

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 17 日現在

機関番号：11301  
 研究種目：挑戦的萌芽研究  
 研究期間：2011～2012  
 課題番号：23659062  
 研究課題名（和文） **新しいカドミウム毒性防御機構としてのMVBソーティングシステム**  
 研究課題名（英文） **MVB sorting system as a novel defense mechanism against toxicity of cadmium**  
 研究代表者  
 永沼 章（NAGANUMA AKIRA）  
 東北大学・大学院薬学研究科・教授  
 研究者番号：80155952

## 研究成果の概要（和文）：

エンドソーム上で機能する MVB ソーティングシステムに関わる蛋白質とカドミウム毒性との関係を酵母を用いて検討した。その結果、同システムに関わる全ての蛋白質のどれ1つを欠損させても酵母がカドミウムに対して高い感受性を示すようになることが判明し、同システムの基質蛋白質がカドミウム毒性の軽減に関与していることが明らかとなった。また、この基質蛋白質は小胞体からゴルジ体を介してエンドソームに輸送されることが示唆された。

## 研究成果の概要（英文）：

We examined the relationship of each protein, which is a member of the MVB sorting system on endosome, and cadmium toxicity using yeast cells. Deletion of each gene for all member protein of the system conferred hypersensitivity to cadmium toxicity. This result suggested that certain substrate protein(s) of this system plays a role in reduction of cadmium toxicity. Moreover, it was indicated that the substrate protein(s) is transported to the endosome through Golgi body from endoplasmic reticulum.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・環境系薬学

キーワード：カドミウム、MVB ソーティングシステム、酵母、毒性軽減機構、液胞

## 1. 研究開始当初の背景

本申請者は、酵母を用いて、カドミウムに対する細胞の感受性に影響を与える蛋白質を遺伝子レベルで網羅的に検索し、MVB ソーティングシステムに関わる複数の蛋白質（Snf7, Vps25 および Vps27）をカドミウムの細胞毒性を軽減する因子として同定した。MVB ソーティングシステムは、エンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれた膜蛋白質（受容体やトランスポーター）などを“リソソームに運んで分解するか細胞膜に戻して再利用するか”を選別する重要な細胞内機構の一つであり、酵母からヒトまで広く保存されている。これまでに、同システムと

カドミウム毒性との関係について検討された例はなく、本申請者が見出した「MVB ソーティングシステムに関わる因子がカドミウム毒性に対して防御的に作用する」という知見は、これまでに知られていない全く新しいカドミウム毒性防御機構の存在を示唆するものである。

本研究によって MVB ソーティングシステムがカドミウム毒性に対して防御的に作用することが明らかにされれば、これまで予想もされなかった新しいカドミウム毒性防御機構の存在を示すことになり、他に例のない全く独創的な研究としてその意義は計り知れないものがある。これら本研究によって得

られる成果は、今後のカドミウム研究に新しい分野を創成し得る学術的波及効果の高いものになると考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究は、MVB ソーティングシステムとカドミウム毒性との関係を明確にするとともに、その機構の一部を明らかにすることを目的として、以下の事項についての検討を行う。

(1) 本申請者は MVB ソーティングシステムに関わる3つの蛋白質を欠損させた酵母がそれぞれカドミウムに対して高い感受性を示すことを見出したが、MVB ソーティングシステムにはそれらを含めて少なくとも13種の蛋白質が関わっているため、MVB ソーティングシステムとしての総体的な機能がカドミウム毒性に関与するか否かに興味もたれる。そこで、残りの10種の蛋白質の欠損がカドミウム毒性に与える影響を検討することにより、MVB ソーティングシステムの総体的な機能とカドミウム毒性との関係を明らかにする。

(2) MVB ソーティングシステムで選別を受ける蛋白質は、エンドサイトーシスのみならずいくつかの経路によって MVB へ輸送されることが知られている。そこで、これら経路の中で、カドミウム毒性防御に関わる経路を特定する。

