

気泳動により分離しアガロースゲルから精製した後、このフラグメントを template DNA として、template DNA 2 μ l に、3.2 pmol primer 0.5 μ l (forward または reverse) , Premix 2.5 μ l を加え、PCR を行った。

PCR サイクル

96°C	20 秒	} 40 サイクル
50°C	20 秒	
60°C	2 分	

※ なお、用いた primer は *Dra* I , *Eco* R I , *Hind* III -1, 2 である。

反応終了後、stop solution (3M NaOAc 1 μ l, 100 mM Na₂EDTA 1 μ l, 20 mg/ml glycogen 0.5 μ l) を 2.5 μ l 加え、エタノール沈殿により濃縮し、SLS 25 μ l に sample を溶解し、CEQ96 -well sample plate へ移し、オートシークエンサーにより塩基配列の解析を行った。

パラコート耐性候補株として選んだ欠損酵母のパラコートに対する感受性

シークエンスにより解析した塩基配列を *Saccharomyces* Genome Database (<http://genome-www.stanford.edu/Saccharomyces/>) を用いて検索し、パラコート耐

性候補の欠損部分の ORF (Open reading frame) を同定した。同定した欠損酵母を新たにグリセロールストックから YPAD 寒天培地上に広げ、欠損酵母のシングルコロニーを得た。その後、SD 培地 2 ml に植菌し、30°C で一晚培養した後、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。96 well plate にパラコート(0, 1, 5, 7.5, 10, 15, 20, 25 mM)を 20 μ l/well ずつ添加した後に、希釈培養液を 180 μ l/well ずつ播き、30°C で 2 日間培養した後の酵母の増殖を 600 nm の吸光度を基に判定した。なお、BY4742 野生株を実験の対照とした。

欠損酵母のマスタープレートの作成

96 well plate にグリセロールストックとして保存してある欠損酵母を Transter[®]96 Disposable Cartridge を用いて、ジェネティシン 200 μ g/ml を含む YPAD 寒天培地上にスポットし、その後 30°C で一晚培養したものをマスタープレートとして用いた。

スクリーニングに用いるパラコート濃度の条件検討

酵母 BY4742 野生株、欠損で酵母にパラコート感受性を与えることが知られている *sod1* Δ 、同じく *ctrl* Δ

を各々SD 培地 2ml に植菌し、30℃で一晩培養した後、この培養液をSD 培地で希釈した (2×10^8 , 1×10^8 , 5×10^7 , 1×10^7 cells/ml)。この希釈培養液 10 μ l を YPAD 寒天培地上にスポットし、30℃で24時間培養後、パラコート(0, 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 5, 10, 15 mM)を含む YPAD 寒天培地にスポンジを用いてレプリカした。レプリカしたプレートを30℃で2日間培養後、プレートの状態をスキャナで取り込み、画像を比較した。このとき、BY4742 野生株の生育速度と *sod1* Δ ならびに *ctrl* Δ の生育速度の違いが明確に見られるパラコート濃度をスクリーニングに用いた。

スポンジを用いたマスタープレートからの欠損酵母のレプリカ

作成したマスタープレートにスポンジを押し当て、スポンジにマスタープレート上の欠損酵母を移し、前述した条件検討によって得られた濃度のパラコート(0, 1, 5 mM)を含む YPAD 寒天培地上にスポンジの欠損酵母を移した面を押し当て、レプリカした。レプリカした YPAD プレートを30℃でインキュベートし、レプリカした直前、24時間後、48時間後のプレートの様子をスキャナで取り込み、画像を見比べて、パラコートを含まない寒天培地上での生育速度

が同じプレート上の欠損酵母と比べて平均程度で、パラコートを含む寒天培地上での生育速度が同じプレート上の欠損酵母と比べて遅いと思われる欠損酵母を、パラコート感受性候補株として選んだ。

パラコート感受性候補株として選んだ欠損酵母のパラコートに対する感受性

パラコート感受性候補株として同定した欠損酵母を新たにグリセロールストックから YPAD 寒天培地上に広げ、欠損酵母のシングルコロニーを得た。その後、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 1×10^5 cells/180 μ l になるように希釈した。96 well plate にパラコート(0, 0.25, 0.5, 1, 2.5, 5, 7.5, 10 mM)を20 μ l/well ずつ添加した後に、希釈培養液を180 μ l/well ずつ播き、30℃で2日間培養した後の酵母の増殖を600 nmの吸光度を基に判定した。なお、BY4742 野生株を実験の対照とした。

MVB sorting pathway 構成因子の欠損酵母でのパラコートに対する感受性

欠損酵母を用いたスクリーニングでは得られなかった、MVB sorting pathway 構成因子の欠損酵母(*vps20*

Δ , *vps25* Δ , *vps27* Δ , *vps28* Δ , *vps34* Δ , *vps4* Δ) を新たにグリセロールストックから YPAD 寒天培地上に広げ、欠損酵母のシングルコロニーを得た。その後、SD 培地 2 ml に植菌し、30°C で一晩培養した後、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。96 well plate にパラコート(0, 0.25, 0.5, 1, 2.5, 5, 7.5, 10 mM)を 20 μ l/well ずつ添加した後に、希釈培養液を 180 μ l/well ずつ播き、30°C で 2 日間培養した後の酵母の増殖を 600 nm の吸光度を基に判定した。なお、BY4742 野生株を実験の対照とした。

MVB sorting pathway 構成因子の欠損酵母での様々な薬毒性に対する影響の検討

MVB sorting pathway 構成因子の欠損酵母である、*vps27* Δ , *vps4* Δ , *stp22* Δ を新たにグリセロールストックから YPAD 寒天培地上に広げ、欠損酵母のシングルコロニーを得た。その後、SD 培地 2 ml に植菌し、30°C で一晩培養した後、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。96 well plate に、適当な濃度に希釈した過酸化水素 (H_2O_2)、*t*-ブチルヒドロペルオキシド(*t*-BOOH)、メナジオン亜硝酸ナトリウム (menadione)、ジアミド

