

**Figure 4-2. HOM2, HOM3, VID28またはWHI2遺伝子の欠損が酵母のメチル水銀感受性に与える影響 (2)**  
 $1 \times 10^6$  cells/mLの酵母を1、2、3、4、5  $\mu$ Mの塩化メチル水銀存在下、30°Cで3時間静置培養した後、 $5 \times 10^4$  cells/spotとなるようにスポットイングして、30°Cで培養後、観察した。

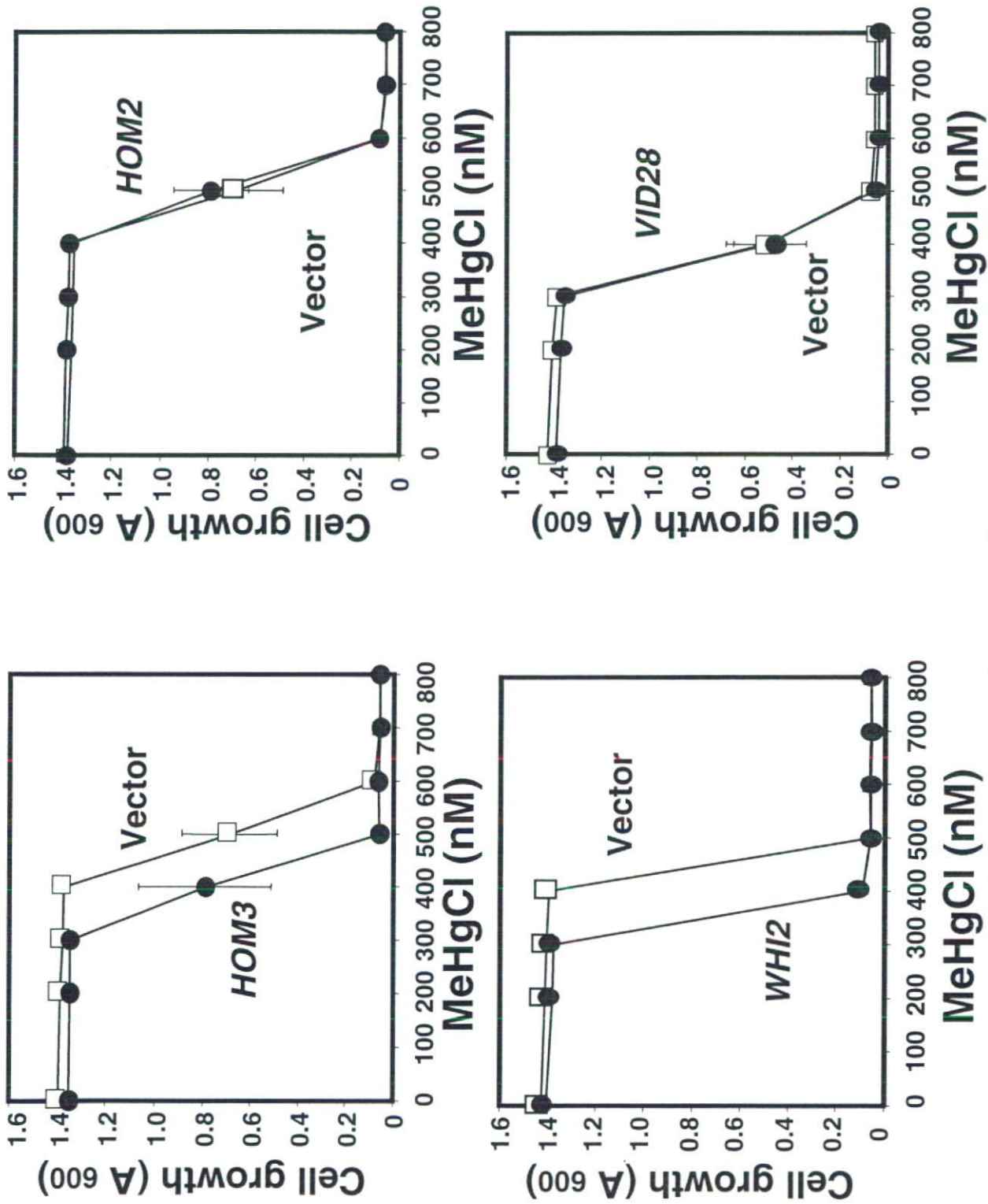
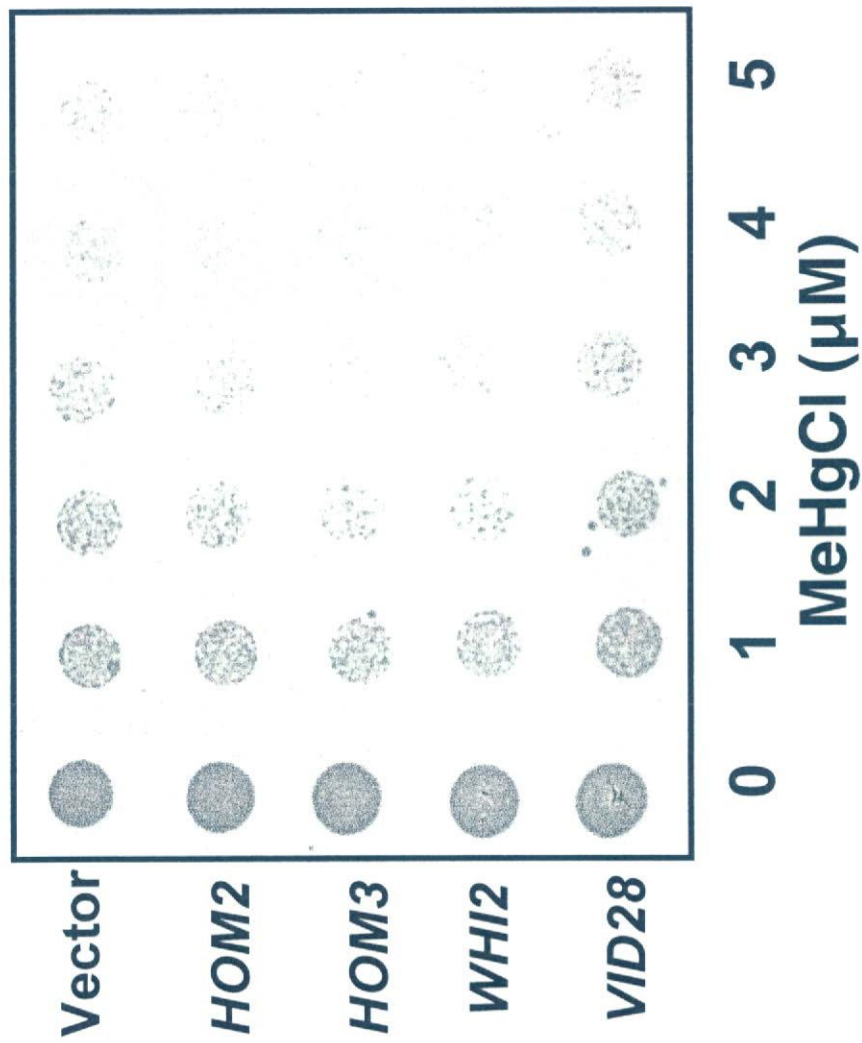


