

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 H₂DCFDA 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。

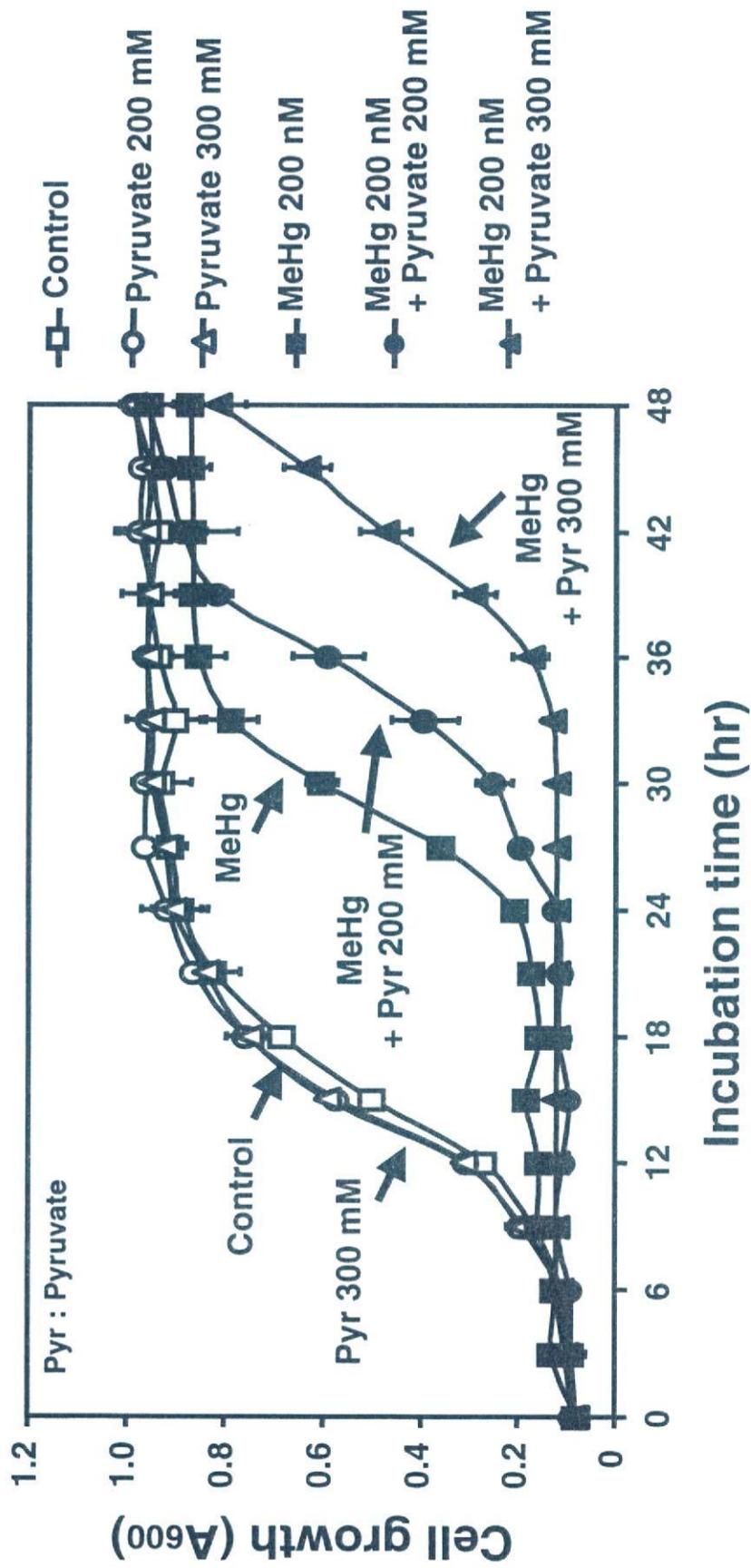


Figure 1. Pyruvateが酵母のメチル水銀感受性に与える影響
 5×10^5 cells/mLの野生酵母をメチル水銀 (200 nM)およびpyruvateの存在下で、30°Cで培養し、酵母の増殖を経時的に検討した。

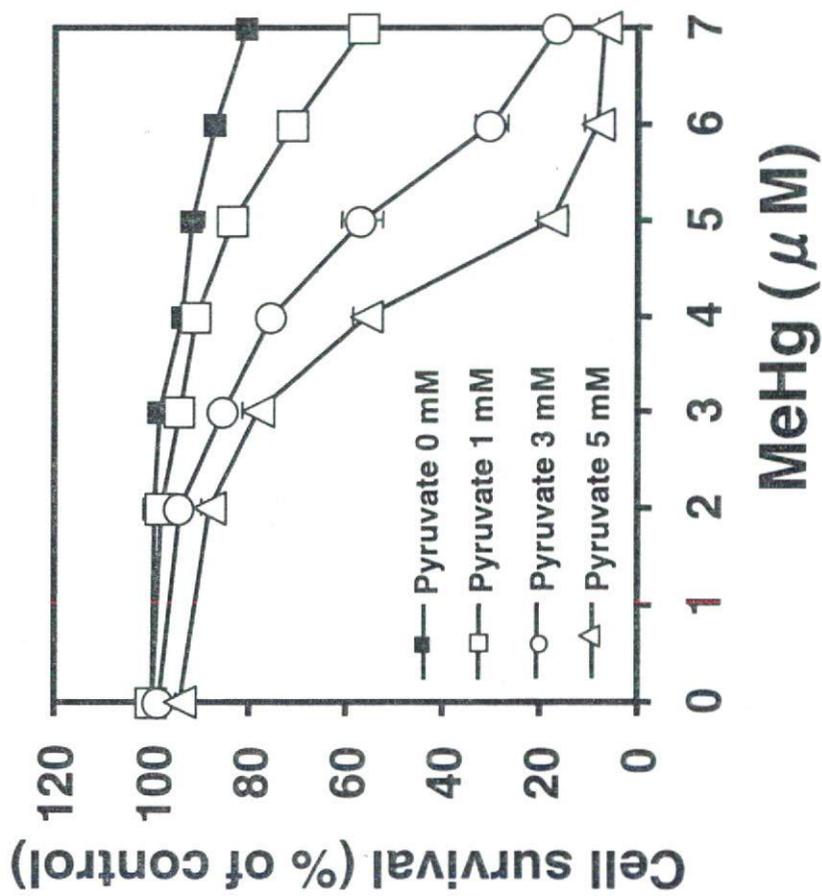


Figure 2. Pyruvateがヒト由来神経芽腫細胞 (IMR-32)のメチル水銀感受性に与える影響
 2×10^4 cells/mLのIMR-32細胞をメチル水銀およびpyruvate存在下で、37°Cで48hr培養後、Alamar blue試薬を用いて細胞の生存率を検討した。

