

NaAsO₂(mM)

Fig. 13. *FPS1*欠損酵母へのGFP-Fps1導入が亜ヒ酸感受性
に与える影響

酵母を96 well plate中で各濃度の亜ヒ酸存在下48時間培養した後に
600 nmの吸光度を測定した(n=3)。

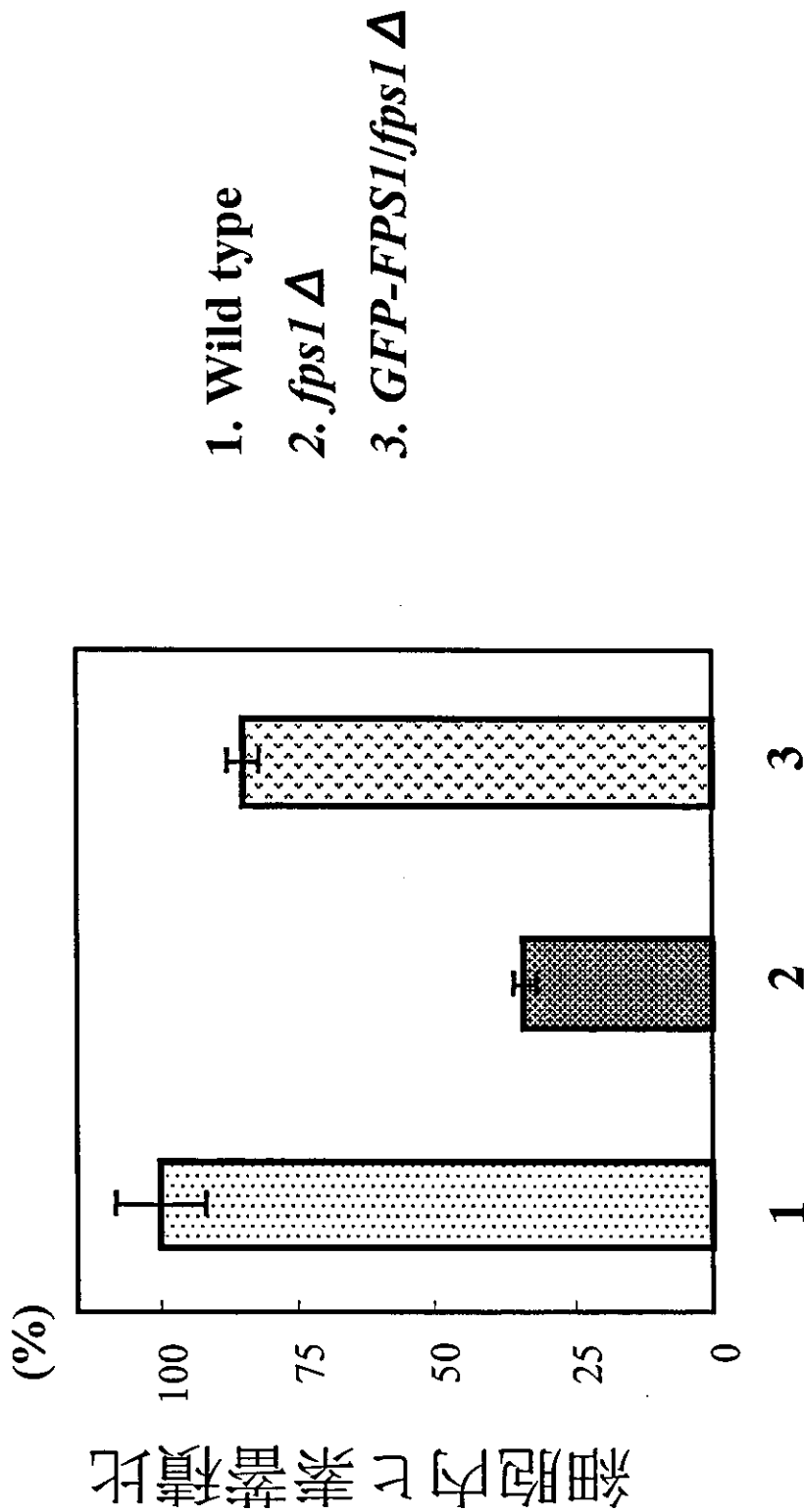
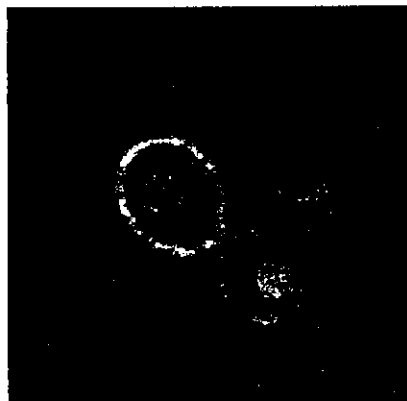


Fig. 14. *FPS1* 欠損酵母への GFP-Fps1 導入が亜ヒ酸添加後の細胞内糖蓄積量に与える影響

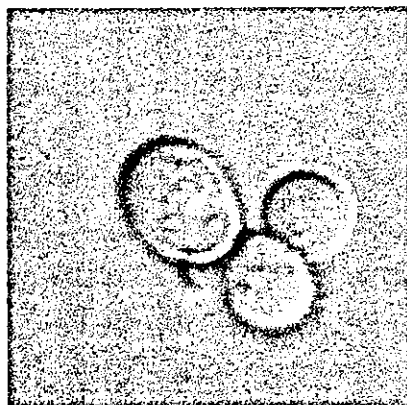
酵母(1×10^8 cells)を 0.2mM の亜ヒ酸を含む液体培地で 3 時間培養後、湿式灰化し、ICP-MS により細胞内のヒ素量を測定した ($n=3$)。WT の値を 100% として表に示した。