(diamide)を 20 μ l/well ずつ添加した。

各薬物の濃度は、次のとおりである。

H_2O_2 : 0, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4, 5 mM

t-BOOH : 0, 0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.25, 1.5 mM

Menadione : 0, 5, 10, 12.5, 15, 17.5, 20, 25 mM

Diamide : 0, 1, 1.25, 1.5, 1.75, 2, 2.5, 3 mM

その後、希釈培養液を 180 μ l/well ずつ播き、30°C で 2 日間培養した後の酵母の増殖を 600 nm の吸光度を基に判定した。なお、BY4742 野生株を実験の対照とした。

Vps27 欠損酵母の欠損の確認

酵母からのゲノム DNA の回収は、Glass beads 法により行った。まず、Vps27 欠損酵母、野生株である BY4742 株のシングルコロニーを 2 mL の SD 培地に植菌し、30°C で一晩培養後、集菌し、滅菌水で洗浄した後、Breaking buffer 100 μ l に懸濁した。これに、phenol/chloroform/isoamylalcohol (25 : 24 : 1) 100 μ l および酸洗浄 Glass beads 0.3 g を加え、3 分間激しく攪拌した後、15000 rpm で 5 分

間遠心して、ゲノム DNA を含む水層を得た。得られたゲノム DNA 溶液をエタノール沈殿により濃縮し、最終的に 20 μ l の DNA 溶液とした。この DNA 溶液を template として、PCR を行った。

PCR サイクル

94°C	5分	}	30 サイクル
94°C	15秒		
55°C	30秒		
72°C	3分30秒		
72°C	5分		

primer

forward {vps27-f (500)} : 5'-CTCGTAATCTGTATCATGCAATT
T-3'

reverse {vps27-r (250)} : 5'-TATGCAGGAACAAGTTTCTTCC-
3'

増幅した DNA をアガロースゲルに泳動し、野生株でのバンドと異なる位置に vps27 欠損酵母でのバンドが検出できることを確認した。なお、vps27 欠損酵母に関しては、欠損が確認できた酵母を、以後の実験の対照とした。

Vps27 発現ベクターの作製

1 で増幅した、野生株の vps27 フ

ラグメントを、アガロースゲルから精製した。さらに、シングルコピープラスミドである pRS316 を Sma I で処理した後、アガロースゲルから精製した。アガロースゲルから精製した Vps27 フラグメントと pRS316 を DNA ligation kit ver.2 を用いて ligation を行った。尚、ligation を行う際に、この ligation の反応液に、Sma I 0.1 μ l を加えた。その後、ligation させたプラスミドを、大腸菌に導入し、この大腸菌よりプラスミドを回収して、プラスミドを得た。大腸菌へのプラスミドの導入は、Hanahan の方法に従って行った。Competent cells 溶液 50 μ l に上述のプラスミド溶液 1 μ l を加え、氷上で 30 分間静置した後、42°C で 45 秒間の heat shock をかけ、さらに氷上で 2 分間静置した。この溶液に、SOC 培地 500 μ l 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 寒天培地上に塗布し、37°C で一晩培養した。尚、塗布時に、4% X-gal 15 μ l, 400 mM IPTG 10 μ l を加えた。形成したコロニーの中で、白色のコロニーを選んで、ampicillin sodium salt 50 μ g/ml を含む LB 培地 2 ml に植菌し、一晩培養した後、GenElute™ Plasmid Mini-prep Kit を用いて大腸菌よりプラスミドを回収した。得

られたプラスミド溶液の一部を *Pvu* II で処理した後、アガロースゲルで泳動し、約 4.8 kb 付近に検出できる pRS316 のバンドの他に、ligation により挿入した *Vps27* フラグメントより約 0.6 kb 大きいバンドが検出できたものを、*Vps27* 発現プラスミド (pRS316-VPS27) とした。

UIM point-mutant (*Vps27*^{S270D,D313D}) の作製

UIM point-mutant は、QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit のプロトコールに従った。2 で作製した pRS316-VPS27 を template として、PCR 反応を行うことにより変異を導入した。

PCR サイクル

95°C	30 秒	} 16 サイクル
95°C	30 秒	
55°C	1 分	
68°C	10 分	

primer

- S270D 変異導入の場合
forward { *vps27*-S270D-f } : 5' - GGAAAGCAATAGAACTCGACTTGAAAG - 3'
reverse { *vps27*-S270D-r } : 5' - CTTTCAAGTCGAGTTCTATTGCTTTCC - 3'
- S313D 変異導入の場合

forward { *vps27*-S313D-f }

: 5' -
GCTGCTATTCAGGAAGACTTGAG
AGAAGCTG - 3'

reverse { *vps27*-S313D-r }

: 5' -
CAGCTTCTCTCAAGTCTTCCTGA
ATAGCAGC - 3'

増幅した PCR 溶液に、*Dpn* I 1 μl を加え、37°C で 1 時間反応させた。このプラスミドを大腸菌に導入して、この大腸菌からプラスミドを回収した。尚、大腸菌へのプラスミドの導入、大腸菌からのプラスミドの回収は、2 と同様の方法により行った。得られたプラスミドを第一章で行った方法でシーケンスを行い、*Vps27* 部分全長の塩基配列を確認した。シーケンスに用いた primer は次のとおりである。

primer

vps27 seq -70f : 5' -
TATTGCTAAGTGAATGAGTAGT -
3'

vps27-S270D-r : 塩基配列は前述のとおり

vps27 uim-sequence-f : 5' -
CAGAGTATGTGATAGCTGCTTTG
AAG - 3'

vps27-S313D-f : 塩基配列は前

述のとおり

vps27 seq 1200f : 5' -
GCAAGGTTGAATTATGCTTTAAA
-3'

vps27 seq 1940r : 5' -
ACTAGTTTAATGACAGAAATATG
-3'

