

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14年度～16年度 総合研究報告書

主任研究者 永沼 章

平成 17 (2005) 年 4 月

目次

I. 総合研究報告	
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. 資料	
1. Cdc34高発現によるメチル水銀毒性軽減機構	13
黄 基旭	
2. Cdc34トランスジェニックマウスの作成	33
黄 基旭	
3. メチル水銀毒性防御機構に関与するF-box蛋白質の同定	39
黄 基旭	
4. Bop3が関与するメチル水銀耐性機構	63
黄 基旭	
5. メチル水銀毒性発現機構における液胞輸送系の関与	97
黄 基旭	
6. 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	119
黄 基旭	
7. 亜ヒ酸耐性に関わるシグナル伝達経路の解析	151
大橋一晶、久下周佐	
8. トリブチルスズの毒性発現に影響を与える遺伝子群の検索とその作用機構	183

大橋一晶

9. パラコートの毒性発現に影響を与える遺伝子群の検索とその作用機構	235
大橋一晶	
10. 酵母細胞膜に存在する鉄還元酵素Fre1によるパラコートの毒性増強機構の解析	291
大橋一晶	
11. 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	323
久下周佐	
12. カドミウム耐性因子の遺伝子多型とその意義	345
久下周佐	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	355
IV. 研究成果の刊行物・印刷物	357

1. 総合研究報告

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
（総合）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

化学物質に対する感受性の種差や個体差の遺伝的要因解明に寄与するために、酵母を用いて化学物質感受性に影響を与える細胞内蛋白質を遺伝子レベルで網羅的に検索した。その結果、メチル水銀毒性に影響を与える遺伝子110種を同定し、同様にヒ素127種、トリブチルスズ24種、パラコート47種、カドミウム3種をそれぞれ同定することに成功した。予想をはるかに上回る数の遺伝子が同定されたが、これら遺伝子がコードする蛋白質には機能的に共通するものが多く含まれることから、各化学物質の感受性決定に関与する細胞内機構はそれほど多くないと想像される。また、同定された遺伝子の中には、これまで化学物質毒性との関連性が示唆されているものはほとんど含まれず、ごく一部を除いた全ての遺伝子が本研究によって初めて見出されたものであった。これらの約70%以上はヒトに相同遺伝子が存在することから、本研究で得られた知見はヒトの化学物質に対する感受性決定機構解明に非常に有用な情報を与えるものと期待される。

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）

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。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つ人々の特定は、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

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、

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かつ徹底的に検索・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。

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）で培養する。ここで生育してきた酵母に導入されている遺伝子を単離し、塩基配列を決定する。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・同定する。これらの方法で同定された遺伝子についてその作用機構を様々な生化学的手法を用いて解析により明らかにする。

（倫理面への配慮）

本研究では健康人から血液の提供を受けて遺伝子多型を検討する。これを実施する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られた試料についてのみ解析を実施する。なお、これらの検討は医師の協力を得て行うが、提供者のプライバシーを守るために個人情報の提供を医師から受けることはしない。

C. 研究結果

1. 化学物質感受性に影響を与える遺伝子群の同定

我々は本化学物質リスク研究事業に採択される以前にメチル水銀毒性の発現に影響を与える遺伝子としてGFAIおよびCdc34を同定していた。これら遺伝子の発見はこれまで予想されていたものとは異なる全く新しいメチル水銀毒性発現機構の存在を示唆する事実として高い評価を受けたが、この2種の遺伝子を同定するには2～3年という長期間を要した。本研究事業に採択されたことによって、遺伝子検索方法の改良や新しいシステムの導入が可能となり、僅か3年間で以下に示すように数種の化学物質に対する感受性決定遺伝子として予想をはるかに上回る数十～数百の遺伝子をそれぞれ同定することに成功した。この当事者も想像し得なかった画期的な成果は、感受性決定機構に関する研究に飛躍的な発展をもたらすものと期待される。

（1）高発現によって感受性に影響を与える遺伝子の同定

我々が以前から実施してきた方法に改良を加え、高発現によって酵母に化学物質に対する耐性を与える遺伝子のスクリーニングを行った。その結果、平成14年度にはメチル水銀16種、ヒ素2種、パラコート3種の遺伝子をそれぞれ同定し、平成15年度にもメチル水銀5種、カドミウム3種を同定することができた。これらの遺伝子はほとんどが化学物質の毒性発現との関係が指摘されたことのないものである。