(3) カドミウムによってある種の蛋白質(例えば酸化を受けた特定の膜蛋白質)の細胞内濃度が上昇することにより細胞機能に障害が生じ、MVB ソーティングシステムはこの蛋白質のリソソームでの分解を促進することによってカドミウムによる細胞障害を防いでいる可能性が考えられる。そこで、MVB ソーティングシステムを介したリソソームでの分解がカドミウムによって促進される蛋白質を同定し、カドミウム毒性と当該蛋白質との関係を明らかにする。

## 3. 研究の方法

本研究では、MVB ソーティングシステムとカドミウム毒性との関係を、遺伝子工学的操作が容易で、ヒト細胞とほぼ同様の MVB ソーティングシステムを保持することが分かっている酵母を用いて検討する。MVB ソーティングシステムに関してこれまでに判明している基礎的情報の多くは酵母をモデル生物とした研究により得られたものであり、その情報も非常に充実していることから、酵母を用いた方が基礎的知見を得るためには有利であり、かつ効率的である。

(1) 出芽酵母のカドミウム感受性に影響を

与える遺伝子の検索：

遺伝子欠損株ライブラリー (Euroscarf) 溶液を、各 well に 195  $\mu$ L の SD 培地を分注した 96 well micro-titer plate へ 5  $\mu$ L ずつ添加し、30°C で 48 hr 培養した。その後、塩化カドミウム (最終濃度 350  $\mu$ M) 20  $\mu$ L と SD 培地 175  $\mu$ L を加えた別の 96 well micro-titer plate に 40 倍希釈した酵母培養液を 5  $\mu$ L 添加し、30°C で培養した。48 hr 後に濁度 (A600) を測定し、0.4 以下であったものをカドミウム高感受性候補株として選んだ。その後カドミウム高感受性候補株についてカドミウムに対する毒性試験を行い、カドミウム感受性に影響を与える遺伝子を決定した。

(2) 酵母からの chromosomal DNA の抽出：

Glass-beads 法によって酵母から chromosomal DNA を抽出した。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 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 分間激しく攪拌した後、12,000 $\times$ g で 5 分間遠心して水層の chromosomal DNA 溶液を ethanol 沈殿し、滅菌蒸留水を加えて 300  $\mu$ L とした。

(3) Vps27 欠損酵母および VPS45 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、分裂酵母 (*Saccharomyces pombe*) 由来の *HIS5* 遺伝子を PCR により増幅した。酵母 (BY4742 株) の形質転換は酢酸リチウム法により行った。まず、Vps27 欠損酵母および 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に集菌し、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°C で 15 分間培養した。この懸濁液 50  $\mu$ L に該当遺伝子を組み込んだ発現 vector 1  $\mu$ g、加熱変性サケ精子 DNA 50  $\mu$ g および 40% polyethylene-glycol 300  $\mu$ L を加え、30°C で 30 分間培養した。その後、42°C で 15 分間の熱ショックをかけた後に集菌し、100  $\mu$ L の滅菌水で懸濁して SD 寒天培地に塗布し、30°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 によって行った。

#### （４）液体培地を用いた耐性試験：

0、12.5、25、50、100、150、200、250  $\mu\text{M}$  にそれぞれ希釈した塩化カドミウム溶液を 96well micro-titer plate に 20  $\mu\text{L}$  ずつ分注した（final: 0、1.25、2.5、5、10、15、20、25  $\mu\text{M}$  となる）。野生酵母またはそれぞれの遺伝子欠損酵母の single colony を SD 培地 2 mL に植菌し 30°C で一晩振盪培養した後、 $5.56 \times 10^4$  cells/mL となるように希釈し、96 well micro-titer plate にそれぞれの希釈系列に対して 3 well ずつ、1well あたり 180  $\mu\text{l}$  ずつ添加した（final:  $1 \times 10^4$  cells/well となる）。そして気相インキュベーターを用いて 30°C で 48 hr 培養後、酵母の増殖の指標として濁度（A600）を測定した。

