

Fig. 7 Effect of triple deletion of YBR203W, YLR097c and YLR224w on MeHg sensitivity

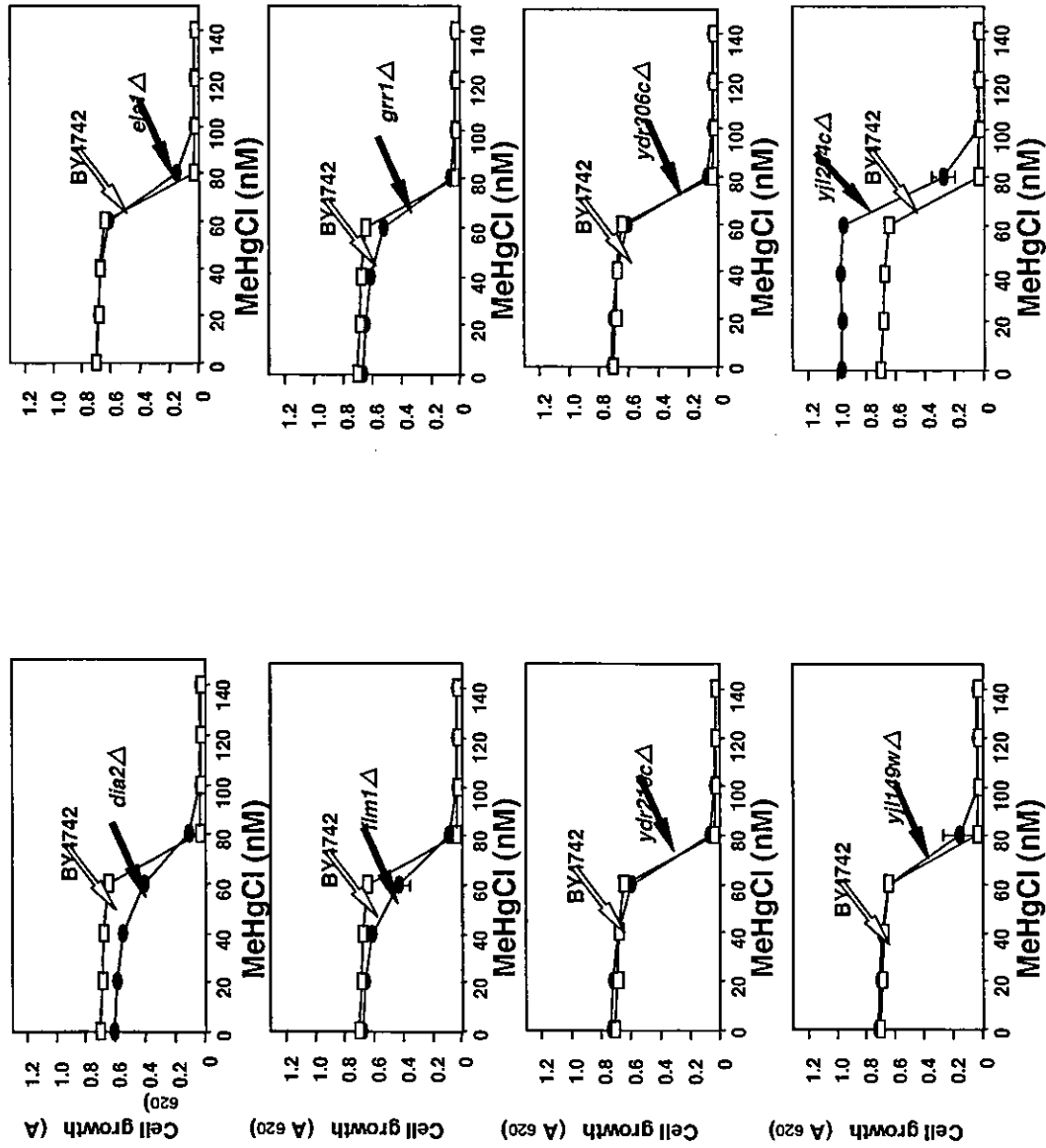


Fig. 8 Effect of deletion of *DIA2*, *ELA1*, *FLM1*, *GRR1*, *YDR219c*, *YDR306c*, *YJL149w* or *YJL204c* on MeHg sensitivity of yeast strain BY4742

