

buffer を加えて、SDS-PAGE (12.5%) を行った。泳動終了後、セミドライ型 blotting 装置を用いて immobilon-P membrane (Millipore) に blotting した。この membrane を blocking solution (5% skin milk, TTBS:20 mM Tris-HCl (pH7.5), 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20) に浸して blocking した後、1 次抗体液に一晩浸した。その後、HRP 標識化 2 次抗体液に 2 時間浸し、さらに、ECL reagent (Amersham Pharmacia Biotech) を用いて化学発光させ、film に露光して検出した。1 次抗体には multiubiquitin specific antibody (MBL)、2 次抗体には horseradish peroxidase conjugated anti-mouse IgG (Cappel) を用いた。

(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. Bop1、Bop2 高発現によるメチル水銀感受性に対する影響および Bop3 高発現によるメチル水銀耐性に対する Pam1 の関与に関する検討

Bop3 は Pam1 という機能未知である蛋白質の multicopy suppressor として同定されてきた因子である。そこで、本研究では Bop3 のメチル水銀耐性機構への Pam1 の関与を検討するために、Bop3 と同様に Pam1 の multicopy suppressor として同定されている Bop1 および Bop2 についてその高発現酵母を作製し、メチル水銀に対する感受性を検討した。現在のところ Bop1、Bop2 は Bop3 と同じようにその機能は未知である。

その結果、Bop1 高発現酵母のメチル水銀に対する感受性は比較対照酵母である pKT10 のみを導入した酵母 (pKT10/W303B) とほとんど差が認められなかったが、Bop2 および Bop3 高発現酵母は pKT10/W303B に比べ耐性を示した (Fig. 2)。

次に Bop3 高発現によるメチル水銀耐性に対する Pam1 自体の関与を検討した。Pam1 は前述したように機能は未知であるが Protein serine/threonine phosphatase 2A (PP2A) 欠損に対する multicopy suppressor として同定された因子である。まず、*PAM1* 欠損株 (*pam1*Δ) を作製し、そのメチル水銀への感受性を検討した。その結果、*pam1*Δ は比較対照株である W303B とメチル水銀に対する感受性はほとんど差がなかった (Fig. 3-a)。そこで次に、

*pam1*Δに Bop3 を高発現させた株を作製 (*BOP3/pam1*Δ) し、メチル水銀耐性への影響を検討した。その結果、*BOP3/pam1*Δは比較対照である *BOP3/W303B* 株とほぼ同じ耐性を示した (Fig. 3-b)。

もし、Pam1 が Bop3 高発現によるメチル水銀耐性機構に関与があるとするのならば Bop1 高発現酵母も Bop2 や Bop3 高発現酵母と同じようにメチル水銀耐性を示す可能性が高い。また、*BOP3/pam1*Δにおいては *BOP3/W303B* に比べメチル水銀耐性の消失もしくは減弱や増強などの差がみられるはずである。しかし、両者ともこの仮定とは異なる結果であることより Pam1 は Bop3 のメチル水銀耐性獲得機構には必要ではない可能性が高いと考えられる。

## 2. Bop3 の機能 domain 解析

### 2-1 Bop3 と Bmh1、Bmh2、Fkh1 および Rts1 との結合の確認

まず始めに、Bop3 とその結合蛋白質として同定されている Bmh2、Fkh1 および Rts1 との結合を yeast two-hybrid system における蛋白質結合実験を用いて検討した。本実験では Bmh2 に高い相同性を持つ Bmh1 も含めて検討した。その結果、Fig. 4-a では SD (-*trp-leu-his*) の

寒天培地で、*BMH2* と *BOP3* を導入した酵母のみ生育してきたことより、以前に報告されていた通りに Bmh2 と Bop3 が結合することが確認された。しかしながら、Bmh1 との結合は認められなかった。

### 2-2 メチル水銀耐性獲得に必要とされる領域およびそれぞれの結合蛋白質との結合に必要とされる領域の解析

Bop3 とその結合蛋白質の結合が Fig. 4 で確認された。そこで次に、Bop3 の機能 domain としてメチル水銀耐性に必要な領域とそれぞれの結合蛋白質の結合に必要な領域を検索するために、Bop3 のいくつかの部分欠損型 mutant を作製 (B1~B5、Fig. 5-a 参照) した。まずこれらの mutant を酵母に高発現させてメチル水銀感受性への影響を検討した。比較対照には pRS425 および *BOP3* を高発現させた酵母を用いた。その結果、B1/W303B では pRS425/W303B とほとんど差がなく、高発現によるメチル水銀耐性がみられなかった (Fig. 5-b)。また、B2、B3、B4、B5 を高発現した酵母でも *BOP3/W303B* に比べるとその耐性の強さに低下がみられた。したがって、Bop3 高発現によるメチル水銀耐性にはすべての領域が関与していると考えられ、特に

B2 で欠損した N 末端領域が Bop3 高発現によるメチル水銀耐性には必須の領域であると考えられる。

」

### 3. Bmh1 および Bmh2 の Bop3 高発現によるメチル水銀耐性獲得機構における関与に関する検討

#### 3-1. Bmh1 および Bmh2 高発現酵母のメチル水銀に対する感受性への影響および Bmh1 および Bmh2 欠損酵母の Bop3 高発現によるメチル水銀耐性に対する影響

Bmh1 および Bmh2 は mammalian の 14-3-3 蛋白質の出芽酵母における homologue である。14-3-3 蛋白質はすべての真核生物でよく保存されていて、p53 に結合して apoptosis を制御する機能や Cdc2-CycB complex に結合して cell cycle を制御する機能など、細胞内で多彩な役割を果たしていることが知られている。また Bmh1 および Bmh2 も酵母での RAS/MAPK cascade signalling に関与していることが報告されている。まず始めに本研究では、この Bop3 結合蛋白質として以前から知られている Bmh2 またはその相同因子である Bmh1 高発現によるメチル水銀に対する感受性を検討した。

その結果、Bmh1、Bmh2 高発現酵母は比較対照である pKT10 のみを

導入した酵母と比べてメチル水銀に対して耐性を示した (Fig. 7-a)。しかしながらこの耐性の強さは実験に用いたコロニー間で差がみられ、耐性を与えないコロニーも存在した。以前の報告より Bmh1 および Bmh2 高発現酵母は growth が抑制されることが明らかにされていて、これらコロニー間における耐性度の違いは酵母内での Bmh 蛋白質の発現量の違いによるものではないかと考えた。そこで複数の Bmh2 高発現酵母のコロニーを用いて、それぞれのコロニーでの Bmh2 の発現量を定量 PCR により比較検討した結果、メチル水銀へ耐性を示すコロニーはコントロールに比べ発現量が 3~4 倍であるのに対し、メチル水銀に耐性を示さないコロニーはコントロールに比べその発現量は 7~8 倍 (Fig. 8) にも達していることがわかった。したがって、コロニー間により耐性に差がみられるのは、酵母細胞内で Bmh2 がより高レベルで発現しているコロニーの増殖が過度に抑制され、メチル水銀に対する耐性がみられなくなった結果と考えられる。等しい発現 vector を使用しているにもかかわらず、このように発現量に差がみられる理由は不明である。しかし、酵母に Bmh1 および Bmh2 を適当なレベルで高発現させるとメチル水銀に

対して耐性を与えることが明らかになった。

次に Bop3 のメチル水銀耐性獲得機構に Bmh2 との interaction が関与している可能性を検討する目的で、*BMH2* 欠損酵母に *BOP3* を導入 (*BOP3/bmh2*Δ) し、メチル水銀に対する感受性を検討した。なお、比較対照には W303B に *BOP3* を導入した株 (*BOP3/W303B*) を用いた。その結果、*BOP3/bmh2*Δ のメチル水銀に対する感受性は *BOP3/W303B* とほとんど差は認められなかった (Fig. 9)。また、*BMH1* 欠損酵母においても同様の結果が得られた (Fig.9)。

もし、Bmh2 および Bmh1 が Bop3 のメチル水銀に対する耐性獲得機構に関与しているのならば、*BOP3/bmh2* Δ 株 または *BOP3/bmh1* Δ 株では耐性が認められなくなるはずであるが、*BOP3/W303B* と同様の耐性を示すことより、Bmh2 および Bmh1 と Bop3 の interaction は Bop3 高発現が与えるメチル水銀耐性獲得には必要でない可能性が高い。しかし、Bmh2 と Bmh1 はそれぞれがヘテロダイマーやホモダイマーを形成し、標的因子のリン酸化を引き金としてその標的蛋白質に結合することでそれらの活性を調節していることが知

