

令和 4 年 5 月 16 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06404

研究課題名(和文) 有害金属の発達神経毒性におけるMARCKSタンパク質の関与とその役割

研究課題名(英文) Role of MARCKS protein on developmental neurotoxicity of toxic metals

研究代表者

白石 光也 (Shiraishi, Mitsuya)

鹿児島大学・農水産獣医学域獣医学系・教授

研究者番号：20383656

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：中枢神経系の発達に必須のタンパク質であるMARCKSは、メチル水銀による毒性の発現に関与することが報告されている。本研究では、分化誘導した培養神経細胞に対する各種有害金属の毒性、およびMARCKSの関与とその制御機構について解析した。その結果、MARCKS発現量やリン酸化状態の変化がその毒性発現機構に重要である可能性を示した。さらに、メチル水銀以外の重金属による毒性にもMARCKSが広く関与していることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

有害金属による健康被害は近年においても国際的な懸念事項である。本研究で、分化誘導した培養神経細胞においてMARCKSがその毒性に広く関与することを明らかにした意義は高い。また本研究で提示された培養神経細胞の分化誘導法およびMARCKSの機能解析手法は、重金属毒性を含む神経学的研究の発展において非常に有用であることを示した。

研究成果の概要(英文)：MARCKS is an essential protein for the development of the central nervous system, and has been reported to be involved in the toxic mechanisms of methylmercury. In this study, we analyzed the involvement of MARCKS in the toxic mechanisms of various heavy metals on differentiated cultured neuronal cells. We showed that changes in MARCKS expression level and phosphorylation state may be important for the mechanism of heavy metal toxicity. Furthermore, it was clarified that MARCKS is widely involved in the toxicity caused by heavy metals other than methylmercury.

研究分野：基礎獣医学

キーワード：重金属 培養神経細胞 MARCKS 分化誘導

1. 研究開始当初の背景

有害金属は自然環境中を循環しており、ヒトや家畜、野生動物を含む生物は常に有害金属に暴露されている。米国有害物質疾病登録局 (ATSDR) による有害化学物質の“Priority List (2017)”において有害金属 (ヒ素・鉛・水銀・カドミウム) は最上位にランクされており、その健康影響は国際的に重大な問題として認識されている。特に中枢神経系の発育期における有害金属への暴露が、アルツハイマー病や注意欠陥・多動性障害など中枢神経系疾患のリスクファクターとなっている可能性が懸念されている。

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、神経細胞の構造や機能における役割を介して、神経細胞の成熟に深く関与している。近年、アルツハイマー病やパーキンソン病など中枢神経系疾患モデル動物および患者の脳において **MARCKS** リン酸化の亢進が報告されるなど、その病態生理学的な役割が注目されている。代表的な有害金属であるメチル水銀により、培養神経細胞および中毒モデル動物の脳において **MARCKS** リン酸化を引き起こすことが報告され、メチル水銀毒性による中枢神経障害に **MARCKS** が関与することが示唆されている。有害金属は、その金属種や暴露形態により特徴的で多彩な毒性発現機序を示すことが知られている。また、脳の発育期は化学物質への高い感受性を示すが、特に有害金属の影響については研究が不十分である。

2. 研究の目的

有害金属の発達神経毒性を広範かつ俯瞰的に理解するためには、神経細胞が発育・成熟過程を示す実験条件およびモデル動物を用いて解析する必要がある。さらに、近年その病態生理学的な役割が注目されている **MARCKS** について、メチル水銀以外の有害金属毒性への関与は未解明であり、これを明らかにすることは有害金属への暴露と中枢神経系疾患との関連を明らかにするためにも重要である。

そこで本研究では、代表的な有害金属 (ヒ素、鉛、水銀、カドミウム) による発達神経毒性の発現機序について、特に神経細胞の発育・成熟過程における影響と **MARCKS** との関連に注目し、**in vitro** および **in vivo** における毒性学的影響とその科学的背景を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

細胞培養：ヒト神経芽細胞腫由来の **SH-SY5Y** 細胞は、**10%** 牛胎児血清 (**FBS**) を添加した **DMEM/Ham's F-12** 培地で培養し、継代数が **15** 以下の細胞を実験に用いた。

細胞生存率の測定：**96** 穴マイクロプレートに播種した **SH-SY5Y** 細胞に、各種重金属を処置した。細胞生存率への影響は、**Cell Counting Kit-8 (Dojindo)** を用いて測定した。吸光度 (**450 nm**) の測定にはマイクロプレートリーダー (**Infinite M200 FA, TECAN**) を用いた。

