

2003/29/7

別添2 厚生労働科学研究費補助金研究報告書表紙

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

生活環境中微量化学物質に対する感受性決定
に関する遺伝子群の解明

(H14-食品・化学-028)

平成15年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 永沼 章

平成 16 (2004) 年 4 月

目次

| | |
|--------------------------------------|-----|
| I. 総括研究報告 | |
| 生活環境中微量化学物質に対する感受性決定に関する遺伝子群の解明 | 1 |
| 永沼 章 | |
| II. 分担研究報告 | |
| 1. メチル水銀およびカドミウムに対する感受性に関わる遺伝子群の同定 | 9 |
| 永沼 章 | |
| 2. トリブチルスズの毒性発現に影響を与える遺伝子群の検索とその作用機構 | 11 |
| 大橋一品 | |
| 3. パラコート毒性発現に影響を与える遺伝子群の検索とその作用機構 | 65 |
| 大橋一品 | |
| 4. メチル水銀毒性防御機構に関与するF-box蛋白質の同定 | 121 |
| 黄 基旭 | |
| 5. Cdc34トランスジェニックマウスの作成 | 145 |
| 黄 基旭 | |
| 6. Bop3が関与するメチル水銀耐性機構 | 153 |
| 黄 基旭 | |
| 7. カドミウム耐性因子の遺伝子多型とその意義 | 187 |
| 久下周佐 | |
| III. 研究成果の刊行に関する一覧表 | 199 |
| IV. 研究成果の刊行物・印刷物 | 201 |

1. 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
（総括）研究報告書

生活環境中微量化学物質に対する感受性決定に関する遺伝子群の解明

主任研究者 永沼 章 東北大学大学院薬学研究科教授

本研究は、健康影響が懸念されている化学物質や重金属類に対する感受性決定遺伝子を酵母を用いて網羅的に検索・同定することを目的としている。昨年度は、高発現することによって酵母に化学物質耐性を与える遺伝子を主に検索したが、この方法では全ての遺伝子を漏れなく検索することは困難である。そこで本年度からは遺伝子欠損酵母ライブラリーを用いて、酵母の全遺伝子について感受性に与える影響の有無を検索することにした。その結果、トリブチルスズおよびパラコートが示す細胞毒性の発現に影響を与える遺伝子をそれぞれ多数同定することに成功した。本成果は、これまでには考えられない画期的なものである。また、昨年度の本研究でユビキチン・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感受性を決定する重要な蛋白質が含まれることが示唆されたが、ユビキチン化反応において基質蛋白質の認識を担うF-Box蛋白質（17種存在）の各分子種について詳細な検討を行った結果、Grr1, Ufo1, Ylr097およびTlr224がメチル水銀毒性の軽減に関与することが明らかとなった。一方、昨年度メチル水銀耐性因子として同定されたBop3はいくつかの結合蛋白質が報告されているが、それらについての検討により、Bop3高発現によるメチル水銀耐性は少なくともMsn2, Fkh1およびRts1の3者が関与する複雑な機構によることが示唆された。今後の本研究の進展によってBop3の新しい機能が明らかになるものと期待される。さらに、昨年度、既知のカドミウム毒性防御因子であるメタロチオネインの遺伝子プロモーター領域に一塩基置換の有ることを明らかにしたが、この置換を有するプロモーターはカドミウムによる誘導活性が低いことも明らかとなった。

分担研究者

久下周佐

(東北大学大学院薬学研究科・助教授)

大橋一晶

(東北大学大学院薬学研究科・助手)

黄 基旭

(東北大学大学院薬学研究科・教務職員)

A. 研究目的

化学物質に対する感受性の種差や個体差は主に遺伝子レベルで決定されており、遺伝的高感受性要因を有する人々は、正常人には影響のない少量の化学物質の摂取によって健康障害が生じる。動物実験ではダイオキシンに対するモルモットの感受性がハムスターに比べて約1万倍高いことが判明しており、モルモットタイプの遺伝子を保持する人間個体が存在する可能性も否定できない。したがって、健康障害を引き起こす可能性のある化学物質に対して高感受性を示すような遺伝的要因を持った人々の特定は、健康被害を最小限に抑えるという厚生労働行政において極めて重要な課題であり、可及的速やかに対応すべき事項の一つと考えられる。我々は最近、より確実に感受性決定因子を見つけだす方法を模索し、対象となる化学物質に対する耐性を酵母に与える遺伝子をライブラリー中から無作為検索する方法が有効なことを見出した。酵母の遺伝子の多くはヒトにも相同遺伝子が存在するので、酵母遺伝子の検索によって感受性決定に関わるヒト遺伝子が判明する可

能性は高い。そこで本研究では、上記の方法などを用いて、健康影響が懸念されている代表的な化学物質や重金属類に対する感受性決定遺伝子を網羅的に検索・同定すると共に、それら遺伝子から作られる蛋白質の機能解析などによって化学物質感受性決定因子を明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

