

Fig. 1. Ubiquitin-proteasome system. Ubiquitin is activated initially by ubiquitin-activating enzyme (E1) via formation of a thioester bond with this enzyme. The activated ubiquitin is then transferred to one of a large number of distinct ubiquitin-conjugating enzymes (E2s) by transthiolation. The E2 enzymes then catalyze the ubiquitination of substrate proteins either directly or in conjunction with one of a number of distinct ubiquitin-ligases (E3s) which are composed of multiple proteins. The ubiquitination of a substrate protein is followed by degradation of the protein by the proteasome.

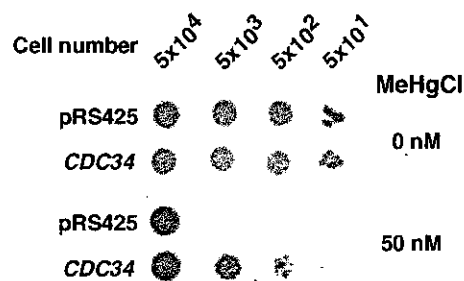


Fig. 2. Effects of the overexpression of Cdc34 on the sensitivity of yeast cells to MeHg. Yeast strains carrying pRS425 (control) or pRS425-CDC34 were grown on a plate of agar-solidified SD (-leu) medium for 3 days with or without MeHgCl.

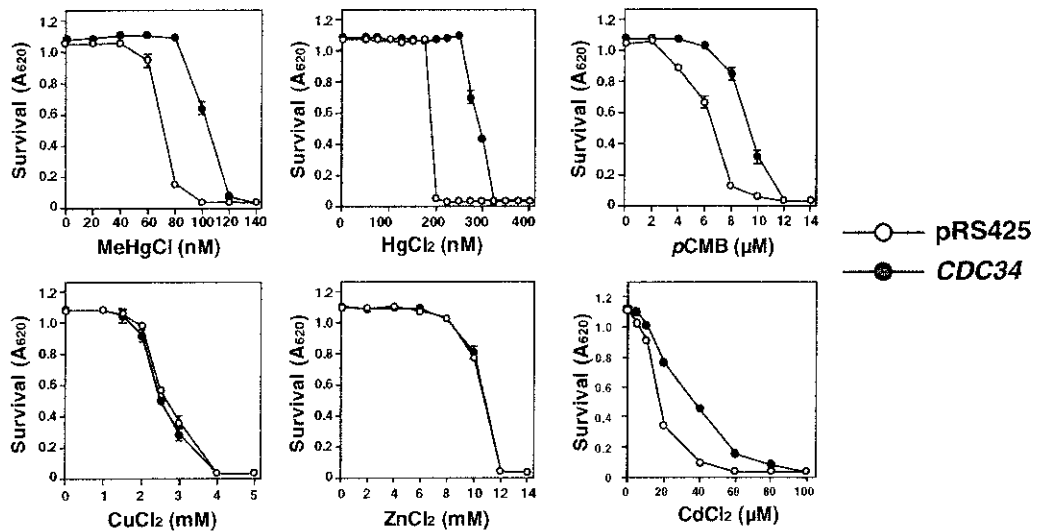


Fig. 3. Sensitivity of yeast cells that overexpressed Cdc34 to various metal compounds. Yeast cells carrying pRS425 (control) or pRS425-CDC34 (p1P1-F2) were grown in SD (-leu) medium that contained methylmercuric chloride (MeHgCl), mercuric chloride (HgCl₂), *p*-chloro-mercuribenzoate (pCMB), copper chloride (CuCl₂), zinc chloride (ZnCl₂) or cadmium chloride (CdCl₂). After a 48-hr incubation, absorbance at 620 nm was measured spectrophotometrically. Each point and bar represent the mean value and S. D. of results from four cultures. The absence of a bar indicates that the S. D. falls within the symbol.

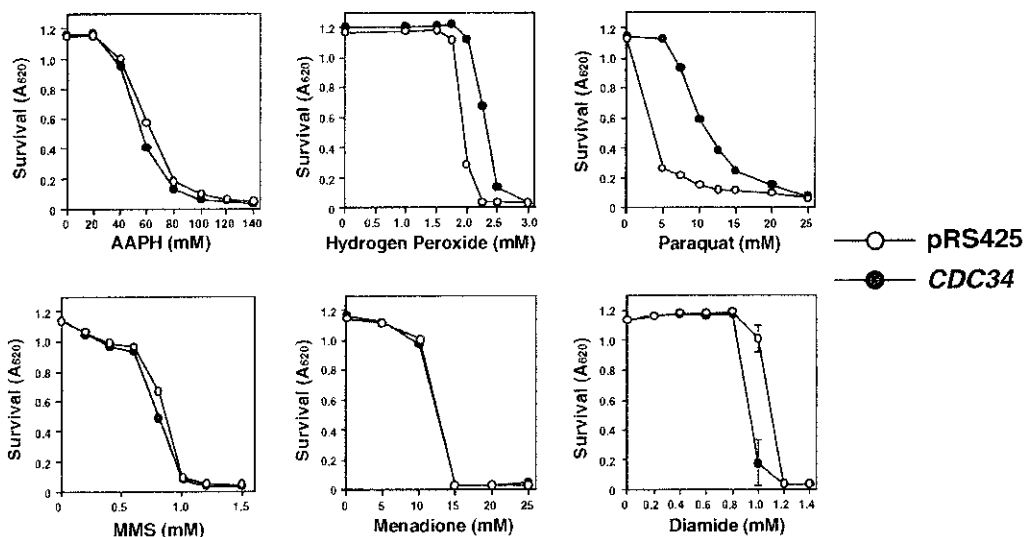


Fig. 4. Sensitivity of yeast cells that overexpressed Cdc34 to various oxidative-stress inducing agents. Yeast cells carrying pRS425 (control) or pRS425-CDC34 (p1P1-F2) were grown in SD (-leu) medium that contained 2,2'-azobis(2-amidinopropane)dihydrochloride (AAPH), hydrogen peroxide, paraquat, methyl methanesulfonate (MMS), menadione or diamide. After a 48-hr incubation, absorbance at 620 nm was measured spectrophotometrically. Each point and bar represent the mean value and S. D. of results from four cultures. The absence of a bar indicates that the S. D. falls within the symbol.

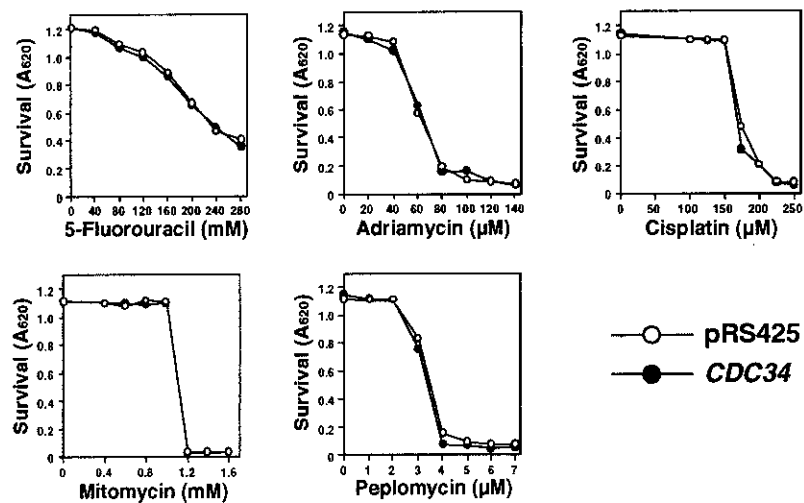


Fig. 5. Sensitivity of yeast cells that overexpressed Cdc34 to various anticancer drugs. Yeast cells carrying pRS425 (control) or pRS425-CDC34 (p1P1-F2) were grown in SD (-leu) medium that contained 5-fluorouracil, adriamycin, cisplatin, mitomycin or peplomycin. After a 48-hr incubation, absorbance at 620 nm was measured spectrophotometrically. Each point and bar represent the mean value and S. D. of results from four cultures. The absence of a bar indicates that the S. D. falls within the symbol.