られている (Fig. 7-b)。Bop3 との結合が知られているのは現在のところ Bmh2 のみであり、そのことは yeast two-hybrid 系を用いた結合実験 (Fig. 4-a) においても確認されているが、Bmh2 と Bmh1 は 93% という高い相同性を有していることから考えると、Bmh2 が欠損している状況では Bmh1 がその機能を相補している可能性も考えられる。そこで、*BMH1* と *BMH2* の両遺伝子の欠損酵母の作製を検討したが、これら両遺伝子を同時に欠損させると酵母が生存できなくなることより、この検討は断念せざるを得なかった。そこで、Bmh1 および Bmh2 が Bop3 のメチル水銀耐性へ関与している可能性をさらに検討するために Bmh1 および Bmh2 の結合蛋白質を data base より検索した。

### 3-2. Msn2 および Msn4 高発現酵母のメチル水銀感受性

3-1 で示したように Bmh1 および Bmh2 の結合蛋白質を検索した結果、現在知られているいくつかの結合蛋白質の中では、メチル水銀感受性に影響を与える可能性が高い因子として、酸化ストレスや浸透圧の変化、ヒートショック、栄養不足などの様々なストレスに対して応答することが知られている Msn2 および Msn4 と

いう転写因子が第一候補として挙げられる。

そこで、Bop3 のメチル水銀耐性機構は Bmh2 を介した両転写因子の局在を制御することにより得られるものではないかという仮定をし、これらの高発現酵母 (*MSN2/W303B*, *MSN4/W303B*) を作製し、メチル水銀に対する感受性を検討した。その結果、*MSN2/W303B* が比較対照である pKT10 のみを導入した酵母よりもメチル水銀に高い感受性を示した。一方、*MSN4/W303B* はほとんど差がみられなかった (Fig. 10-a)。Msn2 は Cys2His2 Zn-finger 型の転写因子で前述したような様々なストレスに対して、核に移行し、標的遺伝子のプロモーター上に存在する STRE (stress response element) に結合してその転写を活性化する。したがって、Msn2 高発現が与えるメチル水銀に対する高感受性は、Msn2 により転写活性が促進され、発現量が増加した標的因子がメチル水銀の毒性を増強している可能性が考えられ、その因子がメチル水銀の標的因子である可能性も十分考えられる。したがって、Bop3 高発現によるメチル水銀耐性は Bop3 が細胞質で Bmh2 を介して Bop3-Bmh2-Msn2 という complex を形成して Msn2 の核移行を阻害する (Fig. 10-b) ことで獲得

される可能性が考えられる。

### 3-3. メチル水銀が Msn2 の細胞内分布に与える影響

Msn2 がメチル水銀ストレスに应答し、核に移行するのではないかという可能性を検討するために、蛍光蛋白質である green fluorescent protein (GFP) を融合させた Msn2 (GFP-Msn2) を作製し、メチル水銀添加時の GFP-Msn2 の局在を観察した。比較対照には以前の報告で Msn2 が核移行を起こすことが知られている NaCl (0.4 M) と MeHgCl (80 nM) の溶媒である SD medium を用いた。その結果、NaCl (0.4 M) 添加 5 min 後に、すでに GFP-Msn2 は核での局在が観察されたが、MeHgCl (80 nM) は SD medium と同様に 30 min 後でも細胞質に存在していた (Fig. 11)。以前の報告では Msn2 のストレス応答は非常に素早く行われることが知られていることから考えても、少なくとも GFP-Msn2 を用いたこの実験系では Msn2 がメチル水銀添加により核移行することは認められなかった。また、Msn2 の遺伝子と Msn4 の遺伝子の二重欠損株に Bop3 を高発現させた株を作製 (*BOP3/msn2msn4*  $\Delta$ ) し、メチル水銀への感受性を検討してみたが、比較対照の *BOP3/W303B* 株とほと

んど同じ耐性を示した (Fig. 10-c)。

したがって、これらの結果からは Bop3 のメチル水銀耐性は Msn2 の局在制御により獲得されたものである可能性は低いと考えられる。

#### 3-4. メチル水銀感受性に対する Rtg3 欠損の影響

さらにメチル水銀感受性に影響を与える可能性が高いと考えられる Bmh2 の結合蛋白質を data base より検索した。その結果、Rtg3 という bHLH-leucine zipper 構造をもつ転写因子を見出した。Rtg3 は酵母に高発現させると、その核への局在が促進され、酵母が生存できないことが明らかになっている。また、Rtg3 は Bmh1 および Bmh2 と細胞質で結合することで、その局在を制御されることが明らかになっており、Bmh1 および Bmh2 の二重欠損株が生存できない原因の一つは、この Rtg3 を細胞質にとどめる重石の役割をする両蛋白質がないことで、Rtg3 が過剰に核に局在するためではないかと考えられている。メチル水銀存在下で Rtg3 の核局在が促進されていると仮定するならば、Bop3 は Bmh2 が Rtg3 を細胞質にとどめる機能を促進することでメチル水銀耐性を獲得している可能性が考えられる。また、2-2 で Msn2 高発現ではメチル水銀への

高い感受性がみられるにもかかわらず、2-3 で確認されたように GFP-Msn2 はメチル水銀に応答しない。そこで、この Msn2 高発現によるメチル水銀高感受性は Msn2 がメチル水銀存在下で高発現すると Bmh2 と Msn2 の結合が促進され、Rtg3 と Bmh2 との結合が解離し、Rtg3 が過剰に核に局在することが原因である可能性を考えた。そこでまず、Bop3 高発現によるメチル水銀耐性に Rtg3 が必要であるかを検討するために Rtg3 欠損株を作製し、Bop3 を高発現させて (*BOP3/rtg3Δ*)、そのメチル水銀耐性への影響を検討したところ、*BOP3/rtg3Δ* は比較対照の *pRS425/rtg3Δ* に比べメチル水銀耐性を示した (Fig. 12-a)。*rtg3Δ* 自体がメチル水銀に対して高感受性を示したことで *BOP3/W303B* との比較は難しいが、少なくとも Bop3 高発現によるメチル水銀耐性はみられる。したがって、Msn2 高発現で見られるメチル水銀高感受性に Rtg3 が関与している可能性については、さらなる検討の必要があるが、少なくとも Bop3 高発現によるメチル水銀耐性獲得には Rtg3 は必要ではない可能性が高いと言える。

また、Bmh 蛋白質によってその局在が制御されることが知られているこれら 3 つの転写因子が複合的に作

用し、Bop3 高発現によるメチル水銀耐性に関与している可能性も考え、MSN2、MSN4 および RTG3 の三重欠損株 (*msn2msn4rtg3*Δ) を作製し、Bop3 を高発現 (*BOP3/msn2msn4rtg3*Δ) させてそのメチル水銀感受性への影響を検討した。その結果、*BOP3/msn2msn4rtg3*Δ においても Bop3 高発現による耐性がみられた (Fig. 12-b)。

以上の結果より、Bmh2 と Bop3 の interaction が Bop3 高発現によるメチル水銀耐性に関与している可能性は低いと考えられる。

しかしながら、ここで検討した因子にはもう一つの共通点としてすべての因子が抗生物質である Rapamycin により影響を受けることが知られている。Rapamycin はその標的として Tor1、Tor2 という kinase に高い特異性を持っていて、この Rapamycin を用いた研究により TOR (target of rapamycin) pathway の signal 伝達は解明が進められてきた。Bmh 蛋白質の高発現は Rapamycin 耐性を与え、Msn2 および Msn4、Rtg3 は Rapamycin 処理により核移行することがわかっている。これはすべて Rapamycin が TOR kinase に結合し TOR pathway を不活性化することによる。現在までにこの TOR

pathway により制御を受ける因子として明らかになっているものは、Msn2 および Msn4、Rtg3 の他に Gln3 という転写因子が存在する (Fig. 13)。TOR pathway は栄養が欠乏した状況で活性化されるが、この Gln3 は主に N 源の不足時に活性化され、窒素代謝にかかわる因子の転写を促進することが明らかになっている。また、この Gln3 の活性化には suppressor である Ure2 の脱リン酸化のために PP2A 活性が必要であることも知られている。現在までに Gln3 と Bop3 の直接的な関与は明らかになってはいないが、これまでに検討した因子とこの Gln3 が複合的に作用し、Bop3 のメチル水銀耐性に影響を与える可能性も考えられる。したがって、Gln3 についても Bop3 高発現によるメチル水銀耐性への影響を検討する必要があると言える。この Gln3 については現在検討中である。