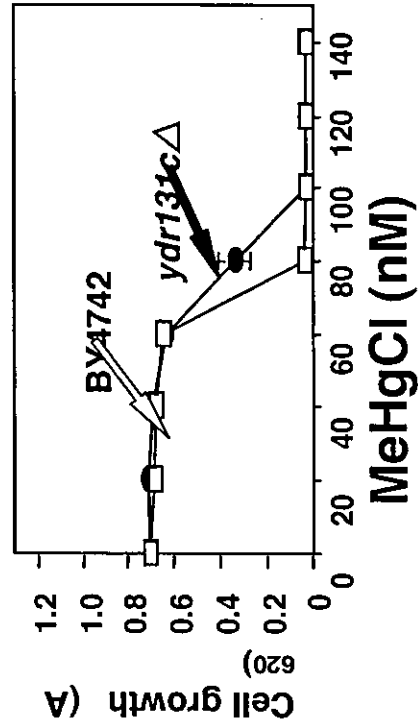
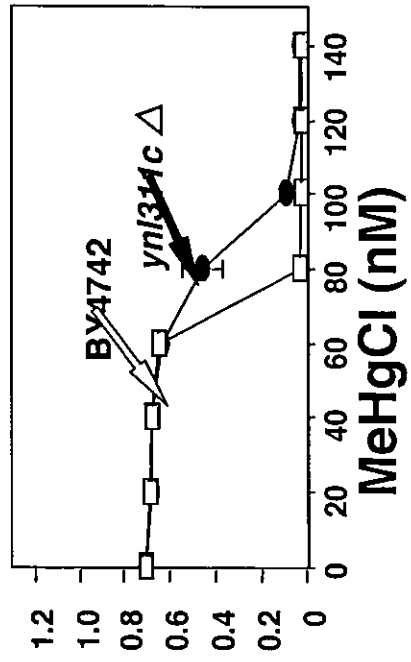


Fig. 9 Effect of deletion of *YDR131c* or *YNL311c* on MeHg sensitivity of yeast strain BY4742

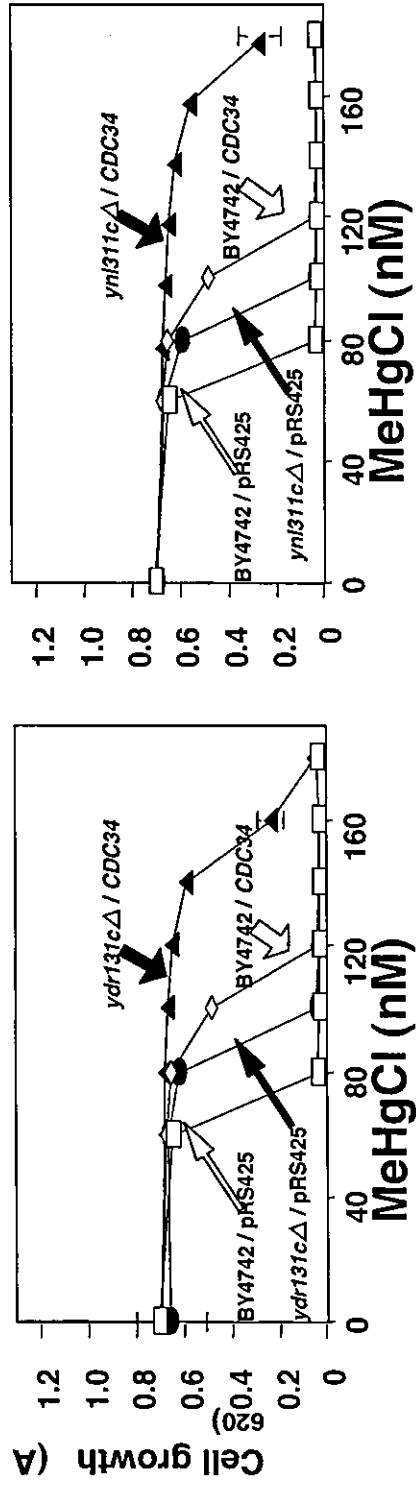


Fig. 10 Effect of deletion of *YDR131c* or *YNL311c* on MeHg sensitivity of yeast that overexpressed *Cdc34*

