The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	吸入麻酔薬イソフルランの酵母細胞への作用機序の研究
Author(s)	高津, 芙美
Citation	大阪大学, 2017, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/61651
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

学位論文

吸入麻酔薬イソフルランの酵母細胞への作用機序の研究

大阪大学大学院歯学研究科　口腔科学専攻

口腔科学フロンティアセンター　先端口腔生物学教室

高次脳口腔機能学講座　歯科麻酔学教室

高津芙美

（指導教官：野田健司教授）

目次

第 1 章　序論　・・1
第 2 章　材料・方法　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・3
2-1　細胞培養
2-2　酵母株とプラスミドの構築
2-3　顕微鏡観察
2-4　タンパク抽出
2-4-1　リン酸化の解析
2-4-2　ユビキチン化の解析
2-5　SDS-PAGE、ウェスタンブロッティング
第 3 章　結果　・・7
第 4 章　考察　・・12
第 5 章　謝辞　・・15
第 6 章　参考文献　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・16
第 7 章　図表　・・21

略語表

OD　optical density

DMSO　dimethyl sulfoxide

Triton X-100　polyoxyethylene(10) octylphenyl ether

ssDNA　single-stranded DNA

SDS　sodium dodecyl sulfate

DTT　dithiothreitol

Tris　tris(hydroxymethyl)-aminomethane

TCA　trichloroacetic acid

EDTA　ethylenediaminetetraacetic acid

PMSF　phenylmethylsulfonyl fluoride

CHES　N-cyclohexyl-2-aminoethanesulfonic acid

NTCB　2-nitro-5-thiocyanatobenzoic acid

NEM　N-ethylmaleimide

PVDF　polyvinylidene difluoride

PBS-T　phosphate buffered saline with Tween 20

Tween 20　polyoxyethylene(20) sorbitan monolaurate solution

第 1 章　序論

全身麻酔は現代の医療において、外科的手術の際には必要不可欠である。麻酔薬は生体内に取り込まれると意識消失、不動化、自律神経の抑制など多様な作用をもたらす。これまで麻酔薬が中枢神経系の多くの領域で神経伝達を阻害することが報告されており、最終的な作用部位はシナプス膜であるという説が最も有力であるが、麻酔薬がどのようにしてシナプス膜に作用しているのか、その細胞レベルでの作用機序には未だ不明な点が多く、特に吸入麻酔薬の作用機序は事実上ほぼ不明であるとされている（1）。吸入麻酔薬の作用機序として、現在提唱されている仮説は大きく膜脂質説と膜タンパク質説に分けられる。膜脂質説では麻酔薬が神経細胞内の脂質に非特異的に作用して膜構造を変化させ、麻酔作用を引き起こすとされる（2）。しかし膨大な量のターゲットが存在するにも関わらず、麻酔作用という特異的な作用が生じるのはなぜかを説明できないといわれている（3）。一方、膜タンパク質説では麻酔薬が$GABA_A$受容体に代表される膜タンパク質に直接結合し、麻酔作用を生じるとされる（4）。しかしながら化学構造が大きく異なる麻酔薬でも同じような全身麻酔作用を生じることや、単一のタンパク質への影響のみで麻酔薬がもつ様々な作用を説明することは不可能であるといわれている（3）。このように膜脂質説や膜タンパク質説だけでは説明がつかないことが多く、新たな仮説を考える必要があると思われた。

これまで吸入麻酔薬は哺乳類の神経細胞および神経細胞以外の細胞、植物細胞、酵母細胞、細菌など、様々な細胞や組織に対し何らかの作用をもたらすことが報告されている（5、6、7）。Keilらは、出芽酵母*Saccharomyces cerevisiae*に対し吸入麻酔薬のひとつであるイソフルランを暴露させると、その増殖が阻害されることを報告した（6）。またPalmerらは、酵母細胞に対してイソフルランが持つ作用にどのような遺伝子が関わっているのかを調べるため、様々な変異体に対しイソフルラン処理を行い、スクリーニングを行った（8）。その結果、アミノ酸トランスポーターTat1の過剰発現により12%のイソフルランに耐性を示した。またアミノ酸トランスポーターBap2を欠失させると野生株以上にイソフルランに感受性を示した。Tat1、Bap2は酵母細胞の細胞膜上に存在し、Tat1はロイシン、トリプトファン、イソロイシン、バリン、チロシンを取り込み（9、10）、Bap2はロイシン、イソロイシン、バリンを取り込むアミノ酸トランスポーターである（11）。そして今回、出芽酵母の細胞膜上に存在するBap2をはじめとするいくつかのトランスポーターが、イソフルラン処理によりエンドサイトーシスされ液胞へ輸送されることを見出した。

細胞膜上のトランスポーターの多くは、栄養飢餓や細胞ストレスなどの環境の変化に応じてユビキチン化され、それを目印に集まったエンドサイトーシス実行分子の働きによりエンドサイトーシスされることで量的調節される（12）。哺乳類細胞においては多種類のユビキチンリガーゼが様々な細胞膜上のタンパク質をユビキチン化するが、出芽酵母ではこれまで報告されたほとんどのエンドサイトーシスにおいて、HECT型ユビキチンリガーゼであるRsp5がユビキチン化を担う（13、14、15）。そしてその際、Rsp5はアダプタータンパク質によりそれぞれのトランスポーターの元へリクルートされることが知られており、アダプタータンパク質なしではRsp5がトランスポーターに作用できない場合が多い（16、17）。今回、イソフルラン処理によるBap2のエンドサイトーシスがRsp5依存的であることを確認し、その際アダプタータンパク質Art2が関与していることを見出した。このように、本研究ではイソフルラン処理によって生じるBap2のエンドサイトーシスの詳細な機序を解析することで、イソフルランが膜タンパク質や細胞膜にどのような影響を与えるかを理解し、ヒトにおける麻酔薬の作用機序を解明する手がかりを得ることを目的とした。

第 2 章　材料・方法

2-1　細胞培養

酵母の生育には主に YPD（1% Yeast Extract（BD Biosciences, New Jersey, USA）、2% peptone（BD Biosciences）、2% glucose（Wako、大阪、日本））、または SCD（0.17% yeast nitrogen base without amino acids and ammonium sulfate（BD Biosciences）、0.5% ammonium sulfate（nacalai tesque、京都、日本）、0.5% bacto casamino acid（BD Biosciences）、20 μg/ml tryptophan（Sigma-Aldrich, Missouri, USA）、20 μg/ml adenine（Sigma-Aldrich）、 20 μg/ml uracil（Sigma-Aldrich）、2% glucose）を用いた。寒天培地には 2% agarose（松栄寒天、東京、日本）を添加した。酵母の培養は寒天培地に植菌した細胞を YPD または SCD の液体培地で 30℃にて前培養した後、YPD または SCD の液体培地に植え継いだ。30℃にて本培養した後、対数増殖期（OD=1~2/ml）に達した細胞を実験に用いた。

イソフルラン（Wako）は室温において液体であるが、高い揮発性を持つため通常の培養環境では一定濃度を細胞に暴露させることが困難である。そこで文献（18）に準じ、10 ml シリンジ（TERUMO、東京、日本、SS-10SZP）あるいは 50 ml シリンジ（SS-50ESZ）とキャップ（トップ、東京、日本、JMDN70280000）を用いて密閉環境にし、イソフルラン処理が可能な実験系を確立した。対数増殖期（OD=1~2/ml）にある酵母細胞を液体培地に懸濁し、それぞれの実験に応じた量をシリンジに入れた。イソフルランを DMSO（Wako）で 10 倍に希釈し、ハミルトンシリンジ（HAMILTON, Nevada, USA, 80465）を用いてシリンジの先端が液体培地中に浸かるようにして目的の量を添加した。速やかにエアーを抜いてキャップをし、プランジャーを押して密閉されていることを確認した。その後 30℃でそれぞれの実験に応じた時間培養した。ラパマイシン（LKT Laboratories, Minnesota, USA）はストック溶液（ethanol（Wako）: Triton X-100（Wako）= 9 : 1（v/v））にて 1 mg/ml で保存し、シリンジ先端より終濃度 200 ng/ml となるよう添加した。

2-2　酵母株とプラスミドの構築

本研究に用いた酵母株とプラスミドの種類はそれぞれ表 1 と表 2 に記す。遺伝子破壊あるいはタグ付加を行うために、目的の DNA 配列に相同な領域 20 bp を両端に持つ PCR 断片を親株に導入し、相同組み替えにより株を作製した。PCR 断片作成のための鋳型プラスミドは

以下のものを用いた。

- 遺伝子破壊: pFA6a-natNT2、pFA6a-kanMX6、pFA6a-zeoNT3
- C 末端 3xHA タグ付加: pYM24
- C 末端 GFP タグ付加: pYM25
- C 末端 3xGFP タグ付加: pFA6a-3myeGFP-dcufc-natNT2
- C 末端 mCherry タグ付加: pKN12、pKN9
- C 末端 5xFlag タグ付加: pKL255
- N 末端 Tet07-Ubi-Leu-3xHA タグ付加: pMK632

目的の DNA 配列に相同な領域 20 bp を両端に持つ PCR 断片が作成されるようプライマーを設計し、KOD -plus-（TOYOBO、大阪、日本）を用いて PCR を行った。対数増殖期（OD=1~2/ml）にある親株を 3000 rpm で 2 分間遠心して細胞を回収し、滅菌水で洗浄した。そこにボイルした 50 µl 2 mg/ml ssDNA（Sigma）、240 µl 50%（w/v）polyethylene glycol（Sigma）、36 µl 1 M litium acetate（nacalai tesque）、25 µl PCR 断片を加えてボルテックスし、42℃、1 時間で形質転換を行った。作製した株はそれぞれ clonNAT（Werner Bioagents, Jena, Germany）（100 µg/ml）、G418（Wako）（200 µg/ml）、Zeocin (Life Technologies, Massachusetts, USA) (200 µg/ml)、Hygromycin B（Wako）（200 µg/ml）を添加した YPD 培地で選択した。この形質転換操作は Guide to Yeast Genetics and Molecular and Cell Biology に従った。また遺伝子破壊やタグ付加の成否は、PCR やウェスタンブロッティングを行い確認した。PCR は選択培地で生育しているコロニーを zymolyase（nacalai tesque）溶液（0.1 mg/ml）に懸濁し 37℃で 30 分間静置して細胞壁を溶解する処理を行ったのち、KOD FX（TOYOBO）を用いて行った。

2-3　顕微鏡観察

酵母をシリンジにて培養した後、液体培地を遠沈菅に移し、3000 rpm で 2 分間遠心した。上清を適量捨ててサンプルとし、1.5 µl をスライドガラスにのせカバーガラスを被せた。マニキュアでカバーガラスの淵を封鎖し（図 16 の実験時のみ）、落射型蛍光顕微鏡 DMI6000B（Leica Microsystems, Wetzlar, Germany）を使用して生細胞観察を行った。撮影した画像は Adobe Photoshop CS4 を用いてカウントを行った。

2-4　タンパク抽出

酵母をシリンジにて培養した後、目的に応じた量の細胞を回収し 1 OD あたり 100 μl の 0.2 M NaOH（Wako）と 1% 2-mercaptoethanol（Wako）を加え懸濁し、氷上に 10 分間安置した。4℃、14000 rpm で 2 分間遠心し、上清を捨て、1xSample buffer（2% SDS（nacalai tesque）、100 mM DTT（Wako）、 60 mM Tris-HCl（pH6.8）（Sigma）、0.001% bromophenol blue（Sigma）、10% glycerol（Wako））を 1 OD あたり 100 μl 加え、ペレットを懸濁した。100℃で 5 分間加温し、遠心した上清を SDS-PAGE のサンプルとした。

2-4-1　リン酸化の解析

酵母をシリンジにて培養した後、10 OD の細胞を回収し、TCA（Wako）を終濃度が 6% になるよう加えた。5 分間氷上に安置した後、4℃、10000 rpm で 1 分間遠心した。上清を捨て、−20℃で保存しておいた acetone（Wako）で 2 回洗浄し、ペレットを完全に乾燥させた。100 μl Urea buffer（50 mM Tris-HCl（pH7.5）、5 mM EDTA（Wako）、6 M urea（Wako）、1% SDS、1 mM PMSF（Wako）、0.5xComplete EDTA-free protease inhibitor cocktail（Roche Life Science, Penzberg, Germany））を加えペレットを懸濁し、スクリューキャップチューブに移し、ペレットと等量の zirconia beads 0.6 mm（バイオメディカルサイエンス、東京、日本）を加えた。ビーズ式細胞破砕装置 MS-100（トミー精工、東京、日本）にて 5500 rpm で 30 秒間細胞破砕した後、30 秒間氷上に安置という作業を 4 回繰り返し、4℃、15000 rpm で 10 分間遠心した。上清を同量ずつ新しいチューブに移し、15 μl 1 M CHES（pH10.5）（Wako）と 10 μl 7.5 mM NTCB（Sigma）を加え、室温で一晩安置した。同時に残りの上清で Protein Assay Bicinchoninate kit（nacalai tesque）を用いてタンパク量を定量した。翌日、4xSample buffer を 25 μl 加え、さらにタンパク定量の結果に基づき 1xSample buffer をサンプル間の濃度が揃うように加えた。

2-4-2　ユビキチン化の解析

酵母をシリンジにて培養した後、50 OD の細胞を回収し、滅菌水で洗浄後、500 μl の buffer C（6 M guanidine-HCl（Wako）、50 mM Na-Phosphate（pH8.0）（Wako）、10 mM Tris-HCl（pH8.0）、300 mM NaCl（Wako）、5 mM NEM（nacalai tesque）、1 mM PMSF、0.5xComplete EDTA-free protease inhibitor cocktail）に懸濁した。スクリューキャップチューブに移し、ペレットと等量の zirconia beads 0.6 mm を加えた。ビーズ式細胞破砕装置 FastPrep-24（フナコシ、東京、日本）で 20 秒間細胞破砕した後、2 分間氷上に安置という

作業を 3 回繰り返し、4℃、15000 rpm で 15 分間遠心した。上清を同量ずつ新しいチューブに移し、Ni-NTA Agarose（QIAGEN, Hilden, Germany）と最終濃度が 10 mM となるように imidazole（Wako）を加え、4℃で 4 時間振盪した。buffer C + 20 mM imidazole で 1 回、buffer D（8 M urea、50 mM Na-Phosphate（pH8.0）、10 mM Tris-HCl（pH8.0）、300 mM NaCl、5 mM NEM、1 mM PMSF、0.5×Complete EDTA-free protease inhibitor cocktail）+ 20 mM imidazole で 1 回、buffer D（pH6.0）+ 20 mM imidazole で 2 回、計 4 回洗浄し、60 μl の 2xSample buffer + 0.6 M imidazole を加え 65℃で 15 分間加温し、遠心した上清を SDS-PAGE のサンプルとした。

2-5　SDS-PAGE、ウェスタンブロッティング

Running buffer（25 mM Tris-HCl（pH8.3）、191 mM glycine（Wako）、0.1% SDS）中で、サンプルの上清をポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけ、タンパク質を分離した。その後タンク式ブロッティング装置 NA-150（日本エイドー、東京、日本）中で、Transfer buffer（25 mM Tris-HCl（pH8.3）、192 mM glycine、20% methanol（Wako））を用いて PVDF メンブレン（GE healthcare, Little Chalfont, UK）に 150 mA 定電流で 70 分間転写した。タンパク質が転写された PVDF メンブレンを、1%スキムミルク（森永乳業、東京、日本）を含む PBS-T（137 mM NaCl（Wako）、2.7 mM KCl（Sigma）、10 mM $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$（Wako）、1.76 mM KH_2PO_4（Wako）、0.1% Tween 20（Wako））を用いて室温で 30 分間ブロッキング処理した。次に 1%スキムミルクを含む PBS-T で希釈した一次抗体を室温で 2 時間反応させた。PBS-T で 3 回洗浄し、1%スキムミルクを含む PBS-T で希釈した二次抗体を室温で 45 分間反応させた。その後 PBS-T で 3 回洗浄し、Luminata Forte Western HRP Substrate（Merck Millipore, Massachusetts, USA）または ECL select（GE healthcare）と反応させ、Versa Doc imaging system （Bio Rad, California, USA）を用いてバンドを検出した。一次抗体は anti-HA 16B12（Covance, New Jersey, USA） 1/1000 希釈、anti-Pgk（Invitrogen, California, USA）1/5000 希釈、anti-Flag M2（Sigma）1/3000 希釈で、二次抗体は anti-mouse IgG HRP conjugated（SouthernBiotech, Alabama, USA）1/5000 希釈で使用した。

