

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 MilliQ 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, VTA1, 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貪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。

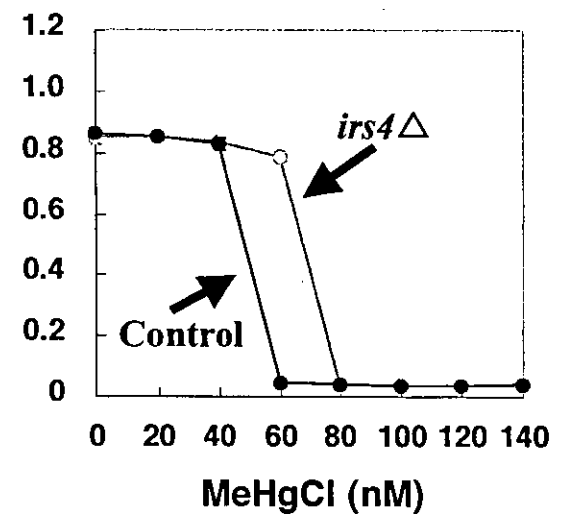
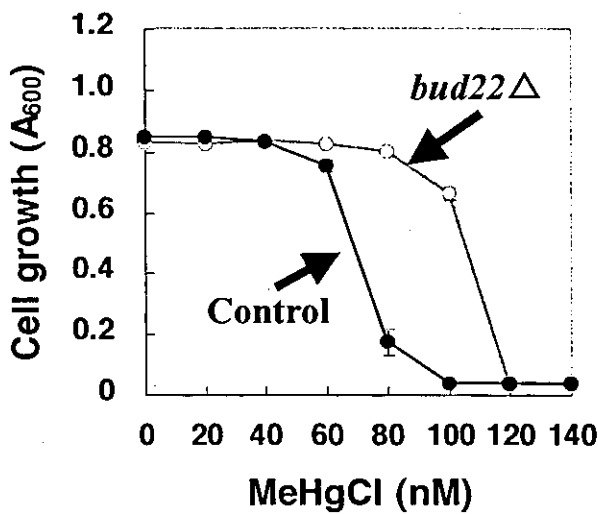
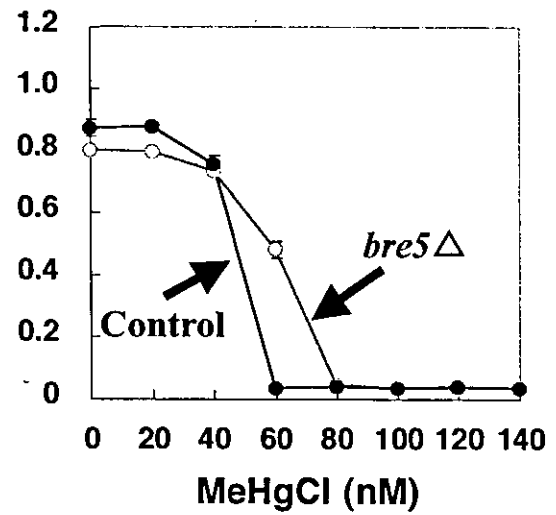
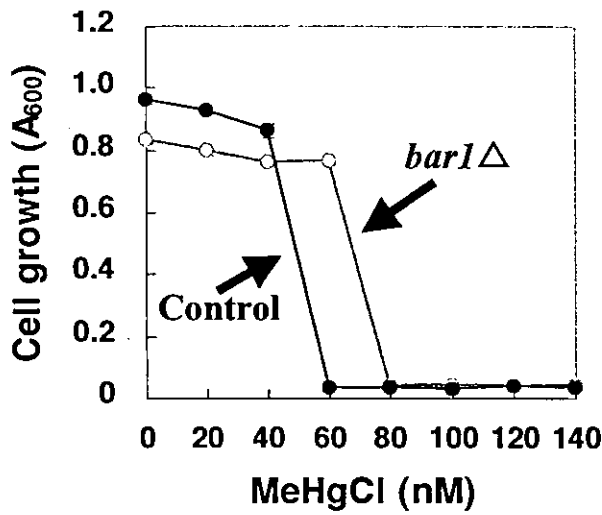
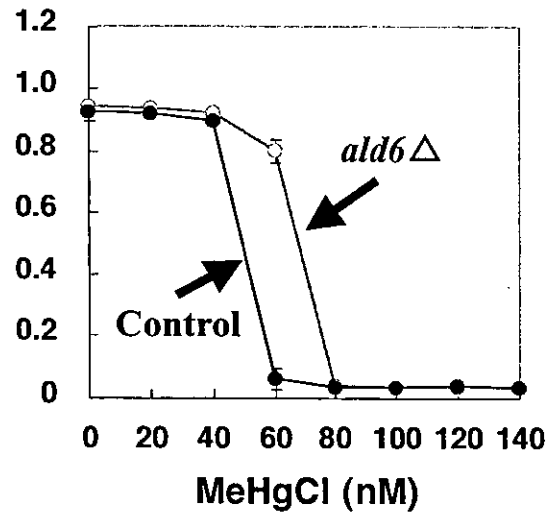
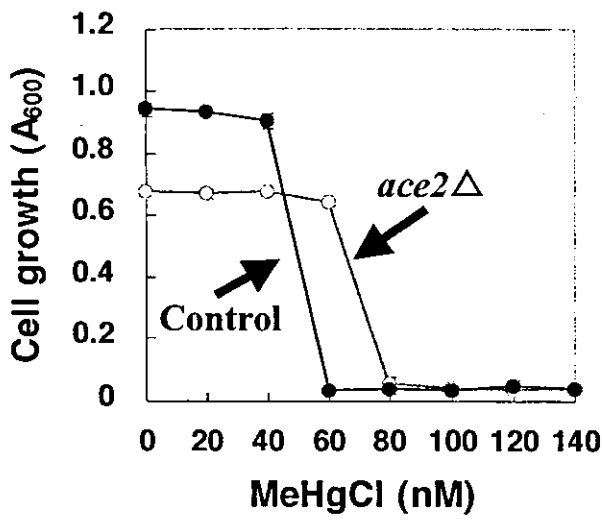