#### 4. Fkh1 の Bop3 高発現によるメチル水銀耐性獲得機構における関与についての検討

最近、yeast two-hybrid system により Bop3 の結合蛋白質として新たに Fkh1 と Rts1 が同定された。Fkh1 (Forkhead Homologue 1) は forkhead とよばれる winged-helix 型の DNA 結合 domain をもつ

転写因子 family の一つである。Forkhead family の転写因子は初期発生や分化、cell cycle などのさまざまな細胞内応答に関与し、機能していることがわかっている。Fkh1 欠損株では、G<sub>2</sub>/M cyclin を code している *CLB2* の mRNA level が上昇することが報告されていて、そのため cell cycle の調節を介した transcriptional silencing や pseudohyphal growth への関与が示唆されている。また最近、*MATa* 型酵母の mating-type switching を調節する機能も報告されている。

本研究ではまず、この新たに同定された Bop3 結合蛋白質についてその高発現酵母を作製 (*FKH1*/W303B) し、メチル水銀への感受性を検討した。比較対照には pKT10 のみを導入した株 (pKT10/W303B) を用いた。その結果、*FKH1*/W303B のメチル水銀感受性は pKT10/W303B とほとんど差が認められなかった (Fig. 14-a)。したがって、Fkh1 高発現では Bop3 高発現と異なり、酵母のメチル水銀に対する感受性に影響を与えないことがわかった。

次に Fkh1 と Bop3 の interaction が Bop3 のメチル水銀耐性獲得機構に関与している可能性を検討する目的で、*FKH1* 欠損株 (*fkh1*Δ) を作

製し、*BOP3* を導入 (*BOP3/fkh1*Δ) してメチル水銀への感受性を検討した。その結果、*BOP3/fkh1*Δ の感受性は比較対照である *BOP3*/W303B とほとんど差がなかった (Fig. 14-b)。したがって、Bop3 高発現によるメチル水銀耐性獲得機構に Fkh1 は必要でない可能性が高いと考えられる。

しかしながら、ここで pRS425 のみを W303B に導入した株 (pRS425/W303B) と *fkh1*Δ に導入した株 (pRS425/*fkh1*Δ) を比較すると pRS425/*fkh1*Δ もメチル水銀に耐性を示している (Fig. 14-b)。*BOP3/fkh1*Δ のメチル水銀への耐性は前述したように *BOP3*/W303B とほとんど差がない。もし、Fkh1 が Bop3 高発現によるメチル水銀耐性機構にまったく関与しないと、*fkh1*Δ による耐性は別の機構を介するとするならば、多少なりとも耐性が増強される可能性が考えられる。しかし、耐性は *BOP3*/W303B とほとんど差がないことより *FKH1* 欠損による耐性は Bop3 高発現によりあたえられる耐性獲得機構の一部に含まれるか少なくとも部分的には何らかの関与がある可能性が考えられる。

##### 5. *Rts1* の Bop3 高発現によるメチル水銀耐性獲得機構における関与に



## ついでに検討

Rts1 は Fkh1 と同様に、最近新たに Bop3 結合蛋白質として同定された因子である。Rts1 は Protein serine/threonin phosphatase 2A (PP2A) の B' サブユニットの一つである。PP2A は触媒活性をもつ C サブユニット、基質特異性や細胞内での局在を制御していると考えられている B サブユニットと C 末側に C サブユニット、N 末側に B サブユニットを結合しトリマーの構造維持を担う足場蛋白質である A サブユニットの 3 つからなる (Fig. 15-a)。PP2A は酵母からヒトまでよく保存されていて、その活性は DNA replication から transcription, signal transduction, intermediary metabolism にまでおよぶさまざまな細胞内応答に関与している。本研究ではまず、Rts1 高発現酵母を作製 (*RTS1/W303B*) し、メチル水銀に対する感受性を検討した。その結果、*RTS1/W303B* は細胞増殖が抑制され 48 時間後では感受性を示すようにみえるが (Fig. 15-b) 72 時間後では比較対照である pKT10 のみを導入した株とほとんど差がなかった (Fig. 15-b)。したがって、Rts1 高発現では Bop3 高発現と異なり、酵母のメチル水銀に対する感受性に影響を与えないことがわかった。

次に Rts1 と Bop3 の interaction が Bop3 のメチル水銀耐性獲得機構に関与している可能性を検討する目的で、*RTS1* 欠損株 (*rts1 $\Delta$* ) を作製し、*BOP3* を導入 (*BOP3/rts1 $\Delta$* ) してメチル水銀への感受性を検討した。その結果、*BOP3/rts1 $\Delta$*  の感受性は比較対照である *BOP3/W303B* に対し、耐性が增強された (Fig. 15-c)。このことは、Rts1 は Bop3 の耐性獲得機構に必須因子ではないが、何らかの関与がある可能性を示唆している。第二節で検討した Bmh1 および Bmh2 は、標的因子がリン酸化されるのを引き金としてその因子に結合することが知られている。よって、Bop3 はリン酸化蛋白質である可能性が高い。また、Rts1 は PP2A の基質特異性などを決定しているサブユニットであることより、Bop3 が *RTS1* 欠損によりその脱リン酸化を制御されている可能性も考えられる。したがって、*RTS1* 欠損により Bop3 のリン酸化状態が維持され、Bop3 のメチル水銀耐性を增強したのではないかと考えられる。

## 6. Bop3 結合蛋白質 Bmh2、Fkh1、Rts1 の複合的な相互作用が Bop3 高発現によるメチル水銀耐性獲得機構に与える影響

### 6-1. 二重欠損酵母および三重欠損が Bop3 高発現によるメチル水銀耐性に与える影響

これまでに、それぞれの Bop3 結合蛋白質の欠損株を作製し、そのメチル水銀への感受性を検討してきた。しかし、どの結合蛋白質の単独欠損株でも Bop3 高発現による耐性が消失することはなかった。そこで、この 3 つの結合蛋白質の 2 者もしくは 3 者が同時に interaction することが Bop3 の高発現によるメチル水銀耐性へ影響を与えるのではないかという可能性を考え、それぞれの二重欠損株 (*bmh2fkh1*  $\Delta$ 、*bmh2rts1*  $\Delta$ 、*fkh1rts1*  $\Delta$ ) および三重欠損株 (*bmh2fkh1rts1*  $\Delta$ ) を作製し、Bop3 を導入し、メチル水銀への感受性を検討した。その結果、すべての欠損株で Bop3 高発現による耐性がみられた (Fig. 16)。したがって、Bop3 高発現によるメチル水銀耐性獲得機構にはこれら結合蛋白質の interaction は必要ではない可能性が高いと考えられる。しかし、3-1 で述べたように *fkh1*  $\Delta$  (pRS425/*fkh1*  $\Delta$ ) 自体がメチル水銀耐性を示す。また、pRS425/W303 と比較すると pRS425/*bmh2*  $\Delta$  もわずかながらメチル水銀耐性を示していることがわかる (Fig. 9)。しかし、pRS425/*bmh2fkh1*  $\Delta$  ではそれぞれ

の単独欠損株が示すメチル水銀耐性がみられない (Fig. 16)。これは、*Fkh1* と *Bmh2* のそれぞれの欠損株が与えるメチル水銀耐性機構に相互の蛋白質の存在が必要とされている可能性も考えられる。したがって、第四節の検討で *fkh1*  $\Delta$  が与えるメチル水銀耐性機構と Bop3 高発現が与えるメチル水銀耐性機構は何らかの関与がある可能性を示唆したが、ここで新たに *fkh1*  $\Delta$  が与えるメチル水銀耐性機構への *Bmh2* の存在の関与も示唆された。これまでの結果から、現在知られている結合蛋白質が Bop3 高発現によるメチル水銀耐性機構に必要なではない可能性が高いが、この結果よりこれら結合蛋白質が Bop3 のメチル水銀耐性機構に部分的にはあるが関与をもっている可能性も否定できない。

