

結合したヒ素を液胞に運ぶことによりヒ素の毒性を軽減させる因子であり、[Rosen et al., 2002; Ghosh et al., 1999] 同様の機構によりカドミウム毒性も軽減する [Li et al., 1994; Szczypka et al., 1994] ことが知られている。また、Ycf1 の遺伝子発現は転写因子 Yap1 によって制御されている [Wemmie et al., 1994]。これまでに細胞内のヒ素量を調節するこれらの因子 Fps1, Arr3, Ycf1 の遺伝子発現調節に Hog1 が関与する報告はない。

HOG1 欠損がこれら3つのヒ素トランスポーターの mRNA 量に及ぼす影響を調べたところ、Arr3 および Ycf1 の mRNA 量はヒ素未処理時には野生株と *HOG1* 欠損酵母の間に有為差は認められなかった (Fig. 9a, 9b)。しかし、亜ヒ酸処理によって、野生株の Arr3 mRNA 量は顕著に上昇し、*HOG1* 欠損酵母においてはさらに高い上昇が認められた (Fig. 9a)。野生株において認められた結果は、Arr3 mRNA 量が亜ヒ酸の処理濃度に応じて上昇する [Wysocki et al., 1997] という報告と一致するものである。また、亜ヒ酸処理時に *HOG1* 欠損による Arr3 mRNA の上昇が認められたが、*HOG1* 欠損酵母は細胞内ヒ素蓄積量が多い (Fig. 6) ために、細胞内ヒ素量に応じて Arr3 mRNA 量が野生

株に比べて高くなった可能性が考えられる。Ycf1 mRNA は、野生株では亜ヒ酸処理による有為な変動は認められなかったが、*HOG1* 欠損酵母では亜ヒ酸処理による発現上昇が観察された (Fig. 9b)。Ycf1 に関しても Arr3 同様に細胞内ヒ素の上昇に応答した遺伝子発現調節が起こっているのかも知れない。何れにしろ、Ycf1 の発現上昇は、前述のように、液胞へのヒ素の取り込みを促進させてヒ素毒性の軽減をもたらすことから、この現象は少なくとも *HOG1* 欠損による酵母の亜ヒ酸に対する感受性上昇機構には関わらないと考えられる。一方、亜ヒ酸の取り込みに関わる因子 Fps1 mRNA レベルは、亜ヒ酸未処理、亜ヒ酸処理時ともに *HOG1* 欠損酵母の方が野生株よりも1.5倍程度高かった (Fig. 9c)。また、Fps1 は Arr3 や Ycf1 とは異なり、亜ヒ酸処理に依存した mRNA レベル上昇は認められなかった。この結果は *HOG1* 欠損時には *FPS1* の発現が上昇して亜ヒ酸を取り込みやすい状態になっていることを示唆しており、亜ヒ酸耐性機構における Hog1 と Fps1 の関係についてはさらに詳細な検討が必要であると考えられる。

Hog1、Fps1 の両者とも、浸透圧の異常が起きた際に浸透圧を調節するという似通った機能があるため、現在

までに両者の直接的な関係については報告されていないが、*HOG1* 欠損酵母においては *Fps1* の発現を上昇させることで浸透圧調節機能を補うなど互いが密接に関連している可能性も否定できない。

4. Hog1 が関与する亜硫酸耐性における *Fps1* の関与

4-1. *FPS1* 欠損酵母における *HOG1* 欠損が亜硫酸感受性および細胞内ヒ素蓄積量に与える影響

FPS1 欠損酵母と *FPS1 HOG1* 二重欠損酵母の亜硫酸に対する感受性を調べたところ、*FPS1* 欠損酵母は亜硫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その影響はほとんど認められなかった (Fig. 10)。また、*FPS1* 欠損酵母と *FPS1 HOG1* 二重欠損酵母を亜硫酸処理した後の細胞内ヒ素蓄積量を調べたところ、*FPS1* 欠損酵母は野生株に比べて四分の一程度であったが (Fig. 11b)、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 (Fig. 11a, 11b)。すなわち、*FPS1* が存在しないと *HOG1* 欠損による亜硫酸感受性の上昇および細胞内ヒ素蓄積量の増大が認められないという

ことになり、*Hog1* が関与する亜硫酸耐性に *Fps1* が関わっていると考えられる。

4-2. *HOG1* 欠損が細胞内へのヒ素蓄積速度に与える影響

野生株と *HOG1* 欠損酵母を亜硫酸処理した際の細胞内ヒ素量の経時的変動 (10 分以内) を測定した。その結果、亜硫酸処理 1 分後という非常に短い処理時間においても野生株に比べて *HOG1* 欠損酵母の方が高い細胞内ヒ素濃度を示した (Fig. 12a)。また、Fig. 12a で比較的直線性のある 0 分から 3 分までのグラフの傾きからヒ素取り込み速度を求めたところ、*HOG1* 欠損酵母の方が野生株に比べて 3 倍以上高い値を示した。もし野生株と *HOG1* 欠損酵母との間でヒ素に応答した遺伝子発現調節を介して細胞内ヒ素量に差が生じているならば、亜硫酸処理後 30 分といったある程度時間が経過した後にはじめてヒ素蓄積量の差が認められると予想される。しかし、Fig. 12a で得られた結果は、*HOG1* 欠損酵母がもともと亜硫酸を取り込みやすい性質を有していることを示唆している。野生株と *HOG1* 欠損酵母のヒ素取り込み速度の差、3 倍が全て *Fps1* に依るならば、*HOG1* が *FPS1* の mRNA 量だけではなく、蛋白量、および一分子あたりの活性を

調節している可能性も考えられる。

さらに野生株と *HOG1* 欠損酵母の細胞内ヒ素量を亜ヒ酸添加後 180 分まで測定した結果 (Fig. 12b)、*HOG1* 欠損酵母では亜ヒ酸処理 10 分後から 180 分後にかけても細胞内ヒ素量の増加が観察されたが、野生株では亜ヒ酸処理 60 分後の値よりも 180 分後の値の方が低いという結果が得られた。

FPS1 プロモーター下に *Fps1*-GFP-HA 融合蛋白質を発現させるシングルコピーのプラスミドを作製し、*FPS1* 欠損酵母に導入した。その結果、*FPS1*-GFP-HA 発現プラスミドの導入によって、*FPS1* 欠損酵母で観察される亜ヒ酸耐性および取り込み低下がそれぞれ野生株に近い程度まで回復することが確認された (Fig. 13, 14)。

4-3. *HOG1* 欠損が *Fps1* の細胞内分布に与える影響

前述したように、*Fps1* は細胞膜、液胞に存在する [Huh, WK. et al, 2003,; Tamas, MJ. et al, 1999] ことが報告されているが、細胞膜に存在する *Fps1* が亜ヒ酸の取り込みに関与すると考えられる。*HOG1* 欠損により *Fps1* mRNA 量の上昇が観察されたが、*Hog1* が *Fps1* の細胞内分布にも影響を与えている可能性が考えられる。そこでこの細胞中での *Fps1*-GFP の細

胞内分布を観察したところ、GFP の蛍光はこれまでの報告と同様に細胞膜上と液胞に観察された (Fig. 15)。またこの酵母の *HOG1* も同時に欠損させても、*HOG1* の有無による GFP の分布の変化は観察されなかった (Fig. 15)。以上の結果より *Fps1* の細胞内分布は *Hog1* による影響をほとんど受けないと考えられる。

4-4. 亜ヒ酸が *Fps1* の細胞内分布に与える影響

トランスポーターの中には、鉄キレート物質を細胞内に取り込むトランスポーターである *Arn1* のように、細胞に取り込みなどの機能が必要な際に細胞膜に分布し、不必要なときにはエンドソームに分布する [Kim, Y. et al., 2002] という例が知られている。*Fps1* についても同様に、亜ヒ酸にตอบสนองして細胞膜上の分布を減少させることにより亜ヒ酸の取り込みを抑制している可能性も考えられる。そこで *FPS1*-GFP-HA 発現プラスミドを *FPS1* 欠損酵母に導入した酵母を亜ヒ酸で処理した際の GFP の細胞内分布の変化を観察した。その結果、*Fps1* の細胞内分布には亜ヒ酸処理による影響がほとんど認められなかった (Fig. 16)。

