

RF-0908 南西諸島のマンガースの水銀濃縮解明に関する研究

(2) 水銀濃縮機構の解析と重金属解毒系遺伝子の発現評価系の作製と個体での発現評価

鹿児島大学 大学院 医歯学総合研究科

山本 雅達

<研究協力者>

愛媛大学 (平成23年4月より鳥取大学)

平田 (宝来) 佐和子

平成21～22年度累計予算額：7,215千円 (うち、平成22年度予算額：3,315千円)

予算額は、間接経費を含む。

[要旨] アジアを中心とする重工業地帯の無秩序な拡充は、今や世界規模の深刻な水銀汚染を引き起こしている。海洋における水銀汚染は食物連鎖高次に位置する大型魚類・海生哺乳類に生態濃縮によってさらに蓄積される。これらは外洋を回遊することから世界各地で水揚げされること、また近年の国際的物流の活性化によって世界中で消費される海洋資源となったが、我が国において水俣病に代表されるように、これら魚肉摂取による水銀中毒の対症療法はいまだ確立されておらず、社会的にも未解決な問題が多い。人々の健康被害に加え、海洋生態系への影響はより深刻化しているように思われるが、実はマグロや一部の鯨類では局所的な水銀汚染に匹敵する濃度を示しながらもその生命活動に影響を受けていない種が存在するという報告が相次いでなされた。このことは、種特有の水銀解毒機構の存在を示唆するが、海洋生物であるが故その試料獲得や研究手法の困難さから水銀蓄積、解毒機構などの解明には至っていない。

一方、我々は陸生哺乳類の中でもマンガースが水銀高蓄積種であることを見出し、水銀解毒機構の解明に有用なツールとなることを示してきた。そこで実験動物であるラットと野生マンガースに由来する肝初代培養細胞を作製し、細胞の重金属感受性試験を行った。その結果、ラット肝細胞は安定した重金属感受性を示すが、マンガースに由来する肝細胞はその生育環境が様々で個体差があり、捕獲時に水銀蓄積が高い個体では、それに由来する肝細胞も水銀の耐性および水銀の取り込み量が高いことから、水銀耐性を示すマンガースはその個体に由来する肝細胞そのものが水銀耐性に寄与している可能性の有無、水銀暴露応答性遺伝子の同定を目的として、マンガースGCS、GRおよびTRX2遺伝子について発現解析を行なった結果、水銀暴露に対してこれらの遺伝子の発現量に変化はなかったことから、機能的には関与していないことが示された。

[キーワード] 水銀、ジャワマンガース、初代培養肝細胞、重金属感受性試験、水銀暴露応答性遺伝子

1. はじめに

水銀は近代工業化の拡大に伴ってわが国では50～70年代にその汚染が社会問題となった。近年、アジアを中心とした新興国の工業生産能力の向上に従ってそれは世界規模で被害が拡大しつつある。水銀中毒は多くの場合その個体の生命維持に甚大な影響を及ぼすが、いまだその治療法や解毒剤の開発には至っていないのが現状である。これまでにマグロや海生哺乳類であるクジ

ラは局所的な水銀汚染に匹敵する濃度を有する個体が確認されながらも、その生命活動に影響を受けていないという報告が相次いでなされ、このことは、種特有の水銀解毒機構の存在が示唆されたが、海洋生物であるが故その試料獲得や研究手法の困難さから水銀蓄積、解毒機構などは明らかにされていない。

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、奄美大島において野生動物種の金属類蓄積調査を広範に行なった結果、そこに生息するマングースは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⁾²⁾³⁾。マングースはその地域において食物連鎖の高次に位置する陸生哺乳類であり、また特定外来種として精力的に捕獲処分が遂行されている動物種である。このことに注目し、マングース由来肝細胞とラット由来肝細胞を用いて、重金属暴露試験、同取込排泄試験、重金属応答遺伝子の発現解析法など、我々は水銀代謝機序解析のツールとしてマングースに由来する肝細胞が有用であることを示した⁴⁾⁵⁾。

2. 研究目的

マングースにおける重金属耐性機構機序と耐性責任分子の同定を目的として（１）マングースとラット肝初代培養細胞の金属取り込み—排泄試験を行ない、（２）同条件下における重金属暴露に対する金属解毒の代謝に関与する遺伝子の発現変化を観察した（概要を図1に示す）。

