

パラコートによる細胞外での活性酸素産生およびパラコート毒性発現に重要な役割を果たしている可能性が高い。

2-4. 鉄還元酵素ファミリーがパラコート毒性に及ぼす影響

出芽酵母では、鉄還元酵素ファミリーとして Fre1~7、Ygl160w および Ylr047c の 9 種の酵素の存在が知られている。Fre1 以外の鉄還元酵素がパラコート毒性に及ぼす影響を検討するため、Fre1、Fre2、Fre3、Fre4 および Ygl160w をそれぞれ Fre1 欠損酵母に高発現させ、それらの鉄還元活性、パラコート処理による細胞外活性酸素産生およびパラコート感受性について検討した。

まず鉄還元活性について調べたところ、Fre2 高発現酵母において Fre1 高発現酵母の 397%という非常に高い鉄還元活性が認められたが、Fre3、Fre4 および Ygl160w 高発現酵母の活性は Fre1 高発現酵母のそれぞれ 22、49、24%であった (Fig. 11)。

パラコート処理後の細胞外活性酸素濃度 (Fig. 12) は、Fre2 高発現酵母が Fre1 高発現酵母の 246%という高値を示したが、非常に低い鉄還元活性しか認められなかった Fre3 高発現酵母はこの Fre2 高発現酵母よりも高い値 (339%) を示した。Fre3 高発現酵母

と同程度の低い鉄還元活性を示した Ygl160w 高発現酵母は空ベクター導入酵母 (24%) とほぼ同様の活性酸素産生 (21%) を示した。なお、Fre4 高発現酵母のパラコート処理後の細胞外活性酸素濃度は Fre1 高発現酵母の 61%であった。したがって、鉄還元酵素の中には、鉄還元活性は弱いにも関わらずパラコートに依存した活性酸素産生量の多いもの (Fre3) や、鉄還元活性を持つがパラコートによる活性酸素産生は行わないもの (Ygl160w) が存在し、パラコートに依存した活性酸素産生は鉄還元活性と相関しないと考えられる。

次に、これら高発現酵母のパラコート感受性を検討した (Fig. 13)。その結果、Fre2 高発現酵母は Fre1 高発現酵母よりも高いパラコート感受性を示し、Fre3 高発現酵母は、Fre2 高発現酵母よりもさらに高い感受性を示した。また、Fre4 高発現酵母は Fre1 高発現酵母に比べわずかに低いパラコート感受性を示し、Ygl160w 高発現酵母は空ベクターを導入した酵母と同程度の感受性を示した。よって、パラコート感受性は、鉄還元活性の強さよりもむしろパラコート処理による細胞外活性酸素産生量に相関すると考えられる。

以上の結果により、鉄還元酵素がパラコートを基質とすることにより細

胞外に活性酸素が産生され、この産生された活性酸素が酵母に毒性を及ぼす可能性が強く示唆された。鉄還元活性の強さとパラコート感受性に相関性が見られなかったのは、酵素によってパラコートを基質として認識する強さが異なるためかも知れない。

2-5. パラコート毒性における SOD 添加の影響

パラコート存在下で酵母を培養した際に、Fre1 などの酵素の作用によって細胞外に産生される活性酸素は O_2^- であると考えられる。そこで、酵母培養液に O_2^- を不均化する酵素であるスーパーオキシドジスムターゼ (SOD) を添加し、パラコート毒性に及ぼす影響を検討した (Fig. 14)。

その結果、パラコート 1 mM 添加時に認められる野生株の増殖阻害が、SOD の添加により顕著に軽減された。また、Fre1 欠損株では SOD の添加の影響はほとんど観察されなかった。以上の結果は、細胞外に産生された O_2^- が酵母に毒性を及ぼすという可能性を支持している。

3. Fre1 によるシスプラチン毒性増強機構の解析

3-1. 鉄還元酵素活性とシスプラチン感受性との関係

Fre1 は、シスプラチンの毒性も増強させる。そこで、パラコートの場合に認められた Fre1 によるラジカル発生機構とシスプラチン毒性との関係を検討した。

まず Fre1 の鉄還元活性がシスプラチン毒性の増強に及ぼす影響を検討するため、3-2-3 の実験と同様に、Fre1 の鉄還元活性に関わるドメインの変異体を Fre1 欠損酵母に高発現させた酵母を用いてシスプラチン感受性を検討した。その結果、正常 Fre1 を高発現させた酵母は Fre1 欠損酵母に空ベクターを導入した酵母に比べて非常に高いシスプラチン感受性を示したのに対して、鉄還元活性を示さない変異 Fre1 である H294A または H308A を高発現させた酵母は空ベクターを導入した酵母と同程度の感受性を示し、正常 Fre1 の 27% に相当する弱い鉄還元活性を示す H462A を高発現させた酵母は正常 Fre1 高発現酵母よりやや弱い感受性を示した (Fig. 15)。これらの結果は、パラコートの場合と同様に、Fre1 の鉄還元活性がシスプラチン毒性の増強に必要である可能性を示している。

また、Fre1 以外の鉄還元酵素を Fre1 欠損酵母に高発現させたところ、Fre2 または Fre3 高発現酵母は Fre1 高発現酵母よりも高い感受性を示し、Fre4 高発現酵母は Fre1 高発現酵母よりもわ

ずかに低い感受性を示した (Fig. 16)。Ygl160w 高発現酵母のシスプラチン感受性は空ベクターを導入した酵母よりわずかに高い感受性を示した (Fig. 16)。Fig. 9 に示したように、鉄還元活性の強さは Fre2 高発現酵母が最も強く、Fre3 高発現酵母は非常に低い (Fre1 高発現酵母を 100% としたとき Fre2 は 397%、Fre3 は 22%)。しかし、シスプラチン感受性は Fre3 高発現酵母が最も高く、鉄還元活性の強さとは一致していない。なお、この各鉄還元酵素を高発現させた酵母のシスプラチン感受性は、Fig. 11 に示したパラコートに対する感受性パターンとよく類似していた。

3-2. シスプラチン処理による細胞外活性酸素産生の検討

3-3-1 の結果から、シスプラチンの場合にもパラコートと同様に Fre1 により電子が付与されることにより細胞外で活性酸素が産生する可能性が考えられる。そこで、シスプラチン処理による細胞外での活性酸素産生を dihydrorhodamine 123 を用いて測定した。しかしながら、シスプラチン処理による細胞外活性酸素産生の増大は観察されなかった (Fig. 17)。また、酵母培養液に SOD を添加し、シスプラチン毒性に及ぼす影響を検討したが、SOD の添加による毒性軽減効果は

観察されず、逆にシスプラチン毒性の増強が認められた (Fig. 18)。

以上の結果より、シスプラチンの場合にはパラコートとは異なり、Fre1 を介した活性酸素の産生は生じないものの、Fre1 によるシスプラチン毒性の増強には Fre1 の鉄還元活性が関与していると考えられる。また、各種鉄還元酵素ファミリーを高発現させた際の各高発現酵母の感受性の違いがシスプラチンとパラコートでほぼ同様であったことから、酵母の鉄還元酵素を介した両化合物の毒性増強機構に、何らかの類似した機構が存在する可能性も考えられる。