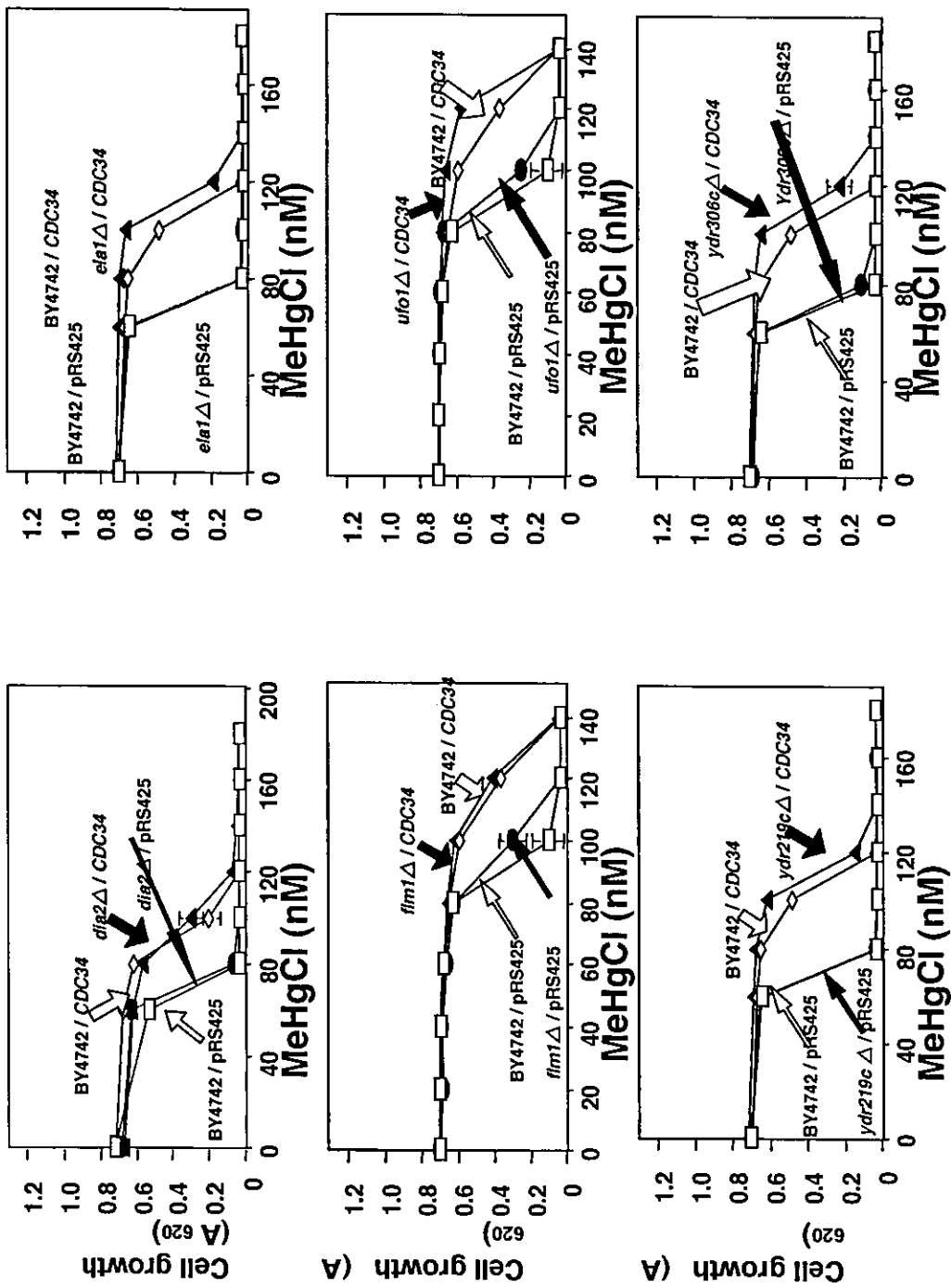


Fig. 11-1 Effect of deletion of *DIA2*, *ELA1*, *FLM1*, *UFO1*, *YDR219c* or *YDR306c* on MeHg sensitivity of yeast that overexpressed Cdc34