Fig. 1-1 欠損によりメチル水銀耐性を示す遺伝子

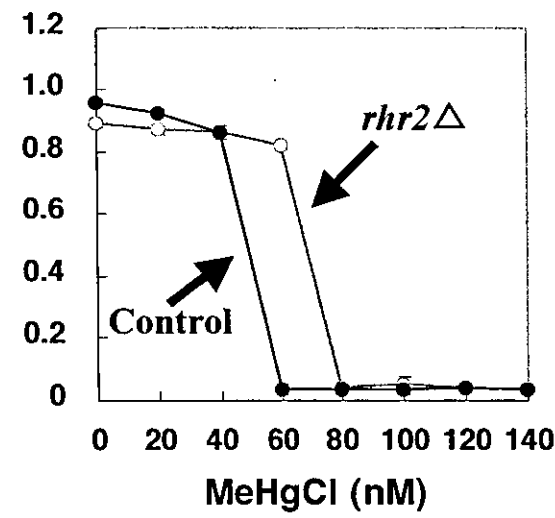
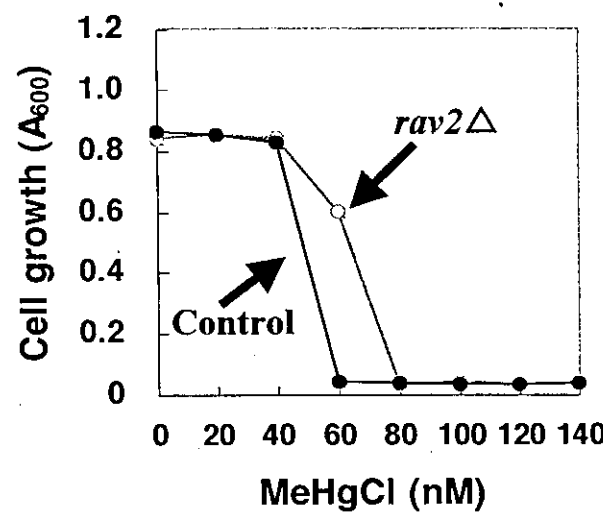
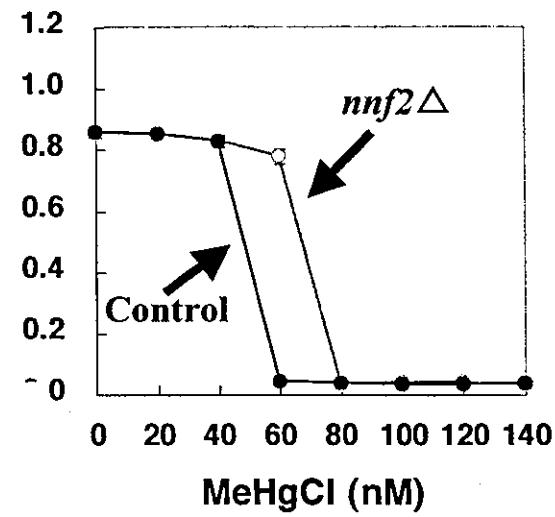
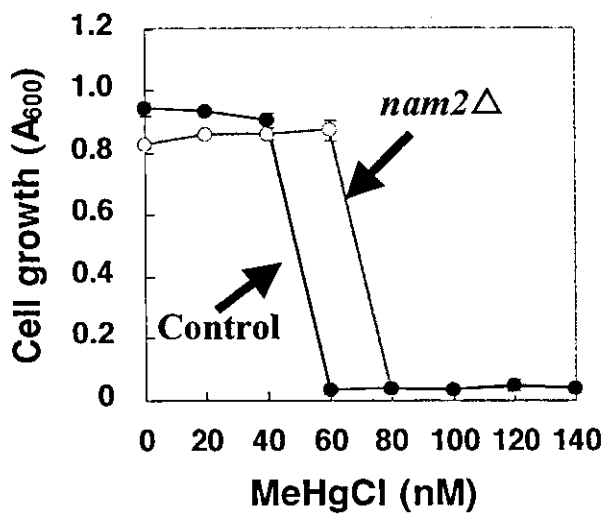
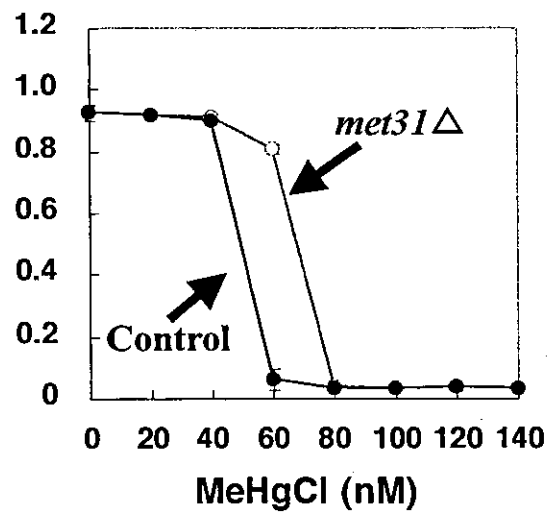
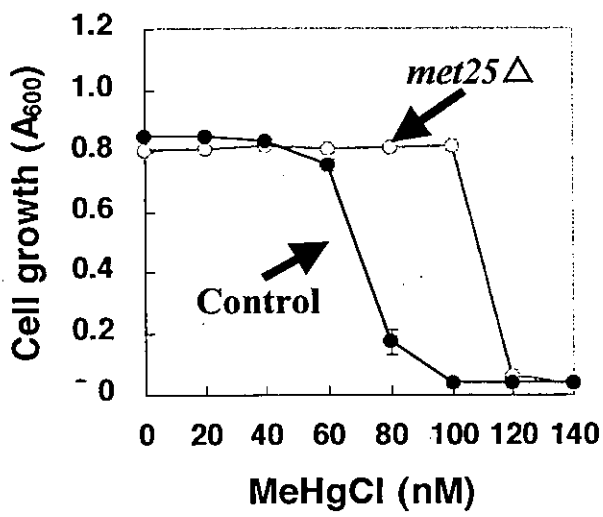


