

Fig. 12. 高発現株スクリーニングより得られたTBT耐性酵母株の生存曲線

遺伝子高発現によりTBTに対して耐性を獲得した酵母のTBT存在下での生存曲線を示す。
 酵母と各濃度のTBTを96 well plate中で48時間培養した後に、600 nmの吸光度を測定した (n=3)。

(A) Chromosome XV 624729 - 619040



(B)

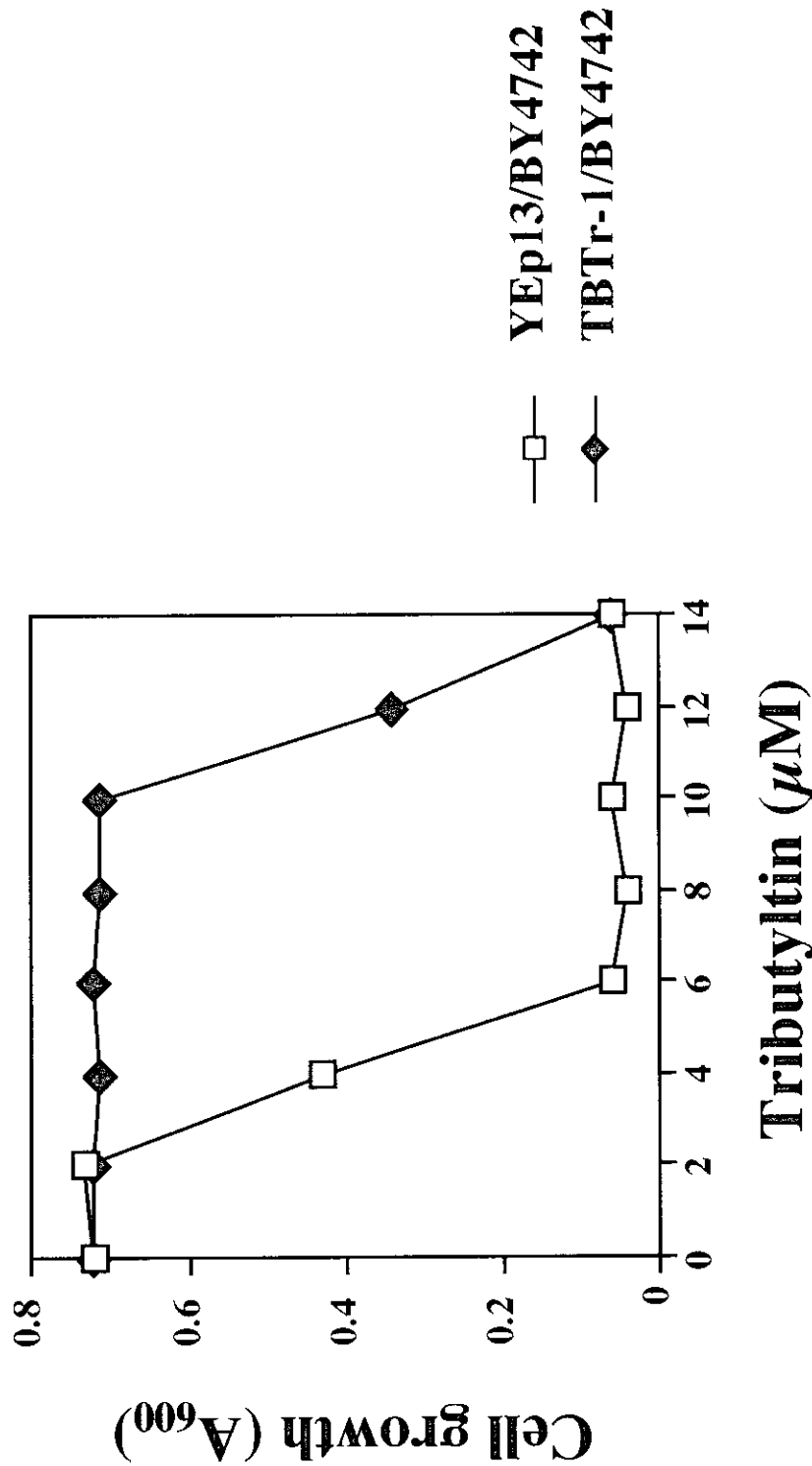


Fig. 13. TBTr-1プラスミドにおけるTBT耐性遺伝子の同定

(A) TBTr-1に含まれる酵母遺伝子断, (B) 酵母を96 well plate中で各濃度のTBT存在下48時間培養した後、600 nmの吸光度を測定した ($n=3$)。 (—◆—): TBTr-1を導入した酵母のTBT存在下での生存曲線, (—□—): コントロール。