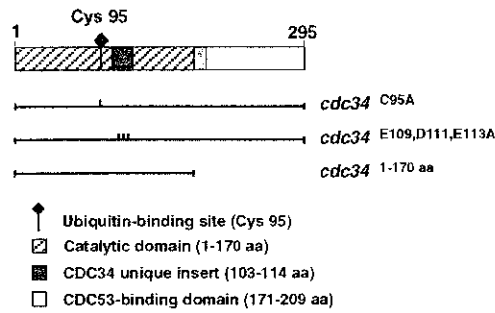


Fig. 6. Structural domains of Cdc34 and construction of mutant proteins. Cdc34 has only one cysteine moiety, located at position 95, and this cysteine moiety is known to be the binding site for ubiquitin. The altered amino acids are located in a 12-residue segment of Cdc34 that is not found in most other E2s and might be involved in the unique activity of Cdc34.

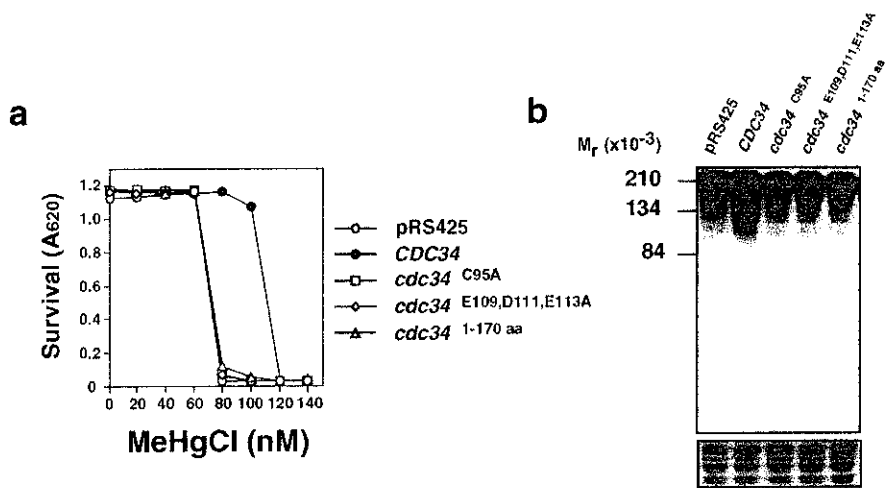


Fig. 7. Effects of overexpression of Cdc34 or its mutants on the sensitivity of yeast cells to MeHg and ubiquitination of proteins. a, Yeast strains carrying pRS425 (control), pRS425-CDC34, pRS425-*cdc34*^{C95A}, pRS425-*cdc34*^{E109, D111, E113A} or pRS425-*cdc34*^{1-170 aa} were grown in SD (-leu) medium in the presence of various concentrations of MeHgCl. After a 48-hr incubation, absorbance was measured at 620 nm. Each point and bar represent the mean value and S.D. of results from three cultures. The absence of a bar indicates that the S.D. falls within the symbol. b, Lysates of these cells were subjected to immunoblotting analysis with multiubiquitin-specific antibody. Staining with Coomassie blue (lower panel) is shown as an indication of the amount of total protein loaded.

も Cdc34 の E2 としての機能に必須とされている。そこで、ユビキチン結合部位の cysteine は保持し、E3 結合領域を欠損させた mutant、あるいは unique insert 中の三つのアミノ酸をすべて alanine に置換させた mutant (Fig. 6) をそれぞれ高発現させた酵母を用いてメチル水銀に対する感受性を調べた。その結果、いずれの mutant を高発現させた酵母もメチル水銀に対して耐性を示さなかった (Fig. 7a)。以上の結果は、Cdc34 高発現によるメチル水銀耐性には、Cdc34 がユビキチンおよび E3 と結合することが必要であることを示しており、Cdc34 の E2 としての機能であるユビキチン転移反応がメチル水銀耐性に必須であると考えられる。

次に、これらの酵母より細胞抽出液を調製し、multiubiquitin specific antibody を用いた immunoblotting により、細胞内でユビキチン化された蛋白質の総量を測定した。その結果、Cdc34 高発現酵母ではユビキチン化蛋白質量が control 酵母に比べて著しく高かったが、メチル水銀に対して耐性を示さなかった Cdc34 の mutant を高発現させた酵母ではユビキチン化蛋白質量が control 酵母とほとんど同程度であった (Fig. 7b)。この結果も、Cdc34 の E2 としての作用すなわち、ユビキチン転移反応の亢進が酵母にメチル水銀耐性を与える可能性を強く支持している。なお、ユビキチンシステムでは E2 以外にも複数の蛋白質 (E1、E3) が関与しているが、本研究結果は、Cdc34 が

高発現するだけでユビキチン化反応が促進されることを示している。

3. ユビキチンシステム構成因子の高発現酵母のメチル水銀に対する感受性

Cdc34 を介する蛋白質のユビキチン化には、E1 である Uba1 および E3 複合体の一つである SCF (Skp1、Cdc53/cullin、E-box protein) が関与し、この E3 複合体は四つの subunit (Cdc53、Skp1、Hrt1、F-box protein) からなることが知られている (Fig. 1)。そこで、この酵素群の各構成因子の高発現が酵母のメチル水銀感受性に与える影響を検討した。その結果、E2 以外の因子の中では、E1 である Uba1 を高発現させた酵母のみがメチル水銀に対して若干耐性を示したものの、他の因子の高発現は酵母のメチル水銀耐性にほとんど影響を与えなかった (Fig. 8a)。またこれらの酵母内の蛋白質のユビキチン化量を調べたところ、E2 である Cdc34 を高発現している酵母のみで、顕著な上昇が認められた (Fig. 8b)。

一方、E2 は遺伝子ファミリーを形成しており、出芽酵母ではメチル水銀耐性因子として見出した Cdc34 以外にも、12 個の E2 様遺伝子が同定されている。そこで、いくつかの E2 の分子種を高発現させた酵母を作製し、これらの酵母を用いてメチル水銀に対する感受性を調べた。その結果、Cdc34 (Ubc3 と呼ばれる) を高発現させた酵母よりもその程度は劣るものの、Ubc4、5、7 の高発現によっても、メチル水銀耐

性が認められた (Fig. 9a)。ここで認められた耐性度の差は、恐らく各 E2 分子種の基質特異性の差を反映しているものと考えられる。さらに、これらの酵母内のユビキチン化蛋白質量を調べたところ、メチル水銀に対して耐性を示した E2 の分子種を高発現させた酵母においてもユビキチン化蛋白質量の増加が認められた (Fig. 9b)。以上の結果は、E2 がユビキチン化反応の律速蛋白質である可能性を初めて示唆するものであり、E2 の高発現は細胞内における蛋白質のユビキチン化を促進させることによって、メチル水銀毒性に対して防御的に作用するものと考えられる。

4. メチル水銀による細胞内でのユビキチン化蛋白質量の変動

メチル水銀は SH 基との結合性が強く、特に SH 酵素はメチル水銀によって強く阻害されることが知られている。したがって、SH 酵素の一つである Cdc34 のユビキチン転移活性がメチル水銀によって直接的に阻害されるという可能性も否定できない。この場合、Cdc34 高発現酵母では Cdc34 活性が阻害されるのに必要なメチル水銀濃度が control 細胞に比べて高くなるために耐性を示すことになる。そこで、メチル水銀の添加が細胞内での蛋白質のユビキチン化量におよぼす影響について検討したところ、control 酵母および Cdc34 高発現酵母共に細胞内のユビキチン化蛋白質量はメチル水銀添加によって減少することはなく、むしろ

