

200401257A

別添1 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

化学物質リスク研究事業

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

(H14-食品・化学-028)

平成16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 永沼 章

平成 17 (2005) 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. メチル水銀およびヒ素に対する感受性に関わる遺伝子群の同定	9
永沼 章	
2. メチル水銀毒性発現機構における液胞輸送系の関与	11
黄 基旭	
3. 転写因子 Msn2 によるメチル水銀毒性増強作用に関与する因子の検索 および作用機序解析	33
黄 基旭	
4. 酵母細胞膜に存在する鉄還元酵素Frelによるパラコートの毒性増強機構の解析	65
大橋一晶	
5. 亜硫酸耐性に関わるシグナル伝達経路の解析	97
大橋一晶、久下周佐	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	131
IV. 研究成果の刊行物・印刷物	133

1. 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
（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

本研究は、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・同定することを目的としている。昨年度確立した遺伝子欠損酵母ライブラリーを用いた感受性決定遺伝子検索法を用いて、本年度はメチル水銀およびヒ素に対する酵母の感受性に影響を与える遺伝子を検索し、それぞれ82種類および113種類の遺伝子を同定することに成功した。また、これら本研究で同定された遺伝子群の作用機構解析も行った。その結果、①今回の遺伝子欠損酵母ライブラリーを用いた簡易検索によってメチル水銀感受性に影響を与えることが判明した遺伝子の中に、液胞への物質輸送に関わる遺伝子が多数存在したことから、細胞内における液胞への物質輸送とメチル水銀毒性発との関係を検討したところ、液胞への物質輸送の中でもゴルジ体から液胞への輸送経路の1つであるCPY経路、またはエンドソームから液胞への経路がメチル水銀毒性の発現に関与することが初めて明らかとなった。②我々が昨年度の本研究において、高発現によってメチル水銀毒性を顕著に増強させることを見出した転写因子Msn2の作用機構についても検討し、細胞増殖に必須の酵素でありメチル水銀の標的分子であることが判明しているGFATの発現をMsn2が転写レベル抑制することが明らかとなった。③細胞膜上の鉄還元酵素Frelは欠損によって強いパラコート耐性を酵母に与えることを見出しているが、補年度の研究によって、パラコートが培地中に存在すると、細胞外でのFrelを介した活性酸素産生が促進され、その結果として細胞障害が生じることが判明した。④高浸透圧防御に関わるシグナル伝達経路のMAPキナーゼであるHog1の高発現が酵母に顕著な亜硫酸耐性を与えるが、この現象がヒ素の取り込みに関与するトランスポーターFps1の活性低下に起因することが明らかとなった。

分担研究者

久下周佐

(東北大学大学院薬学研究科・助教授)

大橋一晶

(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

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。また、これまでに同定された遺伝子について、その作用機構を遺伝生物学的手法を用いて検討した。(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た。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) 遺伝子欠損酵母ライブラリー中からの感受性決定遺伝子の検索

遺伝子欠損酵母ライブラリーを用いて、酵母の全遺伝子について感受性に与える影響の有無を検索した。酵母の遺伝子数は約6,000であるが、本法は、欠損不能な遺伝子(必須遺伝子)を除いた約5,000の遺伝子一つずつ欠損させた変異酵母約5,000株について、それぞれ感受性を調べるものであり、時間と労力は要するがこれまでより信頼性の高い結果を得ることが出来る。本年度はこの方法によってメチル水銀およ

びヒ素の毒性に影響を与える遺伝子群を検索し、それぞれ82種類および113種類の遺伝子を同定することに成功した。

(2) これまでに同定された遺伝子の作用機構解析

1. メチル水銀毒性発現機構における液胞輸送系の関与

遺伝子欠損酵母ライブラリーを用いた簡易検索によって同定された遺伝子の中に、液胞への物質輸送に関わる遺伝子が多数存在した。そこで、細胞内における液胞への物質輸送とメチル水銀毒性発との関係を検討した。粗面小胞体で合成された蛋白質はゴルジ体へ運ばれ、そこで行き先が選別され輸送される。液胞への輸送は、ゴルジ体から直接液胞へ運ぶ経路であるALP経路とエンドソームを介して液胞へ運ぶ経路であるCPY経路が存在する。また、エンドサイトーシスによって取り込まれたものをエンドソームを介して液胞へ運ぶ経路も存在する。液胞への輸送に関わる各々の経路とメチル水銀毒性との関わりを明確にするために、簡易スクリーニングでメチル水銀耐性が認められなかった遺伝子欠損株の中から各々の経路に関わる遺伝子の欠損株について、再度詳細にメチル水銀感受性に対する影響を検討したところ、CPY経路に関わるPEP12や、エンドソーム膜上に存在し、エンドソームから液胞への輸送に関わる因子および液胞の膜に存在し小胞の融合に必要な因子群は、全てその欠損により酵母にメチル水銀耐性を与えた。しかし、その他の小胞体とゴルジ体間の小胞輸送に関わる因

子や、ゴルジ体から液胞へ直接小胞を運ぶ経路であるALP経路に関わる因子、細胞外から物質を取り込む機構であるエンドサイトーシスに関わる因子群は欠損させても酵母のメチル水銀に対する感受性に影響を与えなかった。以上の結果から、液胞への物質輸送の中でもゴルジ体から液胞への輸送経路の1つであるCPY経路、またはエンドソームから液胞への経路がメチル水銀毒性の発現に関与することを明確に示唆している。これまで液胞への物質輸送系が外因性物質の毒性発現に関与するという報告はなく、本知見はメチル水銀毒性の発現機構解明の突破口となるかも知れない。

