

損酵母の single colony を SD 培地 2 mL に植菌し 30°C で一晩振盪培養した後、 $1 \times 10^6$  cells を SD 培地 900  $\mu$ L に植菌した後、滅菌水または 10  $\mu$ M の塩化メチル水銀を final : 0, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7  $\mu$ M となるように加えた。30°C で 3hr 静置培養した後、集菌し、900  $\mu$ L の滅菌水で洗浄後、100  $\mu$ L の滅菌水で懸濁し、SD 寒天培地に 5  $\mu$ L スポットティングした (final :  $5 \times 10^4$  cells/spot となる)。気相インキュベーターを用いて 30°C で培養後、観察した。

#### 7. 酵母からの総蛋白質抽出

空 vector のみを導入した酵母、もしくは何らかの蛋白質をコードする遺伝子を組み込んだ vector を導入した酵母の single colony を 2 mL の SD 培地に植菌し一晩振盪培養後、50 mL の SD 培地に再び集菌、30°C で OD が約 0.6 ~ 0.8 になるまで (約半日) 振盪培養した。集菌し、滅菌水にて 2 回洗浄後、10% TCA 1 mL を加え氷上に 30 min 放置した。TE で中性になるまで洗浄後、葉さじ約 2 杯分のガラスビーズと 450  $\mu$ L の TE を加えた。5 min, 4000 rpm で酵母を破碎後、懸濁液 150  $\mu$ L を別の tube に移し、50  $\mu$ L の lysis buffer (4% SDS, 180 mM Na-HEPES ; pH7.5) を

加え、100°C, 5 min 加熱した。その後、13,000  $\times$ g, 5min で遠心し、上澄 100  $\mu$ L を 1.5 mL tube に移して、900  $\mu$ L Triton lysis buffer (0.2% TritonX-100, 150 mM NaCl, 50 mM Na-HEPES ; pH7.5, 5 mM EDTA, 10 mM NEM) を加え cell lysate とした。

#### 8. Immunoblotting

12.5% のポリアクリルアミドゲルを用いて 30 mA/枚で電気泳動を行った。Transfer 後の membrane を blocking solution に浸して約 6 hr, blocking した後に 1 次抗体液 (任意の希釈) に浸し、約半日間振盪した。TTBS で 2 回、TBS で 1 回、それぞれ 15 min 振盪して wash した後に HRP 標識化 2 次抗体液 (5000 倍希釈) に浸し、1 hr 振盪した。TTBS で 2 回、TBS で 1 回、それぞれ 15 min 振盪して wash した後に ECL reagent を用いて化学発光させ、Versa Doc Model 5000 (Bio-rad) により検出した。

#### 9. VPS27 欠損酵母への HIS5 fragment の導入

分裂酵母 (*Saccharomyces pombe*) 由来の HIS5 遺伝子を持つ plasmid pUG27 を template とし、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。*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。

#### 1 0. *VPS27*・*YNR005C* 二重欠損酵母、 *VPS27*・*UBI4* 二重欠損酵母の作製

得られた PCR 産物を、酢酸リチウム法により *YNR005C* 欠損酵母または *UBI4* 欠損酵母に導入した。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 *YNR005c* 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에서도生育可能となる。これによって得られた colony を *VPS27*・*YNR005C* 二重欠損酵母または *VPS27*・*UBI4* 二重欠損株の候補 clone とし、chromosomal DNA を抽出し、PCR により *VPS27* 遺伝子欠損の有無を確認した。

#### 1 1. Northern blotting

*UBI4* を認識する probe を作製のために *BcaBEST*<sup>TM</sup> Labeling kit (Takara) を使用した。まず PCR によって増幅した *UBI4* の ORF を制限酵素 *Bgl* II により切断した後、913 bp のバンドを Gene Clean II Kit を用いてゲル抽出した。

これを鋳型 DNA として 10  $\mu$ L 加え、random primer 2  $\mu$ L、滅菌水 3  $\mu$ L を混合し、95°C で 3 min 加熱することでアニーリングした後、氷中で急冷し 5 min 放置した。次に 10 $\times$ buffer、DIG DNA labeling mixture を各々 2  $\mu$ L、*BcaBEST* DNA polymerase を 1  $\mu$ L 加えて、52°C で 30 min 保温した。その後 stop solution を 2  $\mu$ L 加え、反応を停止させた。PCR は酵母 chromosomal DNA を template として行った。

メチル水銀処理した酵母からの RNA 抽出は hot phenol 法で行った。酵母株を SD 培地 10 mL に植菌し 30°C で一晚振盪培養した後、この培養液を SD 培地 50 mL に 5 $\times$ 10<sup>6</sup> cells/mL となるように再び植菌し、30°C で 3 hr 培養した。その後、final 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0  $\mu$ M となるように塩化メチル水銀を添加し、さらに 30°C で 90 min 培養した。Wash 後、TES solution と酸性 phenol を 400  $\mu$ L ずつ加え、10 min 毎に攪拌をしながら計 60 min、65°C で加熱した。冷却後、遠心分離にて水層と油層に分離させ、水層を別のチューブに移した後に更に 400  $\mu$ L の酸性 phenol を加え攪拌した。遠心分離後、別チューブに移した水層に ethanol を加え RNA を沈殿させた。上清を捨て、沈殿物を 70% ethanol で

wash 後、ethanol を極力除いた後に適量の滅菌水を加え、RNA 溶液とした。

### 1 2. Yeast two-hybrid 法

Yeast two-hybrid 法用 vector である pAS1-CYH2 に *VPS27* を cloning した vector と、酵母 cDNA library が cloning されている pACT2 vector を、酢酸リチウム法により酵母 AH109 株に導入し、histidine を含まない SD 寒天培地で培養した。ここで用いた AH109 株は *GAL4* 上流の活性化配列に制御されているレポーター遺伝子 *HIS3* を持っているため、陽性 clone は histidine を含まない SD 寒天培地で生育可能である。ここで得られた colony を 2 ml の SD 培地に植菌し一晩振盪培養した後、この培養液を再度、histidine を含まない SD 寒天培地に塗布し、培養した。ここで生育した酵母について、plasmid を単離し、再度酵母に導入して、得られた colony を 2 ml の SD 培地に植菌し一晩振盪培養した後、この培養液を再度、histidine を含まない SD 寒天培地に塗布し、培養した。ここで生育した clone について、その pACT2 の insert を sequence により確認し、その遺伝子を決定した。

### 1 3. 免疫沈降

空 vector pKT10 と pRS425 を導入した株、もしくは HA-Ynr005c をコードする遺伝子を組み込んだ pKT10 と Myc-ユビキチンをコードする遺伝子を組み込んだ pRS425 を導入した株をそれぞれ SD 培地 2 mL に植菌し 30°C で一晩振盪培養した後、200 mL マイヤーに入れた 50 mL の SD 培地に再び植菌し、30°C で OD が約 0.6~0.8 になるまで（約半日）振盪培養した。集菌し、滅菌水にて 2 回洗浄後、10% TCA 1 mL を加え氷上に 30 min 放置した。TE で中性になるまで洗浄後、葉さじ約 2 杯分のグラスビーズと 450  $\mu$ L の TE を加えた。5 min, 4000 rpm で酵母を破碎後、懸濁液 150  $\mu$ L を別の tube に移し、50  $\mu$ L の lysis buffer (4% SDS、180 mM Na-HEPES; pH7.5) を加え、100°C、5 min 加熱した。その後、13,000  $\times$ g、5 min で遠心し、上澄 100  $\mu$ L を 1.5 mL tube に移して、900  $\mu$ L Triton lysis buffer (0.2% TritonX-100、150 mM NaCl、50 mM Na-HEPES : pH7.5、5 mM EDTA、10 mM NEM) を加え cell lysate とした。DC protein assay kit を用いて総蛋白質量を定量後、2 mg/mL となるように TBS で希釈した。30  $\mu$ L 分の予め TBS で 3 回洗浄した anti-HA affinity matrix (Roche) を加え、4°C、3 hr incubate した。incubate 後、5 回 TBS で wash

