

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：36102

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K12346

研究課題名（和文）化学物質のToxico-Transcriptome研究

研究課題名（英文）Toxico-Transcriptome study of environmental chemicals

研究代表者

角 大悟（Sumi, Daigo）

徳島文理大学・薬学部・教授

研究者番号：30400683

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、化学物質とスプライシング機構との関連性を明らかにすることについて検討を進めた。その結果、mRNAのスプライシングに関わる因子（SRSF5）を制御することにより、化学物質（亜ヒ酸を中心に）の毒性に関わる因子を同定することができた。同定された因子が転写因子であったことから、本転写因子の下流に位置する遺伝子群のどれが、化学物質の毒性を規定する因子かについて検討が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は、新しい手法による化学物質の毒性関連分子を特定できたことにある。ヒ素化合物を中心に検討を進め、ヒ素の毒性を規定する因子として転写因子FOXO1を見出した。ヒ素による中毒発症は世界的な問題として扱われることから、毒性発現に関わる分子の同定は、学術的・社会的から意義が高い。本法は、農薬や食品添加物など生活に密着している化学物質についても応用可能であり、社会に求められる情報を提供できる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated the relationship between chemical substances and the splicing mechanism. We identified the factor involved in the toxicity of chemical substances (mainly sodium arsenite) by controlling the factor involved in mRNA splicing (SRSF5). Since the identified factor was a transcription factor, it is necessary to investigate which of the genes located downstream of this transcription factor determines the toxicity of the chemical substance.

研究分野：毒性学

キーワード：スプライシング ヒ素化合物 SRSF

1. 研究開始当初の背景

毒性学の研究は、生体に影響を及ぼすような過剰な量の物質が体内に侵入した際の毒物の移動や分布経路を明らかにするトキシコキネティクスと標的部位に到達した物質がどのように毒性を発揮するのかを明らかにするトキシコダイナミクスに分類される。トキシコダイナミクス研究の進展により、各種化学物質の毒性発現機構が明らかとなった。研究代表者は、環境化学物質の毒性発現機構の解明を目指しているが、その中でも特にヒ素化合物について研究を進めている。ヒ素化合物はヒト体内でヒ素メチル基転移酵素 (AS3MT) によるメチル化代謝を受けている。研究代表者はヒト肝がん HepG2 細胞の AS3MT mRNA が選択的スプライシング (Exon3, Exon4 と 5 が欠失された mRNA) を受けていることを見出し、その作用が細胞によって異なること、さらに選択的スプライシングから産生されるタンパク質には活性が欠失していることを検出した。さらに、過酸化水素を曝露した細胞において、AS3MT のスプライシング異常を介した新しいスプライシングバリエント (Exon3~9 が欠失された mRNA) を検出し、これらの細胞ではヒ素に対し感受性が高くなることを見出した。これらの結果から、化学物質の解毒に関わる酵素群の mRNA のプロセッシングが正確に行われているかを検討することは、化学物質の毒性発現を唱える上で重要であると考えた。

一方、トキシコダイナミクス研究を進展させる上で、多くの研究者が化学物質による DNA 修飾に起因した特異な mRNA 発現量の変化を見るために網羅的に mRNA 量を測定する DNA アレイ、またタンパク質発現量の変化を測定するプロテインアレイを使用している。DNA アレイは、化学物質の曝露による mRNA 発現量の変動を解析することが可能である。また、プロテインアレイでは、DNA アレイほど解析できる数はそれほど多くはないが、ウエスタンブロットや ELISA に比べて一度に種々のタンパク質発現量の変化を解析することができる。しかしながら、これらのアレイは対象とする生体高分子の一部を認識するプローブおよび抗体を利用したものであることから、これらの方法では化学物質による mRNA のプロセッシング障害を見抜くことはできない。mRNA のプロセッシング障害を介して産生された不完全長の mRNA およびタンパク質はその機能に異常がある可能性が高く、このことが化学物質の毒性発現に関与していることは否定できない。

