

- polyribosomes. *Mol Biol Cell* 10, 3849-3862 (1999).
- 32 Odom, A. R., Stahlberg, A., Wente, S. R., and York, J. D. A role for nuclear inositol 1,4,5-trisphosphate kinase in transcriptional control. *Science* 287, 2026-2029 (2000).
- 33 He, X., Zhang, B., and Tan, H. Overexpression of a sterol C-24(28) reductase increases ergosterol production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Lett* 25, 773-8. (2003).
- 34 Grzanowski, A., Needleman, R., and Brusilow, W. S. Immunosuppressant-like effects of phenylbutyrate on growth inhibition of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* 41, 142-9. (2002).
- 35 Nelissen, B., DeWachter, R., and Goffeau, A. Classification of all putative permeases and other membrane plurispanners of the major facilitator superfamily encoded by the complete genome of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev* 21, 113-134 (1997).
- 36 Regenber, B., During-Olsen, L., Kielland-Brandt, M. C., and Holmberg, S. Substrate specificity and gene expression of the amino-acid permeases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* 36, 317-328 (1999).
- 37 Beck, T., Schmidt, A., and Hall, M. N. Starvation induces vacuolar targeting and degradation of the tryptophan permease in yeast. *J Cell Biol* 146, 1227-1237 (1999).
- 38 Schmidt, A., Beck, T., Koller, A., Kunz, J., and Hall, M. N. The TOR nutrient signalling pathway phosphorylates NPR1 and inhibits turnover of the tryptophan permease. *Embo Journal* 17, 6924-31 (1998).
- 39 Kaur, R., and Bachhawat, A. K. The yeast multidrug resistance pump, Pdr5p, confers reduced drug resistance in *erg* mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology Uk* 145, 809-818 (1999).
- 40 Li, A. M., Watson, A., and Fridovich-Keil, J. L. Scp160p associates with specific mRNAs in yeast. *Nucleic Acids Res* 31, 1830-7. (2003).
- 41 Subba Rao, G., Bachhawat, A. K., and Gupta, C. M. Two-

hybrid-based analysis of protein-protein interactions of the yeast multidrug resistance protein, Pdr5p. *Funct Integr Genomics* 1, 357-66. (2002).

42 Kolaczkowski M, van der Rest M Anticancer drugs, ionophoric peptides, and steroids as substrates of the yeast multidrug transporter Pdr5p. *J Biol Chem.* 271(49):31543-8. 1996

#### D. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし。

##### 2. 学会発表

塚原 章、大橋一品、永沼 章: 酵母のトリブチルスズに対する感受性に影響を与える蛋白質の検索. フォーラム 2003 : 衛生薬学・環境トキシコロジー2003.

塚原 章、大橋一品、永沼 章: 酵母のトリブチルスズ感受性に影響を及ぼすトランスポーター様因子. 日本薬学会第124年会, 2004.

#### E. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

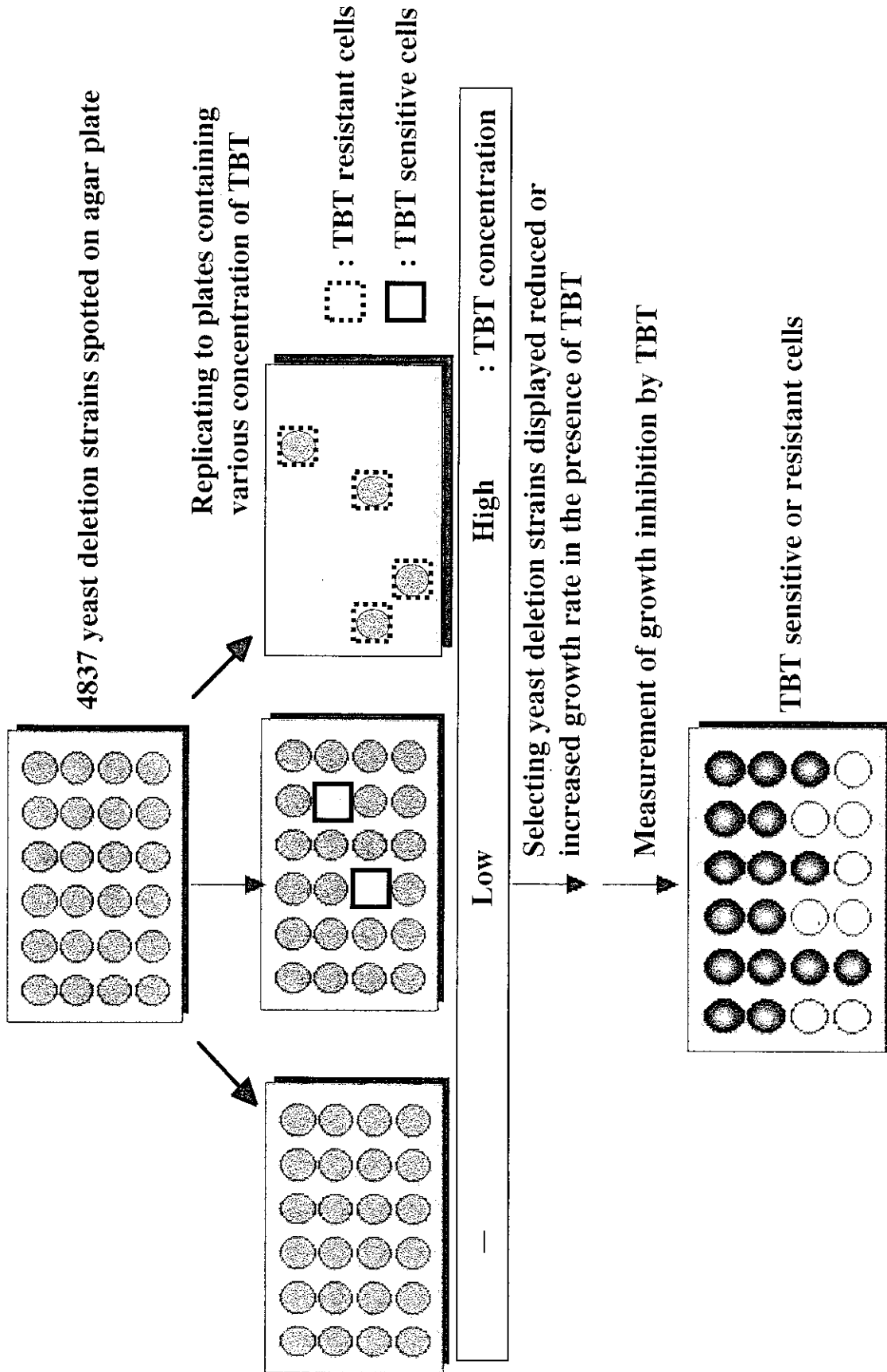
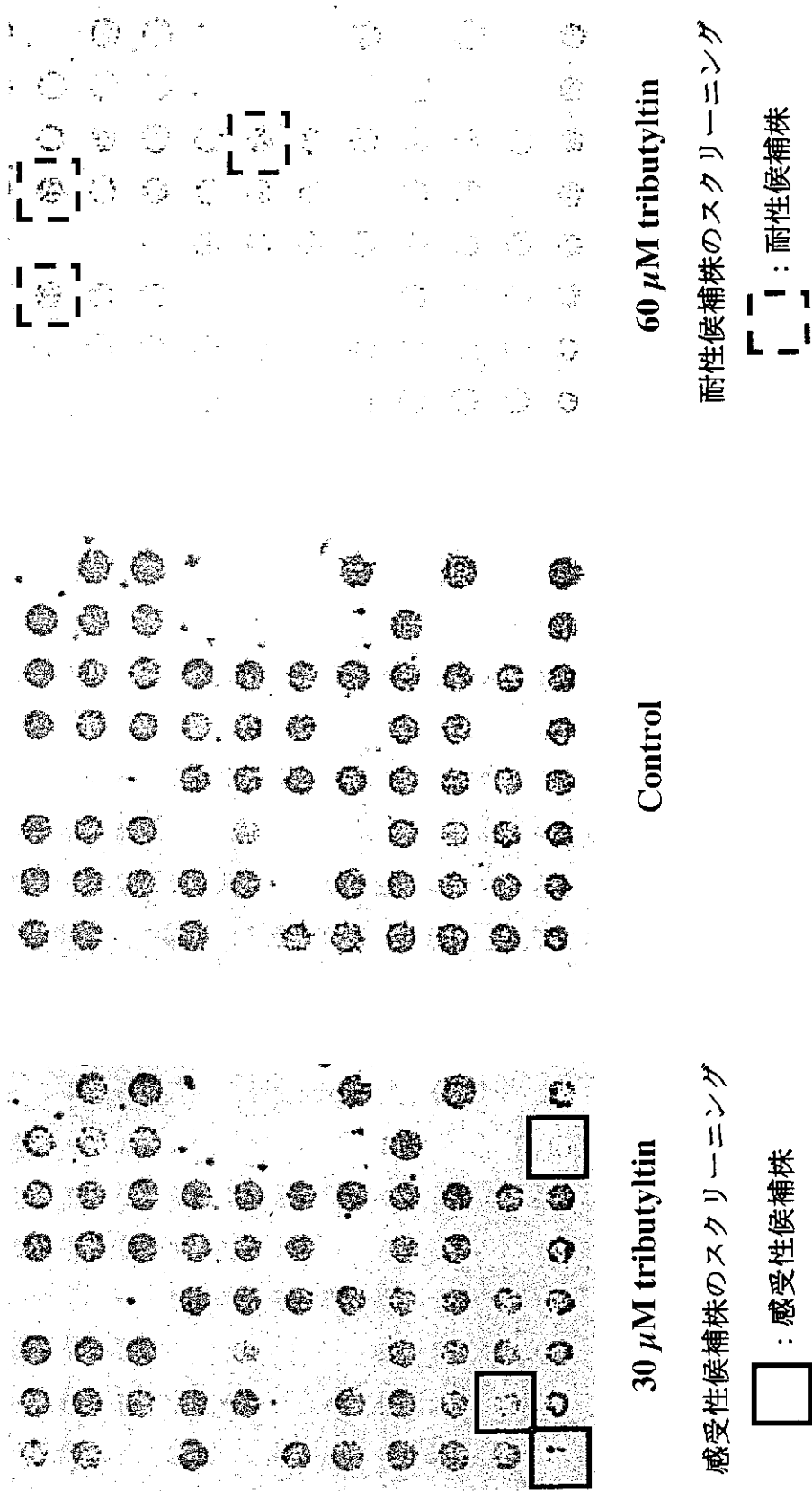
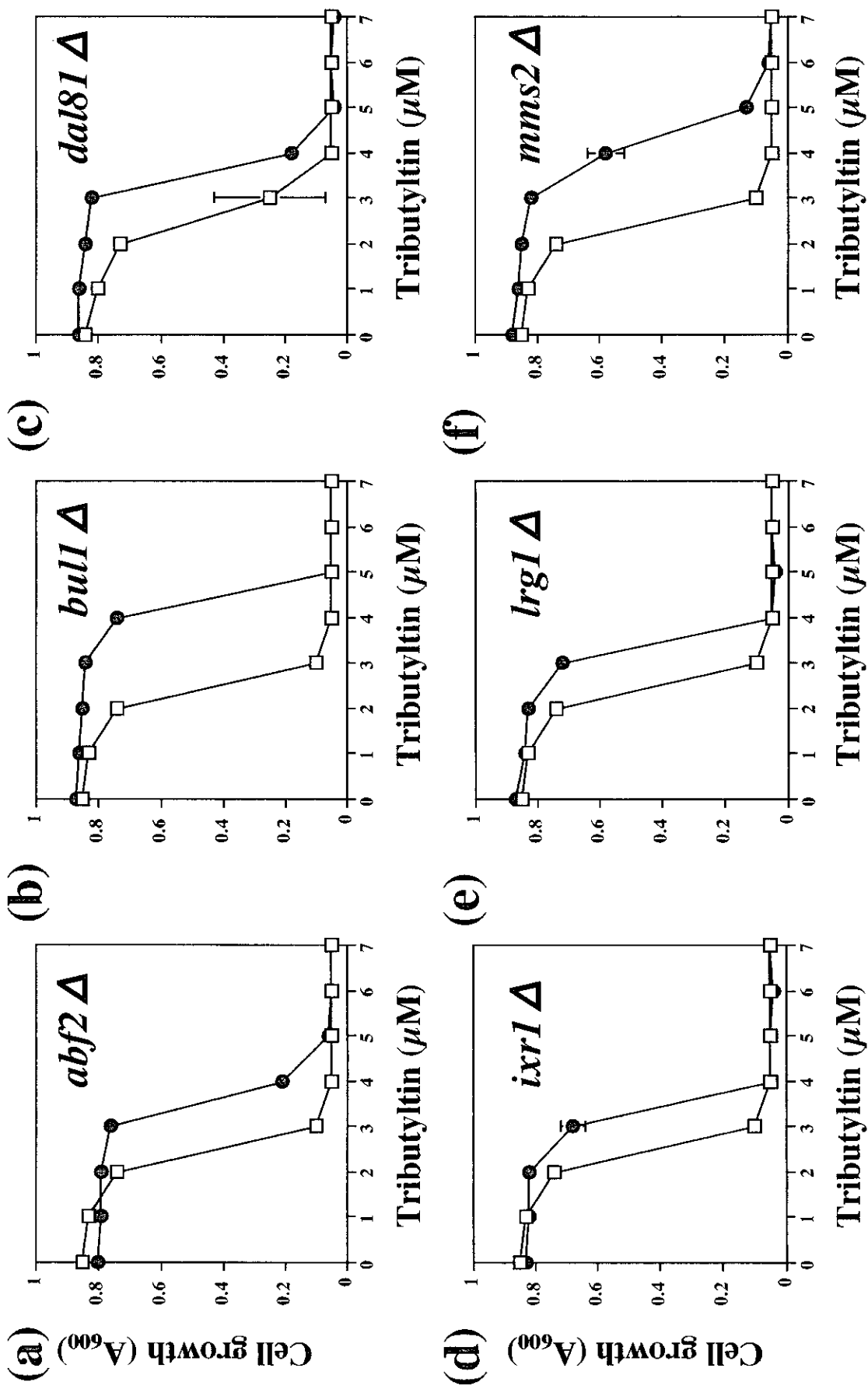