後、beads を含めて全量が 70  $\mu$ L となるように TBS、2  $\times$  sample buffer を加えた (beads : 20  $\mu$ L、TBS : 25  $\mu$ L、2  $\times$  sample buffer : 25  $\mu$ L)。100°C で 3 min boil し、SDS-PAGE 用 sample とした。このうち、1 well に対して 20  $\mu$ L を用いた。

### C. 結果

#### 1. メチル水銀毒性と酵母の細胞内蛋白質輸送システムとの関係

##### 1-1. 液胞への蛋白質輸送経路に関わる因子群がメチル水銀毒性に与える影響

Figure 1 に示した液胞への蛋白質輸送経路の中でメチル水銀毒性の増強に関与する経路を特定するために、これら経路に関与する蛋白質をそれぞれ欠損させた酵母のメチル水銀感受性を野生株と比較した。その結果、①小胞体からゴルジ体への輸送経路 (Emp24, Emp47)、②ゴルジ体から液胞への輸送経路 (Apl5, Apl6)、⑤エンドサイトーシス (End3, Ent1, Ent2, Ent4) に関わる蛋白質をそれぞれ欠損させた酵母のメチル水銀感受性は野生酵母と同程度であった (Figure 2-1)。一方、③ゴルジ体からエンドソームへの輸送 (Figure 2-2 ; Vps45, Pep12, Vps68)、④エンドソーム内への蛋白質の取り込み (Figure 2-2, 3-1,

5-2 ; Vps27, Hse1, Stp22, Srn2, Vps28, Vps36, Vps25, Snf8, Did4, Vps20, Vps24, Snf7, Doa4) および⑥エンドソームと液胞の融合 (Figure 4 ; Vam3, Vam7, Ypt7) に関与する各蛋白質の欠損酵母はメチル水銀に対して耐性を示した。以上の結果から、酵母細胞内の液胞への蛋白質輸送経路の中で、③ゴルジ体からエンドソームへの輸送、④エンドソーム内への蛋白質の取り込み (エンドサイトーシスによる蛋白質取り込みは除く)、⑥エンドソームと液胞の融合がメチル水銀毒性増強に関与していると考えられる。

一方、③ゴルジ体からエンドソームへの輸送、④エンドソーム内への蛋白質取り込み、および⑥エンドソームと液胞の融合はそれぞれ異なる機構でメチル水銀毒性を増強している可能性も否定できない。そこでまず、ゴルジ体からエンドソームへの輸送に関わる因子 (Vps45) とエンドソーム内への蛋白質の取り込みに関与する因子 (Vps27) の二重欠損酵母を作製し、メチル水銀に対する感受性を検討した。その結果、VPS27 単独欠損酵母または VPS45 単独欠損酵母は野生酵母と比較して同程度の強いメチル水銀耐性を示したが、VPS27 と VPS45 の両方を同時に欠損させても耐性度の上昇は認められず、それぞれの単独欠損酵母と同程度の耐性を示した (Figure 5)。

次に、エンドソーム内への蛋白質の取り込みに関与する因子とエンドソームと液胞の融合に関与する因子の二重欠損酵母 (*vps27Δvam3Δ* および *vps27Δvam7Δ*) のメチル水銀に対する感受性を検討した。その結果、*VAM3* または *VAM7* 単独欠損酵母は *VPS27* 単独欠損酵母に比べてメチル水銀に対する耐性度は劣るものの、*VPS27* と *VAM3* または *VPS27* と *VAM7* の両方を同時に欠損させた酵母は *VPS27* 単独欠損酵母と比較して耐性度の上昇は認められず、同程度のメチル水銀耐性を示した (Figure 6)。これらの結果は、ゴルジ体からエンドソームへの輸送、エンドソーム内への蛋白質取り込みおよびエンドソームと液胞の融合のシステムが同一経路上でメチル水銀毒性増強に関与していることを示唆しており、ある種の蛋白質がゴルジ体からエンドソームを介して液胞に運ばれることによってメチル水銀の毒性が増強される可能性が考えられる。

#### 1-2. メチル水銀毒性増強における *Vps27* の役割

エンドソーム内への蛋白質の取り込みには、エンドソーム膜上に存在する *Vps27*-Hse1 複合体およびその下流因子である ESCRT 複合体が関与しており、この蛋白質取り込み機構は

multivesicular (MVB) sorting pathway と呼ばれている (Figure 7)。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。その後、ESCRT-I 複合体 (*Vps28*, *Srn2*, *Stp22*)、ESCRT-II 複合体 (*Vps25*, *Vps36*, *Snf8*)、ESCRT-III 複合体 (*Did4*, *Vps20*, *Vps24*, *Snf7*) がエンドソーム膜上にリクルートされ、それらの複合体へ順にモノユビキチン化蛋白質が受け渡されていく。そして最終的に、脱ユビキチン化酵素 *Doa4* によりユビキチンが外された蛋白質は、エンドソーム内へ取り込まれ (Figure 2)、エンドソーム膜上へリクルートされた ESCRT 複合体は *Vps4* の働きにより細胞質へと解離する。本研究においては、Figure 3-1 および 5-2 に既に示したように、この経路に関与する因子は、どれを欠損させても酵母がメチル水銀耐性を示した。しかし、それらの中でこの経路の最初の段階で機能する *Vps27* を欠損させた酵母は特に強いメチル水銀耐性したことから、*Vps27* がメチル水銀毒性発現に深く寄与している可能性が考えられる。そこで、*Vps27* に着目し、メチル水銀毒性増強との関わりについて更に詳細に検討を行った。

まず Vps27 と Hse1 が複合体を形成して機能することから、両者を共に欠損した *VPS27*・*HSE1* 二重欠損酵母を作製してそのメチル水銀感受性を調べた。*VPS27* または *HSE1* をそれぞれ単独で単独欠損させた酵母は共に野生酵母に比べてメチル水銀耐性を示したが、その耐性度は *HSE1* 単独欠損酵母の方が *VPS27* 単独欠損酵母よりも低かった (Figure 8)。しかし、*VPS27*・*HSE1* 二重欠損酵母は *VPS27* 単独欠損酵母と同程度のメチル水銀耐性を示した (Figure 8)。このことから、Vps27 と Hse1 の機能または活性は異なり、*HSE1* 欠損によるメチル水銀毒性耐性獲得には Vps27 の存在が必要であると考えられる。Hse1 は、Vps27 中の 416-418 番目のアミノ酸配列を介して Vps27 と直接結合することから、Hse1 は Vps27 と結合することによって、Vps27 の活性を高める役割を果たしているのかもしれない。

Vps27 の構造中に存在する機能ドメインには、N 末端側から基質認識部位の一つである VHS ドメイン (1-145 amino acids)、エンドソーム膜上に結合するために必要な FYVE ドメイン (168-231 amino acids) およびユビキチン蛋白質と結合する二つの UIM ドメイン (257-274 amino acids、300-317 amino acids) がある (Figure 9)。そこで、これらのドメインとメチル水銀

