

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 高発現でみ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 (*msn2msn4rtg3Δ*) を作製し、Bop3 を高発現 (*BOP3/msn2msn4rtg3Δ*) 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/msn2msn4rtg3Δ* 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、G₂/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/threonine 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 (*rts1Δ*) を作製し、*BOP3* を導入 (*BOP3/rts1Δ*) してメチル水銀への感受性を検討した。その結果、*BOP3/rts1Δ* 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* Δ 、*bmh2rts1* Δ 、*fkh1rts1* Δ) および三重欠損株 (*bmh2fkh1rts1* Δ) 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* Δ (pRS425/*fkh1* Δ) 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* Δ 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* Δ 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お互い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* Δ 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* Δ 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。

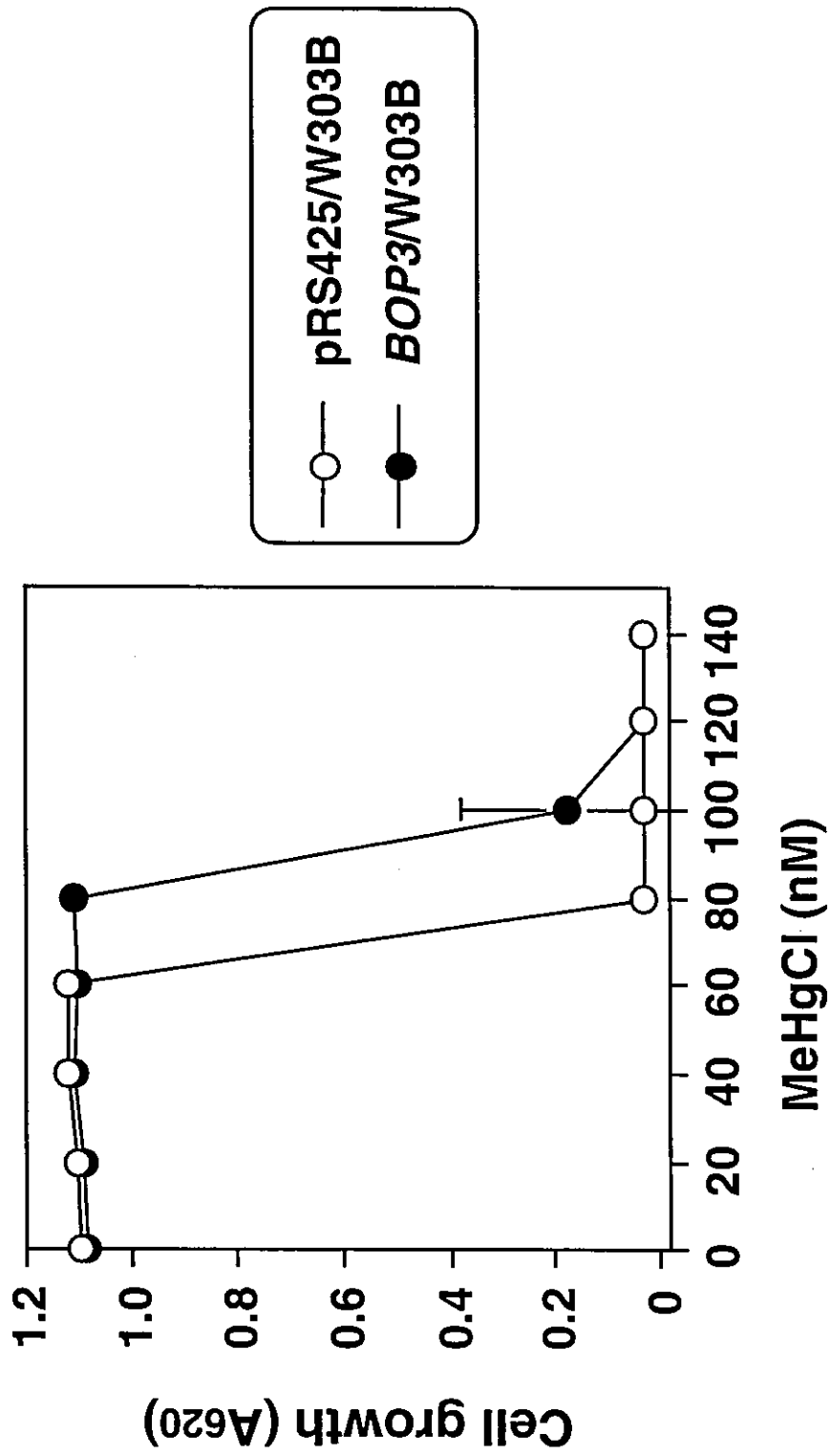
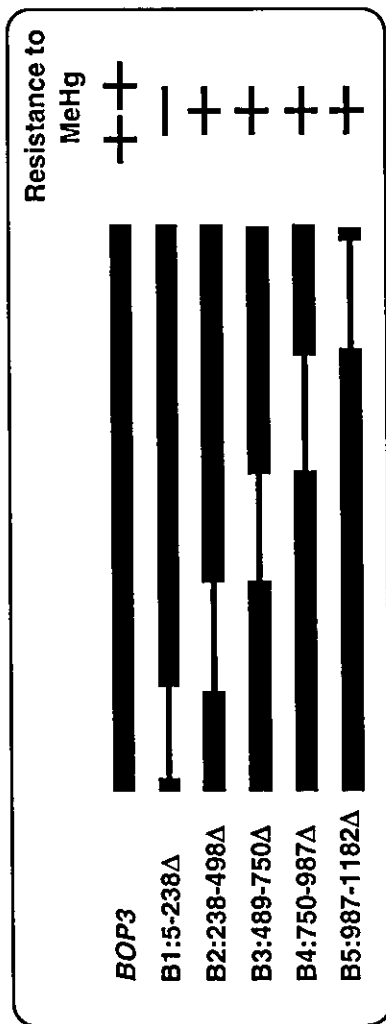


Fig. 1 Sensitivity of yeast cells that overexpressed Bop3 to methylmercuric chloride (MeHg)

(a)



(b)

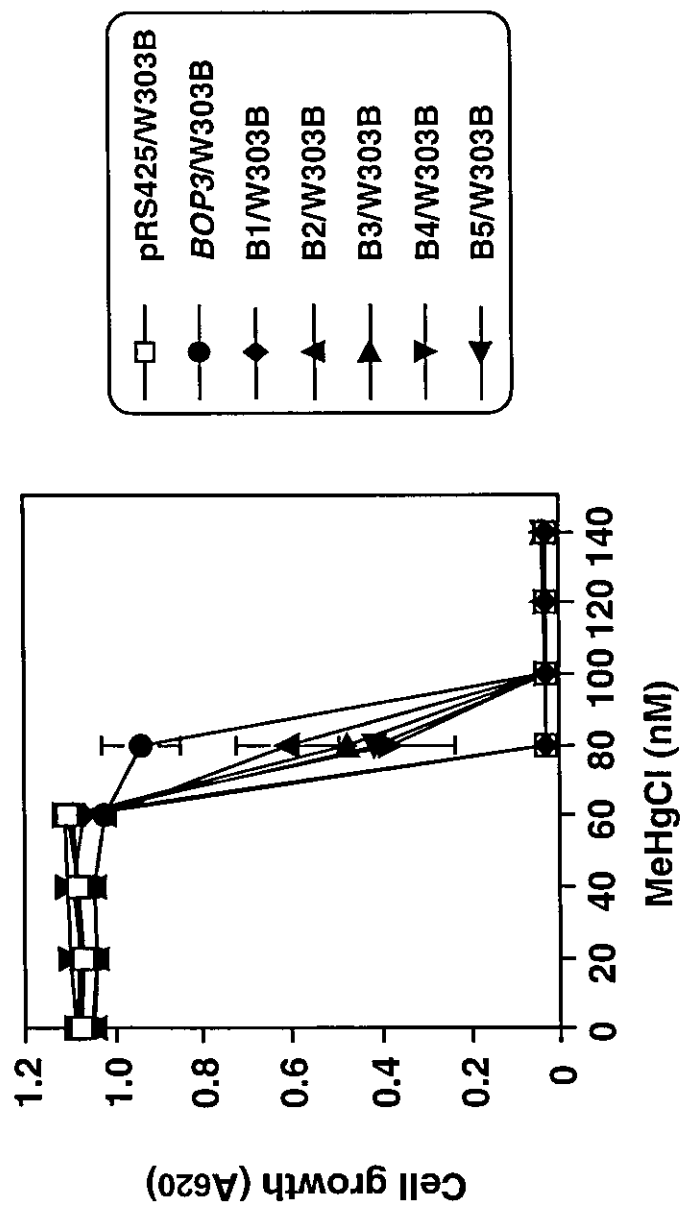


Fig. 2 (a) Schematic representation of the various deletion mutants of *BOP3*.
(b) Sensitivity of those mutants to MeHg.