4-5. *HOG1* 欠損による *Fps1* 蛋白量

の変動

3においてFPS1 mRNAレベルのHOG1欠損による上昇が認められたので、HOG1欠損による細胞膜中Fps1蛋白質量の変動を観察した。その結果、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細胞膜中Fps1蛋白質量は約2倍であった (Fig. 17)。またこれら酵母におけるHOG1によるFps1 mRNA量の調節に関しては、野生株で認められたと同様のmRNA量の調節が起こっていると考えられる。この結果より、Hog1は細胞膜Fps1の存在量を減らしていると考えられ、その結果ヒ素の取り込みを抑制している可能性が考えられる。

D. 参考文献

大谷 朋子；東北大学大学院薬学研究科卒業論文(2002)

武川陸寛、館林和夫、斉藤春雄：ストレス応答MAPキナーゼ：蛋白質 核酸 酵素、47(11), (2002)

山本正幸、大矢禎一：酵母らぼマニュアル、186-190, (1998)

Barchowsky, A., Edward, J.,

Dudek, Melinda D. Treadwell, nd Karen E. Wetterhahn.: Arsenic induces oxidant stress and NF-KB activation in cultured aortic endothelial cells.: *Free Radical Biol. Med.* 21, 783-790, (1996)

Bilsland-Marchesan, E., Arino, J., Saito, H., Sunnerhagen, P., Posas, F.: Rck2 kinase is a substrate for the osmotic stress-activated mitogen-activated protein kinase Hog1.: *Mol Cell Biol.*, 20(11), 3887-3895 (2000)

Bobrowicz, P., Wysocki, R., Owsianik, G., Goffeau, A., Ulaszewski, S.: Isolation of three contiguous genes, ACR1, ACR2 and ACR3, involved in resistance to arsenic compounds in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.: *Yeast.*, 13(9), 819-828(1997)

Bouganim, N., David, J., Wysocki, R., Ramotar, D.: Yap1 overproduction restores arsenite resistance to the ABC transporter deficient mutant *ycf1* by activating *ACR3* expression.: *Biochem. Cell Biol.*, 79(4), 441-448 (2001)

- Ghosh, M., Shen, J., Rosen, BP.
: Pathways of As(III) detoxification
in *Saccharomyces cerevisiae*.: Proc
Nat Acad Sci Usa, 96(9),
5001-5006, (1999)
- Huh WK, Falvo JV, Gerke LC,
Carroll AS, Howson RW, Weissman
JS, O'Shea EK.: Global analysis of
protein localization in budding
yeast.: Nature., 425(6959), 686-91,
(2003)
- Kim, JY., Choi, JA., Kim, TH., Yoo,
YD., Kim, JI., Lee, YJ., Yoo, SY.,
Cho, CK., Lee, YS., Lee, SJ.:
Involvement of p38
mitogen-activated protein kinase
in the cell growth inhibition by
sodium arsenite.: J Cell Physiol.,
190(1), 29-37, (2002)
- Liu, Z., Boles, E., Rosen, BP.:
Arsenic trioxide uptake by hexose
permeases in *Saccharomyces*
cerevisiae.: J Biol Chem., 279(17),
17312-17318, (2004)
- Kim, Y., Yun, CW., Philpott, CC.:
Ferrichrome induces endosome to
plasma membrane cycling of the
ferrichrome transporter, Arn1p, in
Saccharomyces cerevisiae.: EMBO
J., 21(14), 3632-3642, (2002)
- Liu Y, Guyton KZ, Gorospe M, Xu
Q, Lee JC, Holbrook NJ.:
Differential activation of ERK,
JNK/SAPK and P38/CSBP/RK
map kinase family members
during the cellular response to
arsenite.: Free Radic Biol., 21(6),
771-781 (1996)
- Li ZS, Lu YP, Zhen RG, Szczypka M,
Thiele DJ, Rea PA.: A new pathway
for vacuolar cadmium
sequestration in *Saccharomyces*
cerevisiae: YCF1-catalyzed
transport of
bis(glutathionato)cadmium.: Proc
Natl Acad Sci U S A., 94(1), 42-47
(1994)
- Luyten, K., Albertyn, J., Skibbe,
WF., Prior, BA., Ramos, J.,
Thevelein, JM., Hohmann, S.: Fps1,
a yeast member of the MIP family
of channel proteins, is a facilitator
for glycerol uptake and efflux and
is inactive under osmotic stress.:
EMBO J., 14(7), 1360-71 (1995)

- Nadal, E., Casadome, L., Posas, F.: Targeting the MEF2-like transcription factor Smp1 by the stress-activated Hog1 mitogen-activated protein kinase.: *Mol Cell Biol.*, 23(1), 229-237 (2003)
- Namgung, U., Xia, Z.: Arsenite-induced apoptosis in cortical neurons is mediated by c-Jun N-terminal protein kinase 3 and p38 mitogen-activated protein kinase.: *J Neurosci.*, 20(17), 6442-51 (2000).
- O'Rourke, SM., Herskowitz, I., O'Shea, EK.: Yeast go the whole HOG for the hyperosmotic response.: *Trends Genet.*, 18(8), 405-12 (2002)
- Petrick, J.S., Jagadish, B., Mash, E.A., Aposhian, H.V.: Monomethylarsonous acid (MMA^{III}) and arsenite: LD₅₀ in hamsters and in vitro inhibition of pyruvate dehydrogenase.: *Chemical Research in Toxicology*, 14(6), 651-656 (2001)
- Proft, M., Pascual-Ahuir, A., de Nadal, E., Arino, J., Serrano, R., Posas, F.: Regulation of the Sko1 transcriptional repressor by the Hog1 MAP kinase in response to osmotic stress.: *EMBO J.*, 20(5), 1123-1233 (2001)
- Proft, M., Kevin, S.: Hog1 kinase converts the Sko1-Cyc8-Tup1 repressor complex into an activator that recruits SAGA and SWI/SNF in response to osmotic stress.: *Mol Cell.*, 9(6), 1307-1317 (2002)
- Rosen, BP.: Biochemistry of arsenic detoxification.: *FEBS Lett.*, 529(1), 86-92 (2002)
- Szczyepka, MS., Wemmie, JA., Moye-Rowley, WS., Thiele, DJ.: A yeast metal resistance protein similar to human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) and multidrug resistance-associated protein.: *J Biol Chem.*, 269(36), 22853-22857 (1994)
- Tamas, MJ., Luyten, K., Sutherland, FC., Hernandez, A., Albertyn, J., Valadi, H., Li, H.,

Prior, BA., Kilian, SG., Ramos, J., Gustafsson, L., Thevelein, JM., Hohmann, S.: Fps1p controls the accumulation and release of the compatible solute glycerol in yeast osmoregulation.: *Mol Microbiol.*, 31(4), 1087-1104, (1999)

Tseng, CH.: The potential biological mechanisms of arsenic-induced diabetes mellitus.: *Toxicol Appl Pharmacol.*, 197(2), 67-83 (2004)

Wemmie, JA., Szczypka, MS., Thiele, DJ., Moye-Rowley, WS.: Cadmium tolerance mediated by the yeast AP-1 protein requires the presence of an ATP-binding cassette transporter-encoding gene, YCF1.: *J Biol Chem.*, 269(51), 32592-32597, (1994)

Wysocki, R., Bobrowicz, P., Ulaszewski, S.: The *Saccharomyces cerevisiae* ACR3 gene encodes a putative membrane protein involved in arsenite transport.: *J Biol Chem.*, 272(48), 30061-30066 (1997)

Wysocki, R., Chery, CC., Wawrzycka, D., Van Hulle, M., Cornelis, R., Thevelein, JM., Tamas, MJ.: The glycerol channel Fps1p mediates the uptake of arsenite and antimonite in *Saccharomyces cerevisiae*.: *Mol Microbiol.*, 40(6), 1391-401 (2001)

