

母の場合と同様にメチル水銀に対する耐性獲得は認められないと予想される。そこで、正常酵母および *YCK1/YCK2* 二重欠損酵母に *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が *YCK1/YCK2* 二重欠損酵母ではほとんど認められなかった (Figure 17)。以上のことから、*Akr1*、*Yck1* および *Yck2* はメチル水銀毒性軽減において同一経路で機能しており、*Akr1* による *Yck1* および *Yck2* のパルミトイル化を介したシグナル伝達がメチル水銀毒性軽減に関与していると考えられる。

D. 考察

メチル水銀毒性増強作用を示し、かつ、細胞内でユビキチン化される蛋白質として、*Hom3* および *Whi2* が同定された。*Hom3* は aspartate kinase (L-aspartate 4-P-transferase) として知られ、methionine、threonine および lysine 合成に関与する蛋白質である。*Whi2* は細胞周期やストレス応答に関与するという報告があるが、詳細な機能は明らかになっていない。一方、*Hom3* および *Whi2* と同様に、欠損によってメチル水銀耐性を与える因子として同定された *Hom2* および *Vid28* は高発現させても酵母のメチル

水銀感受性に影響を与えなかった。したがって、正常酵母における両蛋白質の細胞内レベルはメチル水銀毒性増強作用を示すうえでは十分量に達していると考えられる。しかし、*Hom2* は aspartate-semialdehyde dehydrogenase として知られ、*Hom3* と同様に methionine、threonine および lysine 合成に関与している。*Hom3* 高発現酵母はメチル水銀に対して正常酵母より高い感受性を示したが、*Hom2* 高発現酵母のメチル水銀感受性は正常酵母と同程度であることから、*Hom3* がアミノ酸合成の一連の流れの中での律速酵素である可能性が考えられる。また、methionine、threonine または lysine の代謝産物がメチル水銀毒性に関与している可能性も考えられたが、培地中にこれらのアミノ酸をそれぞれ添加したところ、酵母のメチル水銀感受性には影響が認められなかった (データ示さず)。このことから、*Hom3* および *Hom2* によるメチル水銀毒性増強は両蛋白質のアミノ酸合成に関わる機能以外の働きによるものと考えられる。*Vid28* は糖新生に関与する fructose-1,6-bisphosphatase の分解に関与しており、*Vid28* の欠損により fructose-1,6-bisphosphatase の分解が抑制されることが報告されていることから *Vid28* を欠損した酵母では糖新生が亢進していると考えられる。

我々は、細胞内において解糖系の生成物であるピルビン酸がメチル水銀毒性を増強することを見出している。したがって、*VID28* 欠損酵母がメチル水銀に対して耐性を示す理由として糖新生の亢進に伴う解糖系の抑制によるピルビン酸生成量の減少を考えることもできる。*Vid28* 高発現酵母のメチル水銀に対する感受性が正常酵母と同程度であったのは、解糖系に複数存在する律速酵素の影響で、酵母に *Vid28* を高発現させてもピルビン酸生成量に変動しないためかもしれない。

一方、*Cdc34* 高発現による酵母のメチル水銀耐性獲得に *Whi2* が必要とされることも判明した。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。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ユビキチン鎖のレセプターである *Rpn10* が関与することも示唆された。これまでに *Rpn10* 以外に *Rpn1* および *Rpn2* などがユビキチン鎖のレセプターとして同定されており、各レセプターには基質特異性が存在する可能性が高い。*Rpn10* が *Whi2* の分解に関わる因子であれば、*RPN10* 欠損酵母では *Whi2* の細胞内レベルが上昇し、メチル水銀に対して高い感受性を

示す可能性も考えられたが、*RPN10* 欠損酵母のメチル水銀感受性は正常酵母と同程度であった。当研究室ではユビキチン・プロテアソームシステム関連因子の一つである *Rad23* が、メチル水銀毒性を軽減する蛋白質のユビキチン・プロテアソームシステムを介した分解を抑制することによって、酵母にメチル水銀耐性を与えることを明らかにしている。すなわち、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メチル水銀毒性増強蛋白質と毒性軽減蛋白質が細胞内に共存していると考えられる。このことから、*RPN10* 欠損酵母では両蛋白質のプロテアソームでの分解が共に抑制された結果、正常酵母と同程度のメチル水銀感受性を示した可能性も考えられる。

もう一つのメチル水銀毒性増強蛋白質である *Hom3* のユビキチン化には少なくとも *Cdc34* は関与しないことが示唆された。酵母には *Cdc34* 以外にもユビキチン転移酵素は 12 種存在しており、それぞれのユビキチン転移酵素が関わる蛋白質ユビキチン化には基質特異性がある。また、*Cdc34* 以外のユビキチン転移酵素 *Ubc1*, *Ubc4*, *Ubc5*, *Ubc7* または *Ubc11* を高発現させた酵母も、メチル水銀に対して耐性を示す

ことが明らかになっている。このことから、Hom3 のユビキチン化にはこれらのユビキチン転移酵素のいずれかが関与している可能性が考えられる。また、Whi2 の場合にも、ユビキチン化に関わるユビキチン転移酵素が Cdc34 だけではない可能性も否定できない。

これまで Whi2 は細胞周期や様々なストレス応答に関与することが報告されている。WHI2 欠損酵母では細胞周期に関わる G1 cyclin である Cln1 および Cln2 の転写レベルが亢進されることが知られている。そこで、細胞周期とメチル水銀毒性の関係を検討するため、Cln1 または Cln2 を正常酵母に高発現させ、メチル水銀に対する感受性を検討したところ、その感受性は正常酵母と同程度であった(データ示さず)。また、Whi2 以外にも Whi1 および Whi3 が細胞周期に関与するが、WHI1 欠損酵母および WHI3 欠損酵母のメチル水銀に対する感受性も正常酵母と同程度であった(データ示さず)。以上のことから、Whi2 が示すメチル水銀毒性増強作用は、細胞周期調節機能以外の機能による可能性が考えられる。

Whi2 と結合する蛋白質である Akr1 がメチル水銀毒性を軽減する作用を有し、Whi2 が何らかの機構によってこの Akr1 の機能を抑制することによ

ってメチル水銀毒性を増強している可能性も示された。Cdc34 を高発現させた酵母はメチル水銀耐性を示すが、この現象は Cdc34 高発現によって Whi2 のユビキチン化を介した分解が促進し、その結果、Whi2 によって抑制されていた Akr1 の機能が十分に発揮されるようになったためと考えられる。Akr1 はパルミトイルトランスフェラーゼの一つであり、その酵素群の中では Akr1 のみが特異的にメチル水銀毒性軽減に関与することが示された。パルミトイルトランスフェラーゼは基質となる蛋白質のシステイン残基と細胞膜のパルミチン酸を結合させることによって、その蛋白質を細胞膜に結合させる。細胞膜に結合した蛋白質はシグナル伝達に関与し、エンドサイトーシス、アポトーシス、細胞の分化などに重要な役割を果たす。

本研究において、Akr1 によってパルミトイル化されるカゼインキナーゼである Yck1 および Yck2(共にカゼインキナーゼ I の isoform)が Akr1 と同様にメチル水銀毒性を軽減する作用を有することが示された。カゼインキナーゼは真核生物に広く保存されており、細胞周期、分化、アポトーシスや神経変性疾患などに深く関与していることが知られている。これまでに

Yck1 および Yck2 によってリン酸化を受ける蛋白質が複数同定されているが、それら蛋白質をコードする遺伝子をそれぞれ欠損した酵母のメチル水銀に対する感受性を検討したところ、いずれの欠損酵母も正常酵母と同程度の感受性であった（データ示さず）。今後、両蛋白質によってリン酸化を受け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。

ヒトには *AKR1* のホモログである *HIP14* が同定されており、パルミトイルトランスフェラーゼ活性を有すると共に、脳内で多く発現することが報告されている。さらに、*HIP14* が神経伝達物質の生成および分布に関わる蛋白質の機能を調節していることも報告されていることから、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。現在、siRNA 法を用いたヒト *HIP14* ノックダ

ウン細胞を作製してメチル水銀に対する感受性を検討している。

E. 研究発表

1. 論文発表

なし。

2. 学会発表

福光 徹、黄 基旭、荻原庸介、永沼章：パルミトイルトランスフェラーゼ *Akr1* によるメチル水銀毒性軽減における *Whi2* の関与。フォーラム 2007；衛生薬学・環境トキシコロジー，2007.

