

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：82708

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25660174

研究課題名(和文) 分泌膜小胞(エキソソーム)を介するメチル水銀排出経路に関する研究

研究課題名(英文) Methylmercury detoxification mechanism by the exosomal secretory pathway

研究代表者

今村 伸太郎 (Imamura, Shintaro)

独立行政法人水産総合研究センター・中央水産研究所・研究員

研究者番号：80510007

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)：セレンによるメチル水銀の解毒メカニズムを明らかにするため、エキソソームの誘導によるメチル水銀の分泌・排出経路を解析した。ゼブラフィッシュ胚へのメチル水銀投与によって胚から培養水中にエキソソームが分泌された。その分泌量はメチル水銀の投与量に依存的に増加した。セレン含有イミダゾール化合物セレノニンに対するトランスポーターとして同定されたOCTN1を遺伝的に発現しないゼブラフィッシュ欠損変異体octn1^{-/-}の胚では、エキソソームの分泌および水銀排出が抑制された。以上の結果から、セレンによるメチル水銀の解毒は、セレノニンとOCTN1を介するエキソソーム分泌経路によることを見出された。

研究成果の概要(英文)：To analyze detoxification mechanism to reduce methylmercury (MeHg) toxicity by selenium, we report evidence that a novel Se-containing compound, selenoneine accelerates the excretion and demethylation of MeHg through exosomal secretion. When the embryos were microinjected with MeHg-Cys into yolk sac, the secreted exosomes released into rearing water from the embryos. The exosomes were released in cultured medium by MeHg injection in a dose dependent manner. Selenoneine is incorporated into cells by an organic cations/carnitine transporter-1 (octn1). In octn1^{-/-} fish line, the exosomal secretion and Hg excretion were suppressed. Therefore, the exosomal secretory pathway was accelerated by selenoneine incorporated into cells through octn1 and might mediate MeHg detoxification.

研究分野：分子生物学

キーワード：メチル水銀 エキソソーム ゼブラフィッシュ

1. 研究開始当初の背景

メチル水銀は水俣病の原因物質であり、脳中枢に作用し、神経障害をもたらす有害化学物質である。現在でもその毒性発現の分子メカニズムは十分理解されていない。疫学調査や動物試験の結果、魚肉からメチル水銀を摂取した場合にはメチル水銀単体に対する曝露と比べて毒性が見られない (Ganther et al, 1972)。申請者らは魚肉に含まれるセレン含有イミダゾール化合物 (セレノネイン: 2-selenyl-N₂,N₆-trimethyl-L-histidine, JBC, 285, 18134-18138, 2010) を同定し、魚肉と同時に存在することで解毒作用による無毒化および排出が促されることを見いだした。一方、実験モデルであるゼブラフィッシュ胚 (受精後 8 時間) の卵黄嚢にメチル水銀をマイクロインジェクションによって注入すると、飼育水中に分泌膜小胞 (エキソソーム) が大量に放出され、その中に水銀が含まれることを見出した。本課題では、ゼブラフィッシュ胚のバイオアッセイ系を利用して、エキソソームを介するメチル水銀の解毒排出機構の分子メカニズムを解析した。

2. 研究の目的

本課題では、ゼブラフィッシュを実験モデルとして用い、メチル水銀排出の分子メカニズム解明を目的とし、以下の 4 項目を実施した。

- (1) メチル水銀で誘導されるエキソソーム分泌顆粒の大量精製法の確立
- (2) エキソソームに含まれる物質の同定およびエキソソームの構造と機能の解析
- (3) ゼブラフィッシュ遺伝子欠損体を用いてエキソソーム形成・排出の分子機序の解析
- (4) セレン化合物によるメチル水銀排出経路の活性化機構の解析

