

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こと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。

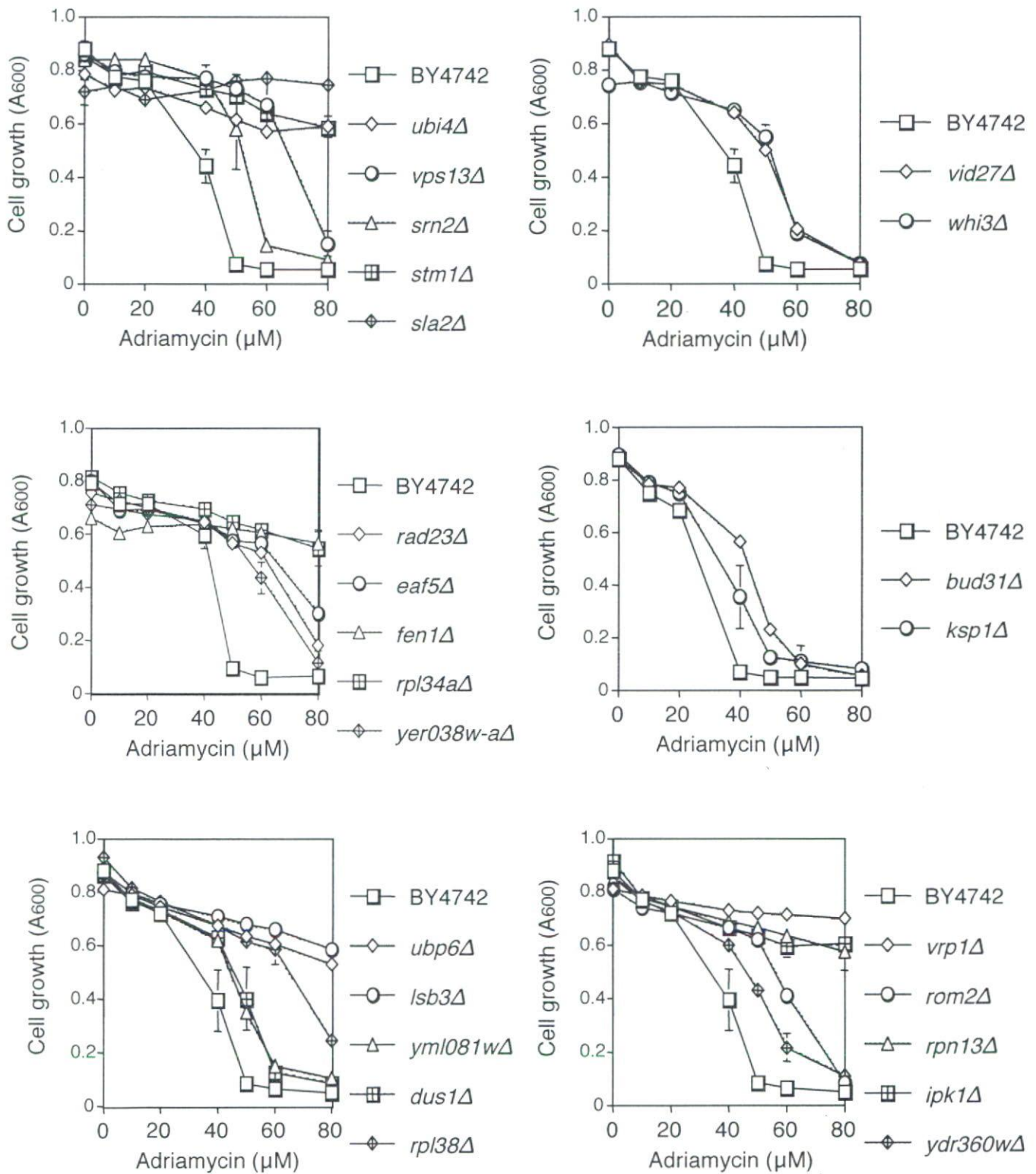


Fig. 1-1 欠損により酵母にアドリアマイシン耐性を与える遺伝子

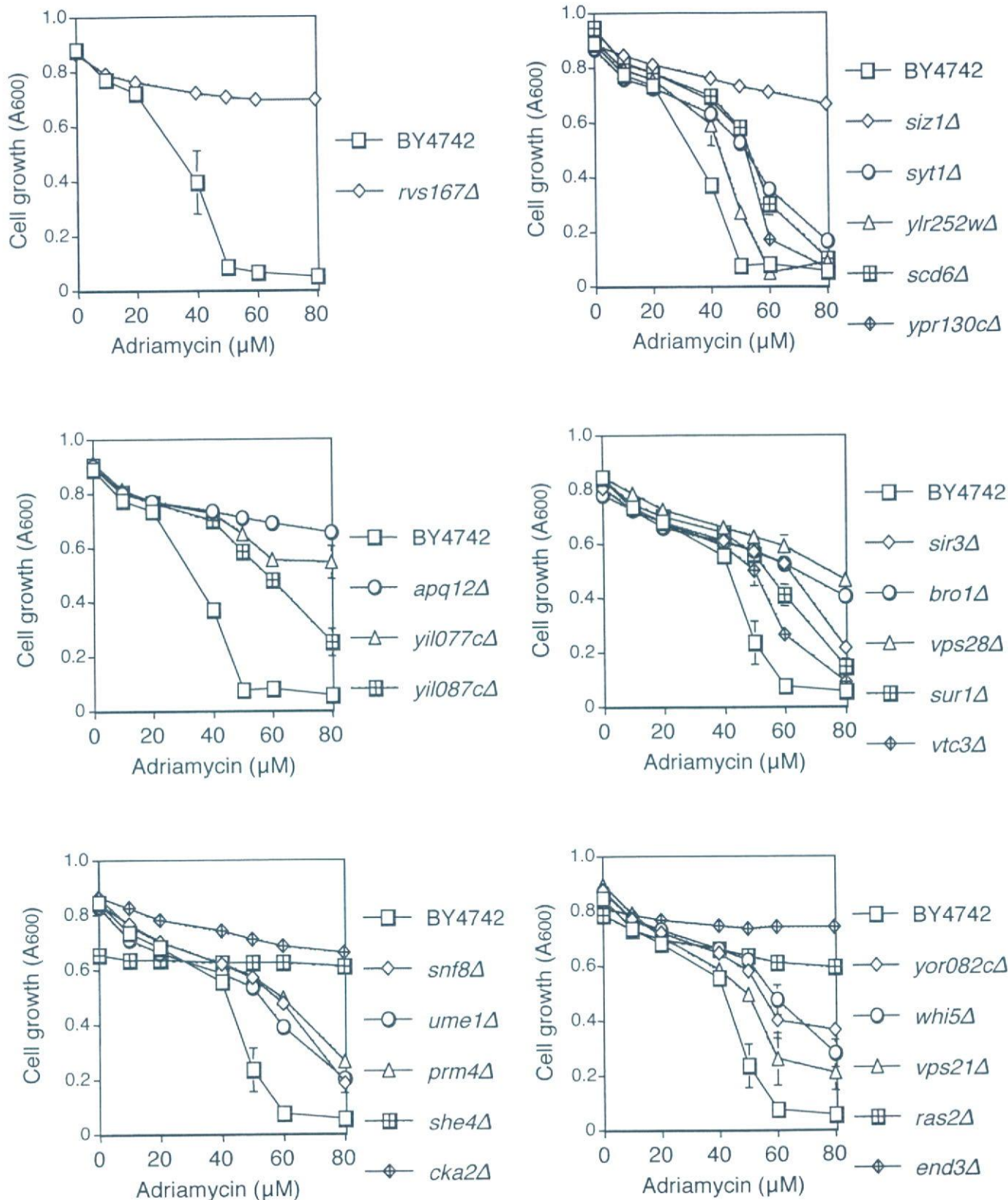


Fig. 1-2 欠損により酵母にアドリアマイシン耐性を与える遺伝子

