

Fig. 4. Effect of deletion of Fre1 in yeast cells on sensitivity to various cytotoxic compounds

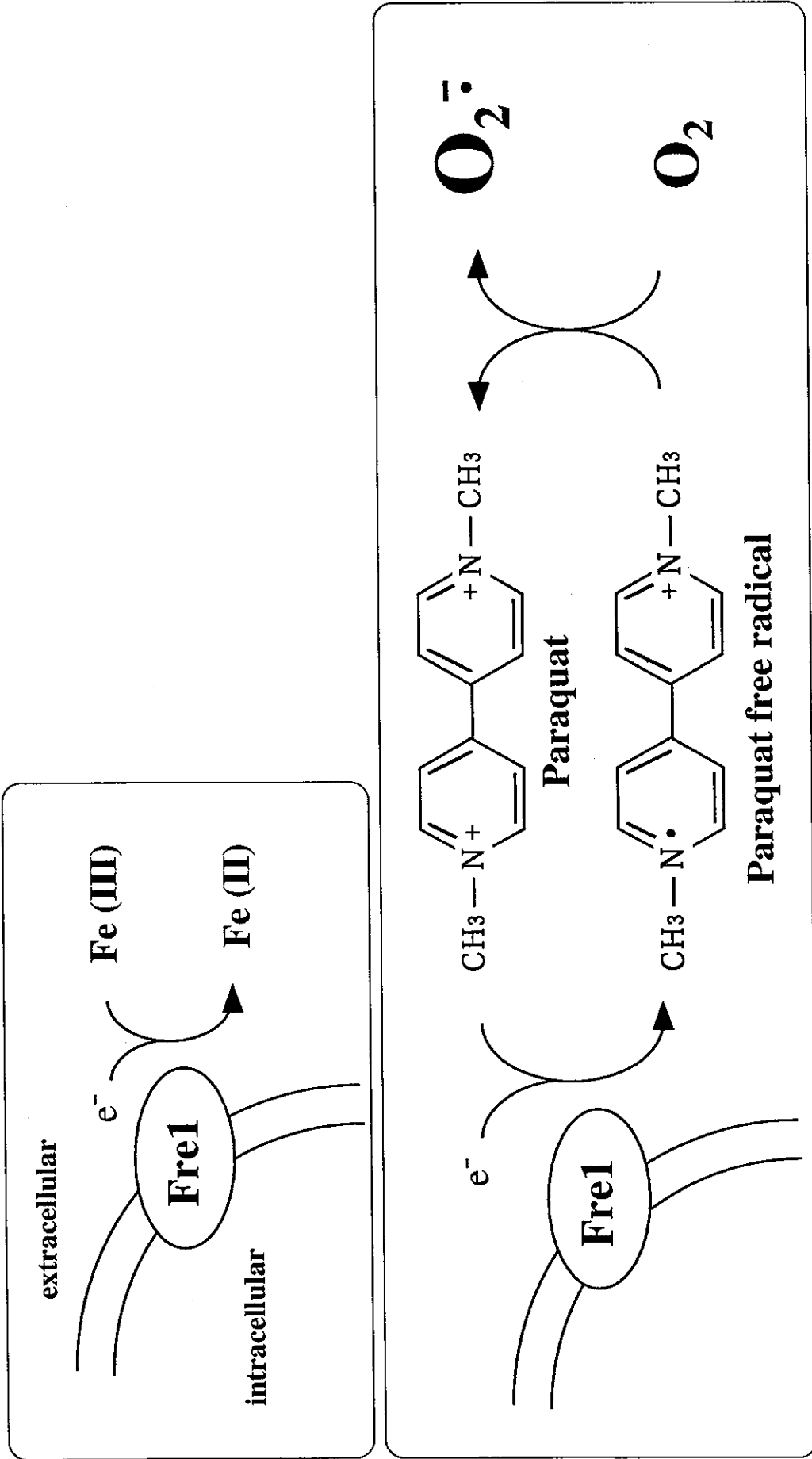


Fig. 5. Suggested mechanism of superoxide generation by Fre1

Fre1は鉄および銅を還元 (e⁻を供与) する酵素で、パラコートにも e⁻を供与しうる

Hasset, R. and Kosman, D. J. (1995)

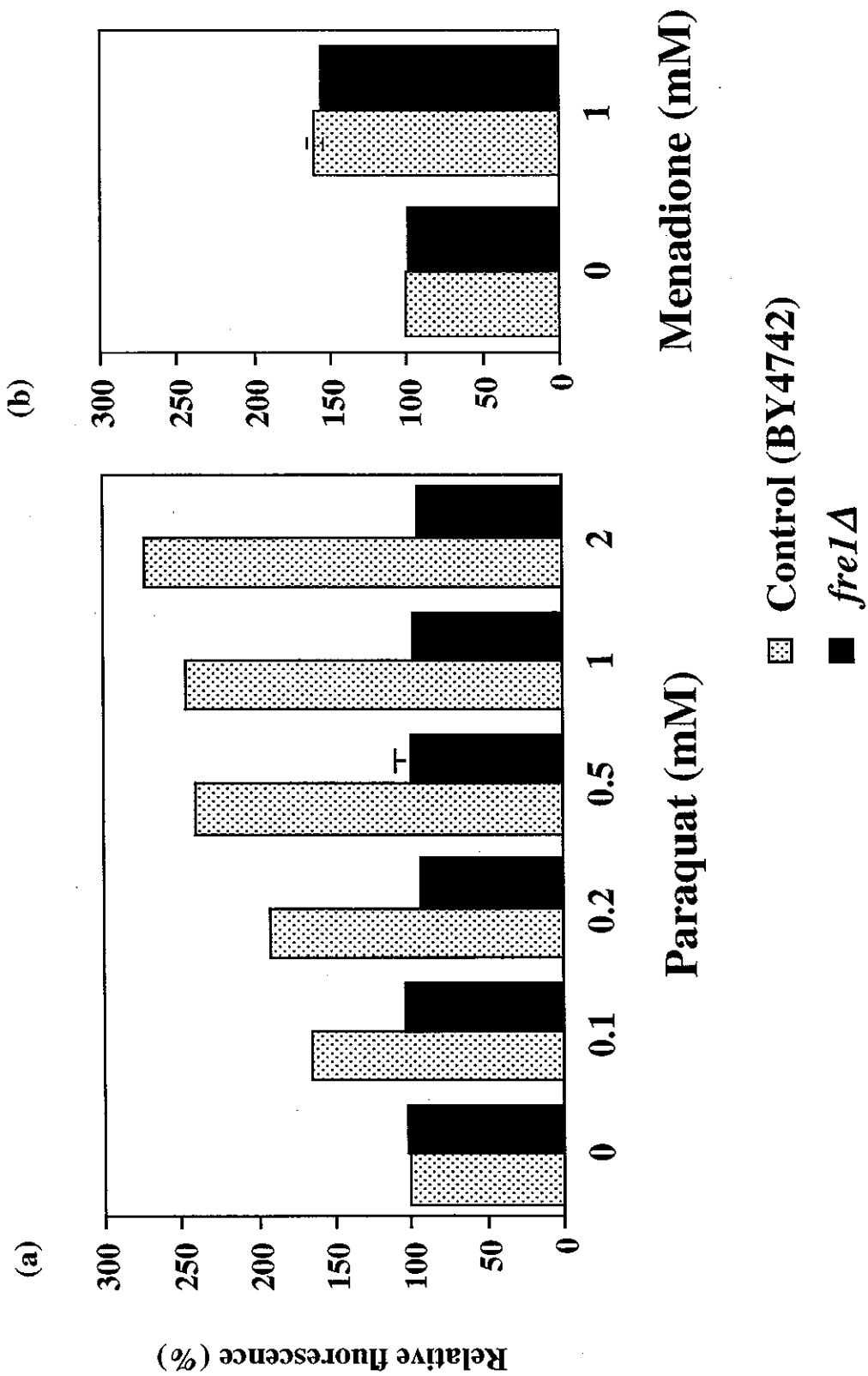


Fig. 6. Effect of deletion of Fre1 on extracellular ROS production in yeast cells treated with paraquat or menadione

