

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2015

課題番号：24659301

研究課題名(和文)ヒ素感受性関連遺伝子群の探索と毒性発現・生体防御機構の解明

研究課題名(英文)Functional genetic screening of the genes involved in the arsenite sensitivity

研究代表者

信國 好俊(Nobukuni, Yoshitaka)

広島大学・原爆放射線医科学研究所・准教授

研究者番号：80295641

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ヒ素毒性発現と生体防御機構の解明を目的に、ジーントラップ挿入変異細胞ライブラリーを用いたヒ素感受性関連遺伝子群の探索とその機能解析に取り組んだ。ヒ素感受性低下変異細胞34クローンの解析から、11の感受性関連候補遺伝子(P450関連遺伝子1、シグナル伝達関連遺伝子1、蛋白合成関連遺伝子2、がん関連遺伝子1、機能未同定遺伝子6)を同定した。また、P450酵素系、Wnt/カテニン経路と三酸化ヒ素感受性の関連性を示した。

研究成果の概要(英文)：To clarify the mechanisms underlying the toxicity of arsenite, we conducted a functional genetic screening of the genes involved in the sensitivity to arsenite using the gene trap insertion mutant cells library. From the analysis of 34 mutants showed decreased sensitivity to arsenite, eleven sensitivity-related candidate genes (one P450-related gene, one signaling-related genes, two protein synthesis-related genes, one cancer-related gene, six unidentified function genes) were identified. We also showed that the P450 enzyme system and Wnt / catenin pathway are the determining factors of sensitivity to arsenite.

研究分野：ゲノム機能学、薬毒物学、環境毒性学、内分泌代謝学

キーワード：三酸化ヒ素 薬毒物感受性 薬毒物耐性 抗がん剤耐性 ジーントラップ ゲノム機能 トキシコゲノミクス 責任遺伝子探索

1. 研究開始当初の背景

ヒ素の毒性は古くから知られるが、現在でも地下水の汚染等により地球規模で600万人が慢性中毒を呈し、5,000万人以上がその危険に曝されていると考えられている。一方、亜ヒ酸は急性前骨髄球性白血病に対して顕著な抗がん作用を示し、ヒ素の作用機構と感受性決定因子の解明は、環境衛生学や毒性学のみならず、薬理学上においても重要な課題である。しかし、その標的や感受性決定の分子機構は未だ十分には解明されていない。

近年、random mutagenesis を用いたゲノム機能学的解析法が進み、標的分子や感受性決定の分子機構解明への応用が試みられてきた。ヒ素毒性の研究でも、酵母を用いた研究で、その取り込みに重要な遺伝子(Liu-Z et al., PNAS, 2002)について興味ある報告がなされた。しかし動物細胞では今尚方法論的な難しさがああり、新たな解析方法が求められている。

我々はこれまでに、大規模ジーントラップ挿入変異細胞ライブラリーを用いた機能遺伝子群の系統的解明法の検討と開発を行ってきた。この方法では、ジーントラップ法でランダムに遺伝子を破壊した細胞ライブラリーの中から変異細胞を単離することができれば、変異の責任遺伝子群の解明と同時に、その遺伝子が破壊された細胞を用いた生化学的・細胞生物学的解析が可能になる。

(Nobukuni et al, JBC, 2005、Nobukuni et al, Jpn J Hyg, 2005)。このゲノム機能学的解析方法を用いることで「ヒ素感受性に関与する遺伝子群」を一括して解明することができるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

ヒ素中毒の新たな予防と治療法の開発を目的に、我々が独自に検討・開発を進めてきたジーントラップ挿入変異細胞ライブラリーを用いたゲノム機能学的方法を用いて、ヒ素感受性に関与する遺伝子群のスクリーニングと同定を行う。このヒ素感受性関連遺伝子群の情報を手がかりに、ヒ素の毒性発現機構及びヒ素に対する生体防御機構の解明を目指す。更に、ヒ素に関する本研究を押し進めることで、他の様々な環境有害物質の標的分子や感受性に関与する遺伝子群、生体防御機構の解明を可能とする新たな機能トキシコゲノミクスの解析法を確立する。

3. 研究の方法 (図1参照)

