

因子群の欠損酵母での様々な薬毒性に対する影響

MVB sorting pathway での液胞への MVB cargo の輸送を阻害することが、酵母のパラコート毒性を増強させている可能性を示してきた。そこで本章では、そのパラコート毒性が、パラコート特異的な毒性なのか、それともパラコートを介した O_2^- の増加の結果として生じる酸化ストレス誘導によるものなのかを検討するため、パラコート以外に酸化ストレスを与える薬物に対する感受性を検討した。MVB sorting pathway に関与する因子群の中から、Stp22, Vps4, Vps27 の各欠損酵母を用い、過酸化水素、t-ブチルヒドロペルオキシド、メナジオン、ジアミドに対する耐性試験を行った。

その結果、*stp22Δ*, *vps4Δ*, *vps27Δ* は、これら 4 種の薬剤に対して感受性を示すことが明らかとなった。この結果から、MVB sorting pathway に関与する因子の欠損酵母は、パラコート以外の活性酸素産生物質に対しても感受性を示すことが確認された。したがって、MVB sorting pathway における液胞への MVB cargo の輸送が、酸化ストレスを軽減している可能性が強く示唆された (Fig. 9)。

ここで用いた薬剤は、まず、ROS

の一種である過酸化水素 (H_2O_2) である。過酸化水素は、微量ながらも常に生体内に存在している ROS で、細胞膜を自由に通過できることが知られている[1]。このことから、過酸化水素が及ぼす毒性は、主に細胞内における ROS による傷害であるといえる。過酸化水素に対しては、*stp22Δ*, *vps4Δ*, *vps27Δ* のいずれにおいても同程度の感受性を示すことから、MVB sorting pathway に関与する因子群の欠損により、細胞内での ROS による傷害に感受性となると考えられる。

次に用いた薬剤は、脂溶性の高い過酸化物、t-ブチルヒドロペルオキシド (t-BOOH) である。t-BOOH は、脂溶性が高いために膜に浸透し、酸化ストレスを誘導する酸化物である[30]。t-BOOH に対して、*stp22Δ*, *vps4Δ*, *vps27Δ* の各欠損酵母はいずれも同程度の感受性を示したが、それほど感受性は高くなかった。したがって、膜への傷害に対する酵母への影響は、MVB sorting pathway での液胞への MVB cargo の輸送にはさほど関係ないのではないかと思われる。

3 番目に用いた薬剤は、活性酸素、特に O_2^- を産生するメナジオンである。メナジオンは、キノン構造をとり、遊離したキノンがセミキノン

ラジカルに1電子還元されることにより、 O_2^- を産生することが知られている[1]。メナジオンに対して、*stp22*Δ, *vps4*Δ, *vps27*Δの各欠損酵母はいずれも同程度の感受性を示し、特に *stp22*Δに関しては、他の欠損酵母より高い感受性を示した。この *stp22*Δの高感受性は、パラコートでの感受性でも観察された。

チオール基 (-SH)を酸化する薬剤であるジアミドについても検討を行った。ジアミドの作用として、細胞内のグルタチオンの枯渇や蛋白質のシステイン残基の酸化が知られており[31]、間接的に細胞に酸化ストレスを及ぼす。ジアミドに対して、*stp22*Δ, *vps4*Δ, *vps27*Δの各欠損酵母はいずれも同程度の感受性を示し、特に *stp22*Δに関しては、メナジオンと同様、他の欠損酵母より高い感受性を示した。したがってジアミドによる、グルタチオンなどの抗酸化酵素の減少が、MVB sorting pathwayに関与する因子の欠損により、酵母に感受性を与えている可能性が考えられる。

また、以上の結果から、MVB sorting pathwayに関与する因子群の欠損により増強されるパラコート毒性は、 O_2^- 産生の結果及ぼされる酸化ストレスによるものである可能性が強く示唆された。

5. MVB sorting pathway 機能阻害によるパラコート感受性の修飾

MVB sorting pathway の構成因子を欠損させた酵母は、パラコートに感受性を示すことから、MVB sorting pathway の機能を阻害することによって、酵母のパラコート感受性が増強する可能性が考えられる (第三章)。

しかし、MVB sorting pathway の構成因子を欠損することによる影響は、MVB cargo の輸送阻害のみではない場合も知られている。例えば Vps27 は、MVB sorting pathway の開始に関与し、MVB cargo を、ユビキチンを介してエンドソーム膜へリクルートすることが知られている。しかし、Vps27 を欠損することにより、MVB sorting pathway での液胞への MVB cargo の輸送が阻害されるだけでなく、エンドソームとゴルジ体間の輸送の阻害や、液胞内腔の膜の生成異常などが起こる[32]。Vps27 には UIM (ubiquitin-interacting motif)と呼ばれるよく保存されたドメインが2つ存在する (Fig. 10)。UIMはVps27とユビキチンが結合するのに重要なドメインで各UIMの配列中に含まれる270番目と313番目のセリンが、MVB cargoを認識するのに重要な役割を果たしていることが知られている。この *vps27* の270番目と313番目のセリ

ンをアスパラギン酸に置き換えた変異体では、MVB sorting pathway での液胞への MVB cargo の輸送が大きく阻害されるにもかかわらず、エンドソームとゴルジ体間の輸送の阻害や、液胞内腔の膜の生成異常は起こらない。そこで、パラコート毒性と MVB cargo の輸送の関連を明らかにするために、UIM 変異体に対するパラコート毒性への影響を検討した。

その結果、Vps27のUIM変異体酵母は、Vps27欠損酵母ほどではないが、パラコートに感受性を示した(Fig. 11)。興味深いことに、Vps27に存在する2つのUIMのうち、どちらか1つ変異を入れた酵母 (Vps27^{S270D}, Vps27^{S313D}) におけるパラコート感受性はほぼ同程度で、UIMを2つとも変異させた酵母 (Vps27^{S270D, S313D}) の場合では、Vps27^{S270D}, Vps27^{S313D}に比べて、若干パラコート感受性が増した。この結果から、酵母はVps27の持つ、MVB cargoの認識能が低下するにしたがって、パラコートに対してより感受性を示すことが明らかとなった。この結果から、MVB sorting pathwayによる液胞へのMVB cargoの輸送により酸化ストレスが軽減されていることが示唆された。

6. Vps27 欠損酵母の細胞内活

性酸素種の測定

MVB sorting pathway の構成因子を欠損することにより、酵母はパラコート感受性となるが、その要因として、MVB sorting pathway における蛋白質の液胞への輸送の阻害であることが前章で示唆された。そこで、MVB sorting pathway による液胞への MVB cargo の輸送を阻害することにより、酸化ストレスによる毒性軽減が行われたいのではないかと考え、Vps27 欠損酵母を用いて、パラコート暴露時、または過酸化水素暴露時の、細胞内での活性酸素量の測定を試みた。

