

	BAIAP2	265.35	Brain-specific angiogenesis inhibitor 1-associated protein 2; interacts with many different proteins (such as BAI1, WASF1, CDC42, RAC1, and DRPLA), may be a substrate for INSR, involved in cytoskeletal organization and lamellipodia and filopodia formation
Unknown function or poorly characterized	BGLAP	210.57	Bone gamma-carboxyglutamate protein (osteocalcin), binds calcium and hydroxylapatite, likely involved in bone remodeling and in recruiting osteoclasts; decreased expression is associated with Saethre Chotzen syndrome
	H326	201.4	Protein containing seven WD domains (WD-40 repeats), which may mediate protein-protein interactions, has a region of low similarity to a region of breakpoint cluster region protein uterine leiomyoma 2 (human WDR22), which may have a housekeeping function
	ITGA10	204.82	Integrin alpha 10, a member of the beta 1 integrin family that associates with the beta 1 integrin (ITGB1) subunit and acts as a collagen receptor during cartilage development
	LLT1	215.85	C-type lectin superfamily 2 member D (lectin-like NK cell receptor), a lectin that regulates IFNG production by natural killer cells, inhibits osteoclastogenesis, and may mediate lymphocyte activation signals
	NR2F6	201.34	Nuclear receptor subfamily 2 group F member 6, a corepressor of transcription mediated by nuclear receptors THRβ, ESR1, and NR3C1, may modulate viral genes; downregulated expression correlates with breast carcinoma
	NSD1	227.16	Nuclear receptor-binding SET-domain protein 1, putative transcription factor; mutations are associated with Sotos syndrome and some cases of Weaver syndrome, gene is fused to NUP98 in some acute myeloid leukemia patients
	POLG	204.28	DNA polymerase gamma, the catalytic subunit of mitochondrial DNA polymerase, required for mitochondrial DNA replication and repair; variants of the gene are associated with progressive external ophthalmoplegia and male infertility
	SFRS11	239.21	Splicing factor arginine serine rich 11, a pre-mRNA splicing factor containing arginine-serine rich and RRM domains, involved in mRNA splicing, binds to the 65 kDa subunit of the U2 auxiliary splice factor
	UBL3	207.29	Ubiquitin-like 3, may be involved in response to environmental stress and interacts with Epstein-Barr virus (EBV) nuclear antigen 3C

Table 6. 長時間のメチル水銀処理により発現が上昇する遺伝子(発現変動順)

Gene name	% of control
VGf	310.64
APBA2	267.12
BAIAP2	265.35
ETV5	257.89
ADARB1	253.52
CTDP1	252.84
DNM2	250.98
DKK1	250.12
EGFR	250.10
STMN2	240.50
SFRS11	239.21
FZD1	238.04
TNFRSF6B	234.05
NSD1	227.16
ID4	224.23

Gene name	% of control
HUS1	223.62
CLN8	222.62
CDKN1A	221.69
WIG1	220.27
LLT1	215.85
NQO1	213.50
FLJ11116	213.35
BGLAP	210.57
UBL3	207.29
IL1A	206.85
ITGA10	204.82
POLG	204.28
DUSP9	202.00
ARSB	201.51
H326	201.40

Gene name	% of control
NR2F6	201.34

Table 7. 長時間のメチル水銀処理により発現が減少する遺伝子群 (機能による分類)

Functional group	Gene name	% of control	Function
G-protein	GPR48	43.29	G protein-coupled receptor 48, a predicted member of the G protein-coupled receptor subfamily that bind glycoprotein hormones, resembles other glycoproteins that have been implicated in some Wilms tumor deletion syndromes
	GPRK6	48.01	G protein-coupled receptor kinase 6, a protein kinase that regulates desensitization of G protein-coupled receptors by phosphorylating agonist-stimulated receptors, including muscarinic acetylcholine receptor
Metabolic pathway	C14orf1	43.12	Chromosome 14 opening reading frame 1, a putative integral membrane protein, may be involved in sterol biosynthesis
	C1orf13	45.18	N-acetylneuraminidase pyruvate lyase (dihydropicolinate synthase), a putative N-acetylneuraminidase, predicted to be involved in N-acetylneuraminidase metabolism, ubiquitously expressed
	FABP6	46.9	Fatty acid binding protein 6 (ileal bile acid-binding protein), member of the fatty acid binding protein family that preferentially binds bile acids, may play a role in bile acid transport and metabolism
	FPGT	38.02	Fucose-1-phosphate guanylyltransferase (GDP-beta-L-fucose pyrophosphorylase), catalyzes condensation of beta-L-fucose-1-phosphate and GTP into GDP-L-fucose
	GALNS	45.33	Galactosamine (N-acetyl)-6-sulfate sulfatase, a lysosomal enzyme involved in the degradation of glycosaminoglycans; gene mutations that decrease activity cause mucopolysaccharidosis type IV A or its most severe form, Morquio disease type A
	HIBCH	49.44	Beta-hydroxyisobutyryl-coenzyme A hydrolase, enzyme that hydrolyzes 3-hydroxyisobutyryl CoA, an intermediate of valine catabolism
	NAGK	49.81	Human NAGK N-acetylglucosamine kinase, an enzyme that phosphorylates N-acetylglucosamine and N-acetylmannosamine and promotes their entry into metabolic pathway
Neurological disorder	SIAT9	46.75	Sialyltransferase 9 (GM3 synthase), catalyzes the addition of sialic acid to lactosylceramide forming ganglioside GM3, expressed in the brain, skeletal muscle and testis, decreased activity is associated with metastasis of melanoma and bladder cancer
	CSPG5	44.64	Human CSPG5 Neuroglycan C, putative integral membrane proteoglycan, the corresponding gene is located in the chromosome region where the Sotos syndrome has been mapped

