

次に、Rip1 とミトコンドリア中の pyruvate transporter である Yil006w との関係を知るために、Rip1 と Yil006w の二重欠損酵母を作製した。その結果、Rip1・Yil006w 二重欠損酵母が示すメチル水銀耐性の度合いは、それぞれの単独欠損酵母が示すメチル水銀耐性の度合いより上昇することなく、両単独欠損酵母とほぼ同程度であった (Figure 16)。これらのことから、Rip1 と Yil006w は同一の経路で pyruvate によるメチル水銀毒性の増強作用に関与していると考えられる。次に、メチル水銀によるミトコンドリア中 pyruvate レベル上昇作用に及ぼす Rip1 欠損の影響を調べた。その結果、Rip1 欠損のみではミトコンドリア中の pyruvate レベルには影響を与えなかったが、メチル水銀処理によって野生型酵母で認められるミトコンドリア中 pyruvate レベルの上昇は、Yil006w 欠損酵母と同様に認められなくなった (Figure 17)。以上のことから、Rip1 欠損による酵母のメチル水銀耐性獲得は電子伝達系の活性とは関係なく、メチル水銀によるミトコンドリア中 pyruvate レベルの増加を抑制することによって引き起こされる可能性が考えられる。

## 7. 活性酸素種産生とメチル水銀毒性との関係

細胞内の活性酸素種 (superoxide, hydroxyl radical, hydrogen peroxide) の約 90%はミトコンドリアの酸化リン酸化反応により産生される。特に superoxide の産生は、酸素濃度が急激に上昇した場合や呼吸鎖が断絶された際に著しく増加する。通常、これらの活性酸素種はミトコンドリア内外に存在する抗酸化酵素などによって速やかに代謝される。しかし、活性酸素種が過剰に産生されるとミトコンドリア自身にも影響を与えるのみならず、細胞内に遊離して様々な障害を細胞に与える。酵母では、ミトコンドリアから産生される superoxide に対する抗酸化酵素として、Cu, Zn-SOD (Sod1) および Mn-SOD (Sod2) が知られている。Mn-SOD はミトコンドリアのマトリックス内に局在するのに対して、Cu, Zn-SOD は細胞質やミトコンドリアを含む細胞内小器官の細胞質側膜表面に可逆的に結合した状態で存在する。そこで、Sod1 および Sod2 をそれぞれ欠損させた酵母のメチル水銀感受性を検討したところ、両欠損酵母ともに野生型酵母に比べて高い感受性を示した (Figure 18)。このことから、活性酸素種が何らかの機構によってメチル水銀の毒性発現に関与している可能性が考えられる。そこで現在、pyruvate によるメチル水銀毒性増強における活性酸素種の関与

を調べるため、pyruvate 処理が Sod1 および Sod2 欠損酵母のメチル水銀高感受性に及ぼす影響について検討中である。

メチル水銀は細胞内の活性酸素種のレベルを上昇させることが知られており、これがメチル水銀による毒性発現機構の1つである可能性が示唆されている。そこで、メチル水銀処理が細胞内の活性酸素種レベルに及ぼす影響を H<sub>2</sub>DCFDA 蛍光試薬を用いて調べたところ、野生型酵母ではメチル水銀濃度依存的に活性酸素種レベルが増加したのに対し、Yil006w 欠損酵母での活性酸素種レベルはメチル水銀によってほとんど変動しなかった (Figure 19)。Yil006w 欠損酵母ではメチル水銀によるミトコンドリア中の pyruvate レベルはほとんど変動しないことから、メチル水銀はミトコンドリア中の pyruvate レベルを増加させることによって活性酸素種の発生に寄与しているかも知れない。

#### D. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし。

##### 2. 学会発表

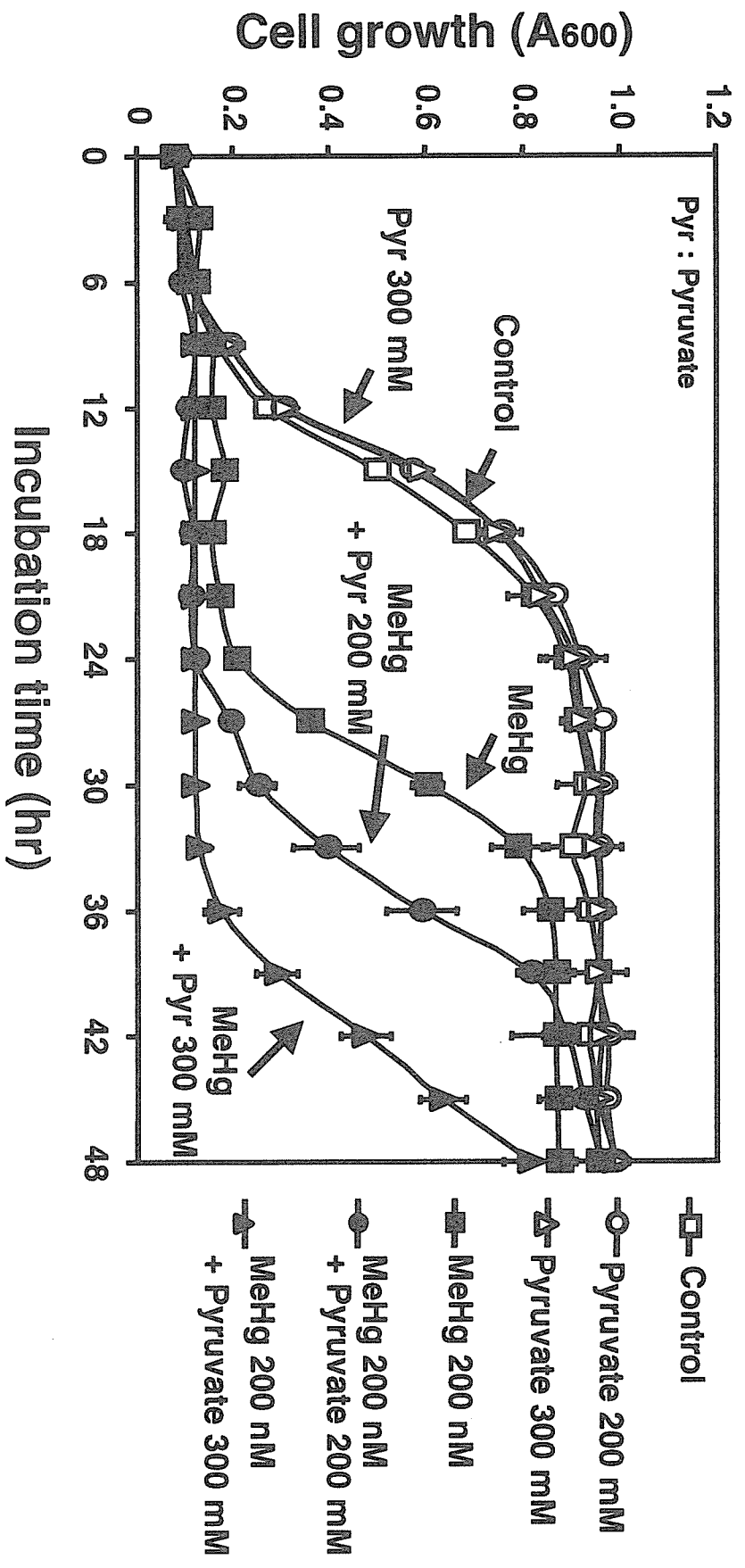
李 辰竜、黄 基旭、永沼 章：メチル水銀がミトコンドリア中のピルビン酸レベルに及ぼす影響。日本薬学会第 127 年会, 2007.

李 辰竜、黄 基旭、永沼 章：ミトコンドリア内ピルビン酸によるメチル水銀毒性増強機構。フォーラム 2006；衛生薬学・環境トキシコロジー, 2006.

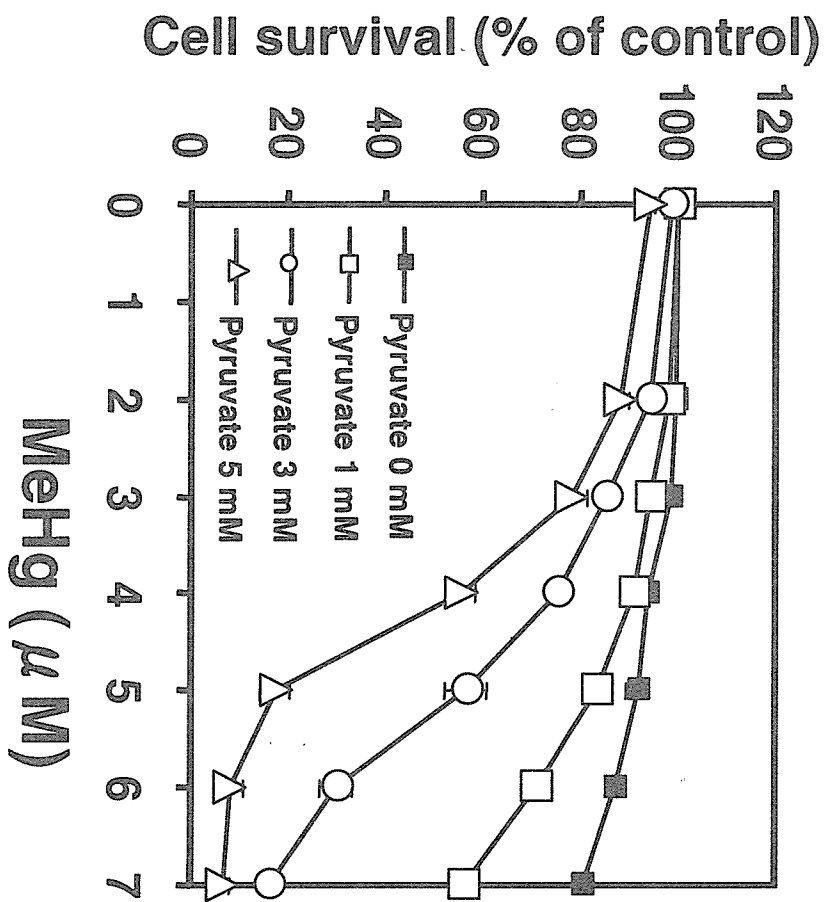
李 辰竜、黄 基旭、永沼 章；ピルビン酸によるメチル水銀毒性増強における Rip1 の役割。第 45 回日本薬学会東北支部大会, 2006