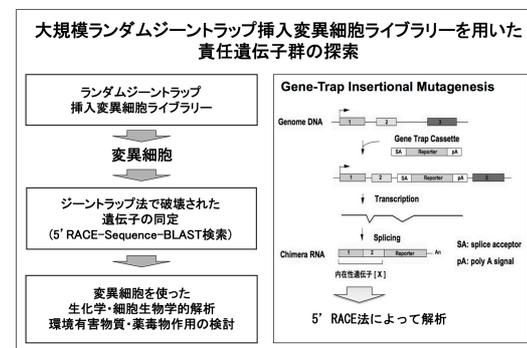
大規模ジーントラップ挿入変異細胞ライブラリーを用いたヒ素感受性関連遺伝子群の探索とヒ素の毒性発現・生体防御機構の解明を以下のステップにより進める。

(1) ヒ素感受性低下(耐性)変異細胞の単離

ジーントラップ挿入変異CHO細胞ライブラリー(Nobukuni et al., JBC, 2005)の中から、As₂O₃の ① 高濃度短時間処理(40 μM, 4 hr)、あるいは ② 低濃度長時間処理(4 μM, 72 hr)でも生き残ってくる細胞を、それぞれヒ素感受性低下(耐性)変異細胞として単離しストックする。

得られた変異細胞株については、ヒ素の細胞内への取り込みの低下や細胞外への排泄の増加、活性酸素産生能の低下、あるいはアポトーシスや細胞障害経路の異常等、ヒ素感受性低下を引き起こしうる様々な異常の変異細胞が含まれてくることが予想・期待される。本申請研究では、数十~100 クローン of ヒ素感受性低下変異細胞の単離を目指す。

(図1)



(2) トラップ(同時に破壊)された遺伝子の解明

得られたヒ素感受性低下細胞の中には、ジーントラップ法でヒ素の取り込みやアポトーシス経路等に異常をきたした種々の変異細胞が含まれていることが予想される。そこで、まず変異細胞からT. RNAを単離し、ジーントラップ法で生じたChimera RNAの内因性遺伝子部分をRT-5' -RACE法で増幅する。シーケンスにより塩基配列を解析し、BLAST検索することで、トラップ(と同時に破壊)されたヒ素感受性に重要と考えられる遺伝子を同定する。

(3) トラップされた遺伝子が「真の責任遺伝子」であることを、miRNA を用いた遺伝子ノックダウンによる正常細胞のヒ素感受性の低下、あるいはヒ素感受性低下変異細胞への野生型 cDNA の遺伝子導入発現によるヒ素感受性の回復を確認することで証明する。

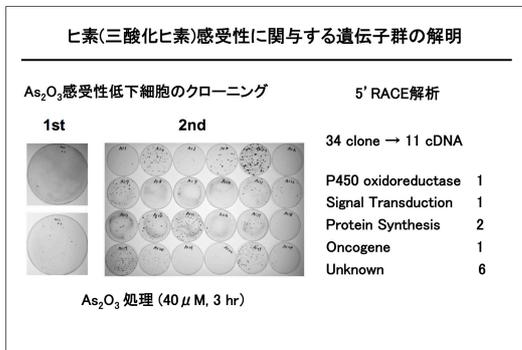
(4) 更に、変異細胞、遺伝子ノックダウン細胞および遺伝子発現細胞のヒ素の取り込み能・排出能、細胞死、酸化ストレス応答を比較検討することで、ヒ素の毒性発現、感受性およびヒ素に対する生体防御機構に関する遺伝子群の解明を進める。

4. 研究成果

(1) ヒ素感受性低下(耐性)変異細胞の単離と責任遺伝子の解明(図2参照)

ジーントラップ挿入変異 CHO 細胞ライブラリー (Nobukuni et al., JBC, 2005)から、2回の三酸化ヒ素処理(40 μ M, 3~4 hr)でも生き残ったヒ素感受性低下変異細胞 34 クローンについて解析を進めた。ジーントラップ法で生じたキメラ RNA の内因性遺伝子部分を RT-5' RACE 法で増幅後塩基配列を決定し、その配列を BLAST 検索することによって、トラップ(同時に破壊)された11個の遺伝子を同定することに成功した。その内訳は、P450 関連遺伝子が1個、シグナル伝達関連遺伝子が1個、蛋白合成関連遺伝子が2個、がん関連遺伝子が1個、機能未同定遺伝子が6個であった。

