

Figure.3-6 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

2×10^4 cells/90 μ 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 % 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。

DNAマイクロアレイの結果

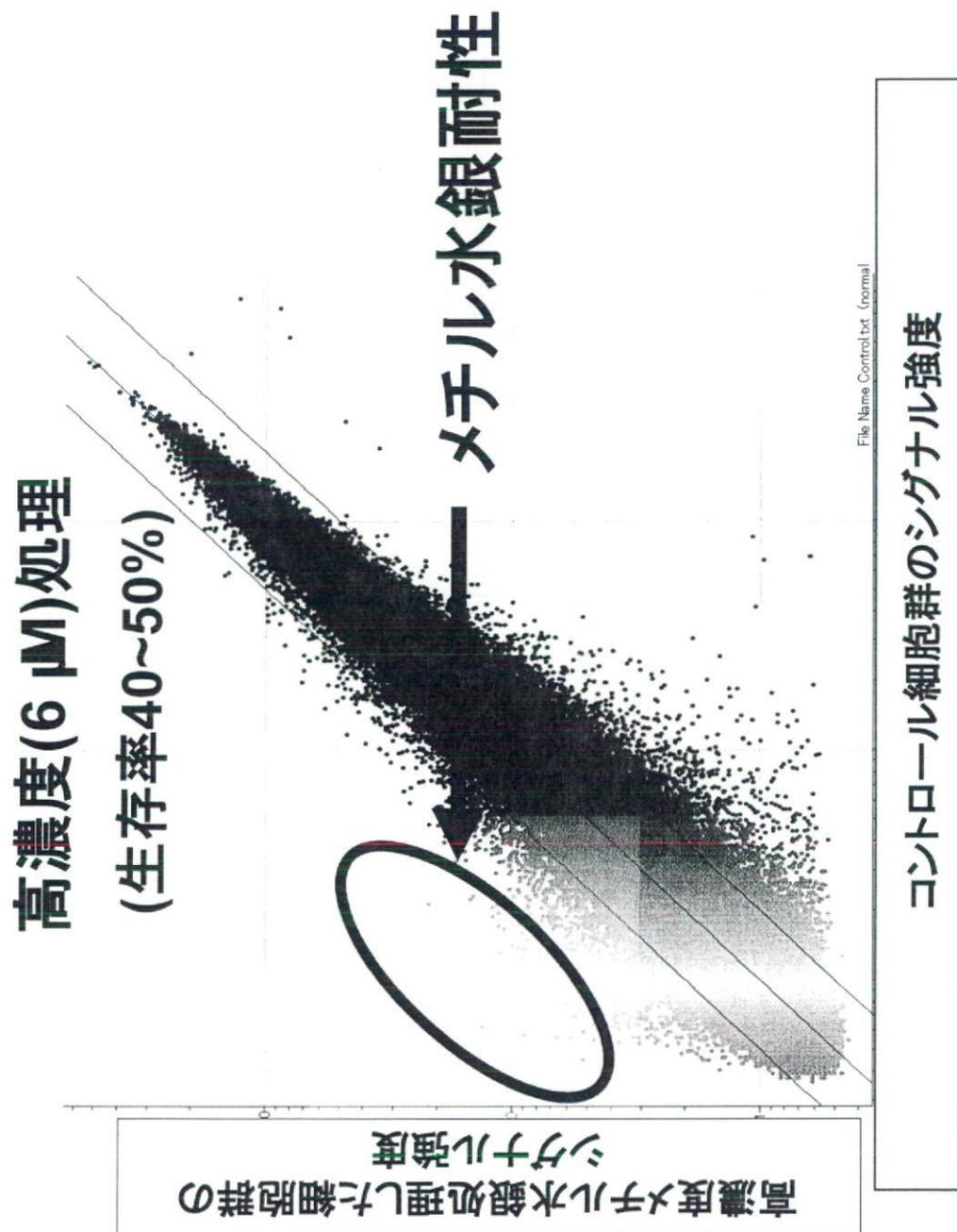


Figure 4. 高濃度のメチル水銀でsiRNA導入細胞を処理した際のDNAマイクロアレイ解析の結果

細胞増殖を50~60%程度阻害する比較的高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。

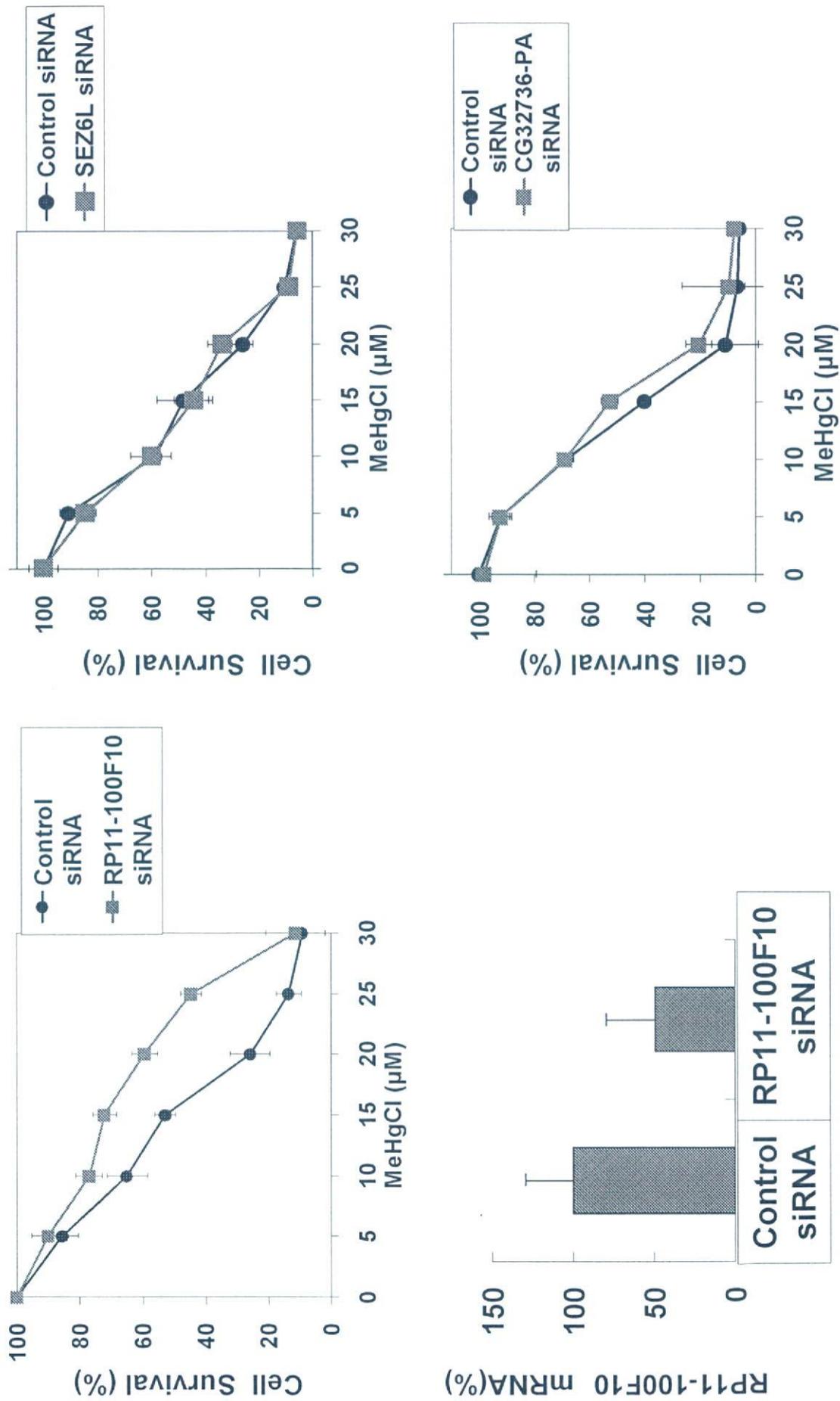


Figure 5-1. 各遺伝子の発現抑制がHEK293細胞のメチル水銀耐性に与える影響

2 × 10⁴ cells/90 μL 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 時間後に alama blue を含む培地に交換し、37 °C、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。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。

