

2. cDNA ライブラリー高発現ベクターの作製

ヒト骨髄由来 cDNA ライブラリープラスミドを鋳型とする PCR によって増幅した cDNA insert 部分を、哺乳類細胞導入用ベクターである pEF5/FRT/V5-DEST (Invitrogen) に組み込んだ (Fig. 3)。用いたプライマーを以下に示す。

T7 promoter primer ;

5'-TAATACGACTCACTATAGGGAG
A-3'

Sp6 promoter primer ;

5'-AGCTATTTAGGTGACACTATAG-
3'

PCR 産物は *DpnI* で消化し鋳型のプラスミドを分解して、もともとの cDNA ライブラリーに用いられていたプラスミド pCMV・SPORT6 の混入を防いだ。pEF5/FRT/V5-DEST の *KpnI*、*NotI* 制限酵素サイトに導入するために、PCR 産物を *KpnI*、*NotI* により消化し、アガロースゲル電気泳動を行って約 1~5kbp のフラグメントを回収・精製した。得られたフラグメントは *KpnI* および *NotI* で消化した pEF5/FRT/V5-DEST とライゲーションした。

ライゲーション反応液を大腸菌に導入し、全体の 1/1000 を LB (amp) プ

レートにプレーティングを行い、残りを 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の Ampicillin を含む Terrific Broth 培地で 30°C、20 時間程度振盪培養し、アルカリ法によってプラスミドを抽出した。LB (amp) プレート上のコロニー数から回収した cDNA ライブラリーの複数を推測した。抽出したプラスミドは制限酵素 *NdeI*、*XhoI* で切断し、電気泳動を行って断片長を基準に cDNA の挿入の有無を確認した (Fig. 4)。アルカリ法で抽出したプラスミドは、Plasmid Miniprep Kit (Sigma) を用いてさらに精製した。

3. cDNA ライブラリー導入細胞の作製

Flp-In-293 cell を 3×10^6 cells/2mL/well になるように 6well plate に播き、抗生物質を含まない D-MEM (high glucose)、37°C、5%CO₂ 存在下で 24 時間培養した後、Lipofectamine™2000 (Invitrogen) を用いてリポフェクション法により、pEF5-cDNA ライブラリーおよび組換え酵素発現プラスミド pOG44 (Invitrogen) を Flp-In-293 cell に導入した。リポフェクションから 12 時間後に 10 cm シャーレに播き直し、さらに 84 時間後 (リポフェクションから 96 時間後) に最終濃度 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるように hygromycinB を添加した。2~3 日ごとに培地を交換しながら、約 2 週間 hygromycinB が含まれた培地で培養し、cDNA ライブラリー導入細胞

を得た。

4. cDNA ライブラリー導入細胞の亜ヒ酸耐性スクリーニング

cDNA ライブラリー導入細胞を 3×10^5 cells/2 mL/well になるように 6 well plate に播き、37°C、5%CO₂ 存在下で 24 時間培養した後、最終濃度 7 μM となるように亜ヒ酸 (NaAsO₂) を添加した。96 時間培養後、medium を取り除き、PBS で 3 回洗浄した後、亜ヒ酸を含まない D-MEM (high glucose) 培地で 48~72 時間培養し、生き残った細胞群を亜ヒ酸耐性候補細胞群とした (Fig. 5)。

5. 亜ヒ酸に対する感受性試験

細胞を 5×10^3 cells/90 μL/well になるように 96 well plate にまいた。37°C、5%CO₂ 存在下で 24 時間培養した後、最終濃度が 0、1、2、3、5、7.5、10、15 μM になるように NaAsO₂ を 10 μL/well 添加した。72 時間培養後、alamar Blue assay (BioSource) によって細胞の生存率を測定した。

6. 亜ヒ酸耐性細胞のクローン化

回復培養後の亜ヒ酸耐性候補細胞群を 1 cell/100 μL/well になるように 2~3 回に分けて段階希釈を行い、96well plate にまいた。37°C、5%CO₂ 存在下で培養すると、1 週間ほどでコロニー

の形成が見られた。1 コロニー/well となっているものを選び、48、24、6 well plate へ段階的に移した。

7. 細胞からのゲノム DNA の抽出

細胞を 1.5 mL tube に回収し、PBS による wash 後、体積の 10~40 倍の DNA 抽出 buffer (150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM EDTA) に懸濁した。10% SDS を 1/100 倍量、proteinaseK (Invitrogen) を final 100 μg/mL、RNase を final 1 μg/mL になるように添加し、転倒混和しながら 55°C で 1 時間インキュベートした。フェノール抽出でタンパクを除き、エタノール沈殿を行い、ゲノム DNA を得た。

8. cDNA の TA クローニング

抽出したゲノム DNA について、以下のプライマーを用いて PCR を行い、cDNA インサート部分を増幅した。

Sense ;
5'-TTTTCTTCCATTTCAGGTGTCGT
GAG-3'

Antisense ;
5'-TAGAATCGAGACCGAGGAGAGG
GTTA-3'

得られた PCR 産物を pGEM-T Easy Vector (Primega) に挿入した。プラスミドを大腸菌に導入、blue/white 選別し、白いコロニーを形成した大腸菌を cDNA が挿入された候補として培養し

た。大腸菌からアルカリ法によりプラスミドを抽出し、制限酵素 *EcoRI* で切断後、電気泳動を行って、cDNA インサートが 1000 bp 以上のものについて塩基配列の解析を行った。

9. GDI2 高発現ベクターの作製

HEK293 細胞の逆転写産物を template として、以下に示す primer を用いて PCR を行った。

GDI2-primer (sense) ; 5'-ATGAATGAGGAGTACGACGTGATC-3'

GDI2-primer (antisense) ; 5'-GTCTTCCCCATAGATGTCATTCTTC-3'