Neurological disorder	PPP1CB	39.06	Protein phosphatase 1 catalytic subunit beta, catalytic subunit of a serine-threonine phosphatase, function in metabolic processes is modulated by regulatory subunits; differentially expressed in gastric cancer and neurons of Alzheimer Disease patients
	TMEFF1	41.76	Transmembrane protein with EGF-like and two follistatin-like domains 1, inhibits cell growth and proliferation, may play a role in growth factor signaling and serve as a tumor suppressor in brain cancers
	ZNF133	40.11	Zinc finger protein 133, contains C2H2 zinc fingers and a Kruppel-associated box, may mediate transcriptional repression, amplified in neuroblastoma cells
Signal transduction	ANKRA2	48.38	Protein with strong similarity to ankyrin repeat family A (RF-XANK-like) 2 (mouse Ankra2), which binds to a proline-rich motif on megalin (mouse Lrp2) and may regulate endocytosis or signal transduction, contains three ankyrin repeats #1
	CART	49.35	Cocaine and amphetamine regulated transcript, a putative neuroendocrine signaling molecule, may have appetite suppressive activity, induces expression of c Fos (FOS) in hypothalamus
	PRKACA	39.18	Protein kinase cAMP-dependent catalytic alpha, acts in transcriptional regulation, may suppress apoptosis, alternative form Calpha2 may act in sperm development, may serve as a tumor biomarker; reduced activity of mouse Prkaca causes neural tube defects
	BTRC	41.34	Beta-transducin repeat containing, receptor subunit of the IkappaB-ubiquitin ligase complex, mediates proteolysis of CD4 and IkappaBalpha (NFKBIA), enhances stress-induced activation of NF-kB, interaction with HIV-1 Vpu inhibits NF-kB activation
Stress response	GLRX	37.76	Glutaredoxin, a disulfide oxidoreductase, binds and inhibits ASK1, functions in apoptosis, cell differentiation, response to oxidative stress, and signal transduction, may act in embryo implantation, may provide antioxidant protection in coronary arteries
	GSTM4	49	Glutathione S-transferase M4, member of the mu class of the GST superfamily of detoxification enzymes that catalyzes the conjugation of glutathione to electrophilic compounds, may be involved in acquired drug resistance in tumors
	SMT3H2	47.24	SMT3 suppressor of mif two 3 homolog 2, member of the sentrin family of ubiquitin-like proteins, conjugated to target proteins involved in nuclear transport by sentrin-specific enzymes, may be involved in the stress response

Tumor progression	CPO	49.39	Protein containing a zinc carboxypeptidase domain, has moderate similarity to carboxypeptidase B2 (plasma) (mouse Cpb2), which is an acute phase protein that is upregulated in inflammation and inhibits
Tumor progression	MAD2L1	43.67	MAD2 mitotic arrest deficient-like 1 (yeast), mitotic spindle checkpoint complex component with BUB1B, BUB3, and CDC20, inhibits anaphase-promoting complex activation, binds MAD1L1, altered expression is linked to several cancers and adult T-cell leukemia
	MCAM	42.57	Melanoma cell adhesion molecule, adhesion molecule and tumor antigen that may act in cytoskeletal rearrangement, embryo implantation, angiogenesis and inflammation, aberrant expression is linked to tumor progression, metastasis and neovascularization
	TPM1	39.36	Tropomyosin 1 alpha (skeletal muscle alpha-tropomyosin), involved in muscle filament motility and muscle contraction, downregulated in prostate and breast carcinoma; mutations cause hypertrophic
Unknown function or poorly characterized	AGPAT2	48.83	1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 2 (lysophosphatidic acid acyltransferase, beta)
	AXOT	49.61	Protein with strong similarity to membrane-associated ring finger 7 (axotrophin, mouse March7), which negatively regulates T cell proliferation via feedback regulation of leukemia inhibitory factor (mouse Lif), contains a C3HC4 type (RING) zinc finger
	D4S234E	49.4	Neuron-specific protein, expressed predominantly in the brain, located in the nucleus during mitosis and in the cytoplasm post mitotically
	ELAVL2	43.15	ELAV-like 2 (Hu antigen B), a 3' UTR mRNA-binding protein that promotes mRNA stability, may function in neurogenesis and the regulation of cell growth, autoantibodies are associated with paraneoplastic encephalomyelitis and sensory neuropathy
	EZH1	48	Enhancer of zeste homolog 1 (Drosophila), a member of the E(z) family of proteins, interacts with the Polycomb-group related protein (EED), may be involved in chromatin silencing
	GAS2	49.62	Growth arrest-specific 2, has very strong similarity to murine Gas2 which is a microfilament-associated protein that is proteolytically cleaved during apoptosis and that may induce actin cytoskeleton reorganization following phosphorylation
	KCNS3	46.1	Potassium voltage-gated channel delayed-rectifier subfamily S member 3, electrically silent, modulates biophysical activity of potassium channel KV2.1 (KCNB1); rat Kcns3 may play a role in pulmonary artery
	MAGOH	48.98	Protein with very strong similarity to mago-nashi homolog (human MAGOH), which may play a role in RNA localization and germ cell development, contains a mago nashi protein domain

Unknown function or poorly characterized	MLF1	31.06	Myelodysplasia/myeloid leukemia factor 1, a cytoplasmic protein; gene fusion with NPM (NPM1) in acute myeloid leukemia results in misdirection of the fusion protein to the nucleus
	NUCB2	47.59	Nucleobindin 2, a calcium binding protein with two EF-hand calcium-binding domains and a leucine-zipper motif; expression is decreased in gastric tumors
	PGRMC2	35.24	Progesterone receptor membrane component 2, putative transmembrane steroid hormone receptor, preferentially expressed in
	PTPN13	44.78	PTPN13-like Y-linked (testis-specific PTP-BL-related protein on Y chromosome), may play a role in spermatogenesis; maps to the nonrecombining region of the Y chromosome, and deletions in this region are associated with male infertility
	ROD1	44.5	ROD1 regulator of differentiation 1, a putative RNA binding protein that inhibits differentiation of leukemia cells when overexpressed
	SEC24D	34.02	SEC24 related gene family member D, binds dynactin 1 (DCTN1), may play a role in vesicle biogenesis and related trafficking events
	SELT	43.68	Protein of unknown function, has very strong similarity to uncharacterized mouse 2810407C02Rik
	SSBP2	36.89	Single-stranded DNA binding protein 2, a member of the single-stranded DNA binding protein (SSBP) family, may bind single-stranded DNA; expressed in all tissues examined, gene undergoes partial deletion in acute myeloid leukemia cells
	TM6SF1	40.25	Transmembrane 6 superfamily 1, member of superfamily of transmembrane 6 proteins; mRNA expression is observed in testis, spleen, and peripheral blood leukocytes

Table 8. 長時間のメチル水銀処理により発現が減少する遺伝子 (発現変動順)