第 3 章　結果

3-1　液相におけるイソフルラン処理は酵母の生育を阻害する

これまで、プレートに植菌した酵母細胞に対し 30℃のガスチャンバー内で 12%の気相にてイソフルランを作用させると、増殖が阻害されるという報告がなされている（6）。この濃度はヒトにおけるイソフルランの MAC（minimum alveolar concentration: 50%のヒトが痛み刺激に対し体動を示さなくなる時の肺胞濃度）の約 10 倍であり、メトキシフルラン、ハロタン、エンフルラン、セボフルランなど他の吸入麻酔薬でも同様の結果となった。本研究では液相でイソフルラン処理を行うことで、実際に細胞が生体内で麻酔薬に暴露される環境により近づけることを試みた。イソフルランは室温において液体であるが、高い揮発性を持つため通常の液体培地での培養法では一定濃度を細胞に暴露させることが困難であった。そこで文献（18）に準じてシリンジとキャップを用いて密閉環境にし、イソフルラン処理が可能な実験系を確立した（図 1-A)。イソフルラン処理後 6 時間培養すると、酵母細胞の生育はイソフルラン濃度依存的に阻害されることが確認された。

3-2　イソフルランは細胞膜上に存在する様々なトランスポーターの動態に影響する

これまで出芽酵母はイソフルラン処理により増殖が阻害され（6)、細胞膜上に存在するアミノ酸トランスポーターの過剰発現によりその増殖阻害が回復するという報告がなされている（8)。イソフルラン処理により、トランスポーターが局在の点で影響を受けている可能性を調べるために、酵母細胞の細胞膜上に存在するトランスポーターTat1、Bap2、Lyp1、Fur4、Hxt1 のゲノム上の遺伝子を GFP でラベルし、今回確立したイソフルラン処理の実験系を用いてそれぞれの局在の変化を観察した。Bap2 はイソフルラン非存在下では細胞膜に局在したが、イソフルラン処理により多くの細胞で典型的な液胞局在のパターンを示した（図 2)。0.08%のイソフルラン処理により、約 75%の細胞で Bap2 が液胞に局在していた（図 2 グラフ中の Both＋Vacuole)。また Tat1 もイソフルラン非存在下では細胞膜に局在したが、イソフルラン処理により液胞以外の細胞内への局在を示した（図 3)。そこで小胞体マーカー Sec63-mCherry と局在を比較したところ、イソフルラン処理により Tat1-GFP は Sec63-mCherry と一部共局在することが確認された（図 3 矢頭)。ウラシルトランスポーターFur4 ではイソフルラン処理により Bap2 の細胞膜局在が減少し、またグルコーストランスポーターHxt1 ではイソフルラン処理により液胞への局在が強くなる現象がみられた（図

4-A)。しかしながらリシントランスポーターLyp1 はイソフルラン処理による局在の変化が認められなかった（図 4-B)。このように、イソフルランがいくつかのトランスポーターの動態に影響することが明らかとなった。

通常、細胞膜上に存在するトランスポーターはエンドサイトーシスを経て液胞へと輸送されるが、新規に合成され小胞体、ゴルジ体から細胞膜を経由せず直接液胞へと輸送される経路も存在する（19)。これまでにみられたトランスポーターの局在変化がエンドサイトーシスにより生じているのかを確かめるため、End3 の欠失株を作製した。End3 はエンドサイトーシス初期のアクチン骨格の形成に関与する因子であり、その欠失により全てのエンドサイトーシスが欠損する（20)。イソフルラン処理により液胞への局在を示す Bap2 は、End3 欠失株では液胞への輸送がみられず細胞膜に局在したままであった（図 5)。また Bap2 は野生株では液胞へ輸送されたのち分解されるが、この輸送に関わる ESCRT 複合体の一つである Vps4（21）の欠失株では分解が抑制された（図 6)。以上のことから、イソフルラン処理による Bap2 の液胞局在はエンドサイトーシスにより輸送されたものであると考えられた。イソフルラン処理により小胞体への局在を示す Tat1 に関して、End3 を欠失させてもその局在変化は影響を受けなかった（図 7 矢頭)。すなわちトランスポーターが細胞膜から取り込まれ小胞体へ輸送されたものではなく、イソフルラン処理により新規に合成された Tat1 の分泌経路が阻害され、小胞体に集積している可能性が考えられた。

3-3　イソフルラン処理による Bap2 のエンドサイトーシスには TORC1 とは別の制御機構が関与する

Tor（Target of Rapamycin）はマクロライド系化合物ラパマイシンの細胞内標的として同定されたタンパク質キナーゼである。TORC1 はこの Tor を中心とする複合体で、単細胞生物から哺乳類に至るまで広く保存されている細胞増殖のマスター制御因子であり、翻訳、転写、オートファジーやトランスポーターのエンドサイトーシスなどを制御することが知られている（22)。ラパマイシンは TORC1 を抑制するはたらきを持つが、これまでラパマイシン処理により Bap2 の分解が促進されることが報告されている（23)。そこでラパマイシン処理後に Bap2 の局在を観察したところ、液胞へ輸送される現象がみられ、エンドサイトーシスが促進されていることが確認された（図 8)。また Fur4、Hxt1 においてもラパマイシン処理によるエンドサイトーシスの促進がみられた（図 4-A 右列)。Tat1 ではラパマイシン処理による局在の変化は認められなかった（図 3 右列)。イソフルランは Bap2 のエンドサイト

ーシスおよび分解を促進することから、ラパマイシンと同様に TORC1 を抑制してこれらの現象を制御している可能性を検討した。TORC1 の直接的基質である Sch9 は TORC1 が活性化されているときはリン酸化されバンドシフトがみられるが、ラパマイシン処理により TORC1 が不活性化されたときは脱リン酸化される（24）。しかしイソフルラン処理では、ラパマイシン処理時と同様の完全な脱リン酸化は認められなかった（図 9）。Npr2 は TORC1 を活性化させる GTR1 の GTPase-activating protein（GAP）であり、その欠失により TORC1 は常時活性化される（25）。しかし Npr2 を欠失させてもイソフルラン処理による Bap2 のエンドサイトーシスが抑制されることはなかった（図 10、*Δnpr2*）。これらのことから、イソフルランは TORC1 とは別の機構を介して Bap2 のエンドサイトーシスを促進していることが示唆された。

3-4　イソフルラン処理による Bap2 のエンドサイトーシスは Rsp5 依存的である

細胞膜上のトランスポーターや受容体タンパク質の多くは、栄養飢餓や細胞ストレスなどの環境の変化に応じてユビキチン化されることがシグナルとなり、エンドサイトーシスされることで量的調節される（12）。ユビキチン化システムは E1（ユビキチン活性化酵素）、E2（ユビキチン結合酵素）、E3（ユビキチン転移酵素＝ユビキチンリガーゼ）からなる酵素群である（26）。哺乳類細胞においては多種類のユビキチンリガーゼが様々な細胞膜上のタンパク質をユビキチン化するが、出芽酵母ではこれまで報告されたほとんどのエンドサイトーシスにおいて、HECT 型ユビキチンリガーゼである Rsp5 がユビキチン化を担う（13、14、15）。Rsp5 は Nedd4 ファミリーに属しヒトにおいては 9 つのホモログが存在するが、出芽酵母では唯一の Nedd4 ファミリータンパク質である（27）。この Rsp5 に着目し、イソフルランによる Bap2 のエンドサイトーシスも Rsp5 依存的である可能性を調べることとした。Rsp5 は欠失させると致死性となってしまうため、条件的 Rsp5 発現抑制株を作製した。ドキシサイクリン投与により可逆的に Tet-off プロモーターに由来する Rsp5 の発現を抑制させ、かつ Rsp5 の N 末端をロイシンに変化させることで N 末端ルールによりプロテアソームによる分解を受けやすくし、Rsp5 タンパク質自体を不安定化させる実験系を用いた（28）。この株をドキシサイクリン存在下で 6 時間培養することで、内在性 Rsp5 のタンパク質量をドキシサイクリン処理前の約 25%まで低下させることができた（図 11）。この条件で培養した細胞にイソフルラン処理を行い Bap2 の局在を観察したところ、イソフルラン処理後も Bap2 は液胞へ移行せず細胞膜に局在した（図 12）。このことは、Bap2 のエンドサイトーシスが

Rsp5 依存的であることを示している。ラパマイシン処理時も同様の結果となったことから、TORC1 の制御による Bap2 のエンドサイトーシスも Rsp5 依存的であることがわかった。また His pull-down アッセイの結果から、イソフルラン処理により Bap2 のユビキチン化が起こっていることも示唆された（図 14）。この実験系は、ユビキチン遺伝子を欠失させ 6xHis-Myc-Ubiquitin を発現するプラスミドを挿入し、目的タンパク質に 5xFlag をタグ付けした株を用い、Ni-NTA ビーズでプルダウンを行うことでユビキチン化された目的タンパク質が検出できるというものである（29）（図 13）。結果より、イソフルラン処理時には Bap2-5xFlag のバンドがイソフルラン非処理時よりも濃く検出され、Bap2 のユビキチン化がイソフルラン処理により生じていることが考えられた。

3-5　イソフルラン処理による Bap2 のエンドサイトーシスは Art2 に依存する

Rsp5 はトランスポーターをユビキチン化する際、各種アダプタータンパク質によりそれぞれのトランスポーターの元へリクルートされることが報告されている（16、17）。アダプタータンパク質は PY モチーフを有しており、それを介して Rsp5 が持つ WW ドメインと相互作用する（30）。アダプタータンパク質は十数種類存在するが、それぞれ認識するトランスポーターの種類やきっかけとなる環境の変化の内容によって、関与するものが決まっている（16、17）。イソフルラン処理による Bap2 のエンドサイトーシスに関わるアダプタータンパク質を同定する目的で、PY モチーフを有するアダプタータンパク質 17 種のそれぞれの欠失株を作製し、イソフルラン処理後の Bap2-GFP の局在観察のスクリーニングを行った。その結果、Art2 欠失株でイソフルラン処理後も Bap2 のエンドサイトーシスが抑制されることが明らかとなった（図 15）。これまでの報告では、Art2 は Tat2、Lyp1 や Smf1 などいくつかのトランスポーターのエンドサイトーシスの際に関与するアダプタータンパク質であることがわかっている（31）。次にイソフルラン処理時の Art2 の局在を調べた。Art2-GFP は通常培養時は細胞質中に一様に分布するが、イソフルラン処理により細胞膜近辺に複数の輝点を形成した（図 16-A）。Art2 の輝点形成はイソフルラン処理後 30 分経過してから観察され、増加傾向にあった（図 16-B）。この輝点はゴルジマーカーSec7 やエンドソームマーカーSnf7 とは重ならず、細胞膜近辺に形成されたことから Art2 はイソフルラン処理がきっかけとなり細胞膜近辺へ移行した可能性が考えられた。このことは、アダプタータンパク質が細胞膜上のトランスポーターの元へ Rsp5 をリクルートしている、という従来の仮説を支持する結果となっていると思われる。

3-6　TORC1 の制御による Bap2 のエンドサイトーシスに Bul1 が関与する

一方、ラパマイシン処理では Art2 欠失株でも野生株と変わらずエンドサイトーシスの促進が認められたため（図 15）、TORC1 の制御を介した Bap2 のエンドサイトーシスには Art2 は関与していないと考えられた。別のアダプタータンパク質 Bul1 を欠失させた株では、ラパマイシン処理後も多くの細胞で Bap2 が細胞膜にも局在している様子が認められ、Bap2 のエンドサイトーシスが部分的に抑制されていることがわかった（図 17-4、*Δbul1*）。このことから TORC1 の制御による Bap2 のエンドサイトーシスにアダプタータンパク質として Bul1 が関与していることが示唆された。

3-7　Bap2 のゴルジ体から液胞への輸送に Bul1 が関与する

さらに Bul1 欠失株ではイソフルラン処理により、Bap2 の細胞質内の輝点形成を認めた（図 17-4、*Δbul1*）。そこで Bul1Bul2 二重欠失株を作製し同様の実験を行ったところ、野生株に比べ液胞局在が減少し（図 18、グラフの vacuole）、輝点への局在が強く認められた（グラフの other）。次にこの輝点とゴルジ体マーカーSec7 との局在を比較した。その結果、Bap2 の輝点は Sec7 と共局在していたため、Bul1Bul2 の欠失により Bap2 がゴルジ体に局在すると考えられた（図 19）。2016 年 12 月のアメリカ細胞生物学会にてシカゴ大学の Benjamin S. Glick らが興味深い報告を行った。細胞膜上のトランスポーターがエンドサイトーシスされ液胞へ輸送される際に、ゴルジ体を経由しているというものである。これまで Gap1（全種類のアミノ酸の輸送を担うトランスポーター）は新規に合成されるとゴルジ体から細胞膜上に到達するものと、ゴルジ体から直接液胞へと輸送されるものがあることが報告されているが（20）、ゴルジ体から液胞への輸送の場合には Bul1Bul2 および Rsp5 による恒常的なユビキチン化が起こっているといわれている（32）。Bap2 の場合も Bul1Bul2 がゴルジ体から液胞への輸送に関わっており、Bap2 が細胞膜からエンドサイトーシスされ、ゴルジ体を経由した際、Bul1Bul2 の欠失のためにゴルジ体に集積している可能性が考えられた。

第 4 章　考察

本研究では吸入麻酔薬の作用機序の解明を目指し、イソフルランを酵母細胞に対し液相で作用させる実験系を確立することで細胞膜上のアミノ酸トランスポーターが液胞へエンドサイトーシスされることを見出した。これまで Gap1、Can1、Tat2、Smf1 といったいくつかのトランスポーターは Rsp5 依存的にユビキチン化され、そこにユビキチン認識ドメインを持つエンドサイトーシスの実行分子が相互作用することで、エンドサイトーシスされることが知られている（32、33、34、35）。今回 Rsp5 の発現を一過性に抑制することで Bap2 のエンドサイトーシスが抑制され（図 12）、またイソフルラン処理時に Bap2 のユビキチン化が起こっていることが確認された（図 14）。したがってイソフルラン処理による Bap2 のエンドサイトーシスもユビキチン化に依存すると考えられる。

今回さらに Bap2 は TORC1 を不活性化することでもエンドサイトーシスされることを示した（図 8）。これまでに報告されているトランスポーターのエンドサイトーシスの機序は、TORC1 を介して Rsp5 やそのアダプタータンパク質のはたらきによるものが多かった。例えば TORC1 が Npr1 キナーゼをリン酸化することで Npr1 が不活性型となりその基質 Art1 に作用できず、Art1 が脱リン酸化状態となりアルギニントランスポーターCan1 のもとへリクルートされることで Can1 のエンドサイトーシスを促進する、というモデルが提唱されている（33）。このモデルでは TORC1 が活性型の時に Can1 のエンドサイトーシスが促進されるが、今回の結果では Bap2 をはじめとするいくつかのトランスポーターはラパマイシン処理時、つまり TORC1 が不活性型の時にエンドサイトーシスされている。ところが今回、TORC1 を不活性化することにより Bap2 のエンドサイトーシスが促進されることを確認し、その際 Rsp5 およびアダプタータンパク質 Bul1 が部分的に関与していることがわかった（図 12、図 17）。Bul1 とそのパラログである Bul2 は、Rsp5 を介して Gap1 のエンドサイトーシスを制御していることがこれまでに報告されている（32）。また TORC1 下流の Npr1 が Bul1Bul2 を直接リン酸化することにより、Gap1 の Rsp5 依存的なユビキチン化を制御しているというモデルが提唱されている（36）。一方 Npr1 の欠失株でもラパマイシン処理による Bap2 のエンドサイトーシスは影響を受けなかったことから（図 10）、TORC1 の制御による Bap2 のエンドサイトーシスの機序には未知の因子やまだ知られていない関係が存在すると考えられる。

イソフルラン処理時も TORC1 活性は保たれていたことから（図 9）、イソフルラン処理時

はTORC1による制御とは別の機序がはたらいていると思われた。アダプタータンパク質のスクリーニングの結果から、イソフルランがArt2を介してBap2のエンドサイトーシスを促進することが判明した（図15）。Art2の細胞膜近辺への集積にはイソフルラン処理開始から30分程度を要し（図16）、この間イソフルラン処理により生じるBap2あるいはその周囲の細胞膜の性状の何らかの変化が重要であると考えられる。これに関してごく最近興味深い報告がなされた（37）。メチオニントランスポーターMup1はメチオニン非存在下では細胞膜に局在するが、メチオニン存在下でArt1-Rsp5のはたらきによりユビキチン化を受け液胞へ輸送される。この際Mup1の細胞質側に露出するN末のドメインが、メチオニン存在下に構造変化を起こすことでArt1がリクルートされ相互作用することができる、というものである。この二つの状態を遷移することでメチオニンの輸送を行っている可能性も議論されている。Bap2においても同様に、イソフルラン処理によりBap2に何らかの構造変化が生じ、その変化をArt2が認識している可能性が考えられる。一方、Tat1はイソフルラン処理により小胞体に集積することが確認された（図3）。小胞体から輸送されるためには、Tat1など積荷タンパク質の細胞質側のドメインとSec24などCOPⅡのコート分子が相互作用することが重要であると考えられている（38）。Tat1も同様にイソフルランにより構造変化をきたすことで、コート分子との相互作用ができなくなった可能性が想定される。