2. 転写因子 Msn2 によるメチル水銀毒性増強作用に関与する因子の検索および作用機序解析

我々は昨年度の本研究において、転写因子 Msn2 の高発現がメチル水銀毒性を顕著に増強させることを見出した。そこで、この Msn2 の作用を消失させる細胞内因子を検索し、hexosamine 経路の律速酵素である GFAT をコードする遺伝子 GFAT を同定した。GFAT は酵母におけるメチル水銀の標的分子であることが我々の研究で明らかになっており、細胞増殖に必須の酵素である GFAT をメチル水銀が特異的に阻害することによって細胞の増殖が停止すると考えられている。Msn2 高発現によるメチル水銀毒性増強作用は GFAT 遺伝子の高発現によって顕著に低下し、さらに Msn2 高発現によって GFAT 遺伝子の発現が抑制されることが確認された。Msn2 の核移行に関わ

る NLS および DNA との結合に関わる Zn-finger ドメインを欠損させた Msn2 を高発現させてもメチル水銀感受性の上昇が認められたことから、Msn2 が細胞内で示す何らかの作用によって GFAT 遺伝子の発現が抑制されると考えられる。一方、Msn2 結合蛋白質の中で、転写因子 Sok2 の遺伝子を欠損させた酵母が高いメチル水銀感受性を示し、さらに GFAT 遺伝子の転写活性および発現レベルも低い値を示すことが判明した。Sok2 を高発現させた酵母では、GFAT mRNA の顕著な増加が認められ、Msn2 の高発現が Sok2 の発現を抑制することによって、GFAT 遺伝子の発現レベルの低下を引き起こす可能性が示唆された。しかし、Sok2 の関与は部分的であり、他の因子も同時に関与している可能性が考えられる。そこで、GFAT 遺伝子の発現に関与する Sok2 以外の細胞内因子を遺伝子ライブラリー中から検索したところ Sok1 が同定された。Sok1 を Msn2 高発現酵母に共発現させることにより、Msn2 高発現によるメチル水銀高感受性化の回復および GFAT 遺伝子の転写活性抑制の回復が認められたことから、Sok1 も Sok2 と同様に Msn2 高発現によるメチル水銀毒性増強作用に関与するものと考えられる。

3. 酵母細胞膜に存在する鉄還元酵素 Fre1 によるパラコート毒性増強機構の解析

我々は鉄および銅の取り込みに関与する細胞膜上の鉄還元酵素 Fre1 の遺伝子欠損により、酵母がパラコートに対し強い耐性を示すことを見いだしている。そこで Fre1

の高発現が酵母のパラコート感受性に与える影響を検討しところ、本酵母はパラコートに対して高い感受性を示した。しかし、スーパーオキシドアニオン (O_2^-) 産生物質であるメナジオンおよび過酸化水素、酸化反応促進剤である AAPH、SH 基阻害剤であるジアミドに対する感受性にはほとんど影響を与えなかった。Fre1 は鉄や銅に電子を付与し還元する酵素であるが、パラコートにも電子を付与するという報告があり、パラコートに与えられた電子は酸素分子に移り、 O_2^- が産生されると考えられる。そこで、酵母をパラコート処理した際の、細胞外の活性酸素生成量を測定したところ、Fre1 欠損株ではパラコート処理による細胞外活性酸素量の増加がほとんど認められなかったが、野生株ではパラコート濃度に依存した上昇が認められた。また、Fre1 高発現酵母では高い鉄還元活性とパラコート処理による細胞外活性酸素量の顕著な増加が認められた。なお、鉄還元活性を示さない Fre1 変異体の高発現はパラコート感受性およびパラコート処理による細胞外活性酸素産生量に影響を与えなかった。さらに、活性酸素生酵素であるスーパーオキシドジスムターゼ (SOD) を培地に添加することによって、パラコート毒性は顕著に抑制された。以上の結果から、パラコートが培地中に存在すると、細胞外での Fre1 を介した活性酸素産生が促進され、その結果として細胞障害が生じるものと考えられる。

4. 亜ヒ酸耐性に関わるシグナル伝達経路の解析

我々は平成14年度に出芽酵母を用いて亜ヒ酸毒性の発現に影響を及ぼす細胞内因子の検索を行い、高浸透圧防御に関わるシグナル伝達経路 HOG (High Osmolarity Glycerol) pathway の MAP キナーゼである Hog1 の高発現が酵母に顕著な亜ヒ酸耐性を与えることを明らかにしている。今回、Hog1 の下流の因子の亜ヒ酸耐性への関与を調べたところ、Skol が Hog1 高発現による亜ヒ酸耐性に関与している可能性が示唆された。しかし、SKO1 欠損酵母の亜ヒ酸感受性が HOG1 欠損酵母よりも低いことから、Skol 以外の因子も関与すると考えられる。HOG1 欠損が細胞内ヒ素蓄積量に与える影響を検討したところ、HOG1 欠損酵母は野生株に比べ、細胞内ヒ素蓄積量が約 11 倍高いことが判明した。SKO1 欠損酵母も、野生株に比べて若干高いヒ素蓄積量を示したものの、HOG1 欠損酵母に比べるとその程度は非常に小さいものであった。HOG1 欠損は、亜ヒ酸の取り込みに関わる因子 Fps1 の mRNA レベルを野生株の約 1.5 倍程度上昇させた。FPS1 欠損酵母は亜ヒ酸に対して顕著な耐性を示したが、FPS1 と共に HOG1 を同時に欠損させても HOG1 欠損の影響はほとんど認められなかった。また、亜ヒ酸処理した後の細胞内ヒ素蓄積量が FPS1 欠損酵母では野生株の四分の一程度であったが、この細胞の HOG1 を同時欠損させても HOG1 欠損によるヒ素蓄積量の増大は認められず、FPS1 単独欠損酵母とほぼ同程度であった。FPS1 欠損酵母に FPS1 発現プラスミドを導入した際の細胞膜画分中 Fps1 に比べ FPS1