Fig. 1. 酵母遺伝子欠損株を用いたTBT感受性に影響を与える因子のスクリーニング方法



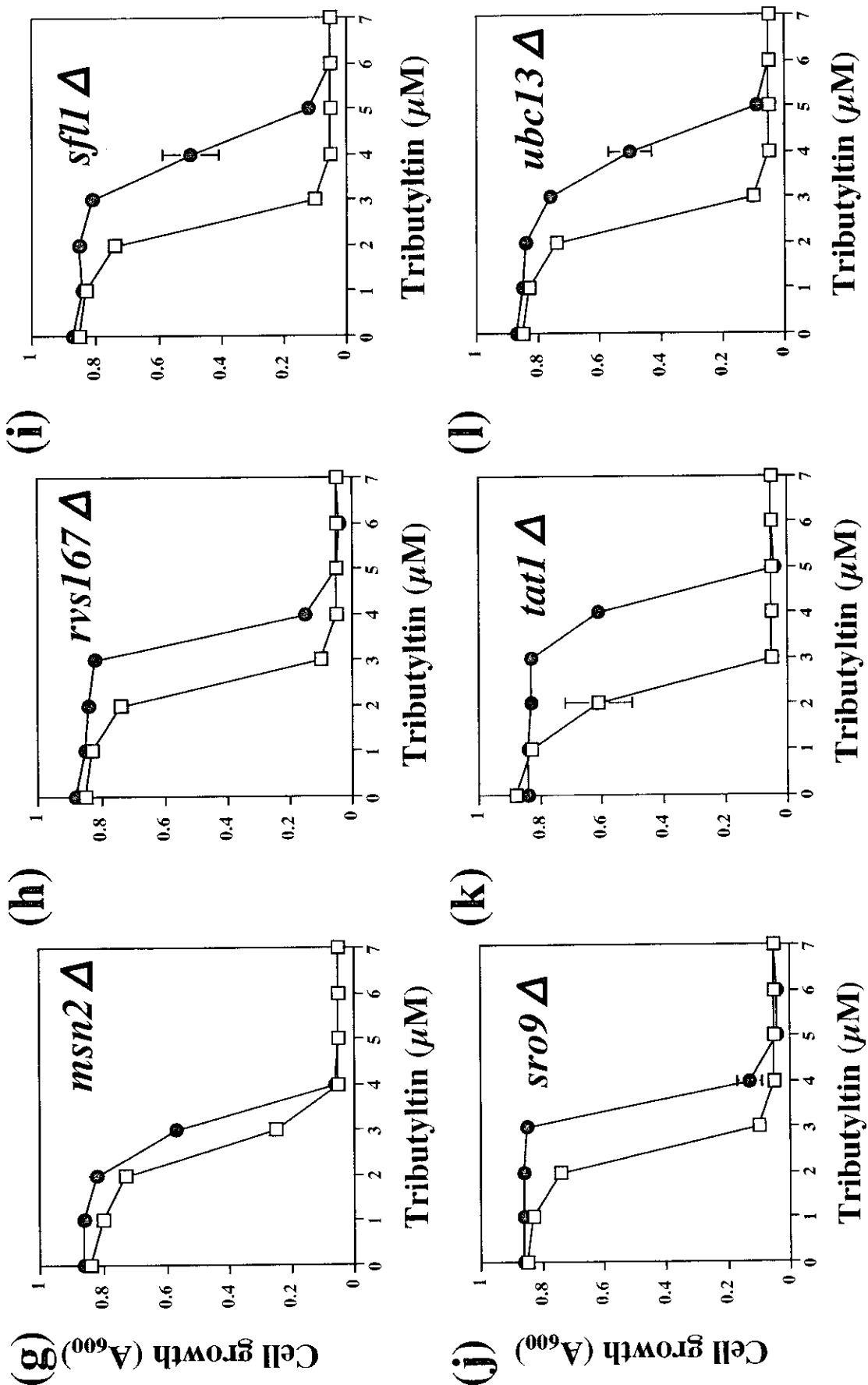
**Fig. 2. TBT存在下での遺伝子欠損株の増殖への影響**

TBTを含むYPADプレートに遺伝子欠損株を移し、24時間培養後の酵母の増殖を観察した。30  $\mu$ M TBT存在下で増殖の抑制された酵母を感受性候補株(□)とし、60  $\mu$ M TBT存在下で増殖した酵母株を耐性候補株(▣)とした。



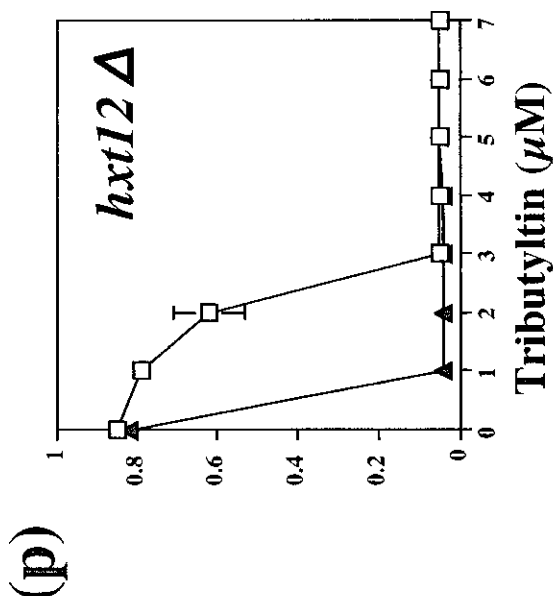
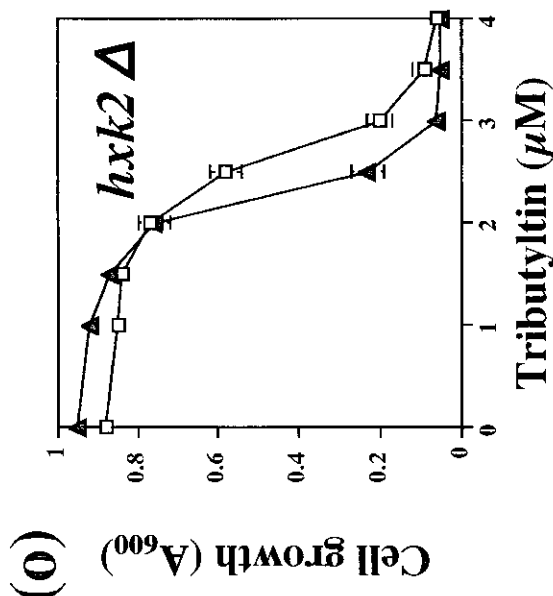
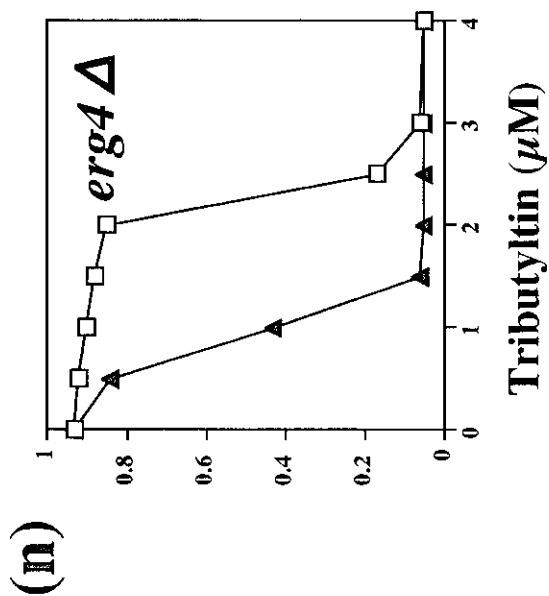
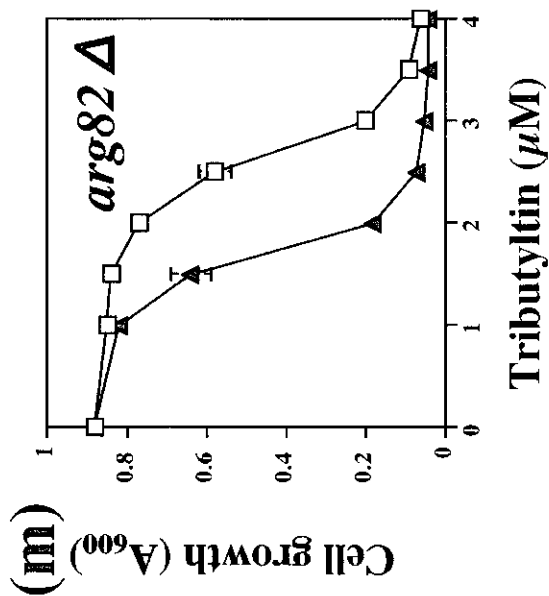
**Fig. 3-1. TBTに対して耐性を示す遺伝子欠損株の生存曲線の生存曲線 (1)**

