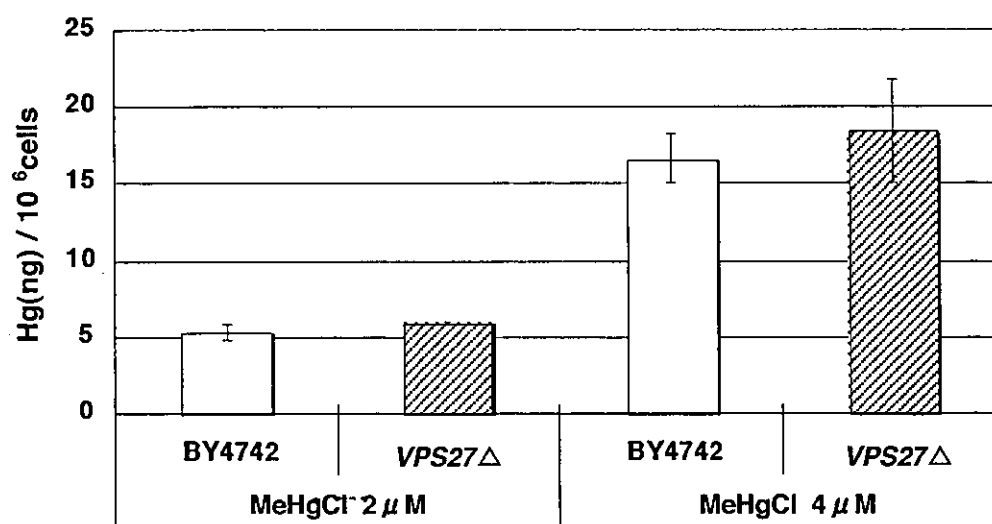


Fig. 4 液胞への輸送経路とメチル水銀感受性との関係



**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  $2 \times 10^6$  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  $2 \times 10^9$  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  $\mu$ L に MSN2/pKT10 plasmid 1  $\mu$ g、加熱変性サケ精子 DNA 50  $\mu$ g および 40% polyethylene-glycol 300  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $1 \times 10^5$  cells/180  $\mu$ L になるように希釈した。この希釈培養液を 96-well plate に  $1 \times 10^5$  cells/well になるように 180  $\mu$ 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  $\mu$ M) 20  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ L を加え懸濁後、glass beads 0.3 g、phenol/chloroform /isoamylalcohol (25:24:1、PCI) 200  $\mu$ L を加えて 3 分間激しく攪拌した。遠心分離後、水層 150  $\mu$ L に 1 M NaCl 30  $\mu$ L、isopropanol 150  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ L に上記の plasmid 溶

液を 1  $\mu$ 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  $\mu$ 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 2mL 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  $1 \times 10^5$  cells/180  $\mu$ L になるように希釈した。この希釈培養液を 96-well plate に  $1 \times 10^5$  cells/well になるように 180  $\mu$ L 添加後、塩化メチル水銀 (final : 0, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140 nM) を 20  $\mu$ 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  $\mu$ L を加えてよく攪拌し、更に酸性フェノール 200  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ g/11  $\mu$ L となるように希釈し、これに 1  $\mu$ L の oligo (dT)<sub>12-18</sub> 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  $\mu$ L、0.1 M DTT 2  $\mu$ L、5×First strand buffer 4  $\mu$ L を加え、42℃で5分間 incubate した。incubate 後、逆転写酵素 M-MLV RT を 1  $\mu$ 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  $\mu$ L の RNase H

を加え 37℃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. $\beta$ -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℃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  $\mu$ 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  $\mu$ L ずつ添加した。攪拌後、-80℃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*  $\beta$ -*D*-galactopyranoside)を添加した溶液を 125  $\mu$ L ずつ添加して、蛍光光度計 Spectramax Geminixs (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 ( $OD_{600}$ ) および反応時間で補正することにより、 $\beta$ -galactosidase activity を算出した。

#### 11. Msn2 truncation mutants の作製

Msn2 truncation mutants は Quik Change™ 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* 処理にて鋳型 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 $\mu$  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



