

Fig. 4-1. 高発現用プラスミドの機能の確認 (1)

高発現用プラスミドの導入による遺伝子欠損株のTBT感受性の回復を指標に、プラスミドの機能の確認をおこなった。酵母を96 well plate中で各濃度のTBT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)。

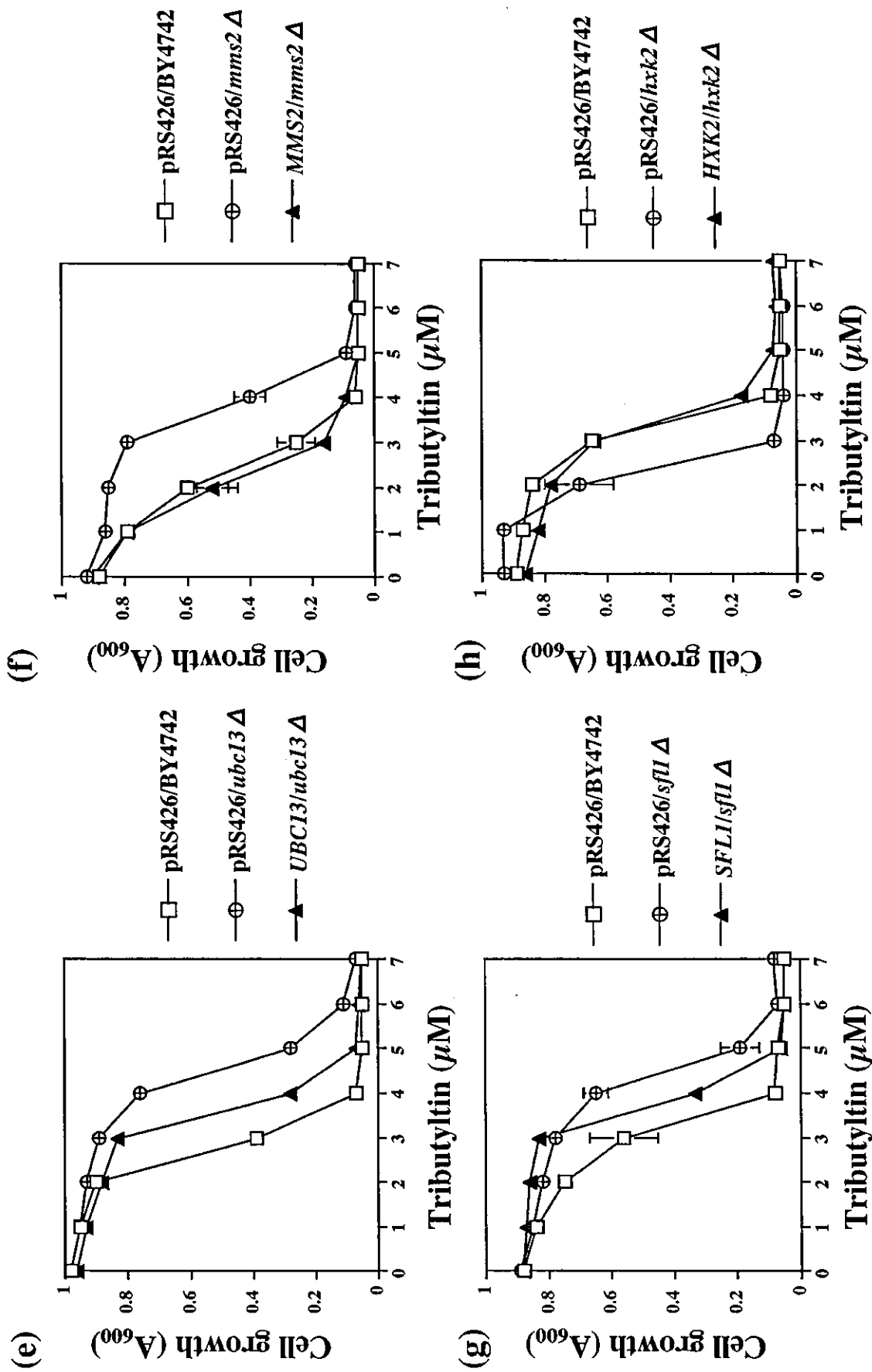


Fig. 4-2. 高発現用プラスミドの機能の確認 (2)

高発現用プラスミドの導入による遺伝子欠損株のTBT感受性の回復を指標に、プラスミドの機能の確認をおこなった。酵母を96 well plate中で各濃度のTBT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)。

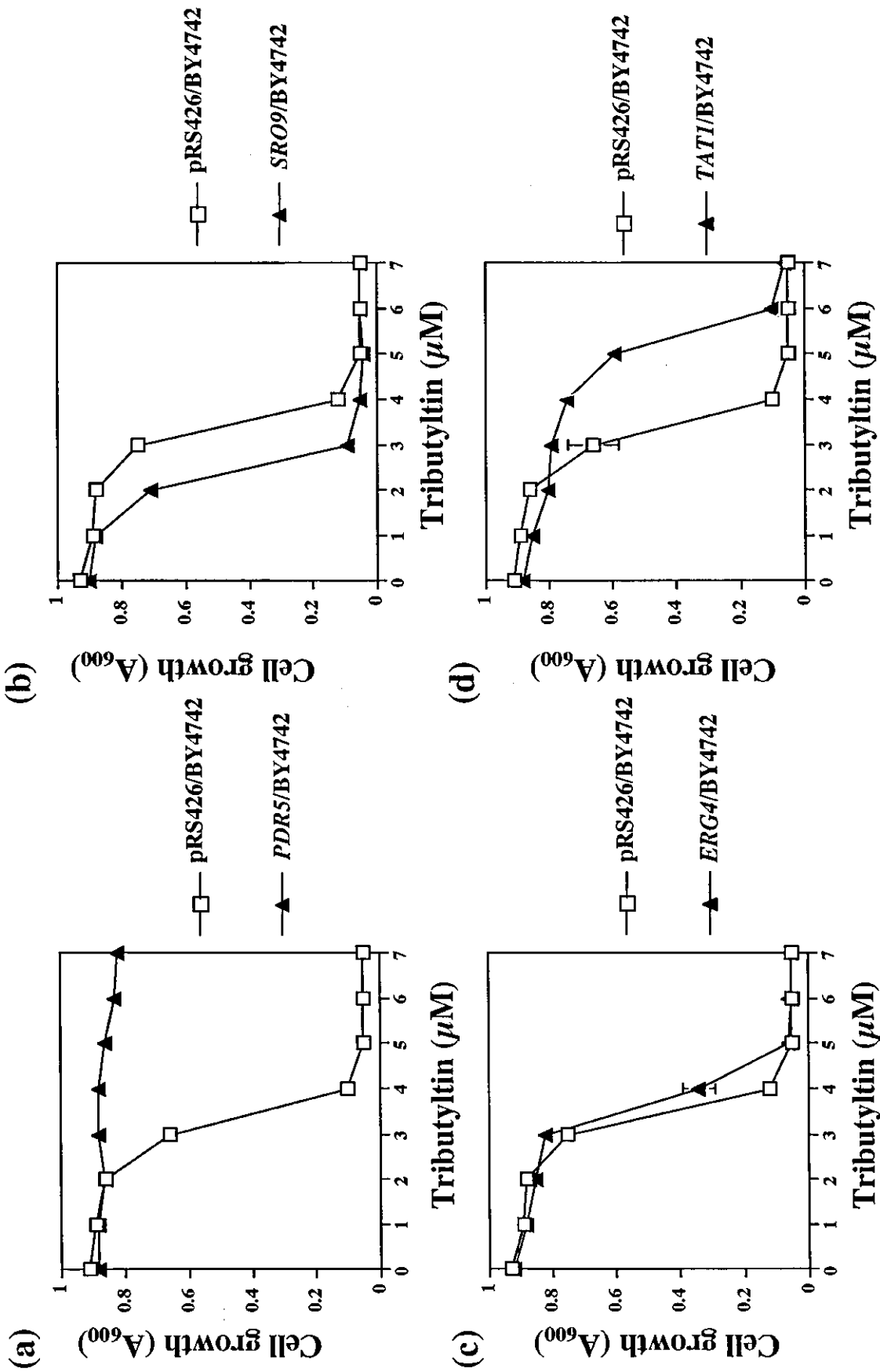
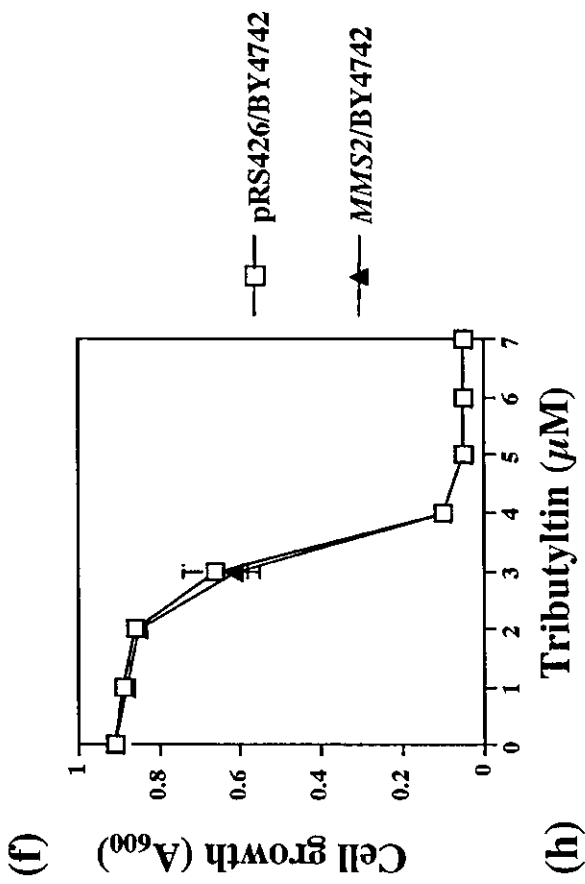
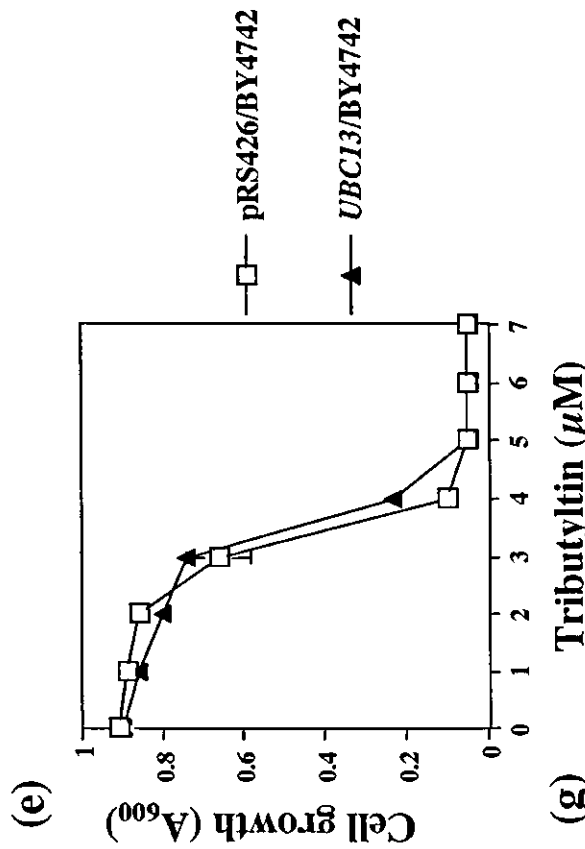
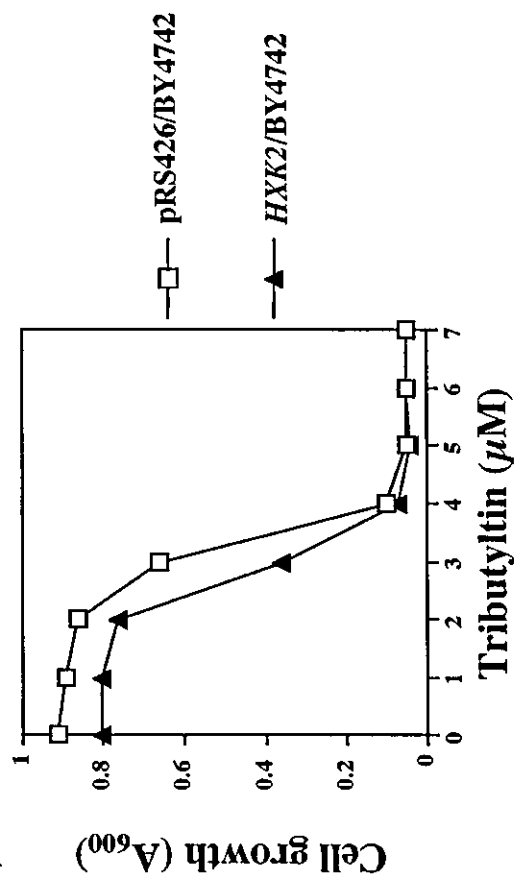