GFP



FPS1/fps1 Δ

透過像



FPS1/fps1 Δ hog1 Δ

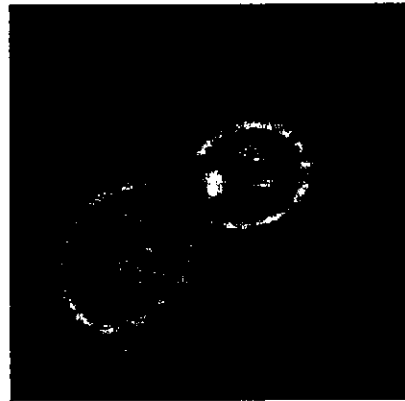


Fig. 15 HOG1 欠損が Fps1 の細胞内分布に与える影響

酵母にFPS1-GFP 発現プラスミドを導入した際のGFPの蛍光を検出することでFps1 細胞内分布を検討した。

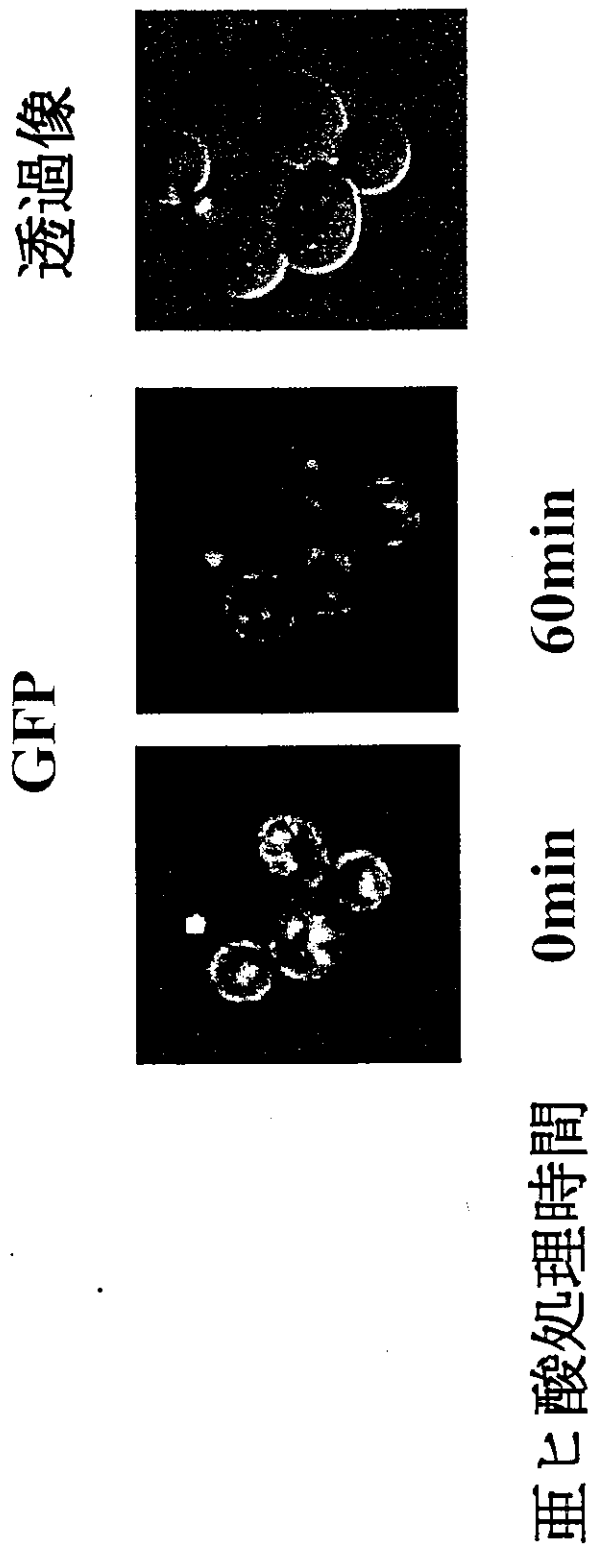


Fig.16 亜ヒ酸処理がFps1の細胞内分布に与える影響

FPS1-GFP 発現プラスミドを導入した酵母に亜ヒ酸を処理した際のGFPの蛍光を検出することでFps1細胞内分布を検討した。

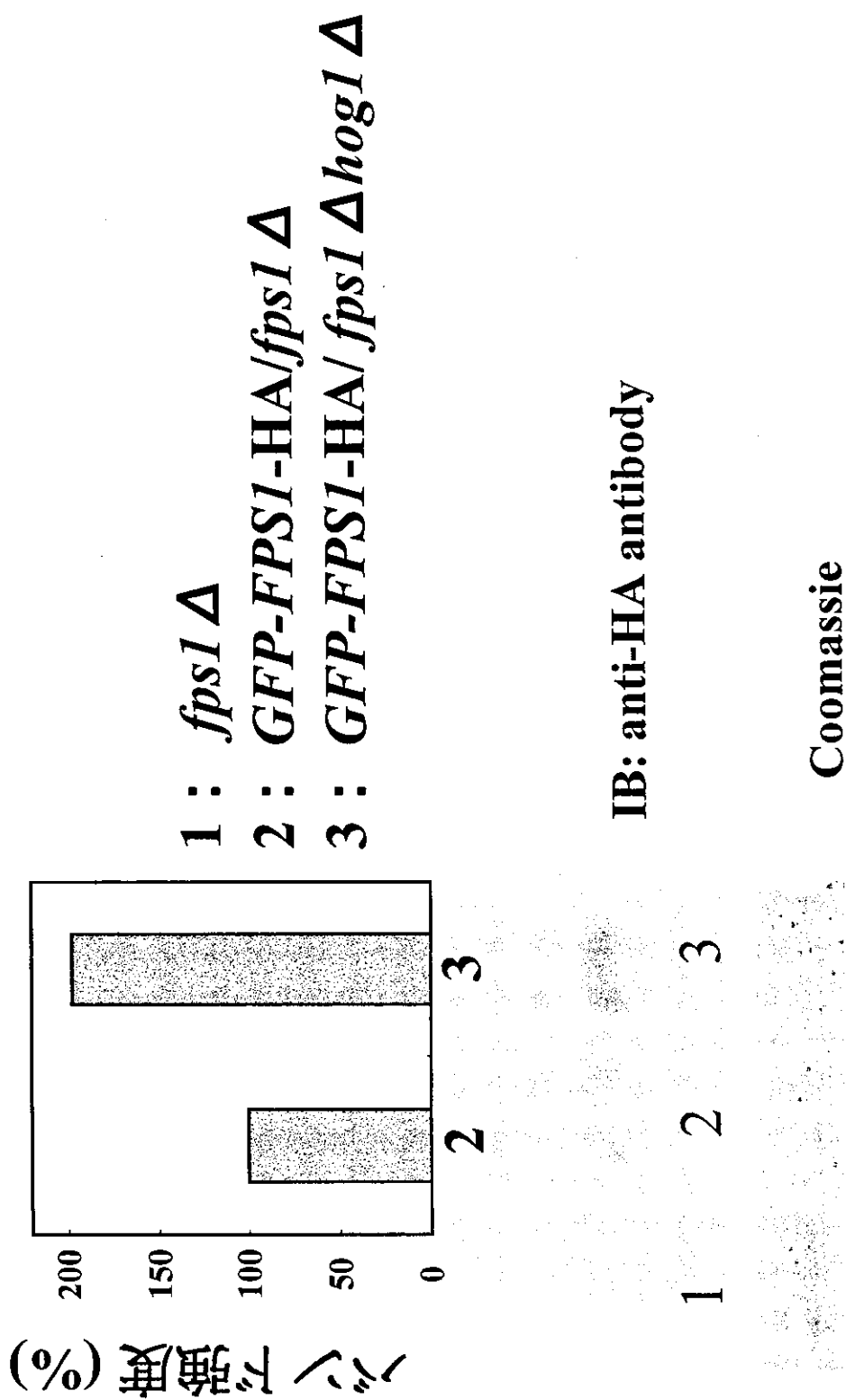


Fig. 17. 細胞膜中のFps1蛋白質量のHOG1欠損による変動

Fps1欠損酵母にFPS1-GFP-HA発現プラスミドを導入した株においてFps1-GFP-HA蛋白質のバンド強度を100%として表に示した。

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

トリブチルスズの毒性発現に影響を与える遺伝子群の検索とその作用機構

分担研究者 大橋一晶 東北大学大学院薬学研究科助手

欠損によって酵母にトリブチルスズ（TBT）耐性を与える遺伝子として24種を同定することに成功した。また、別に高発現により耐性を与える遺伝子の検索も行い2種を同定した。これら遺伝子とその産物の機能によって分類すると、トランスポーターなど輸送排出に関与する因子（8種）、転写調節因子（8種）、ユビキチン化に関与する因子（3種）、その他の機能に関与するもの（3種）および機能未知なもの（3種）に分けることができる。以上の中でPdr5のみが、その遺伝子を欠損した酵母が著しいTBT感受性を示すことが既に報告されている。しかし、我々が同定した因子の中には機能未知ではあるがPdr5と結合する可能性があるとして報告されているScp160の遺伝子が含まれていた。Scp160は高発現によってTBT耐性を与える。そこで両者の関係をTBT感受性を指標に調べたところ、PDR5遺伝子が欠損するとScp160を過剰発現させても酵母はTBT耐性を示さないことが判明した。この結果から、Scp160高発現によるTBT耐性獲得にはPdr5が必須の役割を果たしており、Scp160はPdr5の作用を促進するという機能を持つものと考えられる。現在は、今回同定された輸送排出に関わる因子群の欠損がそれぞれTBTの細胞内蓄積に与える影響を検討している。

A. 研究目的

有機スズ化合物は塩化ビニル樹脂の安定剤や、殺虫剤、駆虫剤として広く世界中で利用されてきた(1)。その中でも、トリブチルスズ(tributyltin; TBT)化合物(トリブチ

ルスズオキシド、塩化トリブチルスズ)は、船底塗料や漁網防汚剤として、海藻や貝類などの付着防止に汎用されてきた(1)。しかし、その結果、特に海洋において環境汚染が生じ、TBT濃度の高い海域で巻き貝のオス化

(内分泌攪乱作用) やカキの成長阻害などの影響が報告されている(1, 2)。また、食物連鎖による有機スズ化合物の生物濃縮も報告され、海洋生態系に与える影響が懸念されている(1)。

TBT の哺乳類に対する毒性としては、ラットに胸腺萎縮やリンパ節出血などの臓器障害をひきおこすことが報告されており(3)、ミトコンドリア障害性や、変異原性のあることも明らかにされている(1)。しかし、その毒性発現機構はほとんど解明されていない。