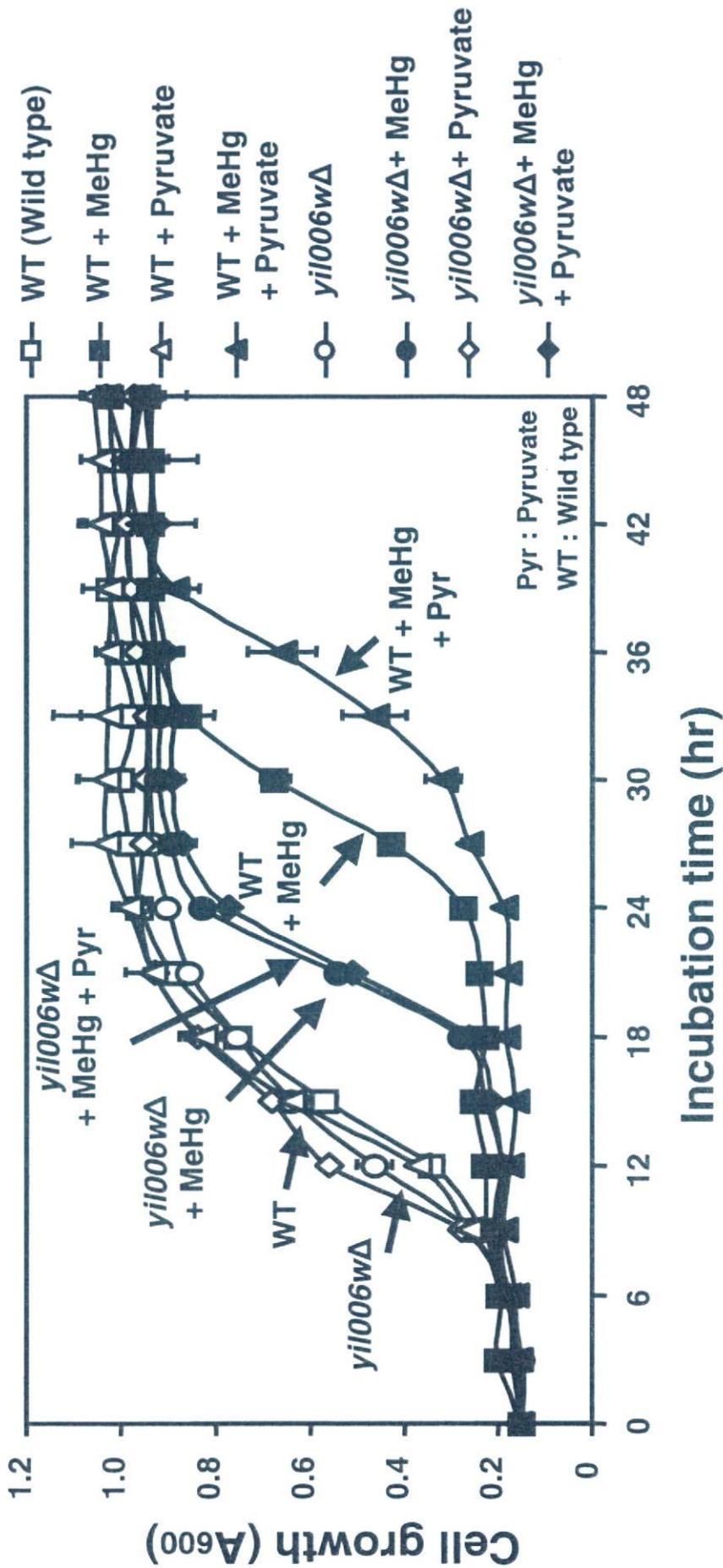


Figure 3. PyruvateがYil006w欠損酵母のメチル水銀感受性に与える影響
 5×10^5 cells/mLの酵母をメチル水銀 (200 nM)およびpyruvate (200 mM)の存在下で、30°Cで培養し、酵母の増殖を経時的に観察した。

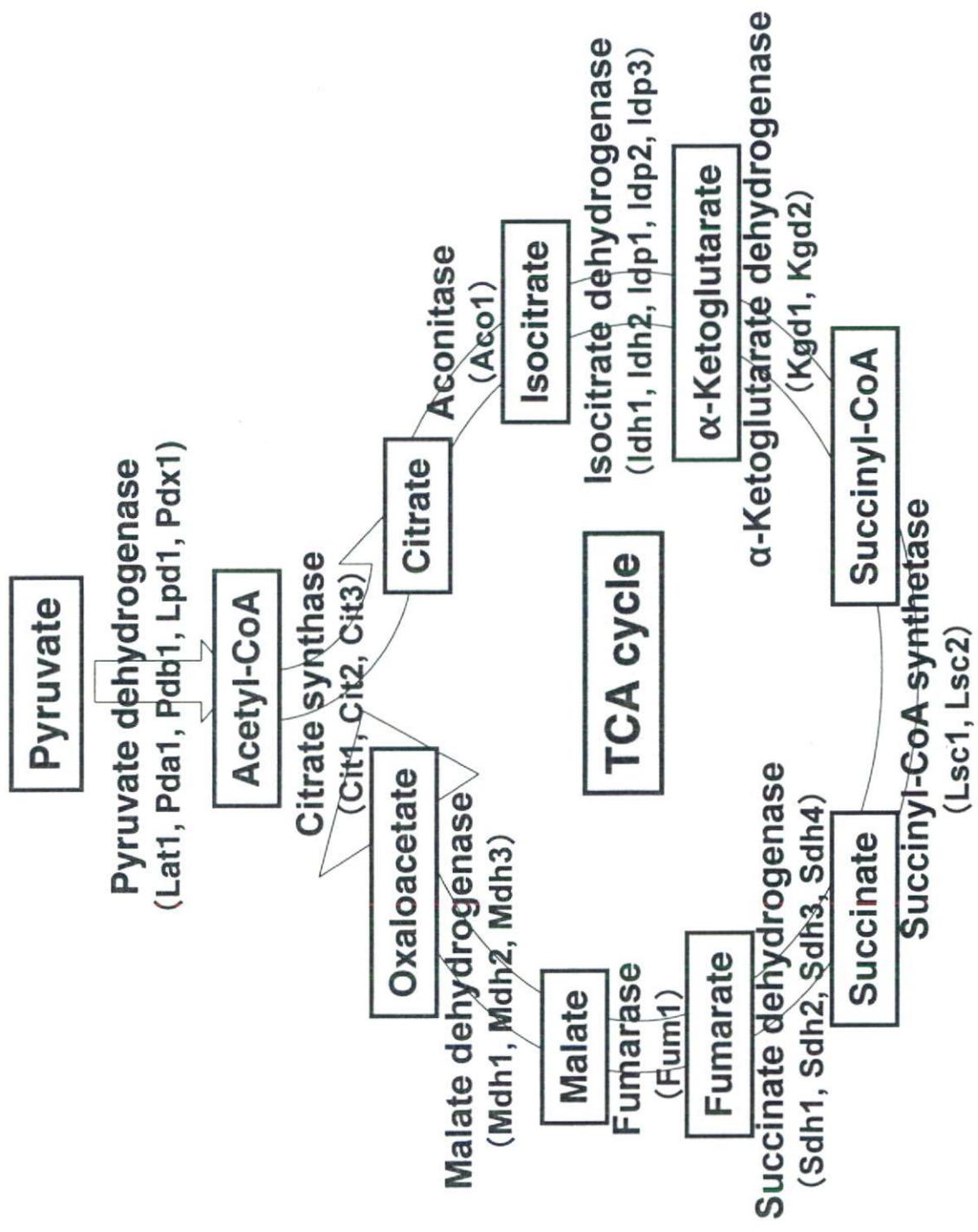


Figure 4. TCA cycle模式图

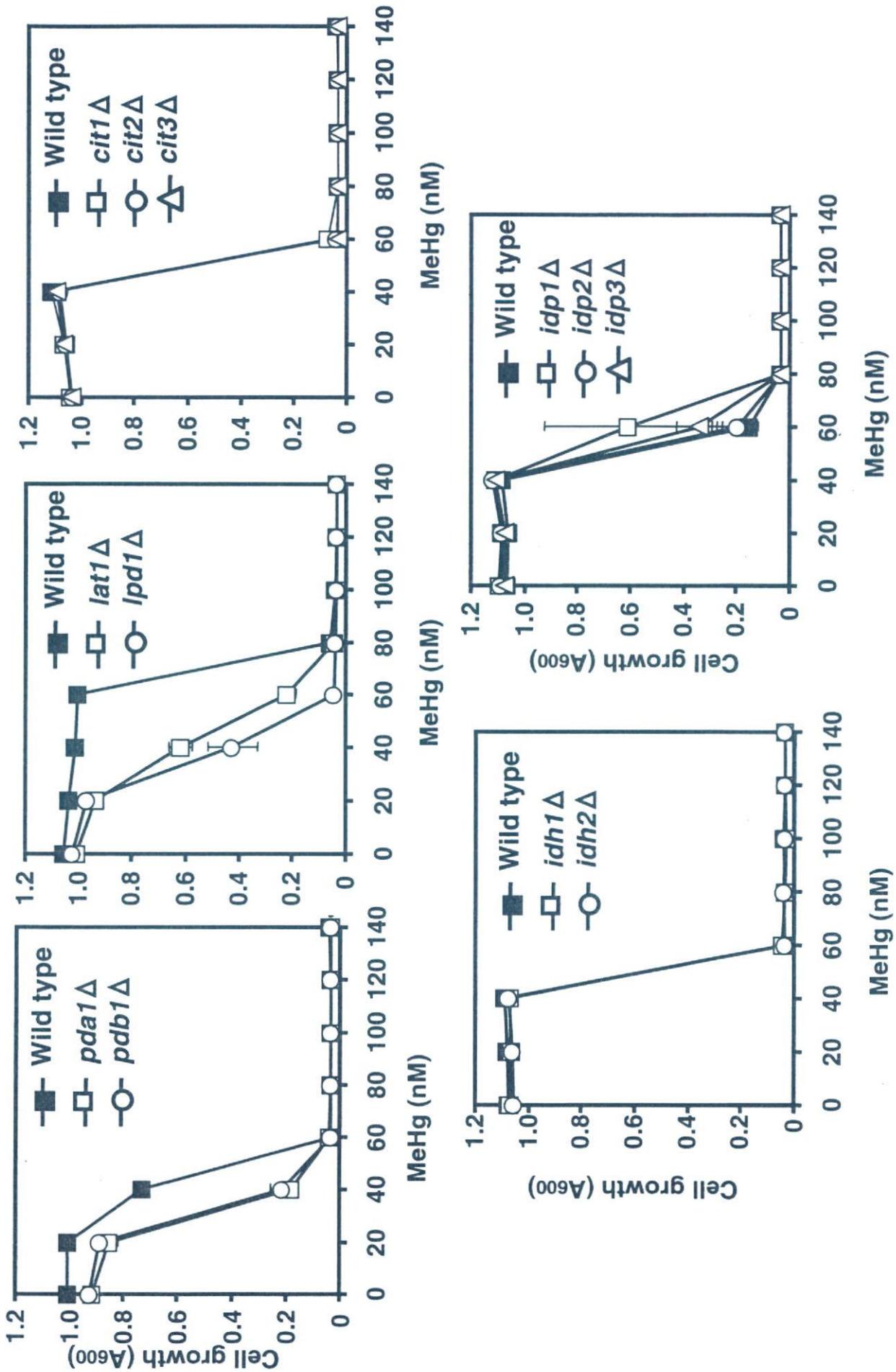


Figure 5-1. TCA cycleを構成する因子の欠損がメチル水銀感受性に与える影響
 5×10^4 cells/mLの酵母をメチル水銀メチル水銀存在下で、30°Cで48hr培養後、酵母の生存率を濁度(A600)により測定した。