3-3. Fre1 がシスプラチンの反応性に及ぼす影響

Fre1 が存在するとシスプラチン毒性が増大する 1 つの可能性として、Fre1 を介した何らかの作用によりシスプラチンの反応性が高まり、その結果として毒性が増強される可能性が考えられる。細胞内に入ったシスプラチンは核内でゲノム DNA と反応し DNA 2 本鎖間に架橋を生じる [1, 26]。そこで、DNA へのシスプラチン結合量を、Fre1 欠損株と野生株で比較した。まず酵母細胞内に蓄積されたプラチナ量を測定したところ、Fre1 の欠損による影響はほとんど認められなかった (Fig. 19 (a))。また、DNA に結合

したプラチナの量も、野生株と Fre1 欠損株に有意な差は認められなかった (Fig. 19 (b))。

したがって、Fre1 によるシスプラチン毒性の増強は、少なくともシスプラチンの DNA への結合の増加ではないと考えられる。

D. 参考文献

- 1 Finegold, A. A., Shatwell, K. P., Segal, A. W., Klausner, R. D., Dancis, A.: Intramembrane bis-heme motif for transmembrane electron transport conserved in a yeast iron reductase and the human NADPH oxidase. : J. Biol. Chem., 271(49), 31021-31024 (1996)
- 2 Shatwell, K. P., Dancis, A., Cross, A. R., Klausner, R. D., Segal, A. W.: The FRE1 ferric reductase of *Saccharomyces cerevisiae* is a cytochrome *b* similar to that of NADPH oxidase. : J. Biol. Chem., 271(24), 14240-14244 (1996)
- 3 Hassett, R., Kosman, D. J.: Evidence for Cu(II) reduction as a component of copper uptake by *Saccharomyces cerevisiae*. : J. Biol. Chem., 270(1), 128-134 (1995)
- 4 Georgatsou, E., Alexandraki, D.: Regulated expression of the *Saccharomyces cerevisiae* Fre1p/Fre2p Fe/Cu reductase related genes. : Yeast, 15(7), 573-584 (1999)
- 5 Anderson, G. J., Lesuisse, E., Dancis, A., Roman, D. G., Labbe, P., Klausner, R. D.: Ferric iron reduction and iron assimilation in *Saccharomyces cerevisiae*. : J. Inorg. Biochem., 47(3-4), 249-255 (1992)
- 6 Dancis, A., Roman, D. G., Anderson, G. J., Hinnebusch, A. G., Klausner, R. D.: Ferric reductase of *Saccharomyces cerevisiae*: molecular characterization, role in iron uptake, and transcriptional control by iron. : Proc. Natl. Acad. Sci. U S A., 89(9), 3869-3873 (1992)
- 7 Fichtinger-Schepman A. M., van der Veer J. L., den Hartog J. H., Lohman P. H., Reedijk J.: Adducts of the antitumor drug cis-diamminedichloroplatinum(II) with DNA: formation, identification, and quantitation. : Biochemistry,

- 24(3), 707-13 (1985)
- 8 西本行男：蛋白質 核酸 酵素, 45
(15), 2511-2518 (2000)

E. 研究発表

1. 論文発表

なし。

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.

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.

F. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

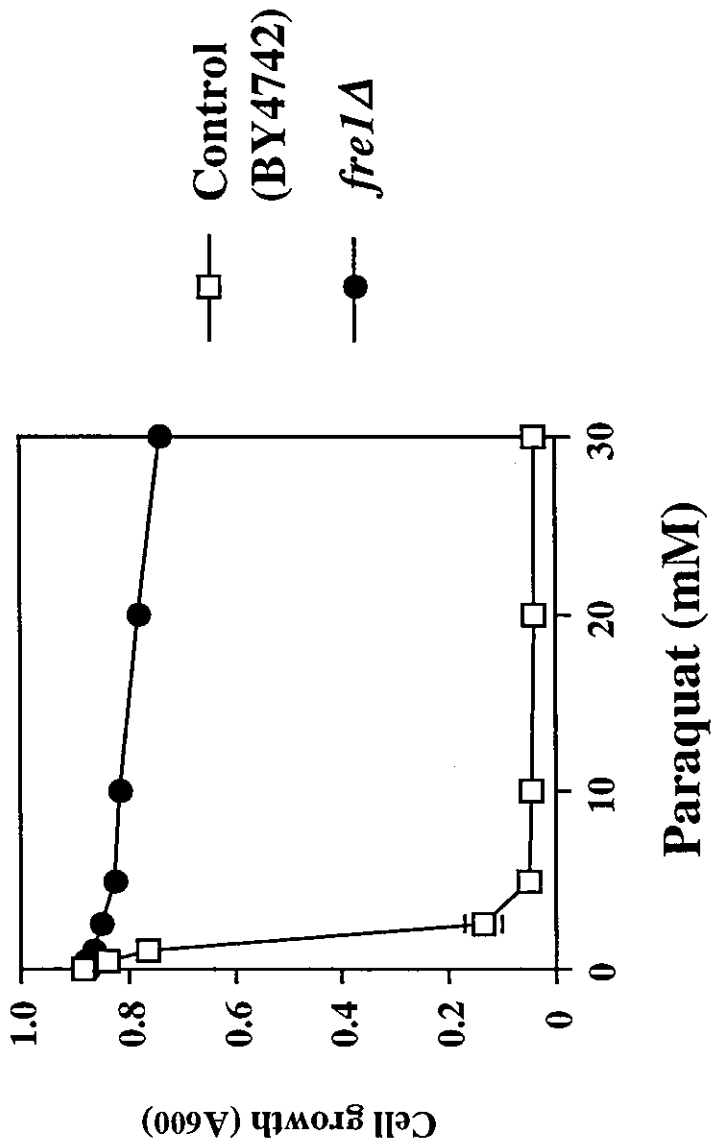


Fig. 1. Effect of deletion of Fre1 in yeast (BY4742) on sensitivity to paraquat

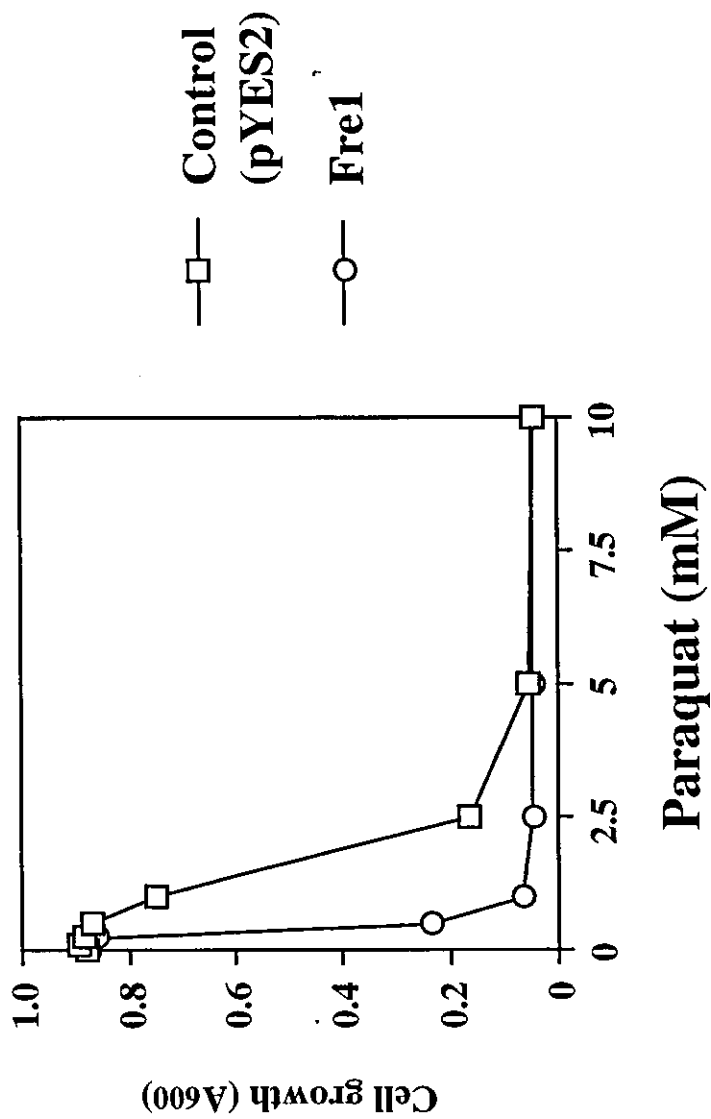


Fig. 2. Effect of overexpression of Fre1 in yeast cells on sensitivity to paraquat