PCR 産物を pEF5/FRT/V5-DEST の *EcoRV* site に挿入したものを GDI2 高発現ベクターとした。

10. GDI2 高発現 HEK293 細胞の亜ヒ酸感受性試験

HEK293 細胞を 5×10^5 cells/2 mL /well となるように 6 well plate に播き、D-MEM (10%FCS)、37°C、5% CO₂ 存在下で 24 時間培養した。GDI2 発現プラスミドを Lipofectamine2000™ を用いて 293 細胞に導入し、37°C、5% CO₂ 存在下で 6 時間培養した。その後、 1×10^4 cells/90 μ L/well となるように

96 well plate に播き、37°C、5% CO₂ 存在下で 24 時間培養後、亜ヒ酸溶液 10 μ L を添加した。さらに 48 時間培養後、alarmar Blue assay を用いて細胞生存率を測定した。

11. GDI2 高発現 HEK293 細胞のパラコートおよびアドリアマイシンに対する感受性試験

HEK293 細胞を 5×10^5 cells/2 mL /well となるように 6 well plate に播き、D-MEM (10%FCS)、37°C、5% CO₂ 存在下で 24 時間培養した。GDI2 発現プラスミドを Lipofectamine2000™ を用いて 293 細胞に導入し、37°C、5% CO₂ 存在下で 6 時間培養した。その後、 1×10^4 cells/90 μ L/well となるように 96 well plate に播き、37°C、5% CO₂ 存在下で 24 時間培養後、パラコートおよびアドリアマイシン溶液 10 μ L を添加した。さらに 48 時間培養後、alarmar Blue assay を用いて細胞生存率を測定した。

(倫理面への配慮)

本研究では動物等は使用せず、生物としてヒト培養細胞のみを用いる。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. Flp-In™ system を用いた cDNA ライ

ブラリー導入細胞の作製

ヒト培養細胞のゲノム特定部位への cDNA ライブラリーの導入は、Flp-In™ system (Invitrogen) を用いて行った。Flp-In™ system とは、Flp リコンビナーゼ発現ベクター (pOG44) と Flp Recombination Target (FRT) 部位を有する発現ベクター (pEF5) を同時に細胞に導入することで、ゲノム上に 1カ所のみ存在する FRT 部位に効率よく目的遺伝子を組み込み、目的タンパク質を安定的に発現する哺乳動物細胞株を樹立する方法である (Fig. 1 参照)。まず、約 1000 万クローンのヒト骨髄由来 cDNA ライブラリーベクターの cDNA 部分を適当な制限酵素で切り出し、FRT を持つベクター pEF5 に挿入し、約 100 万クローンの pEF5-cDNA ライブラリーを得た。ここで得られた pEF5-cDNA ライブラリーを、ゲノム上に FRT 部位をもつヒト胎児腎由来培養細胞 HEK293 (Flp-In-293Cell) に導入した。発現ベクター pEF5 には hygromycin 耐性遺伝子マーカーが存在する。そこで、ゲノム中に cDNA が導入された細胞を選択するために hygromycin B 存在下で培養し、約 1 万コロニーの cDNA 導入細胞を得ることに成功した。

2. cDNA ライブラリーを用いた亜ヒ酸耐性因子の検索とその作用機構解析

1. で得られた cDNA ライブラリー導入細胞を親株 Flp-In-293 cell において顕著な増殖抑制が観察される亜ヒ酸濃度 (7 μ M) で培養し、生き残った細胞を亜ヒ酸耐性細胞候補とした (Fig. 2)。次に亜ヒ酸耐性細胞候補の亜ヒ酸感受性を検討し、耐性を示すクローン (E15, E17) を 2 つ得た (Fig. 6)。クローン E17 から genomic DNA を回収し、ゲノム中に挿入されている cDNA 配列を調べたところ、細胞内小胞輸送に関わる Rab ファミリーの活性抑制因子である GDP dissociation inhibitor 2 (GDI2) (全長 1338 bp) の C 末端領域 (1243-1319 bp) が挿入されていることが明らかとなった。亜ヒ酸毒性と GDI2 の関係を明らかにするため、全長 GDI2 を発現する細胞を作製し、亜ヒ酸感受性を検討したところ、GDI2 過剰発現細胞はコントロールの細胞に比べて高い亜ヒ酸感受性を示した (Fig. 7)。したがって、GDI2 は亜ヒ酸毒性を増強する因子であり、GDI2 の C 末端領域の過剰発現は内因性の GDI2 の機能を阻害するため、細胞に亜ヒ酸耐性を与えている可能性が考えられる。

亜ヒ酸の毒性発現機構の一つに活性酸素産生の促進が知られている。そこで亜ヒ酸以外の活性酸素を産生する化合物 (パラコートおよびアドリアマイシン) に対する GDI2 過剰発現細

胞の感受性を検討した。その結果、GDI2 過剰発現は両化合物に対する感受性にほとんど影響を与えなかった (Fig. 8)。したがって、GDI2 過剰発現は細胞内抗酸化機構に影響を与えることなく、亜ヒ酸毒性を増強するものと考えられる。

これまでに GDI2 とヒ素毒性との関係についての報告はないことから、その関係を詳細に検討することによっ

て、新しいヒ素毒性発現機構の解明に繋がることが期待される。また、本研究で構築したスクリーニング方法は、ヒ素のみならず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に応用することが可能であり、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

なし。

E. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

A.

