

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：17701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23780298

研究課題名(和文) 神経毒性発現機序におけるMARCKSの関与と神経毒性マーカーへの応用

研究課題名(英文) Involvement of MARCKS on methylmercury neurotoxicity and application as a marker for neurotoxicity

研究代表者

白石 光也 (Shiraishi, Mitsuya)

鹿児島大学・獣医学部・准教授

研究者番号：20383656

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：MARCKSは神経細胞の発達と成熟に必須のタンパク質であることから、未だ不明な点が多いメチル水銀毒性発現機序におけるMARCKSの関与を検討した。メチル水銀はSH-SY5Y細胞において細胞生存率の低下を引き起こすと同時に、MARCKS発現量とリン酸化量を変化させることを示し、このリン酸化異常のメカニズムを明らかにした。さらに、メチル水銀中毒モデルラットの脳におけるMARCKSリン酸化の異常を示し、メチル水銀毒性の発現機序にMARCKSが関与していることを示した。

研究成果の概要(英文)：Because myristoylated alanine-rich C kinase substrate (MARCKS) plays an essential role in the differentiation and development of neuronal cells, we studied the alteration of MARCKS expression and phosphorylation in MeHg-induced neurotoxicity of neuroblastoma SH-SY5Y cells and in the rat brain. Exposure to MeHg induced a decrease in cell viability of SH-SY5Y cells, which was accompanied by an alteration of MARCKS phosphorylation and expression. In brain tissue from MeHg-treated rats, abnormal MARCKS phosphorylation was observed. The present study may indicate that alteration in MARCKS has consequences for MeHg-induced neurotoxicity.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：獣医学・基礎獣医学

キーワード：メチル水銀 MARCKS

1 . 研究開始当初の背景

メチル水銀は、代表的な公害病である水俣病の原因化学物質であり、その主要な標的器官である中枢神経系に作用することで神経毒性を発揮する。近年においても、海産物などの食餌由来によるメチル水銀暴露が、特に胎児や乳幼児における神経系の発達・成熟を阻害する可能性が懸念されているが、メチル水銀を含む化学物質による神経毒性の発現機序には今なお未解明の部分が多い。一方、産業的にも新規化学物質の神経毒性評価（スクリーニング）は安全性の確保からも必須の試験であるが、有用な神経毒性マーカーが少ないため、神経毒性評価の経済的・労力的負担が非常に大きいのが現状である。以上のように、化学物質による神経毒性研究・スクリーニングにおける共通した問題点として〔1〕神経毒性発現メカニズムの解明が不十分であること、また〔2〕信頼性の高い神経毒性マーカーが少ないことが挙げられ、この問題解決への社会的な期待が大きくなっている。

Myristoylated alanine-rich C kinase substrate (MARCKS)は、脳の正常な発育に必須のタンパク質であり、神経細胞の構造変化や機能における役割を介して、神経細胞の発達のみならず記憶や学習などの高次脳機能にも深く関与することが報告されている。さらに、アルツハイマー病患者などの脳における MARCKS 発現量・リン酸化量の異常が報告されるなど、中枢神経系疾患との関連も注目されている。これらの知見は、中枢神経系の発達と高次脳機能に MARCKS が深く関与していることを示しているが、毒性学的見地からの MARCKS タンパク質の量的（発現量）または質的（リン酸化）変化の検討はこれまでに行われていない。

神経毒性を持つ化学物質への暴露は、成熟動物における神経系障害を引き起こすだけでなく、胎児や乳幼児における神経系の発生・成熟過程に影響することにより、様々な神経系障害または中枢性疾患の原因・リスクファクターとなる可能性が指摘されている。そのため、化学物質の神経毒性評価（スクリーニング）には、神経細胞の発達・成熟から高次脳機能までに広く関与する分子マーカーを見出すことが重要である。MARCKS は、神経細胞・脳機能への関与が明らかであり、またその機能が発現量のみならずリン酸化によっても制御されるなどの特徴を持つことから、化学物質による MARCKS の量的（発現量）または質的（リン酸化量）な変化を解析することで、高感度かつ信頼性の高い神経毒性評価が可能であると考えられる。

2 . 研究の目的

本研究の目的は、化学物質による神経毒性

研究における問題点である〔1〕神経毒性発現メカニズムの解明が不十分であること、また〔2〕信頼性の高い神経毒性マーカーが少ないこと、を解決することである。そのため本研究期間内で、メチル水銀毒性における MARCKS の関与と動態を *in vitro*（細胞レベル）から *in vivo*（個体レベル）において解析し、神経毒性発現メカニズムにおける MARCKS の役割を明らかにすることを目的とする。また本実験で得られた基礎的知見を応用し、MARCKS の神経毒性マーカーとしての可能性を明らかにする。

