

RF-085 やんばる生態系をモデルとした水銀の生物蓄積に関する研究

(1) 水銀代謝機構の解析

鹿児島大学 大学院医歯学総合研究科 分子腫瘍学分野 山本 雅達

<研究協力者>

環境省	那覇自然環境事務所	野生生物課	阿部慎太郎
愛媛大学	沿岸環境科学研究センター		宝来佐和子
琉球大学	医学部	地域環境医科学講座 医科遺伝学分野	要 匡
琉球大学	農学部	生産環境学科 亜熱帯動物学講座	小倉 剛

平成20年度合計予算額 2,600千円

※上記の予算額は、間接経費600千円を含む

[要旨] マングースは肝臓において水銀(Hg)を高濃度に蓄積する唯一の陸生ほ乳類と考えられ、これまで未解明であった水銀耐性を示す生物種の、水銀蓄積や解毒機構を解明するモデルとして有用である。このことから我々は捕獲されたマングースの初代培養肝細胞を用いて重金属感受性試験を試みた。その結果、メチル水銀についてはマングースの IC_{50} 値の $5.04 \mu\text{M}$ に対して、ラットでは $9.02 \mu\text{M}$ 、また、塩化水銀に対する感受性は $22.1 \mu\text{M}$ に対してラット $61.6 \mu\text{M}$ 、さらにセレンに対する感受性は $67.2 \mu\text{M}$ に対して $153 \mu\text{M}$ といずれもラットに対する値より低く、予想に反して、マングースの初代培養肝細胞はラットのそれよりこれらの重金属に対して感受性が高いという結果が得られた。しかしながら今年度行なった重金属感受性試験に用いた検体は、これまでに測定した生前の水銀蓄積が低い個体であり、これについては水銀蓄積の高い個体について水銀暴露実験を行なう必要があると考えている。

一方で、我々は水銀解毒機構・責任分子の解明を目的として、チオレドキシンの関連蛋白質とその代謝酵素、グルタチオンの代謝酵素と関連蛋白質、メタロチオネインの代謝酵素など、多くの生物種で金属やレドックス代謝に関連する分子について、マングースの各遺伝子のPCRプライマーセットの作製を行なった。今回チオレドキシンのレダクターゼ2遺伝子について、既知であるイヌ・ネコのcDNA情報をもとに相同性が高い領域、そしてヒトのゲノムおよびcDNA情報から短いイントロンを挟む形でプライマーセットを作製した。これを用いてマングース繊維芽細胞のゲノムおよび繊維芽細胞、卵巣、精巣のcDNAを鋳型としてPCRを行なったところ、いずれもマングースのチオレドキシンのレダクターゼ2として予想されるサイズのフラグメントが検出された。今後、マングースのチオレドキシンのレダクターゼ2遺伝子やその他の遺伝子の発現変化を順次解析を行なうことで、これらから得られる知見はマングースの水銀解毒機構・責任分子の解明に貢献できると考える。

[キーワード] マングース、水銀、重金属毒性試験、重金属代謝機構、遺伝子発現変化

1. はじめに

水銀は、世界的にも地球環境汚染物質と位置付けられ、その高い生物濃縮性と毒性から、生態系のダメージに関する周到なモニタリングと対策が不可欠であると考えられている。しかしながら、野生動物の中には水銀を濃縮するが、ヒトのように神経障害を引き起こすことなく生命活動を存続する生物種が存在する。これまでに内外の研究成果によって、特に海生動物の食物連鎖の上位に位置する生物種において水銀の蓄積が非常に高いレベルであることが報告されているが、海洋生物の新鮮な組織を得ることの難しさ、飼育実験が不可能であることから、水銀の蓄積や解毒機構に関する研究はこれまでにほとんどなされておらず、そのメカニズムについては未解明な部分が多い。

一方で、東京農工大・渡邊を中心とした研究グループは独自に沖縄、奄美大島を含む南西諸島・野生動物種の金属類蓄積調査を広範に行なった。その結果、沖縄、奄美大島に持ち込まれたマングースはその肝臓において水銀を海生動物レベルに濃縮していることを明らかにした¹⁾。マングースは外来移入種として駆除が実施されていて、個体あるいは新鮮な組織器官を検体として入手が可能である。このことからマングースはこれまで未解明であった水銀耐性を示す生物種の、水銀蓄積や解毒機構を解明するモデルとして有用であると考えた。