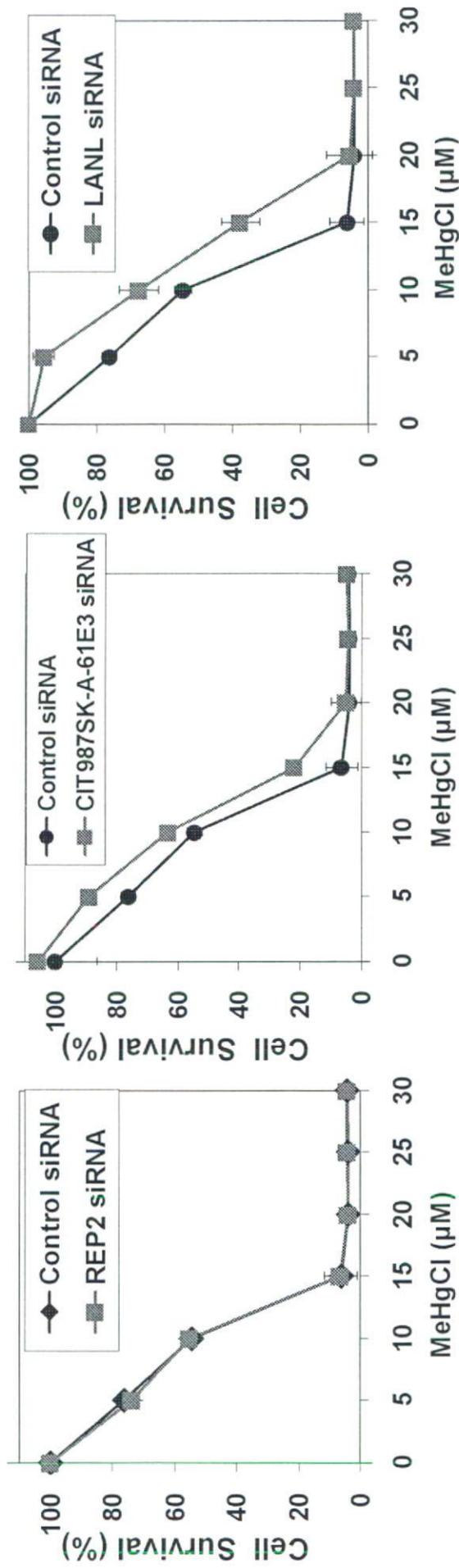


Figure 5-2. 各遺伝子の発現抑制がHEK293細胞のメチル水銀耐性に与える影響

各遺伝子の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。

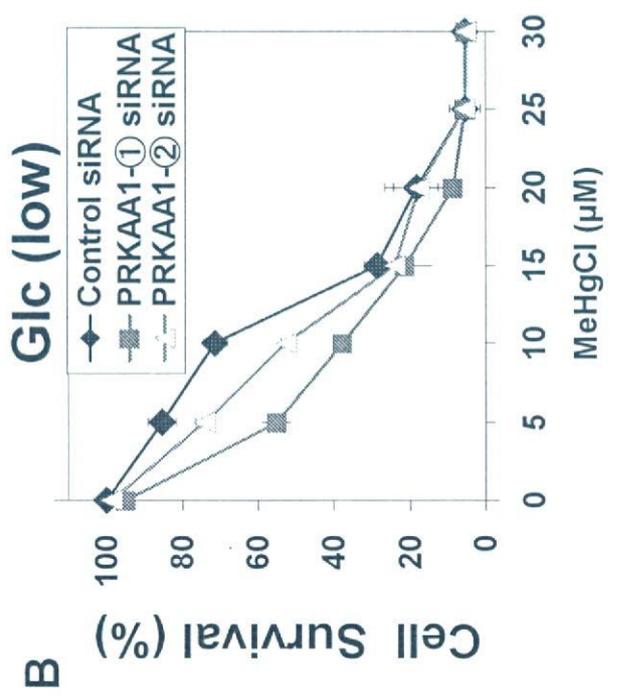
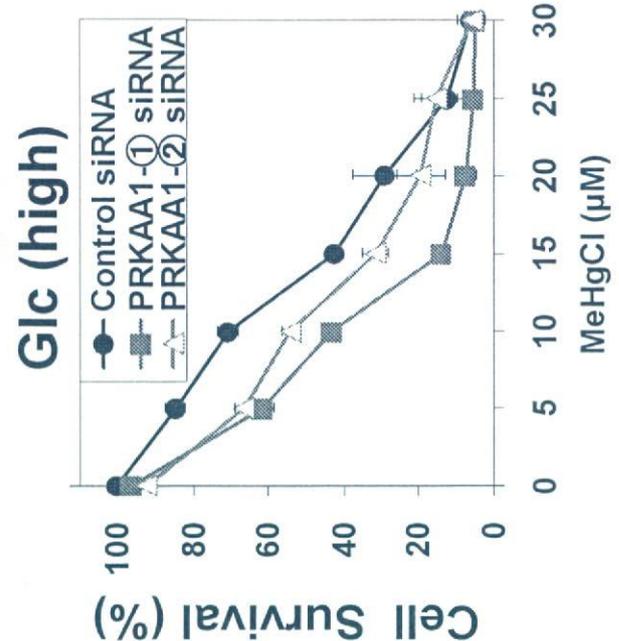
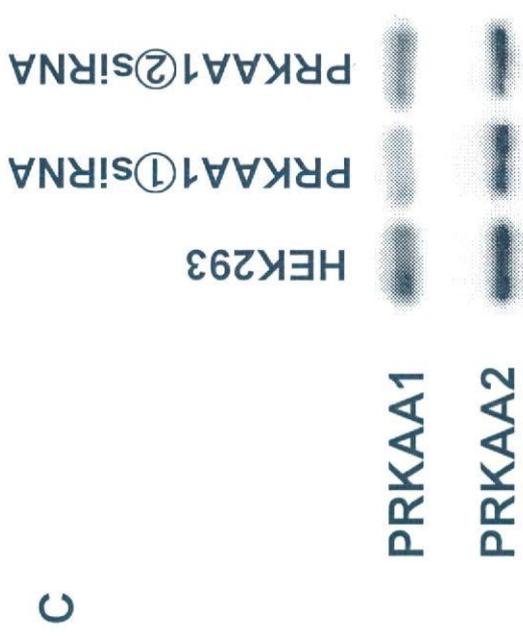
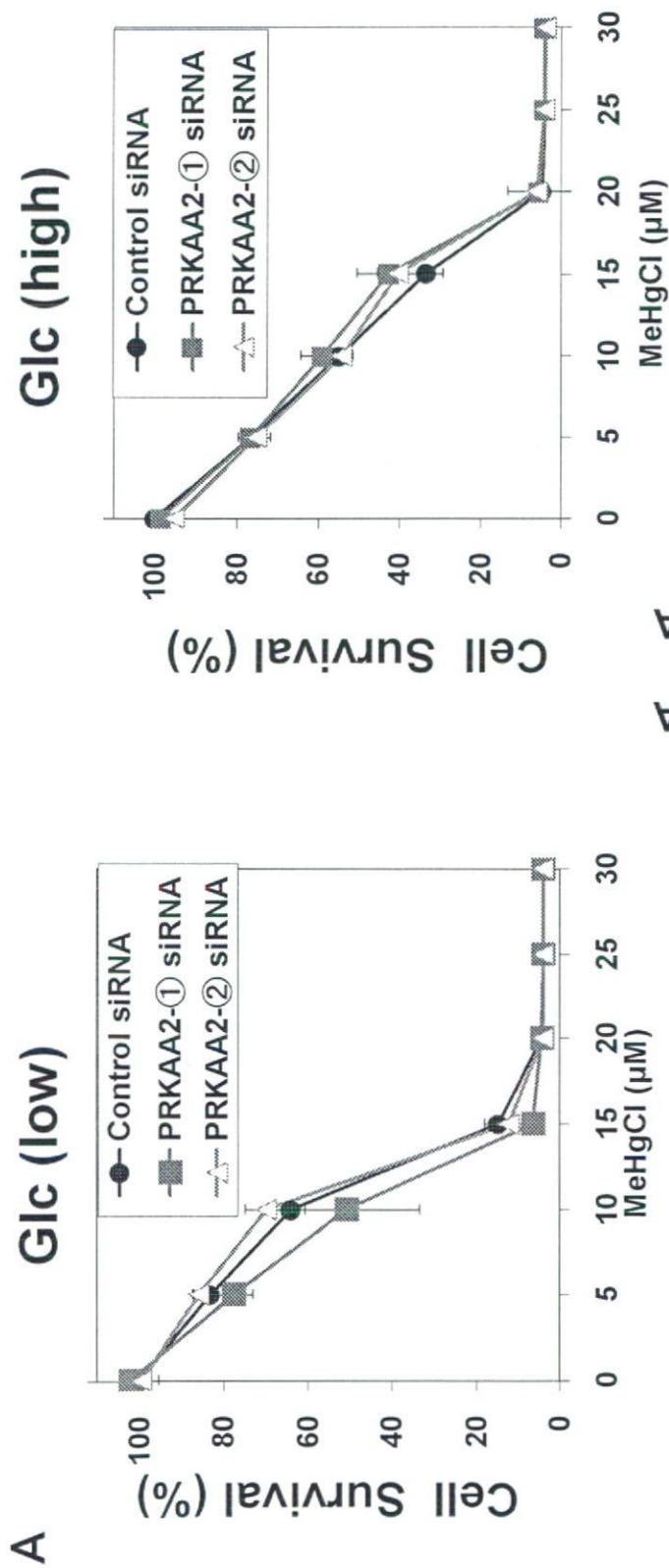