僅かに増加した (Fig. 10)。この結果から少なくとも、メチル水銀は Cdc34 を含む E2 のユビキチン転移活性を阻害しないものと考えられる。

5. メチル水銀に対する耐性獲得とプロテアソーム活性との関係

ユビキチン化された標的蛋白質は最終的にプロテアソームに認識されて速やかに分解される。そこで、プロテアソームによる分解がメチル水銀に対する耐性獲得に及ぼす影響を調べた。まず、プロテアソーム阻害剤である MG132 を用いて、プロテアソームによる分解が Cdc34 高発現によるメチル水銀耐性獲得におよぼす影響を検討したところ、MG132 非存在下では、Cdc34 の高発現が酵母にメチル水銀耐性を与えたが、50 μ M または 100 μ M の MG132 処理によって、Cdc34 の高発現によるメチル水銀耐性が認められなくなった (Fig. 11)。

さらに、プロテアソーム活性が低い酵母 (WCG4-11a) を用いてメチル水銀に対する感受性を調べた。ここで用いた WCG4-11a 株はプロテアソームの subunit である *PRE1* の missense mutant であり、低プロテアソーム活性を示すことが知られている。その結果、control 酵母である WCG4a 株に比べて WCG4-11a 株はメチル水銀に高感受性を示した (Fig.12)。このことから、Cdc34 高発現によるメチル水銀耐性にはプロテアソームによるユビキチン化蛋白質の分解が必須であると考えられる。また、Cdc34 が関与

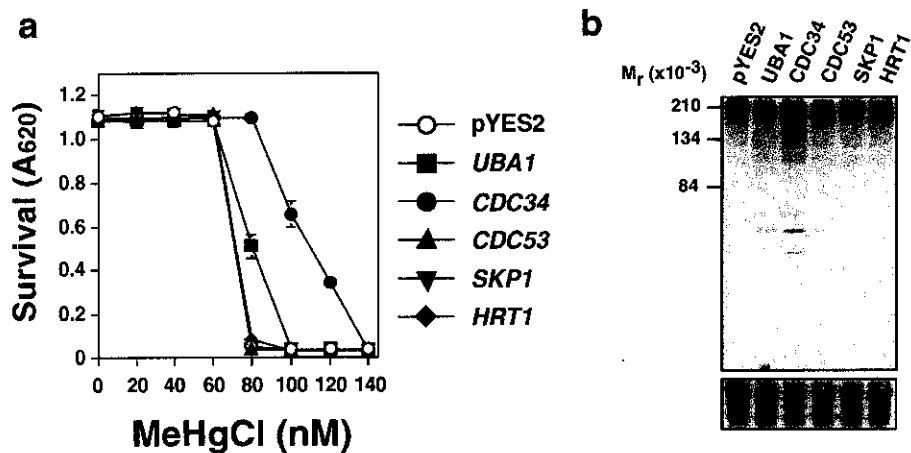


Fig. 8. Effects of overexpression of component proteins of the ubiquitin system on sensitivity to MeHg and ubiquitination of proteins. a, Yeast cells harboring pYES2 (control), pYES2-UBA1, pYES2-CDC34, pYES2-CDC53, pYES2-SKP1 or pYES2-HRT1 were cultured in SG (-ura) medium in the presence of various concentrations of MeHgCl. After a 48-hr incubation, absorbance was measured at 620 nm. Each point and bar represents the mean value and S.D. of results from three cultures. The absence of a bar indicates that the S.D. falls within the symbol. b, Lysates of these cells were subjected to immunoblotting analysis with multiubiquitin-specific antibody. Staining with Coomassie blue (lower panel) is shown as an indication of the amount of total protein loaded.

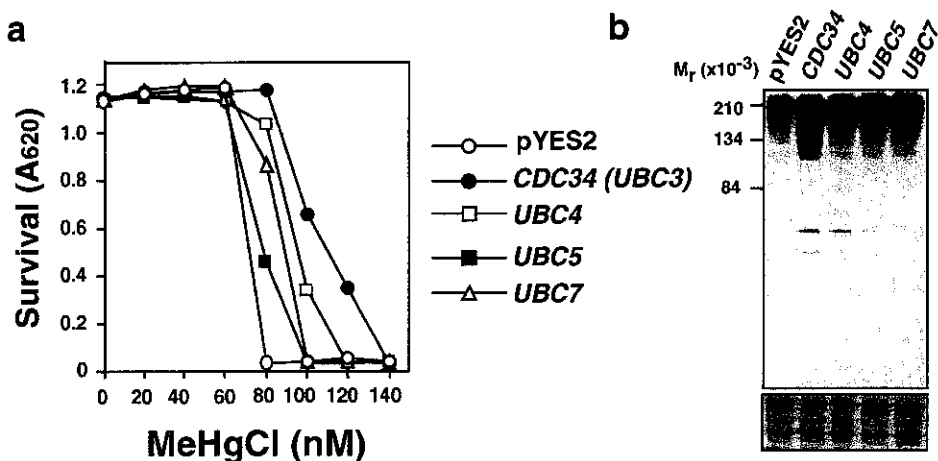


Fig. 9. Effects of overexpression of Cdc34 (Ubc3), Ubc4, Ubc5 or Ubc7 on sensitivity to MeHg and ubiquitination of proteins. a, Yeast cells carrying pYES2, pYES-CDC34, pYES-UBC4, pYES-UBC5 or pYES-UBC7 were grown in SG (-ura) medium that contained methylmercuric chloride (MeHgCl). After a 48-hr incubation, absorbance at 620 nm was measured spectrophotometrically. Each point and bar represent the mean value and S. D. of results from four cultures. The absence of a bar indicates that the S. D. falls within the symbol. b, Lysates of these cells were subjected to immunoblotting analysis with multiubiquitin-specific antibody. Staining with Coomassie blue (lower panel) is shown as an indication of the amount of total protein loaded.

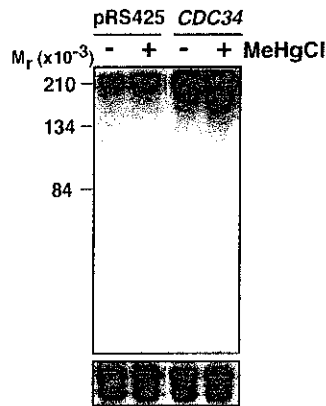


Fig. 10. Effects of MeHg on the ubiquitination of proteins. Yeast cells carrying pRS425 (control) or pRS425-CDC34 were cultured for 3-hr in the presence or absence of MeHgCl (100 nM). Lysates of these cells were subjected to immunoblotting analysis with multiubiquitin-specific antibody. Staining with Coomassie blue (lower panel) is shown as an indication of the amount of total protein loaded.

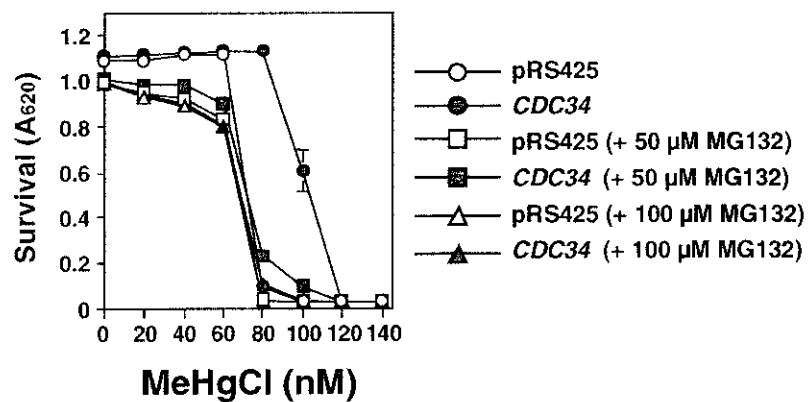


Fig. 11. Effects of MG132 (proteasome inhibitor) on Cdc34-mediated MeHg resistance in yeast cells. Yeast *erg6* cells that harbored pRS425 (control) or pRS425-CDC34 were grown in SD (-leu) medium, with or without the proteasome inhibitor MG132, in the presence of various concentrations of MeHgCl. After a 48-hr incubation, absorbance was measured at 620 nm. Each point and bar represent the mean value and S.D. of results from three cultures. The absence of a bar indicates that the S.D. falls within the symbol.

