

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

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

分担研究者 黄 基旭 東北大学大学院薬学研究科助教

メチル水銀による毒性発現機構およびそれに対する生体の防御機構の全容解明を目的として、約 50,000 種のヒト遺伝子転写産物を標的とした siRNA ライブラリーを導入したヒト培養細胞 (HEK293) を用いて、メチル水銀感受性に影響を与える遺伝子の網羅的な検索を行った。その結果、発現が抑制されること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 (FLJ13570、SHB、PRKAA1、PRP38、CTD-2299I21、Calmodulin 2、RP11-473N2、GINS4、FRMD6、NDUFA4L2、SIX3、RP11-447L10)、逆に、細胞にメチル水銀耐性を与える遺伝子として 2 種 (RP11-100F10、LANL) を同定することに成功した。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る。

発現抑制により細胞を、メチル水銀高感受性にするのが判明した遺伝子の中に、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 PRKAA1 の遺伝子が含まれていた。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。本研究においても、実際に、5.5 mM のグルコース存在下（低グルコース）では 25 mM のグルコース存在下（高グルコース）に比べて AMPK のリン酸化レベルが著しく高いことが確認された。そこでまず、このグルコース濃度の違いが、PRKAA1 発現抑制細胞のメチル水銀高感受性に与える影響について検討したところ、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った。また、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。このことから、AMPK の触媒サブユニットはアイソフォームによって異なる機能を持ち、メチル水銀毒性に対しては PRKAA1 のみが影響を与えと考えられる。

これまでに、AMPKの活性化に関わるキナーゼとして、LKB1やCaMKK $\alpha$ が報告されている。そこで、これらキナーゼの発現抑制がメチル水銀感受性に与える影響を検討したところ、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。しかし、CaMKK $\alpha$ のsiRNAを細胞に導入した場合には、何れの濃度のグルコース存在下においても対照細胞とほぼ同程度のメチル水銀感受性が認められた。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protein phosphatase 2C (PP2C)も知られている。このPP2Cとメチル水銀毒性との関係を検討したところ、低グルコース存在下では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。また、AMPK活性化剤の添加が高グルコース存在下でのメチル水銀毒性を軽減することも確認された。以上の結果から、LKB1によるAMPKのリン酸化(活性化)はメチル水銀毒性軽減に関与しており、PP2Cはその軽減作用を負に制御しているとも考えられる。エネルギーセンサーとして機能するAMPKがメチル水銀のような環境汚染物質の毒性発現調節に関与するとの報告はこれまでになく、今後、AMPKリン酸化とメチル水銀との関係を詳細に検討することによって、メチル水銀による毒性発現機構およびそれに対する生体の防御機構の一部が明らかになるものと期待される。

## A. 研究目的

我々は既に、siRNAライブラリーを用いてHEK293細胞にメチル水銀耐性を与える遺伝子を検索し、glycosylphosphatidylinositol (GPI) アンカーの合成に関与するPIGBをコードする遺伝子の発現抑制がHEK293細胞にメチル水銀耐性を与えることを見出している。しかし、ここで用いたsiRNAライブラリーは約8,500種のヒト遺伝子のmRNAを標的としているため、ヒト遺伝子の全mRNAを網羅していない。そこで本研究では、メチル

水銀による毒性発現機構とそれに対する生体の防御機構の全容解明を目的として、約50,000種のヒト遺伝子のmRNAをそれぞれ分解するように設計されたsiRNA発現プラスミドのプールであるGeneNet™ siRNAライブラリー(System Biosciences)を用いて、メチル水銀感受性に影響を与える遺伝子の網羅的な検索を行った。

## 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  $\mu$ g/ml streptomycin sulfate および 10 % fetal bovine serum を添加した培地を用いて、37°C、5 % CO<sub>2</sub> 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  $2 \times 10^6$  cells となるように 10 cm plate 5 枚に細胞を播き、37°C、5 % CO<sub>2</sub> 存在下で 24 時間培養後、ウイルス液を含む  $4 \times 10^6$  ifu/600 ml D' MEM / 3% FBS を plate 5 枚に添加し、ウイルスを細胞全体へ行き渡らす操作を 10 分おきに 1 時間行い、polybrene を含む D' MEM / 3% FBS 培地 4.4 ml/plate を添加し(6 mg/ml)、37°C、5 % CO<sub>2</sub> 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 % CO<sub>2</sub> 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 mg/ml の puromycin で処理することにより確認した。

## 3. 塩化メチル水銀処理した HEK293 細胞から総 RNA の抽出

得られた細胞をトリプシンで細胞を

はがし、 $5 \times 10^6$  cells となるように 21 枚の 10 cm plate に播き、37°C、5 % CO<sub>2</sub>、D' MEM / 10% FBS 存在下で 24 時間培養し、培地(D' MEM / 10% FBS)を交換した。そして 100 ml ずつ薬物添加(Control, 塩化メチル水銀 3 mM, MeHg 6 mM 各 7 枚ずつ)し、37°C、5 % CO<sub>2</sub>、D' MEM / 10% FBS 存在下で 48 時間培養後、PBS で洗浄し、TRIzol reagent 1 ml を加えて各薬物添加の種類ごとに細胞を回収した。得られた細胞混合液に 0.2 ml の chloroform を加え、激しく攪拌した後、12000  $\times$  g で 15 min 遠心した。得られた水層に 0.5 ml の isopropanol を加えて静置した後に、12000  $\times$  g で 10 min 遠心した。得られた沈殿を 70 % ethanol によりリンスし、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。

## 4. cDNA の作製

cDNA の作製は Revers transcription Reagent を用いて行った。まず、調整した RNA 5ml に cDNA Synthesis プライマー(10 mM)を 1 ml, 脱イオン水 1 ml を加え、全量を 16 ml に統一し、72°C で 2 min インキュベート後、42°C まで下げた。そして 10  $\times$  first-strand Buffer 2 ml DTT(100 mM) 1 ml, dNTP

mix(10 mM) 1 ml を加え、全量を 20 ml にした。そこへ 1 ml の M-MLV Reverse Transcriptase を加え、42°C で 1 時間 インキュベート後、72°C で 5 min インキュベートし、常温まで冷ました。

#### 5. プローブの作製

得られた cDNA 5 ml と first round PCR Master Mix 95 ml (脱イオン水 77 ml, 10×titanium *Taq* PCR buffer 10 ml, 50×dNTP mix 2 ml, forward PCR primer(10 mM) 2 ml, Reverse PCR primer(10 mM) 2 ml, 50×Titanium *Taq* DNA polymerase 2 ml) を混合し、first round PCR を行った。PCR の条件は、94°C で 2 min 行い、94°C で 30 sec, 68°C で 1 min を 1 サイクルとして 20 サイクル行い、68°C で 3 min のステップ後、15°C を維持した。得られた PCR 産物 1 ml と second round PCR master mix 100 ml (脱イオン水 66 ml, 10×titanium *Taq* PCR buffer 10 ml, 50×dNTP mix 2 ml, nested reverse PCR primer(10 mM) 10 ml, nested reverse PCR primer(10 mM) 10 ml, 50×Titanium *Taq* DNA polymerase 2 ml) を混合し、second round PCR を行った。PCR の条件は、94°C で 30 sec, 50°C で 2 min, 68°C で 1 min を 1 サイクル後、94°C で 30 sec, 68°C で 1 min を 1 サイクルと