Figure 6. グルコース濃度の違いがPRKAA1のsiRNA導入細胞のメチル水銀感受性に与える影響

A. 1×10^6 cells となるように各濃度 (5.5, 25 mM) のグルコースを含む培地で培養した HEK293 細胞を 6 well plate に播いた後、24 時間後に蛋白質を抽出した。その後、Immunoblotting によりリン酸化 AMPK および PRKAA1 レベルを検討した。

B. 2×10^4 cells/90 μ 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、aloma blue を含む培地に交換し、37 $^{\circ}$ C、5 % CO_2 存在下で 3 時間培養した後、蛍光マイクロプロベクターによる蛍光測定 (excitation, 544 nm; emission, 590 nm) により細胞生存率を求めた。

C. PRKAA1 の siRNA 導入細胞の発現抑制効果を Immunoblotting により PRKAA1 および PRKAA2 レベルを検討した。



B

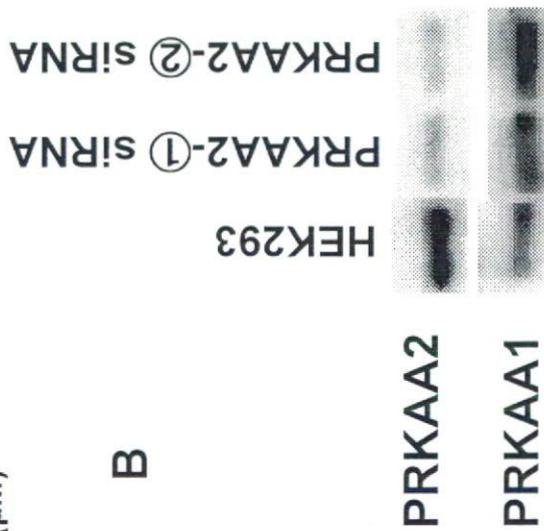


Figure 7. グルコース濃度の違いがPRKAA2のsiRNA導入細胞のメチル水銀感受性に与える影響

A. 2×10^4 cells/90 μ 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 %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. PRKAA2のsiRNA導入細胞の発現抑制効果をImmunoblottingにより PRKAA2およびPRKAA1レベルを検討した。