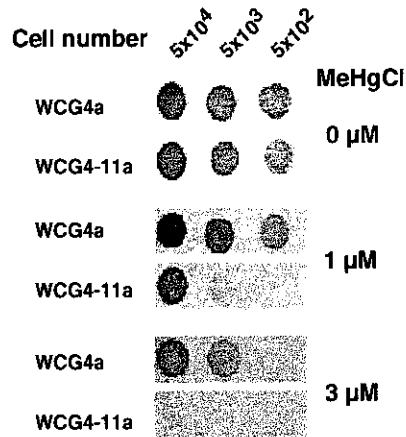


Fig. 12. Effects of proteasome activity on sensitivity to MeHg in yeast cells. Yeast WCG4a cells (control) and WCG4-11a cells (proteasome defective cells) were grown on a plate of agar-solidified YPD medium for 3 days with or without MeHgCl and then the plate was photographed.

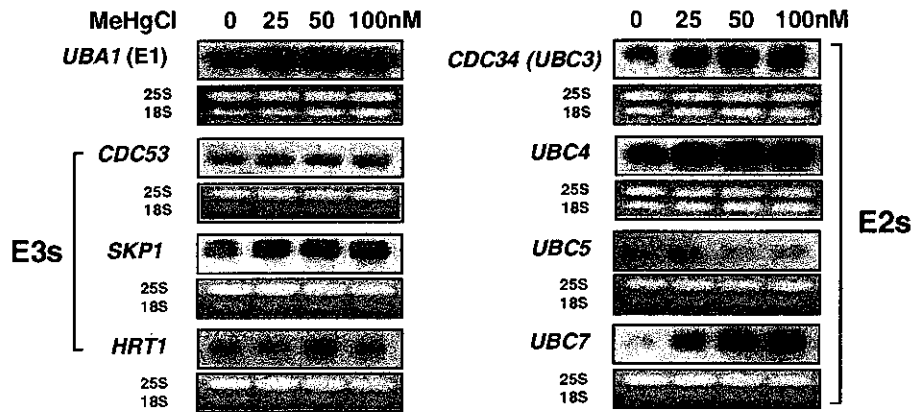


Fig. 13. Effects of MeHg on the levels of transcripts of the component genes of the ubiquitin system. Each lane was loaded with 20 μg of total RNA extracted from yeast cells (W303B) after treatment with methylmercuric chloride (MeHgCl) for 90 min. The bands of 25S and 18S RNA (lower panel) provide an indication of the amount of total RNA loaded in each lane.

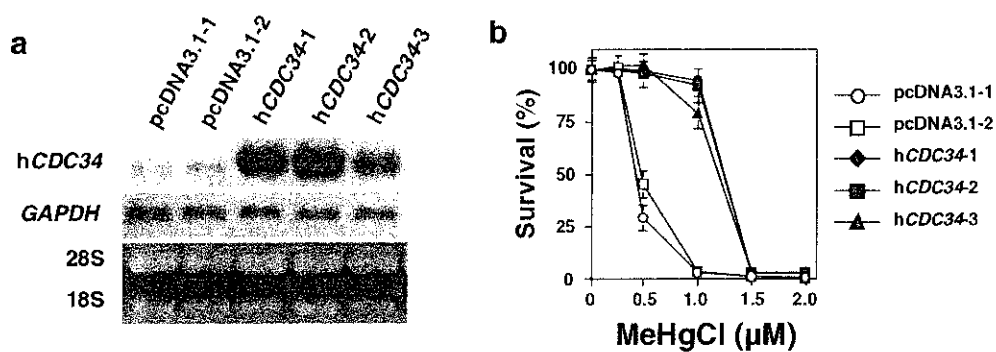


Fig. 14. Effects of overexpression of human Cdc34 (hCdc34) in HEK293 cells on the sensitivity to MeHg. a, Northern blotting analysis of hCDC34 mRNA. HEK293 cells were transfected with pcDNA3.1-hCDC34 or the pcDNA3.1 empty vector. Three clones of hCDC34 transfectants (hCDC34-1 to hCDC34-3) and two clones of cells transfected with the pcDNA3.1 empty vector (pcDNA3.1-1 and pcDNA3.1-2) were established. Each lane was loaded with 20 μg of total RNA extracted from the indicated transfectant. Bands of GAPDH mRNA and of 28S and 18S RNA are shown as indications of the amount of total RNA loaded. b, Sensitivity of each transfectant to MeHg. Each transfectant was cultured for 7 days in the presence of various concentrations of MeHgCl. Each point and bar represent the mean value and S.D. of results from three cultures. The absence of a bar indicates that the S.D. falls within the symbol.

するユビキチン-プロテアソームシステムがメチル水銀に対する防御機構として重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

6. メチル水銀によるユビキチンシステム構成遺伝子誘導の影響

ストレス応答に関わる因子の中には、ストレスにより発現が上昇するものが存在することが知られている。そこで、ユビキチンシステムに関わる各遺伝子の発現に対するメチル水銀の影響を Northern blotting により検討した。その結果、メチル水銀添加により CDC34 (UBC3)、UBC4、UBC7 の mRNA レベルが上昇することが判明した。また、E1 である UBA1 の mRNA レベルもメチル水銀添加によって若干の上昇を示した (Fig. 13)。この結果から、ユビキチンシステムはメチル水銀によるストレスにตอบสนองして誘導される防御機構として機能する可能性も考えられる。

7. hCdc34 高発現細胞のメチル水銀に対する感受性

ヒトなどの高等動物においても、より多くの E2 遺伝子が存在することが知られている。そこで、ヒトの CDC34 (hCDC34) を HEK293 細胞に導入し、hCdc34 高発現細胞を作製した。まず、それぞれの hCdc34 高発現細胞における hCDC34 の発現を Northern blotting 法で確認した結果、vector のみを導入した細胞に比べ、hCDC34 を導入した細胞では、hCDC34 mRNA の増加が

認められた (Fig. 14a)。これらの hCdc34 高発現細胞を用い、メチル水銀に対する感受性を検討したところ、hCdc34 を高発現させた細胞の全てがメチル水銀に対して耐性を示した (Fig. 14b)。このことから、ヒトにおいても Cdc34 が関与するユビキチン-プロテアソームシステムがメチル水銀の毒性軽減機構として働いている可能性が考えられる。

D. 結論

ユビキチン転移酵素の一つである Cdc34 の高発現によるメチル水銀耐性獲得機構を検討し、ユビキチン-プロテアソームシステムがメチル水銀毒性に対する防御機構として重要な役割を果たしていることが初めて示唆された。ユビキチン-プロテアソームシステムが関与するメチル水銀の毒性発現機構およびそれに対する防御機構として以下のような可能性が考えられる。すなわち、ある種の特定の蛋白質がメチル水銀によって何らかの修飾を受け、この修飾蛋白質が細胞内に蓄積することによって細胞障害が引き起こされる。一方、メチル水銀によって修飾を受けた蛋白質のユビキチン化を介したプロテアソームでの分解の促進がメチル水銀毒性に対して防御的に作用する。したがって、メチル水銀により分解が促進される蛋白質を同定することによって、メチル水銀毒性の発現機構が解明できる可能性がある。さらに、ヒトの細胞を用いた実験系においても Cdc34 が関与するユビキチン

-プロテアソームシステムがメチル水銀の毒性軽減機構として働いている可能性が示唆された。したがって、メチル水銀によって修飾を受けてユビキチン化される標的蛋白質をヒト細胞中で同定することによって、ヒトにおけるメチル水銀の細胞内標的分子が明らかになるものと期待される。

E. 健康危険情報
特になし。

F. 研究発表

1. 論文発表

Furuchi, T., Hwang, G. W. and Naganuma, A.: Overexpression of the ubiquitin-conjugating enzyme Cdc34 confers resistance to methylmercury in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Pharmacol.*, 61, 738-741 (2002).

