

293細胞

PP2C siRNA細胞

Glc (low) Glc (high)
 (-) 5 10 (-) 5 1 (-) 5 10 (-) 5 1

Glc (low) Glc (high)
 (-) 5 10 (-) 5 1 (-) 5 10 (-) 5 1

MeHg (μM)

AMPK-P

PRKAA1

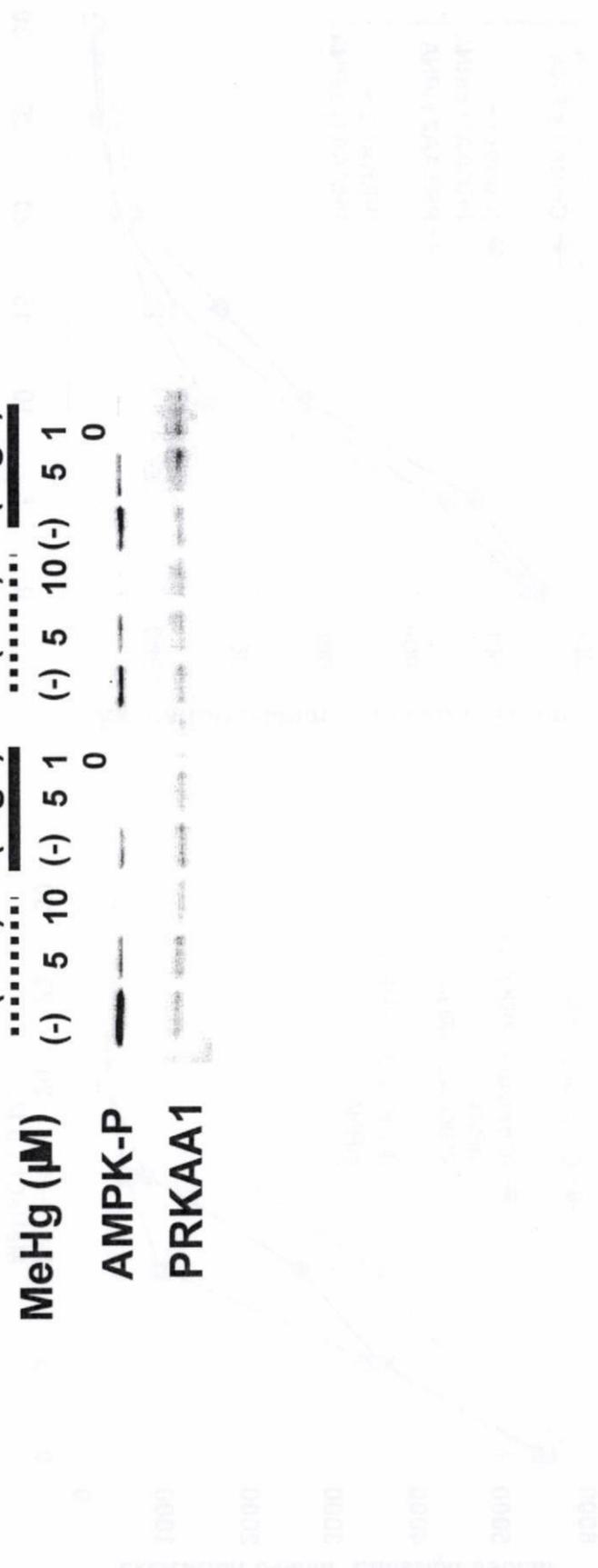


Fig.14 メチル水銀毒性軽減メカニズムの解析

1×10⁶cellsとなるように各濃度(5.5, 25 mM)のグルコースを含む培地で培養したHEK293細胞またはPP2C siRNA導入細胞を6 well plateに播いた後、各濃度(0, 5, 10 μM)の塩化メチル水銀で3時間処理し、蛋白質を抽出した後、Immunoblottingによりリン酸化AMPKおよびPRKAA1レベルを検討した。