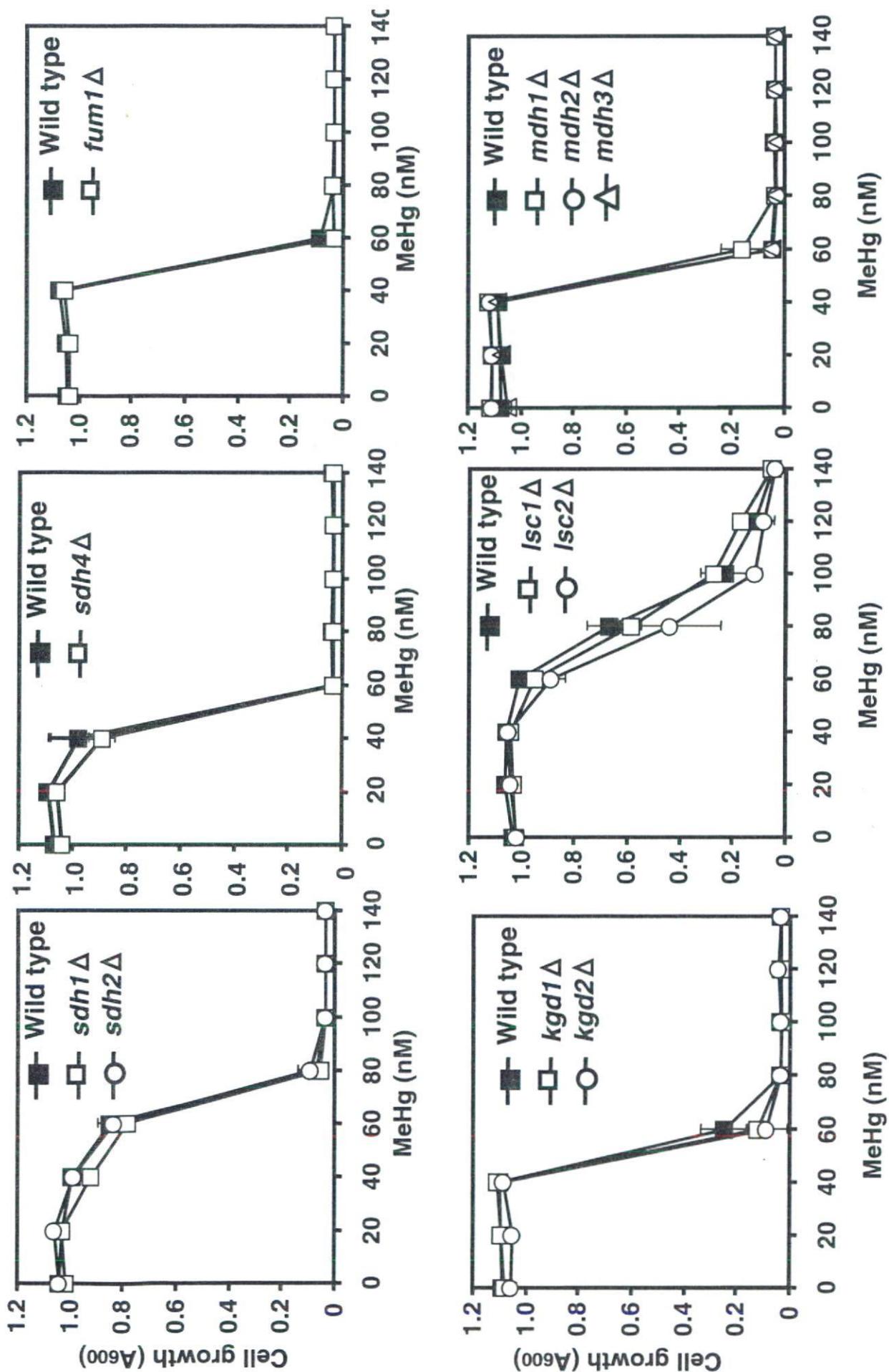


Figure 5-2. TCA cycleを構成する因子の欠損がメチル水銀感受性に与える影響

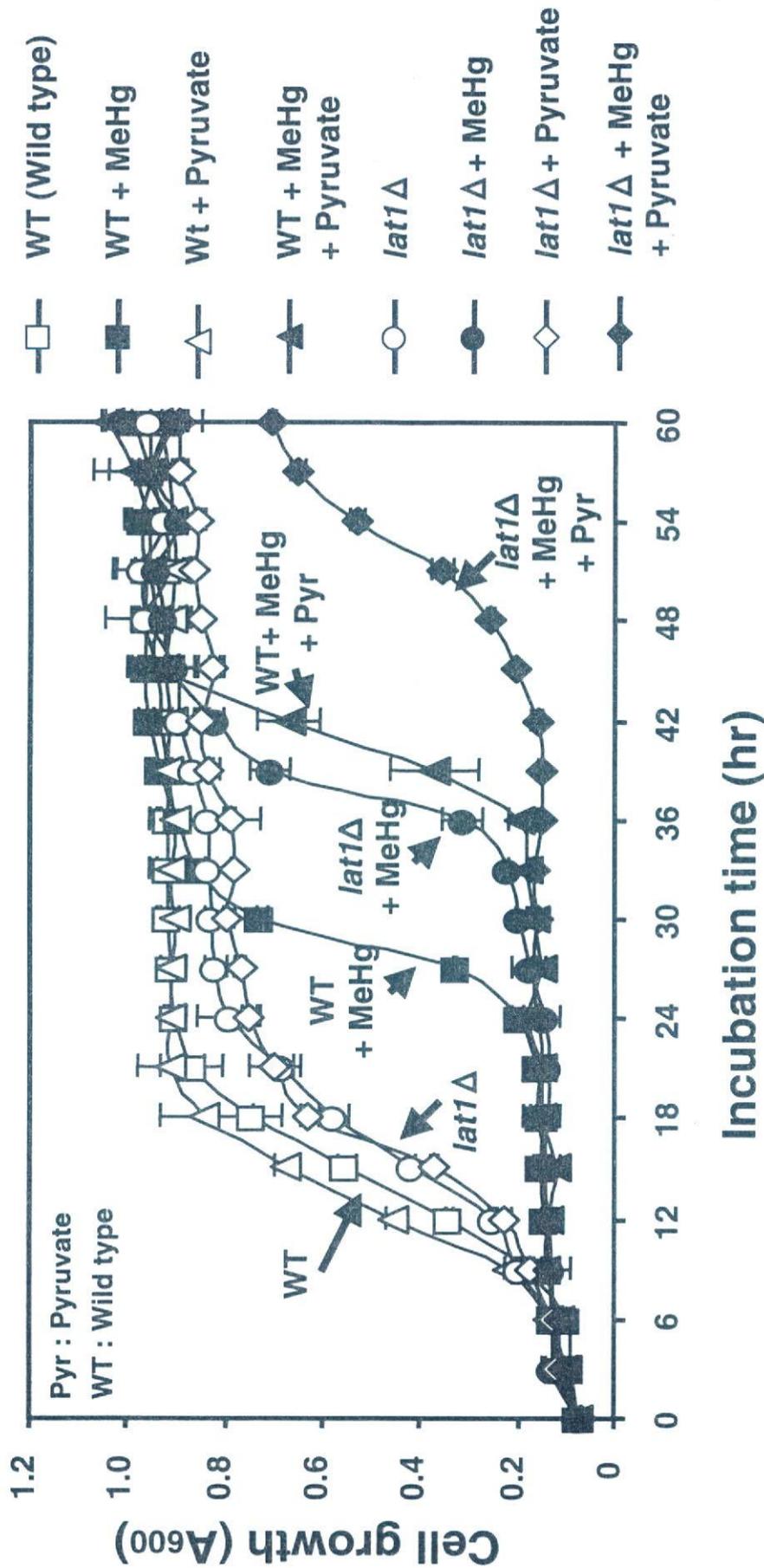


Figure 6. PyruvateがLat1欠損酵母のメチル水銀感受性に与える影響

5 × 10⁵ 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。

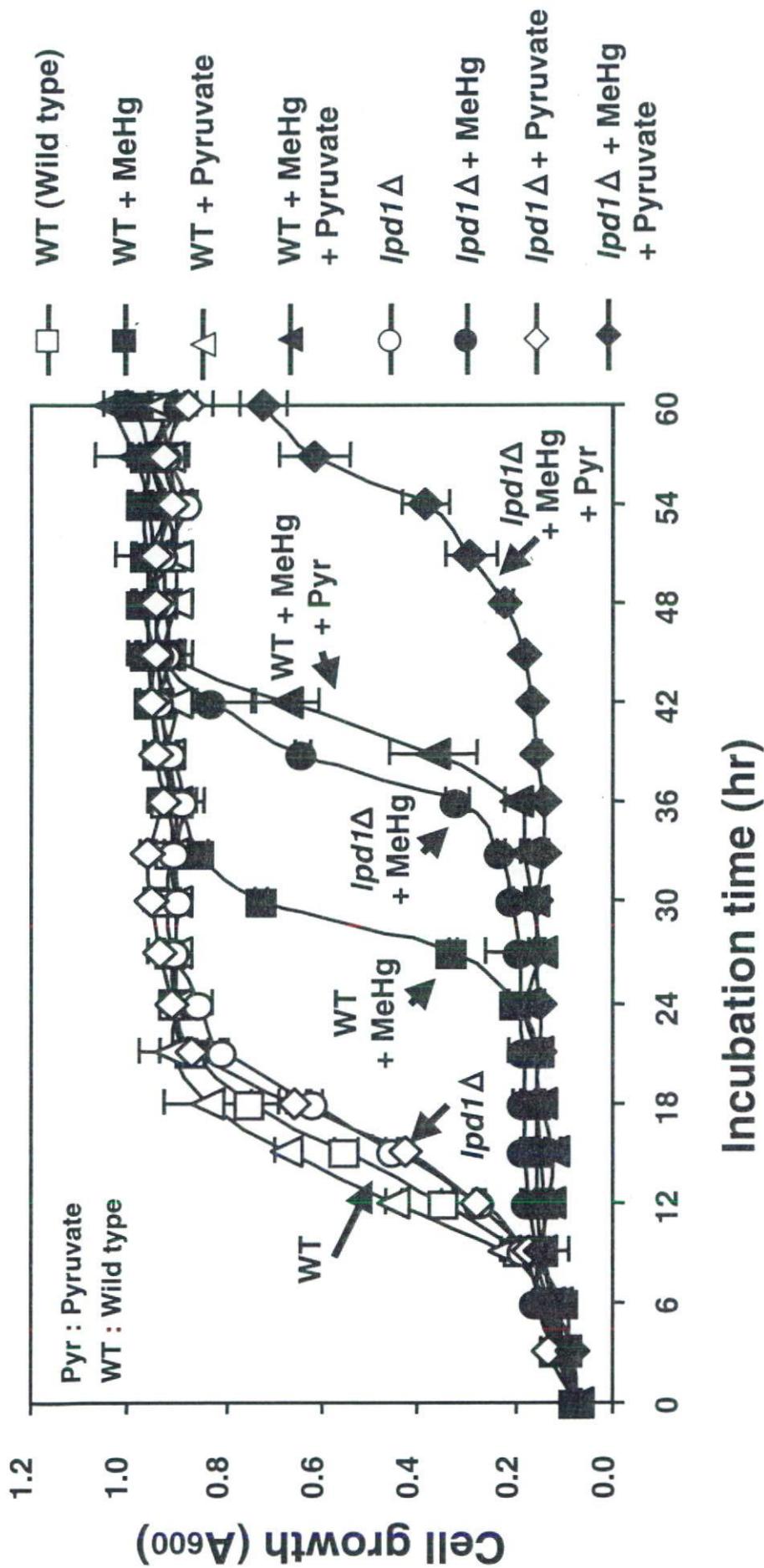


