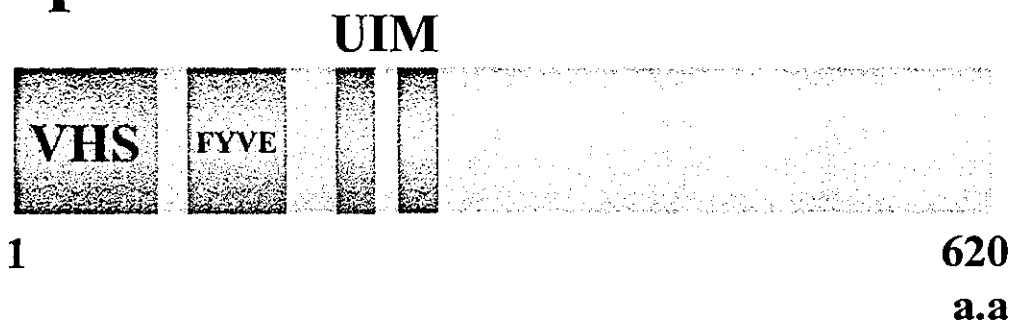


Fig. 9 Effects of deletion of genes related MVB sorting pathway on sensitivity to various drug-induced stress

Vps27



- VHS** : Efficient binding to ubiquitin
- FYVE** : Bind specifically to PI(3)P
- UIM** : Ubiquitin-interacting motifs

Fig. 10 Schematic representation of Vps2

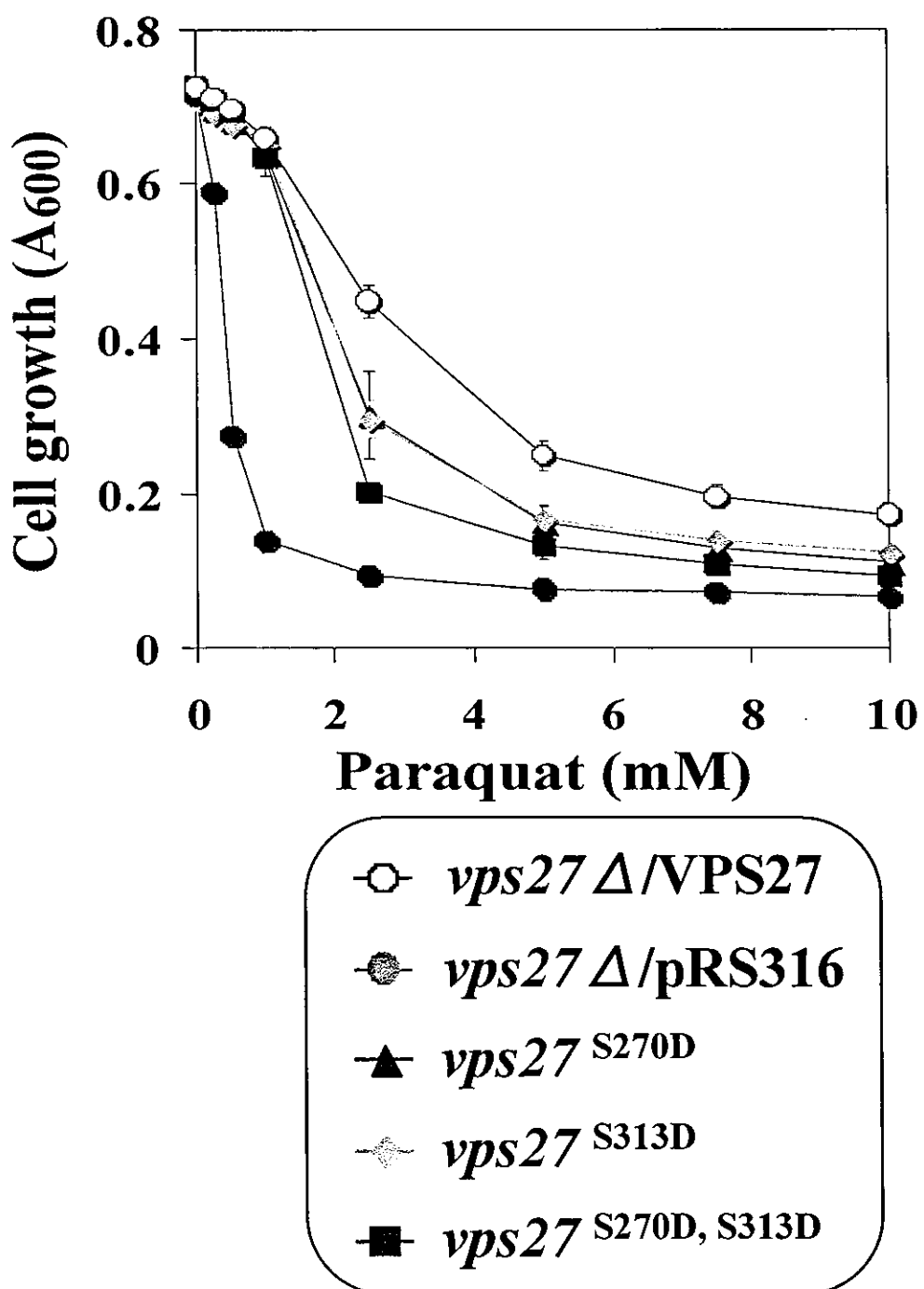


Fig. 11 Effect of point mutations in UIM domains of Vps27 on paraquat sensitivity