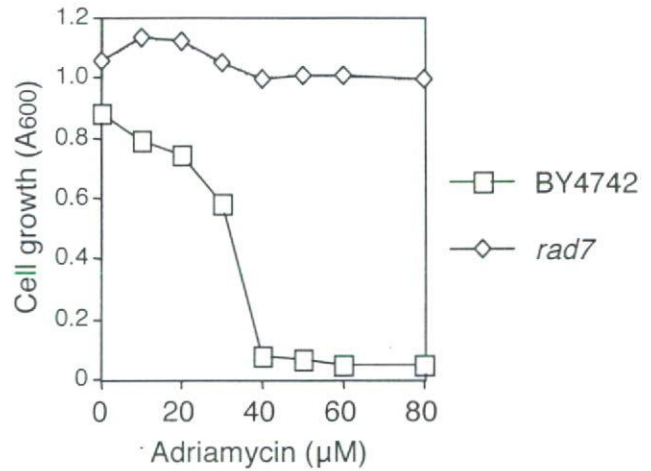
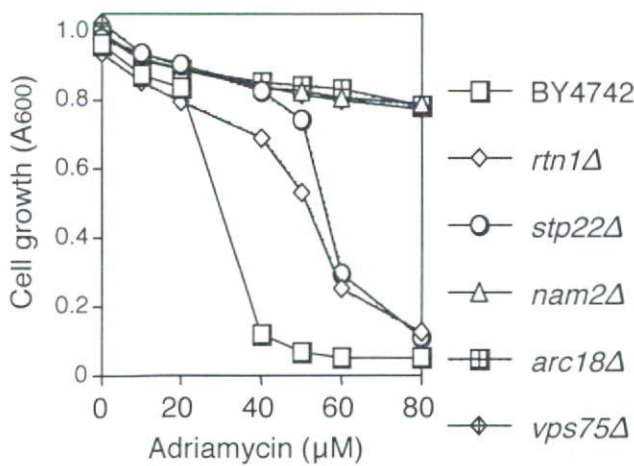
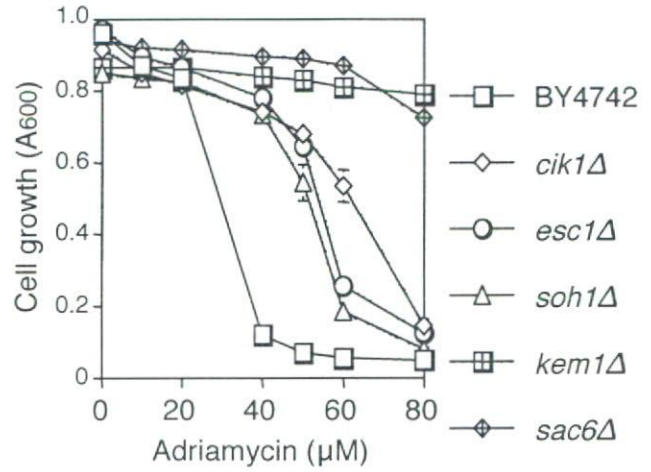
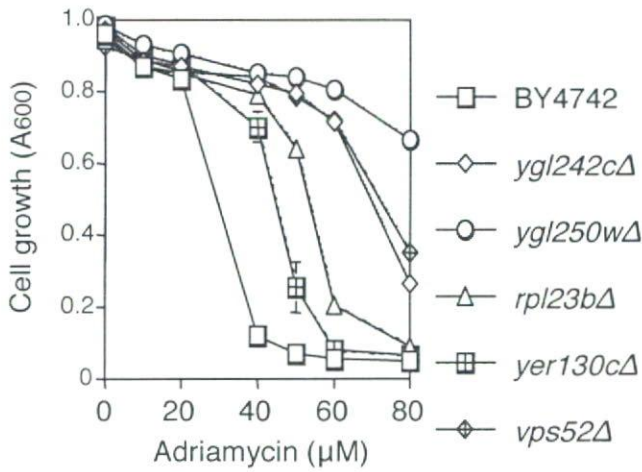
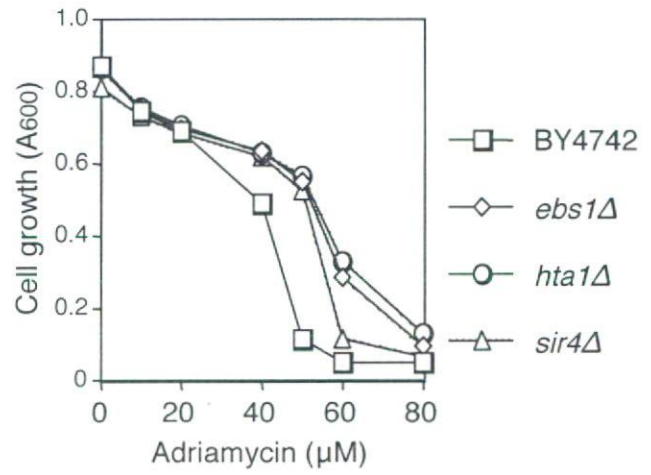
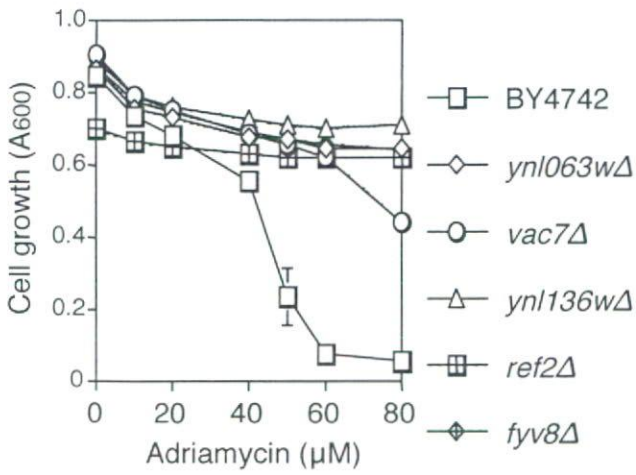