酵母へのプラスミドの導入

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、酵母のシングルコロニーを YPAD 培地 50 ml に植菌し、 2×10^7 cells/ml になるまで培養した後、集菌して洗浄後、100 mM 酢酸リチウム 500 μ l に懸濁した。そのうち 50 μ l の懸濁液に、プラスミド 1 μ l , 過熱変性サケ精子 DNA 5 μ l を加えた。そこに、50% ポリエチレングリコール(4000)/100 mM 酢酸リチウム(8:2) 200 μ l を加えて、30°C で 30 分間培養した。その後、42°C で 15 分間の heat shock をかけ、ウラシルを含まない選択用培地である SD(-Ura)寒天培地上に広げ、30°C で 2 日間培養した。この際、ベクターとして用いた pRS316 中にはウラシル合成酵素をコードする遺伝子 (URA3) が含まれているので、本プラスミドが導入された酵母のみがウラシルを含まない、SD(-Ura)培地中でも生育可能となる。

この方法で作製した形質転換体は、

次のとおりである。

- BY4742 / pRS316
- vps27 Δ / pRS316
- vps27 Δ / VPS27 (pRS316)
- Vps27^{S270D} : vps27 Δ / pRS316-VPS27^{S270D}
- Vps27^{S313D} : vps27 Δ / pRS316-VPS27^{S313D}
- Vps27^{S270D, S313D} : vps27 Δ / pRS316-VPS27^{S270D, S313D}

酵母の細胞内における活性酸素種の測定

酵母のシングルコロニーを 2 ml の YPAD 培地に植菌し、30°C で一晚培養後、 1×10^7 cells/ml を YPAD 培地 10 ml に移し、30°C で 3 時間培養した。その後、3000 rpm, 25°C で 5 分間遠心して集菌し、その沈殿を 10 mM リン酸カリウム (pH 7.0) 2 ml で洗浄し、10 μ M DCFH-DH を含む 10 mM KP buffer 2 mL で懸濁した。30°C で 30 分間培養した後、3000 rpm, 25°C で 5 分間遠心して集菌し、その沈殿に、パラコート、または過酸化水素を含む SD 培地を加え、30°C で 3 時間培養した。尚、パラコート、または過酸化水素の最終濃度は次のとおりである。

パラコート : 0, 5, 10 mM

過酸化水素 : 0, 1, 2, 3 mM
その後、3000 rpm, 4°Cで5分間遠心して集菌し、その沈殿に冷滅菌蒸留水 5 mlで洗浄した。この操作を2回繰り返した後に、その沈殿を冷滅菌蒸留水 200 μ lで懸濁し、そのうち180 μ lを96 well plateに移し、蛍光 plate readerで測定した (excitation 504 nm ; emission 524 nm)。その際、得られた蛍光強度を、菌液の600 nmでの吸光度で補正した。

(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. 欠損により酵母にパラコート耐性を示す遺伝子の検索

パラコート毒性に対する生体内防御機構の解明の手がかりを得るため、本章では、欠損により酵母がパラコート耐性となる遺伝子の検索を行った。まず、当研究室にて保存されている、約 4800 種の遺伝子欠損酵母ライブラリーを用いて、そのライブラリー中の各遺伝子欠損酵母を混合した培養液を、野生株が生育できない濃度のパラコートを含む寒天培地に

て生育させ、コロニーを形成した酵母をパラコート耐性候補株として選んだ。

欠損されている遺伝子の同定は、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について、ゲノム DNA を抽出し、Inverse PCR 法により行った。その結果、18 種の遺伝子 (*ARA1*, *BUD7*, *BUD13*, *CRR1*, *FRE1*, *FYV10*, *LIN1*, *MPH1*, *NBP2*, *RPL41B*, *RTG3*, *SAP185*, *SAS3*, *SDC1*, *SSA2*, *YDR061W*, *YDR467C*, *YJL144W*) が欠損により、酵母にパラコート耐性を付与する遺伝子として同定された。そのうち、4 種の遺伝子 (*BUD13*, *CRR1*, *FYV10*, *NBP2*) が、パラコート耐性に関してこれまでに報告のない新規な因子であった (Fig. 2)。

BUD13 は、酵母の出芽における bud site selection に関わる因子群の一つである Bud13 をコードする遺伝子で、核や細胞質に局在し、おそらく mRNA のスプライシングにも関与すると考えられている[2]。Bud13 は、同じく mRNA のスプライシングに関わるとされている因子 Ist3 と遺伝学的相互作用をしているとの報告がある[3]。Bud13 に関して、パラコート毒性と関連づける報告は未だなされていないが、Ist3 は、欠損により過酸化水素に高感受性を示すことが報

告されており[4]、このことから、もしかしたら Bud13 の欠損の影響が、Ist3 の遺伝子発現にも影響を及ぼしているのではないかと推測される。

CRR1 は、酵母の出芽や細胞壁の構築に関わる *Crr1* をコードする遺伝子である。この *Crr1* は、鉄イオンの調節に関わる転写因子である *Mac1* によって転写調節を受けていることが知られている[5]。*Mac1* は、パラコート毒性を増強させていると考えられている因子 *Fre1* の転写も調節していることが報告されている。さらに *CRR1* の上流にある *Mac1* 結合配列は、ferric reductase で、細胞外でのパラコート毒性を増強させていると考えられている *Fre1* と共有されている可能性が高く、*crr1* Δ は、*Mac1* を介した *FRE1* の発現に影響を及ぼしている可能性があり得る。

FYV10 は、糖新生に関わる fructose-1, 6 -bisphosphatase の分解に関わる *Fyv10* をコードする遺伝子である。*Fyv10* についても、酸化ストレスと関連づける報告はなく、その機構はまったく不明である。

NBP2 は、ヌクレオソームやヒストンの構築に関わる *Nap1* と相互作用する因子として同定された *Nbp2* をコードする遺伝子である。最近の報告で、*Nbp2* が高温条件下での細胞周期の M 期 (mitosis) での増殖や、