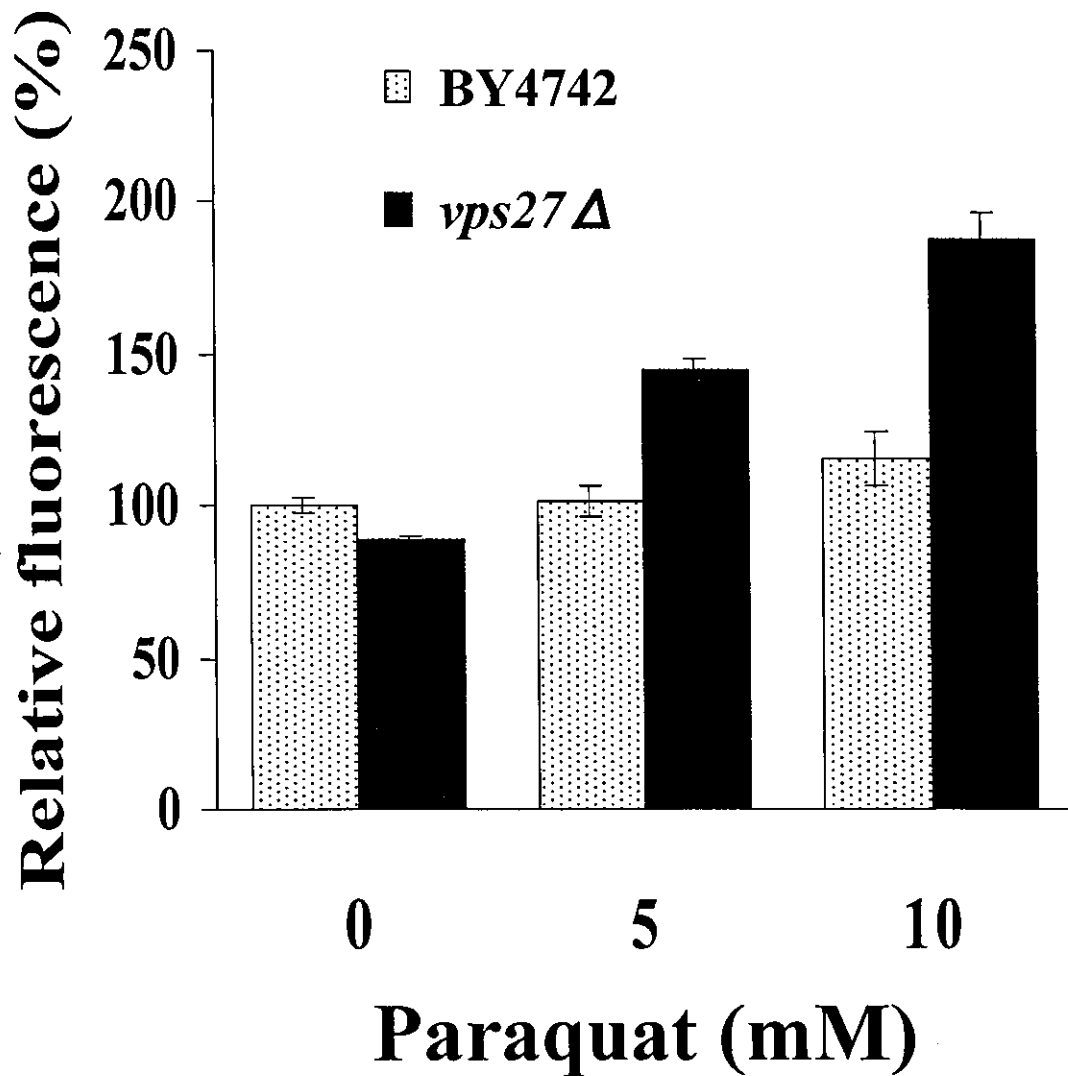


Fig. 12 Effects of deletion of *VPS27* on intercellular ROS levels by paraquat

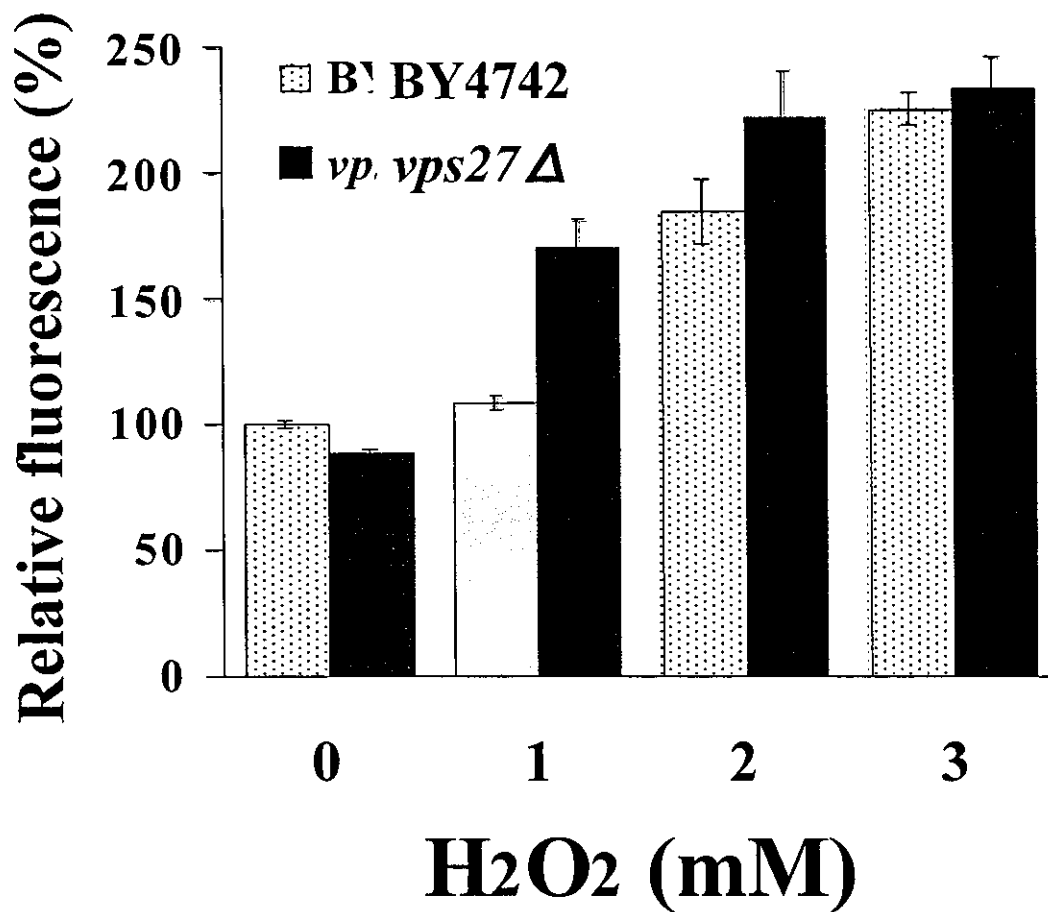


Fig. 13 Effects of deletion of *VPS27* on intercellular ROS levels by hydrogen peroxide