Hwang, G. W., Furuchi, T. and Naganuma, A.: A ubiquitin-proteasome system is responsible for the protection of yeast and human cells against methylmercury. *FASEB J.*, 16, 709-711

(2002).

Naganuma, A., Furuchi, T., Miura, N., Hwang, G. W. and Kuge, S.: Investigation of intracellular factors involved in methylmercury toxicity. *Tohoku J. Exp. Med.*, 196, 65-70 (2002).

永沼 章、黄 基旭: メチル水銀の毒性発現機構. *医学のあゆみ*, 202, 895-898 (2002).

2. 学会発表

黄 基旭、松本京子、古地壯光、永沼 章: Cdc34 高発現が HEK293 細胞のメチル水銀感受性に及ぼす影響. *日本薬学会第 122 年会*, 2002.

黄 基旭、永沼 章: メチル水銀に対する細胞内防御機構としてのユビキチンシステム. *第 25 回日本分子生物学会年会*, 2002.

G. 知的財産権の出願・登録状況
なし。

厚生労働科学研究費補助金（食品・化学物質安全総合研究事業）

（分担）研究報告書

ヒ素毒性の発現に影響を与える遺伝子群

分担研究者 大橋一品 東北大学大学院薬学研究科助手

高発現によって亜ヒ酸耐性を与える遺伝子2種（*PBS2*, *SLG1*）を同定することに成功した。*PBS2*は浸透圧ストレス防御に関与するキナーゼPbs2をコードする遺伝子であり、*SLG1*は細胞壁にかかるストレスに対する防御因子Slg1をコードしている。そこで、両蛋白質がそれぞれ関わるシグナル伝達経路上に存在する因子群と亜ヒ酸耐性との関係を調べるために、それら因子の遺伝子を欠損させた変異酵母の亜ヒ酸に対する感受性を検討した。Pbs2はMAP kinase pathwayに属しMAPKKとして働くが、その活性は二つのMAPKKKであるSte11およびSsk2/22により制御され、それ自身はMAPKであるHog1を活性化することが知られている。検討の結果、Pbs2の上流ではSsk2/22を介する経路上の各遺伝子欠損株が亜ヒ酸に対して高い感受性を示し、Ste11を介する経路に関わる因子の欠損株も弱いながら正常酵母に比べて高感受性を示した。下流の因子ではHOG1欠損株が高い亜ヒ酸感受性を示し、そのさらに下流では、転写因子Sko1を介する経路に関わる各遺伝子の欠損株が高い亜ヒ酸感受性を示した。これらの結果から、亜ヒ酸に対する防御機構としてSsk2/22からPbs2を介してSko1へ至るシグナル伝達経路が重要な役割を担っていることが示唆された。一方、Slg1が関与するシグナル伝達経路中の因子では、その下流のPKCを介して活性化されることが知られているPKC-MAPK cascadeに属するBck1, Mkk1/2, Mpk1の各遺伝子欠損株において高い亜ヒ酸感受性が認められた。以上の結果から、Pbs2 やSlg1の高発現によって特定のシグナル伝達経路が細胞内において活性化され、亜ヒ酸に対する防御機構を担う何らかの下流因子の発現が促進されるものと考えられる。

A. 研究目的

ヒ素による地下水汚染とその中毒が世界的な問題となっている。しかし、ヒ素の細

胞毒性発現機構はあまり明らかにされていない。そこで、遺伝学的解析の容易な出芽酵母を用いて、過剰発現により亜ヒ酸耐性

を与える因子を検索した。

B. 研究方法

1. 酵母へのゲノム DNA ライブラリーの導入

酵母への形質転換は酢酸リチウム法によって行った。まず、酵母 W303B 株を YPAD 培地 50 ml に植え、 2×10^7 cell/ml になるまで振とう培養した後に集菌し、それを 1 ml の 100 mM 酢酸リチウム溶液に懸濁した。ここに、酵母ゲノムライブラリー 1 μ g、過熱変性サケ精子 DNA 50 μ g 及び 50% ポリエチレングリコール(4000) 200 μ l を加え、30°C で 30 分間インキュベートした。その後 42°C で 15 分間の熱ショックをかけた後に集菌し、ロイシンを含まない選択用培地である SD(-leu)寒天培地に播き、30°C で 2 日間培養した。この際、ベクターとして用

いたプラスミド YEp13 中にはロイシン合成酵素をコードする遺伝子(LEU2)が含まれているので、本プラスミドが導入された酵母(形質転換体)のみがロイシンを含まない SD(-leu)培地中でも育成可能となる。

2. 亜ヒ酸耐性遺伝子のスクリーニング

得られた形質転換体を、親株が増殖できない濃度の亜ヒ酸 (2.5, 3.0 mM) を含む、SD(-leu)培地に 1×10^5 cells/200 μ l となるように懸濁した後、96-well plate に 200 μ l ずつ播き、30°C で 2~6 日間培養した。そのとき、各 well 中でコロニー様の濃い沈殿を形成している酵母を回収し、SD(-leu)寒天培地に播き、30°C で 1~2 日間培養し、形成したコロニーを実験に用いた。