Fig. 5-1. 欠損により TBT 感受性に影響を与える因子の高発現が TBT 感受性に及ぼす影響 (1) 遺伝子欠損により酵母の TBT 感受性に影響を与える因子について、酵母に高発現させ、TBT に対する感受性を調べた。酵母を 96 well plate 中で各濃度の TBT 存在下 48 時間培養した後に、600 nm の吸光度を測定した ($n=3$)。



(h)



(g)

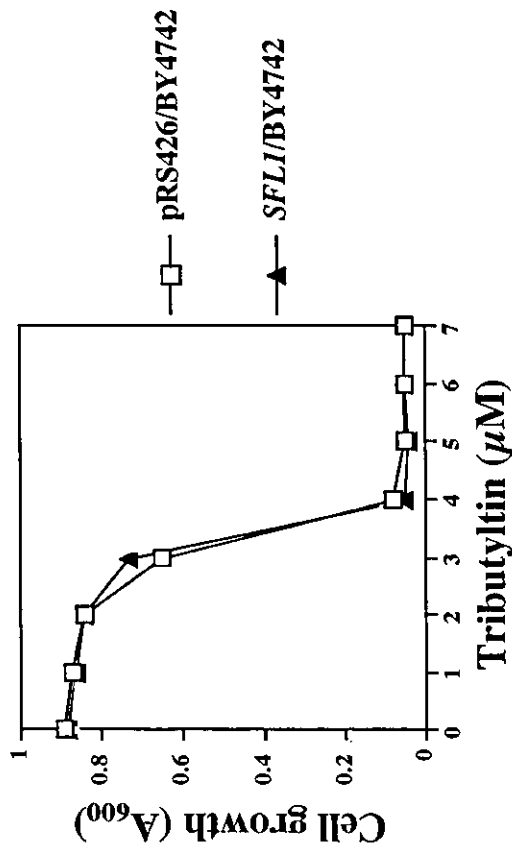


Fig. 5-2. 欠損により TBT 感受性に影響を与える因子の高発現が TBT 感受性に及ぼす影響 (2) 遺伝子欠損により酵母の TBT 感受性に影響を与える因子について、酵母に高発現させ、TBT に対する感受性を調べた。酵母を 96 well plate 中で各濃度の TBT 存在下 48 時間培養した後に、600 nm の吸光度を測定した ($n=3$)。

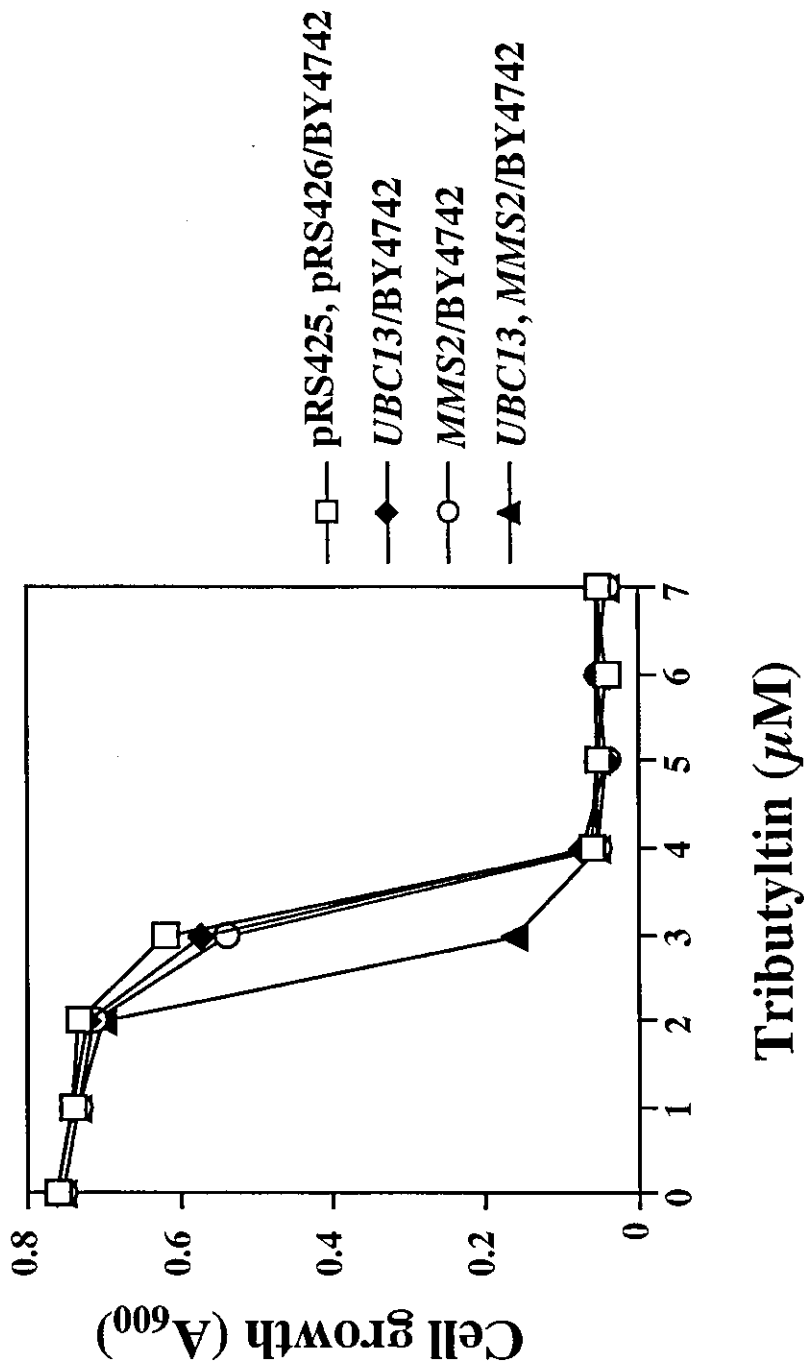


Fig. 6. Ubc13およびMms2を共に高発現させた酵母のTBTに対する感受性
 酵母を96 well plate中で各濃度のTBT存在下48時間培養した後に、600 nmの吸光度を測定した (n=3)。
 (—□—): コントロール, (—◆—): Ubc13高発現酵母, (—○—): Mms2高発現酵母, (—▲—): Ubc13, Mms2を
 共に高発現した酵母。