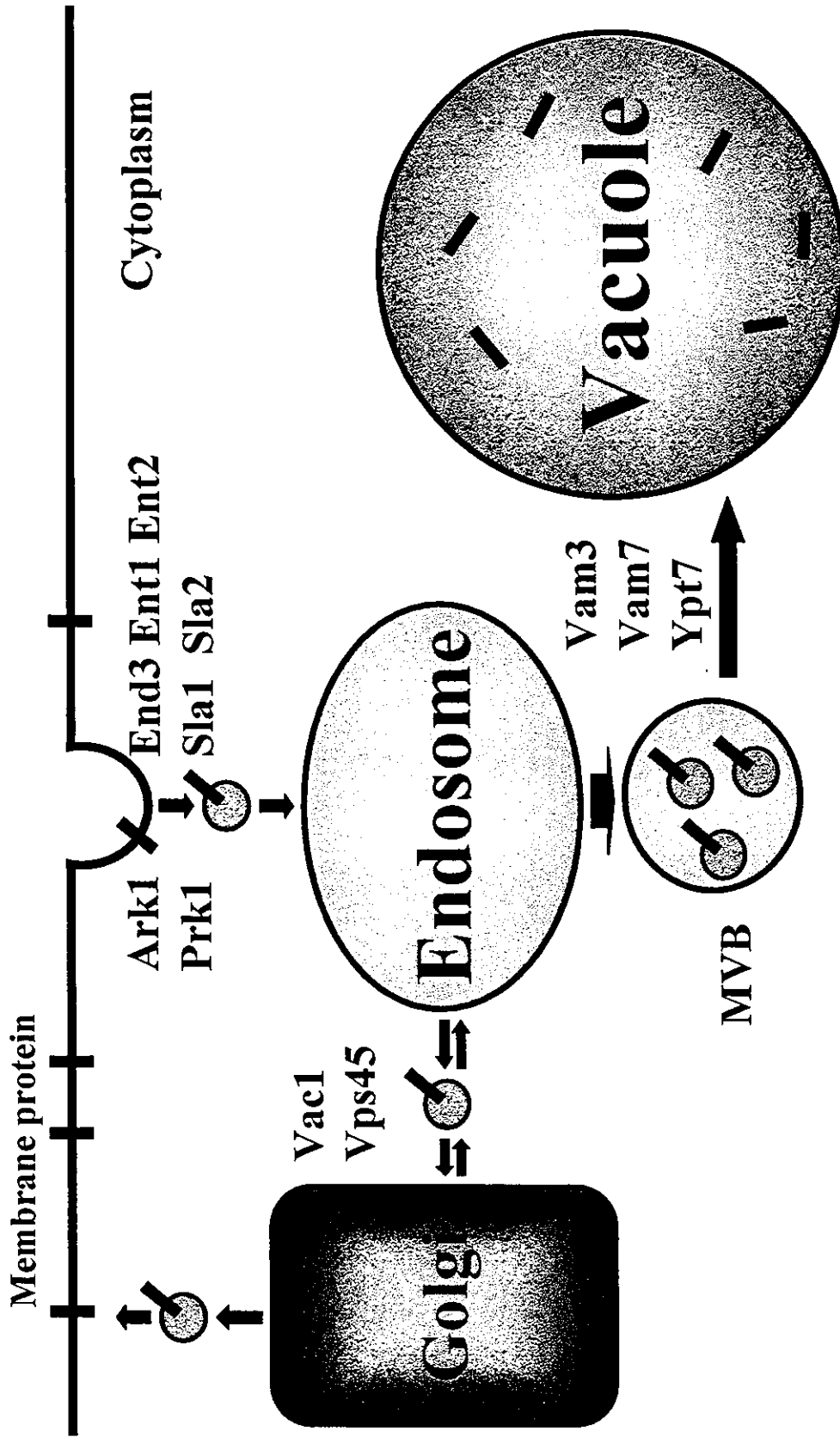


Fig. 14 Localization of factor group of endocytosis

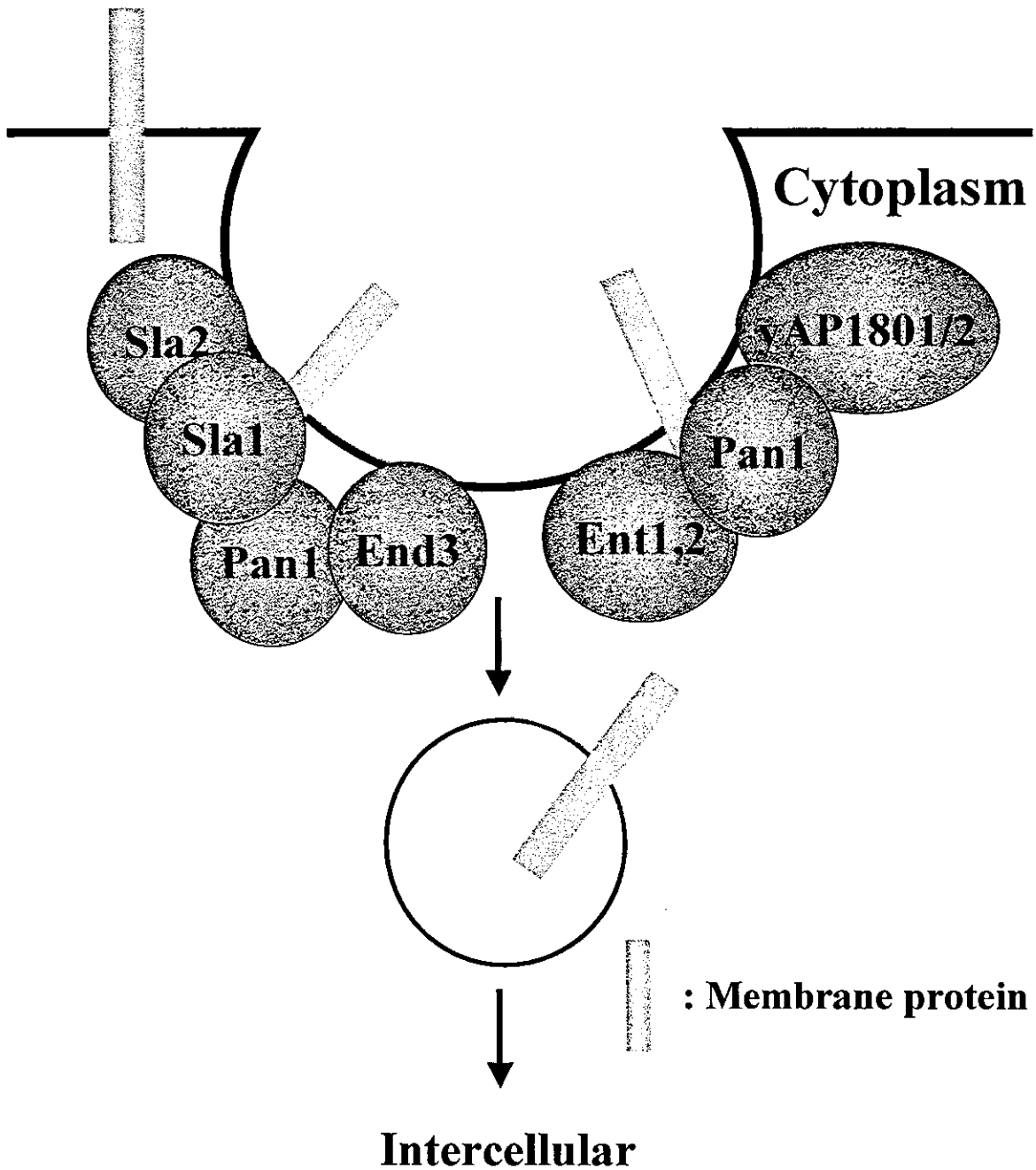


Fig. 15 Model for internalization step of endocytosis in yeast

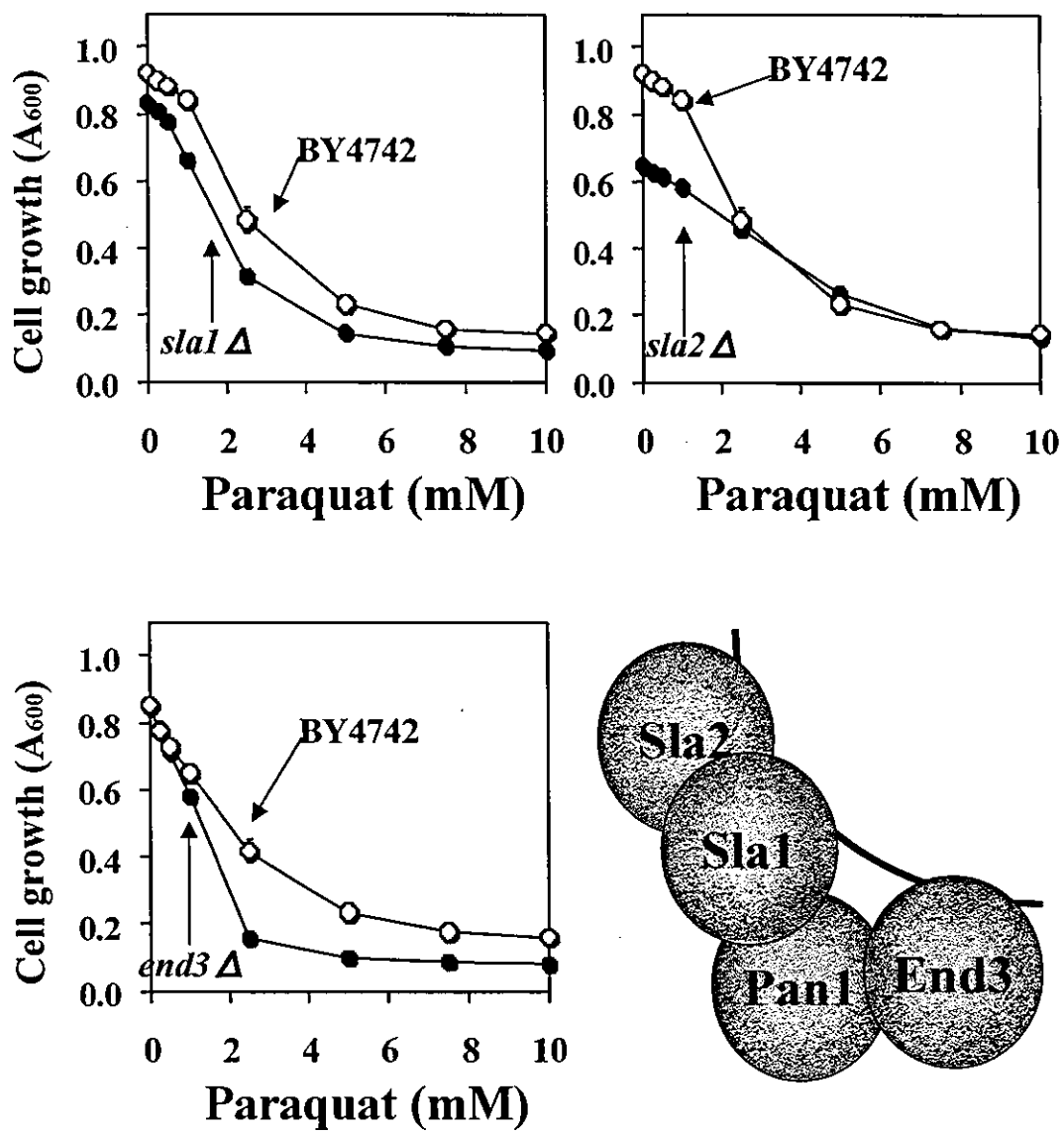