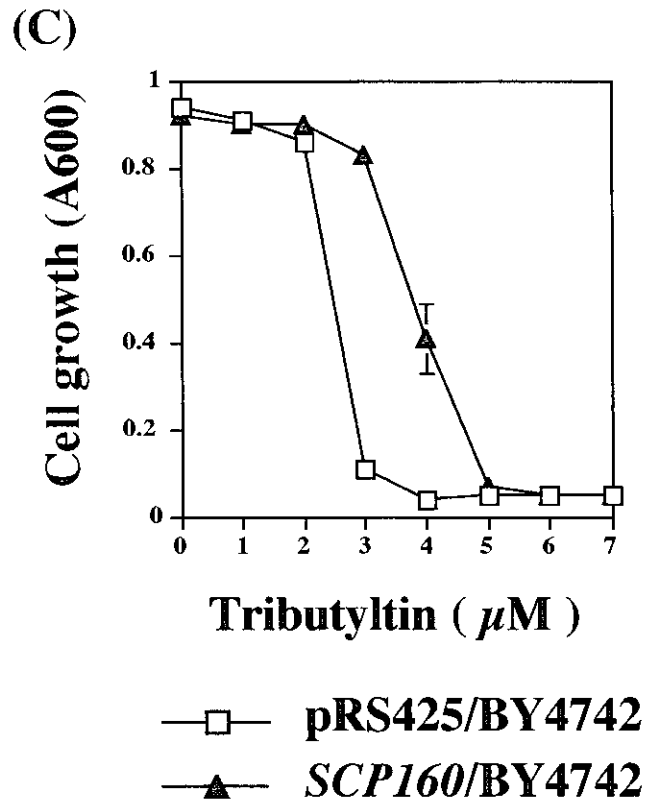
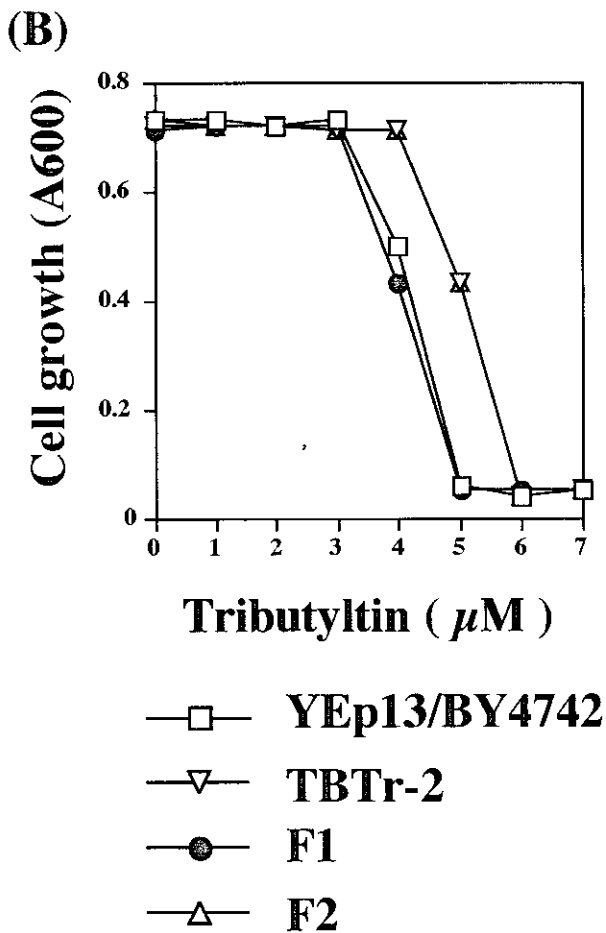
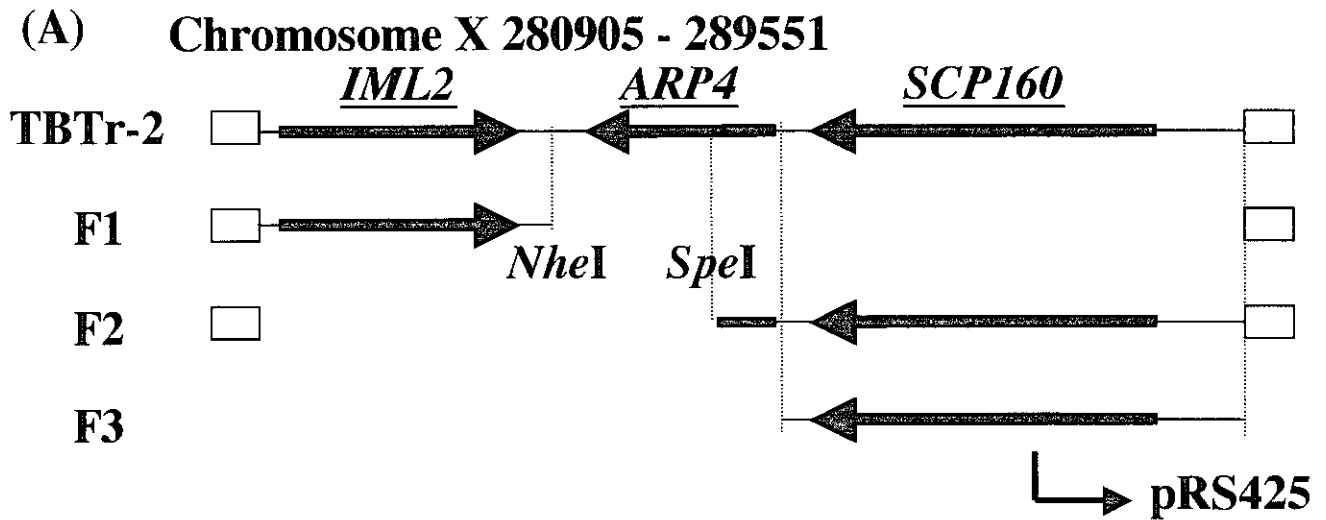


Fig. 14. TBTr-2プラスミドにおけるTBT耐性遺伝子の同定

(A) TBTr-2に含まれる酵母遺伝子断片 (TBTr-2) および 作製したプラスミドに含まれる遺伝子断片 (F1, F2, F3) 酵母を96 well plate中で各濃度のTBT存在下48時間培養した後、600 nmの吸光度を測定した (n=3)。 (B) F1, F2プラスミドをそれぞれ導入した酵母のTBT存在下での生存曲線, (C) F3プラスミド (SCP160) を導入した酵母のTBT存在下での生存曲線。