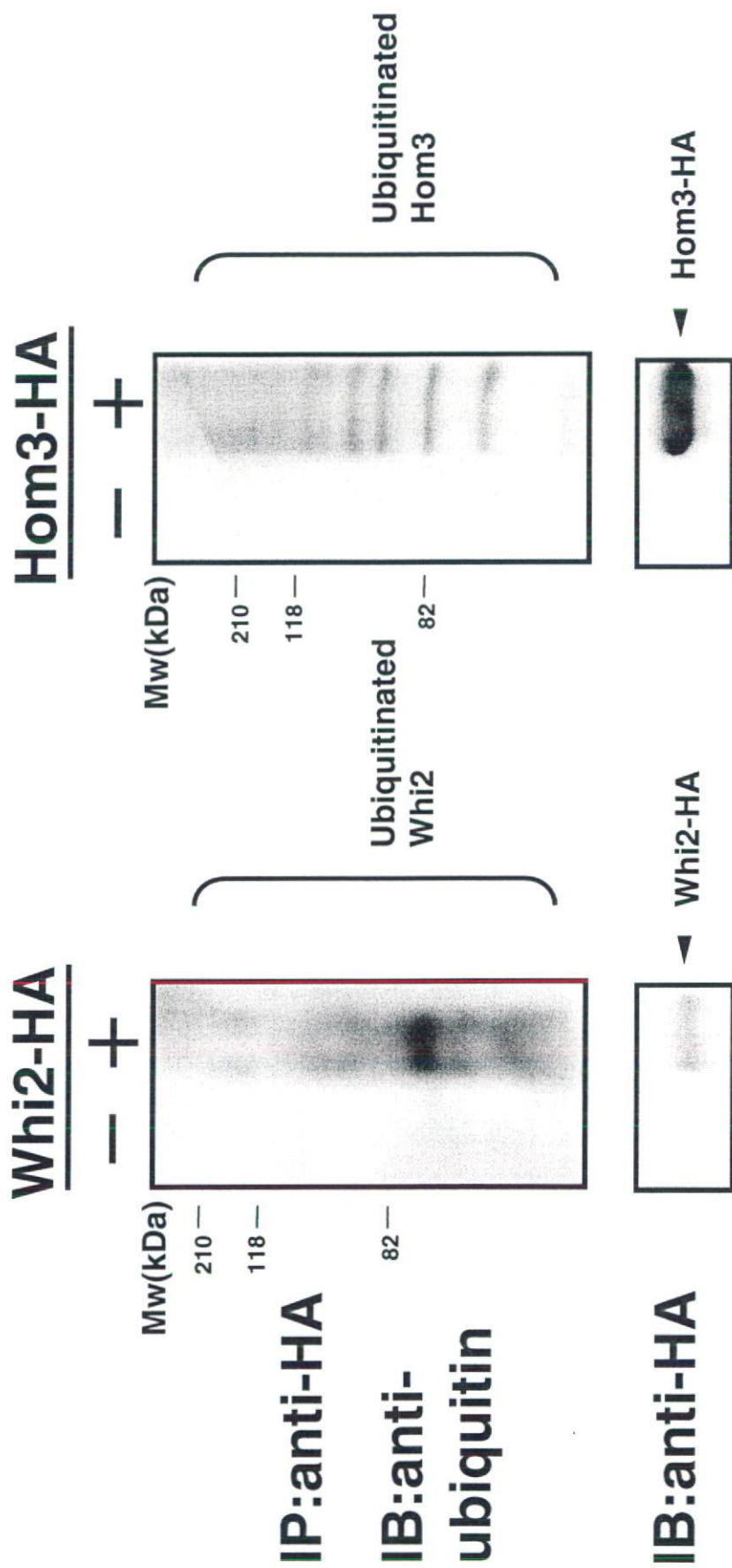
Figure 5-1. Hom2、Hom3、Vid28またはWhi2の高発現が酵母のメチル水銀感受性に与える影響(1)

Hom2、Hom3、Vid28またはWhi2を高発現させた酵母について、Figure 4-1と同様の方法でメチル水銀感受性を検討した。



**Figure 5-2.** Hom2、Hom3、Vid28またはWhi2の高発現が酵母のメチル水銀感受性に与える影響(2)

Hom2、Hom3、Vid28またはWhi2を高発現させた酵母について、Figure 4-2と同様の方法でメチル水銀感受性を検討した。



**Figure 6. Whi2およびHom3のユビキチン化**

Mw...molecular weight

Whi2またはHom3にHA-tagを融合させた蛋白高発現酵母の抽出液について抗HA抗体で免疫沈降を行った後に抗ユビキチン抗体を用いたWestern blottingによりそれぞれの蛋白質のユビキチン化を検出した。

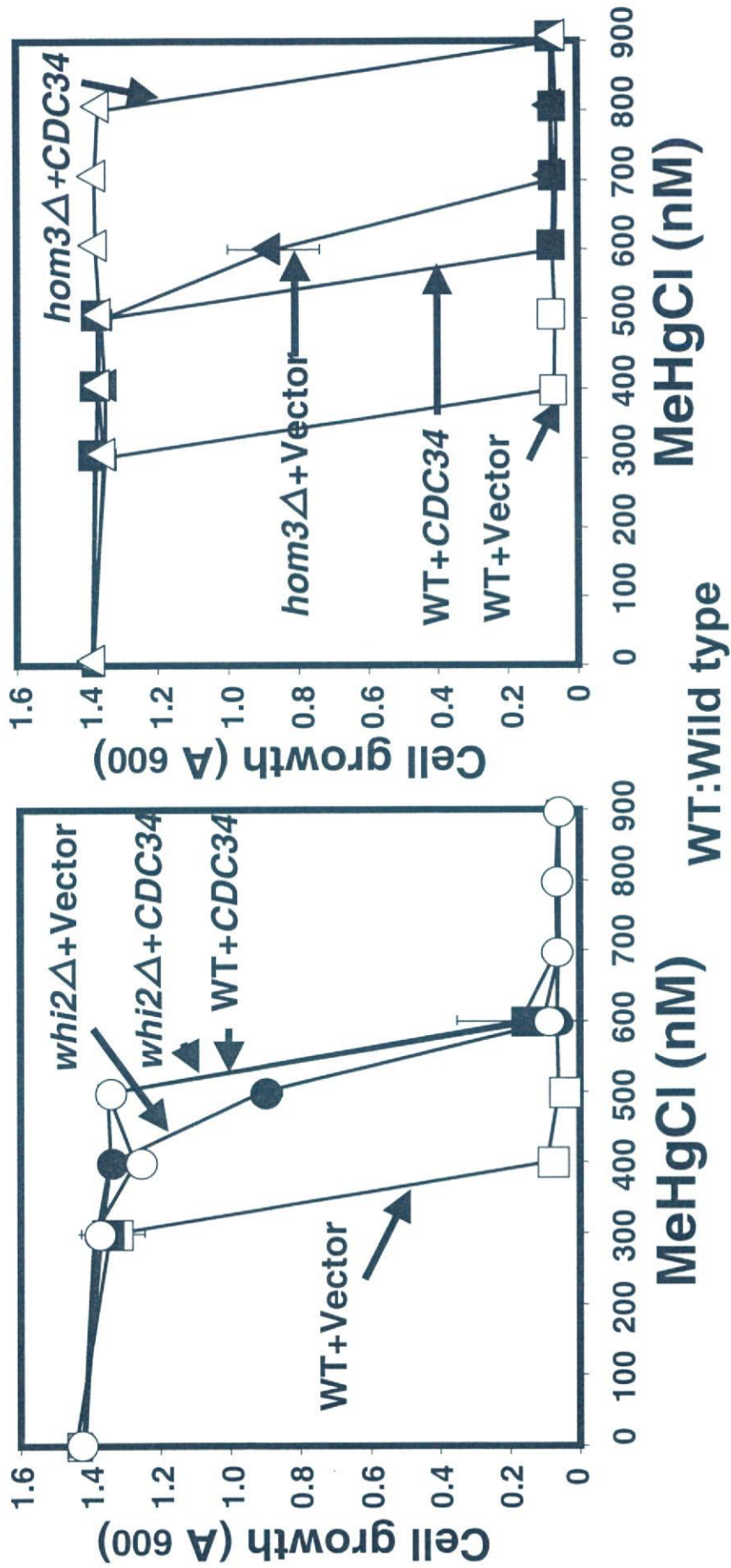
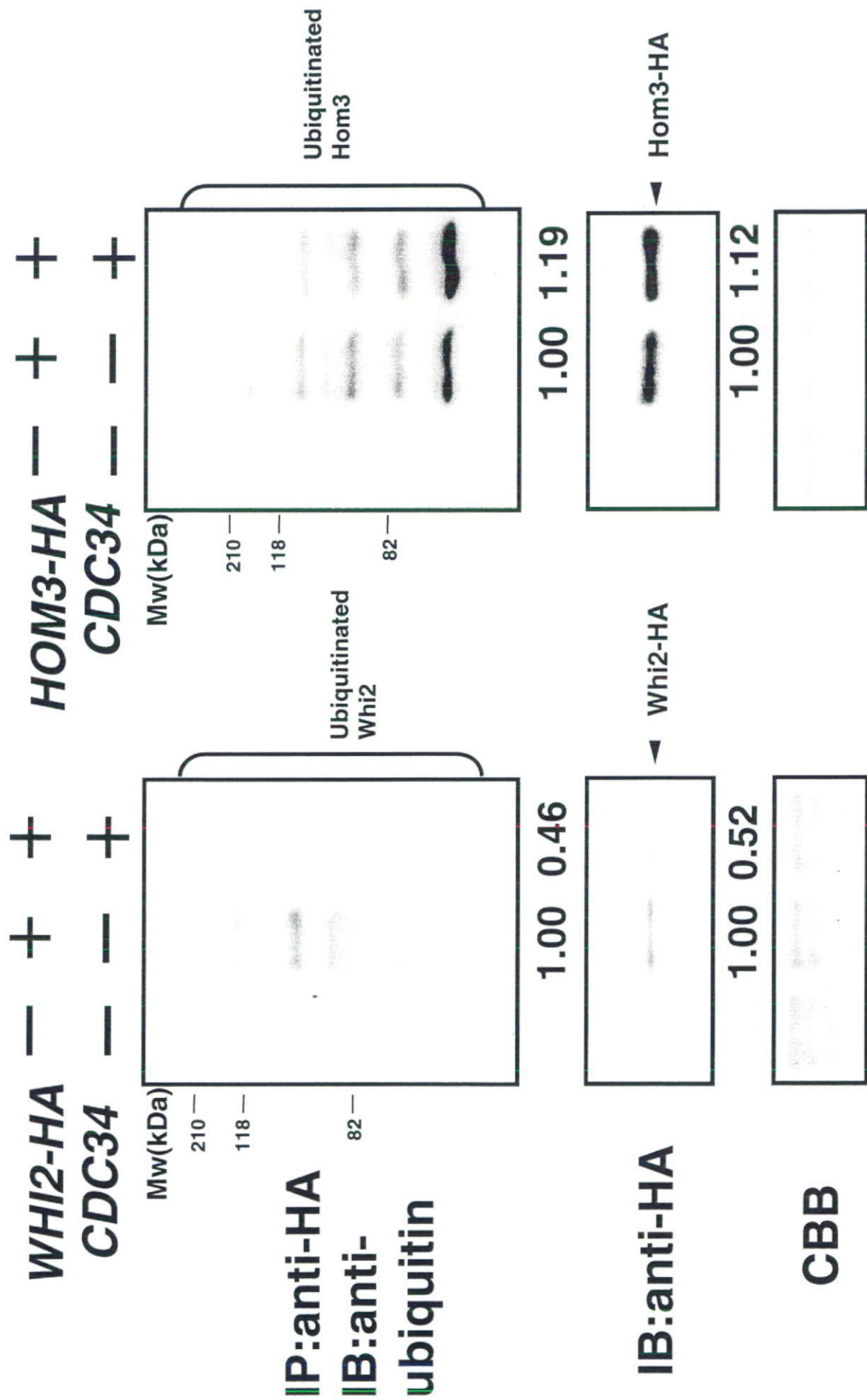