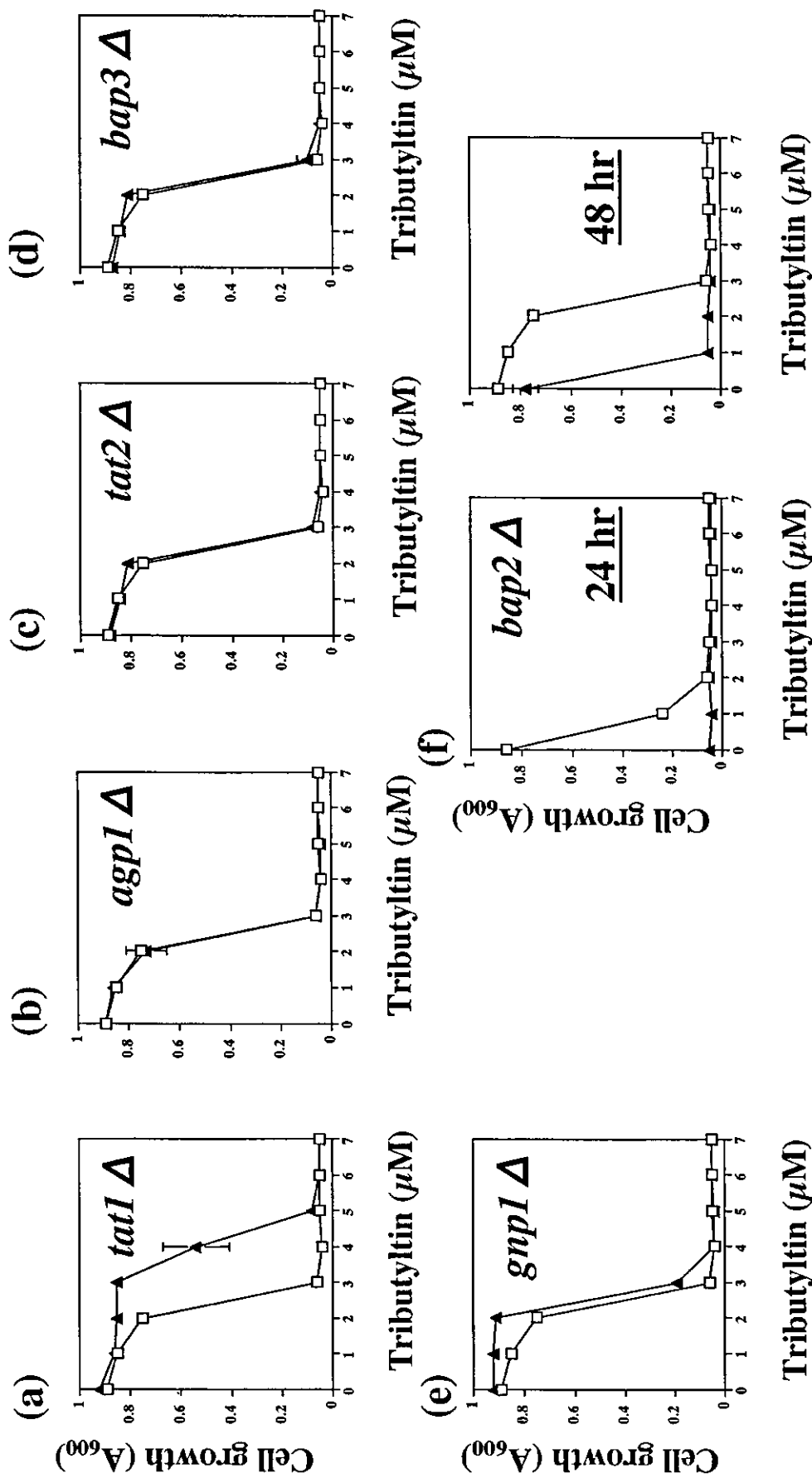


Fig. 7-1. APC familyに属する因子の遺伝子欠損株の生存曲線 (1)

酵母を96 well plate中で各濃度のTBT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)。

(—▲—) は以下に示す遺伝子欠損株のTBT存在下での生存曲線を示す (a) *tat1* Δ, (b) *agp1* Δ, (c) *tat2* Δ, (d) *bap3* Δ, (e) *gnp1* Δ, (f) 酵母 (BY4742, *bap2* Δ) を96 well plate中で各濃度のTBT存在下24, 48時間培養し、各培養時間における600 nmの吸光度を測定した (n=3)。なお、(—□—) は野生株 (BY4742)のTBT存在下での生存曲線を示す。

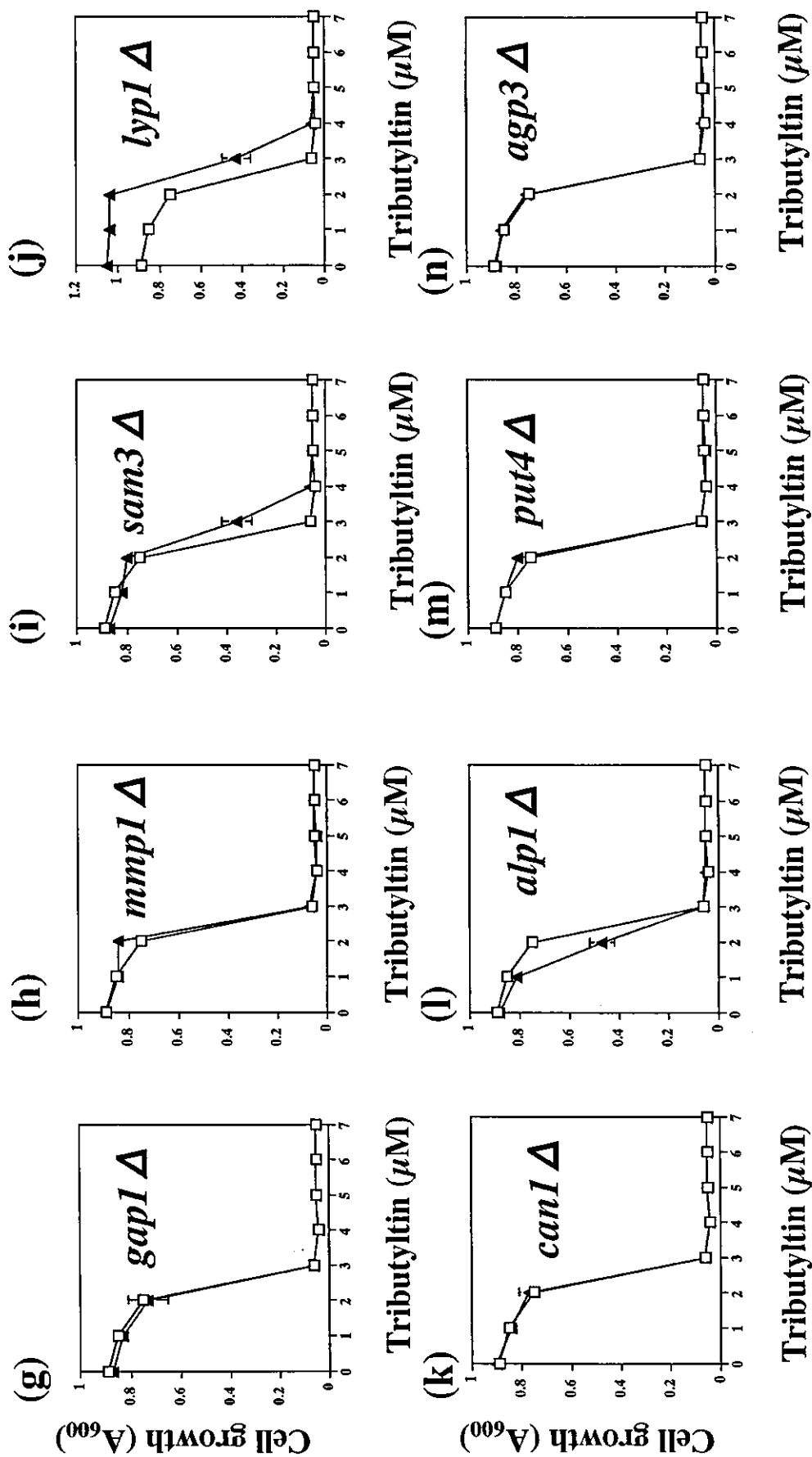


Fig. 7-2. APC familyに属する因子の遺伝子欠損株の生存曲線 (2)

酵母を96 well plate中で各濃度のTBT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)。

(—▲—) は以下に示す遺伝子欠損株のTBT存在下での生存曲線を示す (g) *gap1* Δ, (h) *mmp1* Δ, (i) *sam3* Δ, (j) *lyp1* Δ, (k) *can1* Δ, (l) *alp1* Δ, (m) *put4* Δ, (n) *agp3* Δ, なお、(—□—) は野生株 (BY4742)のTBT存在下での生存曲線を示す。

