

Fig. 1-3 欠損によりメチル水銀耐性を示す遺伝子

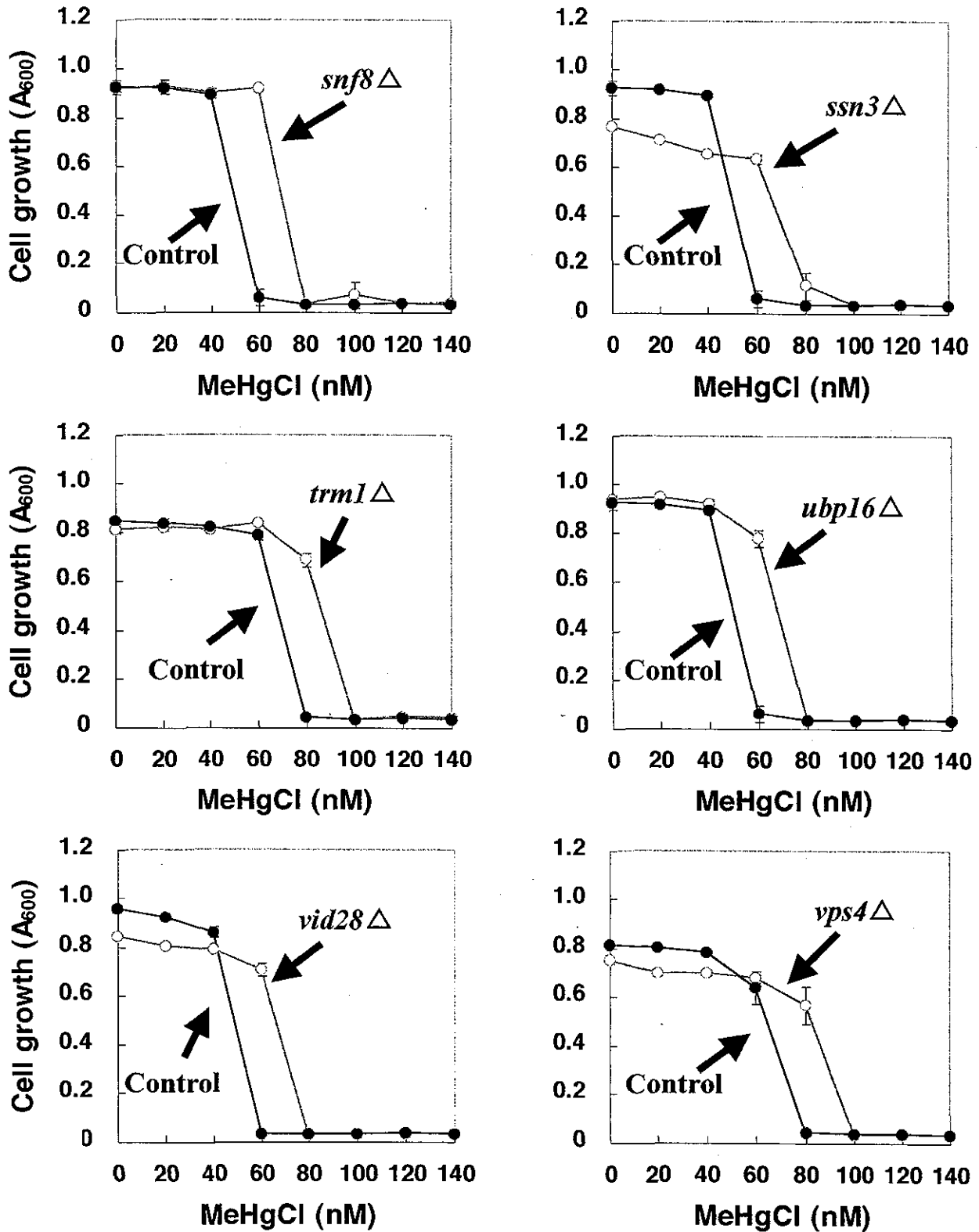


Fig. 1-4 欠損によりメチル水銀耐性を示す遺伝子

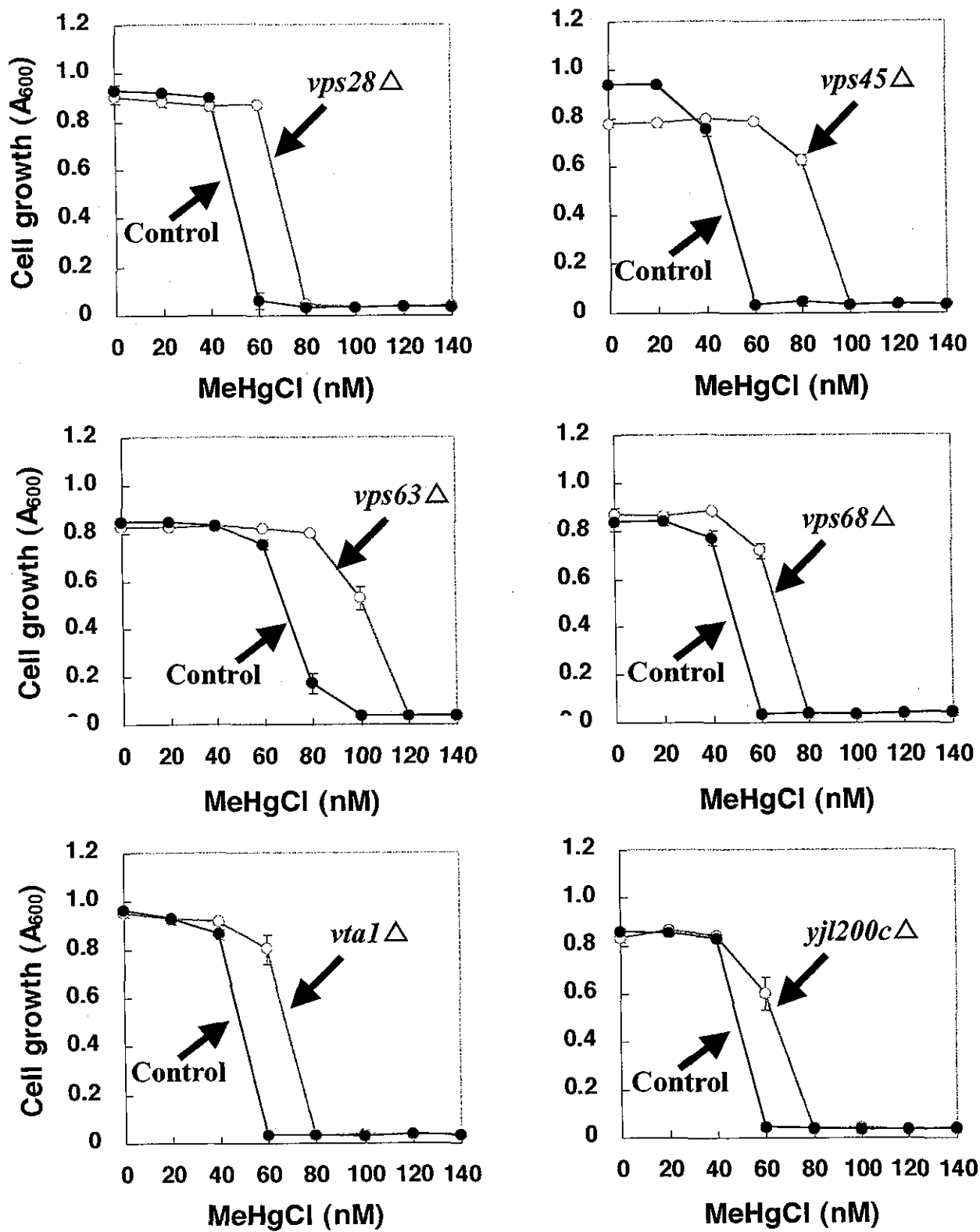


Fig. 1-5 欠損によりメチル水銀耐性を示す遺伝子

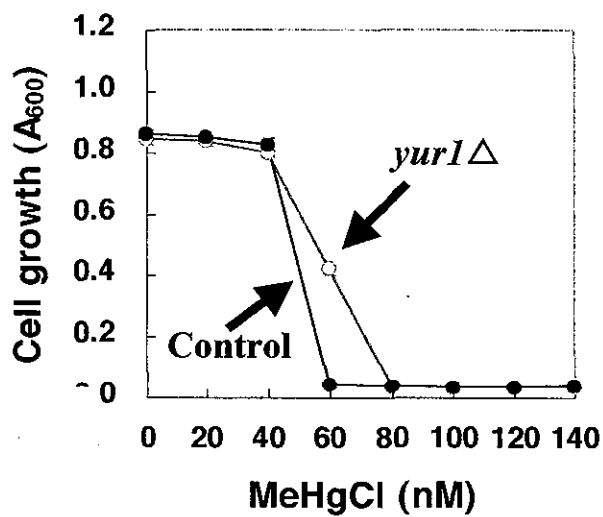
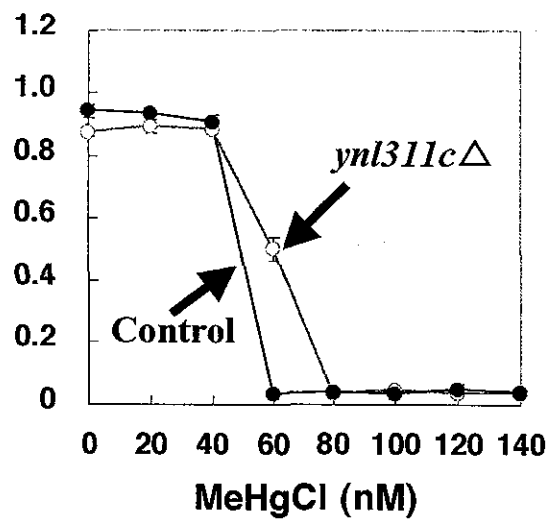
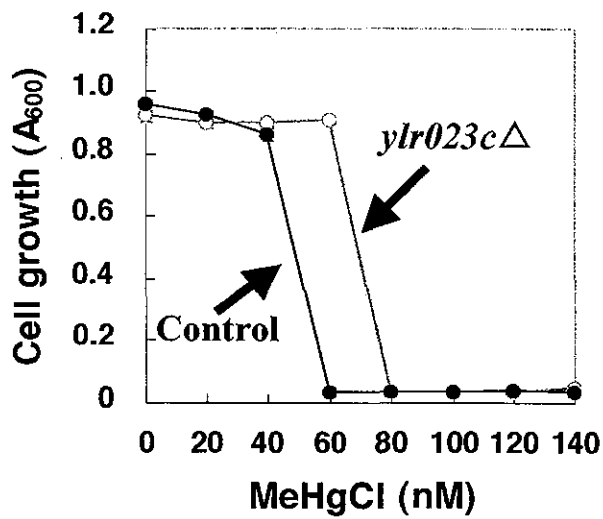