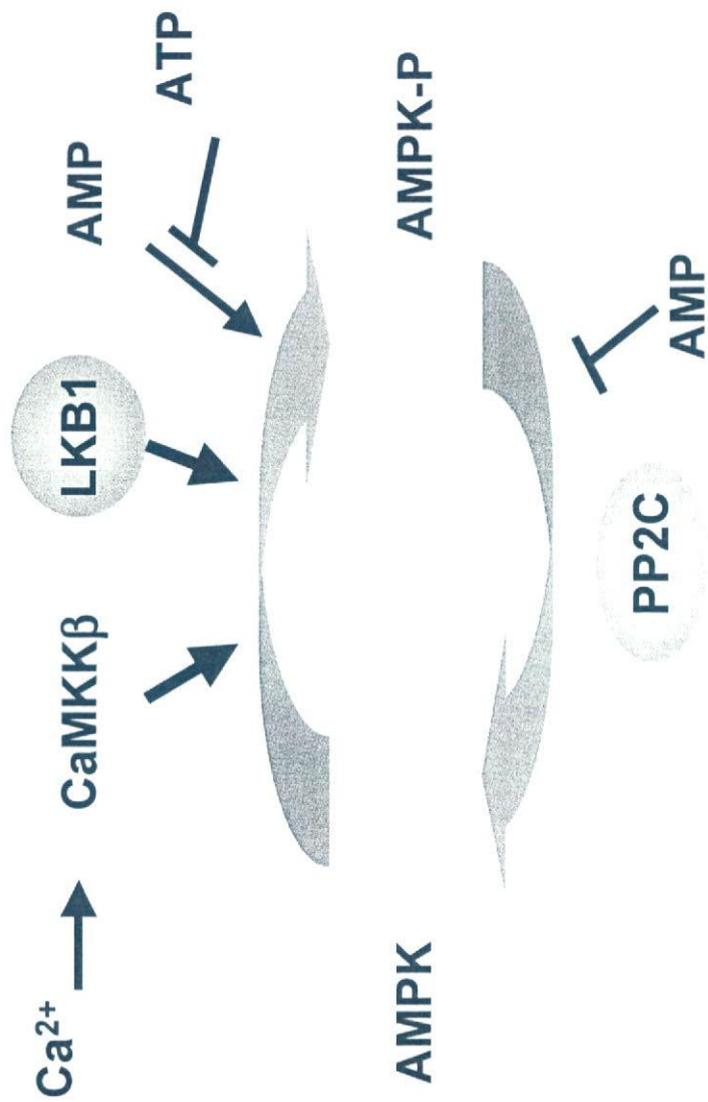


Figure8. AMPK活性化 / 不活性化に関わる制御因子との関連図

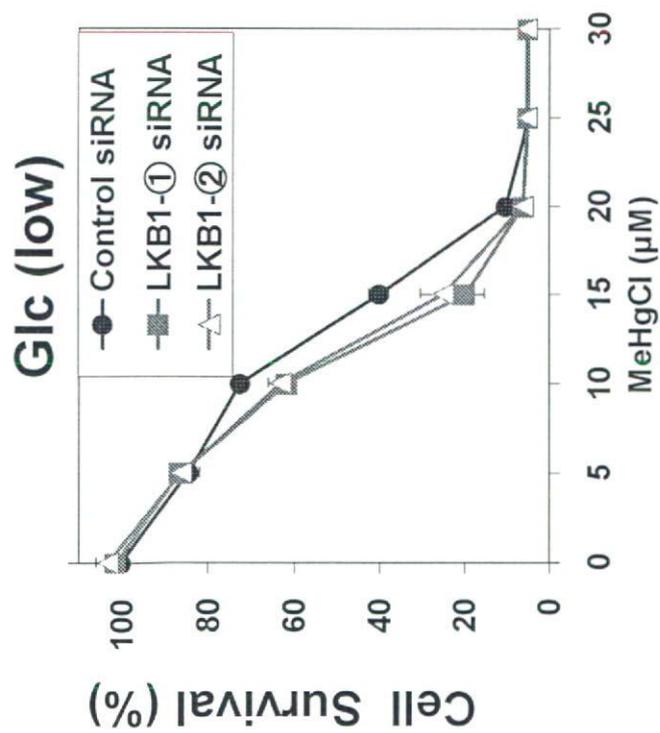
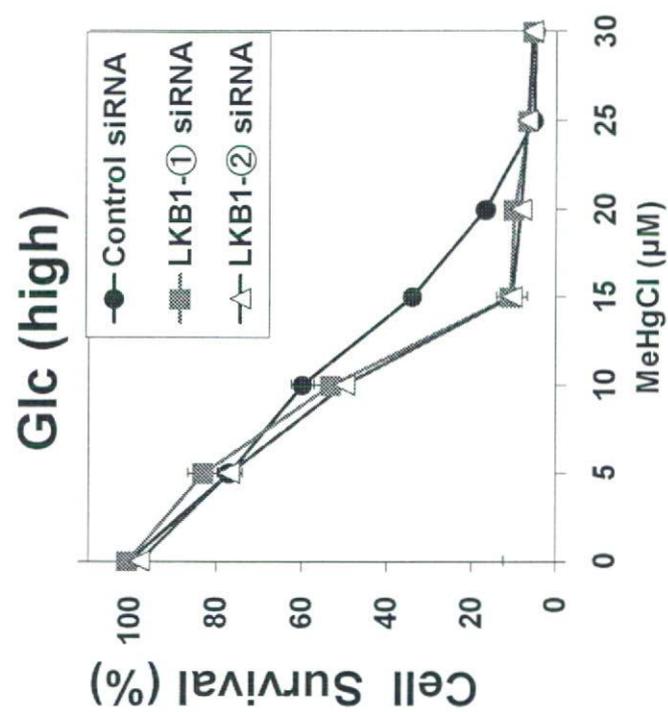


Figure 9-1. AMPKに関わる遺伝子(LKB1)の発現抑制が細胞のメチル水銀感受性に与える影響

2×10^4 cells/90 μ 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 % 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。

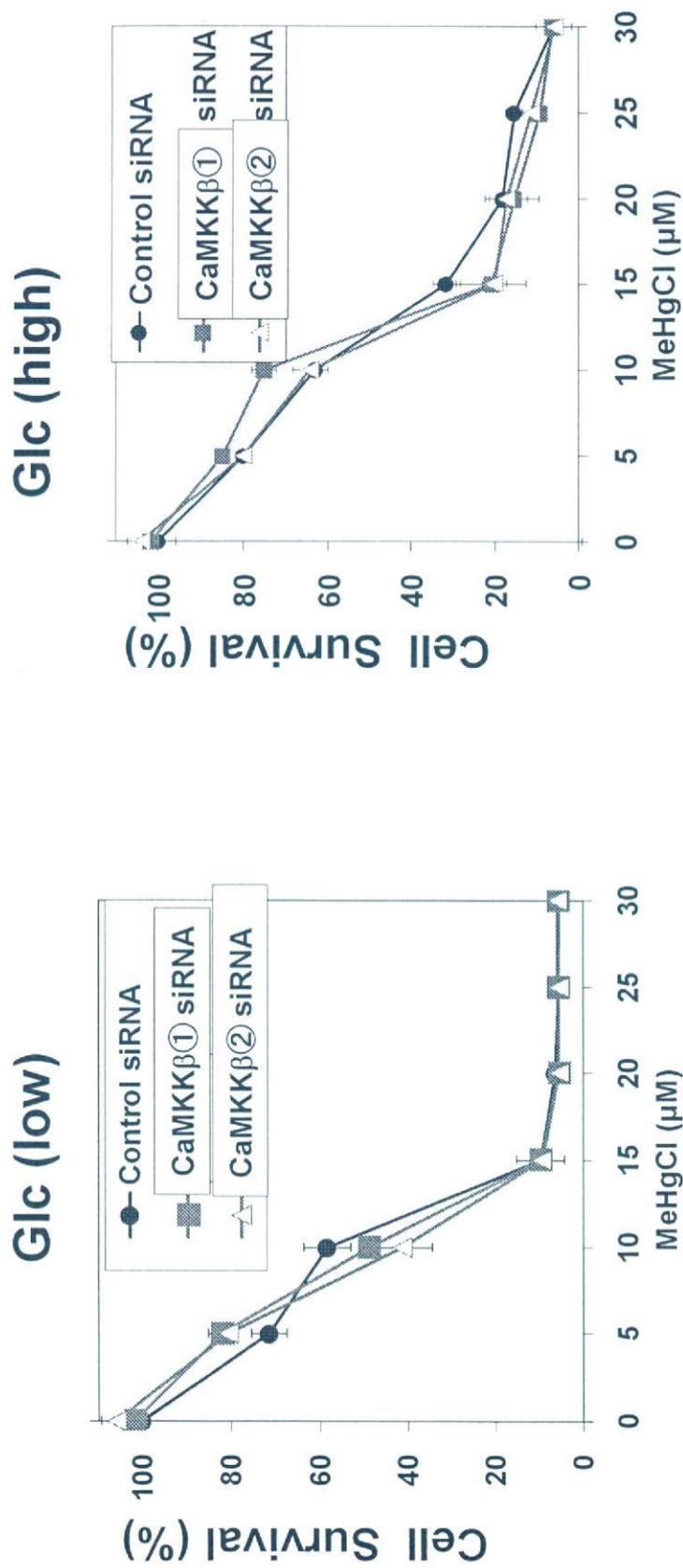


Figure 9-2. AMPKに関わる遺伝子(CaMKKβ)の発現抑制が細胞のメチル水銀感受性に与える影響

2 × 10⁴ cells/90 μL 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、aloma blue を含む培地に交換し、37 °C、5 % CO₂存在下で3 時間培養した後、蛍光マイクロプロ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。