Fig. 1-3 欠損により酵母にアドリアマイシン耐性を与える遺伝子

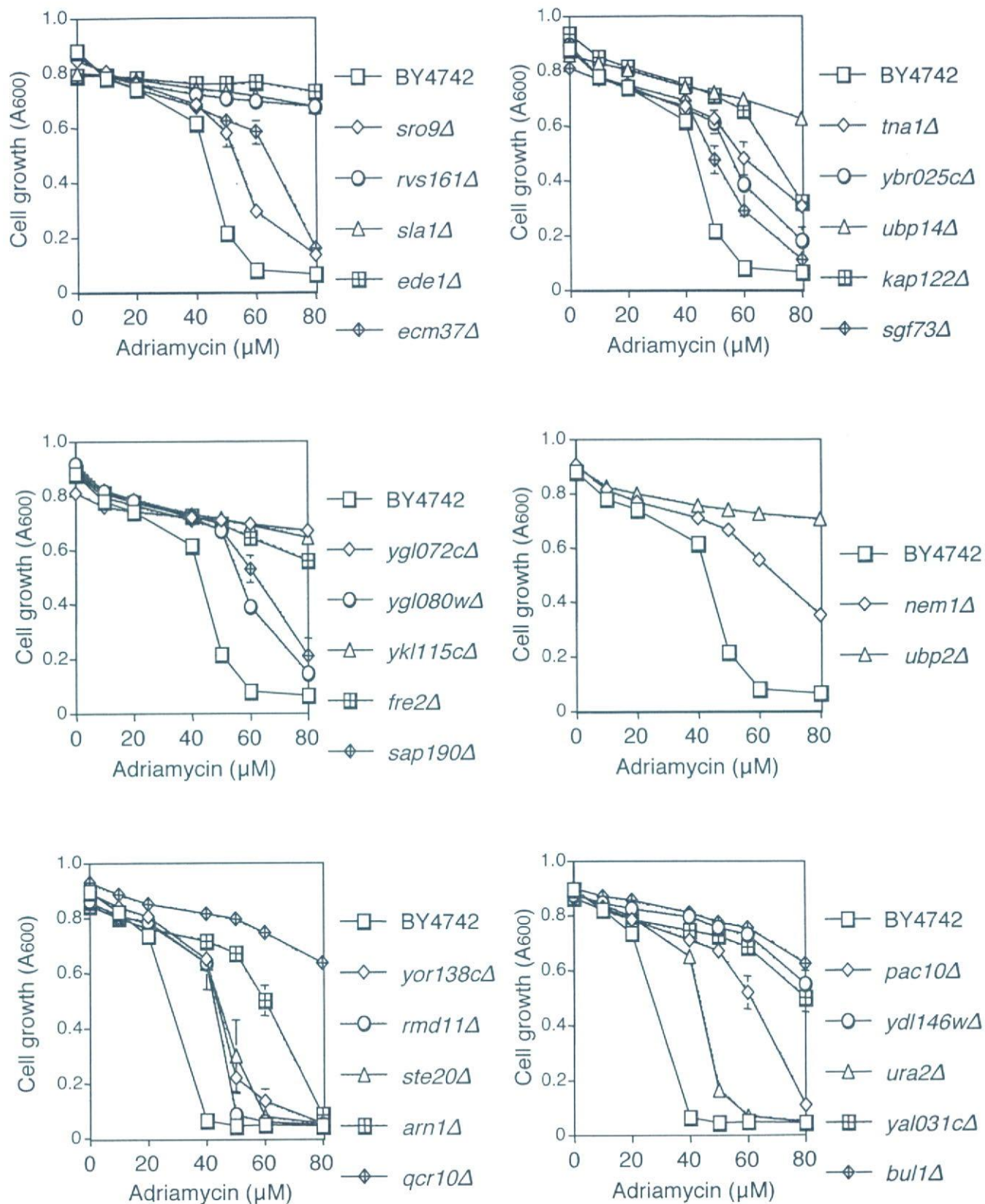


Fig. 1-4 欠損により酵母にアドリアマイシン耐性を与える遺伝子

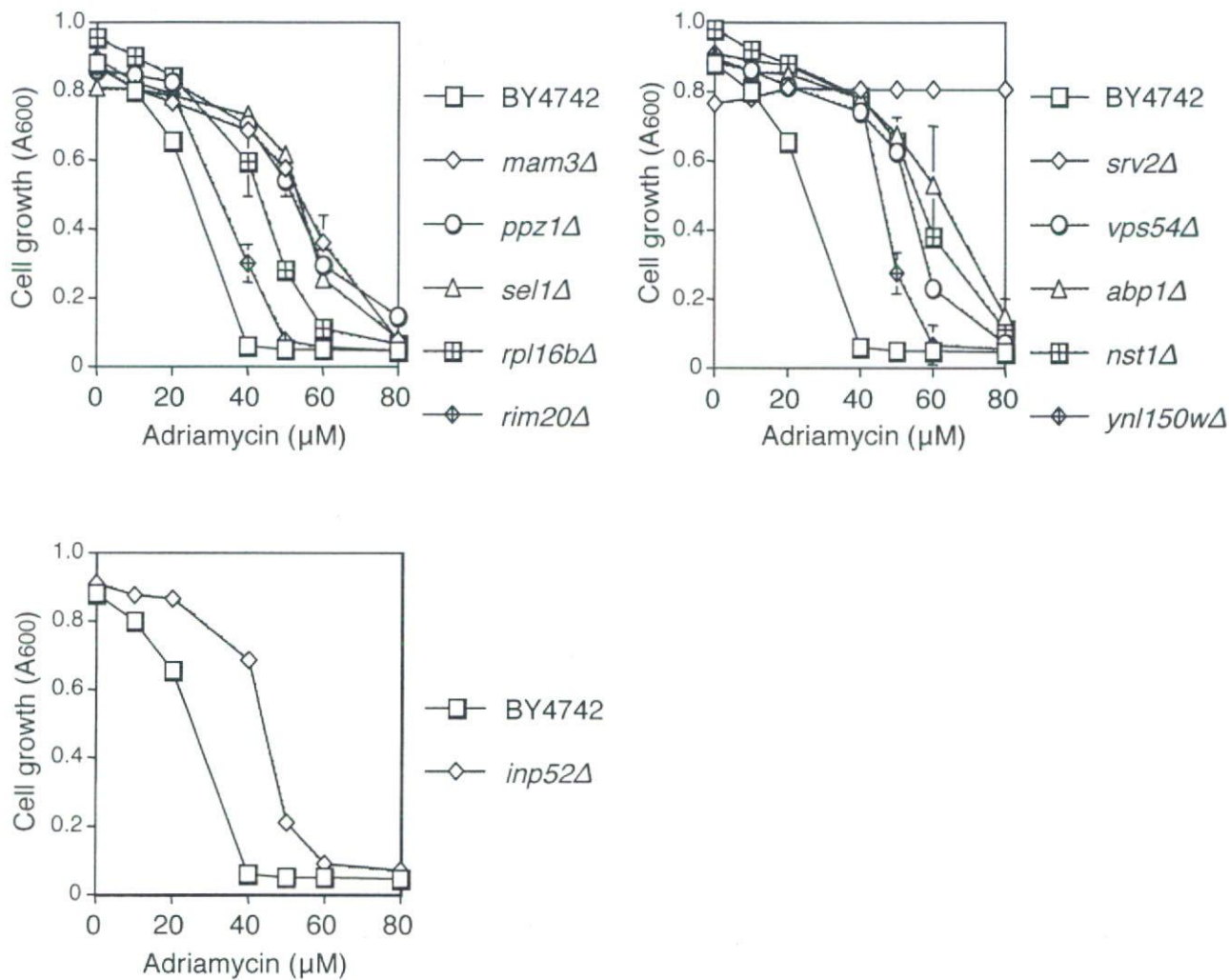


Fig. 1-5 欠損により酵母にアドリアマイシン耐性を与える遺伝子

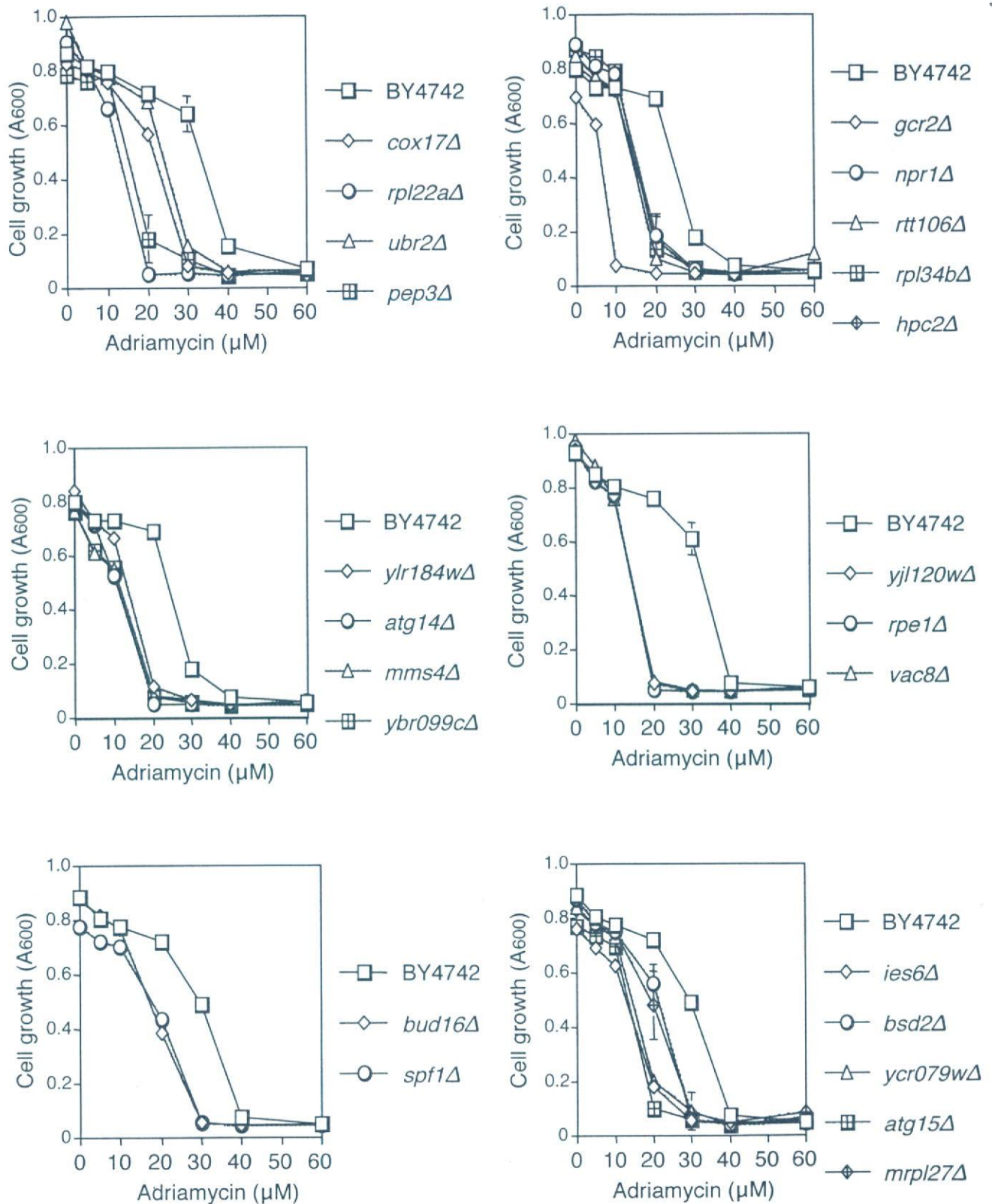


Fig. 2-1 欠損により酵母にアドリアマイシン