(2) 欠損によって感受性に影響を与える遺伝子の同定

酵母の遺伝子数は約6,000であるが、欠損不能な遺伝子（必須遺伝子）を除いた約5,000の遺伝子を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化学物質感受性を調べ、欠損することによって感受性に影響を与える遺伝子を検索した。本法を用いることにより、欠損可能な全遺伝子について化学物質感受性との関連を調べることができ、また、耐性のみならず欠損によって酵母を高感受性にする遺伝子も同定可能となる。

平成14年度には予備研究として全遺伝子ではなく、一部の遺伝子について検討したが、メチル水銀7種、ヒ素12種、パラコート5種の遺伝子をそれぞれ同定できた。この予備研究の結果等をもとにして様々な改良を行い、最終的に確立された方法を用いて平成15年度以降は欠損可能な全遺伝子についてのスクリーニ

ングを行った。再現性の確認までを含めると、一つの化学物質についてのスクリーニングに10ヶ月以上を費やす大がかりな検討となったが、平成15年度にはトリブチルスズとパラコートについてのスクリーニングを実施し、それぞれ24種および39種の遺伝子を同定し、さらに平成16年度にはメチル水銀とヒ素についてそれぞれ82種および113種の遺伝子を同定することに成功した。

2. ユビキチン/プロテアソームシステムによるメチル水銀毒性軽減作用とその機構解析

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ユビキチン/プロテアソーム（UP）システムの一員であるCdc34を同定していたが、本研究においても同システムに関与する因子が多く同定された。UP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。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、細胞内にはメチル水銀の毒性を増強させる蛋白質が存在し、この蛋白質のユビキチン化およびそれに続くプロテアソームでの分解がメチル水銀の毒性に対して防御的に作用するものと考えられる。そこで、ユビキチン化反応において基質蛋白質の認識を担うF-box蛋白質（17種存在）の各分子種について検討したところ、Ylr097およびTlr224がメチル水銀毒性の軽減に関与することが明らかとなった。両F-box蛋白質と結合する蛋白質の中にユビキチン化反応の基質となりメチル水銀毒性を増強させるものが存在すると予想されることから、Ylr097およびTlr224と結合する蛋白質をtwo-hybrid法で検索した。その結果、前者はGrslおよびDld3、後者はEno2がそれぞれ同定された。これら3つの蛋白質は共に細胞内でユビキチン化を受け、さらに高発現によって酵母のメチル水銀感受性が増強されることも判明した。細胞内にはこのような蛋白質が複数存在し、UPシステムはそれらを分解することによってメチル水銀毒性を軽減するものと考えられる。しかし、これとは逆にRad23という蛋白質がUPシステムによる蛋白質分解を抑制することによって、メチル水銀毒性を軽減していることも本研究により明らかとなり、メチル水銀毒性に対する感受性はかなり複雑な機構によって調節・決定されていることが示唆された。現在、個体レベルにおけるUP

システムとメチル水銀毒性との関係をトランスジェニックマウス（本研究で作成済み）を用いて検討中である。

3. 液胞への物質輸送に関わる因子によるメチル水銀毒性修飾とその機構解析

欠損によって酵母にメチル水銀耐性を与える遺伝子として、液胞への物質輸送に関与する蛋白質の遺伝子が数多く同定された。細胞内の液胞への物質輸送には、①ゴルジ体→液胞、②ゴルジ体→エンドソーム→液胞、③エンドサイトーシス→エンドソーム→液胞、という3つの経路が知られているが、検討の結果、①や③の経路はメチル水銀毒性の発現には関係なく、②の経路が重要な役割を果たしていることが判明した。これまでに、酵母のゴルジ体から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。

4. ヒ素の毒性発現に影響を与える遺伝子群の作用機構解析

高発現によって亜ヒ酸耐性を与える遺伝子として同定された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る。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、亜ヒ酸に対する防御機構としてSsk2/22からPbs2およびHog1を介す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、Hog1が欠損するとヒ素の取り込みが顕著に上昇し、ヒ素取り込み輸送体として作用するFps1の活性化がこの現象に重要な役割を演じていることが判明した。