今後、今回見出したArt2依存的なエンドサイトーシスを指標に、イソフルランがBap2の二次構造、三次構造にどのような変化を及ぼすのかを調べることが可能になったと思われる。また今回の結果ではイソフルラン処理によりエンドサイトーシスされるトランスポーターによりその程度が異なることもわかった。今後はこれらのトランスポーターの特徴を比較し、中でもBap2がイソフルランにより最も影響を受ける理由を解明することで、イソフルランが膜タンパク質に与える変化を解明できるかもしれない。さらに今回は先行研究に習いイソフルランの作用のみを観察したが、他の吸入麻酔薬ではまた違った影響がみられる可能性も大いに考えられる。麻酔薬の作用機序については様々な研究がなされているが、麻酔薬が持つ様々な作用はそれぞれ別個のニューロンに起因しており、麻酔薬が作用する特定の膜タンパク質が関与する、という考え方も存在する（39）。もしイソフルランが特異的な配列・ドメインに結合し膜タンパク質の構造変化を起こしているのであれば、その配列・ドメインを持っている膜タンパク質のみがイソフルランにより影響を受けているかもしれない。その詳細を解明し、特定の膜タンパク質だけを標的にするよう新たな化合物を作成し何種類か併用すれば、副作用の発生を妨げ、意識消失、不動化、記憶消失などの望ましい作用だけを選

択的に生じさせることが可能になると考えられる。

第 5 章　謝辞

本稿を終えるにあたり、御懇切なる御指導、御鞭撻を賜りました大阪大学大学院歯学研究科　口腔科学フロンティアセンター　先端口腔生物学教室　野田健司教授ならびに大阪大学大学院歯学研究科　高次脳口腔機能学講座　歯科麻酔学教室　丹羽均教授に深甚なる謝意を表します。また本研究の進行にあたり、御指導ならびに御助言を頂きました大阪大学大学院歯学研究科　口腔科学フロンティアセンター　先端口腔生物学教室　荒木保弘助教、吉良新太郎助教に心より感謝申し上げます。本研究を行うにあたり、多大な御協力を頂きました大阪大学大学院歯学研究科　口腔科学フロンティアセンター　先端口腔生物学教室の教室員の皆様に厚く御礼申し上げます。最後に、私の研究と臨床の両立を様々な面で支えてくださった大阪大学大学院歯学研究科　高次脳口腔機能学講座　歯科麻酔学教室の教室員の皆様に心より感謝いたします。

第 6 章　参考文献

(1). James M. Sonner, Robert S. Cantor, 2013 Molecular mechanisms of drug action: an emerging view. *Annual Review of Biophysics* 42: 143-167

(2). Meyer H., 1899 Zur theorie der alkoholnarkose. *Arch. Exp. Pathol. Pharmakol.* 42: 109-118

(3). John A. Humphrey, Margaret M. Sedensky, Phil G. Morgan, 2002 Understanding anesthesia making genetic sense of the absence of senses. *Human Molecular Genetics* 11(10): 1241-1249

(4). Franks NP., Lieb WR., 1994 Molecular and cellular mechanisms of general anesthesia. *Nature* 367: 607-614

(5). Overton C. E., 1901 Studies of Narcosis. Gustav Fischer, Jena, Germany

(6). Keil R. L., D. Wolfe, T. Reiner, C. J. Peterson, J. L. Riley, 1996 Molecular genetic analysis of volatile-anesthetic action. *Mol. Cell. Biol.* 16: 3446-3453

(7). Batai I., M. Kerenyi, M. Tekeres, 1999 The impact of drugs used in anesthesia on bacteria. *Eur. J. Anesthesiol.* 16: 425-440

(8). Laura K. Palmer, Darren Wolfe, Jessica L. Keeley, Ralph L. Keil, 2002 VolatileAnesthetics Affect Nutrient Availability in yeast. *Genetics* 161: 563-574

(9). Schmidt A., M. N. Hall, A. Koller, 1994 Two FK506 resistance-conferring genes in *Saccharomyces cerevisiae*, TAT1 and TAT2, encode amino acid permeases mediating tyrosine and tryptophan uptake. *Mol. Cell. Biol.* 14: 6597-6606

(10). Regenberg B., L. During-Olsen, M. C. Kielland-Brandt, S. Holmberg, 1999 Substrate specificity and gene expression of the amino acid permeases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* 36: 317-328

(11). Grauslund M., T. Didion, M. C. Kielland-Brandt, H. A. Andersen, 1995 *BAP2*, a gene encoding a permease for branched-chain amino acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* 1269: 275-280

(12). Takeki Shiga, Nobuyuki Yoshida, Yuko Shimizu, Etsuko Suzuki, Toshiya Sasaki, Daisuke Watanabe, Hiroshi Takagi, 2014 Quality control of plasma membrane proteins by *Saccharomyces cerevisiae* Nedd4-like ubiquitin ligase Rsp5p under

environmental stress conditions. *Eukaryot Cell* 13(9): 1191-1199

(13). Rebecca Dunn, Linda Hicke, 2001 Multiple roles for Rsp5p-dependent ubiquitination at the internalization step of endocytosis. *The Journal of Biological Chemistry* 276(28): 25974-25981

(14). Dupre S., Urban-Grimal D., Haguenauer-Tsapis R., 2004 Ubiquitin and endocytic internalization in yeast and animal cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1695: 89-111

(15). Elsa Lauwers, Zoi Erpapazoglou, Rosine Haguenauer-Tsapis, Bruno Andre, 2010 The ubiquitin code of yeast permease trafficking. *Trends in Cell Biology* 20(4): 96-204

(16). Lin C.H., MacGurn J.A., Chu T., Stefan C.J., Emr. S.D., 2008 Arrestin-related ubiquitin-ligase adaptors regulate endocytosis and protein turnover at the cell surface. *Cell* 135: 714-725

(17). Léon S., Haguenauer-Tsapis R., 2009 Ubiquitin ligase adaptors: regulators of ubiquitylation and endocytosis of plasma membrane proteins. *Exp. Cell Res.* 315: 1574-1583

(18). Viachaslau M. Barodka, Edward Acheampong, Garry Powell, Ludmila Lobach, David A. Logan, Zahida Parveen, Valerie Armstead, Muhammad Mukhtar, 2006 Antimicrobial effects of liquid anesthetic isoflurane on *Candida albicans. Journal of Translational Medicine* 4: 46

(19). Roberg K.J., Bickel S., Rowley N., Kaiser C.A., 1997 Control of amino acid permease sorting in the late secretory pathway of *Saccharomyces cerevisiae* by *SEC13*, *LST4*, *LST7* and *LST8. Genetics* 147: 1569-1584

(20). Benedetti H, Susan Raths, Fabienne Crausaz, Howard Riezman, 1994 The *END3* gene encodes a protein that is required for the internalization step of endocytosis and for actin cytoskeleton organization in yeast. *Mol. Biol. Cell* 5(9): 1023-1037

(21). Markus Babst, Beverly Wendland, Eden J. Estepa, Scott D. Emr, 1998 The Vps4p AAA ATPase regulates membrane association of a Vps protein complex required for normal endosome function. *EMBO J.* 17(11): 2982-2993

(22). Stephan Wullschleger, Robbie Loewith, Michael N. Hall, 2006 TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* 124(3): 471-484

(23). Fumihiko Omura, Yukiko Kodama, Toshihiko Ashikari, 2001 The N-terminal domain of the yeast permease Bap2p plays a role in its degradation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 12; 287(5): 1045-1050

(24). Jorg Urban, Alexandre Soulard, Alexandre Huber, Soyeon Lippman, Debdyuti Mukhopadhyay, Olivier Deloche, Valeria Wanke, Dorothea Anrather, Gustav Ammerer, Howard Riezman, James R. Broach, Claudio De Virgilio, Michael N. Hall, Robbie Loewith, 2007 Sch9 is a major target of TORC1 in *Saccharomyces cerevisiae. Molecular Cell* 26: 663-674

(25). Kira S., Tabata K., Shirahama-Noda K., Nozoe A., Yoshimori T., Noda T., 2014 Reciprocal conversion of Gtr1 and Gtr2 nucleotide-binding states by Npr2-Npr3 inactivates TORC1 and induces autophagy. *Autophagy* 10(9): 1565-1578

(26). Daniel Finley, Aaron Ciechanover, Alexander Varshevsky, 1984 Thermolability of ubiquitin-activating enzyme from the mammalian cell cycle mutant ts85. *Cell* 37(1): 43-55

(27). Daniela Rotin, Sharad Kumar, 2009 Physiological functions of the HECT family of ubiquitin ligases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10(6): 398-409

(28). Sivakumar Vadivel Gnanasundram, Martin Koš, 2015 Fast protein-depletion system utilizing tetracycline repressible promoter and N-end rule in yeast. *Mol. Biol. Cell* 26(4): 762-768

(29). Junmin Peng, Daniel Schwartz, Joshua E. Elias, Carson C. Thoreen, Dongmei Cheng, Gerald Marsischky, Jeroen Roelofs, Daniel Finley, Steven P. Gygi, 2003 A proteomics approach to understanding protein ubiquitination. *Nature Biotechnology* 21: 921-926

(30). Ming Li, Yueguang Rong, Dan Peng, Scott D. Emr., 2015 Ubiquitin-Dependent Lysosomal Membrane Protein Sorting and Degradation. *Molecular Cell* 57: 467-478

(31). Elina Nikko, Hugh R. B. Pelham, 2009 Arrestin-mediated endocytosis of yeast plasma membrane transporters. *Traffic* 10: 1856-1867

(32). Helliwell S.B., Losko S., Kaiser C.A., 2001 Components of a ubiquitin ligase complex specify polyubiquitination and intracellular trafficking of the general amino acid permease. *J. Cell Biol.* 153: 649-662

(33). Jason MacGurn, Pi-Chiang Hsu, Marcus B. Smolka, Scott D. Emr, 2011 TORC1 regulates Endocytosis via Npr1-mediated phosphoinhibition of a ubiquitin ligase adaptor. *Cell* 147: 1104-1117

(34). Umebayashi K, Nakano A, 2003 Ergosterol is required for targeting of tryptophan permease to the yeast plasma membrane. *J. Cell Biol.* 161: 1117-1131

(35). Nikko E., Sullivan JA., Pelham HR., 2008 Arrestin-like proteins mediate ubiquitination and endocytosis of the yeast metal transporter Smf1. *EMBO Rep.* 9: 1216-1221

(36). Merhi A., André B., 2012 Internal amino acids promote Gap1 permease ubiquitylation via TORC1/Npr1/14-3-3-dependent control of the Bul arrestin-like adaptors. *Mol. Cell Biol.* 32: 4510-4522

(37). Evan L. Guiney, Till Klecker, Scott D. Emr., 2016 Identification of the endocytic sorting signal recognized by the Art1-Rsp5 ubiquitin ligase complex. *Mol. Biol. Cell* (27): 4043-4054

(38). Hirohiko Iwasaki, Tomohiro Yorimitsu, Ken Sato, 2015 Distribution of Sec24 isoforms to each ER exit site is dynamically regulated in *Saccharomyces cerevisiae. FEBS letters* 589: 1234-1239

(39). Beverley A. Orser, 2007 Lifting the fog around anesthesia. *Scientific American* 296(6): 54-61

(40). Carrie Baker Brachmann, Adrian Davies, Gregory J. Cost, Emerita Caputo, Joachim Li, Philip Hieter, Jef D. Boeke, 1998 Designer deletion strains derived from *Saccharomyces serevisiae* S288C: A useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast* 14(2): 115-32

(41). Jean Spence, Rayappa Raddy Gail, Gunnar Dittmar, Fred Sherman, Michael Karin, Daniel Finley, 2000 Cell cycle-regulated modification of the ribosome by a variant multiubiquitin chain. *Cell* 102(1): 67-76

(42). Daniel Finley, Bonnie Bartel, Alexander Varshavsky, 1989 The tails of ubiquitin precursors are ribosomal proteins whose fusion to ubiquitin facilitates ribosome biogenesis. *Nature* 338(6214): 394-401

(43). Carsten Janke, Maria M. Magiera, Nicole Rathfelder, Christof Taxis, Simone Reber,

Hiromi Maekawa, Alexandra Moreno-Borchart, Georg Doenges, Etienne Schwob, Elmar Schiebel, Michael Knop, 2004 A versatile toolbox for PCR-based tagging of yeast genes: new fluorescent proteins, more markers and promoter substitution cassettes. *Yeast* 21: 947-962

第 7 章　図表

表 1　使用株

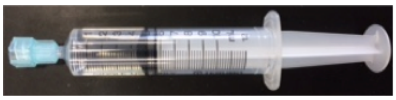
Strain	Genotype	Parent	Reference
BY4741	*MATa, his3D1 leu2D0 met15D0 ura3D0*		ref. 40
YMK119	*MATa, his3D1, leu2D0, met15D0, ura3D0, lys2::tTA, ura3::pCMVtetR'-SSN6 KlURA3 (tetOFF)*	BY4741	ref. 28
SUB280	*MATa, lys2-801, leu2-3, -112, ura3-52, his3-Δ200, trp1-1, ubi1-Δ1::TRP1, ubi2-Δ2::ura3, ubi3-Δub-2, ubi4-Δ2::LEU2 [pUB39] [pUB100]*	DBY1829	ref. 29, 41, 42
SUB592	*MATa, lys2-801, leu2-3, -112, ura3-52, his3-Δ200, trp1-1, ubi1-Δ1::TRP1, ubi2-Δ2::ura3, ubi3-Δub-2, ubi4-Δ2::LEU2 [pUB39] [pUB100] [pUB221]*	SUB280	ref. 41
FKY001	*TAT1-yeGFP::hph*	BY4741	this study
FKY003	*BAP2-yeGFP::hph*	BY4741	this study
FKY005	*LYP1-yeGFP::hph*	BY4741	this study
FKY008	*TAT1-yeGFP::hph, SEC63-mCherry::nat*	FKY001	this study
FKY010	*BAP2-3xHA::hph*	BY4741	this study
FKY013	*Δend3::kan, TAT1-yeGFP::hph, SEC63-mCherry::nat*	FKY008	this study
FKY014	*Δend3::kan, BAP2-yeGFP::hph*	FKY003	this study
MNY035	*SCH9-6xHA::hph*	BY4741	lab stock
FKY015	*TET07-UBI-LEU-3xHA-RSP5::nat*	YMK119	this study
FKY016	*BAP2-yeGFP::hph, TET07-UBI-LEU-3xHA-RSP5::nat*	FKY015	this study
FKY018	*Δnpr1::nat, BAP2-yeGFP::hph*	FKY003	this study
FKY019	*Δnpr2::nat, BAP2-yeGFP::hph*	FKY003	this study
FKY021	*Δart1::kan, BAP2-yeGFP::hph*	BY4741	this study
FKY022	*Δart2::kan, BAP2-yeGFP::hph*	BY4741	this study
FKY023	*Δart3::kan, BAP2-yeGFP::hph*	BY4741	this study
FKY024	*Δart4::kan, BAP2-yeGFP::hph*	BY4741	this study

FKY025	*△art5::kan, BAP2-yeGFP::hph*	BY4741	this study
FKY026	*△art6::kan, BAP2-yeGFP::hph*	BY4741	this study
FKY027	*△art7::kan, BAP2-yeGFP::hph*	BY4741	this study
FKY028	*△art8::kan, BAP2-yeGFP::hph*	BY4741	this study
FKY029	*△art9::kan, BAP2-yeGFP::hph*	BY4741	this study
FKY030	*△bsd2::kan, BAP2-yeGFP::hph*	BY4741	this study
FKY031	*△bul1::kan, BAP2-yeGFP::hph*	BY4741	this study
FKY032	*△bul2::kan, BAP2-yeGFP::hph*	BY4741	this study
FKY033	*△ear1::kan, BAP2-yeGFP::hph*	BY4741	this study
FKY034	*△rcr1::kan, BAP2-yeGFP::hph*	BY4741	this study
FKY035	*△rcr2::kan, BAP2-yeGFP::hph*	BY4741	this study
FKY036	*△sna3::kan, BAP2-yeGFP::hph*	BY4741	this study
FKY037	*△ssh4::kan, BAP2-yeGFP::hph*	BY4741	this study
FKY038	*△bul1::nat, △bul2::kan, BAP2-yeGFP::hph*	FKY032	this study
FKY043	*ART2-3yeGFP::nat*	BY4741	this study
FKY048	*△vps4::nat, BAP2-3xHA::hph*	FKY010	this study
FKY050	*ART2-3yeGFP::nat, SNF7-mCherry::hph*	FKY043	this study
FKY055	*BAP2-5xFLAG::hph, CUP1-6xHIS-MYC-UBI::TRP1*	SUB592	this study
FKY056	*BAP2-5xFLAG::hph*	SUB280	this study

表 2　使用プラスミド

Plasmid	Description	Reference
pFur4-GFP	pRS416/Fur4-GFP	lab stock
pGFP-Hxt1	pRS416/GFP-Hxt1	lab stock
pDsRed-Sec7	pRS316/DsRed-Sec7	lab stock
pFA6a-natNT2	template, nat (KO)	ref. 43
pYM24	template, hph (3xHA)	ref. 43
pYM25	template, hph (yeGFP)	ref. 43
pMK632	template, nat (Tet07-Ubi-Leu-3xHA)	ref. 28
pFA6a-kanMX6	template, kan (KO)	lab stock
pFA6a-zeoNT3	template, zeo (KO)	lab stock
pFA6a-3myeGFP-dcufc-natNT2	template, nat (3yeGFP)	lab stock
pKN12	template, nat (mCherry)	lab stock
pKN9	template, hph (mCherry)	lab stock
pKL255	template, hph (5xFlag)	lab stock