遺伝子ライブラリープラスミドを酵母に導入した後に、この酵母を個々の化学物質の存在下（通常の細胞が生育できない濃度）で培養し、生育してきた酵母に導入されている遺伝子を単離し、塩基配列を決定した。また、ほぼ全ての遺伝子を各々欠損させた酵母ライブラリーを用いて、欠損によって酵母を化学物質に対して耐性または感受性にする遺伝子を単離・同定した。

(倫理面への配慮)

本研究ではヒトの遺伝子解析を行ったが、実施に当たっては倫理委員会で承認された方法に従い、提供者に研究内容を十分に説明してインフォームドコンセントを得た。なお、試料提供者、その家族、血縁者、その他関係者の人権および利益の保護の取り扱いには十分に配慮し、個人情報には求めなかった。

C. 結果・考察

(1) 染色体 DNA ライブラリー中からの感受性決定遺伝子の検索

酵母染色体 DNA ライブラリーを導入し、酵母に化学物質に対する耐性を与える遺伝

子を検索した。その結果、メチル水銀耐性を与える遺伝子を5種新たに発見し、さらにカドミウム耐性を与える遺伝子3種も同定された。

(2) 遺伝子欠損酵母ライブラリー中からの感受性決定遺伝子の検索

これまでは(1)に示したように、高発現することによって酵母に化学物質耐性を与える遺伝子を主に検索してきた。しかし、この方法では全ての遺伝子を漏れなく検索することは困難である。そこで本年度からは遺伝子欠損酵母ライブラリーを用いて、酵母の全遺伝子について感受性に与える影響の有無を検索することにした。酵母の遺伝子数は約6,000であるが、本法は、欠損不能な遺伝子(必須遺伝子)を除いた約5,000の遺伝子を一つずつ欠損させた変異酵母約5,000株について、それぞれ感受性を調べるものであり、時間と労力は要するがこれまでより信頼性の高い結果を得ることが出来る。本年度はこの方法によってトリブチルスズおよびパラコート[®]の毒性に影響を与える遺伝子群を検索した。

(2)-1 トリブチルスズの毒性発現に影響を与える遺伝子群の検索とその作用機構

欠損によって酵母にトリブチルスズ(TBT)耐性を与える遺伝子として24種を同定することに成功した。また、別に高発現により耐性を与える遺伝子の検索も行い2種を同定した。これら遺伝子とその産物の機能によって分類すると、トランスポ

ーターなど輸送排出に関与する因子(8種)、転写調節因子(8種)、ユビキチン化に関与する因子(3種)、その他の機能に関与するもの(3種)および機能未知なもの(3種)に分けることができる。以上の中でPdr5のみが、その遺伝子を欠損した酵母が著しいTBT感受性を示すことが既に報告されている。しかし、我々が同定した因子の中には機能未知ではあるがPdr5と結合する可能性があるとして報告されているScp160の遺伝子が含まれていた。Scp160は高発現によってTBT耐性を与える。そこで両者の関係をTBT感受性を指標に調べたところ、PDR5遺伝子が欠損するとScp160を過剰発現させても酵母はTBT耐性を示さないことが判明した。この結果から、Scp160高発現によるTBT耐性獲得にはPdr5が必須の役割を果たしており、Scp160はPdr5の作用を促進するという機能を持つものと考えられる。現在は、今回同定された輸送排出に関わる因子群の欠損がそれぞれTBTの細胞内蓄積に与える影響を検討している。

(2)-2 パラコートの毒性発現に影響を与える遺伝子群の検索とその作用機構

欠損によって酵母のパラコートに対する感受性に影響を与える遺伝子を39種同定した。その中にはエンドサイトーシスに関与するものが多数含まれていた。生体は細胞膜上の蛋白質をエンドサイトーシスにより細胞内に取り込み、不要となった一部の蛋白質を、リソソームや液胞(酵母の場合)に輸送し分解する。この廃棄すべき蛋白質

の選別はエンドソーム上の一連の因子群により行われ、その経路は multivesicular body (MVB) sorting pathway とよばれる。我々が同定したパラコート感受性に影響を及ぼす因子の中には MVB sorting pathway を構成する 14 の因子が全て含まれており、これら一連の因子群のどの因子が欠損しても酵母のパラコートに対する感受性が増強されるという、非常に興味深い知見を得ることが出来た。MVB sorting pathway を構成する因子の機能が失われると、リソソームや液胞に廃棄されるべき蛋白質がエンドソーム膜に蓄積してしまうことが知られており、我々の結果は、パラコート毒性の軽減にエンドソーム上での廃棄すべき蛋白質の選別が重要な役割を持つことを示唆している。現在は、MVB sorting pathway による選別後の液胞やリソソームへの輸送経路、および細胞膜からエンドソームへの取り込みに関与する経路について、それぞれに関与する因子群がパラコート感受性に与える影響を解析中である。

なお、遺伝子欠損酵母株を用いた検討はカドミウムおよびメチル水銀についても行っているが、現在までにカドミウムの毒性発現に影響をおよぼす遺伝子 3 種、メチル水銀 1 種を同定している。