して 18 サイクル行い、68°C で 3 min のステップ後、15°C を維持した。得られた PCR 産物は QIAGEN' s QIAquick PCR purification kit を用いて精製した後、260 nm の吸光度値から DNA 濃度を算出した。

#### 6. ハイブリダイゼーション

Affymetrix GeneChip Array にビオチンでマークされた siRNA の PCR 産物 15 mg をハイブリダイスさせた。Affymetrix GeneChip の解析は受託した。

#### 7. siRNA 発現プラスミドの作製

各遺伝子の発現を抑制する siRNA のプライマーを 95°C で 5 分間アニーリングさせ、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 siRNA を pFIV-H1 に ligation ver 2.1. を用いて導入し、得られたプラスミド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。

#### 8. siRNA 発現プラスミドの導入

Microporation (Digital Bio Technology) を用いてエレクトロポレーション法にて行った。HEK293 細胞を

5×10<sup>5</sup> cells/tube になるように 1.5 ml tube にとり、960 ×g, 2 min で遠心し、上清を取り除いた。そして resuspension buffer R 100 ml で懸濁し、siRNA 発現プラスミド 2 mg を添加し、1200 V, 20 m/s, 2 回の条件で導入した。発現プラスミドには puromycin 耐性遺伝子が含まれているため、プラスミドの導入は 2 mg/ml の puromycin で処理することにより確認した。

#### 9. 塩化メチル水銀による毒性試験

2×10<sup>4</sup> cells/90 ml/well となるように HEK293 細胞を 96 well plate に播いた後、24 時間後に各濃度(0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 mM)の塩化メチル水銀で処理した。処理 24 時間後に、塩化メチル水銀を含む培地から Alamablue 10 ml を含む培地に交換し、蛍光プレートリーダーで蛍光を測定した。(excitation, 544 nm; emission, 590 nm)。

#### 10. RNA の単離

5×10<sup>6</sup> cells 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×g で 15 min 遠心した。得られた水層に 0.5 ml isopropanol を加え

て静置した後に、12000×g で 10 min 遠心した。得られた沈殿を 70 % ethanol によりリンスし、乾燥後、TE に溶解し RNA 溶液を得た。

#### 11. 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×M-MLV buffer(2 ml)となるように反応液を調整し、42°C で 15 min 逆転写反応を行った。反応後、酵素を失活させるため、95°C で 2 min 加熱した。

#### 12. 定量 PCR

cDNA 2 ml (20 ng) に対し、SYBR Permixon Ex Taq 10 ml, forward primer 4 mM, reverse primer 4 mM, MiliQ 7.2 ml となるように反応液を調整し、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 hGAPDH mRNA を用いて標準化した。

#### 13. AICAR で処理したヒト培養細胞のメチル水銀毒性試験

グルコース濃度(25 mM, 5.5 mM)を含むDMEM培地で培養したHEK293細胞を $2 \times 10^4$  cells/80  $\mu$ l/wellとなるように96 well plateにまいた後、24時間後に0, 100, 200  $\mu$ Mにそれぞれ希釈したAICARを96 well plateに10  $\mu$ lずつ分注して1時間処理した。その後、0, 50, 100, 150, 200, 250, 300  $\mu$ M(final: 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30  $\mu$ M)にそれぞれ希釈した塩化メチル水銀を96 well plateに10  $\mu$ lずつ分注した。処理後24時間に塩化メチル水銀を含む培地からalama blue 10  $\mu$ lを含む培地100  $\mu$ lに交換し、37°C, 5% CO<sub>2</sub>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 4. メチル水銀が AMPK のリン酸化に与える濃度依存的な変化

$1 \times 10^6$  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, 50, 100  $\mu$ M 塩化メチル水銀 (final: 0, 5, 10  $\mu$ M) 0.2 ml を添加し3時間培養後、蛋白質を抽出した。

#### 1 5. メチル水銀が AMPK のリン酸化に与える経時的な変化

$1 \times 10^6$  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50  $\mu$ M 塩化メチル水銀 (final: 5  $\mu$ M) 0.2 ml を添加し各時間(0, 0.5, 1, 2, 3, 6, 9, 12, 24 hr) 培養後、蛋白質を抽出した。

#### 1 6. 総蛋白質の抽出

Cold-PBS で洗浄した細胞に20% TCAを1 ml 添加して固定し、細胞を1.5 ml tubeへ回収後960×gで5 min 遠心して上清を捨て、12.5% TCAを加えてピペティング後、再度14000×gで5 min 遠心した沈殿物にアセトンで中和を行った。そして960×gで5 min、遠心してアセトンを除去し、lysis Buffer(1% SDS, 45 mM HEPES-Na pH7.5)を約100  $\mu$ lを加えて可溶化して加熱後、14000×gで1min 遠心後、上清をwhole cellとした。DC protein assay kitを用いて総蛋白質量を定量し、蛋白質量が一定となるように滅菌蒸留水と4×sample bufferで希釈し、SDS-PAGE用サンプルとした。

#### 1 7. SDS-PAGE

10%のポリアクリルアミドゲルを用いて20 mA / 1枚、50 mA / A2枚で電気泳動を行った。

## 18. Immunoblotting

SDS-PAGE 後、semi-dry 型 blotting 装置を用いて（条件：60 mA，4 hr）transfe した membrane を blocking solution (5% スキムミルク) に浸して 2 hr 以上 blocking した後に、1 次抗体液 (Anti-AMPK $\alpha$ 1: 500 倍、他: 1000 倍希釈) に浸し約半日間振盪した。TBS で 3 回、15 min 振盪して wash した後に、HRP 標識化 2 次抗体液 (5000 倍希釈) に浸し 1 hr 振盪した。TBS で 3 回、TTBS で 1 回、それぞれ 15 min 振盪して wash した後に、Immobilon Western を用いて化学発光させ、Versa Doc Model 5000 (Bio-rad) により検出した。

### (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. 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を与える遺伝子の検索

発現が抑制されることによって HEK293 細胞に高いメチル水銀感受性を与える遺伝子群を網羅的に検索するため、Figure 1 に示す方法により、

約 50,000 種のヒト遺伝子の mRNA をそれぞれ分解するように設計された siRNA 発現プラスミドのプールである GeneNet™ siRNA ライブラリー (System Biosciences) をレンチウイルスを利用して HEK293 細胞中に導入した。siRNA ライブラリー導入細胞を正常細胞の増殖が 10% 程度抑制される濃度のメチル水銀 (final 3 mM) で処理し、生き残った細胞を回収して total RNA を抽出し、得られた total RNA を逆転写後、siRNA 配列の sense 鎖を特異的に認識する primer を用いて増幅した PCR 産物を Gene Chip にハイブリダイズさせ、DNA マイクロアレイ解析を行った。DNA マイクロアレイ解析の結果は、siRNA 配列を特異的に認識して増幅した各プローブのシグナル強度、すなわち、各 siRNA が導入された細胞の存在割合を示すと考えられる。siRNA ライブラリー導入細胞を 3 mM のメチル水銀で処理したところ (Figure 2)、各 siRNA 由来のシグナルの割合 (メチル水銀処理した細胞群のシグナル強度 / コントロール細胞群のシグナル強度) はほとんど対角上に存在したが、HEK293 細胞に高いメチル水銀感受性を与えると予想される siRNA 由来のシグナルが Figure 2 に示した分布図の右下領域に散見された。そこで、メチル水銀未処理のコントロールに比べ 3 mM のメチル水銀で処理した際に、

siRNA 導入細胞の存在割合を示すシグナル強度が減少(右下領域に存在)した siRNA の中でその減少程度が特に高い上位 25 種の siRNA を選択した。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 細胞にメチル水銀高感受性を与える遺伝子と考えられる (Table 1)。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 の塩基配列を挿入した発現ベクター、または、別途合成した dsRNA 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、25 種のうち 12 種 (FLJ13570、SHB、PRKAA1、PRP38、CTD-2299I2、Calmodulin 2、RP11-473N2、GINS4、FRMD6、NDUFA4L2、SIX3、RP11-447L10) 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 3-1~3-6)。特に、12 種の siRNA 導入細胞の中、PRKAA1、RP11-473N2、SHB または CTD-2299I21 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。これら遺伝子の中には機能未知の遺伝子も多く含まれているものの、phospholipase C g1 を介した細胞内の Ca<sup>2+</sup>流動に関与する SHB や、細