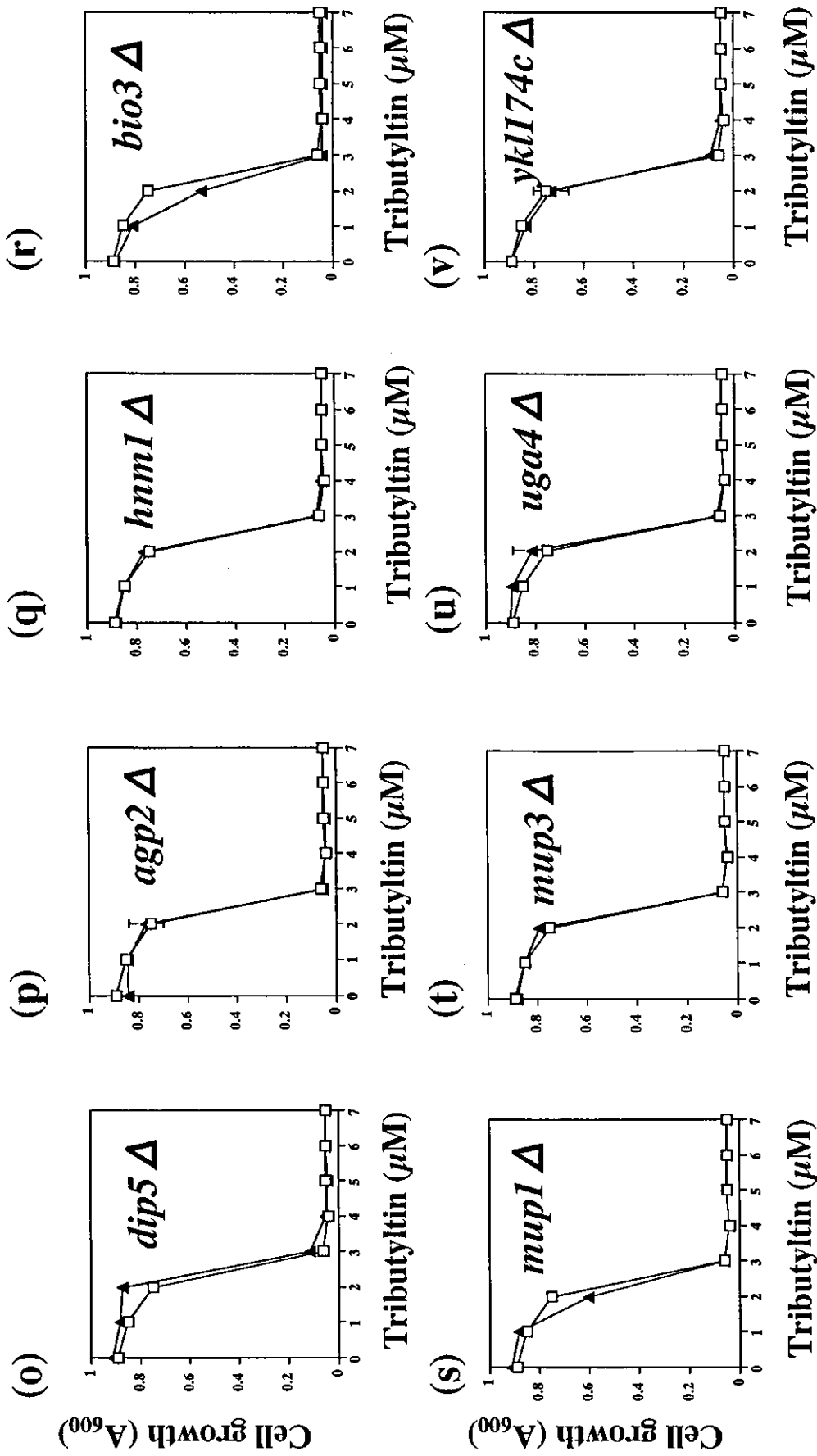


Fig. 7-3. APC familyに属する因子の遺伝子欠損株の生存曲線の生存曲線 (3)

酵母を96 well plate中で各濃度のTBT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)。

(—▲—) は以下に示す遺伝子欠損株のTBT存在下での生存曲線を示す (o) *dip5* Δ , (p) *agp2* Δ , (q) *hnm1* Δ , (r) *bio3* Δ , (s) *mup1* Δ , (t) *mup3* Δ , (u) *uga4* Δ , (v) *ykl174c* Δ , なお、(—□—) は野生株 (BY4742)のTBT存在下での生存曲線を示す。

(A) Ergosterol biosynthesis pathway

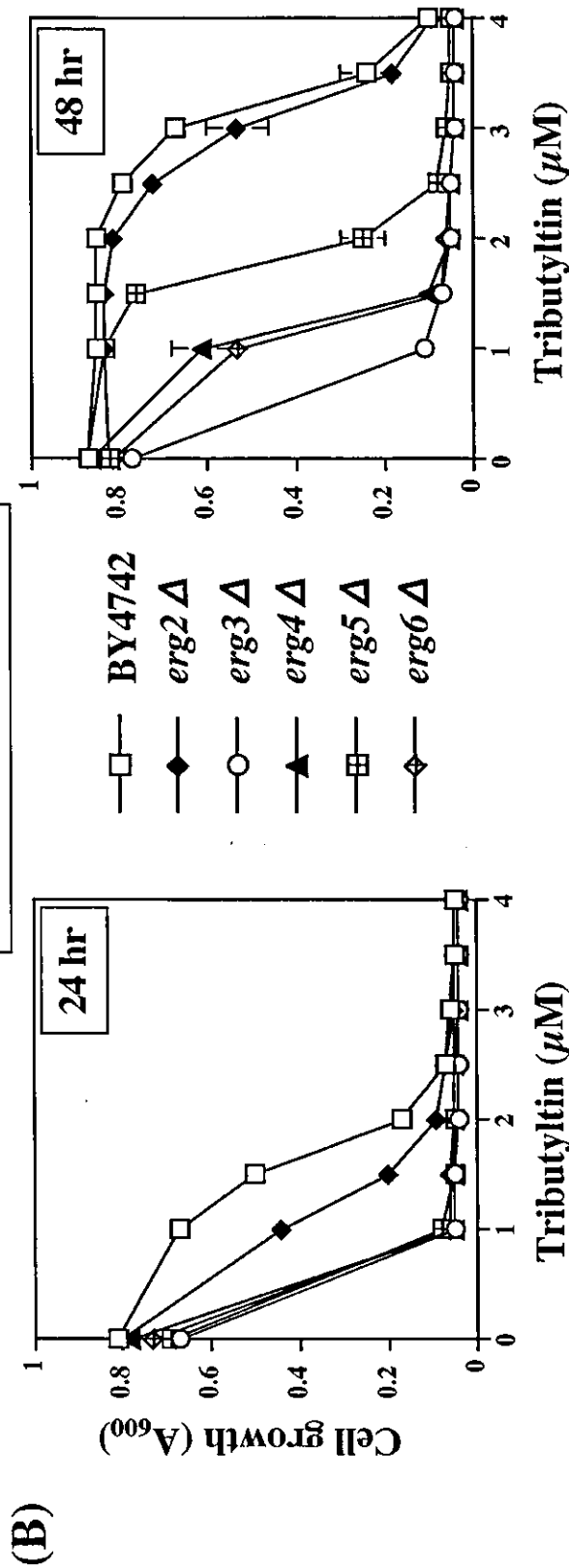
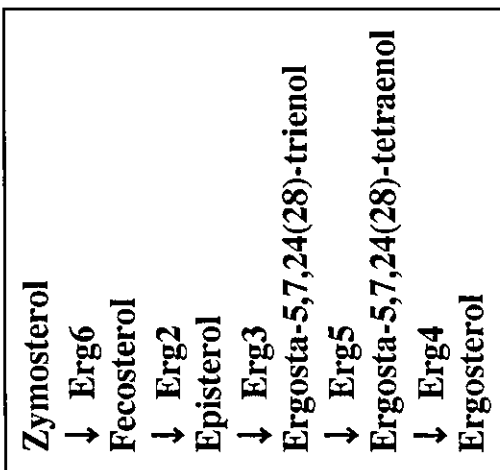


Fig. 8. エルゴステロール合成経路変異酵母のTBTに対する感受性の検討
 (A) エルゴステロール合成経路, (B) 酵母を96 well plate中で各濃度のTBT存在下24, 48時間培養し、各培養時間における600 nmの吸光度を測定した (n=3)。