3. 酵母からのプラスミド DNA の回収

酵母からのプラスミド DNA の回収はガ

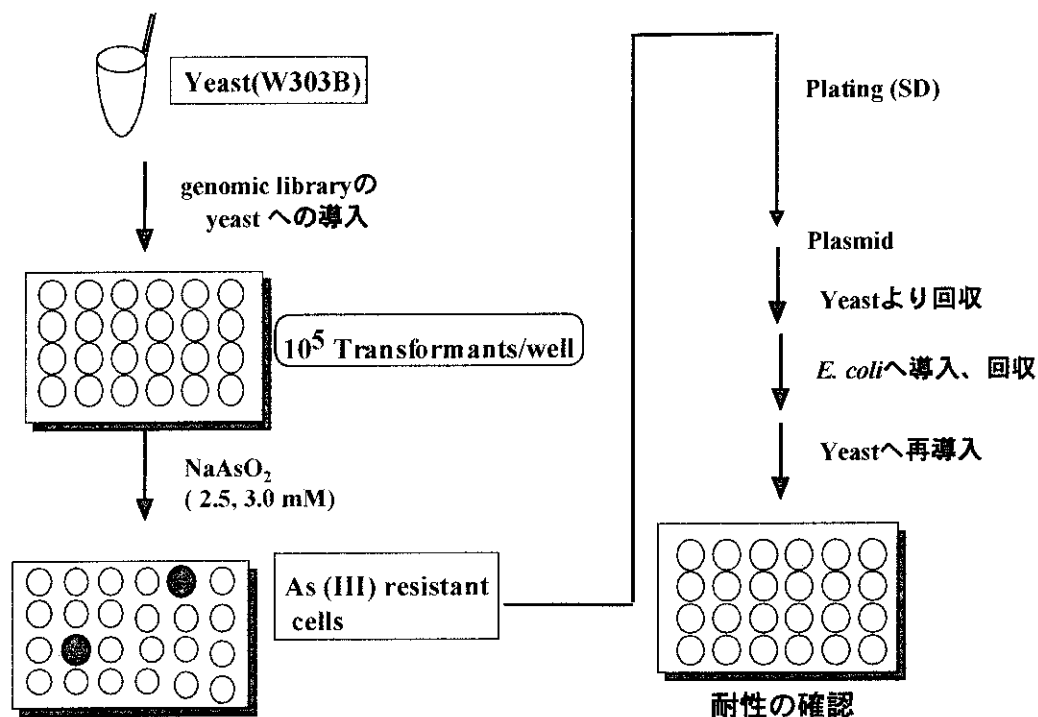


Fig. 1 *Saccharomyces cerevisiae* における As (III)耐性遺伝子のスクリーニング

Table1 As(III)耐性プラスミドのシーケンス解析

• AsR1	chromosome XV 34000-34500bp <i>tR(ACG)O</i> . . . triplet codon-amino acid adaptor(tRNA) <i>YOLCdelta9</i> <i>SLG1(HCS77,WSC1,YOR008C)</i> . . . osmotic response etc. <i>YOR008C-A</i> . . . mitomycin C resistance
• AsR2	chromosome X 175000-182000bp <i>PBS2 (HOG4,SFS4,SSK4,YJL128C)</i> . . . MAP kinase kinase:osmosensory signaling pathway <i>YJL127W-F,A</i>
• AsR3	chromosome XVI 933000-943000bp <i>YPRW1au4</i> <i>SGE1(NOR1,YPR198W)</i> . . . transporter <i>YPR197C</i> <i>ARR1(YAP8,ACR1,YPR199C)</i> . . . transcription factor <i>ARR2(ACR2,YPR200C)</i> . . . arsenate resistance <i>ARR3(ACR3,YPR201W)</i> . . . arsenite transporter
• AsR4	chromosome XIII 253000-258000bp <i>ERG6(ISE1,LIS1,SED6,YML008C)</i> . . . delta(24)-sterol C-methyltransferase <i>YML007C-A</i> <i>YAP1(PAR1,SNQ3,YML007W)</i> . . . jun-like transcription factor
• AsR5	chromosome XII 902400-910000bp <i>ECM19(YLR390W)</i> <i>CCW14(YLR391W-A)</i> . . . structural constituent of cell wall <i>YLR392C</i> <i>ATP10(YLR393W)</i> . . . protein complex assembly
• AsR6	chromosome XI 578000-584000bp <i>YKR073C</i> <i>tK(UUU)K</i> . . . triplet codon-amino acid adaptor <i>YKR074W</i> <i>YKR075C</i> <i>ECM4(YKR076W)</i>

ラスビーズ法により、行った。まず、酵母を 2ml の SD(-leu)培地に植菌し、30℃で 24 時間インキュベートした後、集菌して 200 μ l の breaking buffer に懸濁した。これに、phenol/chloroform/isoamylalcohol(25 : 24 : 1) 及び 0.3 g の酸洗浄ガラスビーズを加え、3 分間激しく攪拌した後、12,000 \times g で 5 分間遠心してプラスミド DNA を含む水層を得た。得られた DNA 溶液をエタノール沈殿により濃縮し、最終的に 20 μ l の DNA 溶液とした。引き続き、プラスミド DNA を精製しするために、大腸菌への導入及び回収を行った。コンピテントセル溶液 50 μ l に上述の DNA 溶液 4 μ l を加え、set volts 2.5 kV, capacitance 2.5 μ F でエレクトロポレーションを行い、これに SOC 培地 1 ml を加え、37℃で 1 時間インキュベートした

後、集菌し、アンピシリン 50 μ g/ml を含む LB 寒天培地に播き、37℃で 12 時間培養した。形成したコロニーをつつき、アンピシリン 50 μ g/ml を含む LB 培地 2 ml に入れ、37℃で 12 時間、振とう培養した後、GenElute™ Plasmid Mini-prep Kit (Sigma) を用いて大腸菌よりプラスミド DNA を回収した。

4. プラスミドを再導入した酵母の亜ヒ酸に対する感受性

プラスミドを再導入した酵母のシングルコロニーを 1 μ l の SD(-leu)培地に植菌し、30℃で一晩培養した後、この培養液を SD(-leu)培地で 1×10^5 cells/180 μ l になるように希釈した。この希釈培養液を 96-well plate に 180 μ l /well(1×10^5 cells/well) ずつ播

き、亜ヒ酸 $20\ \mu\text{l/well}$ (最終濃度 0, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2.0, 2.5, 3.0 mM)を添加した後、 30°C で2日間培養し、酵母の増殖を 620 nm の吸光度を基に測定した。尚、YEp13 ベクターを導入した酵母を実験の対照とした。

5. 亜ヒ酸耐性を与えるプラスミド(AsR1 ~AsR6)の部分塩基配列の決定

スクリーニングより得られたプラスミドをテンプレート DNA とし、このテンプレート DNA 50 fmol を PCR 装置を用いて 96°C 1 分の熱変性後、シーケンス用プライマー (YEp13 Forward または Reverse)、Premix $2\ \mu\text{l}$ を加えて全量が $5\ \mu\text{l}$ となるように滅菌イオン交換水で調整した。 96°C 20 秒、 50°C 20 秒、 60°C 2 分の反応を 1 サイクルとする反応を 40 サイクル行った。反応終了後、stop solution を $4\ \mu\text{l}$ 加え、エタノール沈殿により濃縮し、SLS $25\ \mu\text{l}$ にサンプルを溶解し、CEQ96-well サンプルプレートへ移し、オートシーケンサーにより塩基配列の解析を行った。

6. AsR1 フラグメントのサブクローニング

部分塩基配列の解析により、AsR1 は tRNA である *tR(ACG)O*、機能が不明な *YOLCdelta9*、浸透圧ストレスに関与する *SLG1*、高発現で mitomycin C に耐性を示す *YOR008C-A* の 4 つの ORF を含んでいることが明らかになった。そこで、AsR1 フラグメントについて、亜ヒ酸耐性遺伝子を同定するために、サブクローニングを行った。AsR1 プラスミドを *PvuII*, *ApaI/NheI* で切断し、それぞれを電気泳動により *tR(ACG)O*、*YOLCdelta9* フラグメント及び *YOR008C-A* フラグメントに分離した。これらのフラグメントをアガロースゲルから、精製し、DNA ligation kit ver. 2 を用いて self ligation させた後に、大腸菌に導入しこの大腸菌よりプラスミドを回収して、それぞれのフラグメントからなるプラスミド(1P1、1P2)を得た。また、PCR により *SLG1* のみを含む遺伝子断片を前の遺伝子の終わりから、次の

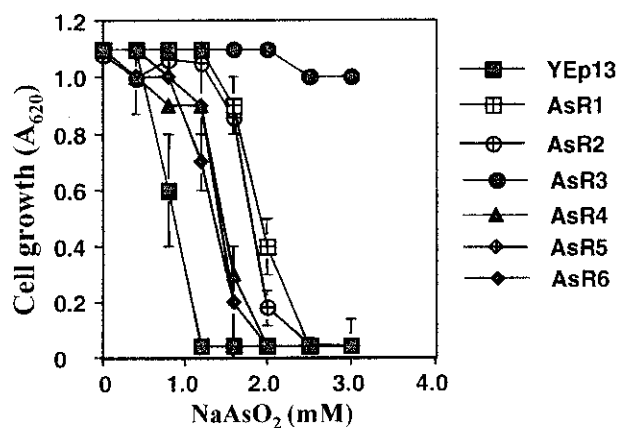


Fig. 2 スクリーニングより得られたAs (III)耐性酵母株の生存曲線

遺伝子の始めまで増幅し、多コピーベクター pRS425(2 μ m プラスミド ori を持つ)へ組み込んだ後に、大腸菌に導入しこの大腸菌よりプラスミドを回収して、プラスミド(1P3)を得た(Fig. 3A)。大腸菌へのプラスミドの導入は Hanahan の方法に従って行った。Competent cells 溶液 200 μ l に上述のプラスミド溶液 10 μ l を加え、氷上に 30 分間静置した後、42°C で 45 秒間の heat shock をかけ、さらに氷上に 2 分間静置した。この溶液に SOC 培地 0.8 ml を加え 37°C で 1 時間培養した後、ampicillin sodium salt 50 μ 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 colony を ampicillin sodium salt 50 μ g/ml 含む LB 培地 3 ml で一晩振盪培養した後、GenElute™ Plasmid Mini-prep Kit (Sigma)を用いて大腸菌よりプラスミドを回収した。