E. 研究発表

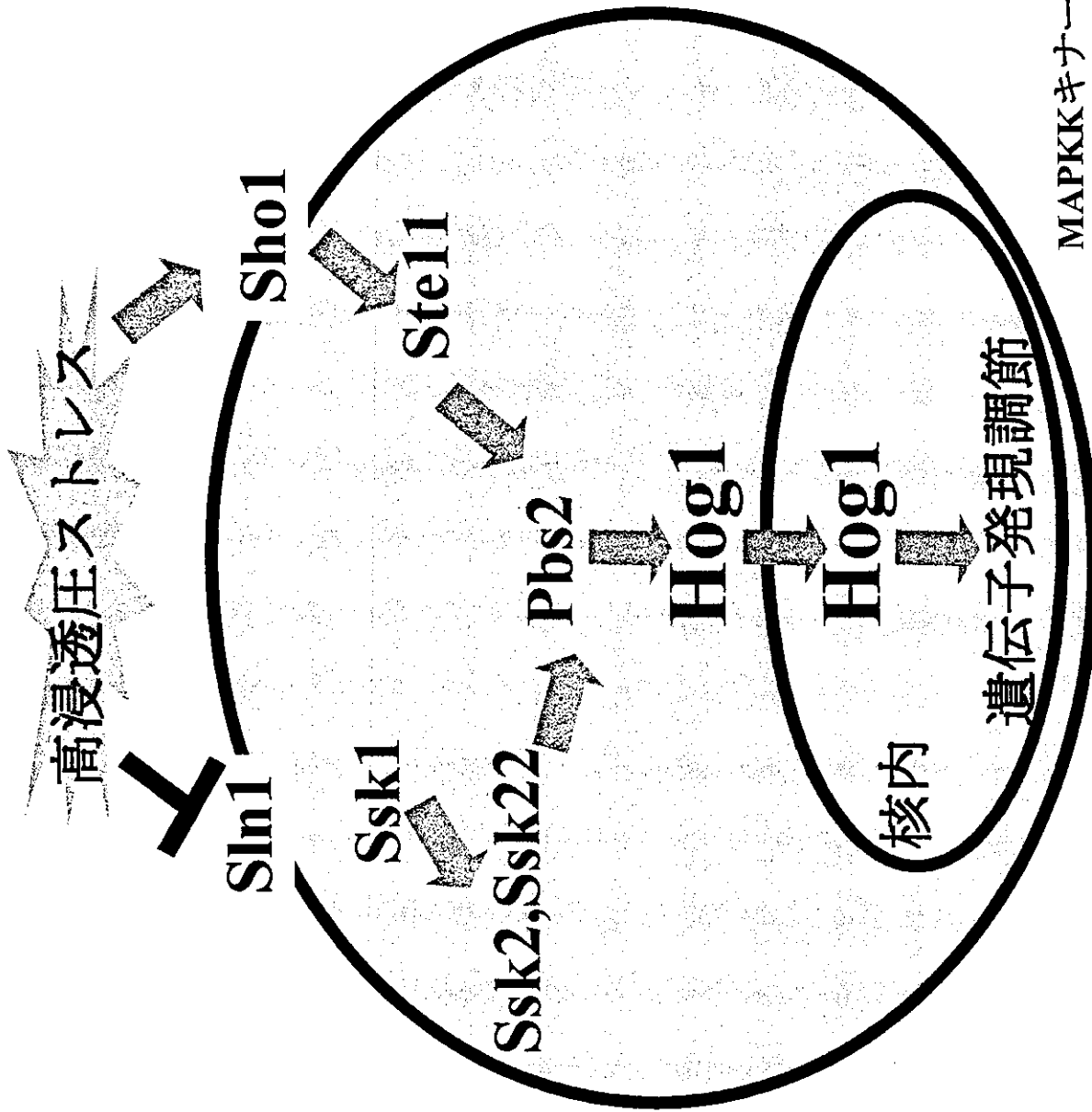
1. 論文発表
なし。

2. 学会発表

横溝朋子、大谷朋子、大橋一品、長谷川達也、瀬子義幸、永沼 章: 亜ヒ酸耐性に関わるシグナル伝達機構の解析. 第77回日本生化学会大会、2004.

横溝朋子、大谷朋子、大橋一品、長谷川達也、瀬子義幸、永沼 章: MAPキナーゼHog1が関与する酵母の亜ヒ酸耐性におけるFps1の関与. フォーラム2004: 衛生薬学・環境トキシコロジー, 2004.