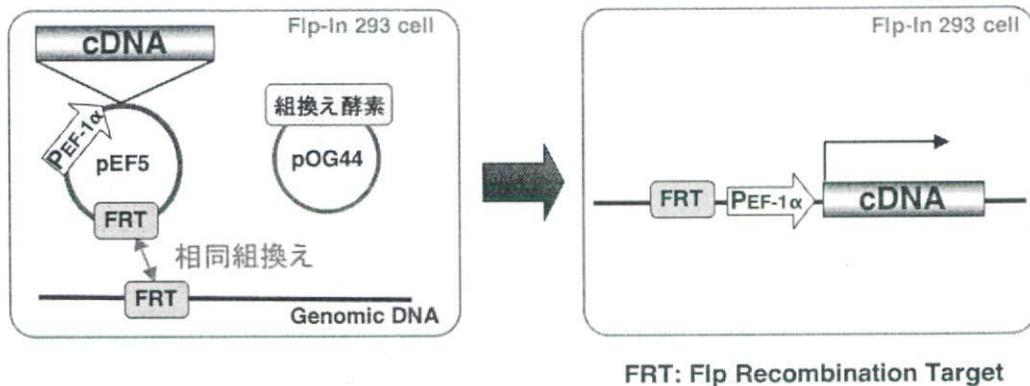


Fig. 1. Flp-In™ system を用いたゲノム上への遺伝子導入法

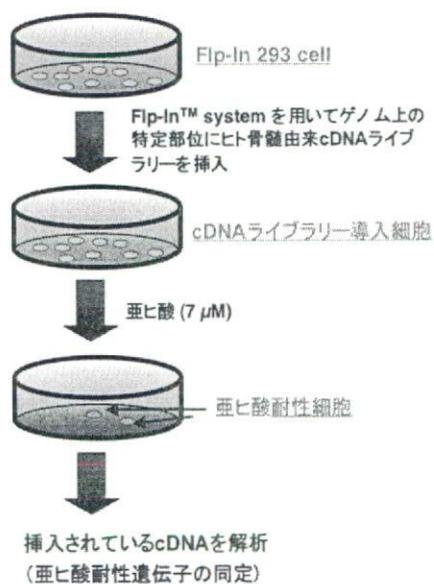


Fig. 2. cDNA ライブラリーを用いた亜ヒ酸耐性因子の検索

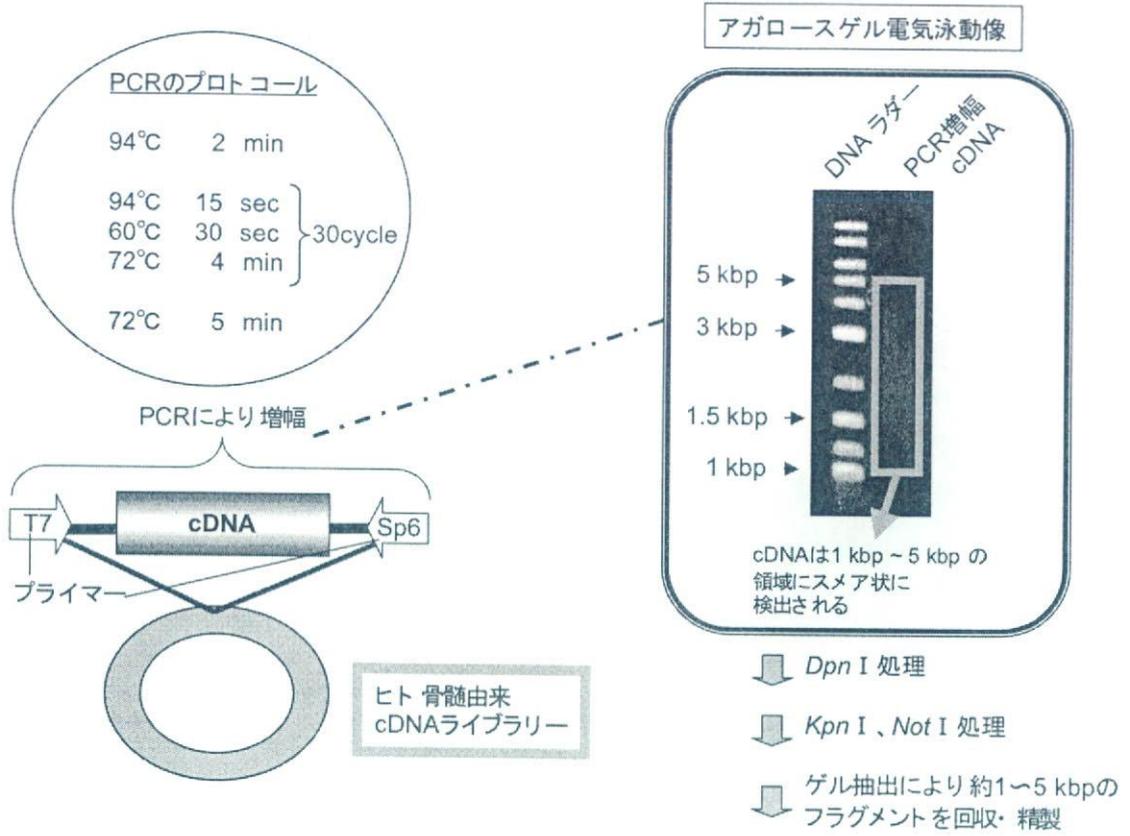


Fig. 3. PCR による cDNA ライブラリーの増幅

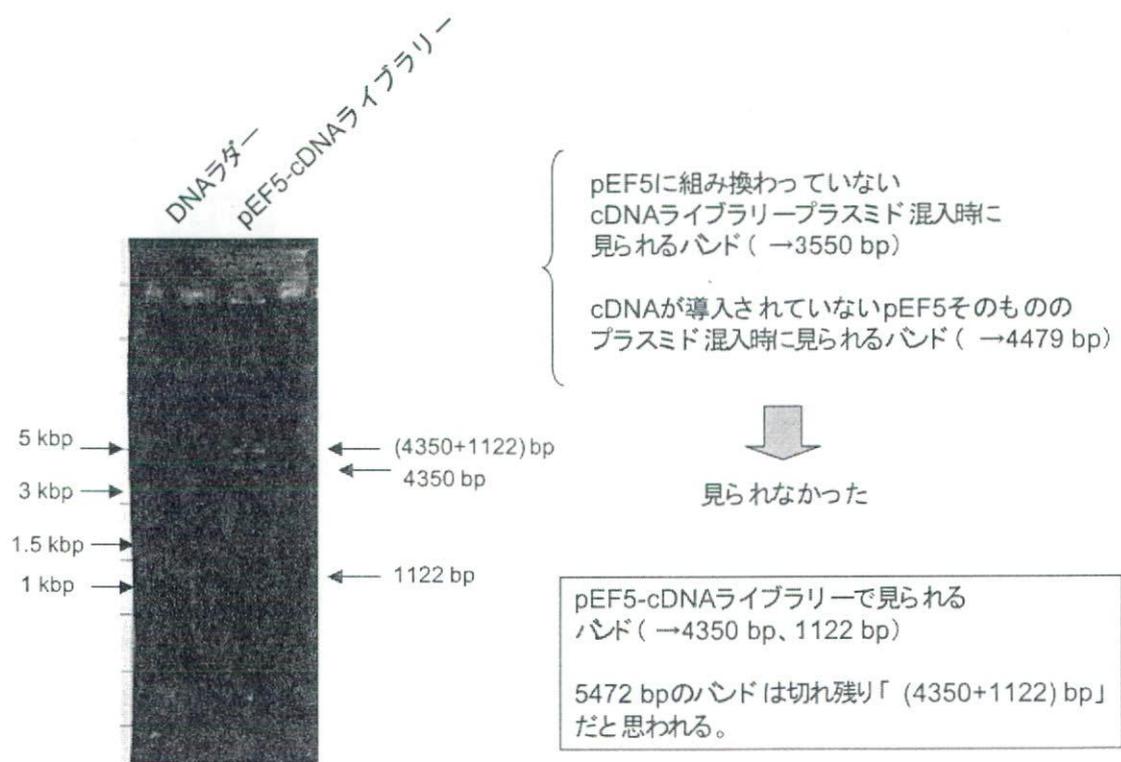
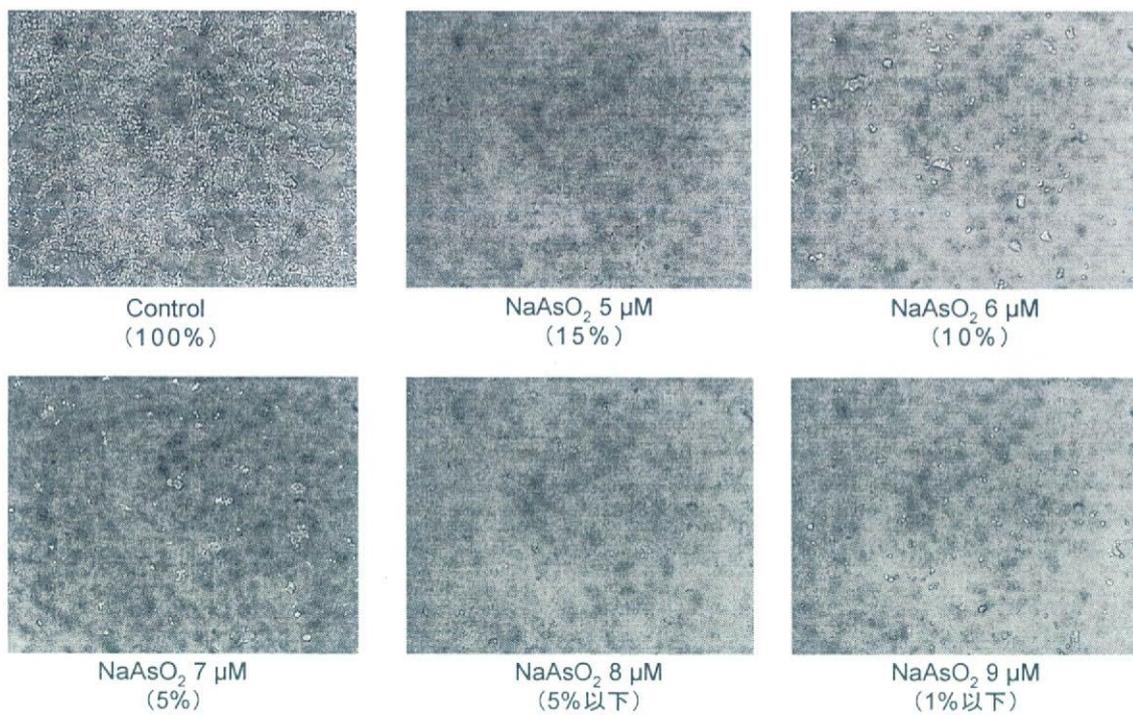
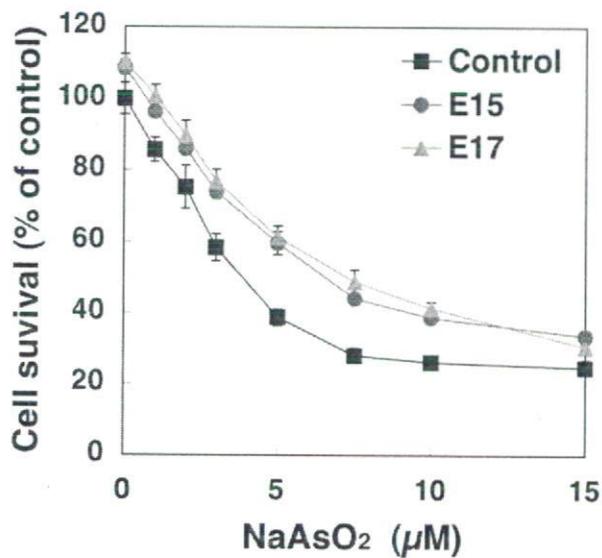


Fig. 4. pEF5-cDNA ライブラリー作製の確認 (アガロースゲル電気泳動像)
 作製した pEF5-cDNA ライブラリーのプラスミドを *Nde*I、*Xho*I で処理し、アガロース
 ゲル電気泳動によって目的とするプラスミドのみが取れていることを確認した。



※括弧内の数値(%)はcontrolを100としたときの細胞の生存率(肉眼による観察)

Fig. 5. Flp-In-293 細胞の亜ヒ酸感受性 (亜ヒ酸添加後 96 時間)



Clone E17

GDI2のC末端領域 (1243-1319 bp)
(GDI2 全長 1338 bp)

GDI2 (GDP dissociation inhibitor 2)