2. 研究の目的

DNA から転写された未成熟な mRNA はエキソン部分のみを集約させるスプライシング機能を介して正常な mRNA となる。しかしながら、化学物質により非意図的なスプライシング産物が誘発されてしまうと、不完全長な mRNA、タンパク質の産生を促してしまうために細胞に毒性が生じる可能性は高い。そこで本研究では、『mRNA のプロセッシングのなかでもスプライシング機能が障害を受けることが、化学物質の毒性発現に関わるのではないか』という仮説を掲げ、Toxico-Transcriptome 研究を進め、化学物質の新規毒性発現機構の解明を目的とした。

3. 研究の方法

細胞：ヒト表皮不死化細胞株由来 HaCaT 細胞を使用した。

AS3MT mRNA の選択的スプライシング：細胞から総 RNA を回収して、RT-PCR を行なった。プライマーは AS3MT mRNA を構成するエキソン 2 および 1 1 内で作製したものを使用した。

siRNA 導入：RNAiMAX を用いて HaCaT 細胞に siRNA を導入した。

細胞毒性：alamarBlue 試薬を添加し、吸光度 560 nm で測定した。

mRNA 量の網羅的解析：RNA-seq を用い mRNA 量を測定した。

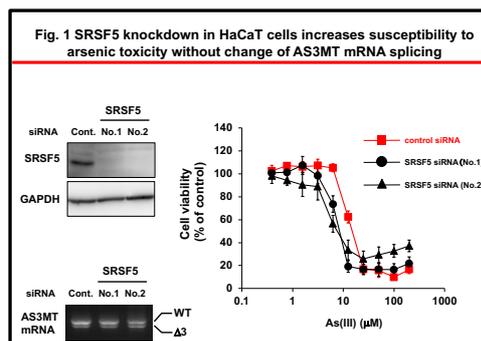
mRNA 量：Realtime-PCR 法で測定した。

タンパク質発現量：Western Blot 法で測定した。

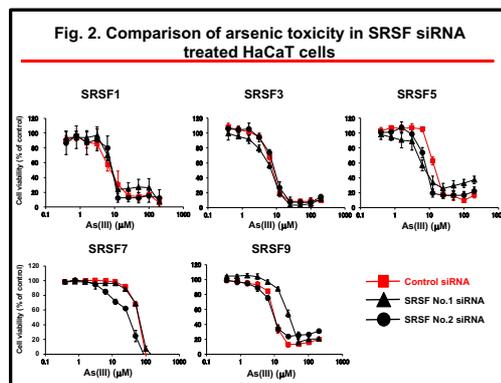
4. 研究成果

(1) SRSF5 発現を抑制した細胞における亜ヒ酸感受性の変化

当研究室では、過酸化水素の添加により AS3MT mRNA のスプライシングに異常が生じ、その際にエキソンを認識する Serine Arginine Rich Splicing factor (SRSF5) が減少していることを見出している。そこで、2 種類の部位が異なる SRSF5 siRNA を導入し、SRSF5 の発現量を抑制した細胞を準備した (Fig.1 左上)。これらの細胞での AS3MT mRNA を検討したところ、SRSF5 siRNA によるスプライシング異常は検出されなかった (Fig.1 左下)。しかしながら、同様の細胞で亜ヒ酸による細胞毒性を alamarBlue 法で検出したと

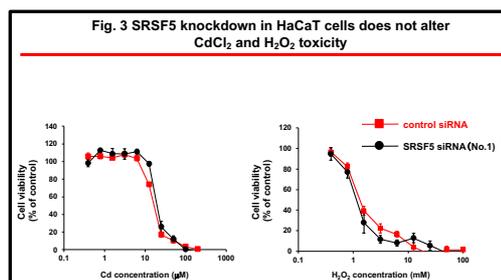


ころ、どちらの siRNA においても、亜ヒ酸に対して感受性が高くなった (Fig.1 右)。ここまでの結果から、SRSF5 の発現量を減少させた細胞では、AS3MT mRNA のスプライシング異常は検出されないものの、亜ヒ酸に対する感受性が亢進することが明らかとなった。一方で、他の SRSF についても検討を進めた。SRSF1,3,7,9 の siRNA を各々細胞に添加し、亜ヒ酸に対する感受性を検討したところ、異なる2つの部位に対する siRNA を用いたところ、SRSF1 と 3 siRNA を導入した細胞では亜ヒ酸に対する感受性に変化を与えなかった (Fig.2)。SRSF7 と 9 に関しては使用した siRNA により異なる反応を示すことがわかった (Fig.2)。これらの結果から、SRSF5 を発現抑制した細胞では、亜ヒ酸に対して感受性が高くなることが明らかとなった。