Fig. 1-2 欠損によりメチル水銀耐性を示す遺伝子

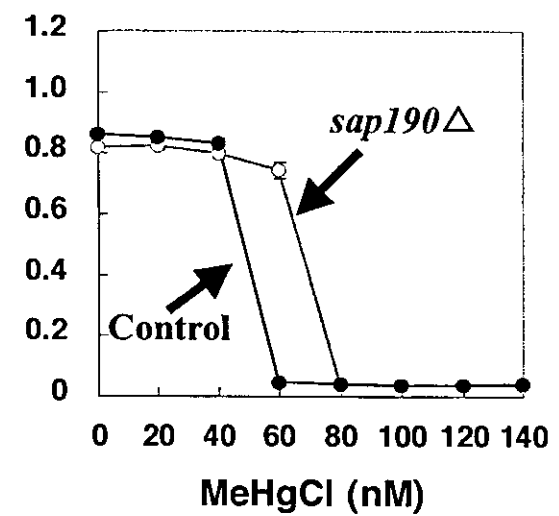
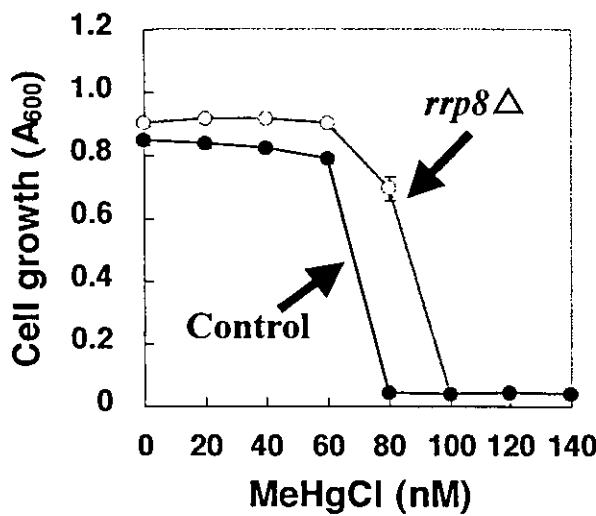
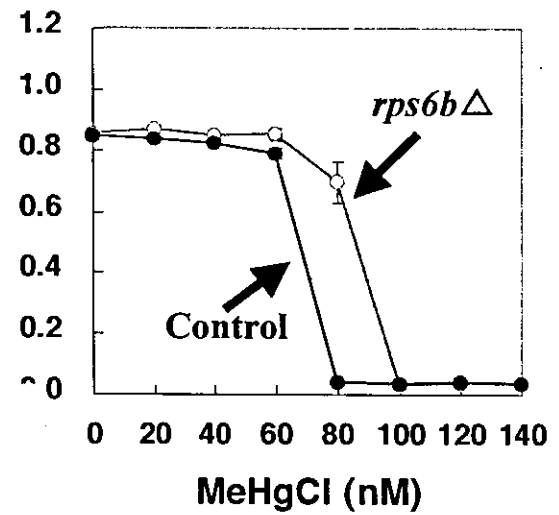
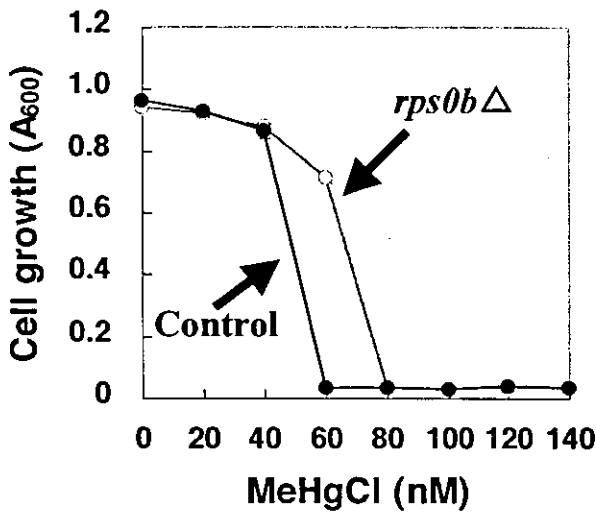
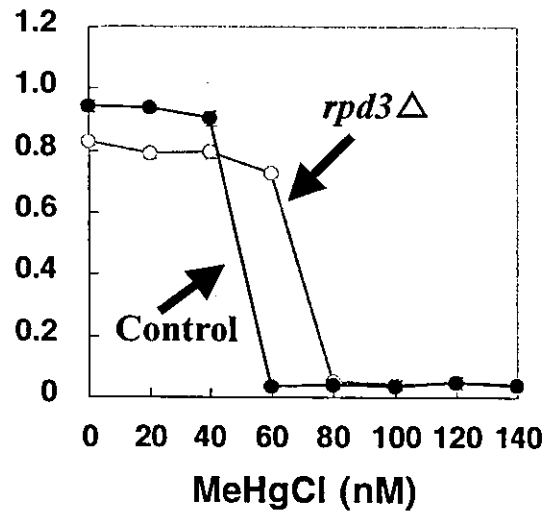
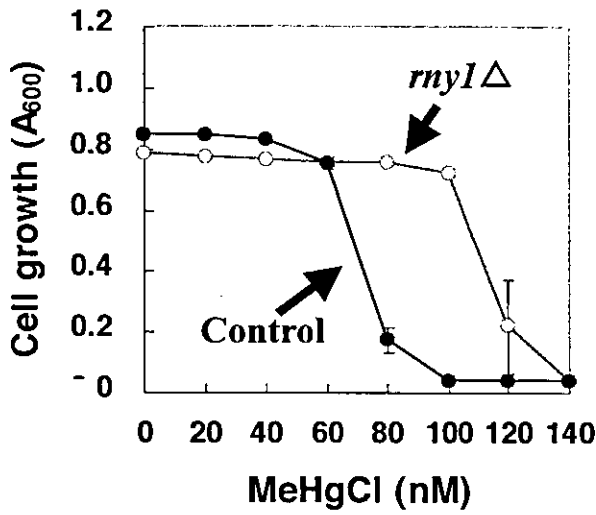