酵母を96 well plate中で各濃度のTBT存在下48時間培養した後に、600 nmの吸光度を測定した (n=3)。  
 (—●—) は以下に示す遺伝子欠損株のTBT存在下での生存曲線を示す (a) *abf2* Δ, (b) *bull* Δ, (c) *dal81* Δ,  
 (d) *ixr1* Δ, (e) *lrg1* Δ, (f) *mms2* Δ, なお、(—□—) は親株 (BY4742)のTBT存在下での生存曲線を示す。



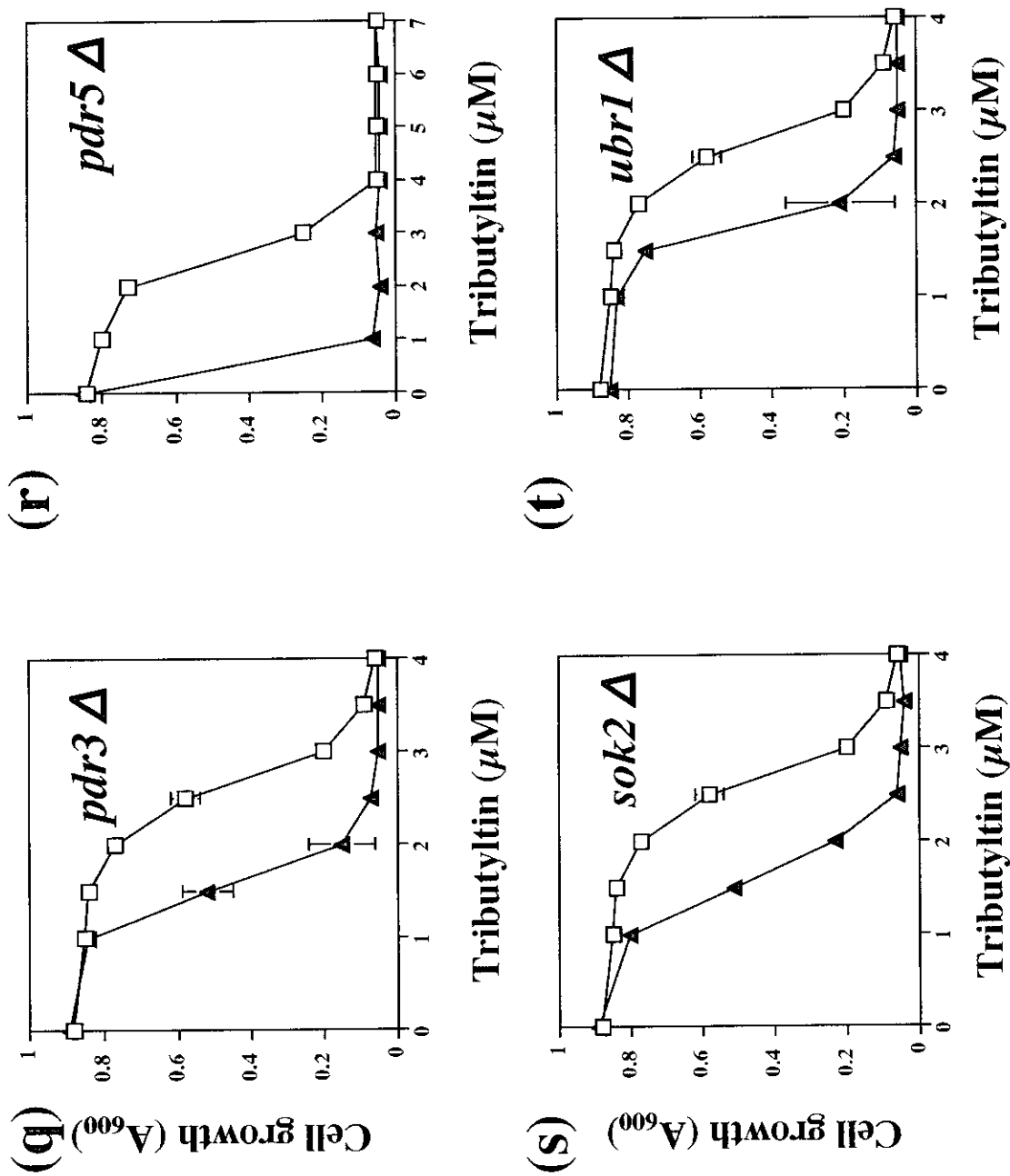
**Fig. 3-2. TBTに対して耐性を示す遺伝子欠損株の生存曲線 (2)**

酵母を96 well plate中で各濃度のTBT存在下48時間培養した後に、600 nmの吸光度を測定した (n=3)。  
 (—●—) は以下に示す遺伝子欠損株のTBT存在下での生存曲線を示す (g) *msn2*  $\Delta$ , (h) *rvs167*  $\Delta$ , (i) *sfl1*  $\Delta$ ,  
 (j) *sro9*  $\Delta$ , (k) *tat1*  $\Delta$ , (l) *ubc13*  $\Delta$ , なお、(—□—) は親株 (BY4742)のTBT存在下での生存曲線を示す。



**Fig. 3-3. TBTに対して高感受性を示す遺伝子欠損株の生存曲線 (1)**

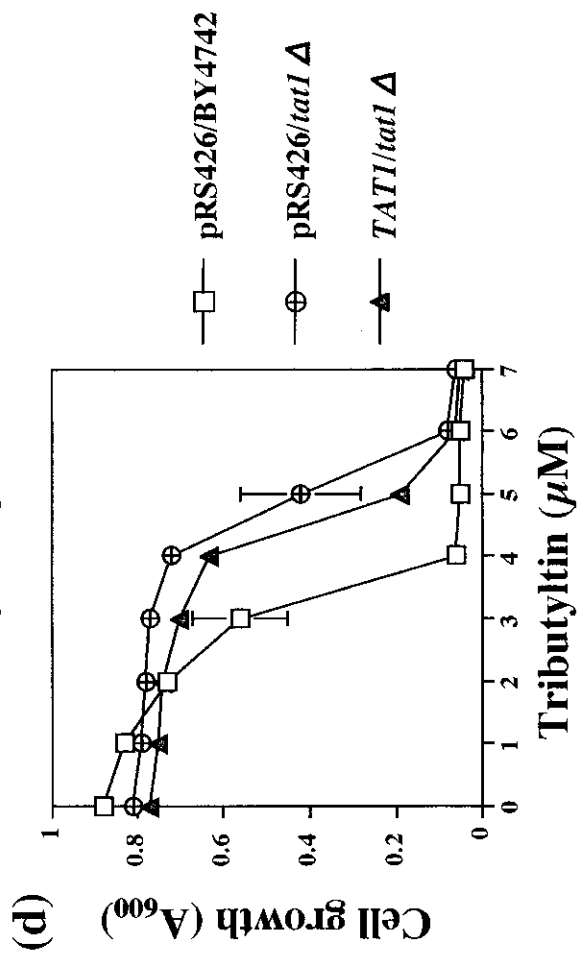
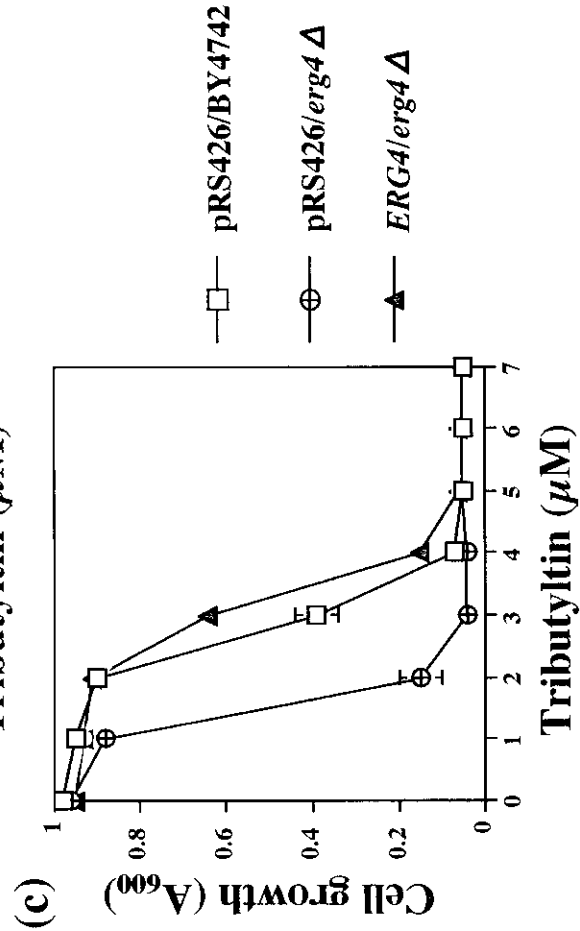
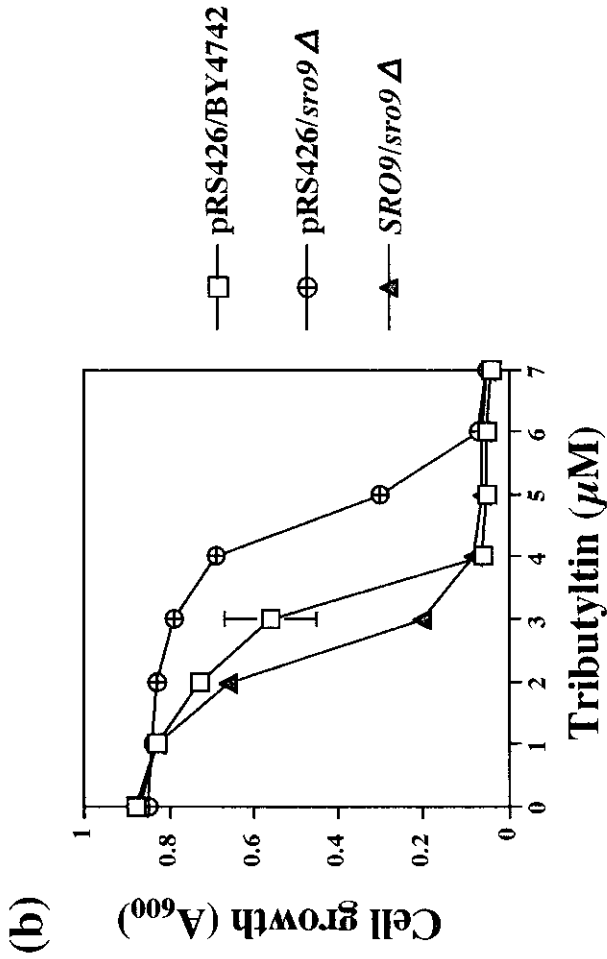
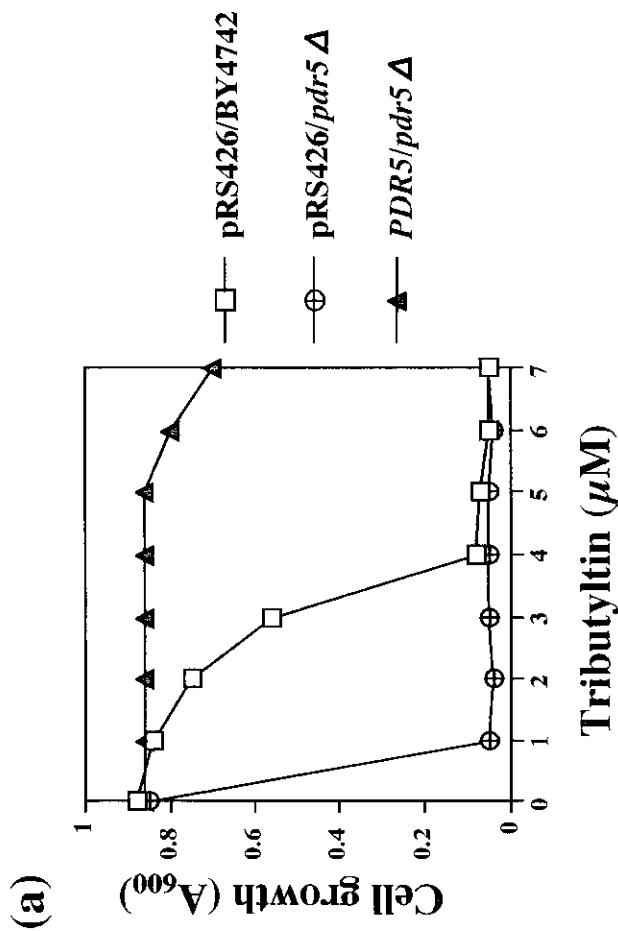
酵母を96 well plate中で各濃度のTBT存在下48時間培養した後に、600 nmの吸光度を測定した (n=3)。 (— $\Delta$ —) は以下に示す遺伝子欠損株のTBT存在下での生存曲線を示す (m) *arg82 Δ*, (n) *erg4 Δ*, (o) *hxx2 Δ*, (p) *hxt12 Δ*, なお、(— $\square$ —) は親株 (BY4742)のTBT存在下での生存曲線を示す。