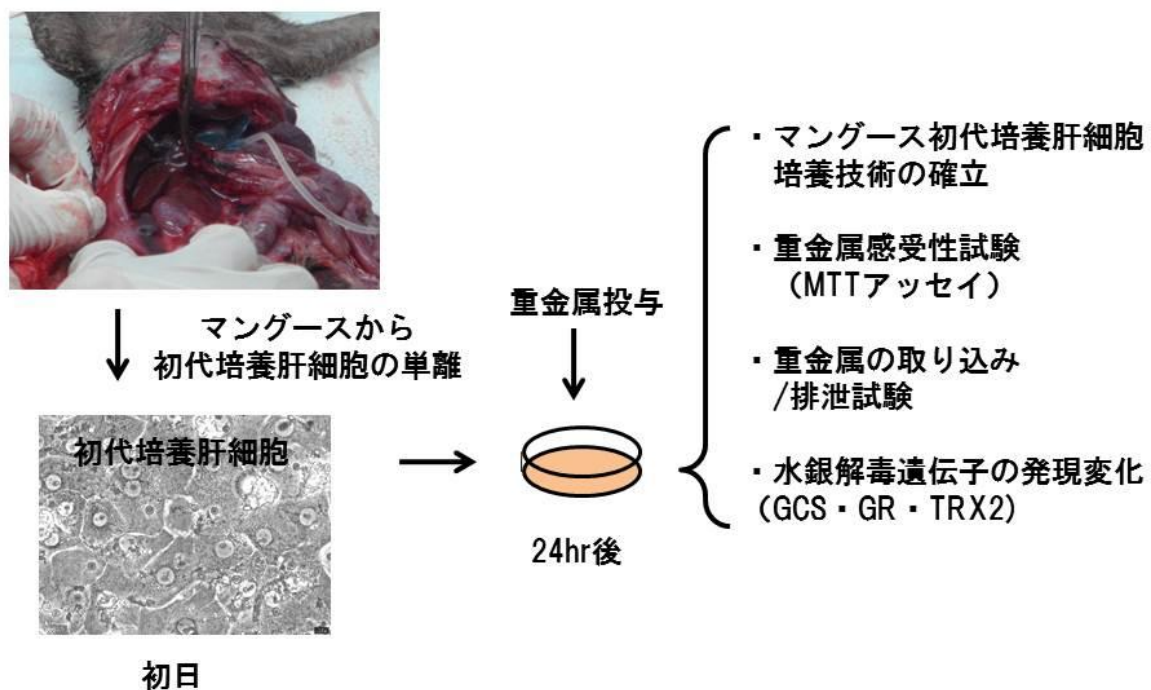


図1. マングース初代培養肝細胞を用いた重金属耐性機構機序と耐性責任分子の同定へのアプローチ

3. 研究方法

(1) マングースおよびラット肝初代培養細胞の金属取り込み—排泄試験

山本、柳らの方法⁴⁾に従って、マングースおよびラット初代培養肝細胞を調製した。

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 (ASTECC)

MeHg (Stream Chemicals 80-2250)

HgCl₂ (WAKO 138-01152)

Se (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)

RF-085-3

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 μM: Sigma #16634)、

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

ファンギゾン (0.5 μg/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

MeHg (1, 5, 10, 15, 20, 30, 50 μM)

HgCl₂ (5, 10, 40, 100, 200, 300, 500 μM)

Se (5, 10, 40, 100, 200, 300, 500 μM)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50μl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OD570nm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OD570nm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。

b 金属取り込み—排泄試験

同時に水銀暴露された細胞を回収し、細胞内に取り込まれたMeHg量、および培養液からMeHgを除いて時間ごとに回収した細胞からMeHg量を定量した値を、それぞれ取り込み量および排泄量として解析した。元素分析は細胞にRIPAバッファー1mLを添加し溶解した後、硝酸3.5mLを加えてマイクロウェーブ分解し、Hgは微量水銀測定装置(CV-AAS)を用いて、SeはICPイオン源質量分析計(ICP-MS; ICP-MS 7500cx, Agilent Technologies, Tokyo, Japan)を用いて測定した。分子イオンによる干渉を回避するため、水素モードでSeを測定した。また、内部標準試料としてスカンジウム(Sc)とロジウム(Rh)をオンラインで導入した。Hgは総Hg (T-Hg)の濃度を指す。

(2) マンダース肝細胞の重金属暴露時の遺伝子発現変化

1) マンダース gamma-glutamylcysteine synthetase の触媒ユニット (GCS) と Glutathione reductase (GSR) のmRNAを検出するプライマーの作製

マンダースの遺伝子発現を検討するためにプライマーを作製するには、マンダースの遺伝子情報は皆無に等しいため、現在既知となっているネコの遺伝子配列を元にして、プライマーを設計した。ネコGCSについてはGene No. ENSFCAT00000014356より、同様にGSRについてはENSFCAT00000001476によりその一次構造を得た。図2にネコGCSおよび図3にGSRの一次構造を示す。