活性酸素を検出する蛍光試薬である DCFH-DA を用いて、酵母の蛍光強度を測定した結果、パラコート暴露 3 時間、または過酸化水素暴露 3 時間で、野生株に比べて、Vps27 欠損酵母での細胞内活性酸素量は、有意に高い値を示した (Fig. 12 または Fig. 13)。野生株での薬物未処理時の細胞内活性酸素量を 100%としたとき、Vps27 欠損酵母では、10 mM のパラコート暴露、または 2 mM の過酸化水素暴露により、約 200%まで細胞内活性酸素量の上昇が見られた。この結果は、酵母が過剰の酸化ストレスにさらされるような条件下では、Vps27 を欠損することにより、細胞内の活性酸素量の顕著な増加が起こ

っていることを示している。したがって、Vps27 欠損酵母で観察されたパラコート感受性の増強または過酸化水素感受性の増強に、細胞内の活性酸素量の顕著な増加が関与する可能性が考えられる。

しかしながら、Vps27欠損による他の要因により結果的に細胞内活性酸素量の上昇が生じている可能性は、現時点では否定できない。今のところVps27欠損による酵母の細胞内活性酸素量の増加についての詳しいメカニズムはまだ不明であり、MVB sorting pathwayの機能阻害によるパラコート毒性増強機構の解明に結び付けるには、さらに解析を行う必要があると考えられる。

7. MVB sorting pathway に関与する経路の阻害によるパラコート感受性の修飾

MVB sorting pathway は、エンドサイトーシスと密接な関係にあることが知られている。また、MVB sorting pathway によってエンドソーム内へと運ばれた MVB cargo は、エンドソームが液胞に融合することによって液胞内へと運ばれる。ゴルジ体から MVB cargo が運ばれてくる事例も知られており[36]、MVB sorting pathway は、様々な細胞内輸送経路に影響を及ぼすことが知られている

(Fig. 14)。そこで、MVB sorting pathway との関連が指摘されている他の細胞内輸送経路もパラコート感受性に影響を及ぼし、MVB sorting pathway と関連して酵母のパラコート毒性を増強させている可能性を考え、細胞内輸送に影響を及ぼす欠損酵母での、パラコート感受性に対する影響を検討した。尚、エンドサイトーシスの開始に関与する経路の因子として、*END3*, *ENT1*, *ENT2*, *SLA1*, *SLA2*, または *ARK1*, *PRK1* の各欠損酵母、液胞とエンドソームとの融合に関与する因子として、*VAM3*, *VAM7*, *YPT7* の各欠損酵母、さらに、ゴルジ体とエンドソーム間の輸送の経路に関与する因子として、*VAC1*, *VPS45* の各欠損酵母を用いて、検討を行った。

エンドサイトーシスの開始は、Fig. 15 で示したように、End3, Pan1, Sla1, Sla2 で構成される complex と、Ent1, Ent2, Pan1, yAP1801/2 で構成される complex によって制御されていることが知られている[38, 39]。End3/Pan1/Sla1/Sla2 complex において、*sla1* Δ , *sla2* Δ に関しては、パラコート毒性に対する影響は見られなかったが、*end3* Δ に関しては、パラコートに感受性を示した(Fig. 16 および Fig. 17)。End3 は、MVB cargo の E3 として知られている Rsp5

と相互作用し、*END3* 欠損により、Rsp5 の局在が変化することが報告されていて[40]、*END3* の欠損によるパラコート毒性の増強という結果は、パラコート毒性における MVB sorting pathway とエンドサイトーシスとを関連付ける手がかりとなる可能性が考えられる。

さらに、End3/Pan1/Slal complex の解離を起こす因子として、Ark/Prk kinase family が知られている[37]。Ark/Prk kinase family である Ark1, Prk1 は、Slal と Pan1 をリン酸化することにより、End3/Pan1/Slal complex を解離させ、細胞骨格形成やエンドサイトーシスの異常を引き起こすとされている(Fig. 18) [41]。*ARK1* や *PRK1* の過剰発現により、エンドサイトーシスが阻害されることが知られていることから、*ARK1* や *PRK1* の欠損により、酵母がエンドサイトーシスを起こりやすくなる状態になると推測し、Ark1 または Prk1 の欠損酵母で、パラコート感受性を検討した。しかし、*ark1* Δ 、*prk1* Δ は、若干パラコートに耐性を示したものの、酵母のパラコート感受性にそれほど影響はなかった(Fig. 18)。ただし本論文では示していないが、配列上の特徴から、Ark/Prk kinase family の一つとして考えられている Akl1 を欠損す

ることにより、酵母はパラコートに強い耐性を示した。Akl1 が Ark/Prk kinase family の一つではあるものの、エンドサイトーシスに働くという確たる証拠が現時点ではないため[38]、仮に Akl1 が Ark/Prk kinase family の一つであるならば、エンドサイトーシスの開始から MVB sorting pathway へのステップがパラコート毒性に関与する可能性が強まると考えられる。

液胞とエンドソームとの融合は、Fig. 19 に示すように、主に SNARE と呼ばれる蛋白質によって行われている。今回検討した因子である、Vam3, Vam7, Ypt7 のうち、Vam7 は、PX (phox) ドメインを介し、エンドソーム膜に存在する PI(3)P と特異的に結合することが知られ、エンドソームと液胞の融合に関与していることが示されている[42]。Vam3, Ypt7 も同じく、エンドソームと液胞との融合に関与するという報告がある[43, 44]。これら因子についてパラコート感受性との関連を調べたところ、いずれの欠損酵母でもパラコートに対して感受性を示した(Fig. 20)。この結果から、MVB sorting pathway から液胞へ MVB cargo を運ぶまでの経路が、酵母のパラコート毒性に影響を与えている可能性が示唆された。

ゴルジ体とエンドソーム間の輸送に関与する因子については、先に行ったスクリーニングで、*RCY1* と *PEP12* が欠損により酵母にパラコート感受性を与える遺伝子として得られていた。したがって、ゴルジ体とエンドソーム間の輸送が、酵母のパラコート毒性に及ぼす影響という点においても、MVB sorting pathway と関連がある可能性が考えられた。しかし、本章で検討した *VAC1*, *VPS45* の欠損酵母は、欠損することにより酵母の生育が抑制されたため、パラコートに感受性かどうか判断が困難であった(Fig. 21)。

以上の結果から、MVB sorting pathwayから液胞へのMVB cargoの輸送までの経路が、酵母においてパラコート毒性を軽減している可能性が考えられるが、MVB sorting pathwayと、液胞とエンドソームとの融合の経路の関連を検討するなど、さらに解析が必要である。

参考文献

- 1) 大柳善彦、浅田浩二、中野稔 (1988) 活性酸素
- 2) Ohi MD, Link AJ, Ren L, Jennings JL, McDonald WH, Gould KL. (2002) Proteomics analysis reveals stable

multiprotein complexes in both fission and budding yeasts containing Myb-related Cdc5p/Cef1p, novel pre-mRNA splicing factors, and snRNAs. *Mol. Cell Biol.* 22(7), 2011-2024