#### E. 知的財産権の出願・登録状況

なし。



**Figure 1. Pyruvateが酵母のメチル水銀感受性に与える影響**  
 $5 \times 10^5$  cells/mLの野生酵母をメチル水銀 (200 nM) およびpyruvateの存在下で、30°Cで培養し、酵母の増殖を経時的に検討した。



**Figure 2. Pyruvateがヒト由来神経芽腫細胞 (IMR-32) のメチル水銀感受性に与える影響**  
 $2 \times 10^4$  cells/mL の IMR-32 細胞をメチル水銀および pyruvate 存在下で、37°C で 48hr 培養後、Alamar blue 試薬を用いて細胞の生存率を検討した。

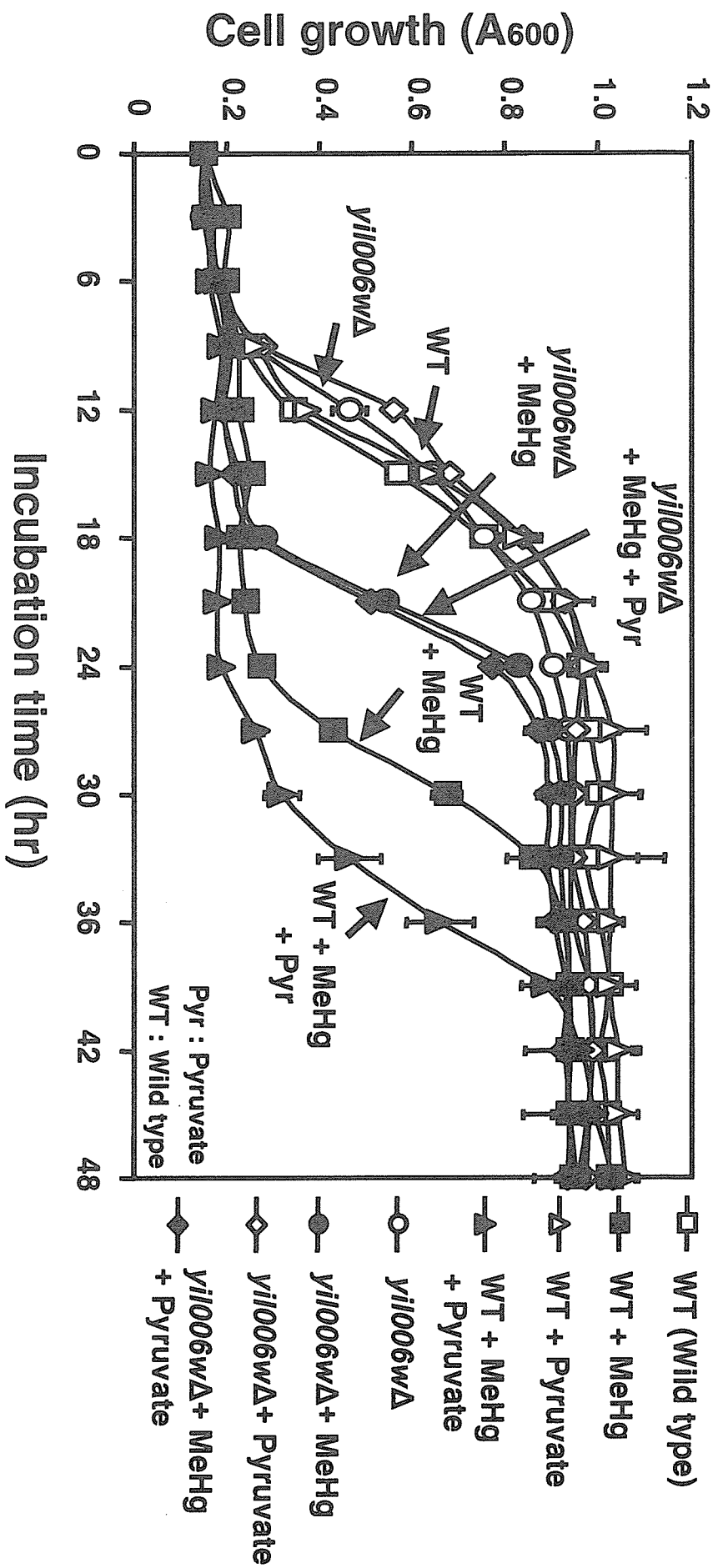


Figure 3. PyruvateがY11006w欠損酵母のメチル水銀感受性に与える影響  
 $5 \times 10^5$  cells/mLの酵母をメチル水銀 (200 nM) およびPyruvate (200 mM) の存在かで、30°Cで培養し、酵母の増殖を経時的に観察した。

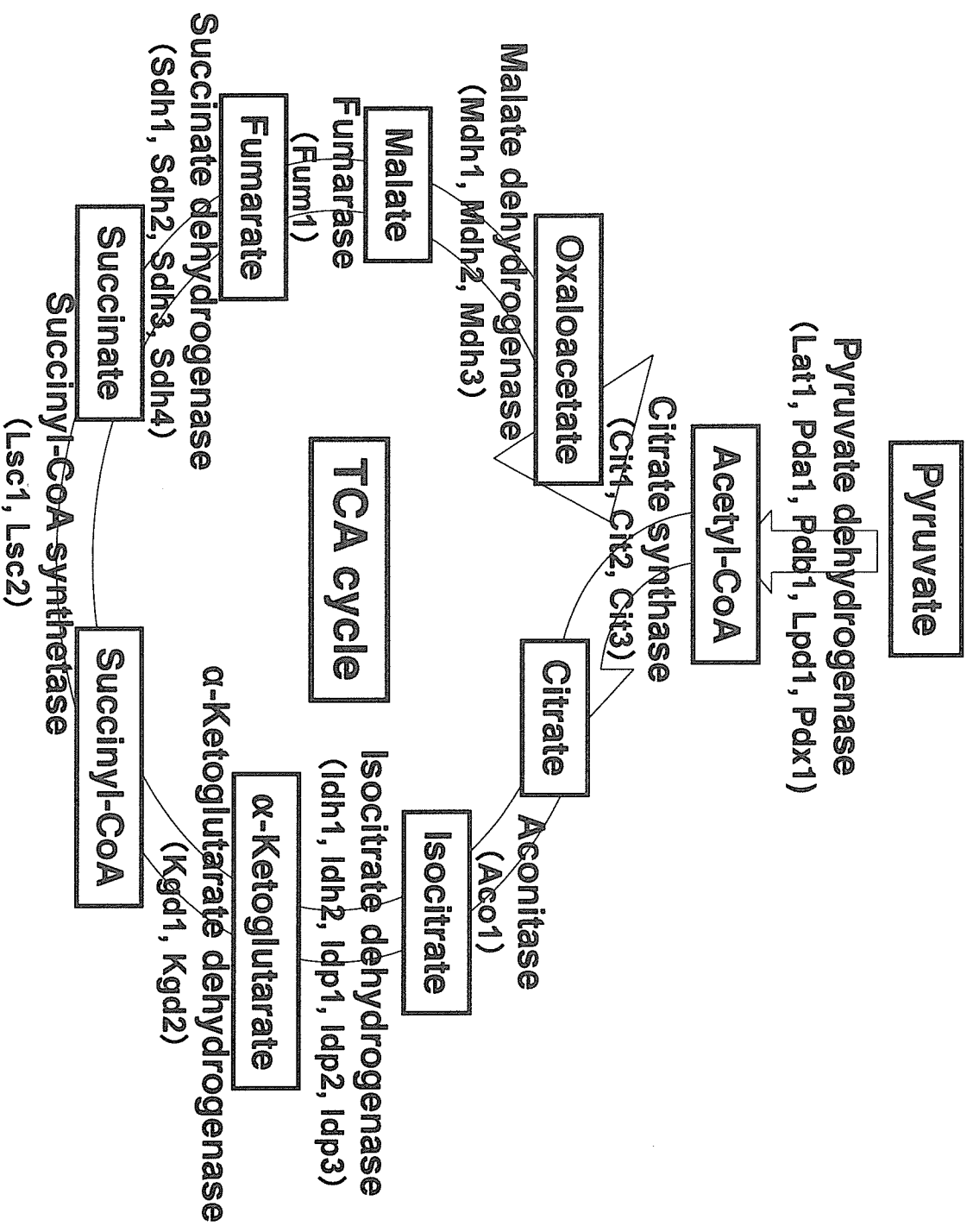
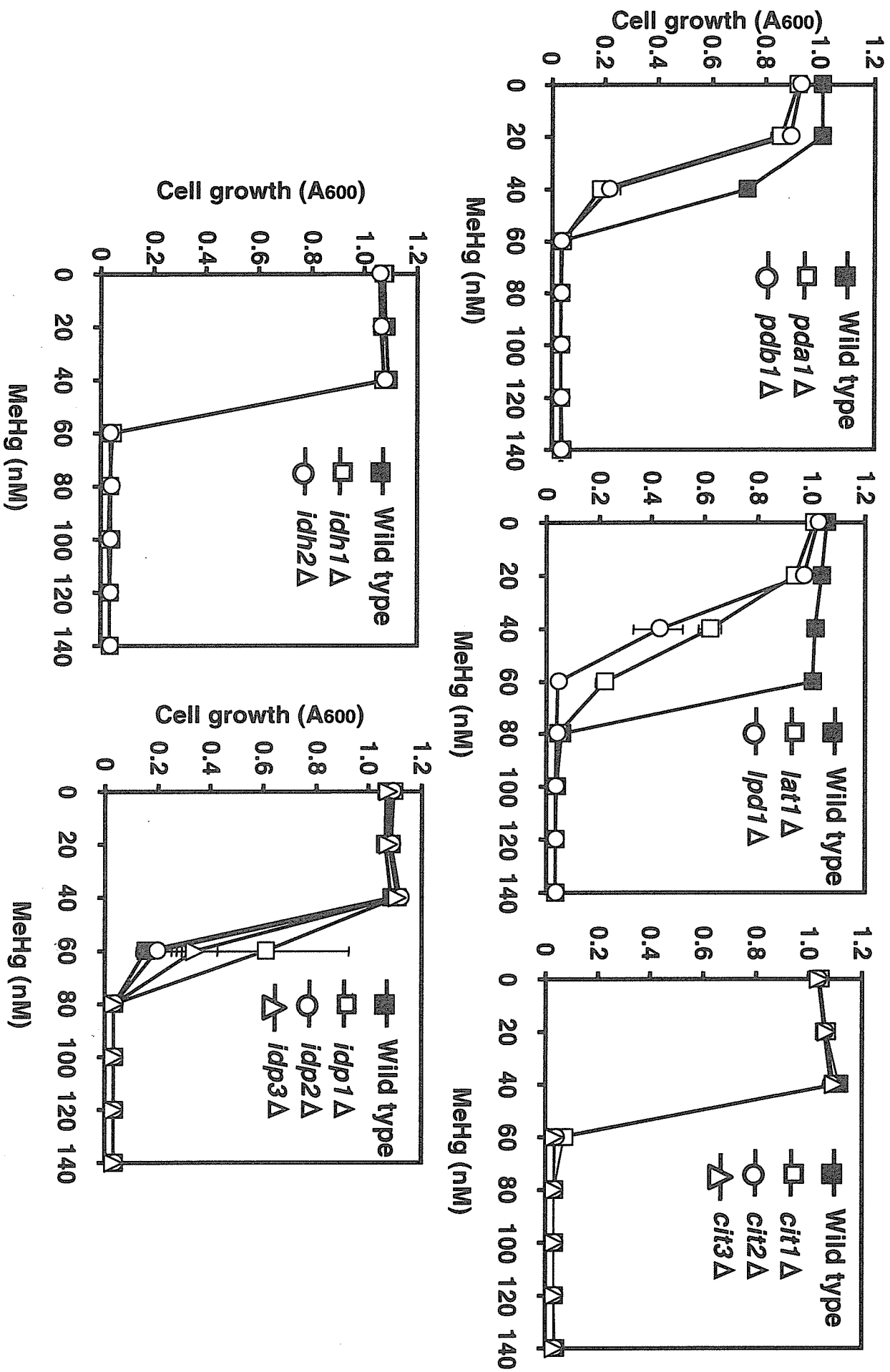