本研究では、TBTの細胞毒性発現機構の解明を目的として、酵母を用いて、TBTの毒性発現に関わる細胞内因子の検索をおこなった。酵母は、真核生物としての基本的な特徴を持ち、酵母蛋白質中にはヒトなどの哺乳類と機能的に共通するものが数多く存在する。したがって、酵母で見いだされるTBT毒性発現に関与する因子は、哺乳類の細胞中にも存在して類似の機構で機能することが予想され、TBTが示す細胞毒性の発現機構解明のための大きな手がかりとなると期待される。

B. 研究方法

1. 薬物および培地

薬物

• Tributyltin chloride (Wako) は Dimethylsulfoxide に溶解し、10 mM の溶液をストックとした。この溶液を適宜水に希釈し、使用した。

培地

• YPAD 培地 : 1% (w/v) Bacto™ yeast extract (Difco)、2% (w/v) Bacto™ peptone (Difco)を高圧蒸気滅菌したものに、別に滅菌した 2% (w/v) glucose (Nacalai Tesque)、0.004% (w/v) adenine sulfate を加えて使用した。

• SD 培地 : 1.67% (w/v) Bacto™ yeast nitrogen base w/o amino acid (Difco) および、1.23% (w/v) dropout powder (L-arginine monohydrochloride 2.5 g, L-aspartic acid 6.0 g, L-glutamic acid monosodium salt 6.0 g, L-lysine monohydrochloride 1.8 g, L-methionine 1.2 g, L-phenylalanin 3.0 g, L-serine 22.5 g, L-threonine 12.0 g, L-tyrosine 1.8 g, L-varine 9.0 g を混和したものを(寒天培地は 2% Bacto agar を加え)、高圧蒸気滅菌したものに 2% (w/v) glucose、0.004% (w/v) adenine sulfate、0.002% L-histidine、0.004% (w/v) L-tryptophan、0.002% (w/v) uracil、0.006% (w/v) L-leucine を加え使用

した。

- ・ LB 培地 : 1% (w/v) Bacto™tryptone (Difco)、0.5% (w/v) Bacto™yeast extract (Difco)、0.5% (w/v) NaCl (Nacalai Tesque) を高圧蒸気滅菌して使用した。また、ampicilin 入り LB 培地は最終濃度 100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ になるように高圧滅菌後の LB 培地に、フィルター滅菌した ampicilin (Wako) 水溶液を加えた。

2. 遺伝子欠損株を用いた酵母の TBT に対する感受性に影響を与える因子のスクリーニング法

実験材料 :

- ・ 酵母 : BY4742 (*MAT α* ; *his3 Δ 1*; *leu2 Δ 0*; *lys2 Δ 0*; *ura3 Δ 0*)
- ・ Complete set of *Saccharomyces cerevisiae* gene deletion strains (Euroscarf)
: BY4742 株のほぼすべての非必須遺伝子を kanamycin 耐性遺伝子マーカーで 1 つずつ欠損させた酵母株ライブラリー
- ・ Transplate Cartridge (Corning)
- ・ スポンジ (東和産業)