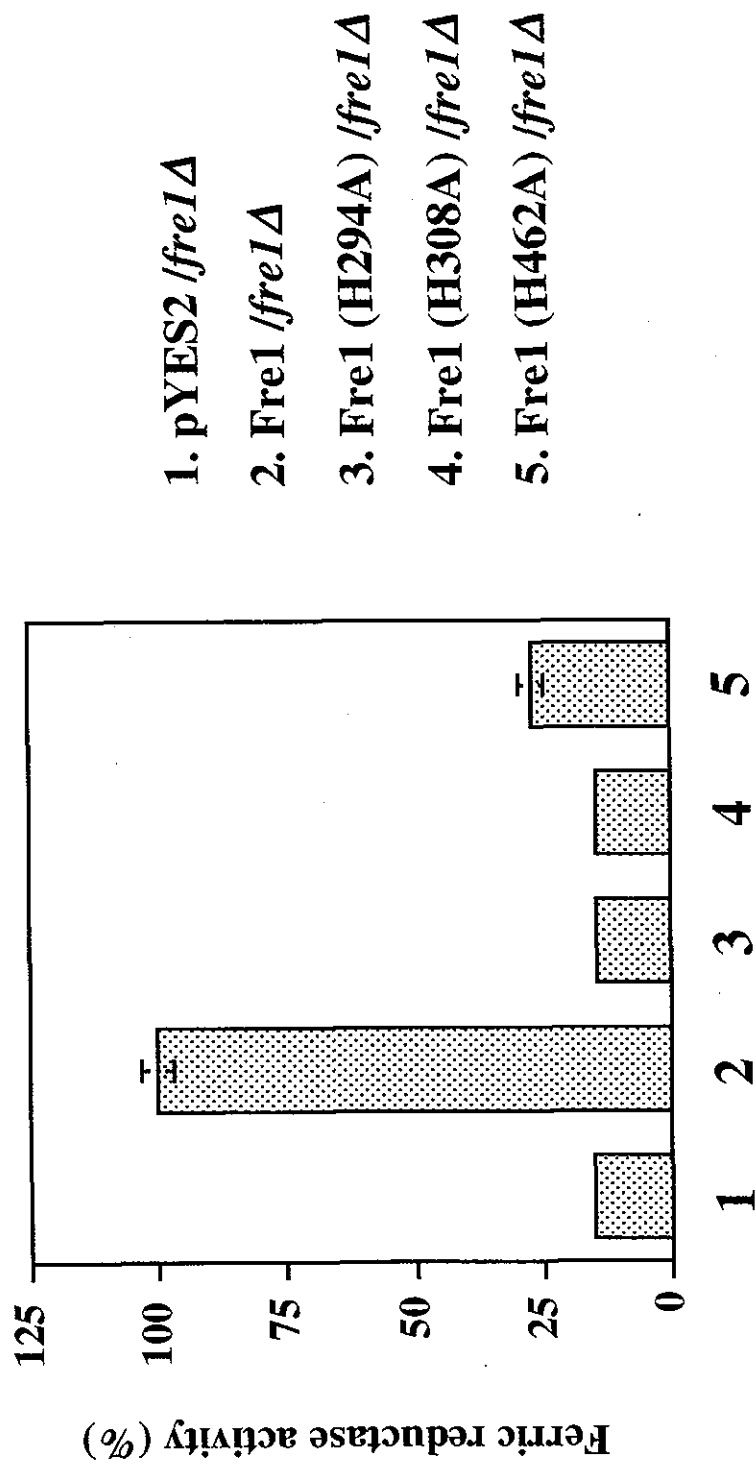


Fig. 8. Ferric reductase activity of yeast cells overexpressing Fre1 mutants

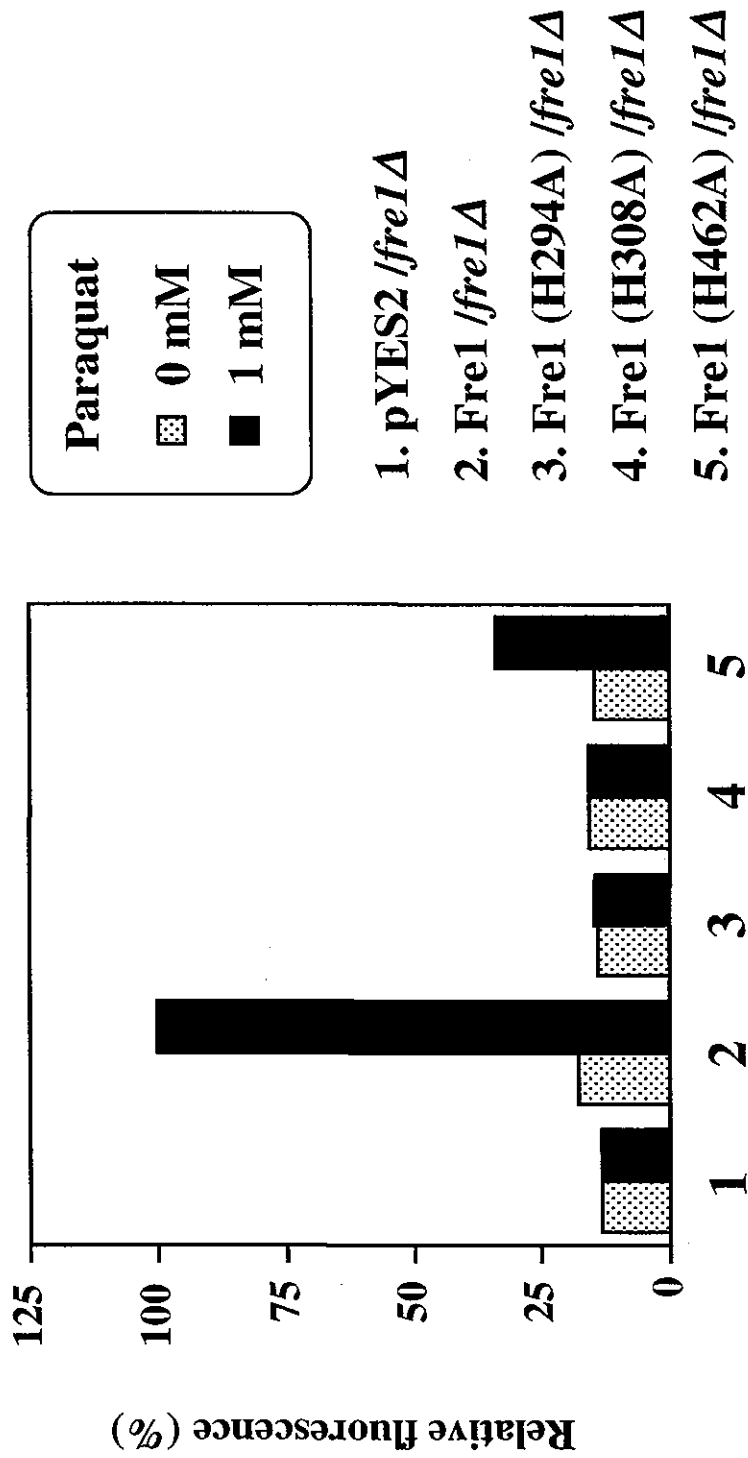


Fig. 9. Paraquat-dependent extracellular ROS production in yeast cells overexpressing *Fre1* mutants