Figure 4. TCA cycle模式图



**Figure 5-1. TCA cycleを構成する因子の欠損がメチル水銀感受性に与える影響**  
 $5 \times 10^4$  cells/mLの酵母をメチル水銀メチル水銀存在下で、30°Cで48hr培養後、酵母の生存率を濁度(A600)により測定した。

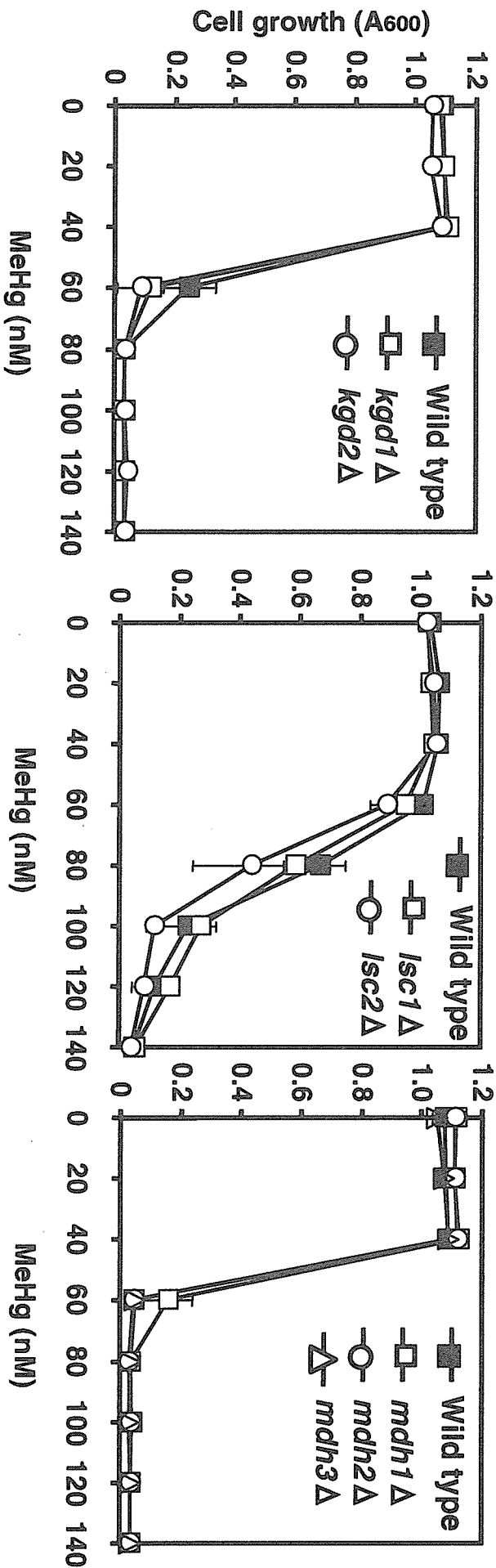
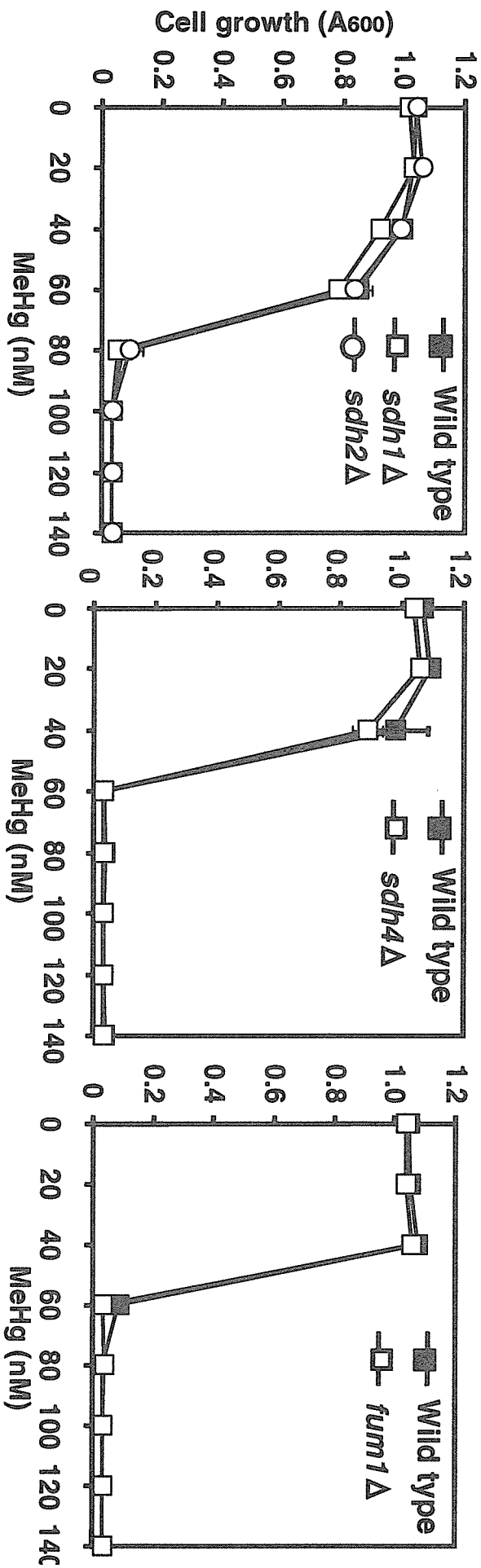


