

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 25 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26550037

研究課題名(和文)メチル水銀による特定ケモカイン分子種の脳選択的発現誘導

研究課題名(英文)Brain selective expression of chemokines by methylmercury

研究代表者

永沼 章(Naganuma, Akira)

東北大学・薬学研究科(研究院)・教授

研究者番号：80155952

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): 37種同定されているマウスのケモカイン分子種の中でCCL3およびCCL4の発現がメチル水銀によって脳組織特異的に誘導されることを明らかにした。メチル水銀による両ケモカインの発現誘導はマウス神経前駆細胞(C17.2細胞)株でも認められた。メチル水銀によるCCL4の発現誘導に関わるプロモーター領域をレポーターアッセイにより検索したところ、転写開始点から上流50 bpまでの領域にメチル水銀によるCCL4の発現誘導に必要な領域が存在することが判明し、さらにこの領域への両転写因子の結合がメチル水銀によって共に増加することも確認された。

研究成果の概要(英文): We found that methylmercury induces the gene expression of chemokines, CCL3 and CCL4, specifically in the brain of mice. The induction of expression of both chemokines by methylmercury was also observed in mouse cultured cells (C17.2 cells). We searched a promoter region, using a reporter assay, involved in CCL4 induction by methylmercury. We found that the promoter region from transcription initiation site to 50 bp of upper reaches is essential for the CCL4 induction by methylmercury. Furthermore, it was confirmed that the binding of both transcription factors to this region were increased by methylmercury.

研究分野：分子毒性学

キーワード：有害化学物質 遺伝子 蛋白質 環境 生体分子

## 1. 研究開始当初の背景

マウスに投与したメチル水銀は、脳に比べて肝臓や腎臓中に10倍以上高濃度に蓄積するが、障害が認められるのは脳のみである。したがって、脳組織特異的なメチル水銀の標的分子が存在すると考えられる。本申請者は、メチル水銀をマウスに投与することによって脳組織選択的に発現が上昇する遺伝子を網羅的に検索し、ケモカイン分子種の1つであるCCL4を同定した。CCL4の脳中での発現は対照マウスではごく僅かであるが、メチル水銀投与によって100倍以上に増加する。一方、肝臓および腎臓中での発現誘導はほとんど認められない。これは、メチル水銀によって脳特異的に発現が上昇する遺伝子が判明した最初の例であり、メチル水銀が示す脳組織選択的な毒性の発現機構解明のための突破口ともなり得る貴重な知見である。

## 2. 研究の目的

(1) マウスのケモカインは37種が同定されている。そこで、これら37種のケモカイン分子種の中で、CCL4と同様にメチル水銀によって脳特異的に発現誘導される分子種を明らかにする。

(2) メチル水銀によって脳特異的に発現誘導されるケモカイン分子種とメチル水銀毒性との関係を神経由来培養細胞を用いて検討し、その毒性学的意義を明らかにする。

(3) 神経由来培養細胞およびマウスを用いた検討によって、メチル水銀によるケモカイン発現誘導に関与する転写因子を明らかにし、脳特異的な誘導機構を解析する。

(4) 同定された転写因子の下流遺伝子の中から、メチル水銀毒性の発現に関わる新規遺伝子を明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) メチル水銀によって脳特異的に誘導されるケモカイン分子種の同定

メチル水銀がマウスの脳及びその他の組織中における全ケモカイン分子種の発現に与える影響：メチル水銀を投与したマウスから大脳、小脳、肝臓、腎臓、脾臓を摘出し、各組織中でのケモカイン分子種(全37種)のmRNAレベルをそれぞれ調べ、脳特異的に誘導される分子種を特定する。なお、既に予備的検討を実施し、全ケモカイン分子種のうちCCL4に加えてCCL3がメチル水銀によって脳特異的に発現誘導されるという結果が得られている。

メチル水銀によって脳特異的に発現誘導されるケモカイン分子種の誘導部位：メチル水銀によって脳特異的に誘導されるケモカイン分子種および脳に加えて他の組織でも

誘導されるケモカイン分子種をそれぞれ2種ずつ選び、メチル水銀を投与したマウスの大脳および小脳中での誘導部位を組織免疫染色によって明らかにする。また、*insitu* ハイブリダイゼーション法によりmRNAの発現誘導部位についても検討する。そして、ケモカイン発現部位とメチル水銀による障害部位との関係を明らかにする。