5. トリブチルスズの毒性発現に影響を与える遺伝子の作用機構解析

高発現によって酵母にトリブチルスズ (TBT) 耐性を与える遺伝子として同定されたScp160は、TBT耐性に関わることが知られているPdr5と結合する可能性がある因子の一つとして報告されている。本研究により、PDR5遺伝子が欠損するとScp160を過剰発現させても酵母はTBT耐性を示さないことが判明した。この結果から、Scp160高発現によるTBT耐性獲得にはPdr5が必須の役割を果たしており、Scp160はPdr5の作用を促進するという機能を持つものと考えられる。

6. パラコート毒性発現に影響を与える遺伝子群の作用機構解析

本研究で、欠損によって酵母のパラコートに対する感受性に影響を与えることが判明した遺伝子の中にはエンドサイトーシスに関与するものが多数含まれていた。生体は細胞膜上の蛋白質をエンドサイトーシスにより細胞内に取り込み、不要となった一部の蛋白質を、リソソームや液胞(酵母の場合)に輸送し分解する。この廃棄すべき蛋白質の選別はエンドソーム上の一連の因子群により行われ、その経路はmultivesicular body (MVB) sorting pathwayとよばれる。本研究によってMVB sorting pathwayを構成する14の因子のどれが欠損してもパラコート感受性が増強されるという、非常に興味深い知見が得られた。MVB sorting pathwayを構成する因子の機能が失われると、リソソームや液胞に廃棄されるべき蛋白質がエンドソーム膜に蓄積してしまうことが知られており、本研究結果は、パラコート毒性の軽減にエンドソーム上での廃棄すべき蛋白質の選別が重要な役割を持つことを示唆している。

一方、本研究によって鉄還元酵素Fre1の欠損がパラコート耐性を与えることも判明したが、機構解析の結果Fre1は細胞外でのパラコートからの活性酸素の産生を促進し、活性酸素除去酵素の培地中への添加がパラコートの毒性軽減に著効を

示すことが明らかとなった。この知見はパラコート毒性が細胞外での活性酸素産生促進によることを初めて示すものであり、同様の機構がヒト細胞でも機能していることも判明したことから、これまでの考え方を覆す新しい機構の解明が期待される。

7. 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

カドミウム毒性に関して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。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検索したところ、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。変異のあるプロモーターの下流にレポーター遺伝子を連結してメタロチオネイン合成能に与える影響を検討した結果、正常なプロモーターと比較してカドミウムによる誘導活性が有意に低いことが判明した。この変異はヘテロ変異が日本人の約20%に、ホモ変異が約1%に認められることから、カドミウム感受性の個人差の決定に関与している可能性が考えられる。

D. 考察

本研究によって、いくつかの代表的な化学物質に対する酵母の感受性に影響を与える遺伝子群が非常に効率良く同定された。それらの遺伝子のほとんど全てが

初めて化学物質毒性に関与することが見出されたものであり、本研究結果はこれまでの研究が如何に非効率的であったかを如実に物語っている。本研究によって多くの新しい感受性決定機構も明らかになったことから、本研究は感受性決定機構に関する今後の研究の発展にも大きく貢献すると思われる。今回同定された酵母遺伝子の多くはヒトにも相同遺伝子が存在することから、酵母を用いたスクリーニング法は感受性決定遺伝子の同定に非常に有用と考えられる。

E. 結論

酵母を用いたスクリーニング法が化学物質に対する感受性の決定に関わる遺伝子（蛋白質）の検索・同定に有用であることが実証された。

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).
- Ohashi, K., Kajiyama, K., Inaba, S., Hasegawa, T., Seko, Y., Furuchi, T. and Naganuma, A.: Copper (II) protects yeast against toxicity of cisplatin independently of induction of metallothionein and inhibition of platinum uptake. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 310, 148-152 (2003).
- Suzuki, T., Aguiar, M., Togawa, T., Naganuma, A., Nishio, K. and Tanabe, S.: MRP5b/SMRP mRNA is highly expressed in metallothionein-deficient mouse liver. *J. Health Sci.*, 49, 524-526 (2003).
- Naganuma, A.: Biological interaction of dietary metals., *J. Toxicol. Sci.*, 28, 249 (2003).
- Naganuma, A., Hwang, G. W. and Furuchi, T.: Intracellular factors involved in methylmercury toxicity in yeast., In: *Proceedings of International Symposium on Bio-Trace Elements 2002* (eds. By Enomoto, S. and Seko, Y.), Riken, Saitama, pp.69-70, (2003).
- 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

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.