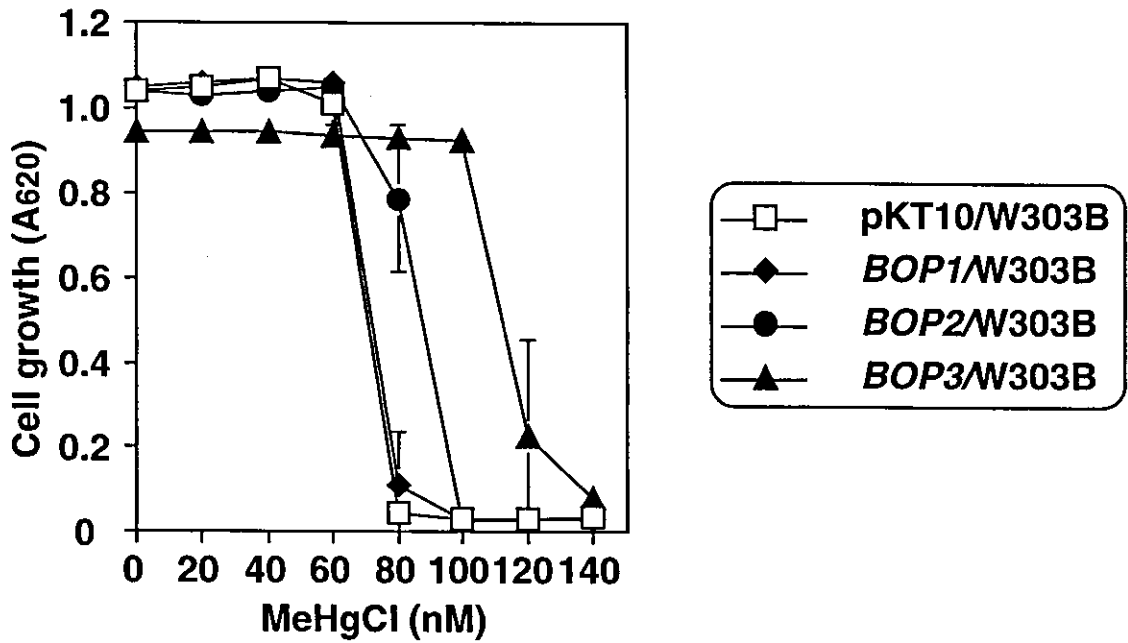


Fig. 3 Sensitivity of cells that overexpressed Bop1 or Bop2 to MeHg

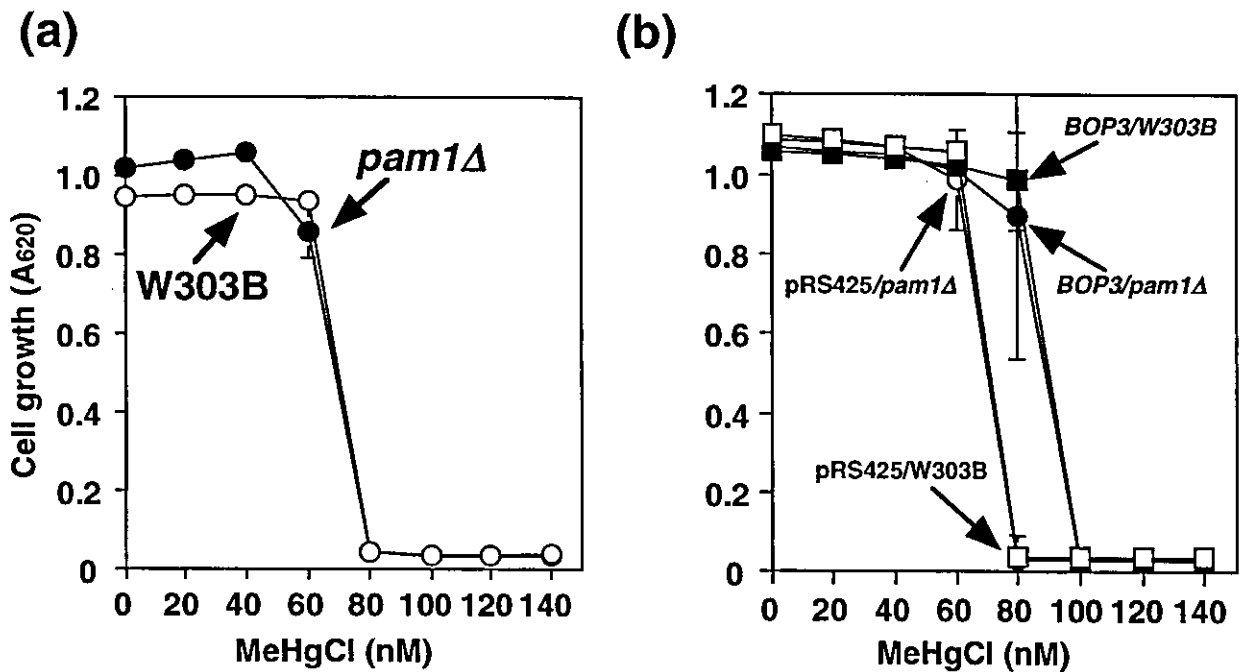
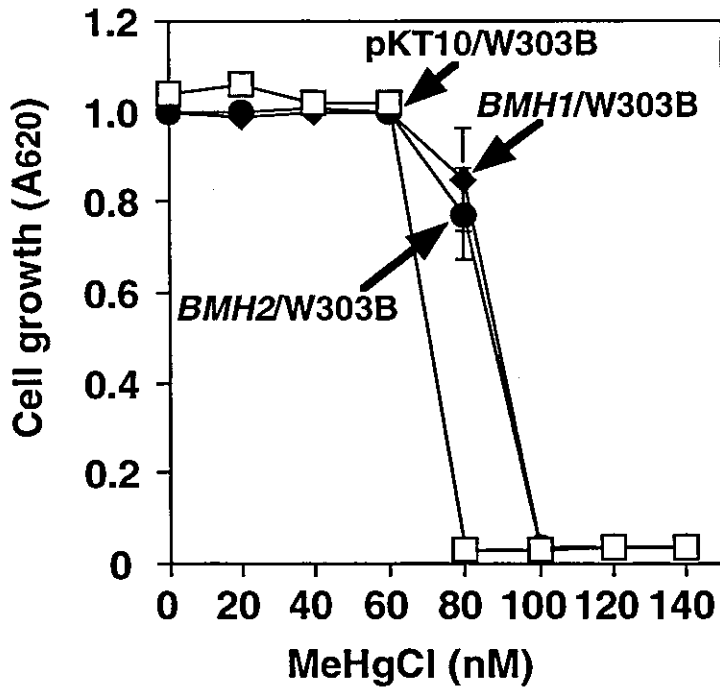


Fig. 4 (a) Sensitivity of *PAM1* deletion mutant strains (*pam1*Δ) to MeHg. (b) Effect of *PAM1* deletion on MeHg-sensitivity of yeast that overexpressed Bop3.