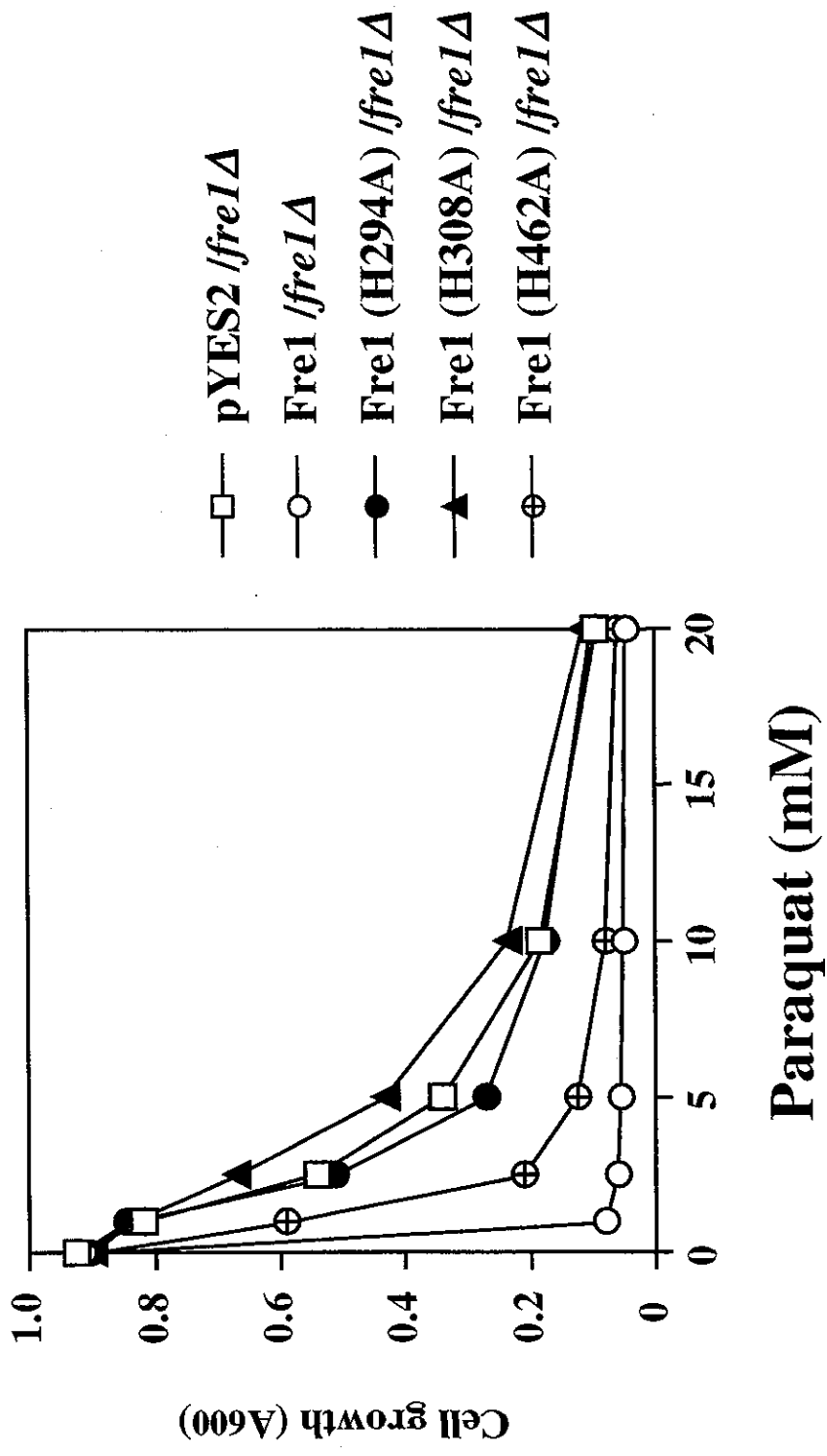


Fig. 10. Effect of overexpression of Fre1 mutants on sensitivity to paraquat

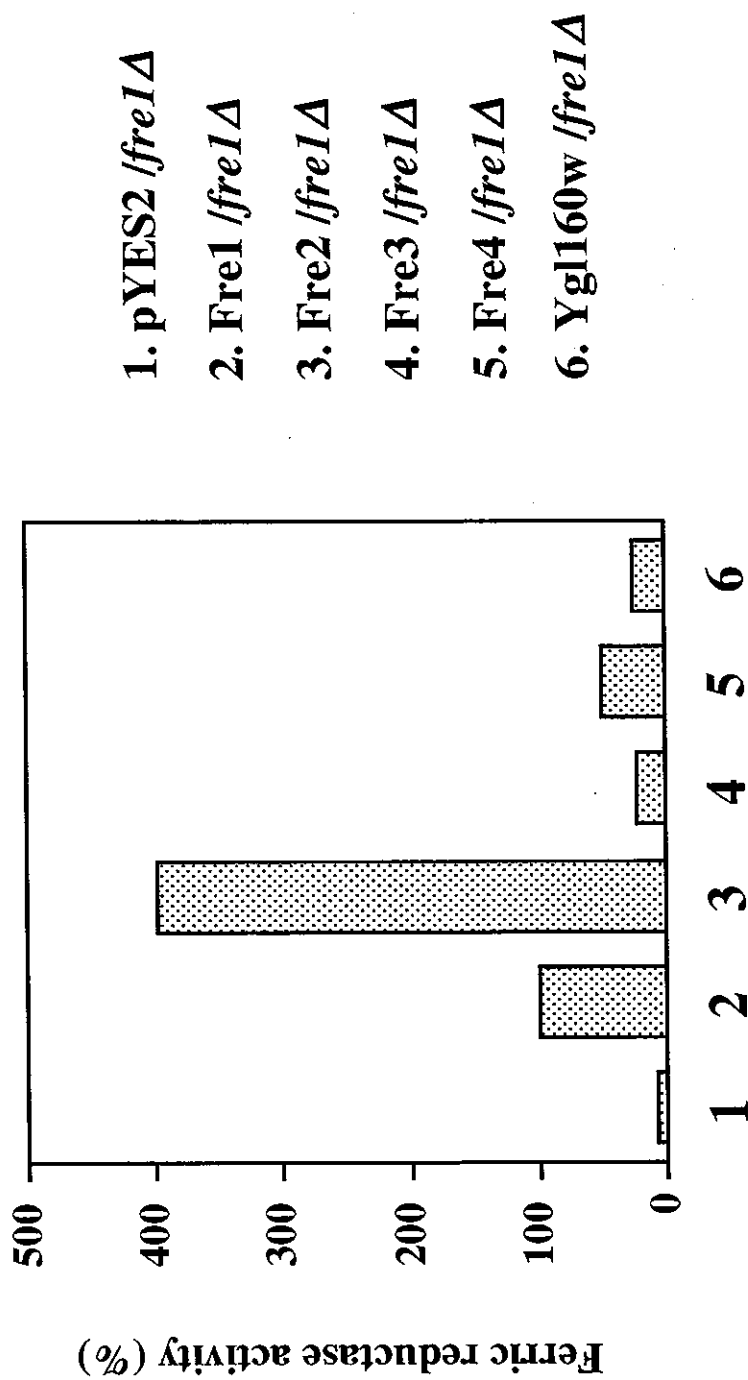