岡崎祥子、久下周佐、永沼 章: 酵母転写因子Yap1を介したレドックスシグナル感知機構. 日本薬学会第123年会, 2003.

大谷朋子、大橋一品、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.

野元正崇、久下周佐、永沼 章: 出芽酵母Yapファミリー転写因子の核内輸送. 日本薬学会第123年会, 2003.

稲葉佐知子、大橋一品、永沼 章: 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の増強. フォーラム2003: 衛生薬学・環境トキシコロジー2003.

岡崎祥子、永沼 章、久下周佐: ペルオキシレドキンを介した酵母Yap1転写因子の酸化ストレス感知機構. フォーラム2003: 衛生薬学・環境トキシコロジー2003.

佐々木大祐、黄 基旭、永沼 章: 酵母におけるメチル水銀耐性因子Rad23の機能ドメイン解析. フォーラム2003: 衛生薬学・環境トキシコロジー2003.

小田部 希、黄 基旭、古尾谷祐子、山本玲子、永沼 章: Msn2高発現によるメチル水銀毒性増強機構の解明. フォーラム2003: 衛生薬学・環境トキシコロジー2003.

石田洋輔、黄 基旭、永沼 章: メチル水銀毒性に対して防御的に作用する酵母F-box蛋白質の検索. フォーラム2003: 衛生薬学・環境トキシコロジー2003.

塚原 章、大橋一品、永沼 章: 酵母のトリブチルスズに対する感受性に影響を与える蛋白質の検索. フォーラム2003: 衛生薬学・環境トキシコロジー2003.

亀尾聡美、仲井邦彦、黒川修行、兼久智和、永沼 章、佐藤 洋: HPLC/ICP-MSによるメタロチオネインイソ蛋白質

(MT-I, MT-IIおよびMT-III)の分離ー簡便法の検討ーメタロチオネイン2003, 2003.

金澤寛明、永沼 章、犬塚 貴、保住 功: 味蕾におけるメタロチオネイン-III, -IVの存在. メタロチオネイン2003, 2003.

佐々木大祐、黄 基旭、永沼 章: メチル水銀毒性に対する防御機構であるユビキチンプロテアソームシステムにおける酵母Rad23の役割. メタロチオネイン2003, 2003.

北 加代子、久下周佐、永沼 章: RNA干渉法によるヒトメタロチオネインの発現抑制系の構築. メタロチオネイン2003, 2003.

岡崎祥子、永沼 章、久下周佐: 酵母Yap1転写因子のレドックスシグナル感知機構におけるペルオキシレドキシ様蛋白質の役割. 第26回分子生物学会年会, 2003.

永沼 章: 食品中微量元素の相互作用. 第30回日本トキシコロジー学会学術年会, 2003.

稲葉佐知子、大橋一品、永沼 章: 酵母細胞膜に存在する鉄還元酵素Frel1によるパラコート毒性発現機構の解析. 第42

回日本薬学会東北支部大会, 2003.

佐々木大祐、黄 基旭、永沼 章: 酵母のメチル水銀耐性因子RAD23の機能ドメイン解析. 第42回日本薬学会東北支部大会, 2003.

佐々木大祐、黄 基旭、永沼 章: Rad23高発現によるメチル水銀耐性機構におけるユビキチン・プロテアソームシステムの関与. 第76回日本生化学会大会, 2003.

石田洋輔、黄 基旭、永沼 章: メチル水銀毒性防御機構に関するF-box蛋白質の同定. 第76回日本生化学会大会, 2003.

北 加代子、久下周佐、永沼 章: RNA干渉法によるヒトメタロチオネインの発現抑制の試み. 第76回日本生化学会大会, 2003.

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、大橋一晶、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、大橋一晶、永沼 章: 酵母のトリプトファン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紹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、大橋一品、長谷川達也、瀬子義幸、永沼章: 亜ヒ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. 知的所有権の取得状況

なし。

II. 資料

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 1×10^4 cells/180 μ 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、 5×10^6 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、2,300xg、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、2,300xg、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 MgCl₂、50 mM KCl、5% glycerol、3 mM DTT、1 mM phenylmethylsulphonyl fluoride、1 μ g/ml pepstatin A) と glass-beads を加えて、30 分間、4℃で混和した後に、20,000xg、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 μ 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)、