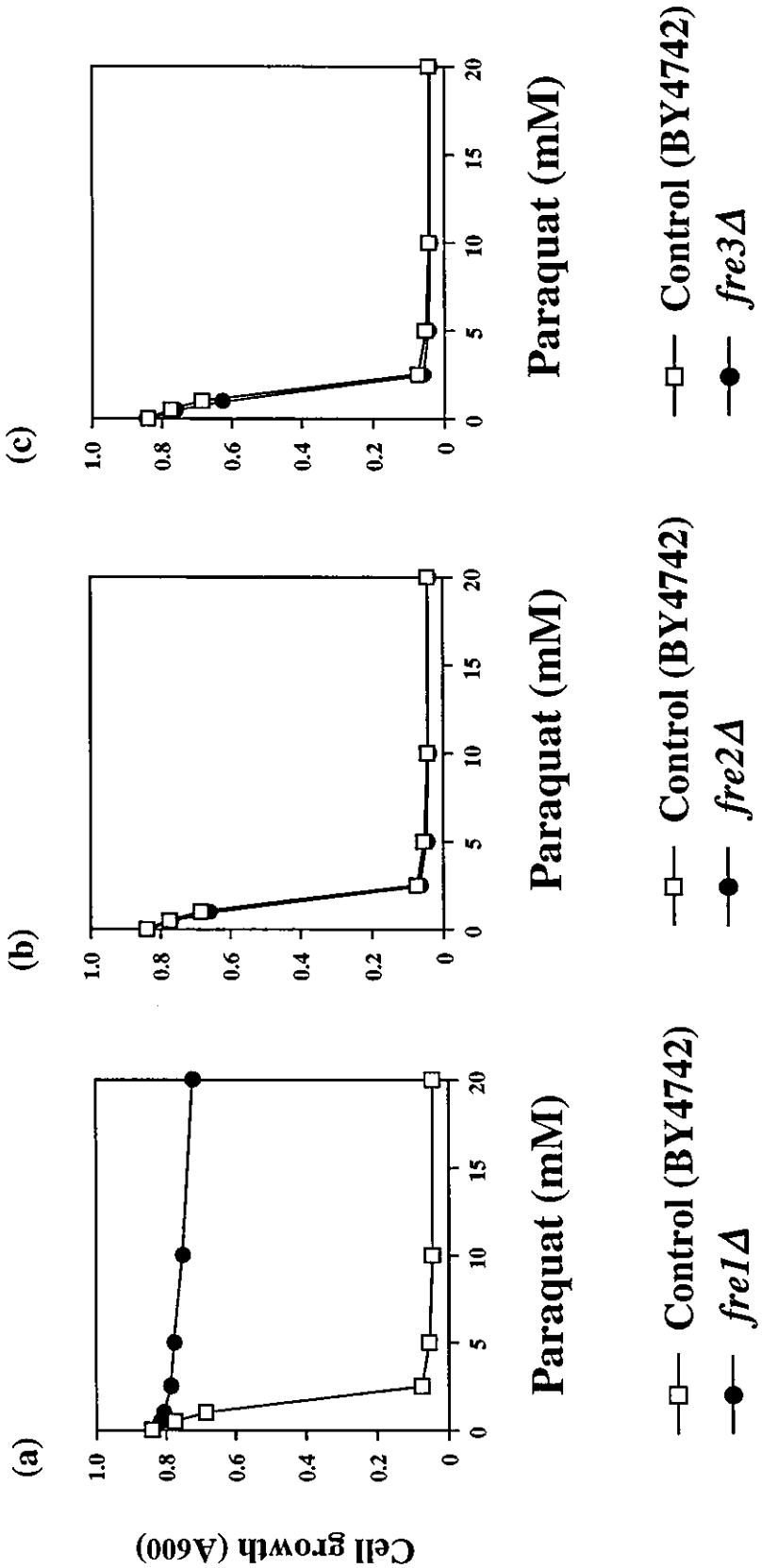


Fig. 3. Sensitivity of *fre1Δ*, *fre2Δ* or *fre3Δ* mutants to paraquat

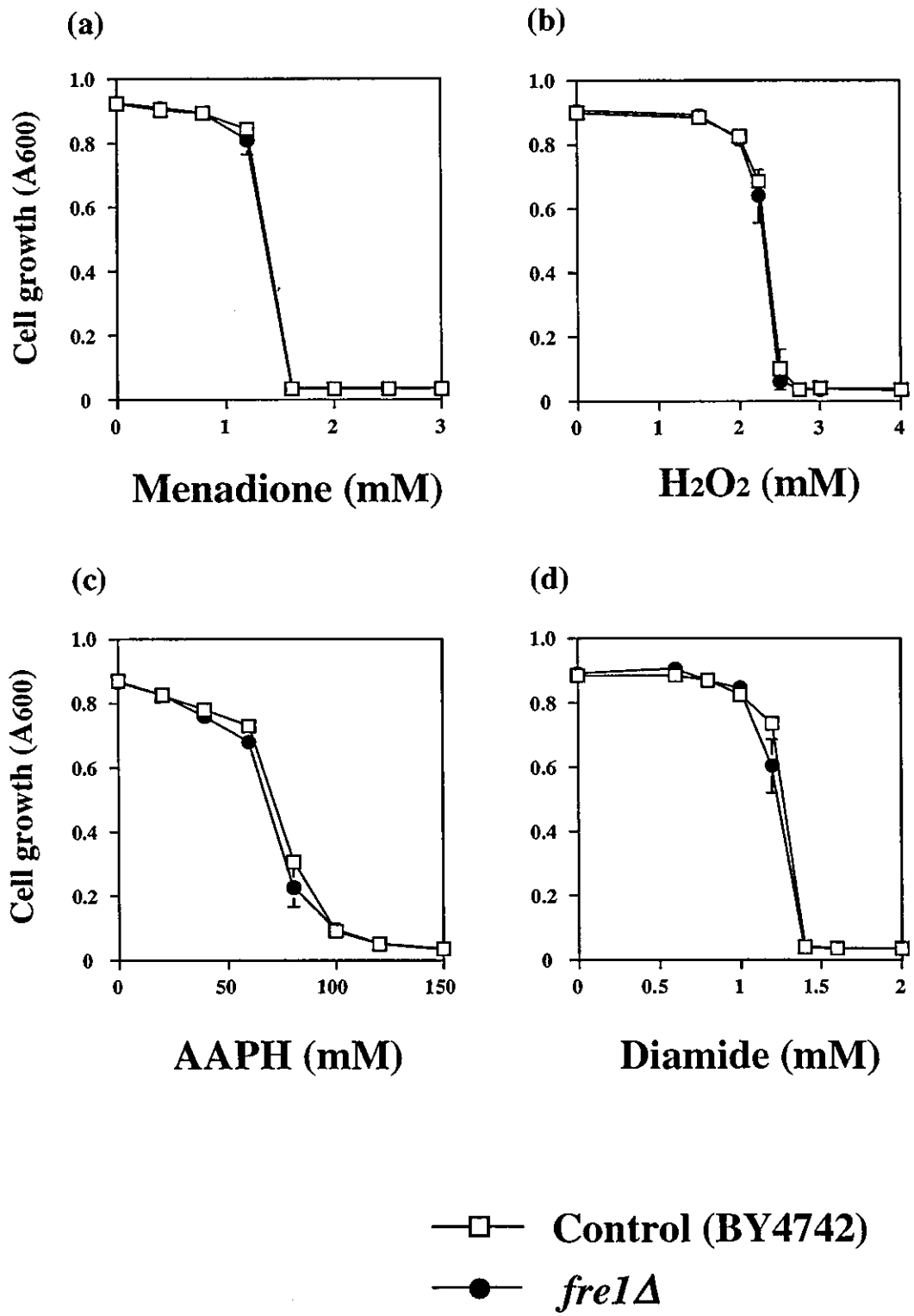


Fig. 4. Effect of deletion of Fre1 in yeast cells on sensitivity to various cytotoxic compounds