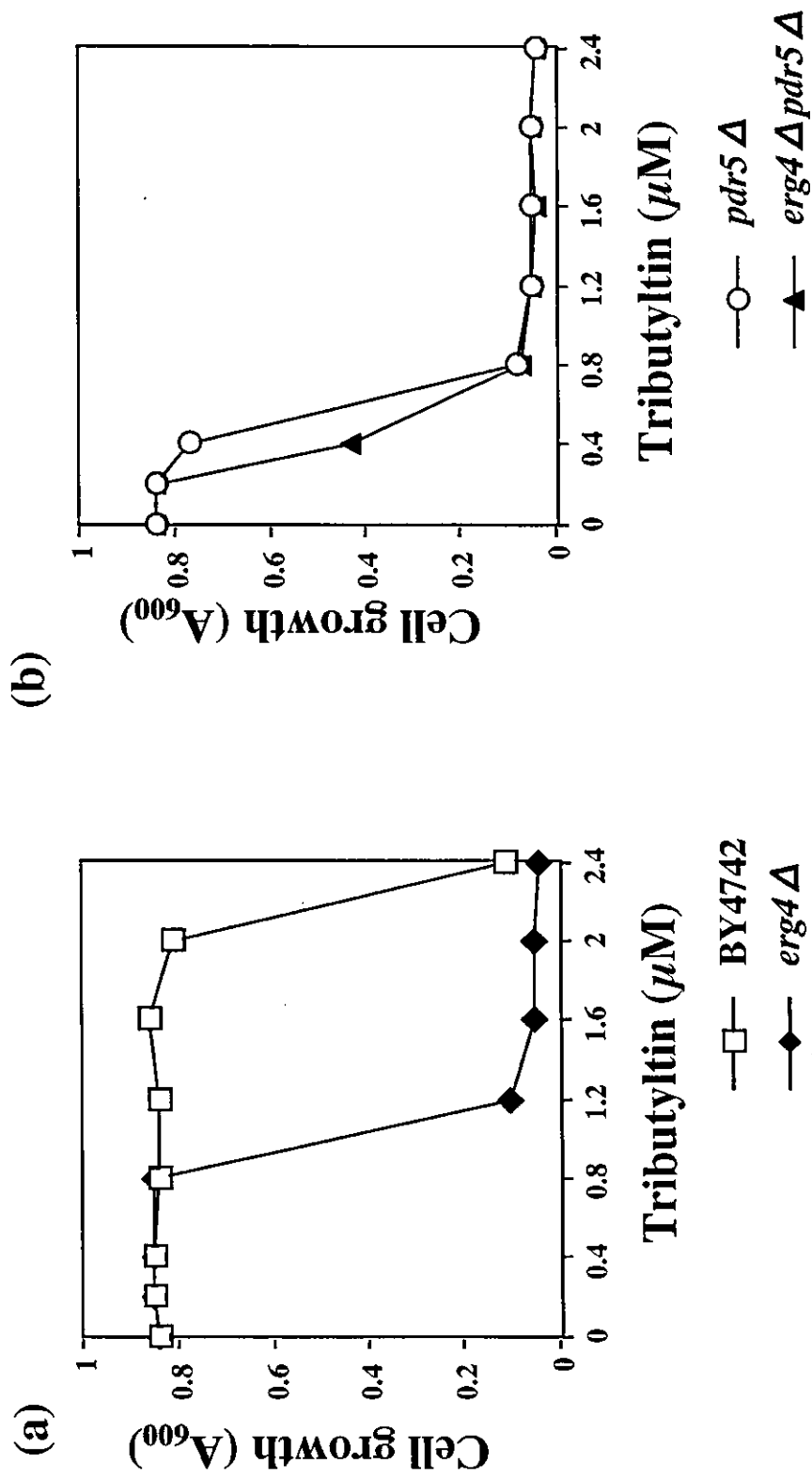


Fig. 9. ERG4遺伝子欠損によるTBT感受性増強機構へのPdr5の効果

酵母を96 well plate中で各濃度のTBT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)。
 (a): Erg4のみ欠損させた際の酵母のTBT感受性への影響, (b): Pdr5の欠損した条件下でErg4を欠損させた際の酵母のTBT感受性への影響。

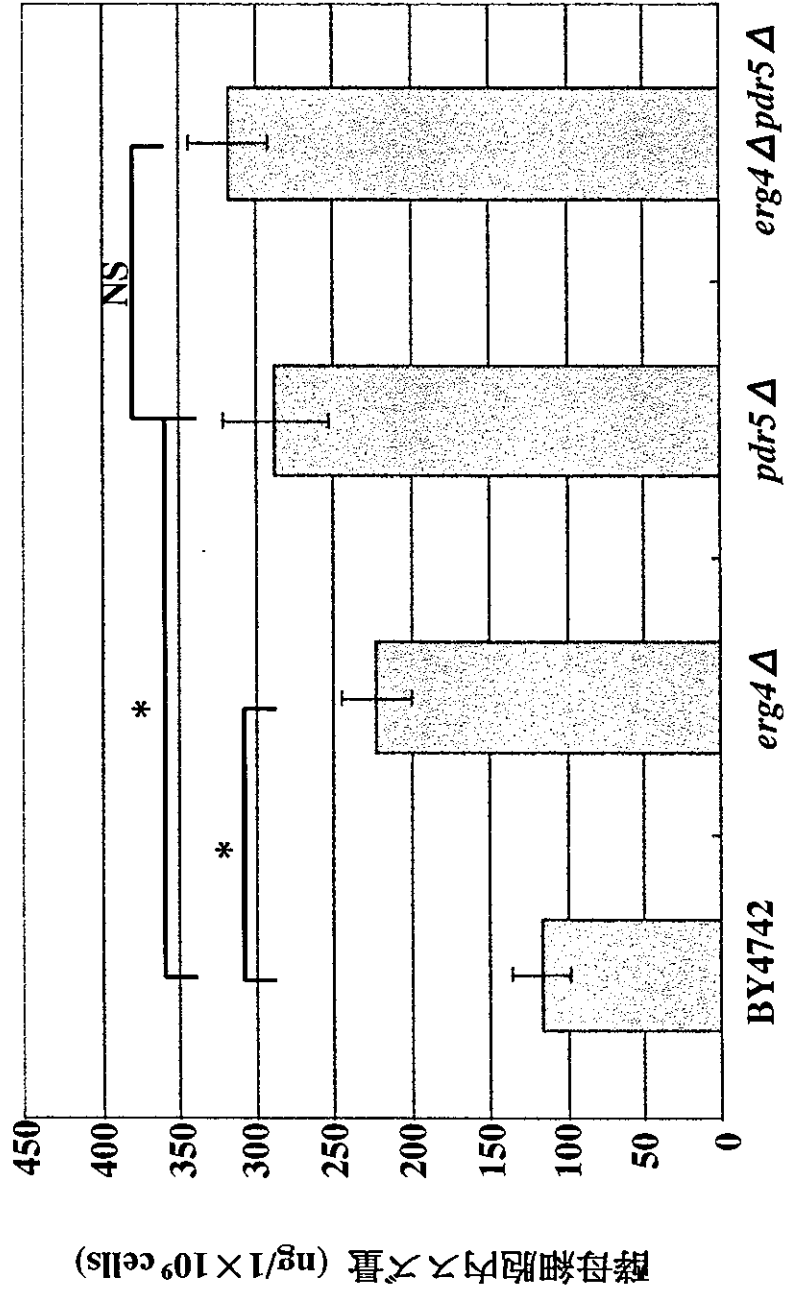


Fig. 10. ERG4遺伝子欠損株の細胞内スズ量にPdr5が及ぼす影響

酵母 (1×10^9 cells) を $10 \mu\text{M}$ の TBT を含む YPAD 液体培地で 3 時間培養後、湿式灰化し、ICP-MS により細胞内のスズ量を測定した ($n=4$)。*: $p < 0.05$, NS: 有意差なし