Fig. 16 Sensitivity of *END3*, *SLA1* or *SLA2* deletion mutant to paraquat

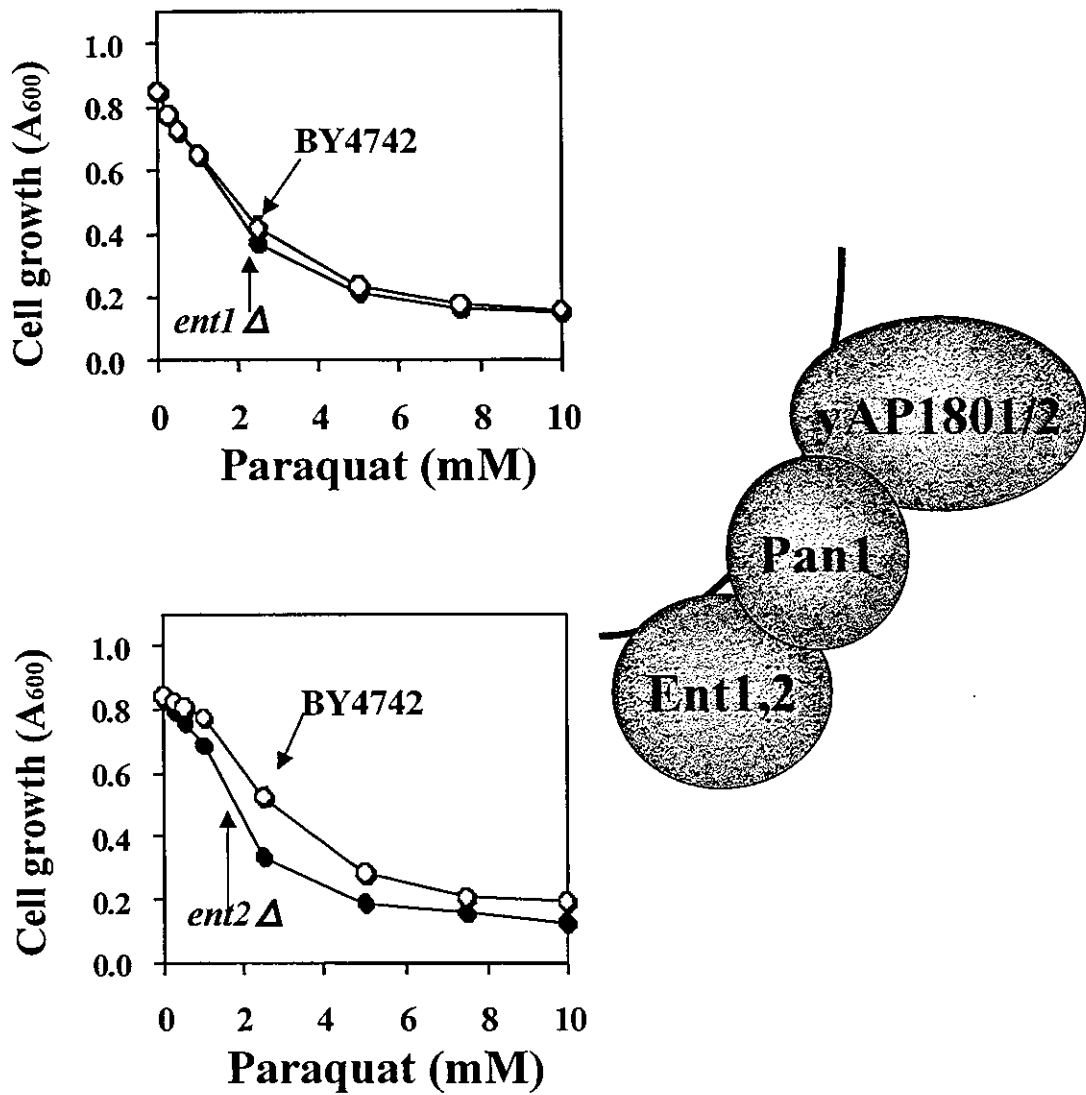


Fig. 17 Sensitivity of *ENT1* or *ENT2* deletion mutant to paraquat

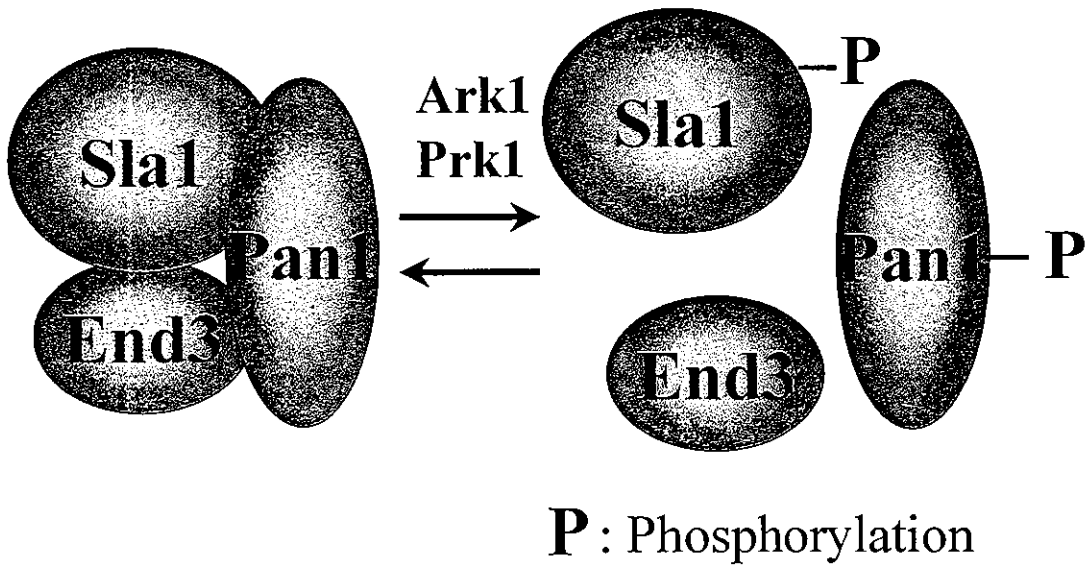
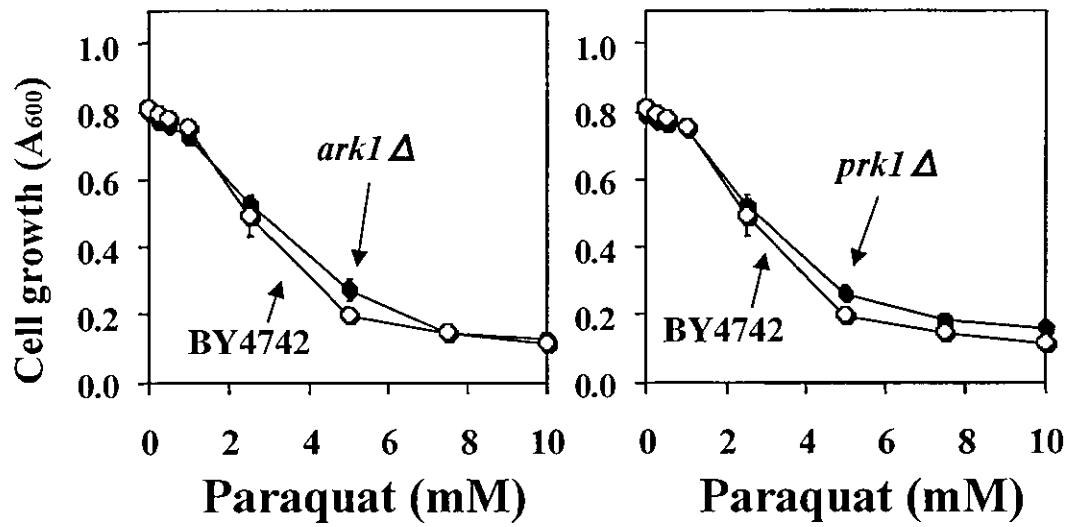