Figure 5-2. TCA cycleを構成する因子の欠損がメチル水銀感受性に与える影響



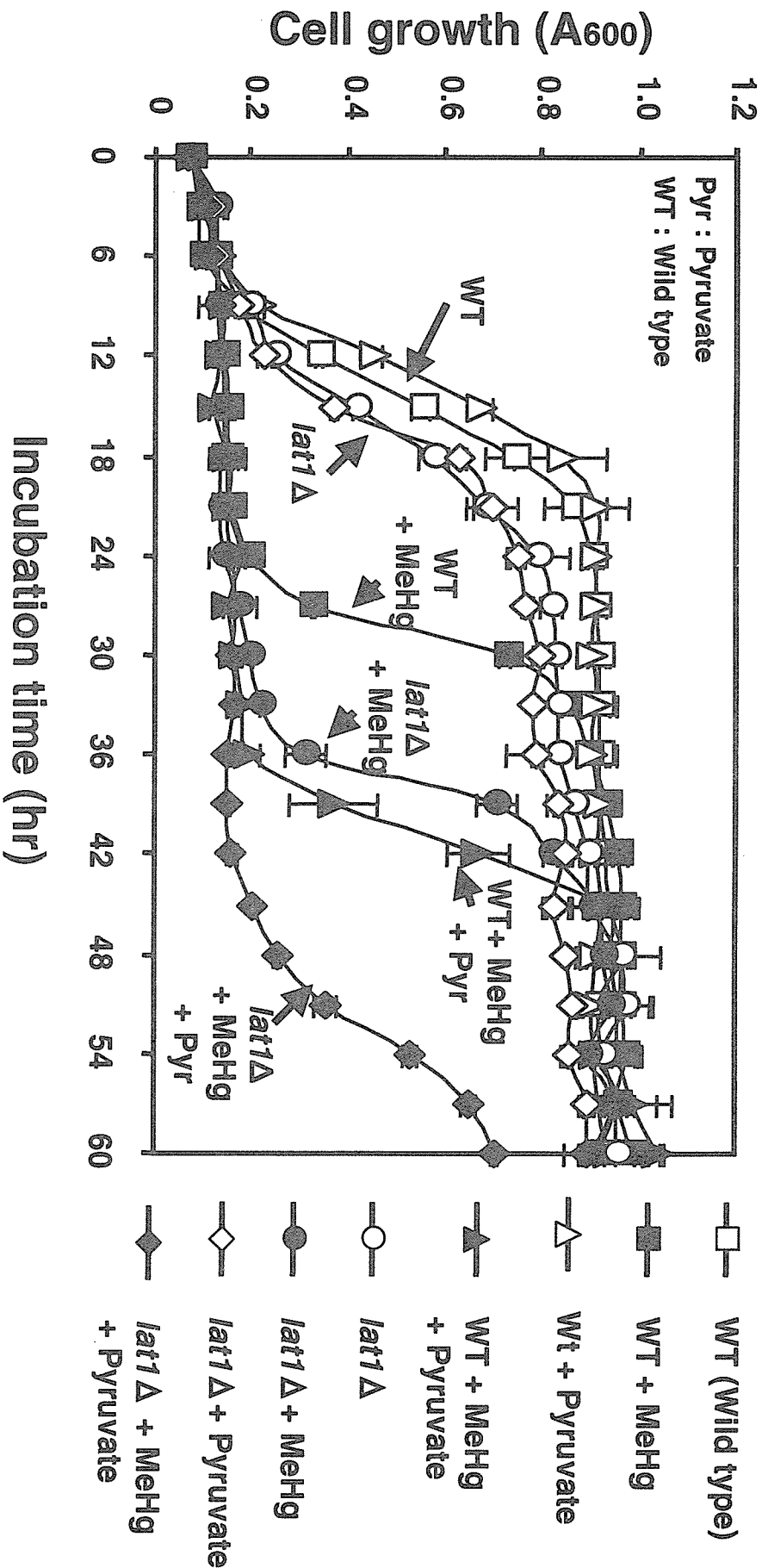
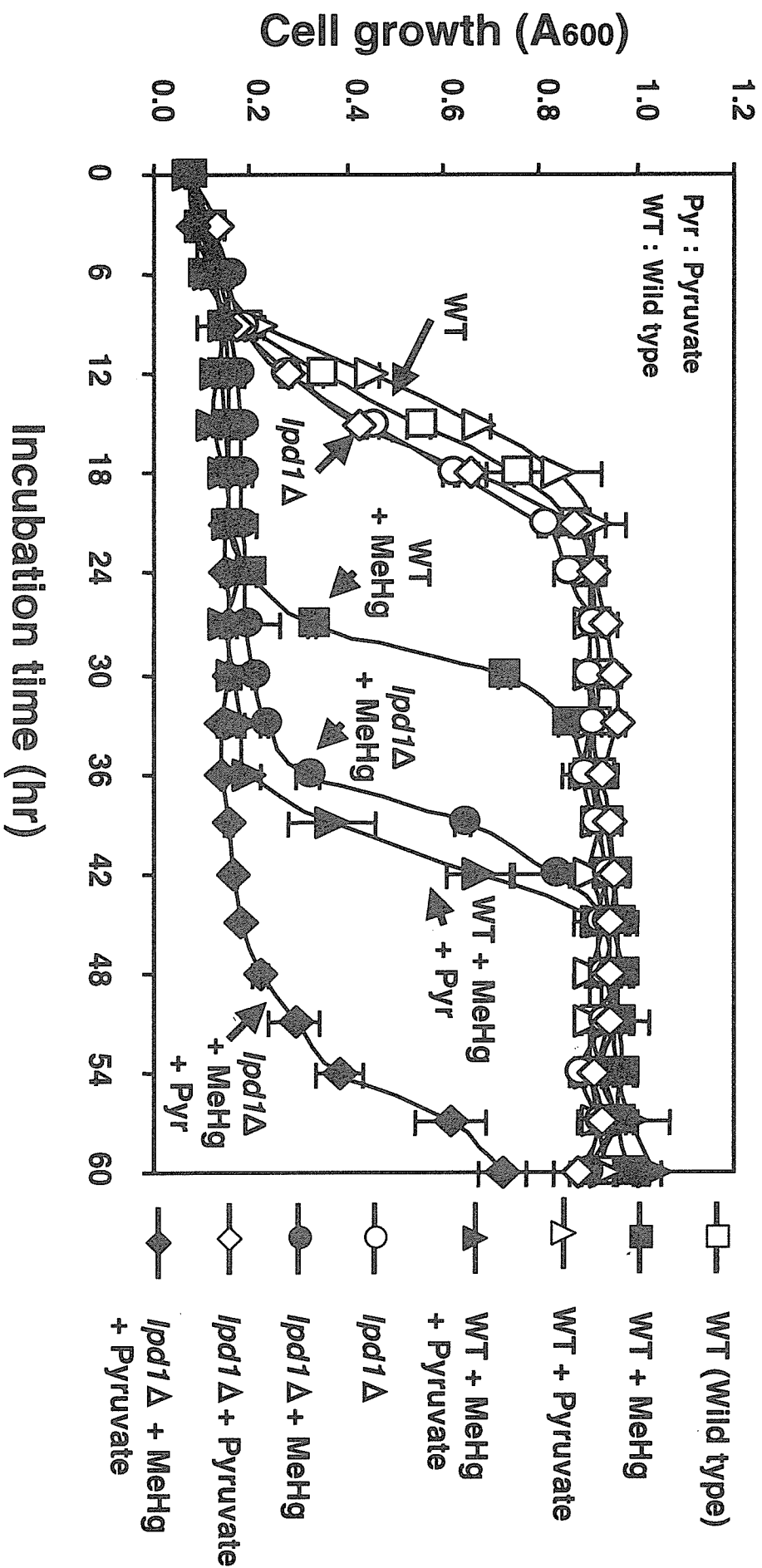


Figure 6. PyruvateがLat1欠損酵母のメチル水銀感受性に与える影響  
 $5 \times 10^5$  cells/mLの酵母をメチル水銀(200 nM)およびPyruvate(200 mM)存在かで、30°Cで培養し、酵母の増殖を経時的に検討した。