Fig. 1-3 欠損によりメチル水銀耐性を示す遺伝子

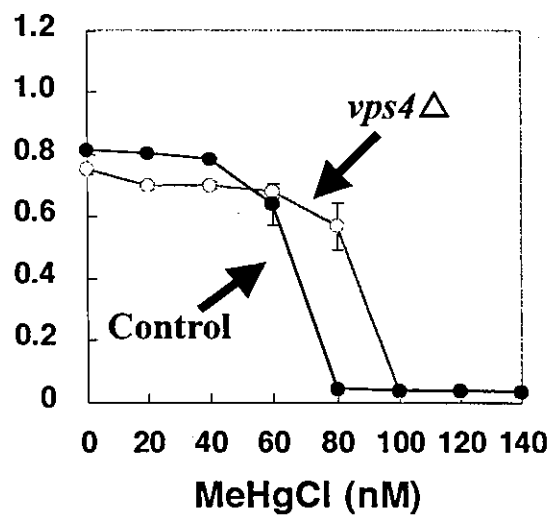
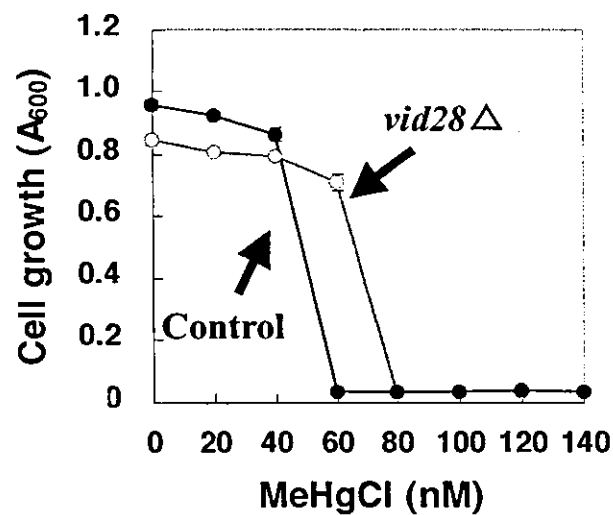
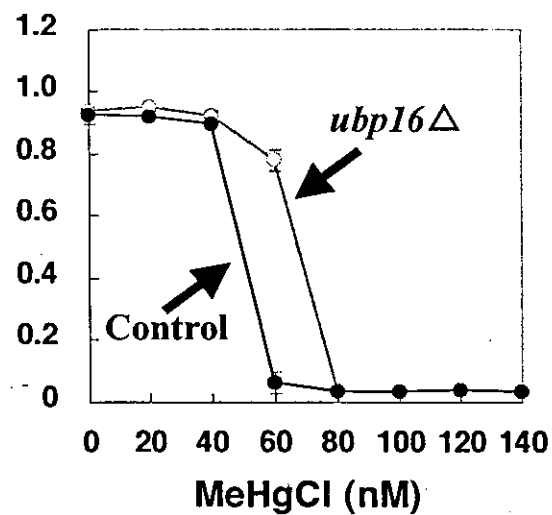
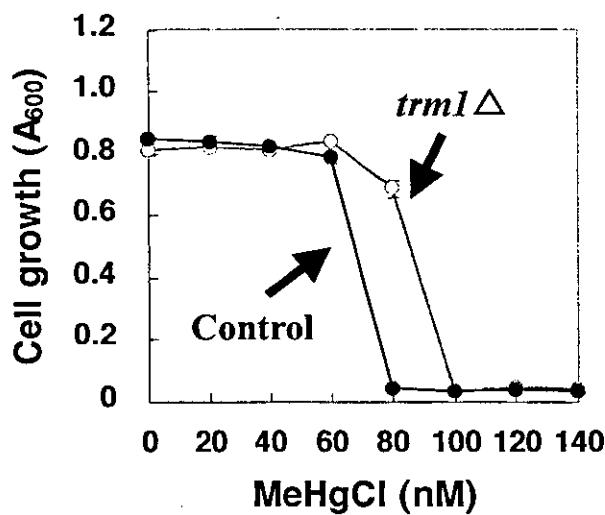
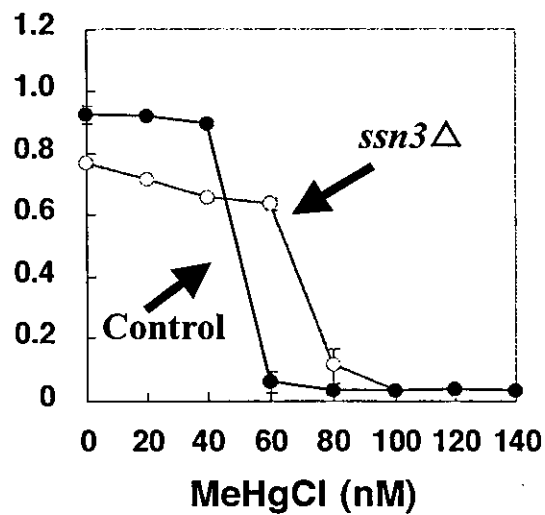
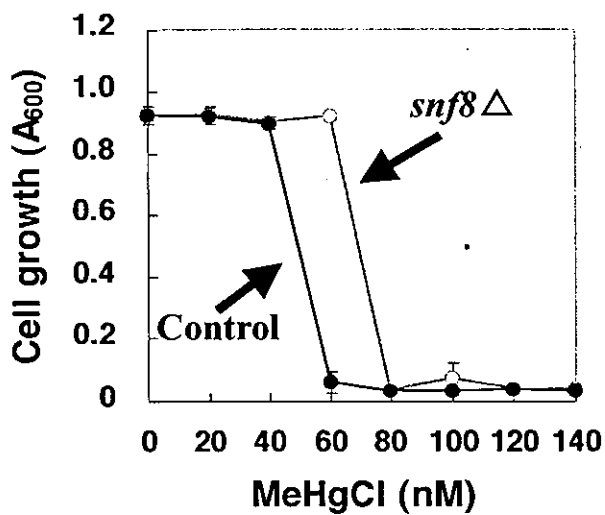