- 3) Ito T, Tashiro K, Muta S, Ozawa R, Chiba T, Nishizawa M, Yamamoto K, Kuhara S, Sakaki Y. (2000) Toward a protein-protein interaction map of the budding yeast: A comprehensive system to examine two-hybrid interactions in all possible combinations between the yeast proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 97(3), 1143-1147.
- 4) Entian KD, Schuster T, Hegemann JH, Becher D, Feldmann H, Guldener U, Gotz R, Hansen M, Hollenberg CP, Jansen G, Kramer W, Klein S, Kotter P, Kricke J, Launhardt H, Mannhaupt G, Maierl A, Meyer P, Mewes W, Munder T, Niedenthal RK, Ramezani Rad M, Rohmer A, Romer A, Hinnen

- A, et al. (1999) Functional analysis of 150 deletion mutants in *Saccharomyces cerevisiae* by a systematic approach. *Mol. Gen. Genet.* 262 (4-5) , 683-702.
- 5) Gross C, Kelleher M, Iyer VR, Brown PO, Winge DR. (2000) Identification of the copper regulon in *Saccharomyces cerevisiae* by DNA microarrays. *J. Biol. Chem.* 275(41) , 32310-32316.
- 6) Ohkuni K, Okuda A, Kikuchi A. (2003) Yeast Nap1-binding protein Nbp2p is required for mitotic growth at high temperatures and for cell wall integrity. *Genetics.* 65(2) , 517-529.
- 7) Carole.E, Cramer, Rowland.H.Davis (1978) Screening for amino acid pool mutants of *neurospora* and yeasts : Replica-printing technique. *J. Bacteriol.* 137(3) , 1437-1438.
- 8) D.J.Katzmann,, G.Odorizzi, S.D.Emr, (2002) Receptor downregulation and multivesicular body sorting. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 893-905.
- 9) Camilla Raiborg, Tor Erik Rusten and Harald Stenmark (2003) Protein sorting into multivesicular endosomes. *Current Opinion in Cell Biol.* 15, 446-455
- 10) Jonathan D. Shaw, Kellie B. Cummings, Gregory Huyer, Susan Michaelis and Beverly Wendland (2001) Yeast as a Model System for Studying Endocytosis. *Experimental Cell Reserch* 271, 1-9
- 11) Reggiori F, Pelham HR (2001) Sorting of proteins into multivesicular bodies : ubiquitin-dependent and -independent targeting. *Nat. Cell Biol.* 4, 394-398.
- 12) Patricia S. Bilodeau, Jennifer L. Urbanowski, Stanley C. Winistorfer and Robert C. Piper (2002) The

- Vps27p-Hse1p complex binds ubiquitin and mediates endosomal protein sorting. *Nat. Cell Biol.* 4, 534-539.
- 13) Naomi Bishop, Alistair Horman and Philip Woodman (2002) Mammalian class E vps proteins recognize ubiquitin and act in the removal of endosomal protein-ubiquitin conjugates. *J. Cell Biol.* 157 , 91-101.
- 14) Shih, S.C., D.J.Katzmann, J.D.Schnell, M.Sutanto, S.D.Emr, and L.Hicke. (2002) Epsins and Vps27p/Hrs contain ubiquitin-binding domains that function in receptor endocytosis. *Nat. Cell Biol.* 4 , 389-393.
- 15) Saurav Misra and James H. Hurley (1999) Crystal Structure of a Phosphatidylinositol 3-Phosphate-Specific Membrane-Targeting Motif, the FYVE Domain of Vps27p. *Cell.* 97 , 657-666.
- 16) Vijay G. Sankaran, Daryl E. Klein, Mira M. Sachdeva, and Mark A. Lemmon (2001) High-Affinity Binding of a FYVE Domain to Phosphatidylinositol 3-Phosphate Requires Intact Phospholipid but Not FYVE Domain Oligomerization. *Biochemistry.* 40, 8581-8587
- 17) D. J. Katzmann, M. Babst and S. D. Emr (2001) Ubiquitin-dependent sorting into the multivesicular body pathway requires the function of a conserved endosomal protein sorting complex, ESCRT-1. *Cell* 106 , 145-155.
- 18) Babst, M., Katzmann, D. J., Snyder, W. B., Wendland, B., and Emr, S. D. (2002) Endosome-associated complex, ESCRT-II, recruits transport machinery for protein sorting at the multivesicular body. *Dev. Cell* 3 , 283-289.
- 19) Hemmo H. Meyer, Yanzhuang Wang and Graham Warren (2002) Direct

- binding of ubiquitin conjugates by the mammalian p97 adaptor complexes, p47 and Ufd1-Npl4. *EMBO J.* 21 , 5645-5652.
- 20) Babst, M., Katzmann, D. J., Estepa-Sabal, E. J., Meerloo, T., and Emr, S. D. (2002) Escrt-III: an endosome-associated heterooligomeric protein complex required for mvb sorting. *Dev. Cell* 3 , 271-282.
- 21) Babst, M., Wendland, B., Estepa, E. J., and Emr, S. D. (1998) The Vps4p AAA ATPase regulates membrane association of a Vps protein complex required for normal endosome function. *EMBO J.* 17 , 2982-2993
- 22) Yeo, S. C., Xu, L., Ren, J., Boulton, V. J., Wagle, M. D., Liu, C., Ren, G., Wong, P., Zahn, R., Sasajala, P., Yang, H., Piper, R. C., and Munn, A. L. (2003) Vps20p and Vta1p interact with Vps4p and function in multivesicular body sorting and endosomal transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Sci.* 116, 3957-3970.
- 23) Schu, P. V., Takegawa, K., Fry, M. J., Stack, J. H., Waterfield, M. D., and Emr, S. D. (1993) Phosphatidylinositol 3-kinase encoded by yeast VPS34 gene essential for protein sorting. *Science* 260, 88-91.
- 24) Stack, J. H., Herman, P. K., Schu, P. V., and Emr, S. D. (1993) A membrane-associated complex containing the Vps15 protein kinase and the Vps34 PI 3-kinase is essential for protein sorting to the yeast lysosome-like vacuole. *EMBO J.* 12, 2195-2204.
- 25) Piper, R. C., Cooper, A. A., Yang, H., and Stevens, T. H. (1995) VPS27 controls vacuolar and endocytic traffic through a prevacuolar compartment in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* 131, 603-617.
- 26) Wiederkehr, A., Avaro, S., Prescianotto-Baschong, C., Haguenuer-Tsapis, R., and