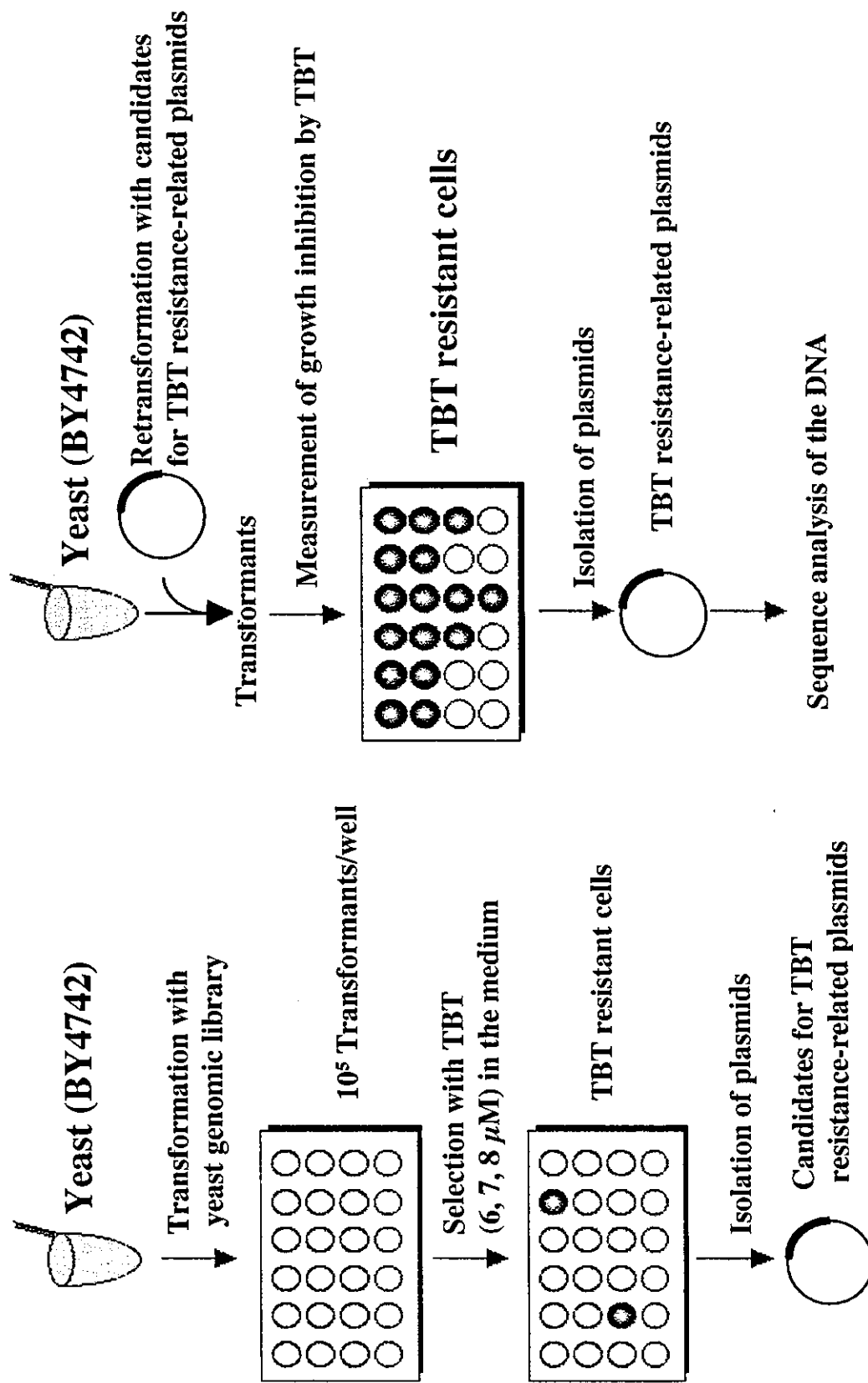


Fig. 11. 高発現によって酵母にTBT耐性を与える遺伝子のスクリーニング方法

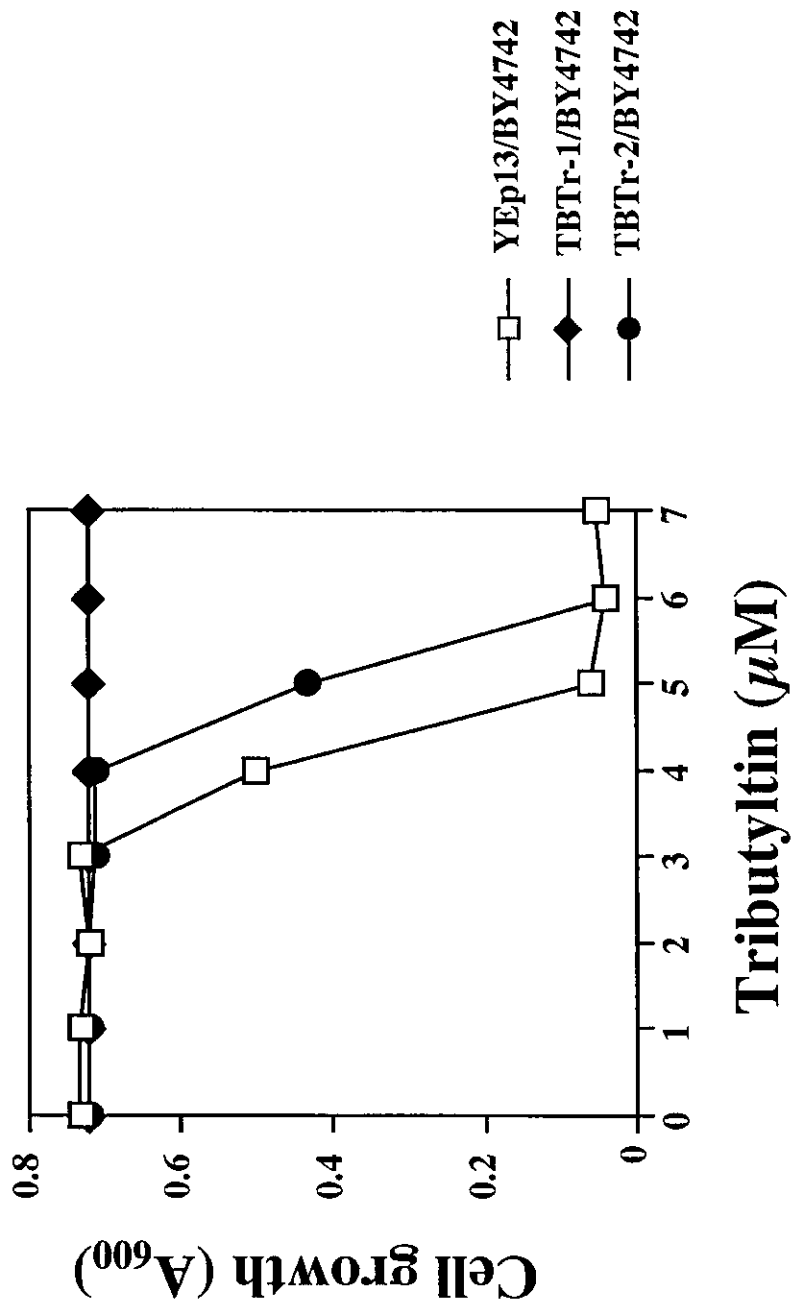


Fig. 12. 高発現株スクリーニングより得られたTBT耐性酵母株の生存曲線

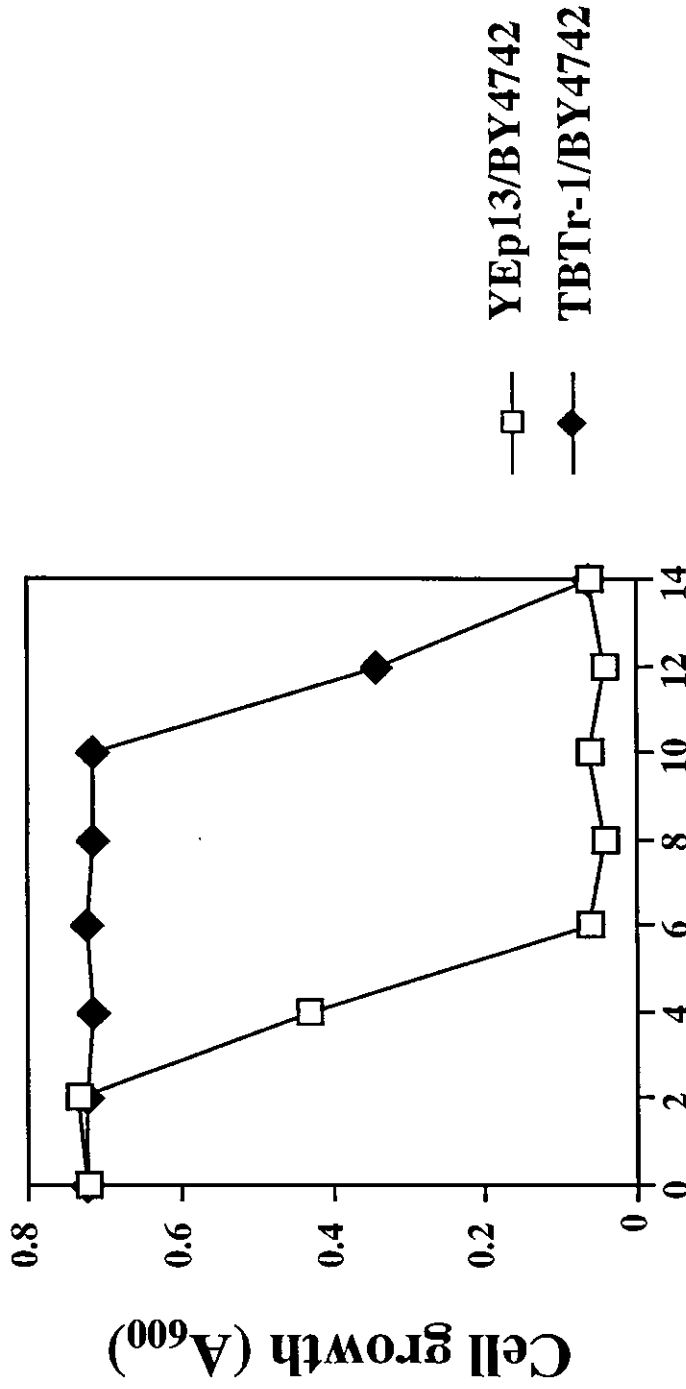
遺伝子高発現によりTBTに対して耐性を獲得した酵母のTBT存在下での生存曲線を示す。
 酵母と各濃度のTBTを96 well plate中で48時間培養した後に、600 nmの吸光度を測定した (n=3)。

(A) Chromosome XV 624729 - 619040

PDR5



(B)



Tributyltin (μM)

Fig. 13. TBTr-1プラスミドにおけるTBT耐性遺伝子の同定

(A) TBTr-1に含まれる酵母遺伝子断, (B) 酵母を96 well plate中で各濃度のTBT存在下48時間培養した後、600 nmの吸光度を測定した (n=3)。 (—◆—): TBTr-1を導入した酵母のTBT存在下での生存曲線, (—□—): コントロール。