(2) メチル水銀によって脳特異的に発現誘導されるケモカインとメチル水銀毒性との関係

本申請者がメチル水銀によってケモカインの発現が誘導されることを論文発表(J. Toxicol. Sci., 36:389-391, 2011)した後に、フランスの研究グループから、ケモカイン分子種の1つであるCCL2がメチル水銀の細胞毒性を軽減する作用を有するとの報告がされた。このことから、脳特異的に発現誘導されるケモカインであるCCL4もメチル水銀の脳選択的な毒性の発現に関係する可能性が考えられる。なお、CCL2もメチル水銀によって発現誘導されるが、脳特異的ではない。

メチル水銀によってCCL4が発現誘導される培養細胞株の検索：培養細胞はその種類によって発現しているケモカイン分子種およびケモカイン受容体が異なる。そこで、CCL4およびその受容体であるCCR5が発現している脳由来の培養細胞を検索する。得られた細胞株の中から、メチル水銀によってCCL4の発現が誘導され、培地中CCL4濃度の上昇が認められる細胞株(本研究目的に合致した細胞株)を選び出す。(予備検討により、既に該当する培養細胞株を数種得ている)。

CCL4がメチル水銀の細胞毒性に及ぼす影響：細胞内で合成されたCCL4は培地中に排出され、その受容体であるCCR5を介して細胞内へシグナルを伝える。そこで、培養細胞の培地中にCCL4、CCL4抗体、またはCCR5阻害剤を添加して、メチル水銀が示す細胞毒性に与える影響を検討する。なお、この際に、(1)で同定されたメチル水銀によって脳選択的に誘導されるCCL4以外のサイトカイン、およびメチル水銀毒性軽減作用を示すことが報告されているCCL2(ポジティブコントロール)についても検討する。

CCL4受容体であるCCR5を介したシグナル伝達とメチル水銀毒性の関係：脳内で産生されるケモカイン類は脳内細胞間の情報伝達物質として極めて重要な役割を果たしている。そこで、CCL4の受容体であるCCR5を介したシグナル伝達に関与する細胞内蛋白質をsiRNAを用いて1つずつノックダウンし、メチル水銀毒性に関与するシグナル伝達システムを明らかにするとともに、その機構を生化学的および分子生物学的手法により詳細に検討する。なお、(1)で同定されたメチル水銀によって脳選択的に誘導されるCCL4以外のサイトカインについても同様に検討する。

### (3) メチル水銀による脳特異的なケモカイン誘導機構

メチル水銀による脳特異的なケモカインの発現誘導機構の解明を目指し、培養細胞を用いて CCL4 の発現調節に関わる転写因子群を明らかにし、その中からメチル水銀を介した発現誘導に関与する転写因子を特定する。

CCL4 遺伝子転写調節領域中からの転写因子結合配列の検索：既知の転写因子が結合することが判明しているコンセンサス配列を、CCL4 遺伝子の転写調節領域中から検索する。脳特異的に機能する転写因子の結合配列があった場合は、その転写因子の活性とメチル水銀との関係を検討する。

CCL4 遺伝子転写調節領域中におけるメチル水銀応答領域の検索：1で転写因子が同定できなかった場合は、CCL4 遺伝子の転写調節領域を部分的に削除していくことによって、メチル水銀による発現誘導に必要な配列を特定する。そして、その塩基配列に結合する蛋白質をプルダウン法等と質量分析によって同定する。同定された蛋白質の中から、siRNA によるノックダウン法などによって目的とする転写因子を明らかにし、その転写因子の活性とメチル水銀との関係を検討する。

マウス脳中でメチル水銀によって活性化される転写因子の検索：1および2の検討では、単一の転写因子にまで絞り込むことができない可能性がある。また、培養細胞を用いた検討では、メチル水銀によって脳組織特異的に活性化される転写因子が同定されない可能性もある。そこでメチル水銀をマウスに投与し、メチル水銀によって脳中で活性化される転写因子を protein/DNA array 法により網羅的に検索する。ここで顕著な活性化が認められた転写因子の中で、上記1および2の検討によっても同定されている転写因子は、CCL4 の発現誘導に関わり、かつ、メチル水銀によって脳選択的に活性化される転写因子ということになる。