HOG1 二重欠損酵母に FPS1 発現プラスミドを導入した際の Fps1 蛋白質量は約 2 倍であった。この結果より、野生株中では、Hog1 は細胞膜 Fps1 の存在量を減らしていると考えられ、その結果としてヒ素の取り込みが抑制されている可能性が示唆された。

D. 結論

メチル水銀およびヒ素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。また、それら遺伝子の一部については作用機構をある程度解明することができた。今後、これら遺伝子群についてさらに詳細な検討を行うことにより、メチル水銀およびヒ素の細胞毒性発現機構の全容が解明されるものと期待される。

E. 健康危険情報

特になし。

F. 研究発表

1. 論文発表

Hwang, G.W., Furuoya, Y., Hiroshima, A., Furuchi, T. and Naganuma, A.: Overexpression of Bop3 confers resistance to methylmercury in *Saccharomyces cerevisiae* through interaction with other proteins such as Fkh1, Rts1 and Msn2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 330, 378-385 (2005).

2. 学会発表

稲葉佐知子、大橋一品、永沼 章: 酵母細胞膜上の鉄還元酵素群によるパラコートに依存した活性酸素産生. 日本薬学会第124年会, 2004.

岩橋芳樹、大橋一品、永沼 章: 酵母における multivesicular body sorting pathway によるパラコート毒性の軽減. 日本薬学会第124年会, 2004.

佐々木大祐、黄 基旭、永沼 章: 酵母のメチル水銀耐性獲得機構におけるRad23とPng1の関係. 日本薬学会第124年会, 2004.

石田洋輔、黄 基旭、永沼 章: F-box蛋白質によるメチル水銀毒性防御機構の解明. 日本薬学会第124年会, 2004.

村井康高、黄 基旭、永沼 章: メチル水銀感受性に関わる遺伝子の検索. 日本薬学会第124年会, 2004.

塚原 章、大橋一品、永沼 章: 酵母のトリプトシルスズ感受性に影響を及ぼすトランスポーター様因子. 日本薬学会第124年会, 2004.

北 加代子、久下周佐、永沼 章: ヒト細胞中の主要なメタロチオネイン分子種の発現を抑制した細胞株の樹立とその応用. 日本薬学会第124年会, 2004.

石田 洋輔、黄 基旭、永沼 章: F-box蛋白質の高発現によるメチル水銀毒性軽減作用. フォーラム2004: 衛生薬学・環境トキシコロジー, 2004.

村井 康高、黄 基旭、永沼 章: 酵母でのメチル水銀毒性発現におけるゴルジ体から液胞への物質輸送システムの関与. フォーラム2004: 衛生薬学・環境トキシコロジー, 2004.

稲葉佐知子、大橋一品、永沼章: 鉄還元酵素群による細胞外でのパラコートを介した活性酸素産生. フォーラム2004: 衛生薬学・環境トキシコロジー, 2004.

横溝朋子、大谷朋子、大橋一品、長谷川達也、瀬子義幸、永沼 章: MAPキナーゼHog1が関与する酵母の亜ヒ酸耐性におけるFps1の関与. フォーラム2004: 衛生薬学・環境トキシコロジー, 2004.

石田 洋輔、黄 基旭、永沼 章: メチル水銀耐性獲得におけるF-box蛋白質の役割. 第43回日本薬学会東北支部大会, 2004

村井 康高、黄 基旭、永沼 章: メチル水銀毒性における液胞への物質輸送システムの関与. 第43回日本薬学会東北支部大会, 2004.

稲葉佐知子、大橋一晶、永沼章：酵母細胞膜上の鉄還元酵素群によるパラコート毒性の増強。第1回東北大学バイオサイエンスシンポジウム, 2004.

横溝朋子、大谷朋子、大橋一晶、長谷川達也、瀬子義幸、永沼章: 亜硫酸耐性に関わるシグナル伝達機構の解析. 第77回日本生化学会大会, 2004.

芥川 正明、黄 基旭、小田部 希、山本 玲子、永沼 章: Msn2高発現によるメチル水銀高感受性に関与する因子の解析. 第77回日本生化学会大会, 2004.

Hwang, G. W., Furuchi, T. and Naganuma, A.: Ubiquitin-proteasome system as a cellular defense mechanism against methylmercury-induced cytotoxicity. FIP2004 (New Orleans, USA), 2004.

石田 洋輔、黄 基旭、永沼 章：酵母 F-box蛋白質、Yil097cおよびYil224w、によるメチル水銀毒性軽減機構の解析。日本薬学会第125年会, 2005.