毒性増強との関わりを調べるために、これらのドメインをそれぞれ欠失させた変異体を作製し (Figure 9)、メチル水銀に対する感受性を調べた。*VPS27* 欠損酵母は野生酵母に比べて強いメチル水銀耐性を示すが、そこに野生型の Vps27 を導入することによってメチル水銀耐性は認められなくなった。しかし、FYVE ドメインを欠失させた変異 Vps27 を導入してもメチル水銀耐性はほとんど消失しなかった。一方、VHS ドメインを欠失させた変異 Vps27 を導入した *VPS27* 欠損酵母は、野生酵母に比べて耐性を示したものの、その耐性度は *VPS27* 欠損酵母よりも低かった (Figure 10A)。これらのことより、Vps27 がエンドソーム膜上で機能することがメチル水銀毒性増強には必要であり、Vps27 の基質認識部位の一つである VHS ドメインがメチル水銀毒性増強に一部関与していると考えられる。一方 UIM ドメインに関しては、UIM1 と UIM2 のうちどちらか一つのドメインを欠失させた変異 Vps27 を導入した *VPS27* 欠損酵母は、野生酵母と同程度の感受性を示した (Figure 10B)。したがって、Vps27 によるメチル水銀毒性の増強には、二つの UIM ドメインのうちどちらか一方が存在すれば良いと考えられる。しかし、両方の UIM を同時に欠失させた変異 Vps27 を導入した *VPS27* 欠損酵母は、野生酵母に比べ

てメチル水銀耐性を示したものの、その耐性度は *VPS27* 欠損酵母よりもかなり低かった (Figure 10B)。Vps27 の mammalian homologue である Hrs が VHS ドメインを介してユビキチンと結合する (Mizuno et al., 2003) ことや、Vps27 と複合体を形成する Hse1 の構造中にも UIM ドメインが存在することから、Vps27 の構造中の両 UIM ドメインが欠損しても、Vps27 の構造中の VHS ドメインや Hse1 の構造中の UIM ドメインがその役割を補っている可能性も考えられる。

## 2. Vps27-Hse1 複合体により認識されるメチル水銀毒性増強蛋白質の検索

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の発現に関わっている可能性が示唆された。エンドソーム内へ蛋白質が取り込まれる際には、その蛋白質が Vps27-Hse1 複合体中のどちらかと結合すると予想される。そこで、X-蛋白質を同定するために、データベース (*Saccharomyces* Genome Database または Proteome Bioknowledge Library) で、両蛋白質と結合することが報告されている蛋白質を調べるとともに、yeast

two-hybrid 法を用いて Vps27 と結合する新たな蛋白質をスクリーニングし、それらの蛋白質の中からメチル水銀毒性に関わる蛋白質を検索した。

### 2-1. Vps27 または Hse1 と結合する蛋白質の欠損がメチル水銀感受性に与える影響

これまでに報告されている Vps27 または Hse1 との結合蛋白質の中から、欠損により酵母にメチル水銀耐性を与える蛋白質を検索したところ、Hse1 と結合する Ynr005c (機能未知) と、Vps27 と結合する Ubi4 (ubiquitin polyprotein; ユビキチン前駆体) をそれぞれ欠損した酵母が野生酵母に比べて高いメチル水銀耐性を示した (Figure 11)。

Vps27 によるメチル水銀毒性増強と Ynr005c または Ubi4 の関係を調べるために、*YNR005C*・*VPS27* 二重欠損酵母または *UBI4*・*VPS27* 二重欠損酵母を作製したところ、どちらの二重欠損酵母も *VPS27* 単独欠損酵母と同程度のメチル水銀耐性を示した (Figure 12)。このことより、Ynr005c および Ubi4 はそれぞれ Vps27 と同一経路上で作用することによってメチル水銀毒性を増強すると考えられる。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高い。一方、Ynr005c はエンドソーム内に取り込まれることによって、メチル水銀毒性を増強する蛋白質である可能性が考えられる。この Ynr005c がエンドソーム内へ取り込まれる蛋白質であるならば、細胞内でユビキチン化を受けるはずである。そこで、HA-tag を融合させた Ynr005c と Myc-tag を融合させたユビキチンを高発現する酵母を作製して、そ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、または抗 HA 抗体を用いた Western blotting により Ynr005c のユビキチン化を検出した。その結果、抗 Myc 抗体によって高分子量側にスメア状のバンドが検出され (Figure 13)、Ynr005c が細胞内でユビキチン化を受けることが確認された。エンドソーム内への取り込みシグナルは蛋白質のモノユビキチン化であることが知られているが、Figure 13 で認められたユビキチン化 Ynr005c は様々な分子量のスメアバンドを示したことから、Ynr005c は細胞内でポリユビキチン化されると考えられる。しかし、ユビキチンはリジン残基と結合するが、Ynr005c の構造中にはリジン残基が複数存在することから、これら

リジン残基の中に特異的にモノユビキチンされるものとポリユビキチン化されるものが含まれている可能性も否定できない。一方、蛋白質と結合したユビキチンは、その蛋白質が MVB sorting pathway を経てエンドソーム内へ取り込まれる直前に、脱ユビキチン化酵素 Doa4 により外されることが報告されている。そこで、*DOA4* 欠損酵母における Ynr005c のユビキチン化を検討したところ、野性酵母に比べてそのユビキチン化量は顕著に増大した (Figure 13)。これらのことより、Ynr005c はユビキチン化を受けた後に、エンドソーム内へ取り込まれる蛋白質であると思われる。

一方、*UBI4* はその発現は通常状態においては非常に低く、heat shock や DNA 障害などのストレスによってその発現量が増加することが知られている。そこで、メチル水銀の添加が細胞内の *UBI4* の発現に与える影響を検討したところ、メチル水銀による濃度依存的な *UBI4* mRNA レベルの増加が認められた (Figure 14)。メチル水銀は *UBI4* の発現を誘導することによって、エンドソーム内への X-蛋白質の取り込みを亢進し、その結果として細胞毒性が引き起こされている可能性も考えられる。

2-2. Vps27 と結合する蛋白質の yeast



## two-hybrid 法による検索

Vps27 が認識する蛋白質を新たに同定するために、Vps27 と結合する蛋白質を yeast two-hybrid 法を用いて検索した。約 13 万の形質転換体を用いて検索したところ、11 個の陽性 clone が得られた。これら clone 中に導入された plasmid を単離し、塩基配列によって insert を確認したところ、*HSE1*、*SRN2*、*PRO2*、*UBI4*、*UTP6* および *RKI1* の cDNA がそれぞれ挿入されていた。この中で、Hse1、Srn2 および Ubi4 はすでに Vps27 との結合が報告されているが、Pro2、Utp6 および Rki1 は Vps27 結合蛋白質として新たに同定されたものである。Pro2 はプロリンの生合成に関与する酵素であり、Utp6 は ribosomal RNA の合成に関与する因子、Rki1 はピリドキシン合成に関与する酵素である。

次に、ここで Vps27 結合蛋白質として新たに同定された Pro2、Utp6 および Rki1 とメチル水銀毒性との関係を検討した。まず、*PRO2* の欠損がメチル水銀毒性に与える影響を検討したところ、*PRO2* 欠損酵母は野生酵母よりも高い感受性を示すように見受けられた (Figure 15)。*PRO2* 欠損酵母はメチル水銀非存在下での増殖が野生酵母に比べて遅いため、メチル水銀感受性を正確に判断することはできなかつ

た (Figure 15)。Utp6 および Rki1 は欠損させると酵母が生存不能になることから、Utp6 または Rki1 を高発現する酵母を作製してメチル水銀感受性を検討した。その結果、両高発現酵母のメチル水銀感受性は共に野生酵母とほとんど違いはなかった。(Figure 16)。これらのことから、Pro2、Utp6 および Rki1 はメチル水銀毒性増強には関与しない可能性が考えられる。しかし、Pro2 の高発現もしくは Utp6 や Rki1 の細胞内発現量の低下が、酵母のメチル水銀感受性に影響を与える可能性は否定できない。