高感受性を与える遺伝子

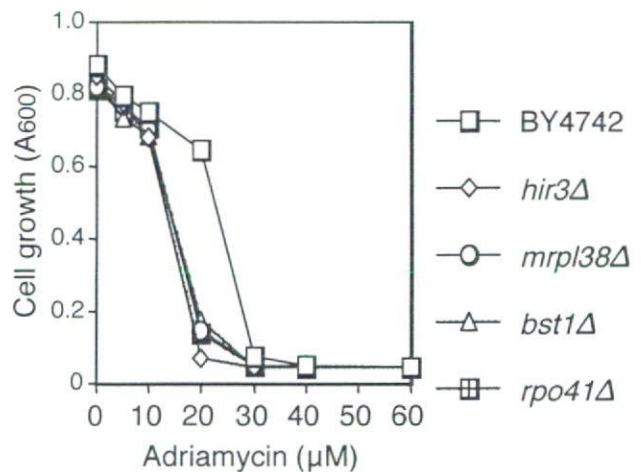
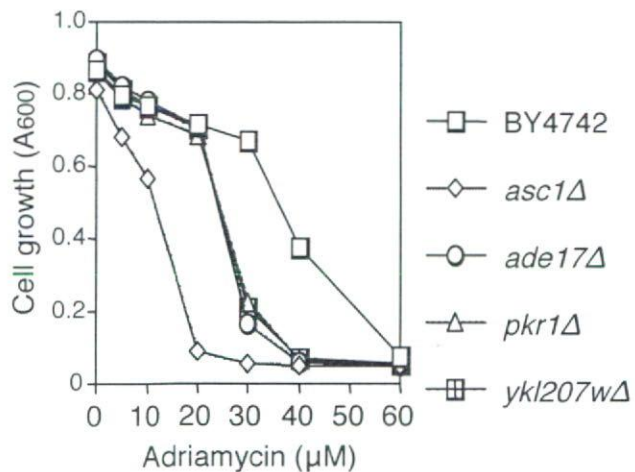
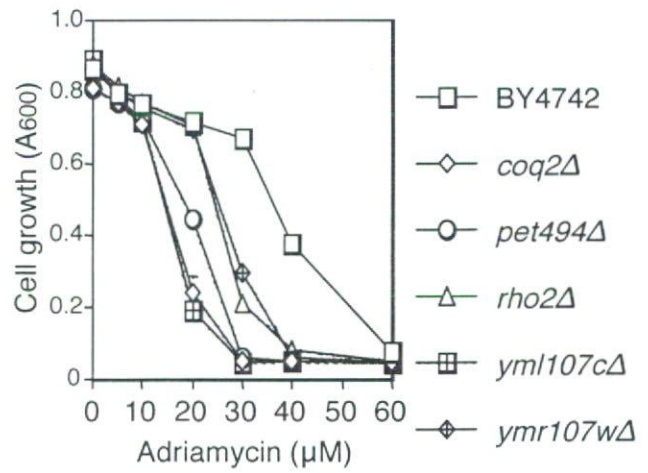
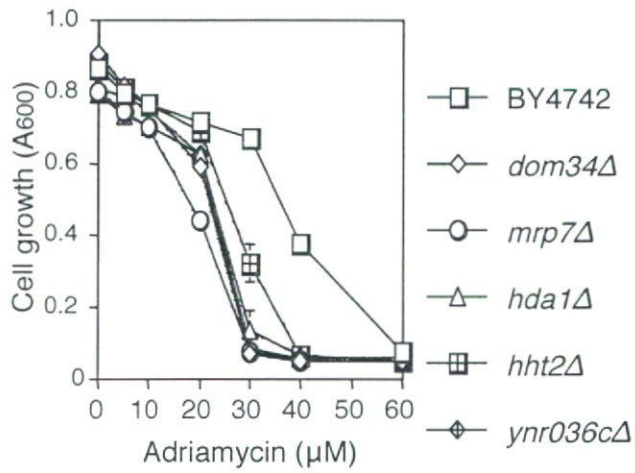
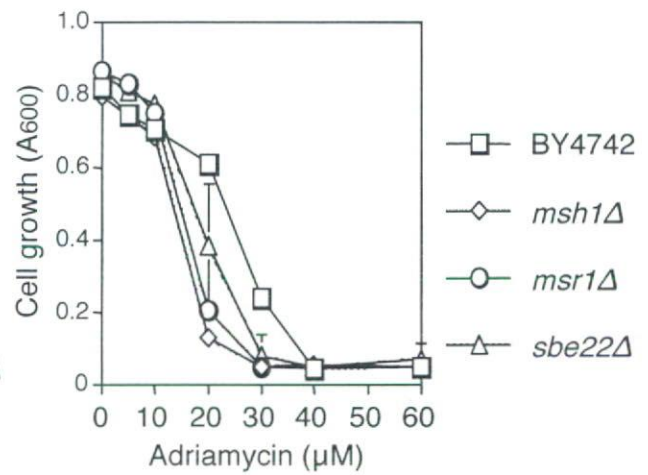
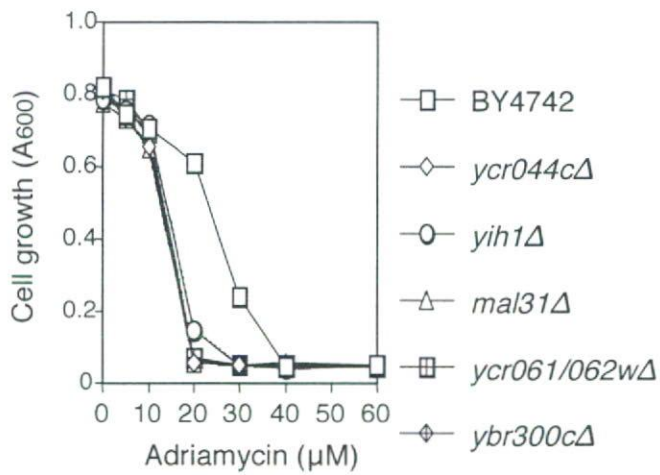