細胞周期解析：**35mm-dish** に播種した **SH-SY5Y** 細胞は、**Accutase (nacalai tesque)** を用いて剥離した。剥離した細胞を **4%** パラホルムアルデヒドにより固定し、**PI staining solution (Dojindo)** を用いて **propidium iodide** により染色した。フローサイトメーター (**FACSVerse, BD**) を使用してレチノイン酸処置による細胞周期への影響を解析した。

Western blot 法：**35mm-dish** に播種した **SH-SY5Y** 細胞より作製した泳動用サンプルは、**SDS-PAGE** (常法) および **Phos-tag** を用いた電気泳動の後、**PVDF** メンブレンに転写し、各種特異的抗体を用いて標的タンパク質を検出した。検出したバンドは、デンシトメトリー (**Scion Image, Scion Corporation**) により解析した。

4. 研究成果

低濃度 **FBS (1%)** の存在下で分化誘導刺激としてレチノイン酸を最大 **7** 日間処置した **SH-SY5Y** 細胞では、神経突起の増加と伸長が位相差顕微鏡観察により認められた。このレチノイン酸を処置した発達神経細胞モデルにおけるメチル水銀の影響を検討したところ、レチノイン酸未処置群 (未分化型 **SH-SY5Y** 細胞) と比べメチル水銀による細胞生存率の低下が有意に増強されていた。この結果は、メチル水銀が分化過程にある神経細胞により強く毒性を示す特徴を反映したものと考えられた。一方、レチノイン酸処置による細胞周期への影響をフローサイトメトリーにより解析したところ、レチノイン酸による分化誘導刺激は **SH-SY5Y** 細胞の細胞周期 (**G₀/G₁, S, G₂/M** 期の割合) に影響しなかった。このことから、レチノイン酸によるメチル水銀毒性の増

強に細胞周期の変化は関与しないと考えられた。また、**SH-SY5Y** 細胞へのレチノイン酸処置により **MARCKS** 発現量の減少、およびリン酸化 **MARCKS** 量の顕著な上昇が認められたことから、この **MARCKS** の変化がメチル水銀に対する感受性の増加に関与している可能性が示唆された。

分化過程にある神経細胞へのメチル水銀毒性および **MARCKS** タンパク質の関与をさらに評価するため、**SH-SY5Y** 細胞を用いた新たな発達神経細胞モデルの作成と評価を実施した。**SH-SY5Y** 細胞の分化誘導刺激として、レチノイン酸に加えて脳由来神経栄養因子、**dibutyl-cAMP** および神経細胞専用培地を使用した。分化誘導から **21** 日後の細胞形態を位相差顕微鏡で観察したところ、高度に発達した神経突起の形成が確認できた（図1）。

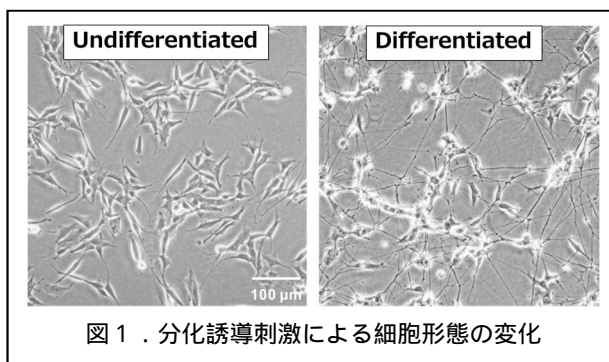


図1．分化誘導刺激による細胞形態の変化

また、**Western blot** 法により成熟神経細胞マーカータンパク質である **Synaptophysin**、**GAP43**、 β -**tubulin**、**MAP2** 発現量を検討したところ、分化誘導細胞において各タンパク質の発現量増加が認められ、本法により **SH-SY5Y** 細胞が高度に分化誘導されていることが確認できた（図2）。

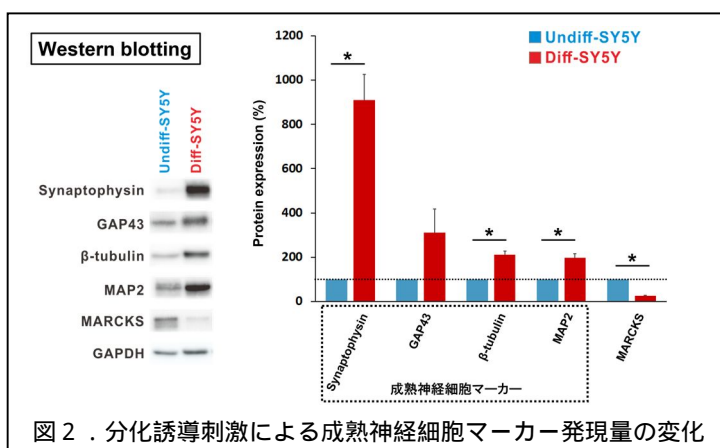


図2．分化誘導刺激による成熟神経細胞マーカー発現量の変化

一方、**MARCKS** タンパク質については、発現量の低下が認められた。以上の結果から、レチノイン酸を含む複数の分化誘導刺激により **SH-SY5Y** 細胞が高度に発達および成熟した神経細胞に分化しており、発達および成熟神経細胞の **in vitro** モデルとして有用であると考えられた。本モデルにおいて、メチル水銀刺激による **MARCKS** 発現量およびリン酸化への影響を検討したところ、形態学的な神経突起の減少と同時に、**MARCKS** 発現量の減少およびリン酸化の上昇傾向が認められた。

分化過程にある神経細胞への各種重金属の影響とそのメカニズムを検討するため、**SH-SY5Y** 細胞を用いて発達神経細胞モデルを作製し、メチル水銀、塩化水銀、カドミウム、ヒ素、マンガン、鉛処置による細胞毒性の評価とその毒性メカニズムを解析した。分化誘導刺激としてレチノイン酸を最大7日間処置して作製した分化型 **SH-SY5Y** 細胞では、メチル水銀、塩化水銀、ヒ素による細胞生存率の低下が未分化型 **SH-SY5Y** 細胞と比較して有意に増強されていた（図3）。

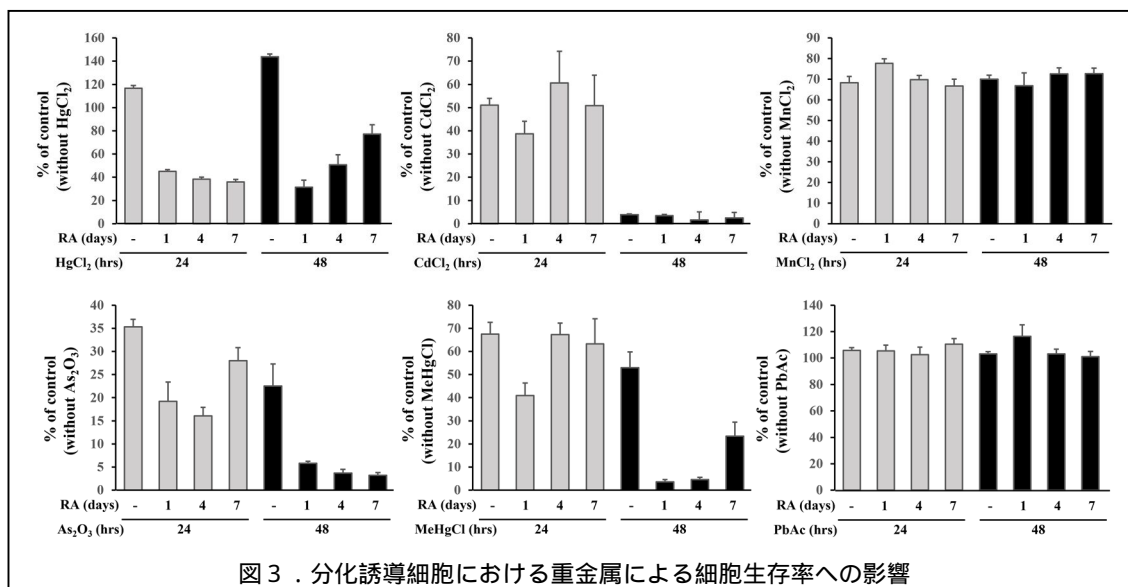


図3．分化誘導細胞における重金属による細胞生存率への影響

また、分化誘導細胞で認められた毒性作用の増強は、レチノイン酸の処置日数によりその程度に差が認められた。各種重金属による細胞毒性メカニズムにおける **MARCKS** タンパク質の関与

を解析する目的で、**MARCKS** の **N** 末端と相同の配列を有し **MARCKS** 機能を阻害する作用を持つ **MANS** ペプチドを用いてその影響を観察した。**MANS** ペプチドの前処置により、塩化水銀、カドミウム、ヒ素による細胞生存率の低下が有意に増強された (図 4)。