胞内のエネルギー代謝に関わることが知られる PRKAA1 の発現抑制が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を与える遺伝子群の検索

発現が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群を網羅的に検索するため、siRNA ライブラリー導入細胞を正常細胞の増殖が 50~60%程抑制される濃度のメチル水銀 (final 6 mM) で処理した後に、上記 1 と同様に、DNA マイクロアレイ解析を行った (Figure 4)。HEK293 細胞にメチル水銀耐性を与える siRNA の塩基配列に由来するシグナルは、その強度の割合 (メチル水銀処理した細胞群のシグナル強度 / コントロール細胞群のシグナル強度) が高くなり、Figure 4 に示した分布図の左上領域に現れる。そこで、メチル水銀未処理のコントロールに比べ 6 mM のメチル水銀で処理した際に、siRNA 導入細胞の存在割合を示すシグナル強度が増加 (左上領域に存在) した siRNA の中でその増加割合が特に高い上位 20 種の siRNA を選択した。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 (Table 2)。これら 20 種の遺伝子のうち 6 種の遺伝子の 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 (残りの 14 種については現在検討中である)、RP11-100F10 または LANL に対する siRNA をそれぞれ導入した細胞が対照細胞に比べてメチル水銀耐性を示し、特に RP11-100F10 siRNA 導入細胞が強い耐性を示した (Figures 5-1~5-2)。

### 3. メチル水銀毒性と AMP-activated protein kinase (AMPK) との関係

発現抑制により細胞にメチル水銀高感受性を与える遺伝子と同定されたものの中に、細胞内のエネルギーの制御や代謝の切り替えを行うスイッチとして機能する AMPK (AMP-activated protein kinase) の触媒サブユニットである PRKAA1 の遺伝子が含まれていた。AMPK はキナーゼの活性を有する  $\alpha$  サブユニットとその制御に関わる  $\beta$  および  $\gamma$  サブユニットからなる。そのサブユニットは種ごとに大きく異なっており、ショウジョウバエでは  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  がそれぞれ 1 種類存在するだけであるが、ヒトではそれぞれが 2~3 種類存在し ( $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 $\beta 1$ 、 $\beta 2$ 、 $\gamma 1$ 、 $\gamma 2$ 、 $\gamma 3$ )、12 種類の組み合わせがあることが知

られている。

AMPK は、細胞内 AMP/ATP 比の増加によって活性化されることが知られており、ATP の消費増大や ATP の産生抑制といったストレスによってその活性が上昇する。このストレスには熱刺激、オリゴマイシンなどの代謝阻害剤、低酸素や虚血、低血糖などが含まれる。このように、AMPK は主に細胞内エネルギー代謝の恒常性の維持などに関与しているが、メチル水銀毒性における AMPK の役割は不明である。そこで次に、メチル水銀毒性と AMPK との関係について検討した。

#### 3-1. PRKAA1 が示すメチル水銀高感受性とグルコースとの関係

PRKAA1 (AMPK の  $\alpha$  サブユニット) は AMPK の触媒サブユニットであり、グルコース飢餓などによりそのリン酸化レベルが上昇することが知られている。また、HEK293 細胞の場合、高濃度 (final 25 mM) のグルコース培地での培養では AMPK のリン酸化レベルは低く、低濃度 (final 4 mM) のグルコース培地での培養ではそのレベルが上昇することが知られている。本研究で用いる培地は最終濃度 5.5 mM のグルコースを含んでおり、比較的高いレベルで AMPK がリン酸化されていると予想される。そこでまず、AMPK のリン酸化

を特異的に検出する抗体を用いて immunoblotting を行ったところ、5.5 mM のグルコース存在下(低グルコース)では 25 mM のグルコース存在下(高グルコース)に比べてリン酸化された AMPK のレベルが著しく高いことが確認された (Figure 6A)。次に、培地中のグルコース濃度の違いが、PRKAA1 の発現抑制が示すメチル水銀高感受性に与える影響について検討した。なお、PRKAA1 の発現抑制のための siRNA は、スクリーニングにより得られた塩基配列 (TCACAATAACTTATAAGAGAAGCAAAG; PRKAA1-① ; 4095-4121) のものと、それとは異なる塩基配列 (CCTGTGACAAGCACTTACTCCAAAATG; PRKAA1-② ; 1354-1380) の siRNA の 2 種類を用い、それぞれを HEK293 細胞に導入した。その結果、15 mM 以上の比較的高濃度のメチル水銀に対する細胞の感受性が低グルコース存在下の方が高グルコース存在下よりも強く現われ、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った (Figure 6B)。なお、2 種類の siRNA を比較すると PRKAA1-① 導入時の方が効果が著しかったが、抗 PRKAA1 ( AMPKa1 ) 抗体を用いた immunoblotting の結果、2 種類の siRNA は共に PRKAA1 の蛋白質レベル

を低下させていたが、その低下の程度は PRKAA1-① siRNA を導入した細胞の方が高かった (Figure 6C)。これらのことから、AMPK の触媒サブユニットである PRKAA1 (AMPKa1) の発現抑制が HEK293 細胞のメチル水銀感受性を高めるものの、この現象は高濃度のグルコース存在下で、より顕著に認められると思われる。

### 3-2. PRKAA2 の発現抑制がメチル水銀感受性に与える影響

AMPK の  $\alpha$  サブユニットには 2 つのアイソフォーム (PRKAA1、PRKAA2) が存在し、PRKAA1 (AMPKa1) と PRKAA2 (AMPKa2) は細胞やストレスの種類によってそれぞれ異なる機能を果たしていることが報告されている。そこで、メチル水銀毒性と PRKAA2 の関係を検討するために、PRKAA2 遺伝子に対する異なる 2 種類の siRNA 塩基配列 ( AACCACGAGTAAGATATTATTTAAATG; PRKAA2- ① ; 2058-2084 、 TTGGAACATCTGGAATTGCAACAACCT; PRKAA2-② ; 2399-2425) をそれぞれ挿入した発現ベクターを導入した HEK293 細胞を作成し、メチル水銀に対する感受性を検討した。その結果、何れの PRKAA2 の siRNA を導入した細胞でも、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