2. 研究目的

(1) マングース肝臓における特異的な水銀蓄積や解毒機構を培養レベルで解明することを目的として、ラット、マングースに由来する初代培養肝細胞を用いて、水銀暴露に対する細胞毒性・感受性試験を行ない、各種差間で比較検討する。

(2) 水銀代謝、蓄積、排出など一連の水銀解毒機構・責任分子の解明を目的として、水銀暴露に対してマングース肝組織に由来する遺伝子の発現変化について調べる。

3. 研究方法

(1) マングース肝初代培養細胞の重金属暴露感受性試験

1) 準備

細胞培養用コラーゲンコート96ウェルディッシュ (イワキ)

Williams' medium E (SIGMA W4128)

CO₂インキュベーター (ASTECH)

メチル水銀 (Stream Chemicals 80-2250)

塩化水銀 (WAKO 138-01152)

セレン (WAKO 194-10842)

Tetrazolium (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide、以下MTT)
(sigma M2128-5G)

DMSO (Dimethyl sulfoxid) (関東化学 2950-1B)

シェーカー (SANKYOU JUNYAKU MX-4)

マルチプレートリーダー (Bio Rad model 550)

2) 試薬調製

Williams' medium E

以下の試薬を記載濃度になるように加える。

胎児牛血清 (10%: GIBCO #12483-020 Lot 356833)、インスリン (1 μ M: Sigma #16634)、

デキサメタゾン (1 μ M: Sigma #D4902)、カナマイシン (100 μ g/mL: Sigma #K1876)

ファンギゾン (0.5 μ g/mL: GIBCO #15290-018)

Tetrazolium

PBSで5mg/mLに調整後、濾過滅菌をストック溶液とする。

3) 手順

a 重金属毒性試験

↓ マングースおよびラットの肝細胞を96ウェルのディッシュの各ウェルに細胞数を2000に合わせて播く。

↓ 5%CO₂存在下、37°Cで一晩培養

↓ 培地を交換して

a メチル水銀 (1, 5, 10, 15, 20, 30, 50 μ M)

b 塩化水銀 (5, 10, 40, 100, 200, 300, 500 μ M)

c セレン (5, 10, 40, 100, 200, 300, 500 μ M)を培地に加え24時間培養。

↓ 各ウェルにMTTを終濃度0.2mg/mLになるように加える。

↓ さらに3時間培養。

↓ 培養上清を捨て、各ウェルにDMSOを50 μ l加えてシェーカーにて30秒攪拌し、細胞を溶解する。

↓ マルチプレートリーダーを用いてOD_{570nm}の吸収波長を測定して以下のように解析。

黄色色素のMTTは生細胞の酵素で還元されてOD_{570nm}の吸収波長をもつ紫色のFormazanへと変化する。この時金属を含まないウェルの吸光度を生存率100%として、金属暴露を受けた細胞の生存率を評価した。細胞数の半分が死滅する際の重金属濃度をIC₅₀ (50%が致死の重金属濃度) として算出し、各細胞の重金属に対する感受性とした。(図1)。

b 重金属分析

組織を凍結乾燥して細かく粉碎した後、超音波分解し、水銀は微量水銀測定装置(CV-AAS)を用いて、⁸²Seはイオン源質量分析計(ICP-MS)を用いて測定した。水銀は総水銀(T-Hg)の濃度を指す。

(2) 水銀解毒機構・責任分子の解明

重金属暴露に応答して発現が変化する遺伝子は、金属解毒機構に関与する責任分子である可能性が高い。これを調べるために、チオレドキシンの関連蛋白質とその代謝酵素、グルタチオンの代謝酵素と関連蛋白質、メタロチオネインの代謝酵素など、多くの生物種で金属やレドックス代謝に関連する分子について、マングースの各遺伝子のPCRプライマーセットの作製を行なった。マングースのように、全くゲノム情報のない生物種の遺伝子配列についてプライマーセットを作製するには、ヒト、マウスのゲノムの構造情報からイントロンの部位とイントロンのサイズを予測し、小さなイントロンを含む部分を、当初のターゲットにするというアプローチで試みた。デー