Fig. 1-4 欠損によりメチル水銀耐性を示す遺伝子

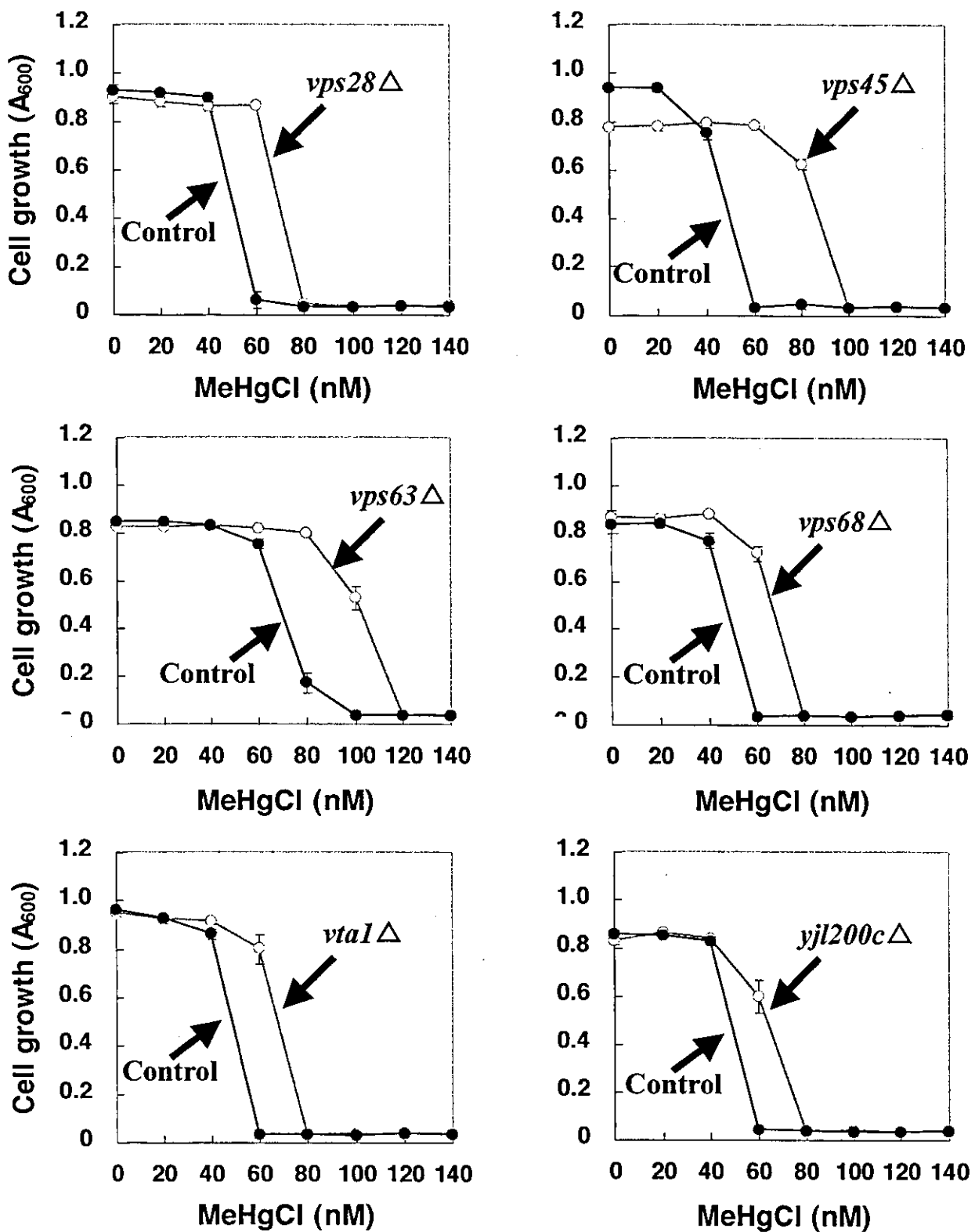


Fig. 1-5 欠損によりメチル水銀耐性を示す遺伝子

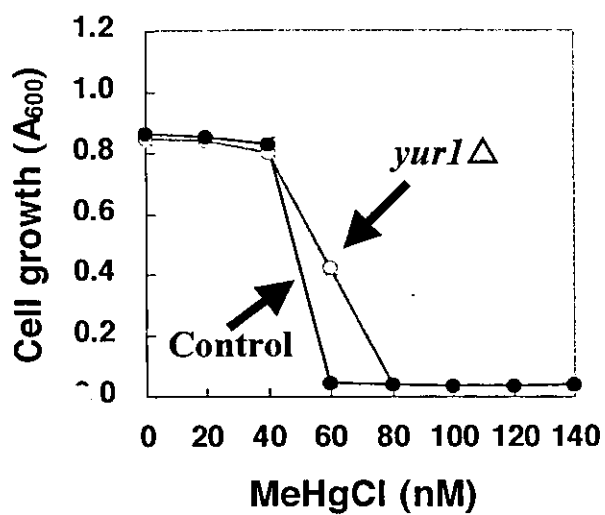
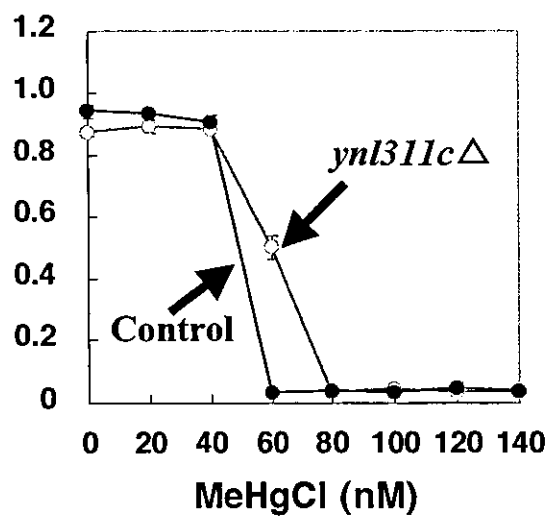
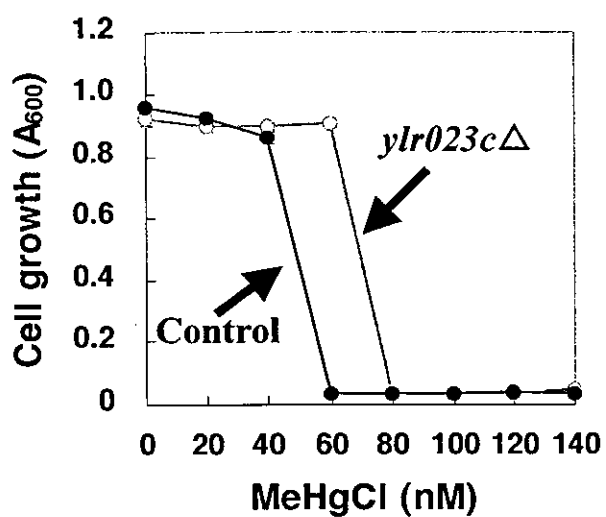