荻原 庸介、黄 基旭、永沼 章：酵母のメチル水銀毒性を増強させる因子の検索。日本薬学会第125年会, 2005.

芥川 正明、黄 基旭、小田部 希、山本

玲子、永沼 章：酵母でのMsn2高発現によるメチル水銀毒性増強機構におけるSok2の役割。日本薬学会第125年会, 2005.

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（化学物質リスク研究事業）
（分担）研究報告書

メチル水銀およびヒ素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

欠損によって酵母のメチル水銀またはヒ素に対する感受性に影響を与える（耐性または高感受性にする）遺伝子をそれぞれ82種および113種同定した。

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

遺伝子欠損酵母ライブラリーを用いて、酵母の全遺伝子について感受性に与える影響の有無を検索した。酵母の遺伝子数は約6,000であるが、本法は、欠損不能な遺伝子（必須遺伝子）を除いた約5,000の遺伝子の一つずつ欠損させた変異酵母約5,000株について、それぞれ感受性を調べるため、時間と労力を要するが、信頼性の高い結果を得ることができる。

（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

遺伝子欠損酵母ライブラリーを用いて、酵母のメチル水銀またはヒ素に対する感受性に影響を与える遺伝子を検索した。その結果、メチル水銀感受性に影響を与える遺伝子を82種新たに発見し、さらにヒ素感受性に影響を与える遺伝子も113種同定された。

D. 研究発表

なし

E. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
（分担）研究報告書

メチル水銀毒性発現機構における液胞輸送系の関与

分担研究者 黄 基旭 東北大学大学院薬学研究科教務職員

メチル水銀による毒性発現機構とそれに対する防御機構を解明することを目的として、メチル水銀感受性に関わる遺伝子を検索した。その結果、欠損によりメチル水銀耐性を示す遺伝子を 33 種類、また欠損によりメチル水銀高感受性を示す遺伝子を 17 種類同定することに成功した。欠損によりメチル水銀耐性を示す遺伝子の中には、液胞への物質輸送に関わる遺伝子が多数存在した。細胞内での液胞への物質輸送には、ゴルジ体から液胞へ直接輸送する経路である ALP 経路、ゴルジ体から一度エンドソームを介して液胞へ輸送する経路である CPY 経路およびエンドサイトーシスによって取り込まれたものを液胞へ輸送する 3 つの経路が知られている。そこで、液胞への各輸送経路とメチル水銀毒性との関わりを明確にするために、簡易スクリーニングでメチル水銀耐性が認められなかった欠損株の中から各々の経路に関わる欠損株について再度メチル水銀感受性への影響を検討したところ、CPY 経路とエンドソームから液胞への輸送経路がメチル水銀毒性発現に関与することが示唆された。これまでに、酵母のエンドソームを介した液胞への輸送とメチル水銀毒性との関係についての報告はなく、本研究で得られた知見はメチル水銀の毒性発現機構解明のための大きな手がかりになるものと思われる。

A. 研究目的

これまで、高発現することによって酵母に化学物質耐性を与える遺伝子を主に検索してきたが、この方法では全ての遺伝子を漏れなく検索することは困難である。そこで本年度は遺伝子欠損酵母ライブラリーを用いて、酵

母の全遺伝子について感受性に与える影響の有無を検索した。その結果、同定された遺伝子の中に、液胞への物質輸送に関わる遺伝子が多数存在したことから、液胞輸送とメチル水銀毒性との関係を検討した。

B. 研究方法

1. 酵母のメチル水銀に対する感受性

酵母の single colony を 2 mL の SD (all+) 培地に植菌し一晩振盪培養後、この培養液を SD (all+) 培地で 1×10^4 cells / 180 μ L になるように希釈した。この希釈培養液を 96 well plate に 180 μ L 添加後、塩化メチル水銀 (最終濃度 0、20、40、60、80、100、120、140 nM) 20 μ L を添加し、30 $^{\circ}$ C で 48 h 培養後、600 nm の吸光度を測定して酵母の増殖を調べた。なお、対照として BY4742 の野生株を用いた。

2. 出芽酵母におけるメチル水銀感受性に影響を与える遺伝子の検索

当研究室で 96-well plate に保存してある出芽酵母 BY4742 株の遺伝子欠損株ライブラリー (Euroscarf) 5 μ L を、195 μ L の SD (all+) の培地に入った 96-well plate に移し、30 $^{\circ}$ C で 48 h 培養した。塩化メチル水銀 (最終濃度 60 nM) 20 μ L と SD (all+) 培地 175 μ L を加えた 96-well plate に 40 倍希釈した培養液 5 μ L を加え、それを 30 $^{\circ}$ C で培養した。24 h 後に生えてきたものをメチル水銀耐性候補株として選び、48 h 培養しても生えてこなかったものをメチル水銀高感受性候補株として選んだ。そして、そのメチル水銀耐性候補株、またはメチル