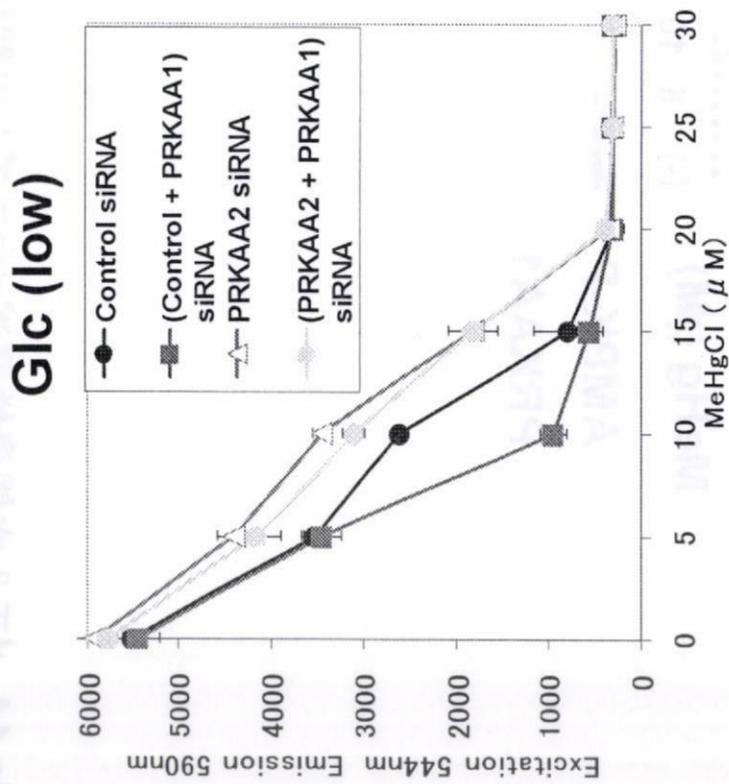
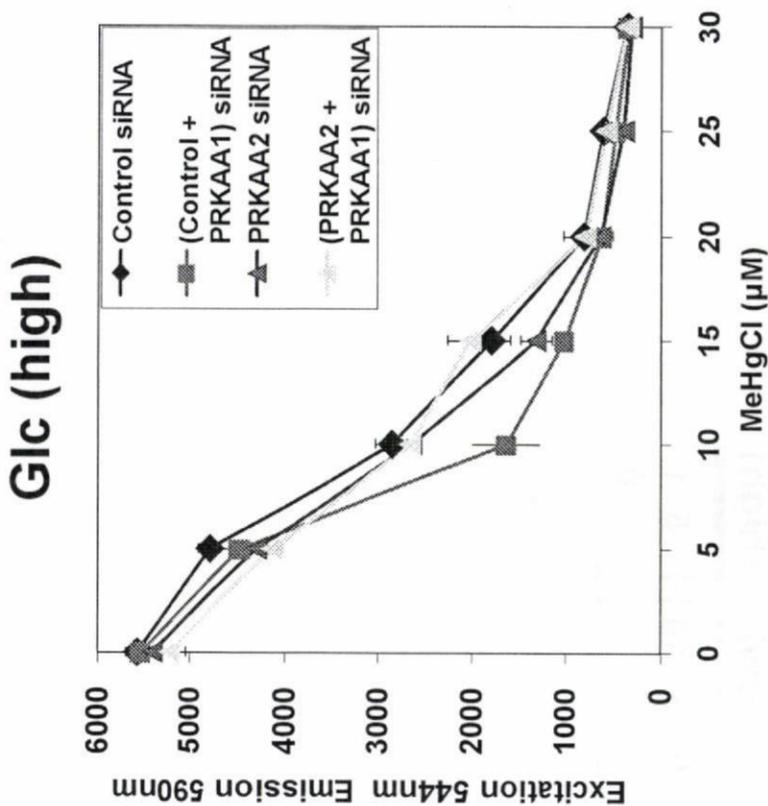
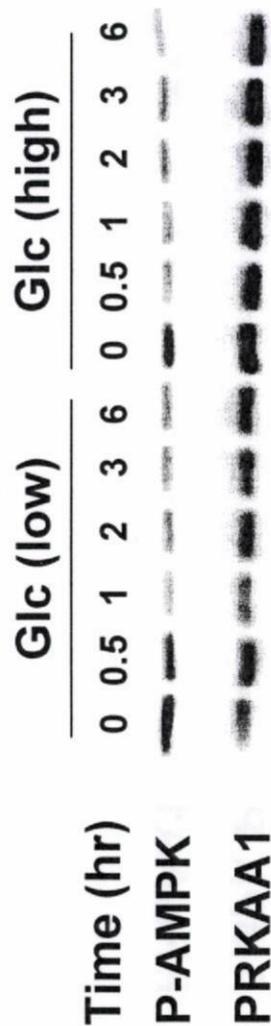


Fig.9 メチル水銀がAMPKのαサブユニットに与える影響

1 × 10⁶ cells となるように各濃度 (5.5, 25 mM) のグルコースを含む培地で培養した Control siRNA または PRKAA2 siRNA 導入細胞を 5 × 10⁵ cells/tube になるように 1.5 ml tubul にとり、960 × g, 2 min で遠心し、上清を取り除いた後に resuspension buffer R 100 μl で懸濁し、siRNA 発現プラスミド 2 mg を添加し エレクトロポレーション法により導入し、2 × 10⁴ cells/90 μL の細胞を 96 well plate 播いた後 24 時間後に塩化メチル水銀で処理した。24 時間処理した後、alama blue を含む培地に交換し、37 °C、5 % CO2 存在下で 3 時間培養した後、蛍光マイクロプレートリーダーによる蛍光測定 (excitation, 544 nm; emission, 590 nm) により細胞生存率を求めた。

Glc (low)

Glc (high)



AICA-riboside(AICAR) : AMPK活性化剤

細胞内AMPの増加により、AMPがγサブユニットに結合することでAMPKがリン酸化する。

→ AICARは細胞内AMP含有量を変えずにAMP類似体として、増加・蓄積によりAMPKをリン酸化する。

AMPKの3量体構造



293細胞 PP2C siRNA細胞

	Glc (low)		Glc (high)		Glc (low)		Glc (high)	
	(-)	5	10	(-)	5	10	(-)	5
MeHg (μM)								
AMPK-P								
PRKAA1								

MeHg (μM)

AMPK-P

PRKAA1

AMPK-P

PRKAA1

1×10⁶ cellsとなるように各濃度(5.5, 25 mM)のグルコースを含む培地で培養した HEK293細胞またはPP2C siRNA導入細胞を6 well plateに播いた後、各濃度(0, 5, 10 μM)の塩化メチル水銀で3時間処理し、蛋白質を抽出した後、immunoblottingによりリン酸化AMPKおよびPRKAA1レベルを検討した。