Fig. 1-6 欠損によりメチル水銀耐性を示す遺伝子

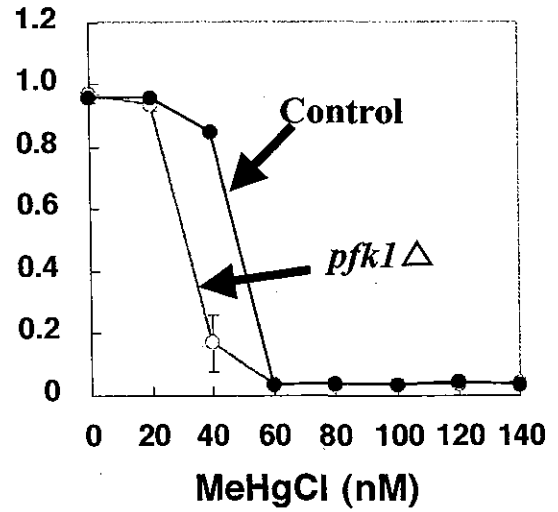
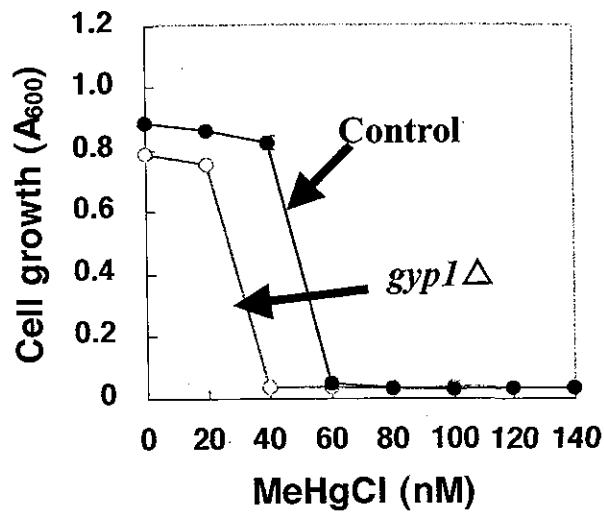
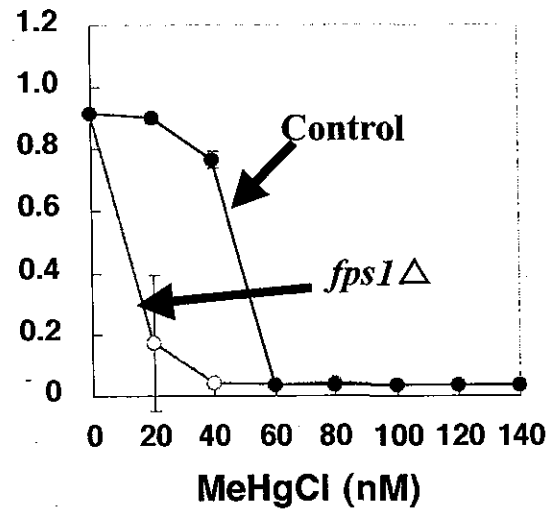
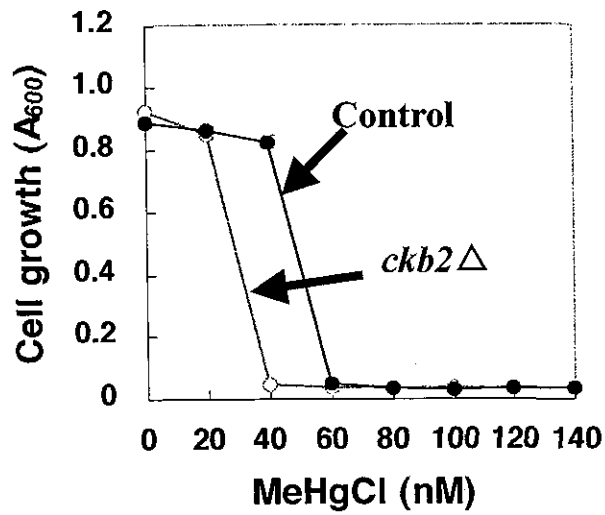
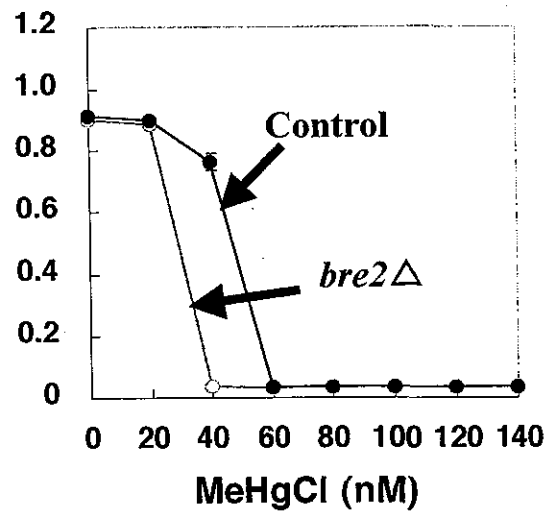
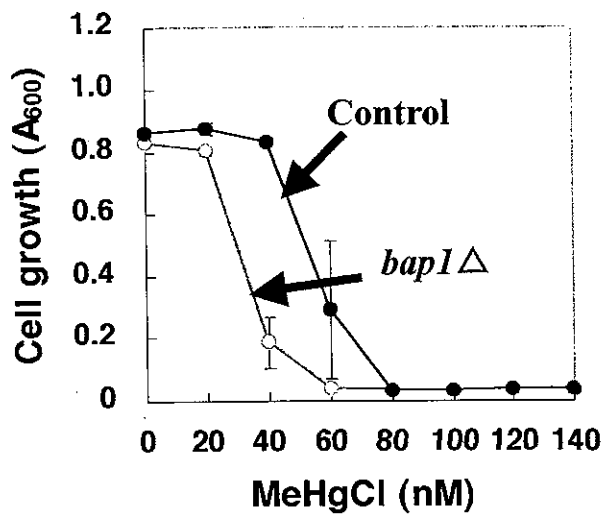