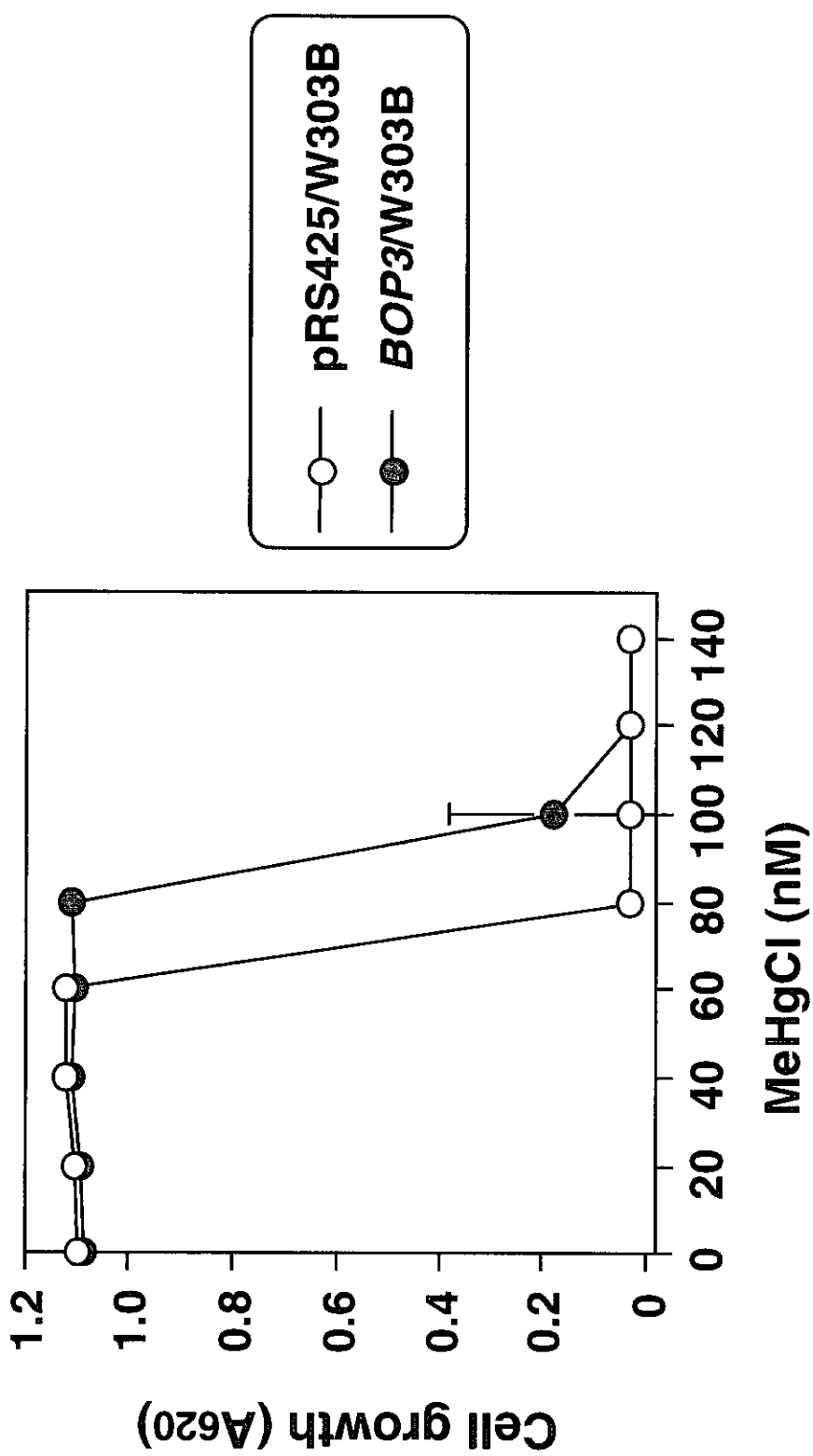
以上本研究では、これまでに同定されている Bop3 結合蛋白質とその関連因子における Bop3 高発現によるメチル水銀耐性への関与を検討してきたが、部分的な関与の可能性は否定できないものの、耐性獲得に必須である因子を見出すには至っていない。そこで Bop3 の周辺因子のさらなる検討が必要であると考えられるが、現在その候補のひとつとして、*CLB2* がコードする CyclinB が挙げられる。*CLB2* と *Fkh1* との関係は

すでに述べたが、この *CLB2* は *RTS1* 欠損に対する multicopy suppressor としても同定されている。また、CyclinB-Cdc28 complex の活性化には PP2A の脱リン酸化活性が必要であること、ヒトの CyclinB-Cdc2 complex が 14-3-3 の結合により制御を受けることから考えて酵母でも CyclinB-Cdc28 complex が Bmh 蛋白質により制御されている可能性が高いことを考えると、*CLB2* のメチ

ル水銀に対する感受性および Bop3 高発現によるメチル水銀耐性への関与を検討する価値は十分あると考える。

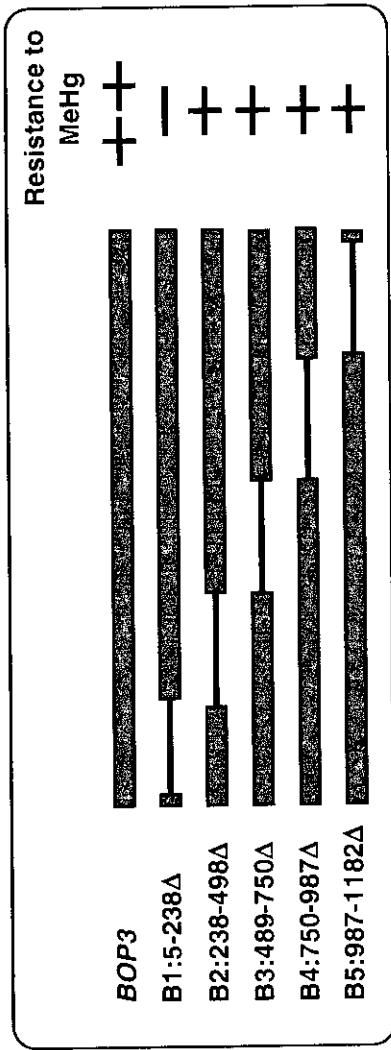
D. 研究発表  
なし、

E. 知的財産権の出願・登録状況  
なし。



**Fig. 1 Sensitivity of yeast cells that overexpressed Bop3 to methylmercuric chloride (MeHg)**

(a)



(b)

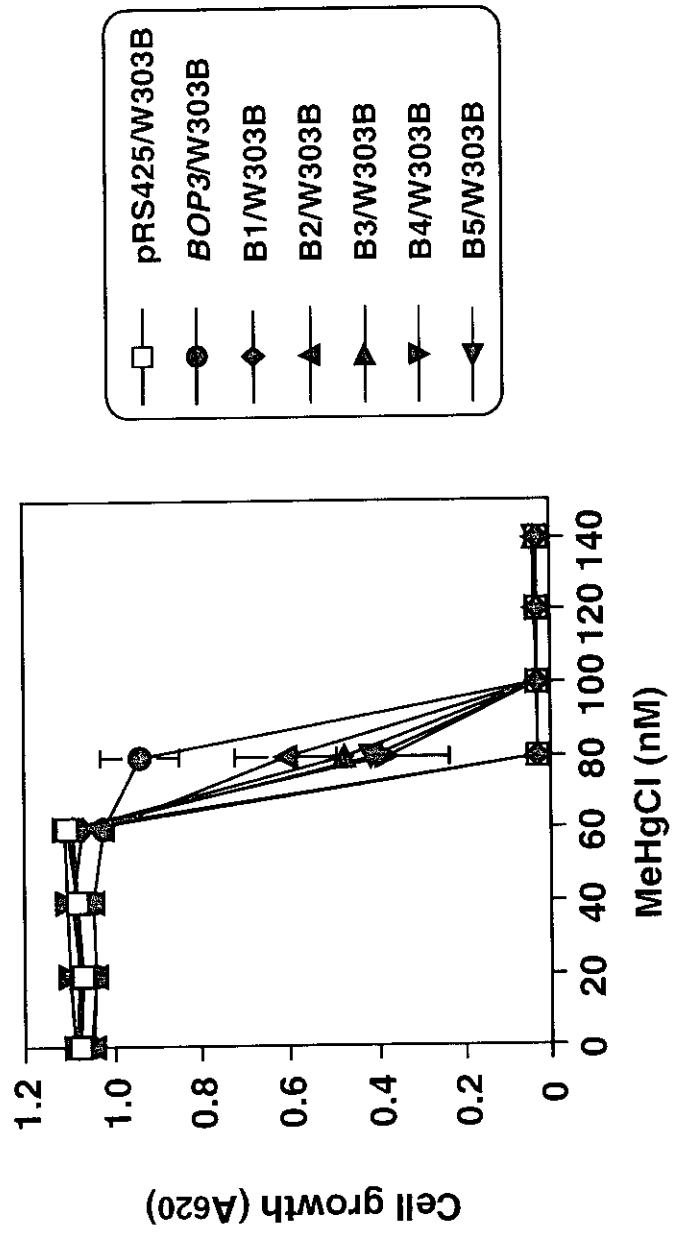


Fig. 2 (a) Schematic representation of the various deletion mutants of BOP3 .  
(b) Sensitivity of those mutants to MeHg.