強は認められず、対照細胞と同程度の感受性を示した (Figure 7A)。なお、これらの細胞では PRKAA2 siRNA の導入によって PRKAA2 の蛋白質レベルが著しく低下していたが、PRKAA1 レベルの変動は認められなかった (Figure 7B)。以上の結果から、AMPK の  $\alpha$  サブユニットはアイソフォームによって異なる機能を持ち、メチル水銀毒性に対しては PRKAA1 のみが影響を与えると考えられる。

### 3-3. AMPK の活性化 (リン酸化) に関わる因子の発現抑制がメチル水銀感受性に与える影響

AMPK は  $\alpha$  サブユニットがリン酸化を受けることによって活性化され、細胞内のエネルギー状態などを維持している。これまでに、AMPK の活性化に関わるキナーゼとして、LKB1 や CaMKKb が報告されている (Figure 8)。また、活性化された AMPK を脱リン酸化することによって不活性化させる因子として、protein phosphatase 2C (PP2C) が知られている (Figure 8)。そこで、これらの因子とメチル水銀毒性との関係を検討するために、siRNA 導入法によりそれぞれの因子の発現を抑制した HEK293 細胞を作成した。

まず、LKB1 の発現抑制がメチル水銀感受性に与える影響を検討したとこ

ろ、HEK293 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 (Figure 9-1)。一方、CaMKKb の siRNA を HEK293 細胞に導入した場合は何れの濃度のグルコース存在下においても、対照細胞とほぼ同程度のメチル水銀感受性が認められた (Figure 9-2)。これらのことから、AMPK の活性化に関わるキナーゼの中では LKB1 がメチル水銀毒性に関与していると考えられる。次に、PP2C とメチル水銀毒性との関係を検討したところ、低グルコース存在下では 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た (Figure 9-3)。このことから、PP2C はメチル水銀毒性を増強させる働きを有するものと考えられる。以上の結果から、LKB1 による AMPK のリン酸化はメチル水銀毒性軽減に関与しており、PP2C はその軽減作用を負に制御している可能性が考えられる。

### 3-4. AMPK の活性化がメチル水銀感受性に与える影響

上記 3 での検討により、AMPK のリン酸化がメチル水銀毒性を軽減する可能性が示された。AMPK の活性化には AMPK の上流キナーゼ (AMPKK) の他に、

細胞内 AMP の増加や ATP の減少といった細胞内 AMP/ATP 比の増加も関わっていることが知られている。AMPK の活性化剤の1つである AICAR は、細胞内 AMP を増加させることなく、AMP 類似体として機能することにより AMPK をリン酸化する薬物である。この AICAR の添加が AMPK のリン酸化に与える影響を検討したところ、高グルコース存在下では 100 mM 以上の AICAR 添加によってリン酸化された AMPK レベルの増加が認められた。しかし、低グルコース存在下では、AICAR 未添加時に既に AMPK のリン酸化レベルは高く、AICAR 添加によってさらにそのレベルが増加されるということとはなかった (Figure 10A)。次に、無毒性レベル (100 mM) または低毒性レベル (200 mM) の AICAR の添加 (Figure 6B) がメチル水銀感受性に与える影響を検討したところ、高グルコース存在下で AICAR 添加によるメチル水銀毒性の軽減が認められた (Figure 10C)。なお、AICAR の添加量に依存したメチル水銀毒性軽減効果は認められず、200 mM では 100 mM 添加時よりもむしろ僅かな軽減効果の低下が認められたが、これは、200 mM の AICAR が弱い細胞毒性を示すことから、AICAR の AMPK 活性化以外の機能によるものかも知れない。

### 3-5. メチル水銀が AMPK のリン酸化に

与える影響

AMPK のリン酸化による活性化がメチル水銀の毒性軽減において重要な役割を果たしていることが明らかになった。そこで、メチル水銀が AMPK のリン酸化に与える影響を検討したところ、何れの濃度のグルコース存在下においても3時間のメチル水銀処理により、AMPK のリン酸化レベルがメチル水銀濃度依存的に減少した (Figure 11A)。また、5 mM のメチル水銀が AMPK のリン酸化に与える影響を経時的に検討したところ、6時間後までは AMPK のリン酸化レベルはメチル水銀処理により低下したのに対し、その後は増加傾向を示した (Figure 11B)。この現象がメチル水銀毒性においてどのように関与しているかは不明であるが、6時間のメチル水銀処理では細胞毒性がほとんど認められないこと (データ示さず) から、AMPK のリン酸化レベルの低下はメチル水銀毒性にはあまり関与せず、メチル水銀による AMPK のリン酸化レベルの増加がメチル水銀毒性から防御するための細胞応答機構の1つである可能性も考えられる。

D. 研究発表

1. 論文発表

なし。

2. 学会発表

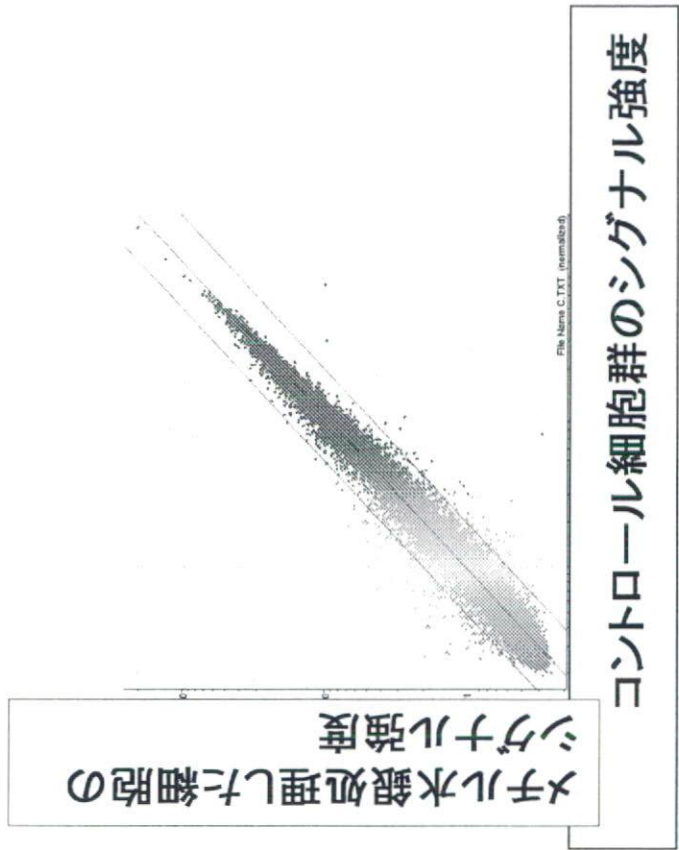
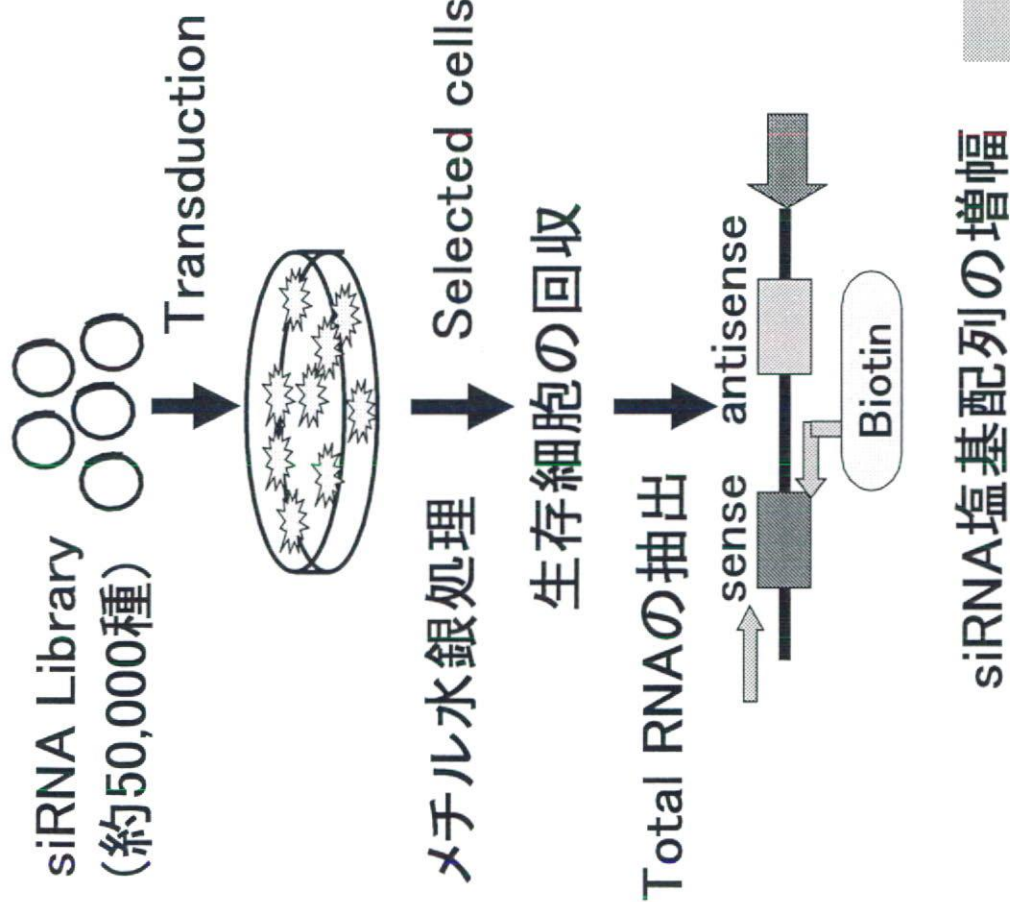
飛田真由美、黄基旭、永沼章：siRNA  
ライブラリーを用いたメチル水銀感