Fig. 2-1 欠損によりメチル水銀高感受性を示す遺伝子

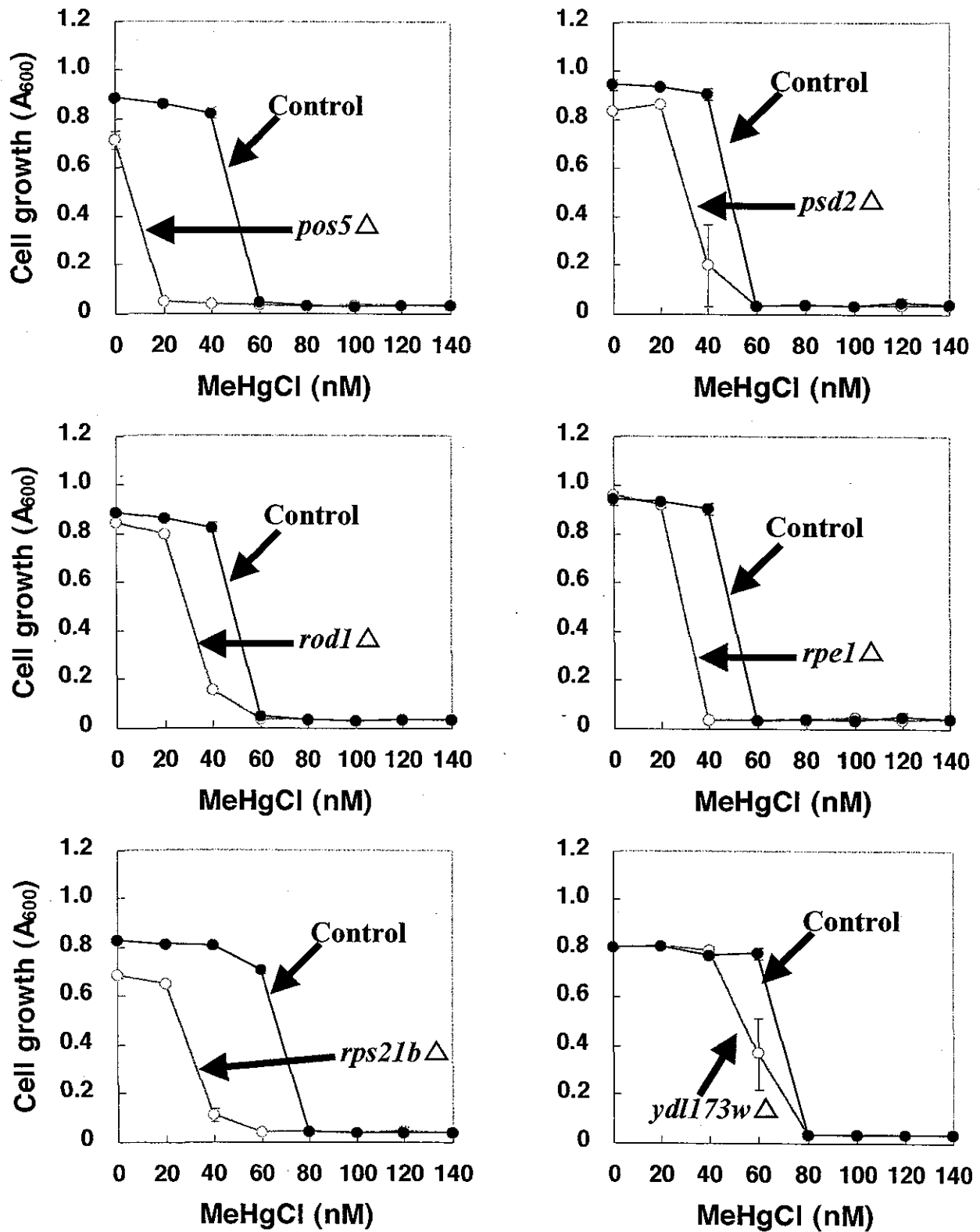


Fig. 2-2 欠損によりメチル水銀高感受性を示す遺伝子

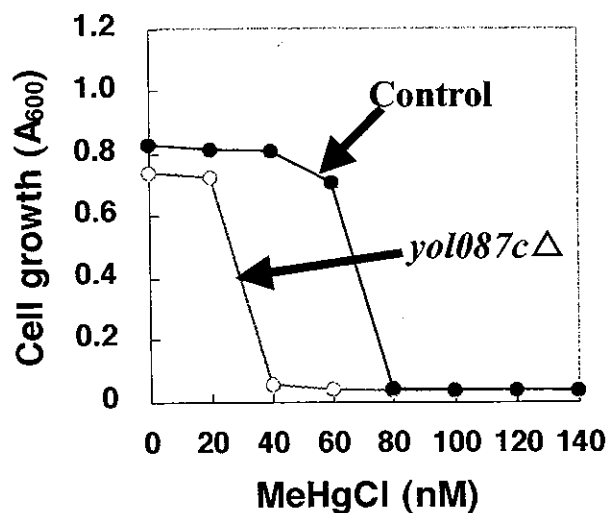
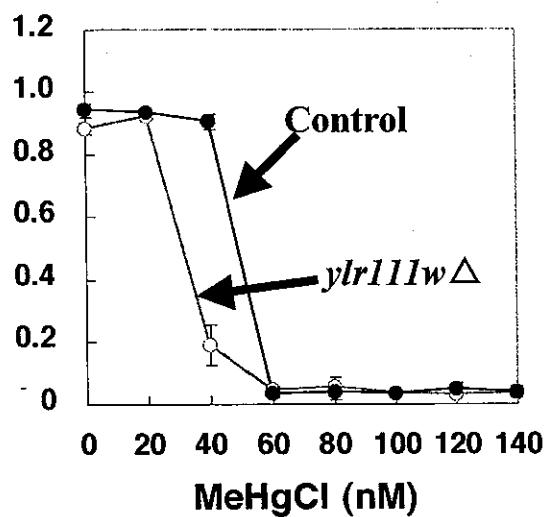
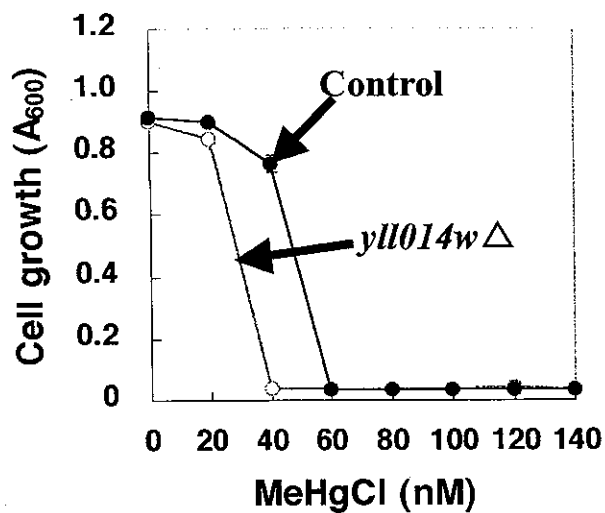
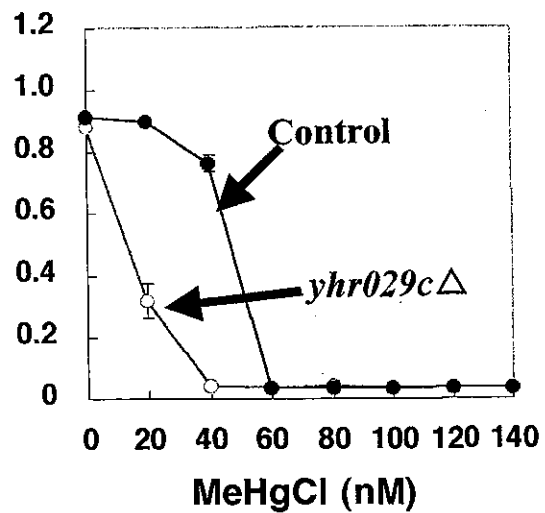
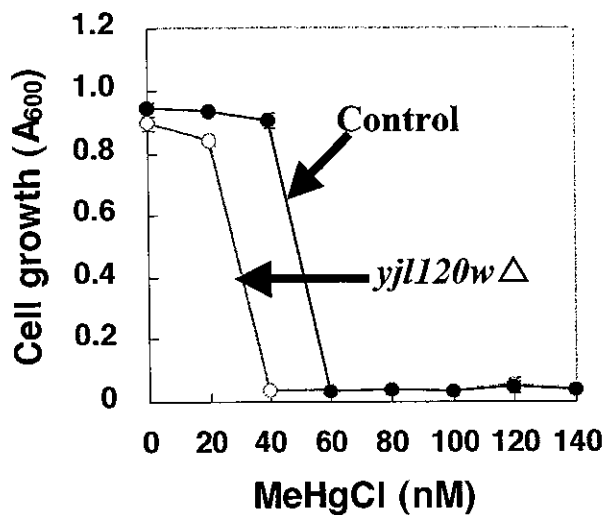


Fig. 2-3 欠損によりメチル水銀高感受性を示す遺伝子

蛋白質	機能
Ace2	Metallothionein expression activator with similarity to Swi5p, has three tandem C2H2-type zinc fingers, required for delaying G1 phase specifically in daughter cells
Ald6	Cytosolic acetaldehyde dehydrogenase
Bar1	Secreted pepsin-like protease that degrades alpha-factor (barrierpepsin)
Bre5	Ubiquitin protease, associates with Ubp3p to de-ubiquitinate Sec23p, mutant is sensitive to brefeldin A
Bud22	Protein with possible role in bud site polarity, has possible coiled-coil domain
Irs4	Protein involved in silencing of ribosomal DNA
Met25	O-Acetylhomoserine sulfhydrylase (OAH SHLase), catalyzes the conversion of O-acetylhomoserine into homocysteine
Met31	Zinc-finger protein involved in transcriptional regulation of methionine metabolism, has two tandem C2H2-type zinc fingers
Nam2	Leucyl-tRNA synthetase, mitochondrial, forms a ternary complex with bI4 maturase and bI4 intron and stimulates bI4 intron splicing activity, dominant alleles suppress mutations in the bI4 maturase
Nnf2	Protein with similarity to human desmoplakin I PIR:A35536
Rav2	Regulator of the (H ⁺)-ATPase of the vacuolar and endosomal membranes
Rhr2	DL-glycerol phosphate phosphatase (sn-glycerol-3-phosphatase)
Rny1	Ribonuclease of the ribonuclease T2 family
Rpd3	Histone deacetylase required for full repression or full activation of many genes, member of the histone deacetylase family, which catalyze removal of acetyl groups from histones
Rps0b	Ribosomal protein S0 (<i>E. coli</i> S2; rat Sb), nearly identical to Rps0Ap
Rps6b	Ribosomal protein S6 (yeast S10; YS4; rp9; human, mouse, and rat S6), identical to Rps6Ap
Rrp8	Protein involved in cleavage at site A2 in pre-rRNA in the pathway of ribosomal RNA processing

Table. 1-1 欠損によりメチル水銀耐性を示す遺伝子がコードする蛋白質の機能

蛋白質	機能
Sap190	Protein that associates with and contributes to function of the protein phosphatase Sit4p
Snf8	Class E vacuolar sorting protein involved in Prc1p vacuolar trafficking pathway and glucose derepression, component of endosomal sorting complex required for transport II (ESCRT-II)
Ssn3	Cyclin-dependent serine/threonine protein kinase of the RNA polymerase II holoenzyme complex and Kornberg's mediator (SRB) subcomplex, involved in regulation of pseudohyphal growth
Tm1	N ² ,N ² -dimethylguanine tRNA methyltransferase, required for methylation of G26 of both mitochondrial and cytoplasmic tRNAs
Ubp16	Putative ubiquitin-specific protease, ubiquitin C-terminal hydrolase
Vid28	Protein involved in the degradation of fructose-1,6-bisphosphatase, possibly required for full induction of IME1 during early meiosis