3. 研究の方法

メチル水銀を注入したゼブラフィッシュ胚から飼育水中に放出されたエキソソーム分泌顆粒を回収し、大量に精製する方法を確立した。受精後 8 時間胚の卵黄嚢にシステインを付加したメチル水銀 (1-5ng/胚) を注入し、24 時間培養後に卵膜を除去し、飼育水を採取する。超遠心によりエキソソーム分画を分離するための条件を設定し、エキソソーム分画を得た。得られた分画にエキソソームのマーカータンパク質 CD63 および酵素活性 (アセチルコリンエステラーゼ活性) が含まれることをウエスタンブロット法により確認し、水銀含有量を冷蒸気原子吸光法で測定した (図 1)。

エキソソームは走査型プローブ顕微鏡およびネガティブ染色による電子顕微鏡により形態を観察した。エキソソーム分泌顆粒の生体動態を調べるために、上記で得られた水銀を含むエキソソーム分泌顆粒を PKH67 リンカーで蛍光ラベルし、ゼブラフィッシュ胚の

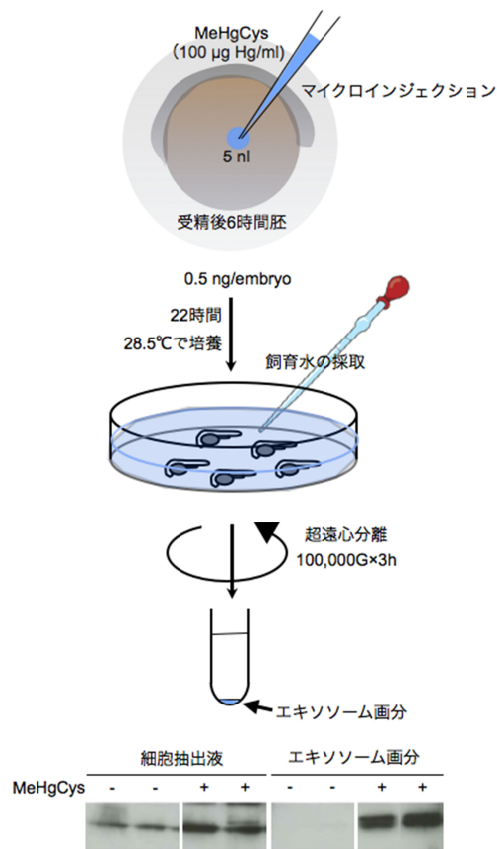


図 1 飼育水中に放出されたエキソソームの精製と CD63 タンパク質の検出

卵黄嚢に注入し、エキソソームの体内動態を観察した。蛍光ラベルエキソソームは共焦点顕微鏡を用いて局在部位を観察した。

エキソソームにはエンドソームおよびリソソームに由来するタンパク質、脂質および RNA が含まれると考えられる。セレン化合物およびメチル水銀曝露条件下でのエキソソームに含まれる分子および成分を同定した。エキソソームに含まれるタンパク質をウエスタンブロット法により同定した。エキソソームに含まれる RNA を電気泳動によって定量した。同定されたタンパク質がメチル水銀排出に関わるのか明らかにするために、分子に対するアンチセンスモルフォリノオリゴをゼブラフィッシュ胚に注入し、翻訳阻害によるメチル水銀排出の効果調べた。また、ゼブラフィッシュの有機カチオントランスポーター欠失体を作成し、メチル水銀排出作用の分子機序を解析した。

4. 研究成果

(1) ゼブラフィッシュ胚にメチル水銀 (0.5-2 ng Hg/embryo) を注入し、飼育水中の分泌物を超遠心 (100,000 x G for 1-3 h) で分離した。走査型プローブ顕微鏡およびネガティブ染色による電子顕微鏡観察によって、直径 20-50 nm のエキソソーム様の形態

を示す小胞が含まれることを確認した(図 2)。エキソソーム特異的タンパク質 CD63 および酵素活性 (AchE 活性) が検出され、エキソソームに含まれる水銀含量は注入した濃度に依存して増加した。以上から、ゼブラフィッシュ胚から飼育水中に放出されるエキソソーム濃縮法を確立し、サイズ、形態、マーカータンパク質の存在から、分泌顆粒はエキソソームであることが確認された。濃縮されたエキソソームを蛍光標識し、再びゼブラフィッシュ胚の血管に注入し、体内における蛍光ラベルエキソソームの局在を観察した。その結果、蛍光ラベルされたエキソソームは血流によって、卵黄嚢にとどまることが明らかになった (図 3)。