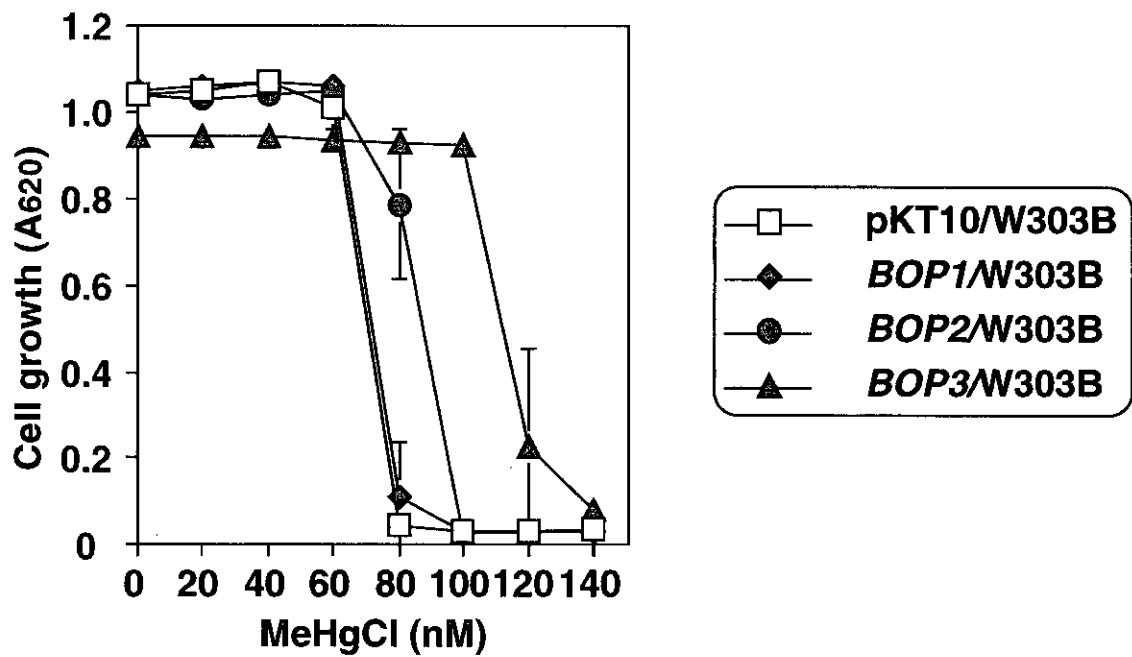


Fig. 3 Sensitivity of cells that overexpressed Bop1 or Bop2 to MeHg

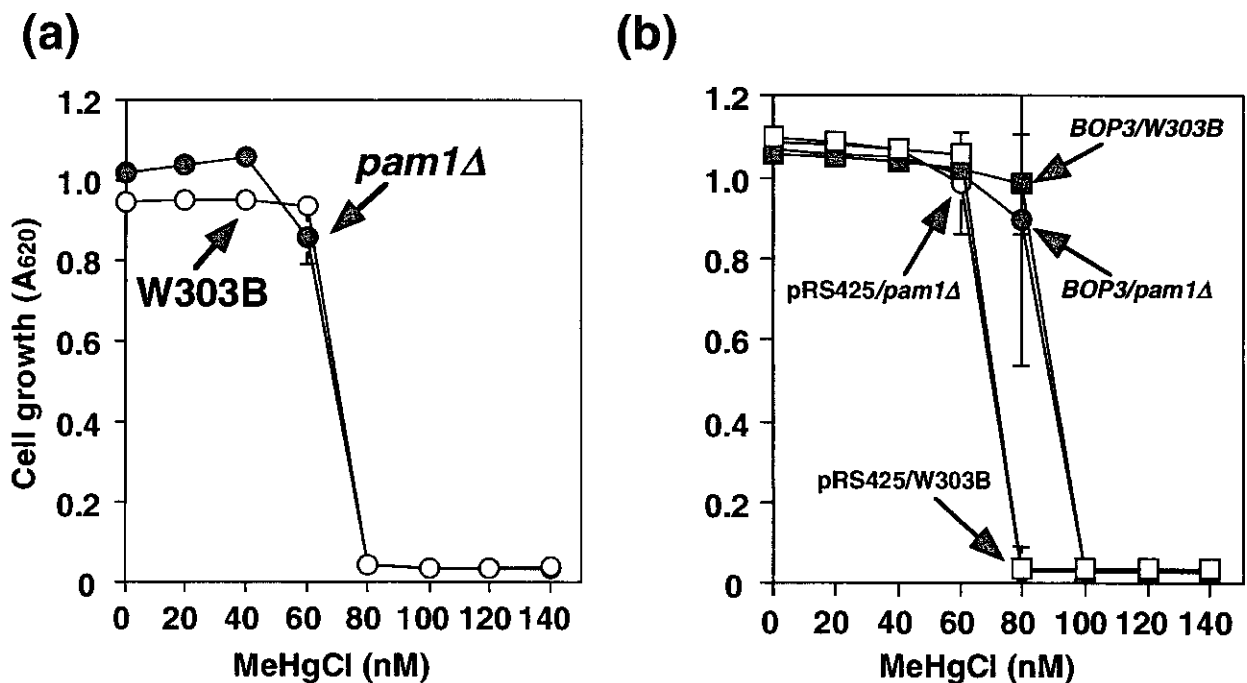
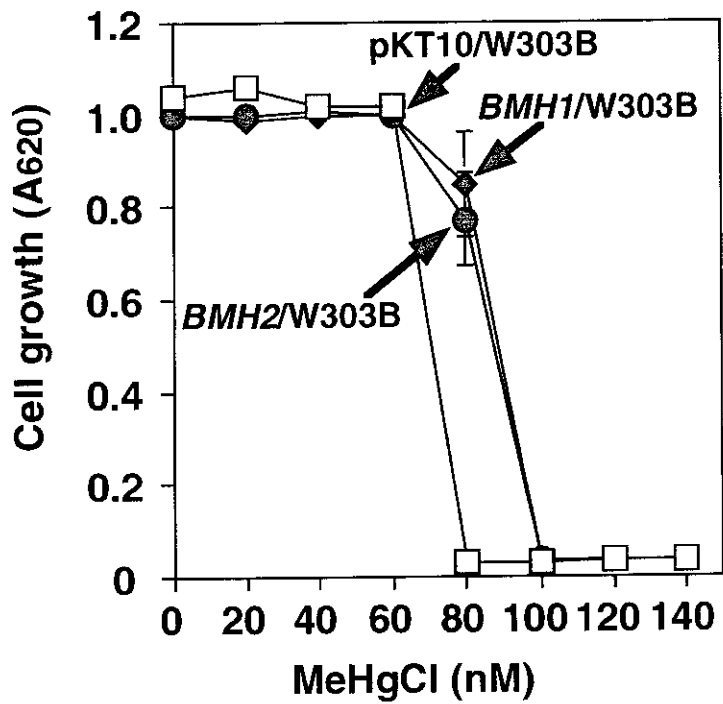


Fig. 4 (a) Sensitivity of *PAM1* deletion mutant strains (*pam1Δ*) to MeHg. (b) Effect of *PAM1* deletion on MeHg-sensitivity of yeast that overexpressed Bop3.