(a)



(b)

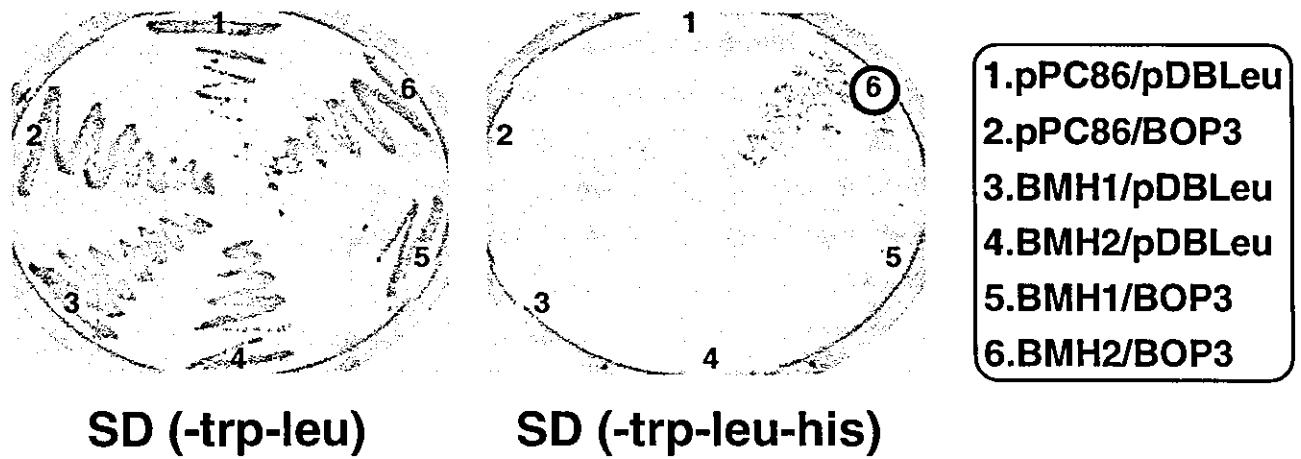


Fig. 5 (a) Sensitivity of cells that overexpressed Bmh1 or Bmh2 to MeHg. (b) Interaction between Bop3 and Bmh2.

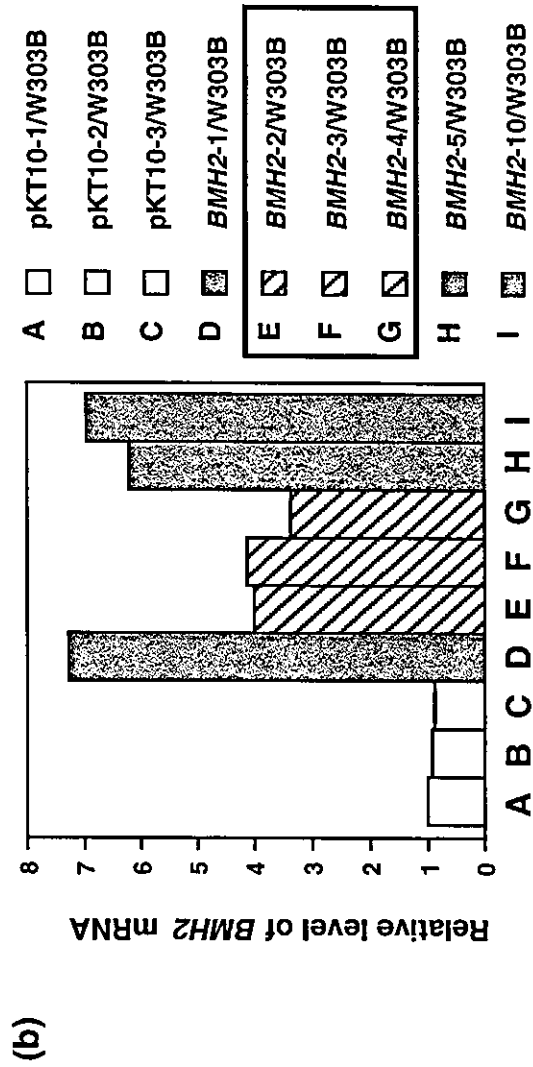
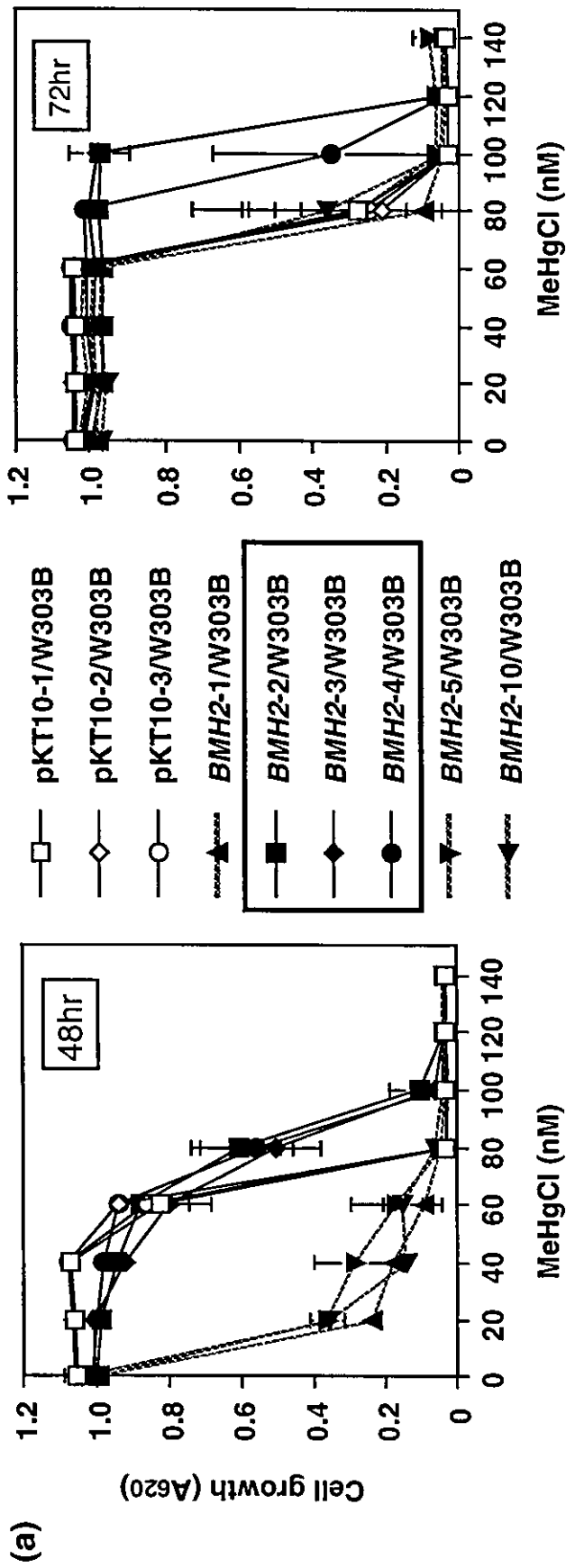
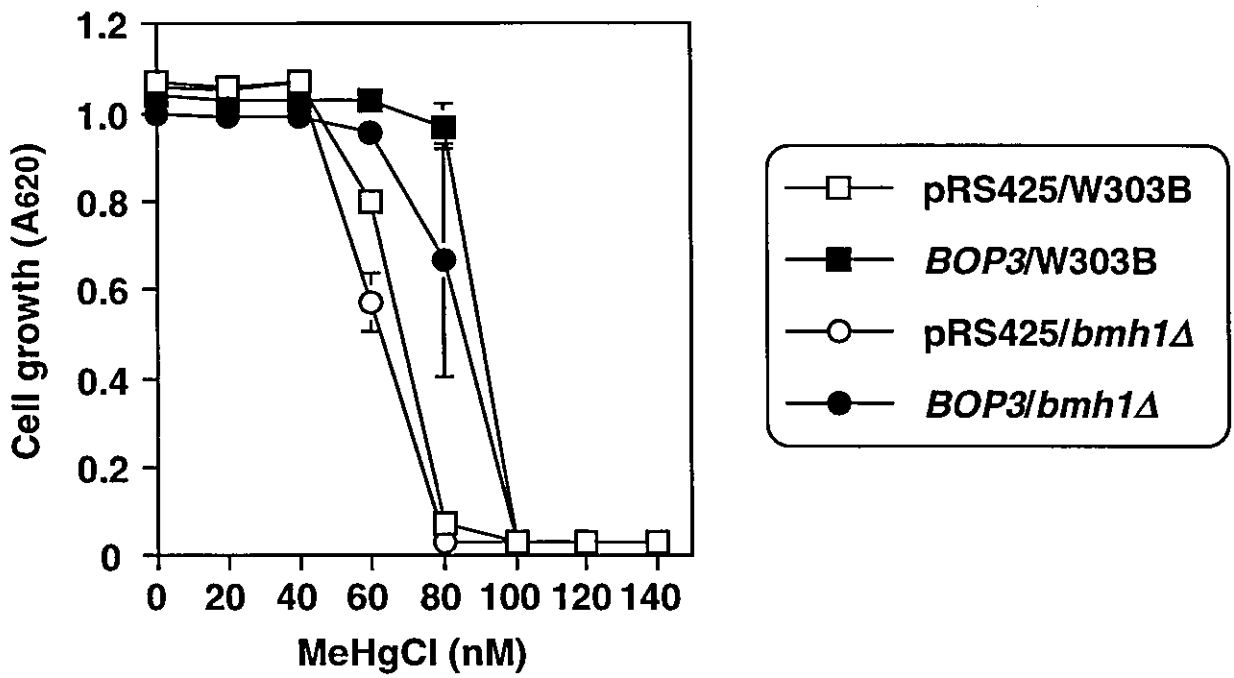