- Riezman, H. (2000) The F-box protein Rcy1p is involved in endocytic membrane traffic and recycling out of an early endosome in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* 149 , 397-410
- 27) Odorizzi, G., Babst, M., and Emr, S. D. (1998) Fab1p PtdIns(3)P 5-kinase function essential for protein sorting in the multivesicular body. *Cell* 95, 847-858.
- 28) Howard, T. L., Stauffer, D. R., Degenin, C. R., and Hollenberg, S. M. (2001) CHMP1 functions as a member of a newly defined family of vesicle trafficking proteins. *J. Cell Sci.* 114, 2395-2404.
- 29) Gerrard, S. R., Levi, B. P., and Stevens, T. H. (2000) Pep12p is a multifunctional yeast syntaxin that controls entry of biosynthetic, endocytic and retrograde traffic into the prevacuolar compartment. *Traffic* 1, 259-269.
- 30) Sunday O. Awe, Nina L. Tsakadze, Stanley E. D'Souza and Ayotunde S. O. Adeagbo (2002) *tert*-Butyl hydroperoxide-mediated vascular responses in DOCA-salt hypertensive rats. *Vascul Pharmacol.* 40(1) , 51-57.
- 31) Babiychuk E, Kushnir S, Belles-Boix E, Van Montagu M, Inze D. (1995) Arabidopsis thaliana NADPH oxidoreductase homologs confer tolerance of yeasts toward the thiol-oxidizing drug diamide. *J. Biol Chem.* 270(44), 26224-26231.
- 32) Bilodeau, P. S., Urbanowski, J. L., Winistorfer, S. C., and Piper, R. C. (2002) The Vps27p Hse1p complex binds ubiquitin and mediates endosomal protein sorting. *Nat. Cell Biol.* 4 , 534-539.
- 33) Shih, S. C., Katzmann, D. J., Schnell, J. D., Sutanto, M., Emr, S. D., and Hicke, L. (2002) Epsins and Vps27p/Hrs contain ubiquitin-binding domains that

- function in receptor endocytosis. *Nat. Cell Biol.* 4, 389-393.
- 34) Gavin, A. C., Bosche, M., Krause, R., Grandi, P., Marzioch, M., Bauer, A., Schultz, J., Rick, J. M., Michon, A. M., Cruciat, C. M., Remor, M., Hofert, C., Schelder, M., Brajenovic, M., Ruffner, H., Merino, A., Klein, K., Hudak, M., Dickson, D., Rudi, T., Gnau, V., Bauch, A., Bastuck, S., Huhse, B., Leutwein, C., Heurtier, M. A., Copley, R. R., Edelmann, A., Querfurth, E., Rybin, V., Drewes, G., Raida, M., Bouwmeester, T., Bork, P., Seraphin, B., Kuster, B., Neubauer, G., and Superti-Furga, G. (2002) Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature* 415, 141-147.
- 35) Katzmann, D. J., Stefan, C. J., Babst, M., and Emr, S. D. (2003) Vps27 recruits ESCRT machinery to endosomes during MVB sorting. *J. Cell Biol.* 162, 413-423.
- 36) Odorizzi, G., Cowles, C. R., and Emr, S. D. (1998) The AP-3 complex: a coat of many colours. *Trends Cell Biol.* 8, 282-288.
- 37) Smythe E, Ayscough KR. (2003) The Ark1/Prk1 family of protein kinases. Regulators of endocytosis and the actin skeleton. *EMBO Rep.* 4(3), 246-251.
- 38) Watson, H. A., Cope, M. J., Groen, A. C., Drubin, D. G., and Wendland, B. (2001) In vivo role for actin-regulating kinases in endocytosis and yeast epsin phosphorylation. *Mol. Biol. Cell* 12, 3668-3679.
- 39) Gourlay, C. W., Dewar, H., Warren, D. T., Costa, R., Satish, N., and Ayscough, K. R. (2003) An interaction between Sla1p and Sla2p plays a role in regulating actin dynamics and endocytosis in budding yeast. *J. Cell Sci.* 116, 2551-2564.
- 40) Kaminska, J., Gajewska,

- B., Hopper, A. K., and Zoladek, T. (2002) Rsp5p, a New Link between the Actin Cytoskeleton and Endocytosis in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* 22, 6946–6948.
- 41) Zeng, G., Yu, X., and Cai, M. (2001) Regulation of Yeast Actin Cytoskeleton-Regulatory Complex Pan1p/Sla1p/End3p by Serine/Threonine Kinase Prk1p. *Mol. Biol. Cell* 12, 3759–3772.
- 42) Cheever, M. L., Sato, T. K., de Beer, T., Kutateladze, T. G., Emr, S. D., and Overduin, M. (2001) Phox domain interaction with PtdIns(3)P targets the Vam7 t-SNARE to vacuole membranes. *Nat. Cell Biol.* 3, 613–618.
- 43) Darsow, T., Rieder, S.E. and Emr, S.D. (1997) A multispecificity syntaxin homologue, Vam3p, essential for autophagic and biosynthetic protein transport to the vacuole. *J. Cell Biol.*, 138, 517–529
- 44) Wichmann, H., Hengst, L. and Gallwitz, D. (1992) Endocytosis in yeast: evidence for the involvement of a small GTP-binding protein (Ypt7p). *Cell*, 71, 1131–1142
- 45) Hoshikawa, C., Shichiri, M., Nakamori, S., and Takagi, H. (2003) A nonconserved Ala401 in the yeast Rsp5 ubiquitin ligase is involved in degradation of Gap1 permease and stress-induced abnormal proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 100, 11505–11510.
- 46) Dupre, S., Volland, C., and Haguenaer-Tsapis, R. (2001) Membrane transport: ubiquitylation in endosomal sorting. *Curr. Biol.* 11, R932–934.
- 47) Jennifer E. Garrus, Uta K. von Schwedler, Owen W. Pornillos, Scott G. Morham, Kenton H. Zavitz, Hubert E. Wang, Daniel A. Wettstein, Kirsten M. Stray, Mélanie Côté, Rebecca L. Rich *et al.* (2001) Tsg101 and the Vacuolar

Protein Sorting Pathway Are Essential for HIV-1 Budding. *Cell* 107, 55-65.

48) Juan Martin-Serrano, Trinity Zang, Paul D. Bieniasz. (2001) HIV-1 and Ebola virus encode small peptide motifs that recruit Tsg101 to sites of particle assembly to facilitate egress. *Nat. Med.* 7, 1313-1319.

49) Lynn VerPlank, Fadila Bouamr, Tracy J. LaGrassa, Beth Agresta, Alexandra Kikonyogo, Jonathan Leis, and Carol A. Carter. (2001) Tsg101, a homologue of ubiquitin-conjugating (E2) enzymes, binds the L domain in HIV type 1 Pr55^{Gag}. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98, 7724-7729.

D. 研究発表

1. 論文発表

なし。

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 Frel 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.

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 Frel 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.

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.

E. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

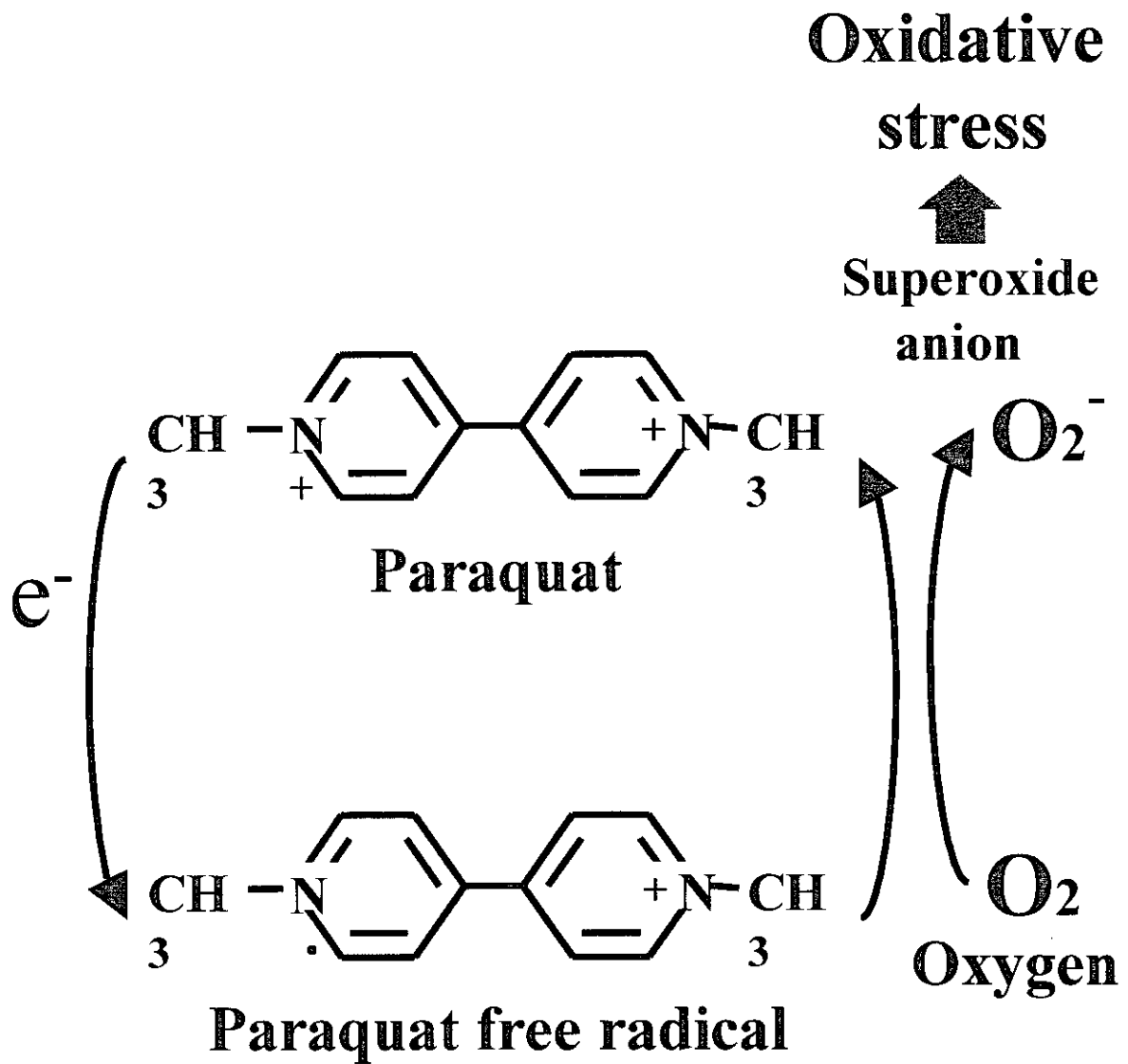
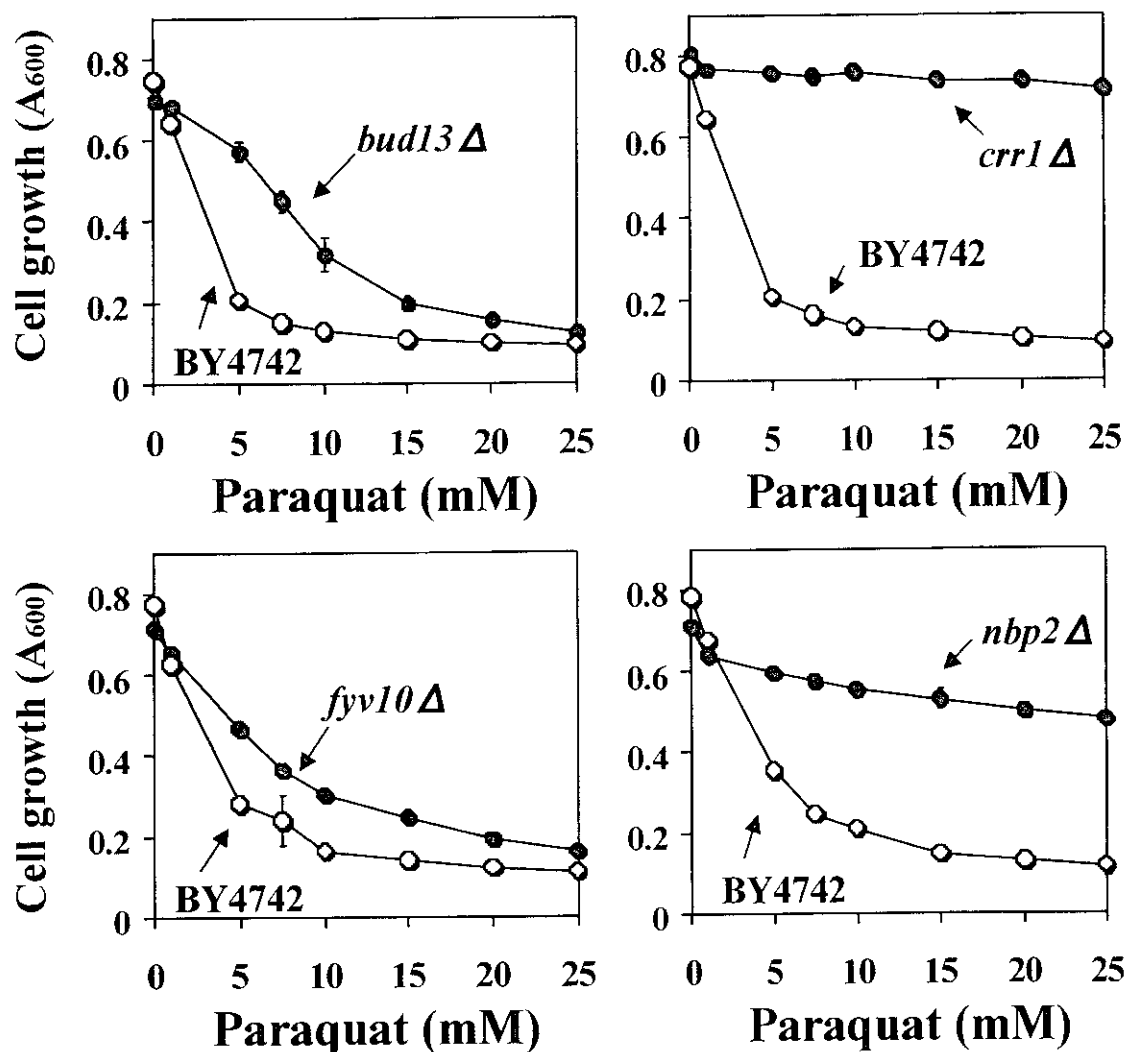