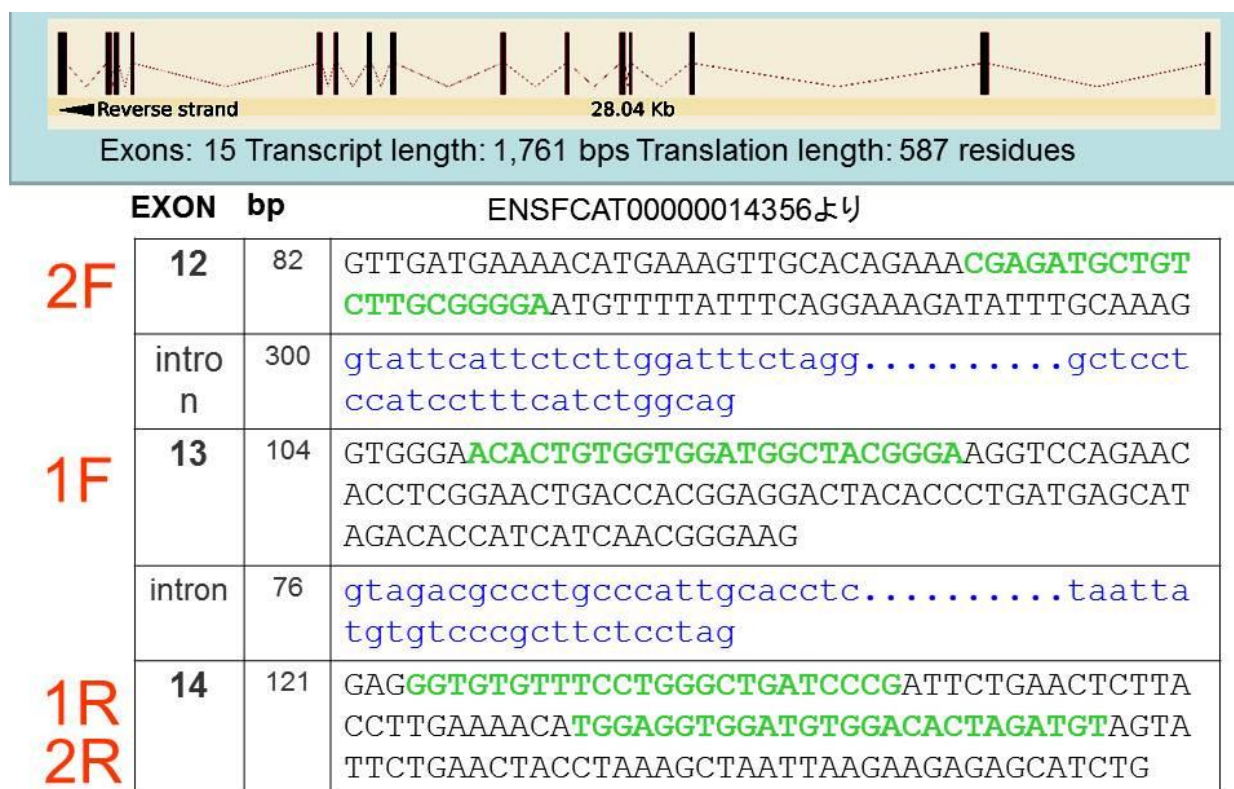


図2. ネコのGCSのDNA配列とプライマー位置

ネコGCSは15個のエクソンからなり、その転写産物の長さは 1761ベース、587 アミノ酸をコードする遺伝子である。この遺伝子のエクソン12と13の間に位置するイントロンは300ベース、それに対して13-14間のイントロンは76ベースと短いことから、今回マングースGCSのプライマーセットとしてエクソン12とエクソン13にGCS-1FとGCS-2Fを、エクソン14にGCS-1RとGCS-2Rを作製した。一方、ネコGSRは11個のエクソンからなり、その転写産物は1236ベース、411 アミノ酸をコードする遺伝子である。この遺伝子のエクソン1とエクソン2の間にあるイントロンは1164ベース、また、エクソン2-3間のイントロンは2646ベースと比較的短いことから、マングースGSRのプライマーセットとしてエクソン1にGSR-1F、エクソン2と3にGSR-1RとGSR-2Rを作製した。それぞれのプライマーのシーケンスを図4に抽出して示す。

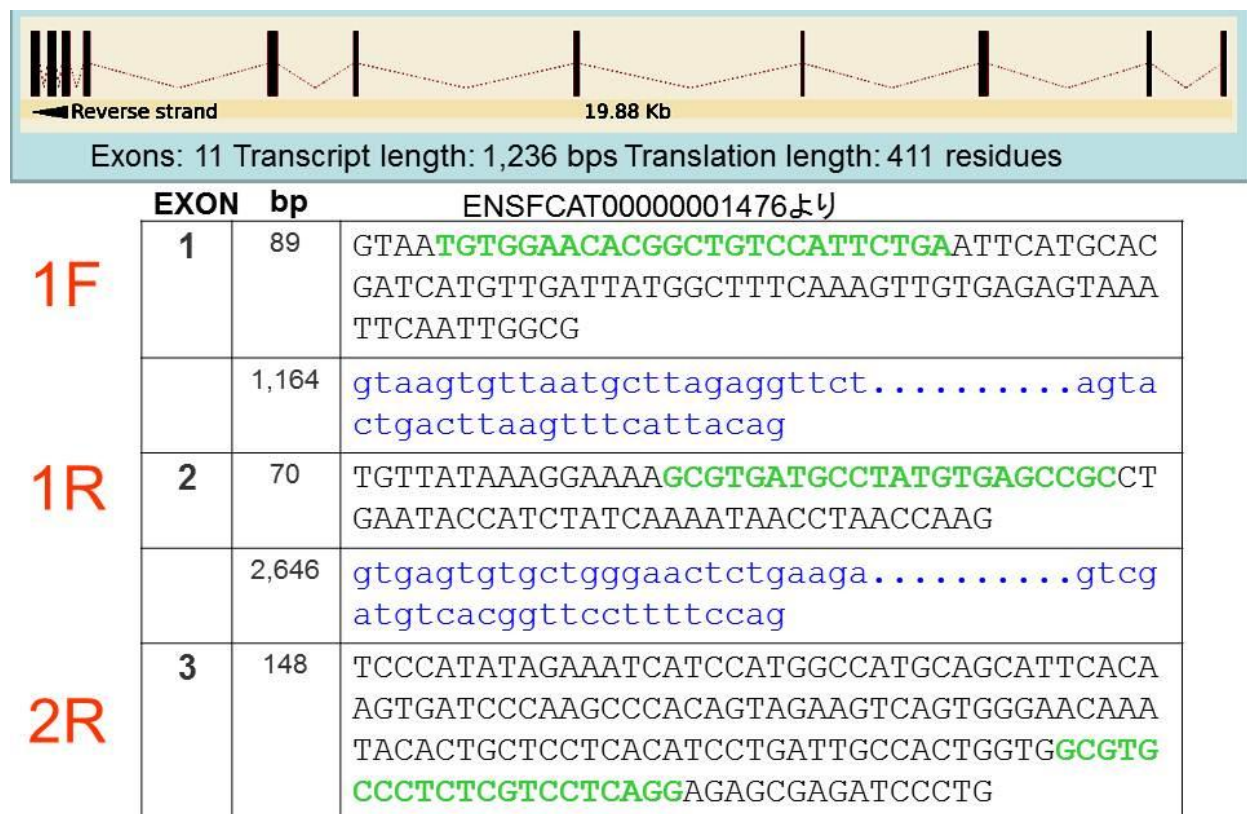


図3. ネコのGSRのDNA配列とプライマー位置

GCS-1F	ACACTGTGGTGGATGGCTACGGGA
GCS-1R	CGGGATCAGCCCAGGAAACACACC
GCS-2F	CGAGATGCTGTCTTGCGGGGA
GCS-2R	ACATCTAGTGTCCACATCCACCTCCA
GSR-1F	TGTGGAACACGGCTGTCCATTCTGA
GSR-1R	GCGGCTCACATAGGCATCACGC
GSR-2R	CCTGAGGACGAGAGGGCACGC

図4. プライマーの配列

2) 逆転写物の同定

マンダースGCSとGSRのmRNAを検出するために、マンダース繊維芽細胞に由来する genome DNAおよび全RNAからcDNAを調製し、これらを鋳型として図5に示す条件でPCR反応を行なった。

PCR反応 (μL)

反応液組成

10x Blend Taq Buffer	2.5
2mM NTP	2.5
DDW	16.75
cDNA (1μg)	1.0
Foward Primer (10pmol)	1.0
Reverse Primer (10pmol)	1.0
Blend Taq	0.25 / Total 25

cDNAのPCR条件

step1	1サイクル
94°C	2 min
step2	30サイクル
94°C	30sec
57°C	30sec
72°C	40sec
step3	1サイクル
72°C	1min

genome DNAのPCR条件

step1	1サイクル
94°C	2 min
step2	30サイクル
94°C	30sec
57°C	30sec
72°C	90sec
step3	1サイクル
72°C	2min

