

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 16 日現在

機関番号：36102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659059

研究課題名(和文)ヒ素の毒性発現を規定するヒ素メチル基転移酵素の選択的スプライシング

研究課題名(英文)Alternative splicing of arsenic methyltransferase regulate arsenic toxicity

研究代表者

角 大悟 (Sumi, Daigo)

徳島文理大学・薬学部・准教授

研究者番号：30400683

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：無機ヒ素のメチル化代謝に関わるヒ素メチル基転移酵素(AS3MT)mRNAの選択的スプライシングが無機ヒ素の毒性発現に関わるのではないかと考え検討を行った。無機ヒ素に曝露されたヒト肝癌HepG2細胞およびヒト正常臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)のRNAを検討したところ、HepG2細胞およびHUVECsともに無機ヒ素曝露による選択的スプライシングの上昇が検出された。種々の細胞間のAS3MT mRNAの選択的スプライシング量を比較したところ、HepG2細胞やヒト食道由来Het1A細胞では高く、ヒト表皮HaCaT細胞、ヒト白血病K562細胞、ヒトT細胞Jurkat細胞では低いことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined whether alternative splicing of arsenic methyltransferase (AS3MT) mRNA regulates arsenic toxicity. Exposure of arsenite to hepato-carcinoma HepG2 cells and human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) resulted in an increase on the levels of splicing variant produced by exon-4 and -5 skipping (delta4,5). We next examined the levels of delta4,5 AS3MT mRNA in various cells. The results indicated that the levels of delta 4,5 in keratinocyte HaCaT cells, leukemia K562 cells and T-cells Jurkat cells were lower as compared with HepG2 and esophageal Het1A cells. In addition we compared the sensitivity to arsenite exposure between HepG2, HaCaT and Het1A cells. The results showed that the sensitivity to arsenite exposure was roughly equal in HaCaT and Het1A cells in spite of the difference of the levels of delta 4,5. These results suggested that the difference of sensitivity to arsenite in the various cells was no correlation with alternative splicing of AS3MT mRNA.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・環境系薬学

キーワード：ヒ素化合物 選択的スプライシング 毒性発現

1. 研究開始当初の背景

バングラデシュなどの東アジア地域ではヒ素化合物を含む地下水の飲水による慢性ヒ素中毒が発生しており、本中毒により循環器疾患、代謝系疾患や多臓器における発癌が報告されている。その一方で、急性前骨髄球性白血病 (APL) の治療薬として三酸化ヒ素 (ATO) が使用されている。

ヒ素メチル基転移酵素 (AS3MT) は、無機ヒ素をメチル化する酵素として同定されたが、培養細胞や組織中の AS3MT 酵素活性はその困難さ故にほとんど測定されていない。一方、当研究室では AS3MT mRNA に 2 つの AS3MT のスプライシングフォーム ($\Delta 3$, $\Delta 4,5$) を検出した。その内エキソンの 4 と 5 番目を欠く $\Delta 4,5$ は full-length (WT) と比較して酵素活性が欠損していることを示した。さらに 5 種類の癌細胞において検討したところ、すべての細胞に $\Delta 4,5$ mRNA (翻訳されても酵素活性を持たない) が検出された (Sumi et al. BBRC, 2011)。これらのことから、これまで全く検討されていないが実は選択的スプライシングにより酵素活性を失った AS3MT は様々な組織、細胞に存在しているのではないかと考えるに至った。そこで、以下の 2 つの研究仮説を立てた。

1. 癌が進展する過程において AS3MT の選択的スプライシングが発生しているのなら、発癌物質であるヒ素自身が AS3MT の選択的スプライシングを引き起こしているのではないか？その結果として、長期にヒ素に曝露されると解毒ではなく、むしろヒ素の毒性が増強される方向に細胞の形質が変化し、そのことがヒ素による癌化と関連しているのではないか？