福光 徹、黄 基旭、永沼 章：メチル水銀毒性軽減におけるパルミトイルトランスフェラーゼ *Akr1* の役割。第 46 回日本薬学会東北支部大会，2007

F. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

E1: ユビキチン活性化酵素
 E2: ユビキチン転移酵素
 E3: ユビキチンリガーゼ
 Ub: ユビキチン

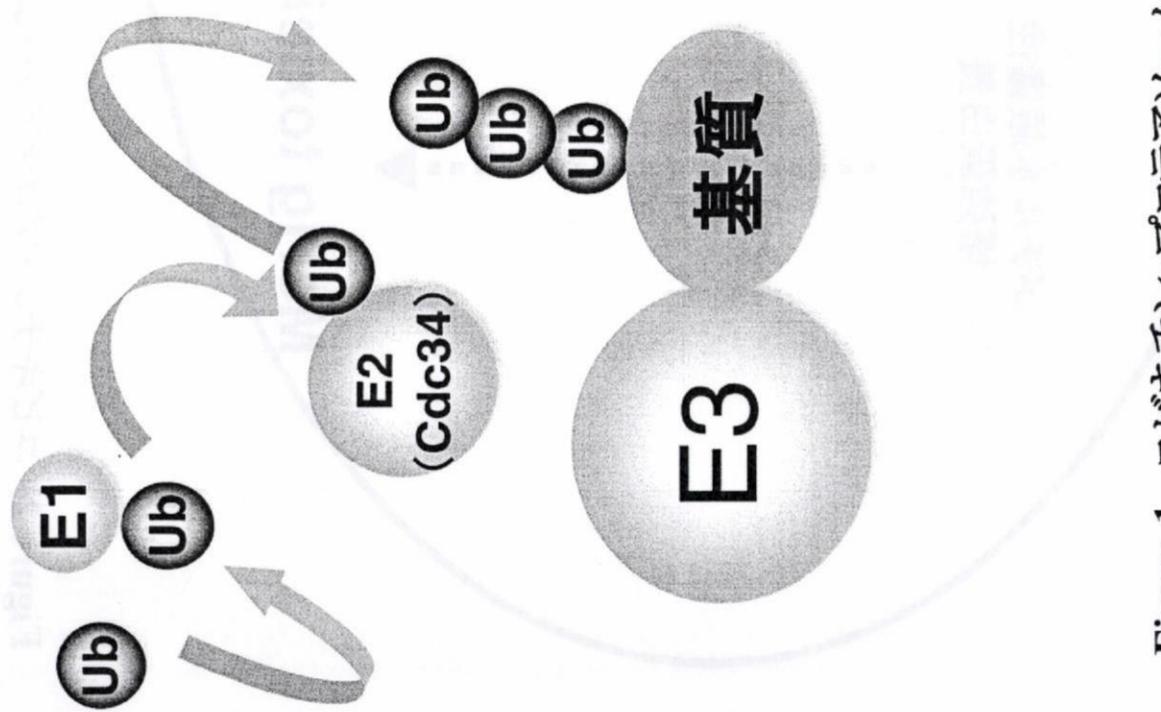


Figure 1. ユビキチン・プロテアソームシステム

ユビキチン活性化酵素であるE1、ユビキチン転移酵素のE2、ユビキチンリガーゼのE3という三つの酵素の連続した働きによって細胞内で蛋白質にユビキチンが連結され、これが分解シグナルとして働き、プロテアソームによる認識を受けて、分解が起こる

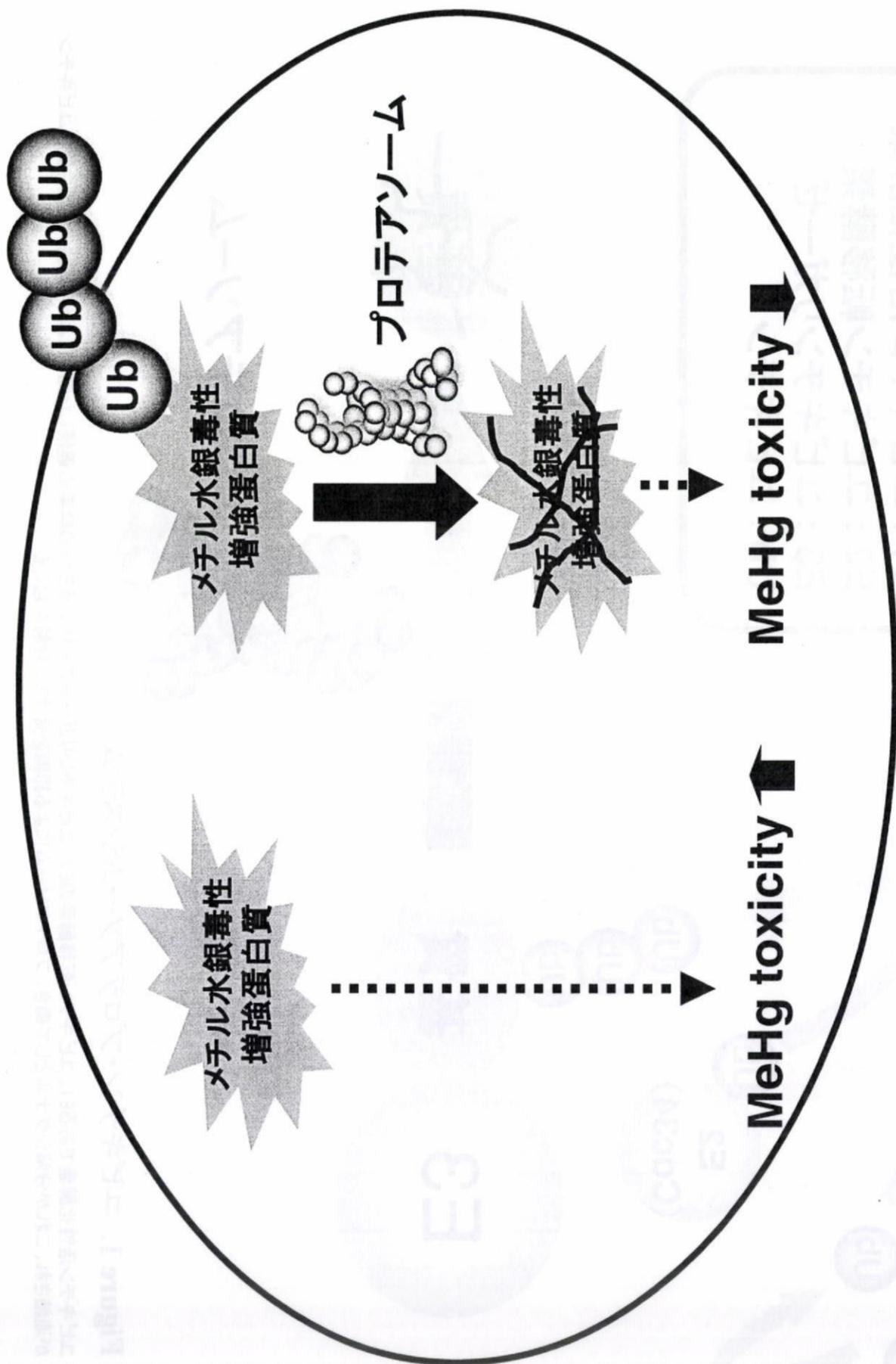


Figure 2. ユビキチン・プロテアソームシステムによるメチル水銀毒性軽減機構のモデル

欠損により酵母にメチル水銀耐性を与えた遺伝子

**ACE2, APL2, BAR1, CDA2, CGR1, DPL1,
DUR3, FCY22, FIS1, FMC1, FUR4, GOS1,
GON3, GVP36, HHT2, HOM2, HOM3, IRS4,
LOC1, MET31, OSH3, POG1, REG2, RHR2,
RIM15, RIP1, ROX1, RPS12, RPS24B, SNL1,
TIF2, TOS11, TPO2, VID28, WHI2, YDL121C,
YDR506C, YEL043W, YHL005C, YIL006W,
YIL029C, YIL077C, YOL125W,**

ユビキチン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
HOM2, HOM3, WHI2, VID28