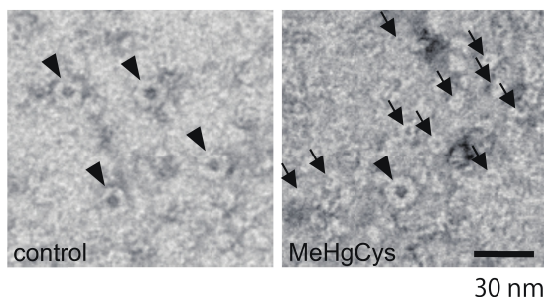


図 2 ネガティブ染色によるエキソソームの電子顕微鏡観察像

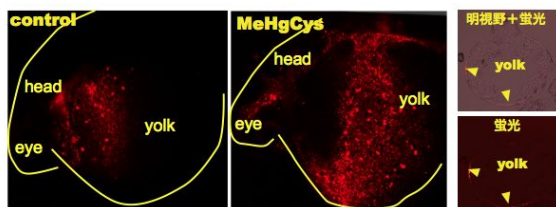


図 3 蛍光ラベルされたエキソソームのゼブラフィッシュ胚における局在

(2) エキソソーム分画の 2 次元電気泳動法およびウエスタンブロット法によって、含量が増加した少なくとも 20 種以上のタンパク質が検出された。また、エキソソーム分画から RNA を抽出したところ、短鎖 RNA が多く含まれていることが確認された。同定されたタンパク質に対するアンチセンスモルフォリノオリゴを設計し、ゼブラフィッシュ受精卵に注入し、発現を抑制させた。その結果、メチル水銀に対する感受性が亢進されることが確認され、エキソソームの分泌経路がメチル水銀排出作用に必須であることが確認された。

(3) セレノネイン ($3\mu\text{M}$) の投与によってエキソソーム分泌およびメチル水銀排出が促進された。セレノネインは有機カチオントランスポーター *octn1* によって細胞内に取り込まれることが報告されていることから、*octn1* ノックアウトフィッシュ *octn1*^{-/-} を樹立した。*octn1*^{-/-} はメチル水銀感受性が高く、エキソソーム分泌が阻害された(図 4)。以上

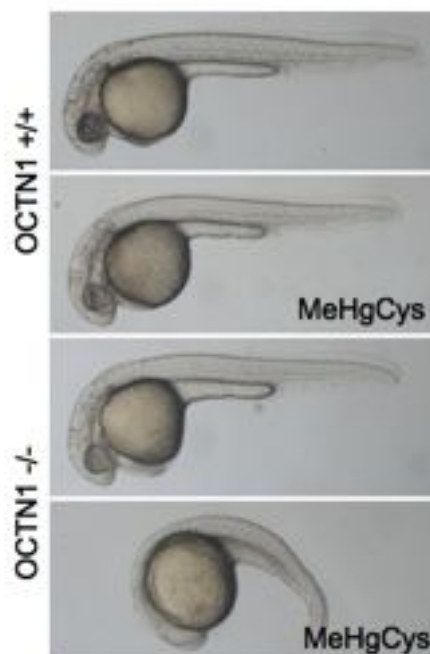


図 4 *octn1* ノックアウトゼブラフィッシュにおけるメチル水銀感受性の亢進

から *octn1* によるセレノネイン取り込みがエキソソーム分泌を促進することが示された。以上の結果から、エキソソーム分泌経路は *octn1* によるセレノネイン細胞内取り込みによって活性化され、メチル水銀を解毒するために必須であることが示された。