受性決定因子の検索. 第46回日本薬  
学会東北支部大会, 2007

E. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

# スクリーニング方法



**DNAマイクロアレイ解析**

**Affymetrix社の  
GeneChipへ  
ハイブリダイズ**

**Figure 1. 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方法**

5 × 10<sup>6</sup> cells となるように siRNA 導入細胞を 21 枚の 10 cm plate に播いた後、24 時間後に塩化メチル水銀 (0.3, 0.6 μM 各 7 枚ずつ) 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、各メチル水銀濃度ごとに生存細胞を回収して総 mRNA を抽出し、総 RNA 中の siRNA 配列の sense を特異的に認識する primer を用いて増幅した PCR 産物を Gene Chip にハイブリダイズさせ、DNA マイクロアレイ解析を行った。

# DNAマイクロアレイの結果

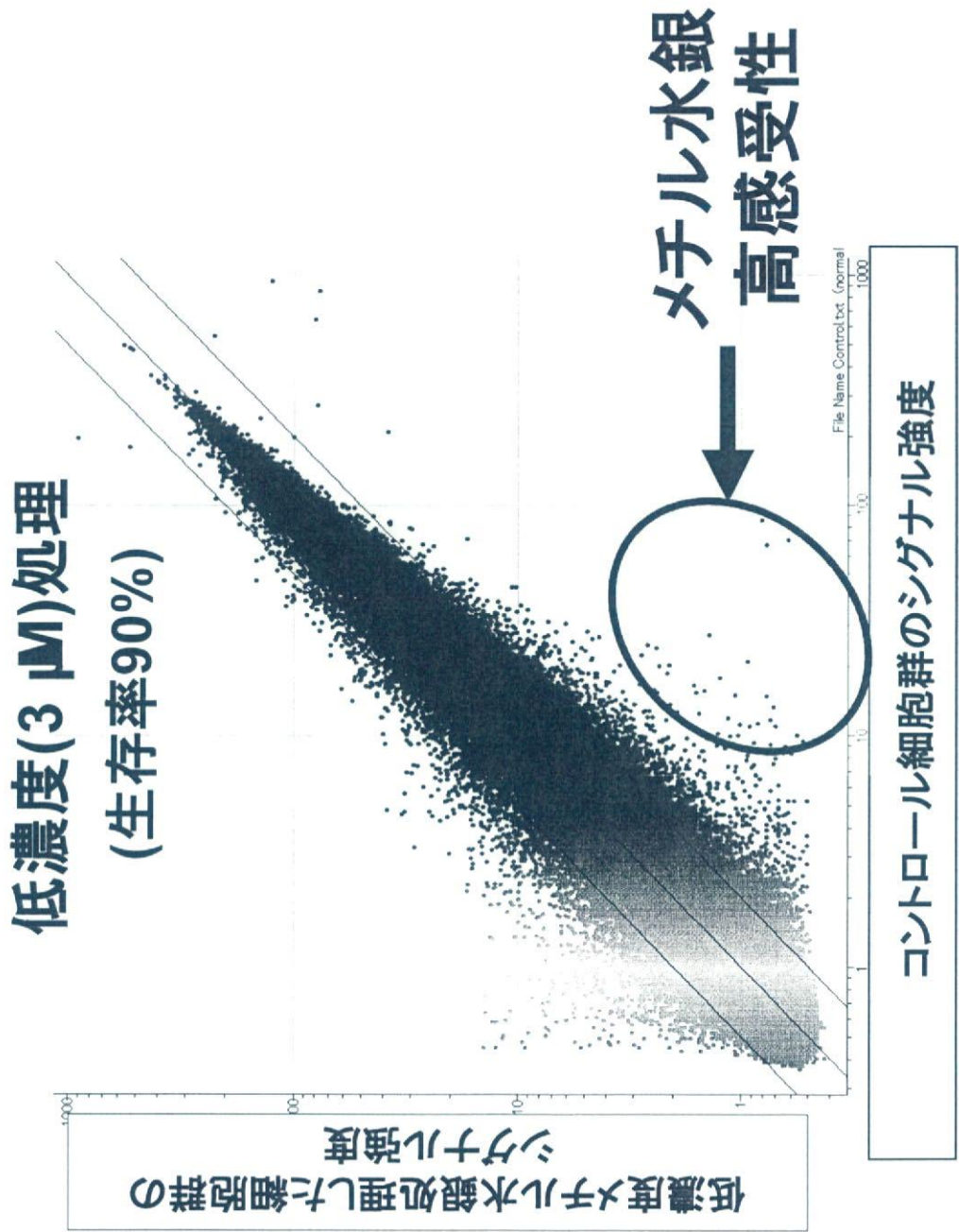
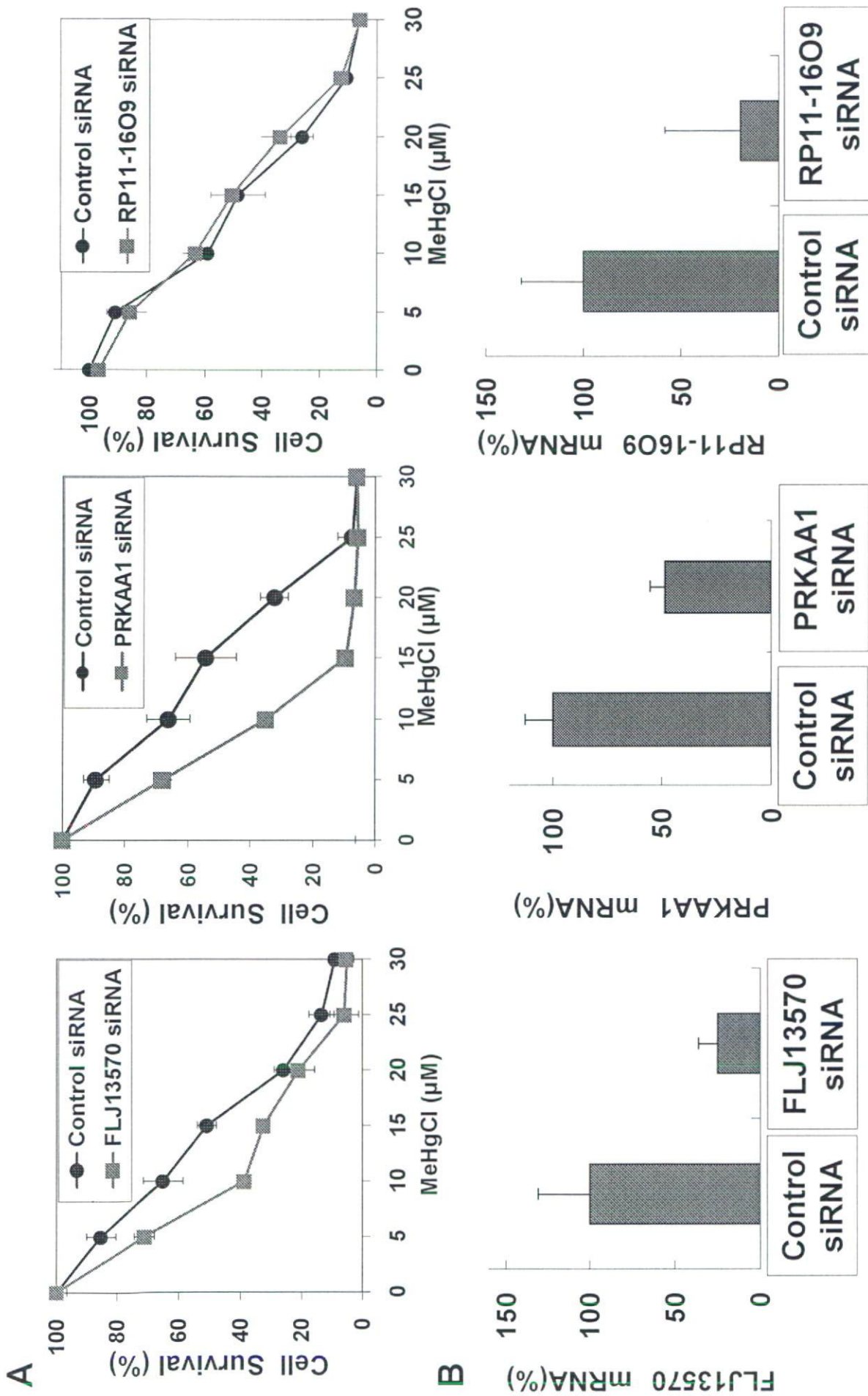