F. 知的財産権の出願・登録状況
なし。



MAPKKキナーゼ : Ssk2, Ssk22, Ste11

MAPKキナーゼ : Pbs2

MAPキナーゼ : Hog1

Fig. 1. HOG (High Osmolarity Glycerol) pathway

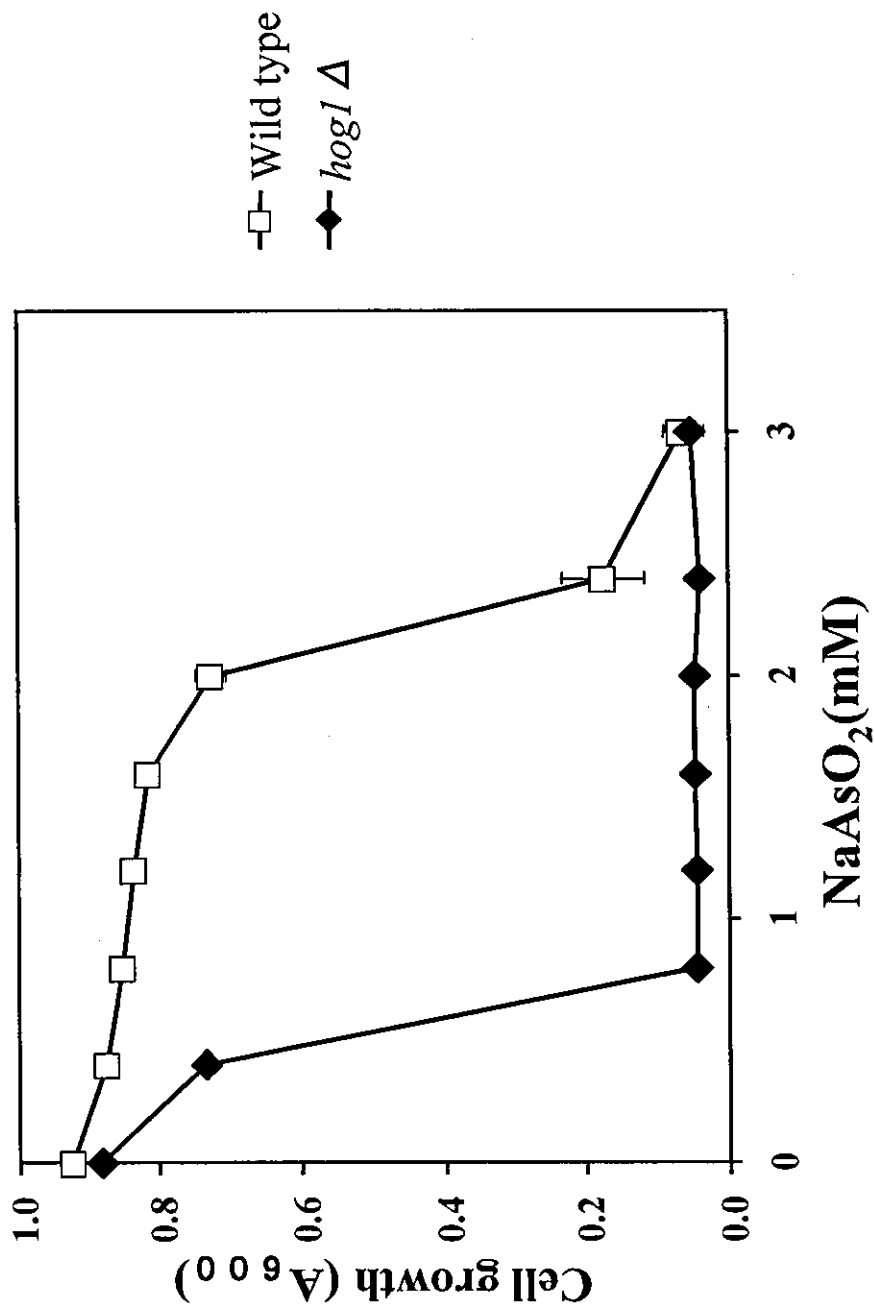


Fig. 2. *HOG1* 欠損酵母酵母の亜ヒ酸に対する感受性

酵母を96 well plate中で各濃度の亜ヒ酸存在下48時間培養した後に600 nmの吸光度を測定した(n=3)。

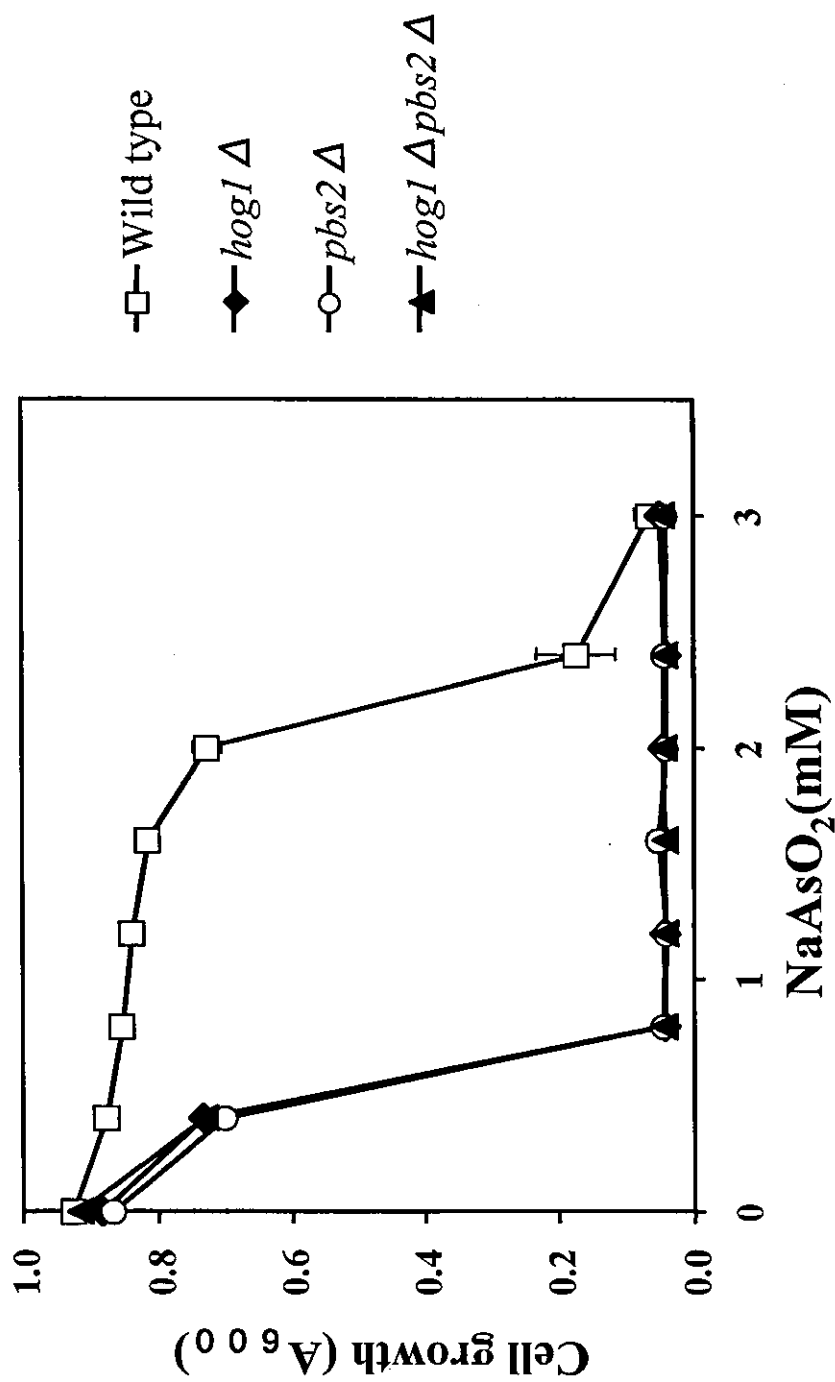


Fig. 3. *PBS2*欠損酵母の亜ヒ酸に対する感受性

酵母を96 well plate中で各濃度の亜ヒ酸存在下48時間培養した後に600 nmの吸光度を測定した(n=3)。

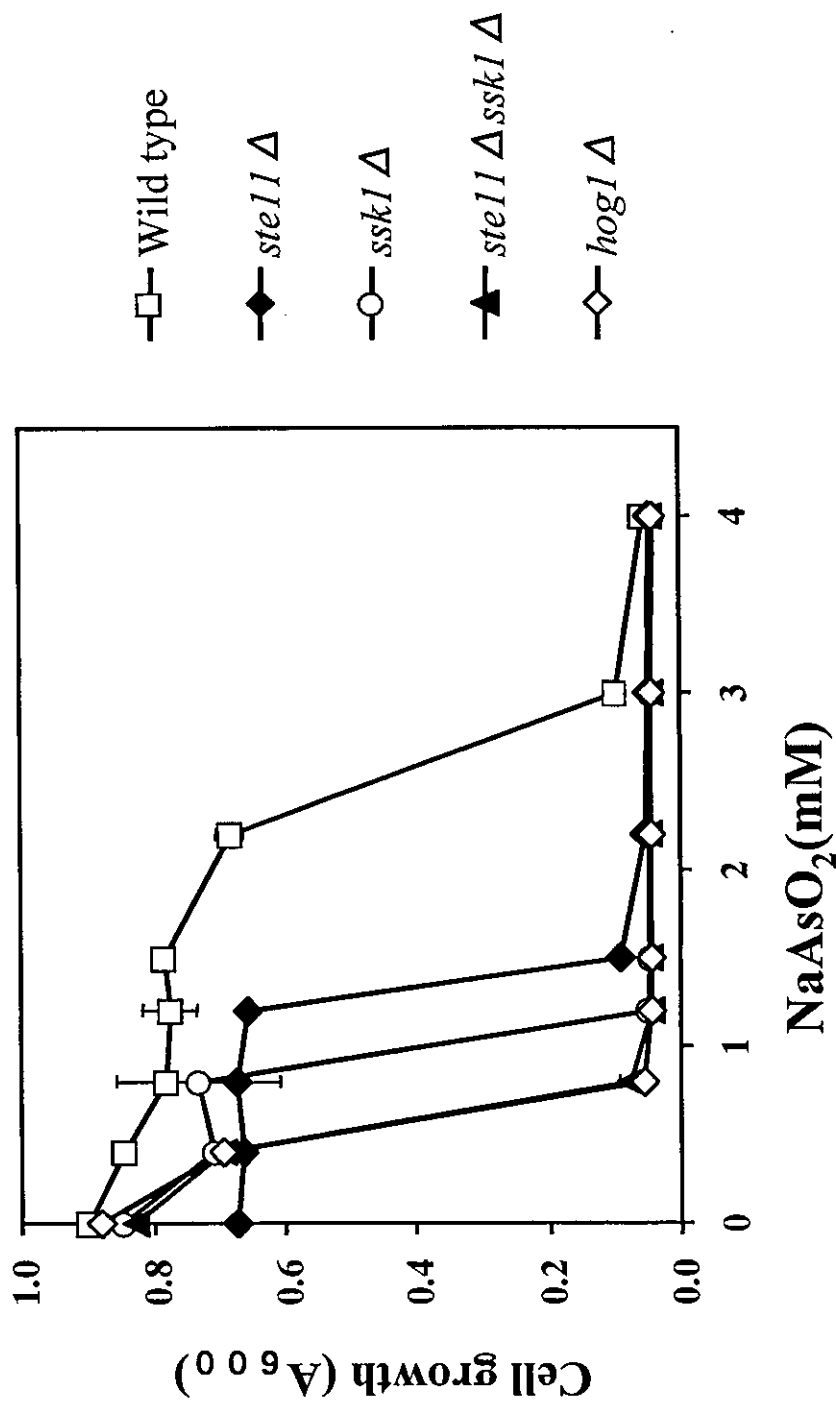