切断後精製しておいた pKT10 plasmid を DNA ligation kit ver.2 を用いて連結後、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。塩基配列をシーケンス解析した後、以下の primer を用いた定量 PCR 法により Sok2 の発現を確認した。

#### 15. GFP 融合 Sok2 発現 plasmid の作製

pRS315 Met GFP×2-HA-BamHI vector の BamHI、Sall site に Sok2 の ORF を挿入することで作製した。まず、chromosomal DNA を template とし、以下に示す BamHI、Sall 切断部位を持つ各 primer を用いて、PCR により SOK2 を増幅した。得られた PCR 産物および上記の vector を制限酵素 BamHI、Sall で切断し、1%アガロースゲル電気泳動後、目的サイズの DNA 断片をゲルより切り出し、GeneClean II kit を用いて精製した。得られた DNA 断片と vector を DNA ligation kit ver.2 を用いて連結し、大腸菌に導入した後培養し、plasmid を回収した。目的の DNA が導入されていることを制限酵素 BamHI、Sall による切断にて確認した。

#### 16. 蛍光顕微鏡を用いた Sok2 の細胞内分布の観察

pKT10 もしくは MSN2/pKT10 plasmid、および 4 で得られた plasmid を酢酸リチウム法により Y700 株に導入した。得られたコロニーを SD (-leu, -ura) 培地 2 mL に植菌し、30℃で一晩振盪培養した。培養液を遠心分離で集菌後、SD (-leu, -met, -ura) 培地 1 mL で 1 時間振盪培養することで GFP が融合した Sok2 を発現させた。核染色は 1 mg/mL の DAPI 溶液を 1 μL (final 1 μg/mL) を同時に添加することにより行った。1 時間培養後、蛍光蛋白質 GFP の蛍光、及び DAPI による核染色を観察した。

#### 17. SOK2 発現レベルの検討

pKT10 もしくは MSN2/pKT10 plasmid を酢酸リチウム法により、Y700 株に導入後、single colony を SD (-trp, -ura) 液体培地 2 mL に植菌後、30℃で log phase の状態になるまで培養した。遠心分離により集菌した後、RNA 抽出、cDNA 作製を行い、定量 PCR を行った。

#### 18. HIS3 reporter plasmid の作製

スクリーニングに用いるレポーター plasmid は GFAT 遺伝子のプロモーター転写活性を調べるために用い

た plasmid を用いて、*lacZ* の ORF の一部を制限酵素 *Bam*HI、*Sac*I を用いて切り出し、そこに *HIS3* の ORF を挿入することで作製した。まず、chromosomal DNA を template とし、以下に示す *Bam*HI、*Sac*I 切断部位を持つ各 primer と反応条件を用いて、PCR により *HIS3* を増幅した。PCR 産物は PCI 等量を加えて攪拌し、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って DNA を析出させた。この DNA 断片および GFAT promoter-*lacZ*/K7 を制限酵素 *Bam*HI、*Sac*I で切断し、1%アガロースゲル電気泳動後、目的サイズの DNA 断片をゲルより切り出し、GeneClean II kit を用いて精製した。得られた DNA 断片と K7 を連結し、大腸菌に導入した後、LB (Amp)培地で一晩振盪培養し、plasmid を回収した。目的の DNA が導入されていることを制限酵素 *Bam*HI、*Sac*I による切断にて確認した。

#### 19. GFAT 遺伝子の転写に関与する細胞内因子のスクリーニング方法

*MSN2*/pKT10、2 で作製した *HIS3* reporter plasmid および酵母 genomic DNA library を酢酸リチウム法により酵母 Y700 株に導入し、

histidine を含まない SD 寒天培地で培養した。この Y700 株 (histidine 要求性細胞) は GFAT 遺伝子上流の活性化配列に制御されているレポーター遺伝子 *HIS3* を持っているため、陽性の clone は histidine を含まない SD 寒天培地でも生育可能となる (Fig. 14)。バックグランドによる影響は、酵母 genomic DNA library の代わりに空 vector である YEp13 を導入した酵母が histidine を含まない SD 寒天培地で生存不可能であったことから、影響がないことを確認した。得られた酵母からの plasmid 抽出および選別は、第二章第二節 4 と同様の方法により、酵母から plasmid を抽出し、TE buffer の代わりに Milli-Q 10  $\mu$ L を加え、plasmid 溶液とした。その後、酵母 genomic DNA library を以下の方法により選別した。