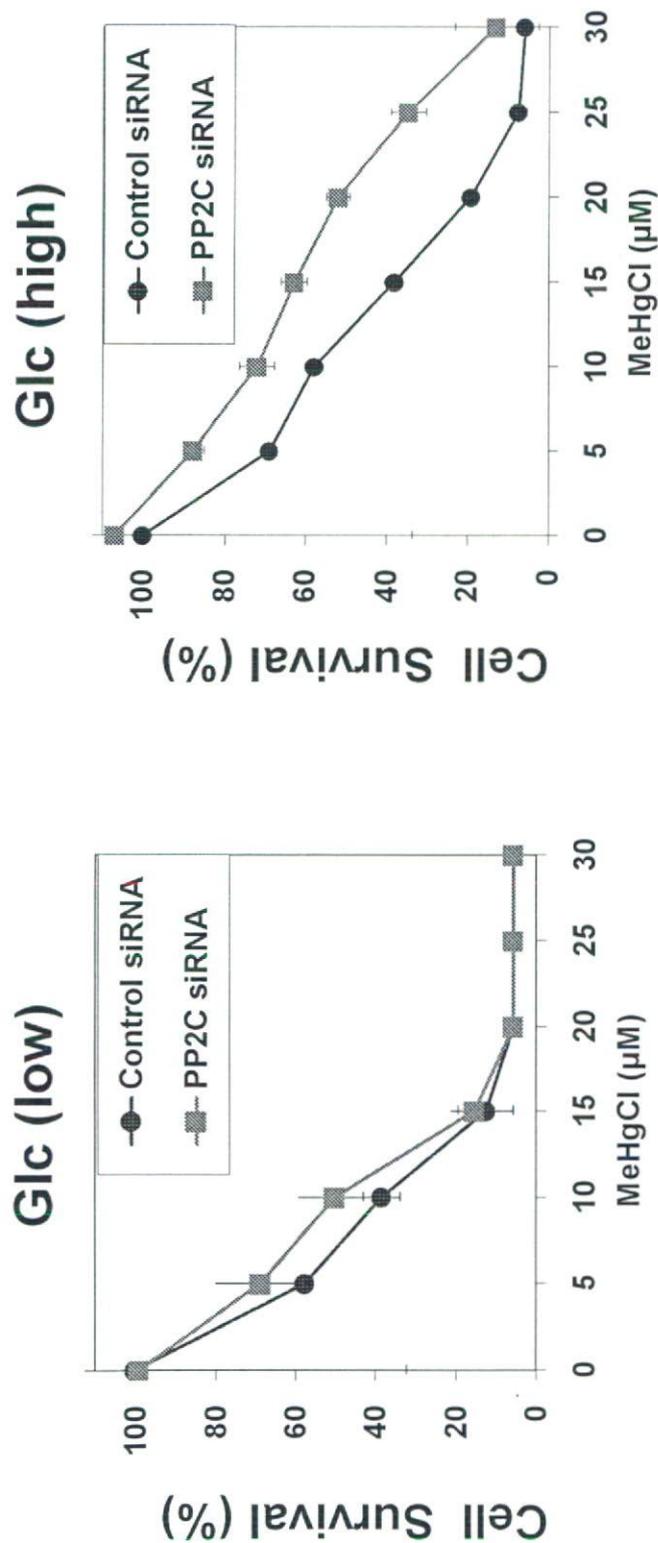


Figure 9-3. AMPKに関わる遺伝子(PP2C)の発現抑制が細胞のメチル水銀感受性に与える影響

2×10^4 cells/90 μ 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 % 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。

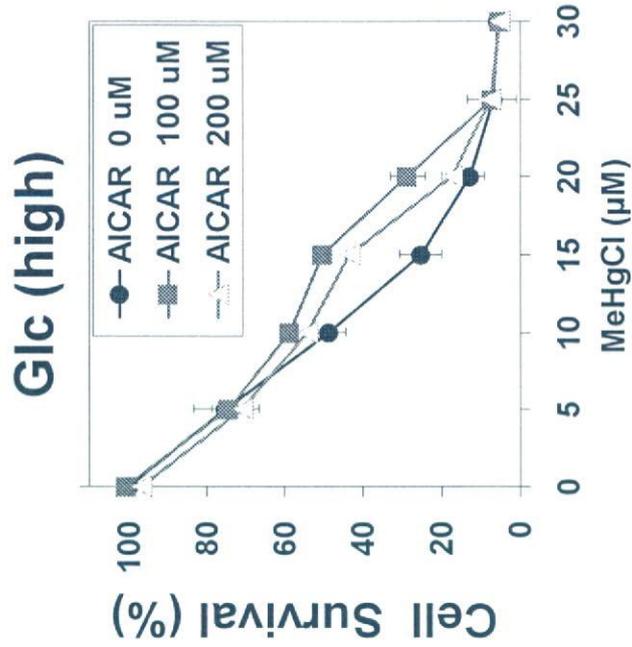
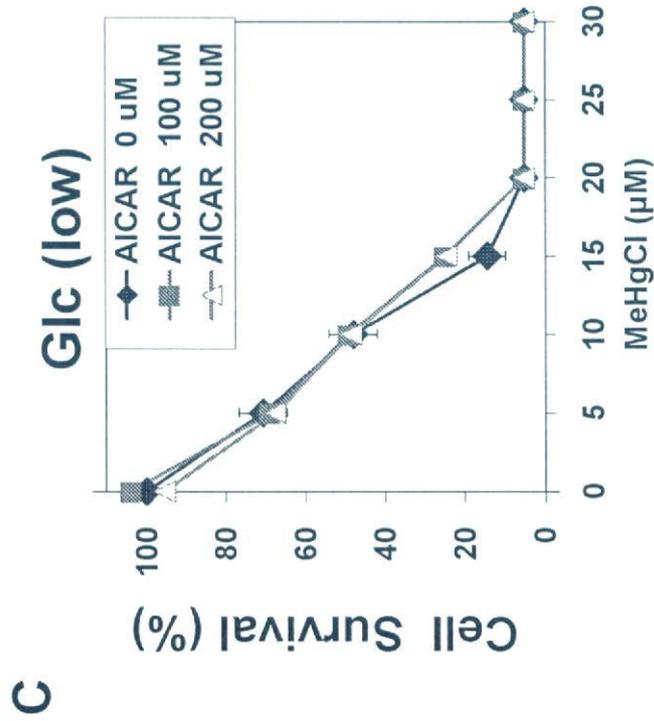
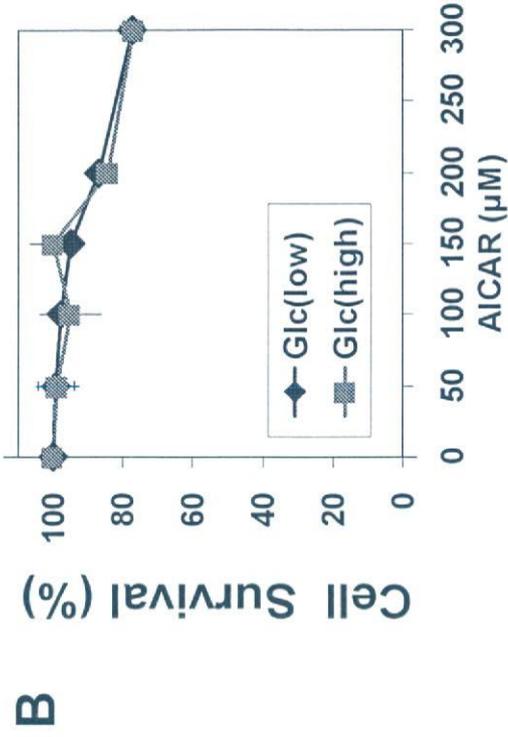
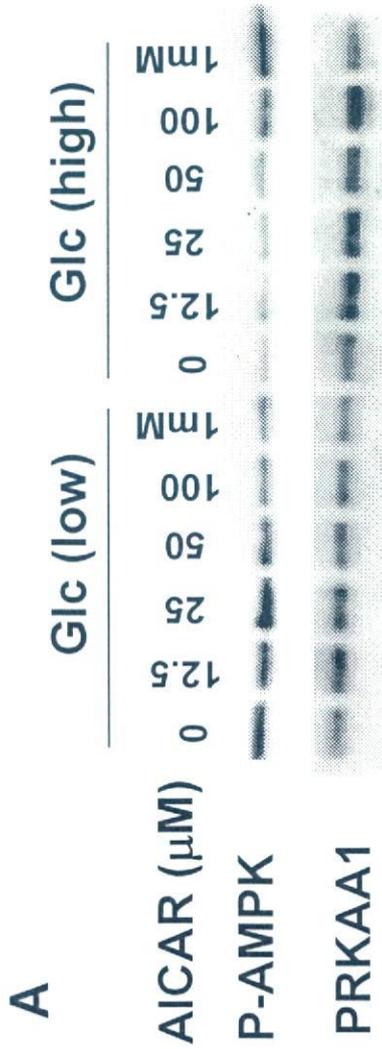