実験方法 :

マスタープレートの作製

96 well plate に保存してある Complete set of *Saccharomyces cerevisiae* gene deletion strains

(Euroscarf) を 96 穴のピペッターである Transplate Cartridge (Corning) を用いて YPAD プレート上にスポットし、12 時間培養しマスタープレートを作製した。

TBT 存在下で増殖に影響のみられる遺伝子欠損株のスクリーニング

4 枚の異なる濃度の TBT を含む YPAD plate (TBT: 30, 40, 50, 60 μM) および YPAD plate にスポンジを用いてマスタープレートから酵母を移し、レプリカプレートを作製した。作製したレプリカプレートを 30 $^{\circ}\text{C}$ で培養し、24 hr, 48 hr 後の各プレートの遺伝子欠損株それぞれのコロニー形成を観察した。そのなかで、野生株がコロニーを形成できない濃度の 60 μM の TBT を含む YPAD プレート上で、コロニーを形成する酵母株を TBT 耐性候補株とし、野生株がコロニーを形成できる最高濃度である 30 μM の TBT を含む YPAD プレート上で、コロニー形成の遅い酵母株を TBT 感受性候補株とした。なお、スクリーニングに用いた TBT 濃度の検討は、野生株 (BY4742)、既知の TBT 感受性株 (*PDR5* 遺伝子欠損株)、方法 10. に示すスクリーニングによって得られた TBT に対して耐性を示す遺伝子欠損株 (*SRO9* 遺伝子欠損株) を用いて行った。ここで選択した候補株は、96 well plate に保存

してある Complete set of *Saccharomyces cerevisiae* gene deletion strains (Euroscarf) からおこなおし、2-3 で示す方法に従って TBT に対する感受性を検討した。

3. 酵母の TBT に対する感受性

酵母のシングルコロニーを、2 ml の SD 液体培地に植菌し、30℃で一晩培養した後、この培養液を SD 液体培地で 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 180 μ l/well (1×10^5 cells/well) ずつ播き、各種濃度 (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 μ M 最終濃度) TBT 20 μ l/well を添加し、30℃で 2 日間培養した後に、マイクロプレートリーダー (Microplate Manager, BIO-RAD) で 600 nm の吸光度を測定して酵母の増殖を調べた。

4. スクリーニングで得られた因子を発現するプラスミドの作製

目的の遺伝子は、酵母 chromosomal DNA を template とし、以下に示すプライマーを用いて、PCR により増幅した。PCR 反応には、Pyrobest DNA polymerase (Takara) を用いて行った。得られた PCR 産物は 0.8% アガロースゲル電気泳動後に、目的サイズの DNA をゲルから切り出し、GeneClean II kit

(Takara) を用いて精製した。同時に、酵母発現ベクターである pRS426 に得られた DNA を組み込むため pRS426 を制限酵素 (*smal*) で切断し、0.8% アガロースゲル電気泳動後に、目的サイズの DNA をゲルから切り出し、GeneClean II kit (Takara) を用いて精製した。得られた目的の遺伝子の断片と *smal* で切断した pRS426 を DNA ligation kit Ver.2 (Takara) に pRS426 のセルフライゲーションを防ぐため *smal* を添加して、連結反応をおこなった後、大腸菌 (XL-1 blue) に以下の方法に従って導入した。コンピテントセル溶液 200 μ l に上述の DNA 溶液 5 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与え、さらに氷上に 2 分間静置した。これを、あらかじめ X-gal および IPTG を塗布したアンピシリン 50 μ g/ml を含む LB 培地に塗布し、37℃で一晩培養した。培養後ブルー/ホワイトセレクションを行い PCR 産物が導入されたプラスミドを保持している大腸菌を選別した。ホワイトコロニーを形成した大腸菌をアンピシリン 50 μ g/ml を含む LB 培地 2 ml で一晩振盪培養した。この培養液 1 ml を遠心し上清を除いた。得られた沈澱に Solution I (15 mM Tris-HCl (pH 8.0)、10 mM EDTA、100 μ g/ml RNase) を 100 μ l

加え攪拌し大腸菌を懸濁させた。この懸濁液に Solution II (0.2 N NaOH (Nacalai Tesque), 1% SDS)を 100 μ l 加えてゆっくり攪拌し室温で 5 分間放置した後、3M potassium acetate (Nacalai Tesque) (pH 5.5)を 100 μ l 加え、遠心した。遠心後の上清 300 μ l をエタノール 750 μ l と混和し、遠心して得られた沈澱を 75%エタノールで洗浄し、TE buffer を 100 μ l 加えたものをプラスミド DNA 溶液とした。

作製したプラスミドの機能を確認するために、クローニングした遺伝子の欠損株に、作製したプラスミドを導入し、遺伝子欠損株の TBT 感受性が回復するか検討した。

プライマー: open reading frame (ORF) の上流約 500 bp および下流約 300 bp 付近で設計した。なお、隣接する ORF が、上流 500 bp 下流 300 bp 以内に含まれる場合には、それらを含まないようにさらに内側にプライマーを作製した。

1) ABF2/pro-f 5 ' -
TTGTTATTGCTCTTCTCCTGGTG
- 3'
 ABF2/pro-r 5 ' -
CACTACACACTTGCTTGGTTAAG
- 3'
2) ARG82/pro-f 5 ' -
ATGGTGTGACAGGCTTGTTGTGT
GTGG - 3'

 ARG82/pro-r 5 ' -
ATTTCTTGCAAACATAAGTAAAT
GCAA - 3'
3) BUL1/pro-f 5 ' -
TTCGGTGTCTTTGATCCGTCT
3'
 BUL1/pro-r 5 ' -
AGCAACAAAAGAGCACCAGA
3'
4) DAL81/pro-f 5 ' -
AACCATAACCATTCGGTCCA
3'
 DAL81/pro-r 5 ' -
TAACCTTGGTCCTGCAGAAGA
3'
5) ERG4/pro-f 5 ' -
CTTCCAGTTTCTTGGATTCTTTTC
TGT - 3'
 ERG4/pro-r 5 ' -
CATACTTCCTGCCACAACATAAT
GTGA - 3'
6) HXK2/pro-f 5 ' -
ATTGGTACCTAGAAATGGCTATC
ATGC - 3'
 HXK2/pro-r 5 ' -
ATCATGTAGATTTTCATAAATCGT
CATA - 3'
7) HXT12/9/pro4000-f 5 ' -
ATTACCACTTACATTA ACTGTTAT
TCG - 3'
 HXT12/11/term1000-r 5 ' -
AGTTGCACTCTTAATAATACGGT