細胞壁の完成に必要であるということが明らかになったが[6]、今回得られた他の因子同様、酸化ストレスに関する報告はない。

2. 欠損により酵母にパラコート感受性を示す遺伝子の検索

1. でのスクリーニングではスクリーニングの際の取り残しが多い可能性が考えられたので、新たにレプリカ法を用いたスクリーニング系を構築した[7]。欠損酵母を寒天培地上にスポットした“マスタープレート”を作製し、パラコートを含む寒天培地へスポンジを用いて複製 (レプリカ) 後、培養した。したがって、この方法では、約 4800 種の遺伝子欠損酵母それぞれについて、個々にパラコート感受性を調べることになる。培養後の各欠損酵母の生育速度が、パラコートを含まないプレートでは野生株とほぼ同程度であるが、パラコートを含むプレートでは野生株と比べて生育速度が極端に低下している欠損酵母をパラコート感受性候補株として選んだ (Fig. 3 および Fig. 4)。その結果、約 120 種の欠損酵母が、パラコート感受性候補株として得られた。さらに、得られた候補株についてパラコートに対する耐性試験を各欠損酵母ごとに行い、その感受性を確認した (Fig. 5)。

その結果、欠損により酵母にパラコート感受性を与える遺伝子を最終的に 29 種同定した。得られた 29 種の遺伝子についてパラコート毒性と関連づける報告はこれまでになく、これら因子の細胞内における役割の解明により新たなパラコート毒性軽減機構の解明につながる可能性がある。

特筆すべきことは、今回得られた 29 種の遺伝子のうち、7 種の遺伝子 (*DID4*, *SNF7*, *SNF8*, *SRN2*, *STP22*, *VPS24*, *DOA4*) が、エンドサイトーシスの経路の一部である、MVB sorting pathway と呼ばれる経路に関与する因子であることが見出されたことである。

エンドサイトーシスとは、細胞膜上に存在するトランスポーターやレセプターなどの細胞膜上の蛋白質が、細胞外の栄養状態などの環境変化によって不要になった時に、細胞膜が細胞質側に陥入することにより、細胞質に取り込まれることから始まる経路である。酵母ではエンドサイトーシスによって細胞質に取り込まれた蛋白質は、一部は液胞へ運ばれ分解され、また一部はゴルジ体を介して細胞膜上へとリサイクルされる (Fig. 6)。生体は、このエンドサイトーシスにより、細胞膜上に存在する蛋白質の量を調節し、細胞外因子の

取り込み量などのバランスを保っている。

エンドソームを介した経路で輸送される蛋白質の中には、細胞膜上に存在する蛋白質が細胞質に取り込まれる際に、ユビキチンリガーゼ (E3) によってユビキチンが一つだけ結合する蛋白質が知られている。このユビキチン化された蛋白質が液胞へ輸送される際に、蛋白質に結合したユビキチンをエンドソーム上の因子が認識して、エンドソームを介する輸送経路に運ぶ仕組みになっている。このモノユビキチン化 (ユビキチンが蛋白質の一つだけ結合すること) された蛋白質を認識し選別する機能は、MVB sorting pathway とよばれ、エンドサイトーシスの一部として機能することが知られている。

前述のように、MVB sorting pathway は、モノユビキチン化された蛋白質 (以下 MVB cargo と総称する) を液胞へ運ぶ役割を持つ (Fig. 7) [8~10]。MVB cargo は、まずユビキチン化されると、Vps27 と呼ばれる因子によって認識され、エンドソーム膜上へとリクルートされ、MVB sorting pathway へと導かれることが知られている[9]。

Vps27 は、ヒトの Hrs (Hepatocyte receptor tyrosine kinase substrate) の酵母ホモログとして同定され、

MVB sorting pathway の開始に関わっており[9]、Vps27 内に保存されている UIM (Ubiquitin-interacting motif) と呼ばれるドメインを介して、MVB cargo に結合しているユビキチンと結合することにより MVB cargo を認識する[11~14]。また Vps27 は細胞質とエンドソーム膜をシャトルする蛋白質で、Vps27 に存在する FYVE ドメインを介して、エンドソームに存在する PI(3)P (Phosphatidylinositol 3-phosphate) に特異的に結合することにより、MVB cargo ごとエンドソーム膜にリクルートされる[15, 16]。エンドソーム膜にリクルートされた Vps27 は、ESCRT (The endosomal sorting complex required for transport) と呼ばれる complex に MVB cargo を受け渡す。

ESCRT complex は3種類存在し、それぞれ ESCRT-1, ESCRT-2, ESCRT-3 と呼ばれている。ESCRT-1 は、Stp22, Snr2, Vps28 から構成されている complex で、Vps27 から MVB cargo を受け渡され、下流の ESCRT-2 をエンドソーム膜へとリクルートして、その ESCRT-2 へと MVB cargo を受け渡すとされている[17]。ESCRT-1 の構成因子である Stp22 は、ヒトの Tsg101 (Tumor susceptibility gene 101) の酵母ホ

モログで、UBC (ubiquitin conjugation-like) ドメインを持ち、MVB cargo に結合しているユビキチンに結合することが知られ、ESCRT-1 の機能において重要な役割を果たすとされている。

ESCRT-2 は、Snf8, Vps25, Vps36 から構成されている complex で、ESCRT-1 同様、下流の ESCRT-3 をエンドソーム膜へとリクルートし、ESCRT-1 から受けとった MVB cargo を ESCRT-3 に受け渡している[18]。また、ESCRT-1 と同じく、ESCRT-2 の構成因子である Vps36 にユビキチン結合能が備わっており、MVB cargo の受け渡しに重要な役割を果たすとされている[19]。