Figure 10. AICAR(AMPK活性化剤)がメチル水銀感受性に与える影響

A. 1×10^6 cells となるように各濃度 (5.5, 25 mM) のグルコースを含む培地で培養した HEK293 細胞を 6 well plate に播いた後、各濃度 (0, 12.5, 25, 50, 100, 1000 μM) の AICAR で 1 時間処理し、蛋白質を抽出した後、immunoblotting によりリン酸化 AMPK および PRKAA1 レベルを検査した。
 B. 2×10^4 cells/90 μL の細胞を 96 well plate にまいた後、24 時間後に AICAR で 24 時間処理し、alima 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。
 C. 2×10^4 cells/90 μL 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 24 時間処理した後、上記 B. と同様の操作にて細胞生存率を求めた。

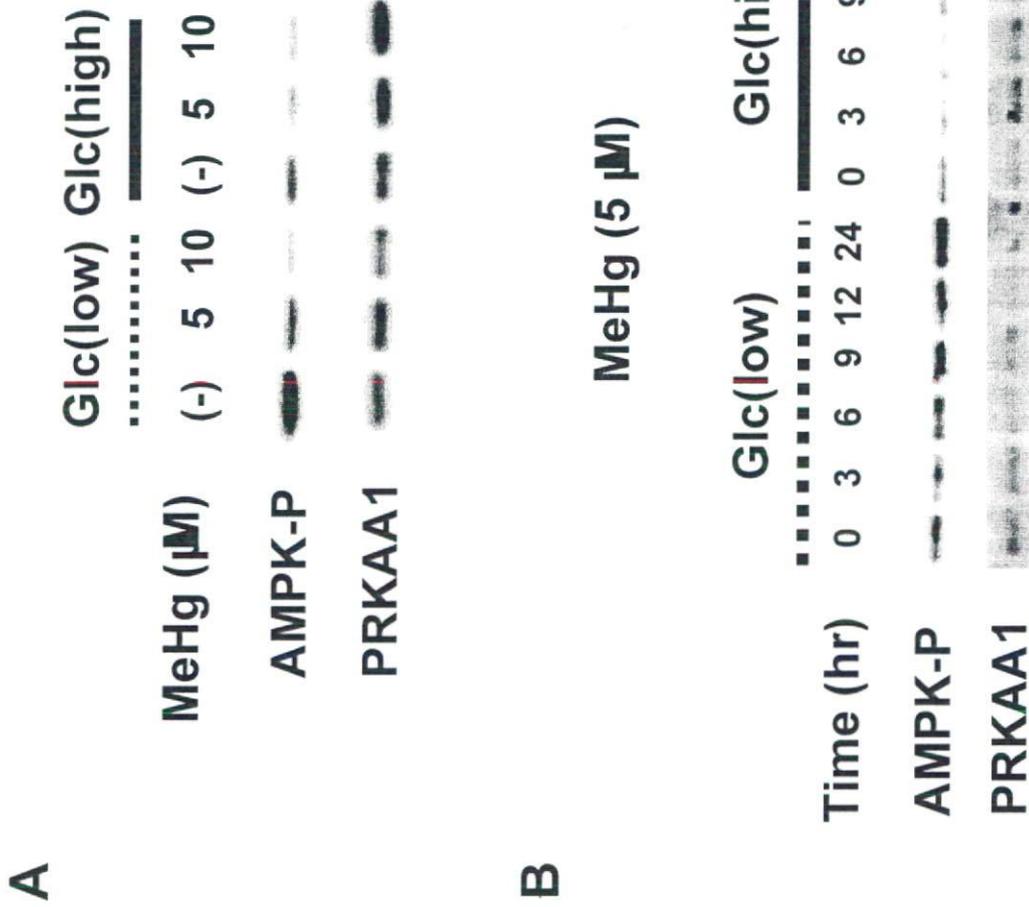


Figure 11. メチル水銀がAMPKのリン酸化に与える影響

A. 1×10^6 cells/1.8 mLとなるように各濃度(5.5, 25 mM)のグルコースを含む培地で培養した HEK293細胞を6 well plateに播いた後、24 時間後に各濃度の塩化メチル水銀(0, 5, 10 μM)で3時間処理し、Immunoblottingによりリン酸化AMPKおよびPRKAA1レベルを検討した。
 B. 1×10^6 cellsとなるように各濃度(5.5, 25 mM)のグルコースを含む培地で培養した HEK293細胞を6 well plateに播いた後、5 μM の塩化メチル水銀で各時間(0, 3, 6, 9, 12, 24)処理し、蛋白質を抽出した後、Immunoblottingによりリン酸化AMPKおよびPRKAA1レベルを検討した。