(図2)

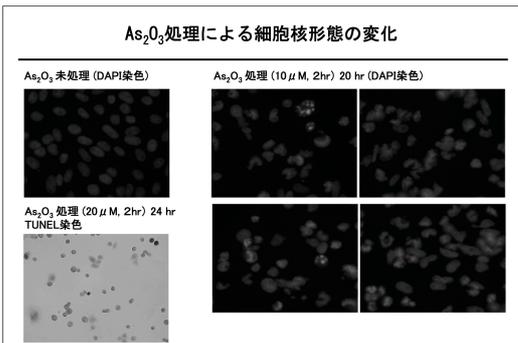


(2) P450 酸化還元酵素(P450 oxidoreductase (POR))の三酸化ヒ素感受性への関与について

上記、三酸化ヒ素感受性低下細胞の1つでP450 酸化還元酵素(POR)がトラップされていたので、その三酸化ヒ素感受性への関与についてmiRNAを用いたPORノックダウン細胞を作製し、検討を行った(図3, 4参照)。

まず、三酸化ヒ素により細胞核の形態変化が観察されたが、これは主に三酸化ヒ素によって誘発される細胞のアポトーシスによるものであるというこれまでの報告を再確認した(図3)

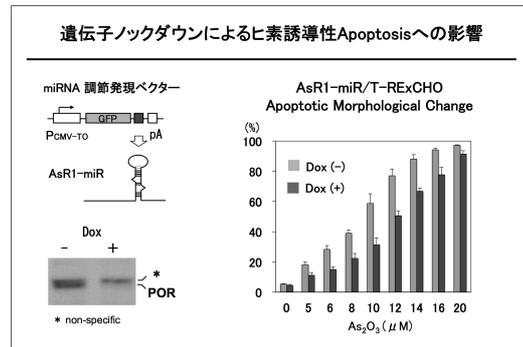
(図3)



次にテトラサイクリン投与によって POR-mRNA に対する miR(microRNA)の発現が誘導される薬剤誘導性 POR ノックダウン細胞を作成した。そしてこの細胞では、テトラサイクリン投与でPOR 蛋白の発現量が減少するとともに、三酸化ヒ素によるアポトーシス性の核の形態変化が軽減する事を確認した(図4)。このことから、POR がヒ素感受性を決定する因子の一つであることを確認した。

POR 蛋白減少による細胞の三酸化ヒ素感受性の低下(耐性化)、三酸化ヒ素によるアポトーシスの減少は、三酸化ヒ素投与で誘発される P450 酵素系での活性酸素種産生の低下によるものと考えている。

(図4)

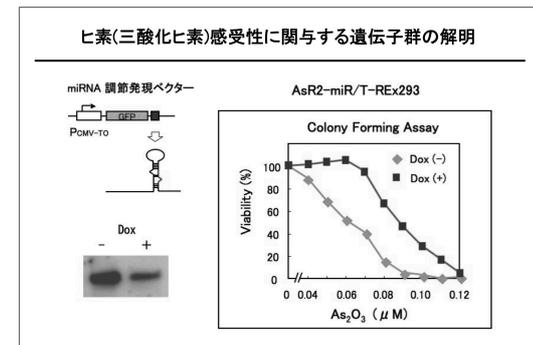


(3) Wnt/カテニン経路の構成蛋白の三酸化ヒ素感受性への関与について(図5参照)

最初我々が AsR2 と命名した、三酸化ヒ素感受性ジーントラップ挿入変異細胞でトラップされていた遺伝子の産物は Wnt/カテニン経路の構成蛋白であることが判明したが、これについてもmiRNA を用いた薬剤誘導性遺伝子ノックダウン細胞を作製し検討を進めた。

miR を用いたテトラサイクリン誘導性ノックダウン細胞では蛋白の発現は~1/4 程度にしか減少できなかったが、それでもコロニー形成による三酸化ヒ素感受性の検討において差が見られ、AsR2 がヒ素感受性を決定する因子の一つである可能性を確認した。

