

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K00555

研究課題名(和文) HiCEP法によるファイリマンゲース肝臓中水銀関連遺伝子群のデータベース作成と同定

研究課題名(英文) Identify and database creation of gene expression related mercury in liver of the small Indian mongoose using HiCEP analysis

研究代表者

寶來 佐和子 (Horai, Sawako)

鳥取大学・農学部・准教授

研究者番号：60512689

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ファイリマンゲース成獣10検体(オス5検体、メス5検体)の肝臓中水銀分析を実施した。水銀濃度の中央値は37.0 ppm(乾重量)、最小値が9.30、最大値が318 ppm(乾重量)であった。次に水銀濃度依存的に発現する遺伝子を明らかにするために、水銀濃度と発現量が正の相関を示した遺伝子を探索した。その結果13種の候補遺伝子を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：Median mercury concentration in liver of 10 adult small Indian mongooses(male and female samples were each five) was 37.0 ppm(dry weight basis)(Min-Max: 9.30-318 ppm DW). Next, we trfind a gene which expresses strong with increase of mercury level in the liver.

研究分野：環境毒性学

キーワード：ファイリマンゲース 水銀 肝臓 HiCEP解析

## 1. 研究開始当初の背景

水銀はグローバルな汚染物質であり、そのリスク評価は現在ハイレベルの国際環境政策課題となっている。その理由として、1950年代に日本における水俣病の発生、1960年から1970年にかけて北欧で有機水銀農薬の散布による汚染、1970年代後半には、南米や東南アジアの国々で苛性ソーダ工場による水銀汚染、1980年代にはアマゾン川流域、ミンダナオ島やスラウェシ島、ピクトリア湖にて金鉱山の水銀汚染等が顕在化していることがあげられる。つまり、社会的関心が高いにもかかわらず、世界における水銀公害は依然として発生している。人間活動による環境中への水銀放出量は年間約 2200 トンと見積もられ、その中で経済発展が著しいアジア諸国の占める割合は 54% である (Pacyna et al. 2006, *Atoms. Environ.*)。また、環境中への水銀放出量は経済発展の速度と明らかに比例していることから (Shi et al. 2010, *Environ. Pollut.*)、今後アジア諸国からの水銀放出量は増加する可能性がある。環境中に放出された水銀は、体内でメチル水銀に変換され、生物濃縮により高次栄養段階の野生生物に高蓄積される。その現象は海洋生態系において顕著であり、多くの海棲哺乳類から高レベルの水銀が検出されている (Horai et al. 2006)。これまで、申請者は外洋性鯨類、カズハゴンドウとスジイルカの肝臓からそれぞれ最高 1240ppm、770ppm (乾重量) の濃度の水銀を検出した。これらのレベルは水俣病患者 (国立水俣病総合研究センター2005, 平成 16 年度成果報告書) やネコ (Eto et al. 2001, *Tohoku J. Exp. Med.*) から検出された濃度をはるかに上回り、毒性が発現してもおかしくない値であった。その一方、水銀を高蓄積する生物種の肝臓は卓越したメチル水銀解毒機構を有していることが指摘されていることから (Ikemoto et al. 2004, *AECT*; Horai et al. 2008, *ET&C*)、野生動物における水銀のリスクを正しく評価するには、脳における毒性影響だけでなく、肝臓のメチル水銀解毒能を理解することも重要となる。なぜなら、メチル水銀毒性の主な標的器官は脳であるが、多くの生物において、肝臓がメチル水銀の解毒・代謝場所であり、水銀高蓄積種の本臓器において、水銀をもっとも高蓄積しているからである。

野生動物の脳を用いた水銀汚染のモニタリングやリスク評価に関する報告は極めて少ないのが現状である。そこでカズハゴンドウとスジイルカの脳を用いてメチル水銀暴露による毒性影響がみられた実験動物 (Sakamoto et al. 2002, *Brain Res.*; Oliveira et al. 2008, *Brain Res.*) と比較したところ、多くの検体で毒性レベルを超過していた。鯨類は化学汚染物質を高蓄積している一方で、実験動物よりも毒性に脆弱であると言われている (立川, 1995)。さらに近年メチル水銀暴露によるヒトを対象とした