Figure 2. 低濃度のメチル水銀でsiRNA導入細胞を処理した際のDNAマイクロアレイ解析の結果  
細胞増殖を10%程度阻害する比較的低濃度のメチル水銀でsiRNA導入細胞を処理した際の各siRNA導入細胞の存在割合をDNAマイクロアレイ解析により求めた。

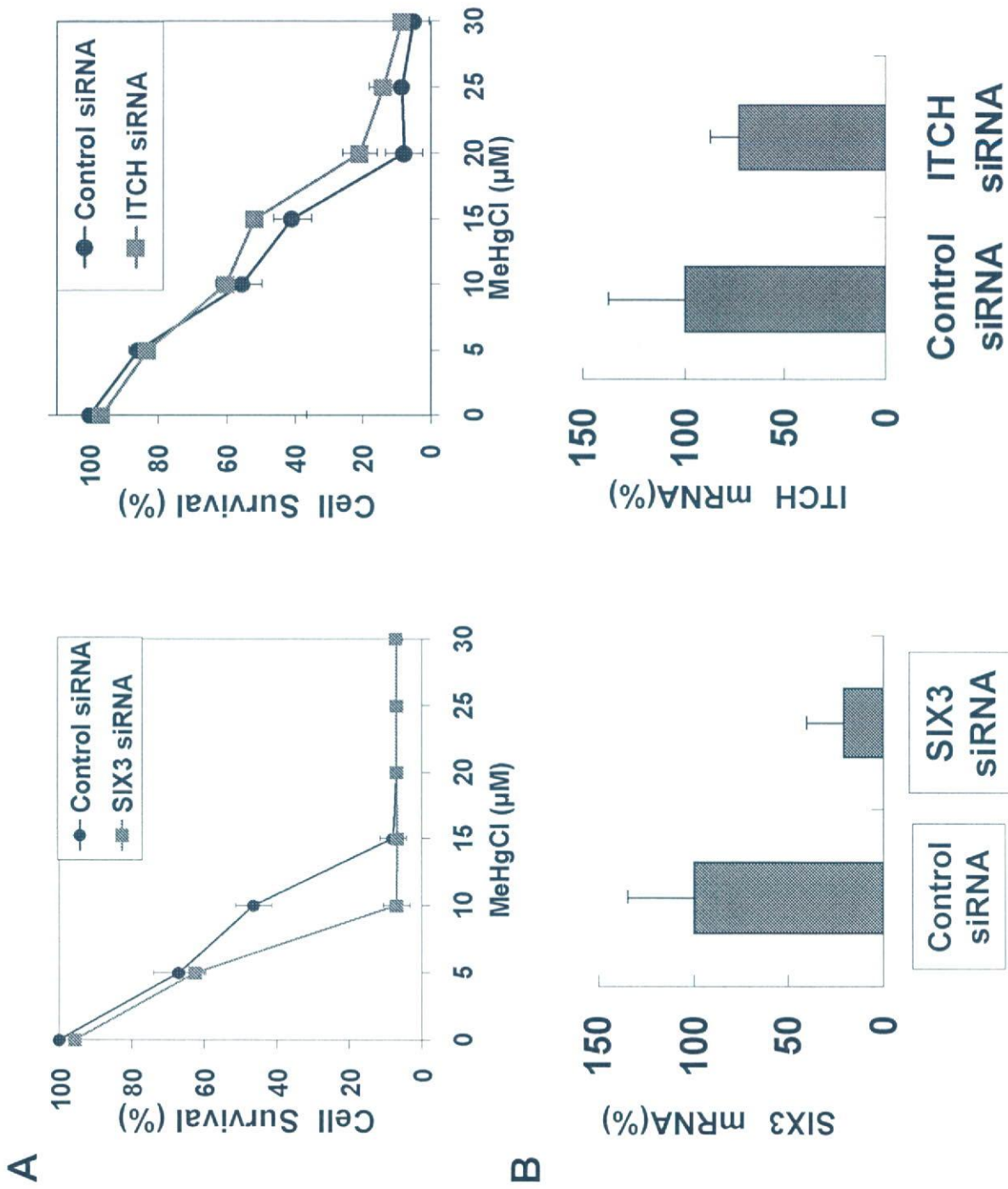


**Figure 3-1. 各遺伝子の発現抑制がHEK293細胞のメチル水銀感受性に与える影響**

A)  $2 \times 10^4$  cells/96  $\mu$ 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。24 時間処理した後、alams blue を含む培地に交換し、37  $^{\circ}$ C、5 %  $\text{CO}_2$ 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。