(図5)



(4) ジェントラップ挿入変異細胞ライブラリーを用いた遺伝子探索法の有用性について

今回のヒ素感受性関連遺伝子群探索の結果と、これまでに取り組んできたジフテリア毒素感受性、抗腫瘍活性物質 Agelastatin 感受性、あるいは Amphotericin-B を用いた細胞内コレステロール代謝輸送に関与する候補責任遺伝子群探索結果の比較検討を行った。

その結果、各薬毒物に関与する遺伝子群として、それぞれに全く異なったスペクトラムの遺伝子群が明らかになった。特に、細胞内コレステロール代謝輸送に関与する候補責任遺伝子群(平成 21 年～24 年科研 B 報告)は、細胞への取り込みや細胞内物質輸送、あるいは脂質代謝異常症の原因遺伝子群が明らかになったことから、我々の開発したジェントラップ挿入変異細胞ライブラリーを用いた責任遺伝子探索法は、細胞の表現型あるいはゲノム機能を指標とした機能遺伝子群の探索に有用であると考えられた。

(5) 今回明らかとなった、未だ機能が不明の複数のヒ素感受性関連候補遺伝子の機能、ヒ素感受性への関与とそのメカニズムについては、興味部会研究課題で、今後更なる研究が必要であると考ええる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 11 件)

- ① 信國好俊、升本順子、沼本通孝、鍛冶利幸、好光健彦、抗腫瘍活性物質・薬毒物感受性関連遺伝子群のゲノム機能学的探索法の開発、第 43 回日本毒性学会学術年会、2016 年 6 月 30 日、名古屋
- ② 信國好俊、升本順子、沼本通孝、三酸化ヒ素感受性決定要因の多様性について、第 21 回ヒ素シンポジウム、2015 年 11 月 15 日、徳島
- ③ 信國好俊、升本順子、沼本通孝、好光健彦、抗腫瘍活性物質感受性関連遺伝子群のゲノム機能学的包括的探索法の開発、第 42 回日本毒性学会学術年会、2015 年 6 月 30 日、金沢
- ④ 信國好俊、升本順子、沼本通孝、三酸化ヒ素感受性と発がん性の関連性について、第 85 回日本衛生学会学術年会、2015 年 3 月 27 日、和歌山
- ⑤ 信國好俊、升本順子、沼本通孝、三酸化ヒ素感受性に関与する遺伝子群の探索と毒性発現機構について、第 14 回分子予防環境医学研究会、2015 年 2 月 14 日、大阪
- ⑥ 信國好俊、升本順子、沼本通孝、好光健彦、抗腫瘍活性物質感受性に関与する遺伝子群のゲノム機能学的探索、第 41 回日本毒性学会学術年会、2014 年 7 月 3 日、神戸
- ⑦ 信國好俊、升本順子、三酸化ヒ素毒性発現におけるシトクロム P450 系の関与、第 84

回日本衛生学会学術総会、2014 年 5 月 27 日、岡山

⑧ 信國好俊、升本順子、好光健彦、Agelastatin A 感受性遺伝子群の探索、第 13 回分子予防環境医学研究会、2014 年 2 月 1 日、和歌山

⑨ 信國好俊、升本順子、沼本通孝、三酸化ヒ素感受性に関与する遺伝子群の探索とヒ素誘導性アポトーシスの検討、第 83 回日本衛生学会学術総会、2013 年 3 月 25 日、金沢

⑩ 信國好俊、升本順子、沼本通孝、三酸化ヒ素感受性関連遺伝子群の探索と活性酸素発生機構の検討、第 12 回分子予防医学研究会、2013 年 2 月 2 日、筑波

⑪ 信國好俊、升本順子、沼本通孝、ヒ素感受性に関与する遺伝子群の探索とヒ素誘導性アポトーシスの検討、第 18 回ヒ素シンポジウム、2012 年 11 月 24 日、宮崎

6. 研究組織

(1) 研究代表者

信國 好俊 (Nobukuni Yoshitaka)

広島大学・原爆放射線医科学研究所・准教授

研究者番号：80295641