Figure 7. Pyruvateが*Ipd1*欠損酵母のメチル水銀感受性に与える影響
 5×10⁵ cells/mLの酵母をメチル水銀(200 nM)およびpyruvate(200 mM)存在かで、30°Cで培養し、酵母の増殖を経時的に検討した。

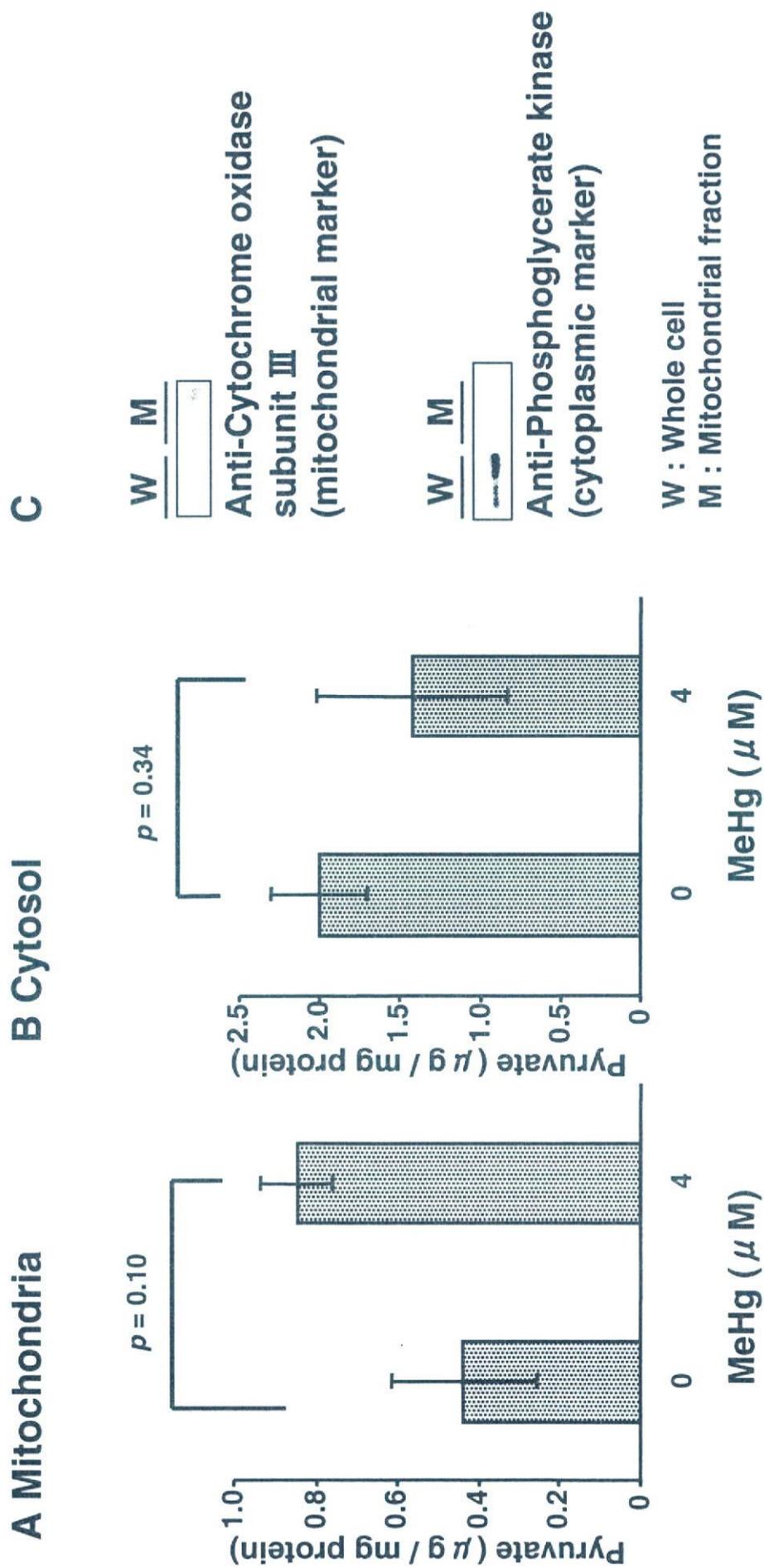


Figure 8. メチル水銀がミトコンドリアおよび細胞質中のpyruvateレベルに与える影響
 ミトコンドリアまたは細胞質中のpyruvateのレベルを測定した(A. ミトコンドリア B. 細胞質)。Cはマーカー蛋白質を指標としたミトコンドリア画分の確認結果。