**Fig. 3-4. TBTに対して高感受性を示す遺伝子欠損株の生存曲線 (2)**

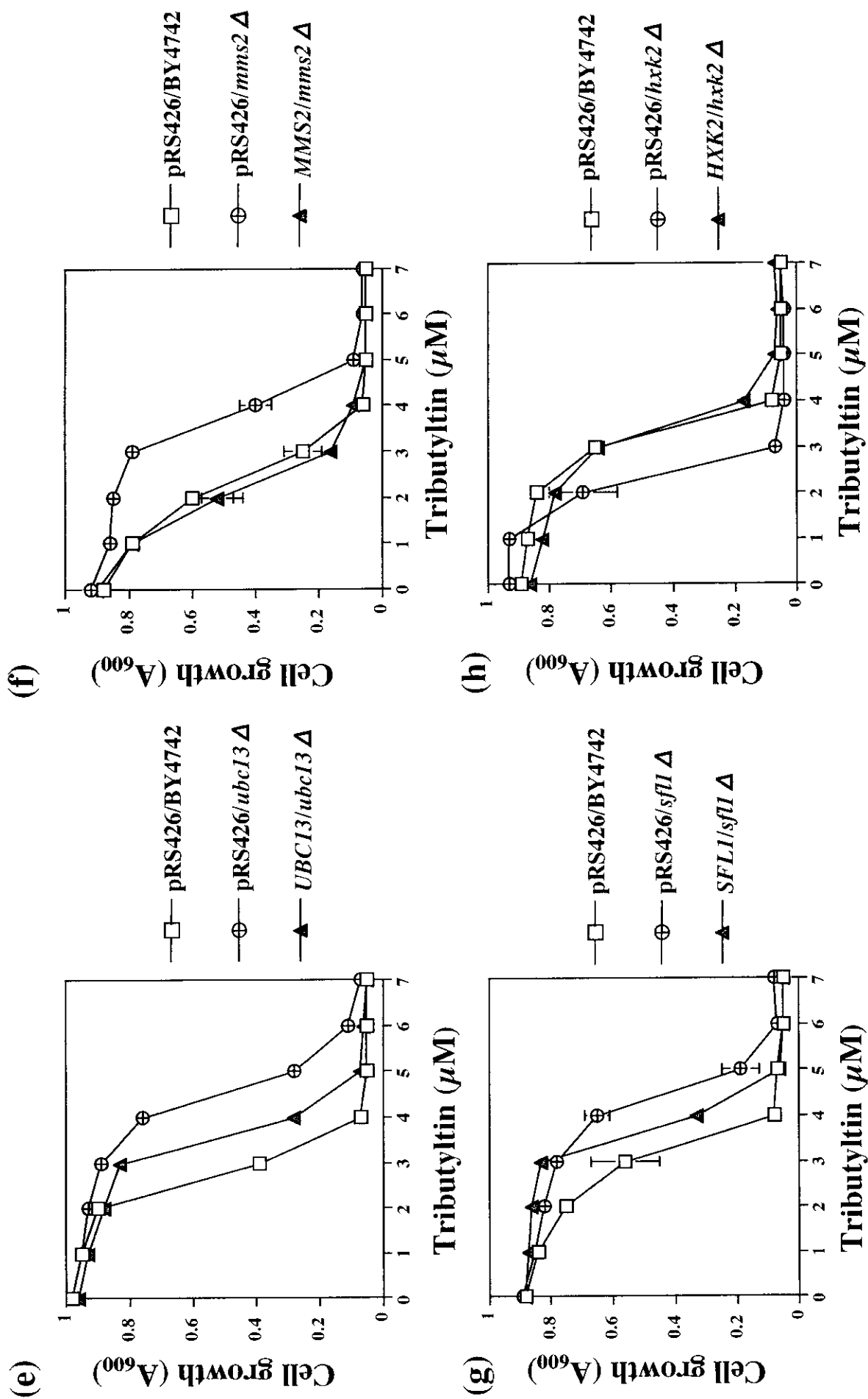
酵母を96 well plate中で各濃度のTBT存在下48時間培養した後に、600 nmの吸光度を測定した (n=3)。(—▲—)は以下に示す遺伝子欠損株のTBT存在下での生存曲線を示す (q) *pdr3* Δ, (r) *pdr5* Δ, (s) *sok2* Δ, (t) *ubr1* Δ, なお、(—□—)は親株 (BY4742)のTBT存在下での生存曲線を示す。





**Fig. 4-1. 高発現用プラスミドの機能の確認 (1)**

高発現用プラスミドの導入による遺伝子欠損株のTBT感受性の回復を指標に、プラスミドの機能の確認をおこなった。酵母を96 well plate中で各濃度のTBT存在下48時間培養した後に、600 nmの吸光度を測定した (n=3)。



**Fig. 4-2. 高発現用プラスミドの機能の確認 (2)**

高発現用プラスミドの導入による遺伝子欠損株のTBT感受性の回復を指標に、プラスミドの機能の確認をおこなった。酵母を96 well plate中で各濃度のTBT存在下48時間培養した後に、600 nmの吸光度を測定した (n=3)。