(a)



(b)

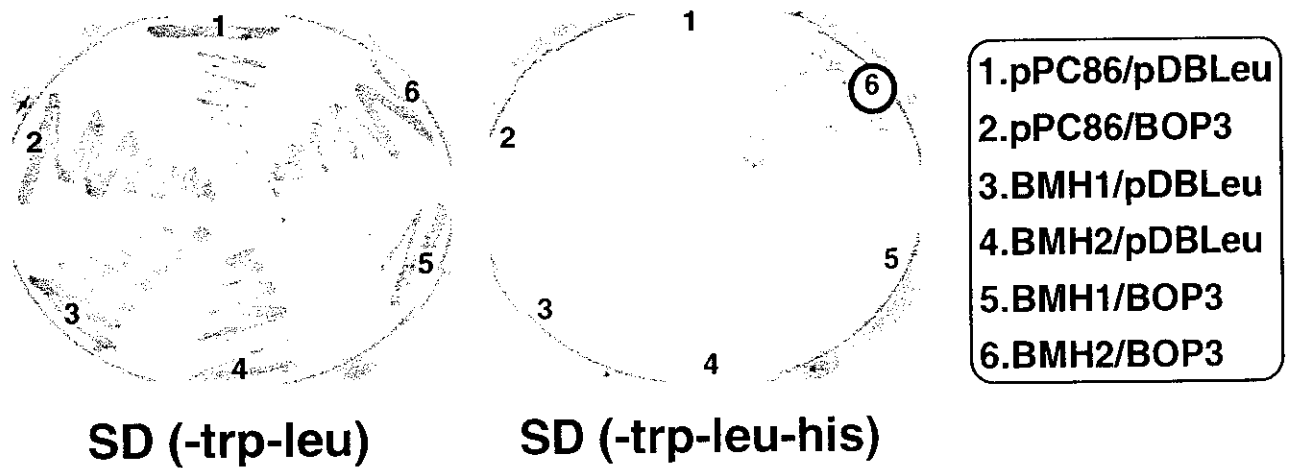


Fig. 5 (a) Sensitivity of cells that overexpressed Bmh1 or Bmh2 to MeHg. (b) Interaction between Bop3 and Bmh2.

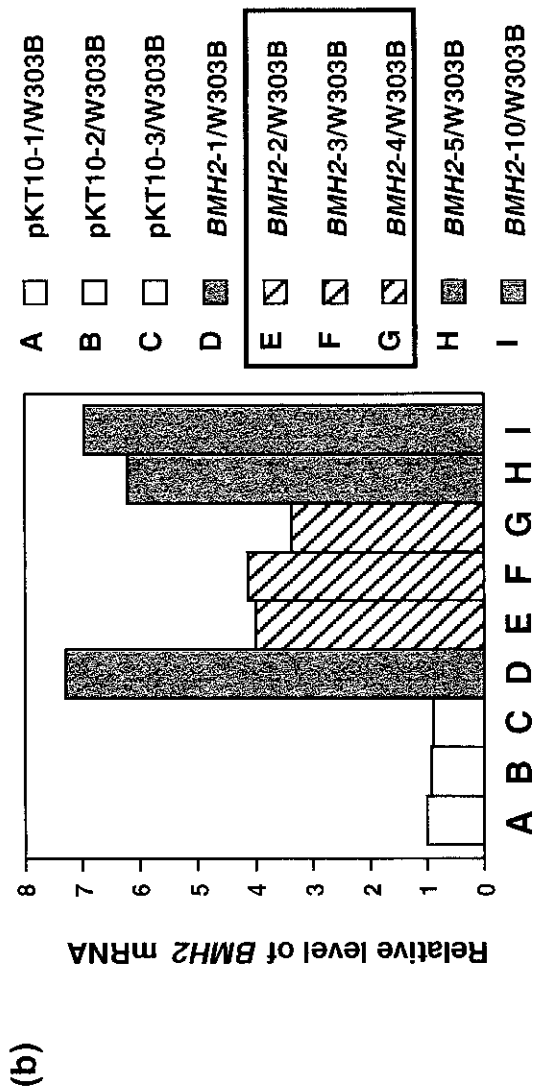
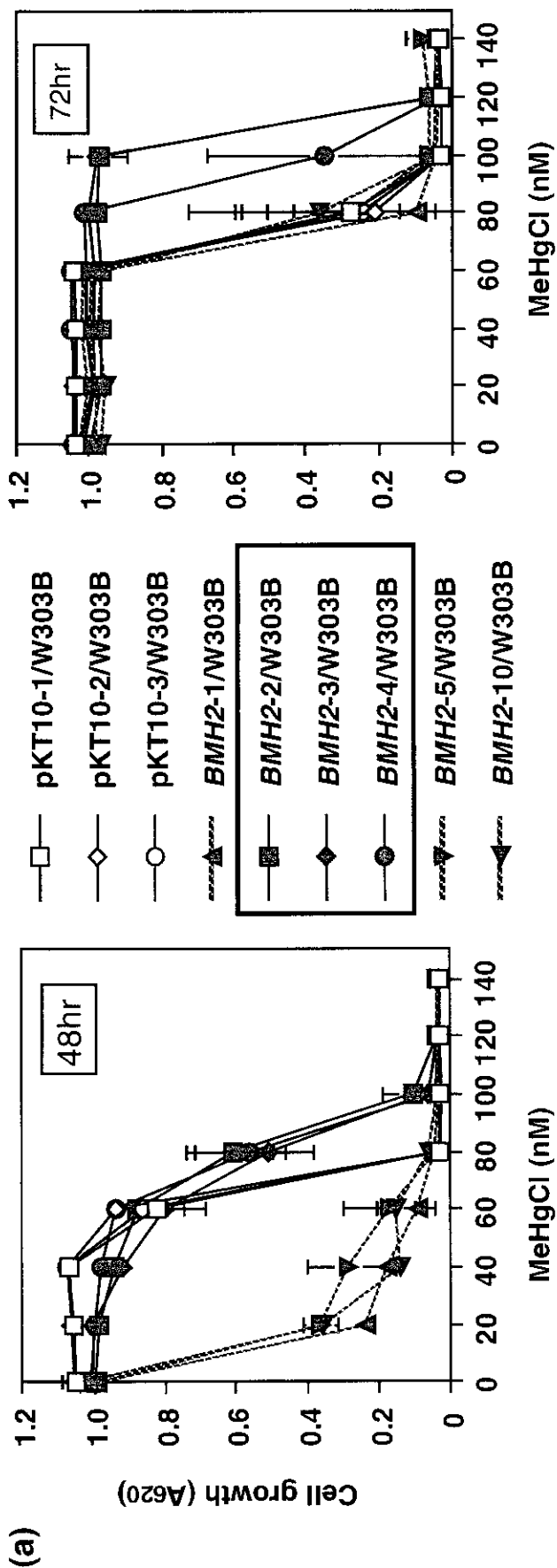
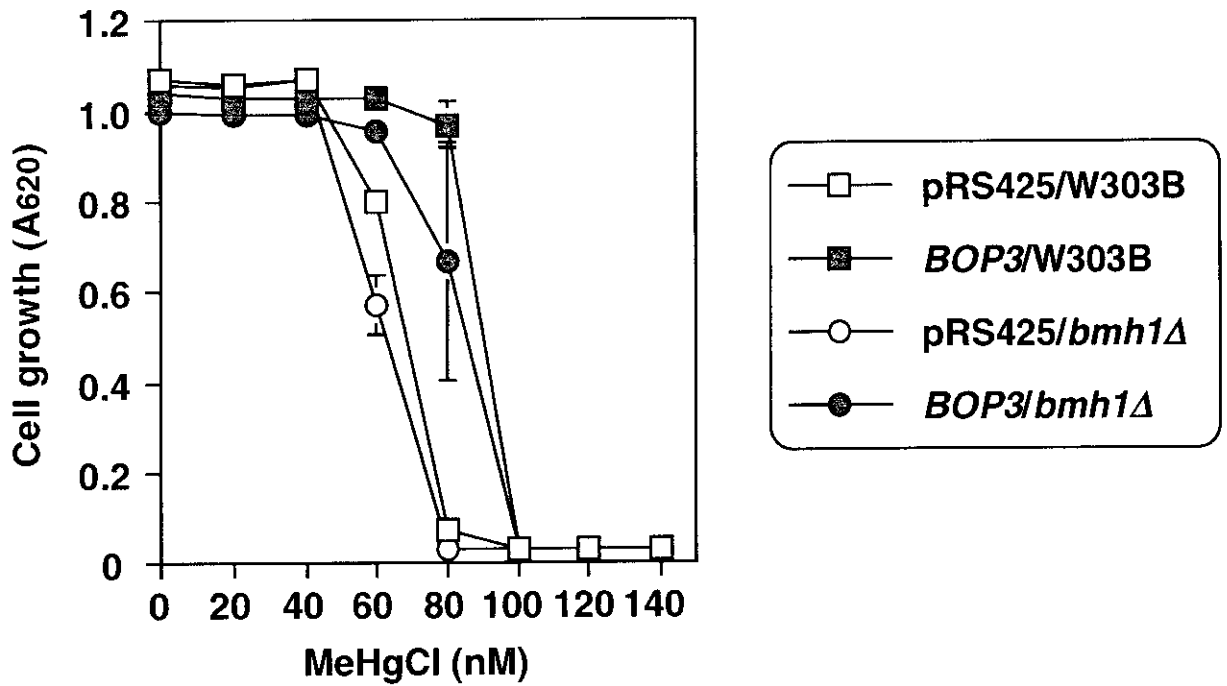