(3) メチル水銀毒性の発現調節機構

(3) - 1 ユビキチン・プロテアソームシステムによる発現調節機構

我々は既に、高発現によってメチル水銀毒性に対して防御的に作用する細胞内因子として Cdc34 を同定している。Cdc34 は、

細胞内蛋白質の選択的分解を担うユビキチン・プロテアソームシステムを構成するユビキチン転移酵素 (E2) ファミリーの一員である。昨年度の検討により、Cdc34 の高発現が特定の蛋白質のユビキチン化を促進してプロテアソームでの分解を促すことによってメチル水銀の毒性発現が抑制されることが既に判明している。すなわち、ユビキチン・プロテアソームシステムは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と考えられる。また、これらの結果は、ユビキチン・プロテアソームシステムによって分解を受ける蛋白質の中に、メチル水銀毒性の発現に非常に重要な役割を果たす蛋白質が含まれていることを示唆している。そこで、ユビキチン化反応において基質蛋白質の認識を担う F-Box 蛋白質 (17 種存在) の各分子種について検討したところ、Grr1, Ufo1, Ylr097 および Tlr224 がメチル水銀毒性の軽減に関与することが明らかとなった。現在、これら 4 つの F-Box 蛋白質がそれぞれ認識する蛋白質の同定を行っている。

(3) - 2 Cdc34 トランスジェニックマウスの作成

Cdc34 はヒトにも存在することから、ヒト Cdc34 をヒト由来細胞に高発現させたところ、酵母の場合と同様な顕著なメチル水銀耐性が認められた。そこで、Cdc34 の意義を個体レベルで検討するために、Cdc34 を高発現するトランスジェニックマウスの作成を試みている (Cdc34 は生存に必須の蛋白質であり、ノックアウトマ

ウスは作成できない)。既にマウスは誕生しており、現在、実験に使用可能な安定発現家系の確立を行っている。来年度には本マウスを用いた研究が可能になると期待される。

(3) - 3 Bop3 が関与するメチル水銀耐性機構

平成 14 年度に実施した検索によって得られたメチル水銀耐性因子のひとつに Bop3 がある。この Bop3 は Pam1 の multicopy suppressor として同定された蛋白質であり、結合蛋白質として Bmh2, Fkh1 および Rts1 が報告されている。そこでこれら蛋白質と Bop3 との関係をメチル水銀耐性を指標として検討した。その結果、Pam1 の欠損は Bop3 高発現によるメチル水銀耐性に影響を与えなかったが、Fkh1 または Rts1 の欠損によって部分的に Bop3 高発現によるメチル水銀耐性が減弱されることが判明し、Fkh1 および Rts1 が部分的に Bop3 高発現によるメチル水銀耐性に関与することが示唆された。また、Bmh2 およびその相同蛋白質 Bmh1 の欠損は Bop3 高発現によるメチル水銀耐性に影響を与えなかったが、両蛋白質は 93% の相同性を有しており、Bmh2 欠損時には Bmh1 がその機能を補っている可能性も考えられる。両者が同時欠損すると細胞は成育できないので、両者同時欠損の影響を調べられない。しかし、Bmh1 および Bmh2 と結合する蛋白質として Msn2, Msn4, Rtg3 が知られている。このうち Msn2 欠損によってのみ Bop3 高発現によるメチル

水銀耐性の低下が観察された。したがって、Bop3 高発現によるメチル水銀耐性は、少なくとも Msn2, Fkh1 および Rts1 の 3 者が関与する複雑な機構によるものと考えられる。今後の本研究の進展によって Bop3 の新しい機能が明らかになるものと期待される。

(4) カドミウム耐性因子の遺伝子多型とその意義

前年度に一般的な日本人の遺伝子多型を検索し、カドミウム耐性因子であるメタロチオネインの遺伝子プロモーター部分に一塩基変異のあることを見出した。そこで本変異の意義を調べるために、変異のあるプロモーターの下流にレポーター遺伝子を連結してメタロチオネイン合成能に与える影響を検討した。その結果、正常なプロモーターと比較してカドミウムによる誘導活性が有意に低いことが判明した。現在、この変異がメタロチオネインのカドミウム毒性軽減作用に与える影響を検討するために、メタロチオネインの発現をノックダウンしたヒト培養細胞を確立中である。

D. 結論

トリブチルスズ、ヒ素およびパラコートに対する感受性決定に関わる遺伝子を多数同定することに成功した。今後はこれら遺伝子の作用機構について検討する予定である。

E. 健康危険情報

特になし。

F. 研究発表

1. 論文発表

Ohashi, K., Kajiya, K., Inaba, S., Hasegawa, T., Seko, Y., Furuchi, T. and Naganuma, A.: Copper (II) protects yeast against toxicity of cisplatin independently of induction of metallothionein and inhibition of platinum uptake. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 310, 148-152 (2003).

Suzuki, T., Aguia, M., Togawa, T., Naganuma, A., Nishio, K. and Tanabe, S.: MRP5b/SMRP mRNA is highly expressed in metallothionein-deficient mouse liver. *J. Health Sci.*, 49, 524-526 (2003).