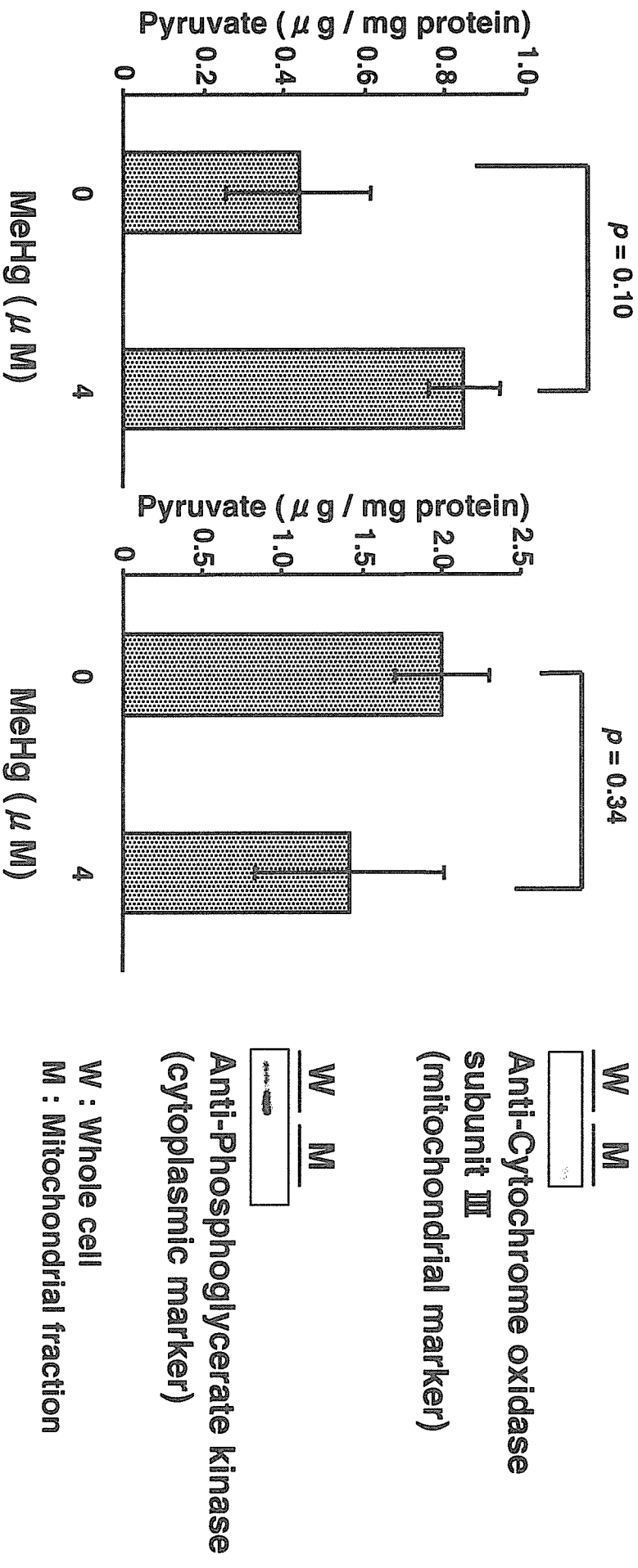


**Figure 7. PyruvateがIpd1欠損酵母のメチル水銀感受性に与える影響**  
 5×10<sup>5</sup> cells/mLの酵母をメチル水銀(200 nM)およびpyruvate(200 mM)存在かで、30°Cで培養し、酵母の増殖を経時的に検討した。

## A Mitochondria

## B Cytosol

## C



**Figure 8. マチル水銀がミトコンドリアおよび細胞質中のpyruvateレベルに与える影響**  
 ミトコンドリアまたは細胞質中のpyruvateのレベルを測定した(A. ミトコンドリア B. 細胞質)。Cはマーカー蛋白質を指標としたミトコンドリア画分の確認結果。

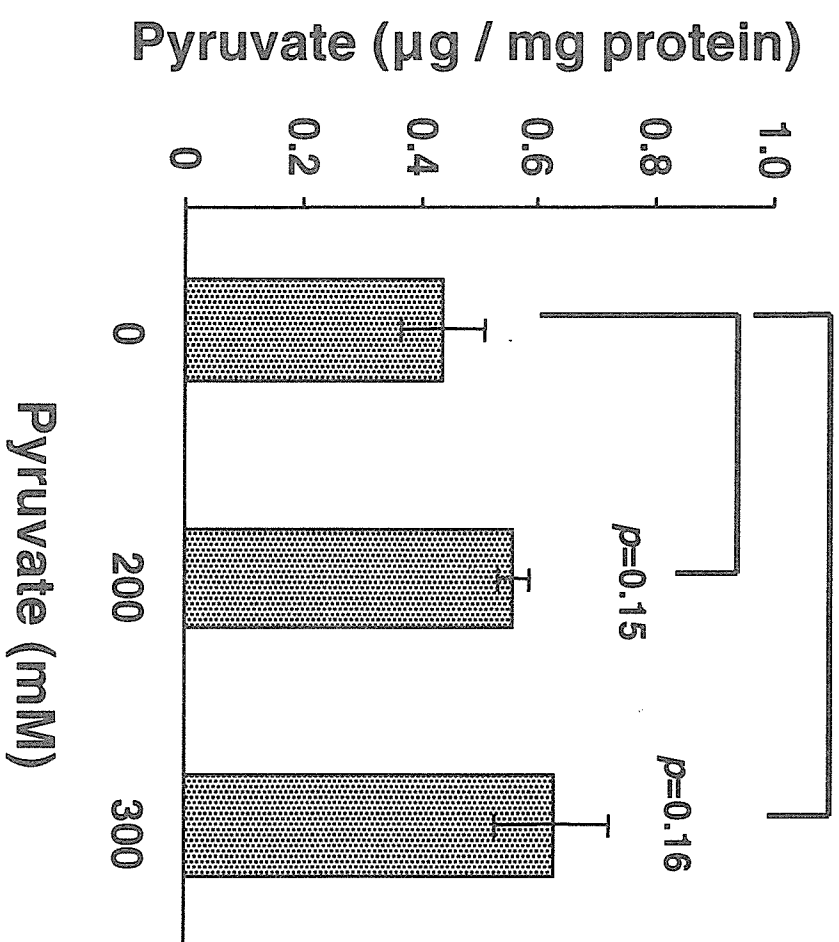
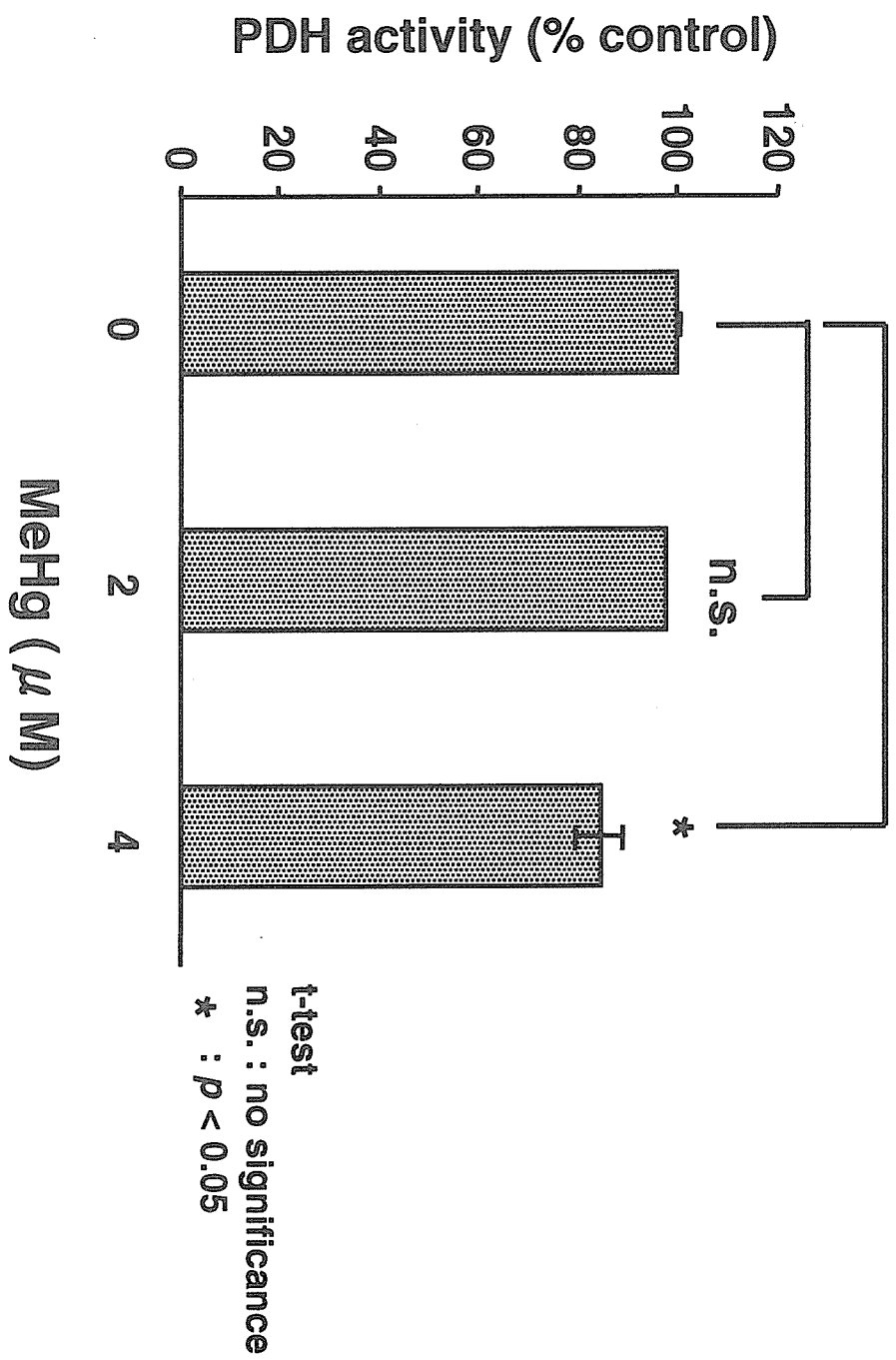
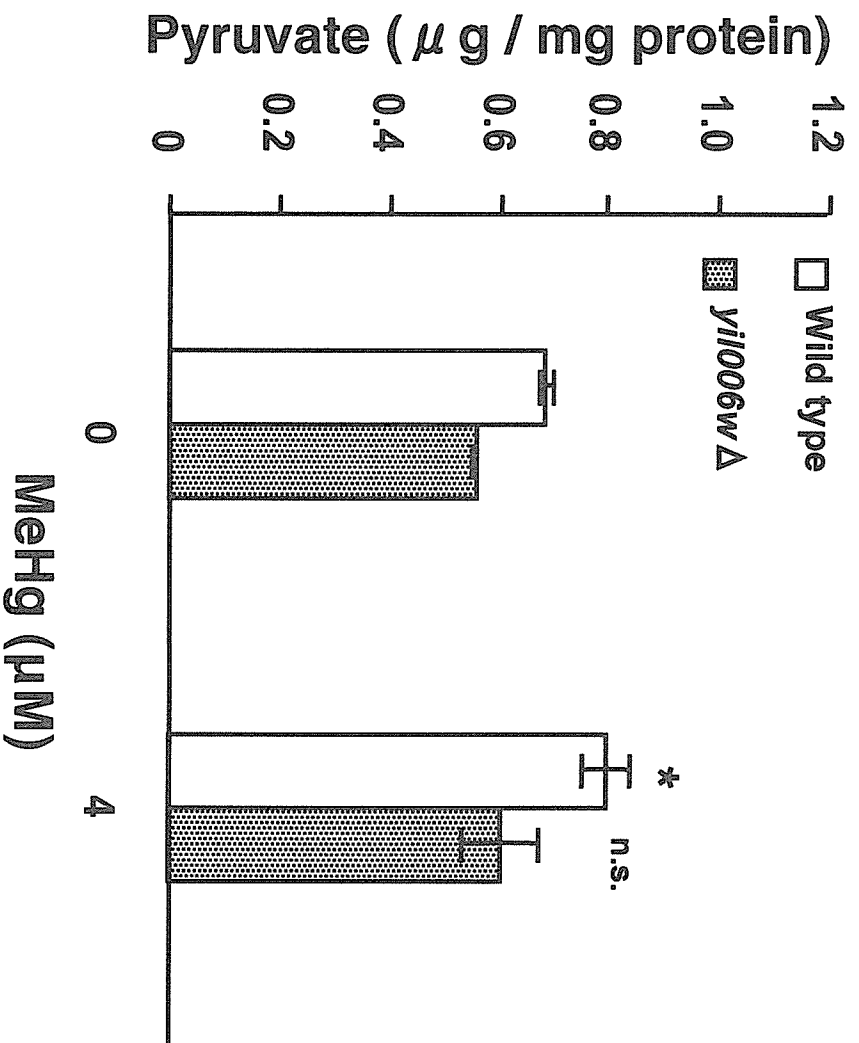