Fig. 4. *STE11* または *SSK1* 欠損酵母の亜ヒ酸に対する感受性

酵母を96 well plate中で各濃度の亜ヒ酸存在下48時間培養した後に600 nmの吸光度を測定した(n=3)。

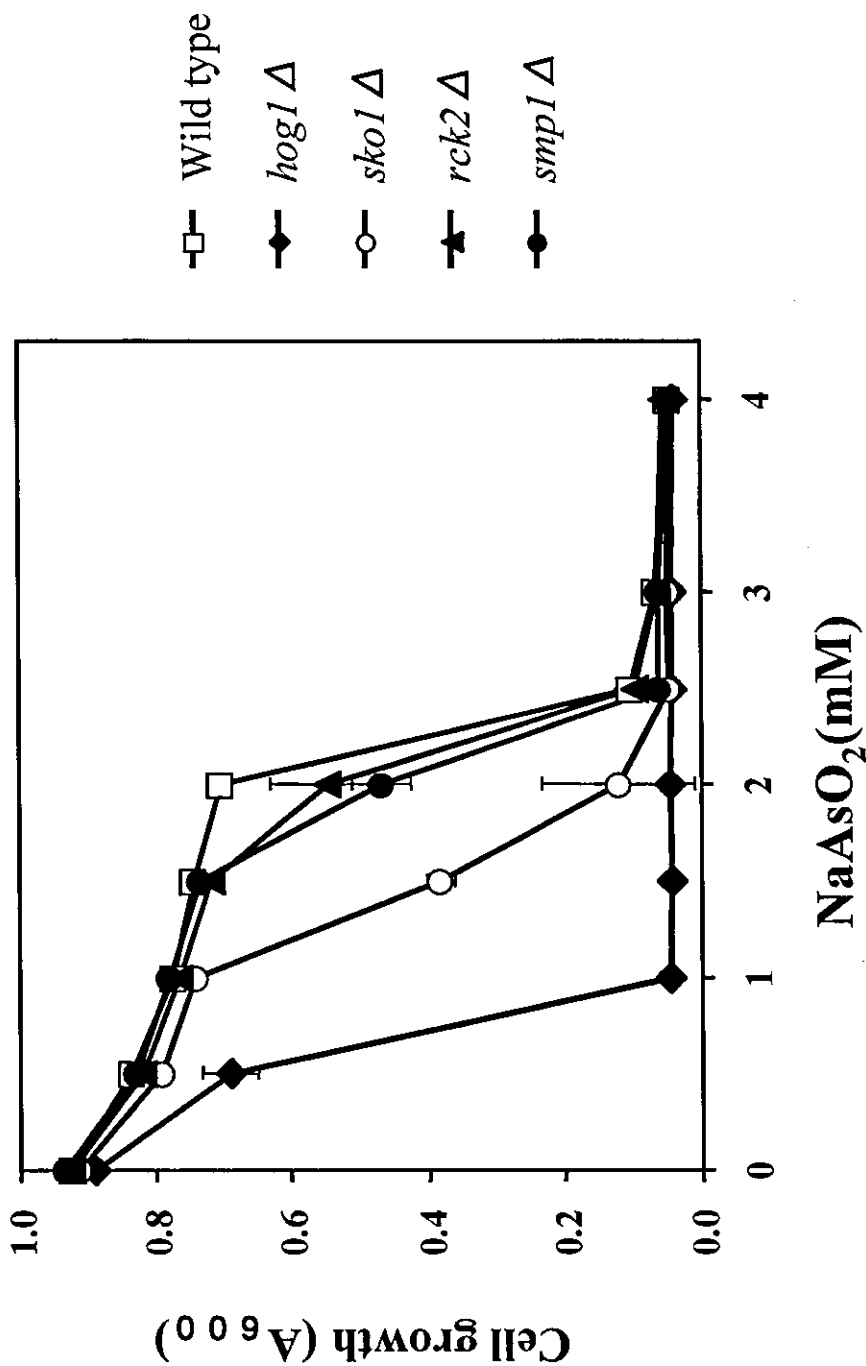


Fig. 5. Hog1の下流因子の遺伝子欠損が亜ヒ酸感受性に与える影響

酵母を96 well plate中で各濃度の亜ヒ酸存在下48時間培養した後に600 nmの吸光度を測定した(n=3)。

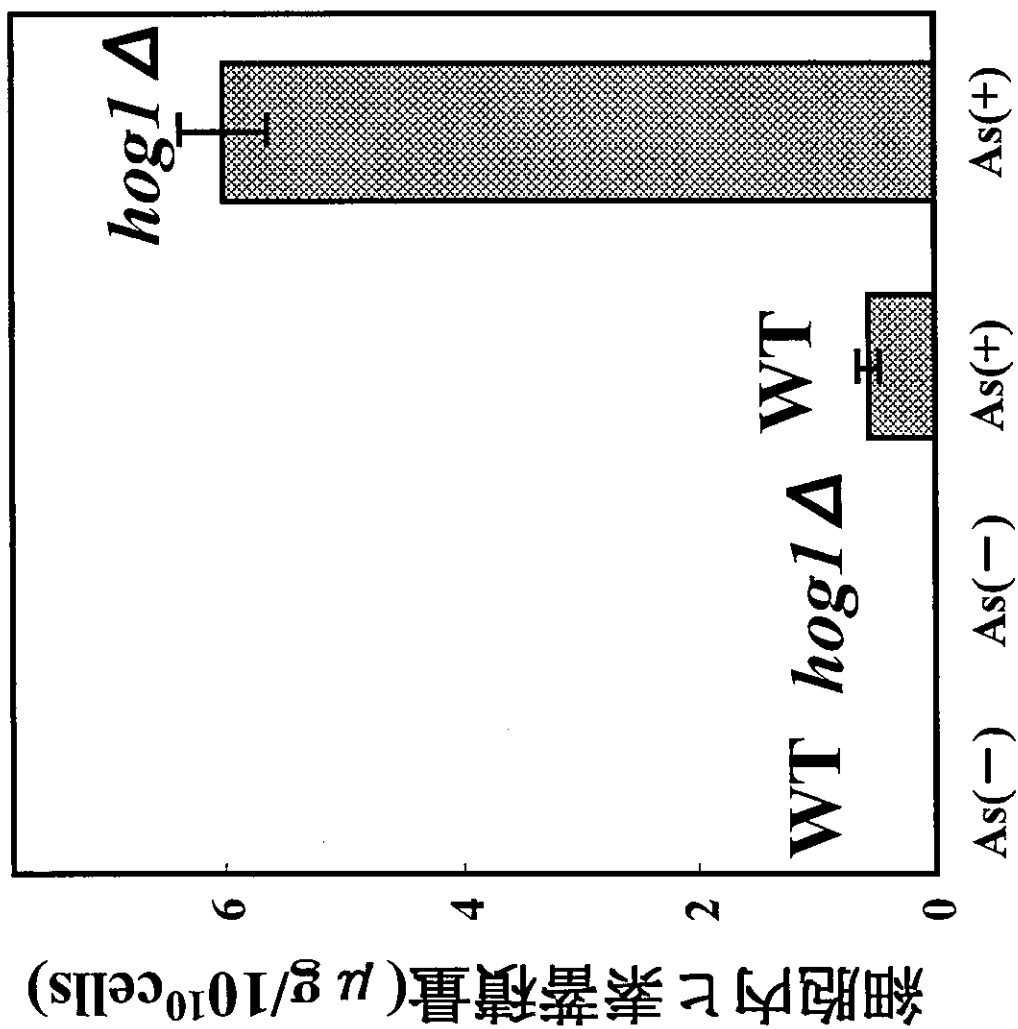


Fig. 6. *HOG1* 遺伝子の欠損が細胞内ヒ素量に及ぼす影響

酵母(1×10^8 cells)を0.2mMの亜ヒ酸を含む液体培地で3時間培養後、湿式灰化し、ICP-MSにより細胞内のヒ素量を測定した (n=5)。表は 10^{10} cellsあたりの細胞内ヒ素量 (μg) を示した。