Naganuma, A.: Biological interaction of dietary metals., *J. Toxicol. Sci.*, 28, 249 (2003).

Naganuma, A., Hwang, G. W. and Furuchi, T.: Intracellular factors involved in methylmercury toxicity in yeast., In: *Proceedings of International Symposium on Bio-Trace Elements 2002* (eds. By Enomoto, S. and Seko, Y.), Riken, Saitama, pp.69-70, (2003).

2. 学会発表

稲葉佐知子、大橋一晶、永沼 章: 酵母細胞膜に存在する鉄還元酵素 Fre1 によるパラコート毒性の増強. フォーラム 2003 : 衛生薬学・環境トキシコロジー2003.

岡崎祥子、永沼 章、久下周佐: ペルオキシレドキンを介した酵母 Yap1 転写因子の酸化ストレス感知機構. フォーラム 2003: 衛生薬学・環境トキシコロジー2003.

佐々木大祐、黄 基旭、永沼 章: 酵母におけるメチル水銀耐性因子 Rad23 の機能ドメイン解析. フォーラム 2003 : 衛生薬学・環境トキシコロジー2003.

小田部 希、黄 基旭、古尾谷祐子、山本玲子、永沼 章: Msn2 高発現によるメチル水銀毒性増強機構の解明. フォーラム 2003: 衛生薬学・環境トキシコロジー2003.

石田洋輔、黄 基旭、永沼 章: メチル水銀毒性に対して防御的に作用する酵母 F-box 蛋白質の検索. フォーラム 2003 : 衛生薬学・環境トキシコロジー2003.

塚原 章、大橋一晶、永沼 章: 酵母のトリブチルスズに対する感受性に影響を与える蛋白質の検索. フォーラム 2003 : 衛生薬学・環境トキシコロジー2003.

亀尾聡美、仲井邦彦、黒川修行、兼久智和、永沼 章、佐藤 洋: HPLC/ICP-MS によるメタロチオネインイソ蛋白質(MT-I, MT-II および MT-III)の分離—簡便法の検討—メタロチオネイン 2003, 2003.

金澤寛明、永沼 章、犬塚 貴、保住 功: 味噌におけるメタロチオネイン-III, -IV の存在. メタロチオネイン 2003, 2003.

佐々木大祐、黄 基旭、永沼 章: メチル水銀毒性に対する防御機構であるユビキチンプロテアソームシステムにおける酵母 Rad23 の役割. メタロチオネイン 2003, 2003.

北 加代子、久下周佐、永沼 章: RNA 干渉法によるヒトメタロチオネインの発現抑制系の構築. メタロチオネイン 2003, 2003.

岡崎祥子、永沼 章、久下周佐: 酵母 Yap1 転写因子のレドックスシグナル感知機構におけるペルオキシレドキシシグナル様蛋白質の役割. 第 26 回分子生物学会年会, 2003.

永沼 章: 食品中微量元素の相互作用. 第 30 回日本トキシコロジー学会学術年会, 2003.

稲葉佐知子、大橋一品、永沼 章: 酵母細胞膜に存在する鉄還元酵素 Fre1 によるパ

ラコート毒性発現機構の解析. 第 42 回日本薬学会東北支部大会, 2003.

佐々木大祐、黄 基旭、永沼 章: 酵母のメチル水銀耐性因子 RAD23 の機能ドメイン解析. 第 42 回日本薬学会東北支部大会, 2003.

佐々木大祐、黄 基旭、永沼 章: Rad23 高発現によるメチル水銀耐性機構におけるユビキチン・プロテアソームシステムの関与. 第 76 回日本生化学会大会, 2003.

石田洋輔、黄 基旭、永沼 章: メチル水銀毒性防御機構に関する F-box 蛋白質の同定. 第 76 回日本生化学会大会, 2003.

北 加代子、久下周佐、永沼 章: RNA 干渉法によるヒトメタロチオネインの発現抑制の試み. 第 76 回日本生化学会大会, 2003.

岡崎祥子、久下周佐、永沼 章: 酵母転写因子 Yap1 を介したレドックスシグナル感知機構. 日本薬学会第 123 年会, 2003.

大谷朋子、大橋一品、永沼 章: 出芽酵母において亜ヒ酸耐性に関わるシグナル伝達機構の解明. 日本薬学会第 123 年会, 2003.

野元正崇、久下周佐、永沼 章: 出芽酵母 Yap ファミリー転写因子の核内輸送. 日本

薬学会第 123 年会, 2003.

稲葉佐知子、大橋一晶、永沼 章: 酵母細胞膜上の鉄還元酵素群によるパラコートに依存した活性酸素産生. 日本薬学会第 124 年会, 2004.

岩橋芳樹、大橋一晶、永沼 章: 酵母における multivesicular body sorting pathway によるパラコート毒性の軽減. 日本薬学会第 124 年会, 2004.