Vps4	Protein involved in vacuolar sorting that causes a novel pre-vacuolar organelle to become prominent, member of the AAA ATPase protein family
Vps28	Protein required for traffic to the vacuole through the endocytic and biosynthetic pathways, component of endosomal sorting complex required for transport (ESCRT-1) with Stp22p and Srn2p
Vps45	Protein of the Sec1p family essential for vacuolar protein sorting
Vps63	Protein involved in Prc1p vacuolar trafficking pathway
Vps68	Class F vacuolar sorting protein involved in Prc1p vacuolar trafficking pathway, has high similarity to uncharacterized <i>C. albicans</i> Orf6.1817p
Vta1	Protein involved in endosomal transport and protein sorting in multivesicular body, may regulate function of Vps4p
Yjl200c	Protein with similarity to aconitase, has potential mitochondrial transit peptide
Ylr023c	Member of the uncharacterized protein family (Hly-III or UPF0073), which may be hemolysins
Ynl311c	Protein that may be involved in amino acid metabolism, contains a cyclin-associated F-box
Yur1	Mannosyltransferase of KRE2 family involved in N-linked glycosylation

**Table. 1-2 欠損によりメチル水銀耐性を示す
遺伝子がコードする蛋白質の機能**

蛋白質	機能
Bap2	Branched-chain amino acid permease, also transports alanine and aromatic and sulfur containing amino acids
Bre2	Component of the SET1 and COMPASS complex, mutant is sensitive to brefeldin A
Ckb2	Casein kinase II Protein kinase CK2, regulatory (beta-prime) subunit
Fps1	Glycerol channel protein that is also involved in uptake of As^{3+} and Sb^{3+} , member of the major intrinsic protein (MIP) family of transmembrane channel proteins
Gyp1	GTPase-activating protein for Ypt1p and Sec4p
Pfk1	Phosphofructokinase alpha subunit, part of a complex with Pfk2p which catalyzes ATP-dependent conversion of fructose-6-phosphate to fructose-1,6-bisphosphate, a key regulatory step in glycolysis
Pos5	Mitochondrial NADH kinase required for resistance to oxidative stress, mitochondrial function, and arginine biosynthesis, has similarity to Utr1p and Yel041p
Psd2	Phosphatidylserine decarboxylase, converts phosphatidyl-L-serine to phosphatidylethanolamine, isozyme present in the Golgi and vacuole
Rod1	Protein that mediates resistance to o-dinitrobenzene (O-DNB)
Rpe1	Ribulose-5-phosphate-3-epimerase, interconverts ribulose-5-phosphate and xylulose-5-phosphate
Rps21b	Ribosomal protein S21 (yeast S26; YS25; rat S21), identical to Rps21Ap
Ydl173w	Protein of unknown function
Yjl120w	Protein of unknown function
Yhr029c	Member of the phenazine biosynthesis-like protein family, has moderate similarity to uncharacterized <i>S. pombe</i> Aes1p
Yll014w	Protein of unknown function, has moderate similarity to uncharacterized <i>C. albicans</i> Ipf5035p
Ylr111w	Protein of unknown function
Yol087c	Protein containing four WD domains (WD-40 repeat), which may mediate protein-protein interactions, has low similarity to uncharacterized <i>C. pseudotropicalis</i> Yol087p