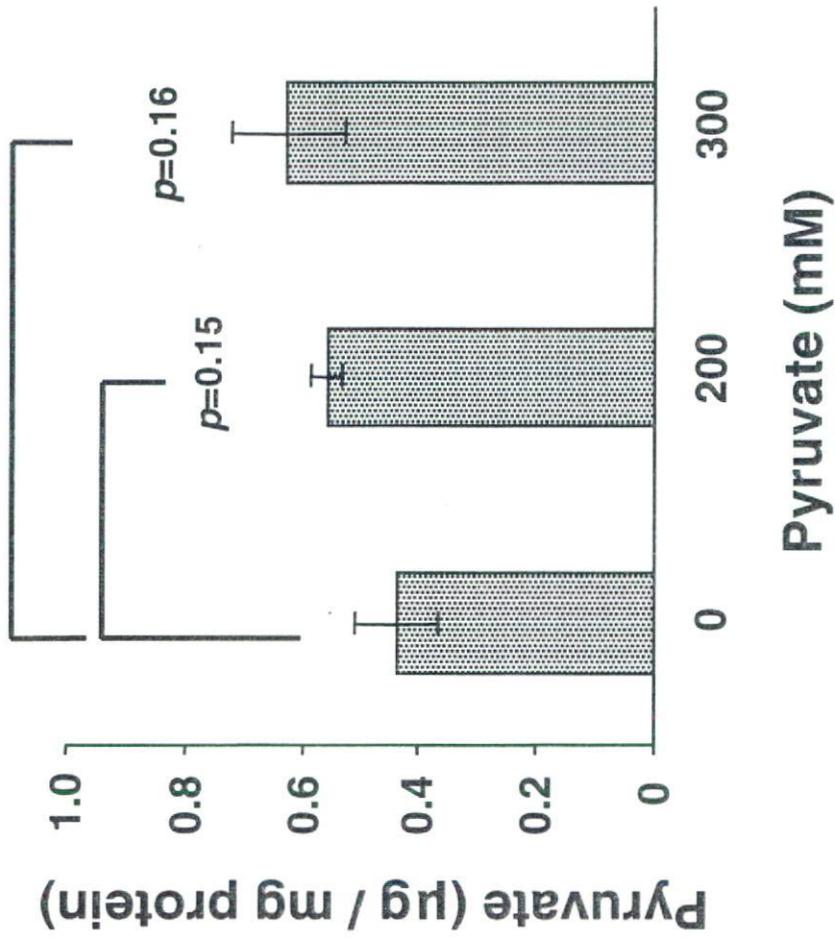


Figure 9. Pyruvateの培地中への添加がミトコンドリア中のpyruvateレベルに与える影響
 培地にpyruvateを添加し、24hr培養後に、ミトコンドリア中のpyruvateのレベルを測定した。