小

低濃度メチル水銀処理したメチル水銀未処理の細胞群のシグナル強度

FLJ13570、SHB、PRKAA1

PRP38、CTD-2299I21、EIF5、calmodulin 2、
FNBP1、RP11-473N2、HDAC4、LAMA2、GINS4

DKFZp434B1023、RP11-16O9、FRMD6、
RPIA、RPL36LA、ITCH、NLGN4X

NDUFA4L2、GANAB、SIX3、NKG7、
RP11-447L10、HIP2

大

Table.1 発現抑制によりヒト培養細胞にメチル水銀高感受性を与えると予想される上位25種の遺伝子

大

高濃度メチル水銀処理したメチル水銀未処理の細胞群のシグナル強度

小

SEZ6L、RP11-100F10、CG32736-PA isoform A

OR7C1、REP2、MSI2、PDE1B、AADAT

KIF1C、KREMEN2、CCR2、
CIT987SK-A-61E3、PPPED2、NLGN4Y、
FCRL2、EDH1、LANL、CRSP3

C3HC4、LOC731223

Table.2 発現抑制によりヒト培養細胞にメチル水銀耐性を与えると予想される上位20種の遺伝子

メチル水銀処理/ コントロール	Name	遺伝子 ID No.	Function
0.008822	FLJ13570	NW_927719	No function
0.009495	SHB	NM_003028.1	Src homology 2 domain containing adaptor protein B
0.011581	PRKAA1	NM_006251.5	Alpha 1 catalytic subunit of AMP-activated protein kinase
0.044626	PRP38	NW_922462	Member of the PRP38 family
0.049895	CTD-2299I21	NT_006713	No function
0.051031	EIF5	NT_026437	Eukaryotic translation initiation factor 5
0.05266	calmodulin 2	NM_001743.3	Calmodulin 2 (phosphorylase kinase delta)
0.054346	FNBP1	NT_010194	Formin binding protein 1
0.055874	RP11-473N2	NT_006238.	No function
0.056342	HDAC4	NM_006037.2	Histone deacetylase 4
0.063589	LAMA2	NW_923184	Laminin alpha 2
0.064463	GINS4	NT_007995	GINS complex subunit 4
0.070675	DKFZp434B1 023	NW_925473	No function
0.071243	RP11-1609		No function
0.071686	FRMD6	NM_152330.2	Member of the FERM domain (Band 4.1 family) family
0.072102	RPIA	NM_144563.2	Ribose 5-phosphate isomerase A
0.075448	RPL36AL	NM_001001.3	Protein with high similarity to ribosomal protein L42 (S. cerevisiae Rpl42Bp)
0.07753	ITCH	NM_031483.3	Itchy E3 ubiquitin protein ligase (atrophin-1 interacting protein 4)
0.081248	NLGN4X	NW_927700	Neuroigin 4, a member of the neuroigin family
0.083901	NDUFA4L2	NM_020142.3	Protein with high similarity to NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex 4 (mouse Ndufa4)
0.088861	GANAB	NM_198334.1	Alpha glucosidase II (alpha neutral subunit)
0.089756	SIX3	NM_005413.1	Sine oculis homeobox (Drosophila) homolog 3
0.091629	NKG7	NM_005601.3	Natural killer cell group 7 sequence
0.093754	RP11-447L10	NW_921873	No function
0.095326	HIP2	NW_922073	Huntingtin interacting protein 2

Table 1. 発現抑制によりヒト培養細胞にメチル水銀高感受性を与えると予想される上位25種の遺伝子

メチル水銀 処理/コント ロール	Name	遺伝子 ID No.	Function
21.35179	SEZ6L	NW_927628	Seizure related 6 homolog (mouse)-like, putative transmembrane signal transduction protein
15.61996	RP11-100F10	NW_926473	No function
12.38929	CG32736-PA, isoform A	NW_921651	No function
11.81508	OR7C1	NM_198944.1	Olfactory receptor family 7 subfamily C member 1
11.7246	REP2	NW_925473	Choroideremia-like (Rab escort protein 2)
11.53846	MSI2	NW_926894	Musashi homolog 2
10.36625	PDE1B	NM_000924.2	Calmodulin-dependent phosphodiesterase 1B
10.24125	AADAT	NW_922217	Amino adipate aminotransferase (kynurenine aminotransferase II),
8.993228	KIF1C	NW_926584.	Kinesin family member 1C
8.883747	KREMEN2	NM_172229.1	Protein with strong similarity to kringle containing transmembrane protein 2 (mouse Kremen2)
8.883314	CCR2	NW_926128	CC chemokine receptor 2
8.725256	CIT987SK-A- 61E3	NW_926151	No function
8.623077	MPPED2	NW_925006	Protein expressed prominently in fetal brain
8.583794	NLGN4Y	NT_011875	Protein with very strong similarity to neuroligin 4 (human NLGN4X)
8.302211	FCRL2	NW_925683	Fc receptor-like protein 2
8.064457	EHD1	NT_033903	EH-domain containing 1
8.06414	LANL	NT_037887	No function
8.017493	CRSP3	NM_015979.2	Cofactor required for Sp1 transcriptional activation subunit 3
7.844358	C3HC4	NW_921618	No function
7.411523	LOC731223	XM_001128868.1	No function

Table 2. 発現抑制によりヒト培養細胞にメチル水銀耐性を与えると予想される上位20種の遺伝子

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

メチル水銀毒性を増強する因子 Whi2 の作用機構

分担研究者 黄 基旭 東北大学大学院薬学研究科助教

我々は、細胞内での蛋白質分解システムの一つである、ユビキチン・プロテアソームシステムにおいてユビキチン転移酵素として機能する Cdc34 の高発現が酵母およびヒト細胞にメチル水銀耐性を与えることを見出し、細胞内に存在するメチル水銀毒性増強蛋白質のユビキチン・プロテアソームシステムによる分解の促進によってメチル水銀毒性が軽減されることを明らかにしている。したがって、このメチル水銀毒性を増強させる蛋白質を同定することによって、メチル水銀毒性の発現機構を解明するうえでの重要な手掛かりが得られるものと思われる。そこで本研究では、まず、酵母遺伝子欠損株ライブラリーを用いてユビキチン・プロテアソームシステムによって分解されるメチル水銀毒性増強蛋白質の検索を行った。その結果、Hom3 および Whi2 を同定することに成功し、そのうち、Whi2 が Cdc34 依存的にユビキチン化された後にプロテアソームで分解される可能性が示された。すなわち、Cdc34 高発現によるメチル水銀耐性獲得はユビキチン・プロテアソームシステムの亢進により、Whi2 の分解が促進された結果であると考えられる。次に、Whi2 のメチル水銀毒性増強機構を解明するために、Whi2 と結合することが報告されている蛋白質の遺伝子欠損が酵母のメチル水銀感受性に与える影響を検討したところ、Akr1 を欠損した酵母が正常酵母に比べて高い感受性を示した。また、WHI2 欠損酵母はメチル水銀に対して耐性を示すが、この耐性は Akr1 を同時に欠損させることにより認められなくなった。この結果から、Whi2 は Akr1 が示すメチル水銀毒性軽減作用を阻害している可能性が考えられる。さらに、正常酵母で認められる Cdc34 高発現によるメチル水銀耐性獲得が Akr1 の欠損によって認められなくなったことから、Cdc34 高発現による酵母のメチル水銀耐性獲得機構には Akr1 が必要であり、Cdc34 が高発現すると Whi2 の細胞レベルが減少し、Whi2 による Akr1 の活性抑制の程度が低下するために、Akr1 のメチル水銀毒性軽減作用が十分に発揮されるようになると考えられる。Akr1 はパルミトイルトランスフェラーゼの一つであり、蛋白