Fig. 1 The mechanism for paraquat toxicity



BUD13 : Protein that may be involved in bipolar and bud site selection

CRR1 : Sporulation specific protein with similarity to Crt1p cell wall protein

FYV10 : Protein involved in the degradation of fructose-1,6-bisphosphatase (FBPase)

NBP2 : Nap1p-binding protein involved in cell wall integrity and mitosis elevated temperatures

Fig. 2 Sensitivity of *BUD13*, *CRR1*, *FYV10* or *NBP2* deletion mutant to paraquat

● : Deletion mutant of yeast cell

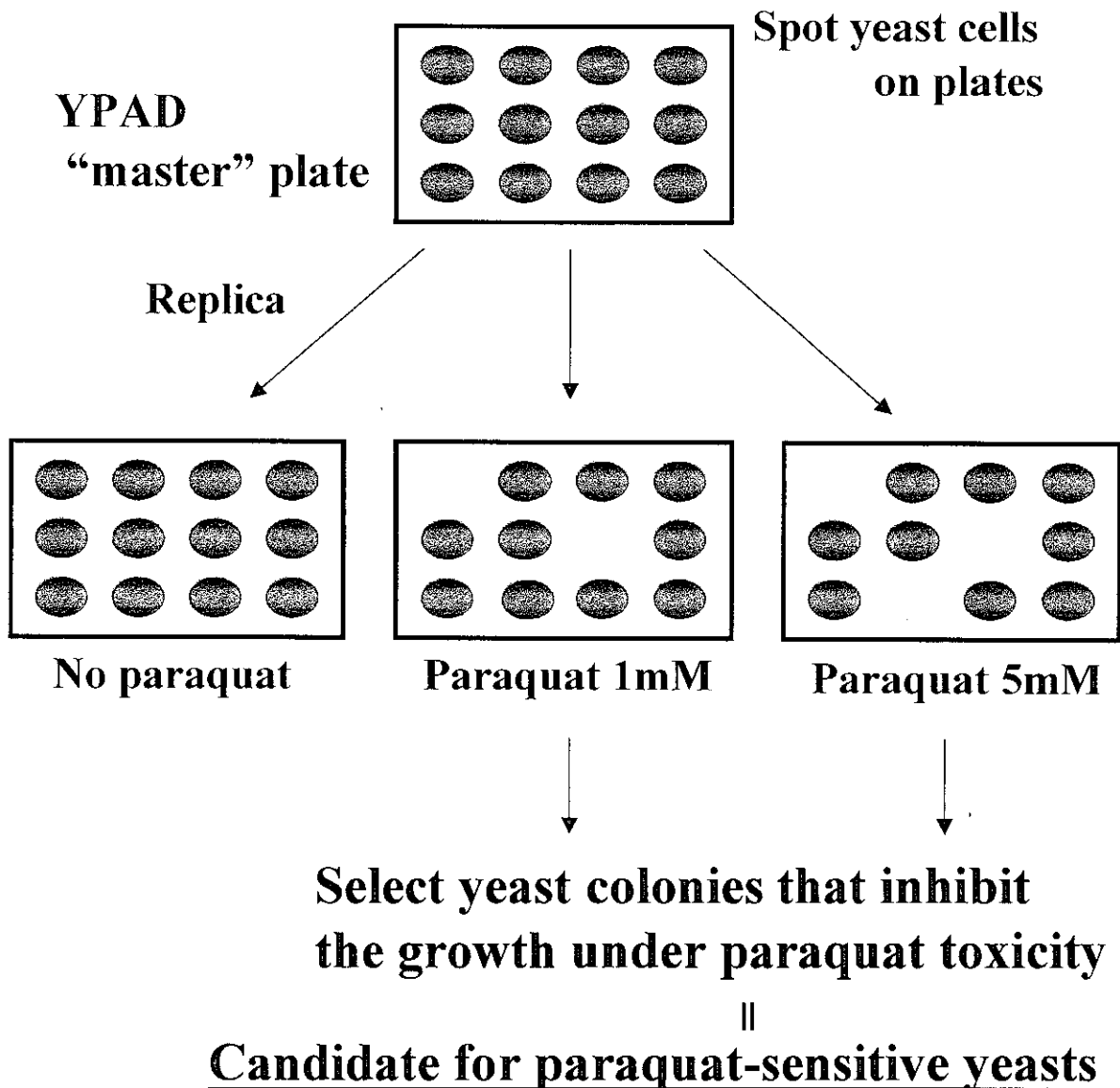


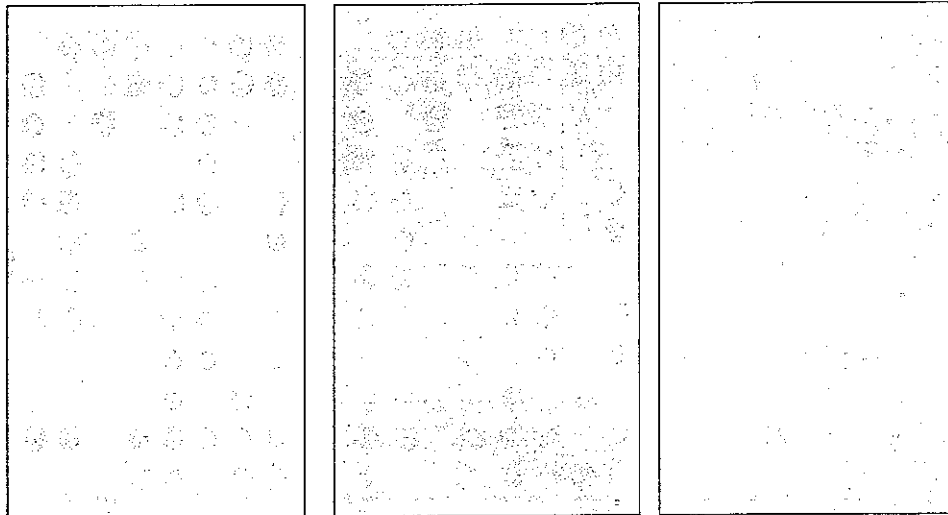
Fig. 3 Screening for paraquat-sensitive yeasts with replica-printing method