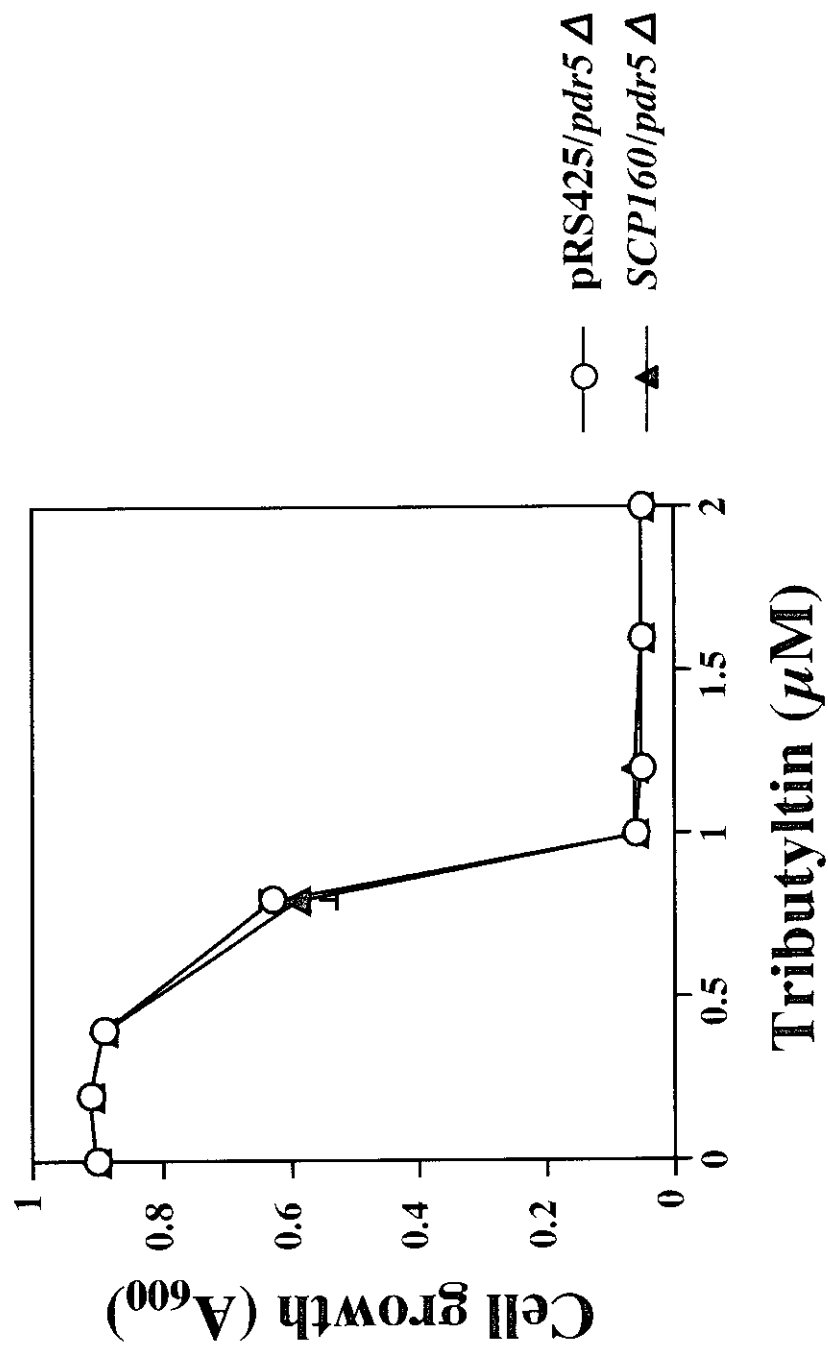


Fig. 15. PDR5遺伝子欠損酵母にScp160を高発現させた際の生存曲線
 酵母を96 well plate中で各濃度のTBT存在下48時間培養した後に、600 nmの吸光度を測定した (n=3)。

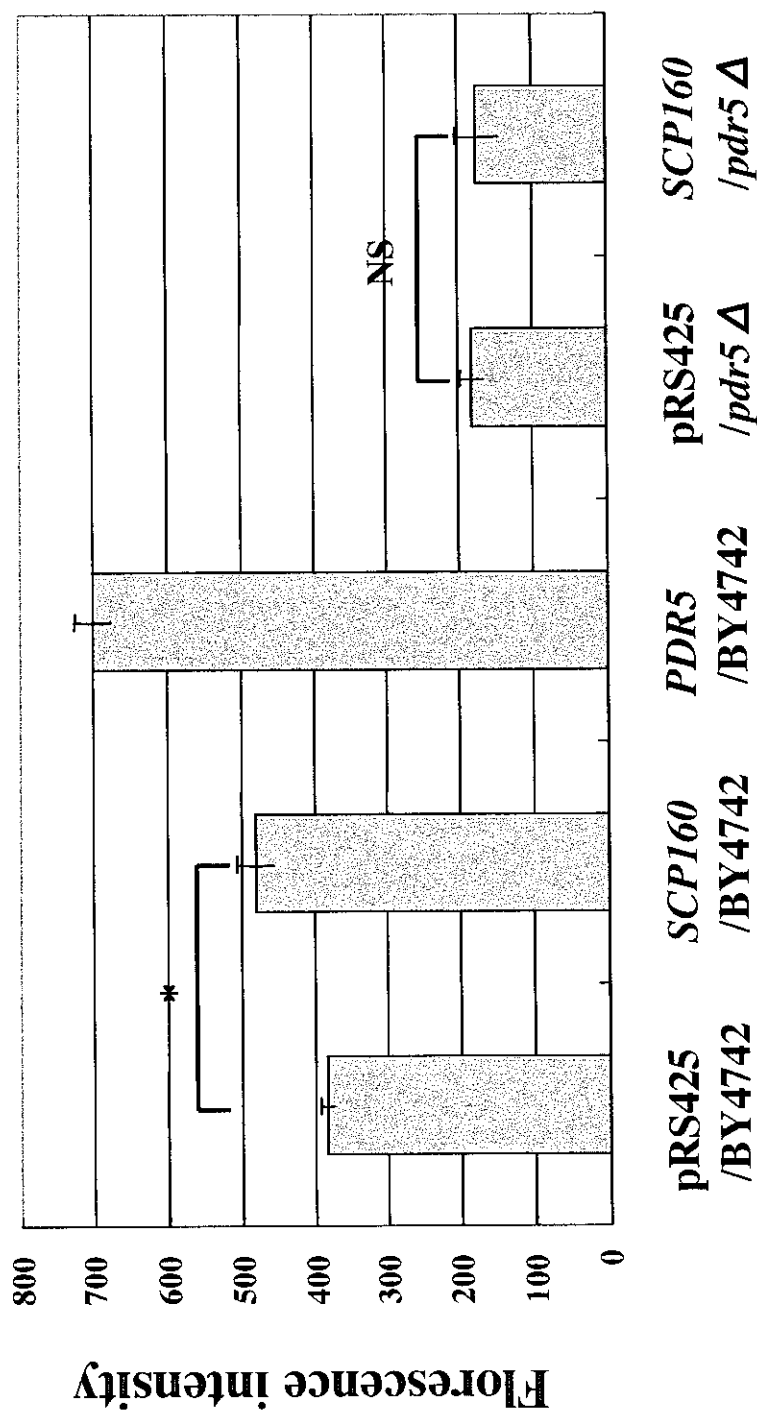


Fig. 16. Pdr5によるローダミン6G排出に及ぼすScp160高発現の効果

酵母をローダミン6Gおよびグルコース代謝拮抗剤である2-deoxy-D-glucoseと共に2時間培養し細胞内にローダミン6Gを取り込ませた。洗浄した後で1 mM glucoseを添加し、30°Cで7分間放置した。その後、遠心し、上清の蛍光強度を測定した (n=3)。*: $p < 0.05$, NS: 有意差なし

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

分担研究者 大橋一品 東北大学大学院薬学研究科助手

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。

A. 研究目的

スーパーオキシドアニオン (O_2^-) やヒドロキシラジカル (OH \cdot)、過酸化水素 (H_2O_2) に代表される活性酸素種 (ROS : reactive oxygen species) は、呼吸に伴う酸素の摂取によりミトコンドリアの呼吸鎖などで産生さ

れる。ROS は反応性が強く生体に毒性を及ぼすため、生体内では活性酸素に対する防御機構が備わっており、常に生体の恒常性（ホメオスタシス）が維持されている。しかし、薬剤、放射線、紫外線、などの外来性の因子により過剰の ROS が発生すると、

生体内で ROS を十分処理することができなくなる。このような状態で過剰の ROS は細胞に傷害を与え、老化やがん、さらに動脈硬化などの疾患の引き金となることが指摘されており、極端に過剰な ROS の発生は細胞死または個体死を招くこともあり得る。このような急激な ROS の増加に対する生体内での防御機構を解明するために私は活性酸素産生物質であるパラコートを用いて細胞レベルでの解析を始めた。