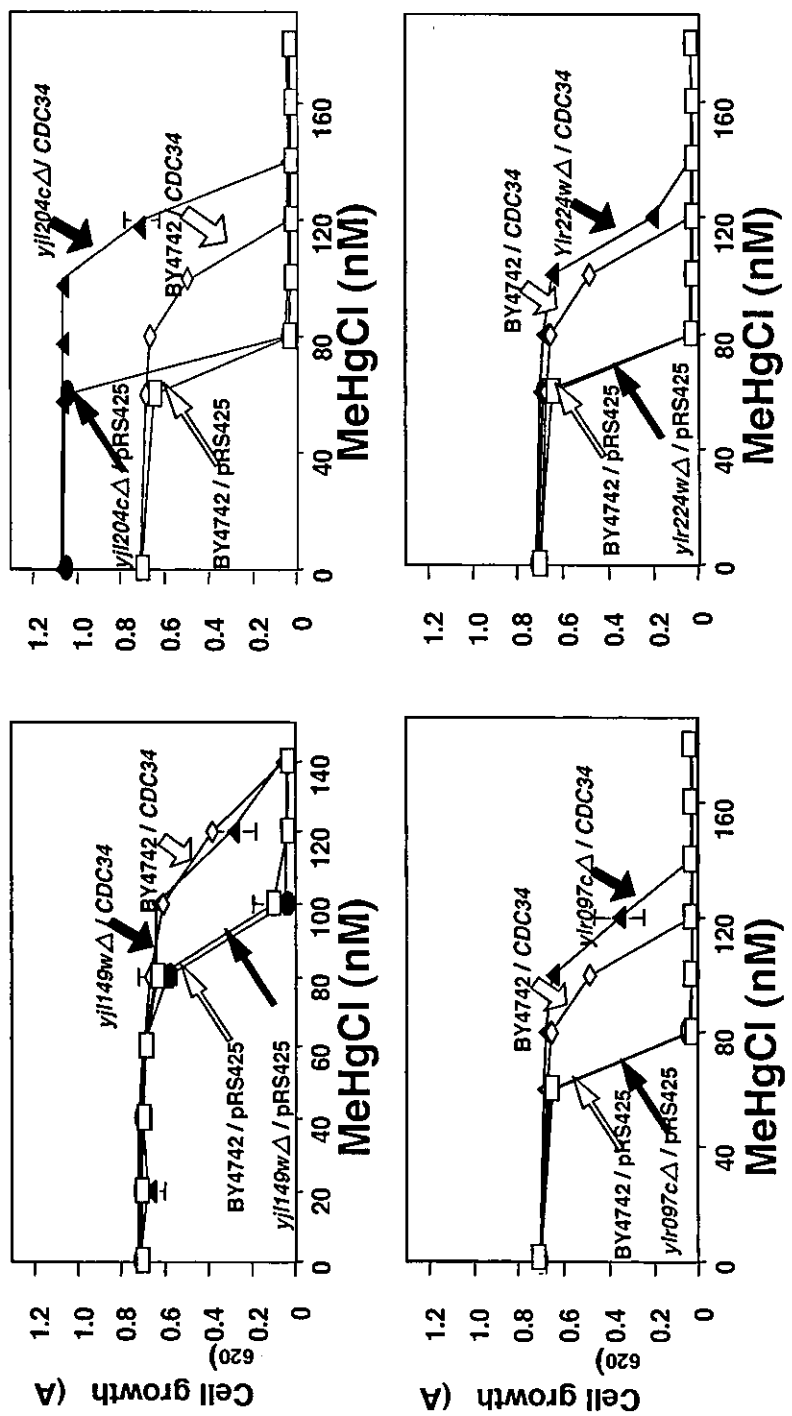


Fig. 11-2 Effect of deletion of YJL149w, YJL204c, YLR097c or YLR224w on MeHg sensitivity of yeast that overexpressed Cdc34

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

Bop3が関与するメチル水銀耐性機構

分担研究者 黄 基旭 東北大学大学院薬学研究科教務職員

Bop3 結合蛋白質の中で 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。

A. 研究目的

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 との関係性をメチル水銀耐性を指標として検討した。

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により行った。まず、酵母株を完全培地である YPD 培地 2 ml に植菌し 30℃で一晩振盪培養した後、この培養液を YPD 培地で 2×10^6 cells/ml になるように希釈した。この希釈培養液 50 ml を 1×10^7 cells/ml になるまで振盪培養した後に集菌し、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 になるように懸濁し、気相中、 30°C で 15 分間 incubate した。この懸濁液 $50 \mu\text{l}$ に該当遺伝子を組み込んだ発現 vector $5 \mu\text{l}$ 、加熱変性サケ精子 DNA $50 \mu\text{g}$ および 40% polyethylene-glycol (4000) $300 \mu\text{l}$ 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、 $100 \mu\text{l}$ の滅菌水で懸濁して SD (pRS425/-leu pKT10/-ura pYES2/-ura) 寒天培地に塗布し、 30°C で 2 日間培養した。

2. 遺伝子欠損株の作製

2-1. HIS3 マーカーによる作製

HIS3 マーカーを含む A397

plasmid を template として PCR を行い、それぞれの欠損株のマーカーを合成した。ここで合成した PCR 産物は、その両端部に標的遺伝子部位での組換えに必要な各遺伝子との相同配列を持っている。これらの PCR 産物を、酢酸リチウム法により W303B 株に導入することによって得られた histidine 非要求性 colony を、遺伝子欠損株の候補 colony とした。酵母からの遺伝子の回収は glass beads 法によって行った。まず、single colony を YPD 培地 2mL に植菌し、 30°C で一晩振盪培養した後に集菌し、breaking buffer $100 \mu\text{l}$ に懸濁し、

glass beads $0.3 \mu\text{g}$ および phenol/chloroform/isoamylalcohol (25:24:1) $100 \mu\text{l}$ を加え激しく攪拌した後、遺伝子を含む上澄を得た。この上澄溶液を isopropanol 沈殿により濃縮し、 $300 \mu\text{l}$ の滅菌水を加え遺伝子溶液とした。ここで、得られた遺伝子溶液を template として、各遺伝子の外側に設定した primer を用いて標的遺伝子領域を PCR により増幅し、その PCR 産物の大きさを agarose 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。