Figure 9. Pyruvateの培地中への添加がミトコンドリア中のpyruvateレベルに与える影響  
 培地にpyruvateを添加し、24hr培養後に、ミトコンドリア中のpyruvateのレベルを測定した。



**Figure 10. メチル水銀がpyruvate dehydrogenase (PDH)の活性に与える影響**

O.D. ≒ 0.7の酵母をメチル水銀存在下で、30°Cで3hr 培養後、ミトコンドリア画分を得て、酵素反応によりpyruvate dehydrogenaseの活性を測定した。



t-test (vs. MeHg未処理)  
 n.s. : no significance  
 \* :  $p < 0.05$

Figure 11. マチル水銀がYj1006w欠損酵母のミトコンドリア中pyruvateレベルに与える影響  
 Figure 8と同様にミトコンドリアまたは細胞質内のpyruvateのレベルを測定した。

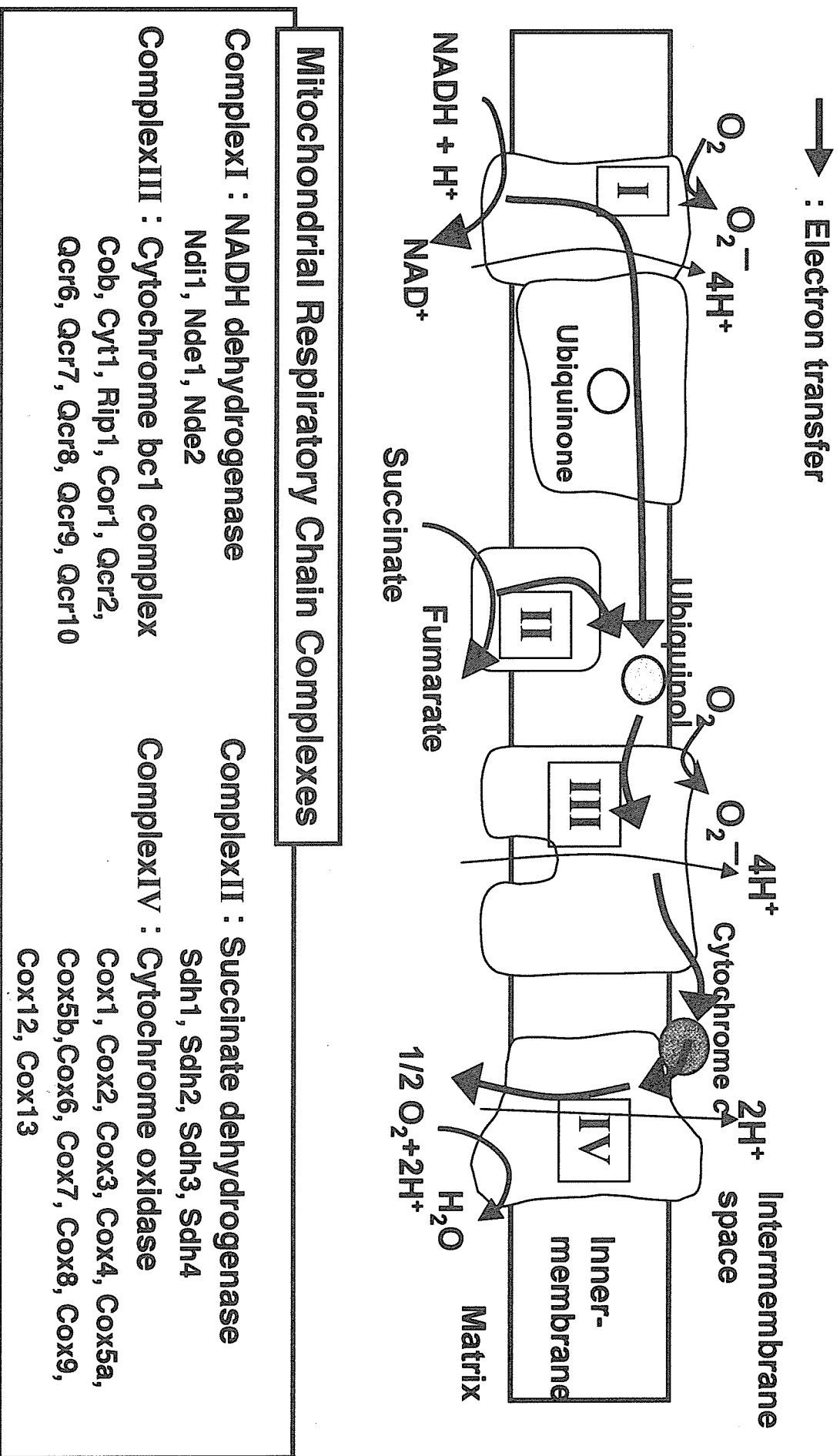
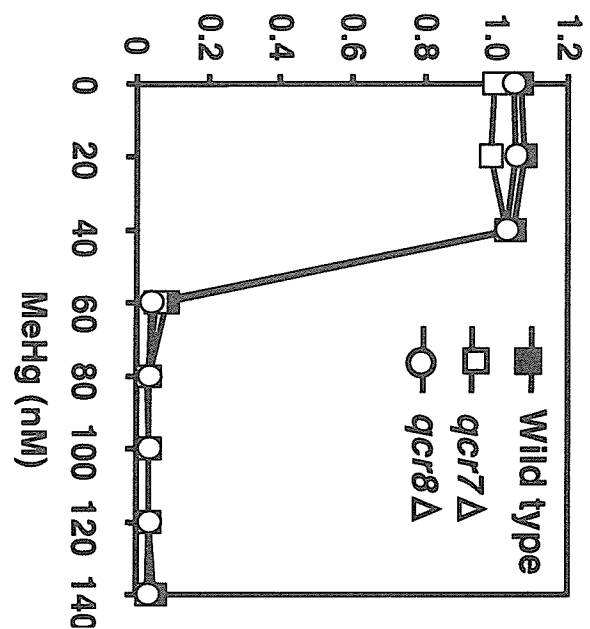
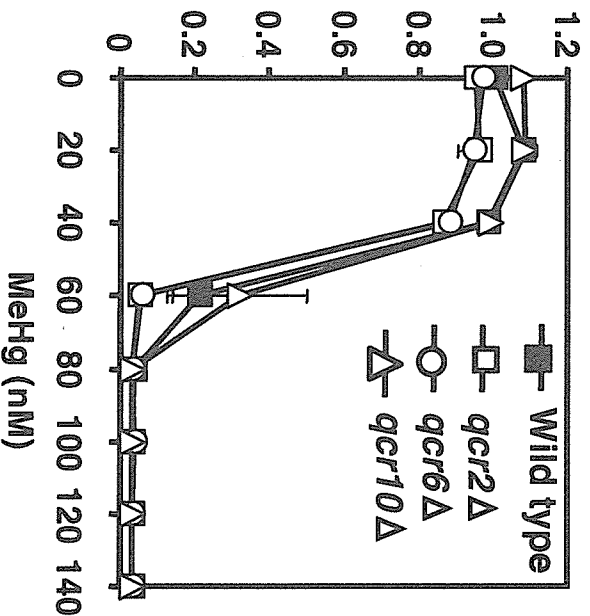
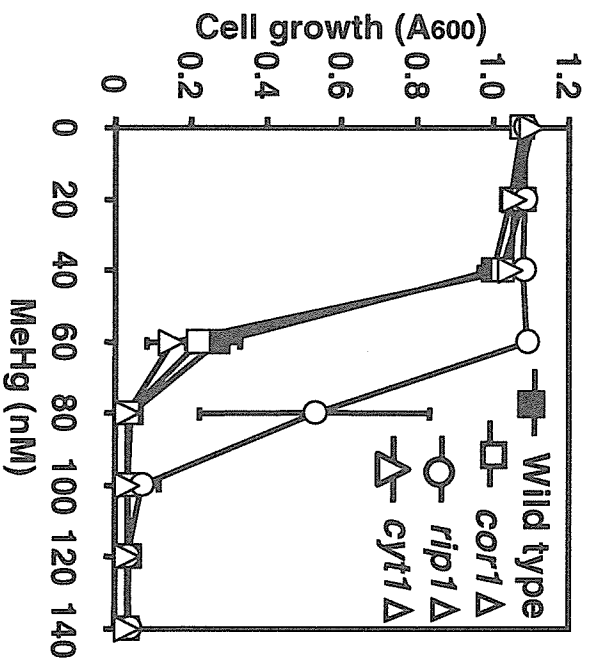
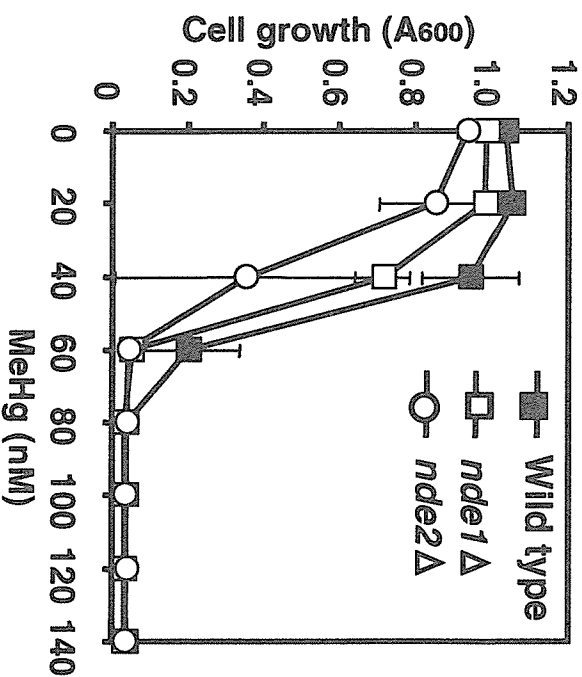
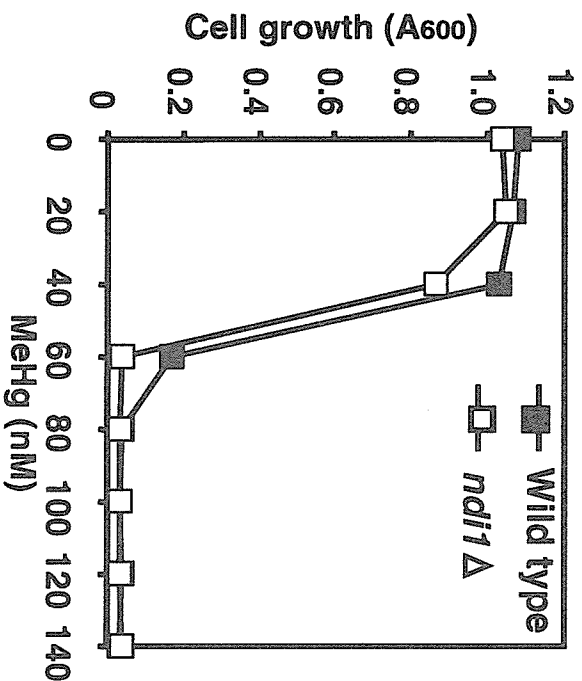