パラコートは農薬として現在も広く利用されている。Fig. 1 で示したように、パラコートは NADPH から 1 電子還元を受けてパラコートフリーラジカルを形成し、このラジカルが酸素に電子を供与することによって O_2^- が産生する。したがって、その毒性は、 O_2^- の増加に伴う酸化ストレスであると考えられている[1]。

そこで、本研究ではまずパラコート毒性に対する生体内防御機構の解明を目的として、出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) を用いてパラコート毒性に影響を与える因子の検索を行った。

B. 研究方法

親株が生育できないパラコート濃度の条件検討

酵母 BY4742 野生株を SD 培地 2 ml に植菌し、30℃で一晩培養した後、この培養液を SD 培地で 5×10^7 cells/ml になるように希釈した。この希釈培養液 200 μ l をパラコート (25, 50, 100 mM) を含む SD 寒天培地に播き、30℃で7日間培養した。このとき、BY4742 野生株がコロニーを形成せず、パラコート濃度が最も低いものを親株が生育できない濃度としてスクリーニングに用いた。

パラコート耐性遺伝子欠損株のスクリーニング

グリセロールストックにて保存されている欠損酵母の mix を YPAD 培地に植菌し、30℃で一晩培養した後、この培養液を YPAD 培地で 5×10^7 cells/ml になるように希釈した。この希釈培養液 200 μ l を、前述した条件検討によって得られた親株が生育できない濃度であるパラコート 50 mM を含む SD 寒天培地に播き、30℃で 2~4 日間培養した。このとき生育できたコロニーをパラコート耐性候補株として別の YPAD 寒天培地上に広げ、パラコート耐性候補株のシングルコロニーを得た。

酵母からのゲノム DNA の回収

スクリーニングによって得られたパラコート耐性候補株を YPAD 培地

10 ml に植菌し、30℃で一晩培養した後、この培養液を 3000 rpm で 5 分間遠心して細胞を集め上清を捨てた。その後細胞を 1M sorbitol, 0.1M Na₂EDTA (pH 7.5) 0.5 ml で洗浄した後に、再度 1M sorbitol, 0.1M Na₂EDTA (pH 7.5) 0.5 ml で懸濁し、2.5 mg/l zymolias 100T 20 μl を加えて 30℃で 1 時間インキュベートした。この培養液を 12000 rpm で 1 分間遠心し上清を捨てた後、細胞を 50 mM Tris-HCl, 20 mM Na₂EDTA 0.5 ml に懸濁し、10%SDS 50 μl を加えて軽く攪拌し、65℃で 30 分間インキュベートした。この抽出液に 5M KOAc 0.2 ml を加えて、氷上で 30 分間置き、12000 rpm で 10 分間遠心してゲノム DNA を含む上清を得た。得られた DNA 溶液をエタノール沈殿により濃縮した後、最終的に TE (10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 1 mM Na₂EDTA 200 μl) に懸濁しゲノム DNA 溶液とした。

パラコート耐性候補株の遺伝子欠損部分の解析 (Inverse PCR 法)

得られたゲノム DNA 溶液のうち 100 μl を用いて、この DNA 溶液に 1 mg/ml RnaseA 溶液を加え、37℃で 30 分間インキュベートして RNA を除いた。その後、滅菌イオン交換水を加えて 200 μl の DNA 溶液とし、

フェノール抽出を行い最終的にゲノム DNA を TE 100 μl に懸濁し、精製した。このゲノム DNA 溶液 10 μl を用いて、ゲノム DNA を *EcoR* I で切断し、細分化した。なお、ゲノム DNA が細分化されたことを、得られた DNA 溶液の一部を用いて電気泳動を行い、スメア状のバンドが見えることによって確認した。細分化した DNA 溶液にフェノール抽出を行い、*EcoR* I を失活させた後、この DNA 溶液 1 μl を用いて、T4 DNA ligase で self-ligation させて細分化した DNA を環状にした。この環状 DNA を template として、PCR を行った。

PCR サイクル

94℃	5分	} 40 サイクル
94℃	15秒	
55℃	30秒	
72℃	3分	
72℃	5分	

primer

forward (*Dra* I ,*EcoR* I ,*Hind* III -1) : 5' - GTATGTGAATGCTGGTCGCT-3'
reverse (*Dra* I ,*EcoR* I ,*Hind* III -2) : 5' - TATGGGCTAAATGTACGGGC-3'

増幅した目的のフラグメントを電

気泳動により分離しアガロースゲルから精製した後、このフラグメントを template DNA として、template DNA 2 μ l に、3.2 pmol primer 0.5 μ l (forward または reverse) , Premix 2.5 μ l を加え、PCR を行った。

PCR サイクル

96°C	20 秒	} 40 サイクル
50°C	20 秒	
60°C	2 分	

※ なお、用いた primer は *Dra* I , *Eco*R I , *Hind*III-1, 2 である。

反応終了後、stop solution (3M NaOAc 1 μ l, 100 mM Na₂EDTA 1 μ l, 20 mg/ml glycogen 0.5 μ l) を 2.5 μ l 加え、エタノール沈殿により濃縮し、SLS 25 μ l に sample を溶解し、CEQ96 -well sample plate へ移し、オートシーケンサーにより塩基配列の解析を行った。

パラコート耐性候補株として選んだ欠損酵母のパラコートに対する感受性

シーケンスにより解析した塩基配列を *Saccharomyces* Genome Database (<http://genome-www.stanford.edu/Saccharomyces/>) を用いて検索し、パラコート耐

性候補の欠損部分の ORF (Open reading frame) を同定した。同定した欠損酵母を新たにグリセロールストックから YPAD 寒天培地上に広げ、欠損酵母のシングルコロニーを得た。その後、SD 培地 2 ml に植菌し、30°C で一晩培養した後、この培養液を SD 培地で 1×10^5 cells/180 μ l になるように希釈した。96 well plate にパラコート(0, 1, 5, 7.5, 10, 15, 20, 25 mM)を 20 μ l/well ずつ添加した後に、希釈培養液を 180 μ l/well ずつ播き、30°C で 2 日間培養した後の酵母の増殖を 600 nm の吸光度を基に判定した。なお、BY4742 野生株を実験の対照とした。

欠損酵母のマスタープレーットの作成

96 well plate にグリセロールストックとして保存してある欠損酵母を Transter[®]96 Disposable Cartridge を用いて、ジェネティシン 200 μ g/ml を含む YPAD 寒天培地上にスポットし、その後 30°C で一晩培養したものをマスタープレーットとして用いた。