質のパルミトイル化はエンドサイトーシスやアポトーシスなどにおいて重要なシグナルとしての役割を果たしている。そこで、Akr1のパルミトイルトランスフェラーゼ活性とメチル水銀毒性について検討したところ、パルミトイルトランスフェラーゼ活性を示さない変異Akr1はメチル水銀毒性軽減作用を示さなかった。次に、メチル水銀毒性軽減に関与するAkr1の基質（パルミトイル化される蛋白質）を検索したところ、Yck1およびYck2(共にカゼインキナーゼIのisoform)が同定された。Yck1とYck2を同時に欠損した酵母はAkr1を欠損した酵母と同程度の高いメチル水銀感受性を示し、この二重欠損酵母にCdc34を高発現させてもメチル水銀耐性は認められなかった。以上の結果から、Cdc34の高発現はYck1およびYck2が関与するシグナル伝達を亢進させることによってメチル水銀毒性を軽減している可能性が考えられる。今後、Yck1およびYck2が関与するシグナル伝達経路の下流に存在するメチル水銀毒性軽減に関わる蛋白質を同定することで、メチル水銀毒性に対する生体防御機構が明らかになるものと思われる。

A. 研究目的

我々は、ユビキチン・プロテアソームシステムがメチル水銀毒性に対する防御機構として重要な役割を果たしていることが明らかにしている。ユビキチン・プロテアソームシステムとは真核生物に広く保存されている蛋白質分解経路である。本システムにおいてはまず、ユビキチン活性化酵素(E1)、ユビキチン転移酵素(E2)およびユビキチンリガーゼ(E3)の三つの酵素の連続した働きによって標的蛋白質にユビキチンを連結させる。そして次に、このユビキチン化蛋白質をプロテアソームが認識して、その蛋白質を分解する(Figure 1)。我々のこれまでの検討結果から、ユビキチン・プロテ

アソームシステムによって分解される蛋白質の中にメチル水銀毒性を増強する蛋白質が含まれている可能性が強く示唆されており、この蛋白質が同定できればメチル水銀による毒性発現機構の解明も期待される。そこで本研究では、ユビキチン・プロテアソームシステムによって分解されるメチル水銀毒性増強蛋白質の同定を試み、Whi2を見出すことに成功した。本稿では、このWhi2の同定と、その機構解析結果を報告する。

B. 実験方法

1. 酵母発現 plasmid の作成

Whi2、Hom3、HA-tag 融合 Whi2 および HA-tag 融合 Hom3 を酵母で発現させ

るための発現 plasmid は、酵母 2 μ 系 vector pKT10(*URA3*)の制限酵素 Pvu II 認識部位に、PCR によって増幅したそれぞれの ORF を挿入する方法で作製した。PCR は酵母 chromosomal DNA を template として行った。反応後、それぞれの PCR 産物をアガロース電気泳動後、目的サイズの DNA 断片をゲルより切り出し、Geneclean II kit を用いて精製した。得られた DNA 断片と、予め Pvu II で切断後精製しておいた pKT10 を DNA ligation kit ver. 2 を用いて連結し、大腸菌 (XL1-blue) に導入した。Competent cell 溶液 100 μ L にプラスミド溶液を加え、氷上に 30 分静置した後、42°C で 45 秒間の熱ショックをかけ、さらに氷上に 2 分間静置した後、ampicillin sodium salt 100 μ g/mL を含む LB 寒天培地に塗布し、37°C で一晩培養した。形成されたコロニーを ampicillin sodium salt 100 μ g/mL を含む LB 培地 2 mL で一晩振盪培養した後、GenElute™ Plasmid Miniprep Kit を用いて大腸菌より plasmid を回収した。発現はそれぞれの欠損酵母株に導入後、メチル水銀に対する感受性が正常酵母と同程度になることで確認した。HA-tag 融合蛋白質については抗 HA 抗体を用いた Western blotting で確認した。

Vid28 を酵母で発現させるための発現 plasmid は、PCR によって増幅したそれぞれの ORF を pTarget vector を用いて TA cloning を行った後、制限酵素 BamH I で切断後 blunting を行い、さらに Kpn I で切断後、予め EcoR I で切断後 blunting を行い、さらに Kpn I で切断後精製しておいた pKT10 と連結する方法で作製した PCR は以下に示す primer を用いて行った。発現は *VID28* 欠損酵母株に導入後、メチル水銀に対する感受性が正常酵母と同程度になることで確認した。

Hom2 を酵母で発現させるための発現 plasmid は、PCR によって増幅したそれぞれの ORF を pTarget vector を用いて TA cloning を行った後、制限酵素 Sal I /Xho I で切断後、予め Sal I /Xho I で切断後精製しておいた pKT10 と連結する方法で作製した。PCR は以下に示す primer を用いて行った。発現は *HOM2* 欠損酵母株に導入後、メチル水銀に対する感受性が正常酵母と同程度になることで確認した。

2. 酵母への plasmid の導入

酵母 (BY4742 株) の形質転換は酢酸リチウム法 (Gietz et al., 1992) により行った。まず、酵母株を完全培地である YPD 培地 2 mL に植菌し 30°C で