水銀高感受性候補株について、メチル水銀に対する毒性試験を行い、メチル水銀感受性に影響を与える遺伝子を決定した。

3. 酵母懸濁液の調整

VPS27 欠損株と、その親株である BY4742 野生株の single colony を SD (all+) 培地 10 mL へ植菌し、30 $^{\circ}$ C で一晩振盪培養した。その後、50 mL チューブに 5 mL の SD (all+) 培地を入れ、そこに 1×10^8 cells の酵母を加えた。次いでメチル水銀濃度を最終濃度で 2 ないし 4 nM となるように添加し、0 $^{\circ}$ C と 30 $^{\circ}$ C でそれぞれ 30 分間培養し、3000 rpm、5 分間遠心して沈殿として集菌した。1 mL の Mi liQ 水を加え、菌体を懸濁後 1.5 mL のエッペンチューブに移し、15000 rpm、10 秒遠心して沈殿として集菌した。1 mL の精製水で洗浄した後、100 μ L の精製水に懸濁し、酵母懸濁液とした。

4. 酵母の灰化と Hg 定量

メチル水銀で処理した酵母中の水銀量を、湿式灰化法を用いた還元気化-原子吸光法により測定した。20 mL の試験管に 1 mL の灰化用混酸 (濃硝酸 : 過塩素酸 = 4 : 1) を加え、そこに 50 μ L の酵母混濁液を加え、120 $^{\circ}$ C で 15~20 分間反応させた。放

冷後、MilliQ 水を加えて 1 mL にメスアップし、そのうちの 20 μ L について自動水銀分析装置により総水銀量を測定した。なお、塩化第二水銀を用いて検量線を作成し、総水銀量算出した。得られた結果から酵母あたりに含まれる水銀量を求め、30 $^{\circ}$ C で培養した酵母から 0 $^{\circ}$ C で培養した酵母の 1×10^6 cells 中に含まれる総水銀量を差し引いた値を、酵母 1×10^6 cells 当たりに蓄積された水銀量 (ng) とした。

(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. 出芽酵母におけるメチル水銀感受性に影響を与える遺伝子の検索

出芽酵母において、メチル水銀毒性発現機構および防御機構に関わる因子を得るため、メチル水銀感受性に影響を与える遺伝子欠損株を検索した。遺伝子欠損株全 4850 種類について簡易スクリーニングを行い、その中で欠損によりメチル水銀耐性を示したものを 33 種類 (Fig.1-1~Fig.1-6) および、高感受性を示したものを 17 種類 (Fig.2-1~Fig.2-3) 同定することに成功した。

今回の簡易スクリーニングで同定された欠損によりメチル水銀耐性を示す遺伝子の中には、液胞への物質輸送に関わる遺伝子 (*VPS4*, *VPS28*, *SNF8*, *VPS45*, *VT11*, *VPS63*, *VPS68*, *VPS45*) が多数存在した。このことから、細胞内における液胞への物質輸送とメチル水銀毒性発現に何らかの関係がある可能性が考えられる。

2. 小胞輸送に関わる因子の欠損によるメチル水銀感受性に対する影響

前述したように、液胞への物質輸送が酵母におけるメチル水銀毒性発現に何らかの形で関与する可能性が考えられる。蛋白質はまず、小胞体から小胞を介してゴルジ体へ運ばれた後、輸送先が選別され、様々な場所へ運ばれる。その中で液胞へ運ばれるものも存在する。液胞への輸送は、ゴルジ体から直接液胞へ運ぶ経路である ALP 経路、またはエンドソームを介して液胞へ運ぶ経路である CPY 経路が存在する (Greg, Christopher and Scott, 1998)。また、エンドサイトーシスによって取り込まれたものをエンドソームを介して液胞へ運ぶ経路も存在する (Camilla, Rusten and Harald, 2003)。今回の簡易スクリーニングで得られた欠損株の多くは、液胞への物質輸送に関わる遺伝子の欠

損株であった。そこで、液胞への輸送に関わる各々の経路とメチル水銀毒性との関わりを明確にするために、簡易スクリーニングでメチル水銀耐性が認められなかった遺伝子欠損株の中から各々の経路に関わる欠損株について、再度詳細にメチル水銀感受性に対する影響を検討した。

CPY 経路に関わる *PEP12* や、エンドソーム膜上に存在し、エンドソームから液胞への輸送に関わる因子 (*VPS27*, *SRN2*, *STP22*, *VPS25*, *VPS36*, *DID4*, *VPS20*, *VPS24*, *SNF7*)、および液胞の膜に存在し小胞の融合に必要な t-SNARE として機能している *VAM3* は、その欠損によりメチル水銀に対して耐性を示した (Fig.3-1)。しかし、その他の小胞体とゴルジ体間の小胞輸送に関わる *EMP24*, *EMP47* や、ゴルジ体から液胞へ直接小胞を運ぶ経路である ALP 経路に関わる *APL5*, *APL6*、細胞外から物質を取り込む機構であるエンドサイトーシスに関わる *ENT1*, *ENT2*, *ENT4*, *END3* を欠損させても、どれもメチル水銀に対する感受性はコントロールである BY4742 野生株とほとんど変化しなかった (Fig.3-2)。以上のことより、液胞への物質輸送の中でもゴルジ体から液胞への輸送経路の1つである CPY 経路、またはエンドソームから液胞への