Fig. 18 Sensitivity of *ARK1* or *PRK1* deletion mutant to paraquat

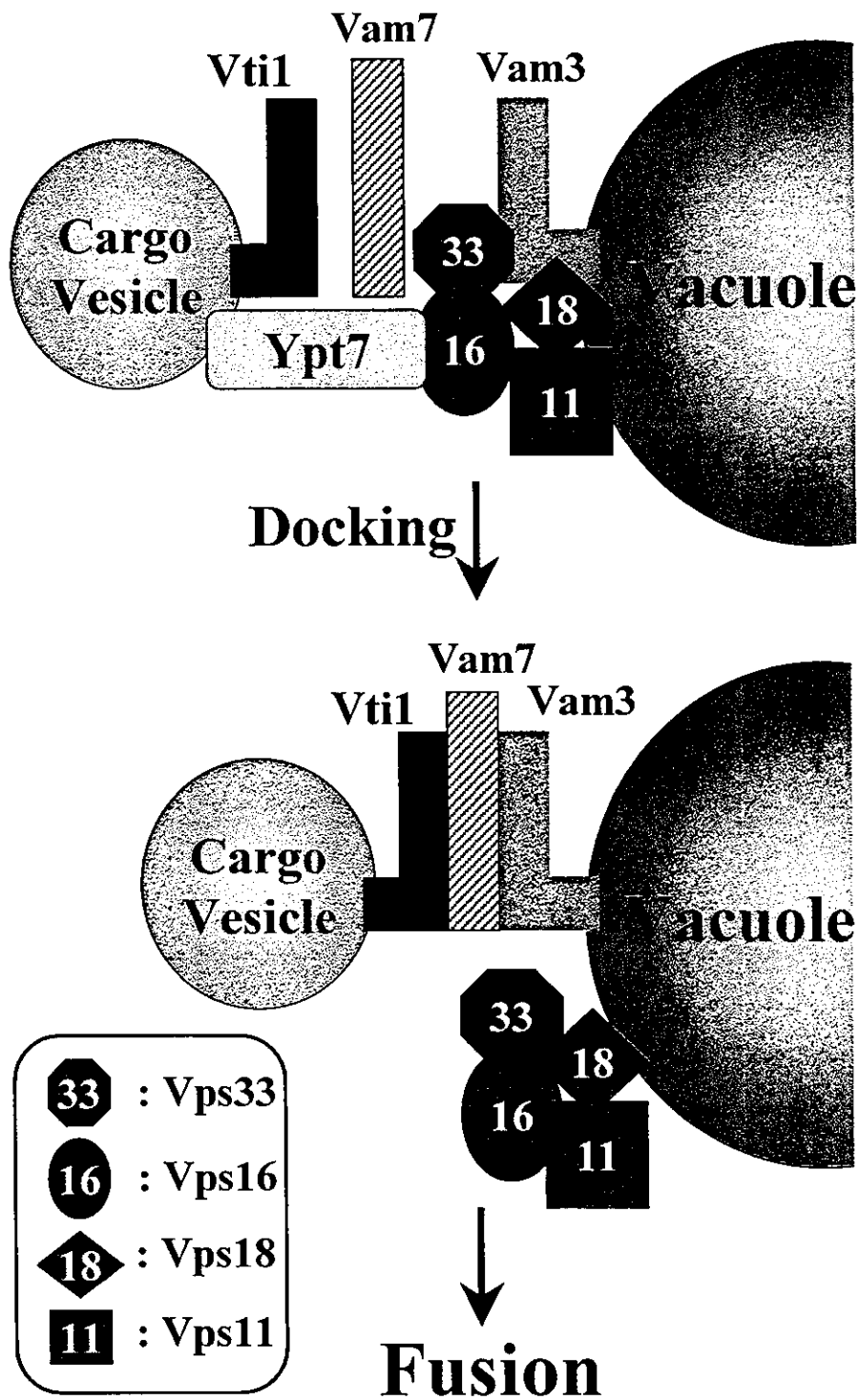


Fig. 19 Model for vacuole-vesicle fusion

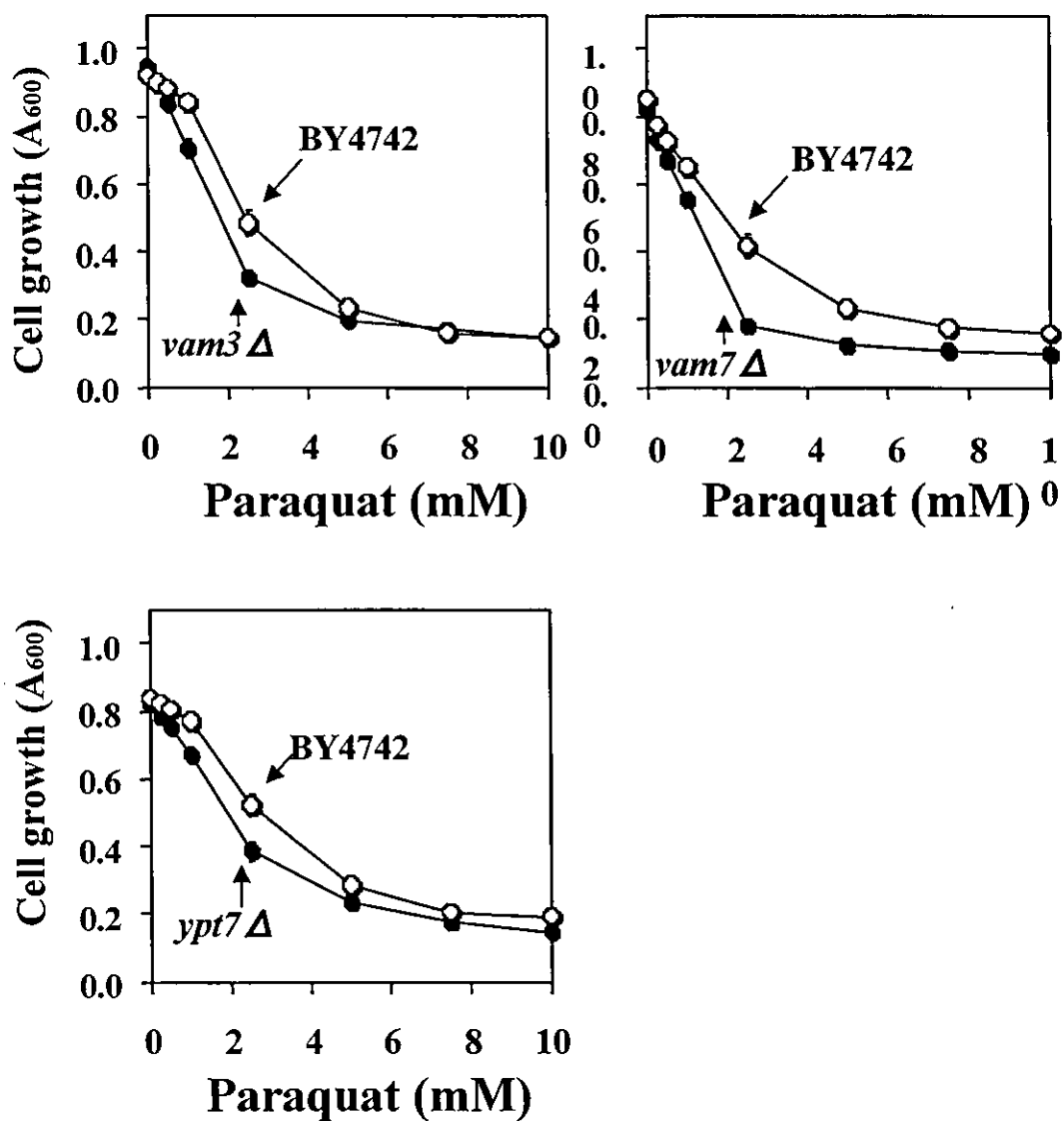


Fig. 20 Sensitivity of *VAM3*, *VAM7* or *YPT7* deletion mutant to paraquat

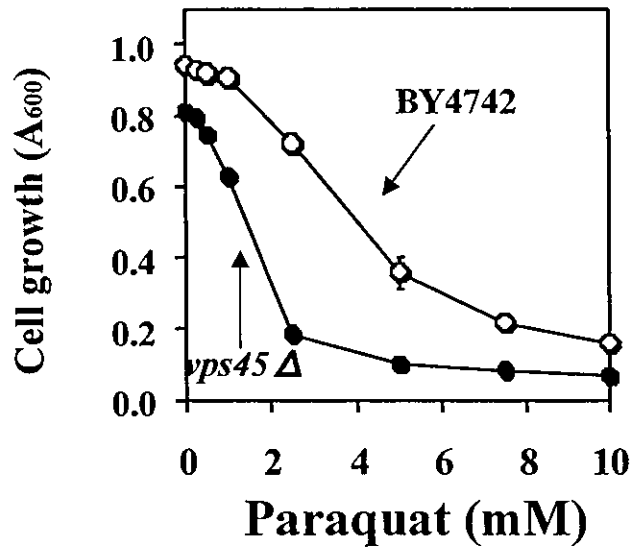
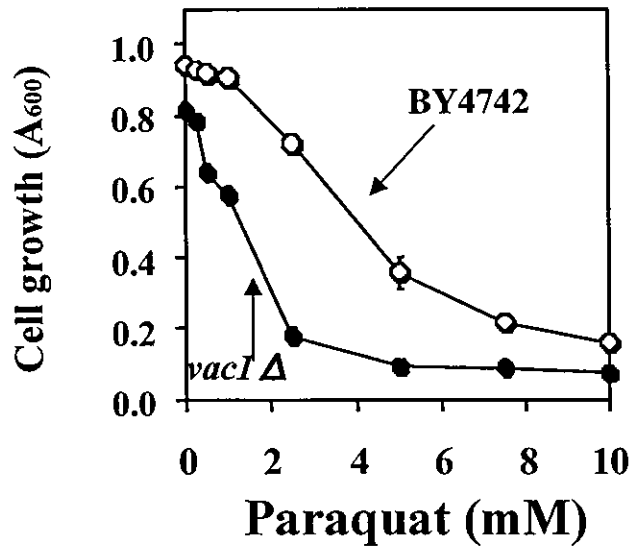


Fig. 21 Sensitivity of *VAC1* or *VPS45* deletion mutant to paraquat

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

酵母細胞膜に存在する鉄還元酵素 Fre1 によるパラコートの
毒性増強機構の解析

分担研究者 大橋一品 東北大学大学院薬学研究科助手

我々は、哺乳類の NADPH オキシダーゼサブユニット gp91phox ホモログで酵母の鉄還元酵素である Fre1 が酵母のパラコートに対する感受性を増強させることを見いだした。Fre1 の酵素活性に応じて、酵母のパラコートに対する感受性が増大すると共にパラコートに依存した酵母細胞外での活性酸素産生も促進されることが明らかとなった。Fre1 以外の酵母鉄還元酵素である Fre2, Fre3, Fre4, Ygl160w を過剰発現させたところ、細胞外での活性酸素産生能力の高い高発現酵母ほどパラコートに対する感受性が高かった。また、野生株において、培地中へのスーパーオキシドジズムターゼ(SOD)添加がパラコート毒性を著しく軽減した。以上の結果から、細胞膜上に存在する鉄還元酵素が細胞外でのパラコートを介したスーパーオキシドラジカル産生を促進させ、発生したスーパーオキシドラジカルが細胞に障害を与えるというこれまでにない全く新しいパラコート毒性の発現機構の存在が示唆された。

A. 研究目的