Figure 3. 酵母遺伝子欠損株ライブラリーを用いたスクリーニング結果

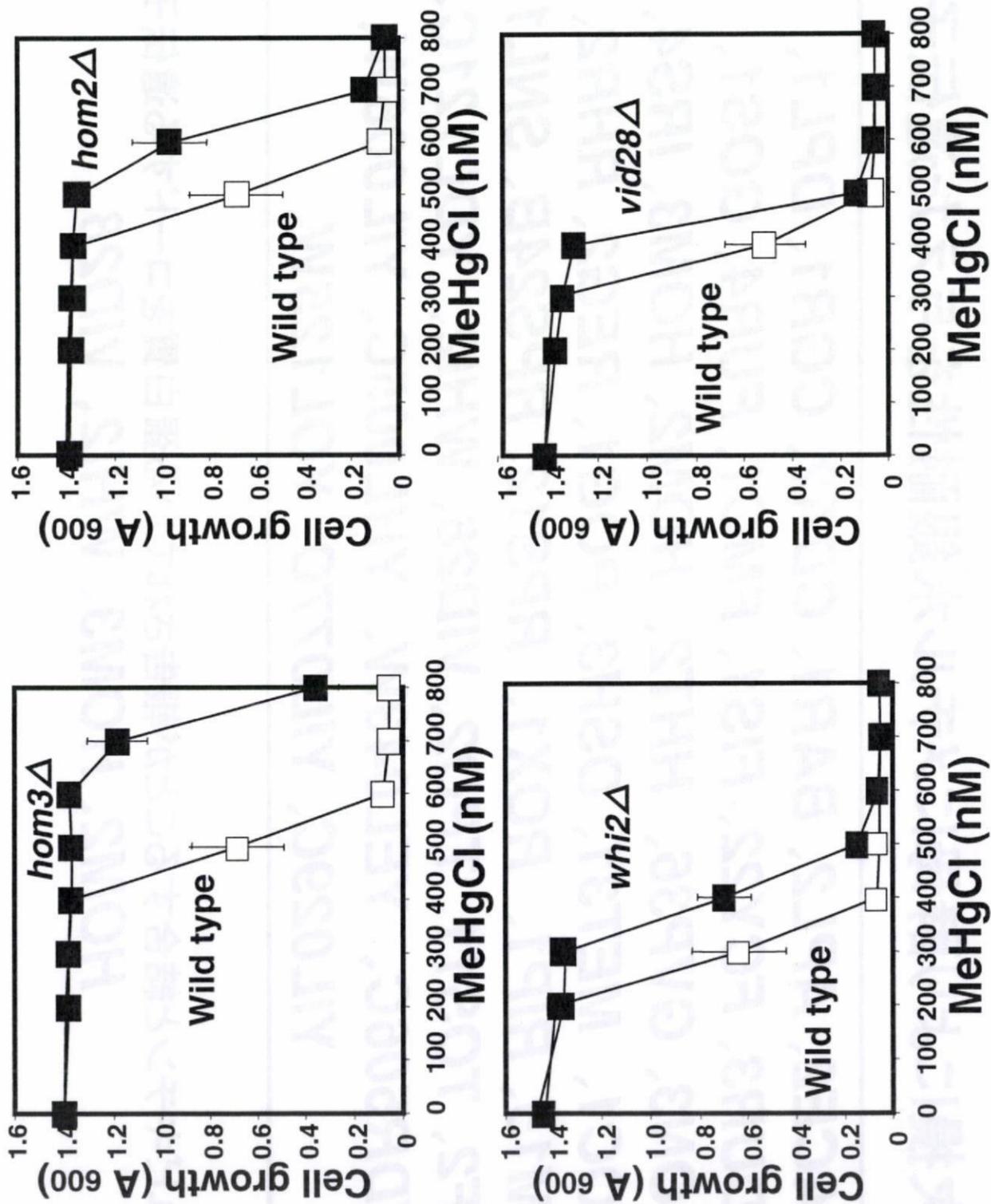


Figure 4-1. HOM2, HOM3, VID28またはWHI2遺伝子の欠損が酵母のメチル水銀感受性に与える影響(1)

1 × 10⁴ cells/wellの酵母を塩化メチル水銀存在下、30°Cで48 時間培養後、濁度を測定 (A600) した。

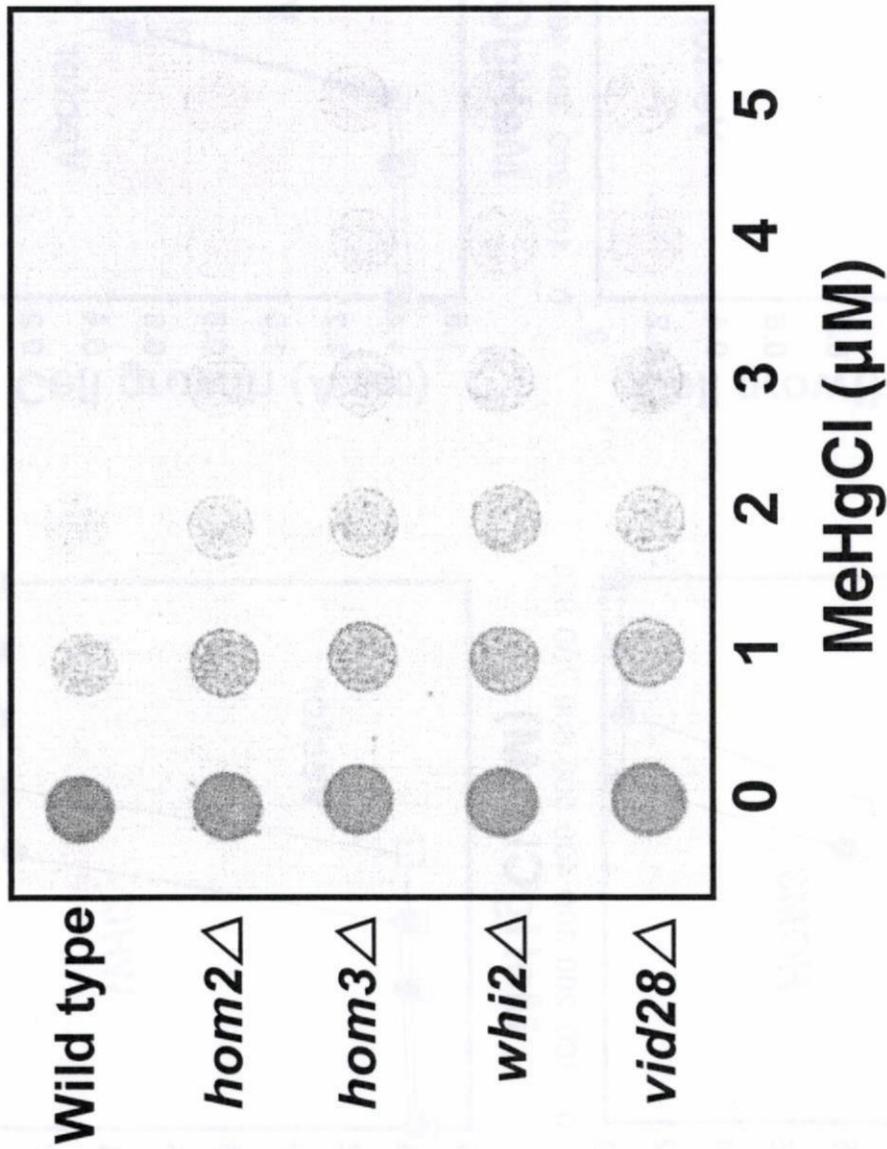


Figure 4-2. HOM2、HOM3、VID28またはWHI2遺伝子の欠損が酵母のメチル水銀感受性に与える影響 (2)
 1×10^6 cells/mLの酵母を1、2、3、4、5 μ Mの塩化メチル水銀存在下、30°Cで3時間静置培養した後、 5×10^4 cells/spotとなるようにスポットイングして、30°Cで培養後、観察した。