氷冷したチューブに、40  $\mu$ L のエレクトロコンピテント細胞と 1  $\mu$ L の抽出した plasmid 溶液を混合し、氷上で 1 分間保持した。ジーンパルサー本体のコンデンサー容量を 25.0  $\mu$ F、設定電圧を 2.50 kV にセットし、パルスコントローラーの抵抗値を 200  $\Omega$  にセットした後、DNA-エレクトロコンピテント細胞混合物を氷冷したエレクトロポレーション用のキュベットに移した後、キュベットをジーンパルサーのキュベットチャンバーにセット

しパルスを与えた。その後、すばやく SOC 培地 1 mL を加え、菌体を懸濁した後、懸濁液を 37℃、1 時間振盪培養することで回復培養した。1 時間後、菌体を LB (Amp) 寒天培地に塗布し、37℃で一晩静置培養した。得られたコロニーを 1 mL の 1×M9 Salts で回収し、そのうち 100 μL を -Leu 選択寒天培地に塗布し、37℃、20 時間培養し、形成されたコロニーからプラスミドを回収した。

#### (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. Msn2 高発現によるメチル水銀高感受性を消失させる細胞内因子の検索

Msn2 高発現によるメチル水銀毒性増強作用のメカニズムを解明する足掛かりとして、Msn2 高発現によるメチル水銀高感受性を消失させる遺伝子を Fig. 1 に示す方法により検索した。まず酵母 genomic DNA library を酢酸リチウム法により Msn2 高発現酵母に導入し、得られた形質変換体のメチル水銀感受性を調べた。その結果、Msn2 高発現酵母が成育できない濃度 (0.2 μM) のメチル水銀を含む SD 培地

においても生育可能な酵母を得ることができた。しかし、ここで生育可能となった酵母は導入された遺伝子とは無関係に、突然変異などによって、Msn2 高発現によるメチル水銀高感受性が消失した可能性も考えられる。そこで、導入した遺伝子によって Msn2 高発現によるメチル水銀高感受性が消失したことを確認するために、得られた酵母から plasmid を抽出した後、Msn2 高発現酵母に再導入し、メチル水銀感受性を調べた。その結果、この plasmid が導入された酵母は全て、そのメチル水銀感受性が control 酵母と同程度までに低下した。従って、この plasmid 中に挿入された genomic DNA fragment (F1) 内に、Msn2 高発現によるメチル水銀毒性増強作用を消失させる遺伝子が含まれていると考えられる。

そこで F1 の forward から約 700 bp の部分の塩基配列を決定した後に、この配列を *Saccharomyces* Genome Database (<http://www.yeastgenome.org/>) を用いて検索し、F1 の塩基配列を決定した。その結果、F1 は第 11 染色体の 241437 bp から 250584 bp の領域であることが判明した。F1 中には *GFAT*、*LAP4* および *YKL102C* の 3 つの遺伝子の open reading frame (ORF) が含まれていたため、Msn2 高発現によるメ

チル水銀毒性増強作用の消失に関与する遺伝子を同定するために、F1 を適当な制限酵素で処理して F1-1 と F1-2 を作製した (Fig. 2)。この 2 種類の fragment (F1-1、1-2) を YEp13 に subclonig し、得られた plasmid を Msn2 高発現酵母に導入して、メチル水銀感受性を調べたところ、F1-1 を含む plasmid を導入した酵母のメチル水銀感受性が control 酵母と同程度にまで低下した (Fig. 3)。このことから、F1-1 内に存在する遺伝子 *GFAT* が Msn2 高発現によるメチル水銀毒性増強作用の消失に関与することが明らかとなった。*GFAT* は *GFAT* (L-glutamine · D-fructose-6-phosphate amidotransferase) をコードする遺伝子である。*GFAT* は hexosamine 経路の初発反応を司る律速酵素であり、細胞内で合成される全てのアミノ糖の前駆体であるグルコサミン-6-リン酸の合成を触媒することから、細胞生存に必須の酵素であることが明らかとなっている (12, 13)。更に興味深いことに、*GFAT* は酵母細胞内におけるメチル水銀の標的分子であることが明らかにされている (14,15)。