Figure 7. WHI2またはHOM3の欠損酵母がCdc34高発現によるメチル水銀耐性獲得現象に与える影響

WHI2欠損酵母およびHOM3欠損酵母にCdc34を高発現させ、Figure 4-1と同様の方法でメチル水銀感受性を検討した。



**Figure 8. Cdc34高発現がWhi2およびHom3の細胞内レベルおよびユビキチン化に与える影響**

Whi2またはHom3にHA-tagを融合させた蛋白質およびCdc34を高発現させた酵母の抽出液について抗HA抗体で免疫沈降を行った後に抗ユビキチン抗体を用いたWestern blottingによりそれぞれの蛋白質のユビキチン化を検出した。

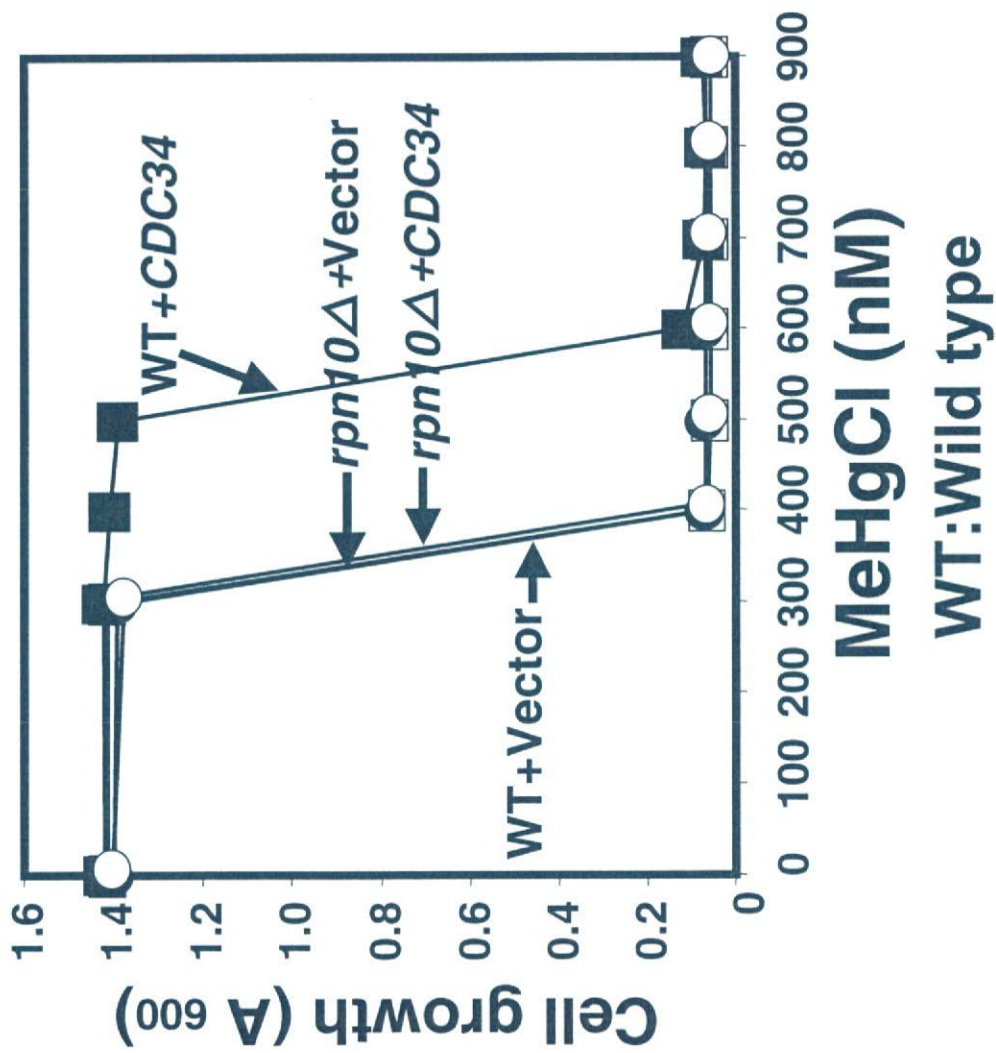
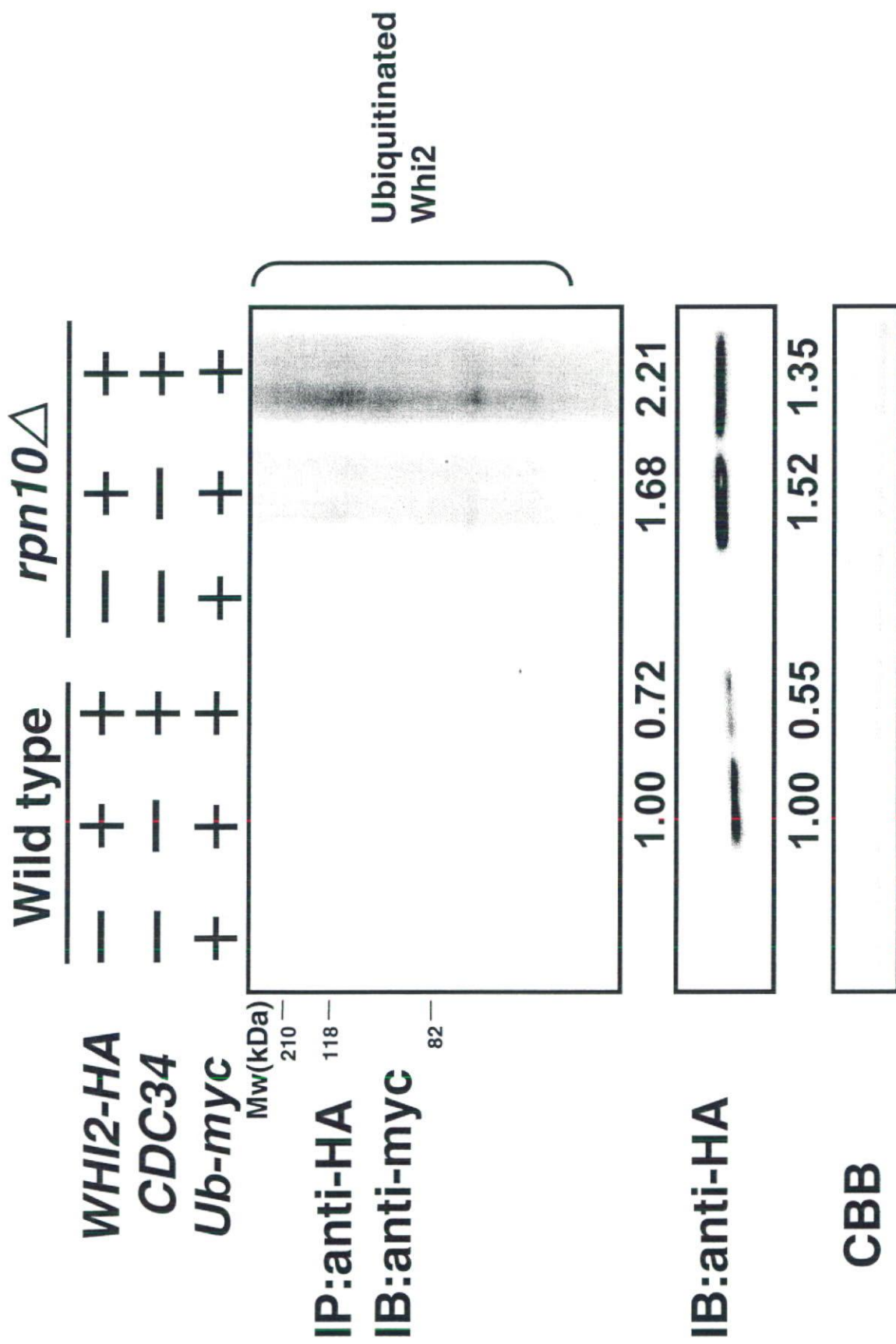