#### （５）寒天培地を用いた耐性試験：

0、2.5、5、10、20、30、40mM にそれぞれ希釈した塩化カドミウム溶液を 1.5 mL tube に 100  $\mu\text{l}$  ずつ分注した（final :0、0.25、0.5、1、2、4 mM もしくは 0、0.5、1、2、3、4 mM となる）。野生酵母またはそれぞれの遺伝子欠損酵母の single colony を SD 培地 2 mL に植菌し 30°C で一晩振盪培養した後、 $1.11 \times 10^6$  cells/mL となるように希釈した。気相インキュベーターを用いて 30°C、3 hr 培養後、集菌し、100  $\mu\text{L}$  の滅菌水で懸濁し、 $1 \times 10^7$  cells/mL となるように希釈し、5  $\mu\text{L}$  を SD 寒天培地にスポッティングした。そして気相インキュベーターを用いて 30°C で 24 hr 培養後、増殖程度を観察した。

## 4. 研究成果

MVB ソーティングシステムは、エンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれた膜蛋白質（受容体やトランスポーター）などを“液胞（リソソーム）に運んで分解するか細胞膜に戻して再利用するか”を選別する重要な細胞内機構の一つであり、酵母からヒトまで広く保存されている。MVB ソーティングシステムには Snf7、Vps25 および Vps27 を含めて少なくとも 13 種の蛋白質が関わっている。そこで、MVB ソーティングシステムとしての総体的な機能がカドミウム毒性に関与するか否かを明らかにするために、残りの 10 種の蛋白質の欠損がカドミウム毒性に与える影響を検討した。その結果、13 種の蛋白質の

どれでも 1 つを欠損させることによって、酵母がカドミウムに対して高い感受性を示すようになることが判明した。この結果は、MVB ソーティングシステムの総体的な機能がカドミウム毒性の軽減に関与していることを明確に示している。

酵母細胞内における液胞への蛋白質輸送経路は、①小胞体からゴルジ体への輸送経路、②ゴルジ体から液胞への輸送経路、③ゴルジ体からエンドソームへの輸送経路、④エンドソーム内への蛋白質の取り込み、⑤エンドサイトーシス、⑥エンドソームと液胞の融合、の 6 つに分けられる。このうちの④は MVB ソーティングシステムによるものである。そこで、既に検討した④を除いた経路とカドミウム毒性との関係を調べるために、各経路に関与する因子をそれぞれ欠損させた酵母のカドミウム感受性を野生株と比較した。その結果、②ゴルジ体から液胞への直接輸送経路（Ap15、Ap16）および⑤エンドサイトーシス（Ent2、Ent4）に関わる因子をそれぞれ欠損させた酵母は、野生酵母と同程度のカドミウム感受性を示した。一方、③ゴルジ体からエンドソームへの輸送（Pep12、Vps68、Vps45）および⑥エンドソームと液胞の融合（Vam3、Vam7、Vpt7）に関与する各因子の欠損酵母は、④と同様に野生株に比べて高いカドミウム感受性を示した。なお、①小胞体からゴルジ体への輸送に関わる因子は大半が欠損によって酵母が生存不可能であり、少数の欠損可能な因子もその欠損によって小胞体からゴルジ体への輸送が制御されるかどうか不明のため、今回は検討を行わなかった。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も、ゴルジ体からエンドソームを介して液胞に蛋白質を輸送する経路がカドミウム毒性軽減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、④MVB ソーティングシステム、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カドミウム毒性を軽減しているという可能性も否定できない。そこで、ゴルジ体からエンドソームへの輸送に関わる Vps45 と MVB ソーティングシステムに関わる Vps27 の二重欠損酵母を作成し、そのカドミウム感受性を検討した。その結果、Vps45 及び Vps27 単独欠損酵母は共に野生株に比べて高いカドミウム感受性を示し、その度合いは Vps45 単独欠損酵母の方が若干高感受性であった。しかし、これらの因子を二重欠損させてもカドミウムに対する感受性が増強されるということは無く、Vps45 単独欠損酵母と同程度の感受性を示した。次に、エンドソームと液胞の融合に関わる因子である Vam3 についても同様に Vps27 との二重欠損酵母を作成し、カドミウム感受性を検討した。その結果、