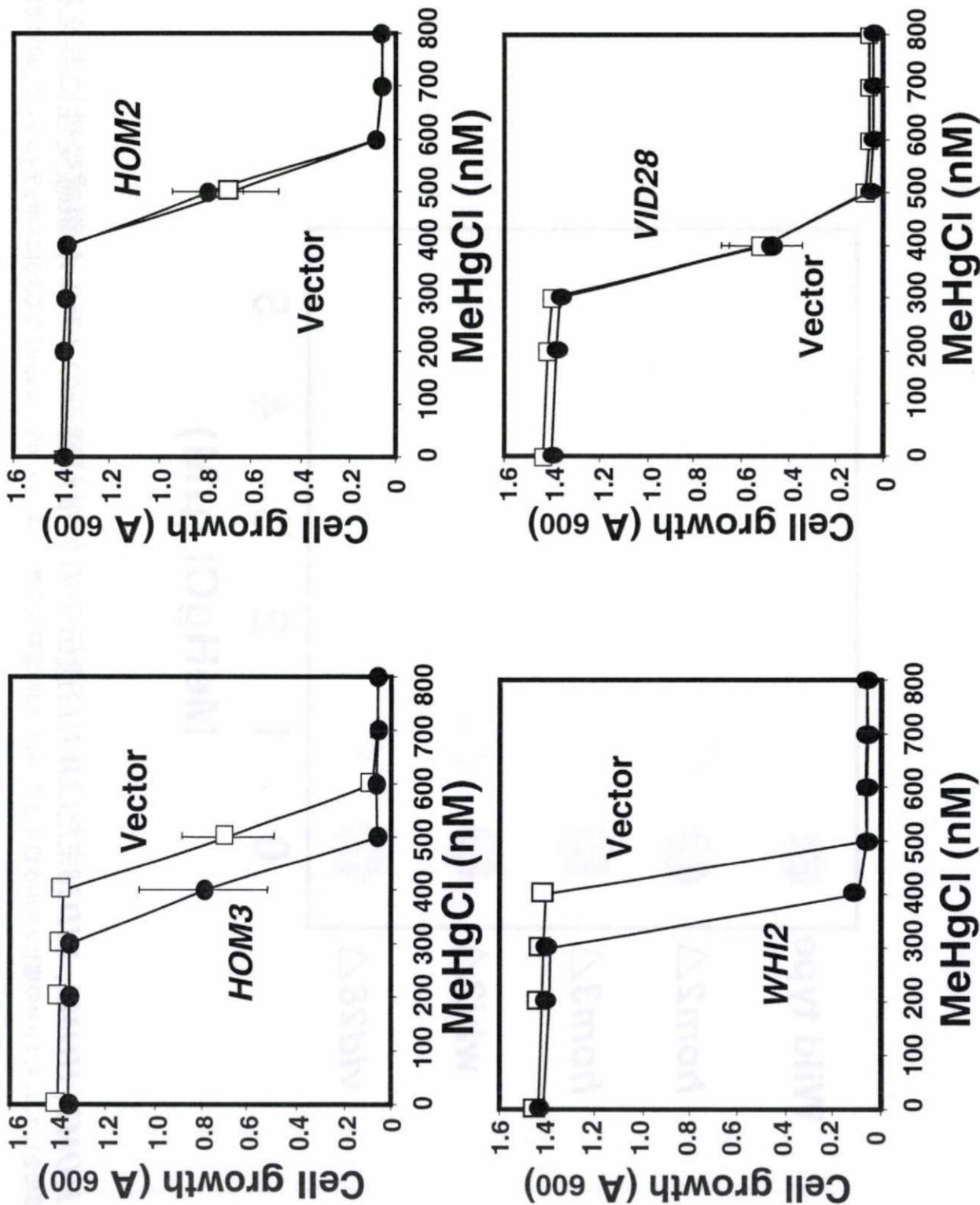


Figure 5-1. Hom2、Hom3、Vid28またはWhi2の高発現が酵母のメチル水銀感受性に与える影響(1)

Hom2、Hom3、Vid28またはWhi2を高発現させた酵母について、Figure 4-1と同様の方法でメチル水銀感受性を検討した。

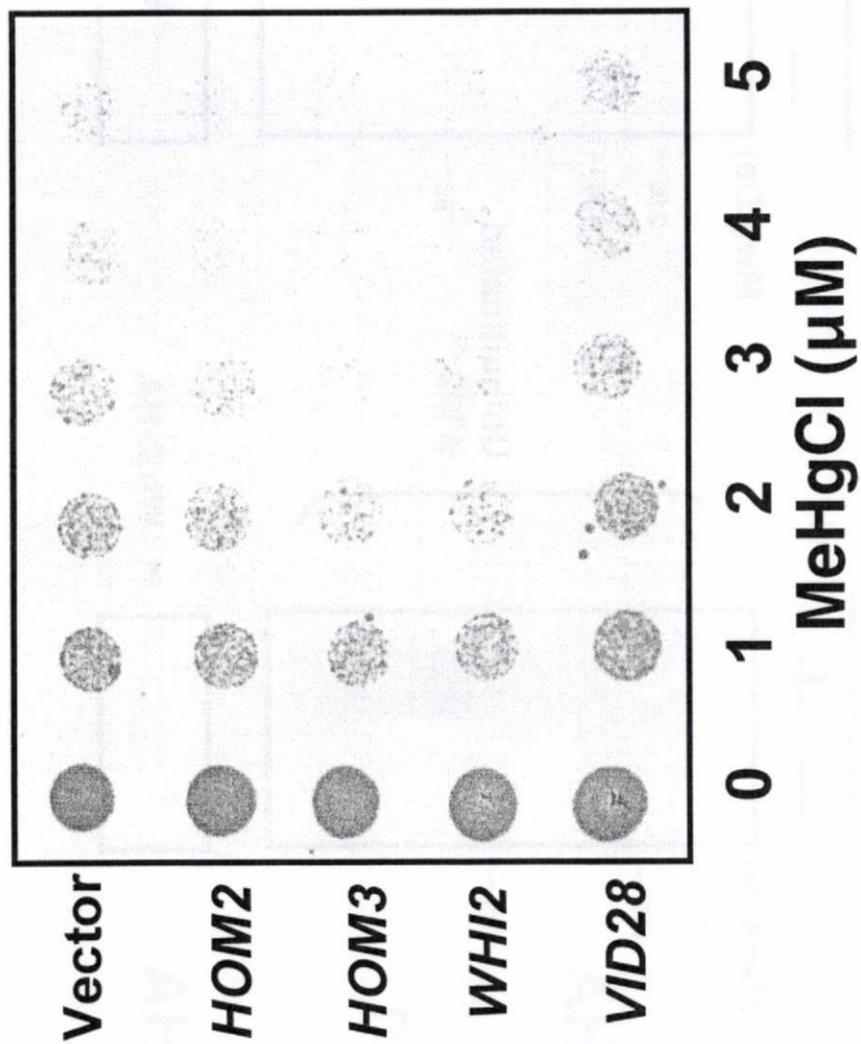


Figure 5-2. Hom2、Hom3、Vid28またはWhi2の高発現が酵母のメチル水銀感受性に与える影響(2)