Fig. 11. Ferric reductase activity of yeast cells overexpressing Fre family

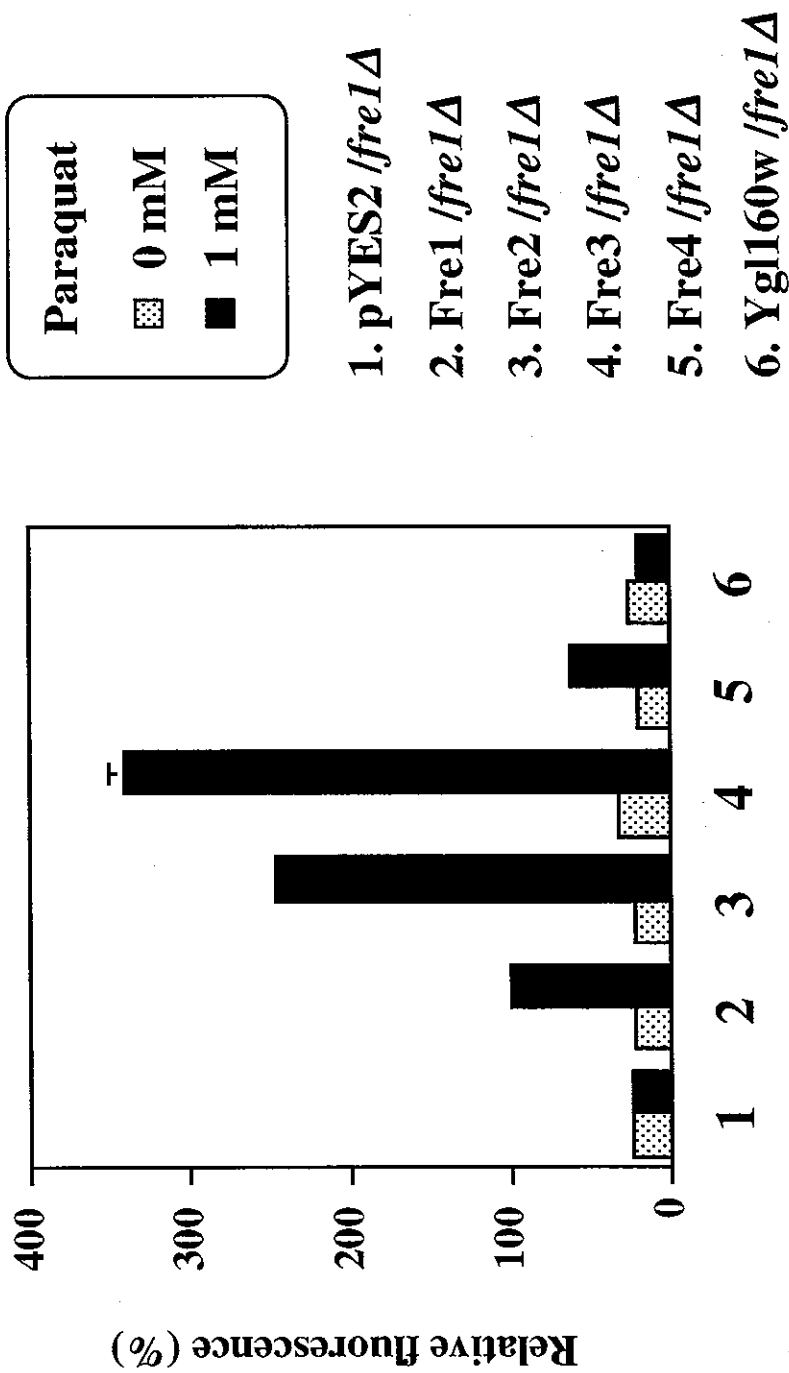


Fig. 12. Paraquat-dependent extracellular ROS production in yeast cells overexpressing Fre family