データベース上 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) に数種類のほ乳動物のDNA配列は掲載されるが、これらの代謝酵素の遺伝子上の進化解析が明確でないことから、今回は情報として精度が保たれていると考えられるイヌとネコの相同部位を用いた。まずヒトのチオレドキシシン遺伝子の場合、エクソン14と15の間にあるイントロンが最も短かく、また、この領域はcDNAの遺伝子配列が既知であるイヌ・ネコとの相同性も高かった。このように相同性が高い領域はイヌ・ネコも同様にイントロンが短いと予想して、連続して共通する配列をプライマー作製に用いた(図2)。作製したプライマーについて特異性を確認するために、以下の方法に従ってマングースゲノムDNAおよびcDNAを調製し、鋳型に用いてPCR反応を行なった。

1) 準備

PBS (Invitrogen70011-044)

トライゾール (Invitrogen 155-96018)

ゲノムDNA, 調製キット (TOYOBO Mag Extracter)

クロロホルム (WAKO)

イソプロパノール (WAKO)

99%エタノール (WAKO)

70%エタノール (WAKO)

DEPC水 (Nakarai 3641541)

Revatra Ace cDNA作製キット (TOYOBO FSK-101)

プライマー

LEFT PRIMER CTGGAGTTCACAGTGGCAGA

RIGHT PRIMER GATCCCCAGAGCAAATCCTT

サーマルサイクラー (Perkin Elmer 9700)

Blend Taq (TOYOBO BTQ-102)

アガロース (Nakarai 01158-85)

10xBPB (Takara A251)

電気泳動バッファー (Nakarai 35430-74)

アガロースゲル撮影装置 (ASTEC)

DNAマーカー (Invitrogen 1kb Ladder)

エチジウムブロマイド溶液 (Fluka 46067)

電気泳動槽 (Advance Mupid)

2) 手順

a マングースゲノムDNAの調製

マングース繊維芽細胞からMag Extracterを用いて定法に従いゲノムDNAを調製した。得られたゲノムDNAは吸光度260nmを測定して定量し、適宜希釈して実験に供した。

b マングース繊維芽細胞、卵巣、精巣に由来するcDNAの調製

マングース繊維芽細胞、卵巣、精巣からトライゾールを用いて定法に従ってトータ

ルRNAを調製した。得られたRNAは吸光度260nmを測定して定量し、適宜希釈して実験に供した。これを鋳型としてRevatra Ace cDNA作製キットを用いて定法にしがたいcDNAを調製した。

c チオレドキシシレダクターゼ遺伝子を標的としたプライマーの特異性について

i PCR反応液の調製

aおよびbで作製したゲノムDNAおよびcDNAの鋳型として、以下の組成でPCR反応液を作製した。

ゲノムDNAまたはDNA	2 μ l (1 μ g)
水	12.6 μ l
10x PCRバッファー	2 μ l
2mM dNTPs	2 μ l
Right primer	0.5 μ l
Left primer	0,5 μ l
Brend Taq	0.4 μ l
Total	20 μ l

ii アガロースゲルの調製

アガロース2gをTAEバッファー100mLに懸濁し100°C5分で良く溶かした。これをゲル板に流し室温に戻して固化したゲルを実験に供した。

iii 電気泳動

iiで作製したゲルのウェルにPCR反応物10 μ lに5 μ lの10xBPB溶液を加えて滴下し、100ボルト20分で泳動した。別のウェルにサイズ既知であるマーカーを泳動することで目的のフラグメントのサイズを予想した。