佐々木大祐、黄 基旭、永沼 章: 酵母のメチル水銀耐性獲得機構における Rad23 と Png1 の関係. 日本薬学会第 124 年会, 2004.

石田洋輔、黄 基旭、永沼 章: F-box 蛋白質によるメチル水銀毒性防御機構の解明. 日本薬学会第 124 年会, 2004.

村井康高、黄 基旭、永沼 章: メチル水銀感受性に関わる遺伝子の検索. 日本薬学会第 124 年会, 2004.

塚原 章、大橋一晶、永沼 章: 酵母のトリプチルスズ感受性に影響を及ぼすトランスポーター様因子. 日本薬学会第 124 年会, 2004.

北 加代子、久下周佐、永沼 章: ヒト細胞中の主要なメタロチオネイン分子種の発

現を抑制した細胞株の樹立とその応用. 日本薬学会第124年会, 2004.

G. 知的財産権の出願・登録状況
なし。

II. 分担研究報告

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

メチル水銀およびカドミウムに対する感受性に関わる遺伝子群の同定

分担研究者 永沼 章 東北大学大学院薬学研究科教授

高発現によって酵母にメチル水銀耐性を与える遺伝子を5種、カドミウム耐性を与える遺伝子を3種同定した。

A. 研究目的

環境化学物質に対する感受性には種差や個体差が存在し、遺伝的に感受性の高い人々は極微量の化学物質に曝露しただけで健康に障害を生じる可能性がある。しかし、この感受性を決定している遺伝子はほとんど分かっていない。そこで本研究では、健康影響が懸念されている代表的な化学物質や重金属類に対する感受性決定遺伝子を網羅的に検索・同定する。

B. 研究方法

遺伝子ライブラリープラスミドを酵母に導入した後に、この酵母を個々の化学物質の存在下（通常の細胞が生育できない濃度）で培養し、生育してきた酵母に導入されている遺伝子を単離し、塩基配列を決定した。

（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

酵母染色体DNAライブラリーを導入し、酵母に化学物質に対する耐性を与える遺伝子を検索した。その結果、メチル水銀耐性を与える遺伝子を5種（*UBC1*、*DDI1*、*UFD2*、*GRR*）を新たに発見し、さらにカドミウム耐性を与える遺伝子3種（*AKL1*、*Cin5*、*Ydr259c*）も同定された。

D. 研究発表

なし

E. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

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

トリブチルスズの毒性発現に影響を与える遺伝子群の検索とその作用機構

分担研究者 大橋一晶 東北大学大学院薬学研究科助手

欠損によって酵母にトリブチルスズ（TBT）耐性を与える遺伝子として24種を同定することに成功した。また、別に高発現により耐性を与える遺伝子の検索も行い2種を同定した。これら遺伝子とその産物の機能によって分類すると、トランスポーターなど輸送排出に関与する因子（8種）、転写調節因子（8種）、ユビキチン化に関与する因子（3種）、その他の機能に関与するもの（3種）および機能未知なもの（3種）に分けることができる。以上の中でPdr5のみが、その遺伝子を欠損した酵母が著しいTBT感受性を示すことが既に報告されている。しかし、我々が同定した因子の中には機能未知ではあるがPdr5と結合する可能性があるとして報告されているScp160の遺伝子が含まれていた。Scp160は高発現によってTBT耐性を与える。そこで両者の関係をTBT感受性を指標に調べたところ、PDR5遺伝子が欠損するとScp160を過剰発現させても酵母はTBT耐性を示さないことが判明した。この結果から、Scp160高発現によるTBT耐性獲得にはPdr5が必須の役割を果たしており、Scp160はPdr5の作用を促進するという機能を持つものと考えられる。現在は、今回同定された輸送排出に関わる因子群の欠損がそれぞれTBTの細胞内蓄積に与える影響を検討している。

A. 研究目的

有機スズ化合物は塩化ビニル樹脂の安定剤や、殺虫剤、駆虫剤として広く世界中で利用されてきた(1)。その中でも、トリブチルスズ(tributyltin; TBT) 化合物(トリブチ

ルスズオキシド、塩化トリブチルスズ)は、船底塗料や漁網防汚剤として、海藻や貝類などの付着防止に汎用されてきた(1)。しかし、その結果、特に海洋において環境汚染が生じ、TBT濃度の高い海域で巻き貝のオス化

(内分泌攪乱作用) やカキの成長阻害などの影響が報告されている(1, 2)。また、食物連鎖による有機スズ化合物の生物濃縮も報告され、海洋生態系に与える影響が懸念されている(1)。

TBT の哺乳類に対する毒性としては、ラットに胸腺萎縮やリンパ節出血などの臓器障害をひき起こすことが報告されており(3)、ミトコンドリア障害性や、変異原性のあることも明らかにされている(1)。しかし、その毒性発現機構はほとんど解明されていない。