(2) SRSF5 発現を抑制した細胞におけるカドミウム、過酸化水素感受性の変化

いままでの結果から、SRSF5 siRNA を導入した HaCaT 細胞では、亜ヒ酸に対する感受性が高くなっている。そこで、本項目では、カドミウムや過酸化水素曝露に対する感受性も亢進するかについて検討を進めた。その結果、カドミウム、過酸化水素による細胞毒性は、SRSF5 の発現抑制では変化が見られなかった (Fig.3)。これらの結果から、SRSF5 を発現抑制した細胞における亜ヒ酸に対する感受性の亢進は、亜ヒ酸特異的に見られることが明らかとなった。



(3) RNA-seq による SRSF5 発現抑制細胞における mRNA 量変化の網羅的解析

次に我々は、SRSF5 を発現抑制した細胞における mRNA 量の変化について検討することとした。HaCaT 細胞に異なる2種類の SRSF5 siRNA を各々導入し、48時間後の細胞を回収した。総 RNA を回収し、RNA-seq を用い mRNA 量の変化を control siRNA を導入した細胞と比較した。Control と比較して、SRSF5 siRNA (No.1)によって2倍以上発現量が減少したトランスクリプトは 2345、SRSF5 siRNA (No.2)によって2倍以上発現量が減少したトランスクリプトは 6054 であった。その中から、control siRNA と比較して、No.1 および No.2 で共通して2倍以上発現が低下しており、かつタンパク質の機能が明らかになっている遺伝子群を Table1 に示す。

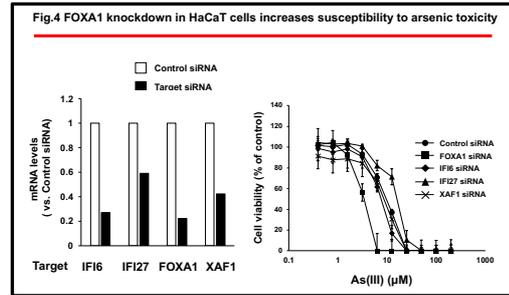
Table.1 Comparison of the levels of mRNA in HaCaT cells treated with SRSF5 siRNA with RNA-seq