Gene name	% of control
MLF1	31.06
SEC24D	34.02
PGRMC2	35.24
SSBP2	36.89
GLRX	37.76
FPGT	38.02
PPP1CB	39.06
PRKACA	39.18
TPM1	39.36
ZNF133	40.11
TM6SF1	40.25
BTRC	41.34
TMEFF1	41.76
MCAM	42.57
C14orf1	43.12

Gene name	% of control
ELAVL2	43.15
GPR48	43.29
MAD2L1	43.67
SELT	43.68
ROD1	44.50
CSPG5	44.64
PTPN13	44.78
C1orf13	45.18
GALNS	45.33
KCNS3	46.10
SIAT9	46.75
FABP6	46.90
SMT3H2	47.24
NUCB2	47.59
EZH1	48.00

Gene name	% of control
GPRK6	48.01
ANKRA2	48.38
AGPAT2	48.83
MAGOH	48.98
GSTM4	49.00
CART	49.35
CPO	49.39
D4S234E	49.40
HIBCH	49.44
AXOT	49.61
GAS2	49.62
NAGK	49.81

Table 9. 短・長時間のメチル水銀処理によって発現が同じく変動する遺伝子

Gene name	6時間のメチル水銀処理時 % of control	24時間のメチル水銀処理時 % of control
ETV5	2259.97	257.89
ID4	655.97	224.23
DKK1	284.06	250.12
FZD1	377.95	238.04
NQO1	471.19	213.50
BAIAP2	449.90	265.35
SFRS11	435.60	239.21
CDKN1A	391.33	221.69
MLF1	49.51	31.06
EZH1	34.59	48.00
CPO	41.72	49.39

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

酵母を用いた化学物質感受性の個人差決定に関わる遺伝子の検索方法の樹立と
その応用

分担研究者 久下周佐 東北大学大学院薬学研究科助教授

（協力研究者 高橋 勉 日本食品衛生協会リサーチレジデント）

化学物質に対する感受性の個人差の原因となる遺伝的要因を解明することを目的として、化学物質感受性の決定に関与する遺伝子検索法の樹立を試みた。その結果、ヒトと同じ真核生物で遺伝学的解析が容易な出芽酵母の遺伝子欠損ライブラリーを用いて、欠損によって細胞の化学物質に対する感受性を高める遺伝子と低下させる遺伝子を同時に検索する方法を樹立することに成功した。この検索方法に関する検討では特に強い細胞毒性を示すアドリアマイシンをモデル化合物として検討し、欠損によって酵母にアドリアマイシン耐性を与える遺伝子を 152 種、高感受性を与える遺伝子を 254 種同定した。欠損によりアドリアマイシン耐性を示す遺伝子の中には、エンドサイトーシスに関わる因子をコードする遺伝子が多数存在したことから、さらにエンドサイトーシス経路とアドリアマイシン毒性について詳細に検討を行った。同定されたエンドサイトーシス関連遺伝子群は全てが *internalization step* に関わるものであったが、*post-internalization step* に関わる遺伝子はアドリアマイシン毒性に関与しないこと、さらに、アドリアマイシンの細胞内への取込みにエンドサイトーシス関連因子群が関与しないことを明らかにした。本検索法で同定された遺伝子（エンドサイトーシス関連因子を含む）のほとんどは初めてアドリアマイシン毒性に関わるものが判明したものであることから、この方法は化学物質の感受性遺伝子検索研究に大きな発展をもたらすものと期待される。

A. 研究目的

化学物質感受性の個体差に関わる遺伝子の検索・同定を目的とした研究の中には、実質的な成果をもたらした例

はほとんどない。その理由のひとつに、これまで提唱されてきた網羅的検索法の信頼性が非常に低いことを挙げることができる。そこで、この技術的

影響を与える遺伝子の効率的かつ信頼度の高い検索法の開発に取り組んだ。本研究では特に、欠損によって細胞の化学物質に対する感受性を高める遺伝子と低下させる遺伝子の両方を同時に精度良く検索する方法を樹立することを目指した。なお、検討用の化学物質としては、強い細胞毒性を示すことが知られているアドリアマイシンを選択した。アドリアマイシンは環境化学物質ではないが、より細胞毒性の強い物質を対象とした方が、検索方法の検討には適していると判断したからである。

B. 研究方法

1. 酵母のアドリアマイシンに対する感受性

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 3×10^4 cells / 180 μ l になるように希釈した。アドリアマイシン (最終濃度 0、5、10、20、30、40、50、60、80 μ M) を 96-well plate に 20 μ l 添加後、この希釈培養液を 96-well plate に 180 μ L 添加し、30°C で 48 時間培養後、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. 出芽酵母におけるアドリアマイシン感受性に影響を与える遺伝子群の検索

当研究室で 96-well plate に保存してある出芽酵母 BY4742 株の遺伝子欠損酵母ライブラリー (Eurocarf) 5 μ l を、115 μ l の YPAD 培地の入った 96-well plate に移し、30°C で 48 時間培養した。アドリアマイシン (最終濃度 40 μ M) 20 μ l と SD (all+) 培地 175 μ l を加えた 96-well plate に 40 倍希釈した酵母培養液 5 μ L を加え、それを 30°C で培養した。24 時間培養後に増殖可能な酵母をアドリアマイシン耐性株候補として選び、48 時間培養しても増殖することのできない酵母をアドリアマイシン感受性株候補として選んだ。そして、そのアドリアマイシン耐性株候補、またはアドリアマイシン感受性株候補について、アドリアマイシンに対する毒性試験を行い、アドリアマイシンに影響を与える遺伝子を同定した。

3. アドリアマイシンの細胞内蓄積量の測定

対数増殖期にある酵母 1×10^7 cells を 1 ml の SD (all+) 培地に懸濁した後、アドリアマイシンを添加し 30°C で 1 時間培養した。その後、集菌し、1 mg/ml bovine serum albumin (BSA) を含む phosphate-buffered saline (PBS) で 2 回洗浄、PBS で 2 回洗浄した後に、

含む phosphate-buffered saline (PBS) で 2 回洗浄、PBS で 2 回洗浄した後に、PBS に再懸濁した。この懸濁液に適量のガラスビーズを加えて、10 分間混和した後に、20,400 x g、10 分間遠心して細胞抽出液とした。この細胞抽出液の蛍光を蛍光 plate reader (Spectra Max Gemini XS、Molecular devices)(励起波長；472 nm, 吸収波長；590 nm) を用いて測定した。

(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. アドリアマイシン感受性に影響を与える遺伝子群の網羅的検索