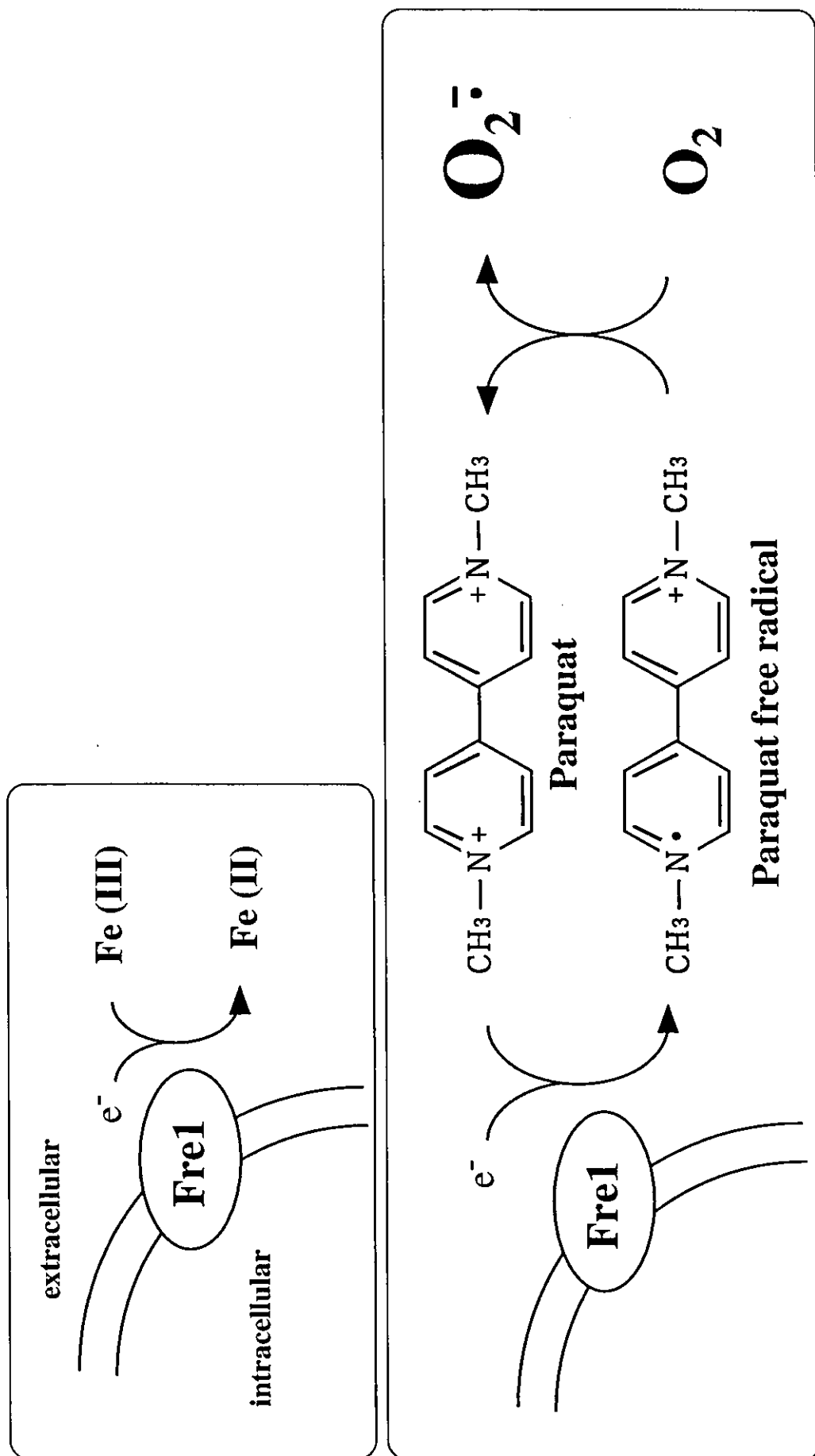


Fig. 5. Suggested mechanism of superoxide generation by Fre1

Fre1は鉄および銅を還元 (e⁻ を供与) する酵素で、パラコートにも e⁻ を供与しうる

Hassett, R. and Kosman, D. J. (1995)