Figure 9. プロテアソーム活性の低い *RPN10* 欠損酵母における *Cdc34* 高発現がメチル水銀感受性に与える影響

*Cdc34* を高発現させた *RPN10* 欠損酵母について、Figure 4-1 と同様の方法でメチル水銀感受性を検討した。



**Figure 10. *RPN10*欠損酵母におけるCdc34高発現がWhi2の細胞内レベルおよびユビキチン化に与える影響**

Whi2にHA-tagを融合させた蛋白質、Cdc34およびmyc-tagを融合させたユビキチンを高発現させた正常酵母および*RPN10*酵母の抽出液について抗HA抗体で免疫沈降を行った後に抗myc抗体を用いたWestern blottingによりそれぞれの蛋白質のユビキチン化を検出した。



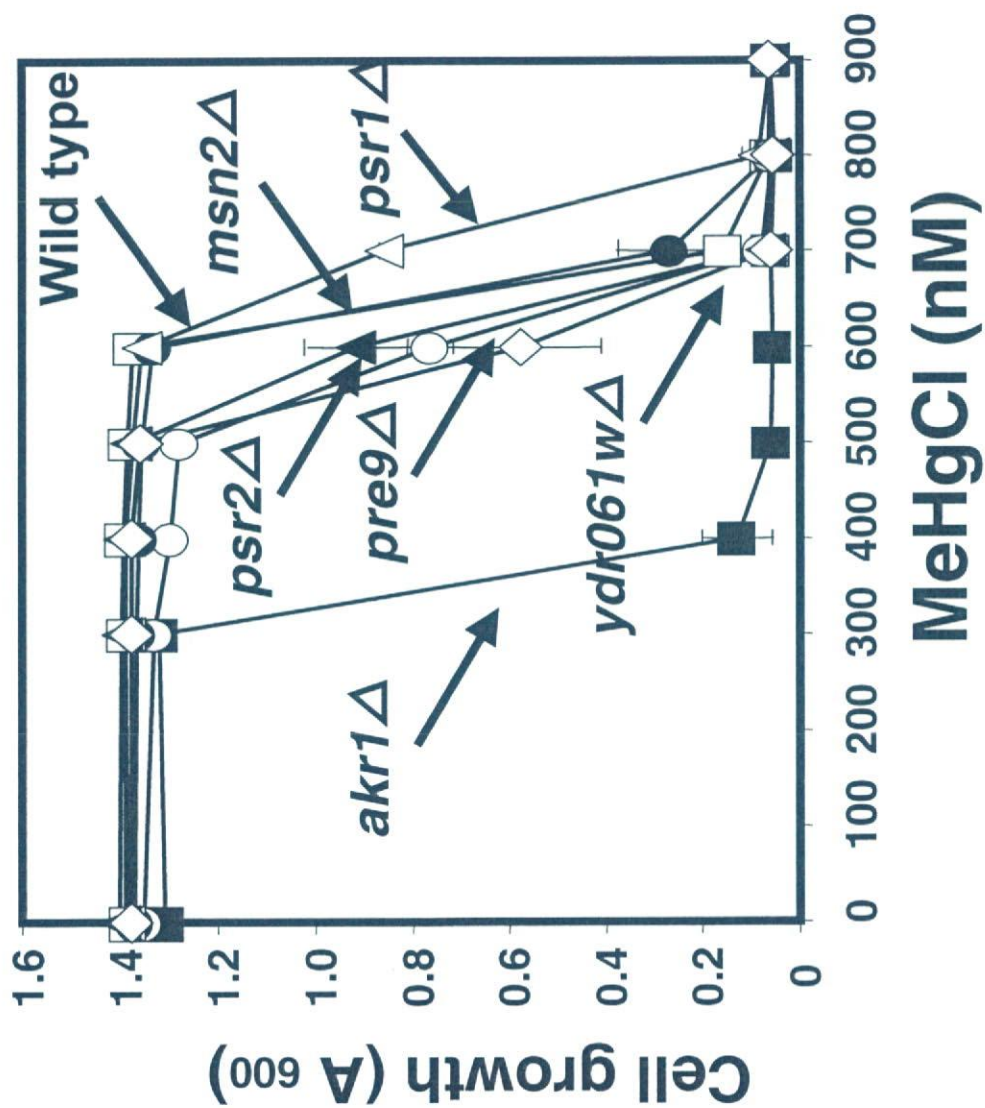
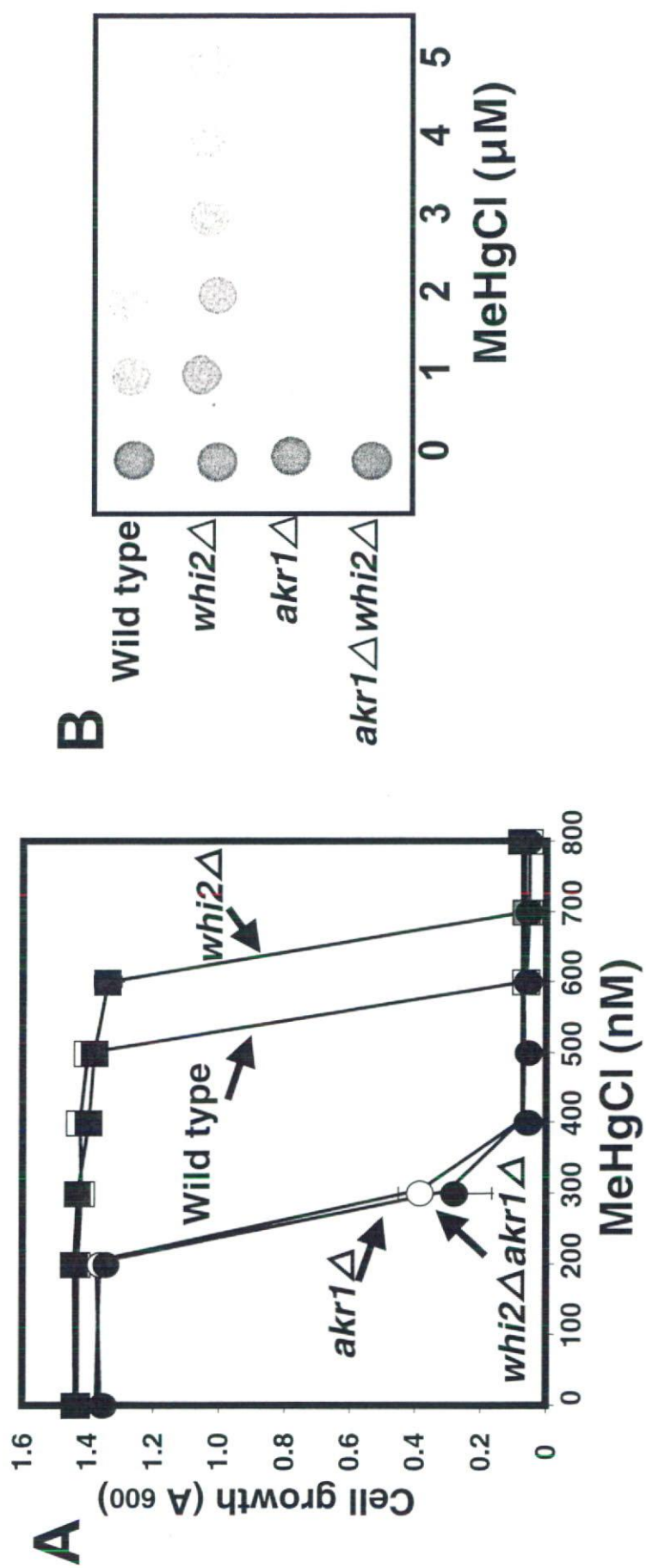