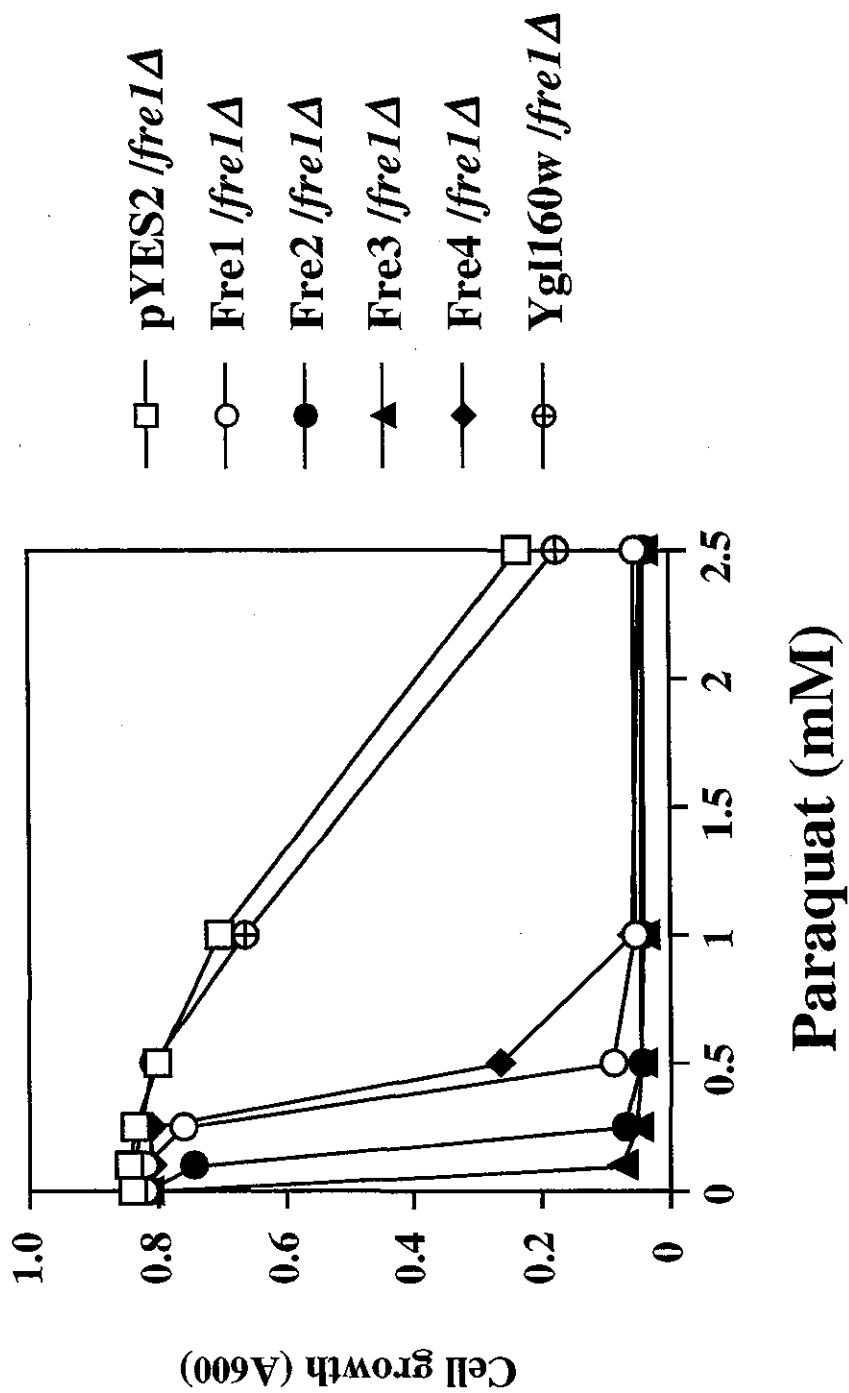


Fig. 13. Effect of overexpression of Fre family on sensitivity to paraquat

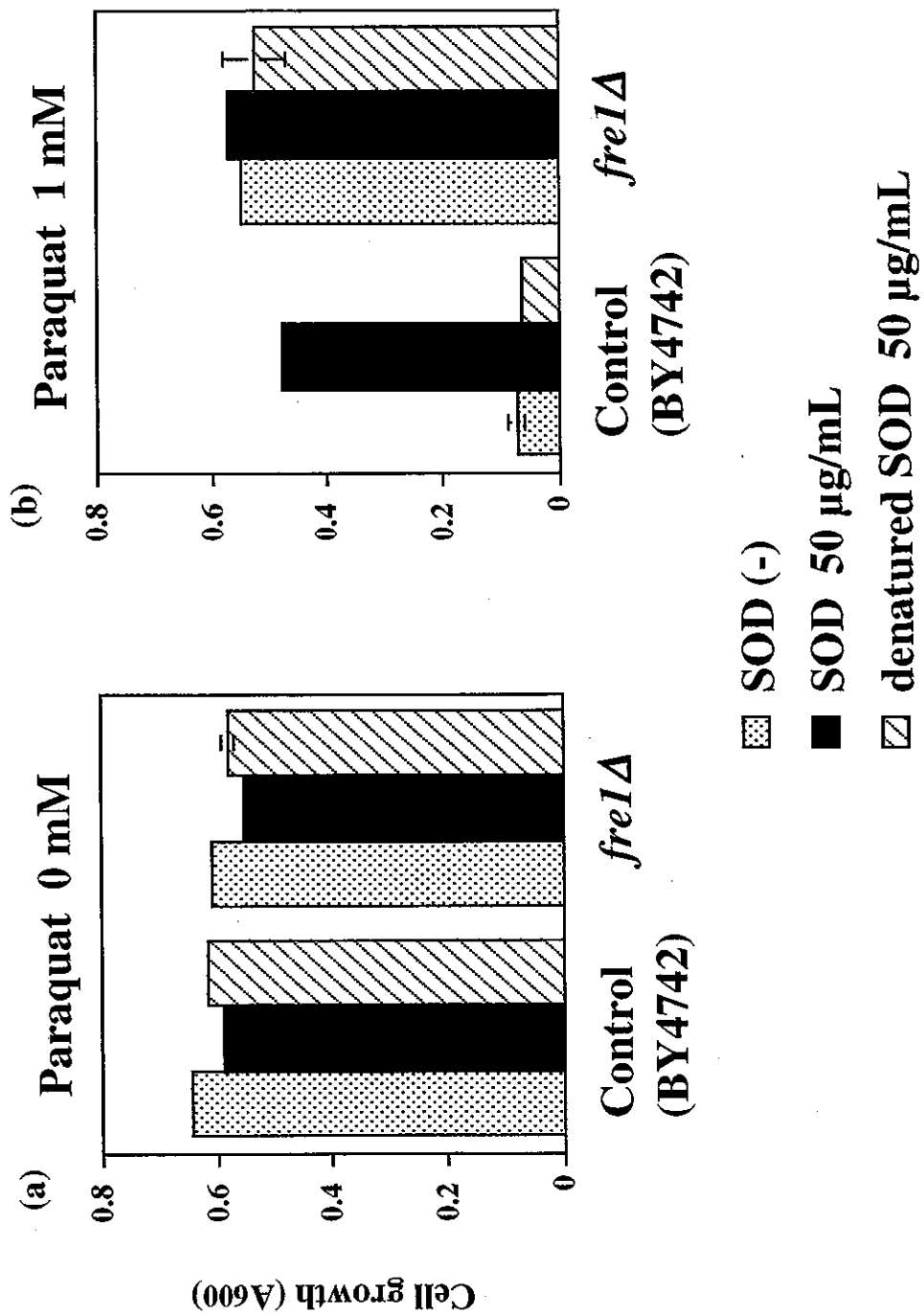


Fig. 14. Effect of SOD supplemented in media on sensitivity to paraquat

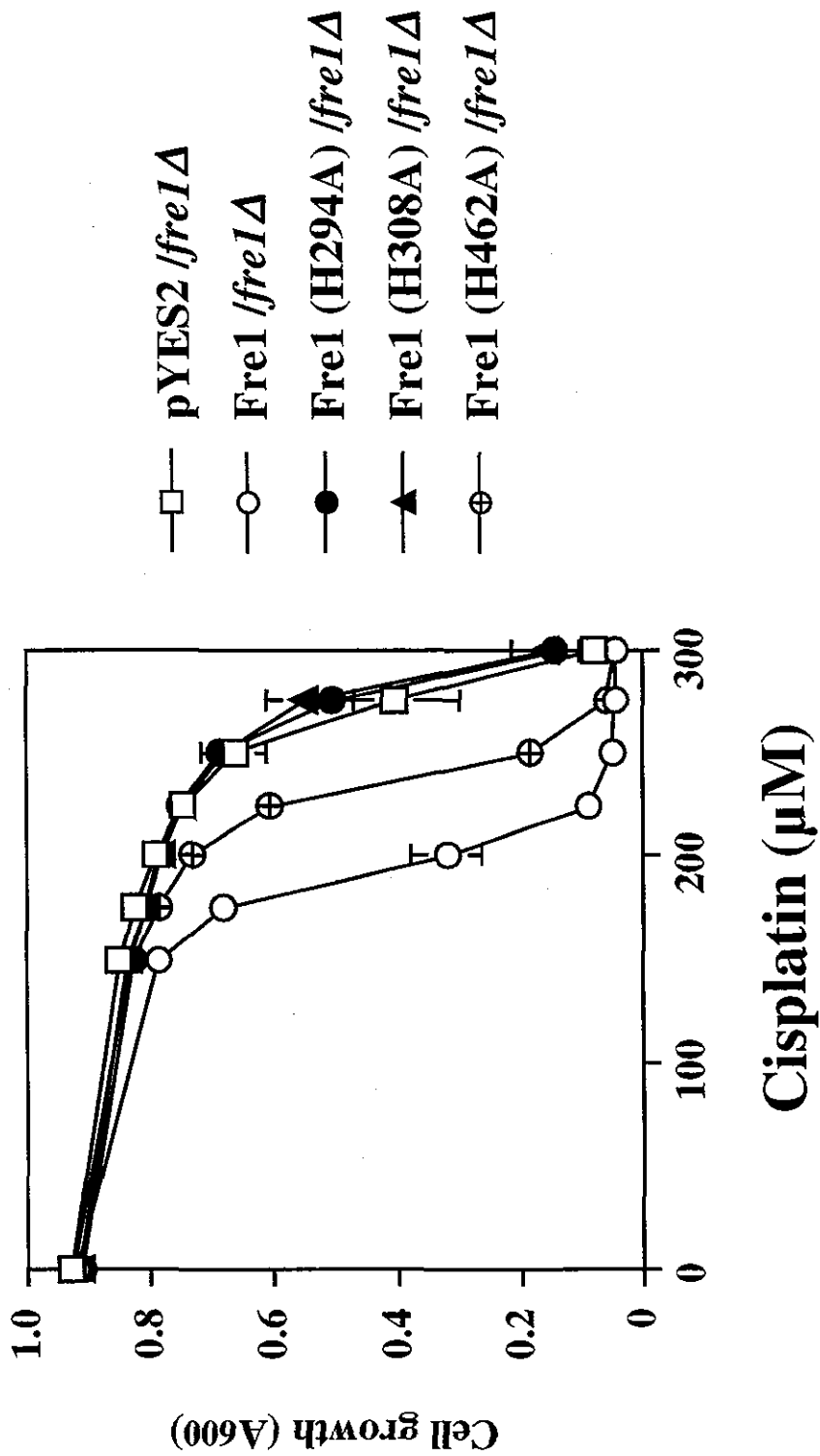


Fig. 15. Effect of overexpression of Fre1 mutants on sensitivity to cisplatin