3 . 研究の方法

実験 1 . 培養神経細胞株におけるメチル水銀処置の MARCKS への影響：メチル水銀処置が MARCKS に与える影響とその細胞毒性作用との関連を明らかにする目的で、培養神経細胞株（SH-SY5Y 細胞）におけるメチル水銀の処置による細胞生存率、MARCKS タンパク質発現量・リン酸化への影響を観察した。

実験 2 . MARCKS ノックダウンによるメチル水銀神経毒性への影響：RNA 干渉法により MARCKS 発現量を減少させた SH-SY5Y 細胞を用いてメチル水銀による細胞生存率減少への影響を検討した。

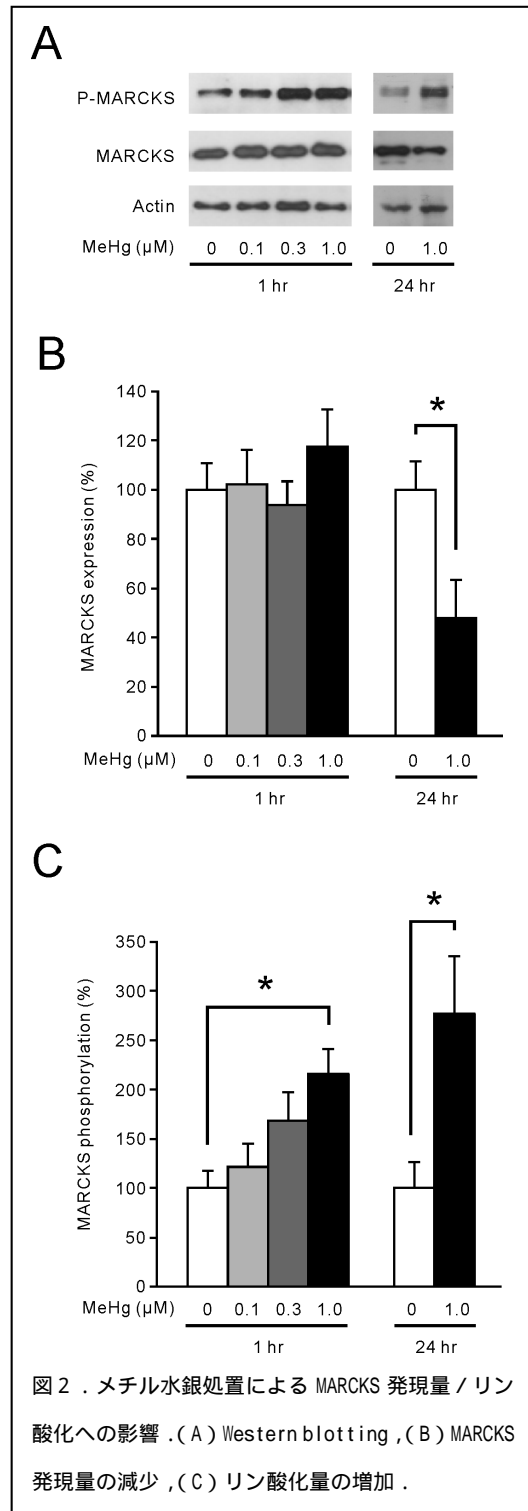
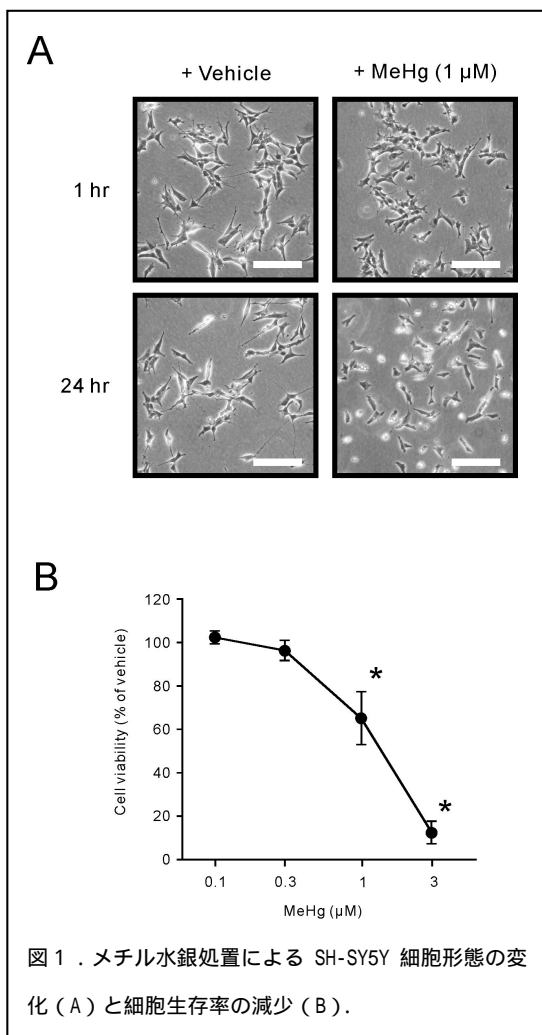
実験 3 . メチル水銀中毒モデルラットにおける脳神経系 MARCKS の変化：Wistar ラットにメチル水銀(40 ppm)を 28 日間給水投与し、メチル水銀中毒モデルラットを作製し、各脳部位における MARCKS 発現量・リン酸化の変化と障害部位との関連を解析した。