0 h

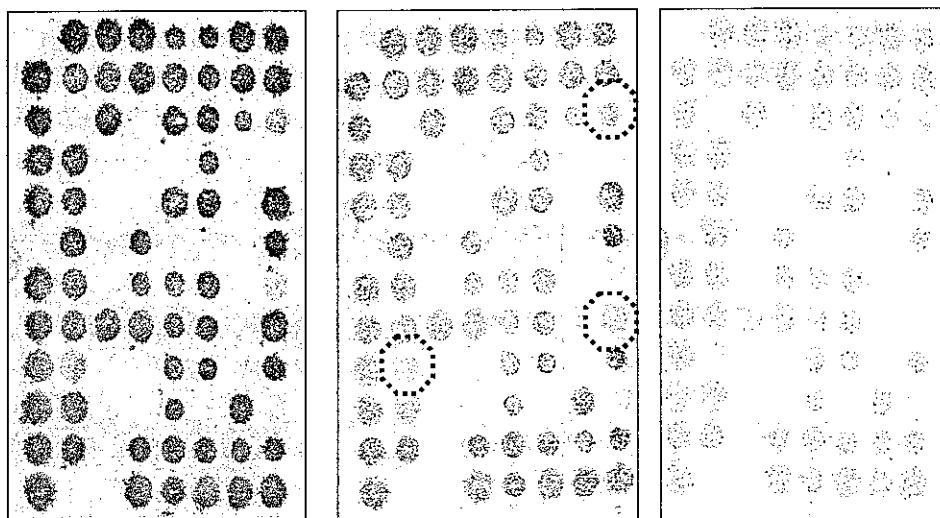
No paraquat

Paraquat 1mM

Paraquat 5mM

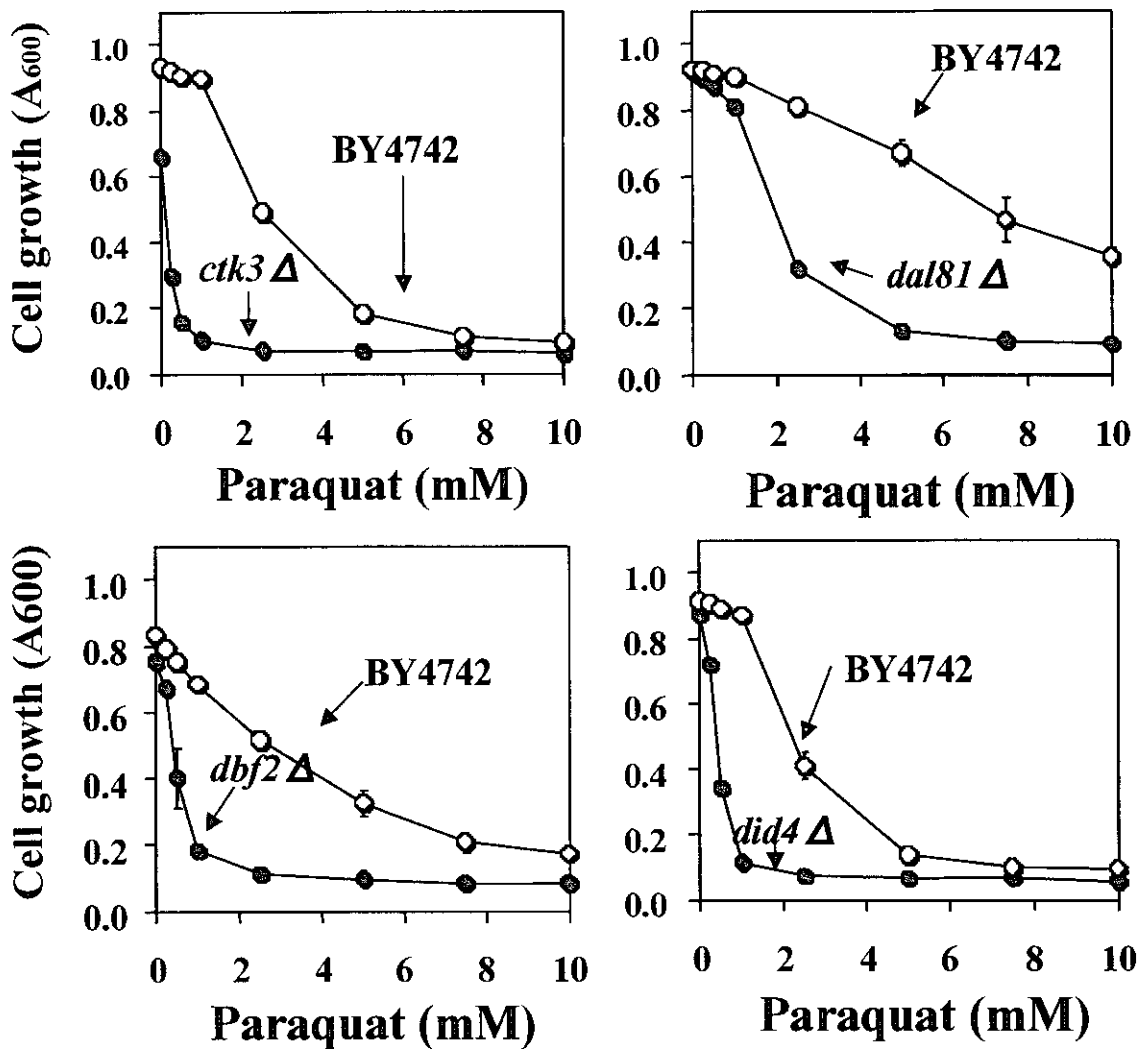


48 h



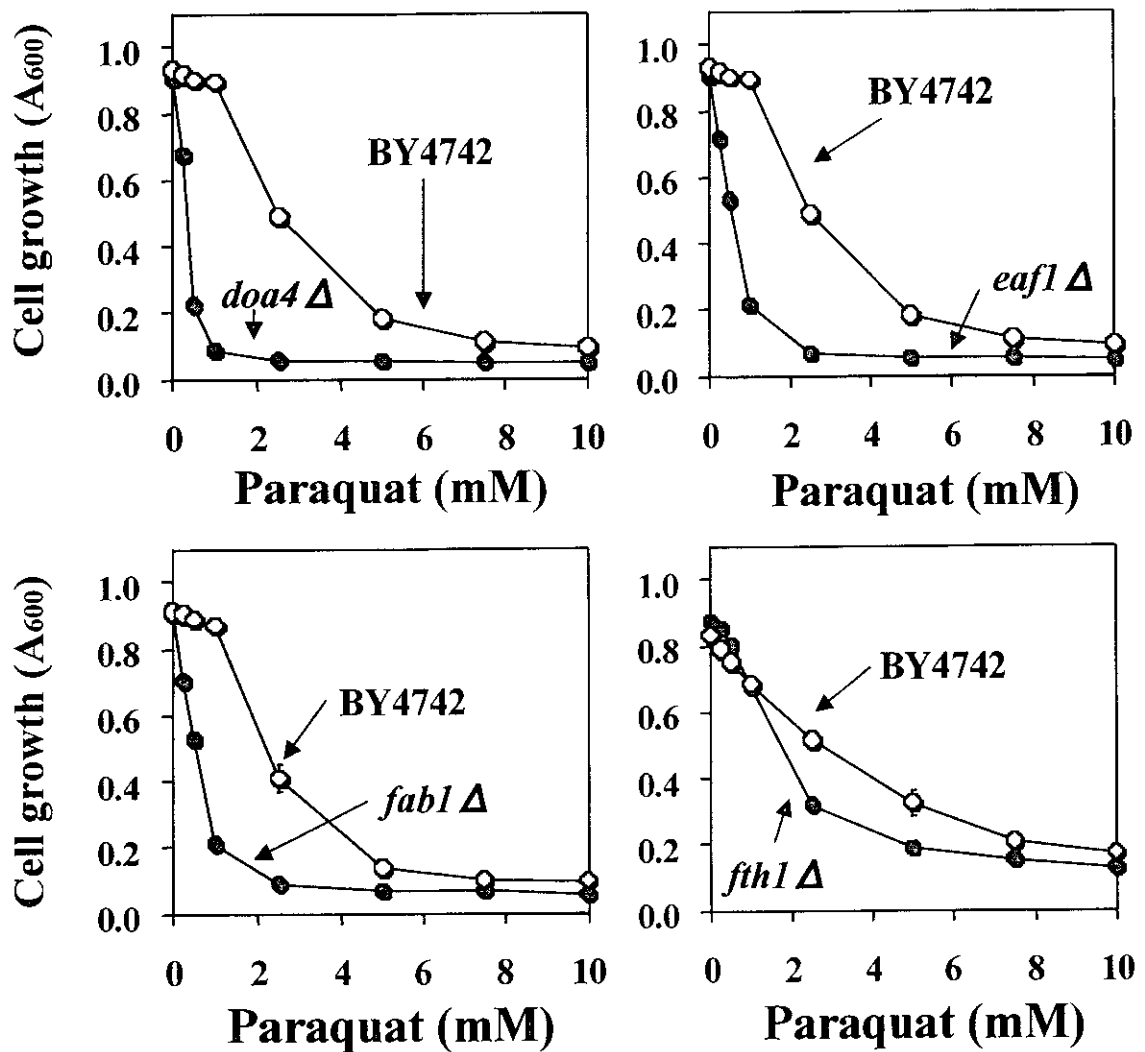
○ : Candidate for paraquat-sensitive yeast