アドリアマイシンに対する感受性の決定に関与する遺伝子群の同定を試みた。出芽酵母は約 6000 の遺伝子を持つが、そのうち生存に必須な遺伝子を除く約 5000 種の遺伝子をそれぞれ欠損させた酵母を 1 株ずつアドリアマイシン (40 μ M) 存在下で培養し、欠損によって酵母にアドリアマイシン耐性を与える遺伝子 105 種 (Fig. 1-1 ~ Fig. 1-5)、高感受性を与える遺伝子 254 種 (Fig. 2-1 ~ Fig. 2-12) をそれぞれ同定することに成功した。欠損により酵母にアドリアマイシン耐性を与え

る遺伝子の産物には、エンドサイトーシスやユビキチンプロテアソーム経路に関わる蛋白質が多数含まれていた (Table 1) が、これらの蛋白質とアドリアマイシン耐性との関係についての報告はされていない。また、欠損により酵母のアドリアマイシン感受性を増強させる蛋白質として、これまでに報告のある DNA 修復や電子伝達系に関わる機構以外にも、細胞内情報伝達系に関わる因子やリボソーム蛋白質などが同定された (Table 2)。今回の検索結果は、これまで予想されなかった多くの細胞内因子がアドリアマイシン毒性に関与していることを示しており、アドリアマイシン毒性発現機構の全容解明に有用な知見を与えるものと考えられる。

2. アドリアマイシン耐性獲得機構におけるエンドサイトーシス経路の役割

Table 2 に示したように、欠損によって酵母にアドリアマイシン耐性を与える細胞内因子としてエンドサイトーシス経路に関わる因子が 11 種同定されたが、これまでにこれらの因子とアドリアマイシン耐性の関係について検討した報告はない。これらの因子はすべてエンドサイトーシス経路中の internalization step に関わっている。そこで、エンドサイトーシス経路

ス経路中の post-internalization step に関わる因子群 (Vps23, Vps27, Pep12, Snc1 および Tlg2) をそれぞれ欠損させた酵母のアドリアマイシン感受性を検討したところ、野生型の酵母とほぼ同程度のアドリアマイシン感受性を示した (Fig. 3)。したがって、エンドサイトーシス経路の internalization step の抑制は酵母にアドリアマイシン耐性を与えるが、post-internalization step の抑制はアドリアマイシン耐性獲得にほとんど関与していないと考えられる。

エンドサイトーシスは様々な物質の細胞内への取込みに関与することからエンドサイトーシスの低下によってアドリアマイシンの細胞内への取込みが減少する可能性が考えられる。また、エンドサイトーシスの低下が、アドリアマイシンの排出に関わるトランスポーターである Pdr5 の安定性を増大させるとの報告がある。そこで、エンドサイトーシスの internalization step に関与する因子 (End3 および Sla1) の欠損がアドリアマイシンの細胞内蓄積量に及ぼす影響について検討した。酵母細胞内のアドリアマイシン蓄積量は、アドリアマイシン存在下 1 時間培養した酵母の細胞抽出液中のアドリアマイシンの蛍光を測定した。その結果、野生型酵母と End3 および Sla1 の各欠損酵母のアドリアマイシ

ン蓄積量に有意な差は認められなかった (Fig. 4)。以上の結果から、エンドサイトーシス経路の internalization step の抑制はアドリアマイシン蓄積量に影響を及ぼすことなく、酵母にアドリアマイシン耐性を与えると考えられる。

本研究で構築したスクリーニング方法を用いれば、様々な環境化学物質に対する感受性に影響を与える細胞内因子の検索が可能であり、感受性の個人差決定機構の解明研究に大きな発展をもたらすものと期待される。

D. 研究発表

1. 論文発表

なし。

2. 学会発表

高橋 勉、廣瀬健一郎、永沼 章：アドリアマイシン感受性の決定に関与する細胞内蛋白質の出芽酵母を用いた検索. 第 32 回日本トキシコロジー学会学術年会, 2005.

高橋 勉、永沼 章：酵母におけるアドリアマイシン耐性に関わるエンドサイトーシス機構の役割. 第 64 回日本癌学会学術総会, 2005.

廣瀬健一郎、高橋 勉、永沼 章：ア

ドリアマイシン感受性に影響を与える
遺伝子群の検索. 第 78 回日本生化学
大会, 2005.