Fig. 6 (a) Sensitivity of several clones that overexpressed Bmh2 to MeHg. (b) Relative level of *BMH2* mRNA derived from different clones.

(a)



(b)

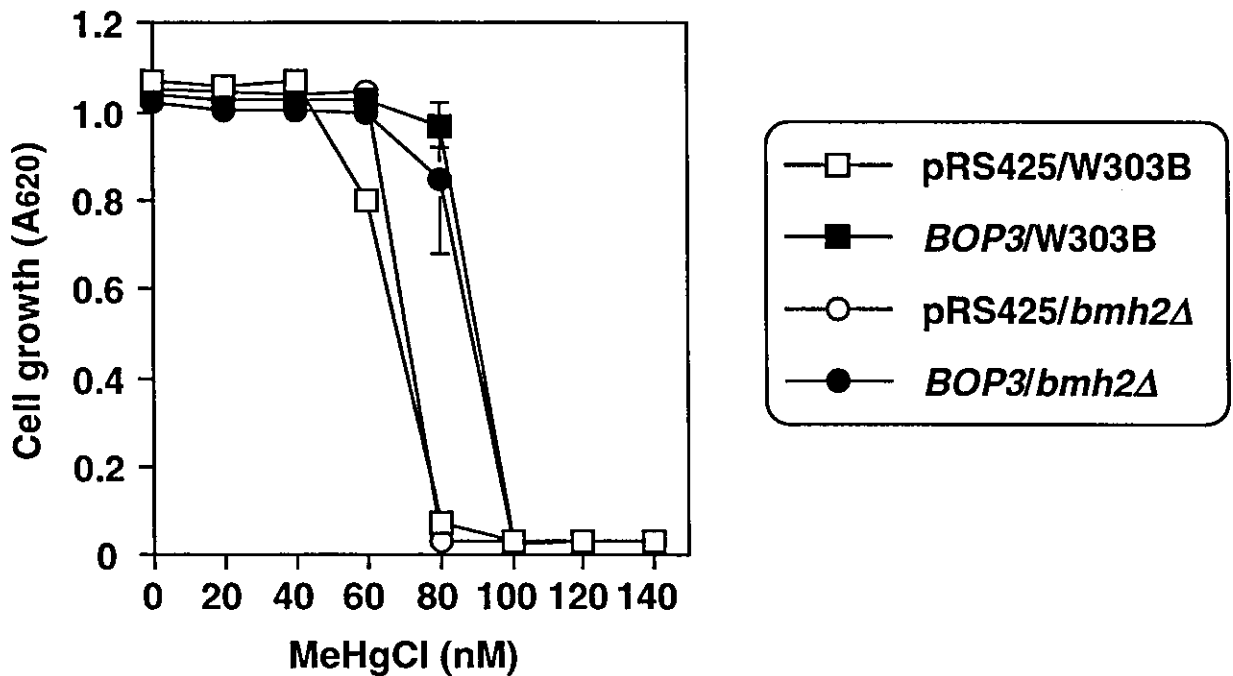


Fig. 7 Effect of deletion of *BMH1* gene (a) or *BMH2* gene (b) on MeHg-sensitivity of yeast that overexpressed Bop3