- ・GDP/GTP交換反応抑制蛋白質
- ・細胞内小胞輸送に関わるRabファミリーの活性制御因子

Fig. 6. 亜ヒ酸耐性クローン(E15, E17)の亜ヒ酸に対する感受性

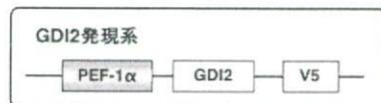
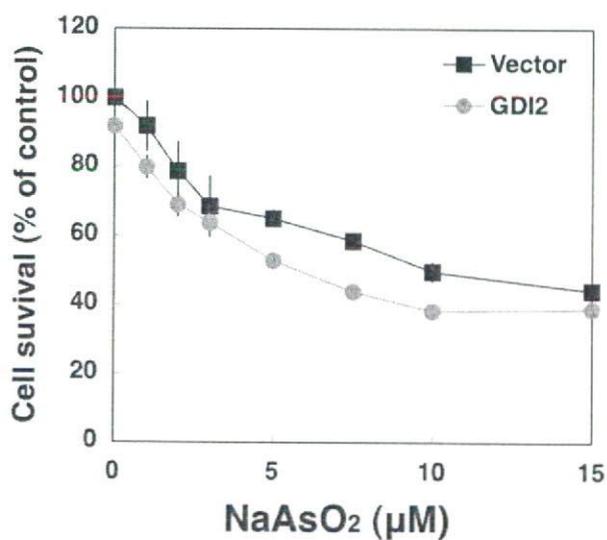


Fig. 7. GDI2 高発現が亜ヒ酸感受性に与える影響

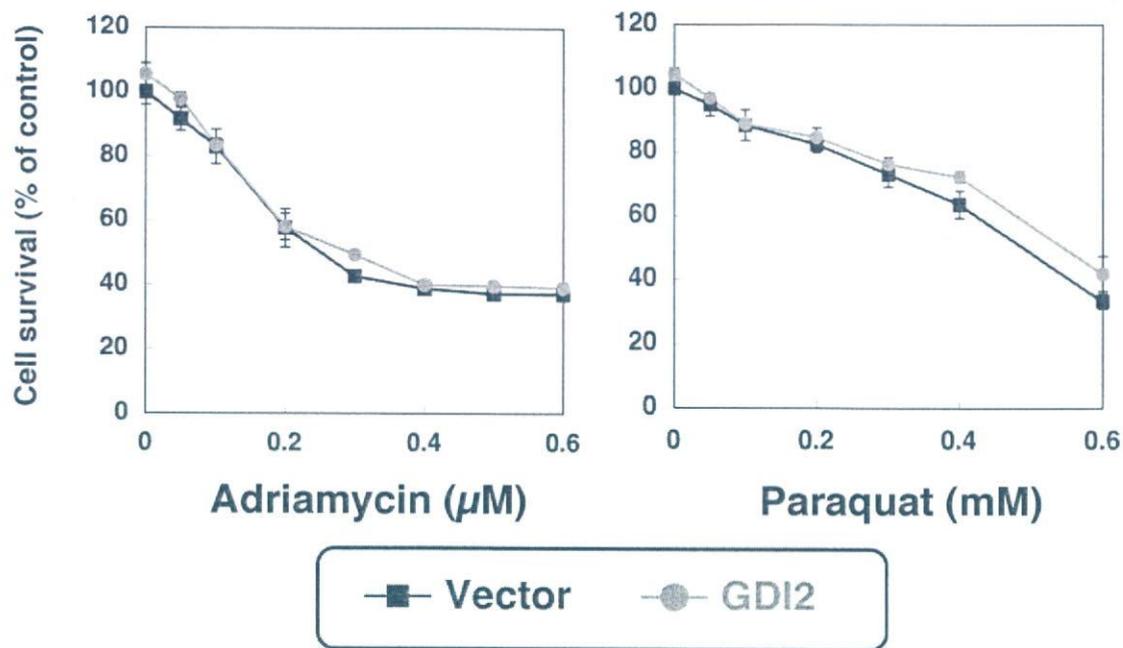


Fig. 8. GDI2 高発現がアドリアマイシンおよびパラコート感受性に与える影響

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

ピルビン酸によるメチル水銀毒性増強機構の解析

分担研究者 黄 基旭 東北大学大学院薬学研究科助手

siRNA ライブラリーを用いた検索によって、ピルビン酸合成に関わる酵素 Eno2 のノックダウンがヒト培養細胞をメチル水銀耐性にすることが判明した。そこで、メチル水銀毒性とピルビン酸との関係を検討した。細胞質で産生された pyruvate はミトコンドリアの内膜に存在する transporter (Yil006w) を介してミトコンドリア内に取り込まれ、pyruvate dehydrogenase (PDH) により acetyl-CoA に変換された後に TCA cycle に入って ATP 産生に関与する。Yil006w 欠損酵母は野生型酵母に比べメチル水銀に対して強い耐性を示し、さらに、野性型酵母で認められる pyruvate によるメチル水銀毒性増強作用を示さなかった。また、TCA cycle を構成する各因子をそれぞれ欠損させてもメチル水銀毒性に影響が認められなかったのに対し、PDH の活性を低下させた酵母は高いメチル水銀感受性を示した。さらに、PDH の構成因子である Lat1 および Lpd1 欠損酵母では、pyruvate の添加によってメチル水銀毒性が著しく増強された。これらのことから、ミトコンドリア内に蓄積された pyruvate は、acetyl-CoA に変換されて TCA cycle に入ることなく、メチル水銀毒性の増強に関わっていると考えられる。

メチル水銀がミトコンドリア中の pyruvate レベルを上昇させ、ミトコンドリア中に過剰に蓄積した pyruvate が細胞増殖を抑制している可能性が考えられる。そこで、メチル水銀が細胞内の pyruvate レベルに及ぼす影響を検討したところ、メチル水銀処理によってミトコンドリア中 pyruvate レベルは上昇し、細胞質中の pyruvate レベルは減少傾向を示した。また、Yil006w 欠損酵母ではミトコンドリア中 pyruvate レベルのメチル水銀による変動が認められなかった。これらの結果から、メチル水銀は pyruvate のミトコンドリア中への取り込みを促進させ、それによって細胞増殖を抑制する可能性が考えられる。