4. 結果・考察

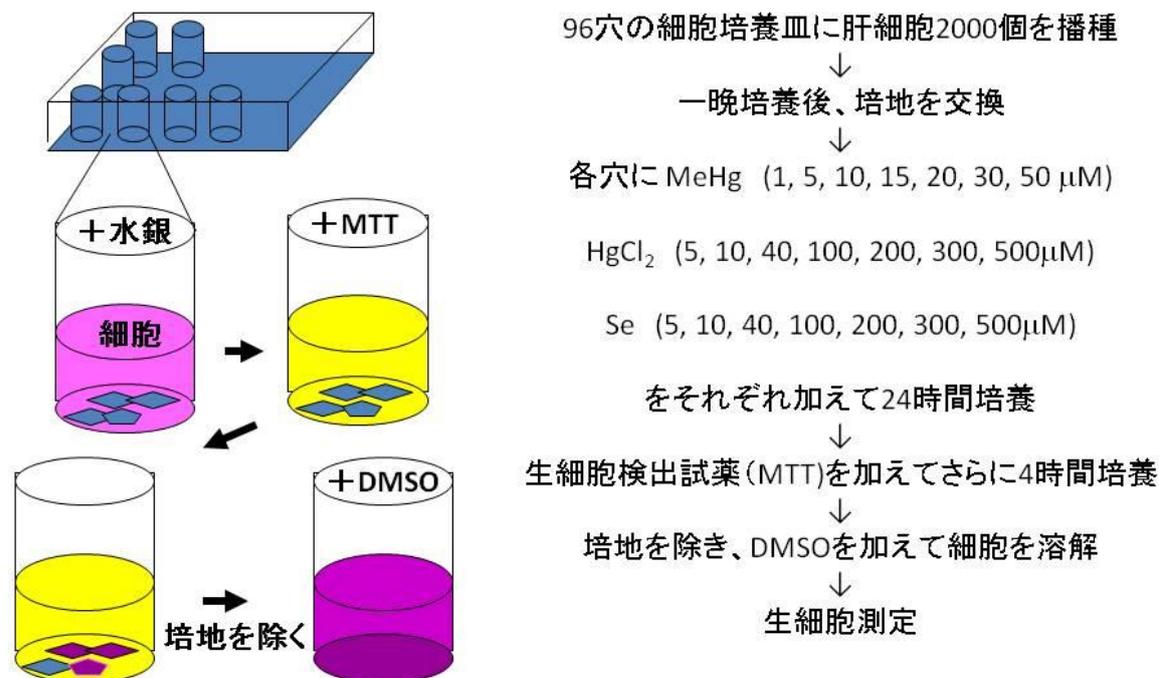
(1) マングース肝初代培養細胞の重金属暴露感受性試験

金属毒性の検討のためにジャワマングース6検体について初代肝細胞を単離して、MTTアッセイを行った。メチル水銀(MeHg)についてはマングースのIC₅₀値の5.04 μ Mに対して、ラットでは9.02 μ M、また、塩化水銀(HgCl₂)に対する感受性は22.1 μ Mに対してラット61.6 μ M、さらにセレン(Se)に対する感受性は67.2 μ Mに対して153 μ Mといずれもラットに対する値より低く、予想に反して、マングースの初代培養肝細胞はラットのそれよりこれらの重金属に対して感受性が高いという結果が得られた(表1 重金属毒性の項)。また、今回初代培養に用いたマングースを含めて、エンドレベルの重金属の蓄積について調べた。つまり生存時に、重金属の高い蓄積を示す個体は、培養レベルでも重金属に対して高い耐性を示し、逆に蓄積が低ければ、その個体から分離培養した肝細胞は、重金属に対して耐性を示さないとも考えられる。今回初代培養に用いたマングースでは、肝細胞を分離する前に、一部肝を切除して、重金属を直接測定した。その結果、これまでにサンプリングしてきたマングースに比較して、蓄積が低いということがわかった(表1 金属蓄積量の項)。したがって、これについては水銀蓄積の高い個体と低い個体について水銀暴露実験を行なう必要があると考えている。