A



B

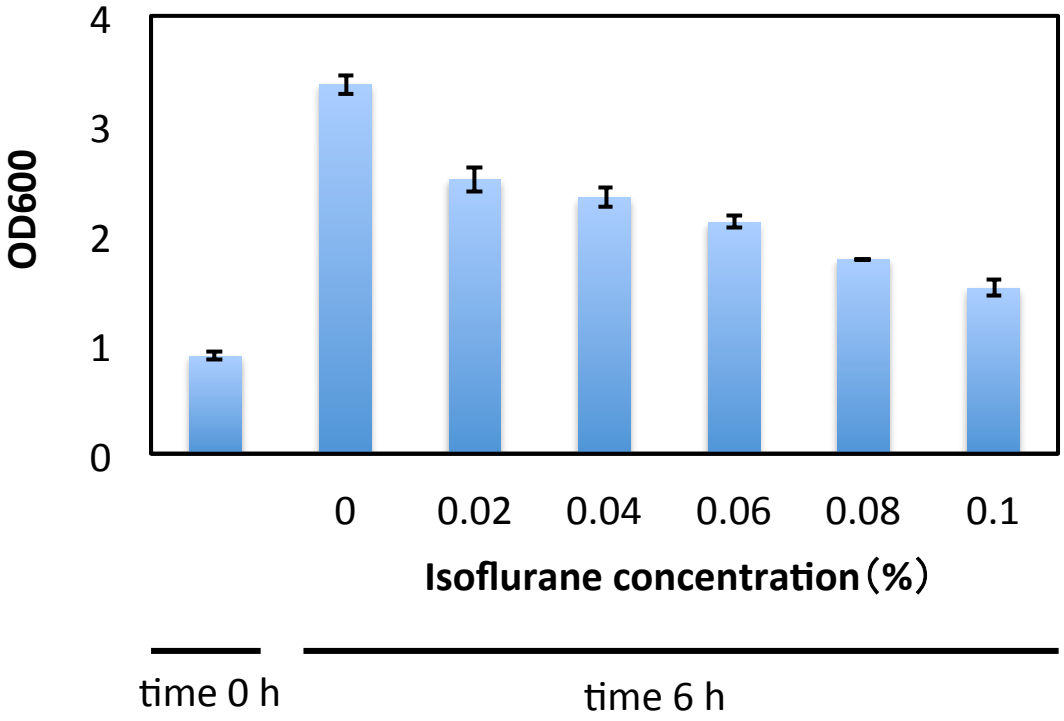


図1. 液相におけるイソフルラン処理は酵母の生育を阻害する

A. シリンジに培養液を入れ、DMSOで10倍に希釈したイソフルランをシリンジ先端より添加しすぐにキャップをして密栓し、振盪培養した。B. YPD液体培地で培養した野生株（BY4741）をシリンジに移し、各濃度のイソフルランを添加し、6時間培養した。グラフの縦軸は吸光度計にて求めた細胞のOD600値を示す。3回の独立した実験で得られた値を平均した値およびSD値を示す。

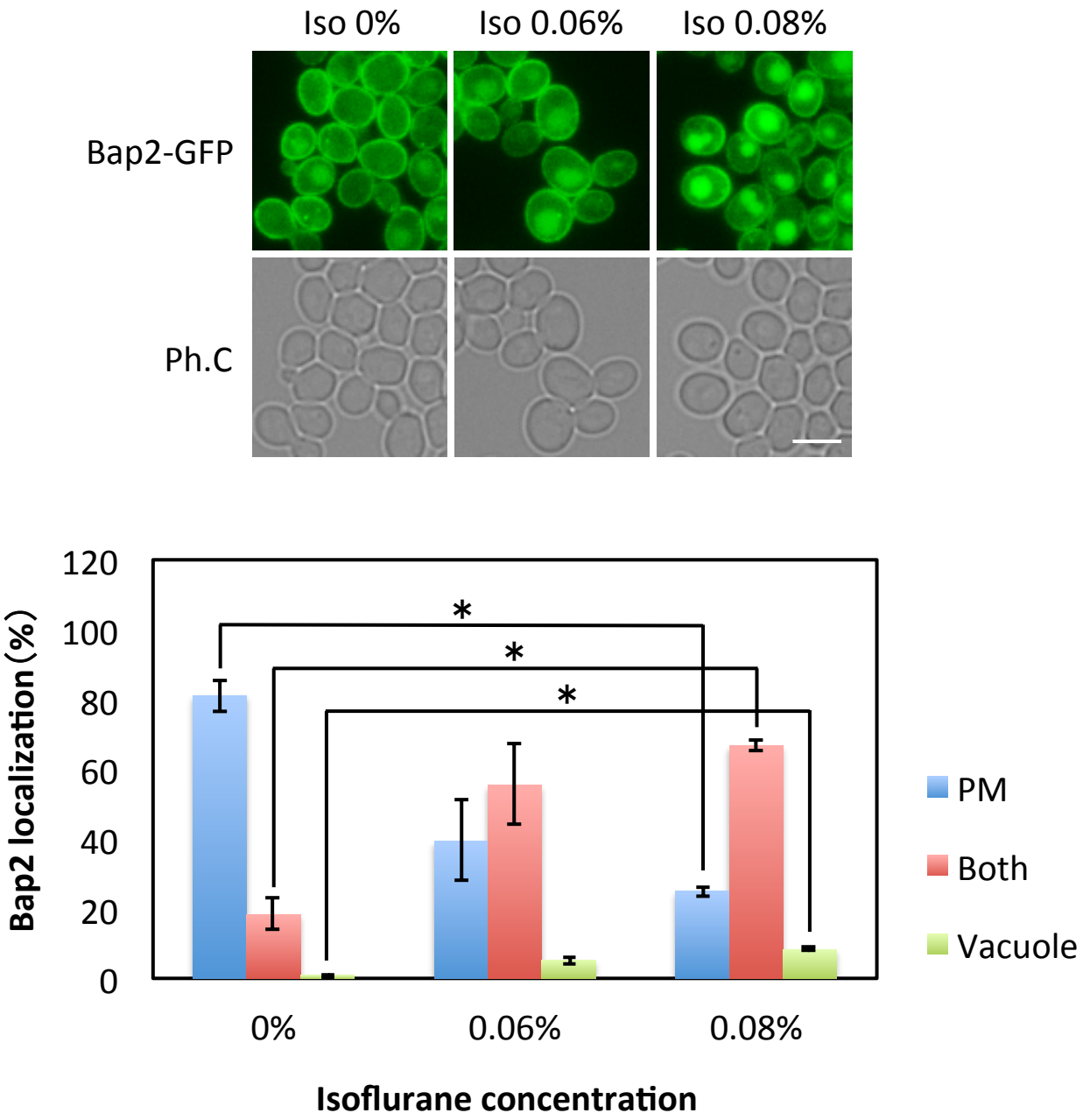


図2. イソフルランは細胞膜上に存在するBap2の動態に影響する

ゲノム上の*BAP2*のC末端にGFPを付加した株（FKY003）をSCD液体培地で培養した。シリンジに移し、DMSOで10倍に希釈したイソフルラン（以降図中でIsoと示す）を添加後2時間培養し、蛍光顕微鏡にて観察した。スケールバーは5 μmを示す。グラフはBap2の局在が細胞膜（PM）、細胞膜と液胞（Both）、液胞（Vacuole）にある細胞数をカウントしその割合を示す。3回の独立した実験で得られた値を平均した値およびSD値を示す。両側t検定により $p<0.05$ を有意差有りとする。（＊： $p<0.05$）

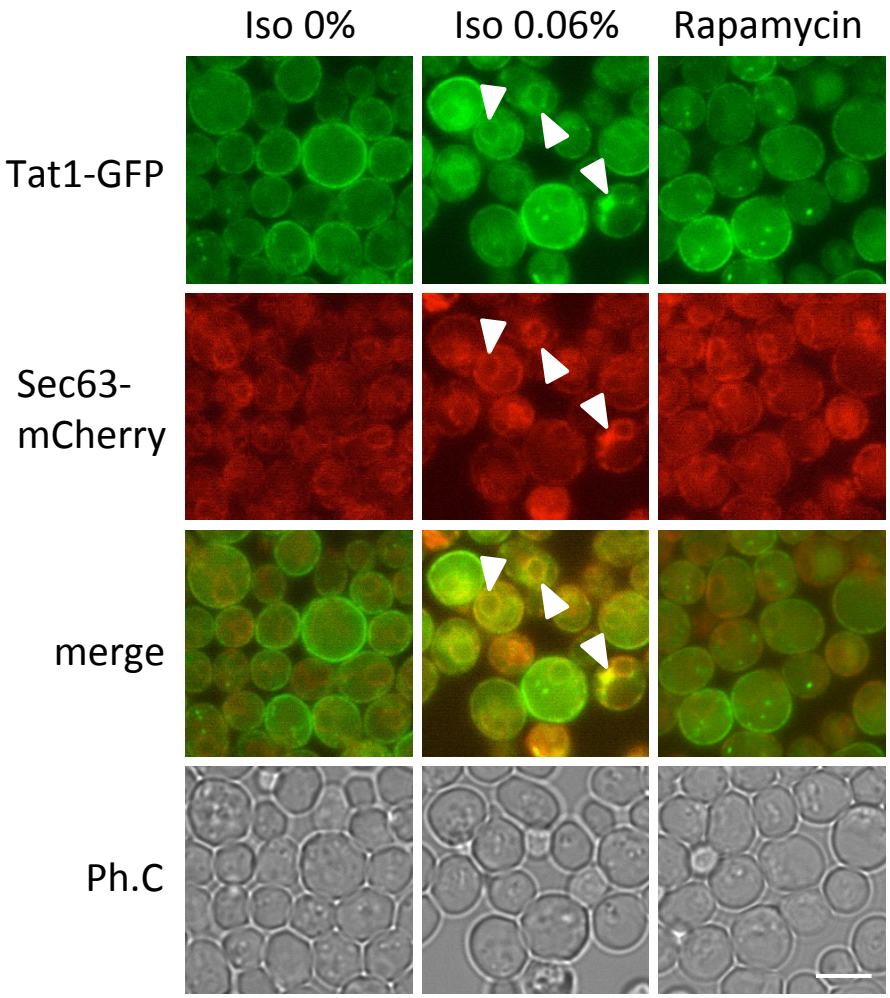


図3. イソフルランは細胞膜上に存在するTat1の動態に影響する

ゲノム上の*TAT1*のC末端にGFPを、*SEC63*のC末端にmCherryを付加した株（FKY008）をSCD液体培地で培養した。シリンジに移し、DMSOで10倍に希釈したイソフルラン0.06%またはラパマイシン（200 ng/ml）を添加後2時間培養し、蛍光顕微鏡にて観察した。スケールバーは5 µmを示す。Tat1-GFPとSec7-mCherryが共局在する部分を矢頭で示す。

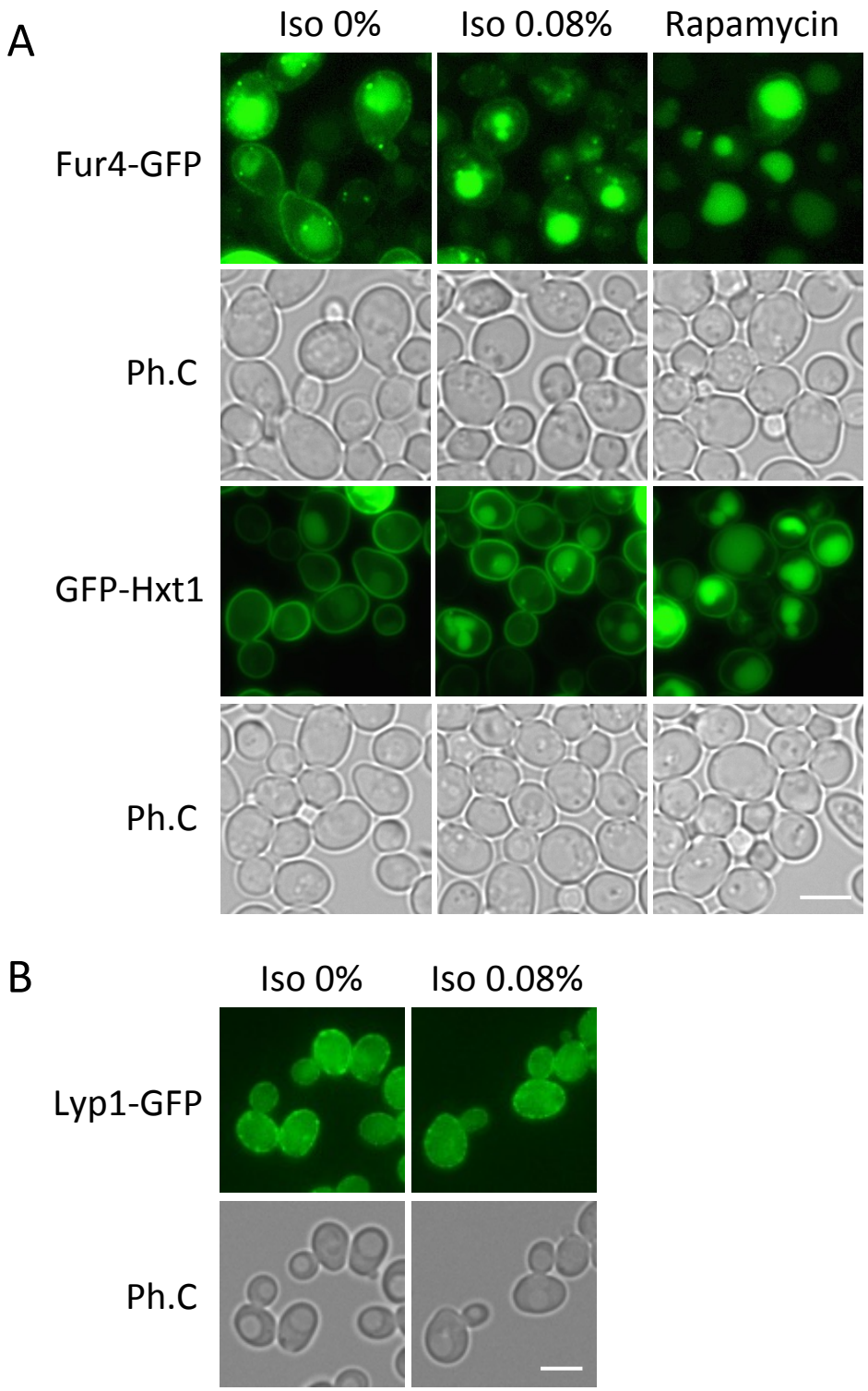


図4. イソフルランは細胞膜上に存在する様々なトランスポーターの動態に影響する

A. プラスミド（pFur4-GFP）を挿入しFur4-GFPを発現させた株、（pGFP-Hxt1）を挿入しGFP-Hxt1を発現させた株をSCD液体培地で培養した。シリンジに移し、DMSOで10倍に希釈したイソフルラン0.08%またはラパマイシン（200 ng/ml）を添加後2時間培養し、蛍光顕微鏡にて観察した。スケールバーは5 µmを示す。B. ゲノム上の*LYP1*のC末端にGFPを付加した株（FKY005）をSCD液体培地で培養し、Aと同様のイソフルラン処理を行った。スケールバーは5 µmを示す。

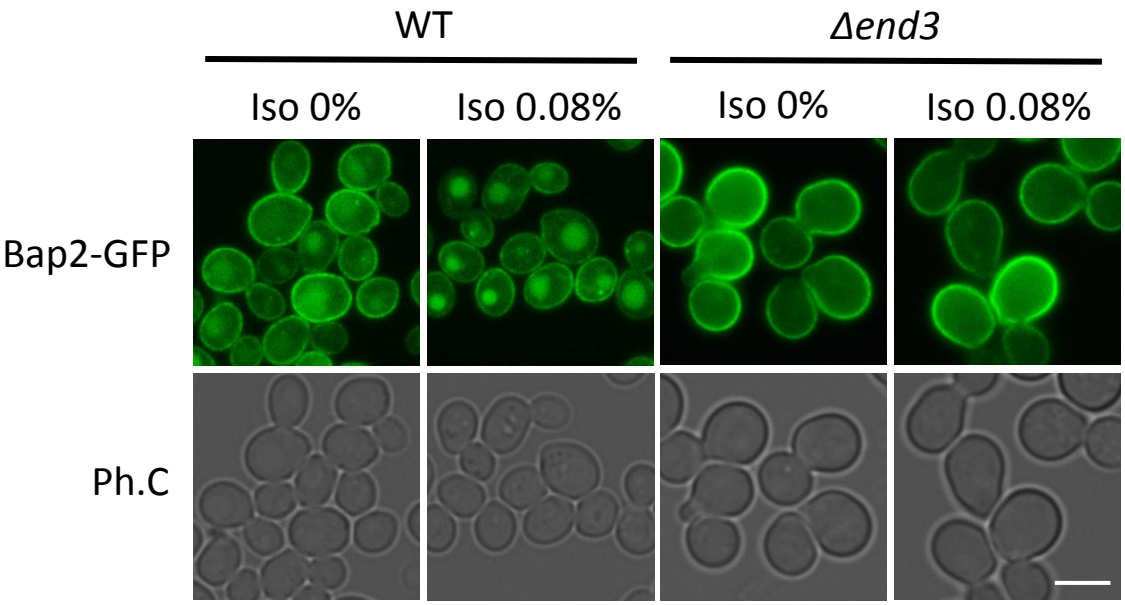


図5. エンドサイトーシス不能株ではBap2の液胞への輸送が抑制される

Bap2-GFPを発現した野生株（FKY003）および*END3*欠失株（FKY014）をSCD液体培地で培養した。シリンジに移し、DMSOで10倍に希釈したイソフルラン0.08%を添加後2時間培養し、蛍光顕微鏡にて観察した。スケールバーは5 μmを示す。