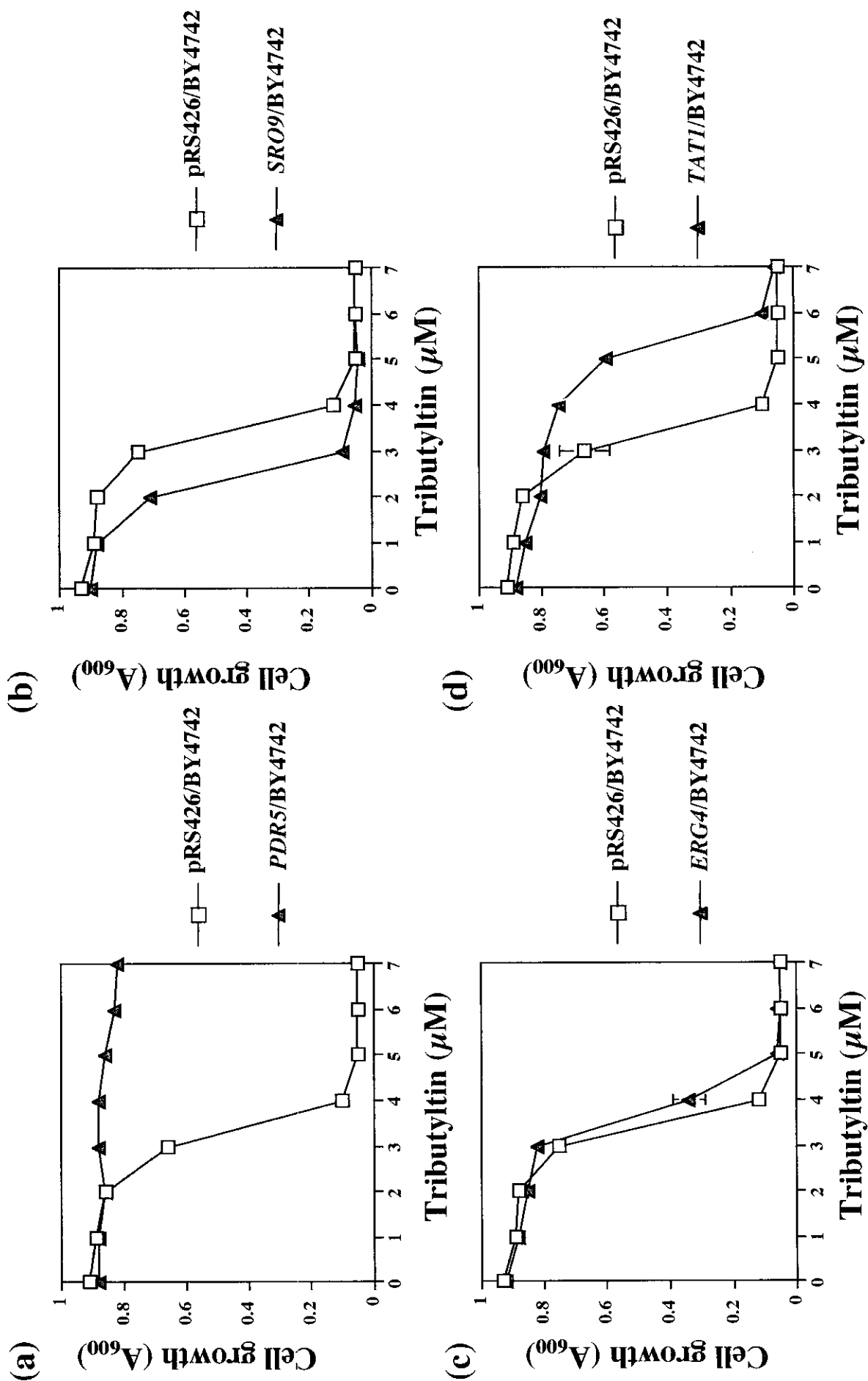


Fig. 5-1. 欠損により TBT 感受性に影響を与える因子の高発現が TBT 感受性に及ぼす影響 (1) 遺伝子欠損により酵母の TBT 感受性に影響を与える因子について、酵母に高発現させ、TBT に対する感受性を調べた。酵母を 96 well plate 中で各濃度の TBT 存在下 48 時間培養した後に、600 nm の吸光度を測定した (n=3)。

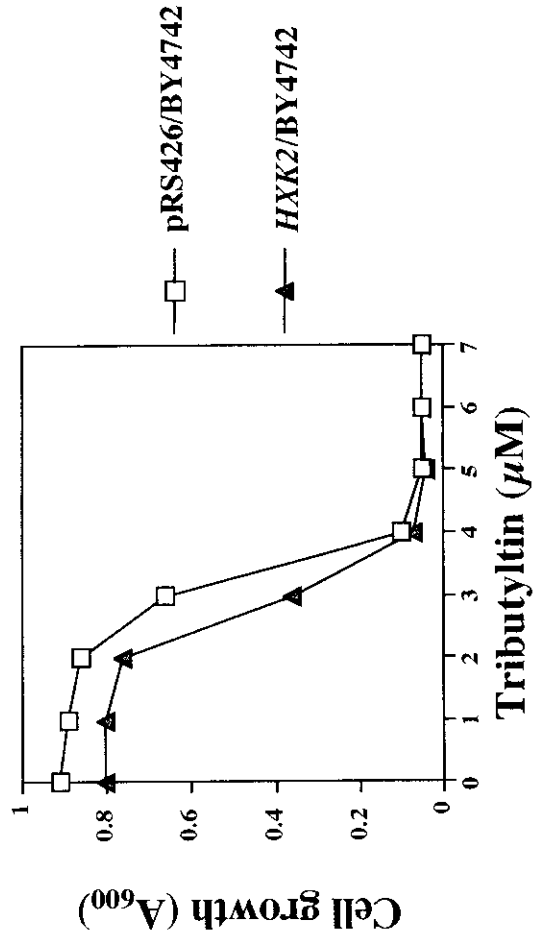
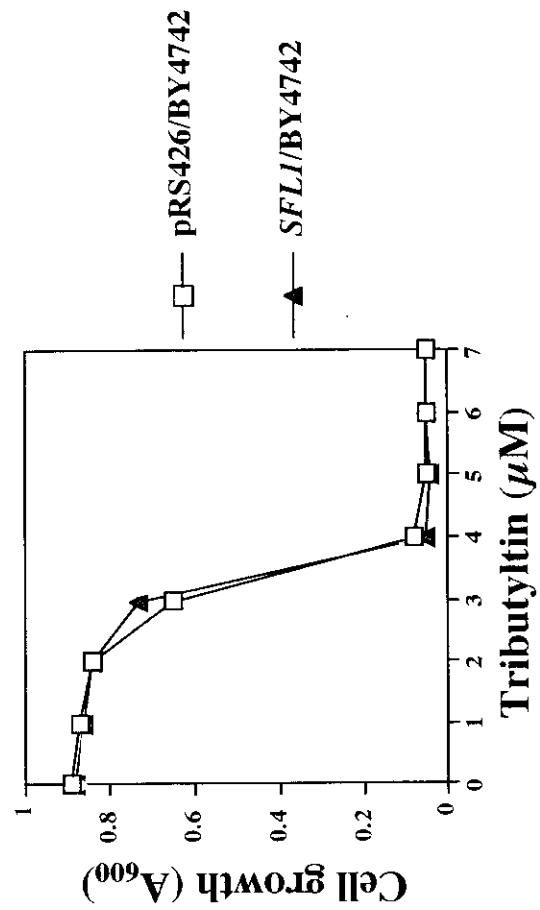
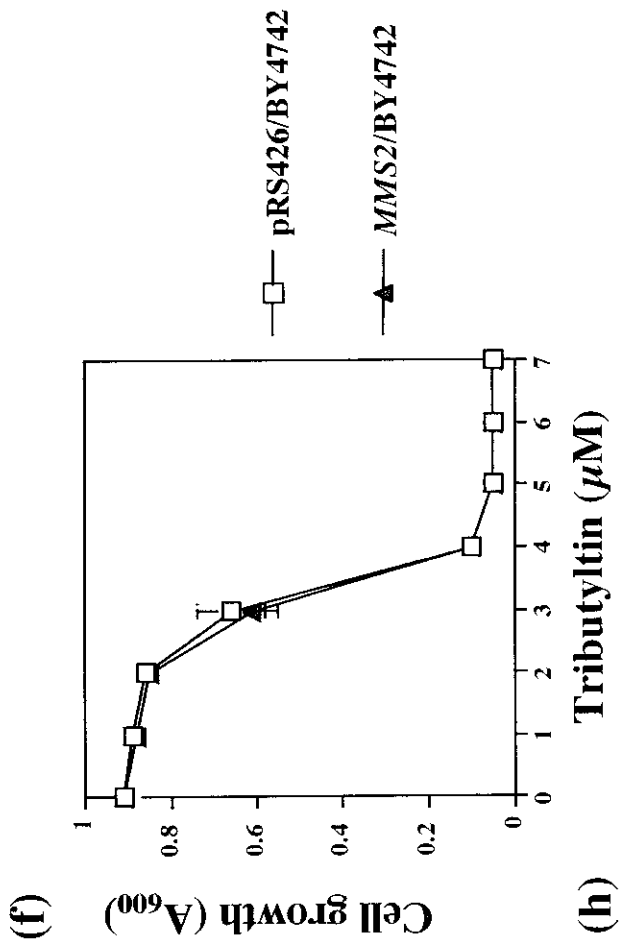
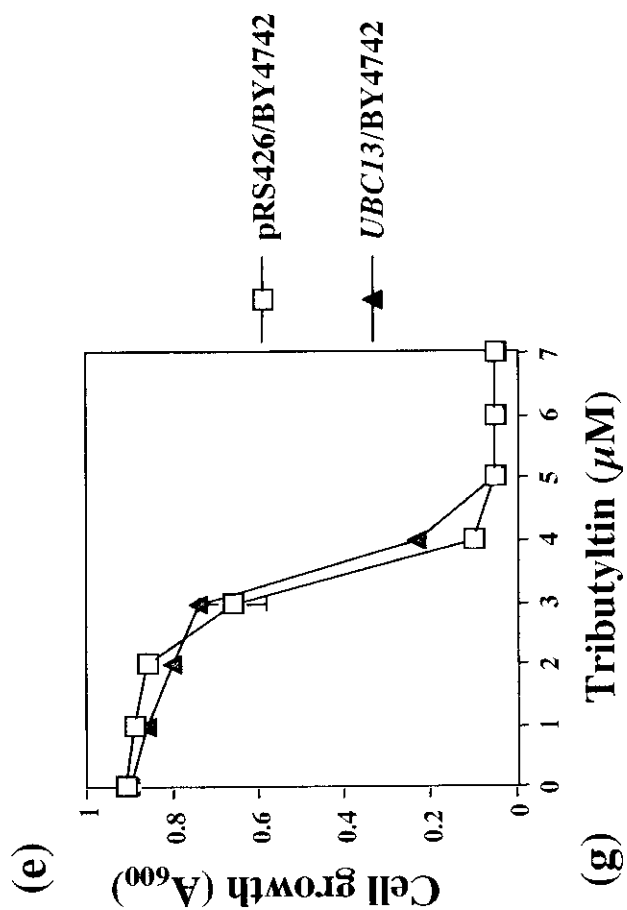
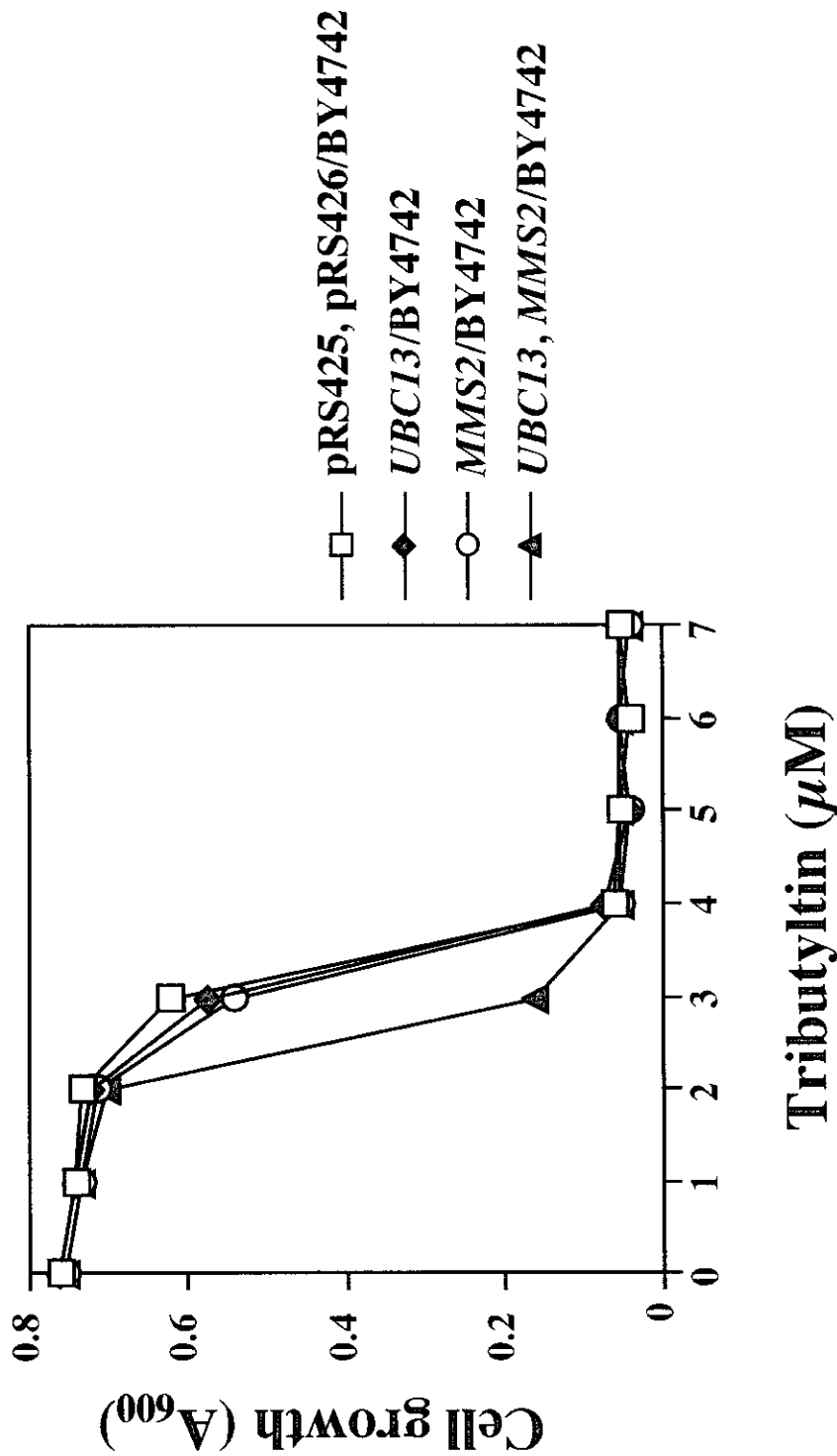
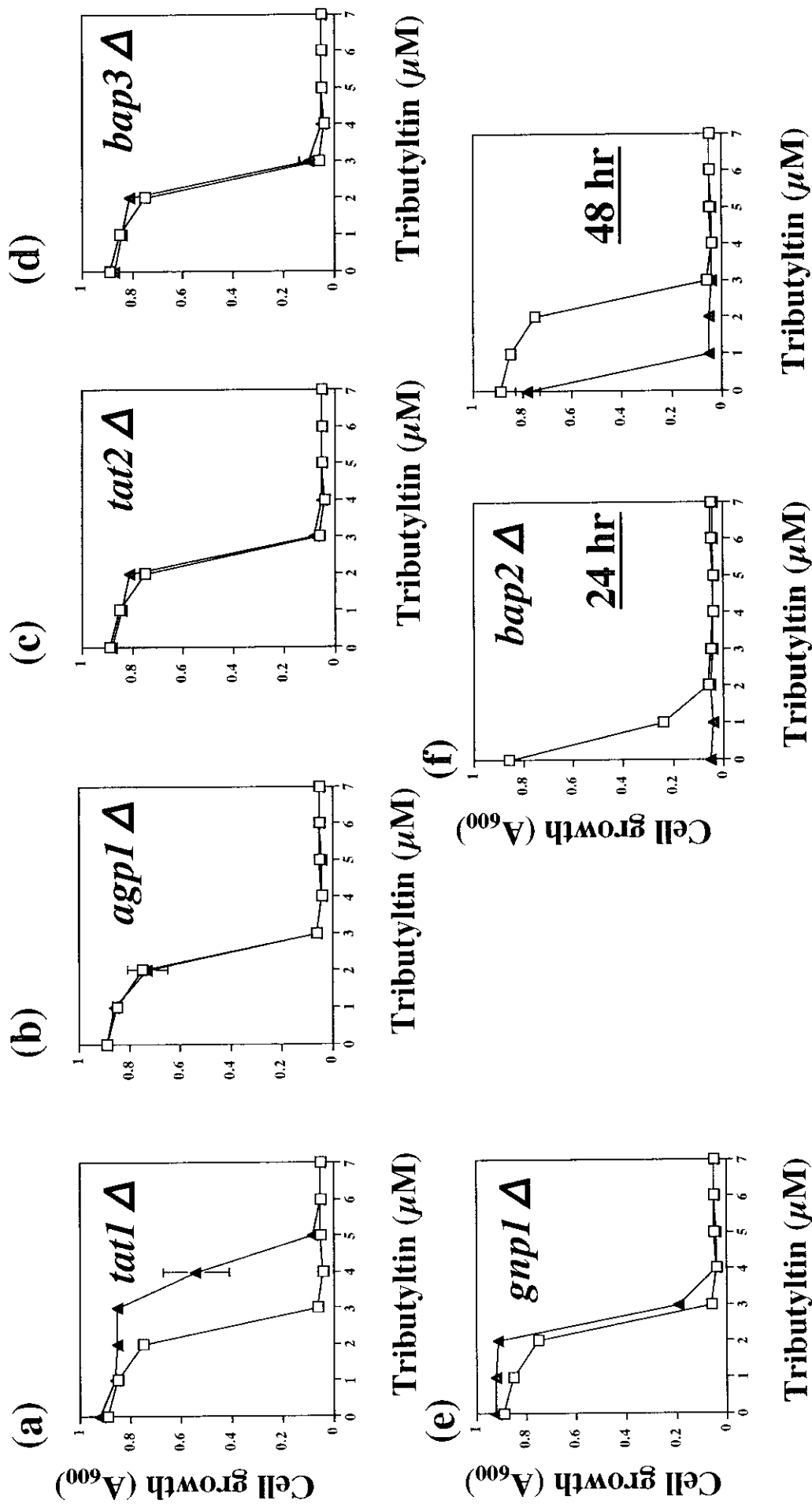