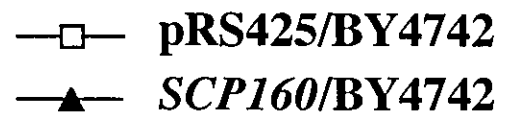
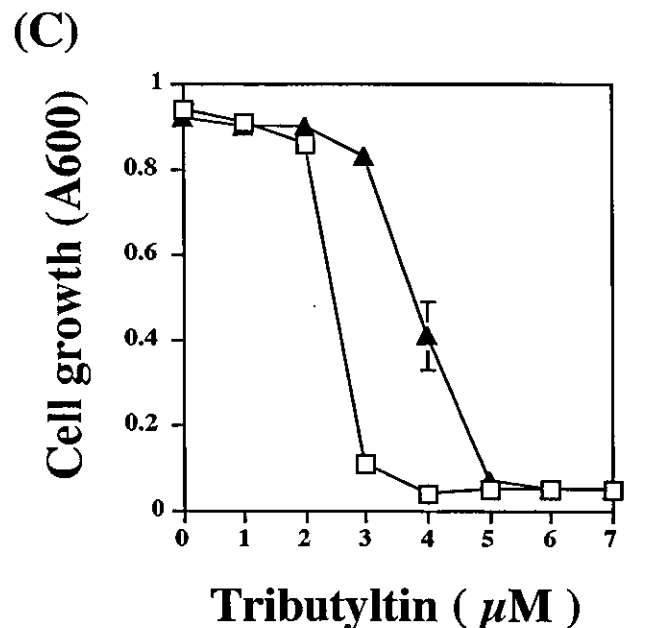
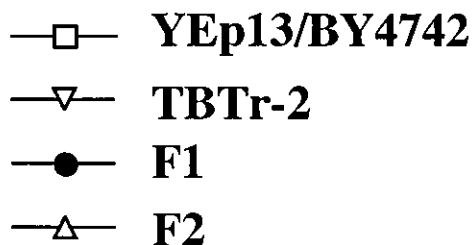
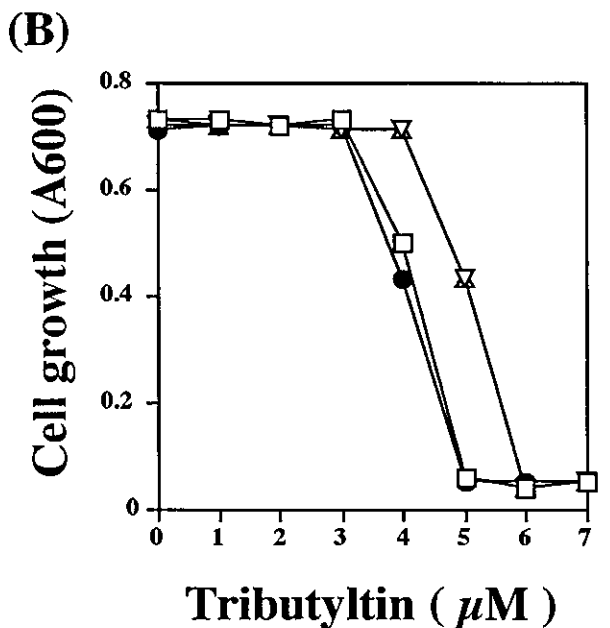
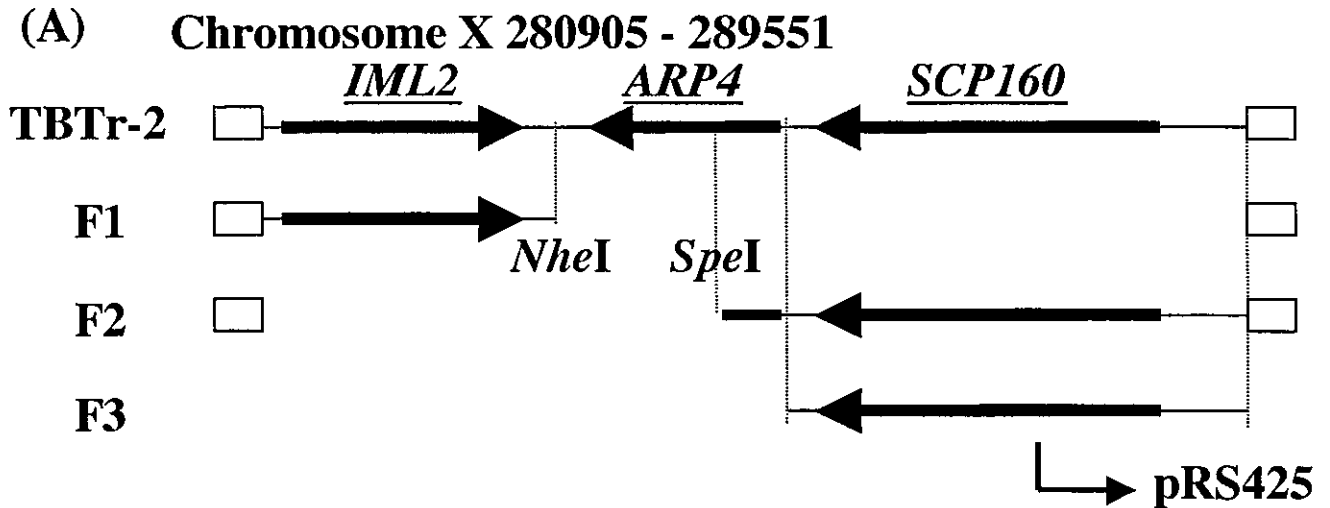


Fig. 14. TBTr-2プラスミドにおけるTBT耐性遺伝子の同定

(A) TBTr-2に含まれる酵母遺伝子断片 (TBTr-2) および 作製したプラスミドに含まれる遺伝子断片 (F1, F2, F3) 酵母を96 well plate中で各濃度のTBT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)。 (B) F1, F2プラスミドをそれぞれ導入した酵母のTBT存在下での生存曲線, (C) F3プラスミド (SCP160) を導入した酵母のTBT存在下での生存曲線。

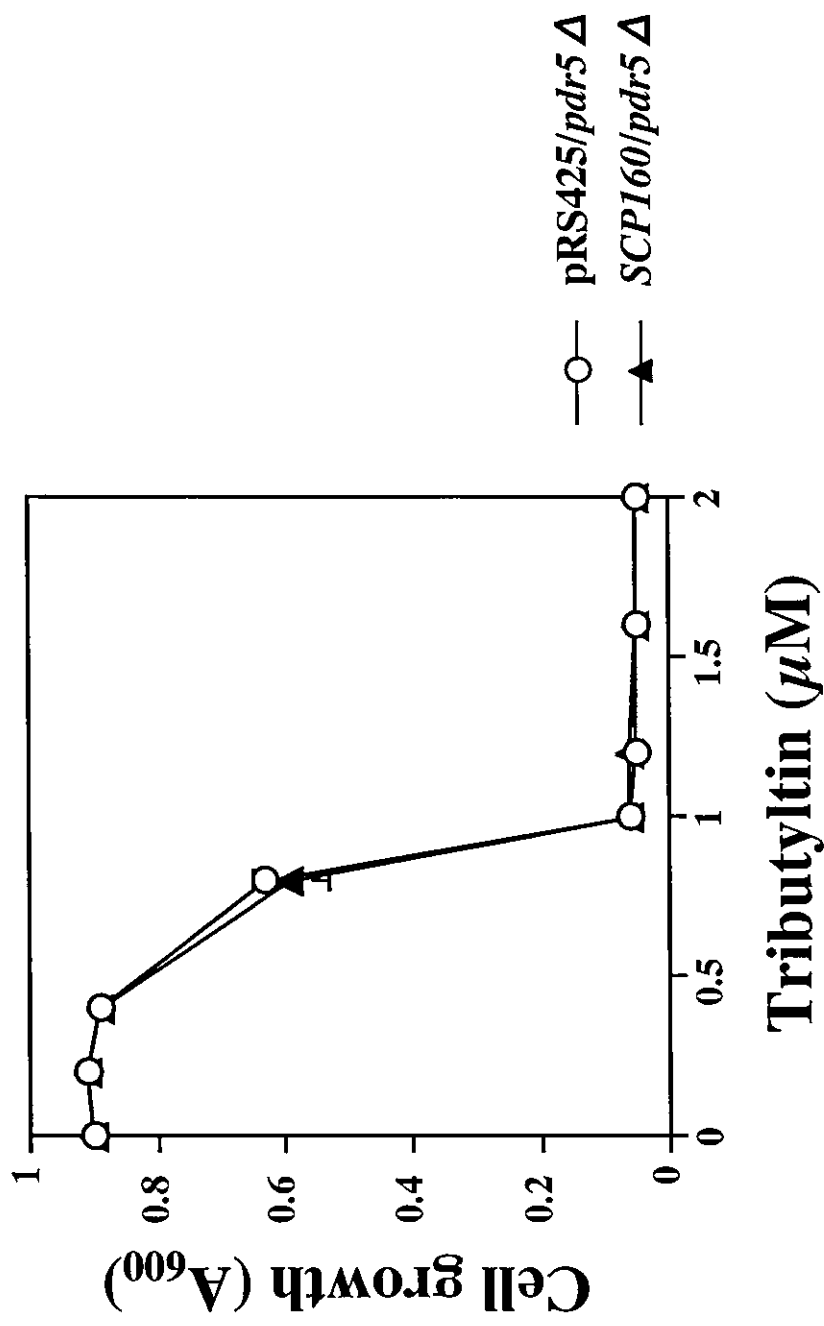


Fig. 15. *PDR5* 遺伝子欠損酵母に *Scp160* を高発現させた際の生存曲線
 酵母を 96 well plate 中で各濃度の TBT 存在下 48 時間培養した後に、600 nm の吸光度を測定した (n=3)。