2. 白血病細胞に活性の無い AS3MT の発現が多いことが白血病治療における ATO の有効性と関連するのなら、AS3MT の選択的スプライシングが顕著な癌細胞に対し ATO が治療効果を示す可能性が高いのではないか？

と考え、以上の 2 仮説に対し、2 年間の研究期間内に、

(1) 正常細胞、実験動物への長期ヒ素曝露およびバングラデシュのヒ素汚染地域に居住する住民から得られた血液細胞の AS3MT の選択的スプライシングを検討し、長期ヒ素曝露による細胞障害作用における AS3MT の選択的スプライシングの関与を探る。

(2) 種々の癌細胞の AS3MT の選択的スプライシング、さらにこれら細胞株のヒ素メチル化能、およびヒ素に対する感受性を検討することで、亜ヒ酸製剤の抗癌スクリーニングにおける AS3MT の選択的スプライシングの有用性を探る。

を検討することとした。

2. 研究の目的

無機ヒ素は環境汚染物質として知られている一方、白血病の治療薬として使用されている。無機三価ヒ素のメチル化を触媒する AS3MT が同定され、AS3MT を介したヒ素のメチル化代謝反応の重要性が注目されている。当研究室では、AS3MT の選択的スプライシングを検出し、スプライシングフォームに酵素活性がないこと、さらに調べた 5 種の癌細胞すべてに、活性の無い AS3MT が発現していることを世界に先駆けて発表した (Sumi et al. BBRC, 2011)。

そこで本研究では、「AS3MT の選択的スプライシングがヒ素化合物の感受性を決定する因子ではないか」と仮説を立て、

- (1) 長期ヒ素曝露による細胞障害における AS3MT の選択的スプライシングの関与
- (2) ヒ酸製剤の抗癌スクリーニングにおける AS3MT の選択的スプライシングの有用性について検討を行うこととした。

3. 研究の方法

細胞：ヒト肝癌 HepG2 細胞、ヒト表皮角下 HaCaT 細胞、ヒト食道 Het1A 細胞、ヒト慢性骨髄性白血病 K562 細胞、ヒト T 細胞由来 Jurkat 細胞を使用した。

総 RNA の採取：準備した細胞に ISOGEN を加えて、常法に従って総 RNA を採取した。採取した総 RNA の濃度は、NanoDrop を使用して測定した。

逆転写反応：逆転写酵素緩衝液、oligo-dT プライマー、M-MuLV 逆転写酵素、RNA 分解酵素阻害剤に総 RNA (2 μg) を加え合計 20 μL として、逆転写反応 (37°C, 90 分 65°C, 6 分) を行った。

$\Delta 4,5$ AS3MT mRNA の定量 (Real-time PCR)：SYBR Premix TaqII および ROX reference dye に逆転写反応で得られた cDNA 2 μL を加え合計 20 μL として、逆転写反応 (37°C, 90 分 65°C, 6 分) を行った。Real-time PCR は StepOnePlus system を使用し、95°C 5 sec 60°C, 30 秒を 40 回繰り返す、60°C, 30 秒の間に得られる蛍光強度を機械に測定させた。補正として β -actin と GAPDH の蛍光強度を用いた。

使用したプライマーの配列

$\Delta 4,5$ AS3MT-f:

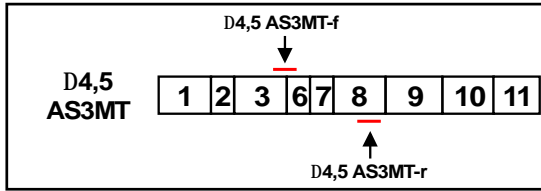
5'-AAGTAGCCCTAAGATCAAACCTGTGTT-3'

$\Delta 4,5$ AS3MT-r:

5'-TCCAGTATAAAGCACCACCCAGACAC-3'