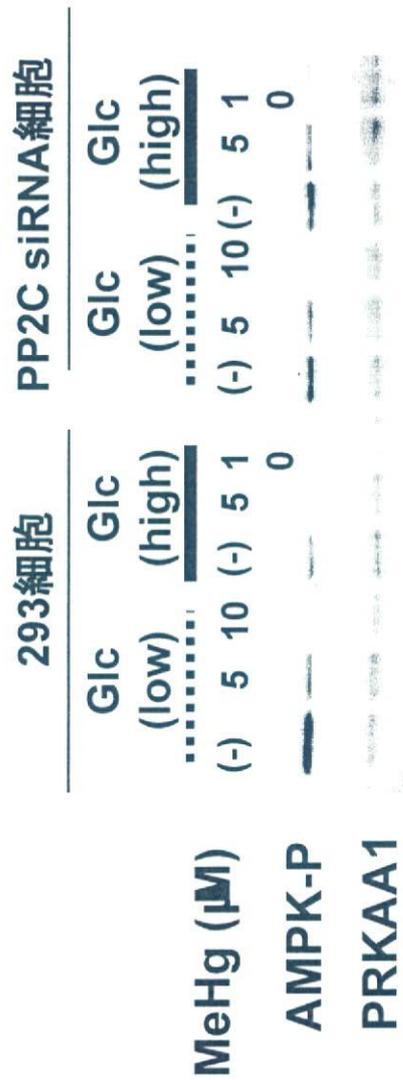


Fig.14 メチル水銀毒性軽減メカニズムの解析

1×10⁶ cellsとなるように各濃度(5.5, 25 mM)のグルコースを含む培地で培養した HEK293細胞またはPP2C siRNA導入細胞を6 well plateに播いた後、各濃度(0, 5, 10 μM)の塩化メチル水銀で3時間処理し、蛋白質を抽出した後、Immunoblottingによりリン酸化AMPKおよびPRKAA1レベルを検討した。

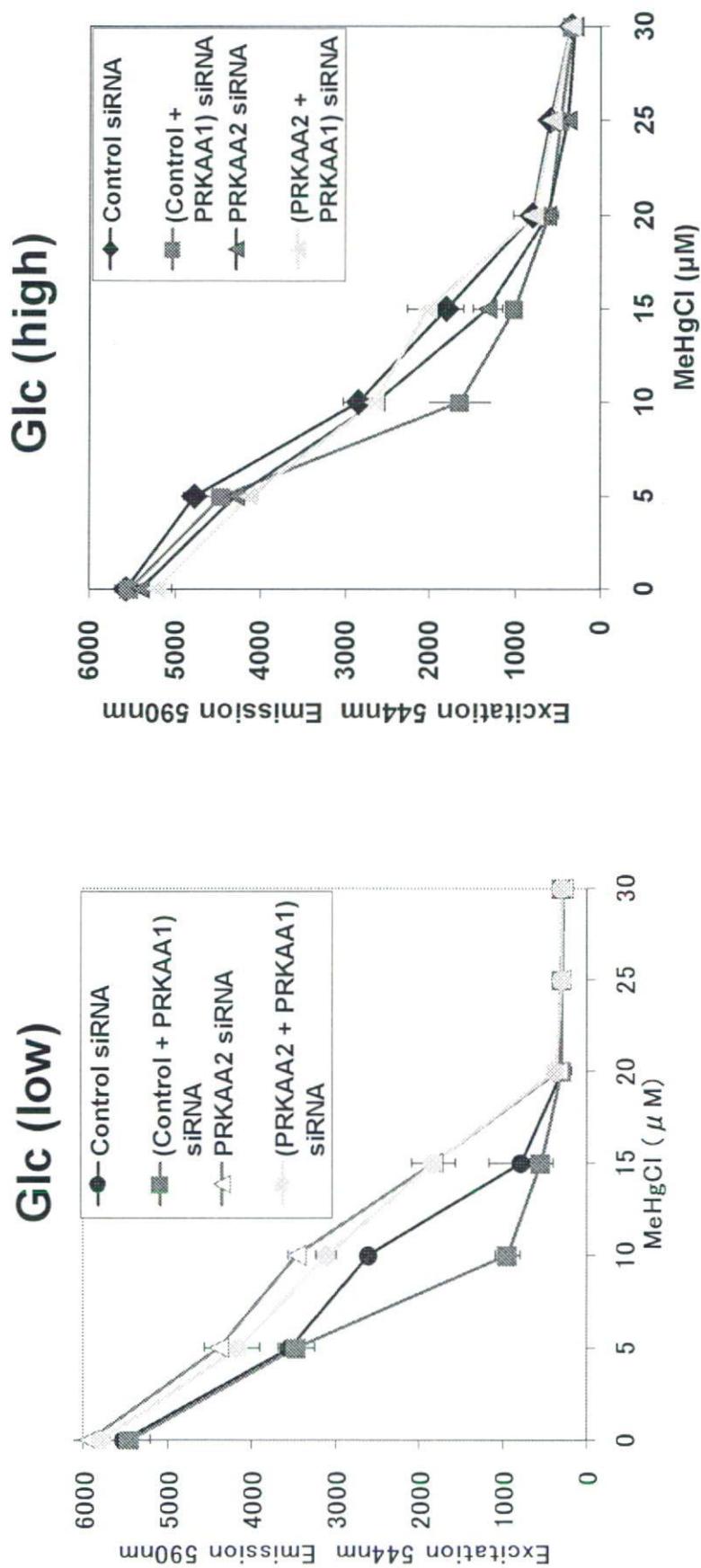
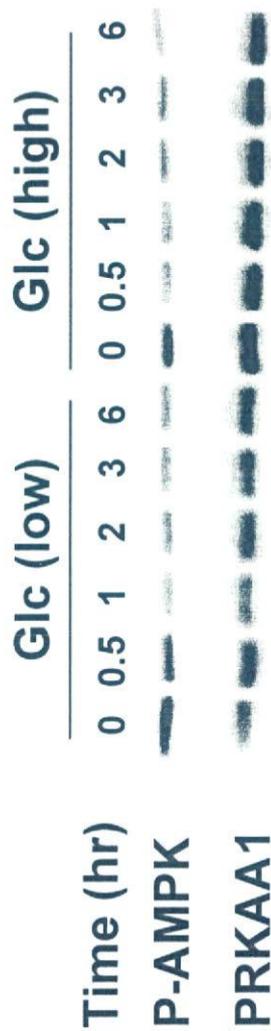


Fig.9 メチル水銀がAMPKのαサブユニットに与える影響

1 × 10⁶ cells となるように各濃度 (5.5, 25 mM) のグルコースを含む培地で培養した Control siRNA または PRKAA2 siRNA 導入細胞を 5 × 10⁵ cells/tube になるように 1.5 ml tubul にとり、960 × g, 2 min で遠心し、上清を取り除いた後に resuspension buffer R 100 μl で懸濁し、siRNA 発現プラスミド 2 mg を添加しエレクトロポレーション法により導入し、2 × 10⁴ cells/96 μl の細胞を 96 well plate 播いた後 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 °C、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。

Glc (low)

Glc (high)