(2) 水銀解毒機構・責任分子の解明

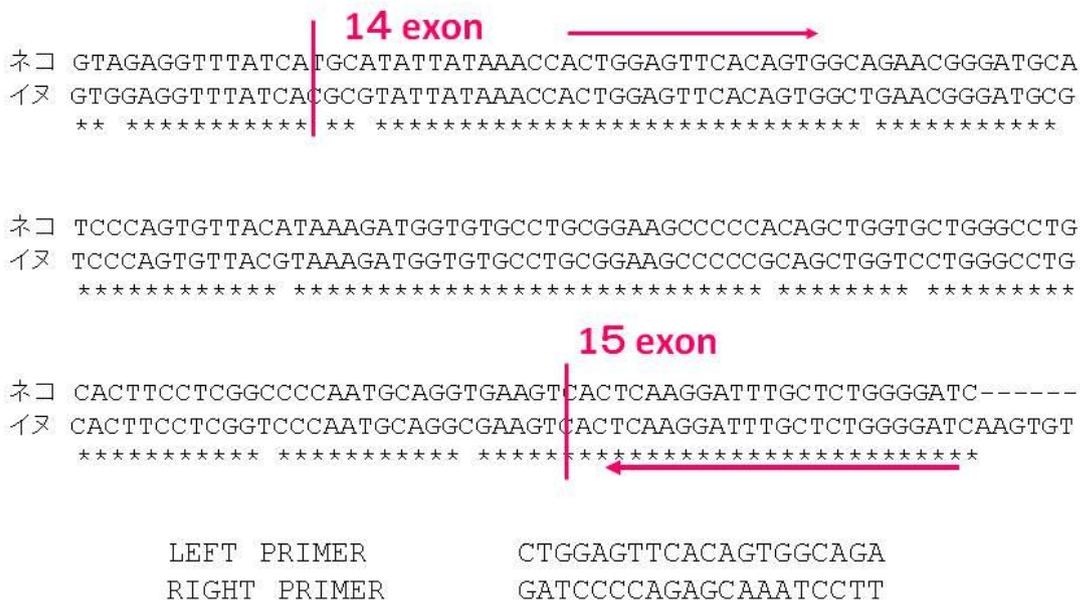
チオレドキシソレダクターゼ2遺伝子特異的なプライマーを用いて、1レーン、マングース繊維芽細胞のゲノムを鋳型としたPCRでは約300bpのフラグメントが検出され、2、3、4レーンでは、それぞれ繊維芽細胞、卵巣、精巣のcDNAを鋳型としてPCRを行なったところ、ゲノムからイントロンを除いた約144bpのフラグメントが検出された(図3)。これらはゲノム、cDNAいずれもマングースのチオレドキシソレダクターゼ2遺伝子として予想されるサイズである。今後、このプライマーセットを用いてマングース初代培養肝細胞に水銀を暴露した細胞と暴露されていない細胞について、チオレドキシソレダクターゼ2遺伝子の発現に変化が生じるかどうかを検討する予定である。同様にその他の代謝酵素についても順次プライマーセットの作製し、水銀暴露応答性遺伝子の探索を行なう。

図1. 水銀毒性感受性試験



本研究で行なった水銀毒性感受性試験に用いたMTTアッセイの概要図

図2. ネコ、イヌのチオレドキシソレダクターゼ2遺伝子の相同性



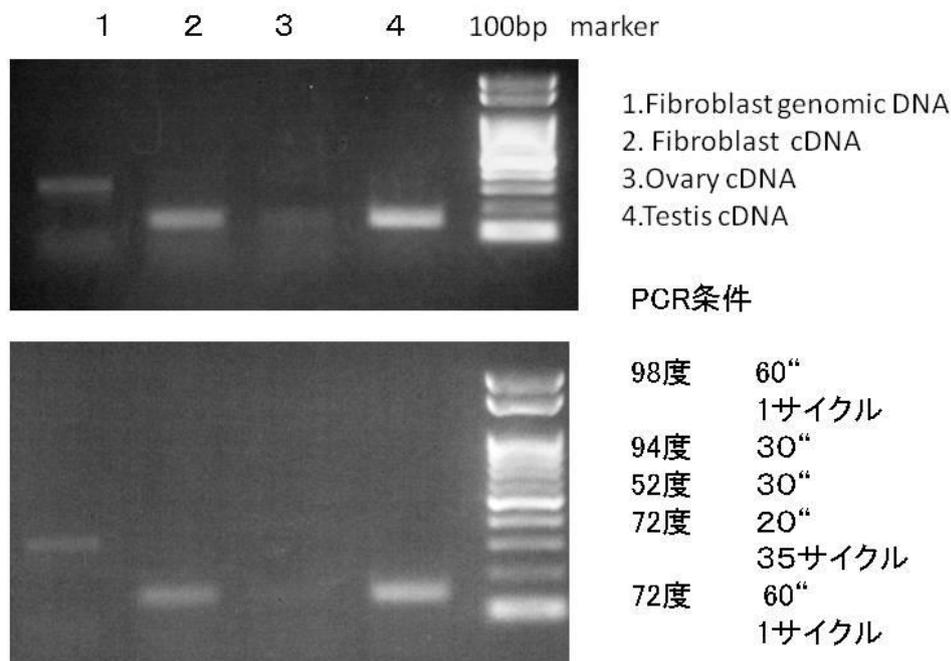
イヌ、ネコのチオレドキシソレダクターゼ2のcDNA構造を示す。イヌとネコで相同する塩基を下に★で示し、ヒトエクソン14の開始地点、およびエクソン15の開始地点のそれぞれ下流に作製したLEFT PRIMER、およびRIGHT PRIMERの位置を矢印で示す。