Fig. 1-6 欠損によりメチル水銀耐性を示す遺伝子

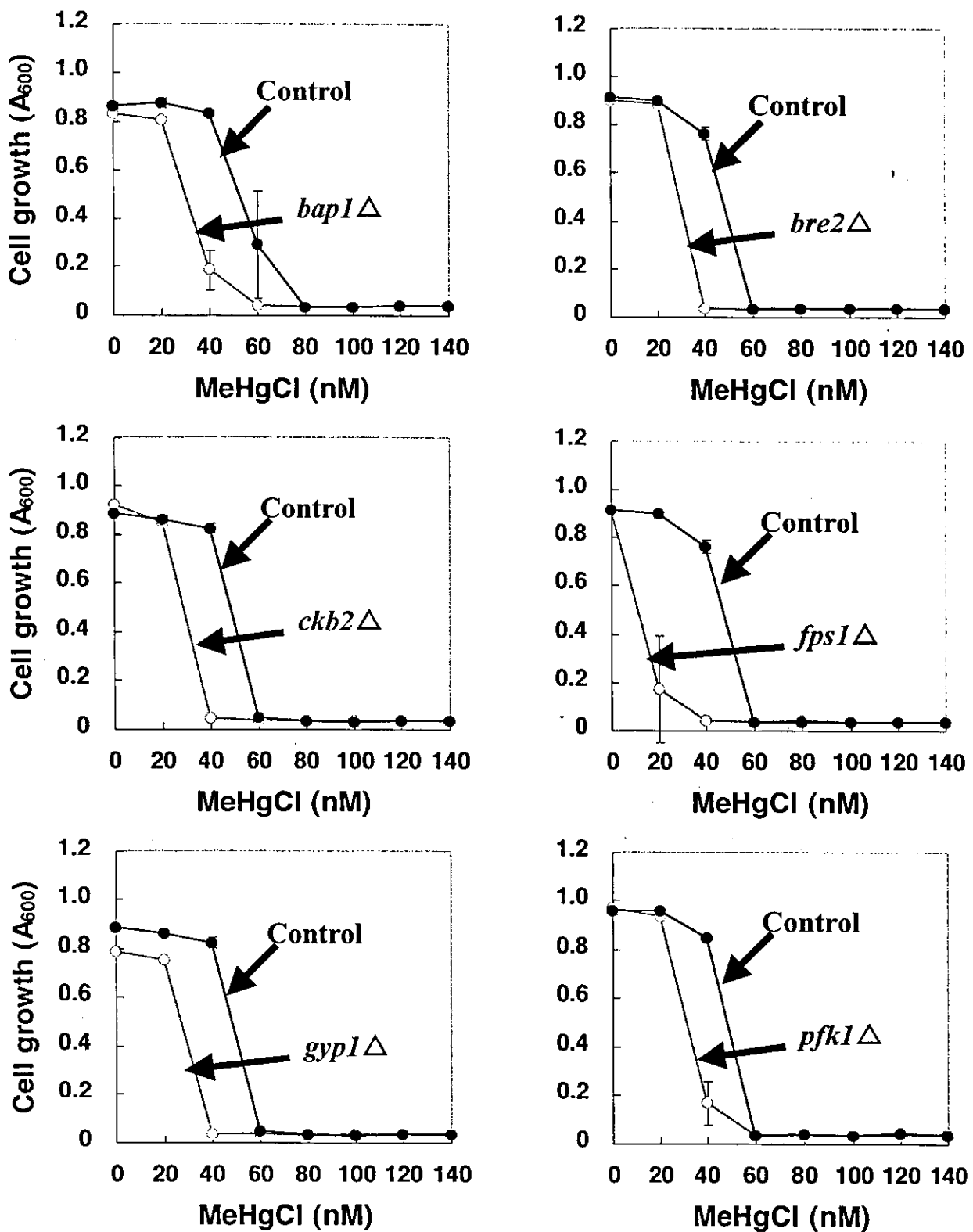


Fig. 2-1 欠損によりメチル水銀高感受性を示す遺伝子

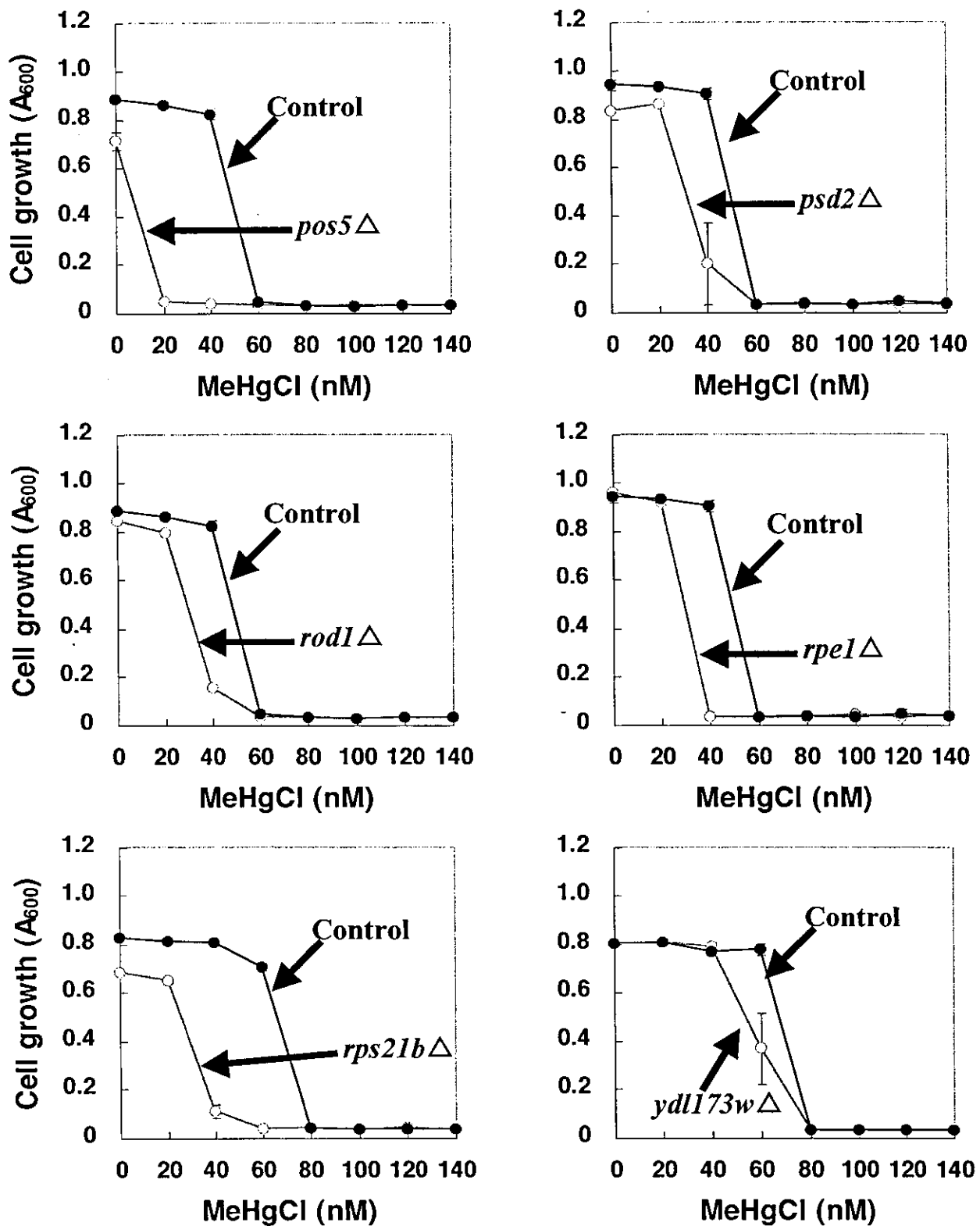


Fig. 2-2 欠損によりメチル水銀高感受性を示す遺伝子

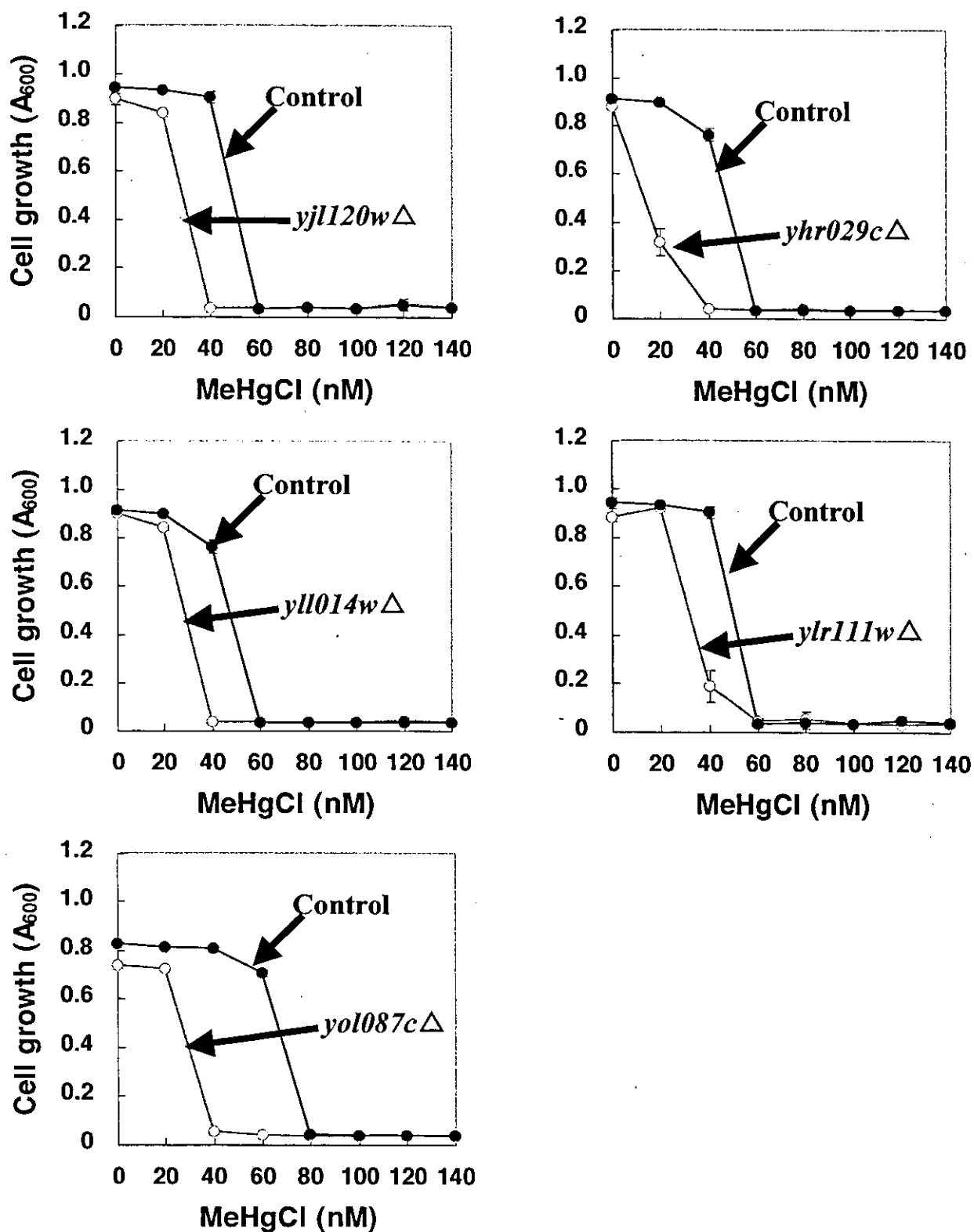


Fig. 2-3 欠損によりメチル水銀高感受性を示す遺伝子

| 蛋白質 | 機能 |
|-------|--|
| Ace2 | Metallothionein expression activator with similarity to Swi5p, has three tandem C2H2-type zinc fingers, required for delaying G1 phase specifically in daughter cells |
| Ald6 | Cytosolic acetaldehyde dehydrogenase |
| Bar1 | Secreted pepsin-like protease that degrades alpha-factor (barrierpepsin) |
| Bre5 | Ubiquitin protease, associates with Ubp3p to de-ubiquitinate Sec23p, mutant is sensitive to brefeldin A |
| Bud22 | Protein with possible role in bud site polarity, has possible coiled-coil domain |
| Irs4 | Protein involved in silencing of ribosomal DNA |
| Met25 | O-Acetylhomoserine sulfhydrylase (OAH SHLase), catalyzes the conversion of O-acetylhomoserine into homocysteine |
| Met31 | Zinc-finger protein involved in transcriptional regulation of methionine metabolism, has two tandem C2H2-type zinc fingers |
| Nam2 | Leucyl-tRNA synthetase, mitochondrial, forms a ternary complex with bI4 maturase and bI4 intron and stimulates bI4 intron splicing activity, dominant alleles suppress mutations in the bI4 maturase |
| Nnf2 | Protein with similarity to human desmoplakin I PIR:A35536 |
| Rav2 | Regulator of the (H ⁺)-ATPase of the vacuolar and endosomal membranes |
| Rhr2 | DL-glycerol phosphate phosphatase (sn-glycerol-3-phosphatase) |
| Rny1 | Ribonuclease of the ribonuclease T2 family |
| Rpd3 | Histone deacetylase required for full repression or full activation of many genes, member of the histone deacetylase family, which catalyze removal of acetyl groups from histones |
| Rps0b | Ribosomal protein S0 (<i>E. coli</i> S2; rat Sb), nearly identical to Rps0Ap |
| Rps6b | Ribosomal protein S6 (yeast S10; YS4; rp9; human, mouse, and rat S6), identical to Rps6Ap |
| Rrp8 | Protein involved in cleavage at site A2 in pre-rRNA in the pathway of ribosomal RNA processing |

Table. 1-1 欠損によりメチル水銀耐性を示す遺伝子がコードする蛋白質の機能

| 蛋白質 | 機能 |
|---------|---|
| Sap190 | Protein that associates with and contributes to function of the protein phosphatase Sit4p |
| Snf8 | Class E vacuolar sorting protein involved in Prc1p vacuolar trafficking pathway and glucose derepression, component of endosomal sorting complex required for transport II (ESCRT-II) |
| Ssn3 | Cyclin-dependent serine/threonine protein kinase of the RNA polymerase II holoenzyme complex and Kornberg's mediator (SRB) subcomplex, involved in regulation of pseudohyphal growth |
| Trm1 | N ² ,N ² -dimethylguanine tRNA methyltransferase, required for methylation of G26 of both mitochondrial and cytoplasmic tRNAs |
| Ubp16 | Putative ubiquitin-specific protease, ubiquitin C-terminal hydrolase |
| Vid28 | Protein involved in the degradation of fructose-1,6-bisphosphatase, possibly required for full induction of IME1 during early meiosis |