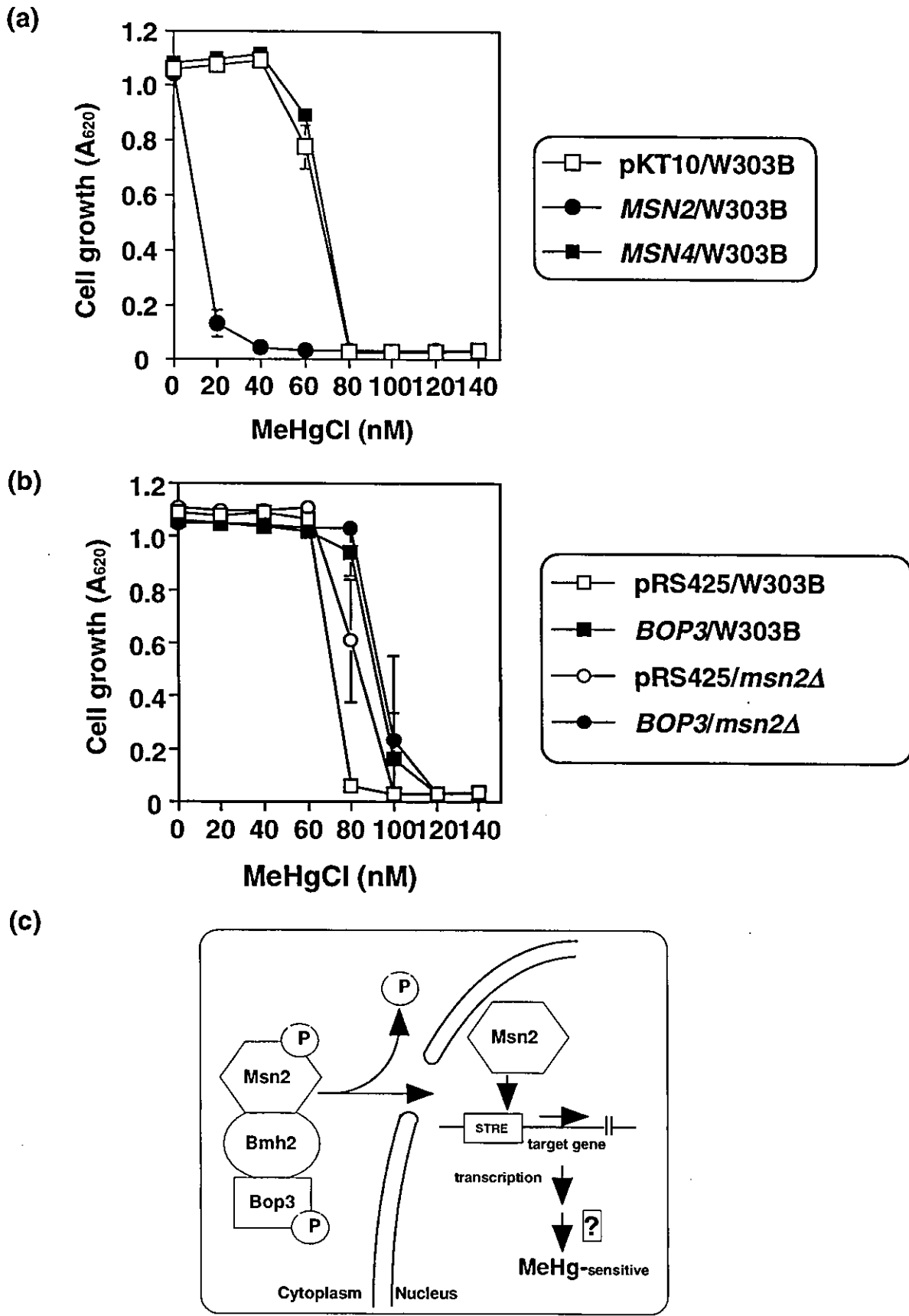


Fig. 8 (a) Sensitivity of yeast cells that overexpressed Msn2 or Msn4 to MeHg. (b) Effect of deletion of *MSN2* on MeHg- sensitivity of yeast that overexpressed Bop3. (c) The model for Bop3-mediated resistance to MeHg through Bmh2-Msn2 complex.

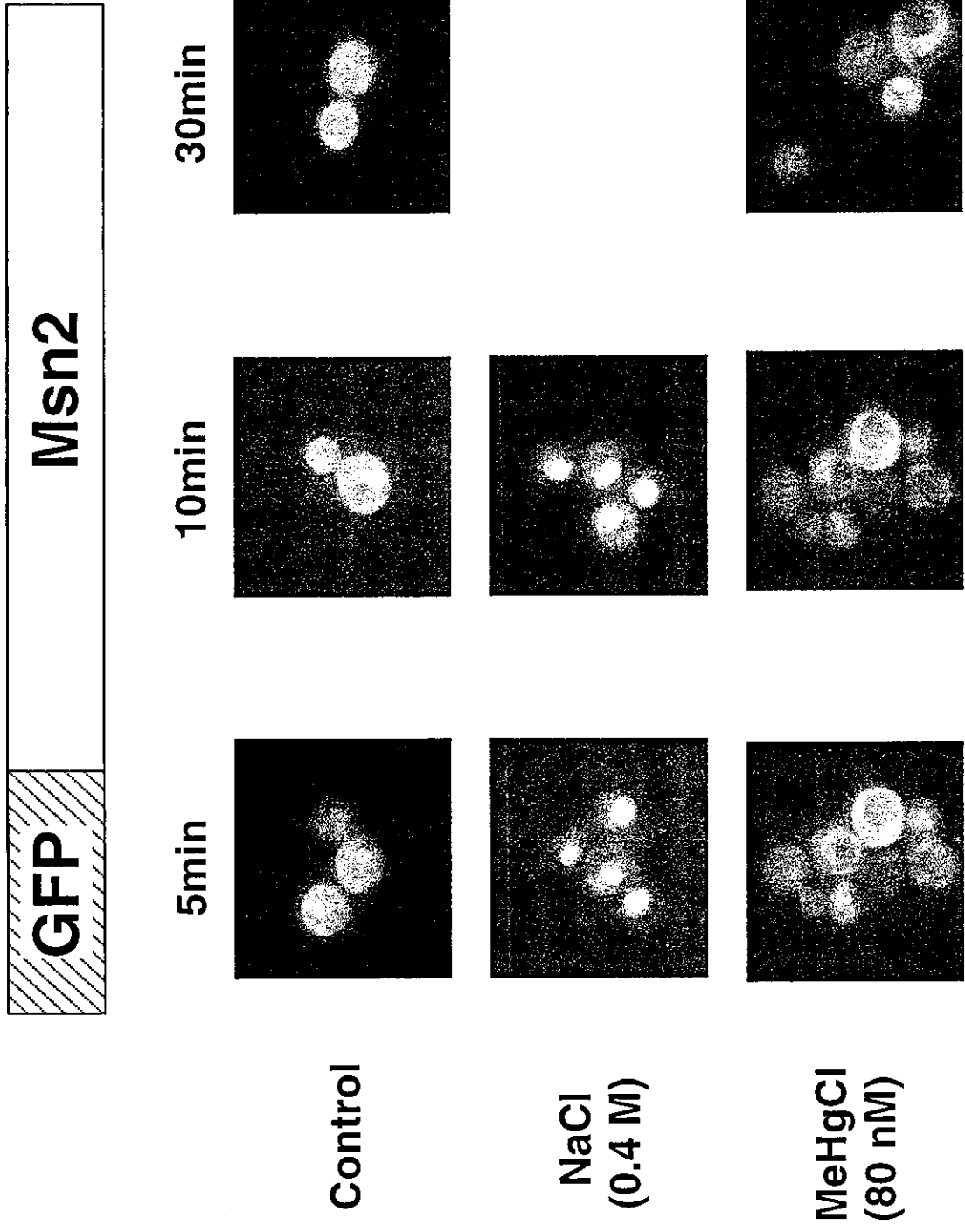


Fig. 9 (a) Schematic representation of GFP-Msn2. (b) Subcellular localization of GFP-Msn2 in yeast cells after treatment with MeHg.