E. 知的財産権の出願・登録状況
なし。

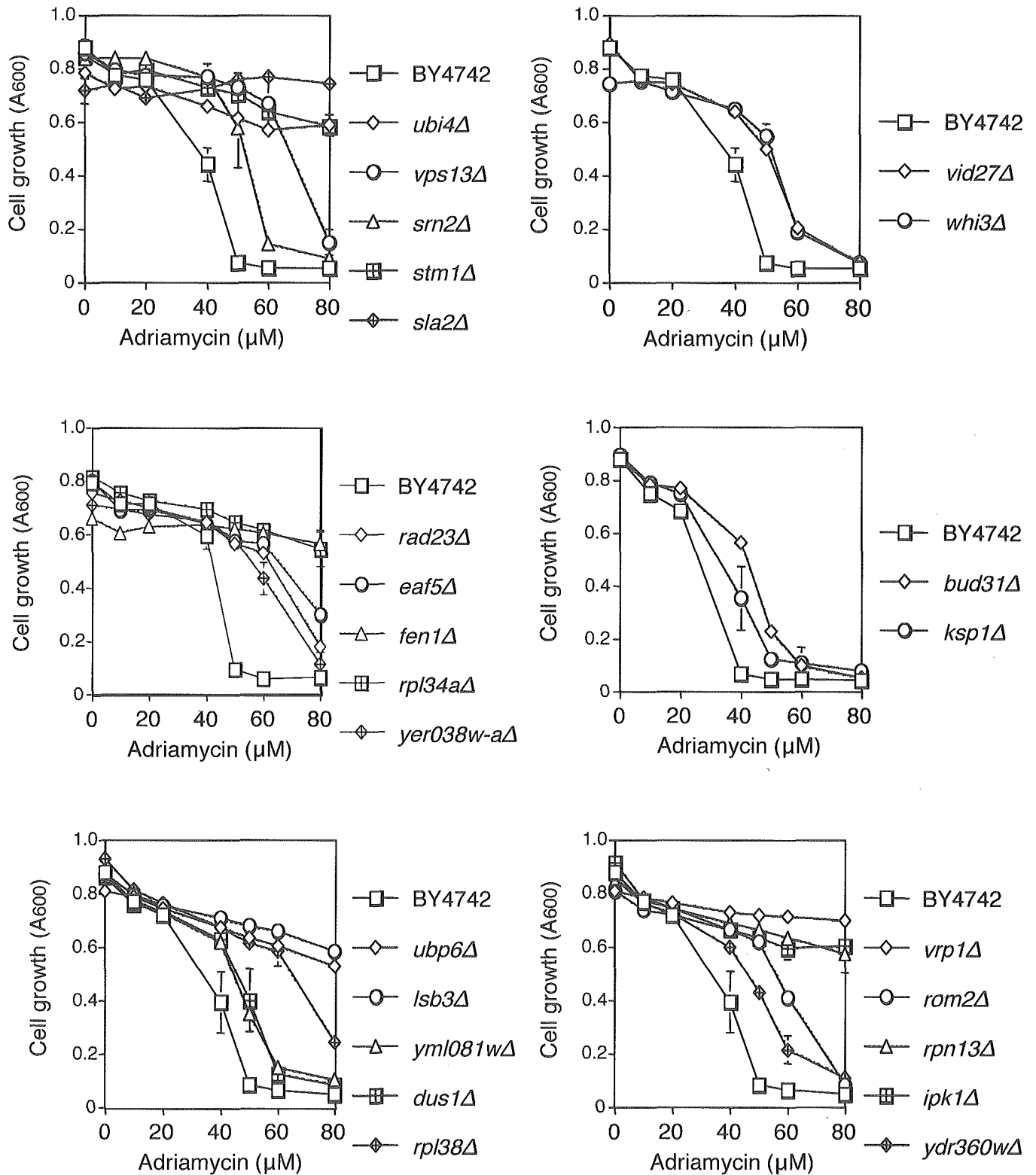


Fig. 1-1 欠損により酵母にアドリアマイシン耐性を与える遺伝子

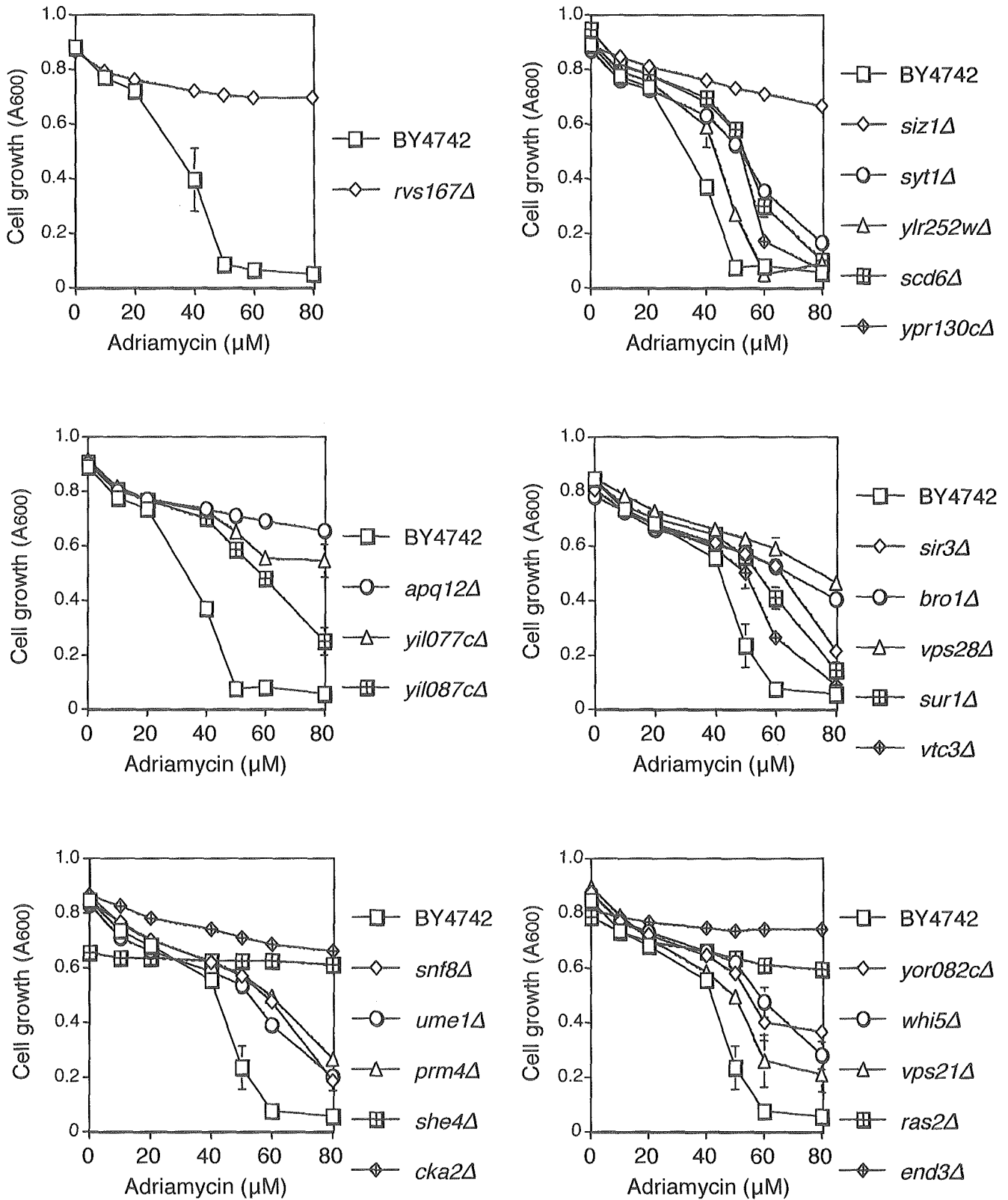