ESCRT-3 は、Did4, Snf7, Vps20, Vps24 から構成されている complex で、MVB sorting pathway の last step として、MVB cargo をエンドソーム内へと取り込ませる役割を果たしている[20]。その時、脱ユビキチン化酵素である Doa4 は、MVB cargo に結合しているユビキチンを外し、細胞質へとリサイクルする。この Doa4 の機能には ESCRT-3 が必要であることが知られている[20]。

これらの因子に加え、ESCRT complex をエンドソーム膜から切り離すことによって MVB sorting pathway の解離を調節する AAA

ATPase である Vps4 や[21, 22]、PI (Phosphatidylinositol) をリン酸化して PI(3)P を合成する Vps15, Vps34 など[23, 24]、MVB sorting pathway はさらに様々な因子が関与することが知られている。

MVB sorting pathway に関与する因子を欠損することにより、MVB sorting pathway での液胞への MVB cargo の輸送は阻害され、MVB cargo はエンドソーム膜に留まることが知られている[25]。今回 MVB sorting pathway 中の因子がスクリーニングで複数得られたことから、MVB sorting pathway の機能を阻害することにより酵母はパラコート感受性を示す可能性が示唆され、MVB sorting pathway の機能がパラコート毒性を軽減しているという新たな可能性が提示された。

また、スクリーニングで得られた欠損により酵母にパラコート感受性を及ぼす因子の中には、他にも細胞内輸送に働く因子が得られた。これらの因子は MVB sorting pathway には直接関与しないものの、他の細胞内輸送経路に関与することが知られている。それらの因子を挙げると、エンドソームからゴルジ体への蛋白質のリサイクルに関わっているとされている Rcy1 をコードする遺伝子である *RCY1* や[26]、PI(3)P をリン

酸化して PI(3,5)P₂ を合成して、液胞の形成や MVB sorting pathway での MVB cargo の輸送にも関わっているとされている Fab1 をコードする遺伝子である *FAB1*[27]、MVB sorting pathway に関与する因子群と同じ class E protein である Vps60 をコードする遺伝子である *VPS60*[28]、初期エンドソームから MVB sorting pathway が機能する後期エンドソームへの移行や、ゴルジ体とエンドソーム間の輸送に関わる Pep12 をコードする遺伝子である *PEP12* である[29]。このことから、パラコート毒性との間には何かの関連性が存在すると考えられる。

3. MVB sorting pathway に関与する因子群の欠損がパラコート感受性に与える影響

2. で述べたように、MVB(multivesicular body) sorting pathway に関与する因子である *DID4*, *SNF7*, *SNF8*, *SRN2*, *STP22*, *VPS24*, *DOA4* が、欠損により酵母にパラコート感受性を与える遺伝子であることを明らかにした。MVB sorting pathway は、細胞内でエンドソームを介した経路で、モノユビキチン化した蛋白質（以下 MVB cargo と総称する）を液胞へ運ぶ役割を持ち[8~10]、MVB cargo は主に

エンドサイトーシスによって運ばれてくるものが多く存在する (Fig. 6 および Fig. 7)。MVB sorting pathway に関与する因子群を欠損すると、MVB cargo が液胞へ運ばれなくなり、エンドソーム膜状に蓄積し、エンドソームが肥大化することが知られている。このことから、これらの欠損酵母で見られるパラコート感受性が、MVB sorting pathway の機能の阻害による影響である可能性が考えられる。

第二章でのスクリーニングでは、マスタープレートからスポンジを用いてレプリカする際に酵母量のばらつきが生じる、という問題点があり、遺伝子欠損によりパラコート感受性となるはずの酵母株がまだ見逃されている可能性が十分に考えられた。そこで、第二章でパラコート毒性との関連する可能性が示唆された MVB sorting pathway に関与する因子群の中で、スクリーニングによって得られなかった遺伝子欠損酵母について、再度パラコート毒性に及ぼす影響を検討した。

その結果、今回検討を行った、*vps20* Δ 、*vps25* Δ 、*vps27* Δ 、*vps28* Δ 、*vps34* Δ 、*vps4* Δ は、全てパラコートに対して感受性を示した。したがって MVB sorting pathway に関与する因子群全てについて、欠損により

酵母にパラコート感受性を与えることが確認された (Fig. 8)。

本章での研究により、MVB sorting pathway に関与する因子群について、それぞれ遺伝子を欠損させた酵母は全ての株が、パラコートに感受性を示すことが明らかとなった。MVB sorting pathway での液胞への MVB cargo の輸送は、MVB sorting pathway に関与する因子群を1つでも欠損させると阻害されることが知られており [25]、本章における結果は、MVB sorting pathway の機能阻害が、酵母のパラコート毒性を増強させている可能性を裏付けるものになった。

しかし、MVB sorting pathway に関与する因子群の遺伝子を欠損させることにより MVB cargo の輸送阻害のほかに、生体内で他の影響が現れ、そのためにパラコート毒性が増強している可能性も考えられるため、さらに検討が必要である。また、パラコート毒性が、パラコートの構造などに由来したパラコート特異的な毒性なのか、それともパラコートの毒性発現機構として知られている O_2^- の増加に伴う酸化ストレス誘導によるものなのか、解明すべき点であると考えられる。

4. MVB sorting pathway に関与する

因子群の欠損酵母での様々な薬毒性に対する影響

MVB sorting pathway での液胞への MVB cargo の輸送を阻害することが、酵母のパラコート毒性を増強させている可能性を示してきた。そこで本章では、そのパラコート毒性が、パラコート特異的な毒性なのか、それともパラコートを介した O_2^- の増加の結果として生じる酸化ストレス誘導によるものなのかを検討するため、パラコート以外に酸化ストレスを与える薬物に対する感受性を検討した。MVB sorting pathway に関与する因子群の中から、Stp22, Vps4, Vps27 の各欠損酵母を用い、過酸化水素、t-ブチルヒドロペルオキシド、メナジオン、ジアミドに対する耐性試験を行った。