Fig.4 Replica prints of yeast



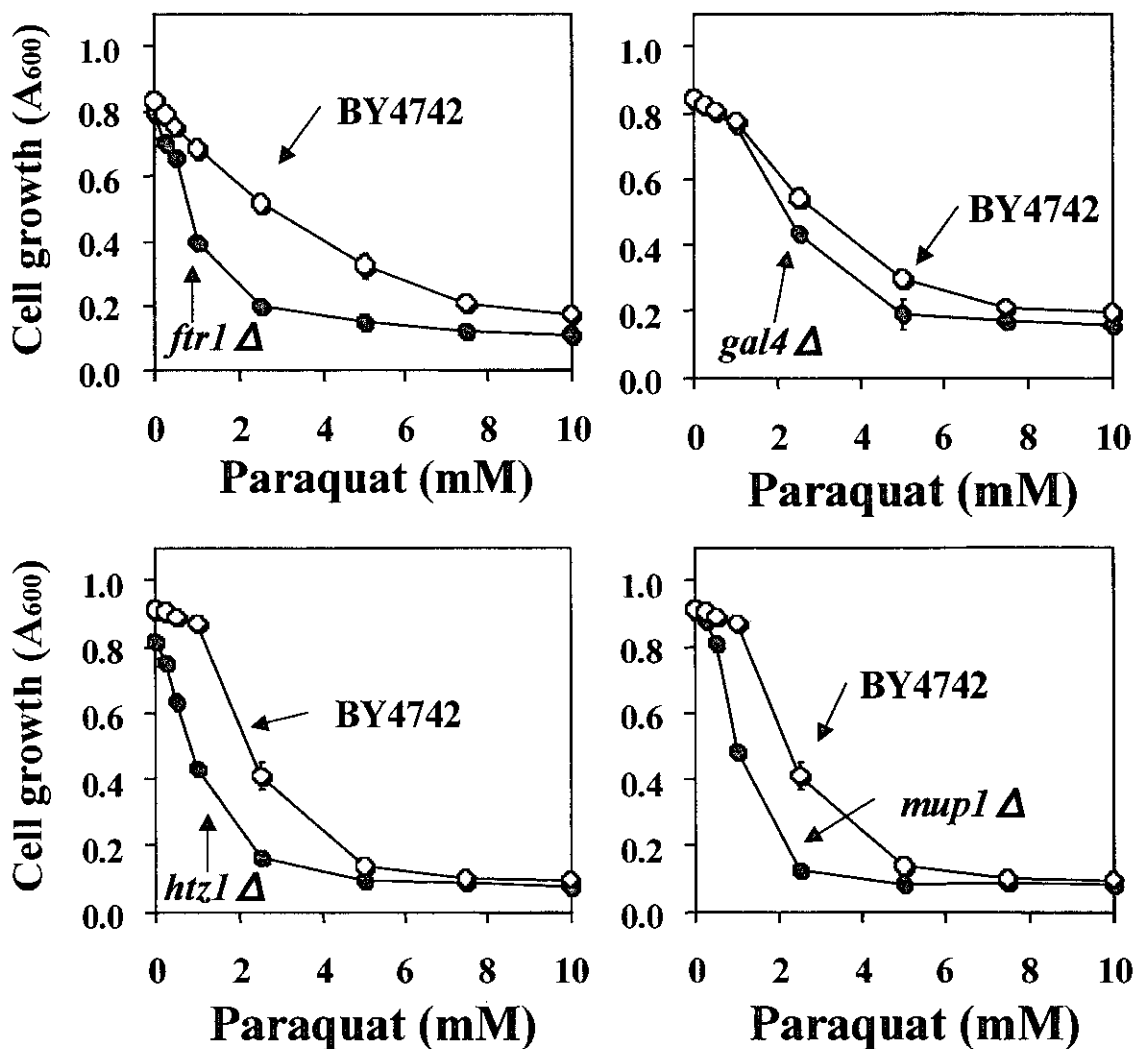
CTK3 : C-terminal domain (RNA-polymerase II CTD) kinase gamma subunit
DAL81 : Transcriptional activator for allantoin, GABA, and urea catabolic genes
DBF2 : Serine/threonine protein kinase
DID4 : Vps factor involved in endosome to vacuole transport, component of ESCRT-III complex

Fig. 5-1 Sensitivity of *CTK3*, *DAL81*, *DBF2* or *DID4* deletion mutant to paraquat



DOA4 : Ubiquitin-specific protease, involved in recycling ubiquitin from the proteasome and the vacuole
EAF1 : unknown function
FAB1 : Phosphatidylinositol-3-phosphate 5-kinase
FTH1 : Vacuolar iron transporter with similarity to Ftr1

Fig. 5-2 Sensitivity of *DOA4*, *EAF1*, *FAB1*, or *FTH1* deletion mutant to paraquat



FTR1 : Iron permease that mediates high-affinity iron uptake
GAL4 : Transcription factor involved in expression of galactose-induced genes
HTZ1 : Histone-related protein, involved in silencing, required for GAL gene induction
MUP1 : High-affinity methionine permease

Fig. 5-3 Sensitivity of *FTR1*, *GAL4*, *HTZ1*, or *MUP1* deletion mutant to paraquat