## D. 考察

ゴルジ体からエンドソームを介した液胞への蛋白質輸送システムがメチル水銀毒性の増強に深く関与することが示唆された。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可能性が考えられる。Vps27 と Hse1 は複合体を形成するにも関わらず、両蛋白質をそれぞれ欠損させた酵母は共に野生酵母に比べてメチル水銀耐性を示したものの、*VPS27* 欠損酵母に比べて *HSE1* 欠損酵母の方がその耐性度は低かった

(Figure 3-1、Figure 7)。VPS27 欠損酵母では、MVB sorting pathway によって液胞へ輸送される蛋白質である carboxypeptidase Y (CPY) や、carboxypeptidase S (CPS) の液胞への輸送阻害が認められるが、HSE1 欠損酵母ではそれらの輸送阻害はほとんど起こらず、ESCRT-I のエンドソーム膜へのリクルートも正常に行われていることが報告されている。したがって、Hse1 の MVB sorting pathway への寄与は Vps27 に比べて小さいものと考えられ、そのために VPS27 欠損酵母に比べて HSE1 欠損酵母の方がメチル水銀毒性に対する耐性度が低いと考えられる。

これまでに MVB sorting pathway に関与する因子の欠損酵母は hygromycin B、bleomycin、fluconazole、tunicamycin、metanesulfonate、tert-butyl hydroperoxide、paraquat、過酸化水素などの様々な薬毒物に対する感受性が野生酵母に比べて高いことが報告されている。しかし、メチル水銀の場合のように野生酵母に比べて耐性を示す薬毒物は全く知られていない。したがって、この経路に関わる因子の欠損が酵母にメチル水銀耐性を与えるという現象はメチル水銀に特異的であると思われる。

一方、Vps27-Hse1 複合体に認識され、かつ、メチル水銀毒性を増強させる蛋白質の検索を行い、Ynr005c を見出すことにも成功した。しかし、Ynr005c の機能は未知であり、メチル水銀毒性との関係についての報告もない。ゴルジ体からエンドソームを介した液胞への蛋白質の輸送がメチル水銀毒性増強に関与している可能性が示唆されたが、Ynr005c も本経路によって液胞内に取り込まれる可能性が考えられる。しかし、YNR005C 欠損酵母はメチル水銀耐性を示すものの、その耐性度は VPS27 欠損酵母より低いことから、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は Ynr005c 以外にも複数存在する可能性が考えられる。そこで、Vps27 と結合する蛋白質を yeast two-hybrid 法で検索したが、メチル水銀毒性に関わる蛋白質を同定するには至らなかった。今後、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の同定をさらに続ける必要があると思われる。

また本研究では、Vps27 結合蛋白質である Ubi4 が、エンドソーム内への蛋白質の取り込みを介したメチル水銀毒性増強現象において重要な役割

を果たしている可能性が示された。酵母のユビキチン遺伝子には *UBI1*～*UBI4* の四種類が知られている。*UBI1*～*UBI3* はユビキチンとリボソーム蛋白質の融合遺伝子であり、少なくとも heat shock により発現が変化しないのに対して、*UBI4* 遺伝子の発現は様々なストレスにより誘導されることが知られている。したがって、*UBI4* はストレス環境下で発現が増強されるストレス蛋白質であるといえる。本検討においても、メチル水銀によって *UBI4* mRNA の発現が誘導されることが判明したが、*UBI4* 欠損酵母はメチル水銀に対して強い耐性を示した。この結果から、Ubi4 は少なくともメチル水銀毒性に対しては、防御的ではなく、毒性増強に働く可能性が考えられる。しかし、その作用機構については更に詳細な

検討が必要である。また、Ubi4 が示す heat shock などのストレスに対する防御作用とメチル水銀毒性を増強する作用はそれぞれ異なる機構によるものである可能性も考えられる。