図5. PCRの反応条件

genome DNA、cDNAおよびPCR反応はそれぞれ、TOYOBO社 Mag Extracter、同revatora A cDNA合成キット、Blend Taq またはタカラ社Ex Taqを用いてそれぞれのプロトコールに準じて行なった。cDNAを用いてPCR反応（上段）、genome DNAを用いて反応した生成物（下段）をTAEアガロースゲ

ルで電気泳動を行ない確認した（図6）。

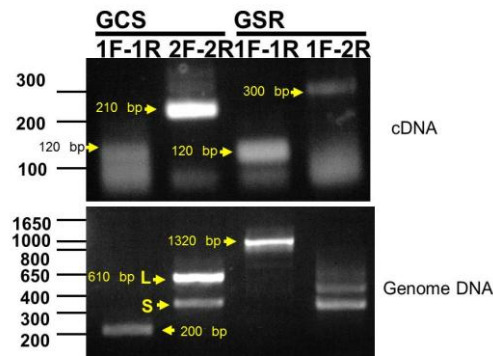


図6. PCR産物の電気泳動

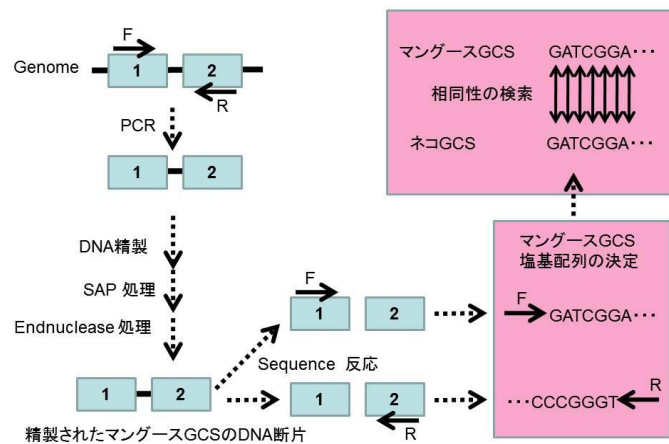


図7. マングースGCSおよびGSRのシーケンス解析

3) マングースGCSとGSRの同定

作製したGCSおよびGSRのプライマーセットによって増幅されたDNA断片をQIAGEN社 DNA extraction kitを用いてプロトコールに従い抽出した。さらにRoche社Shrimp alkaline phosphatase (SAP)を用いて37°C 30分反応させてDNAの5'リン酸の脱リン酸化を行なった。これをタカラ社end nucleaseを用いて鋳型DNAの消化を37°C 30分反応させて行なった後、Applied Biosystems Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kitを用いてプロトコールに従ってシーケンス反応を行なった。得られた一次構造について、ネコGCSはGene No. ENSFCAT00000014356より、同様にGSRについてはENSFCAT0000001476と相同性検索を行なった。その方法を図7に示す。

4) マングース肝細胞の重金属暴露時の遺伝子発現変化の解析

方法（1）に示す条件で培養した細胞から全RNAを回収し、cDNAを作製した。このcDNAを鋳型として図5に示す条件でPCRを行い、Gamma-glutamylcysteine synthetaseのカタリティックサブユニット（GCS）、Glutathione reductase（GR）およびThioredoxin reductase 2（TRX2）の発現変化を解析した。

4. 結果・考察

(1) マングースおよびラット肝初代培養細胞の金属取り込み—排泄試験

平成21年度までにマングース6検体、ラット3検体のMeHg、HgCl₂、Seに対する感受性を示した。その結果、マングースよりも、ラットの方が感受性が低いつまりこれらの重金属に対して耐性度が高いという結果を示した（図8）。

ラット	Sex	MeHg	HgCl ₂	Se
#2009	M	9.02	61.60	153
#2010-1	M	7.66	23.10	>200
#2010-2	M	9.20	15.20	>560
平均		8.63±0.84	33.30±24.82	153±222
マングース 平均(n=6)		4.08±0.98	19.13±2.20	33.0±20.43

図8. ラットとマングース肝初代培養細胞の重金属感受性試験（IC₅₀:50%致死量の値）

初代培養開始から24時間後に金属に暴露し、24時間後にMTTアッセイにより生存細胞数を測定した。薬剤濃度はμMで示した。

平成22年度ではマングースを4検体加えて10検体とし、重金属感受性試験を行なった。その結果、ラットとマングースにおけるMTTアッセイ（24 h）によるMeHg、HgCl₂のIC₅₀値については顕著な差が見られなかった（図9）。しかしながらNa₂SeO₃のIC₅₀値はラットのほうが耐性が高く、用いた薬剤濃度ではIC₅₀を算出できなかった。ラット3検体はいずれも150 μM以上の高い値を示したことから、Seについてはマングースよりラットの方が耐性が高い。

また、マングースのMeHgのIC₅₀にばらつきが観察されたが、これについて検体となったマングースの肝臓中（捕獲時の）T-Hg濃度とその検体に由来する肝細胞のMeHgとSeのIC₅₀との相関を調べたところ、肝臓中T-Hg濃度が高くなるとMeHgに対する耐性度もそれに相関して耐性度が上がるという結果が得られた（図10）。

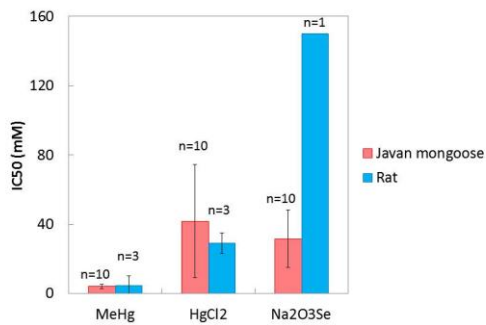


図9. ラットとマングース肝初代培養細胞の重金属感受性試験 (IC50: 50%致死量の値)

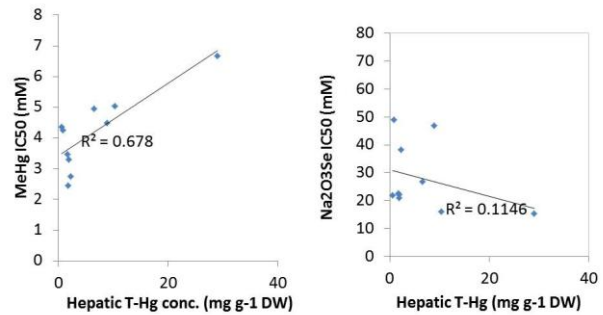


図10. ジャワマングース肝臓中T-Hg濃度とMeHgおよびSeのIC50との関係

このことから、そもそも生育期間中に多くの水銀に暴露され、水銀高蓄積を示す個体に由来する肝細胞では、何らかの影響で水銀耐性機能を有するようになると考えられる。すなわち、高蓄積個体では何らかの解毒機構が存在するのではないかと期待させる結果が得ることができた。

一方、セレンの耐性度は個体の水銀の蓄積量に負に相関して下がる結果となった。クジラなど海洋性哺乳類ではセレンと水銀の両方を高蓄積している個体が多く見受けられ、セレンや水銀などの重金属の解毒には共通の機構を介している可能性が考えられたが、マングースの場合、共通の重金属解毒機構ではなく、水銀に対する固有の解毒機構の存在が示唆される。

次にこれらの細胞の水銀の細胞内動態を調べるために、MeHgを用いて取り込み・排泄試験を行った。その結果、ラットでは時間経過に依存して取り込み量は増加し、約2時間でプラトーに達する。一方、マングースではラットに比べて取り込み量が低く、その排泄量についても2時間取り込ませた検体からMeHgをリリースして2時間の間検討したところ、その培養過程におけるMeHg濃度は低かった (図11)。

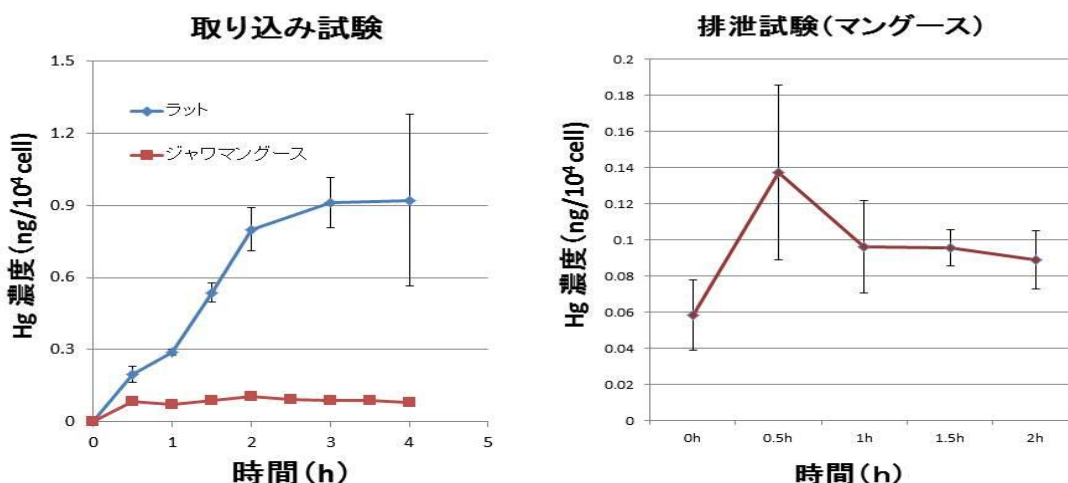


図11. ラット・マングース肝初代培養細胞のメチル水銀取り込み・排泄試験(負荷濃度: 2 μ M)

また、この検体はそもその水銀蓄積量が不明であった。これに対して、水銀高蓄積（T-Hgレベルは29.1 (ug g⁻¹ DW)）を示した検体について、取り込み試験を行なったところ、ラットに比較して有意に高い値でMeHgが取り込まれていることが分かった。ラットはその取り込み量が2時間でプラトーに達するが、この高蓄積のマンガースでは2時間を超えても取り込み量が上昇していた（図12）。

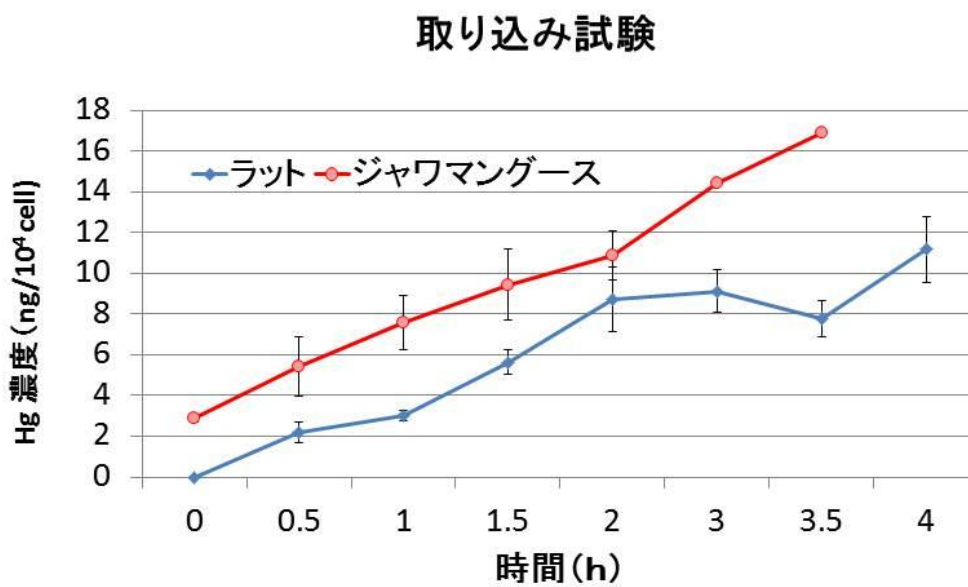


図12. ラット・マンガース肝初代培養細胞のメチル水銀取り込み試験（負荷濃度:2 μ M）

以上のことから、ラットとマンガースに由来する肝細胞の重金属感受性を比較した結果、ラットは安定した重金属感受性を示すが、マンガースはその生育環境が様々であり個体差があること、しかしながら水銀蓄積が高い個体では、その培養細胞も水銀の毒性に感受性が低いこと、MeHgの取り込み量も高いことなど、肝細胞そのものが水銀耐性に寄与しているような性格を持つことが示唆された。

（2）マンガース肝細胞の重金属暴露時の遺伝子発現変化

1) マンガースGCSとGSRのmRNAを検出するプライマーの作製

マンガースゲノムDNAのイントロンの配列を得ることができれば、多型解析に用いる情報にもなる。またRT-PCR反応生成物の中でcDNAと染色体DNAを区別することができる。この2つの理由から、原則的に短いイントロンを挟んでいるエクソン部分にプライマーを設計した。逆に、長いイントロンを挟むPCR反応は多型解析に必要なイントロン部分の情報により多く得られるが、最初のトライアルとして、PCR反応はプライマーの相同性と物理的な伸長距離に強く依存することから、

ネコの遺伝子情報を元に設計したプライマーではその相同性が未知数であるため、今回は短い領域の遺伝子情報を確実に得ることが出来るように短いイントロンを挟む形で作製した。設計はNCBIのPrimer Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) を用いた。

2) 逆転写産物の同定

GCS 2F-2Rを用いたRT-PCR反応 (210bp) ではネコGCSのcDNAから予想されるサイズのフラグメントが得られた。また、GSRについては、GSR-1Fと1R、GSR-1Fと2Rを用いたRT-PCR反応 (120bpと300bp) は共に、ネコGSRのcDNAから予想されるサイズのフラグメントが得られた。一方、ゲノムDNAを鋳型としたGCS-2Fと2RのPCR産物は約350bpの副産物 (Sと表記) を得ると共に、エクソンおよびイントロンの合計サイズで予想される610bpのフラグメントを得ることが出来た。また、GSRについてはGSR-1Fと1Rのプライマーセットによって、予想された長さフラグメント (1320bp) を得ることが出来た。このことから、GCS、GSRについてはcDNA、ゲノムDNA共にネコ-マングース間の遺伝的種間の差は小さく、エクソンとイントロンの構造とその大きさは保存されていると考えられる (図6)。

```

ネコGCS3 1:GTTGATGAAAACATGAAAGTTGCACAGAAACGAGATGCTGTCTTGC GGGGAATGTTTTAT 60
GCS-2F 0:----- 0
GCS-2R 1:-----CGAGATGCTGTCTTGC GGGGAAANTTTTTAT 30
          *****.*****

ネコGCS3 61:TTCAGGAAAGATATTTGCAAAGGTGGGAACACTGTGGTGGATGGCTACGGGAAGGTCCAG 120
GCS-2F 1:-----GGACGGCTACGGCAN T TCCAG 22
GCS-2R 31:TNCAGGAAAGATATTNGCAAAGGTNNGAACACGGTGGTGGACGGCTAC----- 78
          *.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****

ネコGCS3 121:AACACCTCGGAACTGACCACGGAGGACTACACCTGATGAGCATAGACACCATCATCAAC 180
GCS-2F 23:AACAGCTCGGACGTGGCCGCGGAAGACTACGCCCTGATGAGCATAGACACCATCATCAAC 82
GCS-2R 78:----- 78
          *****.***.***.*****.*****.*****.*****.*****.*****

ネコGCS3 181:GGGAAGGAGGGTGTGTTTCCTGGGCTGATCCCGATTCTGAACTCTTACCTTGAAAACATG 240
GCS-2F 83:GGGAAGGAGGGGGTGTGTTTCCTGGGCTGATCCCGATTCTGAACTCTTACCTTGAAAACATG 142
GCS-2R 78:----- 78
          *****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****

ネコGCS3 241:GAGGTGGATGTGGACACTAGATGTAGTATTCTGAACTACCTAAAGCTAATTAAGAAGAGA 300
GCS-2F 143:GAGGTGGATGTGGACACTAGATGTA----- 167
GCS-2R 78:----- 78
          *****

```

$$\begin{aligned} \text{相同性(\%)} &= * \text{の数} / \text{得られた塩基配列} \times 100 \\ &= 219 / 235 \times 100 = 93.2 \end{aligned}$$

図13. マングースのGCS cDNA (PCR2F-2R産物)の配列

3) マングースGCSとGSRの同定

作製したGCSおよびGSRのプライマーセットによって増幅されるDNA断片がGCSおよびGSRであるのかどうか、また、それは種間でどの程度保存されているのかを検討するために、マングースゲノムを鋳型としたPCR反応生成物についてダイレクトシーケンス反応を行ない、その塩基配列を決定後、ネコGCSおよびGSRとの相同性検索を行なった。その結果、GCSのゲノムDNAについてGCS2FおよびGCS2Rでシーケンスを決定した結果約300bp、同様にcDNAについてシーケンスを決定した結果170bpの良好なデータが得られた (図13)。このゲノム情報にはcDNAのシーケンスデータと重な

る部分が170bp存在し、約130bpの未知のイントロン部分のシーケンスデータを得ることができた（図14、15）。また、マングースGCSのcDNAシーケンスはネコのGCSと93.2%の高い相同性を示した（図13）。一方、マングースGSRのシーケンス結果から、GSR-1Fと1RのcDNA約130bp（図16）とGSR-1Fと2RのcDNA約290bpの塩基配列が得られた（図17）。

```

Genome GCS-2FL 1:-----CA-ATTTT--TCAGGAAAGATATTTGCAAAGGTATNCA 36
Genome GCS-2RL 1:TCGAGATGCTGTCTTGC GGGGAAAAGTTTTATTTCAGGAAAGATATTTGCAAAGGTATTCA 60
cDNA GCS-2F 0:----- 0
cDNA GCS-2R 1:-CGAGATGCTGTCTTGC GGGGAAAANTTTATTNCAGGAAAGATATTTGCAAAG----- 52
          *****.***** Intron
Genome GCS-2FL 37:TTCTCTTGGAAATTTCTAGGGTCACTCTTTTTAAGTGTTTATTTTGATAGAGGGCGGTGTAC 96
Genome GCS-2RL 61:TTCTCTTGGGA-TTTCTAGGGTCACTCGTTTTAAGTGTTTATTTTGATAGAGGGCGGTGTAC 119
cDNA GCS-2F 0:----- 0
cDNA GCS-2R 52:----- 52
          Intron
Genome GCS-2FL 97:ATATGCCCCAGCCAGGGAGGGGCAAAGAGAGGGGGAGAGAGAATTCCAAAGCCGGCCCTGG 156
Genome GCS-2RL 120:ATATGCCCCAGCCAGGGAGGGGCAAAGAGAGGGGGAGAGAGAATTCCAAAGCCGGCCCTGG 179
cDNA GCS-2F 0:----- 0
cDNA GCS-2R 52:----- 52
Genome GCS-2FL 157:GCTGTTAGCACAGAGTCCAACGTGAGGCTCAACCCCATGAACCATGAGATCATGACCTGA 216
Genome GCS-2RL 180:GCTGTTAGCACAGAGTCCAACGTGAGGCTCAACCCCATGAACCATGAGATCATGACCTGA 239
cDNA GCS-2F 0:----- 0
cDNA GCS-2R 52:----- 52
Genome GCS-2FL 217:ACTAAAATCAAGAGTTGGATGTTGTACTACTGAGCCCGCCAGGCACCCCAAGTCCCTC 276
Genome GCS-2RL 240:ACTAAAATCAAGAGTTGGATGTTGTACTACTGAGCCCGCCAGGCACCCCAAGTCCCTC 299
cDNA GCS-2F 0:----- 0
cDNA GCS-2R 52:----- 52

```

図14. マングースGCSのgenomeDNA配列(PCR 2F-2RL産物)前半～300bp

```

Genome GCS-2FL 277:AC-CGTGGGCTCTCCCAAGCCGCTGAAGCTCCTCCGTCTCTCCCCGGCAGGTGGGAAC 335
Genome GCS-2RL 300:AC-CGTGGGCTCTCCCAAGCCGCTGAAGCTCCTCCGTCTCTCCCCGGCAGGTGGGAAC 358
cDNA GCS-2R 53:-----GTNNGAAC 60
          ***** Intron *****
Genome GCS-2FL 336:ACGGTGGTGGACGGCTACGGCAAGGCCAGAACAGCTCGGACGTGGCCGCCGAAGACTAC 395
Genome GCS-2RL 359:ACGGTGGTGGACGGCTACGGCAAGGCCAGAACAGCTCGGACGTGGCCGCCGAAGNCTAC 418
cDNA GCS-2F 1:-----GGACGGCTACGGCANNTCCAGAACAGCTCGGACGTGGCCGCCGAAGACTAC 52
cDNA GCS-2R 61:ACGGTGGTGGACGGCTAC----- 78
          *****
Genome GCS-2FL 396:GCCCTGATGAGCATAGACACCATCATCAACGGGAAGGTAGGGGCCCTGCCCGGCGCTCG 455
Genome GCS-2RL 419:GCCCTGATGAGCATAGACACCATCATCAACGGGAAGGTAGGGGCCCTGCCAGGCGCTCG 478
cDNA GCS-2F 53:GCCCTGATGAGCATAGACACCATCATCAACGGGAAG----- 88
          ***** Intron *****
Genome GCS-2FL 456:CAGCACCTGCGCTGCAGGCAGGGCGTAATGATGTGTCTGCTTCCCGTAGGAGGGGGT 515
Genome GCS-2RL 479:CAGCACNTGCGCTGCAG----- 496
cDNA GCS-2F 89:-----GAGGGGGT 96
          ***** Intron *****
Genome GCS-2FL 516:GTTTCCTGGGCTGATCCCGATTCTGAACTCTTACCTTGAAAACATGGAGGTGGATGTGGA 575
Genome GCS-2RL 496:----- 496
c_GCS_2f.prj 97:GTTTCCTGGGCTGATCCCGATTCTGAACTCTTACCTTGAAAACATGGAGGTGGATGTGGA 156
          *****
Genome GCS-2FL 576:CACTAGAT 583
Genome GCS-2RL 496:----- 496
cDNA GCS-2F 157:CACTAGATGTA 167
          *****

```

図15. マングースGCSのgenomeDNA配列(PCR 2F-2RL産物)後半～600bp

これらは各々、ネコGSRと85.1%と95.8%の高い相同性を示した。以上の結果から、マンガースのcDNAを鋳型としてPCRにより得られたDNA断片はネコのGCSおよびGSRとの相同性が高いことが明らかになった。また、マンガースのGCSのgenomeの塩基配列を決定したところ、ユニークなマンガースのイントロン領域の塩基配列情報が得られた。この領域について、個体間で多型解析を行なうことで、個体識別の一手法（方法論）として確立できる可能性があると考えている。

4) マングース重金属感受性遺伝子の発現変化の解析

マンガース3検体から得た肝細胞を24時間培養後、2 μ MのMeHgを加えて30分おきに回収した細胞について、GCS、GR、TRX2の発現変化を観察した。補正はアクチンにより行なった。MeHg暴露から2時間後まで（検体1は4時間）の発現変化を検討したが、いずれの遺伝子もMeHg負荷によって発現が変化しなかった（図18）。

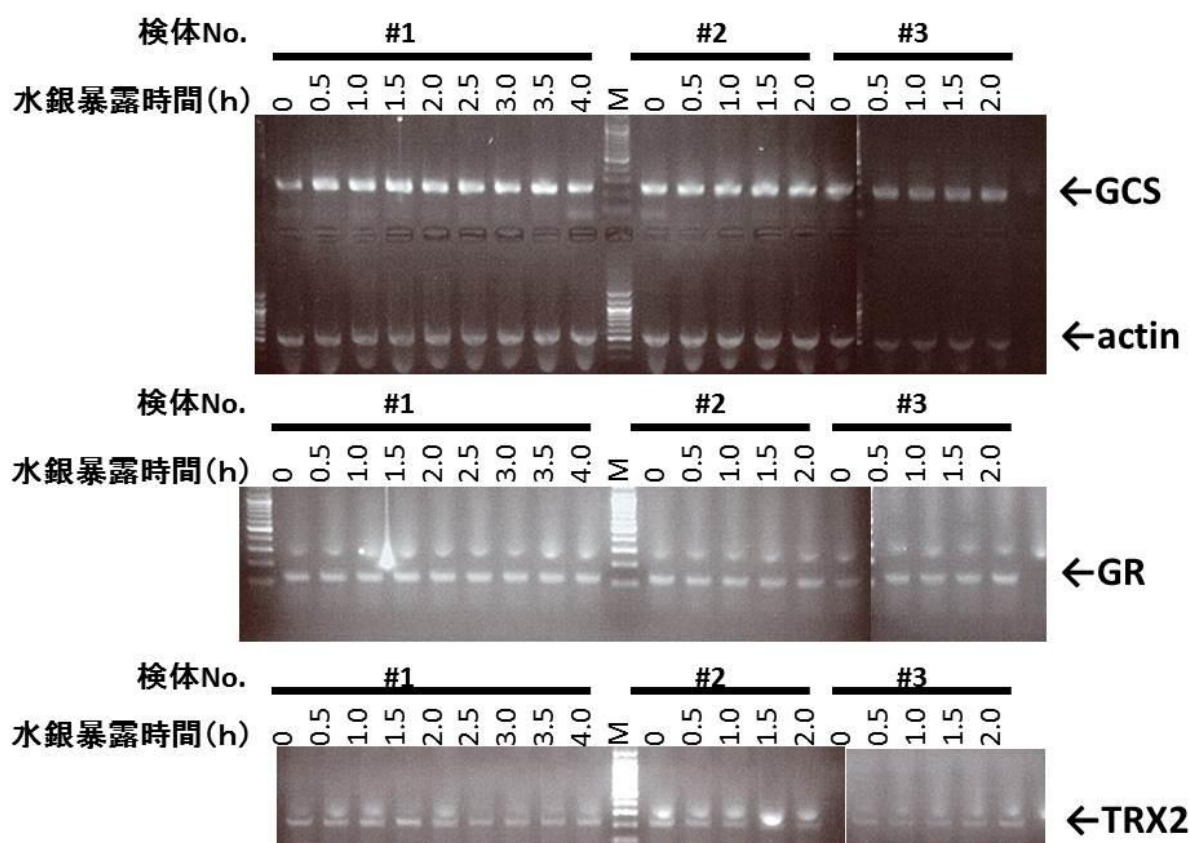


図18. マングース肝初代培養細胞における水銀負荷時の遺伝子発現変化

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

本研究によって、野生マンガースという希少な動物試料を用いて初代培養肝細胞の培養技術を開発し、*in vitro*において重金属感受性試験や、取り込み・排泄試験についても解析可能となった。マンガースに由来する“培養レベルの肝細胞”のMeHgに対する感受性はそれに由来する個体の水銀蓄積の度合いに依存する傾向があることを示し、感受性試験で得られるデータは培養レベルと個体間が正に相関するという画期的な研究手法を確立した。一方、我々は海洋性哺乳類のセ

レンの蓄積量と水銀の蓄積量が正に相関することに注目して、マングース肝細胞においても同様の傾向があるかを検討した。その結果セレンの耐性度は個体の水銀の蓄積量に負に相関して下がる結果となった。このことは、水銀高蓄積を示す個体にはセレン類似の分子化合物を駆除剤として使用することで、有効性が見いだせる可能性を示した。

また遺伝的情報に乏しいマングース培養細胞の発現解析を遂行する上で、マングース以外の動物種の遺伝情報から作製したプライマーを用いることで、マングースの重金属負荷に応答する遺伝子の探索も可能であることを示した。

(2) 環境政策への貢献

我々が最終目標と掲げた水銀応答性遺伝子の探索および水銀解毒機構の解明には至らなかったが、それにはさらに大規模な実験系により検体数を増やす必要があると考えられる。しかしながら本年度まで継続的に行なった研究により確立した *in vitro* の実験手法は野生動物の摂食行動・生活環境をも反映しうるデータを得られることを示した。このことは今後、野生動物の生態とそれにかかわる環境変化との相関を分子生物学的に解析していく学問を切り開き、その応用によって地球規模の環境変化による弊害の除去に貢献できると期待される。

6. 引用文献

- 1) 環境省地球環境研究総合推進費終了研究成果報告集平成19-20年度「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」 p367-426.
- 2) S. Horai, M. Minagawa, H. Ozaki, I. Watanabe, Y. Takeda, K. Yamada, T. Ando, S. Akiba, S. Abe & 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.
- 3) S. Horai, T. Furukawa, T. Ando, S. Akiba, Y. Takeda, K. Yamada, K. Kuno, S. Abe & I. Watanabe (2008) Subcellular distribution and potential detoxification mechanisms of mercury in the liver of the Javan mongoose (*Herpestes javanicus*) in Amamioshima Island, Japan. *Environ Toxicol Chem*, 27, 1354-1360.
- 4) 環境省地球環境研究総合推進費終了研究成果報告集平成19-20年度「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」 p373-401.
- 5) 環境省地球環境研究総合推進費終了研究成果報告集平成19-20年度「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」 p402-4261.

7. 国際共同研究等の状況

特に記載すべき事項はない。

8. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

特に記載すべき事項はない。

(2) 口頭発表 (学会等)

- 1) 宝来佐和子、古川龍彦、要 匡、柳 久美子、山本雅達、小倉 剛、渡邊 泉、

阿部慎太郎、田辺信介：第18回環境化学討論会（2009）：つくば

「ジャワマングース (*Herpestes javanicus*) におけるHg蓄積特性と肝初代培養法の確立」

2) 柳 久美子、花房宏昭、宝来佐和子、山本雅達、古川龍彦、渡邊 泉、平野昴規、小倉 剛、
要 匡：第32回日本分子生物学会（2009）：横浜

「マングースTert遺伝子のクローニングと発現解析」

3) 花房宏昭、柳久美子、森田この美、宝来佐和子、山本雅達、古川龍彦、渡邊泉、小倉剛、要匡：
第33回日本分子生物学会年会（2010）：神戸

「マングースTert遺伝子断片発現ベクターを導入したマングース線維芽細胞の細胞生物学的機能
解析」

(3) 出願特許

特に記載すべき事項はない。

(4) シンポジウム、セミナーの開催（主催のもの）

特に記載すべき事項はない。

(5) マスコミ等への公表・報道等

特に記載すべき事項はない。