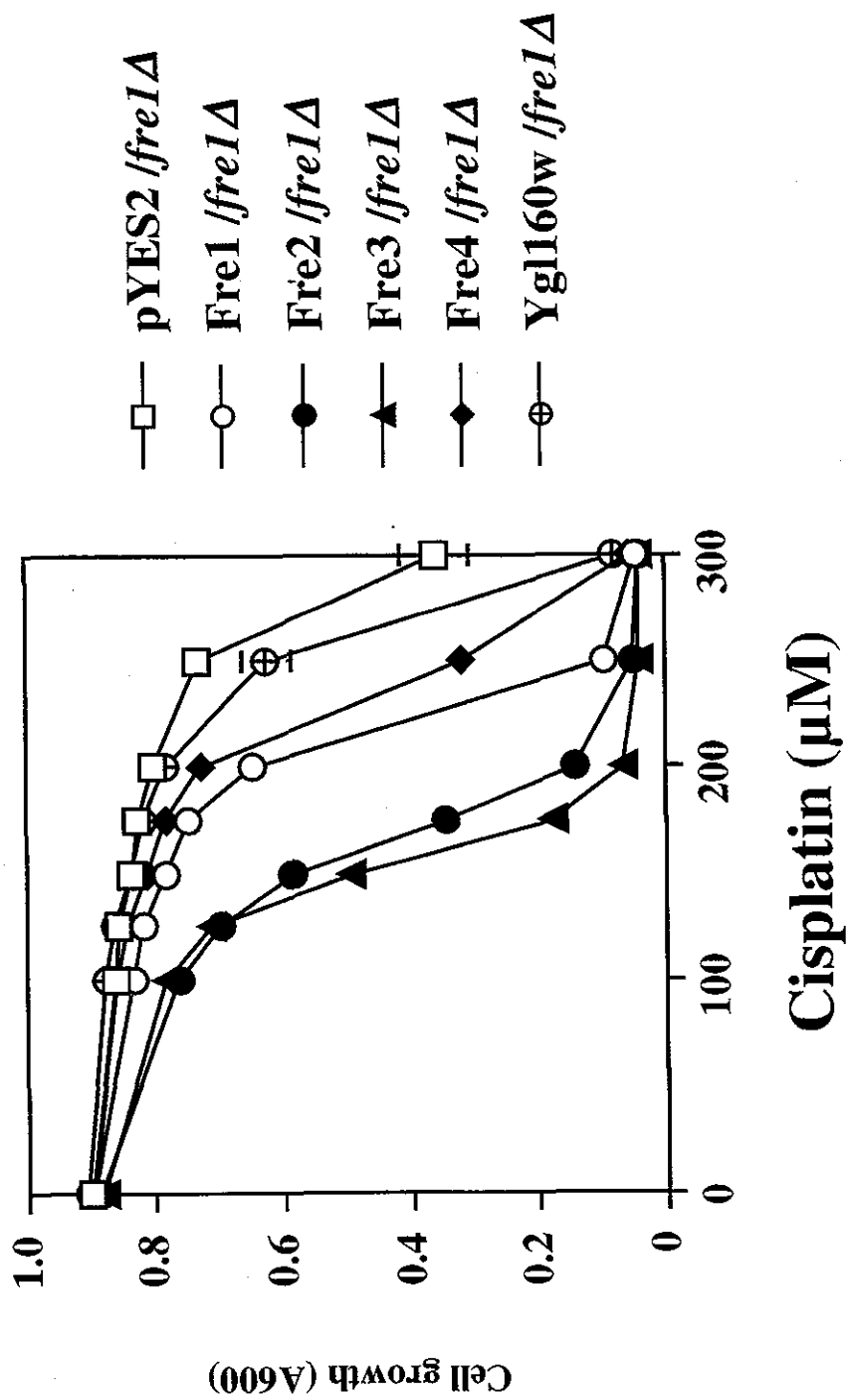


Fig. 16. Effect of overexpression of Fre family on sensitivity to cisplatin

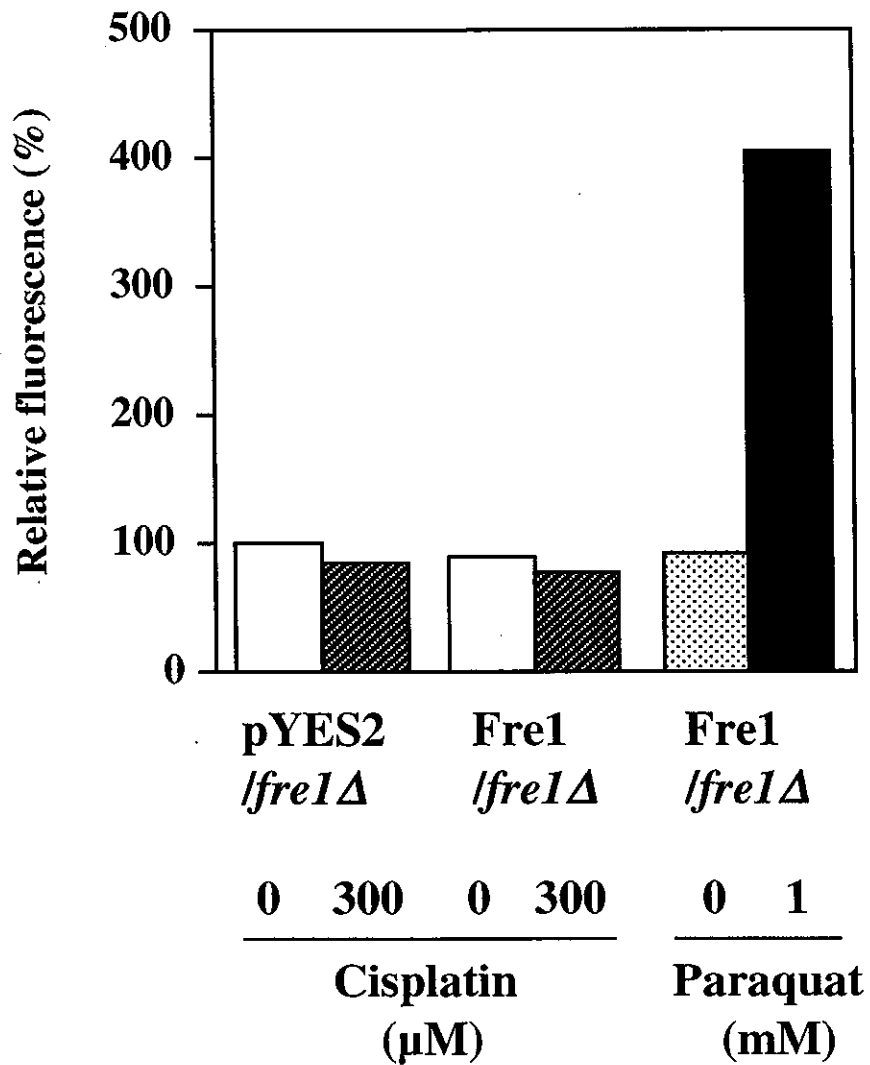


Fig. 17. Effect of overexpression of Fre1 on extracellular ROS production in yeast cells treated with cisplatin or paraquat