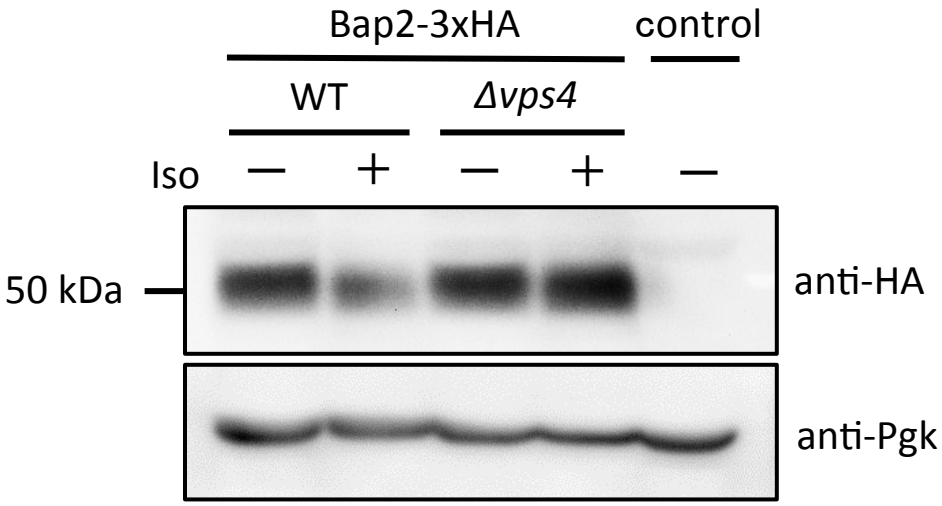


図6. エンドサイトーシス不能株ではBap2の分解が抑制される

Bap2-3xHAを発現した野生株（FKY010）および*VPS4*欠失株（FKY048）をYPD液体培地で培養した。シリンジに移し、DMSOで10倍に希釈したイソフルラン0.08%を添加後2時間培養した。回収した細胞を破砕しウェスタンブロッティングを行った。controlはBY4741株を示す。Pgkは内部標準。

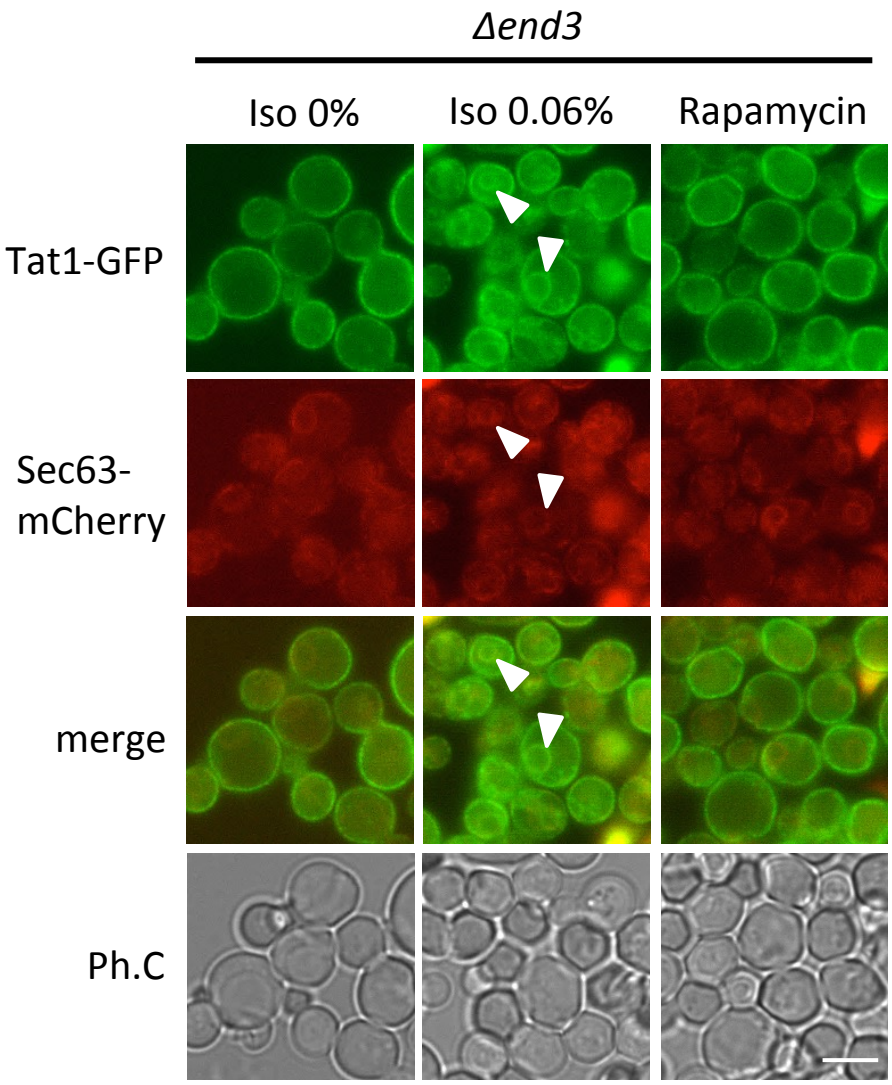


図7. エンドサイトーシス不能株ではイソフルラン処理によるTat1の局在変化は影響を受けない

Tat1-GFP、Sec63-mCherryを発現した*END3*欠失株（FKY013）をSCD液体培地で培養した。シリンジに移し、DMSOで10倍に希釈したイソフルラン0.06%またはラパマイシン（200 ng/ml）を添加後2時間培養し、蛍光顕微鏡にて観察した。スケールバーは5 μmを示す。Tat1-GFPとSec7-mCherryが共局在する部分を矢頭で示す。

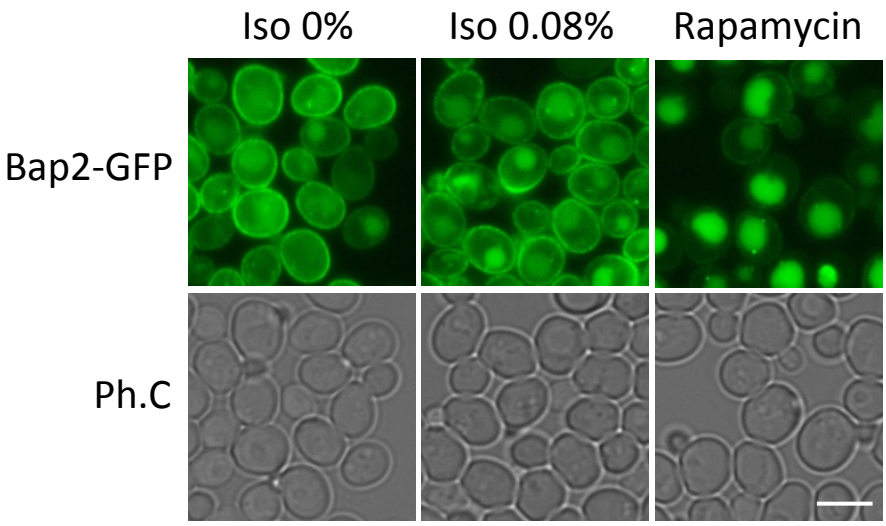


図8. ラパマイシンはBap2のエンドサイトーシスを促進する

Bap2-GFPを発現した株（FKY003）をSCD液体培地で培養した。シリンジに移し、DMSOで10倍に希釈したイソフルラン0.08%またはラパマイシン（200 ng/ml）を添加後2時間培養し、蛍光顕微鏡にて観察した。スケールバーは5 μmを示す。

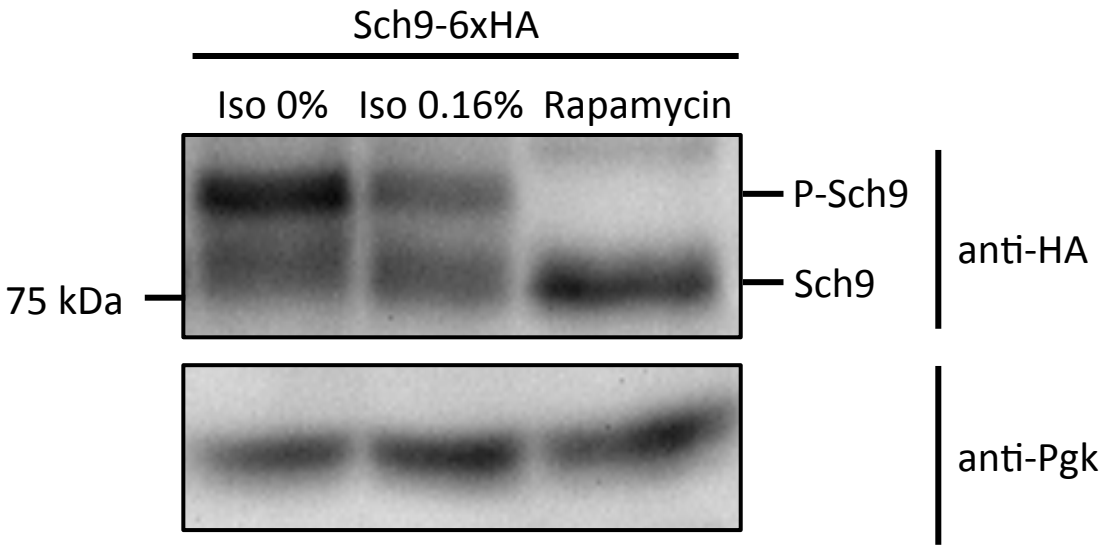


図9. Sch9のリン酸化はイソフルラン処理による影響を受けない

. ゲノム上の*SCH9*のC末端に6xHAを付加した株（MNY035）をYPD液体培地で培養した。シリンジに移し、DMSOで10倍に希釈したイソフルラン0.16%またはラパマイシン（200 ng/ml）を添加後2時間培養した。回収した細胞にNTCB処理を行い、ウェスタンブロッティングを行った。Pgkは内部標準。

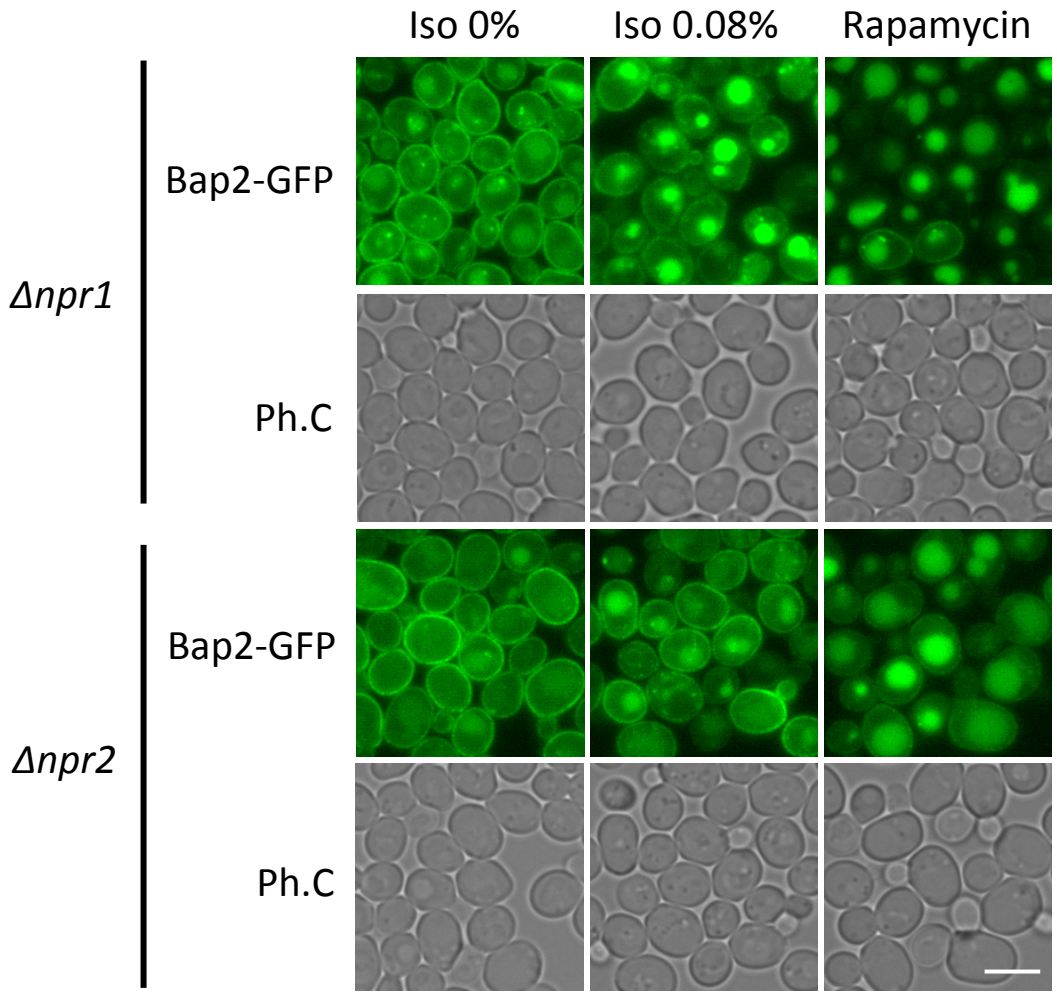


図10. Npr1、Npr2欠失株ではイソフルラン処理によるBap2のエンドサイトーシスは影響を受けない

Bap2-GFPを発現した*NPR1*欠失株（FKY018）および*NPR2*欠失株（FKY019）をSCD液体培地で培養した。シリンジに移し、DMSOで10倍に希釈したイソフルラン0.08%またはラパマイシン（200 ng/ml）を添加後2時間培養し、蛍光顕微鏡にて観察した。スケールバーは5 μmを示す。

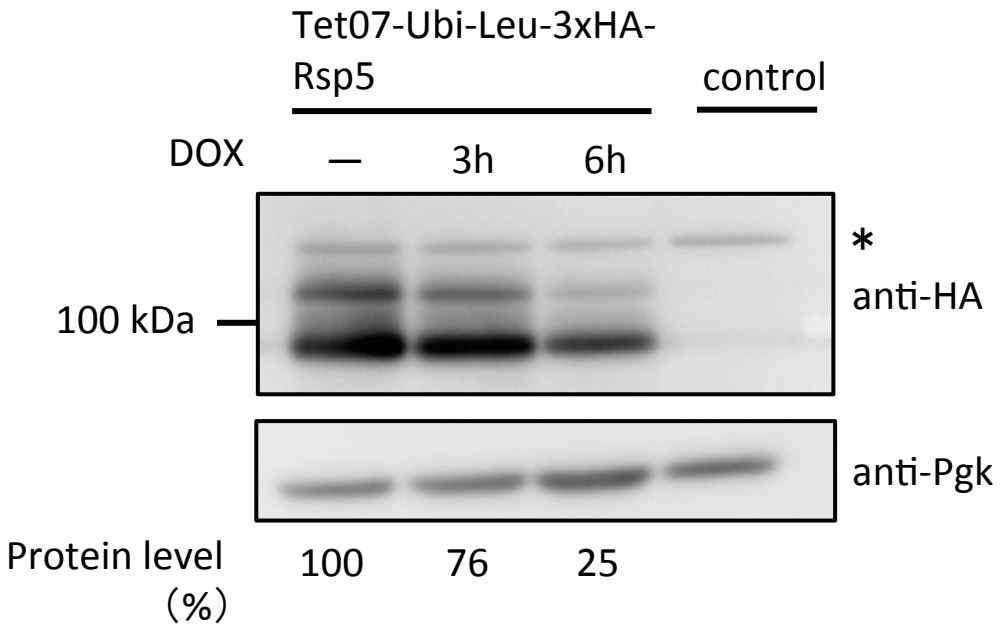


図11. Tet-off & Degron 実験系の確立

ゲノム上の*RSP5*のN末にtet07-Ubi-Leu-3xHAをタグ付けした株（FKY015）をSCD液体培地で培養した。ドキシサイクリン（4 μg/ml）を添加し3時間または6時間培養した後回収した細胞を破砕しウェスタンブロッティングを行った。controlはBY4741株を示す。＊はバックグラウンド。Pgkは内部標準。下段の数字はドキシサイクリン非処理時のRsp5タンパク質量を100としたときのタンパク質量の割合を示す。解析はImage Jを用いた。