| Vps4 | Protein involved in vacuolar sorting that causes a novel pre-vacuolar organelle to become prominent, member of the AAA ATPase protein family |
| Vps28 | Protein required for traffic to the vacuole through the endocytic and biosynthetic pathways, component of endosomal sorting complex required for transport (ESCRT-1) with Stp22p and Sm2p |
| Vps45 | Protein of the Sec1p family essential for vacuolar protein sorting |
| Vps63 | Protein involved in Prc1p vacuolar trafficking pathway |
| Vps68 | Class F vacuolar sorting protein involved in Prc1p vacuolar trafficking pathway, has high similarity to uncharacterized <i>C. albicans</i> Orf6.1817p |
| Vta1 | Protein involved in endosomal transport and protein sorting in multivesicular body, may regulate function of Vps4p |
| Yjl200c | Protein with similarity to aconitase, has potential mitochondrial transit peptide |
| Ylr023c | Member of the uncharacterized protein family (Hly-III or UPF0073), which may be hemolysins |
| Ynl311c | Protein that may be involved in amino acid metabolism, contains an cyclin-associated F-box |
| Yur1 | Mannosyltransferase of KRE2 family involved in N-linked glycosylation |

Table. 1-2 欠損によりメチル水銀耐性を示す遺伝子がコードする蛋白質の機能

| 蛋白質 | 機能 |
|---------|--|
| Bap2 | Branched-chain amino acid permease, also transports alanine and aromatic and sulfur containing amino acids |
| Bre2 | Component of the SET1 and COMPASS complex, mutant is sensitive to brefeldin A |
| Ckb2 | Casein kinase II Protein kinase CK2, regulatory (beta-prime) subunit |
| Fps1 | Glycerol channel protein that is also involved in uptake of As^{3+} and Sb^{3+} , member of the major intrinsic protein (MIP) family of transmembrane channel proteins |
| Gyp1 | GTPase-activating protein for Ypt1p and Sec4p |
| Pfk1 | Phosphofructokinase alpha subunit, part of a complex with Pfk2p which catalyzes ATP-dependent conversion of fructose-6-phosphate to fructose-1,6-bisphosphate, a key regulatory step in glycolysis |
| Pos5 | Mitochondrial NADH kinase required for resistance to oxidative stress, mitochondrial function, and arginine biosynthesis, has similarity to Utr1p and Yel041p |
| Psd2 | Phosphatidylserine decarboxylase, converts phosphatidyl-L-serine to phosphatidylethanolamine, isozyme present in the Golgi and vacuole |
| Rod1 | Protein that mediates resistance to o-dinitrobenzene (O-DNB) |
| Rpe1 | Ribulose-5-phosphate-3-epimerase, interconverts ribulose-5-phosphate and xylulose-5-phosphate |
| Rps21b | Ribosomal protein S21 (yeast S26; YS25; rat S21), identical to Rps21Ap |
| Ydl173w | Protein of unknown function |
| Yjl120w | Protein of unknown function |
| Yhr029c | Member of the phenazine biosynthesis-like protein family, has moderate similarity to uncharacterized <i>S. pombe</i> Aes1p |
| Yll014w | Protein of unknown function, has moderate similarity to uncharacterized <i>C. albicans</i> Ip5035p |
| Ylr111w | Protein of unknown function |
| Yol087c | Protein containing four WD domains (WD-40 repeat), which may mediate protein-protein interactions, has low similarity to uncharacterized <i>C. pseudotropicalis</i> Yol087p |