ATACA - 3'		3'	
8) IXR1/pro-f	5 ' -	PDR5r	5 ' -
ATGCAACAGCAGCAAAGGA - 3'		TCACACTAAATGCTGATGCCTA -	
IXR1/pro-r	5 ' -	3'	
GGGAAGACTACACACATGCGT -		14) RVS167/pro-f	5 ' -
3'		ACCTCTATCAAGTTTTGACTTTCC	
9) LRG1/pro-f	5 ' -	TGT - 3'	
ATATCAAGAAGCCCGCATGT -		RVS167/pro-r	5 ' -
3'		GATATTGTCAGTAGGGTAATATG	
LRG1/pro-r	5 ' -	CTCG - 3'	
CTGCTGTTGGAGATGTTCTGA -		15) SFL1/pro-f	5 ' -
3'		TCCGACAGGTCCTTAAGCCTT -	
10) MMS2/pro-f	5 ' -	3'	
TATTTACTATTACCTCTCGATTTT		SFL1/pro-r	5 ' -
AAG - 3'		AATCACAAGGATCAGGAGGAA -	
MMS2/pro-r	5 ' -	3'	
ATATACATCATTATCGTAGTGAA		16) SOK2/pro-f	5 ' -
TTGC - 3'		AGTCGGCTAAGCATCGATCAT -	
11) MSN2/pro-f	5 ' -	3'	
AAGCCGGTTCTTGACACCAT -		SOK2/pro-r	5 ' -
3'		AACCTCCCACGTTCAACAACC -	
MSN2/pro-r	5 ' -	3'	
ATCTAAGTTGTTACAGGCGGG -		17) SRO9/pro-f	5 ' -
3'		GTGGATCTGGACTCTCGAGCAAG	
12) PDR3/pro-f	5 ' -	ACCC - 3'	
TCCTTGTTAACACCGTGCTCT -		SRO9/pro-r	5 ' -
3'		TATTTTCTCTTTCGTATTAAACTG	
PDR3/pro-r	5 ' -	ATG - 3'	
CTACTGAACAGCTGCATTCCA -		18) TAT1/pro-f	5 ' -
3'		AAAATATAACAATCCGGCCA -	
13) PDR5f	5 ' -	3'	
GATTGCTTCCCACGGAACGAGT -		TAT1/pro-r	5 ' -

CGCACAAACATGTTTGATTGC -
 3'
 19) UBC13/pro-f 5' -
 ACGATGCTCCTTTCAAGTACGCT
 ATTC - 3'
 UBC13/pro-r 5' -
 AAACGCGTCTAGTAAAAATCTGG
 CGTA - 3'
 20) UBR1/pro-f 5' -
 GAAAAGTGATGCGACGGTTT
 3'
 UBR1/pro-r 5' -
 GCGTTTGATTGGGTCGTGTAT
 3'

滅菌済み 50%ポリエチレングリコー
 ル (PEG) 4000 (Nacalai tesque)
 酵母 BY4742 株を YPAD 培地 50
 ml に植え、 2×10^7 cells/ml になる
 まで振盪培養した後に集菌し、それ
 を 1 ml の 100 mM 酢酸リチウム形
 質転換溶液に懸濁した。ここに導入
 したい遺伝子 (プラスミドもしくは
 PCR 産物) 1 μ g、過熱変性サケ精子
 DNA 50 μ g 及び PEG 水溶液 300 μ l
 を加え、30°C で 30 分間インキュベ
 ートした。その後 42°C で 15 分間の
 熱ショックをかけた後に集菌し、SD
 培地に播き、30°C で 2 日間培養した。

PCR サイクル

95°C 5 min
 95°C 15 sec
 55°C 30 sec
 72°C 2 min
 72°C 5 min

} $\times 30$ cycle
 伸長反応 72°C は
 増幅 DNA 1k bp あたり 1 min とした。

5. 酵母への遺伝子の導入 (酢酸リチウム法)

試薬

100 mM 酢酸リチウム (LiAc) 形質
 転換溶液 (1 ml): 1M LiAc 水溶液
 (pH 7.5 高圧蒸気滅菌したもの) 100
 μ l, 滅菌済みイオン交換水 900 μ l
 PEG 水溶液 (1ml): 滅菌済みイオン
 交換水 100 μ l, 1M LiAc 水溶液 100 μ l,

6. PDR5 および ERG4 遺伝子二重 欠損株の作製

HIS5 マーカーを含む欠損株作製用 gene disruption cassette の作製

分裂酵母 (*Saccharomyces
 pombe*) 由来の *HIS5* 遺伝子を持つプ
 ラスミド pUG27 のプロモーター、
 ターミネーターの塩基配列と、欠損
 株で用いた kanamycin 耐性遺伝子の
 プロモーター、ターミネーターの塩
 基配列が同じであることを利用し、
HIS5 遺伝子マーカーを含む欠損株作
 製用 gene disruption cassette の作
 製を行う。Complete set of
Saccharomyces cerevisiae gene
 deletion strains (Euroscarf) から
PDR5 遺伝子欠損株を選び、3. に

示した酢酸リチウム法により *HIS5* フラグメントを導入することによって得られた histidine 非要求性 colony を、kanamycin 耐性遺伝子マーカーが *HIS5* 遺伝子マーカーで置き換わった *PDR5* 遺伝子欠損株候補とした。酵母からの chromosomal DNA の回収は glass beads 法によって行った。まず、酵母を 2 ml の SD (-leu) 培地に植菌し、30℃で 24 時間インキュベートした後、集菌して 200 μ l の breaking buffer に懸濁した。これに、200 μ l の phenol/chloroform/iso-amylalcohol (25 : 24 : 1) 及び 0.3g の酸洗浄ガラスビーズを加え 5 分間激しく攪拌した後、12,000 \times g で 5 分間遠心して chromosomal DNA を含む水層 200 μ l を得た。得られた DNA 溶液をエタノール沈澱により濃縮し、最終的に 100 μ l の DNA 溶液とした。ここで得られた遺伝子溶液を template として、*PDR5* 遺伝子の外側に設定したプライマー (プライマーA) を用いて *PDR5* 遺伝子領域を PCR により増幅し、その PCR 産物の大きさをアガロースゲル電気泳動で調べることにより、*HIS5* マーカーを含む *PDR5* 欠損株が作製されたことを確認して、この確認のための PCR 産物を次に述べる二重欠損株の作製に、さらに用いた。