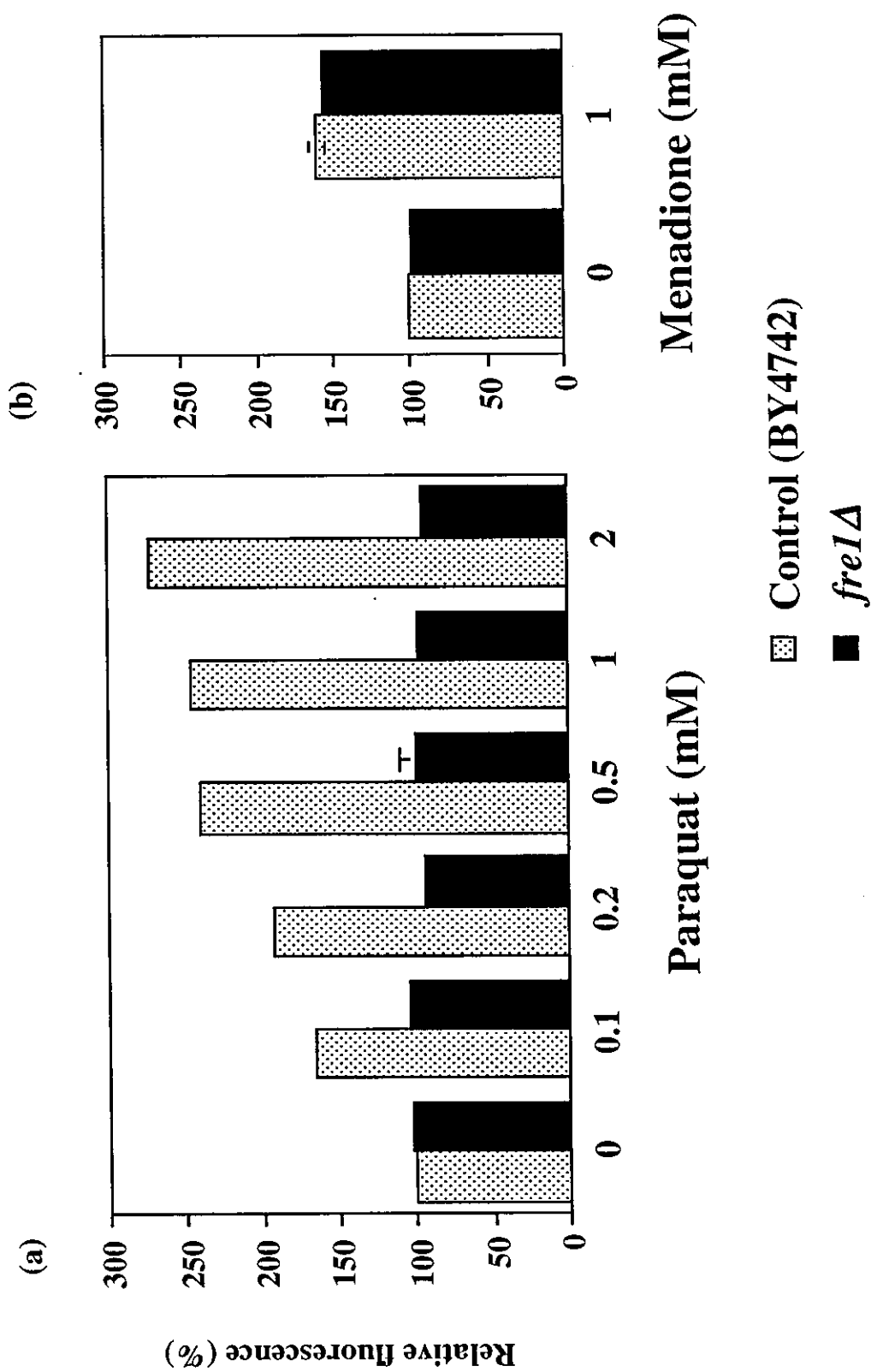


Fig. 6. Effect of deletion of Fre1 on extracellular ROS production in yeast cells treated with paraquat or menadione

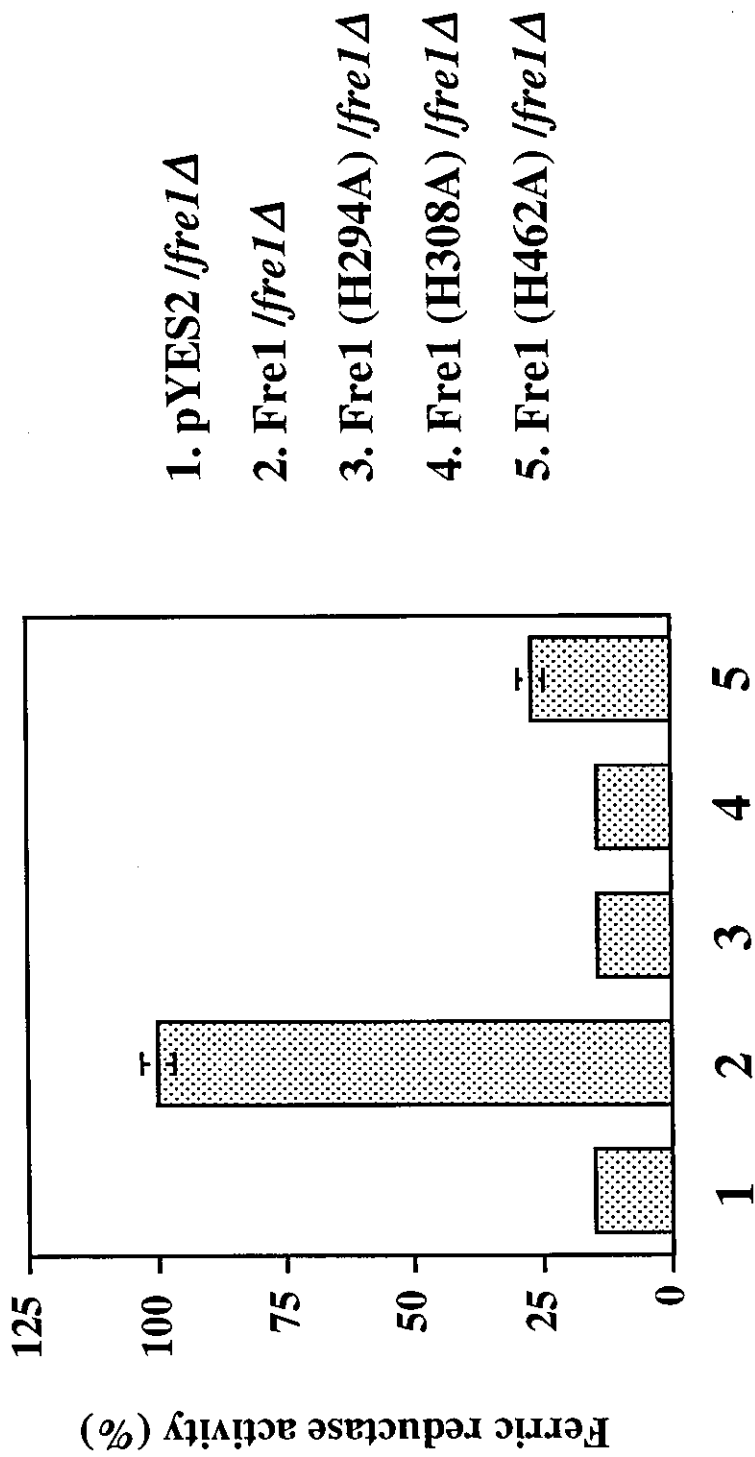


Fig. 8. Ferric reductase activity of yeast cells overexpressing Fre1 mutants



Fig. 9. Paraquat-dependent extracellular ROS production in yeast cells overexpressing *Fre1* mutants