本研究では、TBTの細胞毒性発現機構の解明を目的として、酵母を用いて、TBTの毒性発現に関わる細胞内因子の検索をおこなった。酵母は、真核生物としての基本的な特徴を持ち、酵母蛋白質中にはヒトなどの哺乳類と機能的に共通するものが数多く存在する。したがって、酵母で見いだされるTBT毒性発現に関与する因子は、哺乳類の細胞中にも存在して類似の機構で機能することが予想され、TBTが示す細胞毒性の発現機構解明のための大きな手がかりとなると期待される。

B. 研究方法

1. 薬物および培地

薬物

・ Tributyltin chloride (Wako) は Dimethylsulfoxide に溶解し、10 mM の溶液をストックとした。この溶液を適宜水に希釈し、使用した。

培地

・ YPAD 培地 : 1% (w/v) Bacto™ yeast extract (Difco)、2% (w/v) Bacto™ peptone (Difco) を高圧蒸気滅菌したものに、別に滅菌した 2% (w/v) glucose (Nacalai Tesque)、0.004% (w/v) adenine sulfate を加えて使用した。

・ SD 培地 : 1.67% (w/v) Bacto™ yeast nitrogen base w/o amino acid (Difco) および、1.23% (w/v) dropout powder (L-arginine monohydrochloride 2.5 g, L-asparatic acid 6.0 g, L-glutamic acid monosodium salt 6.0 g, L-lysine monohydrochloride 1.8 g, L-methionine 1.2 g, L-phenylalanin 3.0 g, L-serine 22.5 g, L-threonine 12.0 g, L-tyrosine 1.8 g, L-varine 9.0 g を混和したものを(寒天培地は 2% Bacto agar を加え)、高圧蒸気滅菌したものに 2% (w/v) glucose、0.004% (w/v) adenine sulfate、0.002% L-histidine、0.004% (w/v) L-tryptophan、0.002% (w/v) uracil、0.006% (w/v) L-leucine を加え使用

した。

- ・ LB 培地 : 1% (w/v) Bacto™tryptone (Difco)、0.5% (w/v) Bacto™yeast extract (Difco), 0.5% (w/v) NaCl (Nacalai Tesque) を高圧蒸気滅菌して使用した。また、ampicilin 入り LB 培地は最終濃度 100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ になるように高圧滅菌後の LB 培地に、フィルター滅菌した ampicilin (Wako) 水溶液を加えた。

2. 遺伝子欠損株を用いた酵母の TBT に対する感受性に影響を与える因子のスクリーニング法

実験材料 :

- ・ 酵母 : BY4742 (*MAT α* ; *his3 Δ 1*; *leu2 Δ 0*; *lys2 Δ 0*; *ura3 Δ 0*)
- ・ Complete set of *Saccharomyces cerevisiae* gene deletion strains (Euroscarf)
: BY4742 株のほぼすべての非必須遺伝子を kanamycin 耐性遺伝子マーカーで 1 つずつ欠損させた酵母株ライブラリー
- ・ Transplate Cartridge (Corning)
- ・ スポンジ (東和産業)

実験方法 :

マスタープレートの作製

96 well plate に保存してある Complete set of *Saccharomyces cerevisiae* gene deletion strains

(Euroscarf) を 96 穴のピペッターである Transplate Cartridge (Corning) を用いて YPAD プレート上にスポットし、12 時間培養しマスタープレートを作製した。

TBT 存在下で増殖に影響のみられる遺伝子欠損株のスクリーニング

4 枚の異なる濃度の TBT を含む YPAD plate (TBT: 30, 40, 50, 60 μM) および YPAD plate にスポンジを用いてマスタープレートから酵母を移し、レプリカプレートを作製した。作製したレプリカプレートを 30°C で培養し、24 hr, 48 hr 後の各プレートの遺伝子欠損株それぞれのコロニー形成を観察した。そのなかで、野生株がコロニーを形成できない濃度の 60 μM の TBT を含む YPAD プレート上で、コロニーを形成する酵母株を TBT 耐性候補株とし、野生株がコロニーを形成できる最高濃度である 30 μM の TBT を含む YPAD プレート上で、コロニー形成の遅い酵母株を TBT 感受性候補株とした。なお、スクリーニングに用いた TBT 濃度の検討は、野生株 (BY4742)、既知の TBT 感受性株 (*PDR5* 遺伝子欠損株)、方法 10. に示すスクリーニングによって得られた TBT に対して耐性を示す遺伝子欠損株 (*SRO9* 遺伝子欠損株) を用いて行った。ここで選択した候補株は、96 well plate に保存

してある Complete set of *Saccharomyces cerevisiae* gene deletion strains (Euroscarf) からおこなおし、2-3 で示す方法に従って TBT に対する感受性を検討した。

3. 酵母の TBT に対する感受性

酵母のシングルコロニーを、2 ml の SD 液体培地に植菌し、30℃で一晩培養した後、この培養液を SD 液体培地で 1×10^5 cells/180 μ l になるように希釈した。この希釈培養液を 96 well plate に 180 μ l/well (1×10^5 cells/well) ずつ播き、各種濃度 (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 μ M 最終濃度) TBT 20 μ l/well を添加し、30℃で 2 日間培養した後、マイクロプレートリーダー (Microplate Manager, BIO-RAD) で 600 nm の吸光度を測定して酵母の増殖を調べた。