実験 4 . その他の化学物質（重金属化合物）および細胞種における MARCKS の変化：メチル水銀以外の重金属および神経細胞以外の細胞種における MARCKS または細胞内 Ca 濃度への影響を観察し、MARCKS の毒性マーカーとしての可能性を検討した。

4 . 研究成果

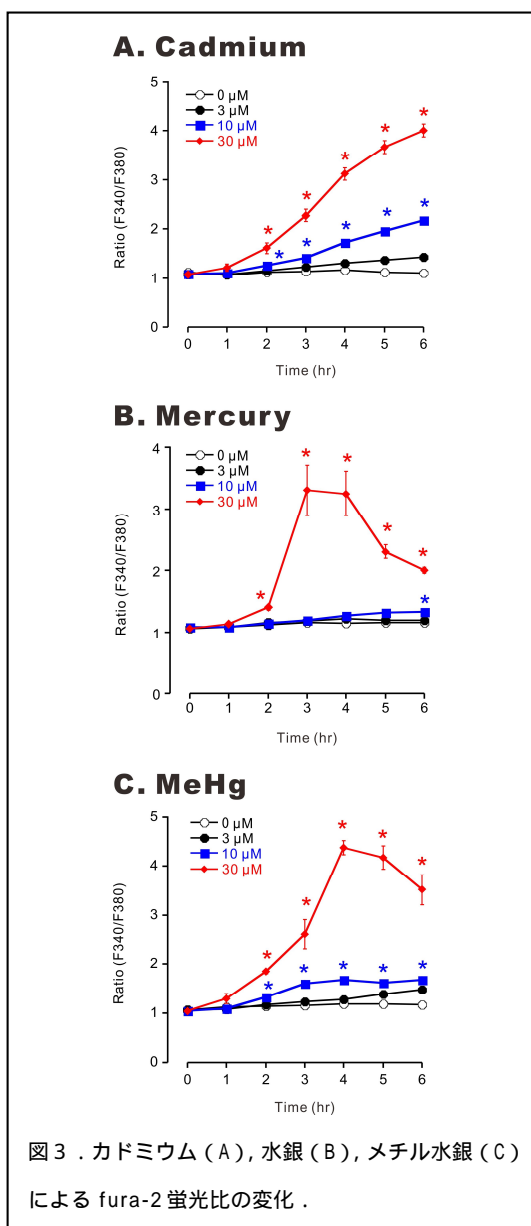
SH-SY5Y 細胞にメチル水銀を処置し、その影響を観察したところ細胞形態の変化と細胞生存率の減少（図 1）に加え、濃度依存的な MARCKS リン酸化量の増加と引き続く発現量の減少が認められた（図 2）。このメチル水銀による MARCKS リン酸化経路に関わるシグナル伝達分子を明らかにするため、各種シグナル伝達経路阻害薬による影響を検討したところ、細胞外 Ca²⁺キレート薬またはプロテインキナーゼ C (PKC) 阻害薬を前処置することにより MARCKS リン酸化が抑制された。また、siRNA により MARCKS をノックダウンさせた細胞では、メチル水銀による細胞毒性（細胞生存率の減少）が増強されていた。さらに、*in vivo* におけるメチル水