2-2. URA3 マーカーによる作製

まず、URA3 マーカーを含む targeting vector を作製した。pYES2 vector より URA3 マーカーを *NheI*/*ApaI* により切断し、0.8% アガロースゲル電気泳動を行い、目的のサイズの 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 URA3 マーカー断片を標的遺伝子が組み込まれた plasmid (pKT10-MSN4 pTarget T-RTS1) の標的遺伝子内部に導入するため、それぞれ適当な制限酵素 (pKT10-MSN4: *SphI*, pTarget T-RTS1: *XbaI*) で切断し、0.8% agarose ゲル電気泳動を行い、目的のサイズの DNA をゲルから切り出し、

GeneClean II Kit を用いて精製した。これと先ほど得られた URA3 マーカー断片を DNA ligation Kit Ver.2 を用いて連結した後、大腸菌 (XL-1) に Hanahan らの方法に従って導入した。コンピテントセル溶液 200 μ l にプラスミド溶液 10 μ l を加え、氷上に 30 分間静置した後、42°C で 45 秒間の熱ショックをかけ、さらに氷上に 2 分間静置した。この溶液に SOC 培地 0.8 ml 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 寒天培地に塗布し、37°C で一晚培養した。形成されたコロニーを ampicillin sodium salt 50 μ g/ml を含む LB 培地 2 ml で一晚浸漬培養した後、GeneElute Plasmid Mini-Prep Kit (Sigma) を用いて大腸菌より plasmid を回収し、targeting vector とした。この plasmid を template として PCR を行い、それぞれの欠損株のマーカーを合成した。ここで合成した PCR 産物は、その両端部に標的遺伝子部位での組換えに必要な各遺伝子との相同配列を持っている。これらの PCR 産物を、酢酸リチウム法により W303B 株に導入することによって得られた uracil 非要求性 colony を、遺伝子欠損株の候補 colony とした。酵母からの遺伝子の回収は glass beads 法によって行った。まず、single colony を YPD

培地 2 ml に植菌し、30°C で一晚振盪培養した後に集菌し、breaking buffer 100 μ l に件濁し、glass beads 0.3 μ g および phenol/chloroform/isoamylalcohol (25:24:1) 100 μ l を加え激しく攪拌した後、遺伝子を含む上澄を得た。この上澄溶液を isopropanol 沈殿により濃縮し、300 μ l の滅菌水を加え遺伝子溶液とした。ここで、得られた遺伝子溶液を template として、各遺伝子の外側に設定した primer を用いて標的遺伝子領域を PCR により増幅し、その PCR 産物の大きさを agarose 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

2-3. Kanamycin 耐性遺伝子 (KAN^r) マーカーによる作製 *Saccharomyces cerevisiae* (BY4742) 株の遺伝子を Kanamycin 耐性遺伝子マーカーで欠損させた COMP-SET1-A (EUROSCARF) を用い、それぞれの標的遺伝子の欠損株より chromosomal DNA を得た。これを template として PCR を行い、それぞれの欠損株マーカーを合成した。ここで合成した PCR 産物は、その両端部に標的遺伝子部位での組換えに必要な各遺伝子との相同配列を持っている。この PCR 産物を、酢酸リチ

ウム法により W303B 株に導入することによって得られた Geneticin 耐性 (KAN^r) colony を、遺伝子欠損株の候補 colony とした。酵母からの遺伝子の回収は glass beads 法によって行った。まず、single colony を YPD 培地 2ml に植菌し、30°C で一晩振盪培養した後に集菌し、breaking buffer 100 μ l に件濁し、glass beads 0.3 μ g および phenol/chloroform/isoamylalcohol (25:24:1) 100 μ l を加え激しく攪拌した後、遺伝子を含む上澄を得た。この上澄溶液を isopropanol 沈殿により濃縮し、300 μ l の滅菌水を加え遺伝子溶液とした。ここで、得られた遺伝子溶液を template として、各遺伝子の外側に設定した primer を用いて標的遺伝子領域を PCR により増幅し、その PCR 産物の大きさを agarose 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。

3. QuikChangeTMsite-directed mutagenesis kit を用いた変異導入法

Bop3 mutant は QuikChangeTMsite-directed mutagenesis kit (Stratagene) の protocol に従って、template として pRS425-BOP3 を用いて目的の塩基配列に *NheI* 部位を導入できるプライ