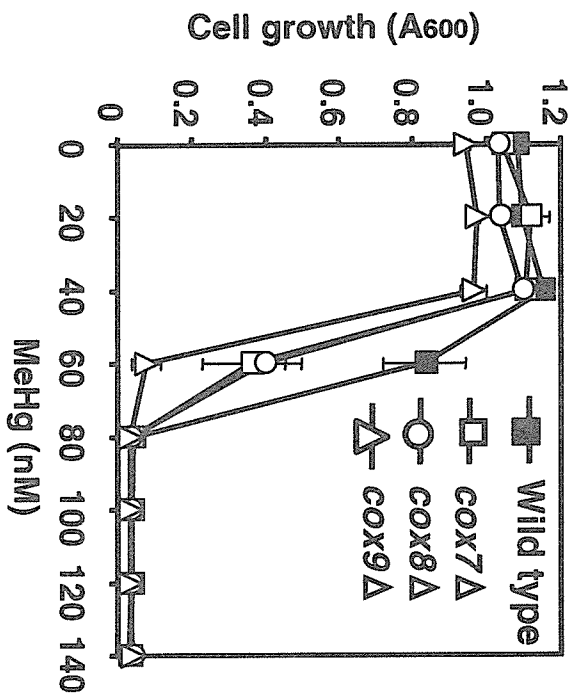
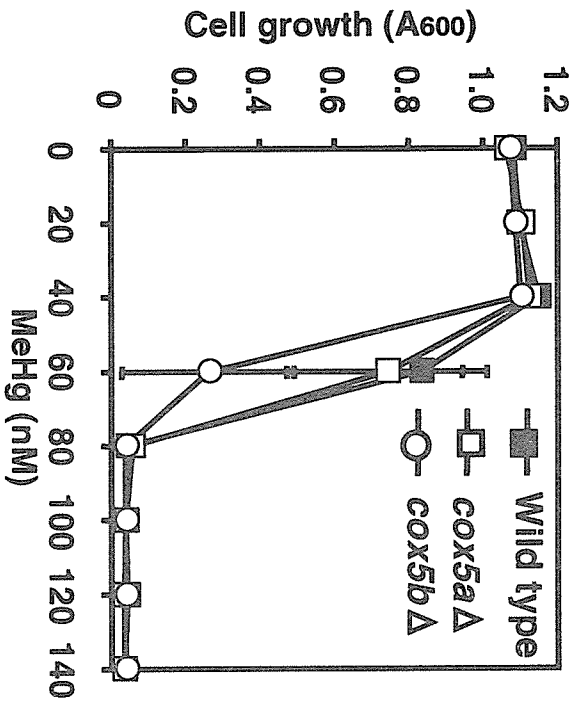
Figure 12. 電子伝達系模式図



**Figure 13-1. 電子伝達系関連酵素を構成する因子の欠損がメチル水銀感受性に与える影響**

5×10<sup>4</sup> cells/mLの酵母をメチル水銀存在下で、30°Cで48hr培養後、酵母の生存率を濁度 (A600) により測定した。Complex I : *Ndi1*, *Nde1*, *Nde2*, Complex III : *Cor1*, *Rip1*, *Cyt1*, *Qcr2*, *Qcr6*, *Qcr7*, *Qcr8*, *Qcr10*,





**Figure 13-2. 電子伝達系関連酵素を構成する因子の欠損がメチル水銀感受性に与える影響**  
 $5 \times 10^4$  cells/mLの酵母をメチル水銀存在下で、30°Cで48hr培養後、酵母の生存率を濁度(A600)により測定した。Complex IV: Cox5a, Cox5b, Cox7, Cox8, Cox9.