Hom2、Hom3、Vid28またはWhi2を高発現させた酵母について、Figure 4-2と同様の方法でメチル水銀感受性を検討した。

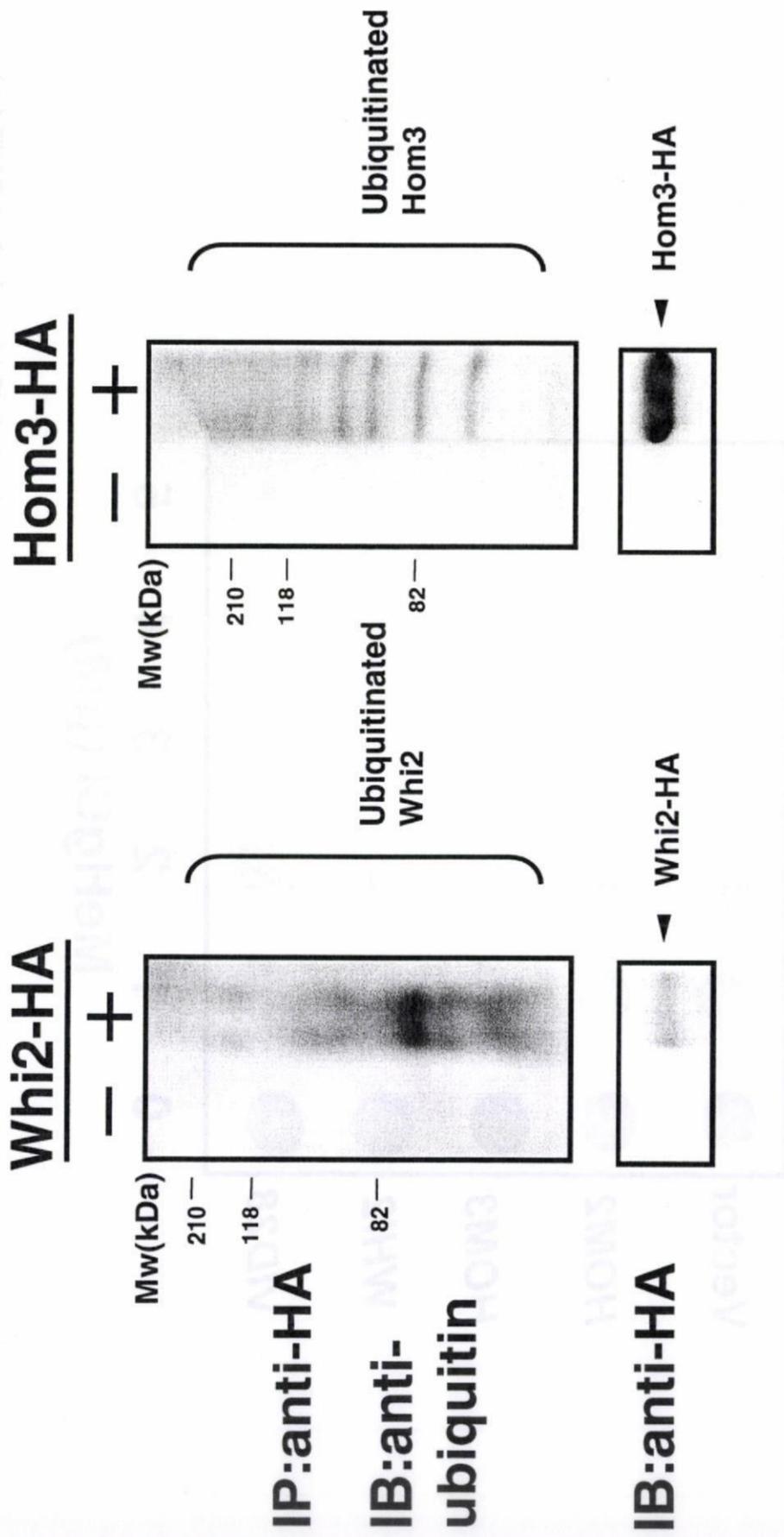


Figure 6. Whi2およびHom3のユビキチン化

Whi2またはHom3にHA-tagを融合させた蛋白質高発現酵母の抽出液について抗HA抗体で免疫沈降を行った後に抗ユビキチン抗体を用いたWestern blottingによりそれぞれの蛋白質のユビキチン化を検出した。