4. スクリーニングで得られた因子を発現するプラスミドの作製

目的の遺伝子は、酵母 chromosomal DNA を template とし、以下に示すプライマーを用いて、PCR により増幅した。PCR 反応には、Pyrobest DNA polymerase (Takara) を用いて行った。得られた PCR 産物は 0.8% アガロースゲル電気泳動後に、目的サイズの DNA をゲルから切り出し、GeneClean II kit

(Takara) を用いて精製した。同時に、酵母発現ベクターである pRS426 に得られた DNA を組み込むため pRS426 を制限酵素 (*sma*I) で切断し、0.8% アガロースゲル電気泳動後に、目的サイズの DNA をゲルから切り出し、GeneClean II kit (Takara) を用いて精製した。得られた目的の遺伝子の断片と *sma*I で切断した pRS426 を DNA ligation kit Ver.2 (Takara) に pRS426 のセルフライゲーションを防ぐため *sma*I を添加して、連結反応をおこなった後、大腸菌 (XL-1 blue) に以下の方法に従って導入した。コンピテントセル溶液 200 μ l に上述の DNA 溶液 5 μ l を加え、氷上に 30 分間静置した後、42℃で 45 秒間の熱ショックを与え、さらに氷上に 2 分間静置した。これを、あらかじめ X-gal および IPTG を塗布したアンピシリン 50 μ g/ml を含む LB 培地に塗布し、37℃で一晩培養した。培養後ブルー/ホワイトセレクションを行い PCR 産物が導入されたプラスミドを保持している大腸菌を選別した。ホワイトコロニーを形成した大腸菌をアンピシリン 50 μ g/ml を含む LB 培地 2 ml で一晩振盪培養した。この培養液 1 ml を遠心し上清を除いた。得られた沈澱に Solution I (15 mM Tris-HCl (pH 8.0)、10 mM EDTA、100 μ g/ml RNase) を 100 μ l

加え攪拌し大腸菌を懸濁させた。この懸濁液に Solution II (0.2 N NaOH (Nacalai Tesque)、1% SDS)を 100 μ l 加えてゆっくり攪拌し室温で 5 分間放置した後、3M potassium acetate (Nacalai Tesque) (pH 5.5)を 100 μ l 加え、遠心した。遠心後の上清 300 μ l をエタノール 750 μ l と混和し、遠心して得られた沈澱を 75%エタノールで洗浄し、TE buffer を 100 μ l 加えたものをプラスミド DNA 溶液とした。

作製したプラスミドの機能を確認するために、クローニングした遺伝子の欠損株に、作製したプラスミドを導入し、遺伝子欠損株の TBT 感受性が回復するか検討した。

プライマー: open reading frame (ORF) の上流約 500 bp および下流約 300 bp 付近で設計した。なお、隣接する ORF が、上流 500 bp 下流 300 bp 以内に含まれる場合には、それらを含まないようにさらに内側にプライマーを作製した。

1) ABF2/pro-f 5' -
TTGTTATTGCTCTTCTCCTGGTG
- 3'
ABF2/pro-r 5' -
CACTACACACTTGCTTGGTTAAG
- 3'
2) ARG82/pro-f 5' -
ATGGTGTGACAGGCTTGTGTGT
GTGG - 3'

ARG82/pro-r 5' -
ATTTCTTGCAAACATAAGTAAAT
GCAA - 3'
3) BUL1/pro-f 5' -
TTCGGTGTCTTTGATCCGTCT
3'
BUL1/pro-r 5' -
AGCAACAAAAGAGCACCAGA
3'
4) DAL81/pro-f 5' -
AACCATAACCATTTCGGTCCA
3'
DAL81/pro-r 5' -
TAACCTTGGTCCTGCAGAAGA
3'
5) ERG4/pro-f 5' -
CTTCCAGTTTCTTGGATTCTTTTC
TGT - 3'
ERG4/pro-r 5' -
CATACTTCCTGCCACAACATAAT
GTGA - 3'
6) HXK2/pro-f 5' -
ATTGGTACCTAGAAATGGCTATC
ATGC - 3'
HXK2/pro-r 5' -
ATCATGTAGATTCATAAATCGT
CATA - 3'
7) HXT12/9/pro4000-f 5' -
ATTACCACTTACATTAAGTGTAT
TCG - 3'
HXT12/11/term1000-r 5' -
AGTTGCACTCTTAATAATACGGT