Fig. 5-2. 欠損により TBT 感受性に影響を与える因子の高発現が TBT 感受性に及ぼす影響 (2) 遺伝子欠損により酵母の TBT 感受性に影響を与える因子について、酵母に高発現させ、TBT に対する感受性を調べた。酵母を 96 well plate 中で各濃度の TBT 存在下 48 時間培養した後に、600 nm の吸光度を測定した (n=3)。



**Fig. 6. Ubc13およびMms2を共に高発現させた酵母のTBTに対する感受性**  
 酵母を96 well plate中で各濃度のTBT存在下48時間培養した後に、600 nmの吸光度を測定した (n=3)。  
 (—□—): コントロール, (—◆—): Ubc13高発現酵母, (—○—): Mms2高発現酵母, (—▲—): Ubc13, Mms2を  
 共に高発現した酵母。



**Fig. 7-1. APC familyに属する因子の遺伝子欠損株の生存曲線 (1)**

酵母を96 well plate中で各濃度のTBT存在下48時間培養した後に、600 nmの吸光度を測定した (n=3)。 (—▲—) は以下に示す遺伝子欠損株のTBT存在下での生存曲線を示す (a) *tat1* Δ, (b) *agp1* Δ, (c) *tat2* Δ, (d) *bap3* Δ, (e) *gnp1* Δ, (f) 酵母 (BY4742, *bap2* Δ) を96 well plate中で各濃度のTBT存在下24, 48時間培養し、各培養時間における600 nmの吸光度を測定した (n=3)。なお、(—□—) は野生株 (BY4742)のTBT存在下での生存曲線を示す。

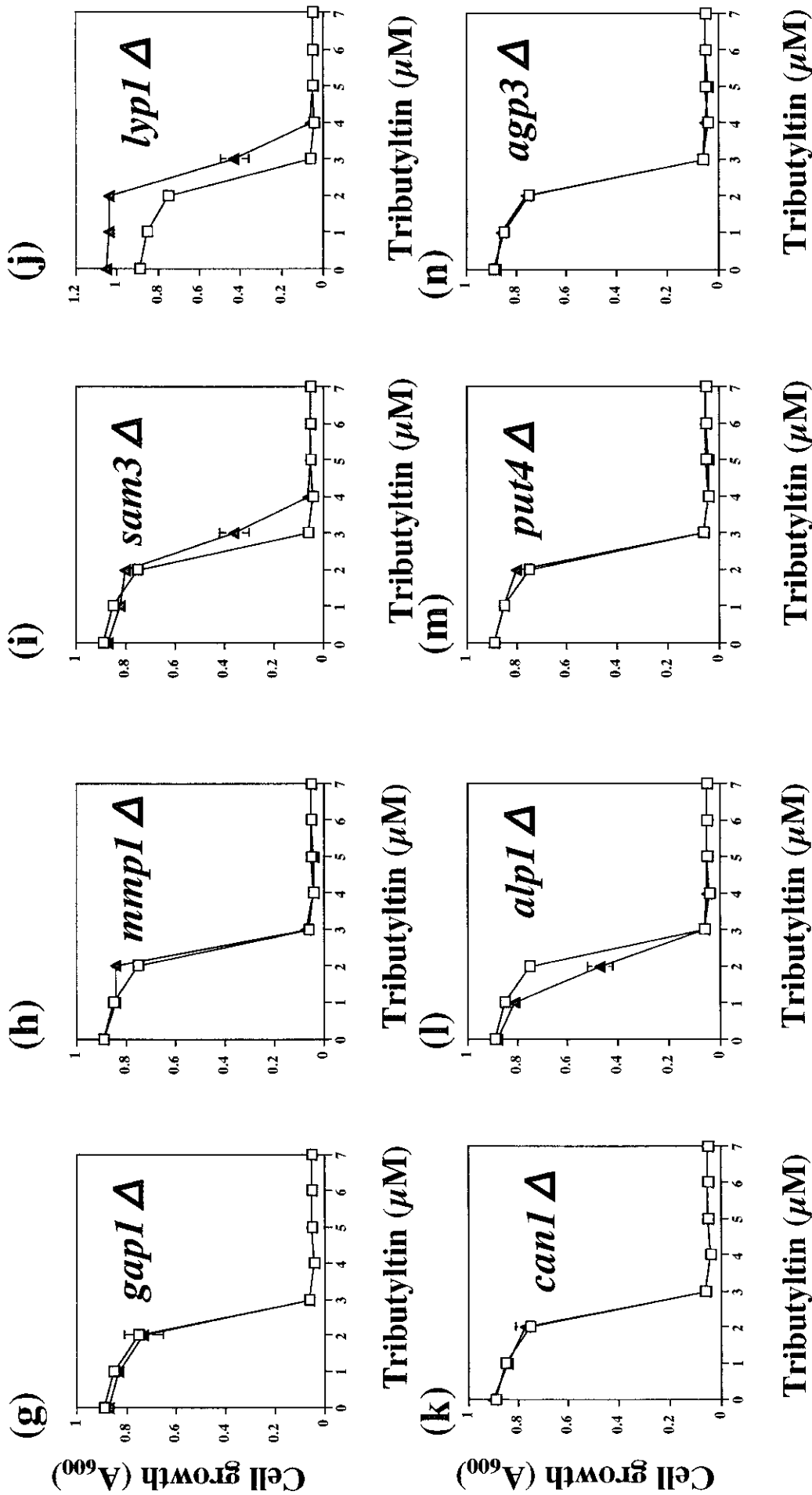


Fig. 7-2. APC familyに属する因子の遺伝子欠損株の生存曲線 (2)