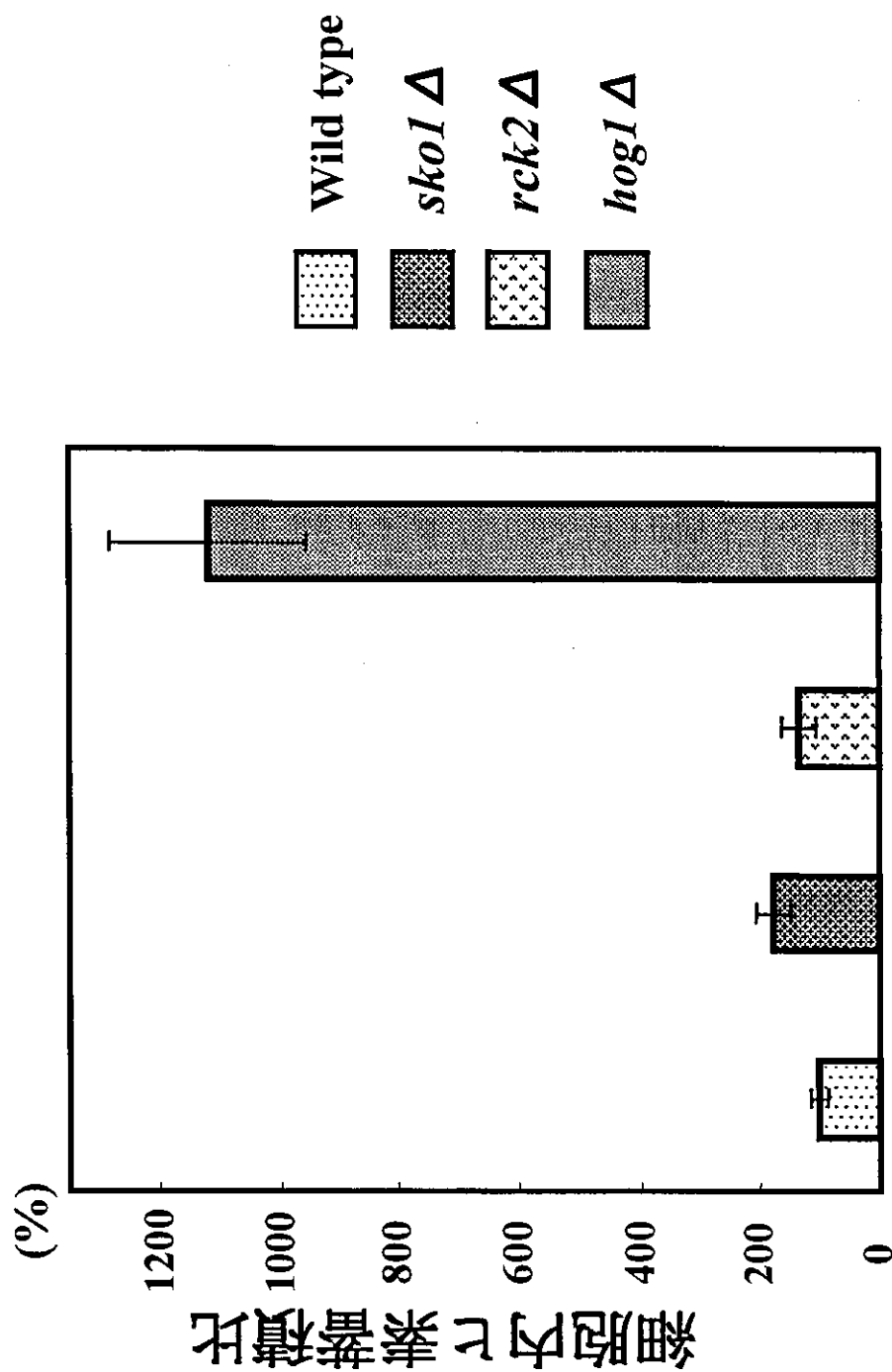


Fig. 7. Hog1の下流因子の遺伝子欠損が細胞内ヒ素量に及ぼす影響

酵母(1×10^8 cells)を0.2mMの亜ヒ酸を含む液体培地で3時間培養後、湿式灰化し、ICP-MSにより細胞内のヒ素量を測定した(n=5)。wildtypeの値を100%として表に示した。