疫学調査 (Wigle et al. 2008, *J. Toxicol. Environ. Health B Crit. Rev.*) や実験動物 (Castoldi et al. 2008, *Regul. Toxicol. Pharmacol.*) を用いた研究から、繁殖や胎児の発育や神経発達への影響が懸念されている。そのため、生態系保全や生物種存続のためにも海棲哺乳類を含む野生動物種の水銀毒性評価は重要である。しかし、野生動物種を用いた水銀毒性の *in vivo* 研究は困難で、比較生物学的な毒性影響評価に関する研究例は現在のところ皆無である。以上のことから、海棲哺乳類を含む野生動物種の水銀毒性に対するリスク評価法の確立は急務であると考えた。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、水銀高蓄積種であるフィリマンゲース遺伝子配列のデータベース作成と、本種肝臓における水銀濃度依存的に変化する発現遺伝子の探索である。

## 3. 研究の方法

フィリマンゲース遺伝子配列のデータベース作成と、本種肝臓における水銀濃度依存的に変化する遺伝子の探索に HiCEP (High Coverage Expression Profiling) 法を適用した。本研究のゴールまでの流れは 本種を沖縄本島で捕獲し、水銀分析と Total RNA 抽出のための臓器採取の実施、水銀分析・Total RNA 抽出、HiCEP 解析、データベース作成、水銀濃度依存的に変化する遺伝子の探索と同定であった。

### (1) 試料

2016 年に沖縄で採取されたフィリマンゲース成獣 10 検体 (オス 5 検体、メス 5 検体) の肝臓を実験に供試した。

### (2) 水銀分析

試料をフリーズドライさせた後、粉碎し均一化した。乾燥粉末試料をテフロンバイアルに約 0.1g 秤量し、 $\text{HNO}_3$  を 3.0mL 加え、マイクロウェーブで分解処理した後、Milli-Q 水で約 25g に希釈した。Hg 濃度を CV-AAS (HG-400、平沼産業) で測定した。分析確度は標準試料 Bovine liver 1577b (National Institute of Standards and Technology, USA) および Dogfish Liver (DOLT-4; National Research Council Canada) を用いて確認した。回収率は 100% であった。

### (3) HiCEP 解析

各肝臓組織 30 mg から RNeasy mini kit (QIAGEN) を用いて、total RNA を抽出した。抽出後、分光光度計を用いて濃度を測定した。HiCEP 解析は (独) 放射線医学総合研究所研究基盤センター研究基盤技術部に委託した。

## 4. 研究成果

### (1) 水銀濃度

10 検体肝臓中総水銀濃度を表 1 に示す。中央値が 37.0 ( $\mu\text{g/g}$  乾重量)、最小値および最大値がそれぞれ 9.30、318 であった。濃度に性

表1 フイリマングース成獣における  
総水銀濃度(μg/g dry wt.)

| サンプルID | 濃度   |
|--------|------|
| #1     | 26.1 |
| #13    | 9.30 |
| #14    | 18.7 |
| #17    | 46.0 |
| #20    | 27.9 |
| #22    | 318  |
| #23    | 220  |
| #3     | 134  |
| #6     | 150  |
| #9     | 22.9 |
| Median | 37.0 |
| SD     | 105  |

差はみられなかった。

(2) HiCEP 解析

これらの水銀濃度をもとに、HiCEP 解析によって水銀濃度依存的に発現が上昇する遺伝子を探索した。その結果、候補遺伝子を含め 13 遺伝子を得ることができた(表 2)。今後の展開として、これらをもとに水銀代謝に関与する新たな遺伝子の発見を目指す。