7. AsR2 フラグメントのサブクローニング

AsR2 プラスミドを *Nhe*I で切断し、電気泳動により YJL127W-A フラグメントに分離した。このフラグメントをアガロースゲルから、精製し、DNA ligation kit ver. 2 を用いて self ligation させた後に、大腸菌に導入しこの大腸菌よりプラスミドを回収して、YJL127W-A からなるプラスミド(2P1)を得た。また、PCR により PBS2 の ORF のみを含む遺伝子断片を増幅し、pRS315 (Alcohol Dehydrogenase の promotor 及び terminator を組み込んであり、CEN ARS を

持つ)へ組み込んだ後に、大腸菌に導入しこの大腸菌よりプラスミドを回収して、プラスミド(2P2)を得た(Fig. 4A)。大腸菌へのプラスミドの導入は 2 と同様に行った。

(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) 亜ヒ酸毒性の発現に影響を与える遺伝子群の検索

亜ヒ酸耐性に関与する酵母遺伝子を Fig.1 に要約した方法によって検索した。2 μ m 系マルチコピープラスミド YEp13 をベクターとする酵母ゲノムライブラリーを酢酸リチウム法により、酵母(W303B 株)に導入し、導入遺伝子を高発現する形質転換体を得た。この形質転換体から、遺伝子の導入により、亜ヒ酸に対して耐性を示すクローンを選択するために、親株が生育できない濃度(2.5, 3.0 mM)の亜ヒ酸を含む SD(-leu)培地に 1×10^5 cells/well ずつ播き 2 ~6 日間培養した。次に各 well 中でコロニー様の濃い沈殿を形成している酵母を P-2 のピペットマンを用いて回収し、SD(-leu)寒天培地に播き、48 時間培養後、形成したコロニーを回収した。最終的に、約 3×10^7 個の酵母についてスクリーニングを行い、32 個の耐性を示す酵母株を得た。しかし、これらの酵母の中には、突然変異や

一時的な耐性獲得によって耐性を示したものがあっても考えられた。そこで導入した遺伝子によって亜硫酸耐性が獲得されたかどうかを確認するために、これらの耐性酵母からプラスミドを回収し、親株へ再導入をして亜硫酸耐性が再現されたかどうかを調べた。得られたプラスミドについてまず制限酵素消化によるパターンから、同じゲノム断片が含まれていると考えられるものを除き、それぞれの亜硫酸耐性への影響を調べた結果、ベクターである YEp13 を導入した株に比べて酵母に明らかに耐性を与えるプラスミド 6 種を得ることに成功した。そこで、これらのプラスミドを酵母より回収し、AsR1~AsR6 とした(Fig. 2)。これらのプラスミドは亜硫酸耐性に関わると考えられる酵母遺伝子断片を含んでいるものと考えられる。

(2) 亜硫酸耐性を与えるプラスミド(AsR1~AsR6)中のフラグメントの部分塩基配列の決定

出芽酵母は全ゲノムDNA塩基配列が既に明らかにされているので、得られたAsR1~AsR6の酵母遺伝子断片両端から数百bpの塩基配列を決定した後に、この配列を *Saccharomyces* Genome Databaseを用いて検索することによって、プラスミドの全塩基配列を決定した。その結果、すべてのプラスミドの染色体上での位置は、AsR1が酵母第15染色体340000から長さ約5 kbpの領

域、AsR2が酵母第10染色体175000付近から長さ約7 kbpの領域、AsR3が酵母第16染色体上933000付近から約10 kbpの領域、AsR4が酵母第13染色体上253000付近から約5 kbpの領域、AsR5が酵母第12染色体上902000付近から約8 kbpの領域、AsR6が酵母第11染色体上578000付近から約6 kbpの領域であることが判明した。また、上記のデータベースを用いることにより、どのような遺伝子がそれぞれのゲノム断片にコードされているかを調べた。その結果は、Table1に示した通りであり、AsR3およびAsR4には、既知の亜硫酸耐性遺伝子として、*ARR1*および*ARR3*、*YAP1*を含んでいることが判明した。AsR1,2,5,6のうちでは、AsR5,6に含まれるORFはほとんど機能未知であり、AsR1,2の方がより強い耐性を示した。

(3) AsR1および2フラグメントに含まれる亜硫酸耐性に関与する遺伝子の同定

AsR1中には、*tR(ACG)O*、*YOLCdelta9*、*SLG1*、*YOR008C-A*の4つのORFが含まれていることが明らかになった (Table1)。そこで、亜硫酸耐性に関与する遺伝子を同定するために、AsR1由来の3種のプラスミド (YEp13-1P1、YEp13-1P2、pRS425-1P3) を作成した(Fig. 3A)。得られたプラスミドを親酵母に導入して亜硫酸に対する感受性を調べたところ、YEp13-1P1、YEp13-1P2を導入した酵母では亜硫酸に対して耐性を示