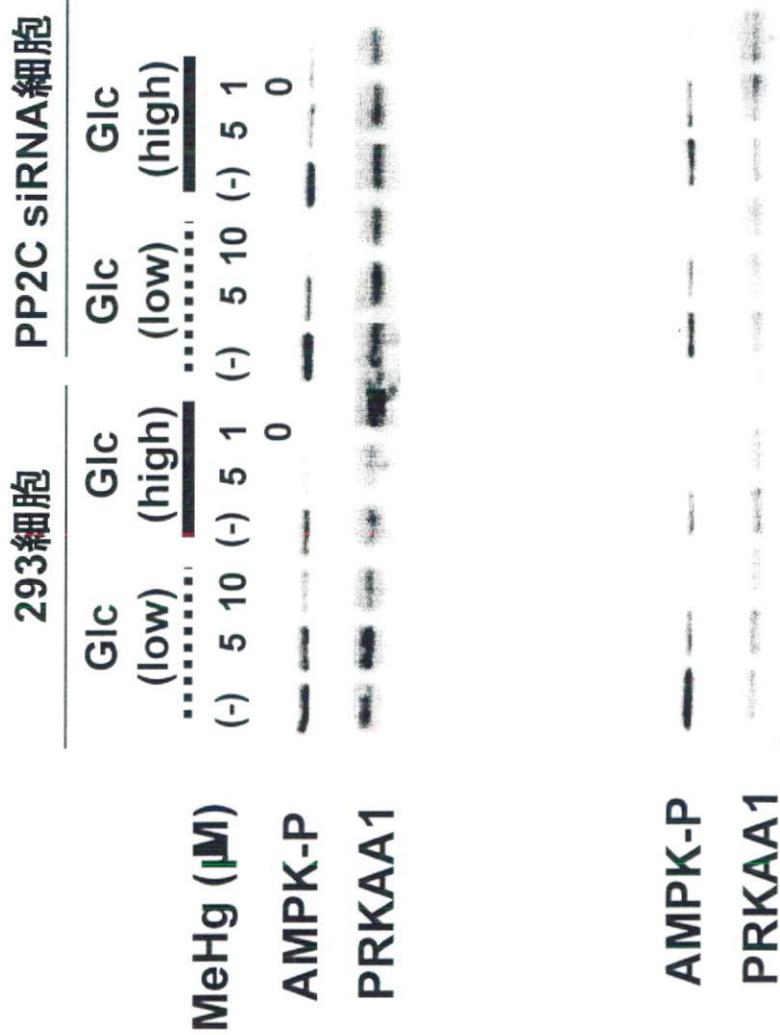


AICA-ribose(AICAR) : AMPK活性化剤

細胞内AMPの増加により、AMPが γ サブユニットに結合することでAMPKがリン酸化する。
→ AICARは細胞内AMP含有量を変えずにAMP類似体として、増加・蓄積によりAMPKをリン酸化する。

AMPKの3量体構造





1×10⁶cellsとなるように各濃度(5.5, 25 mM)のグルコースを含む培地で培養した HEK293細胞またはPP2C siRNA導入細胞を6 well plateに播いた後、各濃度(0, 5, 10 μ M)の塩化メチル水銀で3時間処理し、蛋白質を抽出した後、Immunoblottingによりリン酸化AMPKおよびPRKAA1レベルを検討した。

小

FLJ13570、SHB、PRKAA1

PRP38、CTD-2299I21、EIF5、calmodulin 2、
FBNP1、RP11-473N2、HDAC4、LAMA2、GINS4

DKFZp434B1023、RP11-16O9、FRMD6、
RPIA、RPL36LA、ITCH、NLGN4X

NDUFA4L2、GANAB、SIX3、NKG7、
RP11-447L10、HIP2

大

低濃度メチル水銀処理したメチル水銀未処理の細胞群のシグナル強度

細胞群のシグナル強度

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25種の遺伝子

大

高濃度メチル水銀処理した細胞群のシグナル強度 / メチル水銀未処理の細胞群のシグナル強度

小

SEZ6L、RP11-100F10、CG32736-PA isoform A

OR7C1、REP2、MSI2、PDE1B、AADAT

KIF1C、KREMEN2、CCR2、
CIT987SK-A-61E3、PPPED2、NLGN4Y、
FCRL2、EDH1、LANL、CRSP3

C3HC4、LOC731223

Table.2 発現抑制によりヒト培養細胞にメチル水銀耐性を与えると予想される上位20種の遺伝子

メチル水銀処理/ コントロール	Name	遺伝子 ID No.	Function
0.008822	FLJ13570	NW_927719	No function
0.009495	SHB	NM_003028.1	Src homology 2 domain containing adaptor protein B
0.011581	PRKAA1	NM_006251.5	Alpha 1 catalytic subunit of AMP-activated protein kinase
0.044626	PRP38	NW_922462	Member of the PRP38 family
0.049895	CTD-2299I21	NT_006713	No function
0.051031	EIF5	NT_026437	Eukaryotic translation initiation factor 5
0.05266	calmodulin 2	NM_001743.3	Calmodulin 2 (phosphorylase kinase delta)
0.054346	FNBP1	NT_010194	Formin binding protein 1
0.055874	RP11-473N2	NT_006238.	No function
0.056342	HDAC4	NM_006037.2	Histone deacetylase 4
0.063589	LAMA2	NW_923184	Laminin alpha 2
0.064463	GIN54	NT_007995	GIN5 complex subunit 4
0.070675	DKFZp434B1 023	NW_925473	No function
0.071243	RP11-1609		No function
0.071686	FRMD6	NM_152330.2	Member of the FERM domain (Band 4.1 family) family
0.072102	RPIA	NM_144563.2	Ribose 5-phosphate isomerase A
0.075448	RPL36AL	NM_001001.3	Protein with high similarity to ribosomal protein L42 (S. cerevisiae Rpl42Bp)
0.07753	ITCH	NM_031483.3	Itchy E3 ubiquitin protein ligase (atrophin-1 interacting protein 4)
0.081248	NLGN4X	NW_927700	Neuroigin 4, a member of the neuroigin family
0.083901	NDUFA4L2	NM_020142.3	Protein with high similarity to NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex 4 (mouse Ndufa4)
0.088861	GANAB	NM_198334.1	Alpha glucosidase II (alpha neutral subunit)
0.089756	SIX3	NM_005413.1	Sine oculis homeobox (Drosophila) homolog 3
0.091629	NKG7	NM_005601.3	Natural killer cell group 7 sequence
0.093754	RP11-447L10	NW_921873	No function
0.095326	HIP2	NW_922073	Huntingtin interacting protein 2

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25種の遺伝子

メチル水銀 処理/コント ロール	Name	遺伝子 ID No.	Function
21.35179	SEZ6L	NW_927628	Seizure related 6 homolog (mouse)-like, putative transmembrane signal transduction protein
15.61996	RP11-100F10	NW_926473	No function
12.38929	CG32736-PA, isoform A	NW_921651	No function
11.81508	OR7C1	NM_198944.1	Olfactory receptor family 7 subfamily C member 1
11.7246	REP2	NW_925473	Choroideremia-like (Rab escort protein 2)
11.53846	MSI2	NW_926894	Musashi homolog 2
10.36625	PDE1B	NM_000924.2	Calmodulin-dependent phosphodiesterase 1B
10.24125	AADAT	NW_922217	Amino adipate aminotransferase (kynurenine aminotransferase II),
8.993228	KIF1C	NW_926584.	Kinesin family member 1C
8.883747	KREMEN2	NM_172229.1	Protein with strong similarity to kringle containing transmembrane protein 2 (mouse Kremen2)
8.883314	CCR2	NW_926128	CC chemokine receptor 2
8.725256	CIT987SK-A- 61E3	NW_926151	No function
8.623077	MPPED2	NW_925006	Protein expressed prominently in fetal brain
8.583794	NLGN4Y	NT_011875	Protein with very strong similarity to neuroligin 4 (human NLGN4X)
8.302211	FCRL2	NW_925683	Fc receptor-like protein 2
8.064457	EHD1	NT_033903	EH-domain containing 1
8.06414	LANL	NT_037887	No function
8.017493	CRSP3	NM_015979.2	Cofactor required for Sp1 transcriptional activation subunit 3
7.844358	C3HC4	NW_921618	No function
7.411523	LOC731223	XM_001128868.1	No function

Table 2. 発現抑制によりヒト培養細胞にメチル水銀耐性を与えると予想される上位20種の遺伝子