経路がメチル水銀毒性発現と何らかの関係がある可能性が示唆される (Fig.4)。

3. *VPS27* 欠損株における細胞内へのメチル水銀取り込み量の検討

エンドサイトーシスは食食作用や細胞外の刺激 (ホルモンなど) を細胞内に伝える情報伝達などに関わっている。そのため、エンドサイトーシスによってメチル水銀も一緒に取り込まれる可能性が考えられる。欠損でメチル水銀耐性を示した *VPS27* はエンドソーム膜上の他に、細胞膜上にも存在していることが知られている (Roza and Joanna, 2001)。そのため、エンドサイトーシスにも関与しているかもしれない。そこで、欠損でメチル水銀耐性を示した *VPS27* 欠損株と、コントロールとして BY4742 の野生株についてメチル水銀の取り込みの影響を検討した。2 μ M、4 μ M のメチル水銀の処理時において、BY4742 と *VPS27* 欠損株とではメチル水銀の取り込み量に差は認められなかった (Fig.5)。このことより、*VPS27* の欠損株がメチル水銀耐性を示したのは、細胞内のメチル水銀量が野生株に比べ減少したためではないものと考えられる

D. 参考文献

Camilla Raiborg, Tor Erik Rusten,

- Harald Stenmark. (2003) Protein sorting into multivesicular endosomes. *Curr Opin Cell Biol*, **15**, 446–455.
- Christopher R. Cowles, Greg Odorizzi, Gregory S. Payne, and Scott D. Emr. (1997) The AP-3 Adaptor Complex Is Essential for Cargo-Selective Transport to the Yeast Vacuole. *Cell*, **91**, 109–118.
- Christopher R. Cowles, Scott D. Emr and Bruce F. Horazdovsky J. (1994) Mutations in the VPS45 gene, a SEC1 homologue, result in vacuolar protein sorting defects and accumulation of membrane vesicles. *Cell Sci*, **107**, 3449–3459.
- Greg Odorizzi, Christopher R. Cowles and Scott D. Emr. (1998) The AP-3 complex: a coat of many colours. *Trends Cell Biol*, **8**, 282–288.
- Hwang GW, Furuchi T, Naganuma A. (2002) A ubiquitin-proteasome system is responsible for the protection of yeast and human cells against methylmercury. *FASEB J*, **16**, 709–711.
- K A Becherer, S E Rieder, S D Emr, and E W Jones. (1996) Novel syntaxin homologue, Pep12p, required for the sorting of luminal hydrolases to the lysosome-like vacuole in yeast. *Mol Biol Cell*, **7**, 579–594.
- Ken Sato, and Akihiko Nakano. (2002) Emp47p and its close homolog Emp46p have a tyrosine-containing endoplasmic reticulum exit signal and function in glycoprotein secretion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell*, **13**, 2518–2532.
- Róża Kucharczyk and Joanna Rytka. (2001) *Saccharomyces cerevisiae*--a model organism for the studies on vacuolar transport. *Acta Biochim Pol*, **48**, 1025–1042.
- Schimmoller F, Singer-Kruger B, Schroder S, Kruger U, Barlowe C, Riezman H. (1995) The absence of Emp24p, a component of ER-derived COPII-coated vesicles, causes a defect in transport of selected proteins to the Golgi. *EMBO J*, **14**, 1329–1339.

Sonja R. Gerrard, Alison B. Mecklem and Tom H. Stevens. (2000) The yeast endosomal t-SNARE, Pep12p, functions in the absence of its transmembrane domain. *Traffic*, 1, 45-55.

Wada Y, Nakamura N, Ohsumi Y, Hirata A. (1997) Vam3p, a new member of syntaxin related protein, is required for vacuolar assembly in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Sci*, 110, 1299-1306.

E. 研究発表

学会発表

村井 康高、黄 基旭、永沼 章：酵母でのメチル水銀毒性発現における

ゴルジ体から液胞への物質輸送システムの関与. フォーラム 2004：衛生薬学・環境トキシコロジー, 2004.

村井 康高、黄 基旭、永沼 章：メチル水銀毒性における液胞への物質輸送システムの関与. 第 43 回日本薬学会東北支部大会, 2004.

村井 康高、黄 基旭、永沼 章：メチル水銀感受性に関わる遺伝子の検索. 日本薬学会第 123 年会, 2004.