Table. 2 欠損によりメチル水銀高感受性を示す遺伝子がコードする蛋白質の機能

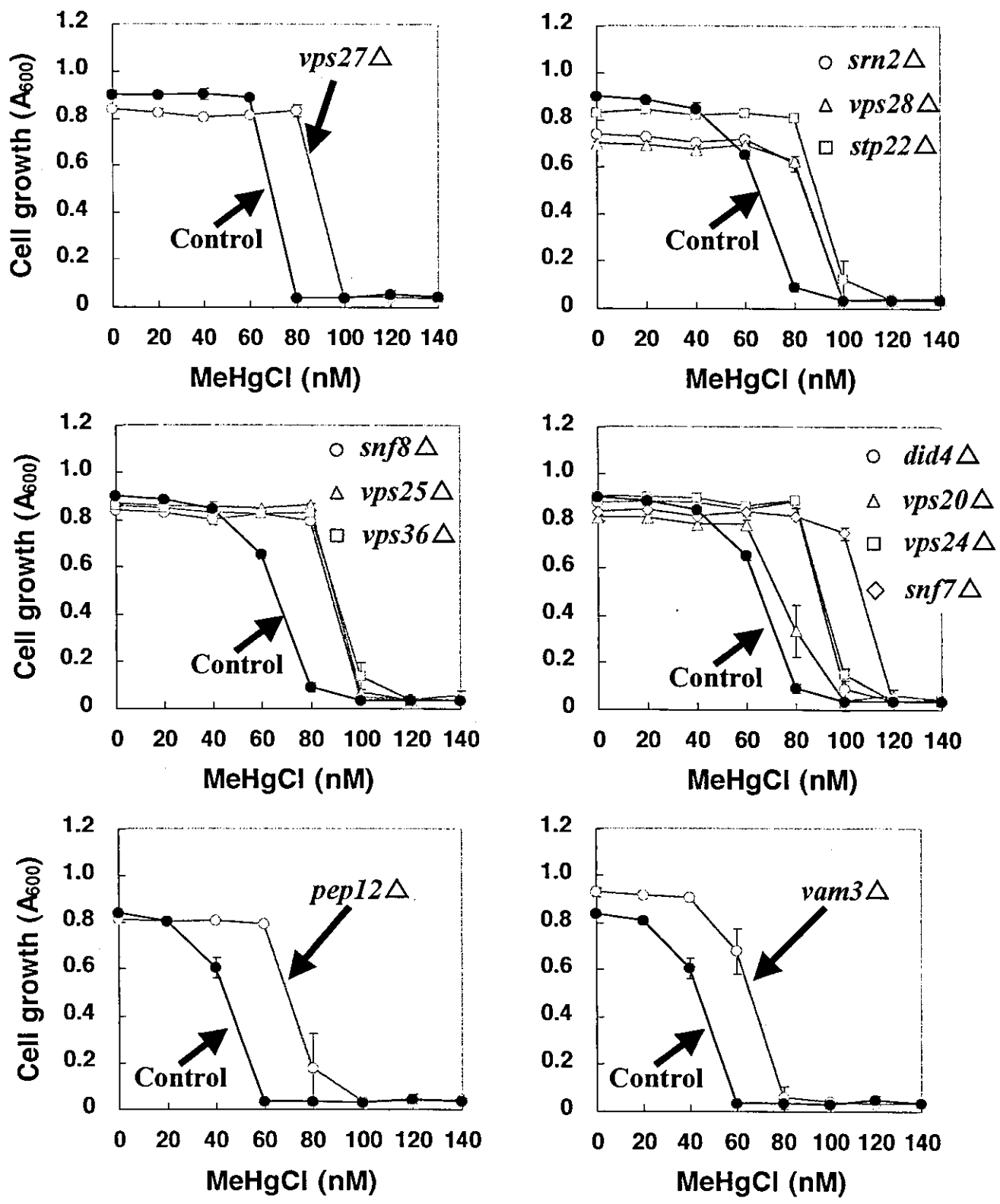


Fig. 3-1 液胞への輸送経路に関わる因子の欠損によるメチル水銀感受性への影響

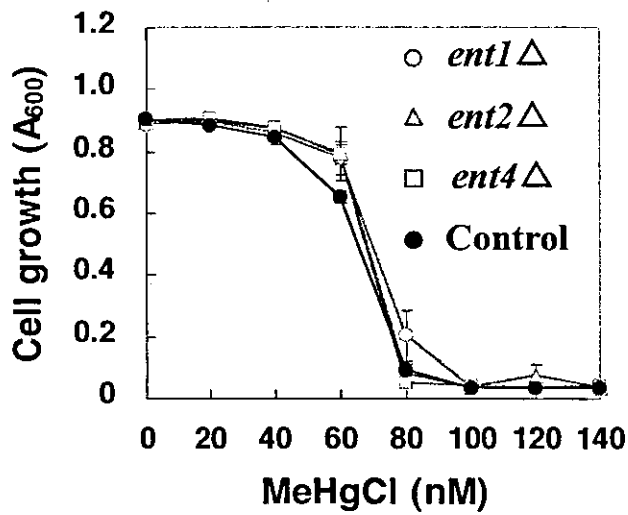
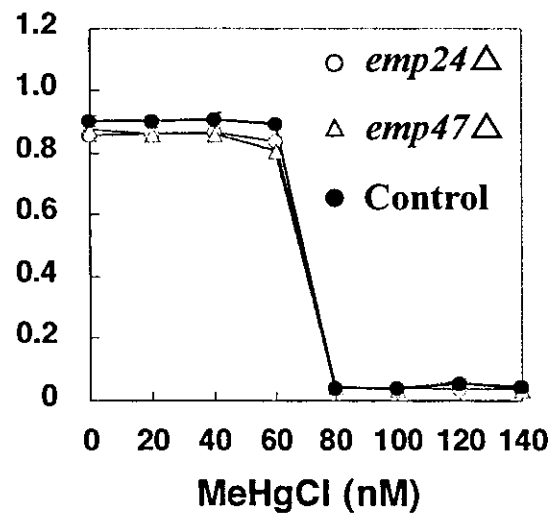
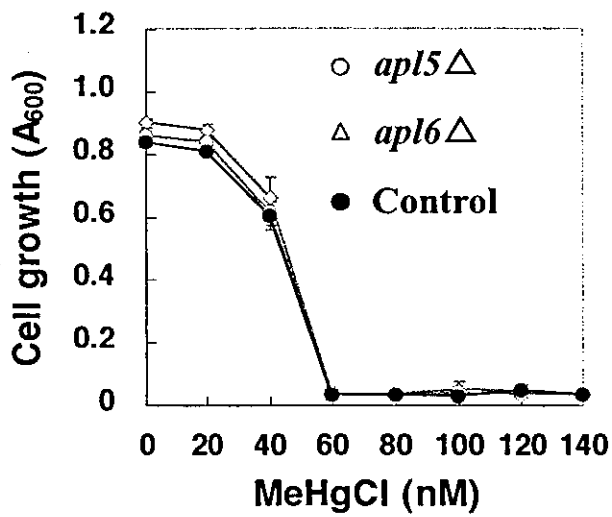


Fig. 3-2 液胞への輸送経路に関わる因子の欠損によるメチル水銀感受性への影響