表1. マンゴース肝初代培養細胞の重金属感受性試験と個体の金属蓄積量

検体番号	Sex	重金属の毒性IC ₅₀ (μM)			金属蓄積量	
		MeHg	HgCl ₂	Se	Hg	Se
#22	オス	5.04 ± 0.258	20.4 ± 0.585	16.1 ± 1.34	10.28037	4.719091
#19	オス	4.36 ± 2.78	22.1 ± 1.31	21.9 ± 1.89	0.608237	1.558864
#101	メス	3.47 ± 0.613	19.6 ± 0.959	22.7 ± 0.393	1.672985	2.34032
#201	メス	2.45 ± 0.11	19.0 ± 0.858	21.0 ± 2.93	1.839319	2.693772
#102	メス	4.93 ± 0.481	15.6 ± 0.384	67.2 ± 1.53	ND	ND
#202	メス	4.25 ± 0.697	18.1 ± 0.514	49.1 ± 5.21	0.811477	1.765169
Rat	オス	9.02 ± 0.344	61.6 ± 13.9	153 ± 18.0	0.0724	4.86

マンゴース検体ナンバーに対し、性別、MeHg、HgCl₂、Seに対するIC₅₀を示す。
ラットについては1検体のみ、同様に性別、MeHg、HgCl₂、Seに対するIC₅₀を示す。
個体の金属蓄積量は肝細胞を分離する前に肝組織を一部切除して測定した。

図3. マングースのチオレドキシシンレダクターゼ2遺伝子の検出



マングース繊維芽細胞より調製したゲノムDNA、および繊維芽細胞、卵巣、精巣より調製したcDNAを鋳型としてPCRを行ない、アガロースゲル電気泳動によりマングースチオレドキシシンレダクターゼ2遺伝子のゲノムDNA、およびcDNAを検出をした。

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

これまでに野生動物の初代培養細胞を用いて重金属暴露応答性の遺伝子発現変化を実験的に検証する知見はきわめて少ない。今回、捕獲されたマングースの初代培養肝細胞を用いて一過性の水銀暴露試験を行ない、その感受性について検証を行なった。このことは、水銀蓄積が高い野生動物について細胞レベルで検証を行なうという、世界でも例のない報告である。また、細胞培養実験では負荷物質に対する遺伝子発現変化を検証するのは定法であり、今回、マングースの水銀蓄積解毒機構の解明に、その初代培養細胞を用いて検証を行なうのは科学における正常進化であると言える。歴史的には個体レベルの交配による遺伝形質の獲得と表現系解析、その分子メカニズムの検証に培養細胞レベル、その責任分子の個体レベルの機能理解にはノックアウト技術が確立されて来たが、現段階で我々はマングースの水銀耐性機構を解明するに当たり、その初期段階に到達した。しかし科学的根拠に基づいた、普遍的な水銀蓄積・代謝機構を検証するには現状では検体数が少なく、また検体に用いる個体のバックグラウンドやキャラクター（年齢、食餌、生活基盤、メスについては出産の有無など）を可能な限り明確にすることで、培養細胞・生化学実験の結果との相関性も検証を行なうことが必要と考えられる。このことを可能として、科学的意義を唱えたい。