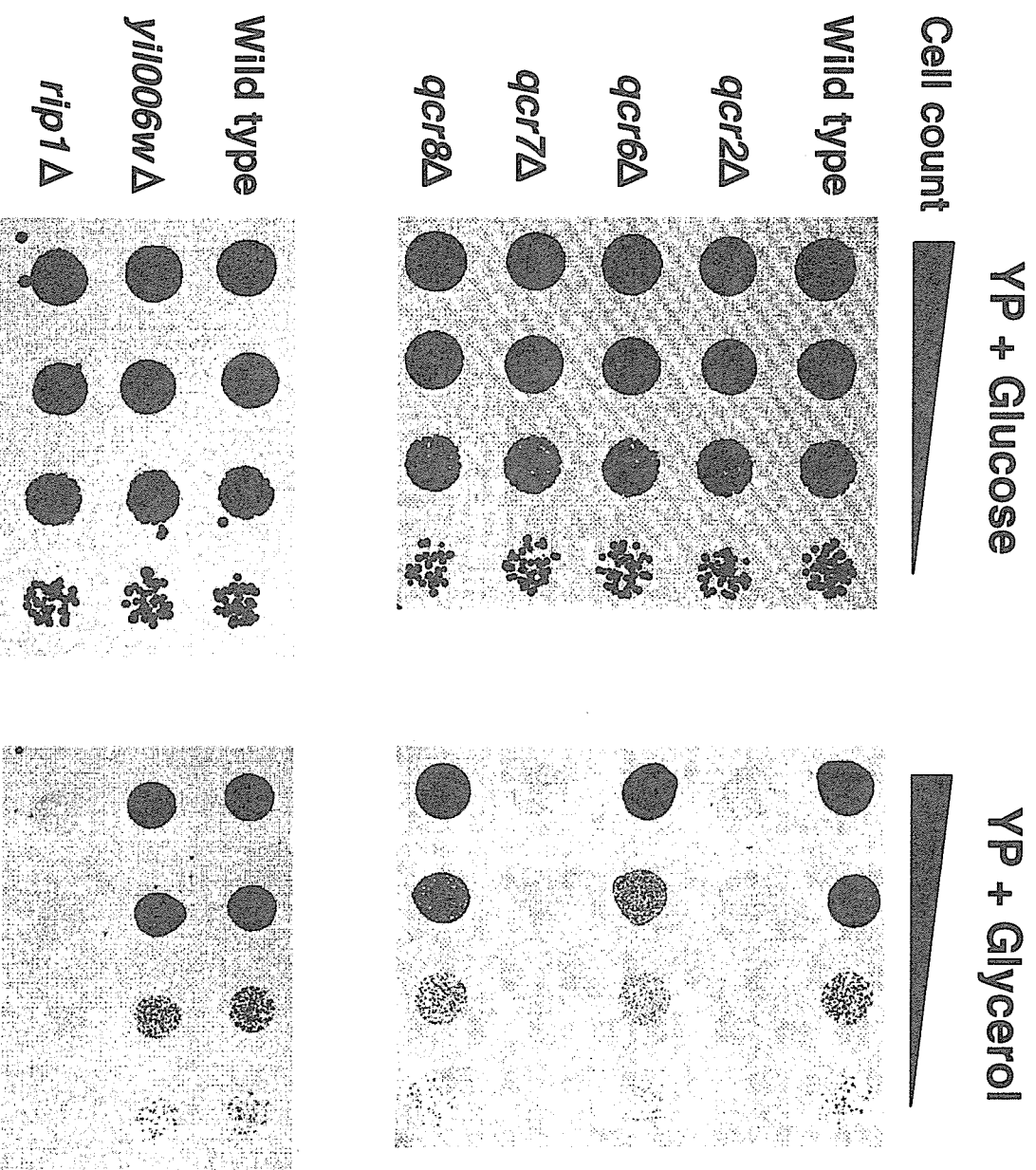
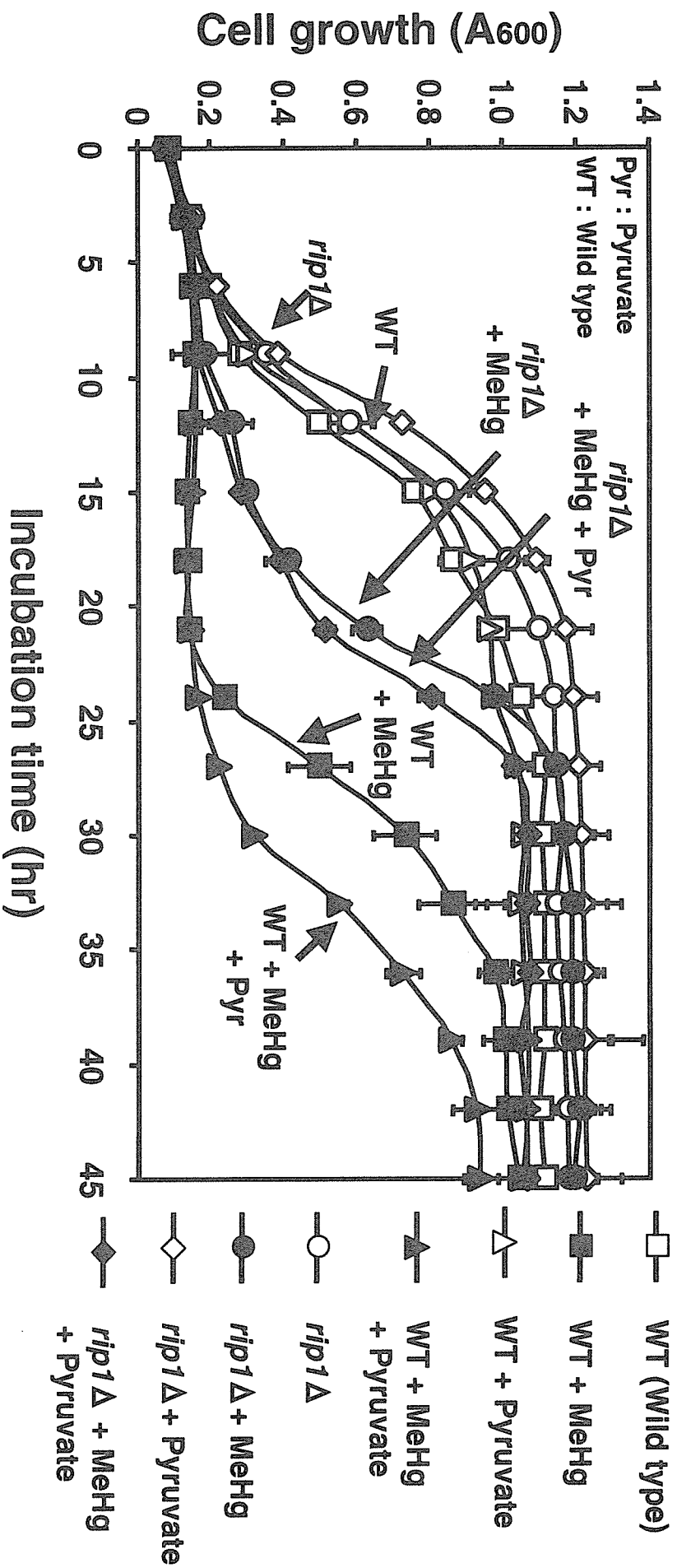


Figure 14. 電子伝達系complex III構成因子の欠損が呼吸鎖の機能に与える影響  
 それぞれの培地に $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^2$  cells/spotとなるように各酵母をスポットニングした後、30°Cで培養後、観察した。



**Figure 15. PyruvateがRip1欠損酵母のメチル水銀感受性に与える影響**  
 $5 \times 10^5$  cells/mLの酵母をメチル水銀(200 nM)およびpyruvate(200 mM)存在かで、30°Cで培養し、酵母の増殖を経時的に検討した。

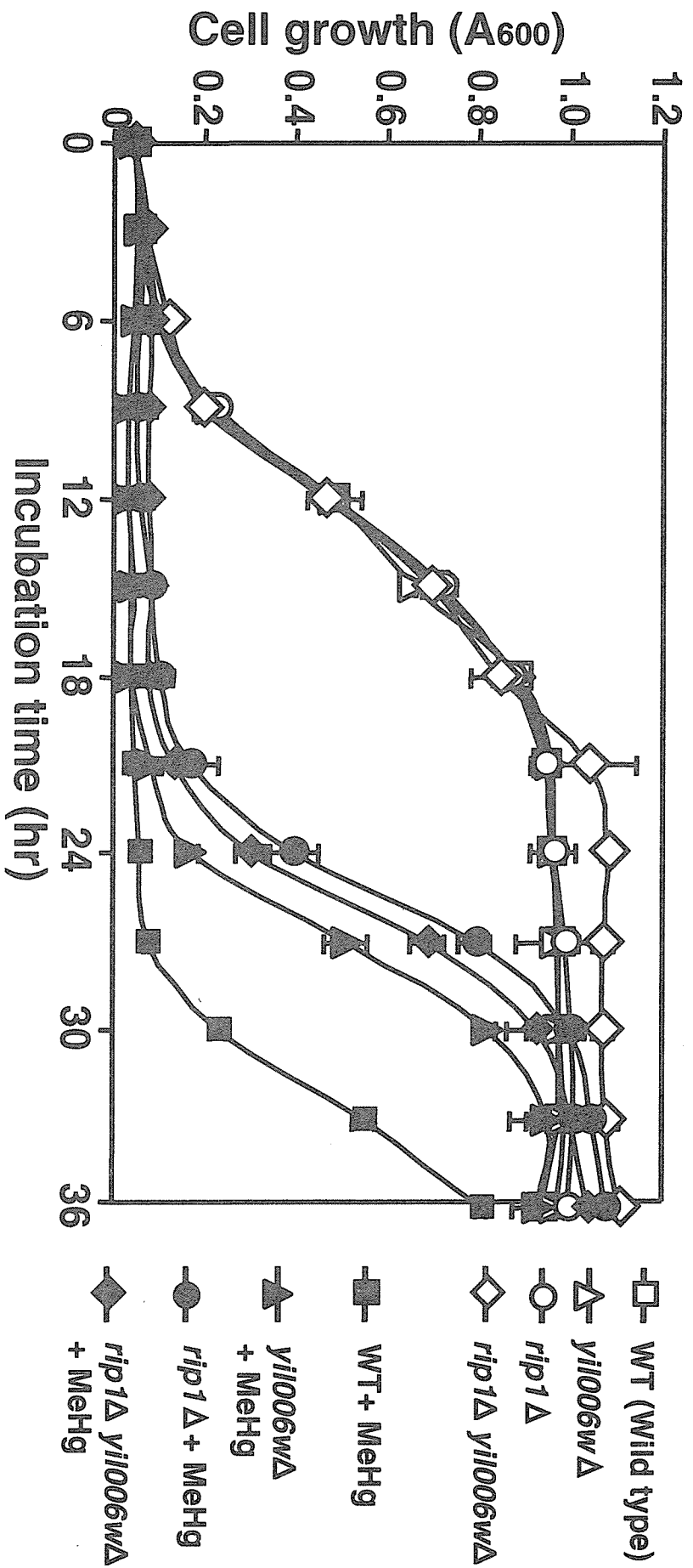


Figure 16. Rip1・Yj1006w 二重欠損がメチル水銀感受性に与える影響  
 $5 \times 10^5$  cells/mLの酵母をメチル水銀存在下で、30°Cで培養し、酵母の増殖を経時敵に検討した。