Fig. 6 (a) Sensitivity of several clones that overexpressed *Bmh2* to MeHg. (b) Relative level of *BMH2* mRNA derived from different clones.



(a)



(b)

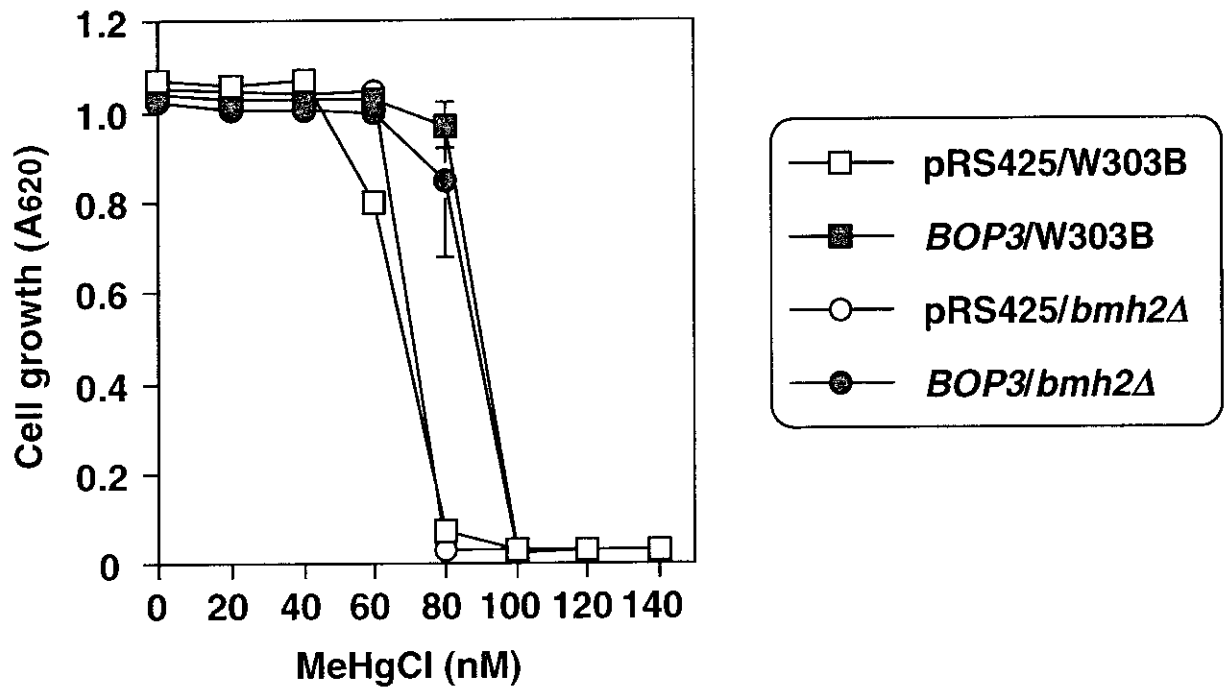
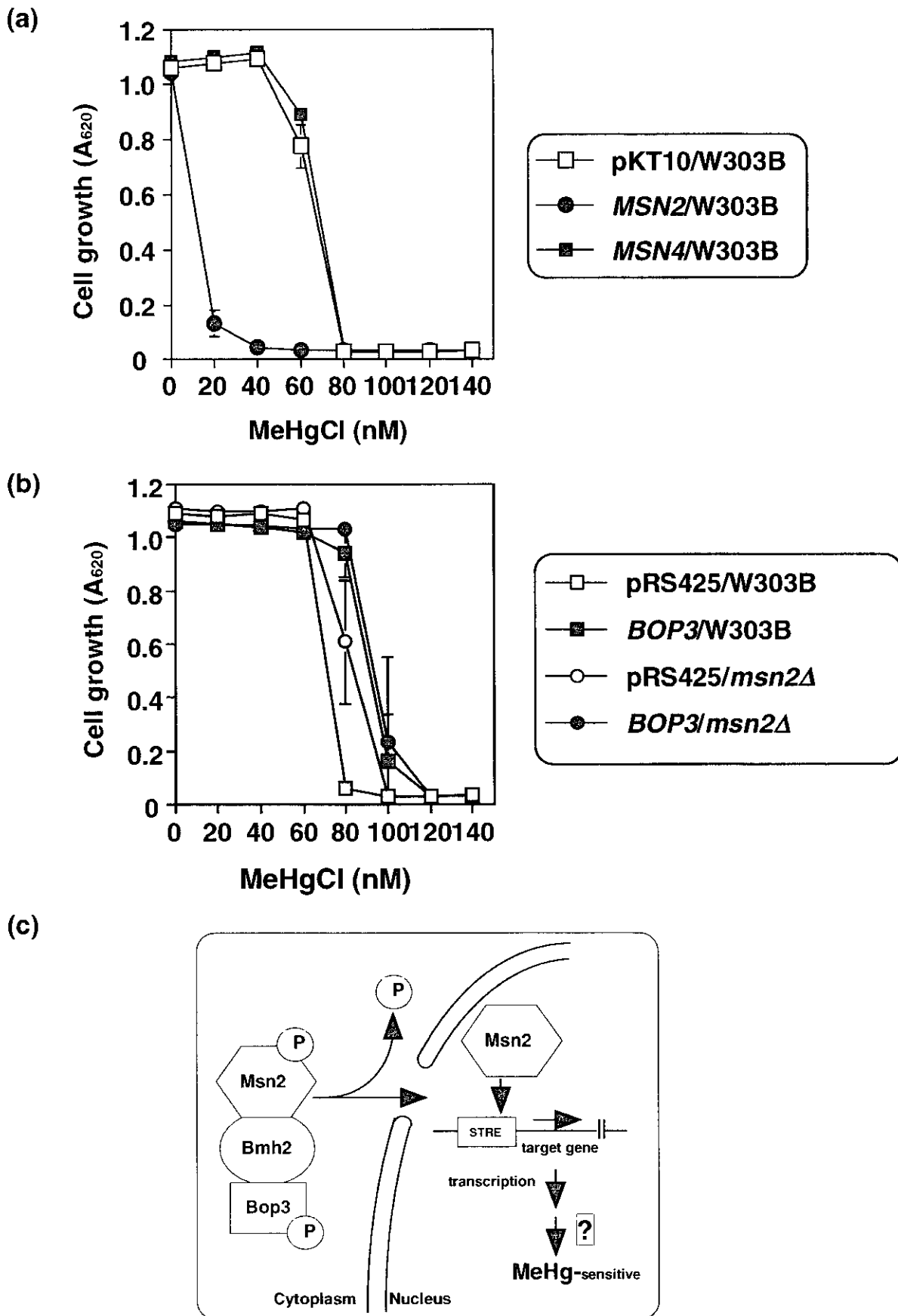
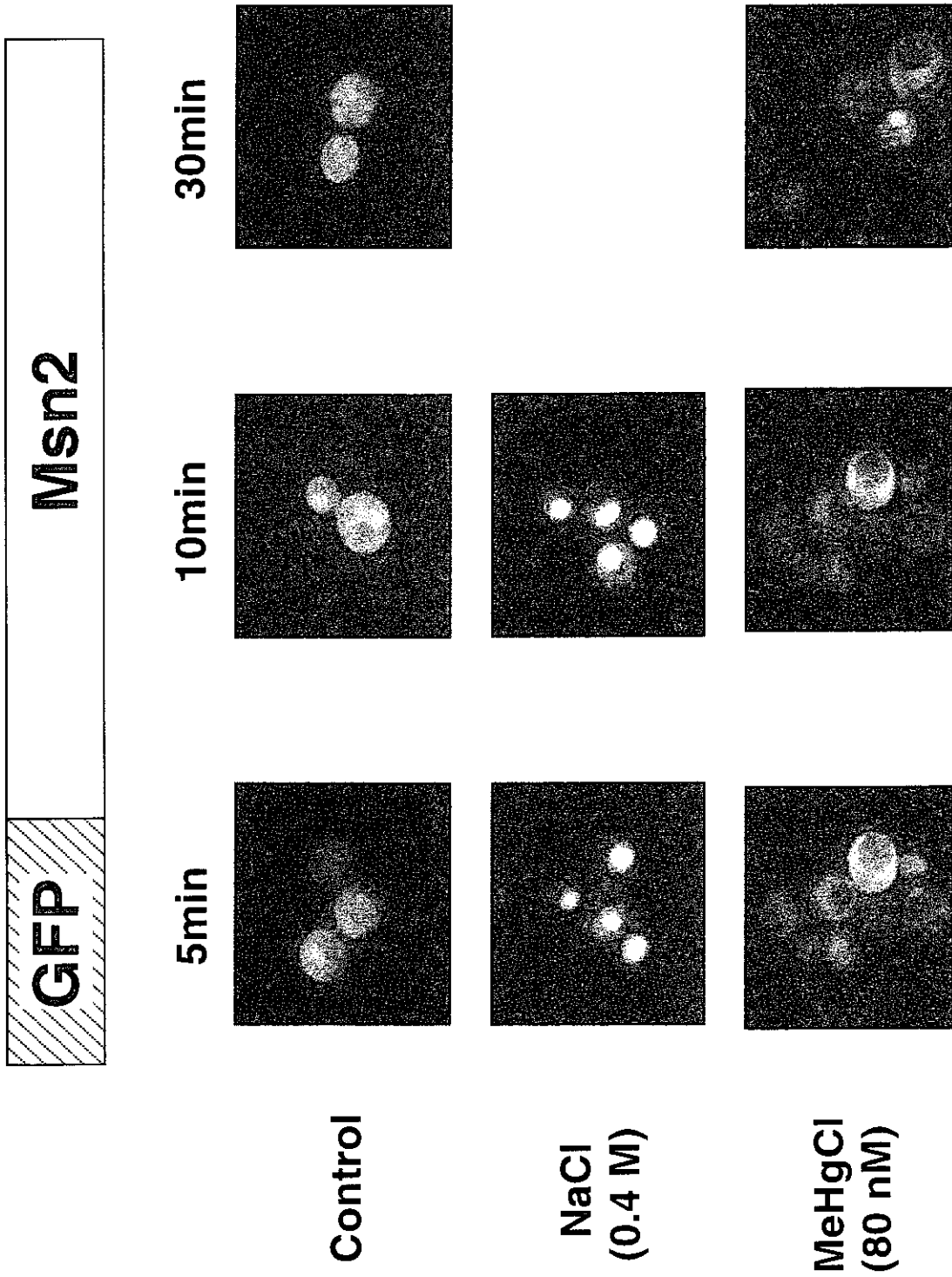