マーを設定し、PCR 反応を行い変異導入 plasmid を作製した。目的の制限酵素部位が導入されたことを制限酵素の切断により確認後、*NheI* で切断し、セルフライゲーションにより目的部位を欠失させた。その後、Bop3 mutant が正しく増幅されていることは sequence により確認した。

4. *BMH2* 遺伝子およびそのホモログである *BMH1* 遺伝子の cloning および遺伝子を発現する plasmid の作製

Bop3 に結合する蛋白質として明らかになっている Bmh2 およびそのホモログである Bmh1 をコードする遺伝子を酵母 chromosomal DNA を template とし、以下に示す primer を用い、PCR により cloning した。それぞれの PCR 産物は 0.8% agarose ゲル電気泳動を行い、目的のサイズの 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 を pGEM-T Easy vector (Promega) を用いて TA cloning を行った。各遺伝子の塩基配列は dideoxy sequence 法により確認した。次に酵母発現 vector である pKT10 に subcloning するため pGEM-T Easy-*BMH1* および pGEM-T Easy-*BMH2* と pKT10 を制限酵素 (*EcoRI*) で切断し、0.8%

アガロースゲル電気泳動を行い、目的のサイズの 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 pKT10 を DNA ligation Kit Ver.2 を用いて連結した後、大腸菌 (XL-1) に Hanahan らの方法に従って導入した。コンピテントセル溶液 200 μ l にプラスミド溶液 10 μ l を加え、氷上に 30 分間静置した後、42°C で 45 秒間の熱ショックをかけ、さらに氷上に 2 分間静置した。この溶液に SOC 培地 0.8 ml 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 寒天培地に塗布し、37°C で一晩培養した。形成されたコロニーを ampicillin sodium salt 50 μ g/ml を含む LB 培地 2 ml で一晩浸盪培養した後、GeneElute Plasmid Mini-Prep Kit (Sigma) を用いて大腸菌よりプラスミドを回収した。BMH1、BMH2 の塩基配列は sequence により確認した。

5. MSN2 遺伝子およびその homologue である MSN4 遺伝子の cloning および遺伝子を発現する plasmid の作製

Bmh2 に結合する蛋白質として明らかになっている Msn2 およびその homologue である Msn4 をコードする遺伝子を酵母 chromosomal DNA

を template とし、以下に示す primer を用い、PCR により cloning した。それぞれの PCR 産物は 0.8% agarose ゲル電気泳動を行い、目的のサイズの 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 を pGEM-T Easy vector (Promega) を用いて TA cloning を行った。各遺伝子の塩基配列は dideoxy sequence 法により確認した。次に酵母発現 vector である pYES2 および pKT10 に subcloning した。まず始めに、pGEM-T Easy-MSN2-1 ,pGEM-T Easy-MSN2-2 および pGEM-T Easy-MSN4-1, pGEM-T Easy-MSN4-2 と pYES2 をそれぞれを適当な制限酵素 (MSN2-1: *SacI/NcoI/AseI* MSN2-2: *NotI/AseI* pYES2: *SacI/NotI*, MSN4-1: *EcoRI/BsrBI* MSN4-2: *NotI/BsrBI* pYES2: *EcoRI/NotI*) で切断し、0.8%アガロースゲル電気泳動を行い、目的のサイズの 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 pYES2 を DNA ligation Kit Ver.2 を用いて連結した後、大腸菌 (XL-1) に Hanahan らの方法に従って導入した。コンピテントセル溶液 200 μ l にプラスミド溶液 10 μ l を加え、氷上に 30 分間静置した後、42°C で 45 秒間の熱ショックをかけ、さらに氷

上に2分間静置した。この溶液にSOC培地0.8 mlを加え、37℃で1時間培養した後、ampicillin sodium salt 50 μ g/mlを含むLB寒天培地に塗布し、37℃で一晩培養した。形成されたコロニーをampicillin sodium salt 50 μ g/mlを含むLB培地2mlで一晩浸盪培養した後、GeneElute Plasmid Mini-Prep Kit (Sigma)を用いて大腸菌よりプラスミドを回収した。その後、pYES2-MSN2およびpYES2-MSN4を適当な制限酵素 (MSN2:NotI MSN4:EcoRI)を用いてpKT10にsubcloningした。MSN2,MSN4の塩基配列はsequenceにより確認した。

6. BOP1 遺伝子、BOP2 遺伝子 FKH1 遺伝子および RTS1 遺伝子の cloning および遺伝子を発現する plasmid の作製

Bop1 および Bop2 と Bop3 に結合する蛋白質として明らかになっている Fkh1 およびその Rts1 をコードする遺伝子を酵母 chromosomal DNA を template とし、以下に示す primer を用い、PCR により cloning した。それぞれの PCR 産物は 0.8% agarose ゲル電気泳動を行い、目的のサイズの 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 を pTargetT vector