## 2. Msn2 高発現が *GFAT* 遺伝子の発現に与える影響

*GFAT* を高発現させることによっ

て、Msn2 高発現によるメチル水銀高感受性が回復したことから、Msn2 が *GFAT* に対してなんらかの抑制的影響を及ぼしている可能性が考えられる。そこで、まず Msn2 高発現が *GFAT* 遺伝子 (*GFAT1*) の発現に及ぼす影響を調べるために、定量 PCR 法により *GFAT* mRNA の発現量を調べた。その結果、control 酵母に比べて Msn2 高発現酵母では *GFAT* mRNA 量が約 50% 減少しており、この減少は *GFAT* を共発現させることにより回復した (Fig. 4)。また  $\beta$ -galactosidase assay 法により *GFAT* 遺伝子のプロモーター転写活性を調べたところ、Msn2 高発現酵母では control 酵母に比べて *GFAT* 遺伝子のプロモーター活性が減少することが明らかとなった (Fig. 5)。このことから、Msn2 高発現による *GFAT* 遺伝子の発現抑制により、酵母が高いメチル水銀感受性を示す可能性が考えられる。

## 3. メチル水銀毒性増強に関与する Msn2 内のドメイン解析

2 の結果から Msn2 高発現によるメチル水銀毒性増強は *GFAT* 遺伝子の発現の抑制を介したものであることが示唆された。この Msn2 高発現によるメチル水銀毒性増強作用に関与する Msn2 内のドメインを特定するために、Fig. 6 に示すように Msn2 の

truncation mutants を作製した。Msn2 構造中には様々なストレスに  
応答して、細胞質から核内に移行するの  
に必要な NLS (nuclear localization  
signal ; 核移行シグナル) ドメインと  
DNA との結合に関与すると考えられ  
る Zn-finger ドメインが存在するこ  
とが知られている(6,7)。そこで、翻訳  
開始コドンの直後から NLS ドメイン  
手前までを欠失させた Msn2 (4~576  
Δ)、NLS ドメインのみを欠失させた  
Msn2 (NLSΔ)、Zn-finger ドメイン  
のみを欠失させた Msn2 (Zn-finger  
Δ)、翻訳開始コドン直後から  
Zn-finger ドメインまでを欠失させた  
Msn2 (4~699Δ)、NLS ドメインから  
終止コドン手前までを欠失させた  
Msn2 (577~2112Δ)をそれぞれ酵母  
中に発現させて、メチル水銀感受性を  
検討した。その結果、Msn2 (4~576  
Δ)、Msn2 (NLSΔ)、Msn2 (Zn-finger  
Δ)、Msn2 (4~699Δ)を高発現させた  
酵母は full-length の Msn2 を高発現  
させた酵母と同程度の高いメチル水  
銀感受性を示したが、これに対して、  
Msn2 (577~2112Δ)を高発現させた  
酵母のメチル水銀感受性は control 酵  
母とほぼ同様であった (Fig. 7)。以上  
の結果から Msn2 高発現によるメチル  
水銀毒性増強作用には Msn2 の NLS  
および Zn-finger ドメインを含む N  
末端側領域は関与しないと考えられ、