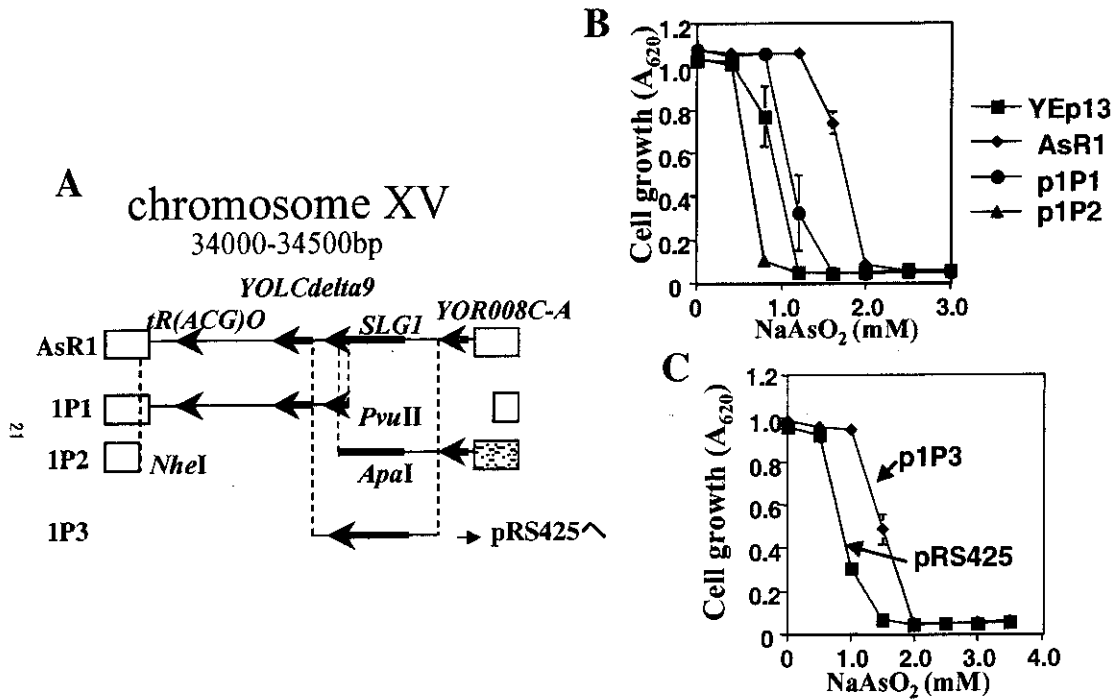


Fig. 3 AsR1 プラスミドにおけるAs (III) 耐性遺伝子の同定

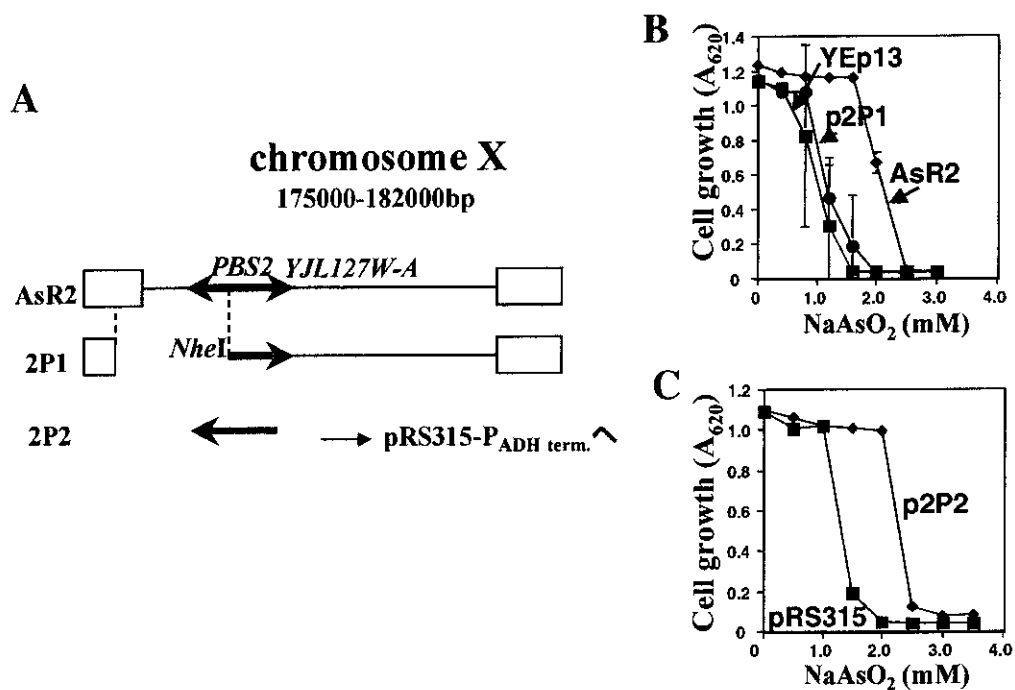


Fig. 4 AsR2 プラスミドにおけるAs (III) 耐性遺伝子の同定

さなかった。しかし、pRS425-1P3を導入した酵母は亜ヒ酸耐性を示した(Fig. 3B,C)。

この結果から、pRS425-1P3フラグメント中のみに存在する *SLG1* が亜ヒ酸耐性に関与

することが明らかとなった。

一方、AsR2中には、*PBS2*、*YJL127W-A*の2つのORFが含まれていることが明らかになった (Table1)。そこで、亜硫酸耐性に関与する遺伝子を同定するために、AsR2由来の2種のプラスミド (YEp13-2P1、pRS315-2P2) を作成した (Fig. 4A)。得られたプラスミドを親酵母に導入して亜硫酸に対する感受性を調べたところ YEp13-2P1 を導入した酵母では亜硫酸に対して耐性を示さなかった。しかし、pRS315-2P2 を導入した酵母は明らかな亜硫酸耐性を示した (Fig. 4B,C)。この結果から、pRS315-2P2 フラグメント中のみ存在する *PBS2* が亜硫酸耐性に関与することが明らかとなった。

(4) *Slg1* 高発現による亜硫酸耐性獲得機

構の解析

Slg1 の高発現が酵母に亜硫酸耐性を与えることが明らかになった。*Slg1* は、PKC MAPK cascade といわれる cell cycle やストレス応答に関与する一連の cascade の構成因子であり、細胞壁へのストレスに対する防御因子であることが報告されている (Fig. 5)。遺伝子の中には、高発現により耐性を示すものの、その遺伝子を欠損しても感受性を示さないもの、また、欠損により感受性を示すものの高発現により影響を受けないものも少なくない。そこで *Slg1* 欠損細胞 (*slg1* Δ) の亜硫酸感受性を検討した。その結果、*slg1* Δ は、亜硫酸に対して高い感受性を示した (Fig. 6-1aA)。*Slg1* 高発現による亜硫酸耐性の獲得および *slg1* Δ によ

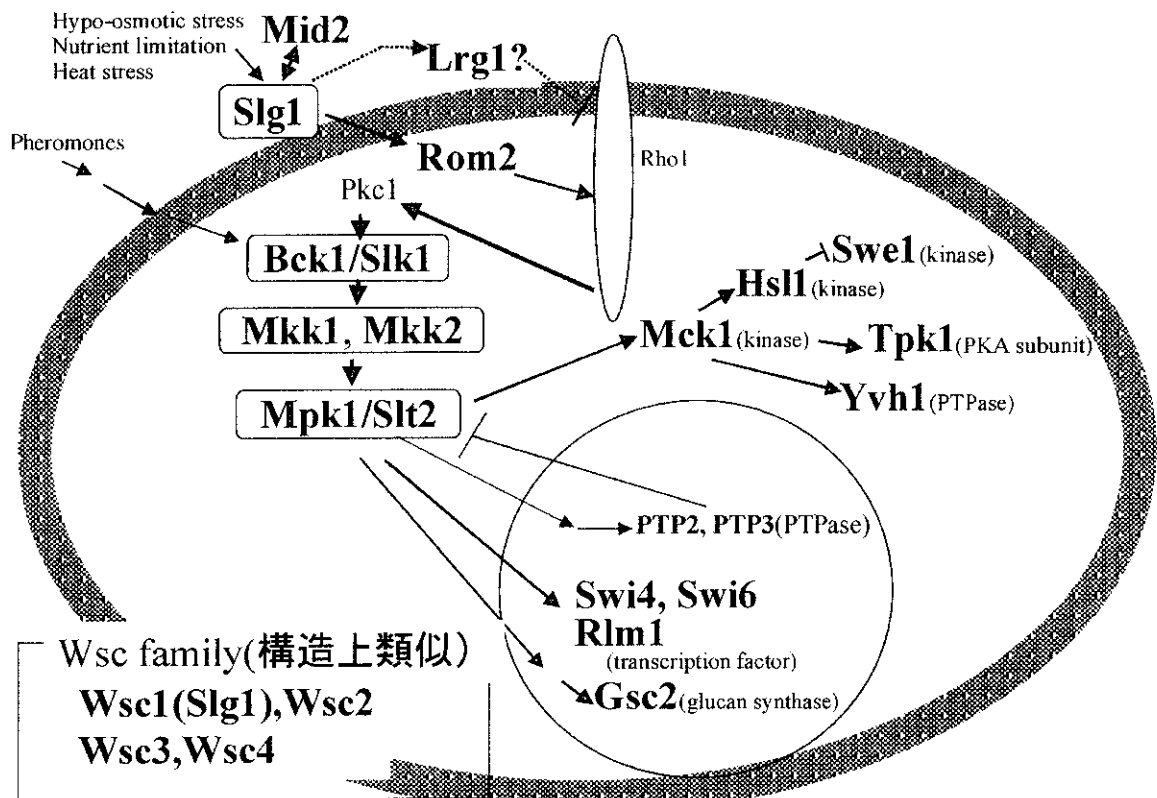


Fig. 5 PKC MAPK cascade