さらに **MARCK** の各種重金属毒性における関与を検討するため、**siRNA** により **MARCKS** 発

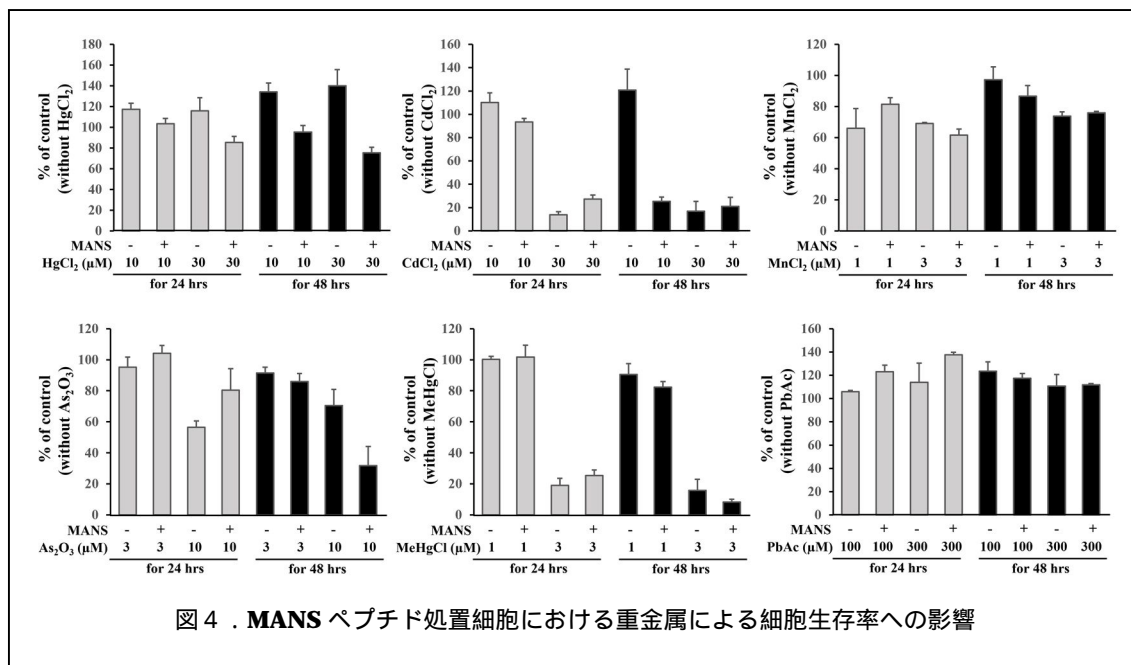


図 4 . **MANS** ペプチド処置細胞における重金属による細胞生存率への影響

現量を減少させた **SH-SY5Y** 細胞 (**MARCKS** ノックダウン細胞) では、メチル水銀およびヒ素による細胞生存率の低下が増強されていたが、塩化水銀ではその毒性作用の減弱傾向が観察された。以上の結果から、分化誘導細胞において一部重金属の毒性作用が増強されており、このメカニズムを明らかにすることは重金属の発達神経毒性の解明に重要であると考えられた。また、**MANS** ペプチド処置および **MARCKS** ノックダウン細胞では、重金属毒性の増強作用が認められたが、一部重金属では減弱作用も観察されたことから、重金属毒性の発現機序および保護機構において **MARCKS** が多彩な役割を果たしている可能性が示唆された。

細胞分化やメチル水銀毒性における **MARCKS** の役割をさらに解明するため、**MARCKS** の新規リン酸化部位特異的抗体を作製しその特異性の検討を実施したが、良好な結果は得られなかった。そのため、**MARCKS** の包括的なリン酸化を解析可能な、**Phos-tag** を用いた電気泳動法の基礎的検討を行った。**MARCKS** のリン酸化に関わることが知られているプロテインキナーゼ **C** を活性化する **PMA** 刺激、および生理活性物質である **bradykinin** 刺激を行った **SH-SY5Y** 細胞では、**MARCKS** 由来の複数のバンドが **Western blot** 法により確認され、特異的リン酸化抗体によらない **MARCKS** リン酸化解析法として有用であることが示された。

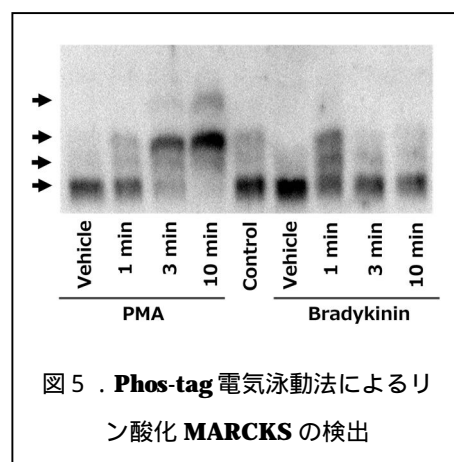


図 5 . **Phos-tag** 電気泳動法によるリン酸化 **MARCKS** の検出

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 牧野 遥、正谷 達膳、藤本 佳万、内藤 清惟、白石 光也
2. 発表標題 未分化型および分化型ヒト由来培養神経細胞におけるウイルス感受性の比較
3. 学会等名 第164回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------	---------