スクリーニングに用いるパラコート濃度の条件検討

酵母 BY4742 野生株、欠損で酵母にパラコート感受性を与えることが知られている *sod1* Δ 、同じく *ctr1* Δ

を各々SD 培地 2ml に植菌し、30℃で一晩培養した後、この培養液をSD培地で希釈した (2×10^8 , 1×10^8 , 5×10^7 , 1×10^7 cells/ml)。この希釈培養液 10 μ l を YPAD 寒天培地上にスポットし、30℃で24時間培養後、パラコート(0, 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 5, 10, 15 mM)を含む YPAD 寒天培地にスポンジを用いてレプリカした。レプリカしたプレートを30℃で2日間培養後、プレートの状態をスキャナで取り込み、画像を比較した。このとき、BY4742 野生株の生育速度と *sod1* Δ ならびに *ctrl* Δ の生育速度の違いが明確に見られるパラコート濃度をスクリーニングに用いた。

スポンジを用いたマスタープレートからの欠損酵母のレプリカ

作成したマスタープレートにスポンジを押し当て、スポンジにマスタープレート上の欠損酵母を移し、前述した条件検討によって得られた濃度のパラコート(0, 1, 5 mM)を含む YPAD 寒天培地上にスポンジの欠損酵母を移した面を押し当て、レプリカした。レプリカした YPAD プレートを30℃でインキュベートし、レプリカした直前、24時間後、48時間後のプレートの様子をスキャナで取り込み、画像を見比べて、パラコートを含まない寒天培地上での生育速度

が同じプレート上の欠損酵母と比べて平均程度で、パラコートを含む寒天培地上での生育速度が同じプレート上の欠損酵母と比べて遅いと思われる欠損酵母を、パラコート感受性候補株として選んだ。

パラコート感受性候補株として選んだ欠損酵母のパラコートに対する感受性

パラコート感受性候補株として同定した欠損酵母を新たにグリセロールストックから YPAD 寒天培地上に広げ、欠損酵母のシングルコロニーを得た。その後、SD 培地 2 ml に植菌し、30℃で一晩培養した後、この培養液をSD培地で 1×10^5 cells/180 μ l になるように希釈した。96 well plate にパラコート(0, 0.25, 0.5, 1, 2.5, 5, 7.5, 10 mM)を20 μ l/well ずつ添加した後に、希釈培養液を180 μ l/well ずつ播き、30℃で2日間培養した後の酵母の増殖を600 nmの吸光度を基に判定した。なお、BY4742 野生株を実験の対照とした。

MVB sorting pathway 構成因子の欠損酵母でのパラコートに対する感受性

欠損酵母を用いたスクリーニングでは得られなかった、MVB sorting pathway 構成因子の欠損酵母 (*vps20*

Δ , *vps25* Δ , *vps27* Δ , *vps28* Δ , *vps34* Δ , *vps4* Δ) を新たにグリセロールストックから YPAD 寒天培地上に広げ、欠損酵母のシングルコロニーを得た。その後、SD 培地 2 ml に植菌し、30°C で一晚培養した後、この培養液を SD 培地で 1×10^5 cells/180 μ l になるように希釈した。96 well plate にパラコート(0, 0.25, 0.5, 1, 2.5, 5, 7.5, 10 mM)を 20 μ l/well ずつ添加した後に、希釈培養液を 180 μ l/well ずつ播き、30°C で 2 日間培養した後の酵母の増殖を 600 nm の吸光度を基に判定した。なお、BY4742 野生株を実験の対照とした。

MVB sorting pathway 構成因子の欠損酵母での様々な薬毒性に対する影響の検討

MVB sorting pathway 構成因子の欠損酵母である、*vps27* Δ , *vps4* Δ , *stp22* Δ を新たにグリセロールストックから YPAD 寒天培地上に広げ、欠損酵母のシングルコロニーを得た。その後、SD 培地 2 ml に植菌し、30°C で一晚培養した後、この培養液を SD 培地で 1×10^5 cells/180 μ l になるように希釈した。96 well plate に、適当な濃度に希釈した過酸化水素 (H_2O_2)、*t*-ブチルヒドロペルオキシド(*t*-BOOH)、メナジオン亜硝酸ナトリウム (menadione)、ジアミド

(diamide)を 20 μ l/well ずつ添加した。

各薬物の濃度は、次のとおりである。

H_2O_2 : 0, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4, 5 mM

t-BOOH : 0, 0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.25, 1.5 mM

Menadione : 0, 5, 10, 12.5, 15, 17.5, 20, 25 mM

Diamide : 0, 1, 1.25, 1.5, 1.75, 2, 2.5, 3 mM

その後、希釈培養液を 180 μ l/well ずつ播き、30°C で 2 日間培養した後の酵母の増殖を 600 nm の吸光度を基に判定した。なお、BY4742 野生株を実験の対照とした。

Vps27 欠損酵母の欠損の確認

酵母からのゲノム DNA の回収は、Glass beads 法により行った。まず、Vps27 欠損酵母、野生株である BY4742 株のシングルコロニーを 2 mL の SD 培地に植菌し、30°C で一晚培養後、集菌し、滅菌水で洗浄した後、Breaking buffer 100 μ l に懸濁した。これに、phenol/chloroform/isoamylalcohol (25 : 24 : 1) 100 μ l および酸洗浄 Glass beads 0.3 g を加え、3 分間激しく攪拌した後、15000 rpm で 5 分

間遠心して、ゲノム DNA を含む水層を得た。得られたゲノム DNA 溶液をエタノール沈殿により濃縮し、最終的に 20 μ l の DNA 溶液とした。この DNA 溶液を template として、PCR を行った。

PCR サイクル

94°C	5分	}	30 サイクル
94°C	15秒		
55°C	30秒		
72°C	3分30秒		
72°C	5分		

primer

forward {vps27-f (500)} : 5'-CTCGTAATCTGTATCATGCAATT-3'

reverse {vps27-r (250)} : 5'-TATGCAGGAACAAGTTTCTTCC-3'

増幅した DNA をアガロースゲルに泳動し、野生株でのバンドと異なる位置に vps27 欠損酵母でのバンドが検出できることを確認した。なお、vps27 欠損酵母に関しては、欠損が確認できた酵母を、以後の実験の対照とした。

Vps27 発現ベクターの作製

1 で増幅した、野生株の vps27 フ

ラグメントを、アガロースゲルから精製した。さらに、シングルコピープラスミドである pRS316 を *Sma* I で処理した後、アガロースゲルから精製した。アガロースゲルから精製した Vps27 フラグメントと pRS316 を DNA ligation kit ver.2 を用いて ligation を行った。尚、ligation を行う際に、この ligation の反応液に、*Sma* I 0.1 μ l を加えた。その後、ligation させたプラスミドを、大腸菌に導入し、この大腸菌よりプラスミドを回収して、プラスミドを得た。大腸菌へのプラスミドの導入は、Hanahan の方法に従って行った。