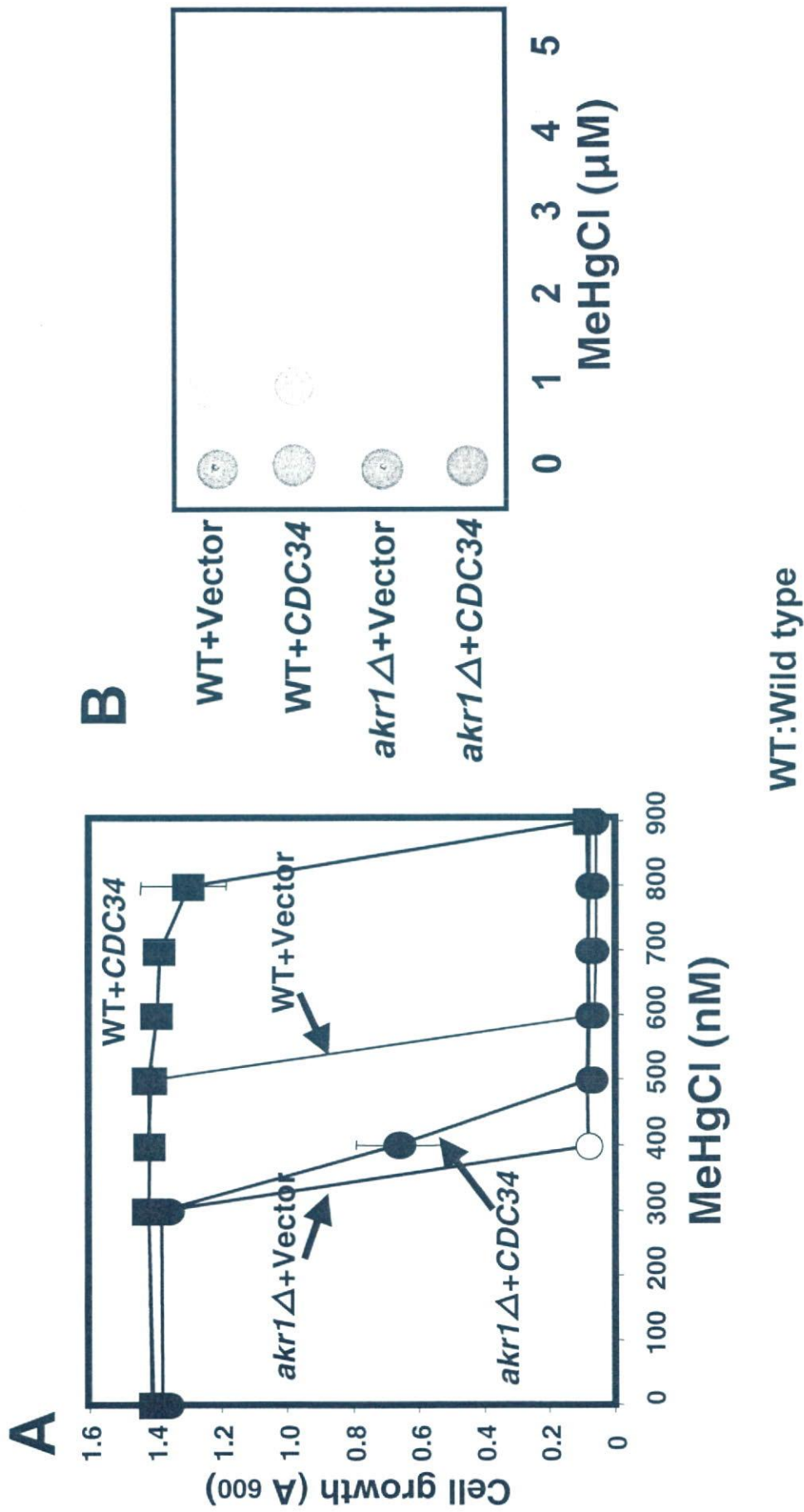
Figure 11. Whi2と結合する蛋白質の欠損が酵母のメチル水銀感受性に与える影響

Whi2と相互作用している蛋白質を欠損した酵母のメチル水銀感受性をFigure 4-1と同様の方法で検討した。



**Figure 12. *WHI2*, *AKR1*および*WHI2/AKR1*遺伝子の欠損が酵母のメチル水銀感受性に与える影響**

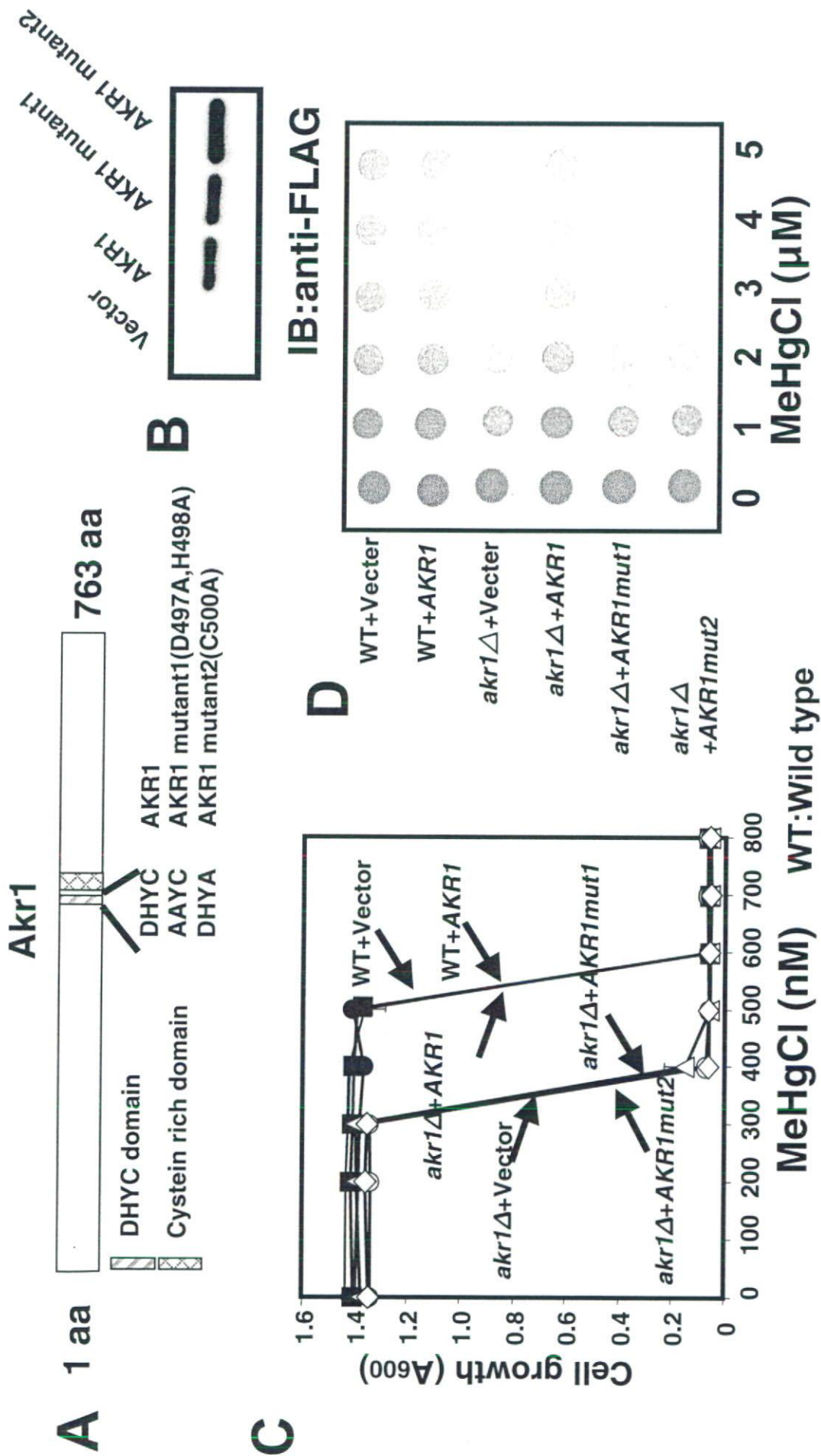
A... *WHI2*欠損酵母、*AKR1*欠損酵母および*WHI2AKR1*欠損酵母のメチル水銀感受性をFigure 4-1と同様の方法で検討した。  
 B... *WHI2*欠損酵母、*AKR1*欠損酵母および*WHI2AKR1*欠損酵母のメチル水銀感受性をFigure 4-2と同様の方法で検討した。