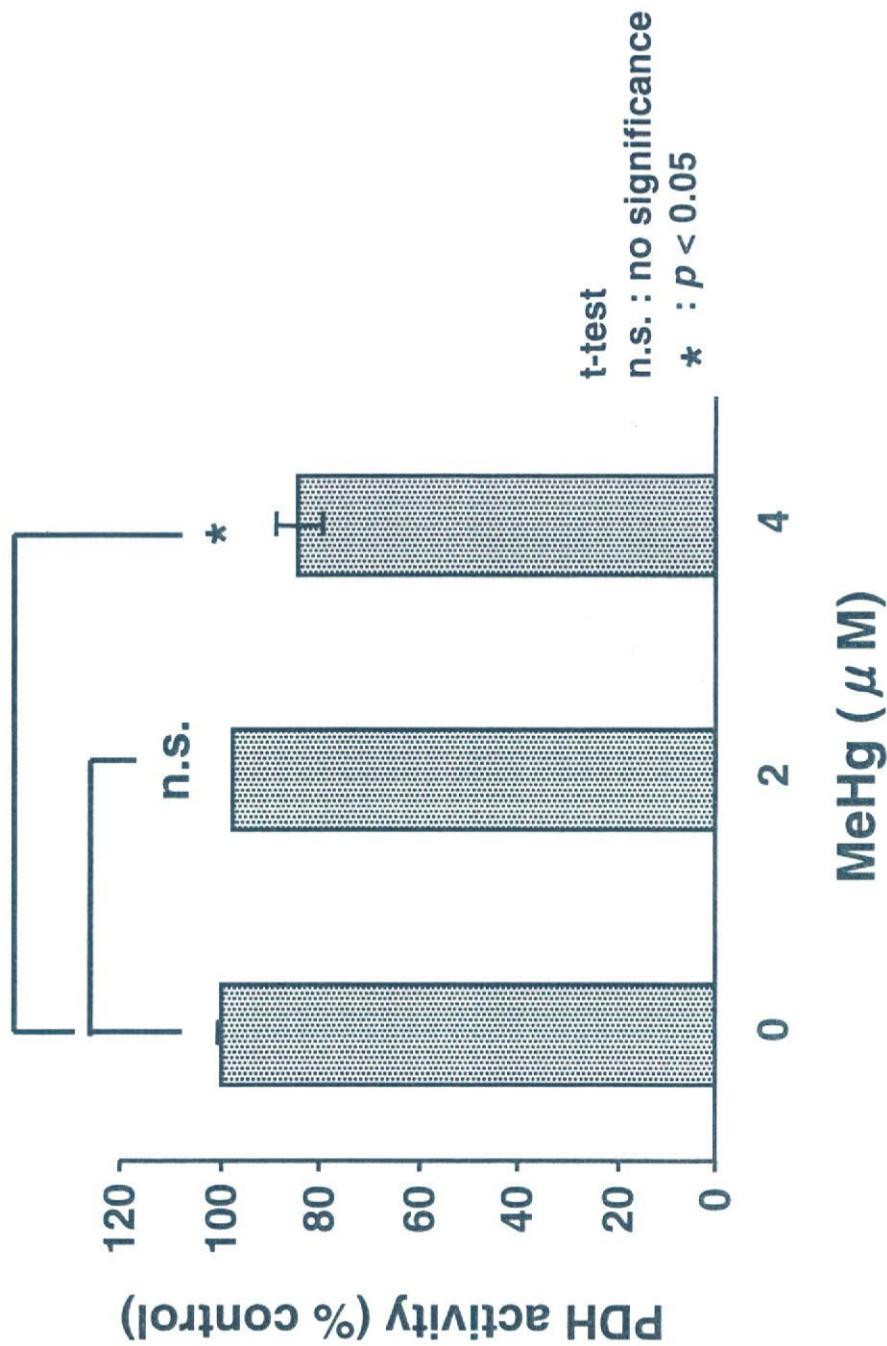


Figure 10. メチル水銀がpyruvate dehydrogenase (PDH)の活性に与える影響

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。

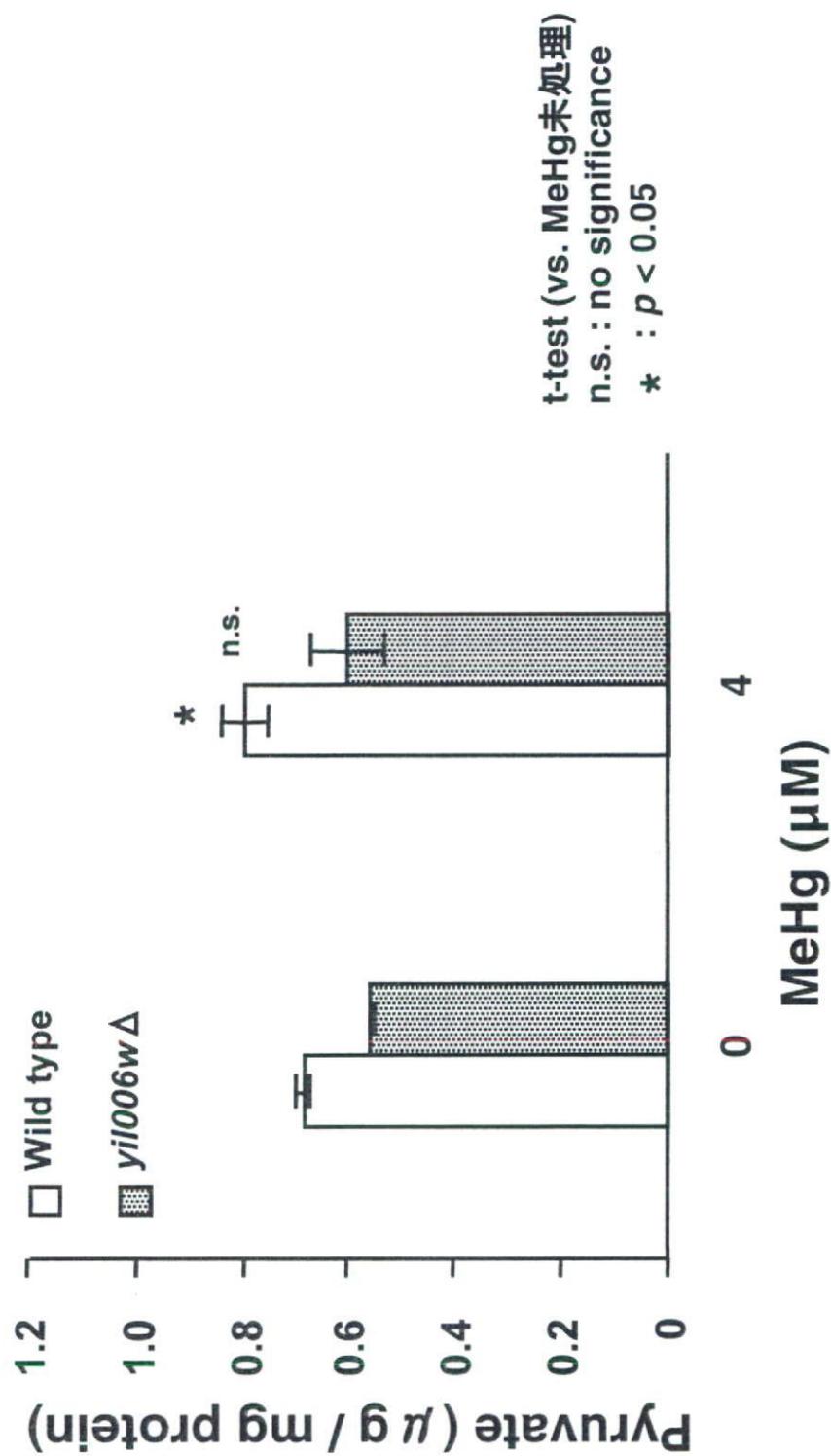
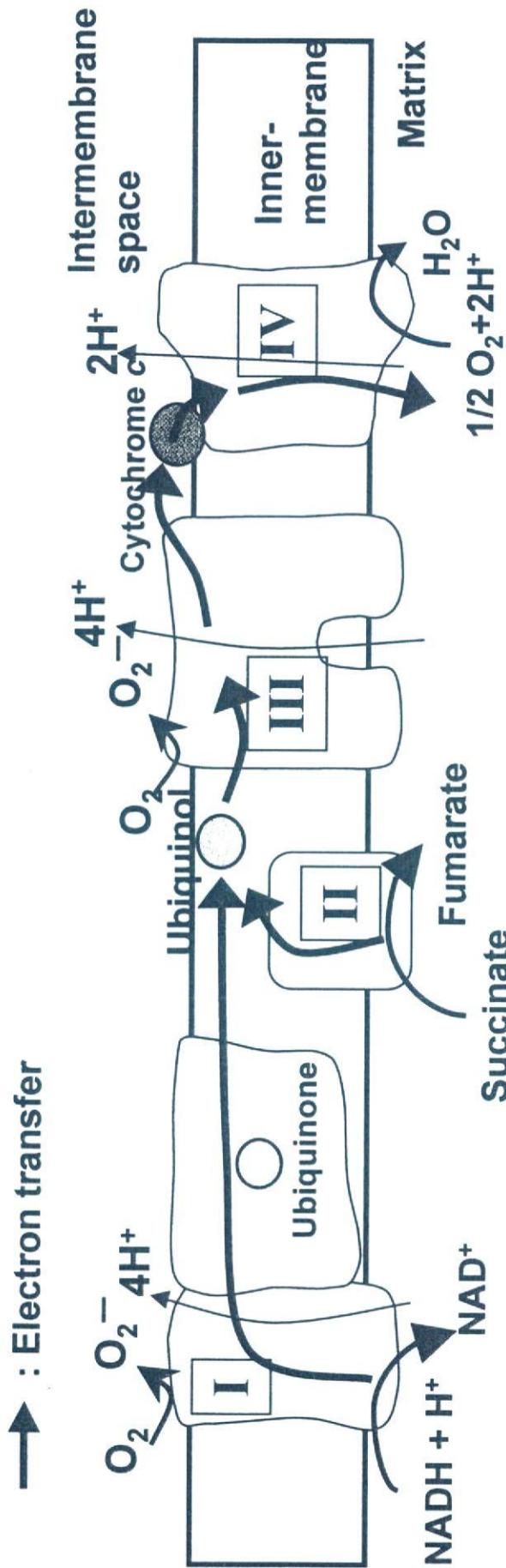


Figure 11. メチル水銀がYil006w欠損酵母のミトコンドリア中pyruvateレベルに与える影響

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。



Mitochondrial Respiratory Chain Complexes

Complex I : NADH dehydrogenase

Ndi1, Nde1, Nde2

Complex III : Cytochrome bc1 complex

Cob, Cyt1, Rip1, Cor1, Qcr2,
Qcr6, Qcr7, Qcr8, Qcr9, Qcr10

Complex II : Succinate dehydrogenase

Sdh1, Sdh2, Sdh3, Sdh4

Complex IV : Cytochrome oxidase

Cox1, Cox2, Cox3, Cox4, Cox5a,
Cox5b, Cox6, Cox7, Cox8, Cox9,
Cox12, Cox13

Figure 12. 電子伝達系模式図

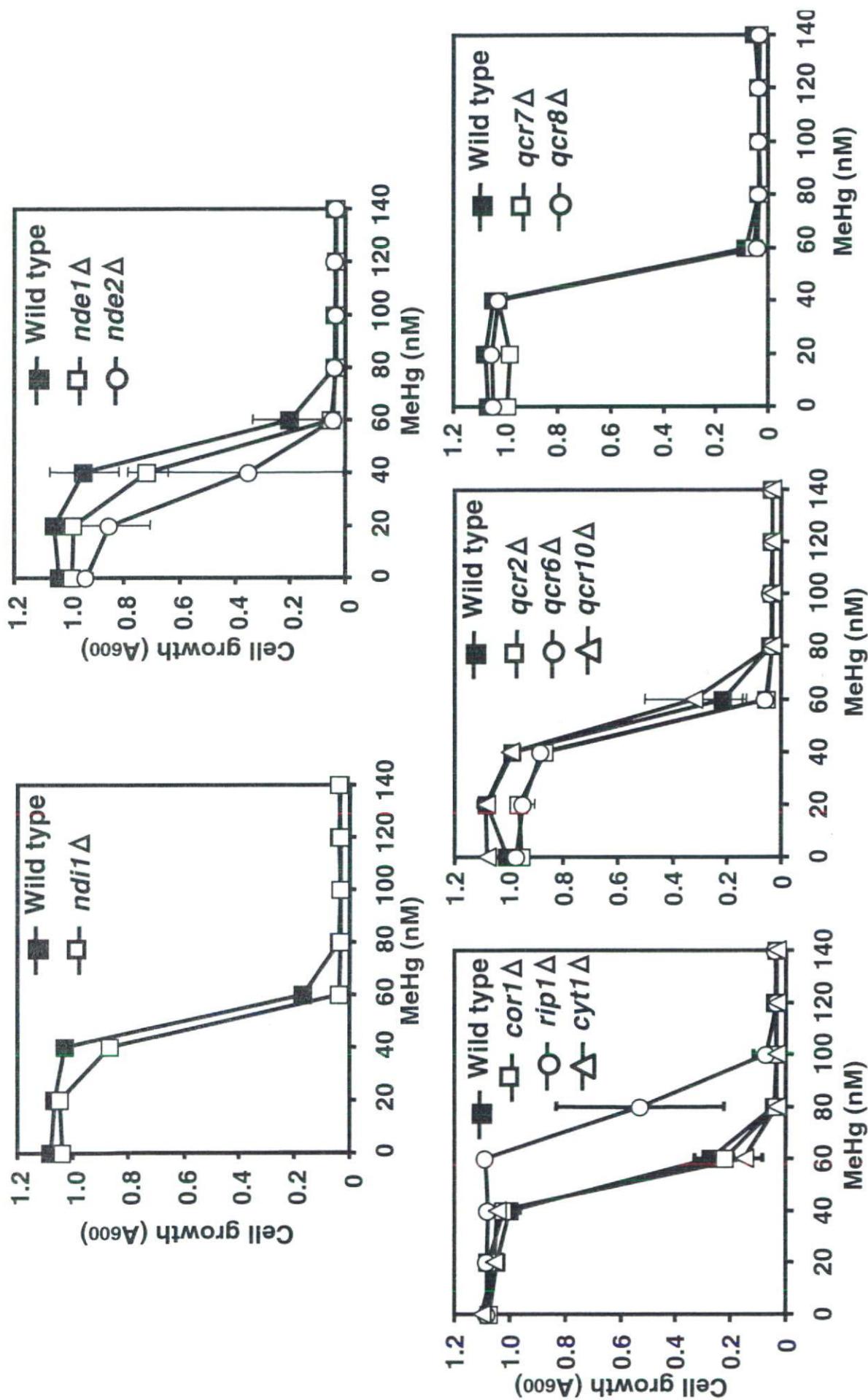


Figure 13-1. 電子伝達系関連酵素を構成する因子の欠損がメチル水銀感受性に与える影響
 5×10^4 cells/mLの酵母をメチル水銀存在下で、30°Cで48hr培養後、酵母の生存率を濁度(A600)により測定した。Complex I: Ndi1, Nde1, Nde2, Complex III: Cor1, Rip1, Cyt1, Qcr2, Qcr6, Qcr7, Qcr8, Qcr10.