B) 各細胞から全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。

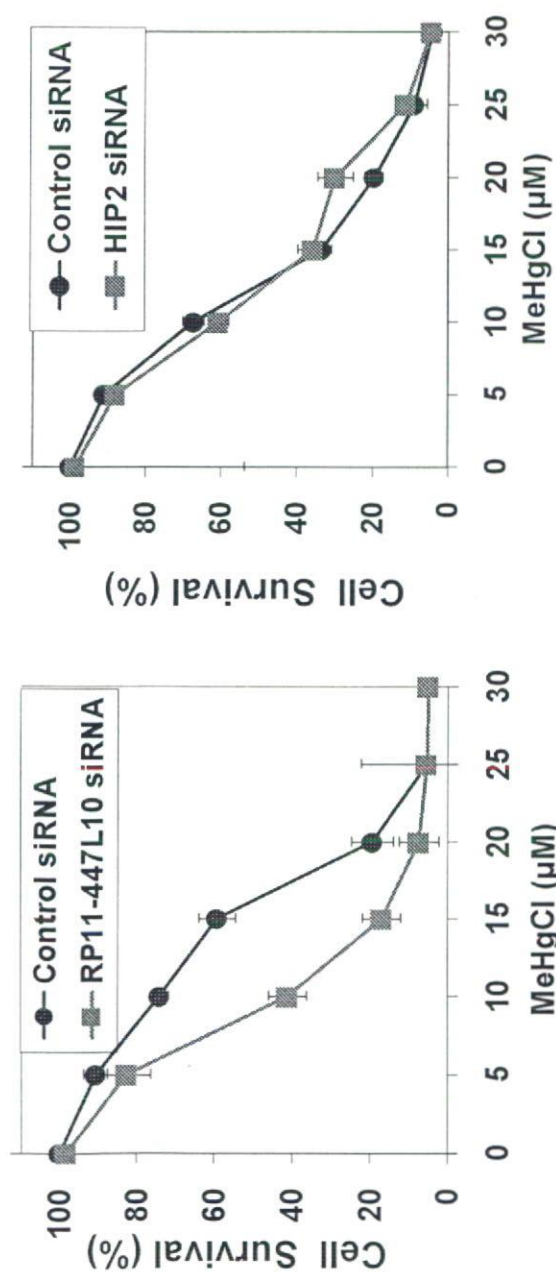




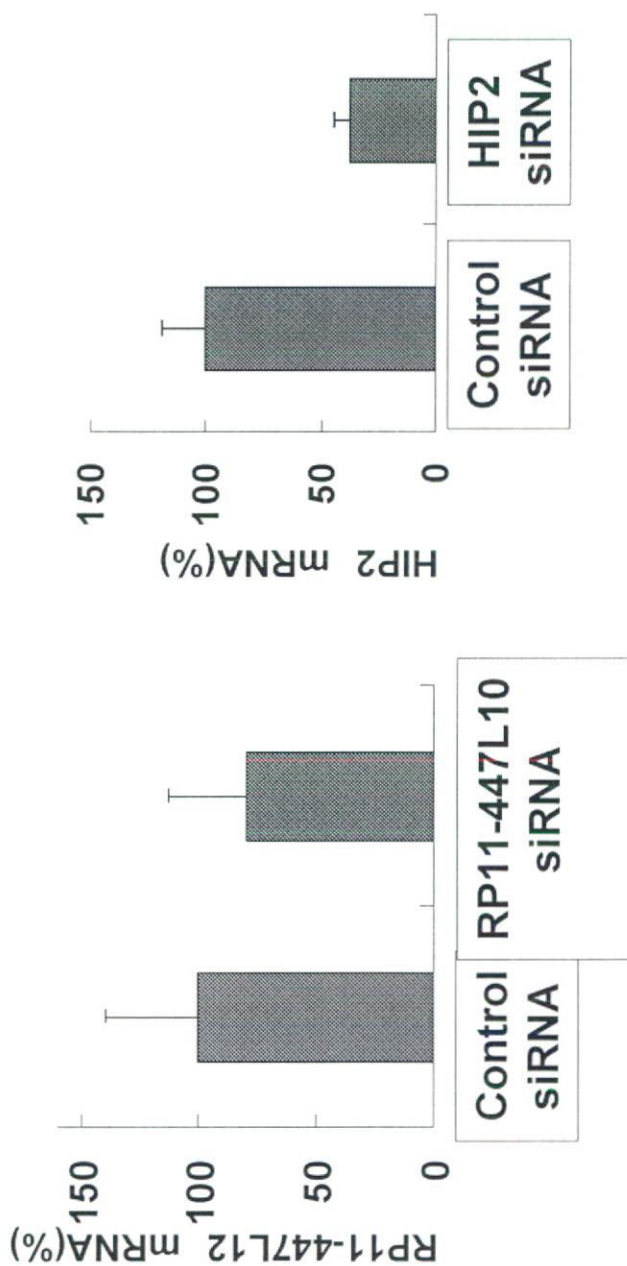
**Figure 3-2. 各遺伝子の発現抑制がHEK293細胞のメチル水銀感受性に与える影響**

- A)  $2 \times 10^4$  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。24 時間処理した後、alama blue を含む培地に交換し、 $37^\circ\text{C}$ 、5 %  $\text{CO}_2$  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。
- B) 各細胞から全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。