Table. 2 欠損によりメチル水銀高感受性を示す遺伝子がコードする蛋白質の機能

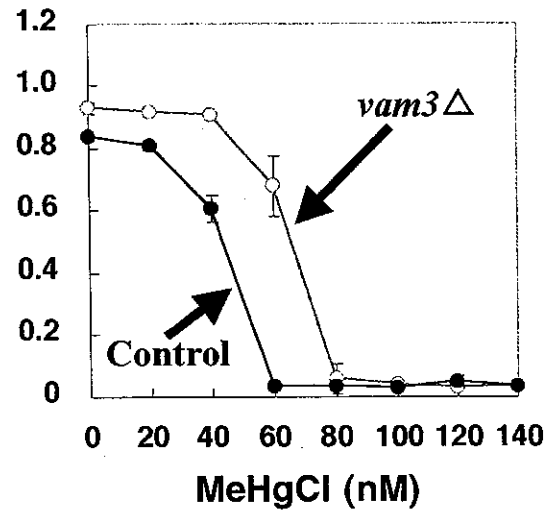
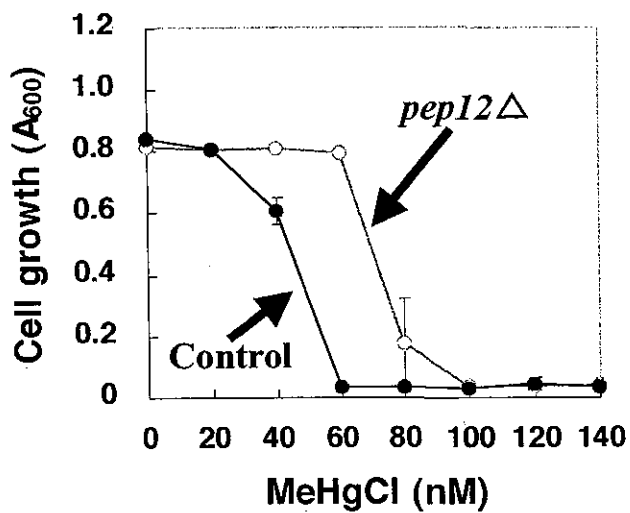
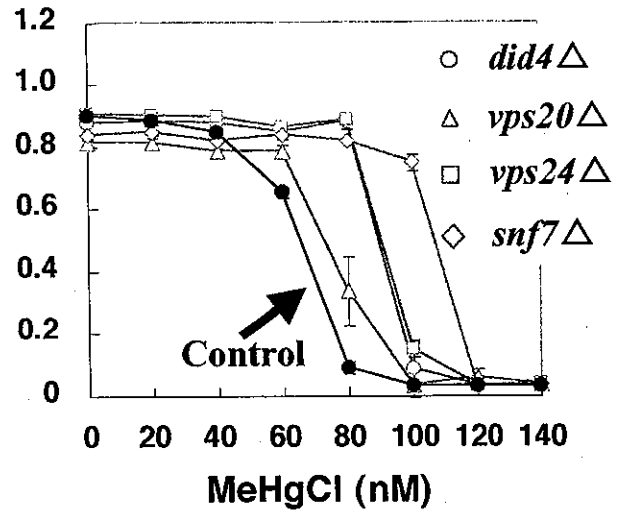
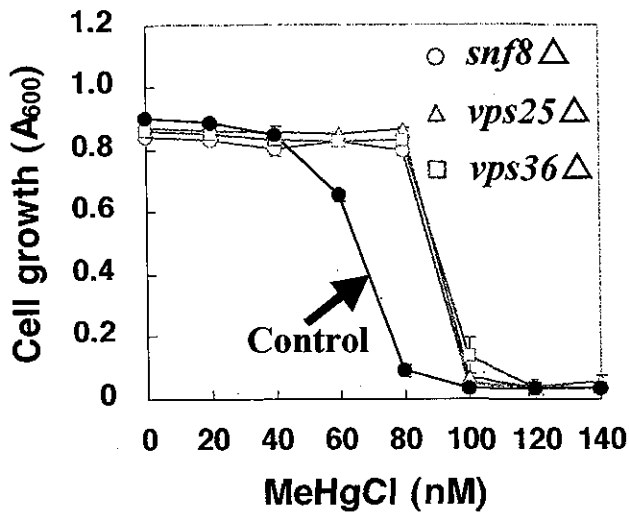
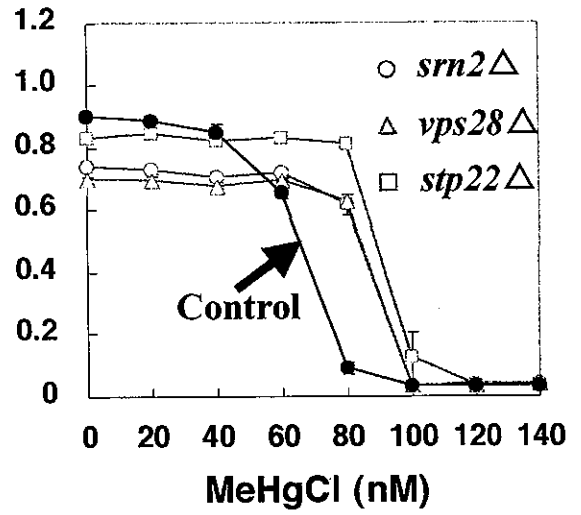
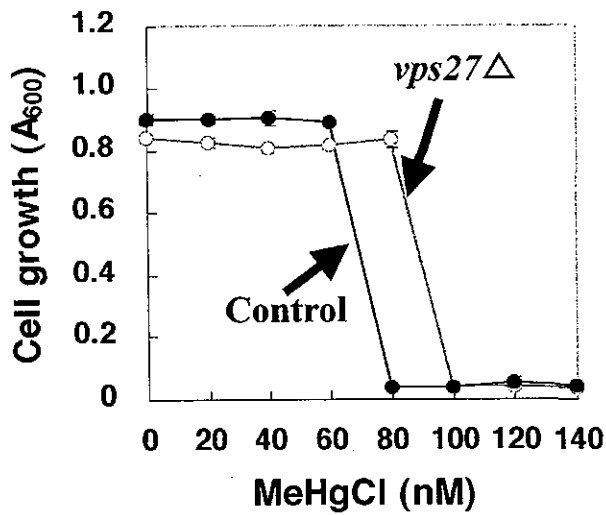