その結果、*stp22Δ*, *vps4Δ*, *vps27Δ* は、これら 4 種の薬剤に対して感受性を示すことが明らかとなった。この結果から、MVB sorting pathway に関与する因子の欠損酵母は、パラコート以外の活性酸素産生物質に対しても感受性を示すことが確認された。したがって、MVB sorting pathway における液胞への MVB cargo の輸送が、酸化ストレスを軽減している可能性が強く示唆された (Fig. 9)。

ここで用いた薬剤は、まず、ROS

の一種である過酸化水素 (H_2O_2) である。過酸化水素は、微量ながらも常に生体内に存在している ROS で、細胞膜を自由に通過できることが知られている[1]。このことから、過酸化水素が及ぼす毒性は、主に細胞内における ROS による傷害であるといえる。過酸化水素に対しては、*stp22Δ*, *vps4Δ*, *vps27Δ* のいずれにおいても同程度の感受性を示すことから、MVB sorting pathway に関与する因子群の欠損により、細胞内での ROS による傷害に感受性となると考えられる。

次に用いた薬剤は、脂溶性の高い過酸化物、t-ブチルヒドロペルオキシド (t-BOOH) である。t-BOOH は、脂溶性が高いために膜に浸透し、酸化ストレスを誘導する酸化物である[30]。t-BOOH に対して、*stp22Δ*, *vps4Δ*, *vps27Δ* の各欠損酵母はいずれも同程度の感受性を示したが、それほど感受性は高くなかった。したがって、膜への傷害に対する酵母への影響は、MVB sorting pathway での液胞への MVB cargo の輸送にはさほど関係ないのではないかと思われる。

3 番目に用いた薬剤は、活性酸素、特に O_2^- を産生するメナジオンである。メナジオンは、キノン構造をとり、遊離したキノンがセミキノン

ラジカルに1電子還元されることにより、 O_2^- を産生することが知られている[1]。メナジオンに対して、*stp22* Δ 、*vps4* Δ 、*vps27* Δ の各欠損酵母はいずれも同程度の感受性を示し、特に *stp22* Δ に関しては、他の欠損酵母より高い感受性を示した。この *stp22* Δ の高感受性は、パラコートでの感受性でも観察された。

チオール基 (-SH)を酸化する薬剤であるジアミドについても検討を行った。ジアミドの作用として、細胞内のグルタチオンの枯渇や蛋白質のシステイン残基の酸化が知られており[31]、間接的に細胞に酸化ストレスを及ぼす。ジアミドに対して、*stp22* Δ 、*vps4* Δ 、*vps27* Δ の各欠損酵母はいずれも同程度の感受性を示し、特に *stp22* Δ に関しては、メナジオンと同様、他の欠損酵母より高い感受性を示した。したがってジアミドによる、グルタチオンなどの抗酸化酵素の減少が、MVB sorting pathwayに参与する因子の欠損により、酵母に感受性を与えている可能性が考えられる。

また、以上の結果から、MVB sorting pathwayに参与する因子群の欠損により増強されるパラコート毒性は、 O_2^- 産生の結果及ぼされる酸化ストレスによるものである可能性が強く示唆された。

5. MVB sorting pathway 機能阻害によるパラコート感受性の修飾

MVB sorting pathway の構成因子を欠損させた酵母は、パラコートに感受性を示すことから、MVB sorting pathway の機能を阻害することによって、酵母のパラコート感受性が増強する可能性が考えられる (第三章)。

しかし、MVB sorting pathway の構成因子を欠損することによる影響は、MVB cargo の輸送阻害のみではない場合も知られている。例えば Vps27 は、MVB sorting pathway の開始に参与し、MVB cargo を、ユビキチンを介してエンドソーム膜へリクルートすることが知られている。しかし、Vps27 を欠損することにより、NVB sorting pathway での液胞への MVB cargo の輸送が阻害されるだけでなく、エンドソームとゴルジ体間の輸送の阻害や、液胞内腔の膜の生成異常などが起こる[32]。Vps27 には UIM (ubiquitin-interacting motif)と呼ばれるよく保存されたドメインが2つ存在する (Fig. 10)。UIMはVps27とユビキチンが結合するのに重要なドメインで各UIMの配列中に含まれる270番目と313番目のセリンが、MVB cargoを認識するのに重要な役割を果たしていることが知られている。この *vps27* の270番目と313番目のセリ

ンをアスパラギン酸に置き換えた変異体では、MVB sorting pathway での液胞への MVB cargo の輸送が大きく阻害されるにもかかわらず、エンドソームとゴルジ体間の輸送の阻害や、液胞内腔の膜の生成異常は起こらない。そこで、パラコート毒性と MVB cargo の輸送の関連を明らかにするために、UIM 変異体に対するパラコート毒性への影響を検討した。

その結果、Vps27のUIM変異体酵母は、Vps27欠損酵母ほどではないが、パラコートに感受性を示した(Fig. 11)。興味深いことに、Vps27に存在する2つのUIMのうち、どちらか1つ変異を入れた酵母 (Vps27^{S270D}, Vps27^{S313D}) におけるパラコート感受性はほぼ同程度で、UIMを2つとも変異させた酵母 (Vps27^{S270D, S313D}) の場合では、Vps27^{S270D}, Vps27^{S313D}に比べて、若干パラコート感受性が増した。この結果から、酵母はVps27の持つ、MVB cargoの認識能が低下するにしたがって、パラコートに対してより感受性を示すことが明らかとなった。この結果から、MVB sorting pathwayによる液胞へのMVB cargoの輸送により酸化ストレスが軽減されていることが示唆された。

6. Vps27 欠損酵母の細胞内活

性酸素種の測定

MVB sorting pathway の構成因子を欠損することにより、酵母はパラコート感受性となるが、その要因として、MVB sorting pathway における蛋白質の液胞への輸送の阻害であることが前章で示唆された。そこで、MVB sorting pathway による液胞への MVB cargo の輸送を阻害することにより、酸化ストレスによる毒性軽減が行われ不会再いのではないかと考え、Vps27 欠損酵母を用いて、パラコート暴露時、または過酸化水素暴露時の、細胞内での活性酸素量の測定を試みた。