Mw...molecular weight

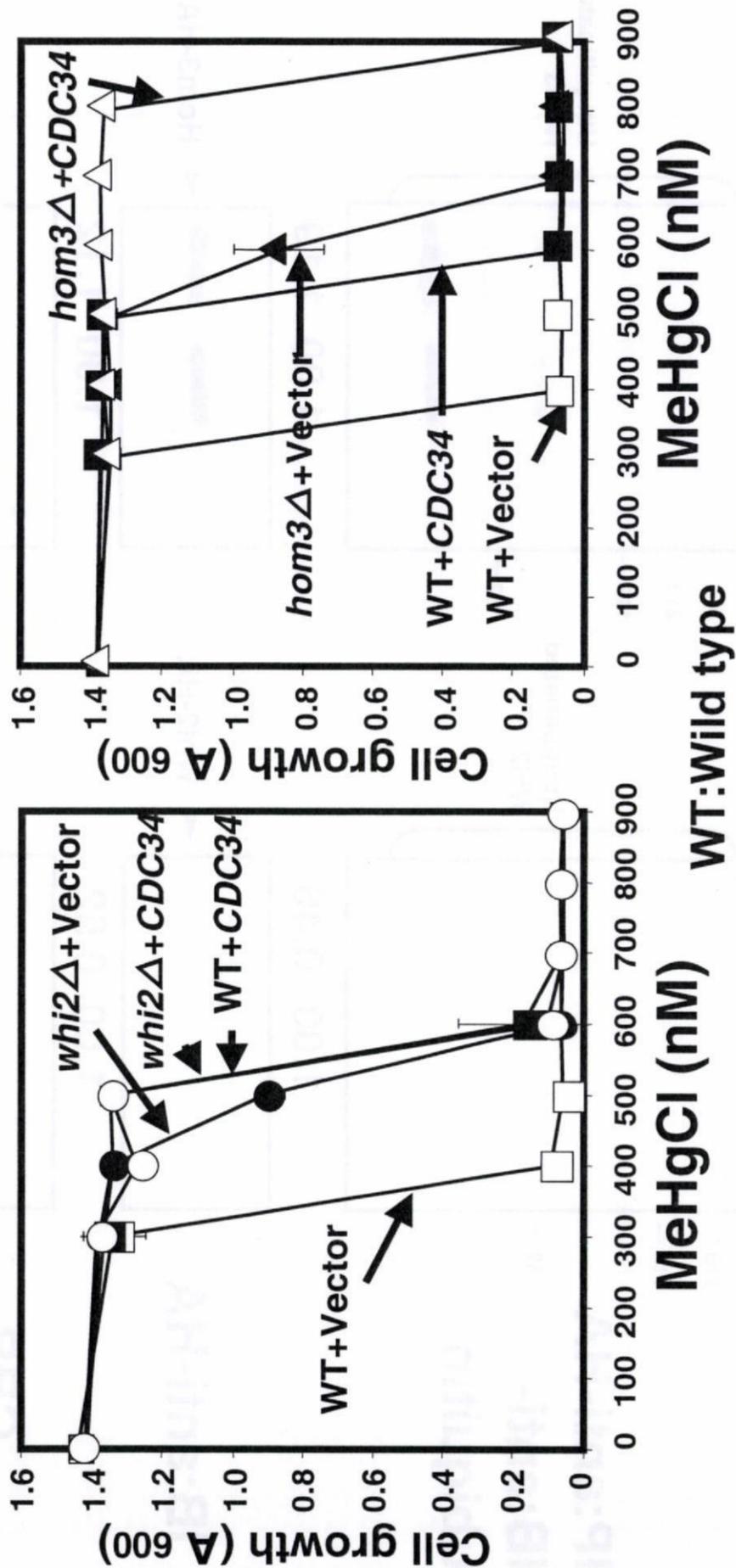


Figure 7. WHI2またはHOM3の欠損酵母がCdc34高発現によるメチル水銀耐性獲得現象に与える影響

WHI2欠損酵母およびHOM3欠損酵母にCdc34を高発現させ、Figure 4-1と同様の方法でメチル水銀感受性を検討した。

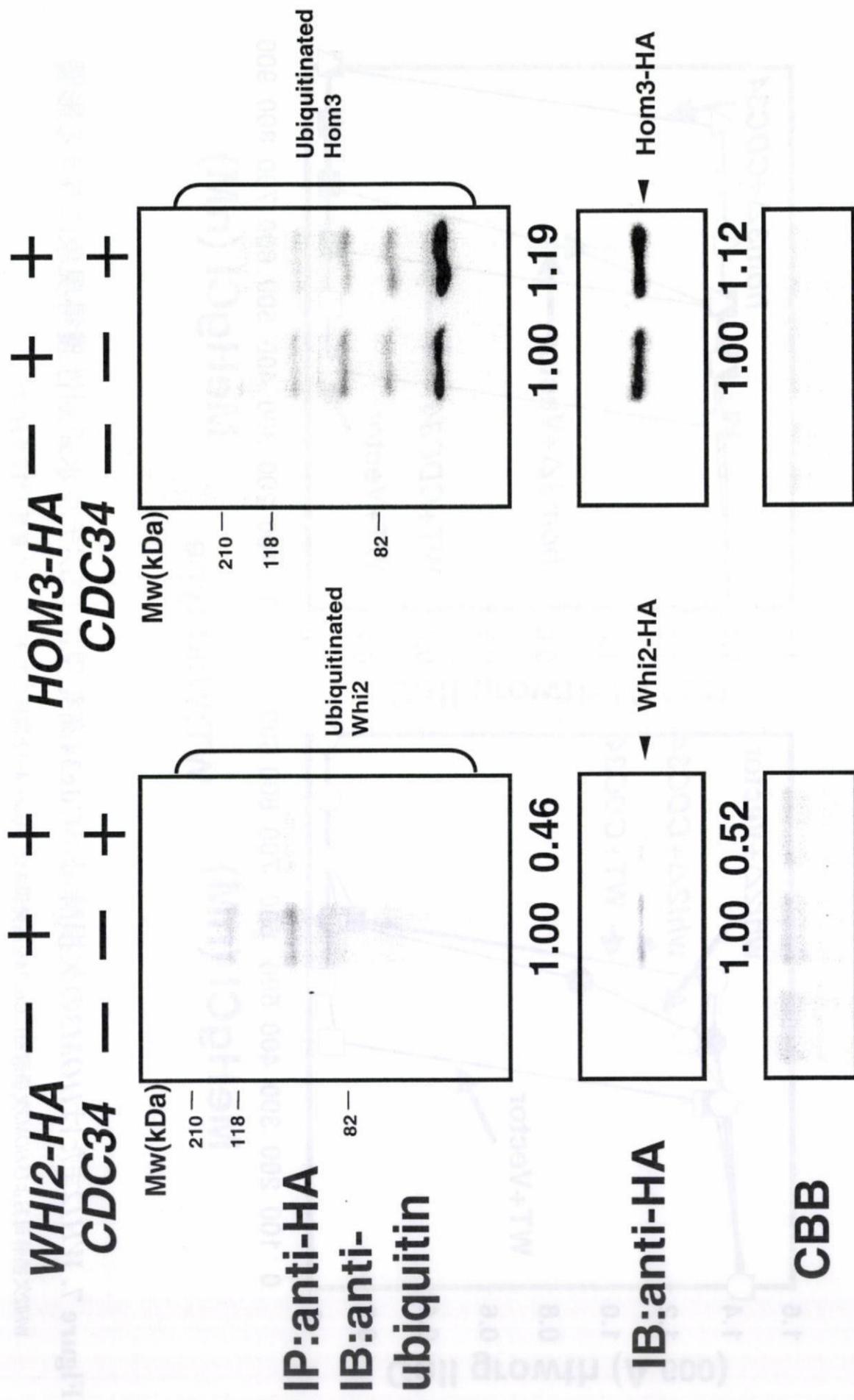


Figure 8. Cdc34高発現がWhi2およびHom3の細胞内レベルおよびユビキチン化に与える影響

Whi2またはHom3にHA-tagを融合させた蛋白質およびCdc34を高発現させた酵母の抽出液について抗HA抗体で免疫沈降を行った後に抗ユビキチン抗体を用いたWestern blottingによりそれぞれの蛋白質のユビキチン化を検出した。

Mw...molecular weight

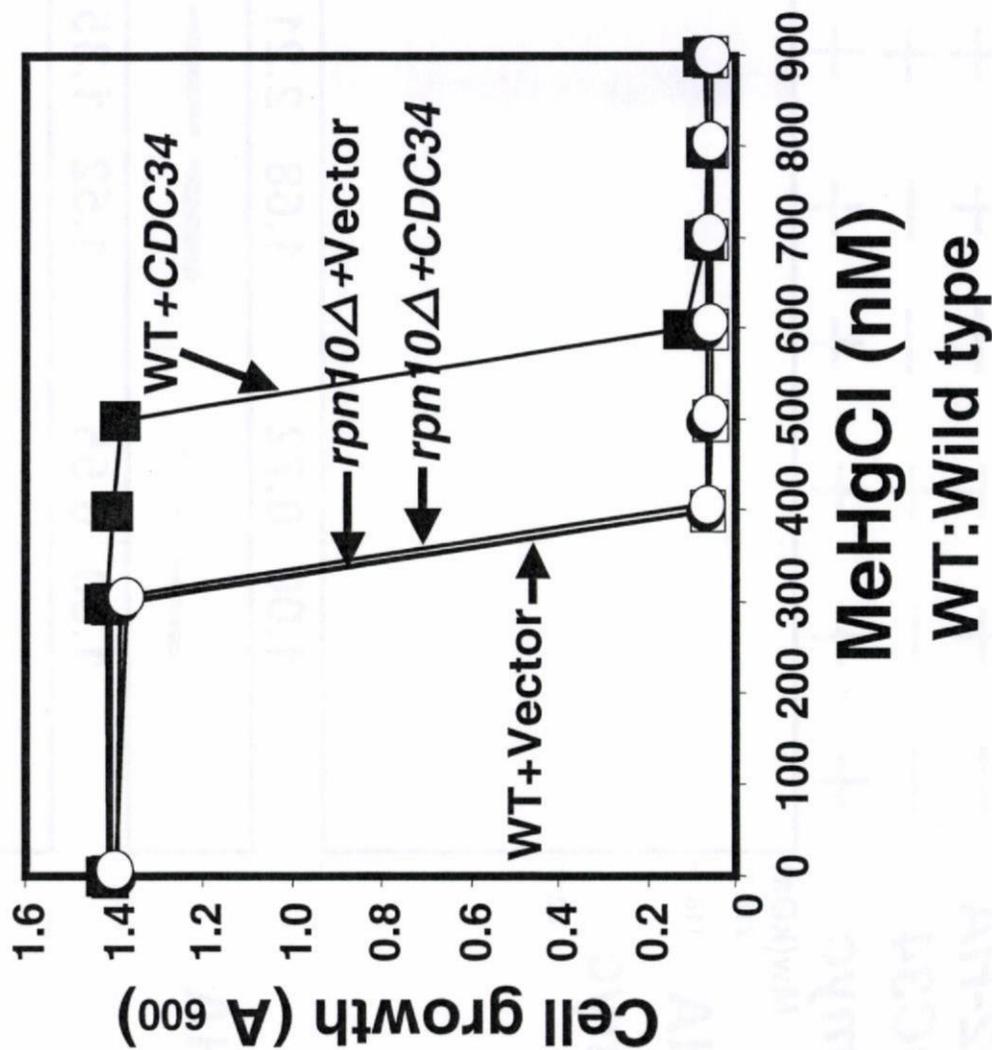


Figure 9. プロテアソーム活性の低い *RPN10* 欠損酵母における *Cdc34* 高発現がメチル水銀感受性に与える影響

Cdc34 を高発現させた *RPN10* 欠損酵母について、Figure 4-1 と同様の方法でメチル水銀感受性を検討した。

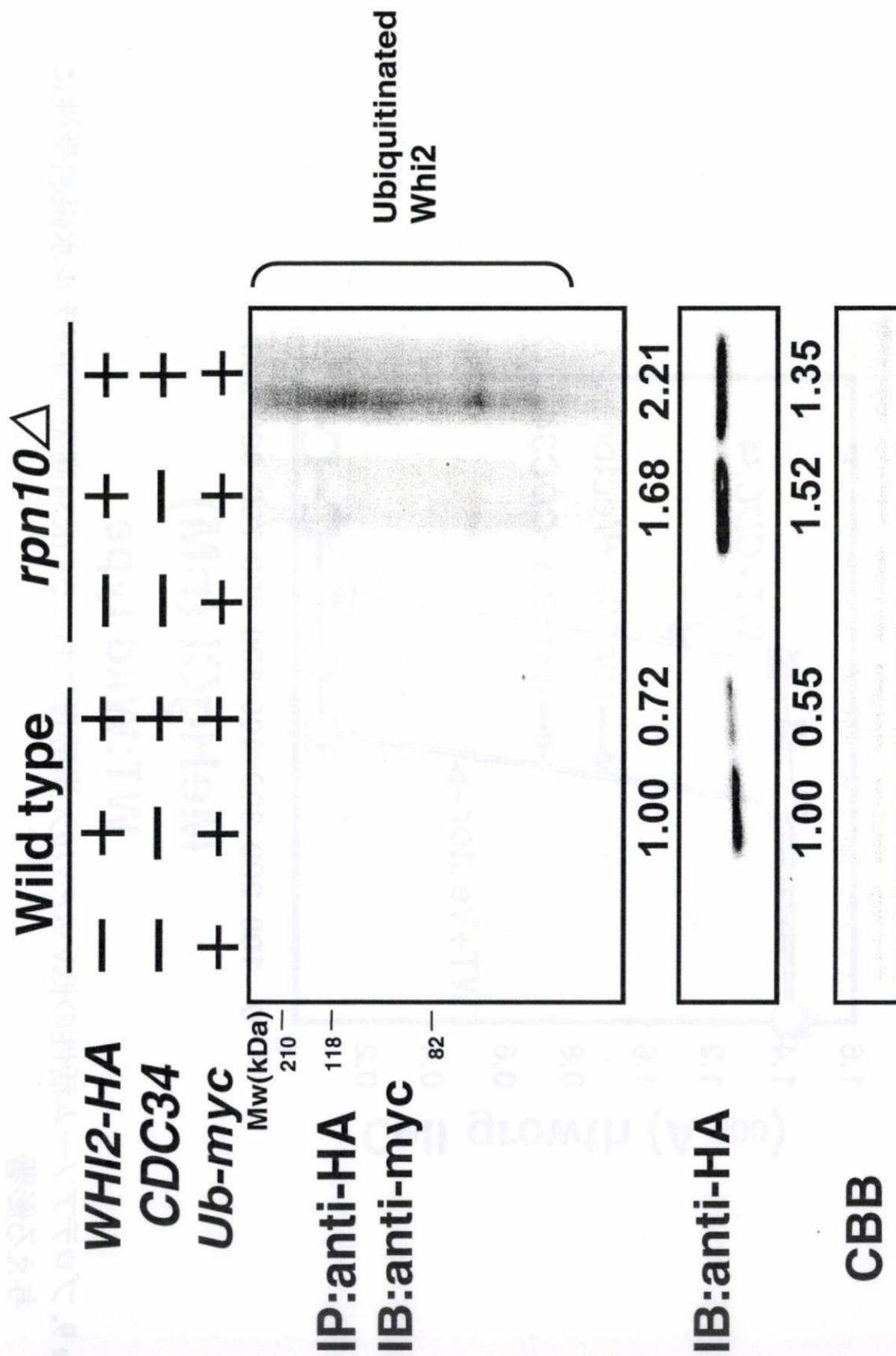


Figure 10. *RPN10*欠損酵母におけるCdc34高発現がWhi2の細胞内レベルおよびユビキチン化に与える影響

Whi2にHA-tagを融合させた蛋白質、Cdc34およびmyc-tagを融合させたユビキチンを高発現させた正常酵母および*RPN10*酵母の抽出液について抗HA抗体で免疫沈降を行った後に抗myc抗体を用いたWestern blottingによりそれぞれの蛋白質のユビキチン化を検出した。