一晚振盪培養した後、この培養液を YPD 培地で 2×10^6 cells/mL となるように希釈した。この希釈培養液 50 mL を 1×10^7 cells/mL になるまで振盪培養した後集菌し、滅菌水で洗浄した。これを 100 mM 酢酸リチウム溶液で 2×10^9 cells/mL となるように懸濁し、気相中、 30°C で 15 分間培養した。この懸濁液 50 μL に該当遺伝子を組み込んだ発現 vector 1 μg 、加熱変性サケ精子 DNA 50 μg および 40% polyethylene-glycol 300 μL を加え、 30°C で 30 分間培養した。その後、 42°C で 15 分間の熱ショックをかけた後に集菌し、100 μL の滅菌水で懸濁して SD 寒天培地に塗布し、 30°C で 2 日間培養した。

3. 酵母からの chromosomal DNA の抽出

酵母からの chromosomal DNA の抽出は glass-beads 法 (Hoffman et al., 1993) によって行った。まず、single colony を SD 培地 2 mL に植菌し、 30°C で一晚振盪培養した後、集菌して breaking buffer 200 μL に懸濁した。これに phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1) 200 μL および glass-beads 0.5 g を加え 3 分間激しく攪拌した後、12,000 $\times\text{g}$ で 5 分間遠心

して水層の plasmid 溶液を ethanol 沈殿し、滅菌蒸留水を加えて 300 μL とした。

4. 寒天培地でのメチル水銀に対する感受性試験

空 vector pKT10 のみを導入した株、もしくは何らかの蛋白質をコードする遺伝子を組み込んだ pKT10 を導入した株、それぞれの株を SD 培地 2 mL に植菌し 30°C で一晚振盪培養した後、 1×10^6 cells を YPD 培地 900 μL に植菌した後、滅菌水または 10、20、30、40、50 μM の塩化メチル水銀を 100 μL 加えた (final : 0、1、2、3、4、5 μM となる)。 30°C で 3 時間静置培養した後、集菌し、100 μL の滅菌水で懸濁し、 1×10^7 cell/mL となるように希釈し、5 μL スポットティングした。(final : 5×10^4 cells/spot となる)。気相インキュベーターを用いて 30°C で培養後、観察した。

5. 液体培地でのメチル水銀に対する感受性試験

空 vector pKT10 のみを導入した株、又は何らかの蛋白質をコードする遺伝子を組み込んだ pKT10 を導入した株を SD 培地 2 mL に植菌し 30°C で一晚振盪培養した後、 5.56×10^4 cell/mL と

なるように YPD 培地で希釈した。0、2、3、4、5、6、7、8 μM にそれぞれ希釈した塩化メチル水銀を 96 well plate に 20 μL ずつ分注した (final: 0、200、300、400、500、600、700、800 nM)。酵母を希釈した培養液を 96 well plate にそれぞれの希釈系列に対して 3 well ずつ 180 μL 分注した (final: 1×10^4 cell/well)。その後、気相インキュベーターを用いて 30°C、48 時間、72 時間培養後、濁度を測定 (A600) した。

6. 蛋白質抽出

空 vector pKT10 のみを導入した株、又は何らかの蛋白質をコードする遺伝子を組み込んだ pKT10 を導入した株を SD 培地 2 mL に植菌し 30°C で一晩振盪培養した後、50 mL の SD 培地に再び植菌し 30°C で OD600 が 0.5~1.0 になるまで振盪培養した。集菌し、滅菌水で洗浄後、10% TCA 1 mL を加え氷上に 30 分放置した。その後 TE で中性になるまで洗浄後、assist tube に移し、薬さじ約 2 杯分のガラスビーズと 450 μL の TE を加えた。Tomy MS-100R を用いて 5 分間、1500 $\times g$ で酵母を破碎後、懸濁液 150 μL を別のチューブに移し、50 μL の lysis buffer を加え、5 分間 100°C で加熱した。その後、

13000 $\times g$ で 5 分間遠心分離し、上澄を 100 μL 取り 900 μL Triton lysis buffer を加え、蛋白質液とした。DC protein assay kit を用いて蛋白質量を定量後、蛋白質量が一定となるように滅菌蒸留水と 2 \times sample buffer で希釈した。5 分間 100°C 加熱し、SDS-PAGE 用サンプルとした。

7. 免疫沈降

蛋白質抽出し、DC protein assay kit を用いて蛋白質量を定量後、2 mg/mL となるように TBS で希釈し、30 μL 分の予め TBS で 3 回洗浄した anti-HA high affinity matrix を加え、4°C、2 時間培養した。その後、5 回 TBS で洗浄した後、ビーズを含めて全量が 70 μL となるように TBS、2 \times sample buffer を加えた (beads: 20 μL 、TBS: 25 μL 、2 \times sample buffer: 25 μL)。100°C、5 分間加熱し、SDS-PAGE 用サンプルとした。このうち、1well につき 20 μL を用いた。

8. Immunoblotting

7.5%または 10%のポリアクリルアミドゲルを用いて 30 mA/枚で電気泳動を行った。SDS-PAGE 後、semi-dry 型 blotting 装置を用いて transfer した後に、その membrane を blocking

solution に浸して 3 時間、blocking した後に 1 次抗体液 (任意の希釈) に浸し、約半日間振盪した。TTBS で 2 回、TBS で 1 回、それぞれ 15 分間振盪して洗浄した後に HRP 標識化 2 次抗体液 (2000 倍希釈) に浸し、1 時間振盪した。TTBS で 2 回、TBS で 1 回、それぞれ 15 分間振盪して洗浄した後に ECL reagent を用いて化学発光させ、Versa Doc で検出した。

9. 遺伝子二重欠損酵母株 (*WHI2/AKR1*, *YCK1/YCK2*) の作製

分裂酵母 (*Saccharomyces pombe*) 由来の *HIS5* 遺伝子を持つ plasmid pUG27 のプロモーターおよびターミネーターの塩基配列と、欠損株で用いた kanamycin 耐性遺伝子のプロモーターおよびターミネーターの塩基配列が同じであることを利用した。*HIS5* フラグメントを PCR によって作製し、PCR 産物を *AKR1* 欠損株、*YCK1* 欠損株に酢酸リチウム法により導入することによって得られた histidine 非要求性コロニーを kanamycin 耐性遺伝子マーカーが *HIS5* 遺伝子マーカーで置き換わった遺伝子欠損株候補とした。これら遺伝子の *HIS5* 遺伝子マーカーへの置換の確認を行うために glass beads 法によって遺伝子欠損株候補酵