Fig. 2-2 欠損により酵母にアドリアマイシン
高感受性を与える遺伝子

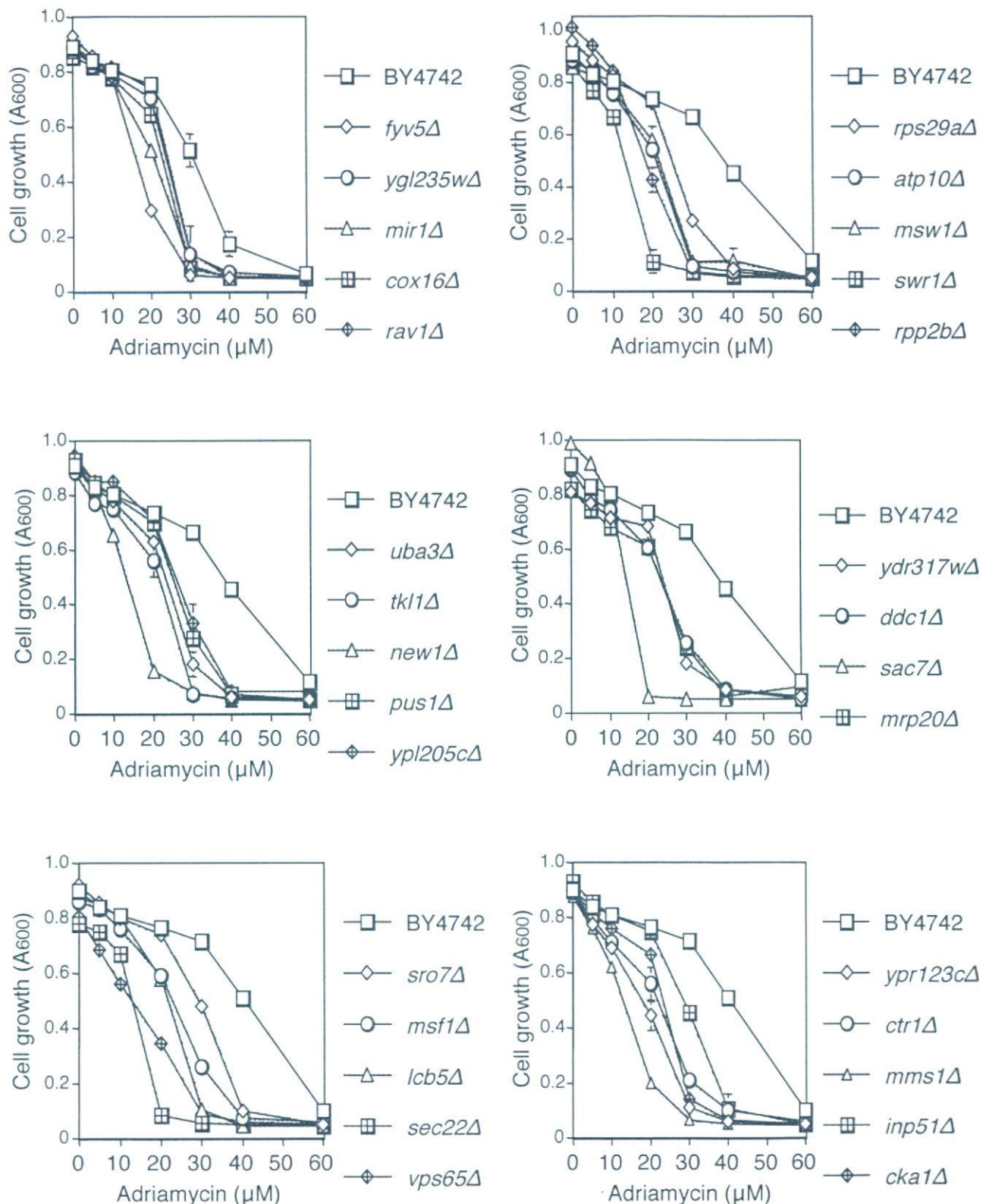


Fig. 2-3 欠損により酵母にアドリアマイシン
高感受性を与える遺伝子

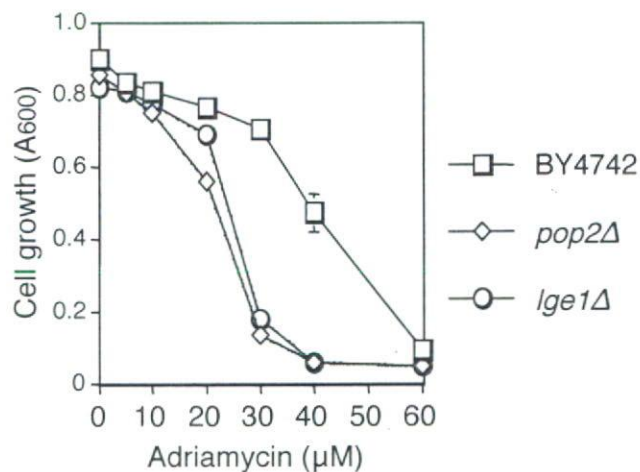
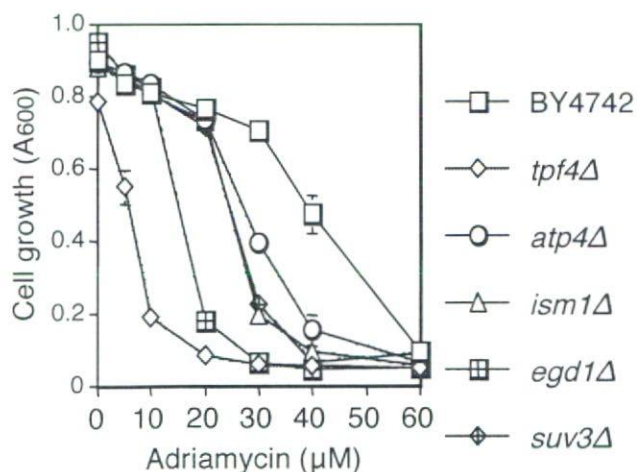
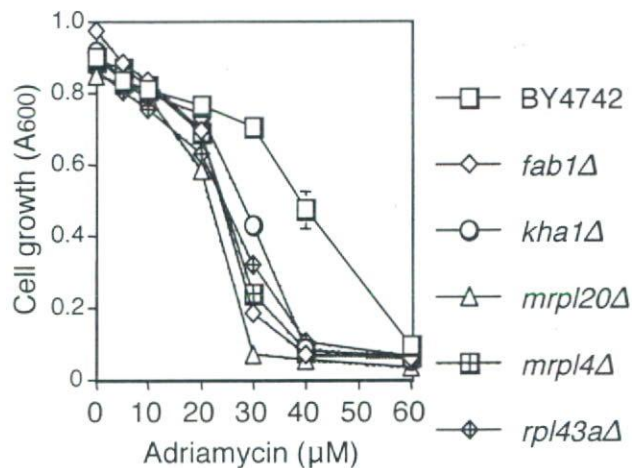
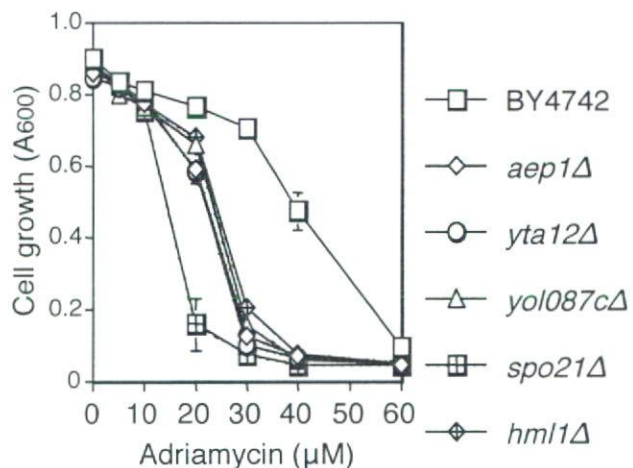
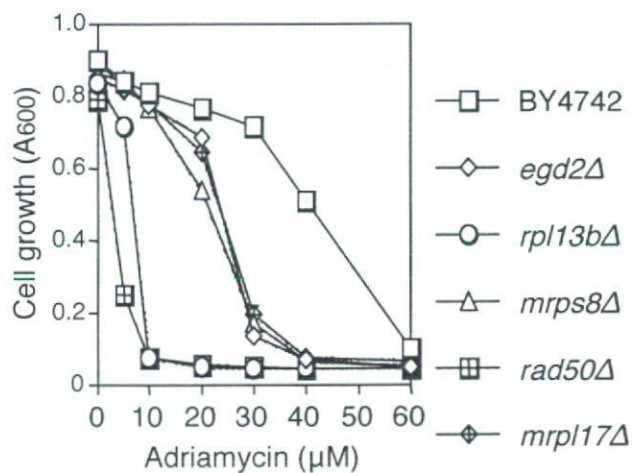
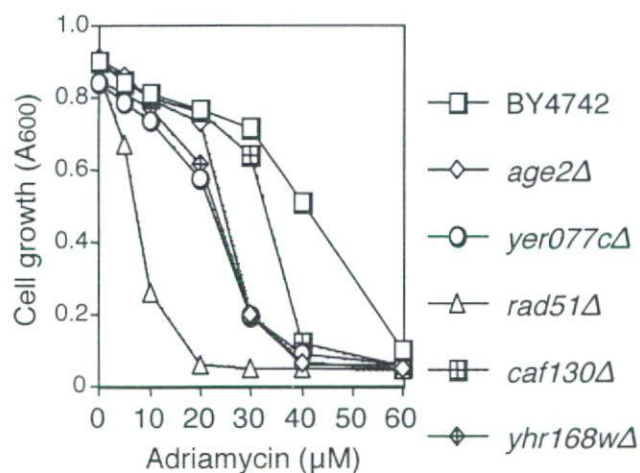