Name	No.1 siRNA vs cont siRNA	No.2 siRNA vs cont siRNA	Name	No.1 siRNA vs cont siRNA	No.2 siRNA vs cont siRNA	Name	No.1 siRNA vs cont siRNA	No.2 siRNA vs cont siRNA	Name	No.1 siRNA vs cont siRNA	No.2 siRNA vs cont siRNA
SRSF5-201	-1.151577454	-2.474659505	IF6-201	-2.63796909	-3.250915678	OTUD6B-201	-1.4186249	-1.355116399	NRP2-201	-1.843159875	-1.535812971
SRSF5-202	-1.183790329	-2.53386156	IF6-202	-2.63796909	-3.250915678	OTUD6B-202	-1.246954854	-1.201778175	NRP2-202	-1.542340695	-1.791090237
SRSF5-203	-1.151577454	-2.474659505	IF6-203	-2.63796909	-3.250915678	OTUD6B-203	-1.292535858	-1.18863287	NRP2-203	-1.262099644	-1.76486801
SRSF5-204	-1.252365757	-2.624953012	IF127-205	-1.844579112	-1.085927524	OTUD6B-204	-1.138377273	-1.188357676	NRP2-204	-1.116392365	-1.7897719
SRSF5-205	-1.151577454	-2.474659505	IF127-206	-2.475052747	-2.494005394	OTUD6B-205	-1.4186249	-1.355116399	NRP2-205	-1.266701775	-1.781181755
SRSF5-206	-1.164160363	-2.505039028	IF127-208	-2.82595757	-2.428975107	OTUD6B-206	-1.4186249	-1.355116399	NRP2-206	-1.365057917	-1.559860921
SRSF5-209	-1.184180187	-2.525038809	IF127-209	-2.614453575	-2.218371163	XAF1-201	-2.33976689	-1.588204039	NRP2-207	-1.373325637	-1.505489529
SRSF5-210	-1.084765927	-2.250558338	IF127-210	-2.475052747	-2.494005394	XAF1-202	-2.339928114	-1.400010779	NRP2-208	-1.452192371	-1.981339421
SRSF5-214	-1.269114344	-2.710297406	IF127-211	-2.614453575	-2.218371163	XAF1-204	-2.325874419	-1.607881948	NRP2-209	-1.584959479	-1.567387132
SRSF5-215	-1.114998403	-2.427308138	IF127-212	-2.475052747	-2.494005394	XAF1-205	-1.877492005	-1.41102045	NRP2-210	-1.167817272	-2.026304383
SRSF5-216	-1.23003465	-2.544440909	IF127-213	-2.475052747	-2.494005394	XAF1-213	-1.951492528	-1.485020949	NRP2-211	-1.568168395	-1.793571989
SRSF5-217	-1.151577454	-2.474659505	IF127-214	-2.475052747	-2.494005394	CBS-207	-1.273424832	-1.069986443	NRP2-212	-1.211734759	-2.013095063
SRSF5-218	-1.181366758	-2.733748657	IF127-215	-2.475052747	-2.494005394	CBS-208	-1.366531521	-1.163093226	NRP2-213	-1.192506254	-1.670890153
SRSF5-219	-1.157083721	-2.510996141	IF127-216	-2.651930378	-2.670883012	FOXA1-201	-1.00726841	-1.043043196	NRP2-214	-1.56981986	-1.539020386
ABCC3-201	-1.306062023	-1.706724093	IF127-217	-2.651930378	-2.670883012	FOXA1-202	-1.011173231	-1.2006609	NRP2-215	-1.273426631	-1.739838043
ABCC3-202	-1.233701195	-1.483979859	IF127-218	-2.651930378	-2.670883012	CHAC1-201	-1.724085818	-1.080075987	NRP2-216	-1.536460058	-1.34380989
ABCC3-203	-1.306062023	-1.706724093	IF127-219	-2.651930378	-2.670883012	CHAC1-203	-1.611422478	-1.186770238	NRP2-217	-1.327647422	-2.200748051
ABCC3-204	-1.470372298	-1.827483802	IF127-220	-2.758843411	-2.362760983				SUOX-206	-1.173899244	-1.455876135
ABCC3-205	-1.052026533	-1.44207363	IF127-221	-1.758848866	-1.077365758				SUOX-211	-1.144142335	-1.511017958
ABCC3-206	-1.15143647	-2.057913152	IF127-222	-2.651930378	-2.670883012				SUOX-212	-1.051033007	-1.707414234
ABCC3-207	-1.31257905	-1.70255446	IF127-223	-2.651930378	-2.670883012				SUOX-213	-1.098338685	-1.465214318
ABCC3-208	-1.397298117	-1.75066982	IF127-224	-2.651930378	-2.670883012				SUOX-215	-1.144140037	-1.648517629
ABCC3-209	-1.295453208	-2.14037532	IF127-227	-2.536453247	-2.55540589				SUOX-216	-1.144140037	-1.648517629
ABCC3-210	-1.350048232	-1.874235915							HIVEP3-204	-1.015627042	-1.172083469
ABCC3-211	-1.296634238	-1.881183611							HIVEP3-205	-1.071792567	-1.029345681
ABCC3-212	-1.037229144	-1.422964357							HIVEP3-206	-1.173890219	-1.275305626
ABCC3-213	-1.062529786	-1.477411041									
ABCC3-214	-1.360304593	-1.74538524									
ABCC3-216	-1.444538229	-1.574522736									