Fig. 3-1 液胞への輸送経路に関わる因子の欠損によるメチル水銀感受性への影響

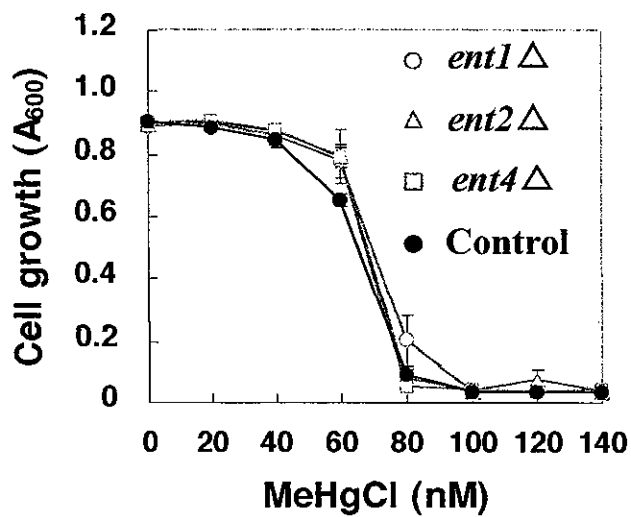
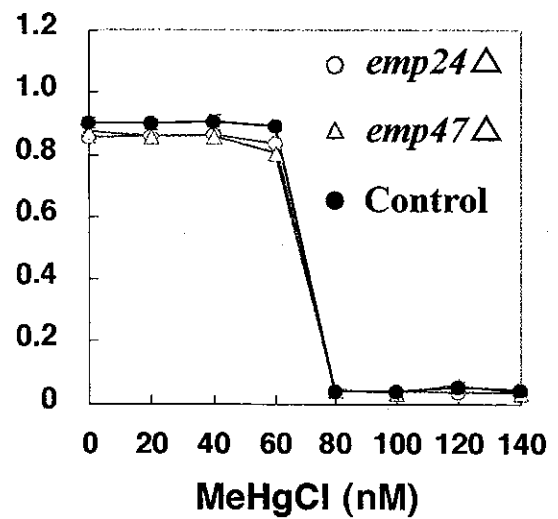
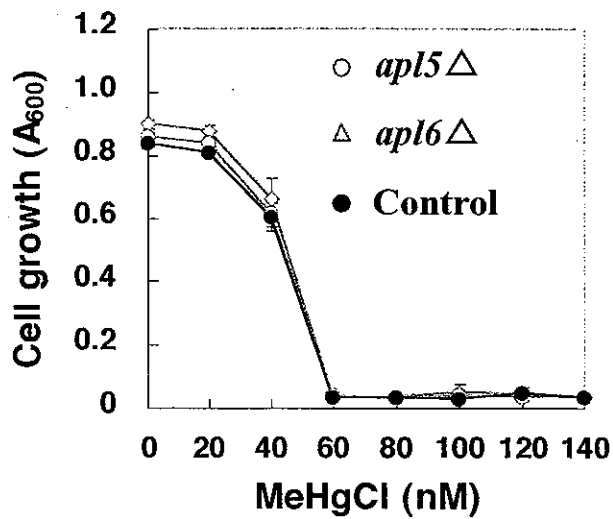