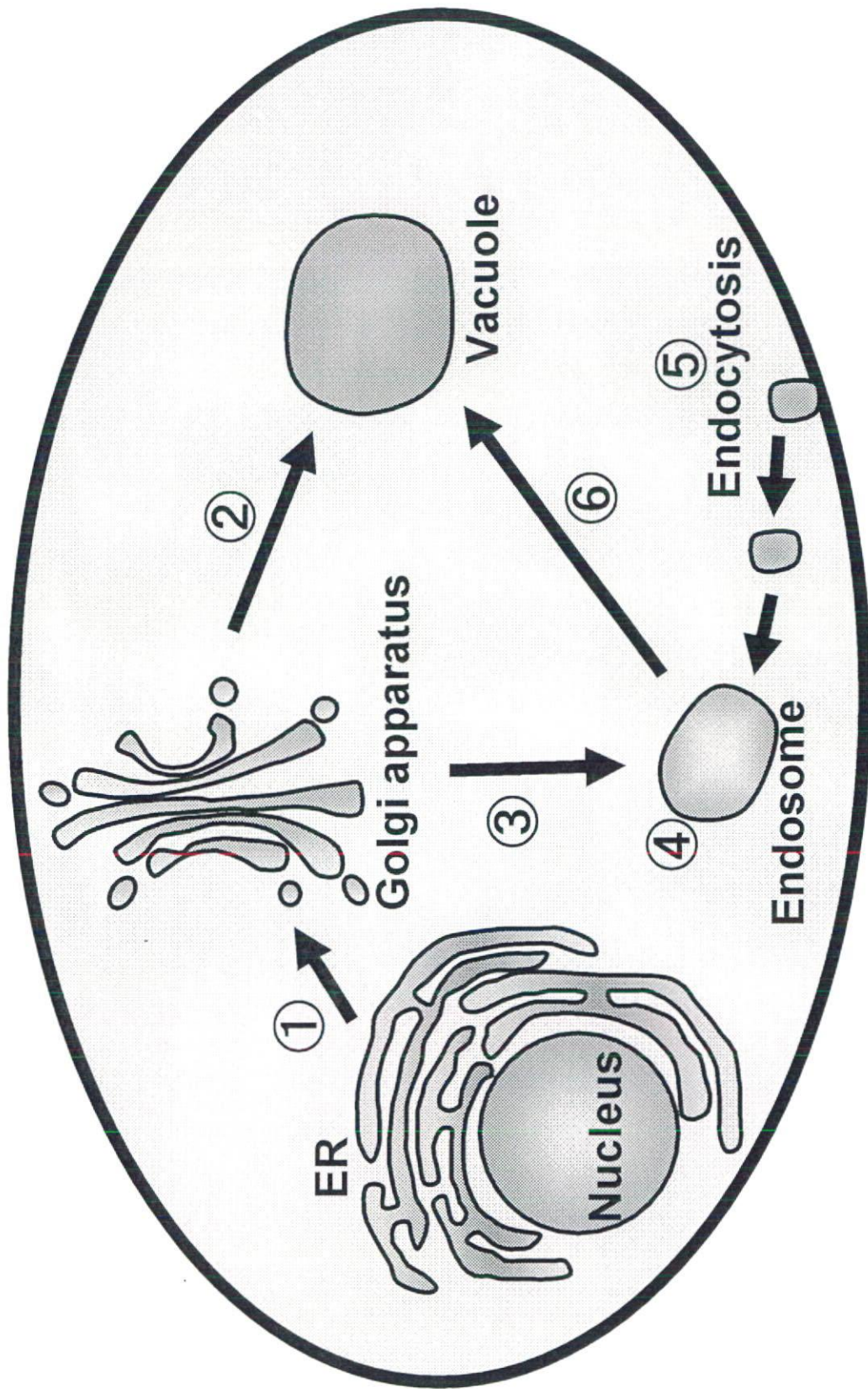
#### E. 研究発表

1. 論文発表  
なし。

#### 2. 学会発表

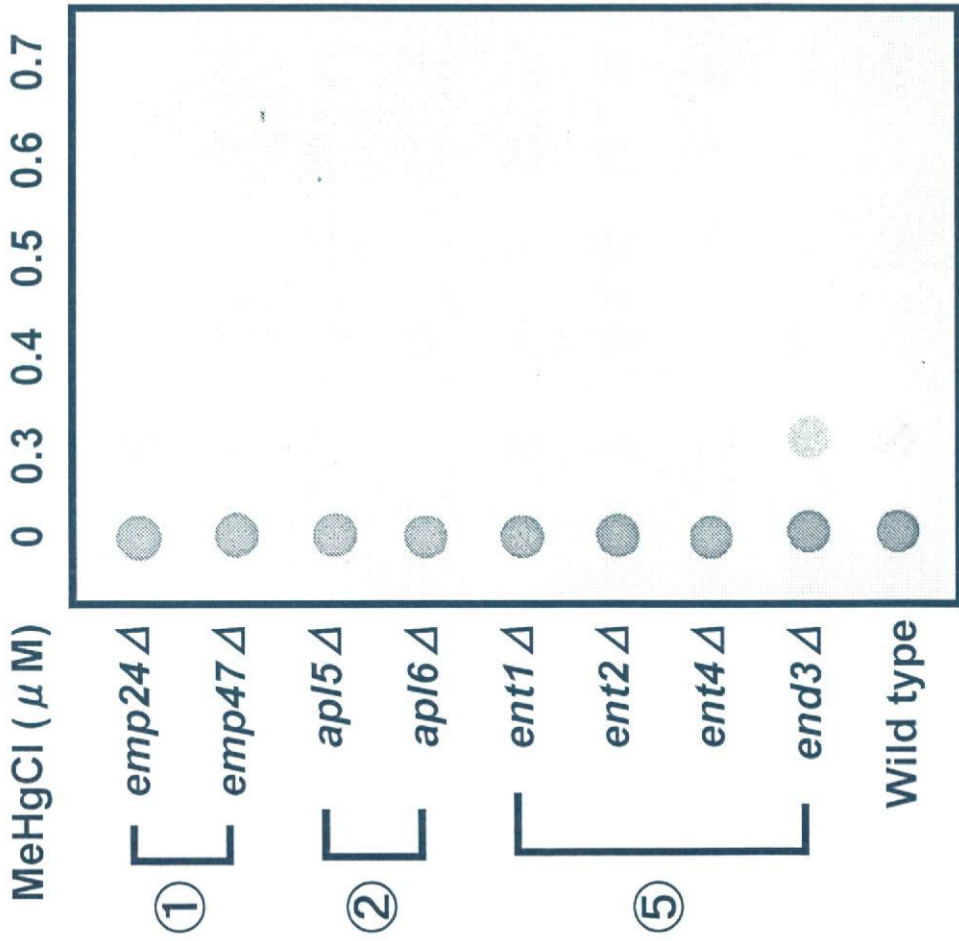
中島晶子、黄 基旭、村井康高、永沼章：酵母 Ubi4 によるメチル水銀毒性増強機構の解析. 日本薬学会第 128 年会, 2008.