我々はパラコートの毒性を増強する因子の遺伝学的スクリーニングを出芽酵母を用いて行い、細胞膜上の鉄還元酵素 Fre1 の高発現がパラコート毒性を増強させることを見出した。

Fre1 はヘムをその構造中に持つ膜蛋白質で、NADPH から供与された電子を FAD に渡し、さらにヘムを介して

この電子を鉄に付与することによって鉄の還元を行う酵素である [1, 2]。Fre1 はパラコートにも電子を付与するという報告があり [3]、電子を供与されたパラコートが酸素分子に電子を与えて活性酸素の 1 つであるスーパーオキシドアニオン (O_2^-) の細胞外での産生を促す可能性も否定できない。そこで本研究では、パラコー

トのFreIによる毒性増強現象における細胞外O₂⁻産生の関与の可能性について検討した。

B. 研究方法

1. *FRE1* 発現 plasmid の作製

酵母の chromosomal DNA を template として、以下に示す primer を用いて *FRE1-1* (5'側: *FRE1-C*, *FRE1-p2* 使用) と *FRE1-2* (3'側: *FRE1-p3*, *FRE1-p4* 使用) を PCR により増幅した。それぞれの PCR 産物を DNA ligation kit ver. 2 を用いて pGEM-T Easy に連結し、大腸菌に導入した。ライゲーション反応液 5 μ L をコンピテントセル溶液 200 μ L に加え、氷上に 30 分間静置した後、42°C で 45 秒間の熱ショックを与え、更に氷上に 1 分間静置した後、アンピシリン 50 μ g/mL を含む LB 寒天培地に播き 37°C で一晩培養した。コロニーをアンピシリン 50 μ g/mL を含む LB 培地 2 mL に植菌し 37 °C で一晩振盪培養した後、GenElute Plasmid Mini-Prep Kit を用いて大腸菌よりプラスミド DNA を精製した。PCR により増幅した *FRE1* については dideoxy sequence 法により塩基配列を確認した。次に酵母発現 vector である pYES2 に subcloning した。まず始めに、pGEM-T Easy-*FRE1-1*、 pGEM-T Easy-*FRE1-2* および pYES2 を適当な制限酵素 (*FRE1-1* : *Sac* I / *Msc* I, *FRE1-2* : *Msc*