Vam3 単独欠損酵母は Vps27 単独欠損酵母に比べて感受性の度合いは低いものの、これらの因子を二重欠損させた酵母は Vps27 単独欠損酵母と比較して感受性の増強は見られず、同程度の感受性を示した。以上の結果より、ゴルジ体からエンドソームへの輸送、MVB ソーティングシステム（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の融合は同一機構によってカドミウム毒性軽減に関与していると考えられる。

以上の結果は、何らかの蛋白質がエンドソームを介して液胞に運ばれることによってカドミウム毒性が軽減されることを示唆している。一つの可能性として、液胞に運ばれた特定の蛋白質が液胞内に存在するプロテアーゼによって分解されることによって細胞がカドミウム耐性を示すようになることを考えることもできる。そこで、液胞内プロテアーゼまたはその関連蛋白質群をそれぞれ欠損させた酵母のカドミウム感受性を野生株と比較した。その結果、感受性の度合いは低いものの、液胞内加水分解酵素の受容体である Pep1、アスパルチルプロテアーゼである Pep4、セリンプロテアーゼである Prb1 をそれぞれ欠損させた酵母が野生株に比べて高いカドミウム感受性を示した。

次に、酵母でのカドミウム毒性軽減機構におけるこれらの液胞蛋白質とエンドソームを介したゴルジ体から液胞への蛋白質輸送経路との関係を検討するため、欠損細胞が比較的高いカドミウム感受性を示した Prb1 または Pep4 と、ゴルジ体からエンドソームへの輸送に関わる Vps45 との二重欠損酵母を作成し、そのカドミウム感受性を検討した。その結果、Prb1 または Pep4 と Vps45 との二重欠損酵母は相加的ではなく、Vps45 単独欠損酵母と同程度のカドミウム感受性を示した。

以上の結果より、エンドソームを介したゴルジ体から液胞への蛋白質輸送システムと、液胞内のプロテアーゼは、同一機構によってカドミウム毒性軽減に関与している可能性が考えられる。

本研究によって、エンドソームを介したゴルジ体から液胞への蛋白質輸送システムと液胞内のプロテアーゼも同一機構によってカドミウム毒性の軽減に関与している可能性が示唆されたことから、カドミウムによって障害をうけた蛋白質などがエンドソームを介してゴルジ体から液胞に運ばれ、液胞内のプロテアーゼによって分解されるという一連の機構が酵母でのカドミウム毒性軽減に重要な役割を果たしているのかも知れない。また、今回検討した Prb1 及び Pep4 は、上記のカドミウム毒性軽減システムにおいてそれぞれ別の基質を分解している可能性も考えられる。今後、Prb1 と Pep4 の二重欠損酵母を作成し、それをを用いた検討を行うこ

とにより、カドミウム毒性軽減機構における Prb1 と Pep4 の関係が明らかになると考えられる。

また、今回検討は行わなかったが、小胞体からゴルジ体への輸送もカドミウム毒性軽減に関与している可能性も否定できない。今後、小胞体からゴルジ体への輸送に関わる遺伝子について、温度感受性変異体（ある特定の温度域においてのみ目的の蛋白質の発現が制御されるもの）などの遺伝子欠損酵母を作成して検討する予定である。なお、今回検討した因子の中には、Vps27（ヒトホモログとして Hrs が知られる）など、ヒト細胞にも機能的に共通する因子が存在するものが少なくない。今後、ヒト細胞においても同様の検討を行うことで、ヒトにおけるカドミウム毒性発現機構およびそれに対する防御機構の解明につながることを期待される。

## 5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 0 件）

〔学会発表〕（計 0 件）

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.pharm.tohoku.ac.jp/~seitai/seitai-index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

永沼 章 (NAGANUMA AKIRA)

東北大学・大学院薬学研究科・教授

研究者番号：80155952

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：