F. 知的財産権の出願・登録状況  
なし。

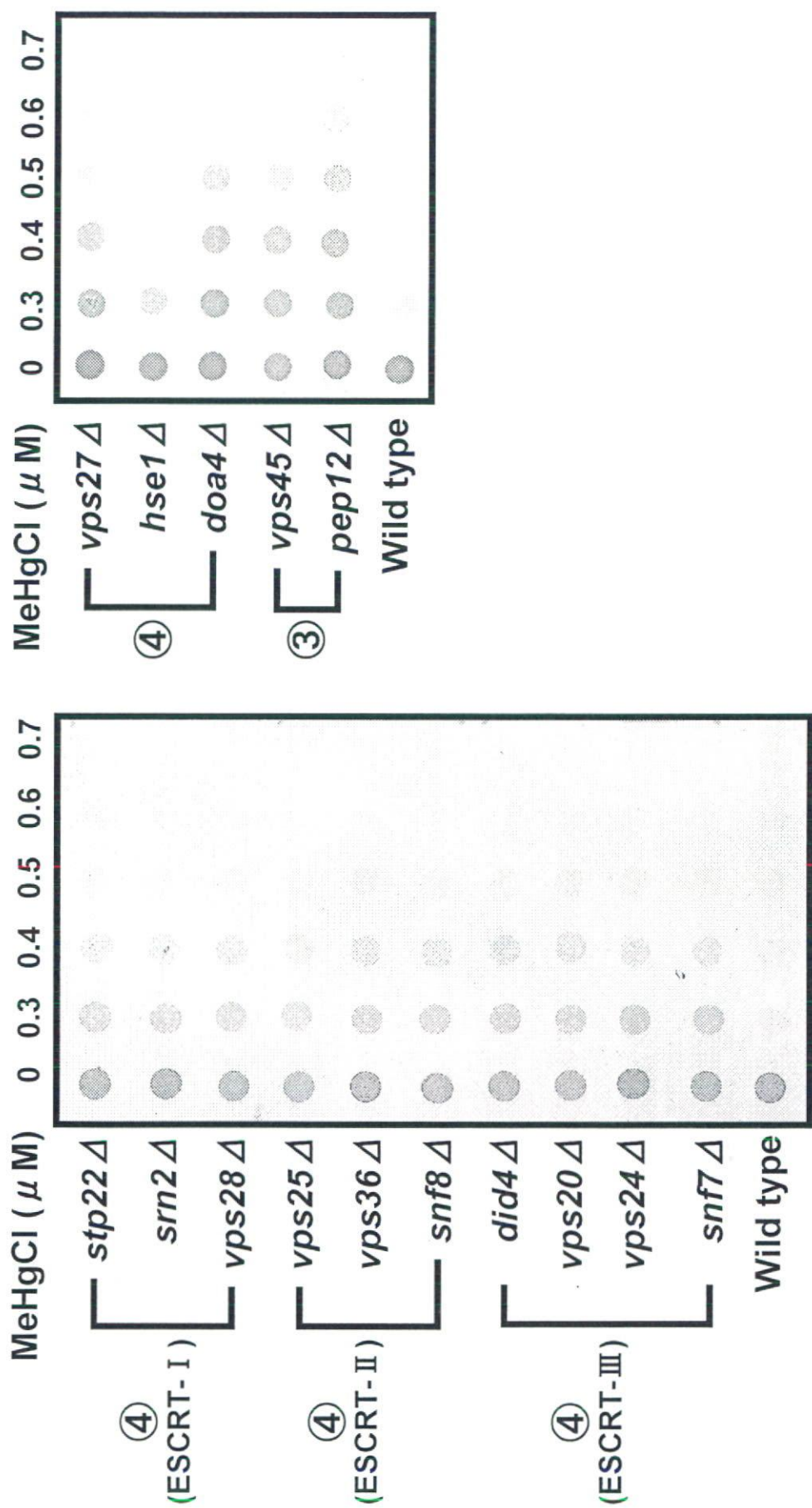


**Figure 1. 酵母細胞内における液胞への蛋白質輸送経路**

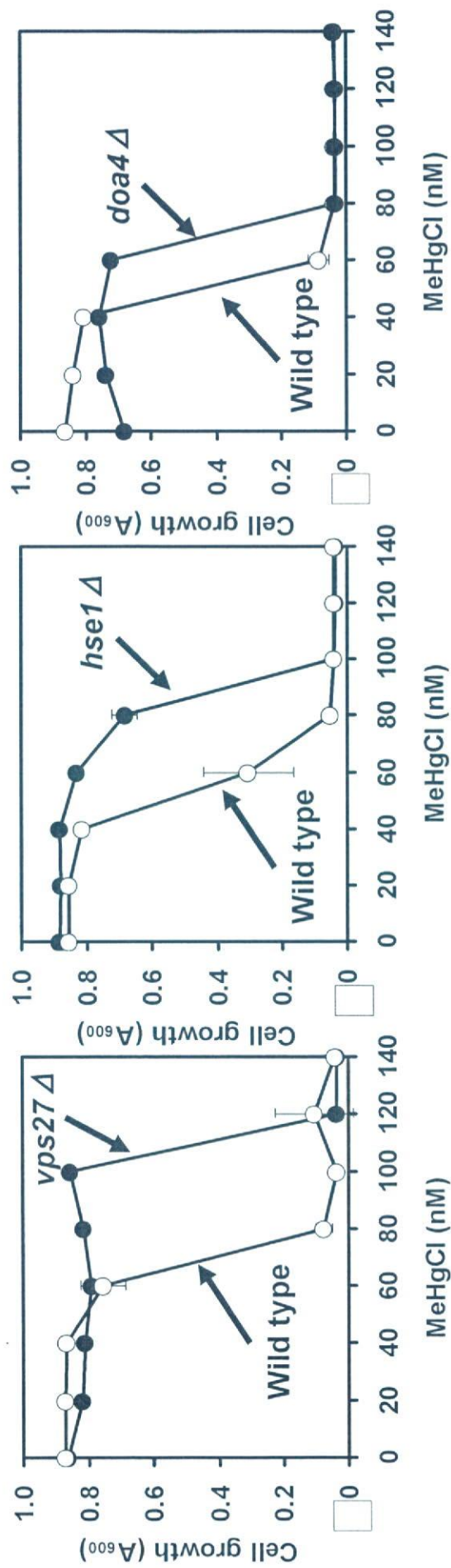
酵母細胞内において液胞への蛋白質輸送経路は、①ER (小胞体) からゴルジ体、②ゴルジ体から液胞、③ゴルジ体からエンドソーム、④エンドソーム内の蛋白質の取り込み、⑤エンドソームと液胞の融合の6つが知られている。



**Figure 2-1. 液胞への蛋白質輸送経路に関わる因子の欠損がメチル水銀感受性に与える影響**  
 $1 \times 10^6$  cells/mLの酵母に滅菌水またはfinal 0, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7  $\mu$  Mとなるように塩化メチル水銀を加え、30°Cで3 hr 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、30°Cで24hr培養後、観察した。丸で囲った数字は Figure 1に示した経路を示す。

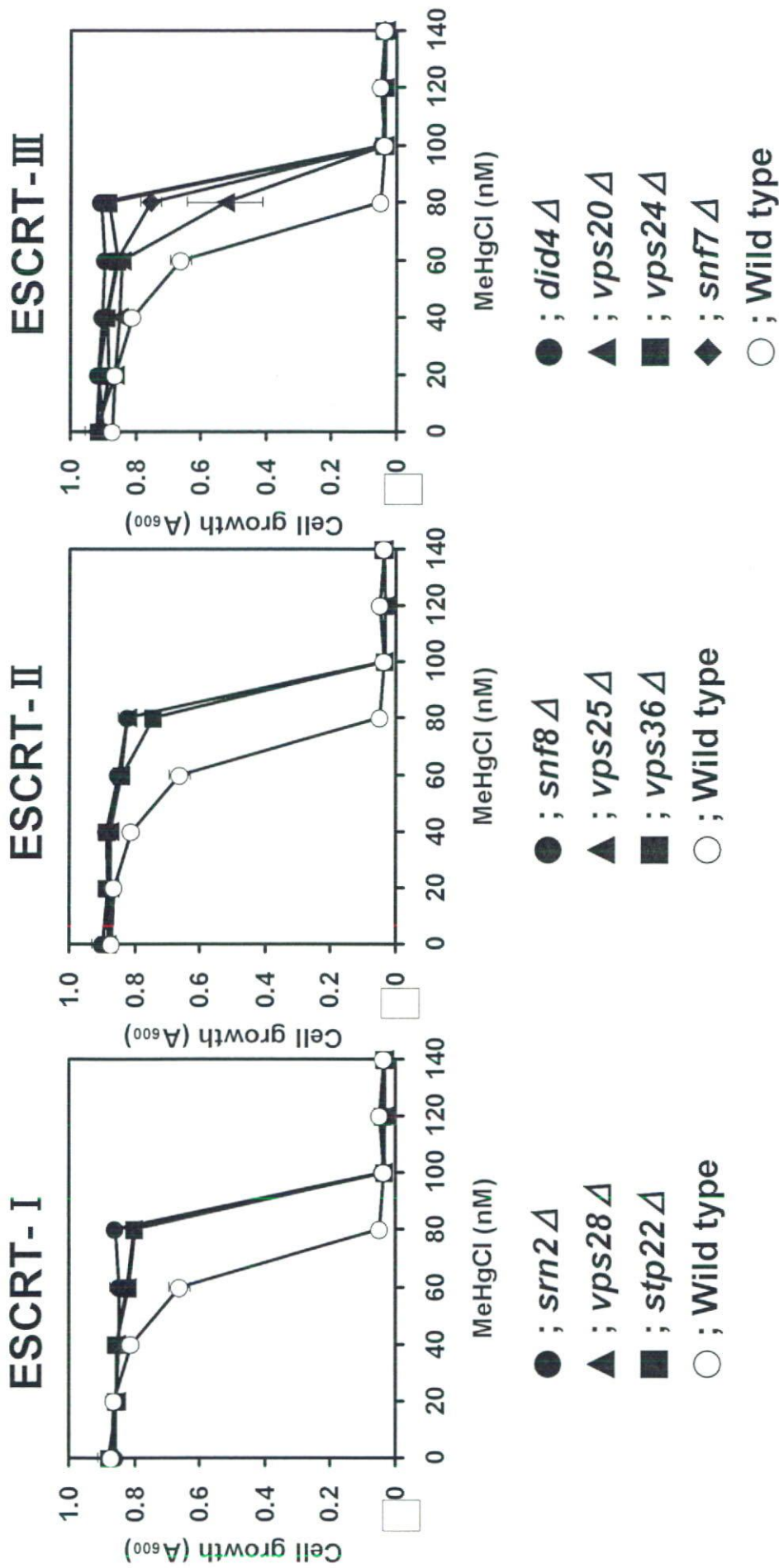


**Figure 2-2.** 液胞への蛋白質輸送経路に関わる因子の欠損がメチル水銀感受性に与える影響  
 $1 \times 10^6$  cells/mLの酵母に滅菌水またはfinal 0,0.3,0.4,0.5,0.6,0.7  $\mu$ M となるように塩化メチル水銀を加え、30°Cで3 hr 静置培養した後、 $5 \times 10^4$  cells/spot となるようにスポットインキュベーションし、30°Cで24hr培養後、観察した。丸で囲った数字は Figure 1に示した経路を示す。