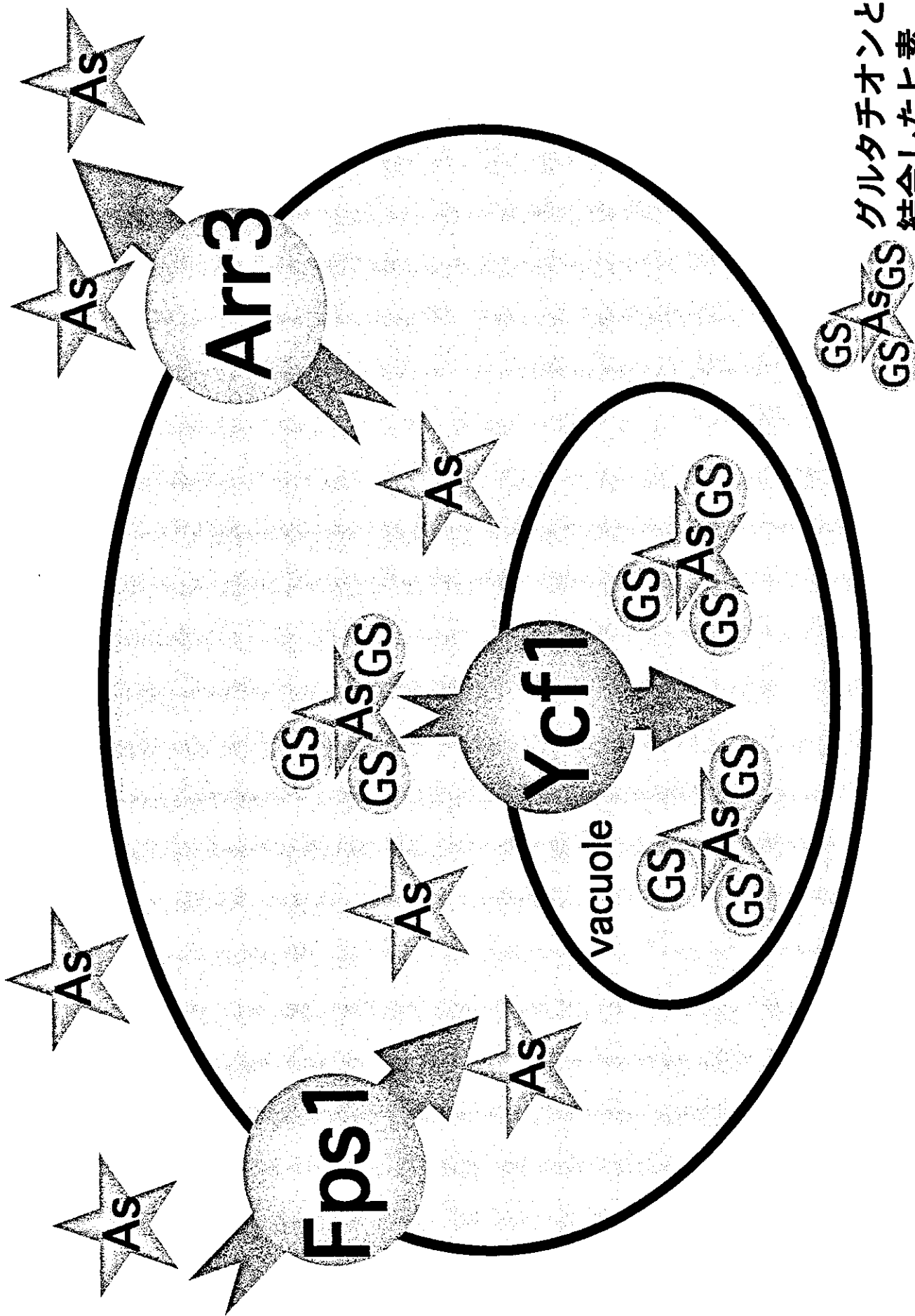


Fig. 8. 酵母細胞内のヒ素量の調節を行う因子

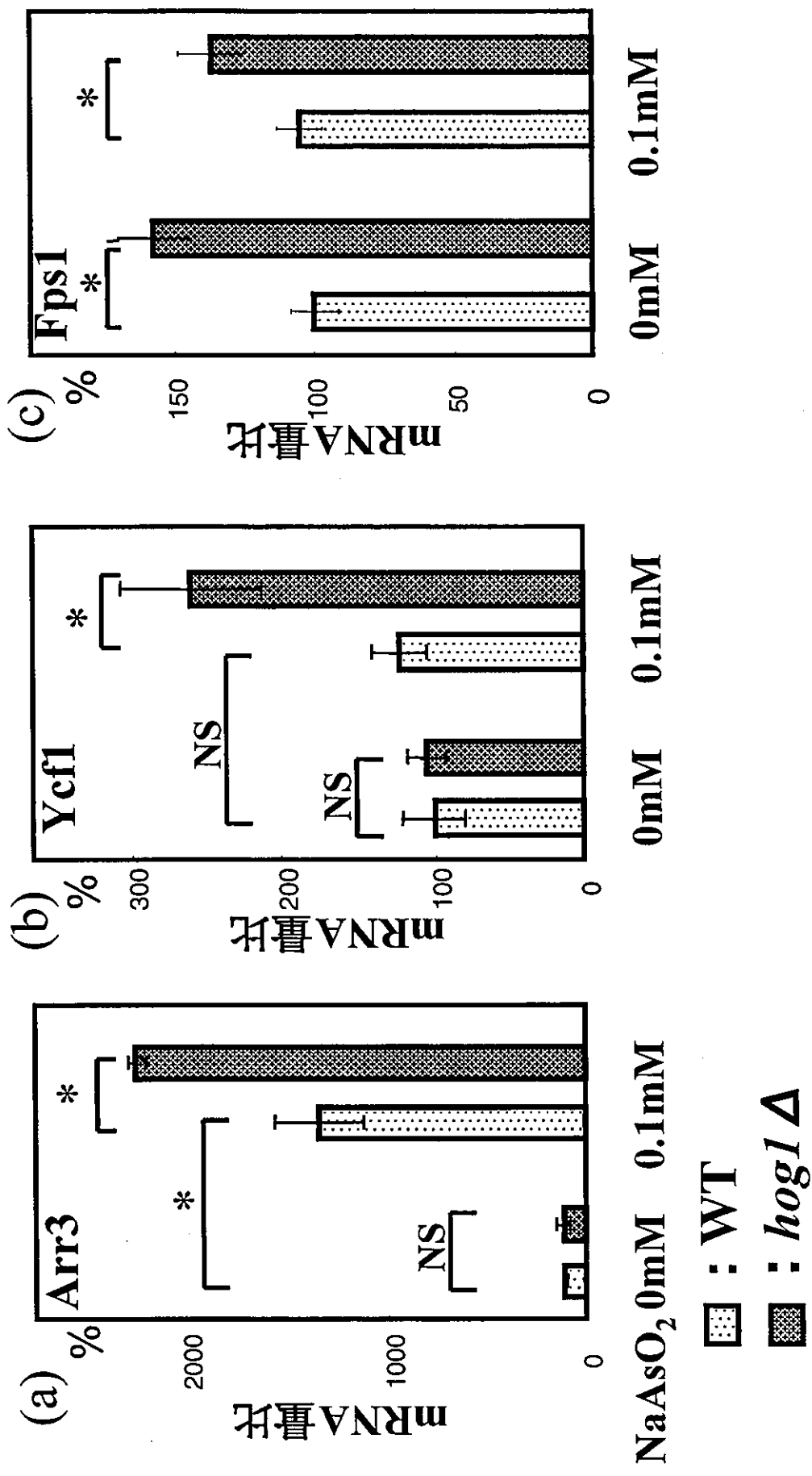


Fig. 9. ヒ素の取り込み、排出に関わる因子のmRNA量に *HOG1*欠損が与える影響

Wild type でのNaAsO₂未処理時のmRNA量を100%として表に示した

* : p<0.005, NS : 有意差なし

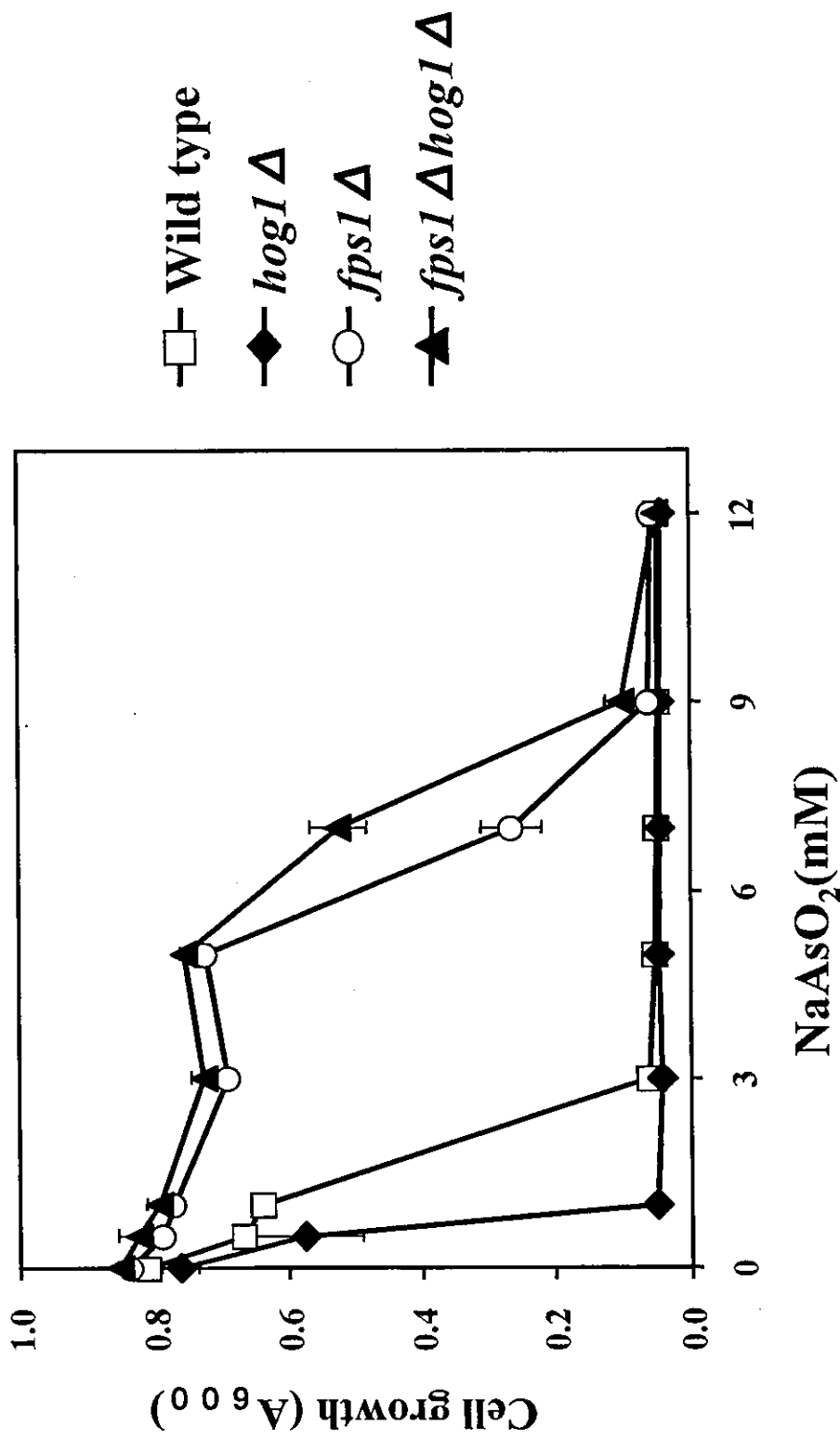


Fig. 10. *FPS1* 欠損酵母における *HOG1* 欠損が亜ヒ酸感受性に与える影響

酵母を96 well plate 中で各濃度の亜ヒ酸存在下48時間培養した後に600 nmの吸光度を測定した(n=3)。

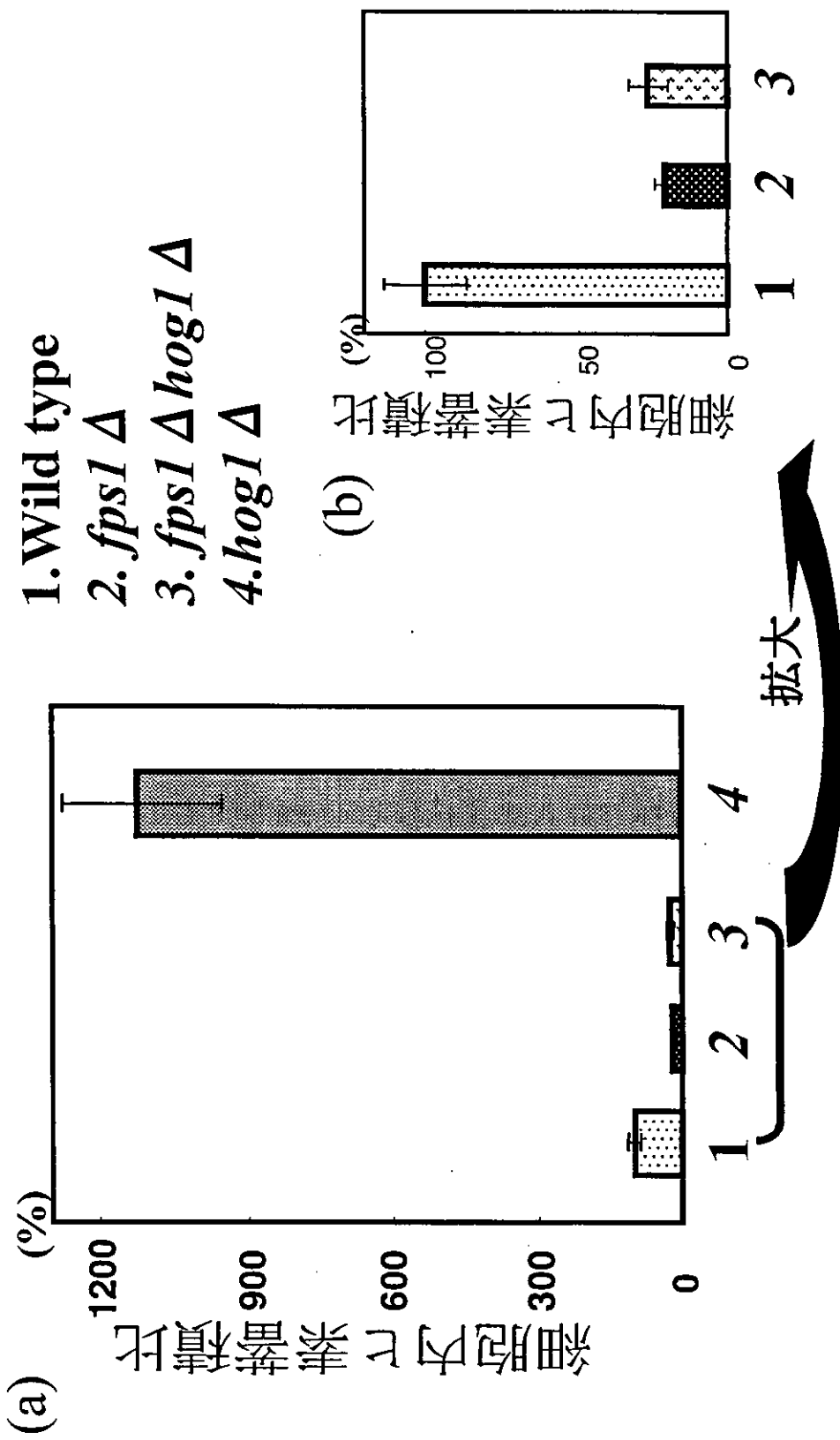


Fig. 11. *FPS1*欠損酵母における*HOG1*欠損が亜ヒ酸添加後の細胞内ヒ素蓄積量に与える影響

酵母(1×10^8 cells)を0.2mMの亜ヒ酸を含む液体培地で3時間培養後、湿式灰化し、ICP-MSにより細胞内のヒ素量を測定した(n=5)。WTの値を100%として表に示した。