Fig. 3-2 液胞への輸送経路に関わる因子の欠損によるメチル水銀感受性への影響

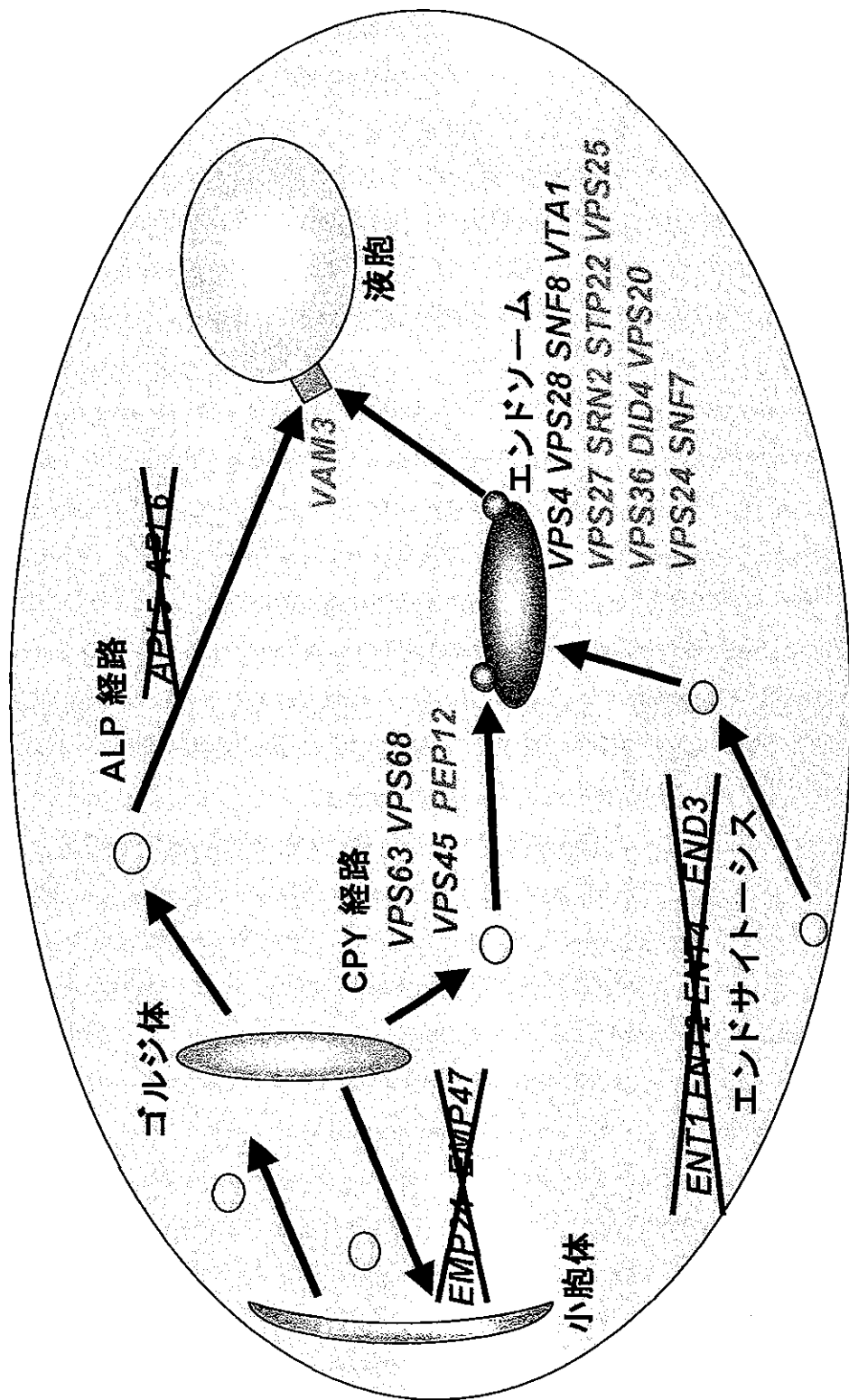


Fig. 4 液胞への輸送経路とメチル水銀感受性との関係

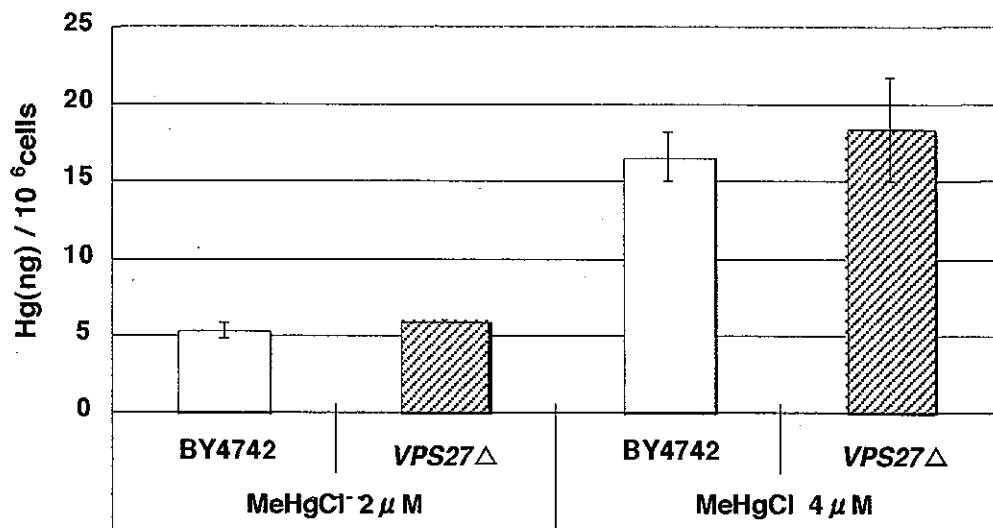


Fig. 5 *VPS27*欠損株とBY4742野生株のメチル水銀取り込み量の比較

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

転写因子 Msn2 によるメチル水銀毒性増強作用に関与する因子の検索
および作用機序解析

分担研究者 黄 基旭 東北大学大学院薬学研究科教務職員

転写因子 Msn2 の高発現によるメチル水銀毒性増強作用を消失させる細胞内因子の同定を検索し、hexosamine 経路の律速酵素である GFAT をコードする遺伝子 *GFAT* を同定した。*GFAT* は酵母におけるメチル水銀の標的分子であることが永沼らによって明らかにされており、メチル水銀による *GFAT* の特異的な阻害によって細胞内のアミノ糖濃度が顕著に低下するものと考えられている。Msn2 高発現によるメチル水銀毒性増強作用は *GFAT* 遺伝子の高発現によって顕著に低下し、さらに Msn2 高発現によって *GFAT* 遺伝子の発現が抑制された。Msn2 の核移行に関わる NLS および DNA との結合に関わる Zn-finger ドメインを欠損させた Msn2 を高発現させてもメチル水銀感受性の上昇が認められた。また、転写因子 Sok2 の遺伝子を欠損させた酵母が、親株と比べて高いメチル水銀感受性を示し、さらに *GFAT* 遺伝子の転写活性および発現レベルも低い値を示すことが判明した。一方、Sok2 を高発現させた酵母では、*GFAT* mRNA の顕著な増加が認められ、Msn2 の高発現が Sok2 の発現を抑制することによって、*GFAT* 遺伝子の発現レベルの低下を引き起こす可能性が示唆された。しかし、Sok2 の関与は部分的であり、他の因子も同時に関与している可能性が考えられた。そこで、*GFAT* 遺伝子の発現に関与する Sok2 以外の細胞内因子を遺伝子ライブラリー中から検索したところ Sok1 が同定された。Sok1 を Msn2 高発現酵母に共発現させることにより、Msn2 高発現によるメチル水銀高感受性化の回復および *GFAT* 遺伝子の転写活性抑制の回復が認められたことから、Sok1 も Sok2 と同様に Msn2 高発現によるメチル水銀毒性増強作用に関与するものと考えられる。

A. 研究目的

我々は、メチル水銀毒性の発現メカニズム解明を目指し、酵母のメチル水銀感受性に影響を与える細胞内因子の検索を行ってきた。これまでにいくつかの因子が同定されたが、その中の1つに転写因子Msn2があり、Msn2が高発現した酵母はメチル水銀に対して高い感受性を示す (5)。Msn2は酸化ストレスや熱ショック、浸透圧の変化、栄養不足などの様々なストレスにตอบสนองして核内へ移行し、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Cys2 His2 Zn-finger型転写因子である (6, 7, 8, 9)。このMsn2高発現によるメチル水銀毒性増強の機構を解明するために、本研究では、この現象に関与する細胞内因子の検索およびその作用機序解析を行った。

B. 研究方法

1. 酵母への plasmid の導入

酵母の形質転換は酢酸リチウム法 (10) により行った。まず、酵母 Y700 株の single colony を完全培地である YPD 培地 2 mL に植菌し 30°C で一晩振盪培養後、この培養液を YPD 培地で 2×10^6 cells/mL となるように希釈した。この希釈培養液 50 mL を $1 \times$

10^7 cells/mL になるまで振盪培養した後集菌し、滅菌水で洗浄した。これを 100 mM 酢酸リチウム溶液で 2×10^9 cells/mL となるように懸濁し、気相中、30°C で 15 分間 incubate した。この懸濁液 50 μ L に MSN2/pKT10 plasmid 1 μ g、加熱変性サケ精子 DNA 50 μ g および 40% polyethylene-glycol 300 μ L を加え、30°C で 30 分間 incubate した。その後、42°C で 15 分間の heat shock をかけた後に集菌し、滅菌水 100 μ L で懸濁した後、SD (-ura) 寒天培地に塗布し、30°C で 2 日間培養した。

酵母 genomic DNA library は上記の方法と同様に MSN2/pKT10 plasmid を導入した酵母に導入した後、SD (-leu, -ura) 寒天培地に塗布し、30°C で 2 日間培養した。

2. Msn2 高発現によるメチル水銀高感受性を消失させる形質転換体の検索

1 で得られた形質変換体の single colony を SD (-leu, -ura) 培地 2 mL に植菌し、一晩振盪培養した。培養液を SD (-leu, -ura) 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 1×10^5 cells/well になるように 180 μ L 添加後、Msn2 高発現酵母が生育出

来ない塩化メチル水銀 (final 0.2 μ M) 20 μ L を添加し 30°C で 24 時間培養した。液体培地中に生育してきた酵母を 2 μ L 回収し、SD (-leu, -ura) 培地 2 mL に懸濁し 30°C で一晩培養した。

3. 酵母からの plasmid の回収

酵母からの plasmid の回収は以下に示す方法により行った。まず、single colony を、SD (-leu, -ura) 培地 2 mL に植菌し、一晩振盪培養した後、遠心分離により酵母を集菌した。Breaking buffer (2 % Triton X-100、1 % SDS、100 mM NaCl、10 mM Tris-HCl (pH 8.0)、1 mM EDTA (pH 8.0)) 200 μ L を加え懸濁後、glass beads 0.3 g、phenol/chloroform /isoamylalcohol (25:24:1、PCI) 200 μ L を加えて 3 分間激しく攪拌した。遠心分離後、水層 150 μ L に 1 M NaCl 30 μ L、isopropanol 150 μ L を加え、5 分間室温で静置した。遠心分離後、70% エタノールで wash し、エタノールを室温乾燥により除いた後、TE buffer (10 mM Tris-HCl (pH8.0)、1 mM EDTA (pH8.0)) 20 μ L を加え plasmid 溶液とした。さらに、plasmid を増幅・精製するために、plasmid を大腸菌へ導入後回収した。大腸菌への plasmid の導入は Hanahan の方法 (11) に従って行った。Competent cell 溶液 100 μ L に上記の plasmid 溶

液を 1 μ L 加え、氷上に 30 分静置した後、42°C で 45 秒間の heat shock をかけ、さらに氷上に 2 分間静置した後、ampicillin sodium salt 100 μ g/mL を含む LB 寒天培地 (LB (Amp)) に塗布し、37°C で一晩培養した。形成されたコロニーを LB (Amp) 培地 2 mL で一晩振盪培養した後、GenElute™ Plasmid Miniprep Kit を用いて大腸菌より plasmid を回収した。

4. Plasmid を再導入した酵母のメチル水銀に対する感受性

3 で回収した plasmid を Msn2 高発現酵母に再導入し、その single colony を SD (-leu, -ura) 培地 2 mL に植菌し、一晩振盪培養した後、SD (-leu, -ura) 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 1×10^5 cells/well になるように 180 μ L 添加後、塩化メチル水銀 (final : 0, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140 nM) を 20 μ L ずつ添加した。Plate の周囲にビニールテープを巻いて密封後攪拌し、気相 incubater で 30 °C で 48 時間培養後、microplate reader で 600 nm における吸光度を測定し、酵母の増殖を調べた。なお、pKT10、YEpl3 vector を導入した酵母を実験の対照とした。