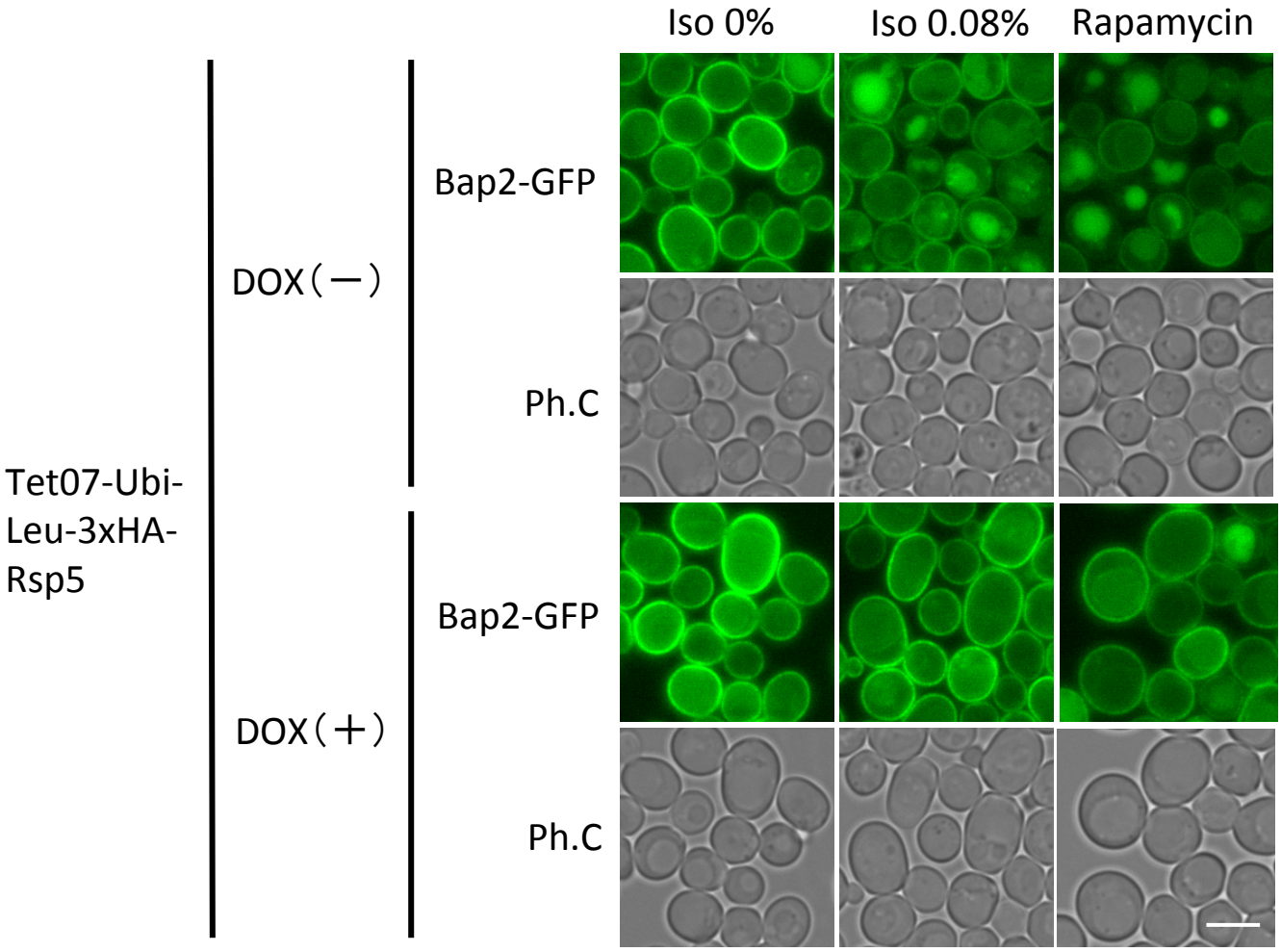


図12. Rsp5発現抑制株ではイソフルラン処理によるBap2のエンドサイトーシスが抑制される

Bap2-GFPおよびtet07-Ubi-Leu-3xHA-Rsp5を発現した株（FKY016）をSCD液体培地で培養し、ドキシサイクリン（4 μg/ml）を添加し6時間培養した。シリンジに移し、DMSOで10倍に希釈したイソフルラン0.08%またはラパマイシン（200 ng/ml）を添加後2時間培養し、蛍光顕微鏡にて観察した。スケールバーは5 μmを示す。

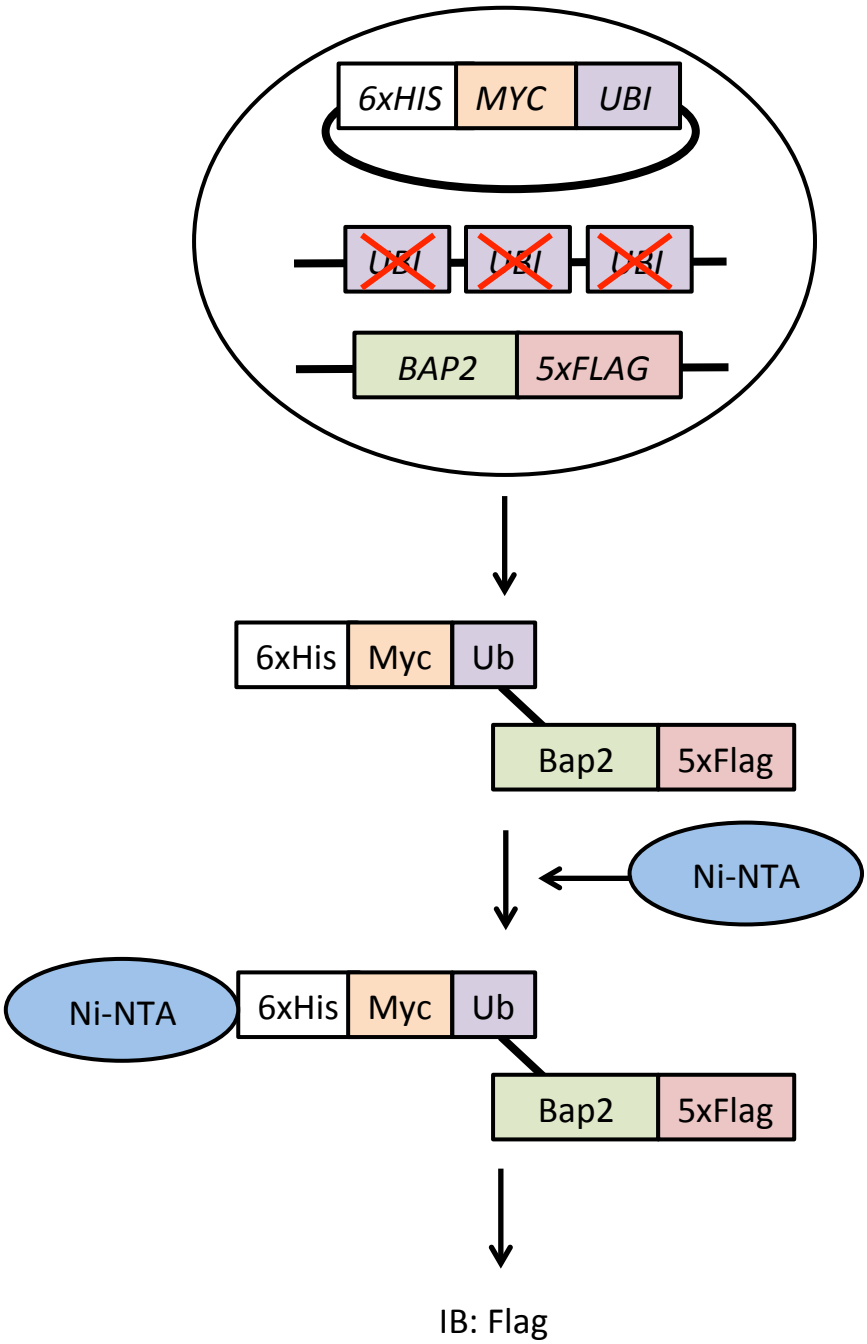


図13. His pull-down アッセイ

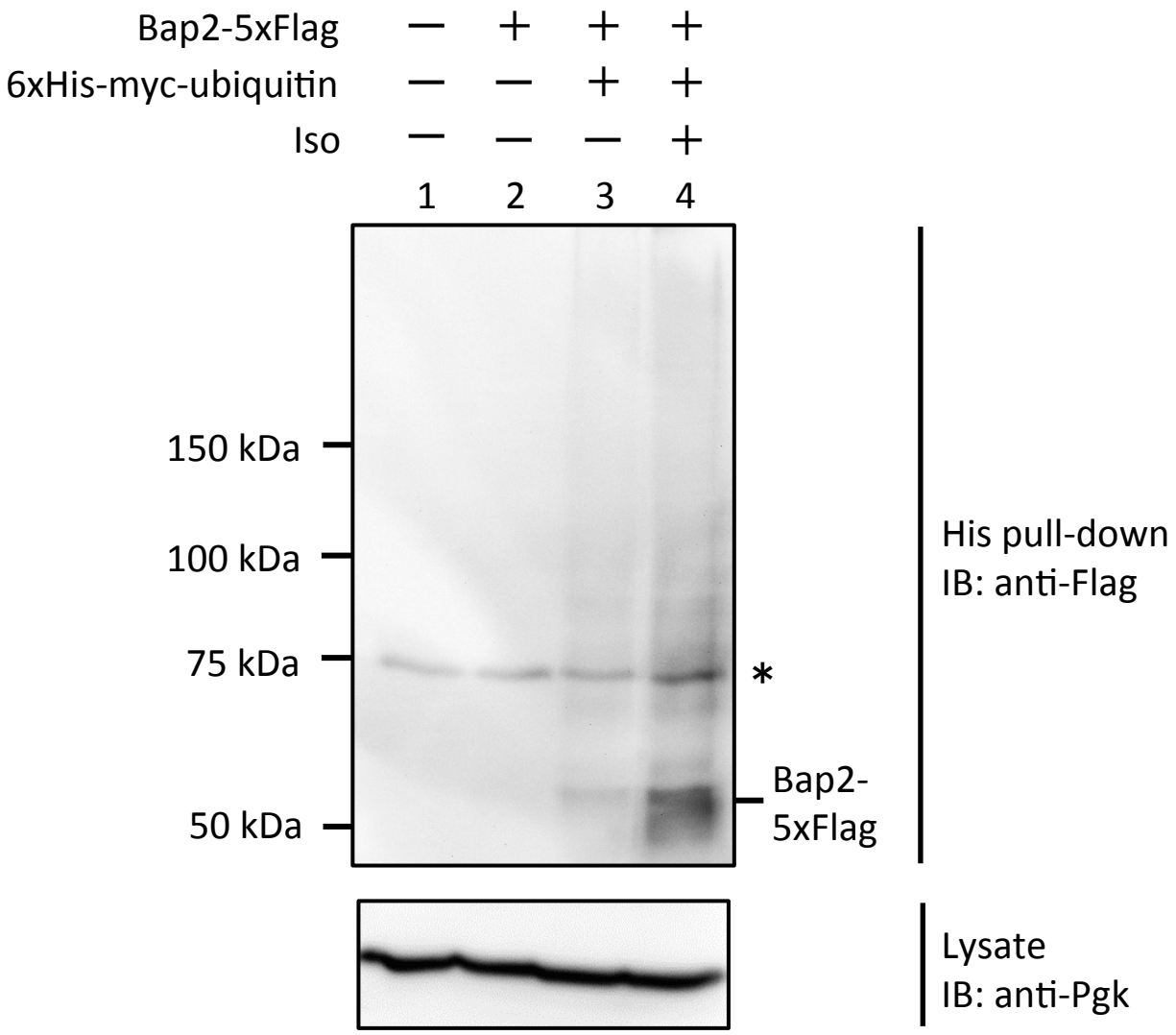


図14. イソフルラン処理によりBap2のユビキチン化が起こることが示唆される

すべてのユビキチン遺伝子を欠失させ6xHis-myc-ubiquitin発現プラスミドを挿入し、ゲノム上の*BAP2*のC末端に5xFlagをタグ付けした株（FKY055）をYPD液体培地で培養した。シリンジに移し、DMSOで2倍に希釈したイソフルラン0.16%を添加後2時間培養した。回収した細胞を破砕しHis pull-down アッセイを行いウェスタンブロッティングを行った。ネガティブコントロールとしてwild-type ubiquitin発現プラスミドを挿入した野生株（SUB280）（レーン1）および*BAP2*のC末端に5xFlagをタグ付けした株（FKY056）（レーン2）を用いた。＊はバックグラウンド。Pgkは内部標準。

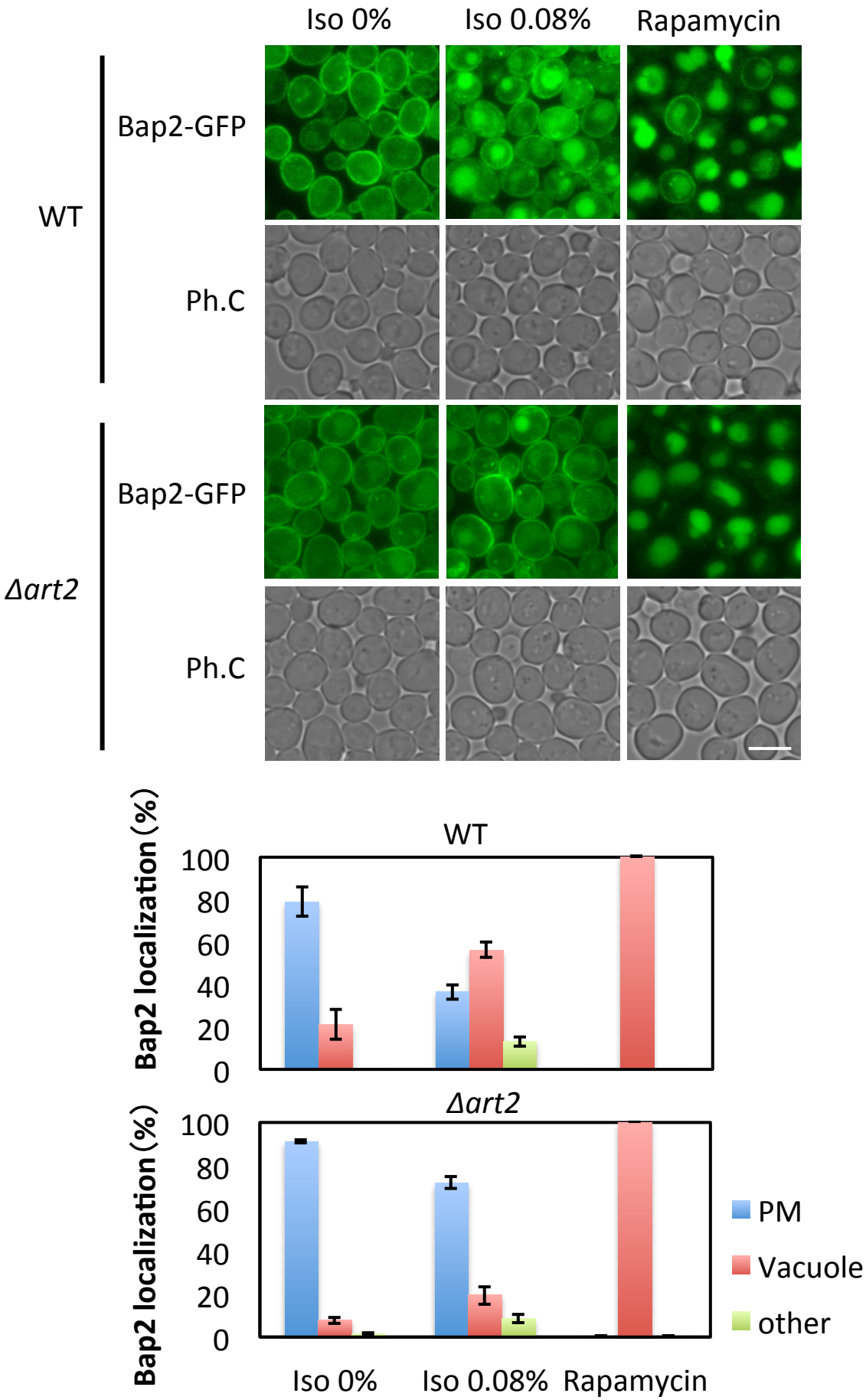

Iso 0%
Iso 0.08%
Rapamycin
WT
Bap2-GFP
Ph.C
Δart2
Bap2-GFP
Ph.C
WT
Bap2 localization (%)
100
80
60
40
20
0
Δart2
Bap2 localization (%)
100
80
60
40
20
0
PM
Vacuole
other
Iso 0%
Iso 0.08%
Rapamycin