酵母を96 well plate中で各濃度のTBT存在下48時間培養した後に、600 nmの吸光度を測定した (n=3)。 (—▲—) は以下に示す遺伝子欠損株のTBT存在下での生存曲線を示す (g) *gap1*  $\Delta$ , (h) *mmp1*  $\Delta$ , (i) *sam3*  $\Delta$ , (j) *lyp1*  $\Delta$ , (k) *can1*  $\Delta$ , (l) *alp1*  $\Delta$ , (m) *put4*  $\Delta$ , (n) *agp3*  $\Delta$ , なお、(—□—) は野生株 (BY4742)のTBT存在下での生存曲線を示す。

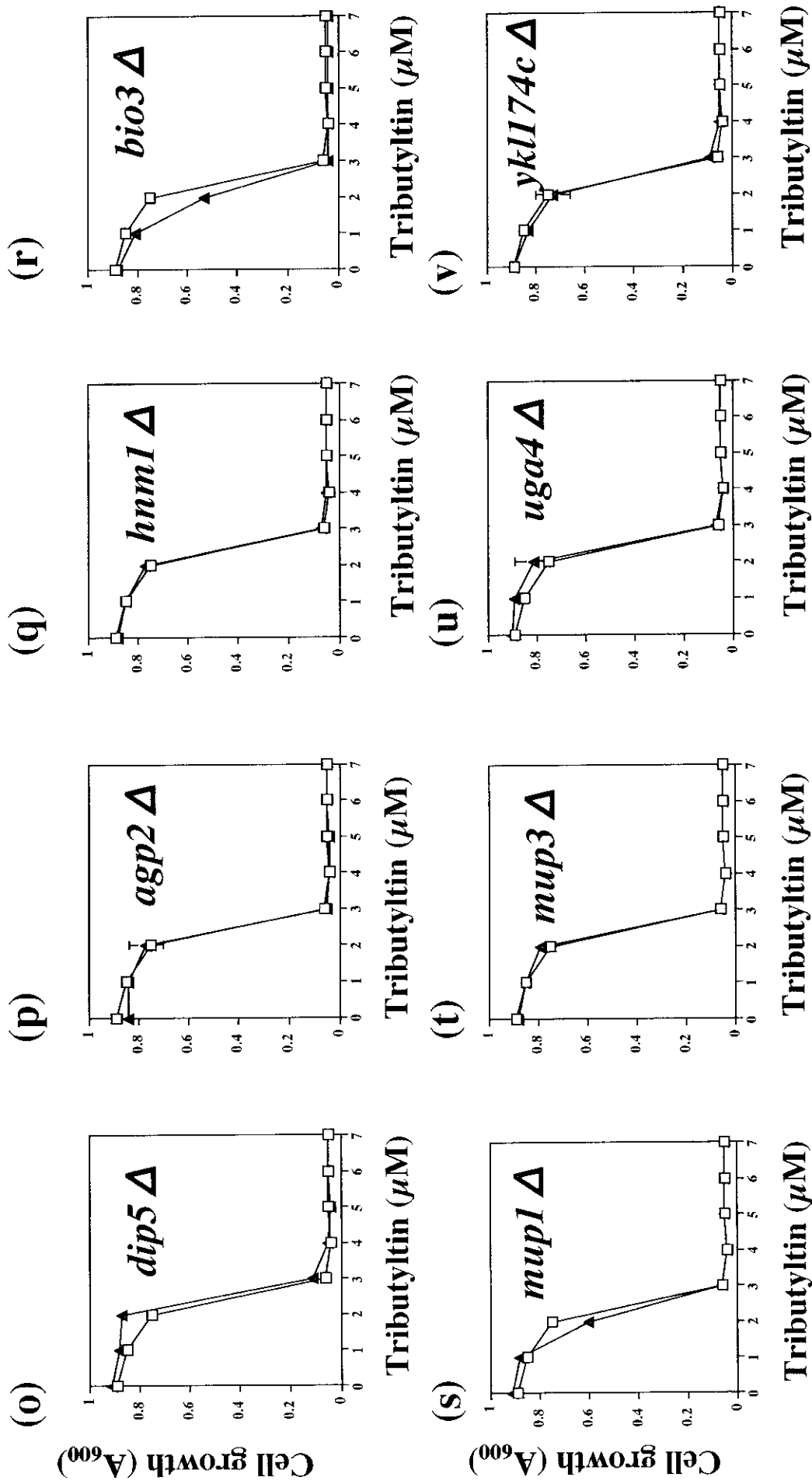


Fig. 7-3. APC familyに属する因子の遺伝子欠損株の生存曲線の生存曲線 (3)

酵母を96 well plate中で各濃度のTBT存在下48時間培養した後に、600 nmの吸光度を測定した (n=3)。  
 (—▲—) は以下に示す遺伝子欠損株のTBT存在下での生存曲線を示す (o) *dip5*  $\Delta$ , (p) *agp2*  $\Delta$ , (q) *hnm1*  $\Delta$ ,  
 (r) *bio3*  $\Delta$ , (s) *mup1*  $\Delta$ , (t) *mup3*  $\Delta$ , (u) *uga4*  $\Delta$ , (v) *ykl174c*  $\Delta$ , なお、(—□—) は野生株 (BY4742)のTBT存在下での生存曲線を示す。