Fig. 2-4 欠損により酵母にアドリアマイシン
高感受性を与える遺伝子

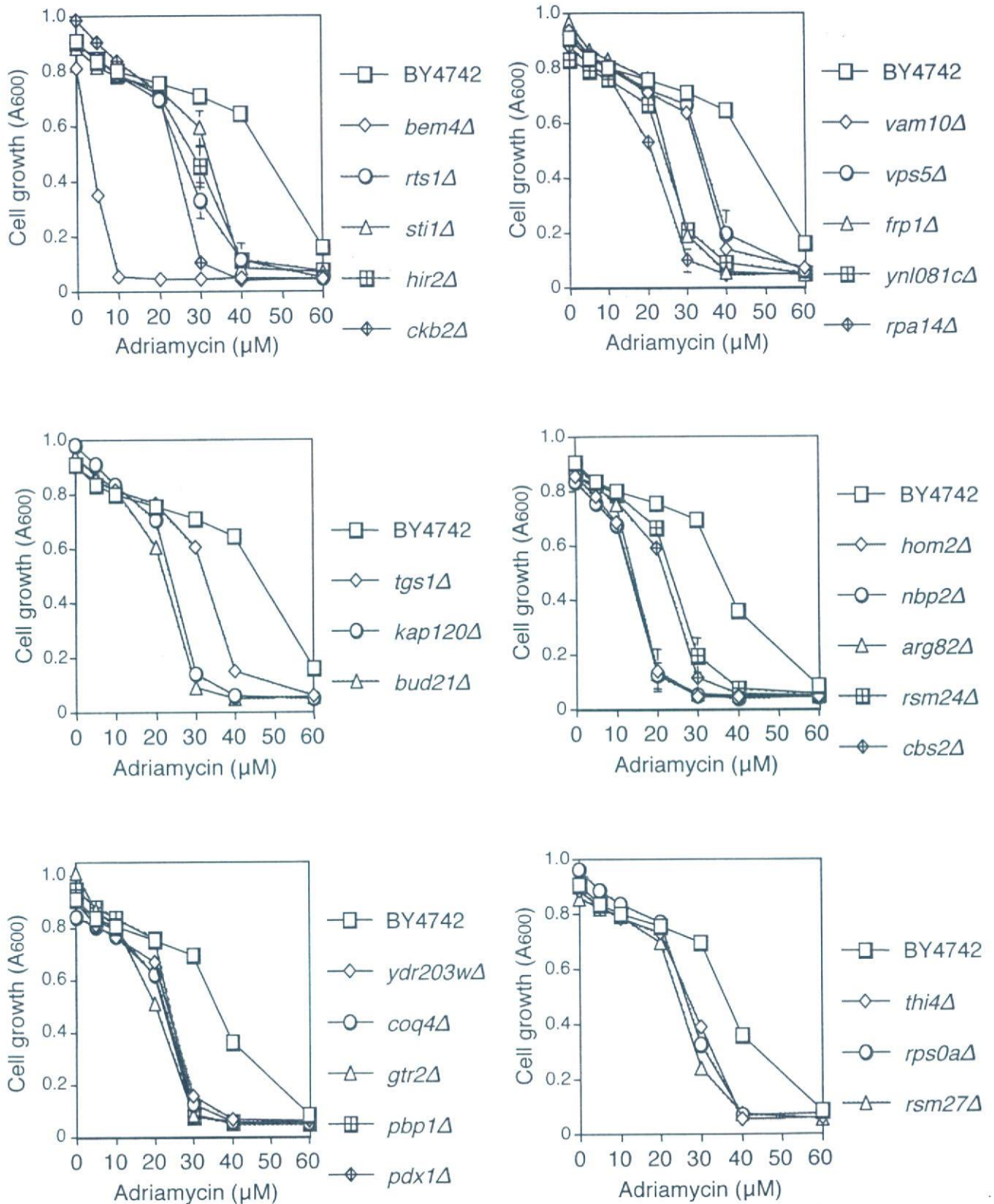


Fig. 2-5 欠損により酵母にアドリアマイシン
高感受性を与える遺伝子

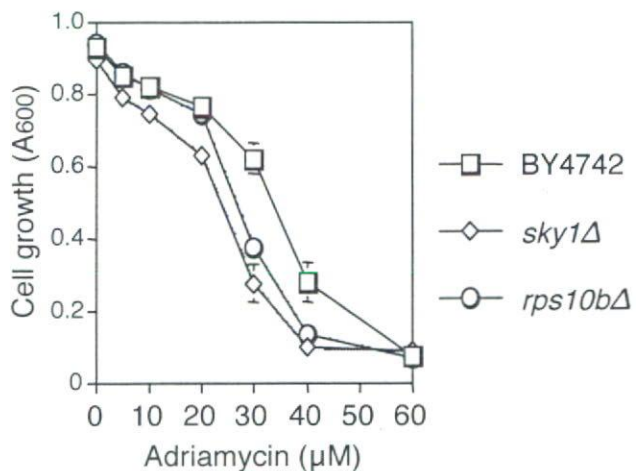
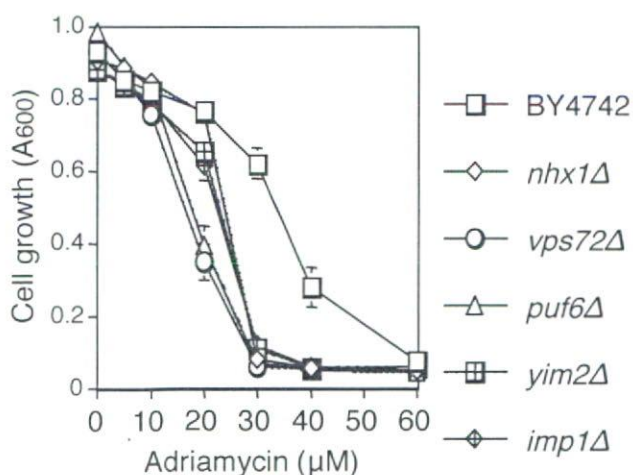
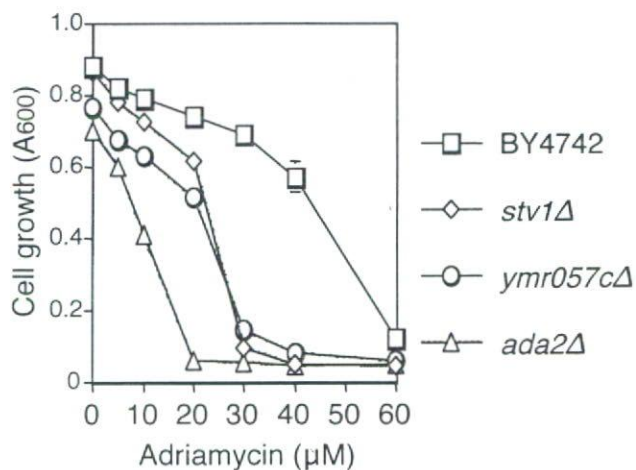
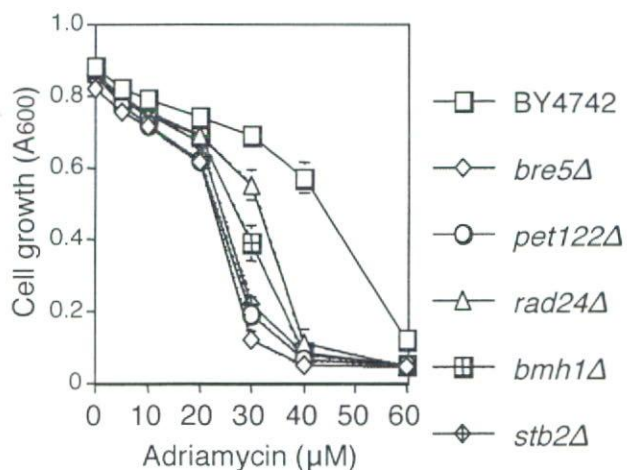
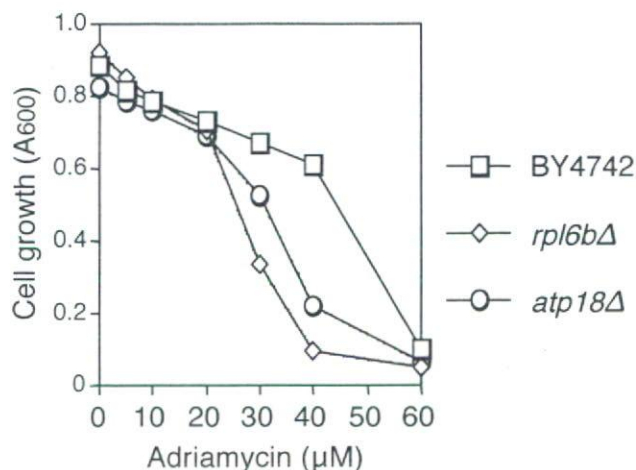
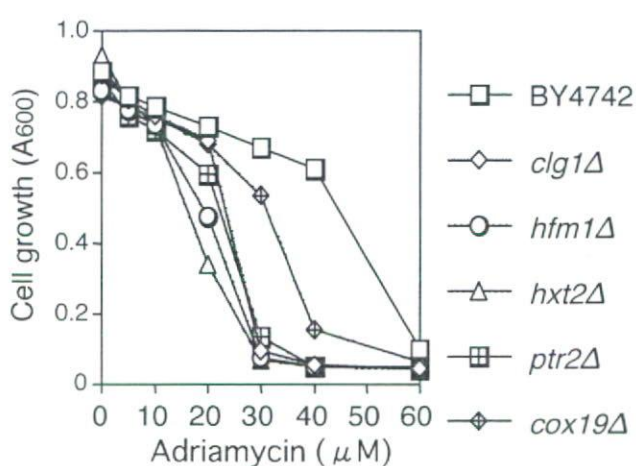