表2 HiCEP法によるシーケンスの結果

| OVC No. | primer | peakid | size (22-1) | size (22-2) | 分取シーケンス配列* | 分取シーケンス配列 | Query NN-nn | Subject 配列 | Subject Length | Subject NN-nn | ACCESSION      | DEFINITION  |
|---------|--------|--------|-------------|-------------|------------|-----------|-------------|------------|----------------|---------------|----------------|---|
| 1       | AA-gg  | 226    | 332.55      | 332.47      | CGGAANT    | CGGAANT   | AA-gg       | GAACGG     | 291            | xx-xx         | CT954305.14    | N.leuconemys DNA sequence from clone CHZ71-269B20, complete sequence  |
| 2       | GA-ag  | 176    | 222.14      | 222.12      | CGGGAAG    | CGGGAAG   | GA-ag       | no hit **  | -              | -             | NG_028911.1    | Homo sapiens follistatin (FST), RefSeqGene on chromosome 5  |
| 3       | AC-gg  | 302    | 636.33      | 636.38      | CGGACAA    | CGGACAA   | AC-xx       | CGGACAA    | 382            | AC-xx         | XM_006927554.2 | PREDICTED: Felis catus transmembrane emp24 protein transport domain containing 7 (TMED7), partial mRNA                              |
| 4       | AA-ta  | 147    | 201.57      | 201.59      | CGGAAC     | CGGAAC    | AA-ta       | GAACATA    | 172            | xx-ta         | XM_013052341.1 | PREDICTED: Mustela putorius furo ATPase type 13A3 (ATP13A3), mRNA   |
| 5       | AC-cc  | 188    | 222.58      | 222.6       | CGGACCC    | CGGACCC   | AC-cc       | GCCTCT     | 181            | xx-cc         | XM_005600228.1 | PREDICTED: Equus caballus inhibitor of DNA binding 2, dominant negative helix-loop-helix protein (ID2), transcript variant X2, mRNA |
| 6       | GA-ag  | 277    | 440.51      | 440.52      | CGGGAGC    | CGGGAGC   | GA-ag       | CGGGAGC    | 401            | GA-xx         | XM_003998602.3 | PREDICTED: Felis catus Schwachman-Bodian-Diamond syndrome (SBDS), mRNA  |
| 8       | GA-ca  | 320    | 577.44      | 577.43      | CGGGAGC    | CGGGAGC   | GA-xx       | CGGGAGC    | 399            | GA-xx         | AF09546.1      | Felis catus fibrinogen A-alpha chain gene, partial cds  |
| 9       | GA-ac  | 319    | 522.91      | 522.88      | CGGGANG    | CGGGANG   | GA-xx       | AAAACGTG   | 123            | xx-xx         | XM_007074288.1 | PREDICTED: Panthera tigris atalaca 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate synthase 2 (PAPSS2), mRNA                                  |
| 11      | AA-ca  | 229    | 467.97      | 468.06      | CGGAAAN    | CGGAAAN   | AA-ca       | CGGAAATC   | 443            | AA-ca         | XM_00398918.3  | PREDICTED: Felis catus nascent polypeptide-associated complex alpha subunit (NACA), mRNA  |
| 12      | AA-cc  | 219    | 267.27      | 267.24      | CGGGAAG    | CGGGAAG   | AA-cc       | no hit **  | -              | -             | -              | -   |
| 18      | GG-cg  | 274    | 481.61      | 481.54      | CGGGGGN    | CGGGGGN   | GG-xx       | no hit **  | -              | -             | -              | -   |
| 19      | AT-tt  | 265    | 378.88      | 378.71      | CGGATCT    | CGGATCT   | AT-tt       | GATCTTGG   | 326            | xx-xx         | NG_031860.1    | Homo sapiens mediator complex subunit 23 (MED23), RefSeqGene on chromosome 6  |
| 20      | GG-tg  | 229    | 658.37      | 658.35      | CGGGGCC    | CGGGGCC   | GG-xx       | GATCTTGG   | 326            | xx-xx         | NG_007086.2    | Homo sapiens arginase 1 (ARG1), RefSeqGene on chromosome 6  |
| 21      | GG-ta  | 153    | 205.31      | 205.32      | CGGGGGC    | CGGGGGC   | GG-ta       | GGGACTG    | 272            | xx-xx         | XM_011280454.1 | PREDICTED: Felis catus Nedk4 family interacting protein 2 (NDFIP2), transcript variant X2, mRNA                                     |
|         |        |        |             |             |            |           |             | CTCCCT     | 166            | xx-ta         | XM_004419462.1 | PREDICTED: Ceratotherium simum sinum transforming growth factor, beta receptor II (70,80kDa) (TGFB2), mRNA                          |