母から chromosomal DNA の回収を行った。得られた chromosomal DNA 溶液を template として *AKR1* 遺伝子、*YCK1* 遺伝子の外側に設計した primer (primer A) を用いて *AKR1* 遺伝子、*YCK1* 遺伝子領域を PCR により増幅し、その PCR 産物の大きさをアガロースゲル電気泳動で調べることにより、*HIS5* マーカーを含む *AKR1* 欠損株および *YCK1* 欠損株が作製されたことを確認して、この確認のための PCR 産物を二重欠損酵母株作製に用いた。

PCR 産物を酢酸リチウム法により酵母に導入した。*WHI2* 欠損株に *AKR1* 欠損株から得られた PCR 産物を、*YCK2* 欠損株に *YCK1* 欠損株から得られた PCR 産物を導入し、得られた histidine 非要求性コロニーを遺伝子欠損株の候補コロニーとした。*AKR1* または *YCK1* の欠損の確認するために、glass beads 法によって酵母から chromosomal DNA の回収を行った。*AKR1* または *YCK1* の欠損の確認は、得られた DNA 溶液を template として primer A のさらに外側に設計した primer (primer B) を用いて *AKR1* または *YCK1* 領域を PCR により増幅し、その PCR 産物の大きさをアガロースゲル電気泳動で調べることにより行った。

10. Akr1 変異体発現 plasmid の作製

Akr1 変異体発現 plasmid は Quik Change™ Site-Directed Mutagenesis Kit の protocol に従い、template は FLAG-AKR1/pKT10 を用い、下記に示す反応条件および目的の塩基配列に変異が導入されている primer を用いて PCR を行うことで作製した。その後、Dpn I 処理にて鋳型 plasmid を消化し、PCR 産物をアガロース電気泳動後、ゲルより切り出し GeneClean II kit を用いて精製した。その後は第二章と同様の方法で大腸菌に PCR 産物を導入した後、plasmid を精製した。変異の導入は sequence により確認した。発現は酵母株に導入後、抗 FLAG 抗体を用いた Western blotting で確認した。

C. 結果

1. ユビキチン・プロテアソームシステムによって分解されるメチル水銀毒性増強蛋白質の検索

1-1. メチル水銀毒性増強蛋白質の同定

酵母遺伝子は約 6000 であるが、そのうち欠損可能な遺伝子をそれぞれ欠損させた酵母遺伝子欠損株ライブラリー約 4800 株についてそれぞれのメチル水銀に対する感受性を調べた

ところ、44 種の遺伝子をそれぞれ欠損した酵母がメチル水銀に対して正常酵母に比べて耐性を示した (Figure 3)。それら遺伝子を産物の機能で分類すると次のようになる：細胞周期に関与する *ACE2*, *BAR1*, *FIS1*, *GVP36*, *LOC1*, *WHI2* および *APL2*、蛋白質輸送に関与する *GOS1*、アミノ酸合成に関与する *CDA2*, *FMC1*, *HOM2*, *HOM3* および *MET31*、リボソーム蛋白質に関与する *CGR1*, *RPS12* および *RPS24B*、トランスポーター *DPL1*, *DUR3*, *FCY22*, *FUR4*, *GON3*, *TPO2* および *YIL006W*、ヒストン *HHT2*、シグナル伝達に関与する *IRS4* および *RIM15*、脂質代謝に関与する *OSH3* および *RHR2*、糖代謝に関与する *REG2* および *VID28*、電子伝達に関与する *RIP1*、転写因子 *POG1*, *TIF2*, *ROX1* および *SNL1* や機能不明である *TOS11*, *YIL029C*, *YIL077C*, *YDR506C*, *YDL121C*, *YEL043W*, *YOL125W* および *YHL005C* の 44 種である (Table1-4)。アフィニティークロマトグラフィー法を用いてユビキチンと結合する蛋白質を検討した結果が報告されているので、上記遺伝子の産物の中でこの報告に含まれるものを調べたところ、Hom2、Hom3、Vid28 および Whi2 がそれに相当した。そこで *HOM2*, *HOM3*, *VID28* または *WHI2* をそれぞれ欠損させた酵母を用いて、液体培地での増殖度合いおよび寒天培地でのコロニー形成によるメチル水銀感

受性を再度調べたところ、いずれの酵母もメチル水銀に対して耐性を示すことが確認された (Figures 4-1, 4-2)。次に、Hom2、Hom3、Vid28 または Whi2 を高発現する酵母を作製し、それらのメチル水銀に対する感受性を検討した。その結果、Hom2 または Vid28 を高発現させた酵母のメチル水銀に対する感受性は正常酵母と同程度であったが、Hom3 または Whi2 を高発現させた酵母は正常酵母と比較してメチル水銀に対して高い感受性を示した (Figures 5-1, 5-2)。これらの結果から、Hom3 および Whi2 はメチル水銀毒性増強蛋白質であり、かつ、その細胞内レベルがユビキチン・プロテアソームシステムによって調節されている可能性が考えられる。

1-2. Hom3 および Whi2 の細胞内でのユビキチン化の検討

Hom3 および Whi2 はユビキチンと結合することから、細胞内でポリユビキチン化を受け、プロテアソームで分解される可能性が考えられる。そこでまず、Hom3 および Whi2 の細胞内でのユビキチン化の確認を行った。HA-tag を融合した Hom3 または Whi2 を高発現させた酵母から蛋白質を抽出し、抗 HA 抗体で免疫沈降を行った後、抗ユビキチン抗体を用いた Western blotting によ