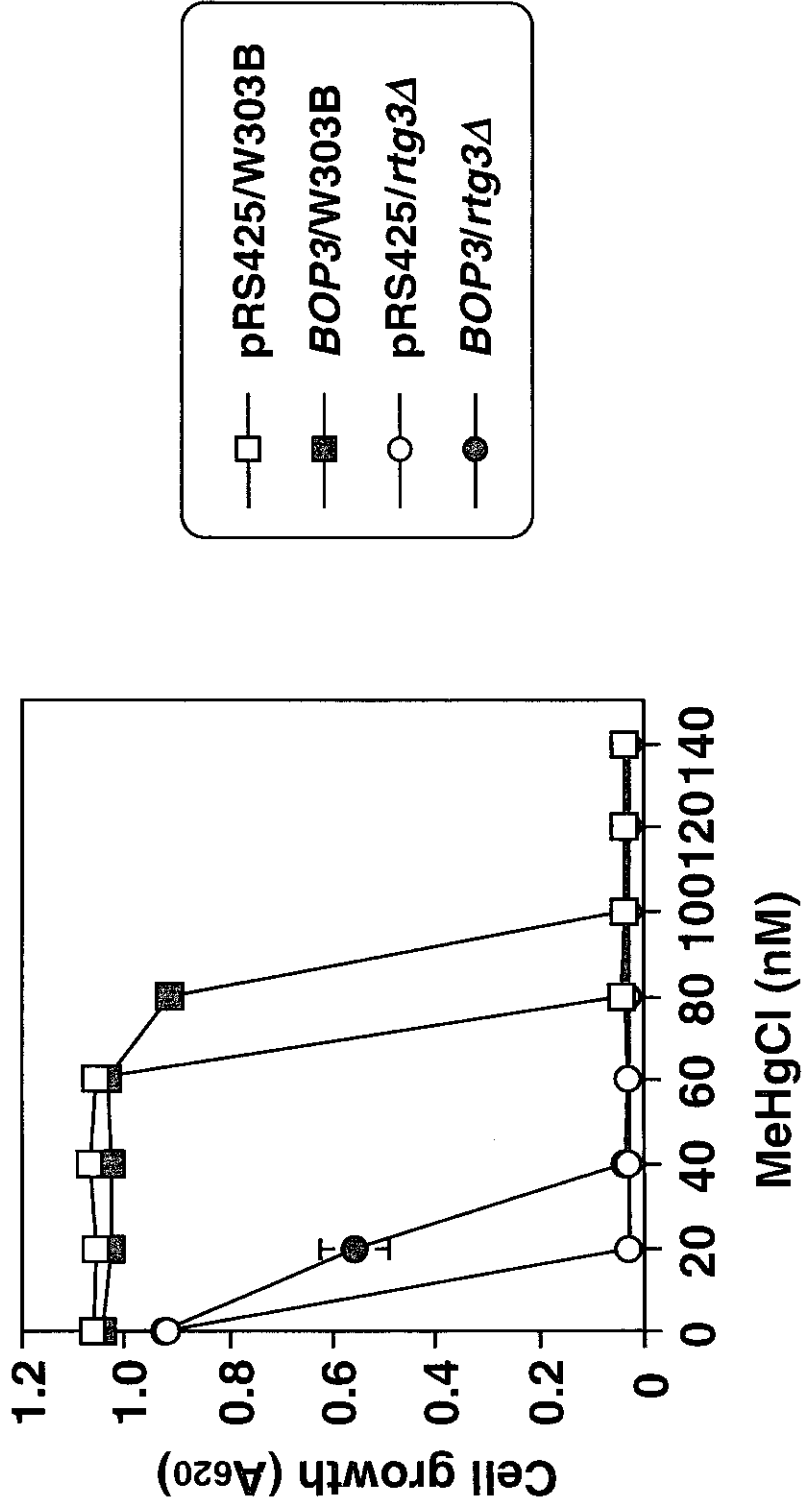
Fig. 7 Effect of deletion of *BMH1* gene (a) or *BMH2* gene (b) on MeHg-sensitivity of yeast that overexpressed Bop3



**Fig. 8 (a) Sensitivity of yeast cells that overexpressed Msn2 or Msn4 to MeHg. (b) Effect of deletion of *MSN2* on MeHg- sensitivity of yeast that overexpressed Bop3. (c) The model for Bop3-mediated resistance to MeHg through Bmh2-Msn2 complex.**



**Fig. 9 (a) Schematic representation of GFP-Msn2. (b) Subcellular localization of GFP-Msn2 in yeast cells after treatment with MeHg.**



**Fig. 10 Effect of deletion of *RTG3* on MeHg-sensitivity of yeast that overexpressed Bop3**