これまでの有害化学物質の毒性研究は、化学物質を機器分析によって検出・測定するとともに、実験動物に曝露して、生残率、神経毒性、細胞死等を指標に生物毒性を評価する研究が主流であり、解毒・排出の機構はほとんど分かっていなかった。本課題から、エキソソーム経路が細胞内の有害化学物質の解毒・排出に重要な役割を果たすことが見出された。魚食から摂取する有害化学物質の人体に対する有害性と解毒効果を診断するためのツールとしてエキソソームの利用が可能になる。また、今後、水産物の安全性とヒトの健康リスクを評価するための新しい分析手法を提供できると考えられる。

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)

今村 伸太郎, 山下 倫明, 動物モデルによるメチル水銀の生物影響評価: ゼブラフィッシュ胚モデル, 日本水産学会誌, 79 巻/5 号, p893, 2013, 査読あり

[学会発表](計 9 件)

今村 伸太郎, エキソソームを介するメチ

ル水銀排出経路,環境省重金属による健康影響に関する総合的研究メチル水銀研究ミーティング,東京,2013-12-11

今村 伸太郎,藪健史,石原 賢司,山下 由美子,山下 倫明, Methylmercury detoxification mechanism by the exosomal secretory pathway in zebrafish embryos, The Japanese Medaka and Zebrafish Meeting, p22, 仙台, 2013-09-21

今村 伸太郎,石原 賢司,山下 由美子,山下 倫明, Detoxification of Methylmercury by Selenoneine-Mediated Exosome Secretion Pathway, 10th International Symposium on Selenium in Biology and Medicine 2013, ドイツ ベルリン, p103, 2013-09-16

今村 伸太郎,山下 倫明,藪健史,オートファジーによるメチル水銀解毒機構,第15回マリンバイオテクノロジー学会大会, p83, 沖縄 2013-06-02

今村 伸太郎,鈴木 珠水,原 竜朗,東畑 顕,石原 賢司,山下 由美子,山下 倫明, 分泌エキソソームによるメチル水銀排出の分子機構,環境省「重金属等による健康影響に関する総合的研究」研究成果発表会・メチル水銀研究ミーティング, 東京, 2014-12-05

今村 伸太郎,Stale Ellingsen, 司馬肇,石原 賢司,山下 由美子,東畑 顕,藪健史, Heidi Amlund, Anne-Katrine L. Haldorsen, 山下 倫明, Exosome-mediated methylmercury detoxification accelerated by novel selenium compound, selenoneine in zebrafish models, Fish and amphibian embryos as alternative models in toxicology and teratology, フランス パリ, 2014-12-01

今村 伸太郎,鈴木 珠水,原 竜朗,東畑 顕,石原 賢司,山下 由美子,東畑 顕,藪健史, Heidi Amlund, Anne-Katrine L. Haldorsen, 山下 倫明, エキソソームを介するメチル水銀の排出機構, 日本水産学会秋季大会, p62, 福岡, 2014-09-21

今村 伸太郎,藪健史,原竜朗,鈴木 珠水,石原 賢司,山下 由美子,山下 倫明, Methylmercury detoxification mechanism by the exosomal secretory pathway in zebrafish embryos, 11th International Conference on Zebrafish Development and Genetics, アメリカ合衆国 ウィスコンシン州 マディソン, p123, 2014-06-24

今村 伸太郎,東畑 顕,Stale Ellingsen,鈴木 珠水,原竜朗,藪健史,石原 賢司,山下 由美子, Heidi Amlund, 山下 倫明, エキソソーム

を介するメチル水銀排出機構,第16回マリンバイオテクノロジー学会大会,三重県津市, p73, 2014-06-01

〔図書〕(計2件)

今村 伸太郎,山下 倫明, 魚食と健康—メチル水銀の生物影響,総説,ゼブラフィッシュ胚モデル,恒星社厚生閣,2014, 10 ページ

山下 倫明,山下 由美子,今村 伸太郎,魚食と健康 - メチル水銀の生物影響,1-3 セレンによるメチル水銀の解毒機構,総説, 恒星社厚生閣,2014, 11 ページ

〔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:
出願年月日:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

今村 伸太郎 (IMAMURA SHINTARO)

独立行政法人・水産総合研究センター・中央水産研究所・主任研究員

研究者番号: 80510007

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし