

20020948

別添2 厚生労働科学研究費補助金研究報告書表紙

厚生労働科学研究費補助金

食品・化学物質安全総合研究事業

生活環境中微量化学物質に対する感受性決定  
に関する遺伝子群の解明

平成14年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 永沼 章

平成 15 (2003) 年 4 月

---

## 目次

---

I. 総括研究報告	
生活環境中微量化学物質に対する感受性決定に関する遺伝子群の解明	……………1
永沼 章	
II. 分担研究報告	
1. メチル水銀、ヒ素、パラコートに対する感受性に関わる遺伝子群の同定	……………7
永沼 章	
2. Cdc34高発現によるメチル水銀毒性軽減機構	……………11
黄 基旭	
3. ヒ素毒性の発現に影響を与える遺伝子群	……………29
大橋一品	
4. カドミウムに対する感受性決定因子メタロチオネインの遺伝子多型	……………47
久下周佐	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	……………68
IV. 研究成果の刊行物・印刷物	……………69

別添 4 厚生労働科学研究費補助金総括研究報告書

# 1. 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（食品・化学物質安全総合研究事業）

（総括）研究報告書

生活環境中微量化学物質に対する感受性決定に関する遺伝子群の解明

主任研究者 永沼 章 東北大学大学院薬学研究科教授

健康影響が懸念されている化学物質や重金属類に対する感受性決定遺伝子を酵母を用いて網羅的に検索・同定した。その結果、メチル水銀、ヒ素およびパラコート各々が示す細胞毒性の発現に影響を与える遺伝子をそれぞれ多数同定することに成功した。また、我々が既にメチル水銀耐性因子として同定していたCdc34の作用機構について検討し、本蛋白質が有するユビキチン転移活性がメチル水銀毒性の軽減に必須であることが判明し、Cdc34の高発現が特定の蛋白質のユビキチン化を促進してプロテアソームでの分解を促すことによってメチル水銀の毒性発現が抑制されることが明らかとなった。さらに、既知のカドミウム毒性防御因子であるメタロチオネインの遺伝子多型を検討し、プロモーター領域および翻訳領域中にそれぞれ一塩基置換が存在することを見出した。

分担研究者

久下周佐

（東北大学大学院薬学研究科・助教授）

大橋一品

（東北大学大学院薬学研究科・助手）

黄 基旭

（東北大学大学院薬学研究科・教務職員）

A. 研究目的

化学物質に対する感受性の種差や個体差は主に遺伝子レベルで決定されており、遺伝的高感受性要因を有する人々は、正常人には影響のない少量の化学物質の摂取によ

って健康障害が生じる。動物実験ではダイオキシンに対するモルモットの感受性がハムスターに比べて約1万倍高いことが判明しており、モルモットタイプの遺伝子を保持する人間個体が存在する可能性も否定できない。したがって、健康障害を引き起こす可能性のある化学物質に対して高感受性を示すような遺伝的要因を持った人々の特定は、健康被害を最小限に抑えるという厚生労働行政において極めて重要な課題であり、可及的速やかに対応すべき事項の一つと考えられる。我々は最近、より確実に感受性決定因子を見つけだす方法を模索し、

対象となる化学物質に対する耐性を酵母に与える遺伝子をライブラリー中から無作為に検索する方法が有効なことを見出した。酵母の遺伝子の多くはヒトにも相同遺伝子が存在するので、酵母遺伝子の検索によって感受性決定に関わるヒト遺伝子が判明する可能性は高い。そこで本研究では、上記の方法などを用いて、健康影響が懸念されている代表的な化学物質や重金属類に対する感受性決定遺伝子を網羅的に検索・同定すると共に、それら遺伝子から作られる蛋白質の機能解析などによって化学物質感受性決定因子を明らかにすることを目的とする。

## B. 研究方法

遺伝子ライブラリープラスミドを酵母に導入した後に、この酵母を個々の化学物質の存在下（通常の細胞が生育できない濃度）で培養し、生育してきた酵母に導入されている遺伝子を単離し、塩基配列を決定した。また、ほぼ全ての遺伝子を各々欠損させた酵母ライブラリーを用いて、欠損によって酵母を化学物質に対して耐性または感受性にする遺伝子を単離・同定した。

### （倫理面への配慮）

本研究ではヒトの遺伝子解析を行ったが、実施に当たっては倫理委員会で承認された方法に従い、提供者に研究内容を十分に説明してインフォームドコンセントを得た。なお、試料提供者、その家族、血縁者、その他関係者の人権および利益の保護の取り扱いには十分に配慮し、個人情報には求めな

かった。

## C. 結果・考察

### (1) メチル水銀毒性の発現に影響を与える遺伝子群の検索

酵母を用いてメチル水銀毒性の発現に影響を与える遺伝子群を検索した結果、我々が既に見出していた*GFA1*および*CDC34*に加えて、新たに23種類の遺伝子を同定することに成功した。そのうち高発現によって酵母のメチル水銀感受性に影響を与える遺伝子は*UBA1*、*UBC4*、*UBC5*、*UBC7*、*YBR203W*、*YLR097C*、*YLR224W*、*UFO1*、*YMR258C*、*RPN10*、*PNG1*、*RAD23*、*BOP3*、*BOP2*、*BMH1*、*BMH2*の16種類であり、欠損によって感受性に影響を与える遺伝子は*UBI4*、*DOA4*、*YDR131C*、*YNL311C*、*MET25*、*FKH1*、*MSN2*の7種類であった。これら23種類の遺伝子の中で少なくとも14種類はコードする蛋白質のホモログが哺乳類にも存在することが確認されている。厚生労働科学研究費に採択される以前は、ひとつの遺伝子が同定される毎にその作用機構を検討するという方針で研究を行ってきたため、我々が過去3年間で同定したメチル水銀毒性関連遺伝子は上述した*GFA1*および*CDC34*の2種のみであった。この2つの遺伝子の発見は共に高い評価を受け、世界的な注目を浴びたが、今年度の本研究において比較的短期間のうちに23種類もの遺伝子を新たに同定できたことは、画期的なことであり、体系的かつ組織的な研究を可能にし

た本研究費の大きな成果といえる。今回同定された遺伝子はその全てが初めてメチル水銀毒性に関わることが判明したものであり、メチル水銀毒性に対する感受性決定機構のみならず、毒性発現機構や防御機構を解明するうえでも、非常に有用な情報を提供することになる。

### (2) Cdc34高発現によるメチル水銀毒性軽減機構

我々は既に、高発現によってメチル水銀毒性に対して防御的に作用する細胞内因子としてCdc34を同定している。そこで、その防御機構を検討した。Cdc34はユビキチン-プロテアソームシステムを構成するユビキチン転移酵素 (E2) ファミリーの一員である。ユビキチン-プロテアソームシステムは細胞内蛋白質の選択的分解を担う重要な細胞内機能の一つであり、短寿命蛋白質や異常蛋白質をユビキチン化したのちに、26S プロテアソームによりATP依存的に分解する。そこで、Cdc34が有するユビキチン転移活性の役割を検討した結果、本活性がメチル水銀毒性の軽減に必須であることが判明し、Cdc34の高発現が特定の蛋白質のユビキチン化を促進してプロテアソームでの分解を促すことによってメチル水銀の毒性発現が抑制されることが明らかとなった。これらの結果から、メチル水銀はある種の特定蛋白質を修飾することによって細胞毒性を発揮し、その一方でユビキチン化システムはこの修飾をユビキチン化シグナ

ルと認識してプロテアソームでの分解を促進させているものと考えられる。したがって、ユビキチン-プロテアソームシステムはメチル水銀毒性に対する防御機構として重要な役割を果たしているものと思われる。

### (3) ヒ素毒性の発現に影響を与える遺伝子群の検索

ヒ素についても同様に検討し、高発現によって亜ヒ酸耐性を与える遺伝子2種 (*PBS2*, *SLG1*) を同定することに成功した。*PBS2*は浸透圧ストレス防御に関与するキナーゼPbs2をコードする遺伝子であり、*SLG1*は細胞壁にかかるストレスに対する防御因子Slg1をコードしている。そこで、両蛋白質がそれぞれ関わるシグナル伝達経路上に存在する因子群と亜ヒ酸耐性との関係を調べるために、それら因子の遺伝子を欠損させた変異酵母の亜ヒ酸に対する感受性を検討した。Pbs2はMAP kinase pathwayに属しMAPKKとして働くが、その活性は二つのMAPKKKであるSte11およびSsk2/22により制御され、それ自身はMAPKであるHog1を活性化することが知られている。検討の結果、Pbs2の上流ではSsk2/22を介する経路上の各遺伝子欠損株が亜ヒ酸に対して高い感受性を示し、Ste11を介する経路に関わる因子の欠損株も弱いながら正常酵母に比べて高感受性を示した。下流の因子では*HOG1*欠損株が高い亜ヒ酸感受性を示し、そのさらに下流では、転写因子Sko1を介する経路に関わる各遺伝子の欠損株が高

い亜ヒ酸感受性を示した。これらの結果から、亜ヒ酸に対する防御機構としてSsk2/22からPbs2を介してSko1へ至るシグナル伝達経路が重要な役割を担っていることが示唆された。一方、Slg1が関与するシグナル伝達経路中の因子では、その下流のPKCを介して活性化されることが知られているPKC-MAPK cascadeに属するBck1, Mkk1/2, Mpk1の各遺伝子欠損株において高い亜ヒ酸感受性が認められた。以上の結果から、Pbs2 やSlg1の高発現によって特定のシグナル伝達経路が細胞内において活性化され、亜ヒ酸に対する防御機構を担う何らかの下流因子の発現が促進されるものと考えられる。これらの結果は、生体がヒ素を感知し、その毒性を防御するためのシグナルを伝える特有の経路を持つ可能性を示すものであり、ヒ素に対する細胞応答機構を考えるうえでも興味深い知見である。

#### (4) パラコート毒性の発現に影響を与える遺伝子群の検索

農薬であるパラコートの毒性発現に影響を与える遺伝子群を検索した結果、高発現によって酵母にパラコート耐性を与える遺伝子3種 (YDR259C, CIN5, CDC34)、欠損によって耐性を与える遺伝子3種 (SPT7, MAC1, FRE1) および欠損によって高感受性にする遺伝子2種 (ATX1, LYS7) を見出すことに成功した。これらの遺伝子がコードする蛋白質の作用機構について今後検討する予定である。

#### (5) カドミウムに対する感受性決定因子メタロチオネインの遺伝子多型

メチル水銀やヒ素については感受性決定に関与する細胞内因子がこれまでほとんど判明していなかったが、カドミウムの場合には以前からメタロチオネインが防御因子として良く知られている。しかし、日本人に腎臓中MT濃度が非常に低い値を示す中高年者が存在することは判明しているものの、メタロチオネインがヒトの個体差を決定する遺伝的要因であるか否かの検討はされていない。そこで、一般的な日本人を対象にしてメタロチオネイン遺伝子の多型をsingle-stranded conformation polymorphism (SSCP) 法により検索した。その結果、プロモーター領域および翻訳領域中にそれぞれ一塩基置換が存在することを見出した。翻訳領域中の一塩基置換はアミノ酸変異を伴うものであり、カドミウム感受性の個体差との関連が考えられる興味深い知見といえる。今後は、これらの遺伝子置換がメタロチオネインの細胞内誘導合成能または蛋白としての機能に及ぼす影響を検討し、ヒトのカドミウム感受性との関係を明らかにしていく予定である。

#### D. 結論

メチル水銀、ヒ素およびパラコートに対する感受性決定に関わる遺伝子を多数同定することに成功した。今後はこれら遺伝子の作用機構について検討する予定である。

## E. 健康危険情報

特になし。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Furuchi, T., Hwang, G. W. and Naganuma, A.: Overexpression of the ubiquitin-conjugating enzyme Cdc34 confers resistance to methylmercury in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Pharmacol.*, 61, 738-741 (2002).

Hwang, G. W., Furuchi, T. and Naganuma, A.: A ubiquitin-proteasome system is responsible for the protection of yeast and human cells against methylmercury. *FASEB J.*, 16, 709-711 (2002).

Naganuma, A., Furuchi, T., Miura, N., Hwang, G. W. and Kuge, S.: Investigation of intracellular factors involved in methylmercury toxicity. *Tohoku J. Exp. Med.*, 196, 65-70 (2002).

Miyairi, S. and Naganuma, A.: Metallothionein determination by isocratic HPLC with fluorescence derivatization. *Methods Mol. Biol.*, 186, 273-283 (2002).

永沼 章、黄 基旭: メチル水銀の毒性発

現機構. *医学のあゆみ*, 202, 895-898 (2002).

永沼 章: 食品中に含まれる金属による健康影響. *金属*, 72, 17-19 (2002).

### 2. 学会発表

古尾谷祐子、黄 基旭、廣島綾乃、古地壯光、永沼 章: 新規メチル水銀耐性因子 Bop3 の同定とその機能解析. 日本薬学会第 122 年会, 2002.

黄 基旭、松本京子、古地壯光、永沼 章: Cdc34 高発現が HEK293 細胞のメチル水銀感受性に及ぼす影響. 日本薬学会第 122 年会, 2002.

Naganuma, A.: Intracellular factors involved in methylmercury toxicity in yeast. *International Symposium on Bio-Trace Elements 2002*, 2002.

Naganuma, A.: Cellular factors involved in methylmercury toxicity in yeast. *The 51st Annual Convention of The Pharmaceutical Society of Korea*, 2002.

永沼 章: 環境汚染重金属に対する感受性決定遺伝子. 第 4 回東北大学学際的ライフサイエンスシンポジウム, 2002.

永沼 章: 環境汚染重金属に対する感受性



を決定する遺伝子群の検索. 第2回 分子  
予防環境医学研究会, 2002.

黄 基旭、松本京子、佐々木大祐、古地壯  
光、永沼 章: 酵母のメチル水銀耐性因子  
Tbr204c の機能解析. 第75回日本生化学会  
大会, 2002.

北 加代子、三浦伸彦、永沼 章: ヒトメ  
タロチオネイン遺伝子のコアプロモーター  
領域の変異がその転写活性に及ぼす影響.  
第75回日本生化学会大会, 2002.

黄 基旭、古地壯光、永沼 章: 酵母 Cdc34  
高発現によるカドミウム耐性獲得における  
Met4 の役割. 第41回日本薬学会東北支部  
大会, 2002.

永沼 章: 重金属に対する感受性に関わる  
細胞内因子. 第25回日本分子生物学会年  
会, 2002.

黄 基旭、古地壯光、永沼 章: Cdc34 高  
発現によるパラコート耐性獲得機構の解析.  
フォーラム 2002: 衛生薬学・環境トキシ  
コロジー2002

黄 基旭、永沼 章: メチル水銀に対する  
細胞内防御機構としてのユビキチンシステ  
ム. 第25回日本分子生物学会年会, 2002.

大谷朋子、大橋一晶、永沼 章: 出芽酵母  
において亜ヒ酸耐性に関わるシグナル伝達  
機構の解明. 日本薬学会第123年会, 2003.

G. 知的財産権の出願・登録状況  
なし。

## II. 分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金（食品・化学物質安全総合研究事業）

（分担）研究報告書

メチル水銀、ヒ素、パラコートに対する感受性に関わる遺伝子群の同定

分担研究者 永沼 章 東北大学大学院薬学研究科教授

メチル水銀、ヒ素およびパラコートの毒性発現に影響を与える遺伝子群を酵母を用いて検索した。その結果、メチル水銀毒性の増強又は軽減に関わる遺伝子23種、同様にヒ素14種、パラコート8種を同定することに成功した。

A. 研究目的

環境化学物質に対する感受性には種差や個体差が存在し、遺伝的に感受性の高い人々は極微量の化学物質に曝露しただけで健康に障害を生じる可能性がある。しかし、この感受性を決定している遺伝子はほとんど分かっていない。そこで本研究では、健康影響が懸念されている代表的な化学物質や重金属類に対する感受性決定遺伝子を網羅的に検索・同定する。

B. 研究方法

遺伝子ライブラリープラスミドを酵母に導入した後に、この酵母を個々の化学物質の存在下（通常の細胞が生育できない濃度）で培養し、生育してきた酵母に導入されている遺伝子を単離し、塩基配列を決定した。また、ほぼ全ての遺伝子を各々欠損させた酵母ライブラリーを用いて、欠損によって酵母を化学物質に対して耐性または

感受性にする遺伝子を単離・同定した。

（倫理面への配慮）

本研究では動物等は使用せず、生物として酵母のみを用いる。したがって、倫理面への配慮を必要としない。

C. 結果・考察

(1) メチル水銀毒性の発現に影響を与える遺伝子群の検索

酵母を用いてメチル水銀毒性の発現に影響を与える遺伝子群を検索した結果、我々が既に見出していたGFA1およびCDC34に加えて、新たに23種類の遺伝子を同定することに成功した。そのうち高発現によって酵母のメチル水銀感受性に影響を与える遺伝子はUBA1、UBC4、UBC5、UBC7、YBR203W、YLR097C、YLR224W、UFO1、YMR258C、RPN10、PNG1、RAD23、BOP3、BOP2、BMH1、BMH2の16種類であり、欠損によって感受性に影響を与える遺伝子は

UBI4, DOA4, YDR131C, YNL311C, MET25, FKH1, MSN2の7種類であった。これら23種類の遺伝子の中で少なくとも14種類はコードする蛋白質のホモログが哺乳類にも存在することが確認されている。

#### (2) ヒ素毒性の発現に影響を与える遺伝子群の検索

ヒ素についても同様に検討し、高発現によって亜ヒ酸耐性を与える遺伝子2種 (*PBS2, SLG1*)、欠損によって酵母を高感受性にする遺伝子12種を同定することに成功した。

#### (3) パラコート毒性の発現に影響を与える遺伝子群の検索

農薬であるパラコートの毒性発現に影響を与える遺伝子群を検索した結果、高発現によって酵母にパラコート耐性を与える遺伝子3種 (*YDR259C, CIN5, CDC34*)、欠損によって耐性を与える遺伝子3種 (*SPT7, MAC1, FRE1*) および欠損によって高感受性にする遺伝子2種 (*ATX1, LYS7*) を見出すことに成功した。

#### D. 結論

メチル水銀、ヒ素およびパラコートに対する感受性決定に関わる遺伝子を多数同定することに成功した。厚生労働科学研究費に採択される以前は、ひとつの遺伝子が同定される毎にその作用機構を検討するという方針で研究を行ってきたため、我々が過

去3年間で同定した遺伝子はメチル水銀耐性に関わる*GFA1*および*CDC34*の2種のみであった。この2つの遺伝子の発見は共に高い評価を受け、世界的な注目を浴びたが、今年度の本研究において比較的短期間のうちに多くの遺伝子を新たに同定できたことは、画期的なことであり、体系的かつ組織的な研究を可能にした本研究費の大きな成果といえる。今回同定された遺伝子はその全てが初めて毒性発現に関わるものが判明したものであり、メチル水銀、ヒ素、パラコートの毒性に対する感受性決定機構のみならず、毒性発現機構や防御機構を解明するうえでも、非常に有用な情報を提供することになる。今後はこれら遺伝子の作用機構について検討する予定である。

#### E. 健康危険情報

特になし。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

Furuchi, T., Hwang, G. W. and Naganuma, A.: Overexpression of the ubiquitin-conjugating enzyme Cdc34 confers resistance to methylmercury in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Pharmacol.*, 61, 738-741 (2002).

Hwang, G. W., Furuchi, T. and Naganuma, A.: A ubiquitin-proteasome system is responsible for the protection

of yeast and human cells against methylmercury. FASEB J., 16, 709-711 (2002).

Naganuma, A., Furuchi, T., Miura, N., Hwang, G. W. and Kuge, S.: Investigation of intracellular factors involved in methylmercury toxicity. Tohoku J. Exp. Med., 196, 65-70 (2002).

永沼 章、黄 基旭: メチル水銀の毒性発現機構. 医学のあゆみ, 202, 895-898 (2002).

## 2. 学会発表

古尾谷祐子、黄 基旭、廣島綾乃、古地壯光、永沼 章: 新規メチル水銀耐性因子 Bop3 の同定とその機能解析. 日本薬学会第122年会, 2002.

黄 基旭、松本京子、古地壯光、永沼 章: Cdc34 高発現が HEK293 細胞のメチル水銀感受性に及ぼす影響. 日本薬学会第122年会, 2002.

Naganuma, A.: Intracellular factors involved in methylmercury toxicity in yeast. International Symposium on Bio-Trace Elements 2002, 2002.

Naganuma, A.: Cellular factors involved in methylmercury toxicity in yeast. The 51st

Annual Convention of The Pharmaceutical Society of Korea, 2002.

永沼 章: 環境汚染重金属に対する感受性決定遺伝子. 第4回東北大学学際的ライフサイエンスシンポジウム, 2002.

永沼 章: 環境汚染重金属に対する感受性を決定する遺伝子群の検索. 第2回分子予防環境医学研究会, 2002.

黄 基旭、松本京子、佐々木大祐、古地壯光、永沼 章: 酵母のメチル水銀耐性因子 Tbr204c の機能解析. 第75回日本生化学会大会, 2002.

黄 基旭、古地壯光、永沼 章: Cdc34 高発現によるパラコート耐性獲得機構の解析. フォーラム 2002: 衛生薬学・環境トキシコロジー2002

永沼 章: 重金属に対する感受性に関わる細胞内因子. 第25回日本分子生物学会年会, 2002.

大谷朋子、大橋一晶、永沼 章: 出芽酵母において亜硫酸耐性に関わるシグナル伝達機構の解明. 日本薬学会第123年会, 2003.

## G. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

表1. 平成14年度の研究によって同定された遺伝子

1. メチル水銀毒性に影響を与える遺伝子

高発現によって影響を与える遺伝子

*UBA1, UBC4, UBC5, UBC7, YBR203W, YLR097C, YLR224W, UFO1, YMR258C, RPN10, PNG1, RAD23, BOP3, BOP2, BMH1, BMH2*

欠損によって影響を与える遺伝子

*UBI4, DOA4, YDR131C, YNL311C, MET25, FKH1, MSN2*

2. ヒ素毒性に影響を与える遺伝子

高発現によって影響を与える遺伝子

*PBS2, SLG1*

欠損によって影響を与える遺伝子

*ROM2, BCK1, SLT2, MCK1, SSK1, SSK2, SSK22, HOG1, SKO1, HSP12, DOG2, RPS278*

3. パラコート毒性に影響を与える遺伝子

高発現によって影響を与える遺伝子

*YDR259C, CIN5, CDC34*

欠損によって影響を与える遺伝子

*SPT7, MAC1, FRE1, ATX1, LYS7*

厚生労働科学研究費補助金（食品・化学物質安全総合研究事業）  
（分担）研究報告書

Cdc34高発現によるメチル水銀毒性軽減機構

分担研究者 黄 基旭 東北大学大学院薬学研究科教務職員

我々は既に、高発現によってメチル水銀毒性に対して防御的に作用する細胞内因子としてCdc34を同定している。そこで、その防御機構を検討した。その結果、Cdc34が示すユビキチン転移活性がメチル水銀耐性に必須であること、そして、Cdc34をはじめとするE2がユビキチン化反応の律速酵素でありE2の高発現のみで蛋白質のユビキチン化が促進されること、さらに、Cdc34の高発現が細胞内における蛋白質のユビキチン化を促進させることによってメチル水銀毒性に対して防御的に作用することが明らかになった。一方、ユビキチン化された標的蛋白質は最終的にプロテアソームに認識されて速やかに分解されるが、プロテアソーム阻害剤や低プロテアソーム活性を示す酵母を用いた検討により、Cdc34高発現によるメチル水銀耐性にプロテアソームによるユビキチン化蛋白質の分解が必須であることも判明した。これらの結果は、メチル水銀がある種の特定な蛋白質に何らかの修飾を与え、この修飾蛋白質が細胞内に蓄積することによって細胞障害が引き起こされる可能性を示唆しており、このメチル水銀によって修飾を受けた蛋白質はユビキチン化を介したプロテアソームでの分解によって無毒化されると考えられる。ヒトのCDC34 (hCDC34) を高発現させたHEK293細胞でもメチル水銀に対する耐性が確認されたことから、メチル水銀によって修飾を受けてユビキチン化される蛋白質をヒト細胞中で同定できれば、ヒトにおけるメチル水銀の細胞内標的分子の解明にもつながるものと思われる

A. 研究目的

我々は既に、高発現によってメチル水銀毒性に対して防御的に作用する細胞内因子として Cdc34 を同定している。Cdc34 は

細胞周期などにおいて重要な役割を担う短寿命蛋白質やストレスなどにより生じる異常蛋白質の分解に関与するユビキチン-プロテアソームシステムを構成する酵素群の

一つであるユビキチン転移酵素 (E2) として知られている。本システム (Fig.1) においては、まず、ユビキチン活性化酵素 (E1) が ATP のエネルギーを利用して E1 分子内の cysteine とユビキチンの C 末端に存在する glycine との間に thioester 結合を形成する。E1 に結合したユビキチンは次に、E2 の cysteine 残基に受け渡される。一方、標的となる蛋白質 (分解される運命にある蛋白質) はユビキチンリガーゼ (E3; 複数の蛋白質の複合体) によって認識される。ユビキチンと結合した E2 は、E3 を構成する蛋白質に結合した後にユビキチンを標的蛋白質に付加 (ユビキチン化) する。標的蛋白質にユビキチン化が起こると、ユビキチン分子内の lysine 残基がさらにユビキチン化され、ポリユビキチン鎖を形成する。このポリユビキチン鎖は 26S プロテアソームによって認識され、標的蛋白質は ATP 依存的に分解される。このユビキチン-プロテアソームシステムで分解される蛋白質には、細胞内の重要な機能を担う細胞周期関連因子、癌遺伝子産物、癌抑制遺伝子産物、転写因子、シグナル伝達分子、あるいは誤った転写翻訳により生じる異常蛋白質などが知られている。

本研究では Cdc34 の高発現が酵母に与えるメチル水銀耐性におけるユビキチン-プロテアソームシステムの関与について検討した。

## B. 研究方法

### 1. QuikChange™ site-directed mutagenesis kit を用いた変異導入法

Cdc34 mutant は QuikChange™ site-directed mutagenesis kit (Stratagene) の protocol に従って、template として pRS425-CDC34 を用いて PCR を行い変異導入 plasmid を作製した。C 末端を欠失させる場合には目的の位置に終止 codon (TAA) を入れるような primer を、また、アミノ酸を変換する場合はそれぞれのアミノ酸を alanine で置換させるような primer を用いた。正しく置換されていることは sequence により確認した。

### 2. ユビキチンシステムに関与する遺伝子の cloning およびそれらの遺伝子を発現する plasmid の作製

ユビキチンシステムに関与する様々な遺伝子を酵母 chromosomal DNA を template とした PCR により cloning した。それぞれの PCR 産物は pTarget vector (Promega) を用いて TA cloning を行った後、適当な制限酵素 (UBA1-EcoRI ; CDC53-BamHI/NotI ; CDC34、SKP1、HRT1-KpnI/XhoI ; UBC7-BamHI/NotI ; CDC34、UBC4、UBC5-KpnI/XhoI) で切断後、酵母発現 vector である pYES2 (Invitrogen) に subcloning した。各遺伝子の塩基配列は sequence により確認した。

### 3. ユビキチンシステム構成因子を高発現する酵母のメチル水銀に対する感受性

それぞれのユビキチンシステム構成因子



を高発現する酵母としては、pYES2-UBA1、pYES2-CDC34、pYES2-CDC53、pYES2-SKP1、pYES2-HRT1、pYES2-UBC4、pYES2-UBC5 または pYES2-UBC7 plasmid を導入した形質転換酵母を用いた。これらの酵母の single colony を SD (-ura) 培地 2 ml に植菌し 30℃ で一晩振盪培養した後、この培養液を SG (2% galactose、4% raffinose ; -ura) 培地で  $1 \times 10^4$  cells/180  $\mu$ l になるように希釈した。

#### 4. *ERG6 (ISE1)* 遺伝子欠損株の作製

まず、targeting vector は *HIS3* マーカーを含む A397 plasmid を template として PCR により合成した。ここで合成した targeting vector は、その両端部に標的遺伝子部位での組換えに必要な *ERG6* 遺伝子との相同配列を持っている。この PCR 産物を、酢酸リチウム法により W303B 株に導入することによって得られた histidine 非要求性の colony を、遺伝子欠損株の候補 clone とした。ここで、得られた colony を直接 template として、*ERG6* 遺伝子の外側に設定した primer を用いて *ERG6* 遺伝子領域を PCR により増幅し、その PCR 産物の大きさを agarose 電気泳動で調べることにより、目的遺伝子欠損の有無を確認した。

#### 5. 酵母細胞内でユビキチン化された蛋白質の総量の測定 (Immunoblotting)

酵母を 2 ml の SD (-leu) 培地に植菌し 30℃ で一晩振盪培養した後、 $5 \times 10^6$  cells/ml を 40 ml の SD (-leu) 培地に移し、30℃ で 90

分間振盪培養した。その後、塩化メチル水銀 (final 100 nM) を添加し、3 時間処理した。次に、 $2,300 \times g$ 、4℃ で 5 分間遠心し、その沈殿に 10 ml の冷滅菌蒸留水を加えて、振盪した後に、 $2,300 \times g$ 、4℃ で 5 分間遠心して沈殿として集菌した。この操作を 2 回繰返して得られた菌体に lysis buffer (20 mM Tris-HCl (pH7.5)、1 mM EDTA、5 mM  $MgCl_2$ 、50 mM KCl、5% glycerol、3 mM DTT、1 mM phenylmethylsulphonyl fluoride、1  $\mu$ g/ml pepstatin A) と glass-beads を加えて、30 分間、4℃ で混和した後に、 $20,000 \times g$ 、4℃ で 30 分間遠心して、細胞抽出液とした。この細胞抽出液 (50  $\mu$ g) に電気泳動用 sample buffer (-mercaptoethanol) を加えて、SDS-PAGE (12.5%) を行った。泳動終了後、wet 型 blotting 装置を用いて immobilon-P membrane (Millipore) に blotting した。この membrane を blocking solution (5% skin milk、TTBS:20 mM Tris-HCl (pH7.5)、150 mM NaCl、0.05% Tween 20) に浸して blocking した後に、1 次抗体液に 4℃ で一晩浸した。その後、HRP 標識化 2 次抗体液に 2 時間浸し、さらに、ECL reagent (Amersham Pharmacia Biotech) を用いて化学発光させ、film に露光して検出した。1 次抗体には multiubiquitin specific antibody (MBL)、2 次抗体には horseradish peroxidase conjugated anti-mouse IgG (Cappel) を用いた。

#### 6. *Cdc34* 高発現によるメチル水銀耐性獲得におけるプロテアソーム活性の役割

それぞれの酵母の single colony を SD (-leu) 培地 2 ml に植菌し 30°C で一晚振盪培養した後、この培養液をプロテアソーム阻害剤である carbobenzoxy-leuciny-leuciny-leucinal (MG132、Affiniti) (100 倍濃度の dimethyl sulfoxide (DMSO、Nacalai) 溶液として調製) を最終濃度 0、50、100  $\mu$ M 含む SD (-leu) 培地で  $1 \times 10^4$  cells/180  $\mu$ l になるように希釈した。MG132 は野生型酵母の細胞膜を通過できないために、本研究では、膜透過性を高めるために ergosterol 合成に関与する酵素 *ERG6 (ISE1)* 遺伝子の欠損株を用いた。

プロテアソーム変異株のメチル水銀感受性は、control 株である WCG4a と、プロテアソームの subunit である *PRE1* の missense mutant でプロテアソーム活性が低い WCG4-11a (University of Stuttgart の W. Heinemeyer 博士より供与された) を塩化メチル水銀 (final 1、3  $\mu$ M) 含む YPD 寒天培地に細胞数が  $5 \times 10^4$ 、 $5 \times 10^3$ 、 $5 \times 10^2/5 \mu$ l になるように spotting し、30°C で 72 時間生育させることにより調べた。

## 7. Northern blotting

酵母を 2 ml の YPD 培地に植菌し 30°C で一晚振盪培養した後、 $5 \times 10^6$  cells/ml を 40 ml の YPD 培地に移し、30°C で 3 時間振盪培養した。次に塩化メチル水銀 (final 0 ~ 100 nM) を添加して 90 分間培養した後、2,300xg、4°C で 5 分間遠心した。得られた沈殿に 10 ml の冷滅菌蒸留水を加えて

振盪した後に、2,300xg、4 °C で 5 分間遠心して沈殿として集菌した。この操作を 2 回繰返して得られた菌体に、RNA extraction buffer、glass-beads および phenol/chloroform (1:1) を加え、激しく混和した後、15,000xg、10 分間遠心して上清を得た。この上清を ethanol によって沈澱させ、total RNA を抽出した。RNA (25  $\mu$ g) に sample buffer (6.4% formaldehyde、48% formamide、MOPS buffer (20 mM 3-(*N*-morpholino) prophanesulfonic acid (pH7.0)、5 mM NaOAc、1 mM EDTA) を加え、65°C、15 分熱変性させた後に、agarose ゲル (1.2%) を用いて電気泳動を行った。泳動終了後、10 x SSC (150 mM NaCl、150 mM sodium citrate) を用い Nytran nylon membrane (Scheicher & Schuell) に transfer した。この membrane を hybridization buffer (7% sodium dodecylsulfate (SDS)、50% formamide、2% blocking reagent (Boehringer)、0.1% sodium *N*-lauroylsarcosylate、57.7 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、42.3 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 、5 x SSC) 中で、50°C、1 時間振盪後、DIG 標識した DNA probe を加えて、50°C、12 時間振盪した。この membrane を 0.1% SDS を含む 2 x SSC 中で 15 分、さらに 0.1% SDS を含む 0.5 x SSC 中で 50°C、1 時間振盪して洗浄した。次に、membrane を blocking 溶液 (0.15 M NaCl、0.1 M maleic acid (pH7.5)、1% blocking reagent) 中で、30 分間 incubate した後に、0.075 U/ml の anti-digoxigenin-alkalyne phosphatase Fab fragments (Boehringer) を含む blocking 溶液中で 30 分間 incubate した。

Membrane を洗浄 buffer (0.3% tween20、0.15 M NaCl、0.1 M maleic acid (pH7.5)) 中で 30 分振盪後、CDP-Star (Boehringer) を基質として発光させ、Lumi Film (Boehringer) に露光して検出した。

#### 8. Human CDC34 (hCDC34) の cloning

HEK (Human Embryonic Kidney) 293 細胞の total RNA を抽出し、それを逆転写酵素 (Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase、Gibco) を含む反応溶液中で 42°C、1 時間 incubate して一本鎖 cDNA を合成した。この cDNA を template とし、PCR を行った。PCR 産物は pTarget vector を用いて TA cloning を行った後、insert は制限酵素 *KpnI/XhoI* で切断し、mammalian 発現 vector である pcDNA3.1-hygro vector に subcloning した。TA cloning 後 hCDC34 の塩基配列を sequence により確認した

#### 9. 細胞培養および hCdc34 高発現細胞の作製

HEK293 細胞は、Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM、日水製薬) に 0.06% L-glutamine、100 U/ml penicillin G sodium (Gibco)、100  $\mu$ g/ml streptomycin sulfate (Gibco) および 10% fetal bovine serum (JRH Bioscience) を添加した培地を用いて、37°C、5% CO<sub>2</sub> 存在下で培養した。

8 で cloning した pcDNA3.1-hCDC34 および空 vector である pcDNA3.1 を TransIT™ (Mirus) を用いて HEK293 細胞に導入した。

各 transfectant は hygromycin (500  $\mu$ g/ml) で selection することにより作製した。これらの細胞から Isogen (Nippon Gene) を用いて total RNA を抽出して、Roche diagnostics DIG system により Northern blotting を行い、hCDC34 mRNA の発現を確認した。

#### 10. hCdc34 高発現細胞におけるメチル水銀に対する感受性

HEK293細胞のstable transfectantを $5 \times 10^2$  cells/90  $\mu$ l/wellになるように96-well plateに播き、37°C、5% CO<sub>2</sub>存在下で24時間培養後、塩化メチル水銀 (final 0~2  $\mu$ M) を含むDMEMを10  $\mu$ l/wellずつ添加してさらに7日間培養した。培養終了後、Alamar Blue (TREK Diagnosis Systems) を10  $\mu$ l/well添加し、37°C、5% CO<sub>2</sub>存在下で3時間incubateした後に、蛍光plate reader (Spectra Max Gemini XS、Molecular Devices) で蛍光を測定した (excitation, 544 nm; emission, 590 nm)。

(倫理面への配慮)

本研究では動物等は使用せず、生物として酵母のみを用いる。したがって、倫理面への配慮を必要としない。

#### C. 結果・考察

##### 1. Cdc34 高発現酵母のメチル水銀に対する感受性

Cdc34 高発現酵母をメチル水銀 (final 50 nM) を含む寒天培地に細胞数が  $5 \times 10^4$ 、 $5 \times 10^3$ 、 $5 \times 10^2$ 、 $5 \times 10^1/5 \mu$ l になるように

spotting して生育させることによりメチル水銀に対する感受性を調べた。その結果、寒天培地においても Cdc34 高発現酵母は空 vector を導入した control 株に比べて明らかな耐性を示すことが確認された (Fig. 2)。

メチル水銀以外の水銀化合物および他の重金属に対する Cdc34 高発現酵母の感受性を pRS425 のみを導入した酵母を対照として検討した。その結果、Cdc34 高発現酵母は水銀化合物である無機水銀や pCMB および重金属であるカドミウムに対して耐性を示した (Fig. 3)。さらに、活性酸素種の一つである過酸化水素や酸化ストレスを誘導するパラコートに対しても耐性を示した

(Fig. 4)。しかし、Cdc34 高発現酵母は alkyl 化剤で発がん性物質でもある methyl methanesulfonate や superoxide anion を生成する menadione、酸素と反応して alkylperoxyl radical や hydroperoxide を生成する AAPH (Fig. 4) や紫外線 (data not shown) に対しては交叉耐性を示さなかった。一方、種々の制がん剤に対する感受性を調べたところ、DNA に架橋を形成する cisplatin、活性酸素を生成する peplomycin、alkyl 化剤である mytomycin C、nucleotide 代謝拮抗剤である 5-fluorouracil および DNA に intercalate する adriamycin に対しても Cdc34 高発現酵母はほとんど耐性を示さなかった (Fig. 5)。これらの結果から、Cdc34 高発現酵母は水銀化合物やカドミウムといった重金属および過酸化水素やパラコートなどの酸化ストレス誘導剤に対して耐性を示すものと思われ

る。

## 2. メチル水銀耐性に関与する Cdc34 domain の解析および細胞内でのユビキチン化蛋白質量の変動

メチル水銀耐性に必要な domain を検索するため、Cdc34 の様々な変異体を高発現する酵母を作製し、それら酵母のメチル水銀に対する感受性を調べた。Cdc34 を含めて E2 は遺伝子ファミリーを形成しており、全ての E2 においては Fig. 6 に示すような catalytic domain が保存されている。この catalytic domain 中には、ユビキチンとの thioester 結合に必須な cysteine が存在する。そこでまず、ユビキチン結合部位である cysteine を alanine に置換した mutant を作製したところ、この酵母はメチル水銀に対して耐性を示さなかった (Fig. 7a)。このことから、Cdc34 とユビキチンとの結合がメチル水銀耐性に必要である可能性が考えられる。

しかし、高発現した Cdc34 のユビキチン結合部位である cysteine にフリーのメチル水銀がトラップされて、細胞内のフリーのメチル水銀濃度が減少し、その結果としてメチル水銀の毒性発現が抑制されるという可能性も否定できない。Cdc34 が E2 としてユビキチン転移機能を示すためには E3 との結合が必須であり、Cdc34 の 171-209 aa (Fig. 6) がその結合領域に相当する。また、unique insert 中にある三つのアミノ酸 (glutamate 109, aspartate 111, glutamate 113)