り両蛋白質のユビキチン化を検出したところ、高分子量側にスメア状のバンド (様々な数のユビキチンが連結された蛋白質の存在による) が検出された (Figure 6)、本研究条件下においても両蛋白質が細胞内でユビキチン化を受けることが確かめられた。

2. メチル水銀毒性増強蛋白質 Hom3 および Whi2 とユビキチン転移酵素 Cdc34 との関係

我々は、ユビキチン転移酵素の一つである Cdc34 を細胞内に高発現させると、細胞内のユビキチン・プロテアソームシステムが亢進し、メチル水銀毒性を増強すると考えられる何らかの蛋白質の分解が促進されるために、その細胞はメチル水銀に対して耐性を示すようになることを報告している。前章の研究によって、Hom3 および Whi2 がユビキチン・プロテアソームシステムによって分解されるメチル水銀毒性増強蛋白質として同定されたが、これらが Cdc34 高発現によって分解促進される蛋白質である可能性も否定できない。そこで、Cdc34 高発現が Hom3 および Whi2 の細胞内レベルまたはユビキチン化量に与える影響を検討した。

まず、正常酵母、*HOM3* 欠損酵母および *WHI2* 欠損酵母に Cdc34 を高発現させた後、メチル水銀に対する感受性を

検討した。その結果、*HOM3* 欠損酵母では正常酵母と同様に *Cdc34* を高発現させることで強いメチル水銀耐性が認められたが、*WHI2* 欠損酵母では *Cdc34* 高発現によるメチル水銀耐性が認められなかった (Figure 7)。このことから、*Cdc34* 高発現によるメチル水銀耐性獲得には *Whi2* が必要であると考えられる。一方、細胞内の *Hom3* の有無に関わらず、*Cdc34* 高発現によるメチル水銀耐性獲得が認められたことから、*Hom3* と *Cdc34* は異なる機構によってメチル水銀毒性に関与していると考えられる。

次に *Cdc34* 高発現が *Whi2* または *Hom3* の細胞内レベルおよびユビキチン化量に与える影響を検討した。正常酵母または *Cdc34* 高発現酵母に HA-tag を融合した *Hom3* または *Whi2* を導入し、それらの酵母から蛋白質を抽出して、抗 HA 抗体で免疫沈降を行った後に、抗 HA 抗体または抗ユビキチン抗体を用いた Western blotting により両蛋白質の細胞内レベルおよびユビキチン化量を調べた。その結果、*Hom3* の細胞内レベルおよびユビキチン化量は *Cdc34* を高発現させでもほとんど変動しなかったが、*Whi2* の細胞内レベルおよびユビキチン化量は *Cdc34* を高発現させることによって共に減少した (Figure 8)。*Whi2* の細胞内レベルの減少は *Cdc34* 高発現によりユビキチン・

プロテアソームシステムを介した *Whi2* の分解が亢進した結果であると思われる。なお、*Whi2* のユビキチン化量も *Cdc34* 高発現によって減少したが、*Whi2* 蛋白質量に対するユビキチン化 *Whi2* 量の値は *Cdc34* 高発現によってさほど大きな変動を示していないことから、これは *Whi2* 蛋白質量の減少に付随したものと考えられる。

メチル水銀毒性増強蛋白質として同定された *Whi2* が細胞内でユビキチン化を受け、かつ、その分解が *Cdc34* の高発現によって促進されることが判明した。そこで次に、*Whi2* がユビキチン化を受けた後に、プロテアソームによって分解されるか否かを検討した。検討には、プロテアソーム活性が低い *RPN10* 欠損酵母を用いた。*Rpn10* はプロテアソームに存在するユビキチン鎖を認識するレセプターであり、*RPN10* 欠損酵母では一部のユビキチン化を受けた蛋白質の分解が抑制されることが知られている。まず、正常酵母および *RPN10* 欠損酵母に *Cdc34* を高発現させ、メチル水銀に対する感受性を検討した。その結果、正常酵母では *Cdc34* 高発現によるメチル水銀耐性が認められたが、*RPN10* 欠損酵母では *Cdc34* 高発現による耐性は認められなかった (Figure 9)。この結果から *Cdc34* 高発現によるメチル水銀耐性獲得には *Rpn10* が必要であり、*RPN10* 欠

損酵母では Cdc34 高発現によってユビキチン化が亢進されたメチル水銀毒性増強蛋白質の分解が正常に行われない可能性が考えられる。そこで、正常酵母および *RPN10* 欠損酵母に HA-tag を融合した Whi2 および Cdc34 を高発現させ、Figure 8 と同様の方法で Whi2 の細胞内レベルおよびユビキチン化量を検討した。その結果、正常酵母では Figure 8 と同様に Whi2 の細胞内レベルおよびユビキチン化量は Cdc34 を高発現させることによって共に減少したが、*RPN10* 欠損酵母では Whi2 の細胞内レベルが正常酵母に比べて増加し、Cdc34 を高発現させても Whi2 レベルの減少はほとんど認められなかった (Figure 10)。また、*RPN10* 欠損酵母では Whi2 のユビキチン化量が Cdc34 を高発現させることにより、顕著に増加した (Figure 10)。以上のことから、メチル水銀毒性増強蛋白質である Whi2 は細胞内で Cdc34 依存的にユビキチン化された後にプロテアソームで分解されると考えられる。また、ユビキチン化された Whi2 のプロテアソームでの分解には Rpn10 が関わっていると思われる。

3. Whi2 が示すメチル水銀毒性増強作用におけるパルミトイルトランスフェラーゼ Akr1 の関与

これまで、Whi2 は細胞周期調節に関与することが知られていたが、少なく

とも Whi2 による細胞周期調節はメチル水銀毒性の増強には関与しないことが明らかとなった。すなわち、Whi2 が有する未知の機能がメチル水銀毒性に関与している可能性が考えられる。そこで、メチル水銀毒性増強に関与する Whi2 の新たな機能を解明するために、データベース (*Saccharomyces* Genome Database または Proteome Bioknowledge Library) 中から Whi2 と結合する蛋白質を調べ、それら蛋白質とメチル水銀毒性との関係を検討した。