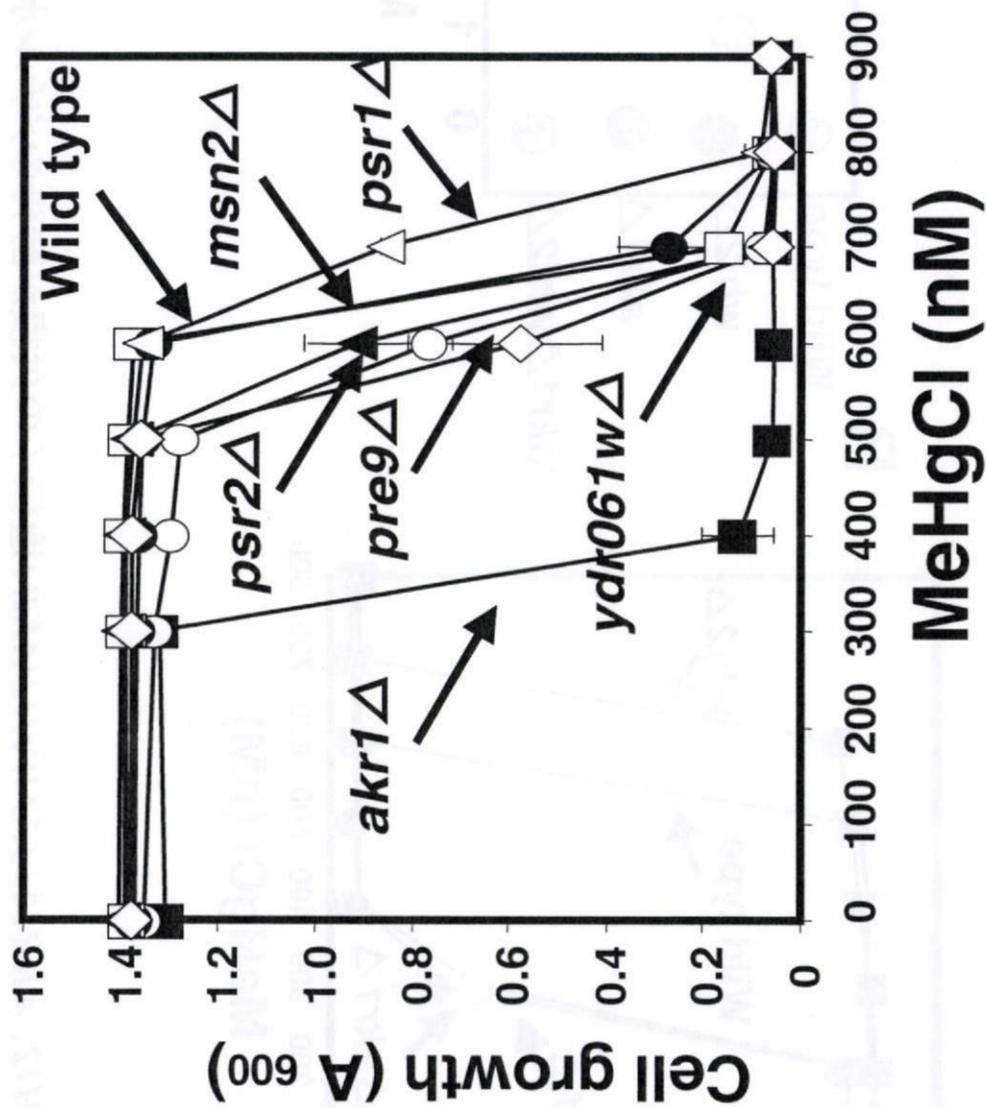


Figure 11. Whi2と結合する蛋白質の欠損が酵母のメチル水銀感受性に与える影響

Whi2と相互作用することが報告されている蛋白質を欠損した酵母のメチル水銀感受性をFigure 4-1と同様の方法で検討した。

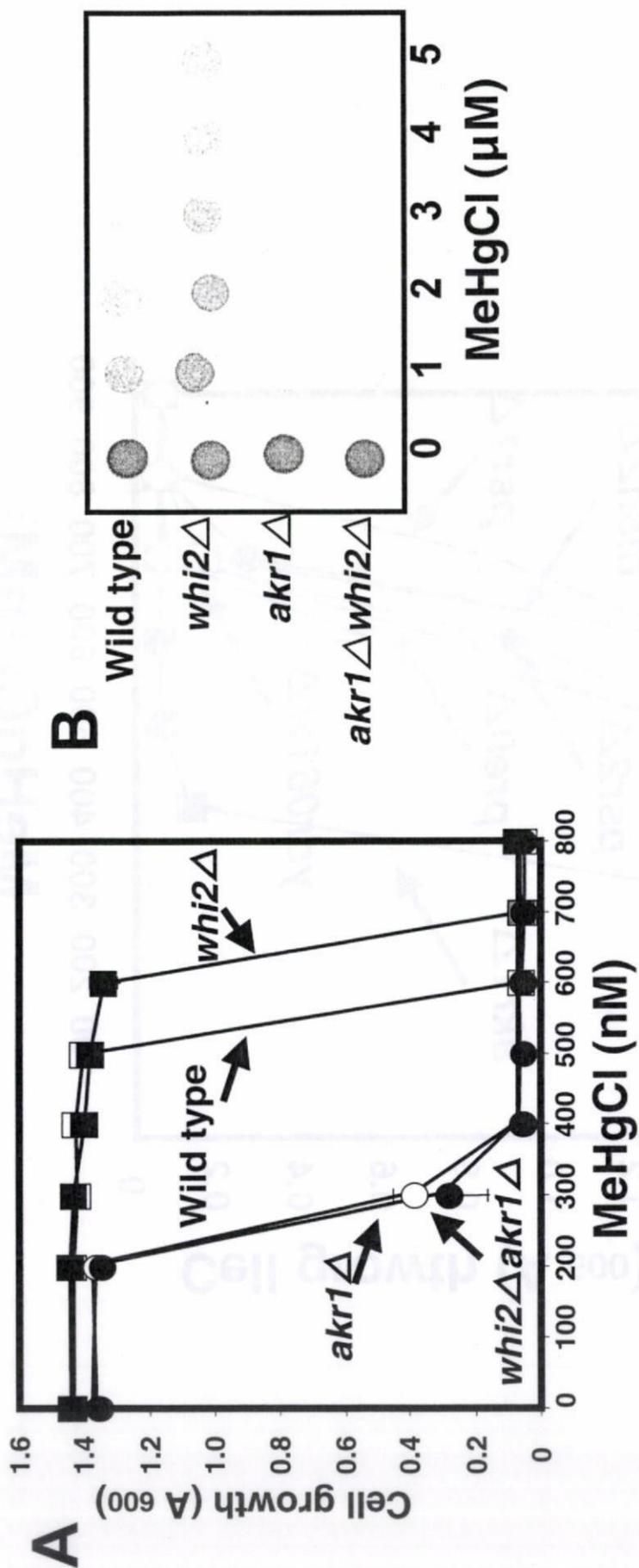


Figure 12. *WHI2*, *AKR1*および*WHI2/AKR1*遺伝子の欠損が酵母のメチル水銀感受性に与える影響

A・・・*WHI2*欠損酵母、*AKR1*欠損酵母および*WHI2AKR1*欠損酵母のメチル水銀感受性をFigure 4-1と同様の方法で検討した。
 B・・・*WHI2*欠損酵母、*AKR1*欠損酵母および*WHI2AKR1*欠損酵母のメチル水銀感受性をFigure 4-2と同様の方法で検討した。