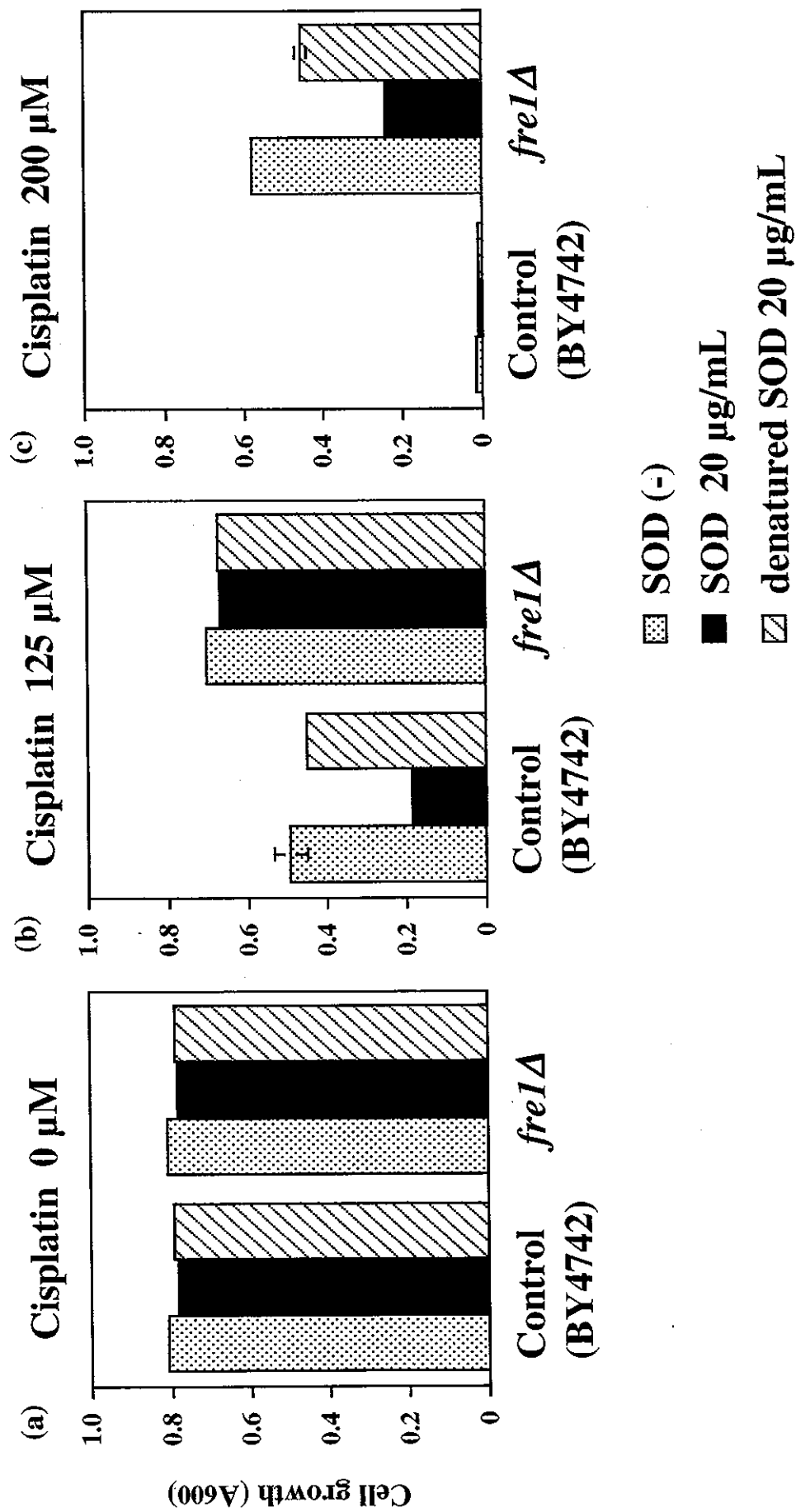


Fig. 18. Effect of SOD supplemented in media on sensitivity to cisplatin

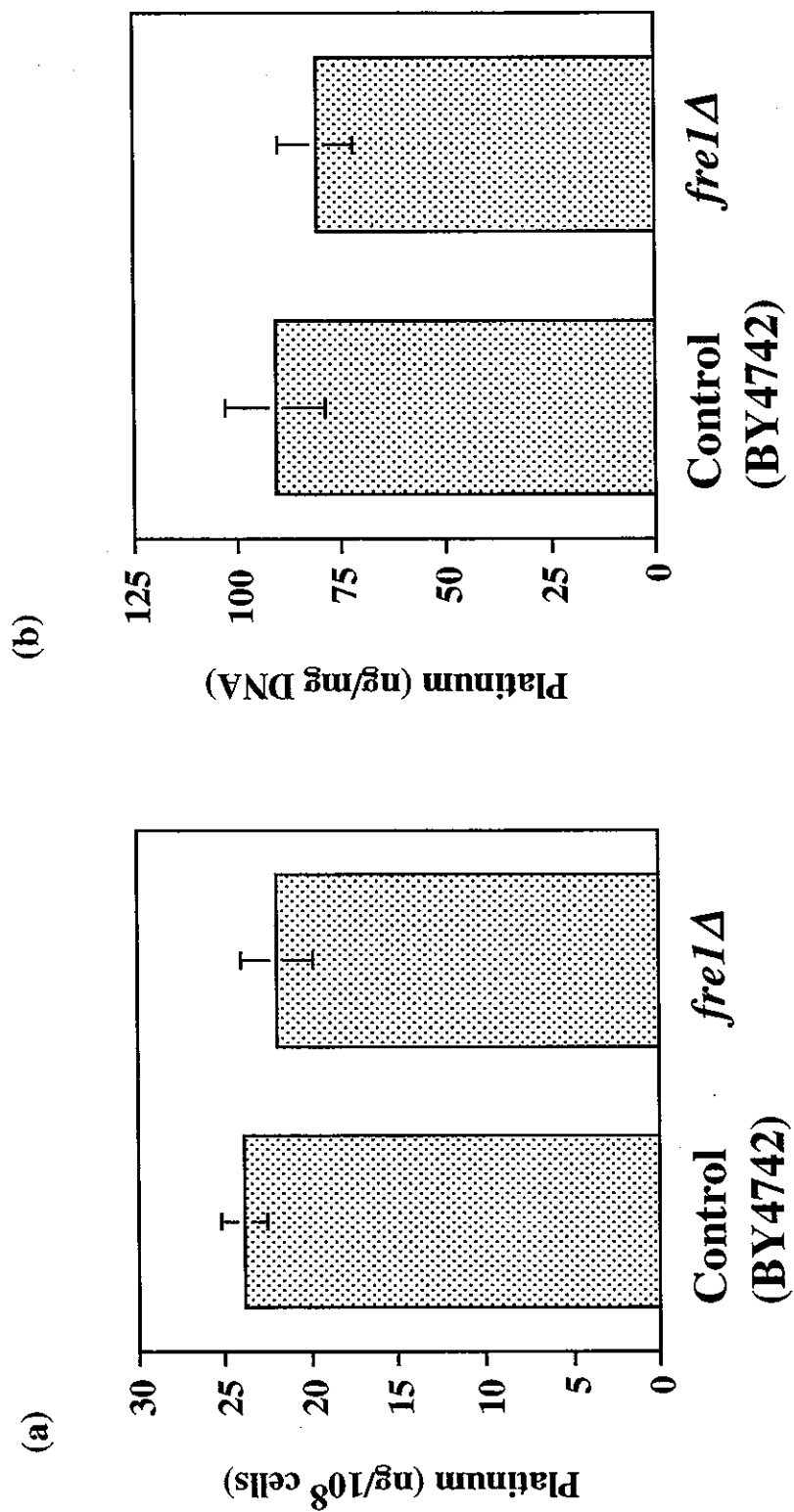


Fig. 19. Cellular accumulation (a) or binding to DNA (b) of platinum in *fre1Δ* mutant treated with cisplatin

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
（分担）研究報告書

亜ヒ酸耐性に関わるシグナル伝達経路の解析

分担研究者 大橋一晶 東北大学大学院薬学研究科助手
久下周佐 東北大学大学院薬学研究科助教授

我々は出芽酵母を用いて亜ヒ酸毒性の発現に影響を及ぼす細胞内因子の検索を行い、高浸透圧防御に関わるシグナル伝達経路 HOG (High Osmolarity Glycerol) pathway の MAP キナーゼである Hog1 の高発現が酵母に顕著な亜ヒ酸耐性を与えることを明らかにしている。今回、Hog1 の下流の因子の亜ヒ酸耐性への関与を調べたところ、Skol が Hog1 高発現による亜ヒ酸耐性に関与している可能性が示唆された。しかし、SKO1 欠損酵母の亜ヒ酸感受性が HOG1 欠損酵母よりも低いことから、Skol 以外の因子も関与すると考えられる。HOG1 欠損が細胞内ヒ素蓄積量に与える影響を検討したところ、HOG1 欠損酵母は野生株に比べ、細胞内ヒ素蓄積量が約 11 倍高いことが判明した。SKO1 欠損酵母も、野生株に比べて若干高いヒ素蓄積量を示したものの、HOG1 欠損酵母に比べるとその程度は非常に小さいものであった。HOG1 欠損は、亜ヒ酸の取り込みに関わる因子 Fps1 の mRNA レベルを野生株の約 1.5 倍程度上昇させた。FPS1 欠損酵母は亜ヒ酸に対して顕著な耐性を示したが、FPS1 と共に HOG1 を同時に欠損させても HOG1 欠損の影響はほとんど認められなかった。また、亜ヒ酸処理した後の細胞内ヒ素蓄積量が FPS1 欠損酵母では野生株の四分の一程度であったが、この細胞の HOG1 を同時欠損させても HOG1 欠損によるヒ素蓄積量の増大は認められず、FPS1 単独欠損酵母とほぼ同程度であった。FPS1 欠損酵母に FPS1 発現プラスミドを導入した際の細胞膜面分中 Fps1 に比べ FPS1 HOG1 二重欠損酵母に FPS1 発現プラスミドを導入した際の Fps1 蛋白質量は約 2 倍であった。この結果より、野生株中では、Hog1 は細胞膜 Fps1 の存在量を減らしていると考えられ、その結果としてヒ素の取り込みが抑制されている可能性が考えられる。