上記 $\Delta 4,5$ AS3MT-f プライマーは、 $\Delta 4,5$ AS3MT mRNA を特異的に検出するためにエキソンの 3 と 6 番目が結合した部分でプライマーを作製した。 $\Delta 4,5$ AS3MT-r プライマーは、エキソン 8 番目の部分で作製した (図 1)。

図 1



β-actin-f:
5'-TGGCACCCAGCACAATGAA-3'
β-actin-r:
5'-CTAAGTCATAGTCCGCCTAGAAGCA-3'

GAPDH-f:
5'-GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3'
GAPDH-r:
5'-TGGTGAAGACGCCAGTGGA-3'

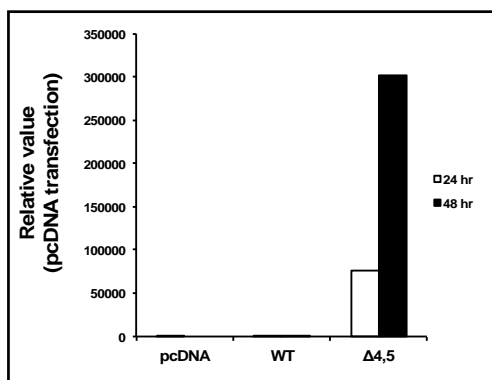
細胞毒性：HepG2, HaCaT, Het1A 細胞を 96 well に播種し亜ヒ酸を添加した。24 時間後に alamarBlue 試薬を添加し、生細胞から得られる吸光度 (OD550 nm) を測定した。

4. 研究成果

(1) 長期ヒ素曝露による細胞障害における AS3MT の選択的スプライシングの関与

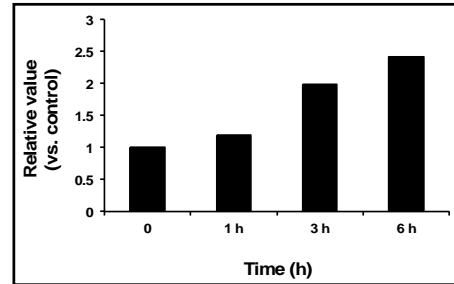
¹ AS3MT mRNA の選択的スプライシングにより得られるΔ4,5 mRNA を特異的に検出するためのプライマーを作成し、本プライマーが機能するかについて検討した。WT および Δ4,5 AS3MT cDNA を遺伝子導入した COS-7 細胞から総 RNA を回収し、real-time PCR を行ったところ、Δ4,5AS3MT cDNA を遺伝子導入した細胞からのみ mRNA を検出することができた (図 2)。本結果から作製したプライマーはΔ4,5 AS3MT mRNA を特異的に検出することが明らかとなった。

図 2



² 次に、亜ヒ酸に曝露された HepG2 細胞およびヒト正常臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) から総 RNA を回収し、本プライマーを使用して real-time PCR にて、Δ4,5 AS3MT mRNA 量を検討した。10 μM の亜ヒ酸に 1, 3, 6 時間曝露された HepG2 を用いて検討したところ、6 時間をピークに経時的にΔ4,5 AS3MT mRNA が増加した (図 3)。

図 3



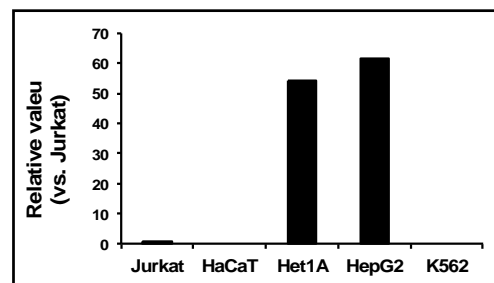
³ HUVEC においては 0.5, 1 μM の亜ヒ酸に 7 日間曝露されると、Δ4,5 AS3MT mRNA が増加した。