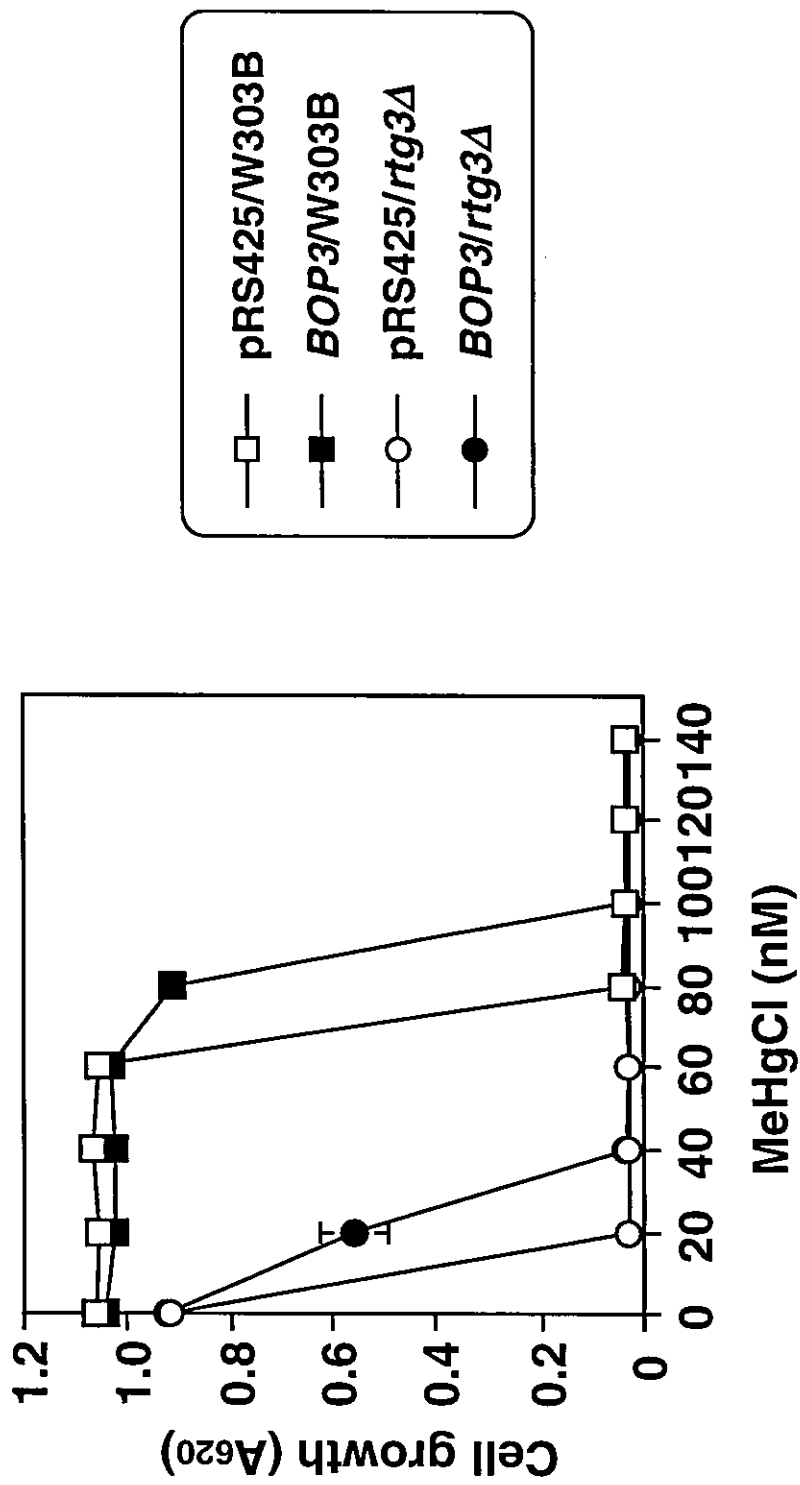


Fig. 10 Effect of deletion of RTG3 on MeHg-sensitivity of yeast that overexpressed Bop3

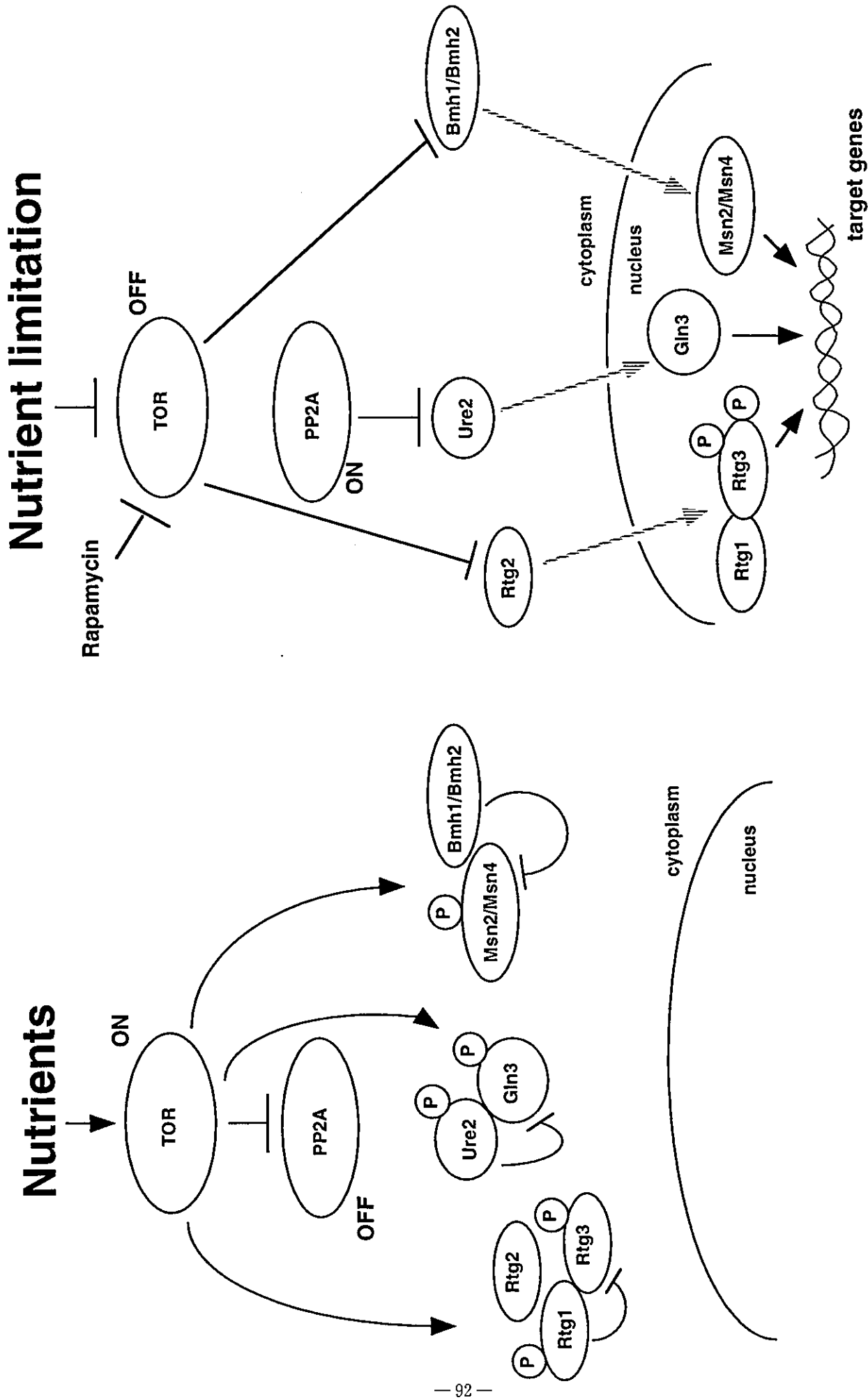
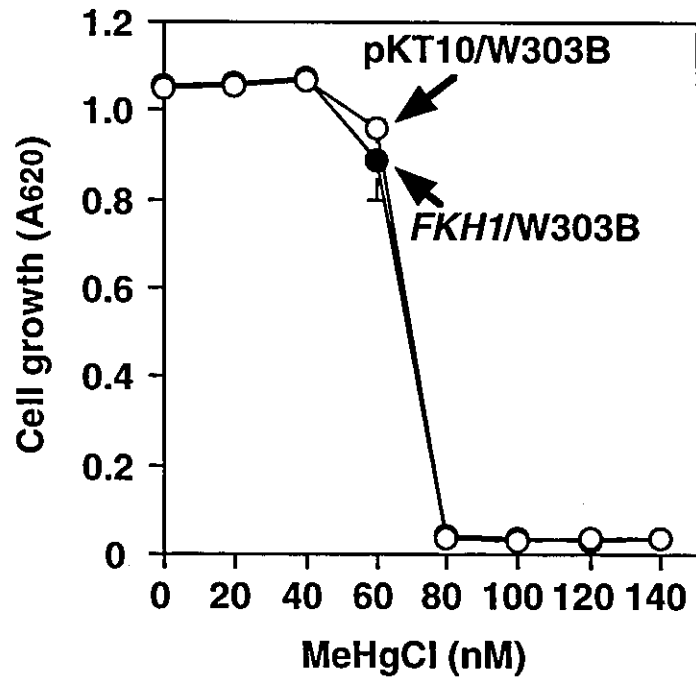


Fig. 11 TOR controls nuclear import of transcription factors

(a)



(b)