プライマーA

PDR5f 5' -
GATTGCTTCCCACGGAACGAGT -
3'

PDR5r 5' -
TCACACTAAATGCTGATGCCTA -
3'

HIS5 マーカーを含む欠損株作製用 gene disruption cassette を用いた *PDR5ERG4* 遺伝子二重欠損株の作製

作製した *PDR5* 欠損株作製用 gene disruption cassette を、酢酸リチウム法により *ERG4* 遺伝子欠損株 (*erg4::kanMX4*) に導入し、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 chromosomal DNA の回収は glass beads 法によって行った。*PDR5* 遺伝子欠損の確認は、chromosomal DNA を template として、プライマーA のさらに外側に設定したプライマー (プライマーB) を用いて *PDR5* 遺伝子領域を PCR により増幅し、その PCR 産物の大きさをアガロースゲル電気泳動で調べることにより行った。

プライマーB

PDR5delcon-f 5' -
TTATCACGACACAACCTTGCC -
3'

PDR5delcon-r 5' -
TTCCAGTCGTGATCACAGTGG -

3'

7. 高発現により酵母に TBT に対して耐性を与える遺伝子のスクリーニング

酵母へのゲノム DNA ライブラリーの導入

酵母への形質転換は酢酸リチウム法によって行った。まず、酵母 BY4742 株を YPAD 培地 50 ml に植え、 2×10^7 cells/ml になるまで振盪培養した後に集菌し、それを 1 ml の 100 mM 酢酸リチウム溶液に懸濁した。ここに酵母ゲノムライブラリー 1 μ g、過熱変性サケ精子 DNA 50 μ g 及び 50% ポリエチレングリコール (4000) 300 μ l を加え、30°C で 30 分間インキュベートした。その後 42°C で 15 分間の熱ショックをかけた後に集菌し、ロイシンを含まない選択用培地である SD (-leu) 液体培地に懸濁し、30°C で 24 時間培養した。この際、ベクターとして用いたプラスミド YEp13 中にはロイシン合成酵素の遺伝子が含まれているので、本プラスミドが導入された酵母（形質転換体）のみがロイシンを含まない SD (-leu) 液体培地中でも育成可能となる。

TBT 耐性遺伝子のスクリーニング

得られた形質転換体を、親株が増

殖できない濃度の TBT (6, 7, 8 μ M) を含む SD (-leu) 培地に 1×10^5 cells/200 μ l となるように懸濁した後、96 well plate に 200 μ l ずつ播き、30°C で 2 日間培養した。そのとき各 well 中でコロニー様の濃い沈澱を形成している酵母を P-2 のピペットマンを用いて回収し、SD (-leu) plate に播き、30°C で 1~2 日間培養し、形成したコロニーを実験に用いた。

酵母からのプラスミド DNA の回収

酵母からのプラスミド DNA の回収はガラスビーズ法により行った。まず、酵母を 2 ml の SD (-leu) 培地に植菌し、30°C で 24 時間インキュベートした後、集菌して 200 μ l の breaking buffer に懸濁した。これに、200 μ l の phenol/chloroform/isoamylalcohol (25 : 24 : 1) 及び 0.3 g の酸洗浄ガラスビーズを加え 5 分間激しく攪拌した後、12,000 \times g で 5 分間遠心してプラスミド DNA を含む水層 200 μ l を得た。得られた DNA 溶液をエタノール沈澱により濃縮し、最終的に 10 μ l の DNA 溶液とした。引き続き、プラスミド DNA を精製するために、大腸菌への導入及び回収を行った。コンピテントセル溶液 50 μ l に上述の DNA 溶液 1 μ l を加え、set volts 2.5 kV, capacitance 2.5 μ F でエレクトロポレーションを行い、こ

れに SOC 培地 1 ml を加え、37℃で 1 時間培養後、集菌し、アンピシリン 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を含む LB 寒天培地に播き、37℃で 12 時間培養した。形成されたコロニーをアンピシリン 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を含む LB 培地 2 ml で一晩振盪培養した後、GenElute™ plasmid mini-prep kit (Sigma)を用いて大腸菌よりプラスミド DNA を回収した。

プラスミドを再導入した酵母の TBT に対する感受性

プラスミドを再導入した酵母のシングルコロニーを 2 ml の SD (-leu) 培地に植菌し 30℃で一晩培養した後、この培養液を SD (-leu) 培地で 1×10^5 cells/180 μl になるように希釈した。この希釈培養液を 96 well plate に 180 $\mu\text{l}/\text{well}$ (1×10^5 cells/well) ずつ播き、TBT 20 $\mu\text{l}/\text{well}$ (最終濃度 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 μM) を添加した後、30℃で 2 日間培養し、酵母の増殖を 600 nm の吸光度を基に判定した。尚、YEpl3 ベクターを導入した酵母を実験の対照とした。

8. Rhodamine6G を用いた Pdr5 排出活性の測定

酵母を SD 培地で浸盪培養し、対数増殖期の酵母を遠心により回収した。酵母を 50mM HEPES pH 7 で 2 回洗浄した後、酵母 (2.8×10^7 cells)

を Buffer A (50 mM HEPES pH 7, 5 mM 2-deoxy-D-glucose, 5 μM rhodamine 6G) 1 ml に懸濁し、室温で 2 時間放置した。その後、酵母を 50mM HEPES pH 7 で 1 回洗浄し、酵母懸濁液を 2 つにわけた。1 つの酵母は 50 mM HEPES pH7, 1 ml に懸濁し、もう一方の酵母は、(50 mM HEPES pH7, 1 mM glucose) 1 ml に懸濁し、それぞれ 30℃で 7 分間放置した。その後、酵母を遠心して落とし、rhodamine6G の蛍光を蛍光プレートリーダー (ex 529 nm, em 553 nm) で測定した。

9. 酵母の細胞内スズ量の測定

酵母を YPAD 培地で浸盪培養し、遠心により酵母を回収した。酵母 (1×10^9 cells) を 10 ml YPAD に懸濁し、10 μM TBT を添加し 30℃で 3 時間浸盪培養した後、遠心し酵母を回収した。酵母はミリ Q 水で 3 回洗浄後、1 ml のミリ Q 水に懸濁した。ここで、96 well plate に 80 倍希釈した酵母懸濁液を 100 μl ずつ移しマイクロプレートリーダーを用いて細胞数を 600 nm の吸光度 (濁度) として測定した。次に、酵母懸濁液をガラス試験管に移し、ここに硝酸 3 ml を加え、以下の要領で加熱した。まず、80℃で 1 時間加熱した後で、100℃