**Figure 13. AKR1欠損がCdc34高発現による酵母のメチル水銀耐性獲得現象に与える影響**

A...Cdc34を高発現させた正常酵母およびAKR1欠損酵母について、Figure 4-1と同様の方法でメチル水銀感受性を検討した。

B...Cdc34を高発現させた正常酵母およびAKR1欠損酵母について、Figure 4-2と同様の方法でメチル水銀感受性を検討した。



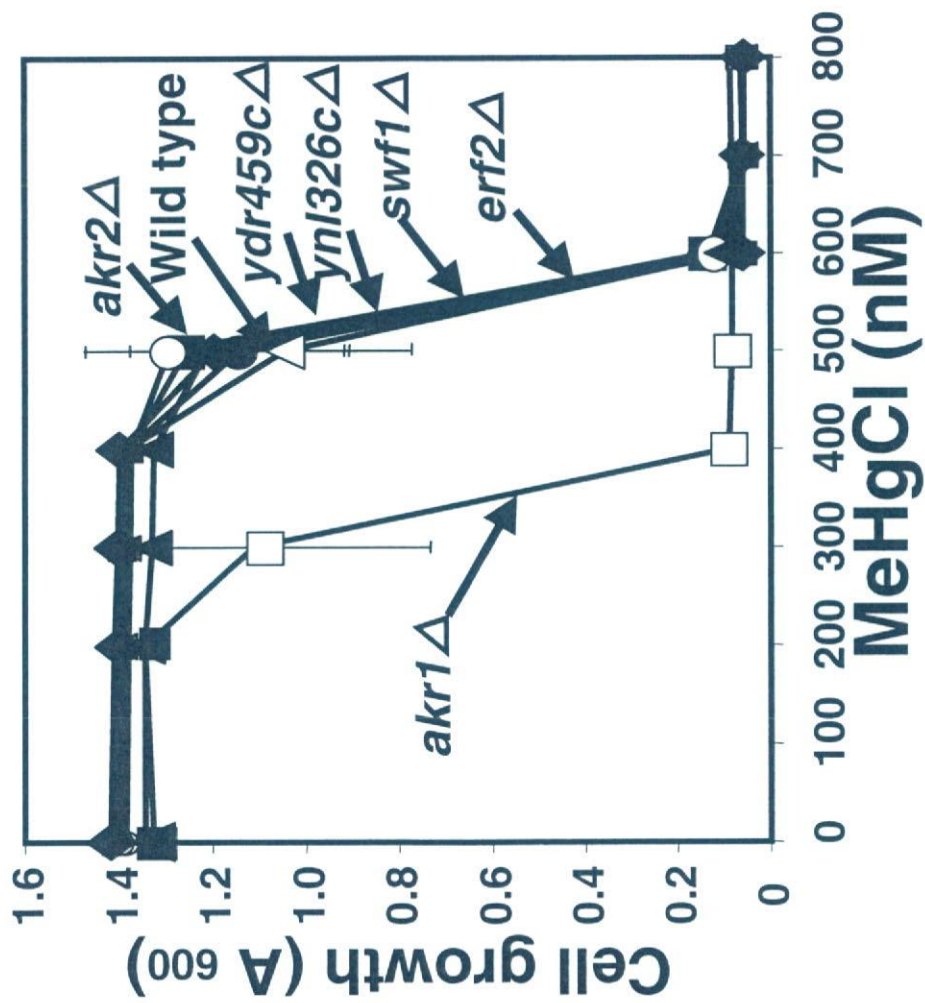
**Figure 14.** Akr1のパルミトイルトランスフェラーゼ活性がメチル水銀感受性に与える影響

A・・・AKR1およびAKR1 mutantの模式図。

B・・・正常なAkr1およびAkr1 mutantの発現を抗FLAG抗体を用いたWestern blottingで確認した。

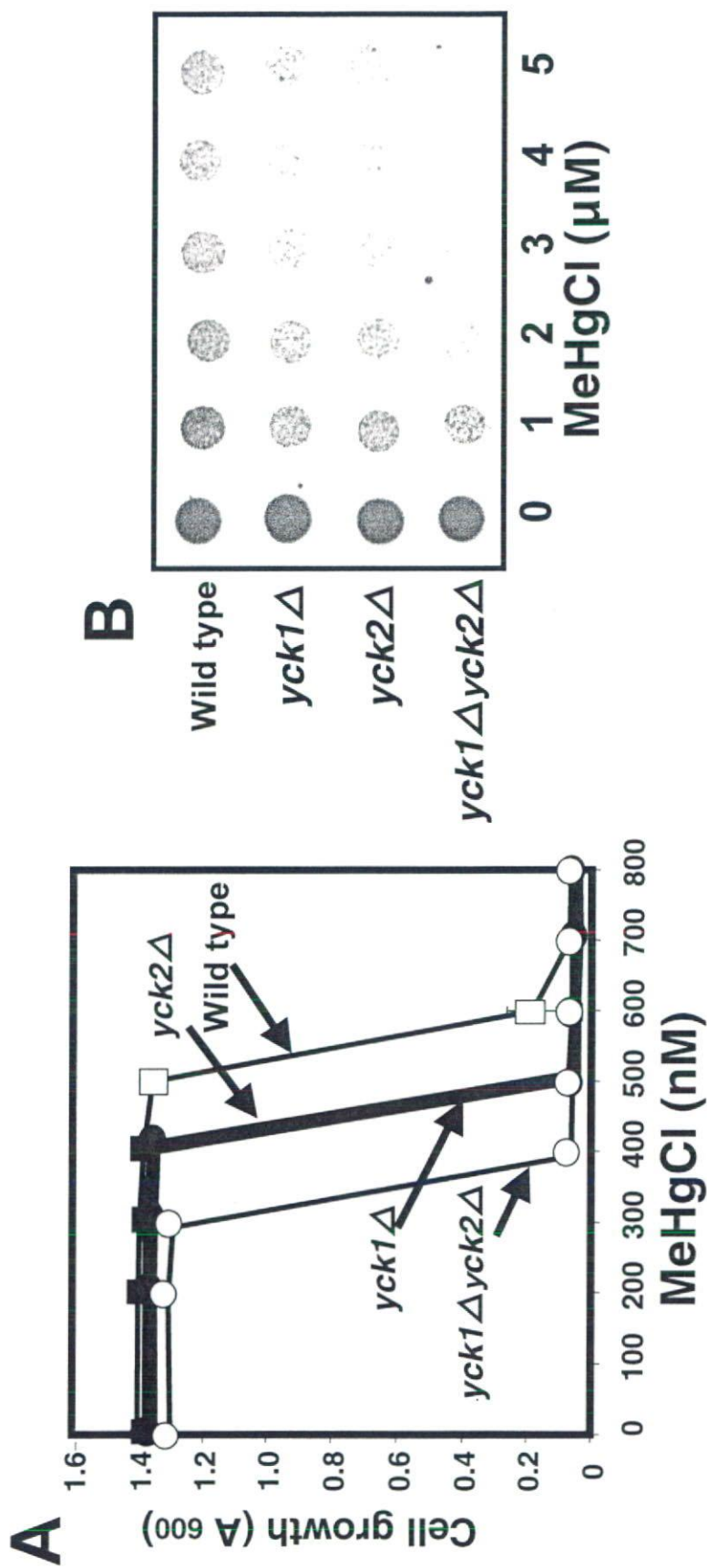
C・・・正常なAkr1またはAkr1 mutantを高発現させた正常酵母およびAKR1欠損酵母について、Figure 4-1と同様の方法でメチル水銀感受性を検討した。

D・・・正常なAkr1またはAkr1 mutantを高発現させた正常酵母およびAKR1欠損酵母について、Figure 4-2と同様の方法でメチル水銀感受性を検討した。