(Promega) を用いて TA cloning を行った。各遺伝子の塩基配列は dideoxy sequence 法により確認した。次に酵母発現 vector である pKT10 に subcloning するため pTargetT-BOP1、pTargetT-BOP2、pTargetT-FKH1 および pTargetT-RTS1 と pKT10 を制限酵素 (KpnI/XhoI) で切断し、0.8% agarose ゲル電気泳動を行い、目的のサイズの 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 pKT10 を DNA ligation Kit Ver.2 を用いて連結した後、大腸菌 (XL-1) に Hanahan らの方法に従って導入した。コンピテントセル溶液 200 μ l にプラスミド溶液 10 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かけ、さらに氷上に 2 分間静置した。この溶液に SOC 培地 0.8 ml を加え、37℃で 1 時間培養した後、ampicillin sodium salt 50 μ g/ml を含む LB 寒天培地に塗布し、37℃で一晩培養した。形成されたコロニーを ampicillin sodium salt 50 μ g/ml を含む LB 培地 2 ml で一晩浸盪培養した後、GeneElute Plasmid Mini-Prep Kit (Sigma) を用いて大腸菌よりプラスミドを回収した。Bop1 および Bop2 は定量 PCR 法 (実験方法 12 参照) によりそれぞれの mRNA 発現

を確認した。また、Fkh1 および Rts1 は Western blotting 法 (実験方法 14 参照) によって蛋白質の発現を確認した。

7. Yeast two-hybrid system における蛋白質結合実験に用いる plasmid の作製

Bop3 およびその結合蛋白質として明らかになっている Fkh1、Rts1、Bmh2 およびその homologue である Bmh1 をコードする遺伝子を酵母 chromosomal DNA を template とし、以下に示す primer を用い、PCR により cloning した。それぞれの PCR 産物は 0.8% アガロースゲル電気泳動を行い、目的のサイズの 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 を pGEM-T Easy vector (Promega) を用いて TA cloning を行った。各遺伝子の塩基配列は dideoxy sequence 法により確認した。次に酵母 Two-hybrid system 用 vector である pDBLeu (*BOP3*) または pPC86 (*BMH1*, *BMH2*, *FKH1*, *RTS1*) に subcloning するため pGEM-T Easy-*BOP3*, pGEM-T Easy-*BMH1*, pGEM-T Easy-*BMH2*, pGEM-T Easy-*FKH1* および pTargetT-*RTS1* と pDBLeu および pPC86 を適当な制限酵素 (pGEM-T

Easy-*BOP3*, pDBLeu : *NheI/NotI*, pGEM-T Easy-*BMH1*, pGEM-T Easy-*BMH2*, pGEM-T Easy-*FKH1*, pTargetT-*RTS1*, pPC86 : *saII/NotI*) で切断し、0.8% agarose ゲル電気泳動を行い、目的のサイズの 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 pDBLeu または pPC86 を DNA ligation Kit Ver.2 を用いて連結した後、大腸菌 (XL-1) に Hanahan らの方法に従って導入した。コンピテントセル溶液 200 μ l にプラスミド溶液 10 μ l を加え、氷上に 30 分間静置した後、42°C で 45 秒間の熱ショックをかけ、さらに氷上に 2 分間静置した。この溶液に SOC 培地 0.8 ml を加え、37°C で 1 時間培養した後、ampicillin sodium salt 50 μ g/ml (pPC86, pPC86-*BMH1*, pPC86-*BMH2*, pPC86-*FKH1*, pPC86-*RTS1*) または Kanamycin sulfate 20 μ g/ml (pDBLeu, pDBLeu-*BOP3*) を含む LB 寒天培地に塗布し、37°C で一晩培養した。形成されたコロニーを ampicillin sodium salt 50 μ g/ml, Kanamycin sulfate 20 μ g/ml を含む LB 培地 2 ml で一晩浸漬培養した後、GeneElute Plasmid Mini-Prep Kit (Sigma) を用いて大腸菌よりプラスミドを回収した。