ミトコンドリア中への pyruvate の蓄積はミトコンドリアに何らかの影響を与え、その結果としてメチル水銀毒性が増強される可能性が考えられる。そこで、ミトコンドリアの電子伝達系とメチル水銀毒性との関係を検討したところ、

complex III の構成因子の 1 つである Rip1 の欠損が酵母にメチル水銀耐性を与えた。さらに、Rip1 は complex III の活性とは無関係に、ミトコンドリアの pyruvate transporter である Yil006w と同一の経路で pyruvate によるメチル水銀毒性増強作用に関与すること、そして、Rip1 欠損酵母は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メチル水銀耐性を獲得している可能性が示唆された。ミトコンドリアは活性酸素種を発生する主な小器官であり、また、メチル水銀による毒性発現機構の 1 つとして酸化ストレスの関与が知られている。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検討したところ、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。この結果から、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することが予想される。

これまでに、エネルギー代謝の中間産物である pyruvate がメチル水銀を含む外来ストレスによる毒性を増強させるとの報告はなく、今後、pyruvate によるメチル水銀毒性増強機構について更なる検討を行うことによって、メチル水銀の毒性発現機構が明らかになるものと期待される。

A. 研究目的

siRNA ライブラリーを用いた検索によって、ピルビン酸合成に関わる酵素 Eno2 のノックダウンがヒト培養細胞をメチル水銀耐性にすることが判明した。そこで、メチル水銀毒性とピルビン酸との関係を検討した。

B. 実験方法

1. 酵母のメチル水銀感受性

酵母の single colony を SD 培地に植菌し一晩振盪培養した後、この培養液を SD 培地で 1×10^4 cells/180 μ l になるように希釈した。液体培地中での感受

性試験においては、この希釈培養液を 96-well plate に 180 μ l 添加後、塩化メチル水銀 (最終濃度 0~140 nM) 20 μ l を添加し 30 $^{\circ}$ C で 48 時間培養後、620 nm の吸光度を測定して酵母の増殖を調べた。なお、vector のみを導入した酵母を対照として用いた。寒天培地中での感受性試験では、 1×10^6 cells を SD 培地 900 μ L に植菌した後、滅菌水または様々な濃度の塩化メチル水銀を含む溶液 100 L を加え、30 $^{\circ}$ C で 3 時間静置培養した後、 1×10^7 cells/mL となるように希釈し、5 μ mL ずつスポッティングした (final : 5×10^4 cells/spot)。そ

して気相インキュベーターを用いて 30℃で培養した後にコロニーの大きさを観察した。

遺伝子発現 plasmid の作製と酵母への導入

目的蛋白質をコードする遺伝子を酵母 chromosomal DNA を template として PCR により cloning した。それぞれの PCR 産物は TA cloning を行った後に、適当な制限酵素で切断後、酵母発現 vector である pKT10 に subcloning した。酵母の形質転換は酢酸リチウム法により行った。なお、導入した遺伝子の発現はリアルタイム定量 PCR 法で確認した。

ミトコンドリアの分画

SD 培地で培養した酵母を spheroplasting buffer(1.2 M sorbitol, 20 mM KPi, pH 7.4)に懸濁し、zymolyase 100T を加えて 30℃で 15~30 分間軽く振盪 (100×g) しながら細胞壁を消化して、spheroplast を沈殿として回収した。これを mitochondrial isolation buffer に懸濁して homogenize した後に 1000×g で 5 分間遠心し(上清を①とした)、その沈殿に mitochondrial isolation buffer を加えてさらに homogenize した (この homogenate の一部を whole cell lysate とした)。1500×g で 5 分間遠心し、上清を①の上清とあわせ、12000

×g で 10 分間遠心し、沈殿を回収した (この際に得られた上清を細胞質分画とした)。その沈殿に mitochondrial isolation buffer を加え、12000×g で 10 分間遠心し、沈殿に mitochondrial isolation buffer を加えた後に 1500×g で 5 分間遠心し、上清を分取した。この上清を 12000×g で 10 分間遠心し、沈殿画分を PMSF を添加しなかった mitochondrial isolation buffer に懸濁し、12000×g で 10 分間遠心し、沈殿をミトコンドリア画分とした。

ミトコンドリア内ピルビン酸の定量

ミトコンドリア分画をソニケーターを用いて 30 秒間超音波処理し、氷上に 30 秒間つけ冷却する操作を 2 回繰り返した。超音波処理したサンプルを 12000×g で 10 分間遠心し、上清を 0.1 μm pore の micro-filter に入れ、6000×g で 5 分間遠心し、filtrate を回収した。その filtrate 300 μL を 0.1 M Tris-buffer (pH 7.4) 240 μL を入れた(final 0.05 M) キューベットに分注した。37、15 分間静置した後、L-lactate dehydrogenase 2 unit または 500 μM β-NADH の 0.1 M トリスバッファーを 60 μL 加え (final 50 mM β-NADH)、37、30 秒間反応しながら、波長 340 nm の吸光度の変化から β-NADH の減少量を求め、ピルビン酸量を算出した。

(倫理面への配慮)

本研究では動物等は使用せず、生物として酵母およびヒト培養細胞のみを用いる。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. Yil006w 欠損酵母におけるメチル水銀感受性の検討

培地中への pyruvate の添加がメチル水銀毒性を顕著に増強させることが酵母 (Figure 1) およびヒト由来細胞 (Figure 2) で確認された。細胞質で産生された pyruvate はミトコンドリアの内膜に存在する transporter (Yil006w) を介してミトコンドリアマトリックスに流入されることが知られている。そこで、pyruvate のミトコンドリアへの取り込みとメチル水銀毒性との関係を調べるため、Yil006w 欠損酵母を用いてメチル水銀感受性を time course により検討した。その結果、Yil006w 欠損酵母 (*yil006w* Δ) は、野生型酵母 (WT) に比べメチル水銀に対して強い耐性を示し、さらに、Yil006w 欠損酵母では野生型酵母で認められる pyruvate によるメチル水銀毒性増強作用が認められなかった (Figure 3)。このことから、pyruvate がミトコンドリア中に取り込まれることによって、メチル水銀毒性が増強されると考えられる。