**Figure 15. Akr1以外のパルミトイルトランスフェラーゼとメチル水銀毒性の関係**

Akr1以外のパルミトイルトランスフェラーゼ活性を持つ蛋白質を欠損した酵母のメチル水銀感受性をFigure 4-1と同様の方法で検討した。



**Figure 16. *YCK1*および $YCK2$ 遺伝子の欠損が酵母のメチル水銀感受性に与える影響**

A... *YCK1*欠損酵母、*YCK2*欠損酵母および $YCK1YCK2$ 欠損酵母のメチル水銀感受性をFigure 4-1と同様の方法で検討した。

B... *YCK1*欠損酵母および $YCK1YCK2$ 欠損酵母のメチル水銀感受性をFigure 4-2と同様の方法でメチル水銀感受性を検討した。

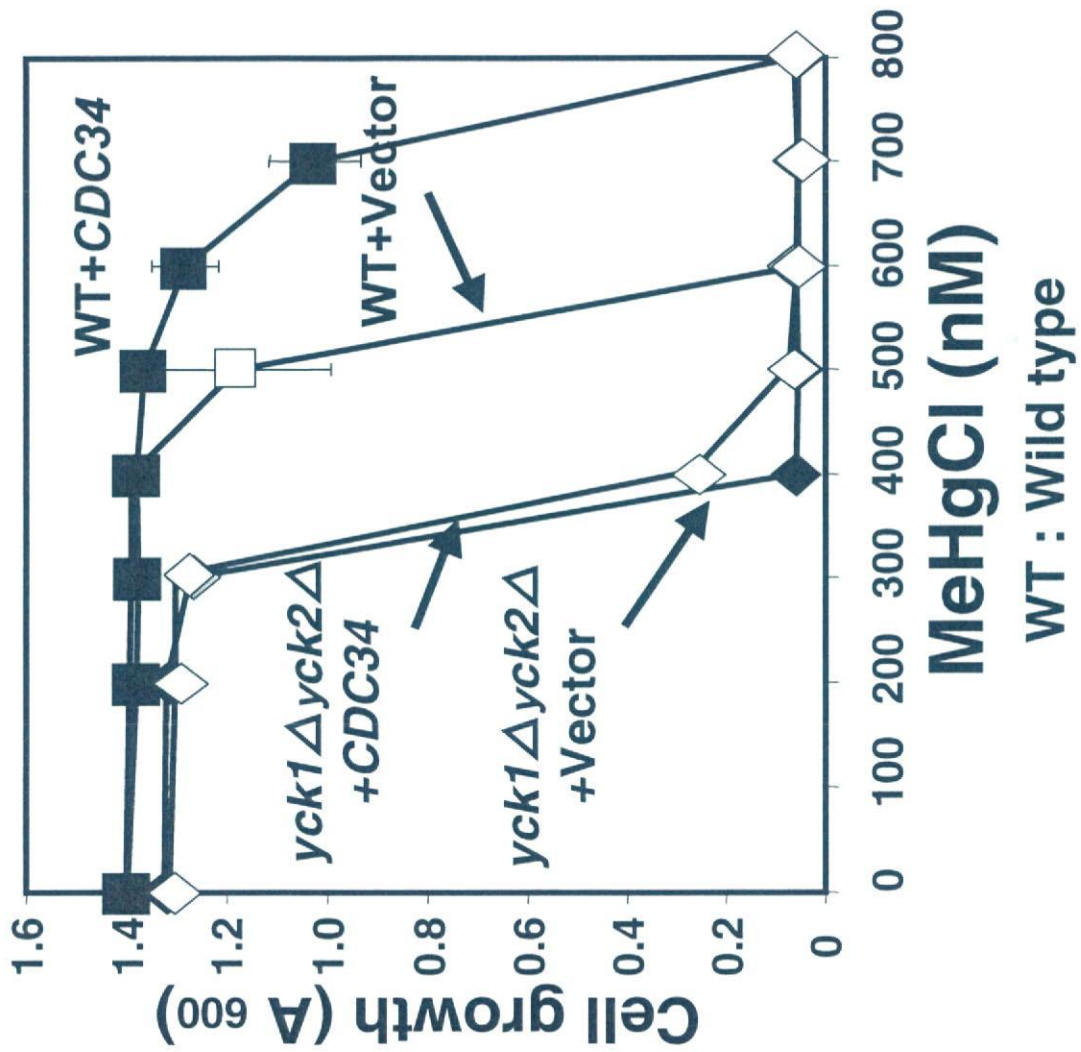


Figure 17. *YCK1/YCK2*二重欠損酵母におけるCdc34高発現がメチル水銀感受性に与える影響  
 Cdc34を高発現させた正常酵母およびYCK1YCK2欠損酵母について、Figure 4-1と同様の方法でメチル水銀感受性を検討した。

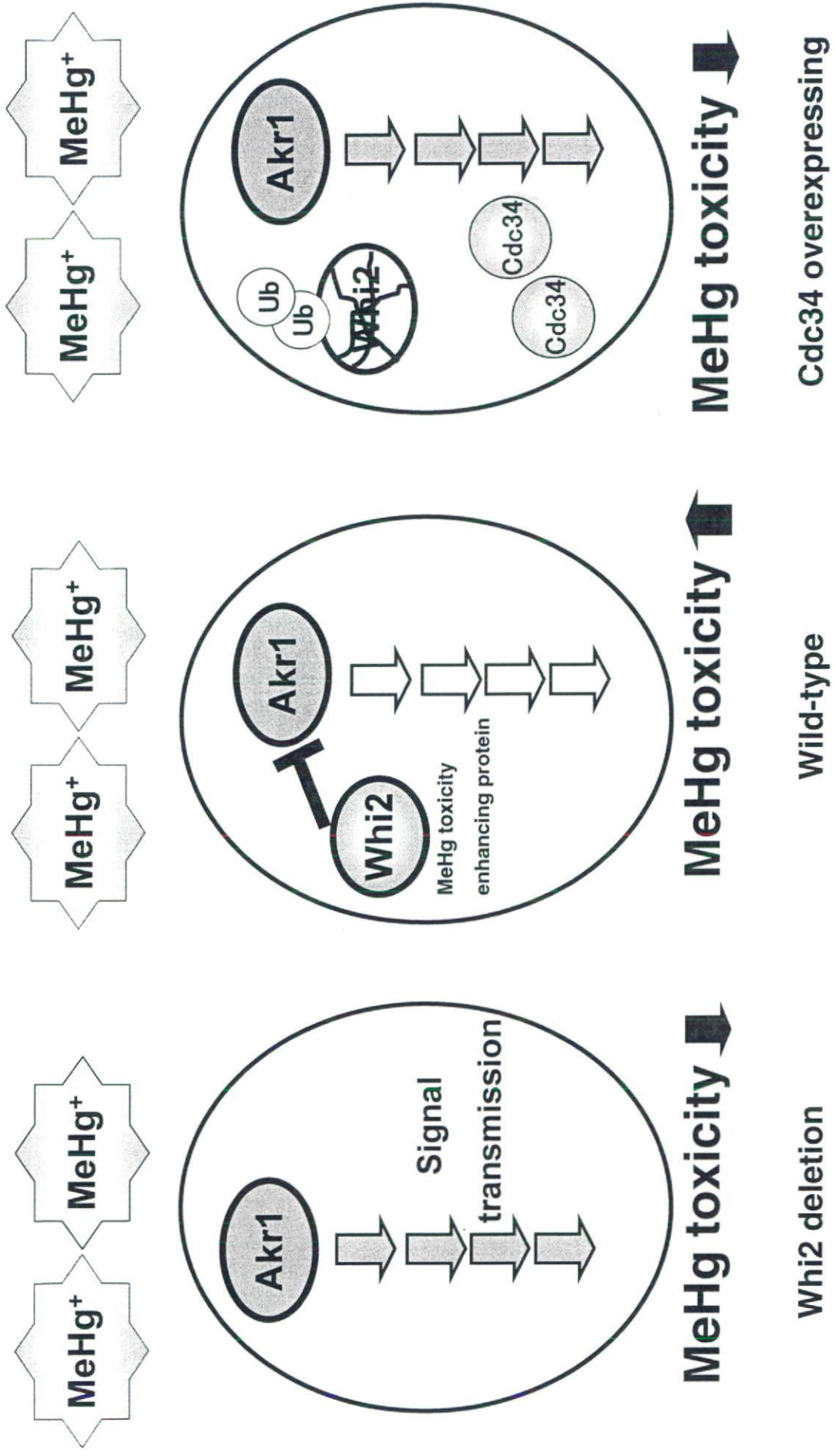


Figure 18. Whi2によるメチル水銀毒性増強機構のモデルおよび Cdc34高発現によるメチル水銀毒性軽減機構のモデル



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

細胞内蛋白質輸送システムによるメチル水銀毒性増強機構

分担研究者 黄 基旭 東北大学大学院薬学研究科助教

液胞への蛋白質輸送に関わることが知られている各因子とメチル水銀毒性との関係を検討した。その結果、ゴルジ体からエンドソームへの蛋白質輸送、エンドソーム内への蛋白質の取り込みおよびエンドソームと液胞との融合に関与する蛋白質群をそれぞれ欠損させた酵母が野性酵母よりも強いメチル水銀耐性を示した。ゴルジ体からエンドソームへの輸送に関与する蛋白質（Vps45）およびエンドソーム内への蛋白質の取り込みに関与する蛋白質（Vps27）をそれぞれ単独で欠損させた酵母が示すメチル水銀耐性の程度が両者を同時に欠損させた酵母とほぼ同じであったことから、ゴルジ体から液胞への一連の蛋白質輸送経路がメチル水銀毒性増強に深く関与している可能性が考えられる。エンドソーム内に取り込まれる蛋白質はまず、細胞質中でモノユビキチン化（一つのユビキチンと結合）され、これがシグナルとなってエンドソーム膜上に存在するVps27-Hse1複合体により認識される。そこで、Vps27の構造中に存在する各機能ドメインを欠失させた変異Vps27を細胞内に発現させて検討したところ、Vps27によるメチル水銀毒性増強作用には、Vps27が有するエンドソーム膜との結合能、エンドソーム内へ取り込まれる蛋白質の認識能、そしてユビキチンとの結合能、がそれぞれ必要であることが示唆された。以上のことから、何らかの蛋白質（X-蛋白質）がエンドソーム上のVps27-Hse1複合体によって認識された後にエンドソーム内へ取り込まれるという現象がメチル水銀毒性増強に関わっていると考えられる。

