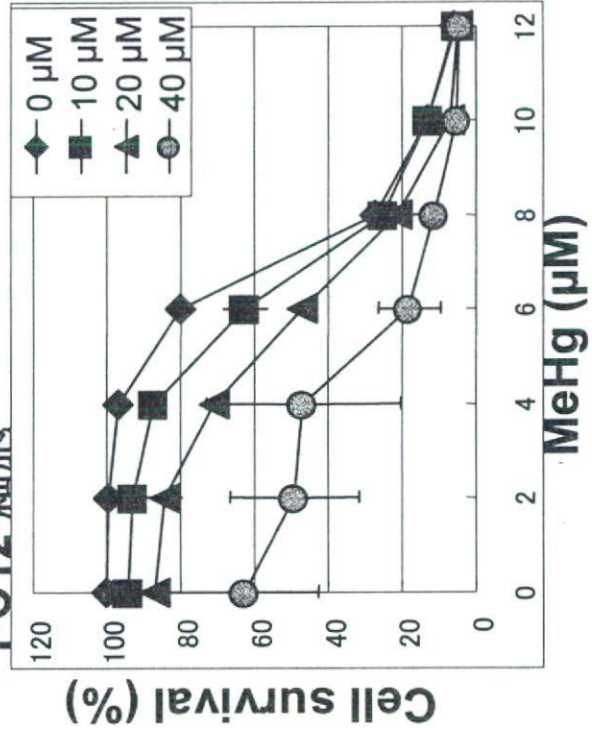


Fig.7 Dihydrospingosine処理が種々の培養細胞のメチル水銀感受性に与える影響

2×10⁴ cells/80 μL/well (HEK293細胞、PC12細胞)、5×10⁴ cells/80 μL/well (SH-SY5Y細胞)、および1×10⁴ cells/80 μL/well (HeLa細胞)となるように細胞を96 well plateにまいた後、24時間後に各濃度の塩化メチル水銀およびdihydrospingosineで処理した。細胞の生存率はFig.2と同様の方法で検討した。