メチル水銀による転写活性機構：同定された転写因子の発現量、細胞内分布、リン酸化などに与えるメチル水銀の影響を検討し、メチル水銀による当該転写因子の活性化機構を解明する。

### 4. 研究成果

本申請者は、ケモカイン分子種の1つである CCL4 がメチル水銀によって脳組織特異的に発現誘導されることをマウスを用いた検討により明らかにした。この知見は、メチル水銀によって脳特異的に発現誘導される蛋白質の存在が示唆された最初の例である。マウスのケモカインは37種が同定されている。そこで、メチル水銀投与によるマウス組織（大脳、小脳、腎臓、肝臓および脾臓）中でのこれら全ケモカイン分子種（37種）の発現変動を検討した。その結果、CCL4 に加えて CCL3 もメチル水銀によって脳組織中でのみ

発現誘導されることが明らかとなった。メチル水銀による CCL3 および CCL4 の発現誘導はマウス神経前駆細胞（C17.2 細胞）株でも認められた。同細胞において、CCL3 および CCL4 の mRNA レベルはメチル水銀添加 2 時間後から上昇したが、細胞の生存率低下及びカスパーゼ3の活性化（アポトーシスの指標）はメチル水銀添加 6 時間後から認められた。このことから、CCL3 および CCL4 の発現レベル上昇はメチル水銀によって細胞が障害されたために惹起されるのではなくメチル水銀に対する細胞応答反応であると考えられる。マウスを用いた検討によってもこのことを支持する結果が得られた。また、CCL3 または CCL4 の発現を siRNA で抑制することによって同細胞のメチル水銀感受性が僅かに高まり、両ケモカインが弱いながらもメチル水銀毒性軽減作用を示すことが示唆された。次に、メチル水銀による CCL4 の発現誘導に関わるプロモーター領域をレポーターアッセイにより検索した。その結果、転写開始点から上流 50 bp までの領域にメチル水銀による CCL4 の発現誘導に必要な領域が存在することが判明した。この 50 bp に結合する可能性のある転写因子をデータベース検索したところ 10 個の転写因子が該当した。この 10 個の転写因子を 1 つずつ siRNA を用いてノックダウンさせたところ、SRF および FOXA1 をそれぞれノックダウンさせることによってメチル水銀による CCL4 mRNA レベルの上昇が抑制されることが判明した。メチル水銀は FOXA1 の細胞内レベルを減少させたが、核内レベルは逆に上昇させた。一方、SRF は細胞内レベルおよび核内レベルがメチル水銀によって共に上昇した。この結果は、メチル水銀が核内レベルを上昇させることによって両転写因子の転写活性を高めている可能性を示唆している。メチル水銀による CCL4 の発現誘導に必要な領域（50 bp）中に存在する FOXA1 結合コンセンサス領域は SRF の同領域内に完全に含まれている。そこで 50 bp 中の SRF 結合コンセンサス領域を含むオリゴ DNA を用いて検討したところ、このオリゴ DNA への両転写因子の結合がメチル水銀によって共に増加することが確認された。本研究によって、メチル水銀がケモカイン分子種の中で CCL3 および CCL4 の発現を脳特異的に誘導し、その発現誘導に SRF および FOXA1 が転写因子として関与することが示された。本知見は、メチル水銀が脳に対して選択的に引き起こす障害のメカニズムを解明するための突破口となり得るものと思われる。

### 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0件)

〔学会発表〕(計1件)

岩井美幸、釋氏佑紀奈、金ミンソク、黄 基  
旭、高橋 勉、永沼 章 メチル水銀によっ  
てマウス膿組織中で発現誘導されるサイト  
カイン、第 41 回日本毒性学会学術年会、2014  
年 7 月 3 日、神戸市  
〔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〕

ホームページ等

<http://www.pharm.tohoku.ac.jp/~seitai/seitai-index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

永沼 章 (NAGANUMA, Akira)

東北大学・大学院薬学研究科・教授

研究者番号：8 0 1 5 5 9 5 2

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：