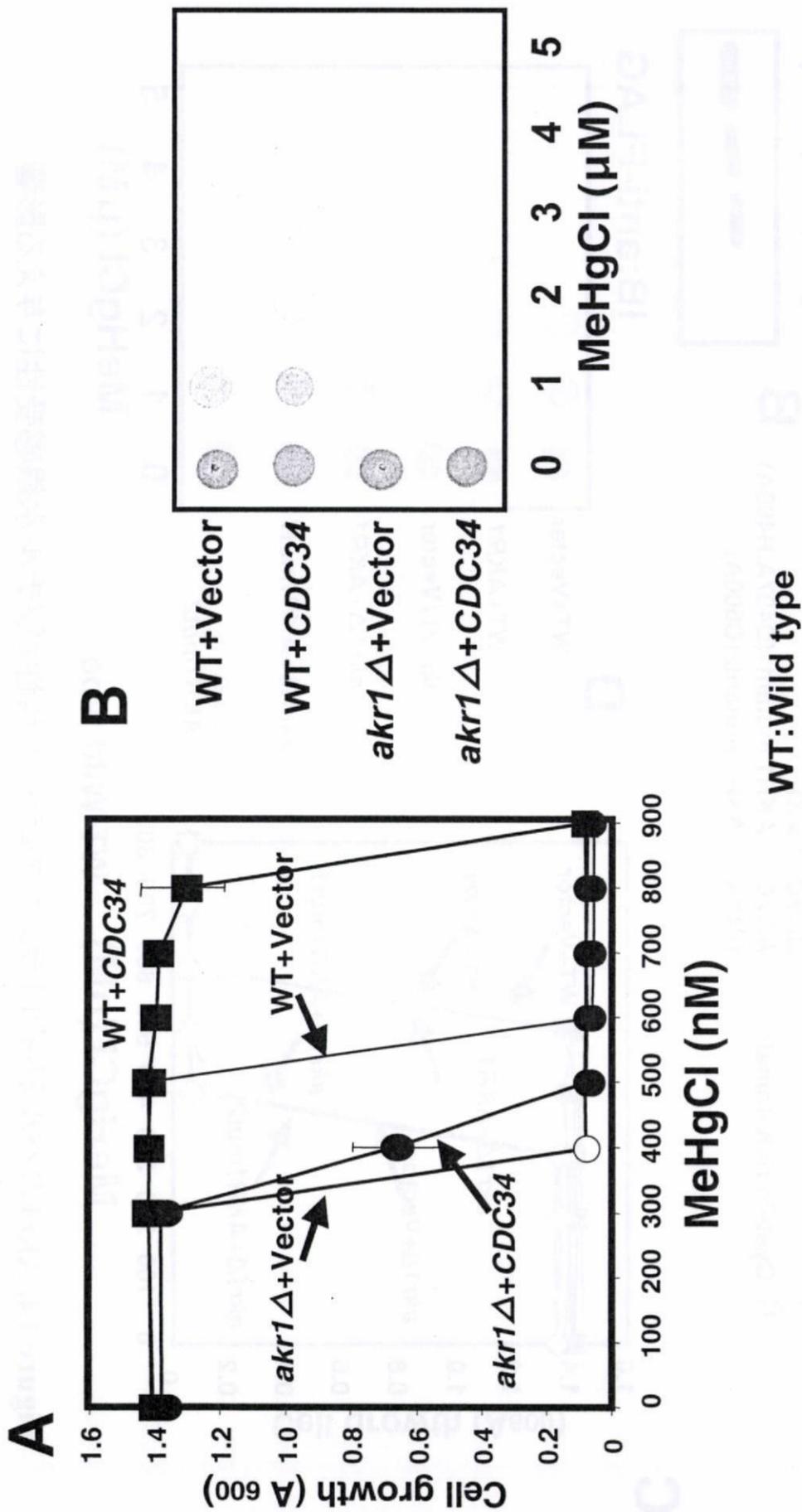


Figure 13. *AKR1* 欠損が *Cdc34* 高発現による酵母のメチル水銀耐性獲得現象に与える影響

A...*Cdc34*を高発現させた正常酵母および*AKR1*欠損酵母について、Figure 4-1と同様の方法でメチル水銀感受性を検討した。

B...*Cdc34*を高発現させた正常酵母および*AKR1*欠損酵母について、Figure 4-2と同様の方法でメチル水銀感受性を検討した。

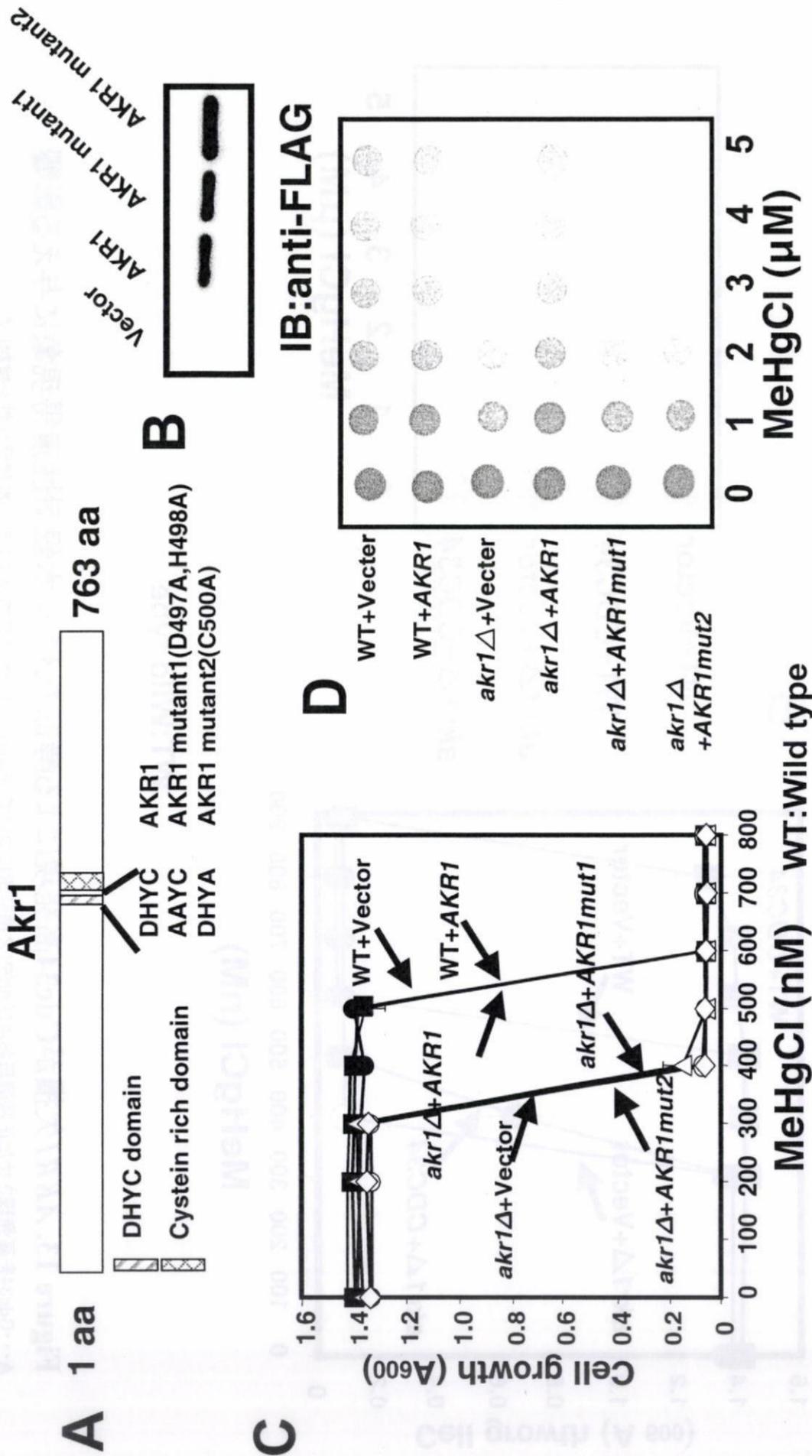


Figure 14. Akr1のパルミトイルトランスフェラーゼ活性がメチル水銀感受性に与える影響

A・・・AKR1およびAKR1mutantの模式図。

B・・・正常なAkr1およびAkr1mutantの発現を抗FLAG抗体を用いたWestern blottingで確認した。

C・・・正常なAkr1またはAkr1mutantを高発現させた正常酵母およびAKR1欠損酵母について、Figure 4-1と同様の方法でメチル水銀感受性を検討した。

D・・・正常なAkr1またはAkr1mutantを高発現させた正常酵母およびAKR1欠損酵母について、Figure 4-2と同様の方法でメチル水銀感受性を検討した。