(2) 地球環境政策への貢献

ハブ退治を目的として移入されたマングースは天敵がない状況においてその勢力は拡大し、沖縄・奄美地方独自に守られてきた生態系の破壊が進み、深刻化した。今回の東京農工大・渡邊らの調査によってマングースに見られる水銀蓄積量は海洋生物並に高値であることが明らかになった。このように、顕著な神経障害を有することなく水銀を蓄積しうる陸生ほ乳類は希である。海洋生物ではその食物連鎖の上位に位置する鯨やマグロでの水銀蓄積が高値であることが報告されているが、そのメカニズムの解明は飼育や新鮮な組織の入手などが困難なことから、ほとんどが明らかにされていないのが現状である。これに対してマングースは我が国の生態系を脅かす外来種として捕獲・排除されている。すなわち、水銀蓄積生物種として捕獲検体の飼育や、細胞の分離・初代培養や形態学的解析が可能である。今回我々はこのことに注目し、マングース初代培養肝細胞を用いて水銀負荷による遺伝子発現変化から、水銀蓄積および代謝機構の責任分子の同定を試みた。このようなアプローチによってマングース特有の水銀蓄積解毒機構の解明が進めば、その責任分子特異的な阻害剤を探索することによってマングースのみを選択的に排除する薬剤の開発が可能と考えられる。今回、水銀蓄積が低いマングースに由来する培養肝細胞は水銀に高感受性を示したことから、逆に、マングース個体レベルで水銀蓄積解毒機構の破綻を招けば、マングース独自の食餌行動から蓄積する水銀によって、マングースのみを排除することが出来ると考えられる。これらは在来種に影響を与えることなく、さらに深刻化が懸念されるマングースの氾濫を食い止める唯一のツールであると言える。

一方、世界的に進む水銀を含めた重金属大気汚染によって、捕獲された一部のマグロでは、その水銀蓄積量は水俣湾水銀汚染に匹敵する蓄積量を記録した。水銀を含む汚染大気は発展途上国からの無秩序な排出によって増加しており、その排出国臨海から外洋を回遊するマグロは水銀によって汚染されたマグロとして各国で水揚げされ、とくに魚食を好む我々日本人のみならず、長い地球上の歴史から見れば水俣病発生は一過性、かつ集中的であったことから、物流の著しい発展を遂げた今日においては、あの悲劇の再来は短期間の内に世界中に飛び火すると懸念される。様々な国の経済政策を前に、統率的な汚染物質排出に関する法規制の具体化は難航しているが、その間にも確実に生態系は重金属により蝕まれ、その回復のめどは立つすべもない。このような状況において、自然回復を待つ政策は治癒への転換期を迎えるまでに時間軸で積分された多大なる犠牲を生じる。その中で、水銀解毒機構を有する生物種の解毒機構の解明は、我々ヒトの食の安全・治療応用のみならず、傷ついた生態系の可及的回復に大きく貢献できると考えられる。

6. 引用文献

- 1) S. Horai, M. Minagawa, H. Ozaki, I. Watanabe, Y. Takeda, K. Yamada, T. Ando, S. Akiba, S. Abe and K. Kuno (2006) Accumulation of Hg and other heavy metals in the Javan mongoose (*Herpestes javanicus*) captured on Amamioshima Island, Japan. *Chemosphere* 65:657-665
- 2) S. Horai, T. Furukawa, T. Ando, S. Akiba, Y. Takeda, K. Yamada, K. Kuno, S. Abe and I. Watanabe (2008) Subcellular distribution and potential detoxification mechanisms of mercury in the liver of the Javan mongoose (*Herpestes javanicus*) in Amamioshima Island, Japan.

7. 国際共同研究等の状況

なし

8. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

なし

(2) 口頭発表 (学会)

- 1) S. Horai, T. Furukawa, T. Kaname, K. Yanagi, M. Yamamoto, G. Ogura, I. Watanabe, S. Abe and S. Tanabe: CSIAM 2008 International Symposium on Control Strategy of Invasive Alien Mammals, Okinawa, Japan, 2008, “Is specific mercury accumulation features useful to fine a measure for controlling the population of Javan mongoose?”

(3) 出願特許

なし

(4) シンポジウム、セミナーの開催 (主催のもの)

なし

(5) マスコミ等への公表・報道等

なし

(6) その他

なし