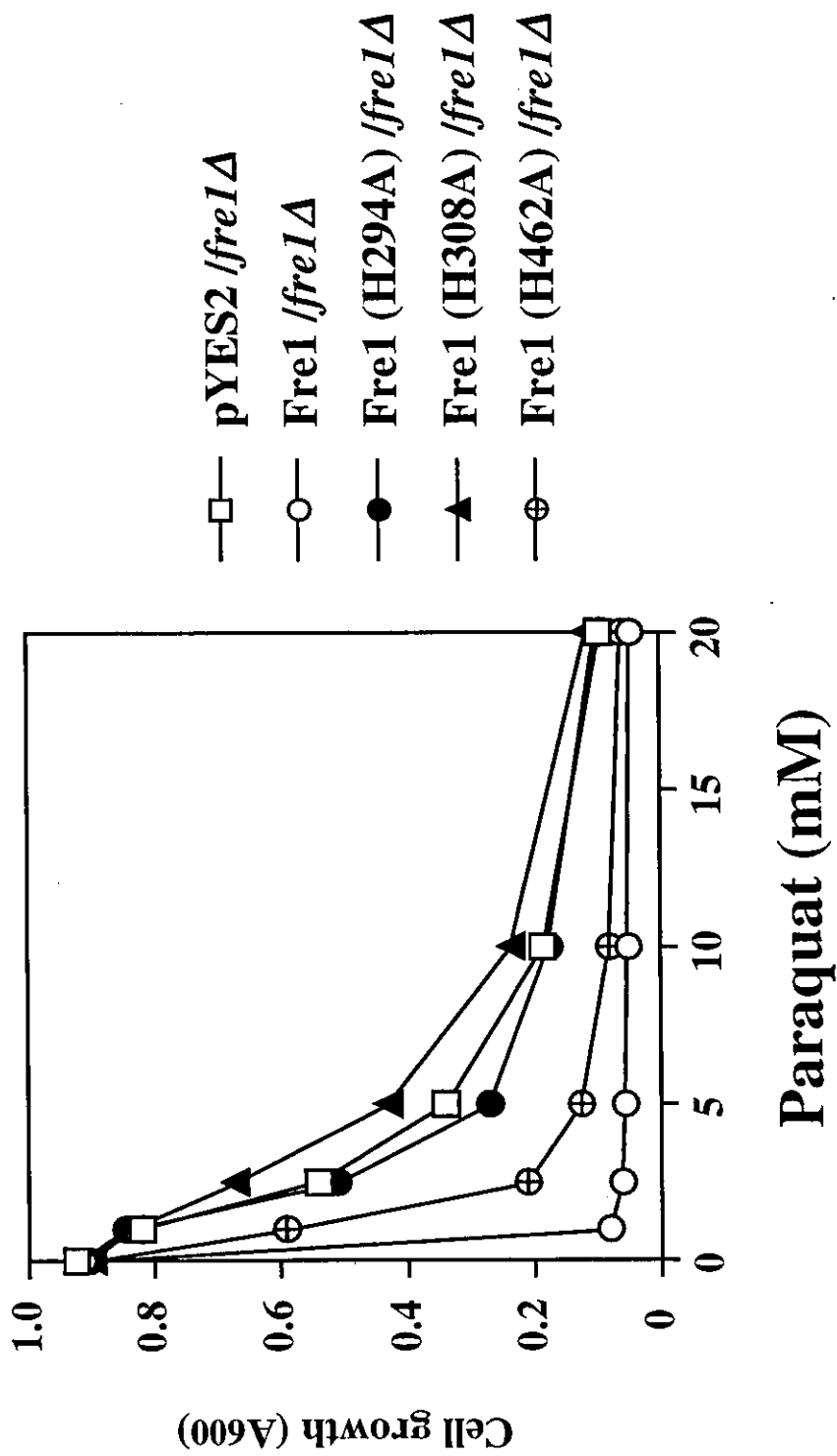


Fig. 10. Effect of overexpression of Fre1 mutants on sensitivity to paraquat

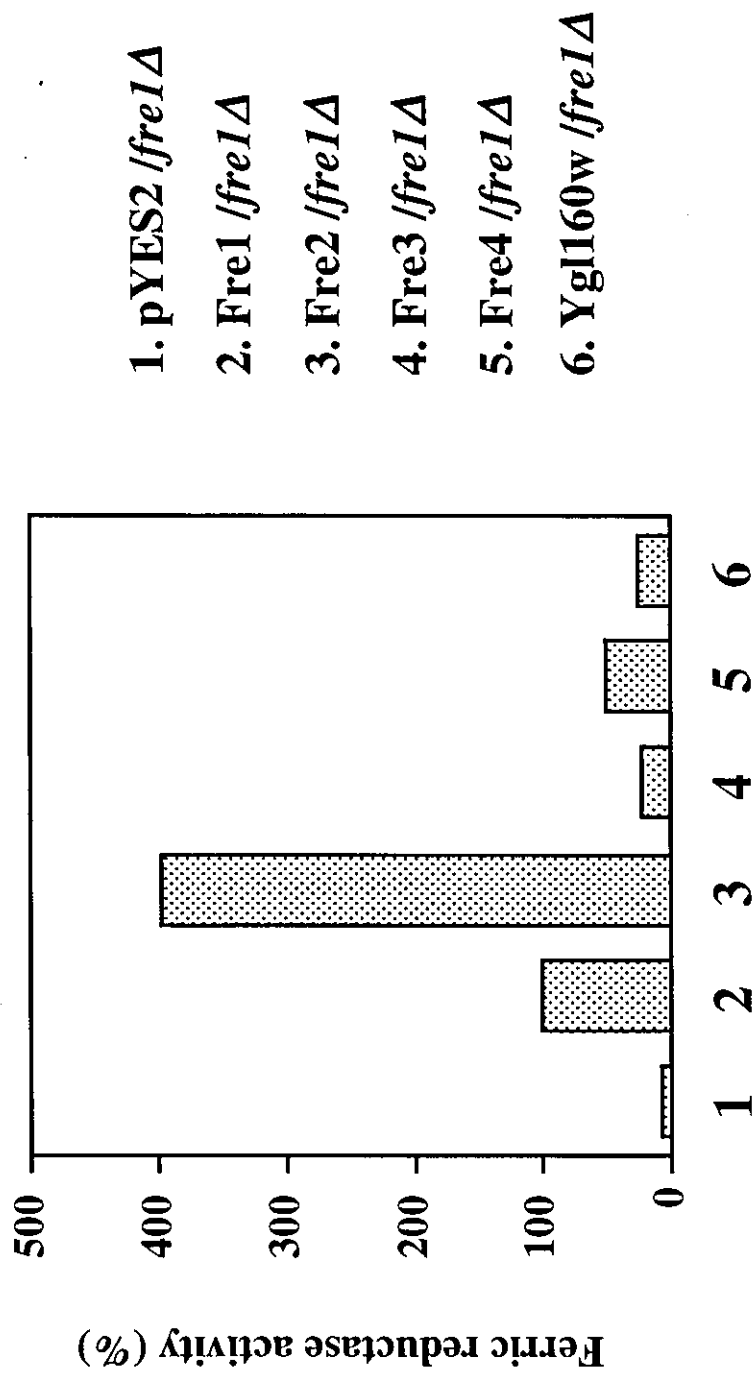


Fig. 11. Ferric reductase activity of yeast cells overexpressing Fre family

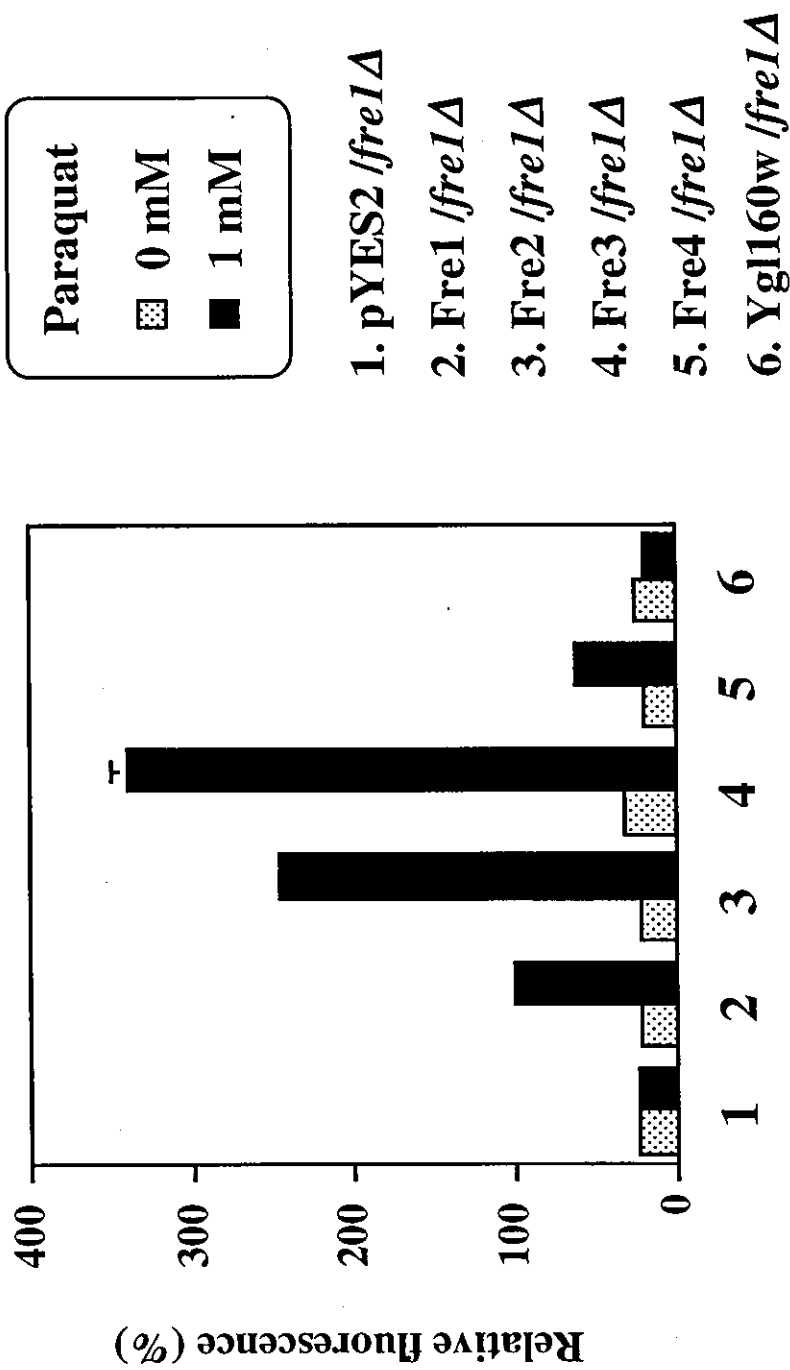


Fig. 12. Paraquat-dependent extracellular ROS production in yeast cells overexpressing Fre family