Msn2 の転写因子としての機能とは異  
なる細胞質における未知の機能が関  
与するものと考えられる。

#### 4. Msn2結合蛋白質がメチル水銀感 受性に与える影響

Msn2は細胞質中で何らかの作用を  
発揮することによって *GFAT* 遺伝子の  
転写を抑制する可能性が考えられる。  
そこで、Msn2が有する未知の機能に  
関与する手掛かりを得るために、  
Msn2と相互作用することが知られて  
いる蛋白質 *Bmh2*、*Sok2*、*Taf2*、*Whi2*  
について、メチル水銀毒性との関係を  
検討した。これまでに Msn2と結合す  
る蛋白質としては、細胞内で多彩な役  
割を担っていることが知られている  
ヒト 14-3-3蛋白質 (16, 17, 18) の酵  
母 homologue である *Bmh2* (19, 20)、  
酵母の成育に転写因子として機能す  
る *Sok2* (21)、転写に関与する TAF(II)  
複合体の構成因子である *Taf2* (22)、細  
胞周期や Msn2の細胞内分布を調節す  
ることでストレス応答に関与する  
*Whi2* (23,24)が知られている。そこで、  
それぞれの蛋白質をコードする遺伝  
子を欠損させた酵母 (*TAF2*欠損酵母  
は生存不能なので除いた) のメチル水  
銀感受性を検討した。その結果、*WHI2*  
欠損酵母はメチル水銀耐性を示し、  
*SOK2*欠損酵母は親株よりも高いメチ  
ル水銀感受性を示した (Fig. 9)。

SOK2欠損酵母におけるGFAT遺伝子のプロモーター転写活性および発現レベルを調べたところ、共に親株に比べて低い値を示した (Fig. 10)。このことから、Sok2はGFAT遺伝子の発現の促進に関与する可能性が考えられる。そこで、Sok2の高発現がGFAT mRNA量に与える影響を調べたところ、顕著な増加が認められた (Fig. 11)。

以上の結果から、Sok2がMsn2高発現によるメチル水銀毒性増強作用に関与している可能性が考えられる。Sok2は核に局在し、転写因子として機能する (21, 28)ことから、Msn2高発現がSok2の核内移行を抑制する可能性も否定出来ない。そこでGFPを融合したSok2を酵母内に発現させ、蛍光顕微鏡によりその蛍光を観察することにより、Msn2高発現がSok2の細胞内分布に与える影響を調べた。その結果、Sok2の多くは核内に分布したが、Msn2を高発現させてもこのSok2の細胞内分布はほとんど影響を受けなかった (Fig. 12)。次に、Msn2の高発現がSOK2の発現に与える影響を調べたところ、Msn2を高発現させた酵母は、control酵母と比べて、SOK2 mRNA量が低値を示した (Fig. 13)。このことから、Msn2の高発現はSOK2の発現を抑制するものと考えられる。

## 5. GFAT遺伝子の転写に関与する因子の検索

Msn2高発現による酵母のメチル水銀毒性増強作用はSOK2の発現の抑制を介したGFAT遺伝子の発現抑制によるものである可能性が示唆された。しかし、Msn2を高発現させた酵母では、SOK2欠損時よりも顕著なGFAT遺伝子の発現抑制が認められることから、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る。そこで、GFAT遺伝子の転写に関与する細胞内因子を検索することにより、Msn2高発現によるメチル水銀毒性増強作用に関与するSok2以外の因子の同定を試みた。

Msn2高発現によりGFAT遺伝子プロモーターの転写活性が抑制されることから、Fig. 14に示す原理に基づいた方法で、このMsn2高発現による転写活性抑制を回復させるSok2以外の細胞内因子の同定を行った。このスクリーニングに用いる酵母はhistidine要求性なのでhistidineを含まない培地中では生育できない。この酵母にGFAT遺伝子プロモーターの制御下で発現するHIS3 (histidine合成酵素)遺伝子およびMSN2遺伝子を導入し、ヒスチジン不含の寒天培地に塗布したところ、酵母のコロニー形成は観察されなかった。そこで、この酵母に染色

体DNA libraryを導入したところコロニーを形成する酵母を得ることができた。これら酵母中に導入された染色体 DNA fragment (F2)内に、Msn2による*GFAT*遺伝子プロモーターの転写活性抑制を回復させる因子が含まれていると考えられる。そこで、ここで得られた染色体DNA fragment (F2)をMsn2高発現酵母に導入したところ、Msn2高発現による*GFAT*遺伝子プロモーターの転写活性抑制およびメチル水銀高感受性化が共に回復した (Fig. 15)。このことから、F2にMsn2高発現によるメチル水銀毒性増強作用に関与する遺伝子が含まれていると考えられる。