活性酸素を検出する蛍光試薬である DCFH-DA を用いて、酵母の蛍光強度を測定した結果、パラコート暴露 3 時間、または過酸化水素暴露 3 時間で、野生株に比べて、Vps27 欠損酵母での細胞内活性酸素量は、有意に高い値を示した (Fig. 12 または Fig. 13)。野生株での薬物未処理時の細胞内活性酸素量を 100%としたとき、Vps27 欠損酵母では、10 mM のパラコート暴露、または 2 mM の過酸化水素暴露により、約 200%まで細胞内活性酸素量の上昇が見られた。この結果は、酵母が過剰の酸化ストレスにさらされるような条件下では、Vps27 を欠損することにより、細胞内の活性酸素量の顕著な増加が起こ

っていることを示している。したがって、Vps27 欠損酵母で観察されたパラコート感受性の増強または過酸化水素感受性の増強に、細胞内の活性酸素量の顕著な増加が関与する可能性が考えられる。

しかしながら、Vps27欠損による他の要因により結果的に細胞内活性酸素量の上昇が生じている可能性は、現時点では否定できない。今のところVps27欠損による酵母の細胞内活性酸素量の増加についての詳しいメカニズムはまだ不明であり、MVB sorting pathwayの機能阻害によるパラコート毒性増強機構の解明に結び付けるには、さらに解析を行う必要があると考えられる。

7. MVB sorting pathway に関与する経路の阻害によるパラコート感受性の修飾

MVB sorting pathway は、エンドサイトーシスと密接な関係にあることが知られている。また、MVB sorting pathway によってエンドソーム内へと運ばれた MVB cargo は、エンドソームが液胞に融合することによって液胞内へと運ばれる。ゴルジ体から MVB cargo が運ばれてくる事例も知られており[36]、MVB sorting pathway は、様々な細胞内輸送経路に影響を及ぼすことが知られている

(Fig. 14)。そこで、MVB sorting pathway との関連が指摘されている他の細胞内輸送経路もパラコート感受性に影響を及ぼし、MVB sorting pathway と関連して酵母のパラコート毒性を増強させている可能性を考え、細胞内輸送に影響を及ぼす欠損酵母での、パラコート感受性に対する影響を検討した。尚、エンドサイトーシスの開始に関与する経路の因子として、*END3*, *ENT1*, *ENT2*, *SLA1*, *SLA2*, または *ARK1*, *PRK1* の各欠損酵母、液胞とエンドソームとの融合に関与する因子として、*VAM3*, *VAM7*, *YPT7* の各欠損酵母、さらに、ゴルジ体とエンドソーム間の輸送の経路に関与する因子として、*VAC1*, *VPS45* の各欠損酵母を用いて、検討を行った。

エンドサイトーシスの開始は、Fig. 15 で示したように、End3, Pan1, Sla1, Sla2 で構成される complex と、Ent1, Ent2, Pan1, yAP1801/2 で構成される complex によって制御されていることが知られている[38, 39]。End3/Pan1/Sla1/Sla2 complex において、*sla1*Δ, *sla2*Δに関しては、パラコート毒性に対する影響は見られなかったが、*end3*Δに関しては、パラコートに感受性を示した(Fig. 16 および Fig. 17)。End3 は、MVB cargo の E3 として知られている Rsp5

と相互作用し、*END3* 欠損により、Rsp5 の局在が変化することが報告されていて[40]、*END3* の欠損によるパラコート毒性の増強という結果は、パラコート毒性における MVB sorting pathway とエンドサイトーシスとを関連付ける手がかりとなる可能性が考えられる。

さらに、End3/Pan1/Sla1 complex の解離を起こす因子として、Ark/Prk kinase family が知られている[37]。Ark/Prk kinase family である Ark1, Prk1 は、Sla1 と Pan1 をリン酸化することにより、End3/Pan1/Sla1 complex を解離させ、細胞骨格形成やエンドサイトーシスの異常を引き起こすとされている(Fig. 18) [41]。ARK1 や PRK1 の過剰発現により、エンドサイトーシスが阻害されることが知られていることから、ARK1 や PRK1 の欠損により、酵母がエンドサイトーシスを起こりやすくなる状態になると推測し、Ark1 または Prk1 の欠損酵母で、パラコート感受性を検討した。しかし、*ark1* Δ、*prk1* Δ は、若干パラコートに耐性を示したものの、酵母のパラコート感受性にそれほど影響はなかった(Fig. 18)。ただし本論文では示していないが、配列上の特徴から、Ark/Prk kinase family の一つとして考えられている Akl1 を欠損す

ることにより、酵母はパラコートに強い耐性を示した。Akl1 が Ark/Prk kinase family の一つではあるものの、エンドサイトーシスに働くという確たる証拠が現時点ではないため[38]、仮に Akl1 が Ark/Prk kinase family の一つであるならば、エンドサイトーシスの開始から MVB sorting pathway へのステップがパラコート毒性に関与する可能性が強まると考えられる。

液胞とエンドソームとの融合は、Fig. 19 に示すように、主に SNARE と呼ばれる蛋白質によって行われている。今回検討した因子である、Vam3, Vam7, Ypt7 のうち、Vam7 は、PX (phox) ドメインを介し、エンドソーム膜に存在する PI(3)P と特異的に結合することが知られ、エンドソームと液胞の融合に関与するということが示されている[42]。Vam3, Ypt7 も同じく、エンドソームと液胞との融合に関与するという報告がある[43, 44]。これら因子についてパラコート感受性との関連を調べたところ、いずれの欠損酵母でもパラコートに対して感受性を示した(Fig. 20)。この結果から、MVB sorting pathway から液胞へ MVB cargo を運ぶまでの経路が、酵母のパラコート毒性に影響を与えている可能性が示唆された。