Fig. 1-2 欠損により酵母にアドリアマイシン耐性を与える遺伝子

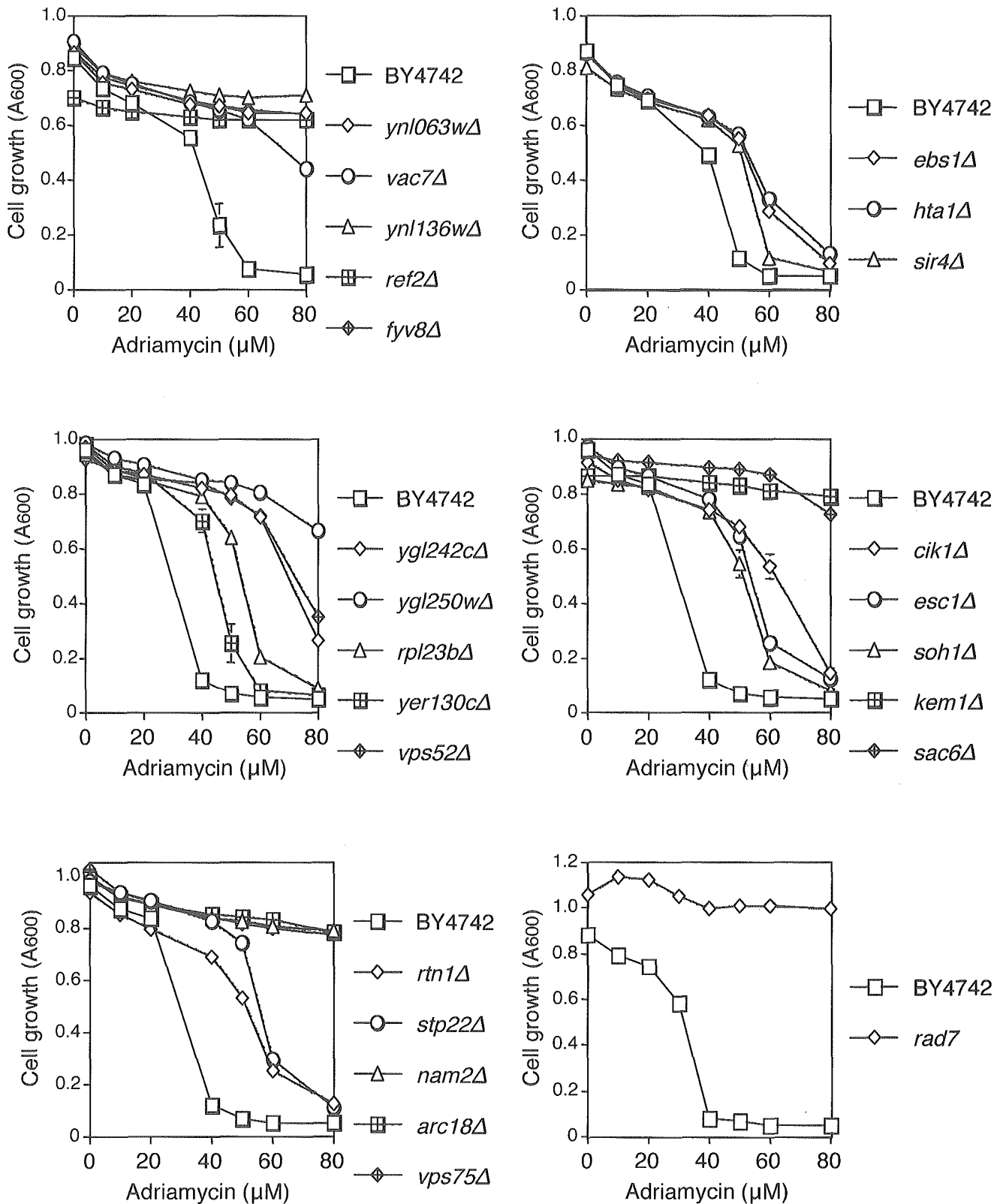


Fig. 1-3 欠損により酵母にアドリアマイシン耐性を与える遺伝子

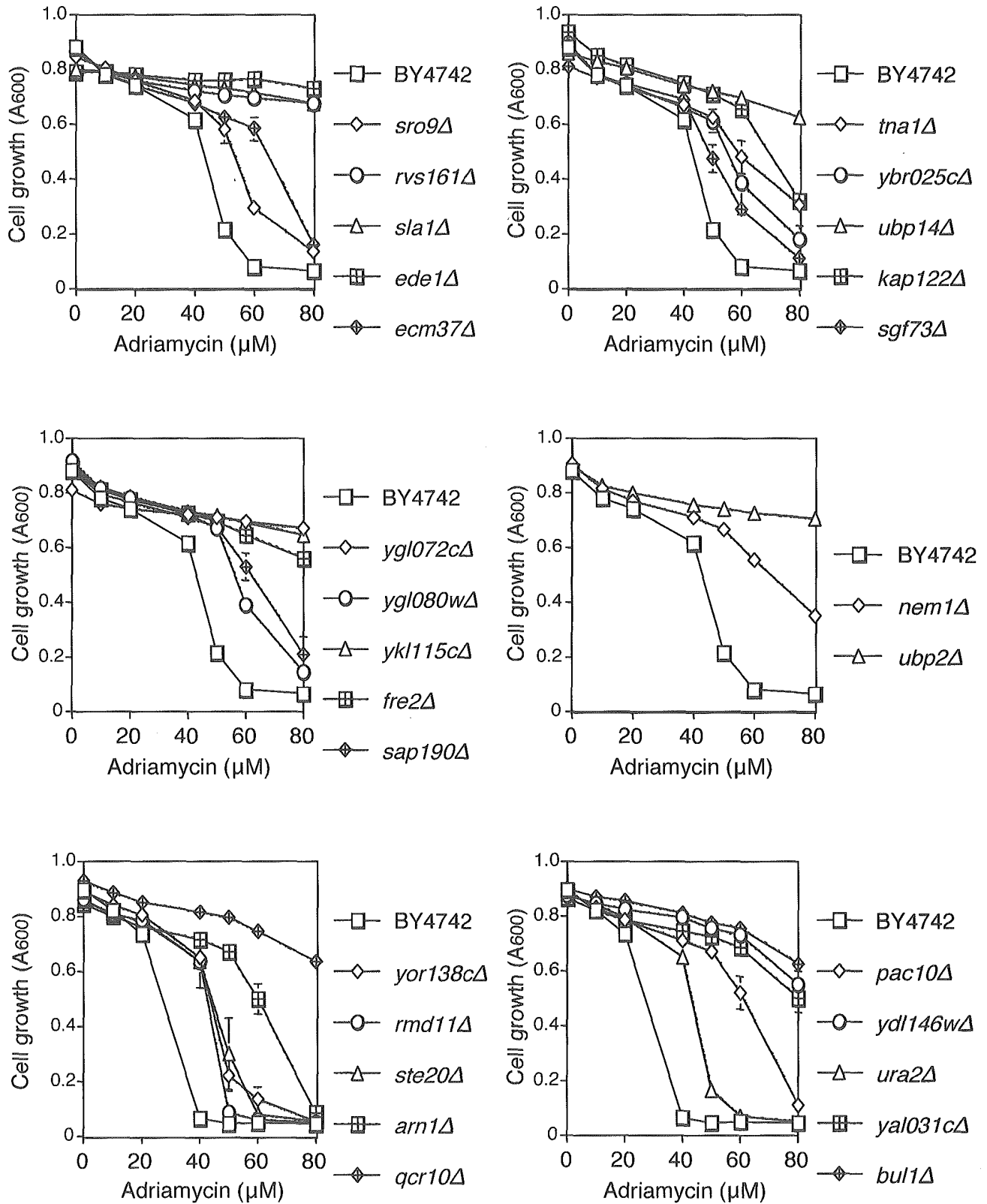