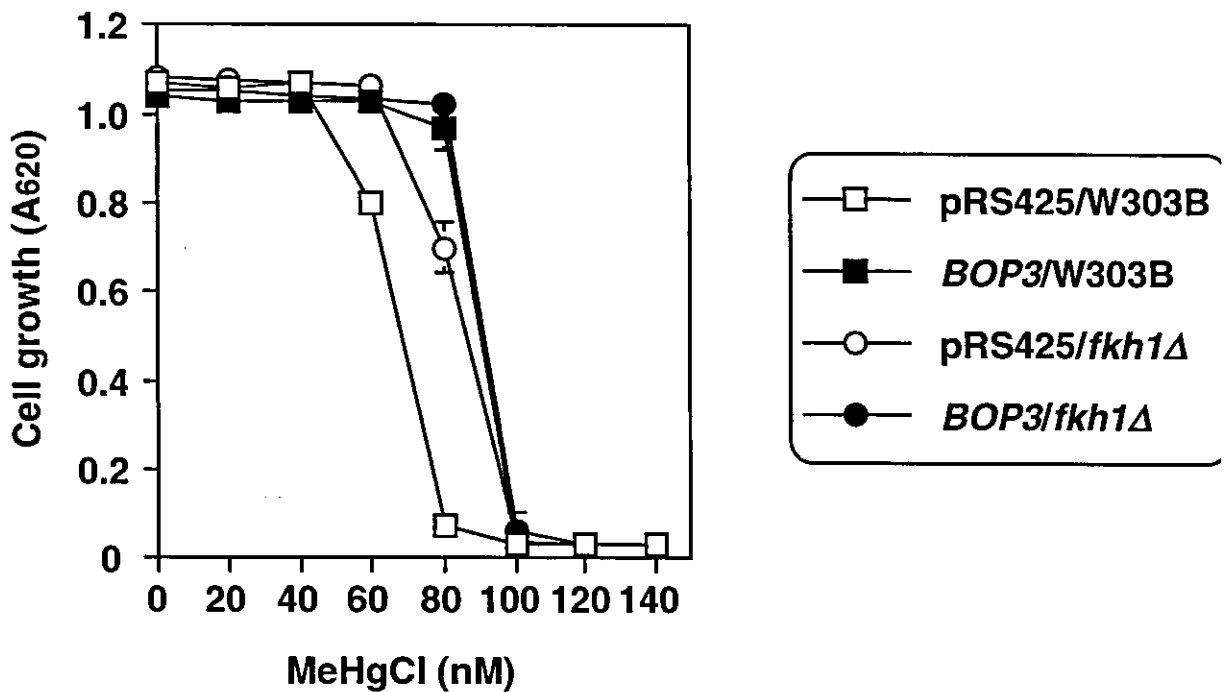


Fig. 12 (a) Sensitivity of yeast cells that overexpressed Fkh1 to MeHg. (b) Effect of deletion of *FKH1* on MeHg-sensitivity of yeast that overexpressed Bop3.

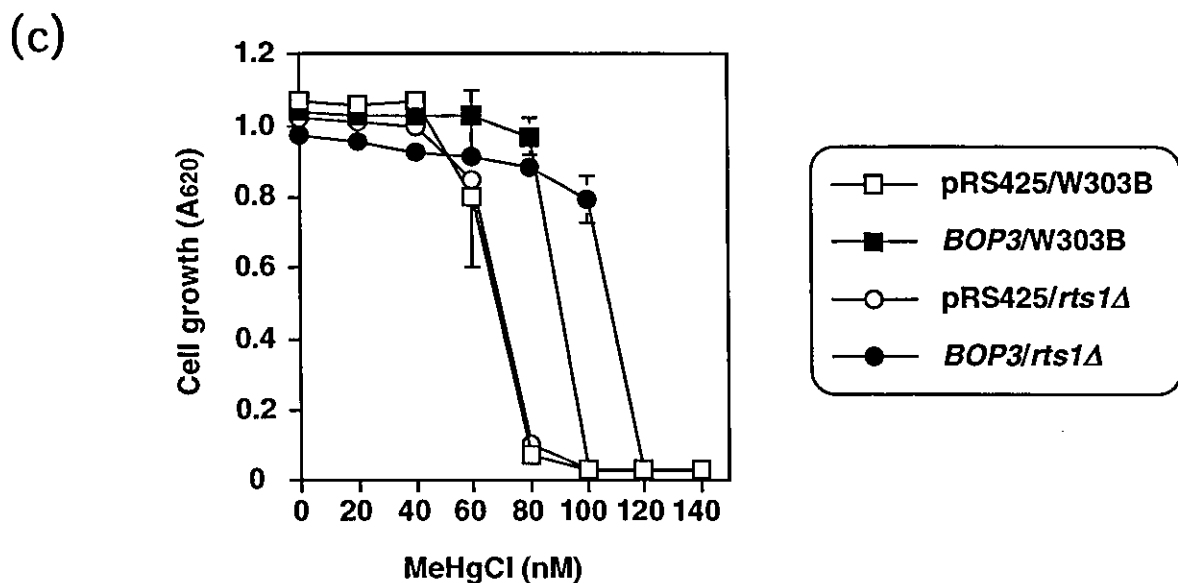
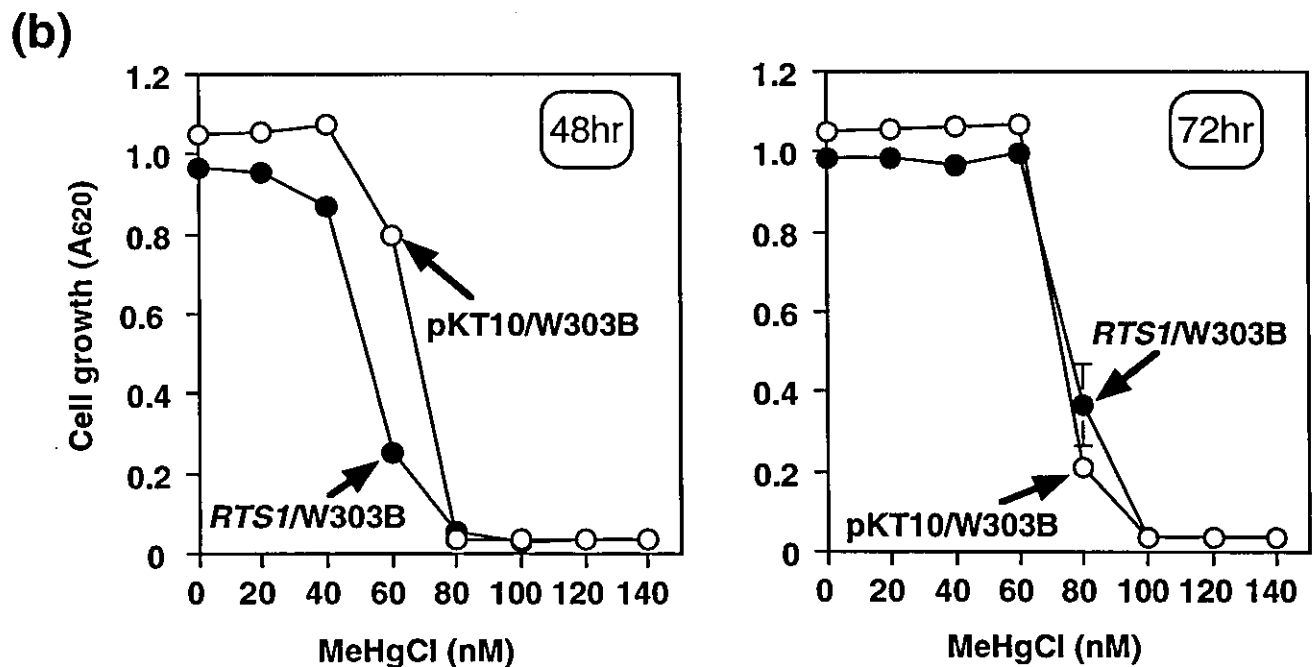
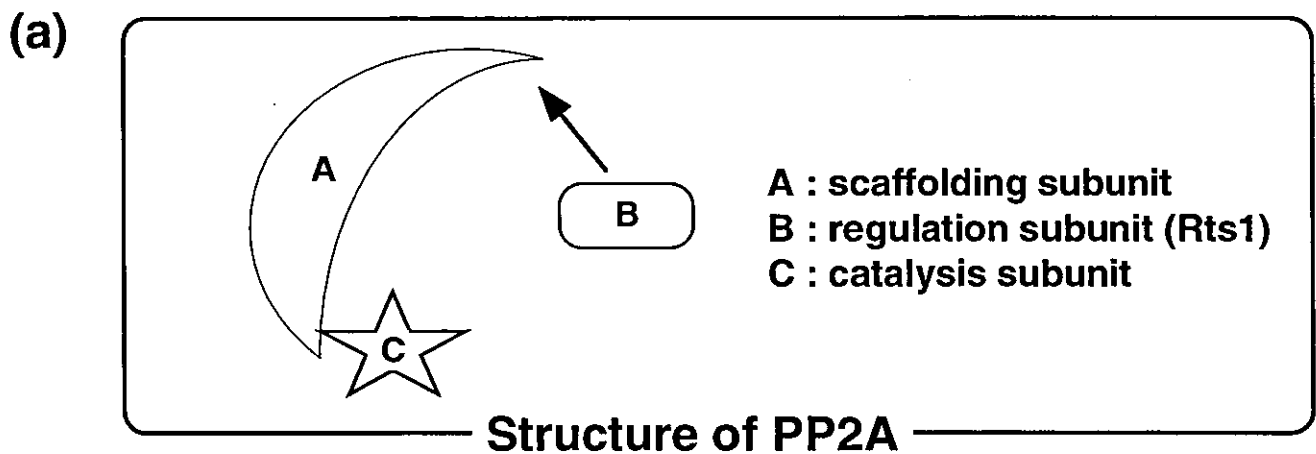