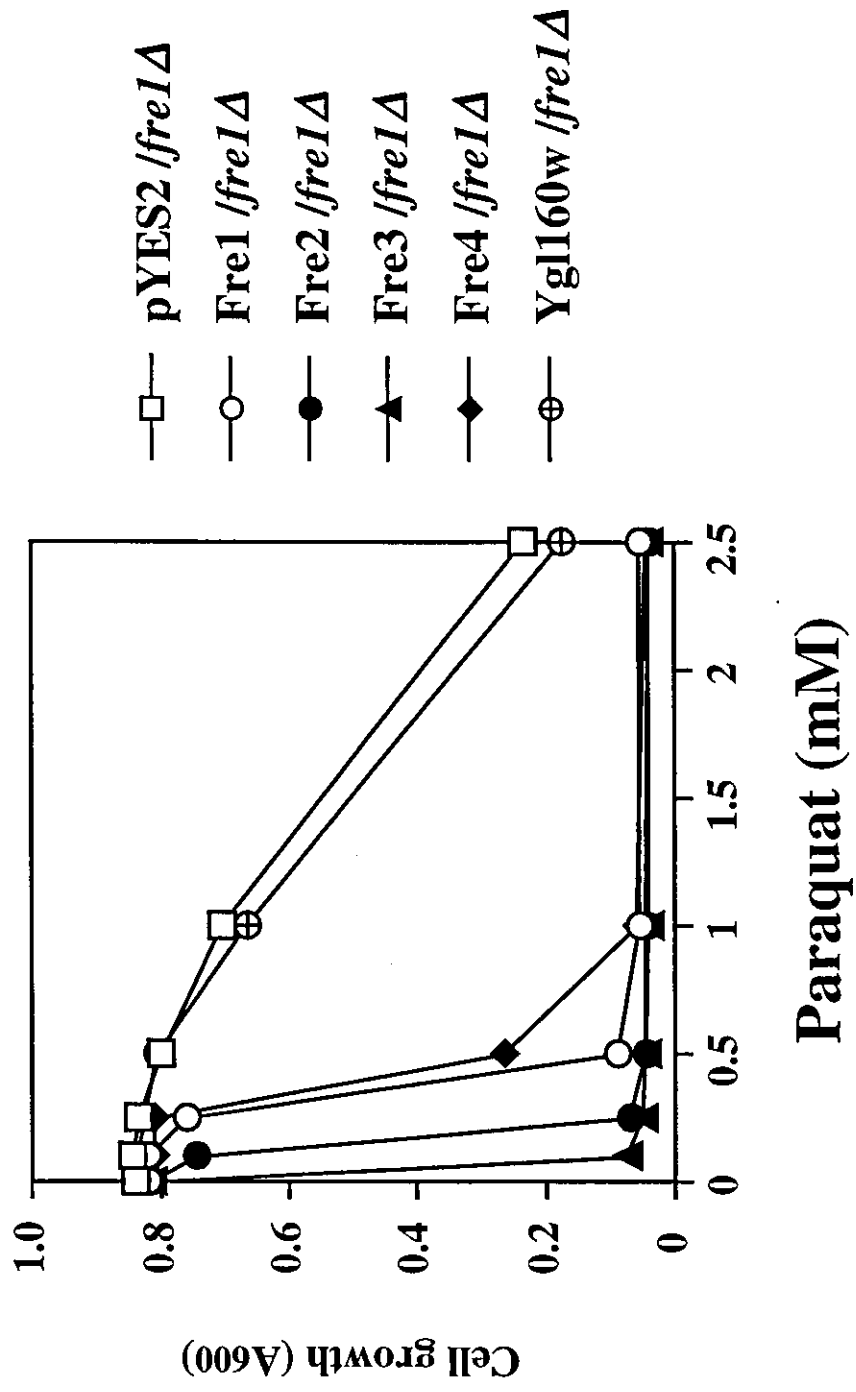


Fig. 13. Effect of overexpression of Fre family on sensitivity to paraquat

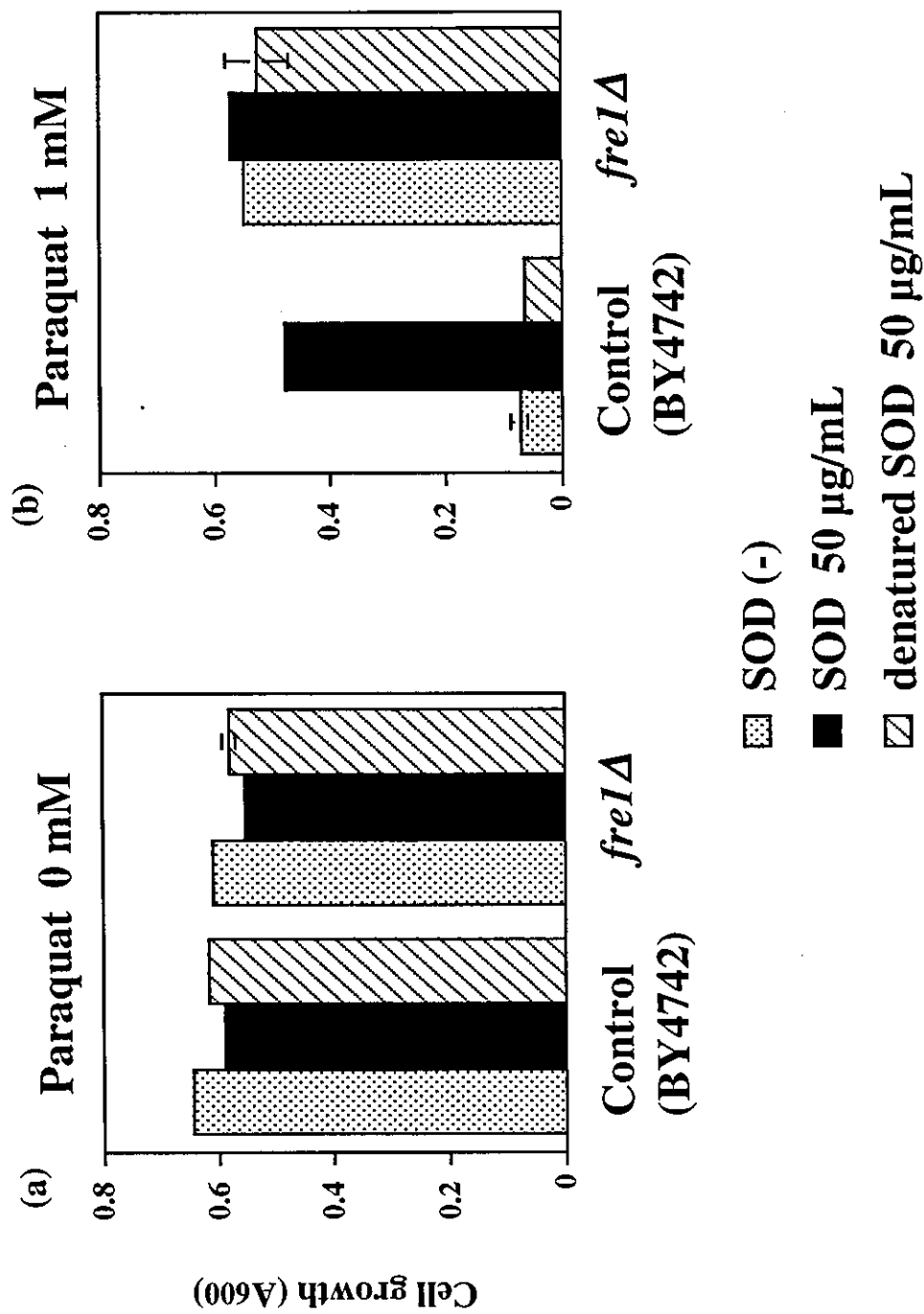


Fig. 14. Effect of SOD supplemented in media on sensitivity to paraquat

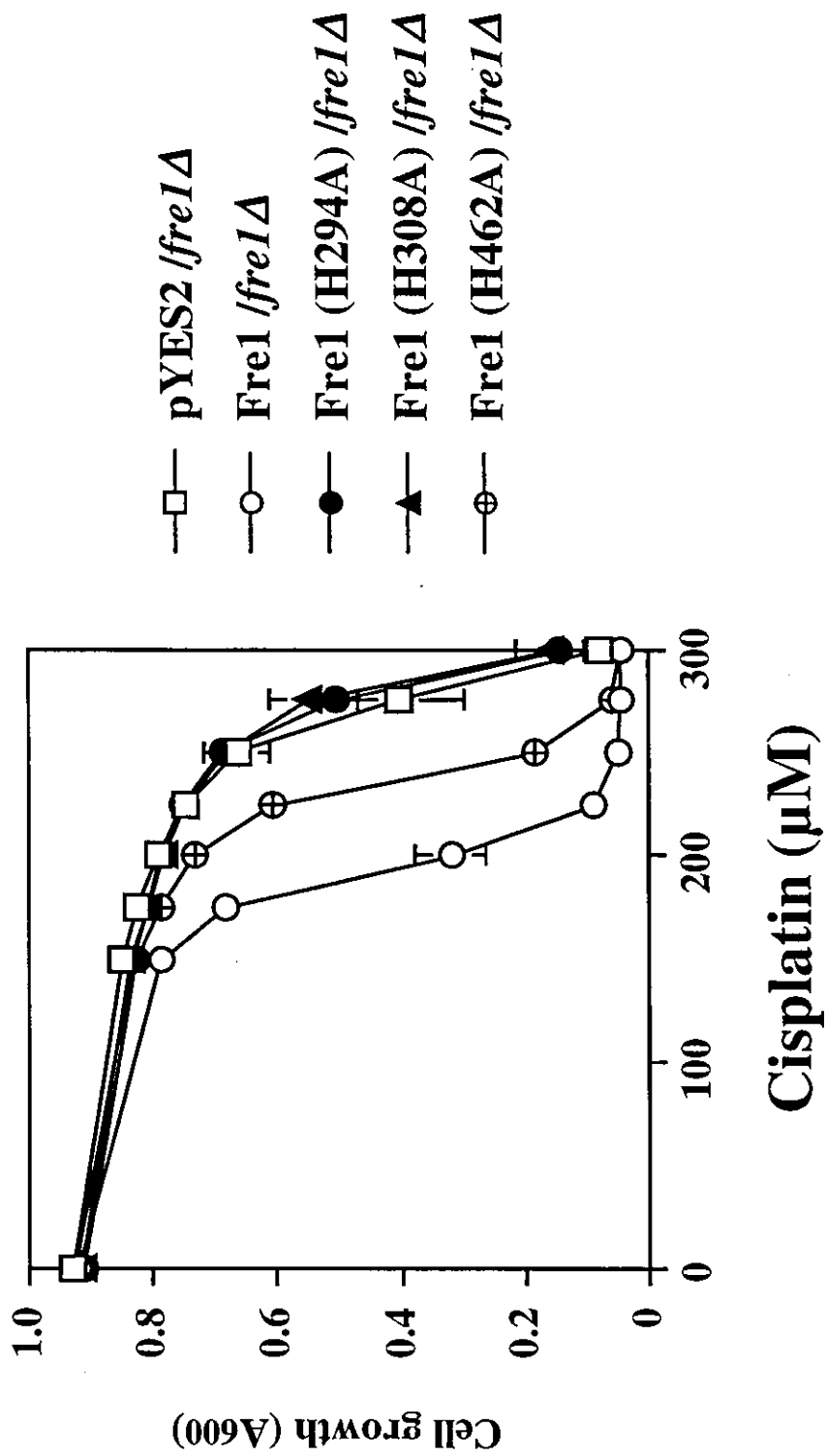


Fig. 15. Effect of overexpression of Fre1 mutants on sensitivity to cisplatin