A. 研究目的

我々は酵母を用いて、亜ヒ酸毒性の発現に影響を及ぼす細胞内因子の探索を行い、高浸透圧防御に関わるシグナル伝達経路 High Osmolarity Glycerol (HOG) pathway の MAP キナーゼである Hog1 の高発現が酵母に顕著な亜ヒ酸耐性を与えることを明らかにしている。HOG pathway では、細胞外の環境変化に応答したシグナルがいくつかの因子を介して Hog1 に伝わる (Fig. 1)。Hog1 はリン酸化されると核に移行し、一部の転写因子をリン酸化し転写調節を行うことにより高浸透圧防御応答を行う [武川睦寛ら, 2002]。このように、浸透圧変化の感知から MAP キナーゼのリン酸化を介した遺伝子発現調節までの一連の経路が HOG pathway である。

MAP キナーゼは酵母から哺乳類に至るまで高度に保存されているが、出芽酵母の MAP キナーゼ Hog1 は哺乳類では、p38 に相当し、この p38 は亜ヒ酸によって活性化されることが知られている [Liu et al., 1996]。前述のように、この p38 の活性化はヒ素によるアポトーシス誘導の引き金とされており [Namgung et al., 2000]、ヒ素毒性発現機構の一つと考えられている。このことは、出芽酵母では MAP キナーゼの一つである Hog1 が亜ヒ酸に対して防御的な役割を果た

すという当研究室で得られている知見と相反することから、Hog1 による亜ヒ酸毒性軽減機構に興味を持たれる。そこで本研究では、Hog1 高発現による亜ヒ酸耐性獲得機構を解明するために HOG pathway に関連する因子群と亜ヒ酸耐性との関連を検討した。

B. 研究方法

1. *FPS1* 発現 plasmid の作製

酵母の chromosomal DNA を template とし、以下に示す primer を用いてプロモーターを含む *FPS1* を PCR により増幅した。得られた PCR 産物は 1.0% アガロースゲル電気泳動後に、目的のサイズの DNA をゲルから切り出し、GeneClean II kit (Takara) を用いて精製した。得られた PCR 産物を DNA ligation kit Ver.2 (Takara) を用いて *sac I*、*sma I* で切断した GFP-HA タグ付きの pRS315 ベクターに連結し、以下の方法に従って大腸菌に導入した。ライゲーション反応液 4 μ L をコンピテントセル溶液 100 μ L に加え、氷上に 30 分静置した後に 42°C で 45 秒間の熱ショックを与え、更に氷上に 2 分間静置した後、アンピシリン 100 μ g/mL を含む LB 寒天培地に播いた。その後 37°C で一晩培養した後に形成されたコロニーをアンピシリン 100 μ g/mL

を含む LB 培地 2mL で一晩振盪培養した後に GeneElute Plasmid Mini-Prep Kit を用いて、大腸菌よりプラスミド DNA を精製した。PCR により増幅した *FPS1* の塩基配列をシーケンスで確認した。

2. 酵母への plasmid の導入 (酢酸リチウム法)

酵母のシングルコロニーを YPAD 培地 2 mL に植菌し 2×10^7 cells/mL になるまで振盪培養した。その後集菌し、100 mM の酢酸リチウム溶液に 2×10^9 cells/mL になるように懸濁した。この懸濁液 20 μ L に plasmid 溶液 1 μ L、加熱サケ精子 DNA 5 μ g、および 50% polyethylene glycol (4000) 96 μ L、500 mM の酢酸リチウム溶液 24 μ L を加えて懸濁し、30°C で 30 分静置した。その後 42°C で 15 分間熱ショックをかけた後に集菌し、140 μ L 滅菌水に懸濁した。その後遠心により集菌し、SD 寒天培地に播いて 30°C で 2 日間培養して得られたコロニーを plasmid 導入酵母とした。

3. 酵母からの DNA の回収 (glass beads 法)

酵母のシングルコロニーを YPAD 培地に植菌し、30°C で 24 時間振盪培養した後に集菌し、200 μ L の breaking buffer に懸濁した。これに

200 μ L の phenol/chloroform/isoamylalcohol (25:24:1) 及び約 0.3g の glass beads を加え、5 分間激しく攪拌した後、12,000 \times g で 5 分間遠心して chromosomal DNA を含む水層 200 μ L を得た。得られた DNA 溶液をエタノール沈殿により沈殿させ、最終的に 100 μ L の DNA 溶液とした。

4. 遺伝子二重欠損酵母株 (*SSK1STE11*、*HOG1PBS2*、*FPS1HOG1*) の作製

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、ターミネーターの塩基配列と、欠損株で用いた kanamycin 耐性遺伝子のプロモーター、ターミネーターの塩基配列が同じであることを利用し、*HIS5* 遺伝子マーカーを含む欠損株作製用 gene disruption cassette の作製を行った。Complete set of *Saccharomyces cerevisiae* gene deletion strains (Euroscarf) の *STE11* 遺伝子欠損株、*HOG1* 遺伝子欠損株、*FPS1* 遺伝子欠損株に酢酸リチウム法により PCR で増幅した *HIS5* フラグメントを導入することによって得られた histidine 非要求性コロニーを kanamycin 耐性遺伝子マーカーが *HIS5* 遺伝子マーカーで置き換わ

った遺伝子欠損株候補とした。これら遺伝子の *HIS5* マーカーへの置換の確認を行うために glass beads 法によって遺伝子欠損株候補酵母から chromosomal DNA の回収を行った。

得られた chromosomal DNA 溶液を template として *STE11* 遺伝子、*HOG1* 遺伝子、*FPS1* 遺伝子の外側に設計した primer (primerA) を用いて *STE11* 遺伝子、*HOG1* 遺伝子、*FPS1* 遺伝子領域を PCR により増幅し、その PCR 産物の大きさをアガロースゲル電気泳動で調べることにより、*HIS5* マーカーを含む遺伝子欠損株が作製されたことを確認して、この確認のための PCR 産物を二重欠損酵母株作製に用いた。

作製した *STE11* 遺伝子欠損株作製用 gene disruption cassette を酢酸リチウム法により酵母に導入した。*SSK1* 遺伝子欠損株 (*ssk1::kanMX4*) に *STE11* 遺伝子欠損株作製用 gene disruption cassette を、*FPS1* 遺伝子欠損株 (*fps1::kanMX4*) に *HOG1* 遺伝子欠損株作製用 gene disruption cassette を、*PBS2* 遺伝子欠損株 (*pbs2::kanMX4*) に、*HOG1* 遺伝子欠損株作製用 gene disruption cassette を導入し、得られた histidine 非要求性コロニーを遺伝子欠損株の候補コロニーとした。各遺伝子 (*STE11*, *FPS1*, *HOG1*) の欠損の確

認するために、glass beads 法によって酵母から chromosomal DNA の回収を行った。各遺伝子 (*STE11*, *FPS1*, *HOG1*) 欠損の確認は、得られた DNA 溶液を template として primerA のさらに外側に設計した primer (primerB) を用いて各遺伝子 (*STE11*, *FPS1*, *HOG1*) 領域を PCR により増幅し、その PCR 産物の大きさをアガロースゲル電気泳動で調べることにより行った。

5. 酵母の亜ヒ酸に対する感受性

酵母を SD(-Leucine) 培地 1mL に植菌して 30°C で一晩振盪培養した後、この培養液を 1×10^5 cells/180 μ L になるように SD(-Leucine) 培地で希釈した。この希釈培養液を 96-well plate に 1×10^5 cells/180 μ L になるように 180 μ L 添加し、亜ヒ酸 (10 倍濃度のもの) を 20 μ L 添加した後に 30°C で 48 時間培養し、600nm の吸光度を測定して酵母の増殖を調べた。

6. 酵母の細胞内ヒ素蓄積量の測定

酵母を YPAD 培地または SD(-Leucine) 培地で一晩振盪培養し、培地 5mL に 1×10^8 cells になるように酵母を希釈して 30°C で 2 時間振盪培養した。その後亜ヒ酸 (最終濃度 0.2mM) を添加し 30°C で 3 時間振盪培養した。その後遠心にて酵母を回収