これらの本研究から、亜ヒ酸の曝露により AS3MT mRNA の選択的スプライシングが発現されていることが明らかとなった。

(2) ヒ素製剤の抗癌スクリーニングにおける AS3MT の選択的スプライシングの有用性

¹ 各臓器および疾患由来のヒト培養細胞を用いて各々のΔ4,5 AS3MT mRNA 量を前項 (1) ¹ のシステムを用いて検討した。HepG2 細胞に加え、ヒト表皮角下 HaCaT 細胞、ヒト食道 Het1A 細胞、ヒト慢性骨髄性白血病 K562 細胞、ヒト T 細胞由来 Jurkat 細胞から総 RNA を採取し、real-time PCR にてΔ4,5 AS3MT mRNA 量を検討したところ、細胞によってその発現量は大きく違うことが明らかとなった (図 4)。

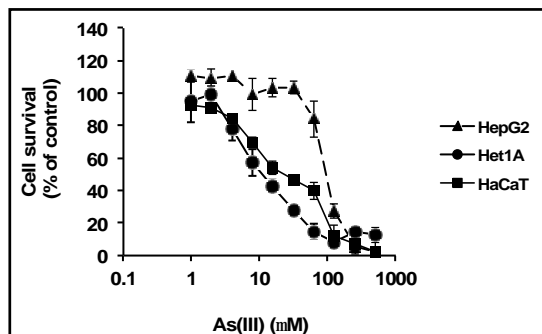
図 4



各種細胞のΔ4,5 AS3MT mRNA 量と亜ヒ酸の感受性との関係性を明らかにするために、HaCaT 細胞, Het1A 細胞, HepG2 細胞の亜ヒ酸に対する感受性をと比較すると、HaCaT 細胞

≥Het1A細胞>HepG2細胞であることが明らかとなった(図5)。

図5



このことから、各種細胞間の亜ヒ酸に対する感受性の違いにおいて、 $\Delta 4,5$ AS3MT mRNA量ではなく、他の因子が関与していることが示唆された。

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2件)

- Sumi, D., Shimizu, Y., and Himeno S. Involvement of Nrf2 activation in the upregulation of S100A9 by exposure to inorganic arsenite. International Journal of Molecular Medicine. 31巻, 2013, 259-264.
- Sumi, D., and Himeno S. Role of Arsenic (+3 Oxidation State) Methyltransferase in Arsenic Metabolism and Toxicity. Biological and Pharmaceutical Bulletin. 35巻, 2012, 1870-1875.

[学会発表](計5件)

- Daigo Sumi, Yuri Shimizu, Seiichiro Himeno. Reduction of the degranulation in rat RBL-2H3 mast cells by chronic exposure to arsenite via impairment of store-operated Ca^{2+} entry. The 6th International Congress of Asian Society of Toxicology. 2012年07月18日~2012年07月20日, 仙台国際センター
- 角大悟, 原田久美, 小川智子, 姫野誠一郎. 亜ヒ酸のNK細胞活性化に対する免疫毒性作用. 第39回日本毒性学会学術年会. 2012年07月18日~2012年07月20日. 仙台国際センター
- 角大悟, 津山博匡, 原田久美, 小川智子, 姫野誠一郎. 亜ヒ酸によるナチュラルキラー細胞の機能障害. 第12回分子予防環境医学研究会. 2013年02月01日~2013年02月02日. つくばサイエンス・インフォメーションセンター
- 小川智子, 津山博匡, 原田久美, 角大悟, 姫野誠一郎. ナチュラルキラー細胞の機

能に対する亜ヒ酸の影響. 日本薬学会第133年会(シンポジウム)(招待講演). 2013年03月28日~2013年03月30日. パシフィコ横浜

- 角大悟, 津山博匡, 原田久美, 小川智子, 姫野誠一郎. ヒ素化合物による免疫担当細胞の機能障害. 日本薬学会第133年会(シンポジウム)(招待講演). 2013年03月28日~2013年03月30日. パシフィコ横浜

[その他]

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

6. 研究組織

(1)研究代表者

角大悟 (SUMI, Daigo)

徳島文理大学・薬学部・准教授

研究者番号: 30400683