A

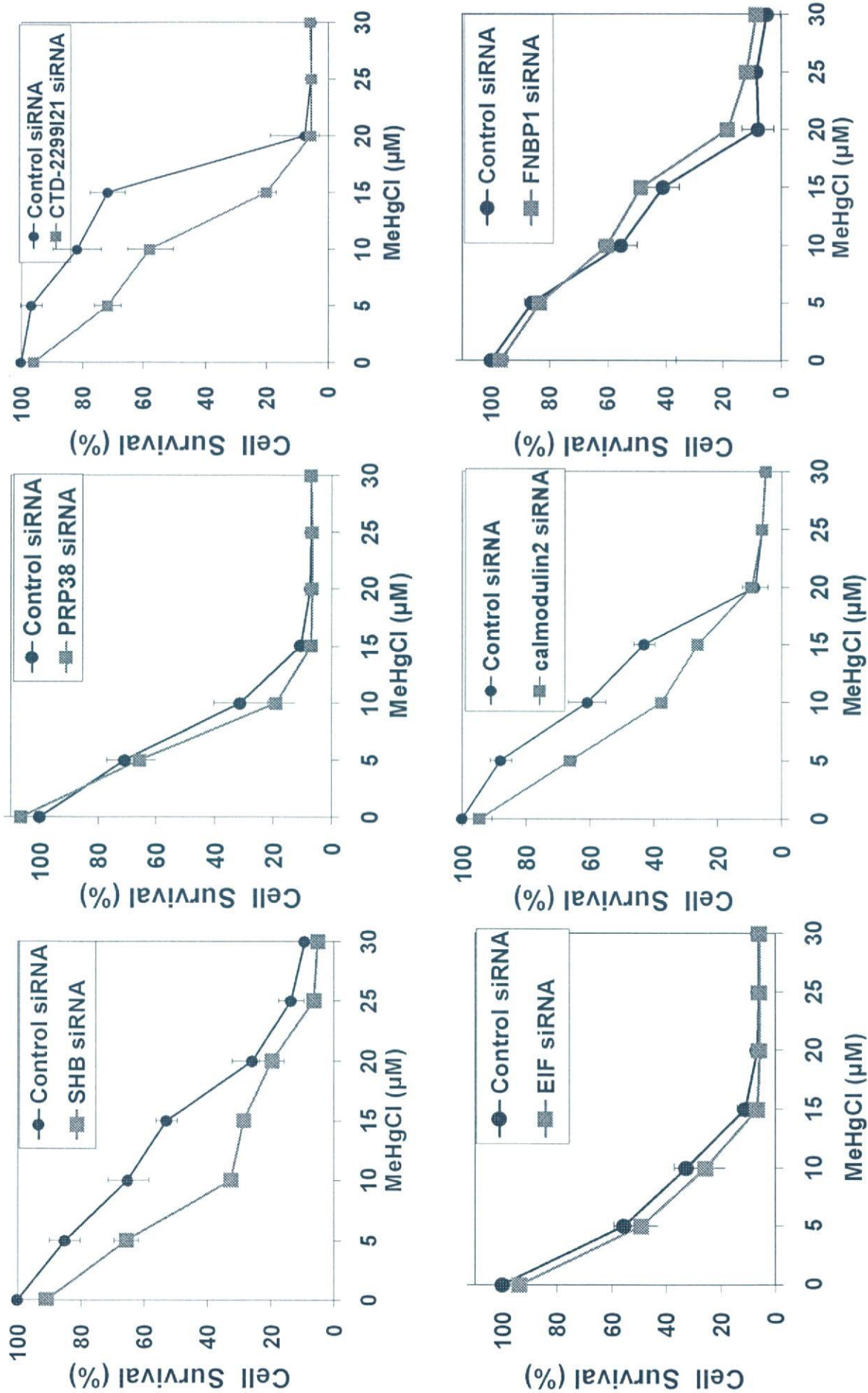


B



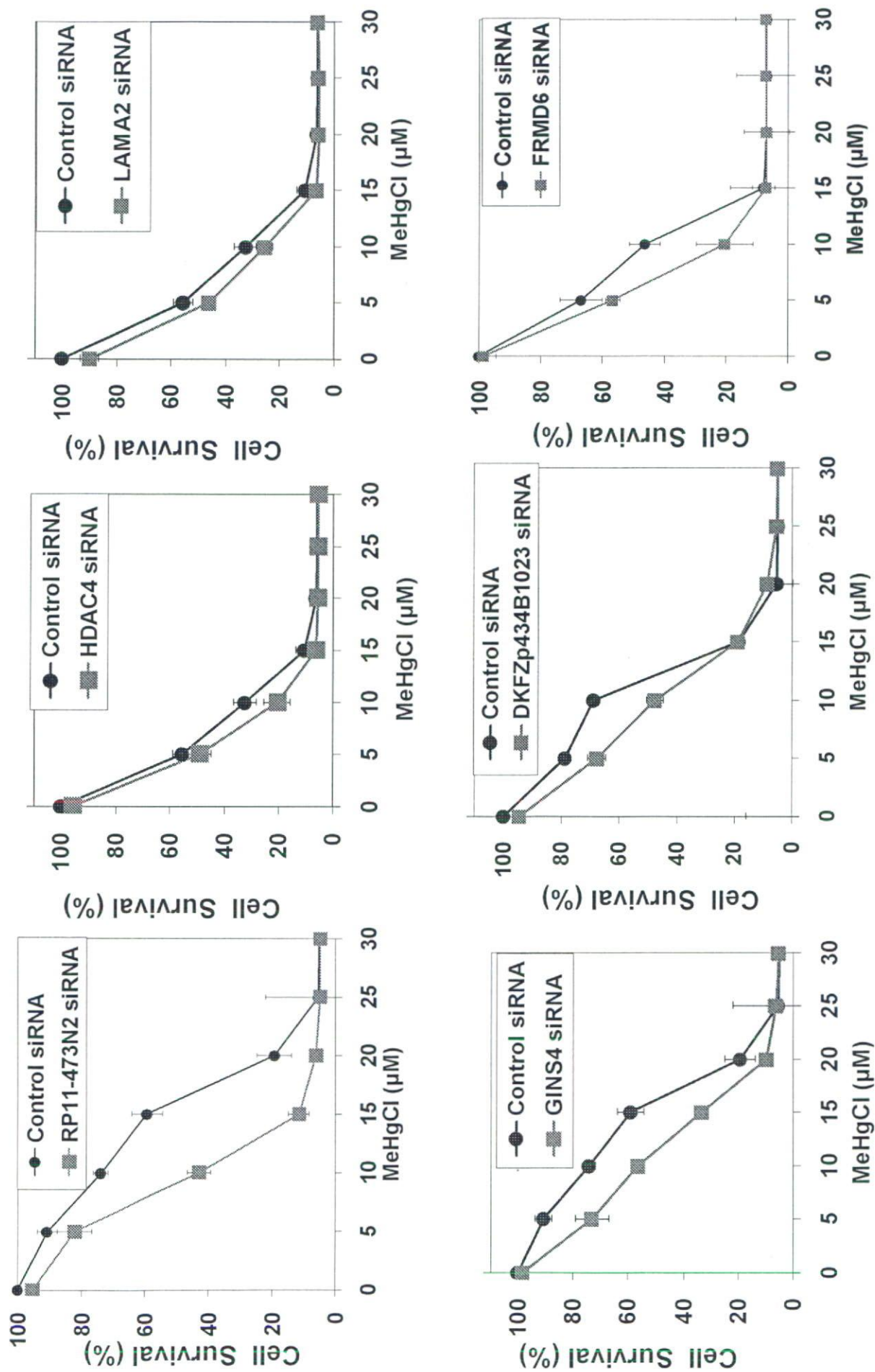
**Figure 3-3. 各遺伝子の発現抑制がHEK293細胞のメチル水銀感受性に与える影響**

- A)  $2 \times 10^4$  cells/90  $\mu$ 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。24 時間処理した後、alama blue を含む培地に交換し、37  $^{\circ}$ C、5%  $\text{CO}_2$ 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。
- B) 各細胞から全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。



**Figure 3-4. 各遺伝子の発現抑制がHEK293細胞のメチル水銀感受性に与える影響**

$2 \times 10^4$  cells/90  $\mu$ 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。24時間処理した後、alima blueを含む培地に交換し、37℃、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。



**Figure 3-5. 各遺伝子の発現抑制がHEK293細胞のメチル水銀感受性に与える影響**

$2 \times 10^4$  cells/90  $\mu$ 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。24 時間処理した後、alima blue を含む培地に交換し、37  $^{\circ}$ C、5 %  $\text{CO}_2$ 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。