I / *Eco* RI, pYES2 : *Sac* I / *Eco* RI) で切断し、1%アガロース電気泳動後に目的のサイズの DNA をゲルから切り出し、GENE CLEAN II KIT を用いて精製した。得られた DNA と pYES2 を DNA ligation kit ver. 2 を用いて連結した。大腸菌への導入および回収を行い、目的とするプラスミド DNA を単離した。

2. *FRE2*, *FRE3*, *YGL160w* 発現 plasmid の作製

酵母の chromosomal DNA を template として、以下に示す primer を用いて *FRE2*, *FRE3*, *YGL160w* を含む配列を PCR により増幅した。それぞれの PCR 産物を 1%アガロース電気泳動後に目的のサイズの DNA をゲルから切り出し、GENE CLEAN II KIT を用いて精製した。次に酵母発現 vector である pYES2 に subcloning した。まず始めに、pYES2 を制限酵素 (*Pvu* II) で切断し、1%アガロース電気泳動後に切断されたプラスミド DNA をゲルから切り出し、GENE CLEAN II KIT を用いて精製した。精製した PCR 産物と pYES2 を DNA ligation kit ver. 2 を用いて連結した。大腸菌への導入および回収を行い、目的とするプラスミド DNA を単離した。

3. *FRE4* 発現 plasmid の作製

酵母の chromosomal DNA を template として、以下に示す primer を用いて *FRE4* を PCR により増幅した。PCR 産物を 1%アガロース電気泳動後に目的のサイズの DNA をゲルから切り出し、GENE CLEAN II KIT を用いて精製した。また、pGEM-3Zf(+)を制限酵素 (*Sma* I) で切断し、1%アガロース電気泳動後に切断されたプラスミド DNA をゲルから切り出し、GENE CLEAN II KIT を用いて精製した。精製した PCR 産物と pGEM-3Zf(+)を DNA ligation kit ver. 2 を用いて連結した。大腸菌への導入および回収を行い、プラスミド DNA を精製した。次に酵母発現 vector である pYES2 に subcloning した。まず始めに、pGEM-3Zf(+)-*FRE4* および pYES2 を制限酵素 (*Kpn* I / *Xba* I) で切断し、1%アガロース電気泳動後に目的のサイズの DNA をゲルから切り出し、GENE CLEAN II KIT を用いて精製した。得られた DNA と pYES2 を DNA ligation kit ver. 2 を用いて連結した。大腸菌への導入および回収を行い、目的とするプラスミド DNA を単離した。

4. *Fre1* 遺伝子への変異の導入

各 *Fre1* 変異体は QuikChange™ site-directed mutagenesis kit (Stratagene) の protocol に従って、template として pYES2-*FRE1* を用いて PCR を行い、変

異導入 plasmid を作成した。*Fre1* の酵素活性に関わるドメインの histidine を alanine に置換させる変異を持つ primer を用いた。PCR 増幅後、各 *Fre1* 変異体の塩基配列を塩基配列解析により確認した。

5. 酵母への plasmid の導入

酵母の形質転換は酢酸リチウム法により行った。まず、酵母 (BY4742 または *fre1Δ*) を YPAD 培地 2 mL に植菌し一晩振盪培養した後、 2×10^6 cells/mL になるように YPAD 培地で希釈した。この希釈培養液 50 mL を 1×10^7 cells/mL になるまで振盪培養した後に集菌し、100 mM の酢酸リチウム溶液に 2×10^9 cells/mL になるように懸濁した。この懸濁液 50 μ L に plasmid 溶液 2 μ L、加熱変性サケ精子 DNA 5 μ g、および 40% polyethylene glycol (4000) 300 μ L を加え 30°C で 30 分間静置した。その後、42°C で 15 分間熱ショックをかけた後に集菌し、100 μ L の滅菌水に懸濁してウラシルを含まない選択培地である SD (-ura) 寒天培地に播き 30°C で 2 日間培養して得られたウラシル非要求性のコロニーを、高発現株のクローンとした。

6. 酵母の薬毒物に対する感受性

酵母を SD 培地 (Fig. 1, 3, 4, 14, 18) または SR (2% raffinose; -ura) 培地

(Fig. 2, 10, 13, 15, 16) 2 mL に植菌し 30°C で一晩振盪培養した後、この培養液を 1×10^4 cells/ 180 μ L になるように SD 培地 (Fig. 1, 3, 4) または SG (3% galactose, 2% raffinose; -ura) 培地 (Fig. 2, 10, 13, 15, 16) で希釈した。この希釈培養液を 96-well plate に 1×10^4 cells/well になるように 180 μ L 添加し、それぞれの化合物 (10 倍濃度のもの) を 20 μ L 添加した後に 30°C で 48 時間培養し、600 nm の吸光度を測定して酵母の増殖を調べた。

酵母培養液に SOD を添加した際の酵母のパラコートに対する感受性を検討する際 (Fig. 14, 19) には、希釈培養液を 1×10^4 cells/ 160 μ L になるように SD 培地で調整し、96-well plate に 1×10^4 cells/well になるように 160 μ L 添加後、SOD または不活性化 SOD (100°C で 10 分処理した後に TCA 沈殿を行ったもの) を 20 μ L 添加し、さらにパラコートを 20 μ L 添加した。そして 24 時間 30°C で培養し、600 nm の吸光度を測定して酵母の増殖を調べた。

7. 細胞外活性酸素産生

酵母を SD 培地 (Fig. 6) または SR (2% raffinose; -ura) 培地 (Fig. 10, 13, 18) 2 mL に植菌し 30°C で一晩振盪培養した後、 5×10^6 cells/mL を 10 mL の SD 培地 (Fig. 6) または SG (3%

galactose, 2% raffinose; -ura) 培地 (Fig. 10, 13, 18) に移し、30°C で 5 時間振盪培養した。2.5 μ g/mL dihydrorhodamine 123 およびパラコートを添加し、遮光して 30°C で 30 分静置した後、15,000 rpm、4°C で遠心し、上清について蛍光を測定した (excitation, 490 nm; emission, 530 nm)。

8. 鉄還元活性の測定

酵母を SR (2% raffinose; -ura) 培地 2 mL に植菌し 30°C で一晩振盪培養した後、 5×10^6 cells/mL を 10 mL の SG (3% galactose, 2% raffinose; -ura) 培地に移し、30°C で 5 時間振盪培養した。酵母を集菌した後に、脱気した assay buffer (50 mM sodium citrate (pH 6.5), 5% glucose) で $A_{600}=2.5$ となるように懸濁した。懸濁液を 30°C で 15 分静置した後に 1 mM BPS (bathophenanthrolinedisulfonic acid disodium salt)、1 mM 塩化鉄 (III) を添加し、遮光して 30°C で 30 分静置した後、15,000 rpm、4°C で遠心し、上清について 520 nm の吸光度を測定した。

9. 酵母細胞内およびゲノム DNA のプラチナ含有量の測定

酵母 (BY4742, *fre1* Δ) を YPAD 培地に植菌し、一晩振盪培養した後 5×10^8 cells/20 mL となるように YPAD 培地で希釈した。この希釈培養液 20 mL