図15. Art2欠失株ではイソフルラン処理によるBap2のエンドサイトーシスが抑制される

Bap2-GFPを発現した野生株（FKY003）および*ART2*欠失株（FKY022）をSCD液体培地で培養した。シリンジに移し、DMSOで10倍に希釈したイソフルラン0.08%またはラパマイシン（200 ng/ml）を添加後2時間培養し、蛍光顕微鏡にて観察した。スケールバーは5 µmを示す。グラフはBap2の局在が細胞膜（PM）、液胞（Vacuole）、その他（other）にある細胞数をカウントしその割合を示す。3回の独立した実験で得られた値を平均した値およびSD値を示す。

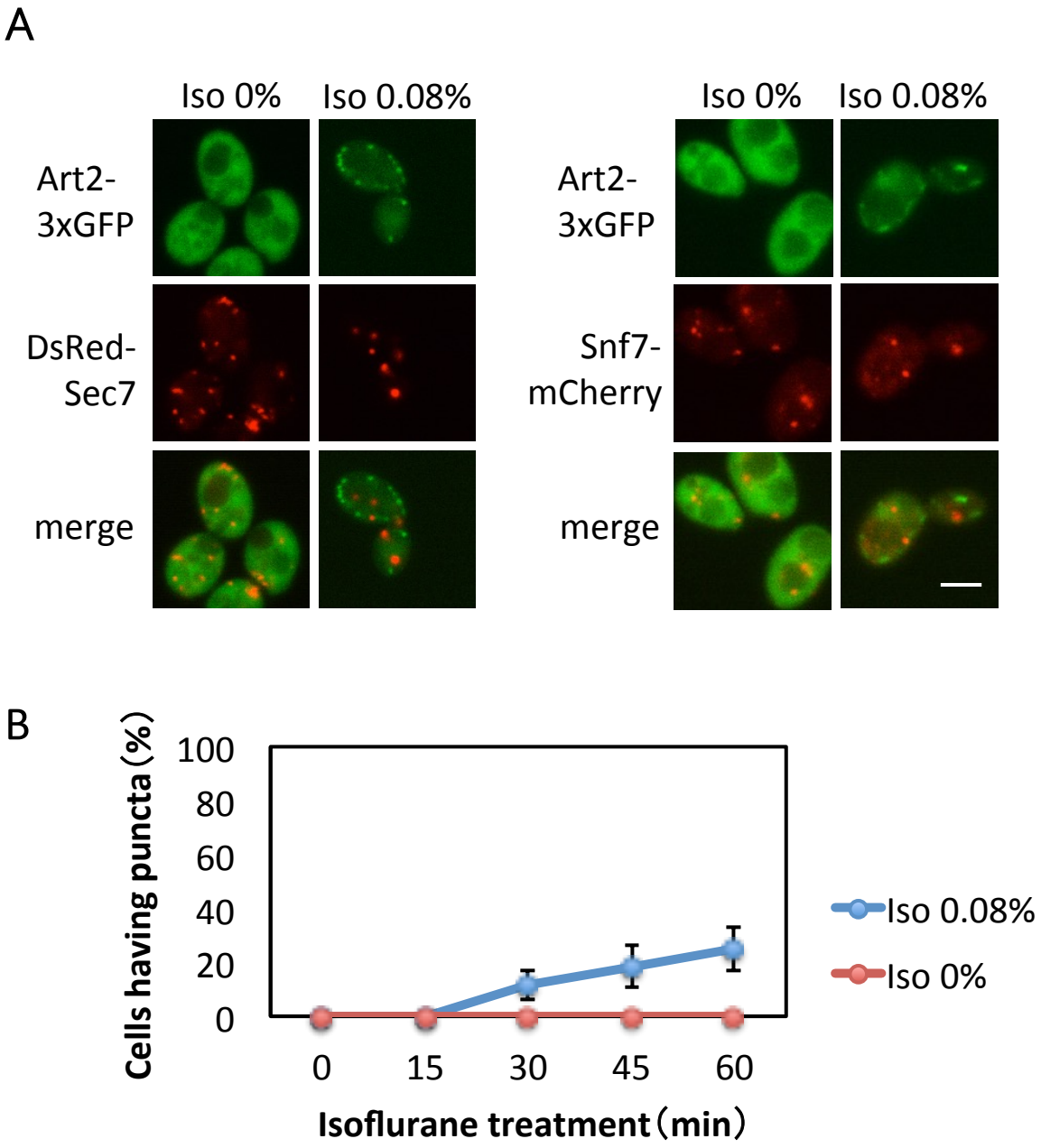


図16. イソフルラン処理によりArt2は細胞膜近辺に集積する

A. Art2-3xGFPを発現した株（FKY043）にプラスミド（pDsRed-Sec7）を挿入しDsRed-Sec7を発現させた株およびArt2-3xGFP、Snf7-mCherryを発現させた株（FKY050）をSCD液体培地で培養した。シリンジに移し、DMSOで10倍に希釈したイソフルラン0.08%を添加後1時間培養し、蛍光顕微鏡にて観察した。スケールバーは5 μmを示す。B. イソフルラン添加後0、15、30、45、60分経過したときの輝点が観察された細胞の割合を示す。3回の独立した実験で得られた値を平均した値およびSD値を示す。