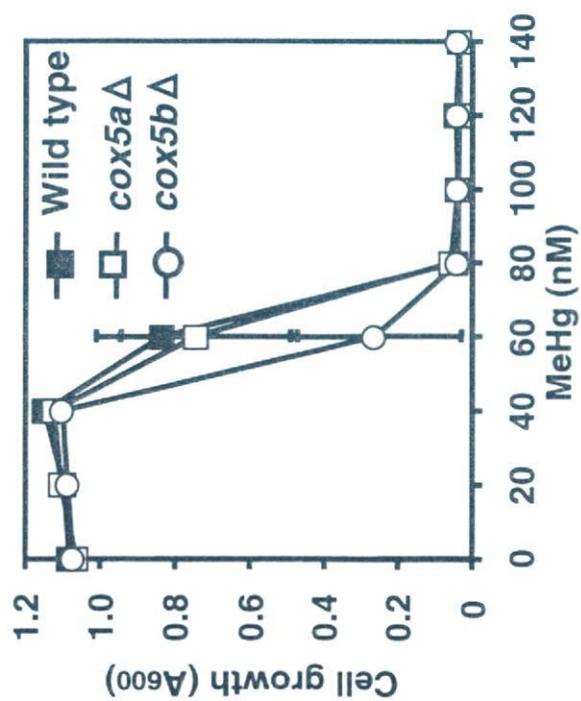
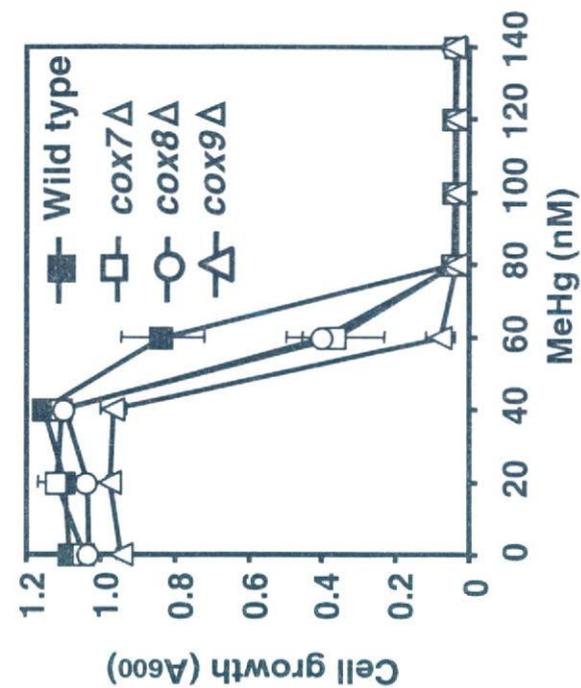


Figure 13-2. 電子伝達系関連酵素を構成する因子の欠損がメチル水銀感受性に与える影響

5 × 10⁴ 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.

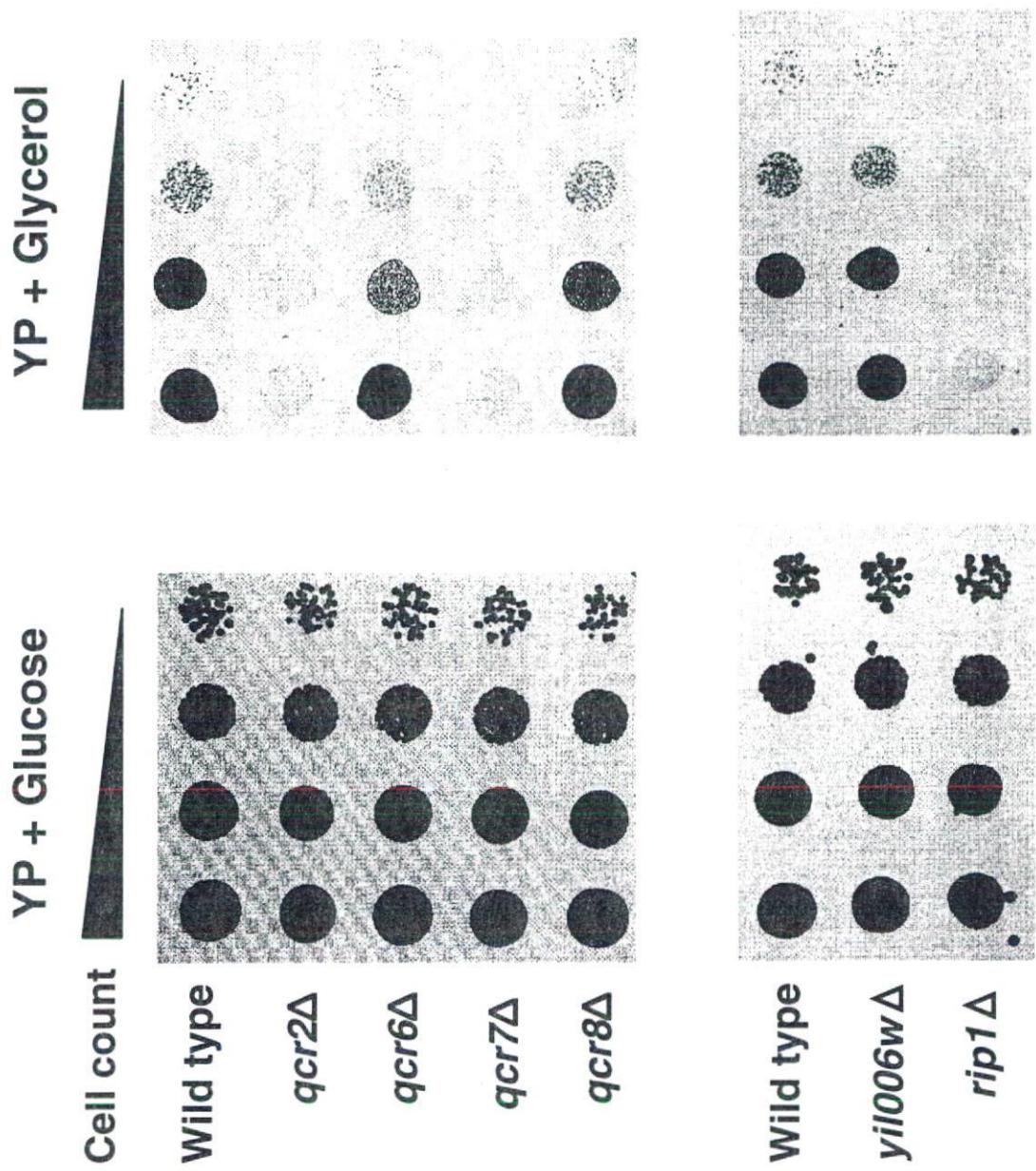


Figure 14. 電子伝達系complex III構成因子の欠損が呼吸鎖の機能に与える影響
 それぞれの培地に 1×10^5 , 1×10^4 , 1×10^3 , 1×10^2 cells/spot となるように各酵母をスポットイングした後、30°Cで培養後、観察した。

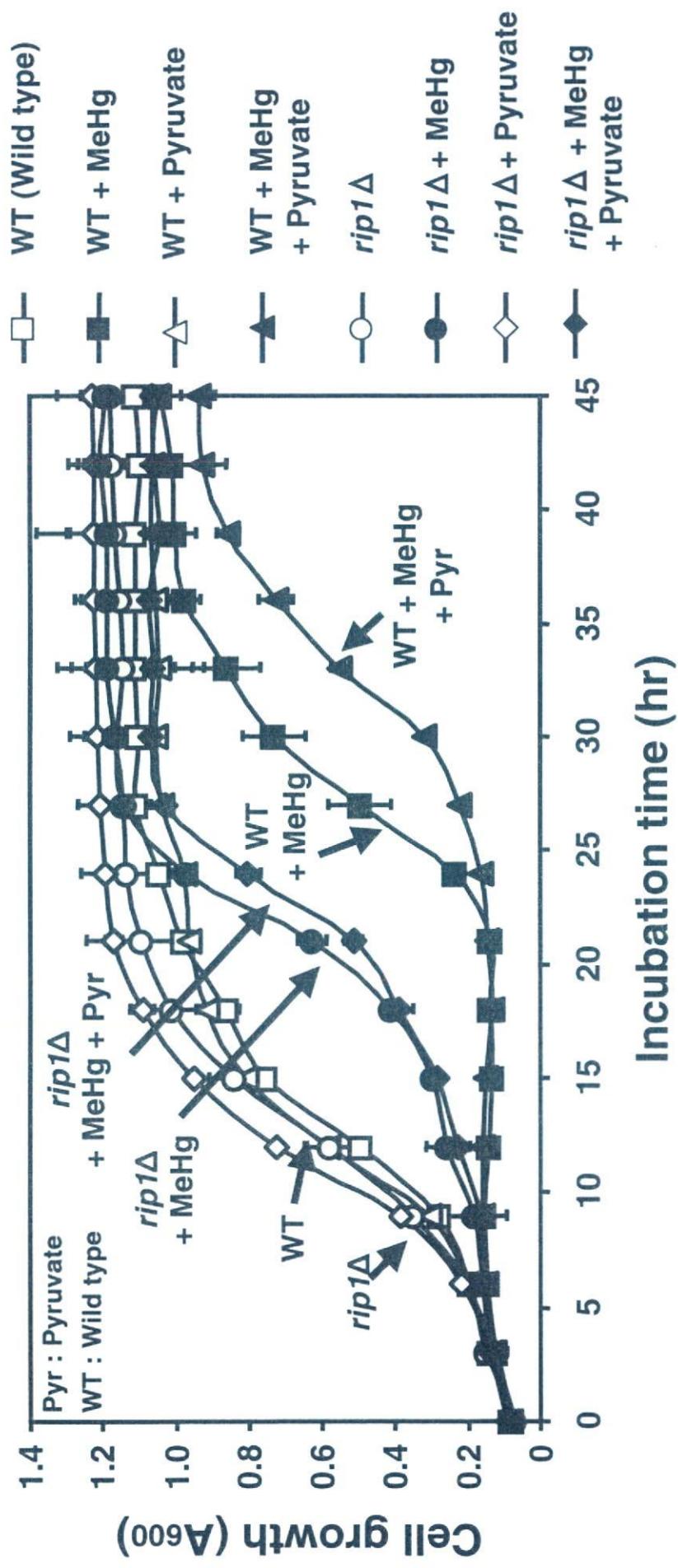


Figure 15. PyruvateがRip1欠損酵母のメチル水銀感受性に与える影響
 5×10^5 cells/mLの酵母をメチル水銀(200 nM)およびpyruvate(200 mM)存在かで、30°Cで培養し、酵母の増殖を経時的に検討した。