Fig. 1-4 欠損により酵母にアドリアマイシン耐性を与える遺伝子

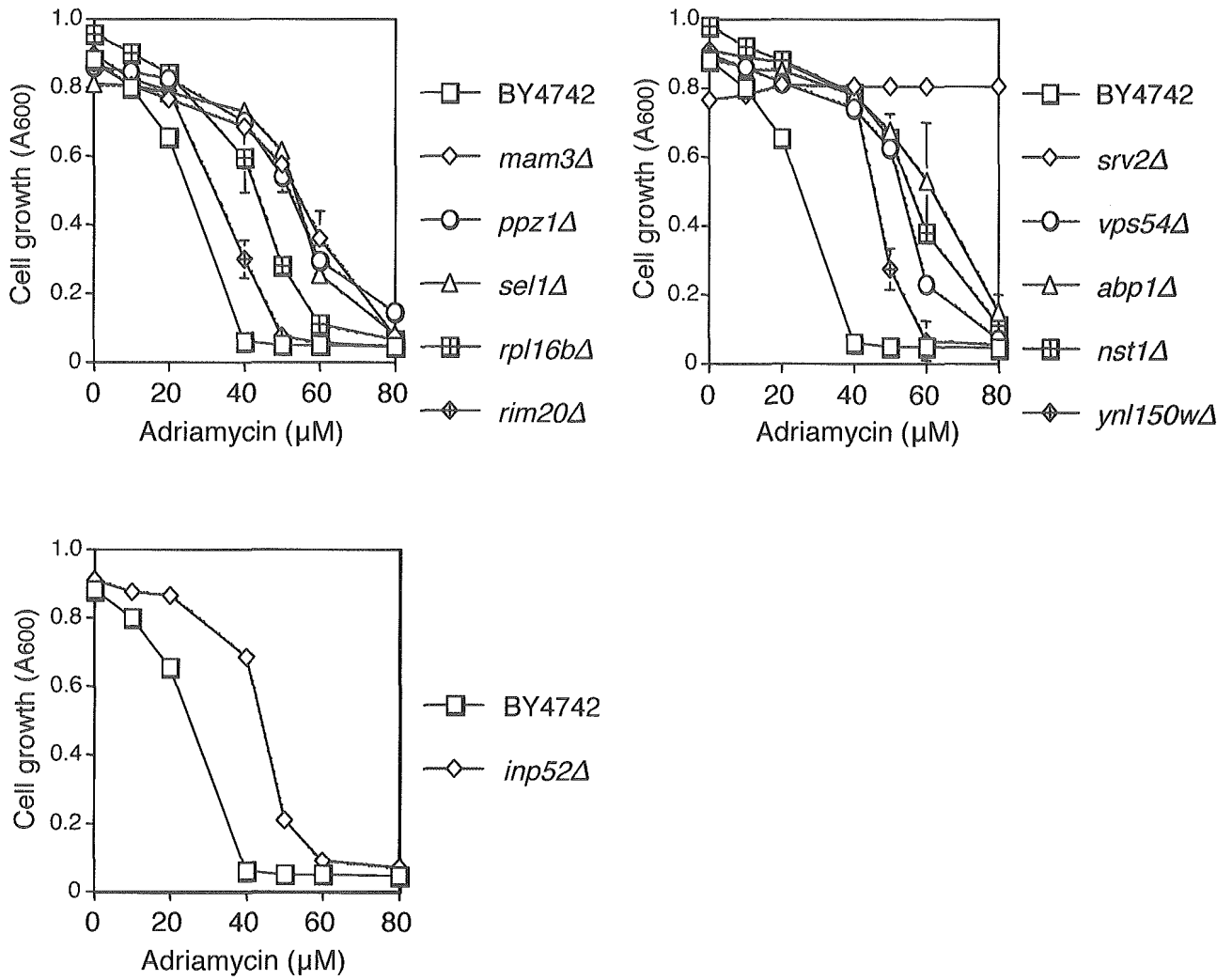


Fig. 1-5 欠損により酵母にアドリアマイシン耐性を与える遺伝子