X-蛋白質を同定するために、Vps27またはHse1と結合することが報告されている蛋白質の中からメチル水銀毒性を増強する蛋白質を検索したところ、Ynr005c（機能未知）およびUbi4（ubiquitin polyprotein）が見出された。特に、Ynr005cは細胞内でユビキチン化を受けることが確認されたことから、エンドソーム内へ取り込まれることによってメチル水銀毒性を増強させる蛋白質である可能性がある。一方、エンドソーム内への蛋白質の取り込みには蛋白質の

モノユビキチン化がシグナルとして働くため、ユビキチンの前駆体である Ubi4 はエンドソーム内へ取り込まれる蛋白質というわけではなく、ユビキチンの供給源として機能している可能性が考えられる。UBI4 の発現は通常状態においては非常に低く、heat shock などのストレスによって誘導されて様々なストレスに対して防御的に働くことが知られている。本研究においても、メチル水銀によって UBI4 の発現が誘導されることが確認されたが、Ubi4 はメチル水銀毒性を増強させる蛋白質であることから、少なくともメチル水銀毒性に対しては、防御的に作用するというこれまでの報告とは逆の作用を示すことになる。メチル水銀はこの UBI4 の発現を誘導することによって、X-蛋白質のモノユビキチン化を介したエンドソーム内への取り込みを亢進し、その結果としてメチル水銀の細胞毒性が引き起こされている可能性も考えられる。

#### A. 研究目的

我々は、欠損によって酵母のメチル水銀感受性に影響を与える遺伝子の検索を行い、合計 50 種を同定することに成功した。この中には、酵母細胞内における液胞への蛋白質輸送に関わる因子をコードする多くの遺伝子 (SNF8、VPS4、VPS27、VPS28、VPS45、VPS68、VTA1) が含まれていた。そこで、液胞への蛋白質輸送に関わるものが知られている各因子とメチル水銀毒性との関係を検討した。

#### B. 実験方法

##### 1. 酵母発現 plasmid の作製

3×HA-tag 融合 Vps27 を酵母で発現させるための発現 plasmid は、当研究室において既に作製されている 2 つの HA-tag を融合させた low copy vector である pRS316 に cloning した。

pRS316 を制限酵素 Sma I /Sal I により切り出し、そこに PCR によって増幅した HA-Vps27 の ORF を挿入する方法で作製した。PCR は酵母 chromosomal DNA を template とし、以下に示す primer と反応条件を用いて行った。反応後、PCR 産物をアガロース電気泳動後、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 断片と予め Sal I /Sma I で切断後精製しておいた pRS316 を DNA ligation kit ver. 2 を用いて連結し、大腸菌 (XL1-blue) に導入した。Competent cell 溶液 50  $\mu$ L にプラスミド溶液を加え、氷上に 30 min 静置した後、42°C で 45 sec の熱ショックをかけ、さらに氷上に 2 min 静置した後、ampicillin sodium salt 100  $\mu$ g/mL を含む LB 寒天培地に塗布し、

37°Cで一晩培養した。形成されたコロニーを ampicillin sodium salt 100  $\mu$ g/mL を含む LB 培地 2 mL で一晩振盪培養した後、GenElute™ Plasmid Miniprep Kit (Sigma) を用いて大腸菌より plasmid を回収した。塩基配列は sequence により確認した。発現は酵母株に導入後、抗 HA 抗体を用いた Western blotting で確認した。

## 2. Vps27 の様々なドメインを欠質させた truncation mutants の発現 plasmid の作製

Vps27 の VHS ドメイン、FYVE ドメイン、UIM ドメインをそれぞれ欠失した truncation mutants は template として 3 $\times$ HA-Vps27/pRS316 を用い、PCR を行い作製した。PCR によって増幅した後、制限酵素 Nhe I または Xho I で処理した DNA 断片を連結することでそれぞれのドメインに相当する領域 (VHS d ドメインは 1-145 amino acids、FYVE ドメインは 168-231 amino acids、UIM-1 ドメインは 257-274 amino acids、UIM-2 ドメインは 300-317 amino acids) を欠失させた。塩基配列は sequence により確認した。発現は酵母株に導入後、抗 HA 抗体を用いた Western blotting で確認した。

## 3. 酵母からの chromosomal DNA の抽出

酵母からの chromosomal DNA の抽出は glass-beads 法 (Hoffman et al., 1993) によって行った。まず、single colony を SD 培地 2 mL に植菌し、30°C で一晩振盪培養した後、集菌して breaking buffer (92% Triton X-100、1% SDS、100 mM NaCl、10 mM Tris-HCl (pH8.0)、1 mM EDTA (pH8.0)) 200  $\mu$ L に懸濁した。これに phenol/chloroform/isoamylalcohol (25:24:1) 200  $\mu$ L および glass-beads 0.5 g を加え 3 min 激しく攪拌した後、12,000 $\times$ g で 5 min 遠心して水層の plasmid 溶液を ethanol 沈殿し、滅菌蒸留水を加えて 300  $\mu$ L とした。

## 4. VPS27 欠損酵母または VPS45 欠損酵母への HIS5 fragment の導入

まず分裂酵母 (*Saccharomyces pombe*) 由来の HIS5 遺伝子を持つ plasmid pUG27 を template とし、分裂酵母 (*Saccharomyces pombe*) 由来の HIS5 遺伝子を PCR により cloning した。

酵母の形質転換は酢酸リチウム法により行った。まず、VPS27 欠損酵母または VPS45 欠損酵母を完全培地である YPD 培地 2 mL に植菌し 30°C で一晩振盪培養した後、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、 $30^\circ\text{C}$  で 15 min incubate した。この懸濁液 50  $\mu\text{L}$  に該当遺伝子を組み込んだ発現 vector 1  $\mu\text{g}$ 、加熱変性サケ精子 DNA 50  $\mu\text{g}$  および 40% polyethylene-glycol (4000) 300  $\mu\text{L}$  を加え、 $30^\circ\text{C}$  で 30 min incubate した。その後、 $42^\circ\text{C}$  で 15 min の熱ショックをかけた後に集菌し、100  $\mu\text{L}$  の滅菌水で懸濁して SD 寒天培地に塗布し、 $30^\circ\text{C}$  で 2 日間培養した。遺伝子欠損株ライブラリーの酵母は標的遺伝子が kanamycin 耐性遺伝子に置換されている。分裂酵母 (*Saccharomyces pombe*) 由来の *HIS5* 遺伝子を持つ plasmid pUG27 のプロモーターおよびターミネーターの塩基配列と、遺伝子欠損株の kanamycin 耐性遺伝子のプロモーターおよびターミネーターの塩基配列が同じであるため、これら二つの遺伝子は相同組み換えを起こしやすい。したがって、*HIS5* fragment が導入された酵母 (形質転換体) のみが histidine を含まない培地中でも生育可能となる。*HIS5* fragment の導入の確認は、

酵母から glass-beads 法によって chromosomal DNA を抽出し、PCR により行った。

#### 5. *VPS27*・*HSE1* 二重欠損酵母または *VPS27*・*VPS45* 二重欠損酵母の作製

*VPS27* への *HIS5* fragment 導入の確認 primer を用いて行った PCR 産物については *HSE1* 欠損酵母に、*VPS45* への *HIS5* fragment 導入の確認 primer を用いて行った PCR 産物については *VPS27* 欠損酵母にそれぞれ酢酸リチウム法により導入した。この PCR 産物は histidine 合成酵素をコードする遺伝子 (*HIS5*) を含み、その両端部に標的遺伝子部位での組換えに必要な *VPS27* 遺伝子もしくは *VPS45* 遺伝子との相同配列を持っている。そのため、導入された酵母 (形質転換体) のみが histidine を含まない培地中でも生育可能となる。これによって得られた colony を、*VPS27*・*HSE1* 二重欠損酵母もしくは *VPS27*・*VPS45* 二重欠損酵母の候補 clone とし、chromosomal DNA を抽出し、PCR により *VPS27* 遺伝子もしくは *VPS45* 遺伝子欠損の有無を確認した。

#### 6. 寒天培地での耐性試験

野生酵母またはそれぞれの遺伝子欠