を3時間振盪培養した後に、シスプラチンを添加し更に2時間振盪培養し、その後集菌した。一部の酵母を酵母内プラチナ量測定のために分け、残りの酵母についてゲノムDNAの回収をガラスビーズ法により行った。酵母をbreaking buffer 200 μ Lに懸濁し、これに、フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール (25:24:1) 200 μ L およびガラスビーズ 0.3 gを加え3分間激しく攪拌した後に、15,000 rpmで5分間遠心分離してDNAを含む水層200 μ Lを得た。さらにエタノール沈澱を行い、最終的に50 μ LのDNA溶液とした。その後、酵母 1×10^8 cells およびDNA 500 μ gを硝酸で湿式灰化し、残留物をMilliQ水5 mLで溶解させ、ICP-MS (HP4500、横河アナリティカルシステムズ)を用いてプラチナの含有量を測定した。プラチナ濃度は195 m/zの測定値から絶対検量線法により算出した。

(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. 鉄還元酵素の高発現または欠損が酵母のパラコートに対する感受性に及ぼす影響

1-1. Fre1 高発現の影響

前述したように、我々は鉄および銅の取り込みに関与する細胞膜上の鉄還元酵素 Fre1 の遺伝子欠損により、酵母がパラコートに対し強い耐性を示すことを見いだしている (Fig. 1)。この事実は Fre1 が両薬物の毒性の増強に関与している可能性を示唆している。そこで Fre1 の高発現がパラコートに対する酵母の感受性に与える影響を検討した。その結果、対照とした空ベクター (pYES2) 導入酵母に比べ、Fre1 高発現酵母はパラコートに対して、高い感受性を示した (Fig. 2)。

1-2. Fre2 または Fre3 欠損の影響

出芽酵母では、鉄還元酵素ファミリーとして Fre1~7、Ygl160w および Ylr047c の9種の存在が知られている [4]。酵母の鉄還元活性は Fre1 が最も高く全体の7~9割を占め、他の酵素の寄与はさほど高くない [5, 6]。

Fre1 以外の鉄還元酵素がパラコートの毒性に及ぼす影響を検討するため、Fre1、Fre2、Fre3 をそれぞれ欠損した酵母のパラコート感受性を検討した。その結果、耐性を示す Fre1 欠損酵母とは異なり、Fre2 または Fre3 の欠損はパラコート (Fig. 3) に対する酵母の感受性にほとんど影響を与えなかった。鉄還元活性の低い Fre2 および Fre3 の欠損が両化合物の毒性

に影響を及ぼさなかったことから、Fre1 による両化合物の毒性増強に、その鉄還元活性が関与している可能性が考えられる。

2. Fre1 によるパラコート毒性増強機構の解析

2-1. 酸化ストレス誘導性薬物の毒性に対する Fre1 欠損の影響

Fre1 の欠損が酵母にパラコート耐性を与えることから、他の酸化ストレス誘導物質に対する感受性に Fre1 欠損が及ぼす影響についても検討した。その結果、スーパーオキシドアニオン (O_2^-) 産生物質であるメナジオンおよび過酸化水素、酸化反応促進剤である AAPH、SH 基阻害剤であるジアミドに対する Fre1 欠損酵母の感受性は野生株とほぼ同様であった (Fig. 4)。従って、Fre1 はパラコートの毒性を特異的に増強する作用を有する可能性が考えられる。

2-2. Fre1 欠損酵母におけるパラコート処理による細胞外活性酸素産生

Fre1 は鉄や銅に電子を付与し還元する酵素であるが、パラコートにも電子を付与するという報告がある [3]。パラコートに与えられた電子は酸素分子に移り、 O_2 が産生されると考えられる (Fig. 5)。Fre1 は酵母細胞膜上

に存在する酵素であり、細胞外の基質に電子を与えることから、もし Fre1 がパラコートを介した活性酸素産生を促進するのならば、活性酸素は細胞外に生じるはずである。そこで、酵母をパラコート処理した際の、細胞外の活性酸素生成量を測定した。測定には、活性酸素と反応して蛍光を発する dihydrorhodamine 123 を用いた。その結果、Fre1 欠損株ではパラコート処理による細胞外活性酸素量の増加がほとんど認められなかったが、野生株ではパラコート濃度に依存した上昇が認められた (Fig. 6 (a))。この結果は、パラコートが細胞外の活性酸素濃度を上昇させ、その機構において Fre1 が重要な役割を果たしていることを示唆している。

なお、パラコートと同様に電子を付与されると酸素分子に電子を与え、 O_2^- を産生させる化合物であるメナジオンについても同様の検討を行ったところ、メナジオンによる細胞外活性酸素濃度の上昇が認められたが、Fre1 欠損株と野生株との間にほとんど差はなかった (Fig. 6 (b))。したがって、メナジオンによる細胞外での活性酸素産生は Fre1 を介したものではないと考えられる。これは、Fre1 の欠損がメナジオン感受性に影響を及ぼさないという結果 (Fig. 5 (a)) に矛盾しない。

2-3. Fre1 の鉄還元酵素活性とパラコート毒性との関係

Fre1 の鉄還元酵素活性が活性酸素産生およびパラコートの毒性発現に及ぼす影響を検討するため、Fre1 の鉄還元活性に関わるドメインに変異を持つ変異 Fre1 蛋白質を Fre1 欠損酵母に高発現させた。Fre1 はヘムをその構造中に持つ膜蛋白質で、NADPH から供与された電子を FAD に渡し、さらにヘムを介してこの電子を鉄に付与することによって鉄の還元を行う。Fig. 7 に示すように、Fre1 の鉄還元活性に関わるアミノ酸のうち、ヘム鉄と結合する histidine (H294、308、364、378) をそれぞれ alanine に置換すると鉄還元活性がほとんどなくなり、FAD 結合部位に含まれる histidine (H462) を alanine に置換すると鉄還元活性が減少するという報告がある [20]。そこで、H294、308、462 をそれぞれ alanine に置換した変異体（それぞれ H294A、H308A、H462A と示す）を発現するプラスミドを作製し、Fre1 欠損酵母に導入した。

まずこれら各 Fre1 変異体発現酵母について、鉄還元活性を測定したところ、H294A および H308A を発現させた酵母はほとんど活性を示さず（空ベクターを導入した酵母と同程度）、H462A 発現酵母は正常 Fre1 を高発現させた酵母の約 27% の弱い活性を示

した (Fig. 8)。

次にこれら各 Fre1 変異体をパラコート処理した際の細胞外活性酸素量を測定した (Fig. 9)。その結果、正常 Fre1 を高発現させた酵母は、パラコート処理により細胞外活性酸素濃度が上昇したが、鉄還元活性がほとんど認められなかった変異体 H294A および H308A は、活性酸素濃度がほとんど上昇せず、空ベクターを導入した酵母と同程度であった。また、弱い鉄還元活性を示した H462A は、正常 Fre1 発現酵母の約 33% にあたる活性酸素濃度の上昇を示した。したがって、パラコートに依存した細胞外での活性酸素産生と鉄還元活性には相関があると思われる。

この鉄還元活性および細胞外での活性酸素産生とパラコート感受性との関係を調べたところ、鉄還元活性が認められない H294A および H308A 発現酵母は空ベクターを導入した酵母と同程度のパラコート感受性を示し、弱い鉄還元活性を示した H462A 発現酵母は、正常 Fre1 発現酵母ほどではないものの、空ベクター導入酵母よりは高い感受性を示した (Fig. 10)。

以上の結果から、鉄還元活性およびパラコート処理による細胞外での活性酸素産生活性の高い酵母ほど高いパラコート感受性を示すと考えられる。したがって、Fre1 の鉄還元活性が、