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

1. Horai, S., Nakashima, Y., Nawada, K., Watanabe, I., Kunisue, T., Abe, S., Yamada, F., Sugihara, R.: Trace element concentrations in the small Indian mongoose (*Herpestes auropunctatus*) from Hawaii, USA. *Ecological Indicators* (2018) 91, 92-104. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2018.03.058> 査読有
2. Furukawa, T., Shinsato, Y, Komatsu, M, Minami, K, Yamamoto, M., Kawahara, K. (2018) ATP7B is involved in the doxorubicine relocalization from nuclei to late endosome and anticancer agent resistance., *Cancer Sci.* 109, pp355. 査読有
3. Moinuddin, FM, Hirano, H, Shinsato, Y, Higa, N, Arita, K, Furukawa, T (2017) ATP7B expression in human glioblastoma is related to temozolomide resistance. *Oncol. Lett.*, 14, 7777-7782. DOI: 10.3892/ol.2017.7249 査読有
2. Takeda, N., 4. Horai, S., Tamura, J.: Facile analysis of contents and compositions of the chondroitin sulfate/dermatan sulfate hybrid chain in shark and ray tissues. *Carbohydrate Res.* (2016) 424: 54-58. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2016.02.006> 査読有
5. Masamoto, I., Yoshimitsu, M., Kuroki, A., Horai, S., Ezinne, C.C., Kozako, T., Hachiman, M., Kamada, Y., Baba, M., Arima, N.: Clinical significance of CD70 expression on T cells in human T-lymphotropic virus type-1 carriers and adult T cell leukemia/lymphoma patients. *Leukemia & Lymphoma* (2016) 57: 685-691. <https://doi.org/10.3109/10428194.2015.1063140>. 査読有
6. Moinuddin, FM, Shinsato, Y, Komatsu, M, Mitsuo, R, Minami, K, Yamamoto, M., Kawahara, K, Hirano, H, Arita, K, Furukawa, T (2016) ATP7B expression confers multidrug resistance through drug sequestration. *ONCOTARGET*, 7, 22779-22790. DOI:10.18632/oncotarget.8059 査読有  
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔学会発表〕(計 2 件)

ハワイ産フイリマンゲース (*Herpestes auropunctatus*) を用いた微量元素モニタリング

**竇來佐和子**, 中島佑輔, 縄田佳那恵, 渡邊 泉, 阿部慎太郎, Robert Sugihara  
第 25 回環境化学討論会、新潟、2016 年 6 月 (口頭)

Environmental monitoring for trace elements in Hawaii Islands using the small Indian mongoose (*Herpestes auropunctatus*).

**Sawako Horai**, Yusuke Nakashima, Shintaro Abe, Izumi Watanabe, Fumio Yamada, Robert Sugihara  
SETAC North America 37<sup>th</sup> Annual Meeting, 6-10 Nov. 2016, Orland, FL, USA. (ポスター)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年月日 :  
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
取得年月日 :  
国内外の別 :

〔その他〕  
なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

竇來佐和子 (HORAI, Sawako)  
鳥取大学・農学部・准教授  
研究者番号 : 60512689

### (2) 連携研究者

古川龍彦 (FURUKAWA, Tatsuhiko)  
鹿児島大学・医学部・教授  
研究者番号 : 40219100

### (3) 連携研究者

山本雅達 (YAMAMOTO, Masatatsu)  
鹿児島大学・医学部・助教  
研究者番号 : 40404537