ヒ素の取り込み速度

hog1 Δ : 379 $\mu\text{g}/\text{min}/10^{10}\text{cells}$

Wild type : 110 $\mu\text{g}/\text{min}/10^{10}\text{cells}$

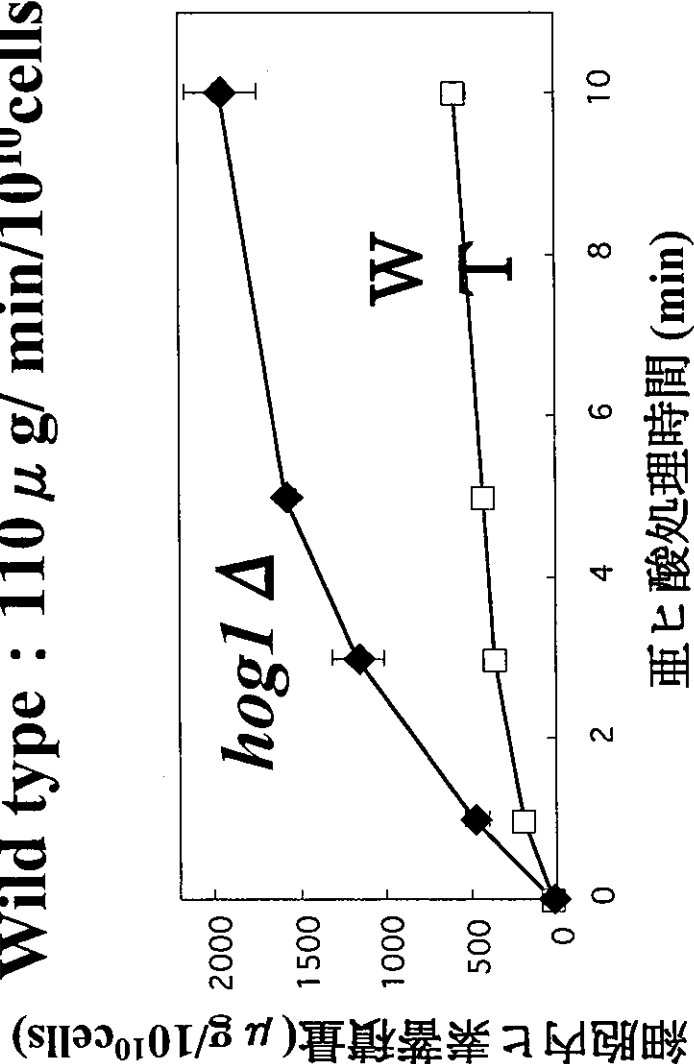


Fig. 12(a). *HOG1*欠損酵母のヒ素の取り込み速度

酵母(1×10^8 cells)を0.2mMの亜ヒ酸を含む液体培地で培養後、湿式灰化し、ICP-MSにより細胞内のヒ素量を測定した($n=3$)。ヒ素の取り込み速度は0min, 1min, 3minの値を直線で取りその傾きを求めた。

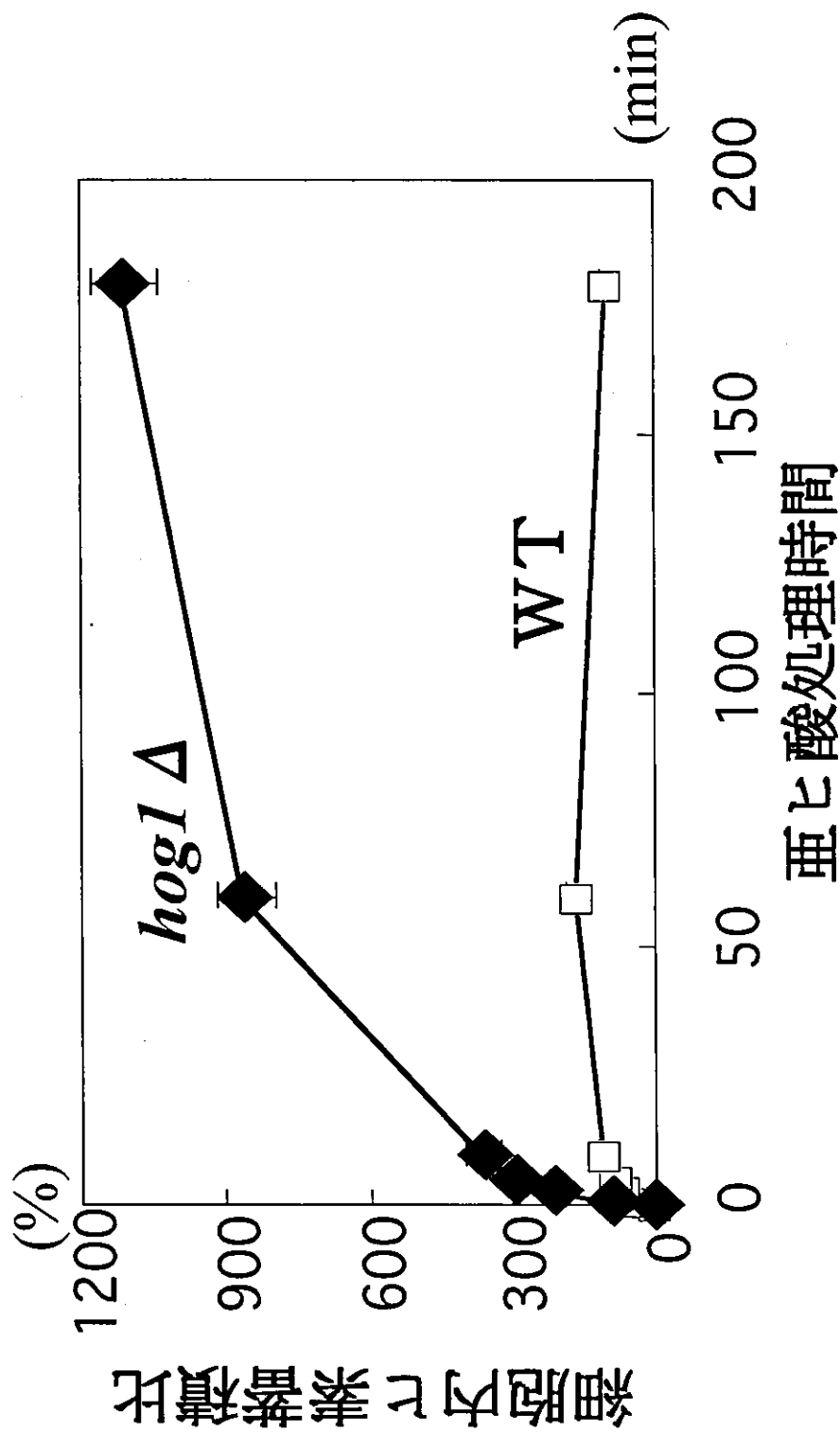


Fig. 12(b). *HOG1*欠損が亜ヒ酸添加後の細胞内ヒ素蓄積量に与える経時的な変化

酵母(1×10^8 cells)を0.2mMの亜ヒ酸を含む液体培地で培養後、湿式灰化し、ICP-MSにより細胞内のヒ素量を測定した($n=3$)。WTにおける亜ヒ酸添加後180min後の値を100%として表に示した。