(1 時間)、110℃ (1 時間)、120℃ (2 時間) と徐々に温度をあげ、140℃で乾固させた。さらに、乾固させたサンプルに過酸化水素水 2 ml、硝酸 0.5 ml を加え、以下の要領で加熱した。まず、80℃で 1 時間加熱した後で、90℃ (1 時間)、100℃ (1 時間)、110℃ (1 時間)、120℃ (1 時間) と徐々に温度をあげ、140℃で乾固させた。この残留物は、ミリ Q 水 1.2 ml で溶解し、ICP-MS (HP4500、横河アナリティカルシステムズ) を用いてスズの含有量を測定した。

10. (補) TBT に対して耐性を示す遺伝子欠損株のスクリーニング

以下に、2. でのスクリーニングで陽性コントロールとして用いた SRO9 遺伝子欠損株の単離法について記す。

TBT 耐性遺伝子欠損株のスクリーニング

まず、*Saccharomyces cerevisiae* gene deletion strains (Euroscarf) 約 4800 種を 3 つに分け YPAD に懸濁し約 1600 種の遺伝子欠損株を含む mixture を作製した。この遺伝子欠損株の mixture を、親株が増殖できない濃度の TBT (6, 7, 8 μ M) を含む SD 液体培地に 1×10^5 cells/200 μ l となるように懸濁した後、96 well

plate に 200 μ l ずつ播き、30℃で 2 日間培養した。そのとき各 well 中でコロニー様の濃い沈澱を形成している酵母を P-2 のピペットマンを用いて回収し、YPAD plate に播き、30℃で 1~2 日間培養し、形成したコロニーを実験に用いた。

スクリーニングで得られた遺伝子欠損株の欠損している遺伝子の同定 (Inverse PCR 法)

まず、遺伝子欠損酵母を 2 ml の YPAD に植菌し、30℃で 24 時間培養し、集菌して Buffer I (1M ソルビトール溶液, 100 mM EDTA) 0.5 ml に懸濁した。これに、10 mg/ml ザイモリエース酵素溶液 0.02 ml を加え、37℃で攪拌しながら 1 時間インキュベートし、集菌後、Buffer II (50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 20 mM EDTA) 0.5 ml に懸濁し、さらに、65℃で 30 分間インキュベートした。30 分後、4 M 酢酸カリウム溶液を 0.20 ml 加え、0℃で 60 分間静置した後、遠心し、ゲノム DNA を含む水層を得た。得られた DNA 溶液をイソプロパノール沈澱により濃縮し、さらに、RNase を用いて RNA を除去後、最終的に 100 μ l のゲノム DNA 溶液を得た。

得られたゲノム DNA 溶液を制限酵素 *EcoRI* で処理し、断片化した。こ

の断片化した DNA をフェノール・クロロホルム法により精製後、T4 DNA ligase を用いて 16℃で 6 時間ライゲーションをおこない、断片化した DNA をセルフライゲーションさせ、環状 DNA にした。フェノール・クロロホルム法により精製後、この環状 DNA を template とし、kanamycin 耐性遺伝子マーカーの末端部分に相補的な配列をもち、3'末端が未知の隣接領域に向いているプライマーを用いて PCR を行い、未知の隣接領域を増幅した。この PCR 産物の塩基配列をシーケンスにより確認し、類似の配列を *Saccharomyces Genome Database* (SGD) から検索し、欠損部分の遺伝子を同定した。

プライマー

DEL-DraE.H.-1 5' -
 TATGGGCTAAATGTACGGGC -
 3'
 DEL-Dra.E.H.-2 5' -
 GTATGTGAATGCTGGTCGCT -
 3'

PCR サイクル

95℃ 5 min
 95℃ 15 sec
 55℃ 30 sec
 72℃ 4 min

} ×40 cycle

72℃ 5 min

同定した遺伝子を欠損した酵母の TBT 感受性の検討

同定された遺伝子を欠損した酵母を、新たに Complete set of *Saccharomyces cerevisiae* gene deletion strains (Euroscarf) からおこした。この酵母の TBT に対する感受性を 3. に示した方法を用いて検討した。

(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. 酵母の TBT に対する感受性に影響を与える因子のスクリーニング

1-1 遺伝子欠損株を用いたスクリーニング

酵母は約 6000 の遺伝子を持つが、そのうち酵母の生存に必須な遺伝子を除いた 4837 種の遺伝子をそれぞれ 1 つずつ欠損させた酵母株を用いて、酵母の TBT に対する感受性に影響を与える遺伝子を網羅的に検索した (Fig. 1)。まず、4837 種の遺伝子欠

損株を寒天培地上にそれぞれスポットし、増殖させることによりマスタープレート (77 枚) を作製した。次に、マスタープレート上の各遺伝子欠損株を異なる濃度の TBT (30, 40, 50, 60 μM) を含む寒天培地にレプリカ法で移し取り、レプリカプレートを作製した。このレプリカプレートを培養し、12 時間および 24 時間培養した時点でのそれぞれの遺伝子欠損株のコロニー形成を観察した。そのなかで、野生株がコロニーを形成できない濃度である 60 μM の TBT を含むプレート上でコロニーを形成する酵母株を TBT 耐性候補株とし、野生株がコロニーを形成できる最高濃度である 30 μM の TBT を含むプレート上でコロニー形成の遅い酵母株を TBT 高感受性候補株とした (Fig. 2)。本法においては、遺伝子欠損によって増殖速度に影響を生じた酵母株が、見かけ上耐性もしくは高感受性を示し、候補として選ばれる可能性がある。そこで、これら候補株を TBT を含む液体培地中で培養して、TBT に対する感受性を確認することによって、TBT に対して耐性または高感受性を示す遺伝子欠損株の確定を行った。