Fig. 2-6 欠損により酵母にアドリアマイシン高感受性を与える遺伝子

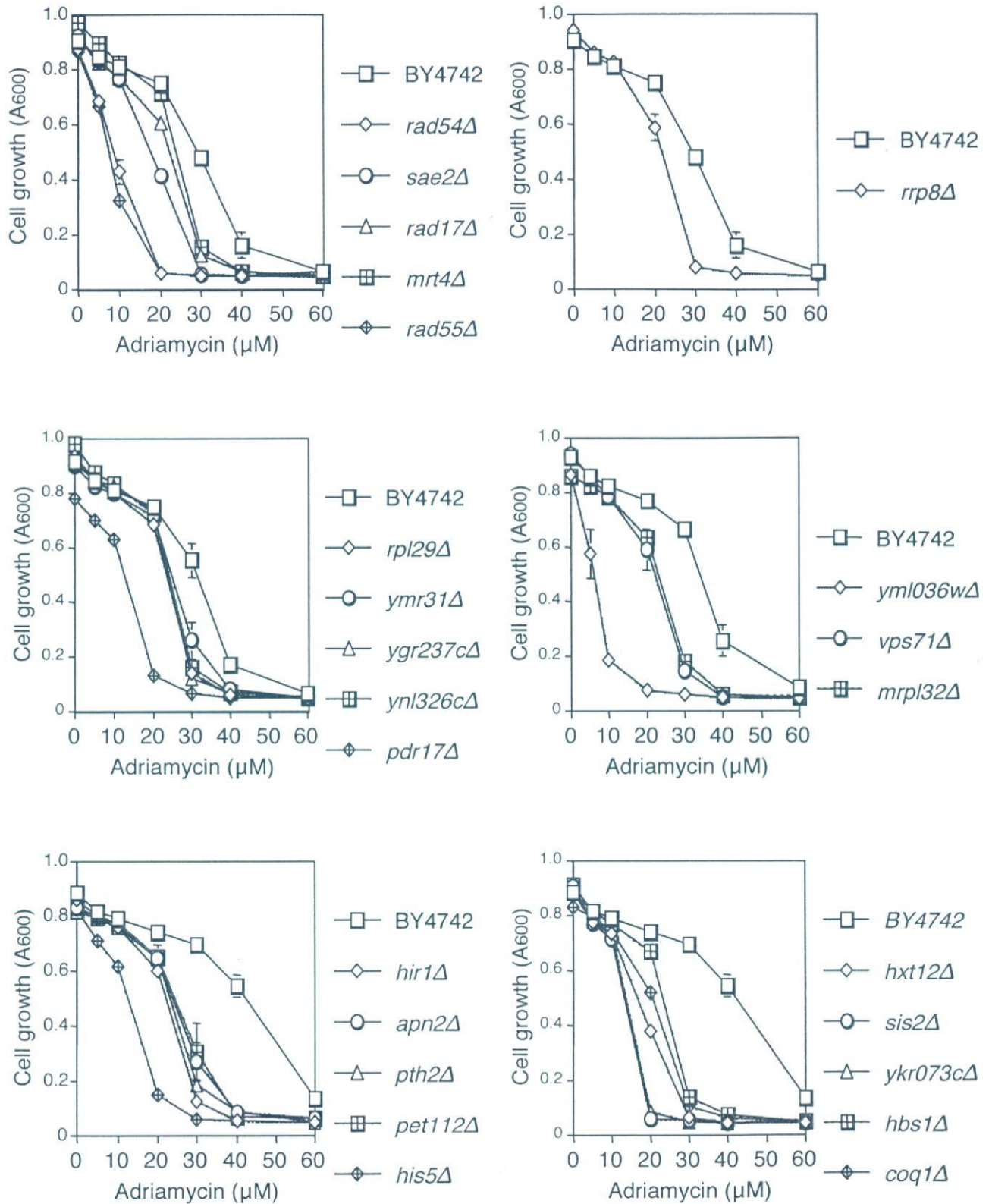


Fig. 2-7 欠損により酵母にアドリアマイシン
高感受性を与える遺伝子

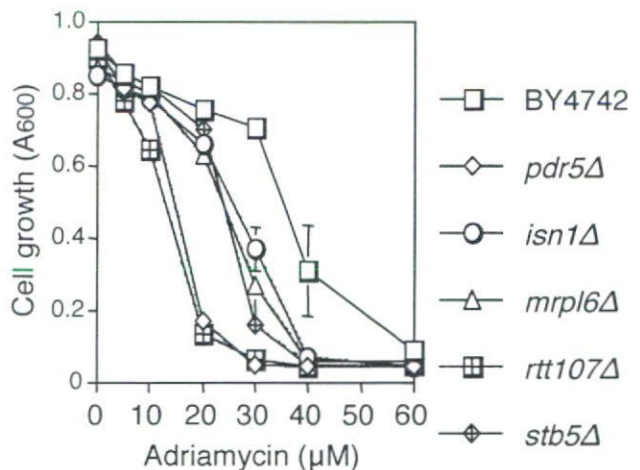
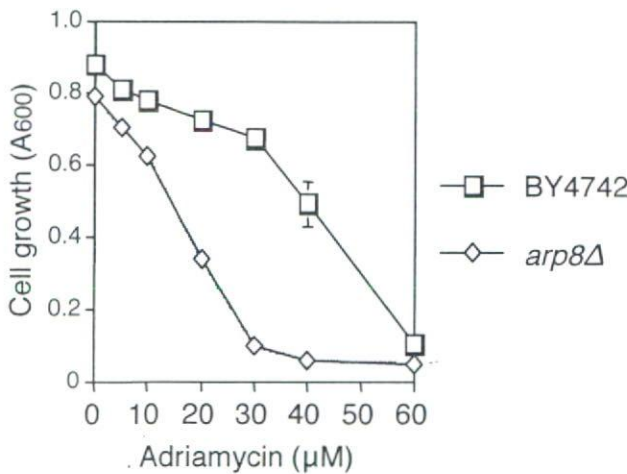
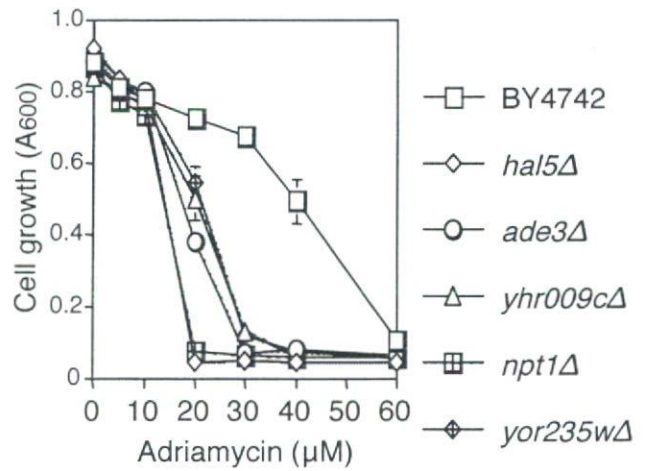