Competent cells 溶液 50 μ l に上述のプラスミド溶液 1 μ l を加え、氷上で 30 分間静置した後、42°C で 45 秒間の heat shock をかけ、さらに氷上で 2 分間静置した。この溶液に、SOC 培地 500 μ l を加え、37°C で 1 時間培養した後、ampicillin sodium salt 50 μ g/ml を含む LB 寒天培地上に塗布し、37°C で一晩培養した。尚、塗布時に、4% X-gal 15 μ l, 400 mM IPTG 10 μ l を加えた。形成したコロニーの中で、白色のコロニーを選んで、ampicillin sodium salt 50 μ g/ml を含む LB 培地 2 ml に植菌し、一晩培養した後、GenElute™ Plasmid Mini-prep Kit を用いて大腸菌よりプラスミドを回収した。得

られたプラスミド溶液の一部を *Pvu* II で処理した後、アガロースゲルで泳動し、約 4.8 kb 付近に検出できる pRS316 のバンドの他に、ligation により挿入した Vps27 フラグメントより約 0.6 kb 大きいバンドが検出できたものを、Vps27 発現プラスミド (pRS316-VPS27) とした。

UIM point-mutant (Vps27^{S270D.D313D}) の作製

UIM point-mutant は、QuikChange[®] Site-Directed Mutagenesis Kit のプロトコールに従った。2 で作製した pRS316-VPS27 を template として、PCR 反応を行うことにより変異を導入した。

PCR サイクル

95°C	30 秒	} 16 サイクル
95°C	30 秒	
55°C	1 分	
68°C	10 分	

primer

- S270D 変異導入の場合

forward { vps27-S270D-f } : 5' - GGAAAGCAATAGAACTCGACTTG AAAG - 3'

reverse { vps27-S270D-r } : 5' - CTTTCAAGTCGAGTTCTATTGCT TTCC - 3'

- S313D 変異導入の場合

forward { vps27-S313D-f }
: 5' - GCTGCTATTCAGGAAGACTTGAG AGAAGCTG - 3'

reverse { vps27-S313D-r }
: 5' - CAGCTTCTCTCAAGTCTTCCTGA ATAGCAGC - 3'

増幅した PCR 溶液に、*Dpn* I 1 μl を加え、37°C で 1 時間反応させた。このプラスミドを大腸菌に導入して、この大腸菌からプラスミドを回収した。尚、大腸菌へのプラスミドの導入、大腸菌からのプラスミドの回収は、2 と同様の方法により行った。得られたプラスミドを第一章で行った方法でシーケンスを行い、Vps27 部分全長の塩基配列を確認した。シーケンスに用いた primer は次のとおりである。

primer

vps27 seq -70f : 5' - TATTGCTAAGTGAATGAGTAGT - 3'

vps27-S270D-r : 塩基配列は前述のとおり

vps27 uim-sequence-f : 5' - CAGAGTATGTGATAGCTGCTTTG AAG - 3'

vps27-S313D-f : 塩基配列は前

述のとおり

vps27 seq 1200f : 5' -
GCAAGGTTGAATTATGCTTTAAA
-3'

vps27 seq 1940r : 5' -
ACTAGTTTAATGACAGAAATATG
-3'

酵母へのプラスミドの導入

酵母への形質転換は、酢酸リチウム法によって行った。まず、酵母のシングルコロニーを YPAD 培地 50 ml に植菌し、 2×10^7 cells/ml になるまで培養した後、集菌して洗浄後、100 mM 酢酸リチウム 500 μ l に懸濁した。そのうち 50 μ l の懸濁液に、プラスミド 1 μ l , 過熱変性サケ精子 DNA 5 μ l を加えた。そこに、50% ポリエチレングリコール(4000)/100 mM 酢酸リチウム(8:2) 200 μ l を加えて、30°C で 30 分間培養した。その後、42°C で 15 分間の heat shock をかけ、ウラシルを含まない選択用培地である SD(-Ura)寒天培地上に広げ、30°C で 2 日間培養した。この際、ベクターとして用いた pRS316 中にはウラシル合成酵素をコードする遺伝子 (*URA3*) が含まれているので、本プラスミドが導入された酵母のみがウラシルを含まない、SD(-Ura)培地中でも生育可能となる。

この方法で作製した形質転換体は、

次のとおりである。

- BY4742 / pRS316
- *vps27* Δ / pRS316
- *vps27* Δ / VPS27 (pRS316)
- Vps27^{S270D} : *vps27* Δ / pRS316-VPS27^{S270D}
- Vps27^{S313D} : *vps27* Δ / pRS316-VPS27^{S313D}
- Vps27^{S270D, S313D} : *vps27* Δ / pRS316-VPS27^{S270D, S313D}

酵母の細胞内における活性酸素種の測定

酵母のシングルコロニーを 2 ml の YPAD 培地に植菌し、30°C で一晚培養後、 1×10^7 cells/ml を YPAD 培地 10 ml に移し、30°C で 3 時間培養した。その後、3000 rpm, 25°C で 5 分間遠心して集菌し、その沈殿を 10 mM リン酸カリウム (pH 7.0) 2 ml で洗浄し、10 μ M DCFH-DH を含む 10 mM KP buffer 2 mL で懸濁した。30°C で 30 分間培養した後、3000 rpm, 25°C で 5 分間遠心して集菌し、その沈殿に、パラコート、または過酸化水素を含む SD 培地を加え、30°C で 3 時間培養した。尚、パラコート、または過酸化水素の最終濃度は次のとおりである。

パラコート : 0 , 5 , 10 mM

過酸化水素 : 0, 1, 2, 3 mM
その後、3000 rpm, 4°Cで5分間遠心して集菌し、その沈殿に冷滅菌蒸留水 5 mlで洗浄した。この操作を2回繰り返した後に、その沈殿を冷滅菌蒸留水 200 μ lで懸濁し、そのうち180 μ lを96 well plateに移し、蛍光 plate readerで測定した (excitation 504 nm ; emission 524 nm)。その際、得られた蛍光強度を、菌液の600 nmでの吸光度で補正した。

(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. 欠損により酵母にパラコート耐性を示す遺伝子の検索

パラコート毒性に対する生体内防御機構の解明の手がかりを得るため、本章では、欠損により酵母がパラコート耐性となる遺伝子の検索を行った。まず、当研究室にて保存されている、約 4800 種の遺伝子欠損酵母ライブラリーを用いて、そのライブラリー中の各遺伝子欠損酵母を混合した培養液を、野生株が生育できない濃度のパラコートを含む寒天培地に