| | | | |
|--------------------------|-------|---------------------------|-------|
| ATACA - 3' | | 3' | |
| 8) IXR1/pro-f | 5 ' - | PDR5r | 5 ' - |
| ATGCAACAGCAGCAAAGGA - 3' | | TCACACTAAATGCTGATGCCTA - | |
| IXR1/pro-r | 5 ' - | 3' | |
| GGGAAGACTACACACATGCGT - | | 14) RVS167/pro-f | 5 ' - |
| 3' | | ACCTCTATCAAGTTTTGACTTTCC | |
| 9) LRG1/pro-f | 5 ' - | TGT - 3' | |
| ATATCAAGAAGCCCGCATGT - | | RVS167/pro-r | 5 ' - |
| 3' | | GATATTGTCAGTAGGGTAATATG | |
| LRG1/pro-r | 5 ' - | CTCG - 3' | |
| CTGCTGTTGGAGATGTTCTGA - | | 15) SFL1/pro-f | 5 ' - |
| 3' | | TCCGACAGGTCCTTAAGCCTT - | |
| 10) MMS2/pro-f | 5 ' - | 3' | |
| TATTTACTATTACCTCTCGATTTT | | SFL1/pro-r | 5 ' - |
| AAG - 3' | | AATCACAAGGATCAGGAGGAA - | |
| MMS2/pro-r | 5 ' - | 3' | |
| ATATACATCATTATCGTAGTGAA | | 16) SOK2/pro-f | 5 ' - |
| TTGC - 3' | | AGTCGGCTAAGCATCGATCAT - | |
| 11) MSN2/pro-f | 5 ' - | 3' | |
| AAGCCGGTTCTTGACACCAT - | | SOK2/pro-r | 5 ' - |
| 3' | | AACCTCCCACGTTTCAACAACC - | |
| MSN2/pro-r | 5 ' - | 3' | |
| ATCTAAGTTGTTACAGGCGGG - | | 17) SRO9/pro-f | 5 ' - |
| 3' | | GTGGATCTGGACTCTCGAGCAAG | |
| 12) PDR3/pro-f | 5 ' - | ACCC - 3' | |
| TCCTTGTTAACACCGTGCTCT - | | SRO9/pro-r | 5 ' - |
| 3' | | TATTTTCTCTTTTCGTATTAAACTG | |
| PDR3/pro-r | 5 ' - | ATG - 3' | |
| CTACTGAACAGCTGCATTCCA - | | 18) TAT1/pro-f | 5 ' - |
| 3' | | AAAATATAAACAATCCGGCCA - | |
| 13) PDR5f | 5 ' - | 3' | |
| GATTGCTTCCCACGGAACGAGT - | | TAT1/pro-r | 5 ' - |

CGCACAAACATGTTTGATTGC -
 3'

19) UBC13/pro-f 5' -
 ACGATGCTCCTTTCAAGTACGCT
 ATTC - 3'

UBC13/pro-r 5' -
 AAACGCGTCTAGTAAAAATCTGG
 CGTA - 3'

20) UBR1/pro-f 5' -
 GAAAAGTGATGCGACGGTTT -
 3'

UBR1/pro-r 5' -
 GCGTTTGATTGGGTCGTGTAT -
 3'

滅菌済み 50%ポリエチレングリコー
 ル (PEG) 4000 (Nacalai tesque)

酵母 BY4742 株を YPAD 培地 50
 ml に植え、 2×10^7 cells/ml になる
 まで振盪培養した後に集菌し、それ
 を 1 ml の 100 mM 酢酸リチウム形
 質転換溶液に懸濁した。ここに導入
 したい遺伝子 (プラスミドもしくは
 PCR 産物) 1 μ g、過熱変性サケ精子
 DNA 50 μ g 及び PEG 水溶液 300 μ l
 を加え、30°C で 30 分間インキュベ
 ートした。その後 42°C で 15 分間の
 熱ショックをかけた後に集菌し、SD
 培地に播き、30°C で 2 日間培養した。

PCR サイクル

| | | |
|-------------|-------------|--|
| 95°C 5 min | } ×30 cycle | 伸長反応 72°C は 増幅 DNA 1k bp あたり 1 min とした。 |
| 95°C 15 sec | | |
| 55°C 30 sec | | |
| 72°C 2 min | | |
| 72°C 5 min | | |

5. 酵母への遺伝子の導入 (酢酸リチウム法)

試薬

100 mM 酢酸リチウム (LiAc) 形質
 転換溶液 (1 ml): 1M LiAc 水溶液
 (pH 7.5 高压蒸気滅菌したもの) 100
 μ l, 滅菌済みイオン交換水 900 μ l
 PEG 水溶液 (1ml): 滅菌済みイオン
 交換水 100 μ l, 1M LiAc 水溶液 100 μ l,

6. PDR5 および ERG4 遺伝子二重 欠損株の作製

HIS5 マーカーを含む欠損株作製用 gene disruption cassette の作製

分裂酵母 (*Saccharomyces pombe*) 由来の *HIS5* 遺伝子を持つ
 プラスミド pUG27 のプロモーター、
 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、ターミネーターの塩
 基配列が同じであることを利用し、
HIS5 遺伝子マーカーを含む欠損株作
 製用 gene disruption cassette の作
 製を行う。Complete set of
Saccharomyces cerevisiae gene
 deletion strains (Euroscarf) から
PDR5 遺伝子欠損株を選び、3. に