(A) Ergosterol biosynthesis pathway

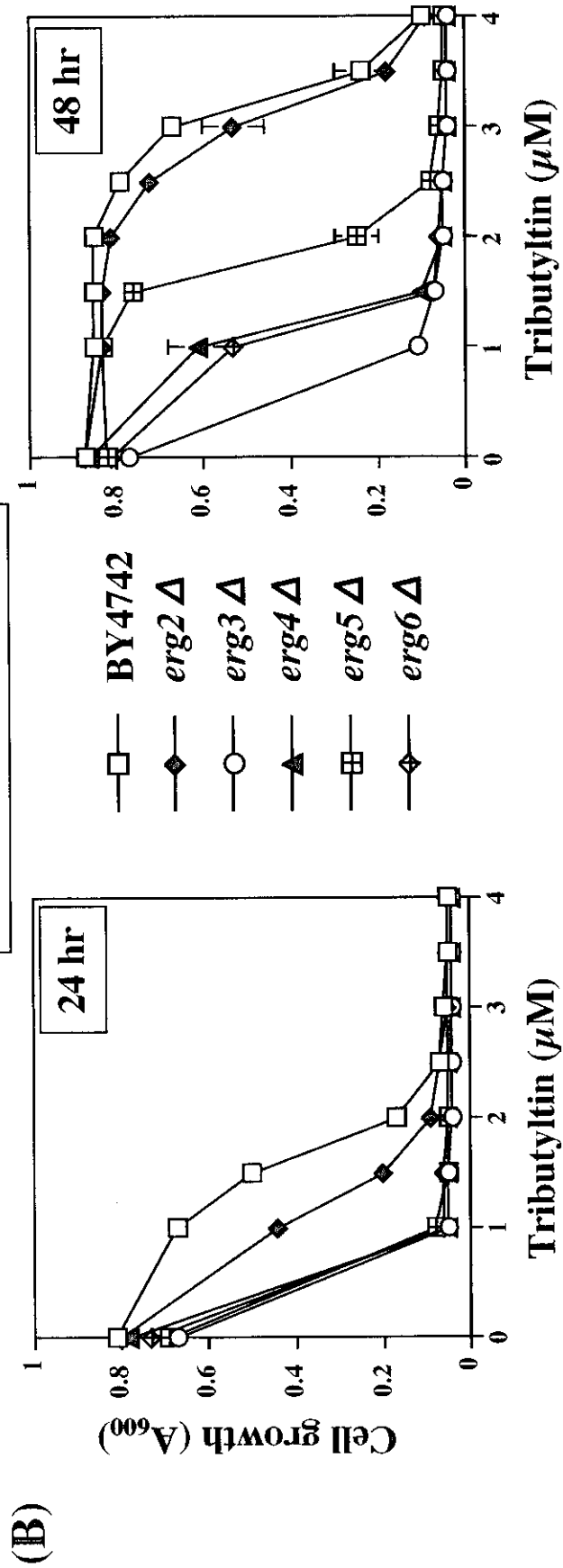
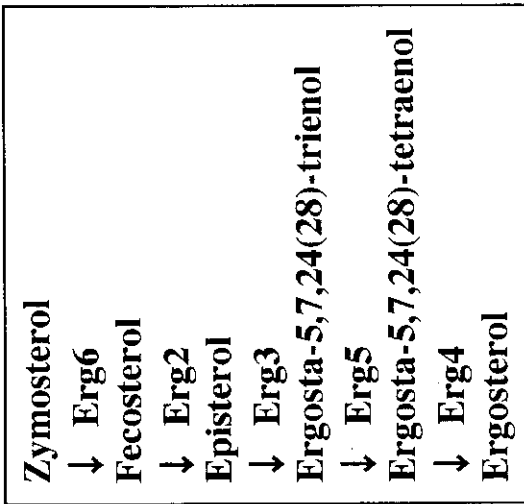
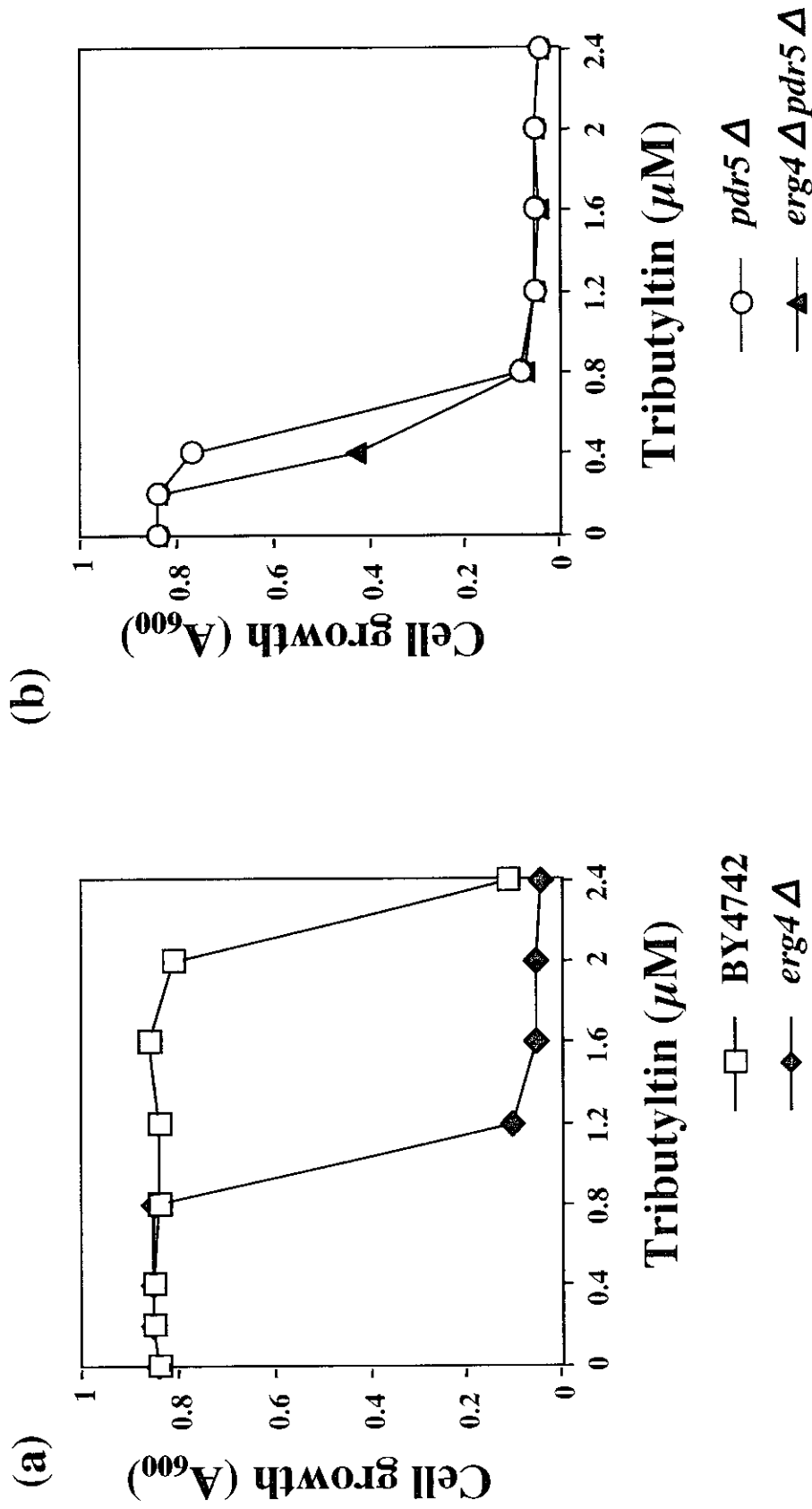
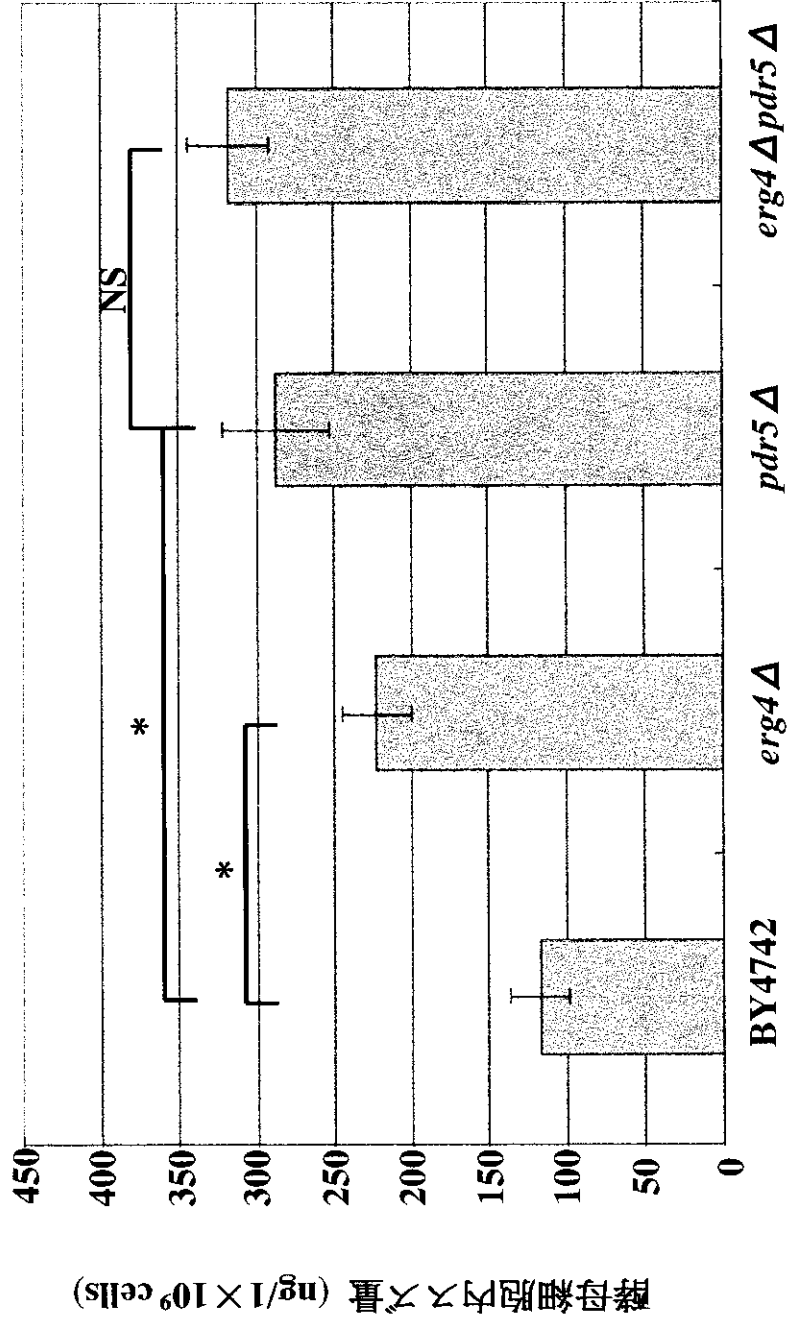


Fig. 8. エルゴステロール合成経路変異酵母のTBTに対する感受性の検討  
 (A) エルゴステロール合成経路, (B) 酵母を96 well plate中で各濃度のTBT存在下24, 48時間培養し、各培養時間における600 nmの吸光度を測定した (n=3)。



**Fig. 9. ERG4遺伝子欠損によるTBT感受性増強機構へのPdr5の効果**

酵母を96 well plate中で各濃度のTBT存在下48時間培養した後に、600 nmの吸光度を測定した (n=3)。  
 (a): Erg4のみ欠損させた際の酵母のTBT感受性への影響, (b): Pdr5の欠損した条件下でErg4を欠損させた際の酵母のTBT感受性への影響。



**Fig. 10. ERG4遺伝子欠損株の細胞内スズ量にPdr5が及ぼす影響**

酵母 ( $1 \times 10^9$  cells) を  $10 \mu\text{M}$  の TBT を含む YPAD 液体培地で 3 時間培養後、湿式灰化し、ICP-MS により細胞内のスズ量を測定した ( $n=4$ )。\*:  $p < 0.05$ , NS: 有意差なし

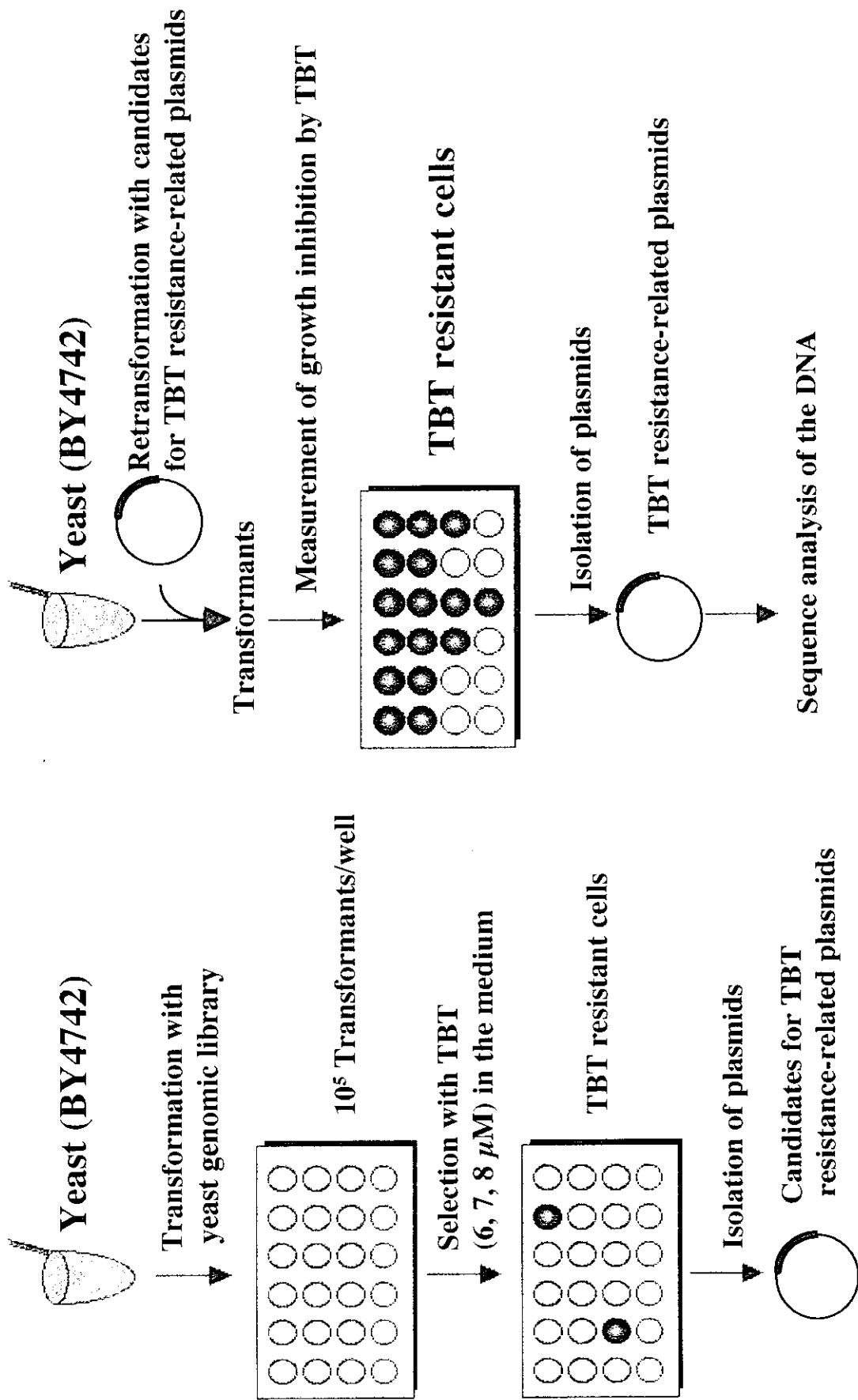


Fig. 11. 高発現によって酵母にTBST耐性を与える遺伝子のスクリーニング方法