F2の塩基配列を決定したところ、F2は第4染色体の453502 bpから463731 bpの領域に由来することが判明した。このF2には*RCR2*、*YDR003W-A*、*RAD57*、*MAF1*、*SOK1*、*TRP1*、*YDR008*の7つの遺伝子のopen reading frame (ORF) が含まれていたため、Msn2高発現による*GFAT*遺伝子プロモーターの転写活性抑制を回復させる遺伝子を同定するために、F2に含まれている遺伝子をFig. 16に示す制限酵素で切り出し、*YEp13*にsubcloningした。また*SOK1*に関しては適当な制限酵素切断部位が存在しなかったことから、PCRを用いて発現plasmidを作製した。これら

のplasmidをMsn2高発現酵母に導入し、メチル水銀に対する感受性を調べたところ、F2-1、F2-2、F2-3、F2-4を高発現させた酵母ではメチル水銀に対して、Msn2高発現酵母と同様高い感受性を示すのに対して (data not shown)、*SOK1*を共発現した酵母においてのみMsn2高発現によるメチル水銀高感受性化および*GFAT*遺伝子プロモーターの転写活性抑制共に回復した (Fig. 17)。このことから、F2中に存在する*SOK1*がMsn2高発現によるメチル水銀毒性作用に関与する遺伝子として同定された。

#### D. 参考文献

- 1) Castoldi AF, Coccini T, Manzo L. Neurotoxic and molecular effects of methylmercury in humans. *Rev Environ Health*. 2003 Jan-Mar;18(1):19-31
- 2) Sanfeliu C, Sebastia J, Cristofol R, Rodriguez-Farre E. Neurotoxicity of organomercurial compounds. *Neurotox Res*. 2003;5(4):283-305.
- 3) 矢ヶ崎修 「毒科学の基礎と実際」 薬業時報社、1999、p88-89

- 4) 熊本日日新聞 水俣病百科 水俣病事典  
<http://www.kumanichi.co.jp/minamata/m-jiten.html>
- 5) 古尾谷裕子;東北大学大学院薬学研究科修士論文 (2002)
- 6) Schmitt AP, Mcentee K. Msn2p, a zinc finger DNA-binding protein, is the transcriptional activator of the multistress response in *Saccharomyces cerevisiae*. Proc Natl Acad Sci USA. 1996 June;93:5777-5782.
- 7) Gorner W, Durchschlag E, Martinez-Pastor MT, Estruch F, Ammerer G, Hamilton B, Ruis H, Schuller C. Nuclear localization of the C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> zinc finger protein Msn2p is regulated by stress and protein kinase A activity. Genes Dev. 1998 Feb 15;12(4):586-97.
- 8) Gorner W, Durchschlag E, Wollf J, Brown EL, Ammerer G, Ruis H, Schuller C. Acute glucose starvation activates the nuclear localization signal of a stress-specific yeast transcription factor. EMBO J. 2002;21:135-144.
- 9) Martinez-Pastor MT, Marchler G, Schuller C, Marchler-Bauer A, Ruis H, Estruch F. The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger proteins Msn2p and Msn4p are required for transcriptional induction through the stress response element (STRE). EMBO J. 1996 May 1;15(9):2227-35.
- 10) Gietz D, St Jean A, Woods RA, Schiestl RH. Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. Nucleic Acids Res. 1992 Mar;20:1425.
- 11) Hanahan D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. J Mol Biol. 1983 Jun;166(4):557-580.
- 12) Ghosh S, Blumenthal HJ, Davidson E, Roseman S. Glucosamine Metabolism. Glucosamine metabolism. V. Enzymatic synthesis of glucosamine 6-phosphate. J. Biol. Chem., May 1960; 235: 1265-1273 .