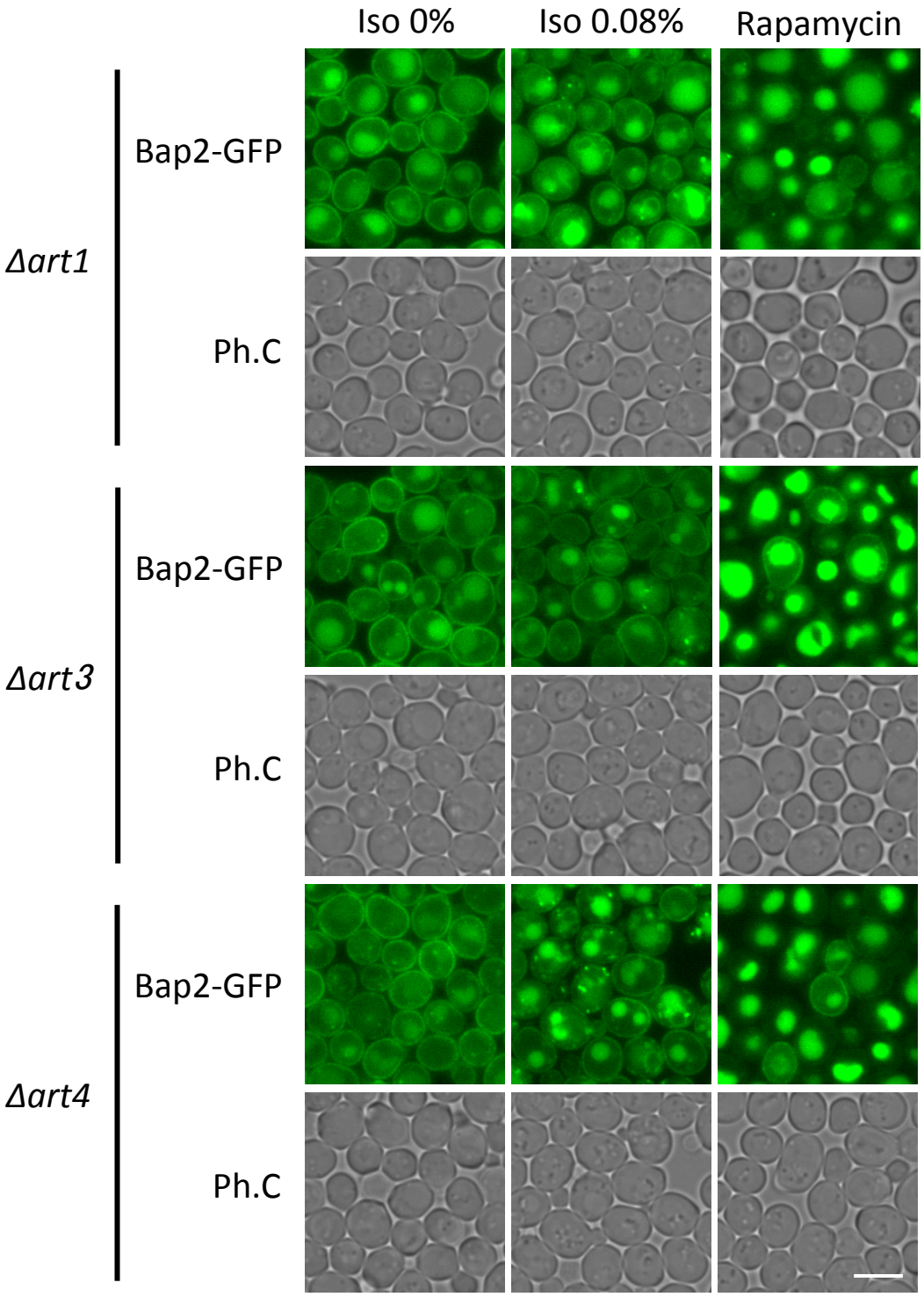


図17-1. アダプタータンパク質の欠失株におけるBap2の動態への影響

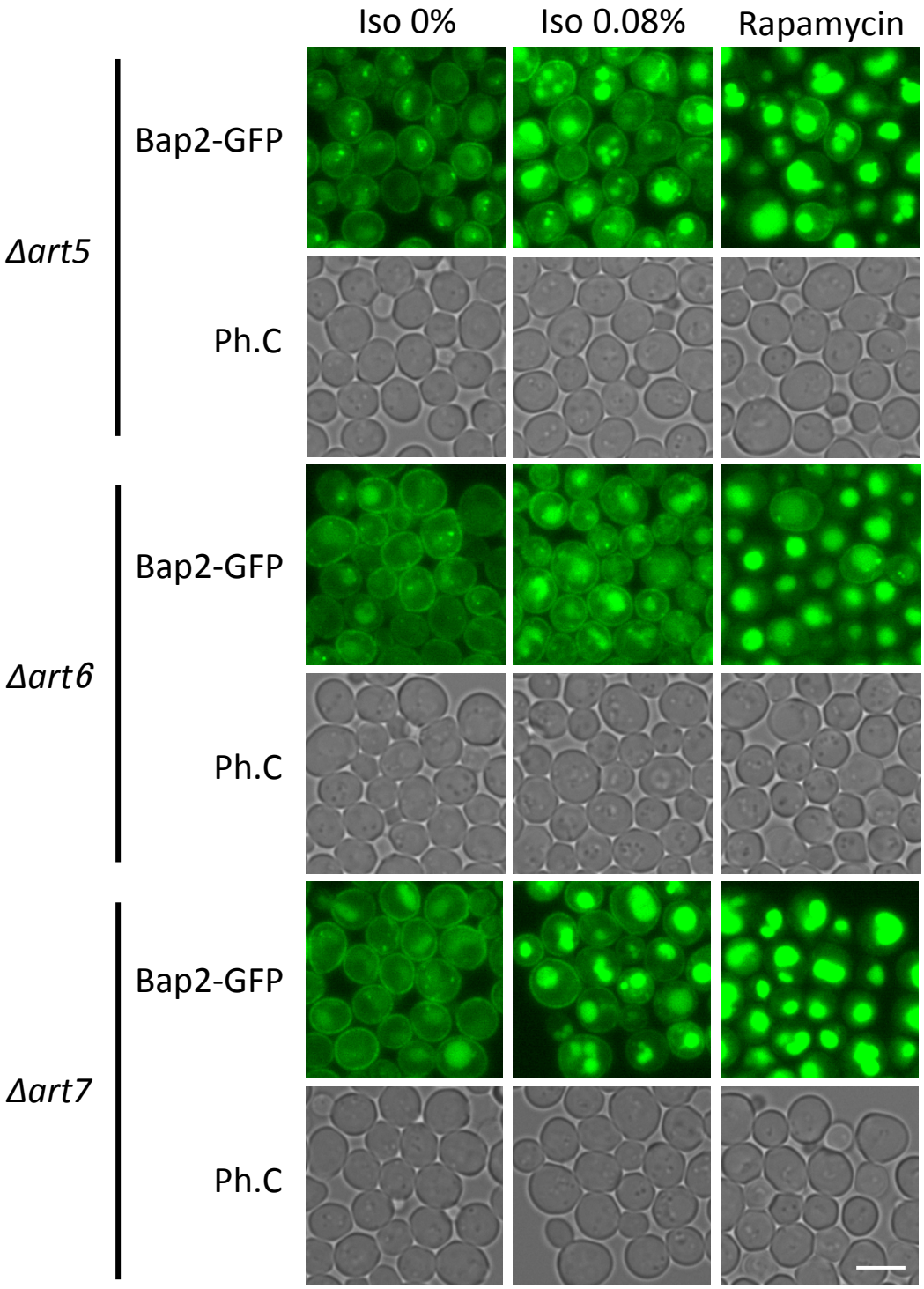


図17-2. アダプタータンパク質の欠失株におけるBap2の動態への影響

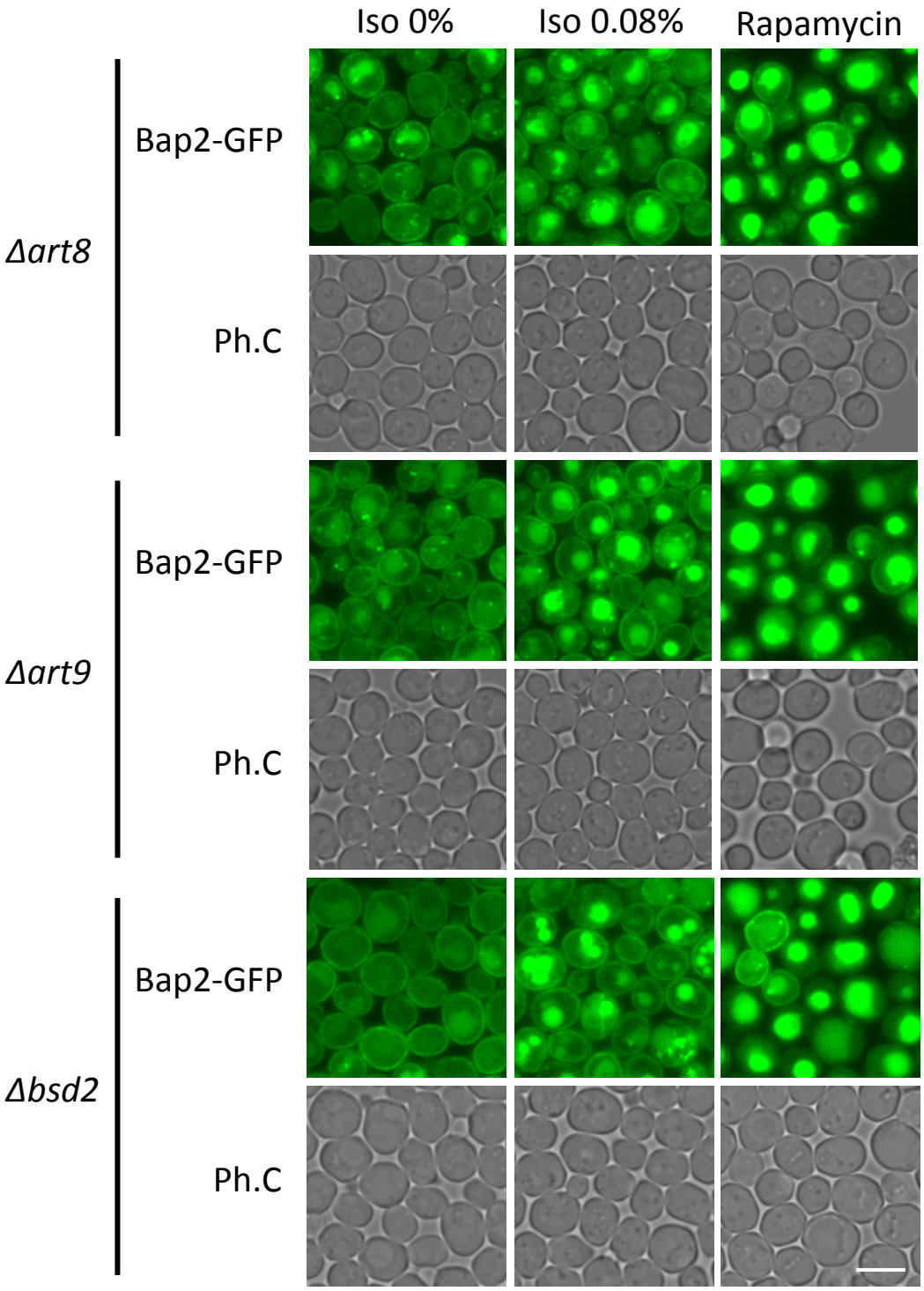


図17-3. アダプタータンパク質の欠失株におけるBap2の動態への影響

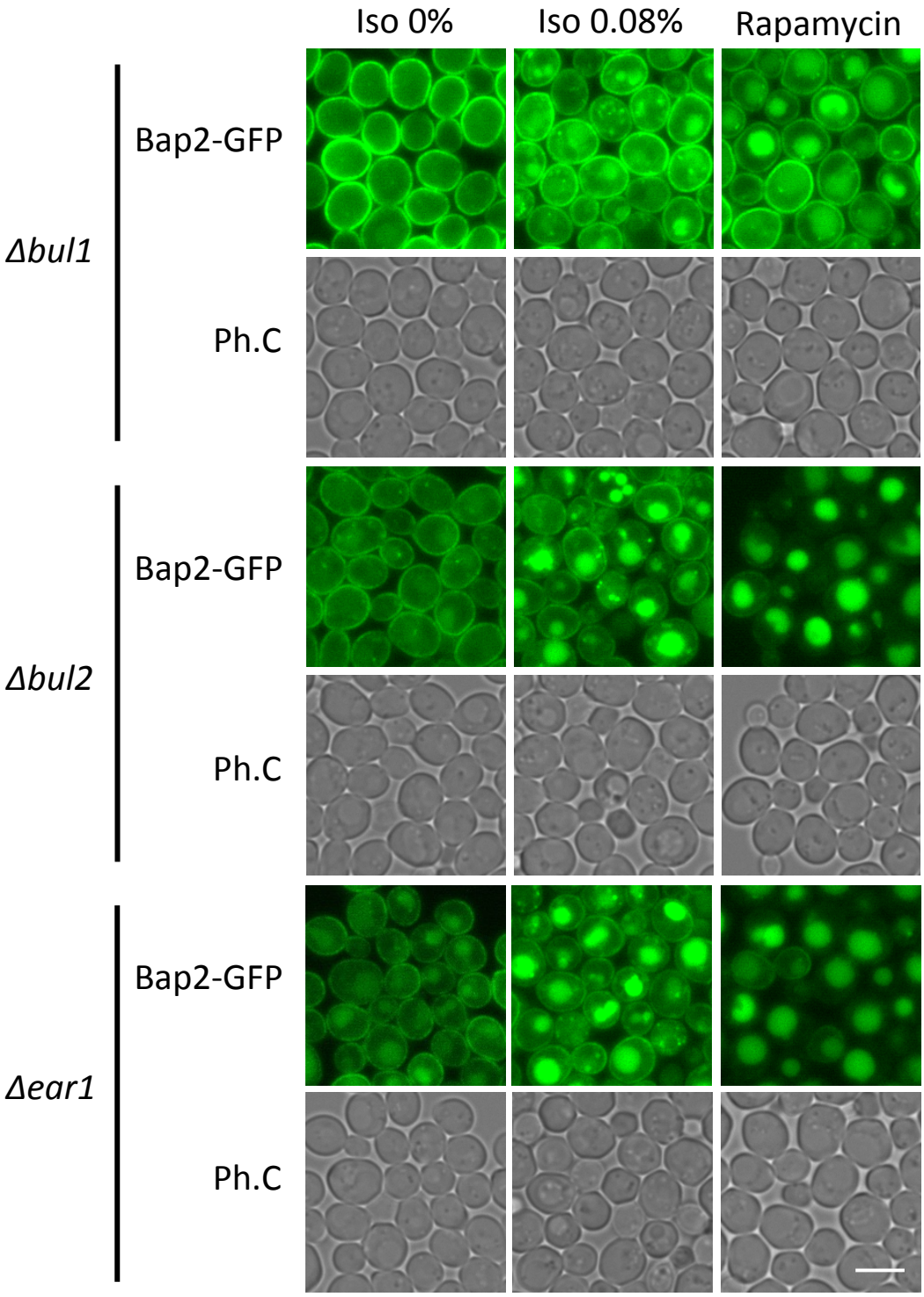


図17-4. アダプタータンパク質の欠失株におけるBap2の動態への影響

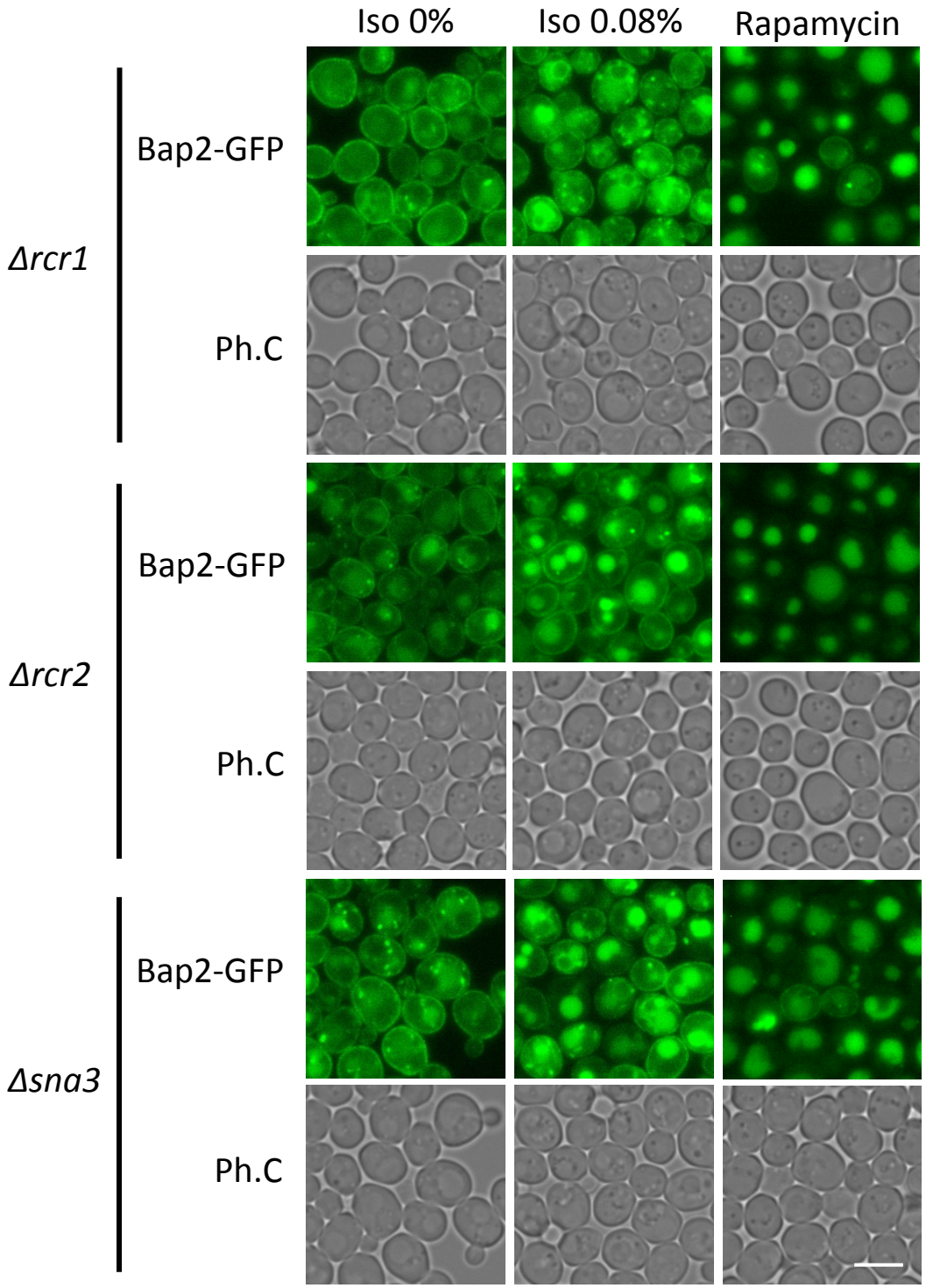


図17-5. アダプタータンパク質の欠失株におけるBap2の動態への影響

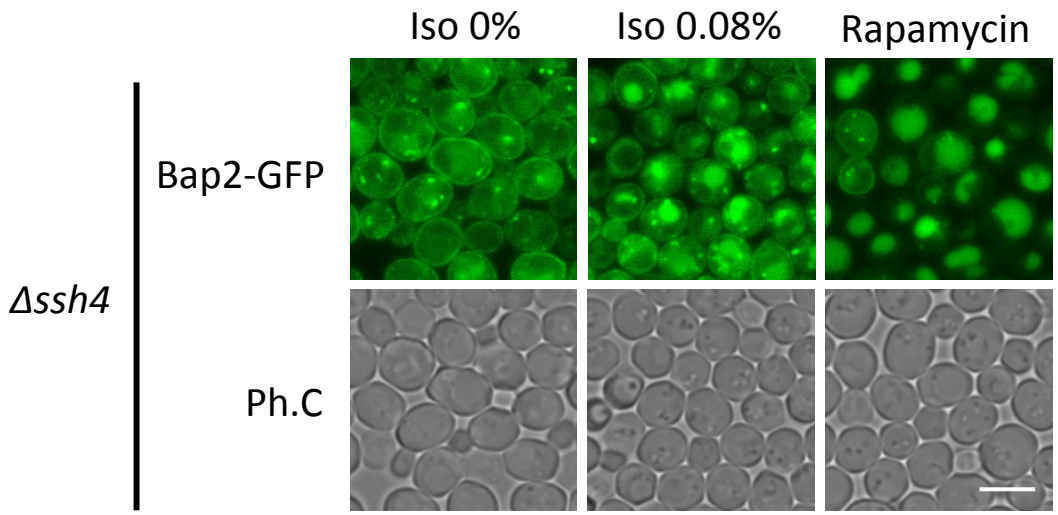


図17-6. アダプタータンパク質の欠失株におけるBap2の動態への影響

Bap2-GFPを発現し、それぞれのアダプタータンパク質を欠失させた株（FKY021、FKY023、FKY024、FKY025、FKY026、FKY027、FKY028、FKY029、FKY030、FKY031、FKY032、FKY033、FKY034、FKY035、FKY036、FKY037）をSCD液体培地で培養した。シリンジに移し、DMSOで10倍に希釈したイソフルラン0.08%またはラパマイシン（200 ng/ml）を添加後2時間培養し、蛍光顕微鏡にて観察した。スケールバーは5 μmを示す。

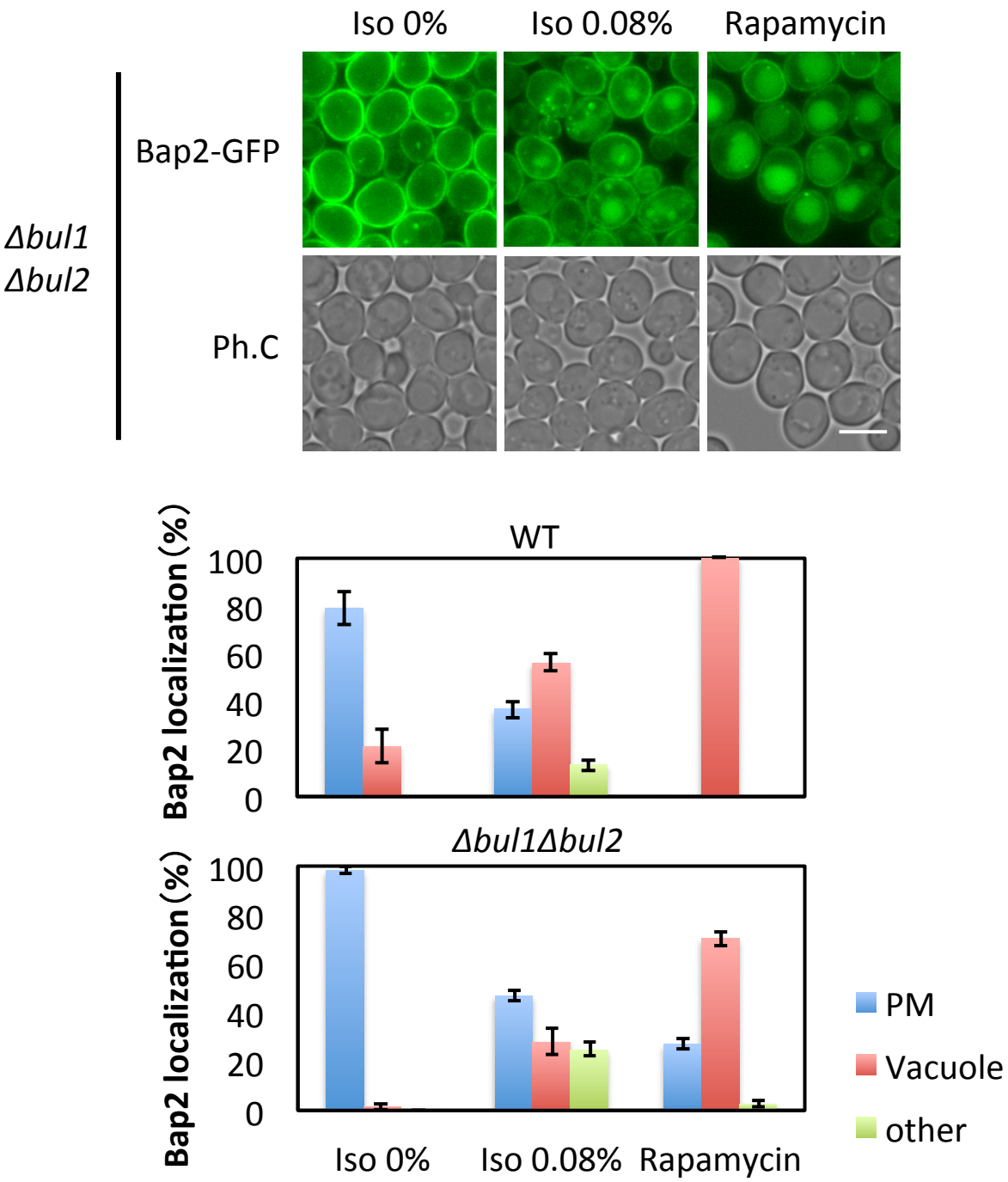


図18. Bul1Bul2二重欠失株ではイソフルラン処理によりBap2の輝点形成を認める

Bap2-GFPを発現した野生株（FKY003）、*BUL1BUL2*欠失株（FKY038）をSCD液体培地で培養した。シリンジに移し、DMSOで10倍に希釈したイソフルラン0.08%またはラパマイシン（200 ng/ml）を添加後2時間培養し、蛍光顕微鏡にて観察した（野生株に関しては図15を参照）。スケールバーは5 μmを示す。グラフはBap2の局在が細胞膜（PM）、液胞（Vacuole）、その他（other）にある細胞数をカウントしその割合を示す。3回の独立した実験で得られた値を平均した値および SD値を示す。

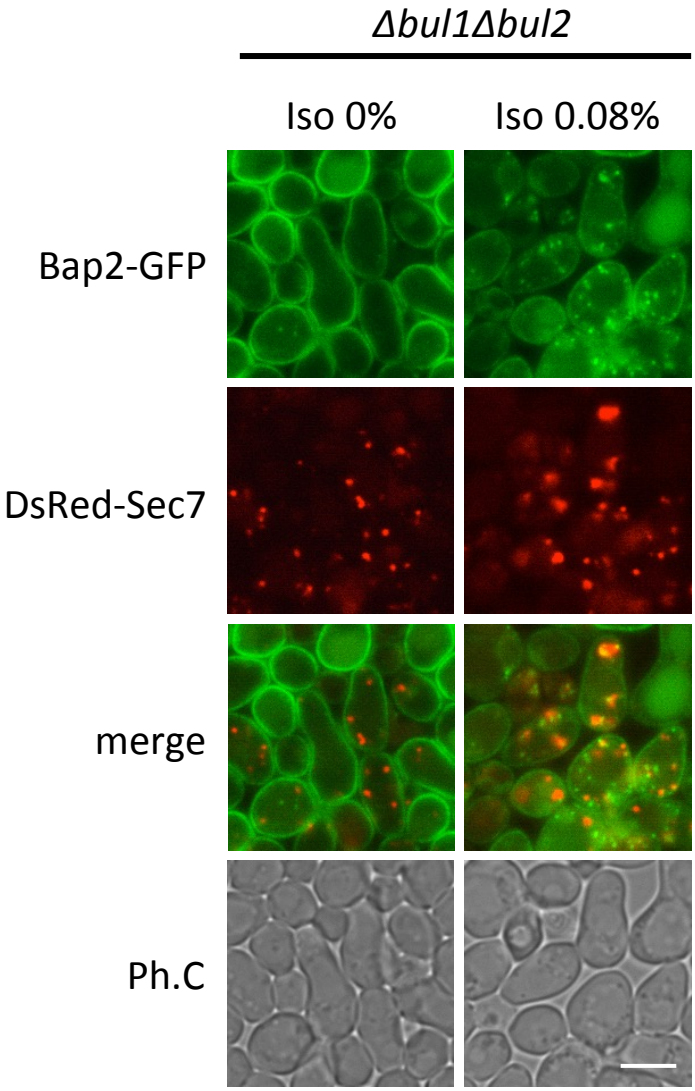


図19. Bul1Bul2二重欠失株ではイソフルラン処理によりBap2がゴルジ体に局在する

*BUL1BUL2*欠失株（FKY038）にプラスミド（pDsRed-Sec7）を挿入しDsRed-Sec7を発現させた株をSCD液体培地で培養した。シリンジに移し、DMSOで10倍に希釈したイソフルラン0.08%を添加後2時間培養し、蛍光顕微鏡にて観察した。スケールバーは5 μmを示す。