RNA-seq のすべての結果は、NCBI の GEO に登録してある (GSE201198)。

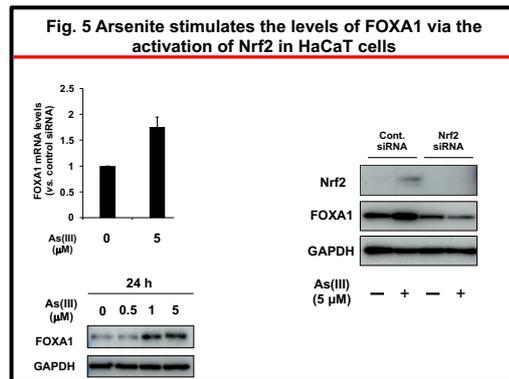
(4) 亜ヒ酸感受性の亢進に関わる因子である FOXA1 の同定

SRSF5 遺伝子発現によって、発現量が減少した遺伝子群 (Table.1) の中から、Forkhead Box A1 (FOXA1)、Interferon- α inducible protein 6 (IFI6)、Interferon- α inducible protein 27 (IFI27)、XIAP associated factor 1 (XAF1) の siRNA を導入した HaCaT 細胞における亜ヒ酸の感受性を control siRNA を導入した細胞と検討・検討した。その結果、FOXA1 siRNA を導入した細胞では、亜ヒ酸の感受性が亢進した (Fig. 4)。



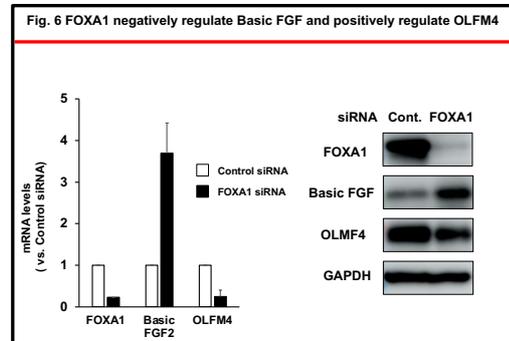
(5) 亜ヒ酸曝露による FOXA1 発現上昇の解析

これまでの結果から、SRSF5-FOXA1 経路が亜ヒ酸の毒性に関係することが明らかとなった。そこで、亜ヒ酸曝露によって FOXA1 発現量が変化するかについて検討した。HaCaT に亜ヒ酸を曝露したところ、FOXA1 の発現量が mRNA、タンパク質ともに上昇することがわかった (Fig. 5 左上: mRNA、左下: タンパク質)。亜ヒ酸曝露により転写因子 Nrf2 が活性化されることにより、ヘムオキシゲナーゼ-1 などの抗酸化タンパク質や異物代謝酵素群の発現が上昇することが明らかとなっている。そこで、亜ヒ酸による FOXA1 発現上昇作用に Nrf2 が関与しているかについて検討した。Nrf2 siRNA を導入した HaCaT 細胞に亜ヒ酸を曝露したところ、Nrf2 の発現抑制に伴い、亜ヒ酸による FOXA1 の発現上昇作用が抑制された。この結果から、亜ヒ酸による FOXA1 の発現上昇に Nrf2 が関与していることが明らかとなった (Fig. 5)。