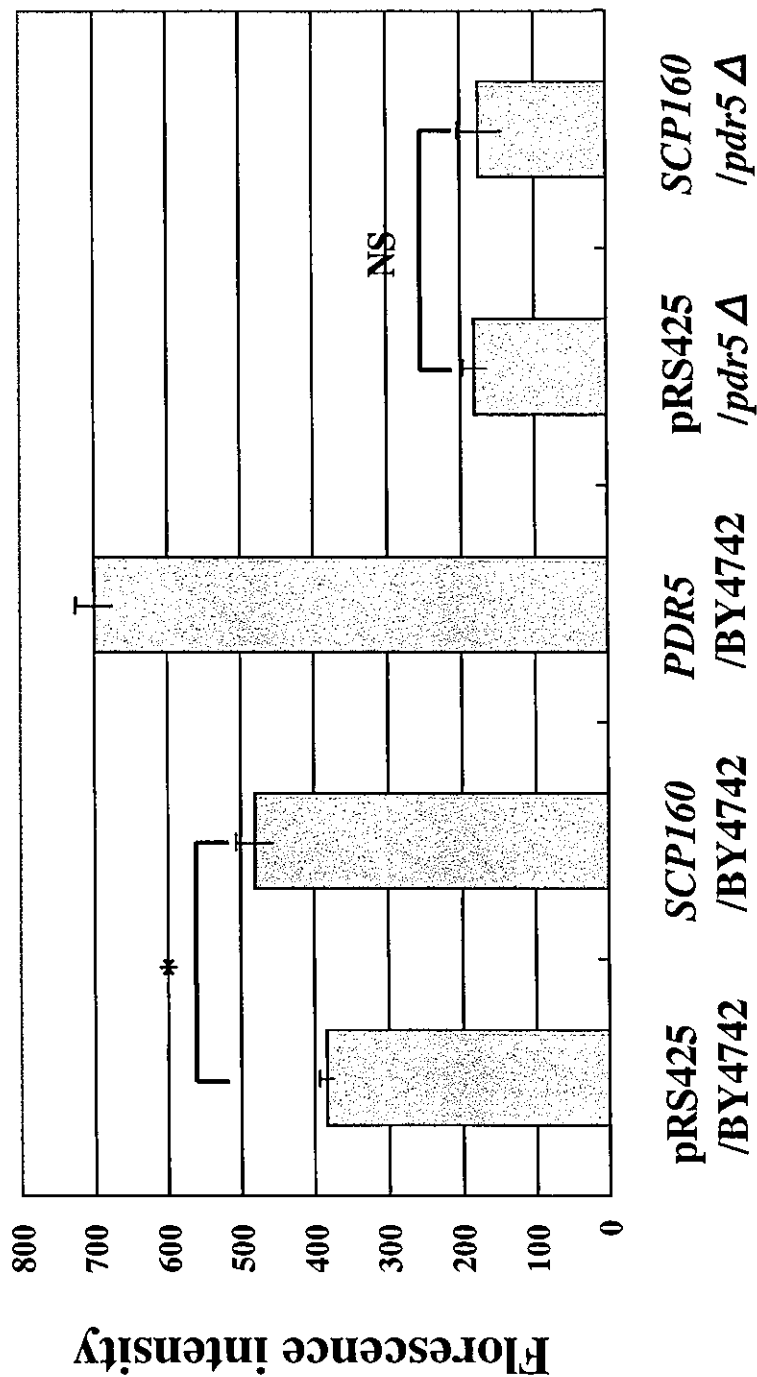


Fig. 16. Pdr5によるローダミン6G排出に及ぼすScp160高発現の効果

酵母をローダミン6Gおよびグルコース代謝拮抗剤である2-deoxy-D-glucoseと共に2時間培養し細胞内にローダミン6Gを取り込ませた。洗浄した後で1 mM glucoseを添加し、30°Cで7分間放置した。その後、遠心し、上清の蛍光強度を測定した (n=3)。*: $p < 0.05$, NS: 有意差なし

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

パラコート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

欠損によって酵母のパラコートに対する感受性に影響を与える遺伝子を 39 種同定した。その中にはエンドサイトーシスに関与するものが多数含まれていた。生体は細胞膜上の蛋白質をエンドサイトーシスにより細胞内に取り込み、不要となった一部の蛋白質を、リソソームや液胞（酵母の場合）に輸送し分解する。この廃棄すべき蛋白質の選別はエンドソーム上の一連の因子群により行われ、その経路は multivesicular body (MVB) sorting pathway とよばれる。我々が同定したパラコート感受性に影響を及ぼす因子の中には MVB sorting pathway を構成する 14 の因子が全て含まれており、これら一連の因子群のどの因子が欠損しても酵母のパラコートに対する感受性が増強されるという、非常に興味深い知見を得ることが出来た。MVB sorting pathway を構成する因子の機能が失われると、リソソームや液胞に廃棄されるべき蛋白質がエンドソーム膜に蓄積してしまうことが知られており、我々の結果は、パラコート毒性の軽減にエンドソーム上での廃棄すべき蛋白質の選別が重要な役割を持つことを示唆している。現在は、MVB sorting pathway による選別後の液胞やリソソームへの輸送経路、および細胞膜からエンドソームへの取り込みに関与する経路について、それぞれに関与する因子群がパラコート感受性に与える影響を解析中である。

A. 研究目的

スーパーオキシドアニオン (O_2^-) やヒドロキシラジカル (OH)、過酸化水素 (H_2O_2) に代表される活性酸素種 (ROS : reactive oxygen species) は、呼吸に伴う酸素の摂取によりミトコンドリアの呼吸鎖などで産生さ

れる。ROS は反応性が強く生体に毒性を及ぼすため、生体内では活性酸素に対する防御機構が備わっており、常に生体の恒常性 (ホメオスタシス) が維持されている。しかし、薬剤、放射線、紫外線、などの外来性の因子により過剰の ROS が発生すると、

生体内で ROS を十分処理することができなくなる。このような状態で過剰の ROS は細胞に傷害を与え、老化やがん、さらに動脈硬化などの疾患の引き金となることが指摘されており、極端に過剰な ROS の発生は細胞死または個体死を招くこともあり得る。このような急激な ROS の増加に対する生体内での防御機構を解明するために私は活性酸素産生物質であるパラコートを用いて細胞レベルでの解析を始めた。

パラコートは農薬として現在も広く利用されている。Fig. 1 で示したように、パラコートは NADPH から 1 電子還元を受けてパラコートフリーラジカルを形成し、このラジカルが酸素に電子を供与することによって O_2^- が産生する。したがって、その毒性は、 O_2^- の増加に伴う酸化ストレスであると考えられている[1]。

そこで、本研究ではまずパラコート毒性に対する生体内防御機構の解明を目的として、出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) を用いてパラコート毒性に影響を与える因子の検索を行った。

B. 研究方法

親株が生育できないパラコート濃度の条件検討

酵母 BY4742 野生株を SD 培地 2 ml に植菌し、30℃で一晩培養した後、この培養液を SD 培地で 5×10^7 cells/ml になるように希釈した。この希釈培養液 200 μ l をパラコート(25, 50, 100 mM)を含む SD 寒天培地に播き、30℃で7日間培養した。このとき、BY4742 野生株がコロニーを形成せず、パラコート濃度が最も低いものを親株が生育できない濃度としてスクリーニングに用いた。

パラコート耐性遺伝子欠損株のスクリーニング

グリセロールストックにて保存されている欠損酵母の mix を YPAD 培地に植菌し、30℃で一晩培養した後、この培養液を YPAD 培地で 5×10^7 cells/ml になるように希釈した。この希釈培養液 200 μ l を、前述した条件検討によって得られた親株が生育できない濃度であるパラコート 50 mM を含む SD 寒天培地に播き、30℃で2~4日間培養した。このとき生育できたコロニーをパラコート耐性候補株として別の YPAD 寒天培地上に広げ、パラコート耐性候補株のシングルコロニーを得た。

酵母からのゲノム DNA の回収

スクリーニングによって得られたパラコート耐性候補株を YPAD 培地

10 ml に植菌し、30℃で一晩培養した後、この培養液を 3000 rpm で 5 分間遠心して細胞を集め上清を捨てた。その後細胞を 1M sorbitol, 0.1M Na₂EDTA (pH 7.5) 0.5 ml で洗浄した後に、再度 1M sorbitol, 0.1M Na₂EDTA (pH 7.5) 0.5 ml で懸濁し、2.5 mg/l zymoliasse 100T 20 μl を加えて 30℃で 1 時間インキュベートした。この培養液を 12000 rpm で 1 分間遠心し上清を捨てた後、細胞を 50 mM Tris-HCl, 20 mM Na₂EDTA 0.5 ml に懸濁し、10%SDS 50 μl を加えて軽く攪拌し、65℃で 30 分間インキュベートした。この抽出液に 5M KOAc 0.2 ml を加えて、氷上で 30 分間置き、12000 rpm で 10 分間遠心してゲノム DNA を含む上清を得た。得られた DNA 溶液をエタノール沈殿により濃縮した後、最終的に TE (10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 1 mM Na₂EDTA 200 μl) に懸濁しゲノム DNA 溶液とした。

パラコート耐性候補株の遺伝子欠損部分の解析 (Inverse PCR 法)

得られたゲノム DNA 溶液のうち 100 μl を用いて、この DNA 溶液に 1 mg/ml RnaseA 溶液を加え、37℃で 30 分間インキュベートして RNA を除いた。その後、滅菌イオン交換水を加えて 200 μl の DNA 溶液とし、

フェノール抽出を行い最終的にゲノム DNA を TE 100 μl に懸濁し、精製した。このゲノム DNA 溶液 10 μl を用いて、ゲノム DNA を *EcoRI* で切断し、細分化した。なお、ゲノム DNA が細分化されたことを、得られた DNA 溶液の一部を用いて電気泳動を行い、スメアー状のバンドが見えることによって確認した。細分化した DNA 溶液にフェノール抽出を行い、*EcoRI* を失活させた後、この DNA 溶液 1 μl を用いて、T4 DNA ligase で self-ligation させて細分化した DNA を環状にした。この環状 DNA を template として、PCR を行った。

PCR サイクル

94℃	5 分	} 40 サイクル
94℃	15 秒	
55℃	30 秒	
72℃	3 分	
72℃	5 分	

primer

forward (*Dra I*, *EcoR I*, *Hind III* -1) : 5' - GTATGTGAATGCTGGTCGCT-3'
reverse (*Dra I*, *EcoR I*, *Hind III* -2) : 5' - TATGGGCTAAATGTACGGGC-3'

増幅した目的のフラグメントを電