5. DNA fragment の YEp13 への subcloning

4で回収した plasmid に含まれている genomic DNA fragment のシーケンス解析を行った後、Fig. 2 に示した制限酵素で切断した。制限酵素処理後、agarose ゲル電気泳動を行い、2種の fragment (F1-1、F1-2) を得た。それぞれの fragment を DNA ligation kit ver.2 を用いて YEp13 と連結後、3と同様の方法を用いて大腸菌に導入し、LB (Amp)液体培地で培養後、GenElute™ Plasmid Miniprep Kit を用いて plasmid を回収した。

6. Subcloning した plasmid (F1-1/YEp13、F1-2/YEp13) を導入した酵母のメチル水銀に対する感受性

1と同様の方法を用いて6で得られた plasmid を Msn2 高発現酵母に導入し、得られた形質変換体を用いて、5と同様の方法によりメチル水銀感受性を調べた。

7. 酵母からの RNA 抽出

下記に示す組み合わせの plasmid を酢酸リチウム法により Y700 株に導入した後、得られた形質変換体の single colony を 20 mL SD (-leu, -ura) 液体培地に植菌し、30℃で log

phase の状態 ($OD_{600}=0.5$ 付近) になるまで培養し、集菌した。集菌後滅菌水で wash し、TES solution (10 mM Tris-HCl (pH 7.5)、10 mM EDTA、0.5 % SDS) 200 μ L を加えてよく攪拌し、更に酸性フェノール 200 μ L を加えて再度攪拌した。攪拌後、65℃で10分毎に30秒間 vortex をかけながら1時間 incubate し、氷上で5分間冷却後、遠心分離にて水層と油層に分離させた。水層を別のチューブに移した後、酸性フェノール 200 μ L を加えて攪拌した。遠心分離後、水層を別チューブに移し、2.5倍量のエタノールを加え-80℃で30分間静置した後、遠心分離し上清を除き、沈殿物を70%エタノールで wash し、エタノールを極力除いた後に適量の滅菌水を加え、RNA 溶液とした。

8. cDNA の作製

RNA 溶液を 3 μ g/11 μ L となるように希釈し、これに 1 μ L の oligo (dT)₁₂₋₁₈ primer を加え、70℃で10分間加熱した後冷却した。冷却後、10 mM dNTP mix 1 μ L、0.1 M DTT 2 μ L、5×First strand buffer 4 μ L を加え、42℃で5分間 incubate した。incubate 後、逆転写酵素 M-MLV RT を 1 μ L 加えて 42℃ 60分間、70℃で15分間 incubate した後、氷上で冷却した。冷却後、0.26 μ L の RNase H

を加え 37°C で 20 分間 incubate し、cDNA 溶液とした。

9. GFAT 遺伝子のプロモーター転写活性を測定するための plasmid の作製

lacZ 遺伝子を含む K7 vector を用い、*lacZ* プロモーター部位に GFAT 遺伝子のプロモーターを subcloning することで作製した。まず、chromosomal DNA を template とし、以下に示す反応条件および *Bam*HI、*Sph*I 切断部位を持つ各 primer を用いて、PCR により目的遺伝子である GFAT 遺伝子プロモーターを増幅させた。PCR 産物は PCI を等量加え攪拌し、遠心分離した後得られた上清に 2.5 倍量のエタノール、1/10 量の酢酸ナトリウムを加えて混和し、遠心分離することにより DNA を析出させた。得られた DNA 断片および K7 vector を制限酵素 *Bam*HI、*Sph*I で切断し 1% アガロースゲルで電気泳動後、目的サイズの DNA をゲルから切り出し、GeneClean II kit を用いて精製した。得られた DNA と K7 vector を DNA ligation kit ver.2 を用いて連結後、Hanahan らの方法 (10) により大腸菌に導入し、LB (Amp) 液体培地で培養後、GenElute™ Plasmid Miniprep Kit を用いて、大腸菌より plasmid を回収した。制限酵素 *Bam*HI、*Sph*I で

切断することで目的の DNA が挿入されていることを確認した。

10. β -galactosidase assay

pKT10 もしくは MSN2/pKT10 plasmid と 4 で作製した plasmid を酢酸リチウム法により Y700 株に導入し、得られた形質変換体の single colony を SD (-trp, -ura) 液体培地 2 mL に植菌し、30°C インキュベーターで log phase の状態 ($OD_{600}=0.5$ 付近) まで培養した。培養液 1 mL を 1.5 mL チューブに移し、遠心分離後、上清を除き SD (-trp, -ura) 培地 1 mL を加え懸濁した後、そのうちの 100 μ L を 96 well plate に分注した。2000 rpm で 5 分間遠心分離後、アスピレーターで上清を吸い取り、0.1 M Tris-HCl (pH7.5)-0.05 % Triton X 100 を 25 μ L ずつ添加した。攪拌後、-80°C で 1 時間凍結し、室温で融解した後、Z buffer (60 mM $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$, 40 mM $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$, 10 mM KCl, 1 mM $MgSO_4 \cdot 7H_2O$) に 1/50 量の 5 mg/mL MUG (methlumbelliferyl β -D-galactopyranoside) を添加した溶液を 125 μ L ずつ添加して、蛍光光度計 Spectramax Geminix (Molecular devices) で 1 分毎の反応を 5 分間、経時的に蛍光強度を測定した (Ex 360 nm, Em 450 nm)。測定

後、細胞濃度の吸光度 (OD₆₀₀) および反応時間で補正することにより、 β -galactosidase activity を算出した。

11. Msn2 truncation mutants の作製

Msn2 truncation mutants は QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit の protocol に従い、template は MSN2/pKT10 を用い、下記に示す反応条件および目的の塩基配列に *NheI* 部位を挿入するような primer を用いて PCR を行うことで作製した。PCR 後、*DpnI* 処理にて鑄型 plasmid を消化後、cloning を行い、変異の導入された plasmid を得た。変異によって導入された *NheI* 部位を利用して目的の領域を切り出し、その後連結することで目的の領域を欠失させた。その後、塩基配列解析により目的の領域が欠失されていることを確認した。

12. SOK2 欠損株 (Y700 株) の作製

まず、BY4742 株の SOK2 欠損株のゲノム DNA を template として以下に示す primer を用いて、PCR を行った後に、酢酸リチウム法により Y700 株に導入し、ゲノム上の SOK2 と相同組換えさせることで作製した。BY4742 株の SOK2 欠損株は標的遺伝子の代わりにジェネティシン耐性

を付与する遺伝子 (G418) が組み込まれているため、導入後 0.4 g/L のジェネティシンを含む YPD 寒天培地に播き、得られた colony を遺伝子欠損株の候補 clone とした。さらに得られた colony からゲノム DNA を抽出し、これを template とし SOK2 遺伝子領域を以下に示す primer を用いて PCR により増幅し、その PCR 産物の大きさを agarose ゲル電気泳動で調べることにより、目的遺伝子欠損の有無を確認した。

13. GFAT 遺伝子発現レベルの検討

GFAT 遺伝子のプロモーター転写活性レベル、mRNA レベルの検討は第二章第二節 10、12 と同様の方法により行った。

14. Sok2 高発現プラスミドの作製

Sok2 を酵母で高発現させるための発現 plasmid は酵母 2 μ 系 vector である pKT10 の制限酵素 *PvuII* 認識部位に、PCR によって増幅した SOK2 の ORF を挿入することにより作製した。まず、chromosomal DNA を template として、以下に示す primer により PCR を行った後、PCR 産物を 1% アガロースゲルで電気泳動後、目的サイズの DNA をゲルから切り出し、GeneClean II kit を用いて精製した。得られた DNA 断片と、予め *PvuII* で