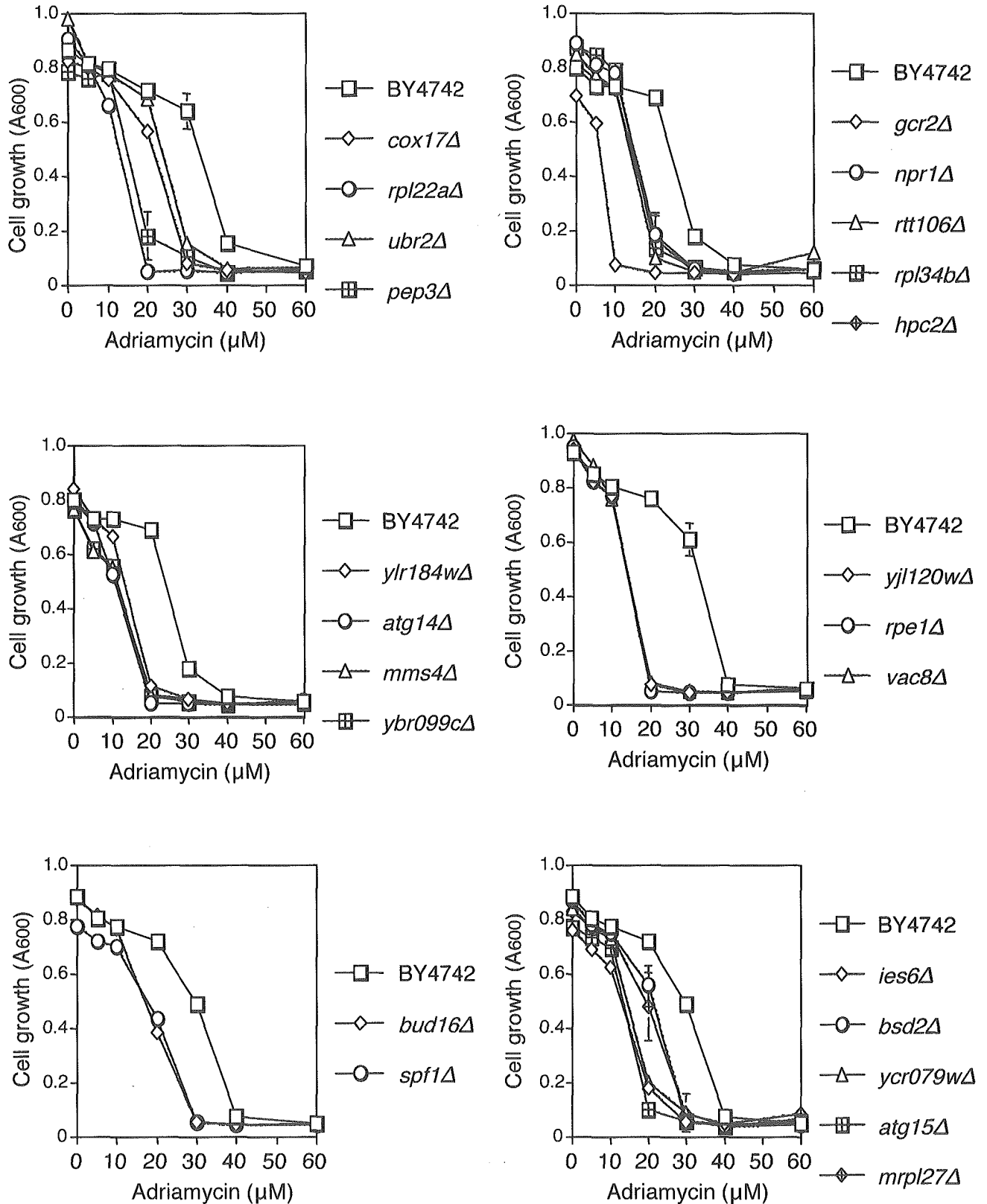


Fig. 2-1 欠損により酵母にアドリアマイシン
高感受性を与える遺伝子

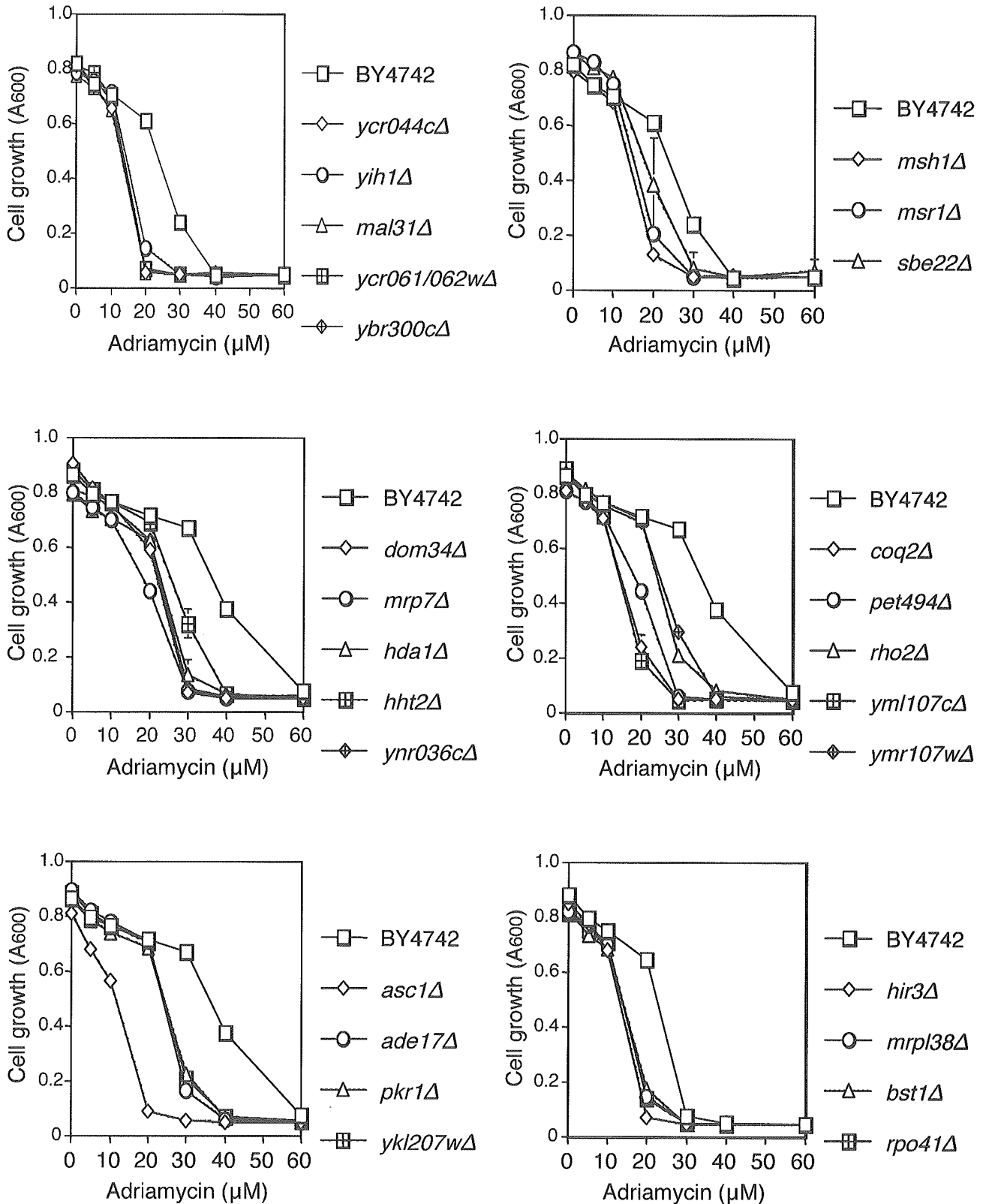


Fig. 2-2 欠損により酵母にアドリアマイシン
高感受性を与える遺伝子