- 13) Lagorce A, Berre-Anton VL, Aguilar-Uscanga B, Martin-Yken H, Dagkessamanskaia A, Francois J. Involvement of *GFAI*, which encodes glutamine-fructose-6-phosphate amidotransferase, in the activation of the chitin synthesis pathway in response to cell-wall defects in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem.* 2002 Mar;269(6):1697-707.
- 14) Naganuma A, Furuchi T, Miura N, Hwang GW and Kuge S. Investigation of Intracellular Factors Involved in Methylmercury Toxicity. *Tohoku J Exp Med.* 2002;196:65-70.
- 15) Naganuma A, Miura N, Kaneko S, Mishina T, Hosoya S, Miyairi S, Furuchi T, Kuge S. GFAT as a target molecule of methylmercury toxicity in *Saccharomyces cerevisiae*. *FASEB J.* 2000 May;14(7):968-72.
- 16) Samuel T., Weber HO., Rauch P., Verdoodt B., Eppel JT., McShea A., Hermeking H., Funk JO. The G2/M Regulator 14-3-3 Prevents Apoptosis through Sequestration of Bax. *J Biol Chem.* 2001; 276: 45201-45206.
- 17) Hermeking H., Lengauer C., Polyak K., He TC., Zhang L., Thiagalingam S., Kinzler KW., Vogelstein B. 14-3-3 sigma is a p53-regulated inhibitor of G2/M progression. *Mol Cell.* 1997; 1:3-11
- 18) Laronga C., Yang HY., Neal C., Lee MH. Association of the cyclin-dependent kinases and 14-3-3 sigma negatively regulates cell cycle progression. *J Biol Chem.* 2000; 275: 23106-23112.
- 19) GP Van Heusden GP., Griffiths DJ., Ford JC., Chin-A-Woeng TF., Schrader PA, Carr AM., and Steensma HY. The 14-3-3 proteins encoded by the *BMH1* and *BMH2* genes are essential in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and can be replaced by a plant homologue. *Eur J Biochem.* 1995, 229:45-53
- 20) Gelperin D., Weigle J.,

- Nelson K., Roseboom P., Irie K., Matsumoto K., Lemmon S. 14-3-3 Proteins: Potential Roles in Vesicular Transport and Ras Signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995; 92: 11539-11543.
- 21) Shenhar G, Kassir Y. A positive regulator of mitosis, Sok2, functions as a negative regulator of meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*. 2001 Mar;21(5):1603-12.
- 22) Sanders SL, Jennings J, Canutescu A, Link AJ, Weil PA. Proteomics of the eukaryotic transcription machinery: identification of proteins associated with components of yeast TFIID by multidimensional mass spectrometry. *Mol Cell Biol*. 2002 Jul;22(13):4723-38.
- 23) Radcliffe P, Trevethick J, Tyers M, Sudbery P. Deregulation of CLN1 and CLN2 in the *Saccharomyces cerevisiae* whi2 mutant. *Yeast*. 1997 Jun 30;13(8):707-15.
- 24) Kaida D, Yashiroda H, Toh-e A, Kikuchi Y. Yeast Whi2 and Psr1-phosphatase form a complex and regulate STRE-mediated gene expression. *Genes Cells*. 2002 Jun;7(6):543-52.
- 25) Cameron S, Levin L, Zoller M, Wigler M. cAMP-independent control of sporulation, glycogen metabolism, and heat shock resistance in *S. cerevisiae*. *Cell*. 1988 May 20;53(4):555-66.
- 26) Markwardt DD, Garrett JM, Eberhardy S, Heideman W. Activation of the Ras/cyclic AMP pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* does not prevent G1 arrest in response to nitrogen starvation. *J Bacteriol*. 1995 Dec;177(23):6761-5.
- 27) Gimeno CJ, Ljungdahl PO, Styles CA, Fink GR. Unipolar cell divisions in the yeast *S. cerevisiae* lead to filamentous growth: regulation by starvation and RAS. *Cell*. 1992 Mar 20;68(6):1077-90.
- 28) Huh WK, Falvo JV, Gerke LC, Carroll AS, Howson RW,

Weissman JS, O'Shea EK. Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature*. 2003 Oct 16;425(6959):686-91.