3-1. Whi2 結合蛋白質が酵母のメチル水銀感受性に与える影響

メチル水銀毒性に関与する Whi2 の未知なる機能を解明するために、Whi2 と結合することが報告されている蛋白質をコードする遺伝子をそれぞれ欠損させた酵母のメチル水銀に対する感受性を検討した。その結果、*AKR1* 欠損酵母が正常酵母に比べて高いメチル水銀感受性を示した (Figure 11)。Akr1 はパルミトイルトランスフェラーゼの一つであり、蛋白質をパルミトイル化して細胞膜に結合させることによって、細胞内のシグナル伝達などに関与することが知られている。この結果から、Akr1 による蛋白質のパルミトイル化がメチル水銀毒性の軽減に

関与している可能性が考えられる。

3-2. メチル水銀毒性における Whi2 と Akr1 との関係

Whi2 と Akr1 の関係を検討するために、*WHI2/AKR1* 二重欠損酵母を作成してメチル水銀に対する感受性を検討したところ、*WHI2* 欠損酵母で認められたメチル水銀耐性が、*AKR1* の同時欠損 (*WHI2/AKR1*) によって認められなくなり、*WHI2/AKR1* 二重欠損酵母は *AKR1* 欠損酵母とほぼ同程度の高いメチル水銀感受性を示した (Figure 12)。このことから、メチル水銀毒性軽減作用を示す Akr1 の機能を Whi2 が抑制し、その結果として Whi2 がメチル水銀毒性増強作用を示すという可能性が考えられる。

3-3. メチル水銀毒性における Akr1 と Cdc34 との関係

次に、Whi2 の細胞レベルの調節に関わっている Cdc34 と Akr1 との関係を検討するために、正常酵母および *AKR1* 欠損酵母に Cdc34 を高発現させて、メチル水銀に対する感受性を検討した。その結果、正常酵母で認められた Cdc34 高発現によるメチル水銀耐性獲得が、*AKR1* 欠損酵母ではほとんど見られなかった (Figure 13)。以上のこと

から、Cdc34 高発現による酵母のメチル水銀耐性獲得機構には Akr1 が必要であり、Cdc34 が高発現すると Whi2 の細胞レベルが減少するため、Whi2 による Akr1 の活性抑制の程度が低下し、Akr1 のメチル水銀毒性軽減作用が十分に発揮されるようになると考えられる。

3-4. Akr1 が示すメチル水銀毒性軽減作用におけるパルミトイルトランスフェラーゼ活性の役割

Akr1 はパルミトイルトランスフェラーゼの一つであり、その活性がメチル水銀毒性軽減に重要な役割を果たしている可能性が考えられる。Akr1 にはパルミトイルトランスフェラーゼ活性に必要とされる DHYC ドメインが存在し、そのドメインに変異を入れると Akr1 のパルミトイルトランスフェラーゼ活性が消失することが報告されている。そこで、Akr1 の DHYC ドメインに変異を導入した FLAG-tag を融合した 2 種類の Akr1 変異体を作成し、それら変異体の発現を Western blotting で確認した後、正常酵母および *AKR1* 欠損酵母にそれぞれ発現させ、メチル水銀に対する感受性を検討した。高いメチル水銀感受性を示す *AKR1* 欠損酵母に正常な Akr1 を高発現させたところ、メチル水銀に対する感受性

は正常酵母と同程度まで回復したが (Figure 14)、2種類の Akr1 変異体をそれぞれ AKR1 欠損酵母に発現させても AKR1 欠損酵母のメチル水銀感受性にはほとんど影響を受けなかった (Figure 14)。この結果から、Akr1 によるメチル水銀毒性軽減には Akr1 の パルミトイルトランスフェラーゼ活性が重要な役割を果たしていると考えられる。

パルミトイルトランスフェラーゼ活性を持つ酵母蛋白質は Akr1 以外にも複数存在しており、それらの蛋白質によって特異的にパルミトイル化される蛋白質も報告されている。しかし、Akr1 以外のパルミトイルトランスフェラーゼの遺伝子を欠損させても酵母のメチル水銀感受性はほとんど変動しなかった (Figure 15)。したがって、Akr1 のパルミトイルトランスフェラーゼ活性が何らかの理由により、特異的にメチル水銀毒性の軽減に関与していると考えられる。

3-5. Akr1 と結合する蛋白質とメチル水銀毒性の関係

Akr1 によって特異的にパルミトイル化を受ける蛋白質がメチル水銀毒性を軽減している可能性も考えられる。そこで、メチル水銀毒性軽減に関与する Akr1 の基質 (パルミトイル化

される蛋白質) を同定するために、まず Akr1 と結合することが報告されている蛋白質をコードする遺伝子をそれぞれ欠損させた酵母のメチル水銀に対する感受性を検討した。その結果、YCK1 欠損酵母および YCK2 欠損酵母がメチル水銀に対して高い感受性を示した (Figure 16)。また、YCK1/YCK2 二重欠損酵母は、YCK1 欠損酵母または YCK2 欠損酵母よりもさらに高い感受性を示した (Figure 16)。Yck1 および Yck2 はカゼインキナーゼとして機能し、Yck2 は Akr1 によってパルミトイル化を受けることが報告されている。以上のことから、Akr1 による Yck1 および Yck2 のパルミトイル化がメチル水銀毒性軽減において重要な役割を果たしている可能性が考えられる。

3-6. YCK1/YCK2 二重欠損酵母における Cdc34 高発現がメチル水銀感受性に与える影響

YCK1/YCK2 二重欠損酵母のメチル水銀に対する感受性は AKR1 欠損酵母と同程度であり、メチル水銀毒性軽減において Akr1、Yck1 および Yck2 が同一経路で機能している可能性が高い。もし、これらの蛋白質がメチル水銀毒性軽減において同一経路で機能していれば、YCK1/YCK2 二重欠損酵母に Cdc34 を高発現させた場合でも、AKR1 欠損酵