**Figure 3-1.** エンドソーム内への蛋白質の取り込みに関与する因子の欠損がメチル水銀感受性に与える影響

1 × 10<sup>4</sup> cells/wellの酵母にfinal 0, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140 nM となるように塩化メチル水銀を加え、液体培地中で30°Cで48 hr 培養後、濁度を測定 (A<sub>600</sub>) した。



**Figure 3-2.** エンドソーム内への蛋白質の取り込みに関与する因子の欠損がメチル水銀感受性に与える影響  
 エンドソーム膜上にリクルートされるESCRT-I複合体 (*Srn2*, *Vps28*, *Stp22*)、ESCRT-II複合体 (*Snf8*, *Vps25*, *Vps36*)、ESCRT-III複合体 (*Did4*, *Vps20*, *Vps24*, *Snf7*)の構成因子を一つずつ欠損させた酵母について、Figure 3-1と同様の方法で検討した。ESCRTについてはFigure 8参照



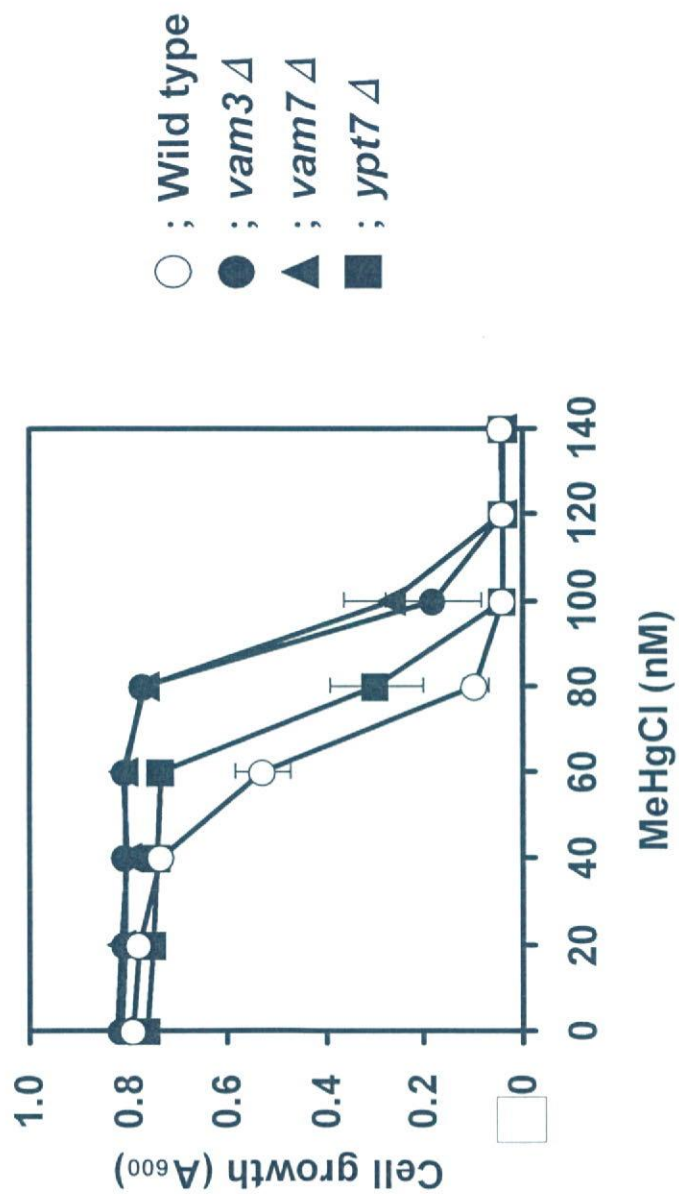
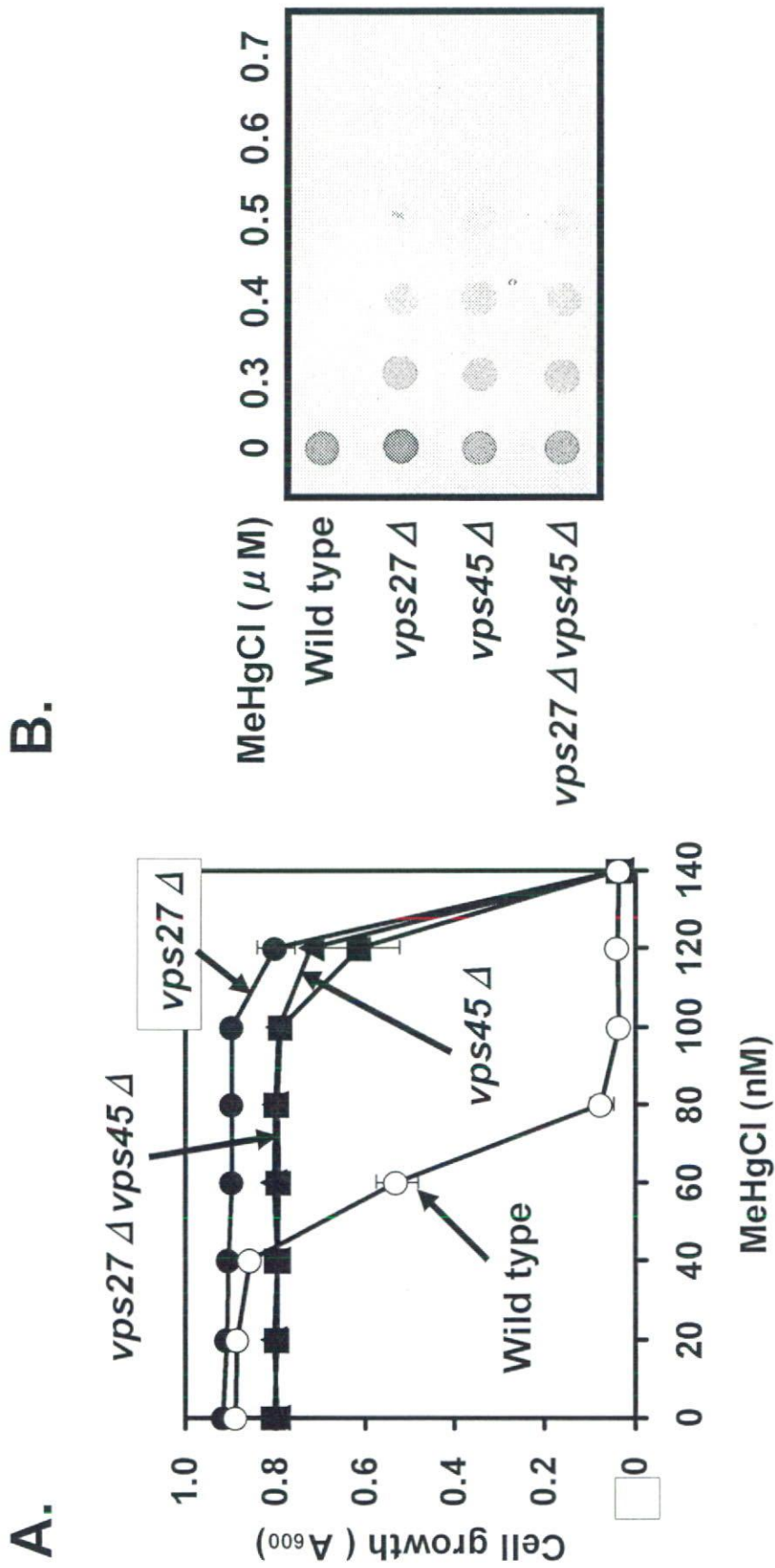