8. Yeast two-hybrid system 用 plasmid の酵母への導入

酵母の形質転換は酢酸リチウム法により行った。まず、酵母 AH109 株を完全培地である YPD 培地 2 ml に植菌し 30℃で一晩振盪培養した後、この培養液を YPD 培地で 2×10^6 cells/ml になるように希釈した。この希釈培養液 50 ml を 1×10^7 cells/ml になるまで振盪培養した後に集菌し、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 になるように懸濁し、気相中、30℃で 15 分間 incubate した。この懸濁液 50 μ l に 8 で作製した酵母 Two-hybrid system 用 plasmid、加熱変性サケ精子 DNA 50 μ g および 40% polyethyleneglycol (4000) 300 μ l を加え、30℃で 30 分間 incubate した。その後、42℃で 15 分間の heat shock をかけた後に集菌し、100 μ l の滅菌水で懸濁して SD (-leu, -trp) 寒天培地に塗布し、30℃で 2 日間培養した。

9. Yeast two-hybrid system における蛋白質結合実験

9 での形質転換により得られた colony を SD (-leu, -trp) 培地 2 mL で 1×10^8 cells/ml になるまで浸盪培養した後、SD (-leu, -trp) 寒天培

地および SD (-leu, -trp, -his) 寒天培地に塗布し、30℃で培養した。

10. GFP (green fluorescent protein) 融合遺伝子の作製

GFP (green fluorescent protein) 融合遺伝子の作製は pBlueScript-GFP536 plasmid を template とし PCR により行った。PCR 産物は 0.8% agarose ゲル電気泳動を行い、目的のサイズの 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 を pGEM-T Easy vector (Promega)を用いて TA cloning を行った。その後、適当な制限酵素 (*Hind*III/*Bam*HI) で切断し、pKT10-MSN2 に subcloning した。GFP の塩基配列は sequence により確認した。

11. GFP-Msn2 融合蛋白質の局在変化の観察

10 で作製した pKT10-GFP-MSN2 を酢酸リチウム法により形質転換を行った。ここで得られた Colony を 2 ml の SD (-ura) 培地で一晩浸盪培養した後、その培養液を SD (-ura) 培地で 2 倍希釈しさらに log phase になるように 2 時間浸盪培養した。この培養液を 96-well plate に 180 μ l 添加後、塩化メチル水銀 (final 80 nM) 20 μ l を添加し 30℃で 5 min、

10 min、30 min 培養後、その培養液 5 μ l をスライドガラス上にスポットし、蛍光顕微鏡を用いて GFP の蛍光を観察した。

12. 定量 PCR 法

酵母を培養した後に total RNA を調整し cDNA を作製した。まず、3 μ g の total RNA にランダムプライマー (50 ng/ μ l) 1 μ l および滅菌精製水を加え全量を 12 μ l にし、70 $^{\circ}$ C、10 分間 incubate した後に 1 分間氷冷した。この溶液に 5 x First-strand buffer 4 μ l、0.1 M DTT 2 μ l、10 mM dNTP 1 μ l を加えて 25 $^{\circ}$ C で 5 分間 incubate した後に Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase (M-MLV RT)(Gibco) を 200 units 加えて 25 $^{\circ}$ C で 10 分間、42 $^{\circ}$ C で 50 分間、70 $^{\circ}$ C で 20 分間 incubate したものを cDNA とした。この cDNA を template とし iQ SYBR Green Supermix (BIO-RAD) およびそれぞれのオリゴヌクレオチドを最終濃度が 400 nM になるように反応溶液を調整した。PCR は iCycler iQ Detection System (BIO-RAD) で行い、経時的に蛍光の変化の検出を行った。cDNA が PCR によって単一のバンドとして増幅するかどうかを電気泳動で確認した。

13. 酵母のメチル水銀に対する感受性

酵母の single colony を SD 培地 2 ml に植菌し一晩振盪培養した後、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。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 0~140 nM) 20 μ l を添加し 30 $^{\circ}$ C で 48 時間培養後、620 nm における吸光度を microplate reader で測定して酵母の増殖を調べた。

14. 蛋白質発現の確認 (Western-blotting 法)

酵母を 2 ml の SD 培地に植菌し 30 $^{\circ}$ C で一晩振盪培養した後、2,300xg、4 $^{\circ}$ C で 5 分間遠心し、その沈殿に 2 ml の冷滅菌蒸留水を加えて、振盪した後に、2,300xg、4 $^{\circ}$ C で 5 分間遠心して沈殿として集菌した。この操作を 2 回繰返して得られた菌体に lysis buffer (20 mM Tris-HCl (pH7.5)、1 mM EDTA、5 mM MgCl₂、50 mM KCl、5% glycerol、3 mM DTT、1 mM phenylmethylsulphonyl fluoride、1 μ g/ml pepstatin A) と glass-beads を加えて、40 分間、4 $^{\circ}$ C で混和した後に、20,000xg、4 $^{\circ}$ C で 10 分間遠心して、細胞抽出液とした。この細胞抽出液に電気泳動用 sample

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な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な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 を使用しているのにもかかわらず、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応答し、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* Δ) 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