て生育させ、コロニーを形成した酵母をパラコート耐性候補株として選んだ。

欠損されている遺伝子の同定は、スクリーニングによって得られたパラコート耐性候補株について、ゲノム DNA を抽出し、Inverse PCR 法により行った。その結果、18 種の遺伝子 (*ARA1*, *BUD7*, *BUD13*, *CRR1*, *FRE1*, *FYV10*, *LIN1*, *MPH1*, *NBP2*, *RPL41B*, *RTG3*, *SAP185*, *SAS3*, *SDC1*, *SSA2*, *YDR061W*, *YDR467C*, *YJL144W*) が欠損により、酵母にパラコート耐性を付与する遺伝子として同定された。そのうち、4 種の遺伝子 (*BUD13*, *CRR1*, *FYV10*, *NBP2*) が、パラコート耐性に関してこれまでに報告のない新規な因子であった (Fig. 2)。

BUD13 は、酵母の出芽における bud site selection に関わる因子群の一つである Bud13 をコードする遺伝子で、核や細胞質に局在し、おそらく mRNA のスプライシングにも関与すると考えられている[2]。Bud13 は、同じく mRNA のスプライシングに関わるとされている因子 Ist3 と遺伝学的相互作用をしているとの報告がある[3]。Bud13 に関して、パラコート毒性と関連づける報告は未だなされていないが、Ist3 は、欠損により過酸化水素に高感受性を示すことが報

告されており[4]、このことから、もしかしたら Bud13 の欠損の影響が、Ist3 の遺伝子発現にも影響を及ぼしているのではないかと推測される。

CRR1 は、酵母の出芽や細胞壁の構築に関わる *Crr1* をコードする遺伝子である。この *Crr1* は、鉄イオンの調節に関わる転写因子である *Mac1* によって転写調節を受けていることが知られている[5]。*Mac1* は、パラコート毒性を増強させていると考えられている因子 *Fre1* の転写も調節していることが報告されている。さらに *CRR1* の上流にある *Mac1* 結合配列は、ferric reductase で、細胞外でのパラコート毒性を増強させていると考えられている *Fre1* と共有されている可能性が高く、*crr1*Δ は、*Mac1* を介した *FRE1* の発現に影響を及ぼしている可能性があり得る。

FYV10 は、糖新生に関わる fructose-1, 6 -bisphosphatase の分解に関わる *Fyv10* をコードする遺伝子である。*Fyv10* についても、酸化ストレスと関連づける報告はなく、その機構はまったく不明である。

NBP2 は、ヌクレオソームやヒストンの構築に関わる *Nap1* と相互作用する因子として同定された *Nbp2* をコードする遺伝子である。最近の報告で、*Nbp2* が高温条件下での細胞周期の M 期 (mitosis) での増殖や、

細胞壁の完成に必要であるということが明らかになったが[6]、今回得られた他の因子同様、酸化ストレスに関する報告はない。

2. 欠損により酵母にパラコート感受性を示す遺伝子の検索

1. でのスクリーニングではスクリーニングの際の取り残しが多い可能性が考えられたので、新たにレブリカ法を用いたスクリーニング系を構築した[7]。欠損酵母を寒天培地上にスポットした“マスタープレート”を作製し、パラコートを含む寒天培地へスポンジを用いて複製 (レブリカ) 後、培養した。したがって、この方法では、約 4800 種の遺伝子欠損酵母それぞれについて、個々にパラコート感受性を調べることになる。培養後の各欠損酵母の生育速度が、パラコートを含まないプレートでは野生株とほぼ同程度であるが、パラコートを含まないプレートでは野生株と比べて生育速度が極端に低下している欠損酵母をパラコート感受性候補株として選んだ (Fig. 3 および Fig. 4)。その結果、約 120 種の欠損酵母が、パラコート感受性候補株として得られた。さらに、得られた候補株についてパラコートに対する耐性試験を各欠損酵母ごとに行い、その感受性を確認した (Fig. 5)。

その結果、欠損により酵母にパラコート感受性を与える遺伝子を最終的に 29 種同定した。得られた 29 種の遺伝子についてパラコート毒性と関連づける報告はこれまでになく、これら因子の細胞内における役割の解明により新たなパラコート毒性軽減機構の解明につながる可能性がある。

特筆すべきことは、今回得られた 29 種の遺伝子のうち、7 種の遺伝子 (*DID4*, *SNF7*, *SNF8*, *SRN2*, *STP22*, *VPS24*, *DOA4*) が、エンドサイトーシスの経路の一部である、MVB sorting pathway と呼ばれる経路に関与する因子であることが見出されたことである。

エンドサイトーシスとは、細胞膜上に存在するトランスポーターやレセプターなどの細胞膜上の蛋白質が、細胞外の栄養状態などの環境変化によって不要になった時に、細胞膜が細胞質側に陥入することにより、細胞質に取り込まれることから始まる経路である。酵母ではエンドサイトーシスによって細胞質に取り込まれた蛋白質は、一部は液胞へ運ばれ分解され、また一部はゴルジ体を介して細胞膜上へとりサイクルされる (Fig. 6)。生体は、このエンドサイトーシスにより、細胞膜上に存在する蛋白質の量を調節し、細胞外因子の

取り込み量などのバランスを保っている。

エンドソームを介した経路で輸送される蛋白質の中には、細胞膜上に存在する蛋白質が細胞質に取り込まれる際に、ユビキチンリガーゼ (E3) によってユビキチンが一つだけ結合する蛋白質が知られている。このユビキチン化された蛋白質が液胞へ輸送される際に、蛋白質に結合したユビキチンをエンドソーム上の因子が認識して、エンドソームを介する輸送経路に運ぶ仕組みになっている。このモノユビキチン化 (ユビキチンが蛋白質の一つだけ結合すること) された蛋白質を認識し選別する機能は、MVB sorting pathway とよばれ、エンドサイトーシスの一部として機能することが知られている。

前述のように、MVB sorting pathway は、モノユビキチン化された蛋白質 (以下 MVB cargo と総称する) を液胞へ運ぶ役割を持つ (Fig. 7) [8~10]。MVB cargo は、まずユビキチン化されると、Vps27 と呼ばれる因子によって認識され、エンドソーム膜上へとリクルートされ、MVB sorting pathway へと導かれることが知られている[9]。

Vps27 は、ヒトの Hrs (Hepatocyte receptor tyrosine kinase substrate) の酵母ホモログとして同定され、

MVB sorting pathway の開始に関わっており[9]、Vps27 内に保存されている UIM (Ubiquitin-interacting motif) と呼ばれるドメインを介して、MVB cargo に結合しているユビキチンと結合することにより MVB cargo を認識する[11~14]。また Vps27 は細胞質とエンドソーム膜をシャトルする蛋白質で、Vps27 に存在する FYVE ドメインを介して、エンドソームに存在する PI(3)P (Phosphatidylinositol 3-phosphate) に特異的に結合することにより、MVB cargo ごとエンドソーム膜にリクルートされる[15, 16]。エンドソーム膜にリクルートされた Vps27 は、ESCRT (The endosomal sorting complex required for transport) と呼ばれる complex に MVB cargo を受け渡す。