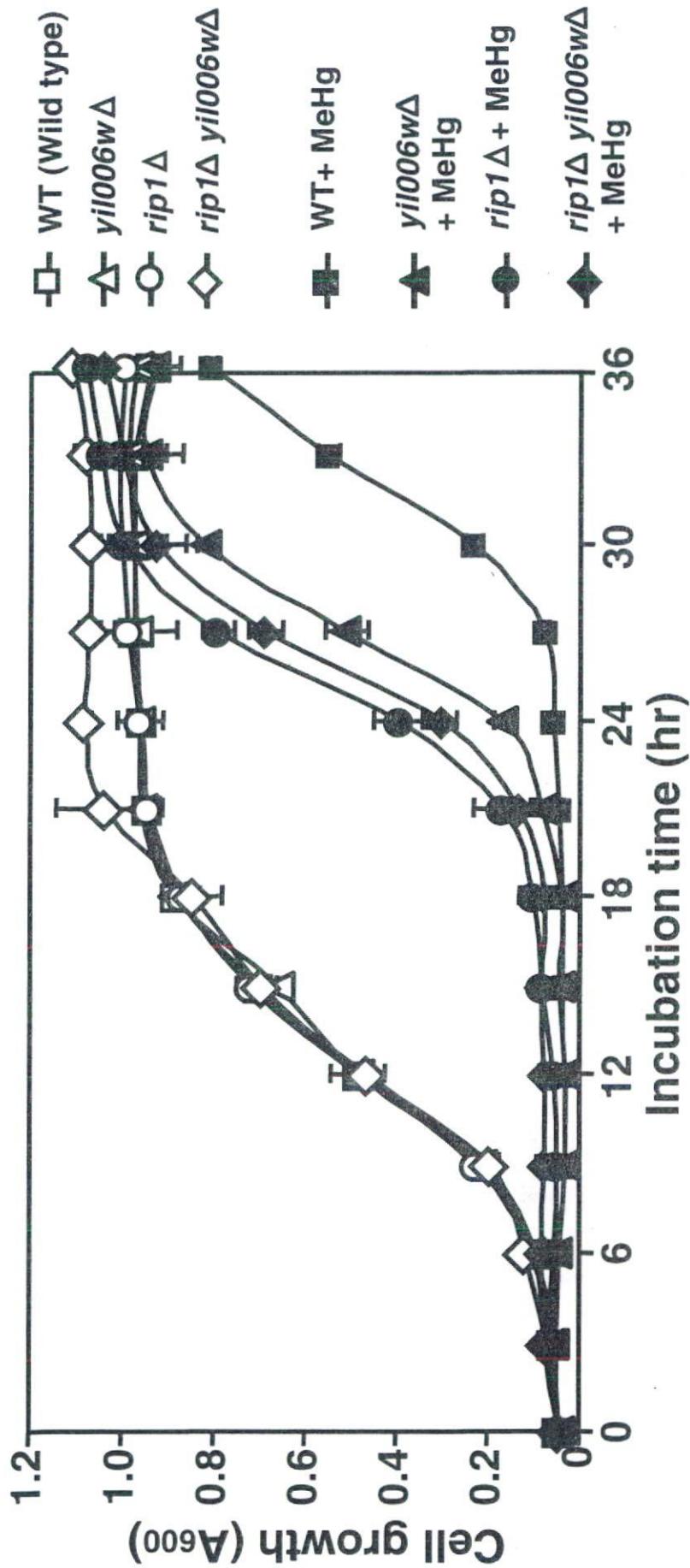


Figure 16. Rip1・Yil006w 二重欠損がメチル水銀感受性に与える影響
 5×10^5 cells/mLの酵母をメチル水銀存在下で、30°Cで培養し、酵母の増殖を経時敵に検討した。

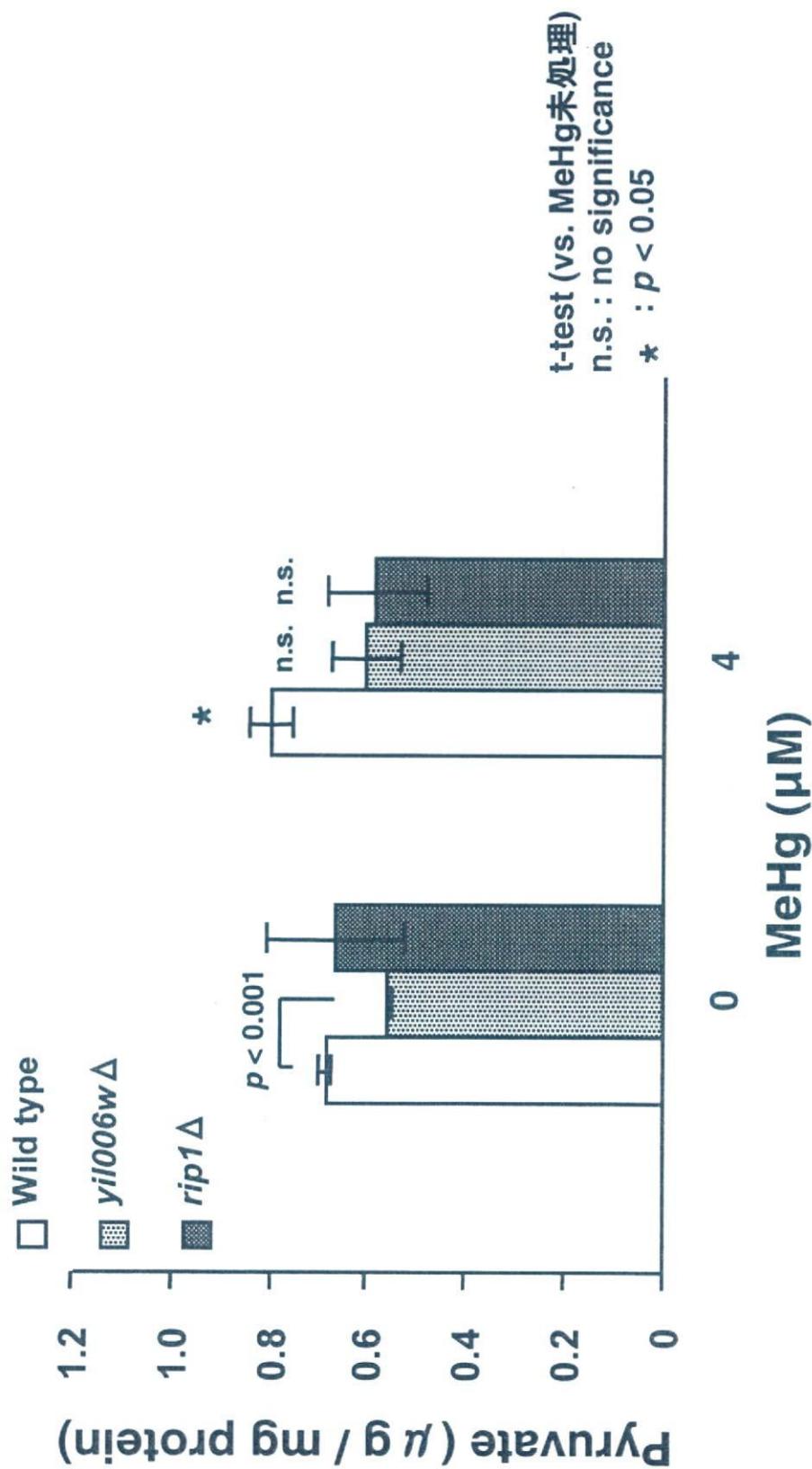


Figure 17. Yil006wまたはRip1欠損酵母においてメチル水銀がミトコンドリア中のpyruvateレベルに与える影響

Figure 8と同様にミトコンドリア中のpyruvateのレベルを測定した。