2. TCA cycle 関連因子とメチル水銀毒性との関係

ミトコンドリア中に取り込まれた pyruvate は acetyl-CoA に変換された後に TCA cycle に入って ATP 産生に参与する (Figure 4)。Pyruvate を acetyl-CoA に変換する酵素は pyruvate dehydrogenase であり、Pda1, Pdb1, Lat1, Lpd1 および Pdx1 の複数の蛋白質で構成されている。Pyruvate の acetyl-CoA への変換とメチル水銀毒性との関係を調べるために、pyruvate dehydrogenase の構成因子である Pda1, Pdb1, Lat1 および Lpd1 の欠損の影響を検討したところ、これら因子をそれぞれ欠損させた酵母は野生型酵母に比べて高いメチル水銀感受性を示した (Figure 5-1)。また、TCA cycle を構成する各酵素についても同様に検討したところ、欠損によってメチル水銀毒性に影響を与える酵素は存在しなかった (Figures 5-1, 5-2)。なお、citrate を isocitrate に変換する酵素である Aco1 を欠損させた酵母は野生型酵母に比べて高いメチル水銀感受性を示したが、Aco1 欠損酵母はメチル水銀非存在下での増殖が野生型酵母に比べて遅いため、メチル水銀感受性を正確に判断することはできなかった (データ示さず)。

TCA cycle の各ステップに関わる因

子の中で、pyruvate を acetyl-CoA に変換する pyruvate dehydrogenase の構成因子 (Pda1, Pdb1, Lat1 および Lpd1) のみが欠損により酵母にメチル水銀高感受性を与えたが、その高感受性の程度は Lat1 および Lpd1 欠損酵母の方が Pda1 および Pdb1 欠損酵母より高かった (Figure 5-1)。Pyruvate dehydrogenase の活性は Pda1 または Pdb1 の欠損によって約 30% 程度低下するのに対し、Lat1 または Lpd1 の欠損ではほとんど活性が認められなくなることから、pyruvate dehydrogenase の活性が低下する程、メチル水銀毒性が増強されると考えられる。

次に、pyruvate によるメチル水銀毒性増強作用における pyruvate dehydrogenase の役割を検討するために、pyruvate dehydrogenase の活性中心である Lat1 (dihydrolipoyl transacetylase) を欠損させた酵母において pyruvate がメチル水銀毒性に与える影響を調べた。これまでの当研究室での検討結果と同様に、野性型酵母を無毒性濃度の pyruvate で処理することによってメチル水銀毒性の増強が観察されたが、Lat1 欠損酵母が示すメチル水銀高感受性も pyruvate の添加によってさらに増強された (Figure 6)。Lpd1 欠損酵母においても Lat1 欠損酵母と同様の結果が認められた (Figure 7)。これらの結果から、ミトコンドリア

マトリックス内に蓄積された pyruvate は、acetyl-CoA に変換されて TCA cycle に入ることなく、メチル水銀毒性の増強に関わっていると考えられる。

3. メチル水銀がミトコンドリア中の pyruvate レベルに与える影響

メチル水銀で処理した酵母よりミトコンドリア画分および細胞質画分を単離し、pyruvate レベルを調べた。なお、ミトコンドリア画分が確かに単離されていることを marker 蛋白質である cytochrome oxidase subunit に対する抗体を用いた Western blotting によって確認した (Figure 8C)。その結果、ミトコンドリア中の pyruvate レベルはメチル水銀処理によって増加することが明らかとなった (Figure 8A)。一方、細胞質中の pyruvate レベルはメチル水銀処理によって減少傾向を示した (Figure 8B)。この結果から、メチル水銀は pyruvate のミトコンドリア中濃度を上昇させる作用を有するものと思われる。メチル水銀処理によって細胞質中の pyruvate レベルは減少したことから、メチル水銀がミトコンドリア中への pyruvate の取り込みを促進させている可能性も考えられる。一方、pyruvate の培地中への添加がミトコンドリア中 pyruvate レベルに与える影響を検討したところ、ミトコンドリア中

の pyruvate レベルは上昇傾向を示したものの、統計的に有意な変動は認められなかった (Figure 9)。単独では毒性を示さない濃度の pyruvate の培地中への添加がメチル水銀の毒性を著しく増強させることから、Figure 9 の結果は、メチル水銀が pyruvate のミトコンドリア中への取り込みを促進させ、この結果として細胞増殖が抑制されるという可能性を強く示唆している。

4. メチル水銀が pyruvate dehydrogenase 活性に与える影響

前項でメチル水銀が pyruvate のミトコンドリア中濃度を上昇させることが判明し、その機構としてメチル水銀がミトコンドリアへの pyruvate の流入を促進させる可能性が考えられるが、ミトコンドリア中での pyruvate 代謝を抑制することによってミトコンドリア中の pyruvate レベルを増加させている可能性も否定できない。

Figure 6 および 7 に示したように、pyruvate dehydrogenase の活性がほとんど抑制されている Lat1 および Lpd1 欠損酵母は野性型酵母に比べて高いメチル水銀感受性を示すとともに、pyruvate によるメチル水銀毒性の増強度合いも高い。Pyruvate dehydrogenase は 3 つの complex で構成されており、その活性には dihydrolipoyl transacetylase (Lat1) の Lys 残基に結

合している lipoic acid が中心的な役割を担っている。この lipoic acid は可逆的にジスルフィド結合を形成する SH 基を持ち、その酸化還元反応により脱炭酸された pyruvate に acetyl 基を転移させる。一方、メチル水銀は SH 基との結合性が強く、特に SH 酵素はメチル水銀によってその活性が強く阻害されることが知られている。したがって、ミトコンドリア中に取り込まれたメチル水銀が Lat1 の SH 基に結合することによって pyruvate dehydrogenase の活性を阻害し、その結果としてミトコンドリア中に pyruvate を蓄積させる可能性も考えられる。