Fig. 13 (a) Structure of PP2A. (b) Sensitivity of yeast cells that overexpressed *Rts1* to MeHg. (c) Effect deletion of *RTS1* on MeHg-sensitivity of yeast that overexpressed *Bop3*.

	Overexpression	Deletion	Involvement in Bop3 related resistance to MeHg
<i>BOP3</i>	++		
<i>PAM1</i>		NE	X
<i>BMH1/2</i>	+	+	X
<i>MSN2</i>	S	+	O
<i>MSN4</i>	NE	NE	
<i>RTG3</i>		S	X
<i>FKH1</i>	NE	+	O
<i>RTS1</i>	NE	NE	O

+: Resistant NE: No effect S: Sensitive

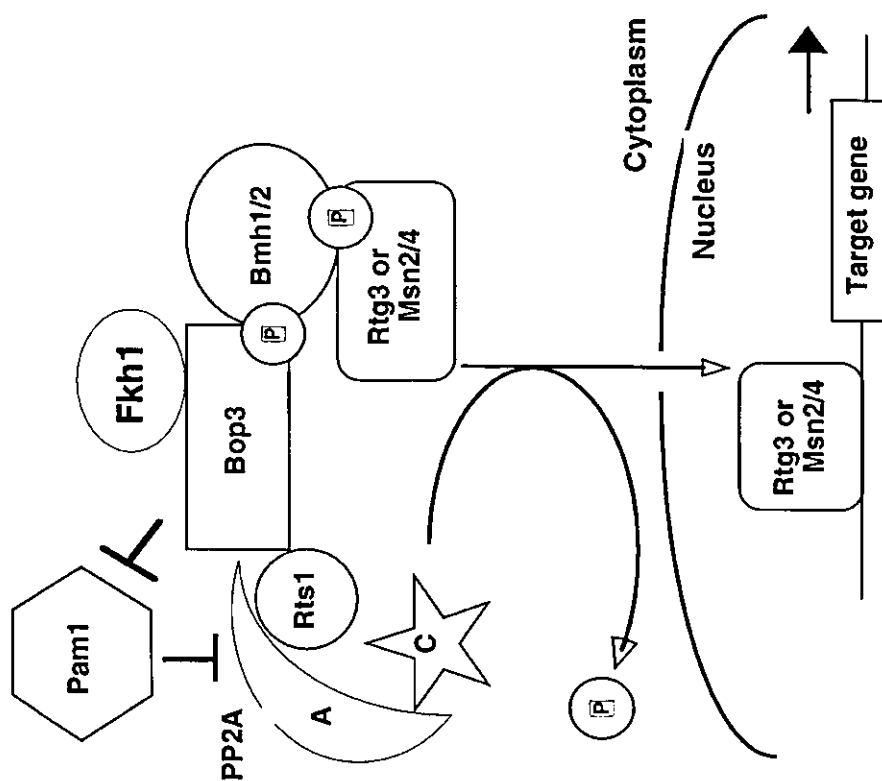


Fig. 14 Summary of results obtained from the present study

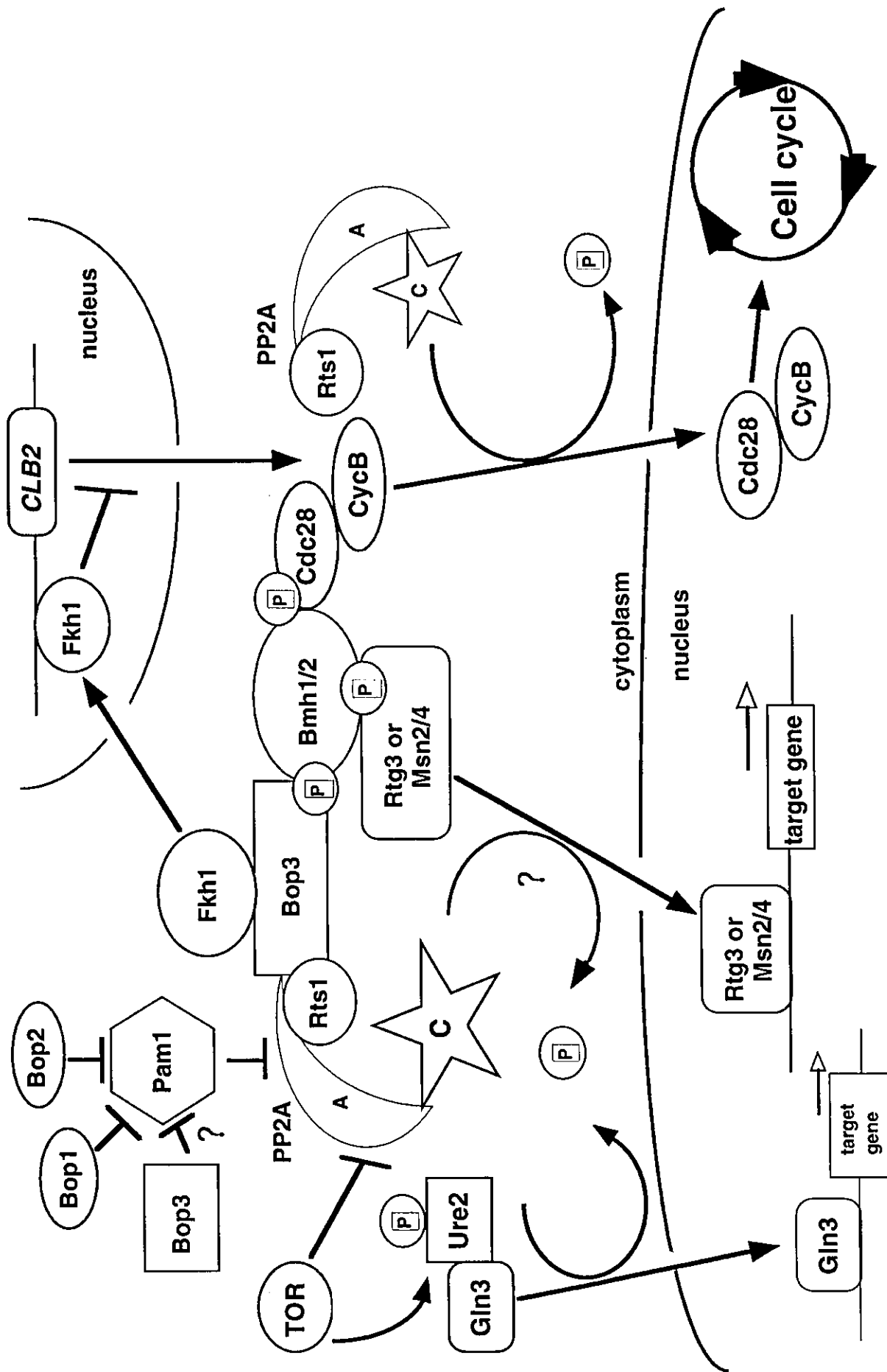


Fig. 15 The relationship between Bop3 and Bop3-related proteins