その結果、TBT に対する感受性が正常株と異なる遺伝子欠損株が 20 種同定された。そのうち、TBT に対し

て耐性を示す遺伝子欠損株は 12 種 (*abf2* Δ , *bul1* Δ , *dal81* Δ , *ixr1* Δ , *lrg1* Δ , *mms2* Δ , *msn2* Δ , *rvs167* Δ , *sfl1* Δ , *sro9* Δ , *tat1* Δ , *ubc13* Δ) (Figs. 3-1, 3-2) であり高感受性を示す遺伝子欠損株は 8 種 (*arg82* Δ , *erg4* Δ , *hvk2* Δ , *hxt12* Δ , *pdr3* Δ , *pdr5* Δ , *sok2* Δ , *ubr1* Δ) (Figs. 3-3, 3-4) であった。Table 1 及び Table 2 に、今回明らかとなった TBT 感受性に影響を及ぼす遺伝子について、その遺伝子名と遺伝子産物の機能を示した。これら遺伝子にコードされる蛋白質を機能で分類すると、transporter などの輸送に関与する因子 (Tat1, Hxt12, Pdr5)、ユビキチン化に関与する因子 (Bul1, Ubc13, Mms2, Ubr1)、転写に関与する因子 (Pdr3, Ixr1, Msn2, Dal81, Sok2, Sfl1)、その他 (Erg4, Rvs167, Abf2, Lrg1, Sro9, Arg82, Hvk2) となる。以下に各蛋白質の機能を示す。

Transporter などの輸送に関与する因子 (Tat1, Hxt12, Pdr5)

今回同定した遺伝子のうち、transporter (Tat1, Hxt12, Pdr5) をコードする遺伝子の欠損は酵母の TBT 感受性に特に強い影響を与えた。Tat1 : 遺伝子欠損により耐性 (Fig. 3-2(k))

Tat1 は、主に細胞膜に存在するア

ミノ酸トランスポーターでチロシン、トリプトファンなどの輸送を行っている(4, 5)。Tat1 については、3-2-1 でさらに検討を試みた。

Hxt12 : 遺伝子欠損により高感受性 (Fig. 3-3(p))

Hxt12 は糖の輸送に関与すると考えられているが、現在のところ明確な機能はわかっていない(6)。本研究では、糖の取込み調節に関与するキナーゼ Hxk2(6)も遺伝子欠損により TBT 感受性を増強する因子として同定されている。Hxt12 と Hxk2 の関係は不明だが、糖のトランスポーターの中には、Hxt6, 7 のように Hxk2 によって発現が制御されているものも存在する(7)。したがって、糖の細胞内への取り込みと TBT 感受性との間に何らかの関連があるものと推測される。

なお、本研究において、*HXT12* 遺伝子欠損株に Hxt12 を発現させても遺伝子欠損株でみられる TBT 高感受性を回復することができなかった。*HXT12* 遺伝子欠損株は、TBT に対し非常に高い感受性を示したが *HXT12* 遺伝子はやや特殊な構造をしており、その ORF の途中に stop codon を含み、2 つの open reading frame (*YIL170w*, *YIL171w*) を有している(6)。スクリーニングで得た *HXT12* 遺伝子欠損株は、2 番目の

ORF である *YIL170w* のみが欠損されており、この欠損株において、*HXT12* 遺伝子中の残りの部分である *YIL171w* から変異 RNA または変異蛋白質が発現している可能性がある。Hxt12 はヘキソーストランスポーターファミリーに属し、塩基配列が他のヘキソーストランスポーターと非常に高い相同性 (*HXT11*: 98%, *HXT9*: 98%, *HXT7*: 74%) をもつ。従って、*YIL171w* 由来の産物が他のヘキソーストランスポーターの機能に影響を及ぼし、TBT 感受性に影響を及ぼしている可能性も考えられる。

Pdr5 : 遺伝子欠損により高感受性 (Fig. 3-4(r))

Pdr5 は高発現により酵母に TBT 耐性を与える因子として既に報告されている(8)。Pdr5 は、酵母に多剤耐性を与える ATP-binding cassette transporter(8)の 1 種であり、細胞膜に存在する Pdr5 が TBT の細胞外への排出を促進することにより酵母に TBT 耐性を与えると考えられている。

転写に関与する因子 (Pdr3, Ixr1, Msn2, Dal81, Sok2, Sfl1)

Pdr3 : 遺伝子欠損により高感受性 (Fig. 3-4(q))

Pdr3 は、酵母に多剤耐性を与える因子群の転写制御に関与する因子(9)であり、既知の TBT 耐性因子である

トランスポーターPdr5 も Pdr3 により転写が制御されている(10)。そのため、*PDR3* 遺伝子欠損による TBT 感受性増強機構に Pdr5 の発現量の減少が関与する可能性が考えられる。

Ixr1 : 遺伝子欠損により耐性 (Fig. 3-1(d))

Ixr1 は低酸素条件下で発現する因子群の転写抑制を行うと考えられている因子である(11)。

Msn2 : 遺伝子欠損により耐性 (Fig. 3-2(g))

Msn2 は、栄養枯渇や酸化ストレスに応答して発現する因子群の転写を制御することが示唆されている(12)。

Dal81 : 遺伝子欠損により耐性 (Fig. 3-1(c))

Dal81 は、アミノ酸や GABA の取込みに関与するトランスポーターを含む因子群の転写を制御することが示唆されている(13)。

Sok2 : 遺伝子欠損により高感受性 (Fig. 3-4(s))

Sok2 は、孢子形成の制御に関与することが示唆されている(14)。

Sfl1 : 遺伝子欠損により耐性 (Fig. 3-2(i))

Sfl1 は転写を抑制する活性をもつが、その機能はあまりよくわかっていない(15)。

ユビキチン化に関与する因子

(Ubc13, Mms2, Bul1, Ubr1)

ユビキチン化に関与する因子としては、Ubc13, Mms2, Bul1, Ubr1 が遺伝子欠損により TBT 感受性に影響を及ぼした。ユビキチン化の生体内での役割は、プロテアソームによって分解される蛋白質の選別・標識がよく知られているが、エンドサイトーシスや DNA 修復などにも関与することが明らかにされつつある(16-18)。ユビキチンは 76 個のアミノ酸からなる小さな蛋白質で、ユビキチン活性化酵素 (E1), ユビキチン転移酵素 (E2), ユビキチン連結酵素 (E3) から構成される複合酵素系によって標的蛋白質に共有結合する(16)。

Ubc13 : 遺伝子欠損により耐性 (Fig. 3-2(l))

Ubc13 はユビキチン転移酵素 (E2) であり、DNA 修復に関与することが示唆されている(18)。

Mms2 : 遺伝子欠損により耐性 (Fig. 3-1(f))

Mms2 は DNA 修復に関与することが示唆されている因子である(19)。

Mms2 は Ubc13 とヘテロダイマーを形成しユビキチン化反応を行うことが明らかにされている(19)。

Bul1 : 遺伝子欠損により耐性 (Fig. 3-1(b))

Bul1 の機能については不明な点が多いが、ユビキチン連結酵素 (E3) で