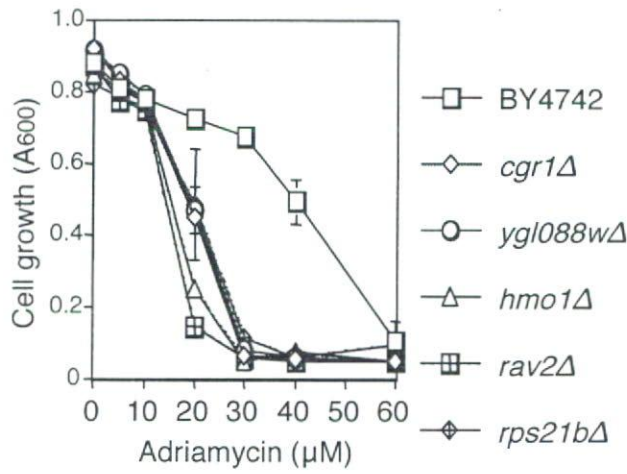
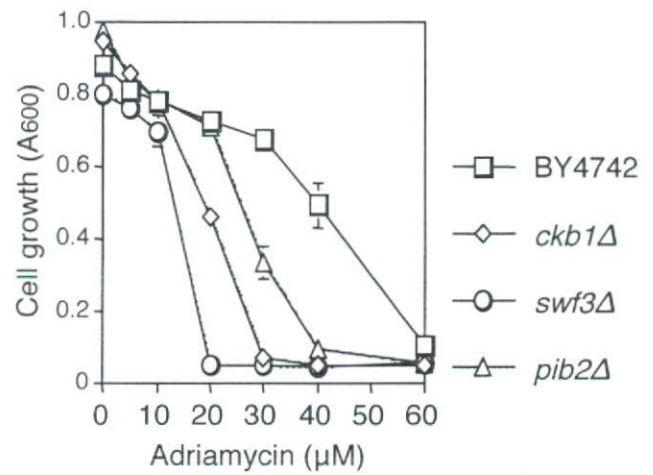
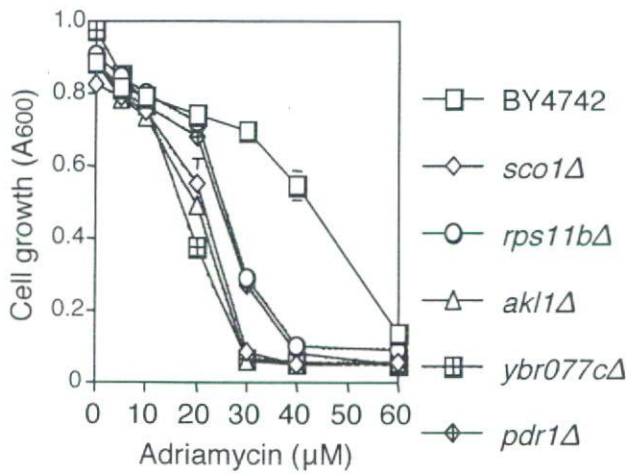


Fig. 2-8 欠損により酵母にアドリアマイシン高感受性を与える遺伝子

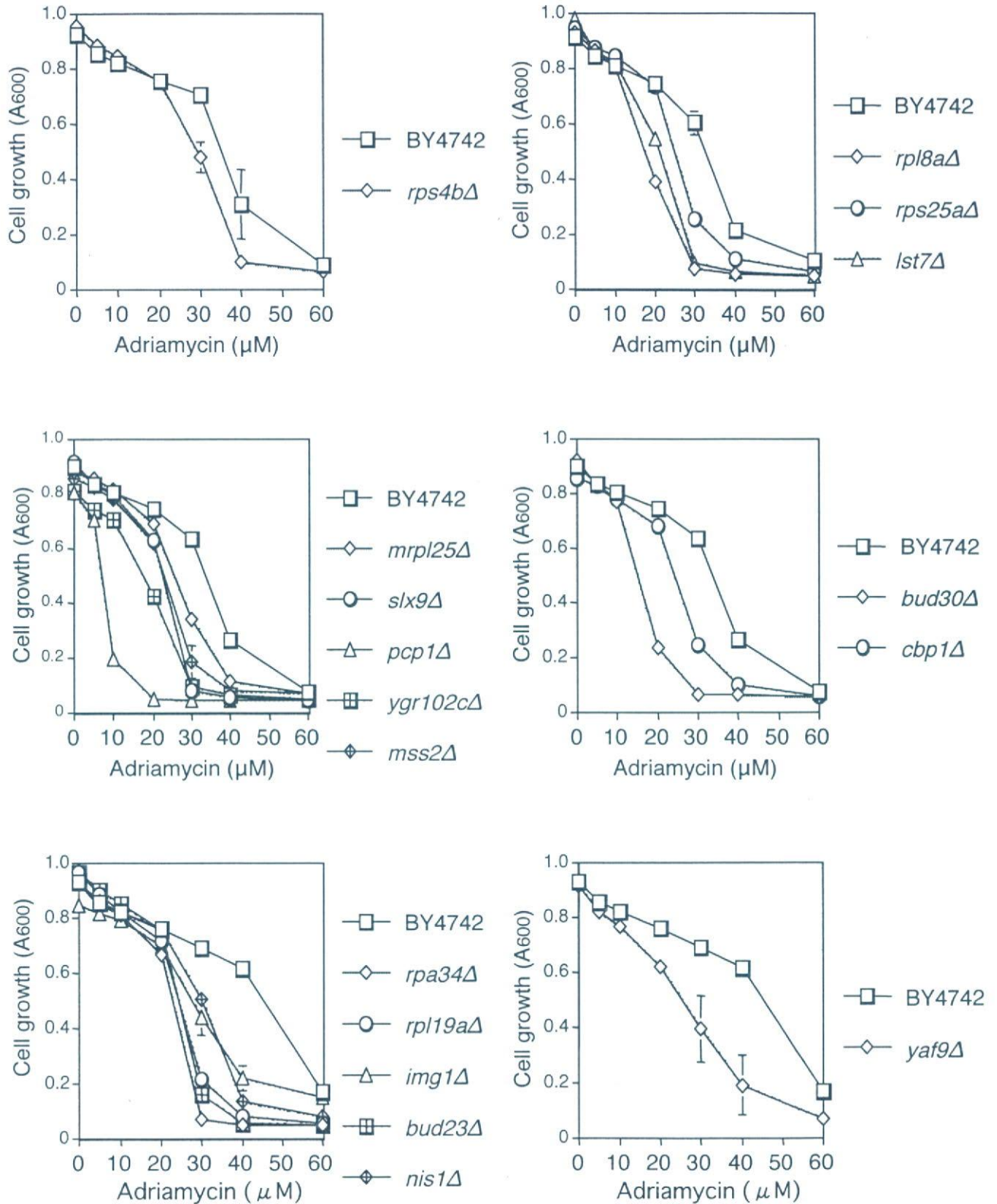


Fig. 2-9 欠損により酵母にアドリアマイシン
高感受性を与える遺伝子