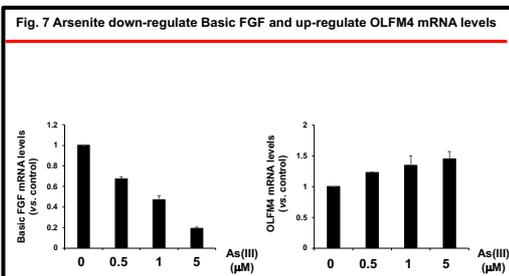


(6) DNA マイクロアレイによる FOXA1 発現抑制細胞における mRNA 量変化の網羅的解析

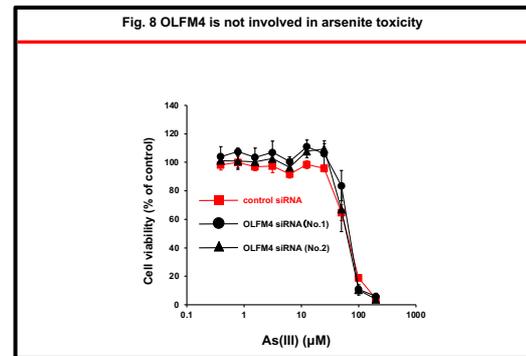
次に我々は、FOXA1 を発現抑制した細胞における mRNA 量の変化について検討することとした。HaCaT 細胞に FOXA1 siRNA を各々導入し、4 8 時間後の細胞を回収した。総 RNA を回収し、DNA マイクロアレイを用い mRNA 量の変化を control siRNA を導入した細胞と比較した。Control と比較して、FOXA1 siRNA によって 2 倍以上発現量が減少したトランスクリプトは 417、2 倍以上減少したトランスクリプトは、494 であった。そのなかで、特に発現量上昇の変化が顕著であった、basic FGF、発現量減少の変化が顕著であった Olfactomedin 4 (OLFM4) について検討を進めた。DNA マイクロアレイで得られた結果が RT-qPCR およびウェスタンブロット法で再現できるかについて検討を進めたところ、FOXA1 siRNA によって basic-FGF の発現量は mRNA、タンパク質ともに上昇し、OLFM4 の発現量は mRNA、タンパク質ともに減少した (Fig. 6)。これらの結果から、FOXA1 は、OLFM4 を正に制御する一方で、basic-FGF は負に制御していることが明らかとなった。



次に亜ヒ酸曝露によるこれらの遺伝子群の変動を検討したところ、亜ヒ酸曝露により OLFM4 mRNA 量が上昇し、basic-FGF の mRNA 量は減少した。これは FOXA1 の発現上昇に伴う反応であることが明らかとなった (Fig. 7)。FOXA1 に正に制御されている OLFM4 が亜ヒ酸毒性に関与しているかについて検討したところ、亜ヒ酸の毒性は、control、OLFM4 siRNA を導入した細胞で変化はなかった (Fig. 8)。以上の結果から、FOXA1 の下流に位置する OLFM4 は亜ヒ酸の毒性には関与しないことが明らかとなった。



本検討により、スプライシング因子の SRSF5 の発現を制御することにより、AS3MT mRNA のスプライシング異常は検出できなかったものの、毒性を規定する因子として FOXA1 を同定するができた。今度、FOXA1 の下流に位置している、亜ヒ酸の毒性を規定する因子の同定に着手したい。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Daigo Sumi, Hiromasa Tsuyama, Tomoko Ogawa, Masatoshi Ogawa, Seiichiro Himeno	4. 巻 412
2. 論文標題 Arsenite suppresses IL-2-dependent tumoricidal activities of natural killer cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Toxicology and Applied Pharmacology	6. 最初と最後の頁 115353
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.taap.2020.115353.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 佐藤友理, 藤永梨緒, 姫野誠一郎, 角大悟
2. 発表標題 亜ヒ酸による細胞毒性に対して防御を担う転写因子FOXA1の同定
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 角 大悟, 藤永 梨緒, 姫野誠一郎
2. 発表標題 ヒ素毒性における転写因子FOXA1の役割
3. 学会等名 衛生薬学・環境トキシコロジー2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 角大悟、高瀬愛、藤永莉緒、姫野誠一郎
2. 発表標題 亜ヒ酸の毒性防御に関わる転写因子FOXA1の同定
3. 学会等名 メタルバイオサイエンス2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 角大悟、高瀬愛、藤永莉緒、姫野誠一郎
2. 発表標題 SRSF5 siRNAノックダウンHaCaT細胞における垂ヒ酸感受性の上昇に關与する因子の探索
3. 学会等名 第47回日本毒性学会学術年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 角 大悟, 高瀬 愛, 姫野 誠一郎
2. 発表標題 スプライシング因子Serine-arginine-rich splicing factor 5は垂ヒ酸の感受性を規定する因子である
3. 学会等名 メタルバイオサイエンス研究会2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高瀬 愛, 角 大悟 , 姫野 誠一郎
2. 発表標題 ヒ素の毒性を規定するスプライシング因子の同定
3. 学会等名 第46回日本毒性学会学術年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 角 大悟 , 姫野 誠一郎
2. 発表標題 ヒ素メチル基転移酵素の選択的スプライシングの研究から同定した新しいヒ素毒性発現機構
3. 学会等名 第49回日本毒性学会学術年会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<http://p.bunri-u.ac.jp/lab10/index.html>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------