F. 知的財産権の出願・登録状況
なし。

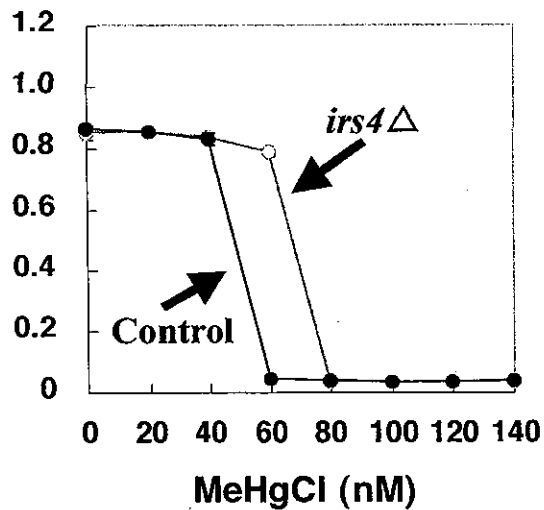
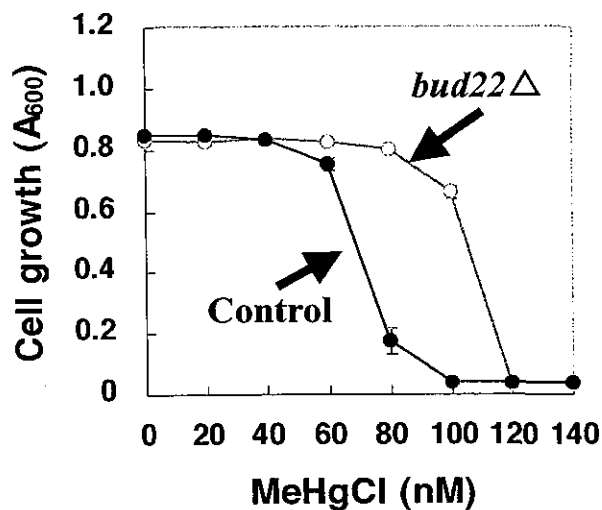
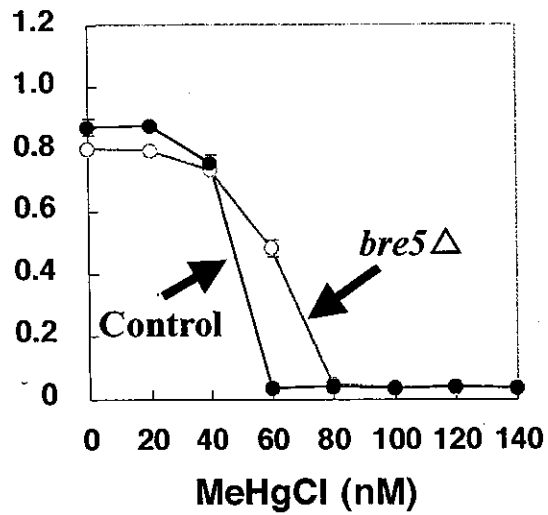
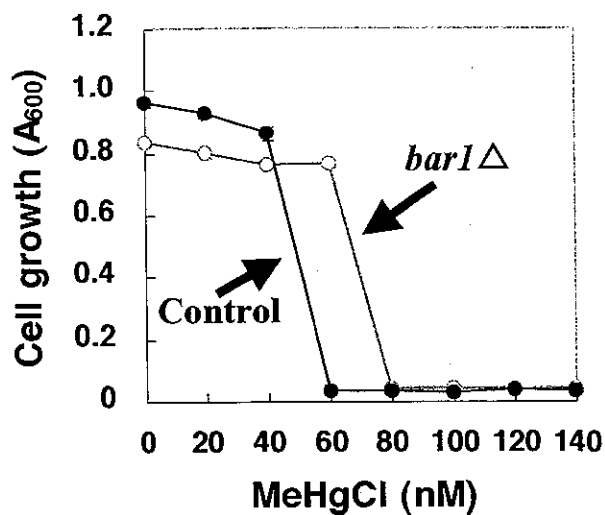
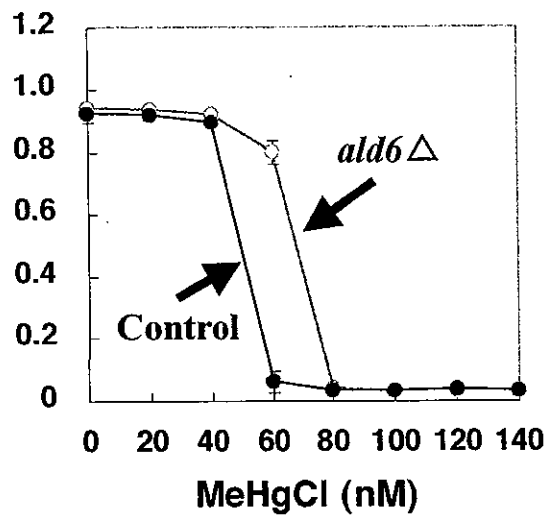
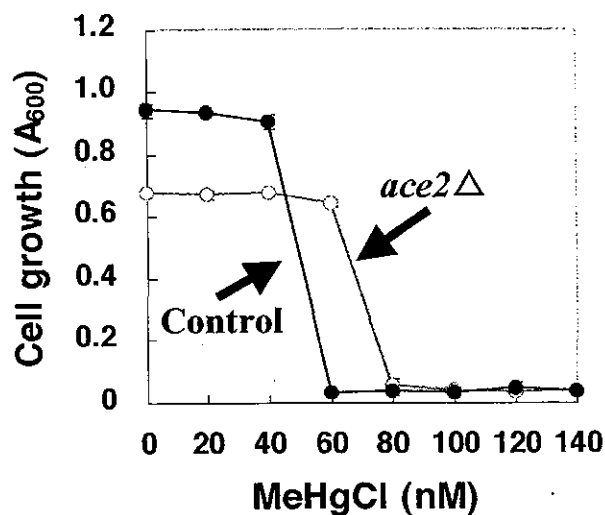