ESCRT complex は3種類存在し、それぞれ ESCRT-1, ESCRT-2, ESCRT-3 と呼ばれている。ESCRT-1 は、Stp22, Srn2, Vps28 から構成されている complex で、Vps27 から MVB cargo を受け渡され、下流の ESCRT-2 をエンドソーム膜へとリクルートして、その ESCRT-2 へと MVB cargo を受け渡すとされている[17]。ESCRT-1 の構成因子である Stp22 は、ヒトの Tsg101 (Tumor susceptibility gene 101) の酵母ホ

モログで、UBC (ubiquitin conjugation-like) ドメインを持ち、MVB cargo に結合しているユビキチンに結合することが知られ、ESCRT-1 の機能において重要な役割を果たすとされている。

ESCRT-2 は、Snf8, Vps25, Vps36 から構成されている complex で、ESCRT-1 同様、下流の ESCRT-3 をエンドソーム膜へとリクルートし、ESCRT-1 から受けとった MVB cargo を ESCRT-3 に受け渡している[18]。また、ESCRT-1 と同じく、ESCRT-2 の構成因子である Vps36 にユビキチン結合能が備わっており、MVB cargo の受け渡しに重要な役割を果たすとされている[19]。

ESCRT-3 は、Did4, Snf7, Vps20, Vps24 から構成されている complex で、MVB sorting pathway の last step として、MVB cargo をエンドソーム内へと取り込ませる役割を果たしている[20]。その時、脱ユビキチン化酵素である Doa4 は、MVB cargo に結合しているユビキチンを外し、細胞質へとリサイクルする。この Doa4 の機能には ESCRT-3 が必要であることが知られている[20]。

これらの因子に加え、ESCRT complex をエンドソーム膜から切り離すことによって MVB sorting pathway の解離を調節する AAA

ATPase である Vps4 や[21, 22]、PI (Phosphatidylinositol) をリン酸化して PI(3)P を合成する Vps15, Vps34 など[23, 24]、MVB sorting pathway はさらに様々な因子が関与することが知られている。

MVB sorting pathway に関与する因子を欠損することにより、MVB sorting pathway での液胞への MVB cargo の輸送は阻害され、MVB cargo はエンドソーム膜に留まることが知られている[25]。今回 MVB sorting pathway 中の因子がスクリーニングで複数得られたことから、MVB sorting pathway の機能を阻害することにより酵母はパラコート感受性を示す可能性が示唆され、MVB sorting pathway の機能がパラコート毒性を軽減しているという新たな可能性が提示された。

また、スクリーニングで得られた欠損により酵母にパラコート感受性を及ぼす因子の中には、他にも細胞内輸送に働く因子が得られた。これらの因子は MVB sorting pathway には直接関与しないものの、他の細胞内輸送経路に関与することが知られている。それらの因子を挙げると、エンドソームからゴルジ体への蛋白質のリサイクルに関わっているとされている Rcy1 をコードする遺伝子である *RCY1* や[26]、PI(3)P をリン

酸化して PI(3,5)P₂ を合成して、液胞の形成や MVB sorting pathway での MVB cargo の輸送にも関わっているとされている Fab1 をコードする遺伝子である *FAB1*[27]、MVB sorting pathway に関与する因子群と同じ class E protein である Vps60 をコードする遺伝子である *VPS60*[28]、初期エンドソームから MVB sorting pathway が機能する後期エンドソームへの移行や、ゴルジ体とエンドソーム間の輸送に関わる Pep12 をコードする遺伝子である *PEP12* である[29]。このことから、パラコート毒性との間には何かの関連性が存在すると考えられる。

3. MVB sorting pathway に関与する因子群の欠損がパラコート感受性に与える影響

2. で述べたように、MVB(multivesicular body) sorting pathway に関与する因子である *DID4*, *SNF7*, *SNF8*, *SRN2*, *STP22*, *VPS24*, *DOA4* が、欠損により酵母にパラコート感受性を与える遺伝子であることを明らかにした。MVB sorting pathway は、細胞内でエンドソームを介した経路で、モノユビキチン化した蛋白質（以下 MVB cargo と総称する）を液胞へ運ぶ役割を持ち[8~10]、MVB cargo は主に

エンドサイトーシスによって運ばれてくるものが多く存在する (Fig. 6 および Fig. 7)。MVB sorting pathway に関与する因子群を欠損すると、MVB cargo が液胞へ運ばれなくなり、エンドソーム膜状に蓄積し、エンドソームが肥大化することが知られている。このことから、これらの欠損酵母で見られるパラコート感受性が、MVB sorting pathway の機能の阻害による影響である可能性が考えられる。

第二章でのスクリーニングでは、マスタープレートからスポンジを用いてレプリカする際に酵母量のばらつきが生じる、という問題点があり、遺伝子欠損によりパラコート感受性となるはずの酵母株がまだ見逃されている可能性が十分に考えられた。そこで、第二章でパラコート毒性との関連する可能性が示唆された MVB sorting pathway に関与する因子群の中で、スクリーニングによって得られなかった遺伝子欠損酵母について、再度パラコート毒性に及ぼす影響を検討した。

その結果、今回検討を行った、*vps20* Δ 、*vps25* Δ 、*vps27* Δ 、*vps28* Δ 、*vps34* Δ 、*vps4* Δ は、全てパラコートに対して感受性を示した。したがって MVB sorting pathway に関与する因子群全てについて、欠損により

酵母にパラコート感受性を与えることが確認された (Fig. 8)。

本章での研究により、MVB sorting pathway に関与する因子群について、それぞれ遺伝子を欠損させた酵母は全ての株が、パラコートに感受性を示すことが明らかとなった。MVB sorting pathway での液胞への MVB cargo の輸送は、MVB sorting pathway に関与する因子群を1つでも欠損させると阻害されることが知られており[25]、本章における結果は、MVB sorting pathway の機能阻害が、酵母のパラコート毒性を増強させている可能性を裏付けるものになった。

しかし、MVB sorting pathway に関与する因子群の遺伝子を欠損させることにより MVB cargo の輸送阻害のほか、生体内で他の影響が現れ、そのためにパラコート毒性が増強している可能性も考えられるため、さらに検討が必要である。また、パラコート毒性が、パラコートの構造などに由来したパラコート特異的な毒性なのか、それともパラコートの毒性発現機構として知られている O_2^- の増加に伴う酸化ストレス誘導によるものなのか、解明すべき点であると考えられる。

4. MVB sorting pathway に関与する