ゴルジ体とエンドソーム間の輸送に関与する因子については、先に行ったスクリーニングで、*RCY1* と *PEP12* が欠損により酵母にパラコート感受性を与える遺伝子として得られていた。したがって、ゴルジ体とエンドソーム間の輸送が、酵母のパラコート毒性に及ぼす影響という点においても、MVB sorting pathway と関連がある可能性が考えられた。しかし、本章で検討した *VAC1*, *VPS45* の欠損酵母は、欠損することにより酵母の生育が抑制されたため、パラコートに感受性かどうか判断が困難であった(Fig. 21)。

以上の結果から、MVB sorting pathwayから液胞へのMVB cargoの輸送までの経路が、酵母においてパラコート毒性を軽減している可能性が考えられるが、MVB sorting pathwayと、液胞とエンドソームとの融合の経路の関連を検討するなど、さらに解析が必要である。

参考文献

1) 大柳善彦、浅田浩二、中野稔 (1988) 活性酸素

2) Ohi MD, Link AJ, Ren L, Jennings JL, McDonald WH, Gould KL. (2002) Proteomics analysis reveals stable

multiprotein complexes in both fission and budding yeasts containing Myb-related Cdc5p/Cef1p, novel pre-mRNA splicing factors, and snRNAs. *Mol. Cell Biol.* 22(7), 2011-2024

3) Ito T, Tashiro K, Muta S, Ozawa R, Chiba T, Nishizawa M, Yamamoto K, Kuhara S, Sakaki Y. (2000) Toward a protein-protein interaction map of the budding yeast: A comprehensive system to examine two-hybrid interactions in all possible combinations between the yeast proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 97(3), 1143-1147.

4) Entian KD, Schuster T, Hegemann JH, Becher D, Feldmann H, Guldener U, Gotz R, Hansen M, Hollenberg CP, Jansen G, Kramer W, Klein S, Kotter P, Kricke J, Launhardt H, Mannhaupt G, Maijerl A, Meyer P, Mewes W, Munder T, Niedenthal RK, Ramezani Rad M, Rohmer A, Romer A, Hinnen

- A, et al. (1999) Functional analysis of 150 deletion mutants in *Saccharomyces cerevisiae* by a systematic approach. *Mol. Gen. Genet.* 262 (4-5) , 683-702.
- 5) Gross C, Kelleher M, Iyer VR, Brown PO, Winge DR. (2000) Identification of the copper regulon in *Saccharomyces cerevisiae* by DNA microarrays. *J. Biol. Chem.* 275(41) , 32310-32316.
- 6) Ohkuni K, Okuda A, Kikuchi A. (2003) Yeast Nap1-binding protein Nbp2p is required for mitotic growth at high temperatures and for cell wall integrity. *Genetics.* 65(2) , 517-529.
- 7) Carole.E, Cramer, Rowland.H.Davis (1978) Screening for amino acid pool mutants of *neurospora* and yeasts : Replica-printing technique. *J. Bacteriol.* 137(3) , 1437-1438.
- 8) D.J.Katzmann,, G.Odorizzi, S.D.Emr, (2002) Receptor downregulation and multivesicular body sorting. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 893-905.
- 9) Camilla Raiborg, Tor Erik Rusten and Harald Stenmark (2003) Protein sorting into multivesicular endosomes. *Current Opinion in Cell Biol.* 15, 446-455
- 10) Jonathan D. Shaw, Kellie B. Cummings, Gregory Huyer, Susan Michaelis and Beverly Wendland (2001) Yeast as a Model System for Studying Endocytosis. *Experimental Cell Reserch* 271, 1-9
- 11) Reggiori F, Pelham HR (2001) Sorting of proteins into multivesicular bodies : ubiquitin-dependent and -independent targeting. *Nat. Cell Biol.* 4, 394-398.
- 12) Patricia S. Bilodeau, Jennifer L. Urbanowski, Stanley C. Winistorfer and Robert C. Piper (2002) The

- Vps27p-Hse1p complex binds ubiquitin and mediates endosomal protein sorting. *Nat. Cell Biol.* 4, 534–539.
- 13) Naomi Bishop, Alistair Horman and Philip Woodman (2002) Mammalian class E vps proteins recognize ubiquitin and act in the removal of endosomal protein-ubiquitin conjugates. *J. Cell Biol.* 157 , 91–101.
- 14) Shih, S.C., D.J.Katzmann, J.D.Schnell, M.Sutanto, S.D.Emr, and L.Hicke. (2002) Epsins and Vps27p/Hrs contain ubiquitin-binding domains that function in receptor endocytosis. *Nat. Cell Biol.* 4 , 389–393.
- 15) Saurav Misra and James H. Hurley (1999) Crystal Structure of a Phosphatidylinositol 3-Phosphate-Specific Membrane-Targeting Motif, the FYVE Domain of Vps27p. *Cell.* 97 , 657–666.
- 16) Vijay G. Sankaran, Daryl E. Klein, Mira M. Sachdeva, and Mark A. Lemmon (2001) High-Affinity Binding of a FYVE Domain to Phosphatidylinositol 3-Phosphate Requires Intact Phospholipid but Not FYVE Domain Oligomerization. *Biochemistry.* 40, 8581–8587
- 17) D. J. Katzmann, M. Babst and S. D. Emr (2001) Ubiquitin-dependent sorting into the multivesicular body pathway requires the function of a conserved endosomal protein sorting complex, ESCRT-1. *Cell* 106 , 145–155.
- 18) Babst, M., Katzmann, D. J., Snyder, W. B., Wendland, B., and Emr, S. D. (2002) Endosome-associated complex, ESCRT-II, recruits transport machinery for protein sorting at the multivesicular body. *Dev. Cell* 3 , 283–289.
- 19) Hemmo H. Meyer, Yanzhuang Wang and Graham Warren (2002) Direct