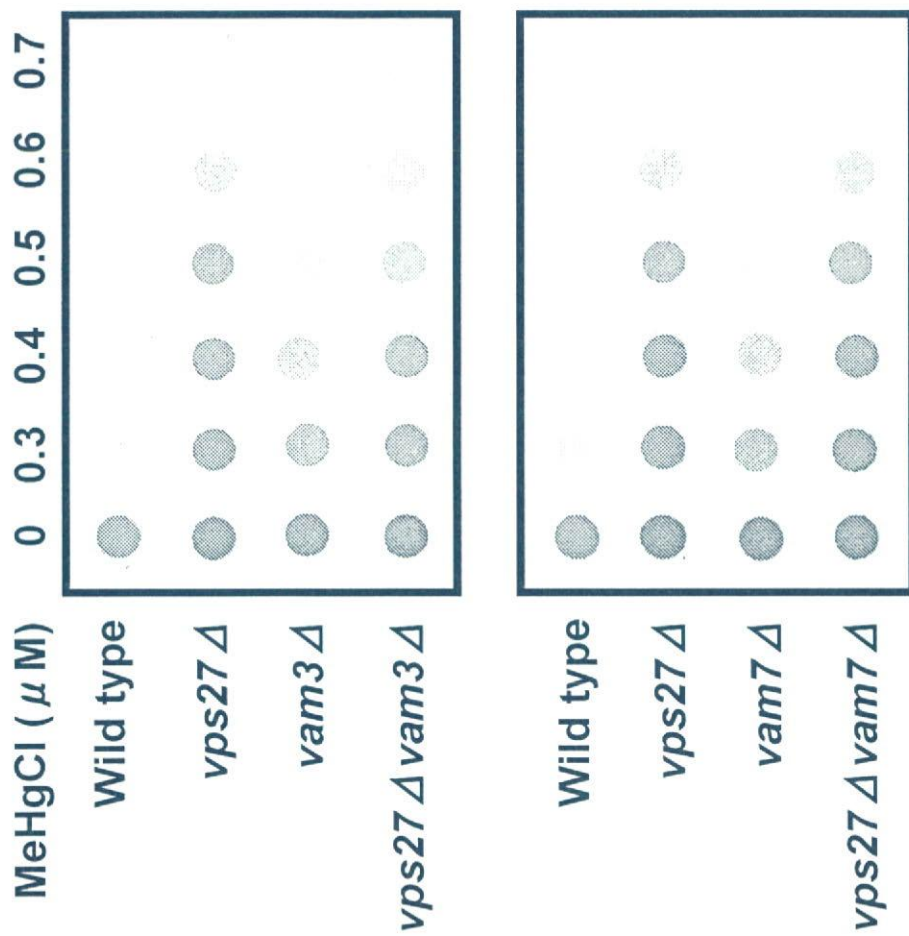
Figure 4. エンドソームと液胞の融合に関わる因子 (*Vam3*, *Vam7*, *Ypt7*) の欠損がメチル水銀感受性に与える影響

Figure 3-1と同様の方法でメチル水銀感受性を検討した。

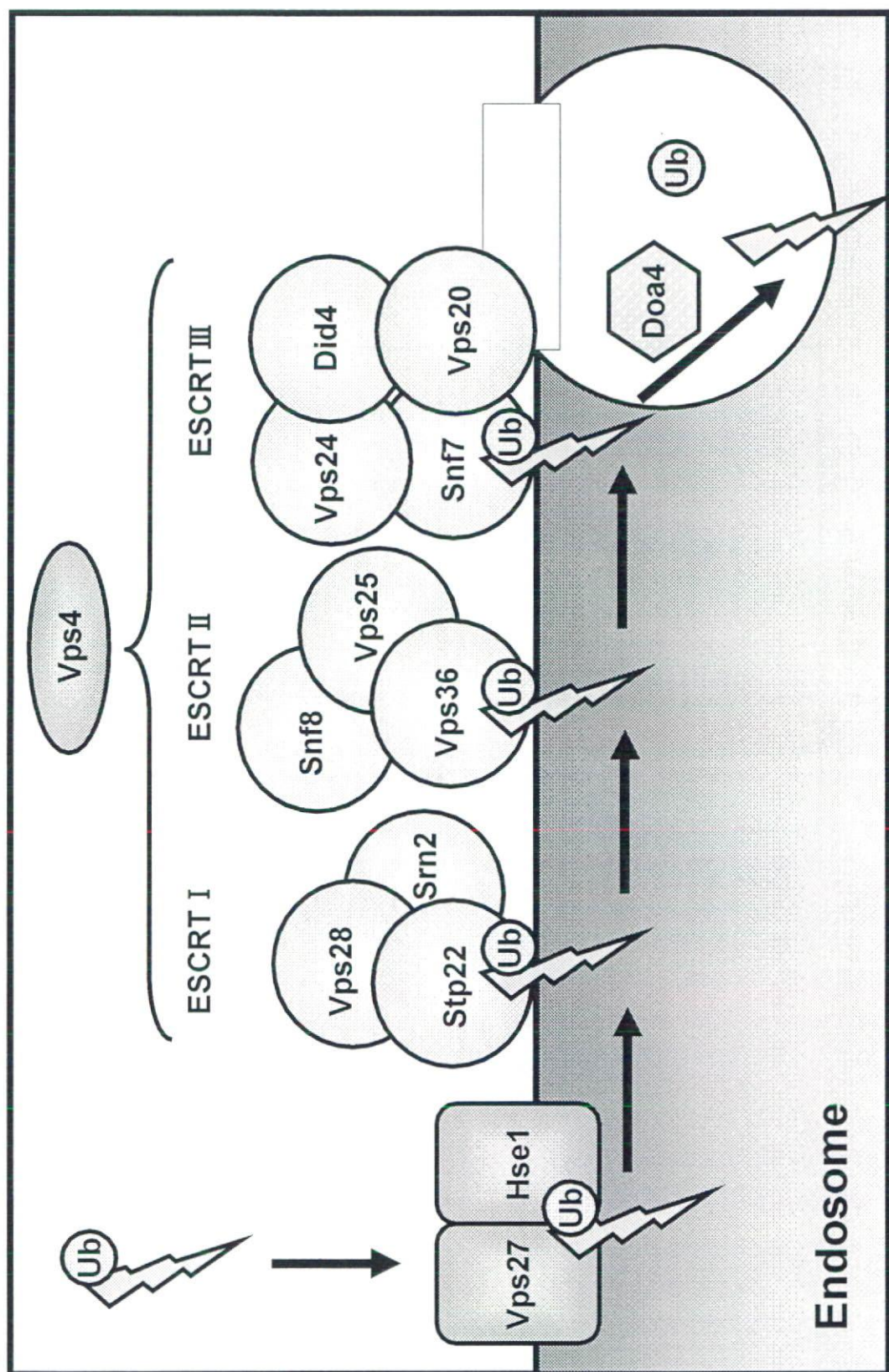


**Figure 5. Vps27とVps45の二重欠損がメチル水銀感受性に及ぼす影響**

A. Figure 3-1と同様の方法でメチル水銀感受性を検討した。B. Figure 2と同様の方法でメチル水銀感受性を検討した。



**Figure 6. *Vps27*と*Vam3*および*Vps27*と*Vam7*の二重欠損がメチル水銀感受性に及ぼす影響**  
 Figure 2と同様の方法でメチル水銀感受性を検討した。



**Figure 7. エンドソーム膜上での蛋白質の取り込み経路 (MVB sorting pathway)**

エンドソーム内へ取り込まれる蛋白質はモノユビキチン化をシグナルとして、Vps27/Hse1複合体に認識され、その後 ESCRT複合体へと受け渡され、最終的に脱ユビキチン酵素Doa4によりユビキチンが外され取り込まれる。