29) Ward MP, Garrett S. Suppression of a yeast cyclic AMP-dependent protein kinase defect by overexpression of SOK1, a yeast gene exhibiting sequence similarity to a developmentally regulated mouse gene. *Mol Cell Biol*. 1994 Sep;14(9):5619-27.

30) Smith A, Ward MP, Garrett S. Yeast PKA represses Msn2p/Msn4p-dependent gene expression to regulate growth, stress response and glycogen

accumulation. *EMBO J*. 1998 Jul 1;17(13):3556-64.

E. 研究発表  
学会発表

芥川 正明、黄 基旭、小田部 希、山本 玲子、永沼 章:酵母での Msn2 高発現によるメチル水銀毒性増強機構における Sok2 の役割. 日本薬学会第 124 年会, 2005.

芥川 正明、黄 基旭、小田部 希、山本 玲子、永沼 章:Msn2 高発現によるメチル水銀高感受性に関与する因子の解析. 第 77 回日本生化学大会, 2004.

F. 知的財産権の出願・登録状況  
なし。

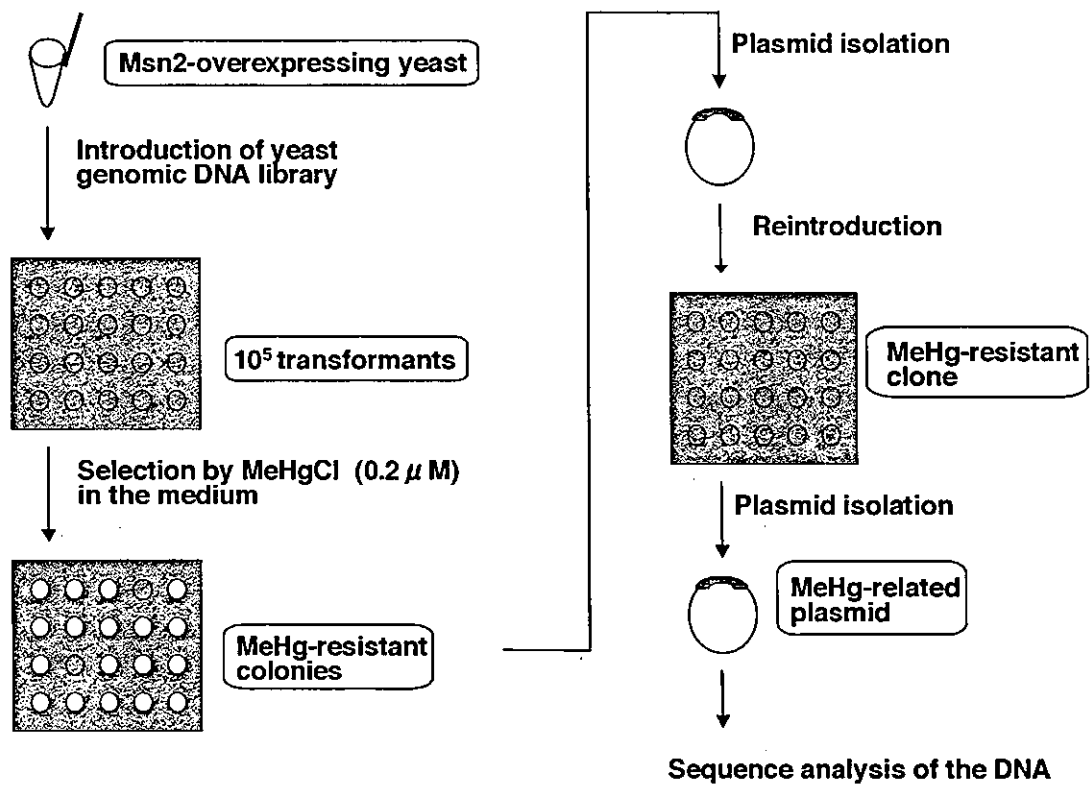


Fig. 1 Msn2高発現によるメチル水銀高感受性を消失させる因子の検索