銀毒性への MARCKS の関与を明らかにするため、メチル水銀中毒モデルラットの脳における MARCKS の変化を検討したところ、脳の一部の部位において MARCKS リン酸化量の増加傾向と発現量の減少傾向が認められた。以上の結果から、メチル水銀は培養神経細胞内の Ca^{2+} の増加とそれに続く PKC 活性化を介して MARCKS リン酸化の増加と発現量の減少を引き起こしている可能性が示唆された。また、メチル水銀中毒モデルラットの脳組織でも培養細胞と同様の傾向が認められ、メチル水銀毒性の発現と MARCKS との関連性が強く示唆された。さらに MARCKS ノックダウン細胞においてメチル水銀による細胞毒性が増強されていたことから、MARCKS は神経細胞の保護に関与している可能性が示された。



メチル水銀が MARCKS 発現量とリン酸化に影響することが明らかとなり、そのメカニズムの一つとして、メチル水銀による細胞内 Ca 動態への影響が考えられたことから、メチル水銀、塩化水銀、カドミウム処置による細胞内 Ca 濃度への影響を SH-SY5Y 細胞を用いて検討した。メチル水銀、塩化水銀およびカドミウム刺激により明らかな fura-2 蛍光比の上昇が認められた (図 3)。膜透過性の重金属キレート剤である TPEN を刺激 3 時間

後に処置したところ、カドミウム刺激による蛍光比の上昇はほぼ完全に抑制された一方、メチル水銀および塩化水銀による蛍光比の上昇は部分的であった。また、メチル水銀、塩化水銀およびカドミウムによる fura-2 蛍光比の上昇は、細胞外 Ca のキレート剤である EGAT、Ca チャネル阻害薬であるニフェジピンまたは LaCl₃ 前処置により有意に抑制された。以上の結果から、重金属によって刺激された細胞内では Ca 以外の二価陽イオン濃度が変化している可能性が示唆され、また、メチル水銀および HgCl₂ は SH-SY5Y 細胞において Ca 流入と Ca 遊離により細胞内カルシウム濃度の上昇を引き起こすことが明らかとなり、メチル水銀を含む重金属による細胞内二価陽イオン動態の一端を明らかにすることができた。



また、毒性マーカーとしての MARCKS の有用性を検討する目的で、メチル水銀以外の重金属または過酸化水素処置による

MARCKS 発現量およびリン酸化への影響を検討したところ、カドミウムおよび過酸化水素の処置により MARCKS リン酸化の上昇傾向が観察された。一方、鉛では MARCKS 発現量/リン酸化の変化は認められず、マンガンではリン酸化の減少傾向が観察された。重金属による MARCKS への影響は多様であり、今後さらなる検討が必要と考えられた。さらに血管内皮細胞株である EA.hy926 細胞を用いてメチル水銀処置の影響を観察したところ、細胞生存率の減少と MARCKS リン酸化の上昇傾向が観察された。以上の結果より、MARCKS が神経細胞だけでなく、他の細胞種における毒性の発現にも関与している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

1. Mitsuya Shiraiishi, Makoto Hangai, Megumi Yamamoto, Masanori Sasaki, Atsuhiko Tanabe, Yasuharu Sasaki, Atsushi Miyamoto. Alteration in MARCKS phosphorylation and expression by methylmercury in SH-SY5Y cells and rat brain. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 37, 1256-1263 (2014) (査読有)

[学会発表](計 5 件)

1. 大久保正人, 宮本篤, 白石光也. Analysis of intracellular calcium mobilization induced by heavy metals using fura-2 and TPEN in SH-SY5Y cells. 第 87 回日本薬理学会年会, 仙台市, 2014 年 3 月 19 日.

2. Mitsuya Shiraiishi, Makoto Hangai, Megumi Yamamoto, Atsuhiko Tanabe, Atsushi Miyamoto. Alteration of MARCKS Expression and Phosphorylation Levels by Methylmercury. The XIII International Congress of Toxicology, Seoul, Korea, July 2 (2013)

3. 大久保正人, 宮本篤, 白石光也. 重金属による細胞内カルシウム濃度の変化とその特徴. 第 155 回日本獣医学会学術集会, 東京都, 2013 年 3 月 30 日

4. 白石光也, 半谷誠, 佐々木真敬, 宮本篤. メチル水銀の細胞毒性発現における MARCKS の役割. 第 86 回日本薬理学会年会, 福岡市, 2013 年 3 月 22 日.

5. 白石光也, 半谷誠, 佐々木真敬, 宮本篤. メチル水銀による MARCKS リン酸化機序と毒性発現との関連. 第 154 回日本獣医学会学

術集会，盛岡市，2012年9月16日

6．研究組織

(1)研究代表者

白石 光也 (SHIRAIISHI MITSUYA)

鹿児島大学・共同獣医学部・准教授

研究者番号：20383656