そこで、メチル水銀が pyruvate dehydrogenase の活性に与える影響を検討した。その結果、ミトコンドリア中の pyruvate レベルを増加させる濃度のメチル水銀処理によって pyruvate dehydrogenase 活性の有意な低下が観察された (Figure 10)。しかし、その程度は非常に弱いことから、メチル水銀による pyruvate dehydrogenase 活性の阻害はメチル水銀によるミトコンドリア中 pyruvate レベルの増加にはほとんど関与していないと考えられる。

また、ミトコンドリア内膜に存在する pyruvate transporter である Yil006w を欠損させた酵母での、ミトコンドリア中 pyruvate 濃度に及ぼすメチル水銀の影響を検討したところ、Yil006w 欠

損酵母ではミトコンドリア中 pyruvate レベルのメチル水銀による変動がほとんど認められなかった (Figure 11)。この結果からも、メチル水銀がミトコンドリア中での pyruvate の代謝を阻害してその濃度上昇を引き起こすという可能性は低いと思われる。だが、Yil006w 欠損酵母のミトコンドリア中 pyruvate レベルは野性型酵母の約 80% であったことから、ミトコンドリアへの pyruvate 流入には Yil006w 以外の因子も関わっていると考えられる。Yil006w は過剰な pyruvate のミトコンドリア中への取り込みに関与する transporter なのかも知れない。

5. 電子伝達系に関わる因子の欠損が酵母のメチル水銀感受性に与える影響

電子伝達反応には多くの蛋白質が関与しており、これらの蛋白質が 4 つの complex (I、II、III および IV) を形成している (Figure 12)。電子伝達系の complex I (NADH-ユビキノ酸化還元酵素) は Ndi1、Nde1 および Nde2 で構成されている。Ndi1 は TCA cycle の脱水素酵素などによって生じたミトコンドリアマトリックス側の NADH を酸化してユビキノンを還元するが、Nde1 および Nde2 は細胞質側からの電子を利用することが知られている。これらの因子の中で、Ndi1

はその欠損によって電子伝達系 complex I の活性が阻害されるが、Nde1 および Nde2 はそれぞれを欠損させても complex I の活性に影響を与えない。一方、complex II (succinate-ユビキノ酸化還元酵素) は Sdh1、Sdh2、Sdh3 および Sdh4 からなる複合体で、TCA cycle 中において succinate を fumarate に変換させる酵素であり、succinate の酸化によって生じた電子をユビキノンに伝達する。Complex II の因子を 1 つでも欠損させると、complex II としての活性が低下する。Complex III (ユビキノール-cytochrome c 酸化還元酵素) は Cob、Cyt1、Rip1、Cor1、Qcr2、Qcr6、Qcr7、Qcr8、Qcr9、Qcr10 などで構成されている。その中で、Cob は cytochrome *b* であり、ミトコンドリア DNA によりコードされる因子である。Cyt1 は cytochrome *c*₁ であり、Rip1 は Rieske iron-sulfur protein である。これら 3 つの因子はユビキノンから cytochrome *c* への電子伝達に関与しており、これらの因子をそれぞれ欠損させると complex III の活性はほとんど消失することが知られている。最後に、complex IV (cytochrome *c* 酸化酵素) は Cox1、Cox2、および Cox3 で構成される中心的な subunit と、Cox4、Cox5A、Cox5B、Cox6、Cox7、Cox8、Cox9、Cox12 および Cox13 からなる。Cox1、Cox2 および Cox3 はミトコンド

リア DNA によりコードされ、他の因子は核 DNA にコードされている。これら complex IV の因子もそれぞれ欠損させるとその複合体の活性が低下することが知られている。

そこで、ミトコンドリアの電子伝達系とメチル水銀毒性との関係を調べるために、電子伝達系に関わる様々な因子の欠損がメチル水銀感受性に与える影響を検討した。その結果、欠損によって酵母をメチル水銀耐性にしたのは complex III の構成因子の 1 つである Rip1 のみであり、その他の complex I ~ IV の構成因子は、いくつかは欠損によって酵母をメチル水銀高感受性にしたものの、ほとんどの因子の欠損はメチル水銀感受性に顕著な影響を与えなかった (Figures 13-1, 2)。Rip1 が欠損すると complex III の活性が低下すると考えられるが、Rip1 は complex III としての機能のほかに、proton pumping にも深く関与することが報告されている因子である。Rip1 欠損による complex III 活性の低下を確認するため、Rip1 を含むいくつかの complex III 構成因子の欠損酵母をグリセロールの YP 培地で培養した。グリセロールを糖原とする場合は、すべてのエネルギーの産生が電子伝達系に依存するため、電子伝達系の機能が低下した酵母は増殖できない。その結果、Rip1 を含む Qcr2 および Qcr8 欠損酵母

がグリセロール培地で増殖できないことが確認された (Figure 14)。このことから、3 種の complex III 構成因子をそれぞれ欠損させた酵母では complex III の活性がほとんど消失していると考えられるが、これら因子の中で、Rip1 のみが欠損によって酵母にメチル水銀耐性を与えたことから、Rip1 欠損によるメチル水銀耐性獲得は complex III の活性低下に起因するものではなく、Rip1 特異的な機能の消失によって引き起こされる可能性が考えられる。

なお、pyruvate transporter である Yil006w を欠損させた酵母はグリセロール培地中での増殖が認められた (Figure 14)。したがって、少なくとも Yil006w 欠損によって電子伝達系の活性は抑制されないと考えられる。

6. Pyruvate によるメチル水銀毒性増強における Rip1 の役割

Pyruvate によるメチル水銀毒性増強作用における Rip1 の役割を検討するため、Rip1 欠損酵母をメチル水銀と同時に pyruvate で処理したところ、Rip1 欠損酵母では、野生型酵母で認められた pyruvate によるメチル水銀毒性増強作用がほとんど認められなかった (Figure 15)。この結果から、pyruvate によるメチル水銀毒性増強に Rip1 が強く関わっているものと考えられる。

次に、Rip1 とミトコンドリア中の pyruvate transporter である Yil006w との関係性を調べるために、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影響