Fig. 1-1 欠損によりメチル水銀耐性を示す遺伝子

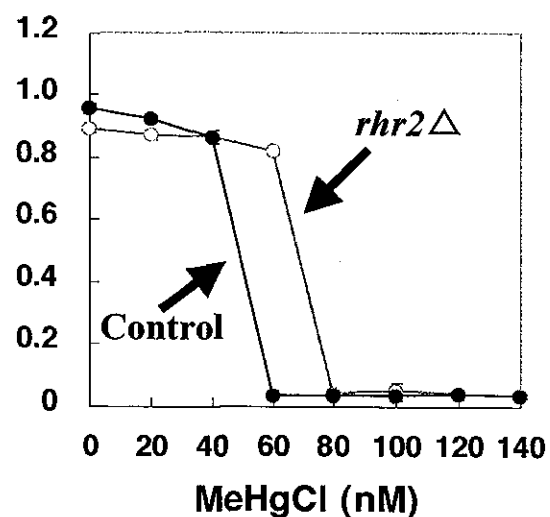
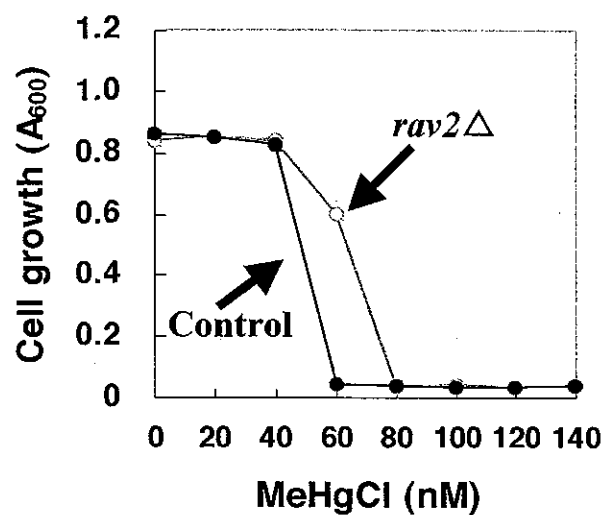
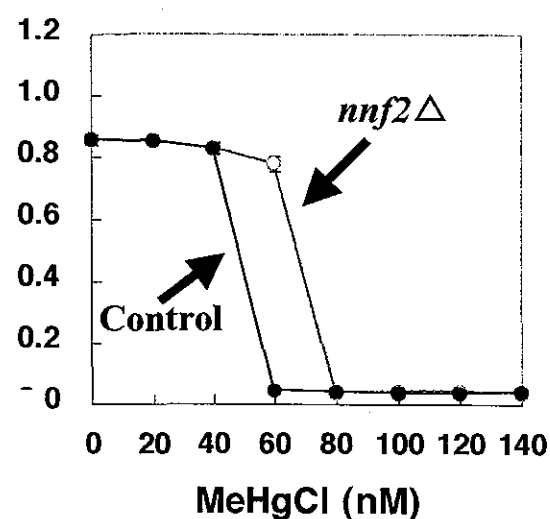
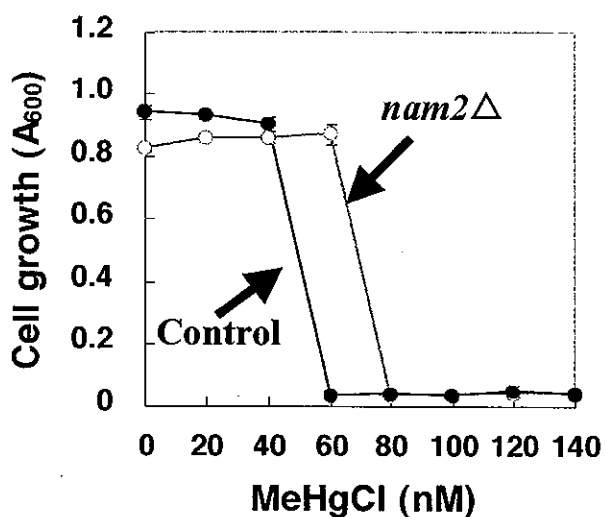
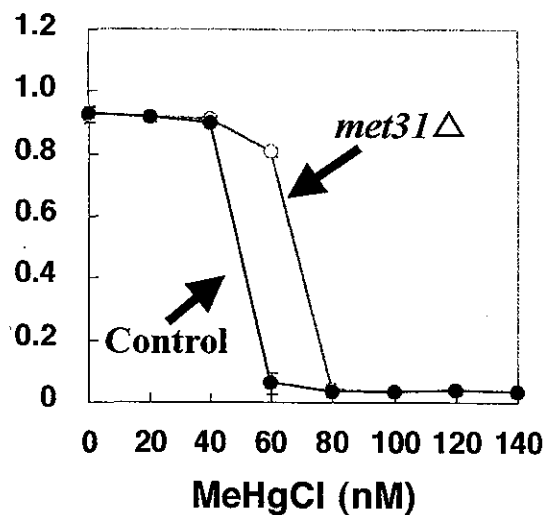
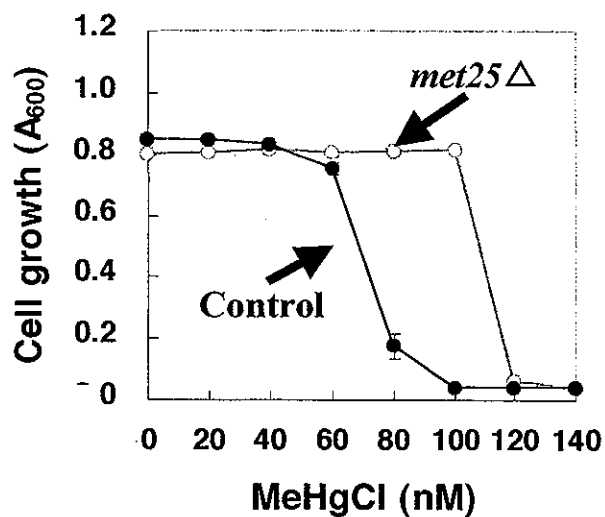


Fig. 1-2 欠損によりメチル水銀耐性を示す遺伝子