

ある Rsp5 と結合することが報告されている(20)。Bul1-Rsp5 複合体は、窒素源やトリプトファン濃度といった外部環境の変化に応じて、複数のアミノ酸トランスポーターをユビキチン化し、ユビキチン化されたアミノ酸トランスポーターは液胞へ運ばれ分解される(21, 22)。実際に、*BUL1* 遺伝子欠損株では、アミノ酸トランスポーターである Tat2 のユビキチン化量の減少および細胞内分布の異常が報告されている(21)。今回のスクリーニングでは、アミノ酸トランスポーター Tat1 の遺伝子欠損株が TBT に対して耐性を示したことから、3-2-1 で、その他のアミノ酸トランスポーターの遺伝子欠損が TBT 感受性に与える影響を検討した。

Ubr1 : 遺伝子欠損により高感受性 (Fig. 3-4(t))

Ubr1 は、ユビキチン連結酵素 (E3) として、ユビキチン化による蛋白質の分解に関わっており、さらにペプチドの取込みの制御にも関与することが示唆されている(23)。Ubr1 によりユビキチン化される蛋白質の中に、TBT の毒性発現に関わる因子が存在する可能性が考えられる。

その他 (Erg4, Rvs167, Abf2, Lrg1, Sro9, Arg82, Hxk2)

Erg4 : 遺伝子欠損により高感受性

(Fig. 3-3(n))

Erg4 は、酵母の細胞膜成分であるエルゴステロールを合成する経路の最終段階で働く sterol C-24 reductase であり(24)、*ERG4* 遺伝子欠損株はエルゴステロールの合成ができないことが報告されている(25)。*ERG4* 遺伝子欠損株については、3-2-2 でさらに解析を行った。

Rvs167 : 遺伝子欠損により耐性 (Fig. 3-2(h))

Rvs167 は、エンドサイトーシスに関与する因子で哺乳類を含む多種の生物に存在することが知られている(26)。*RVS167* 遺伝子欠損株では、その表現型としてエンドサイトーシスの機能障害が報告されている(27)。

Abf2 : 遺伝子欠損により耐性 (Fig. 3-1(a))

Abf2 は、ミトコンドリアに存在する DNA 結合蛋白質で、ミトコンドリア DNA の複製に関与すると考えられており、多種の生物のミトコンドリア中に幅広く存在することが知られている(28, 29)。TBT はミトコンドリアに障害を及ぼすことが報告されていることから、Abf2 がこの毒性の増強に関与している可能性も考えられる。

Lrg1 : 遺伝子欠損により耐性 (Fig. 3-1(e))

Lrg1 は細胞壁の 1, 3 beta-glucan

合成の制御に関与し、低分子量 G 蛋白質である Rho の GTPase 活性を促進することが知られている(30)。

Sro9 : 遺伝子欠損により耐性 (Fig. 3-2(j))

Sro9 は蛋白合成の際に翻訳の正確性を上げる因子ではないかと推測されているものの、その分子機能は全く不明である(31)。

Arg82 : 遺伝子欠損により高感受性 (Fig. 3-3(m))

Arg82 はイノシトールポリリン酸キナーゼとしての活性を持つが、細胞内での機能は余りよくわかっていない(32)。

Hxk2 : 遺伝子欠損により高感受性 (Fig. 3-3(o))

Hxk2 はヘキソキナーゼで、解糖系とグリコーゲン合成を調節するなど糖代謝に関与しており、糖の取り込みなどの調節も行っていることが知られている(6)。

1-2 スクリーニングで同定された因子の高発現が酵母の TBT 感受性に及ぼす影響

3-1-1 で行ったスクリーニングの結果、欠損により酵母の TBT 感受性に影響を与える因子を 20 種同定した。そこで、これら因子の高発現が、酵母の TBT 感受性に及ぼす影響を検討

した。

まず、高発現用プラスミドを作製し、その機能を確認するために、クローニングした遺伝子の欠損株に作製したプラスミドを導入して遺伝子欠損株の TBT 感受性の回復を調べた。現在までに 20 種中 9 種 (Pdr5, Sro9, Erg4, Tat1, Mms2, Ubc13, Sfl1, Hxk2, Hxt12) についての検討が終了しており、残りについても検討中である。検討が終了した 8 種についてはプラスミド導入によって欠損株の TBT 感受性がある程度回復することが確認された(Figs. 4-1, 4-2)。そこで、これらの因子を野生株に高発現させた際の TBT に対する酵母の感受性を検討した(Figs. 5-1, 5-2)。その結果、欠損酵母で高感受性を示す場合は高発現酵母で耐性、また、欠損酵母で耐性の場合には高発現酵母で高感受性となることを期待したが、そのような表現型を示したのは、Pdr5 (欠損で高感受性→高発現で耐性)、Sro9 (欠損で耐性→高発現で高感受性) および Erg4 (欠損で高感受性→高発現で耐性) のみであった。Mms2, Ubc13 および Sfl1 は、高発現させても TBT に対する感受性に影響が認められず、Tat1 は、欠損酵母が TBT 耐性を示した(Fig. 3-2(k)) にもかかわらず、高発現させた酵母も耐性を示した(Fig. 5-1(d))。Hxk2 は高発現

により酵母の増殖が遅くなったため、TBT に対する感受性を野生株と比較するのが困難であった(Fig. 5-2(h))。以下に Pdr5, Sro9, Erg4, Tat1, Mms2, Ubc13 の各因子について述べる。

Pdr5 (欠損で高感受性→高発現で耐性)

Pdr5 は、薬剤排出ポンプとしての機能を持つことから、高発現による耐性獲得は、恐らく、Pdr5 の分子数増加による TBT の排出機能の亢進によることが推測される。

Sro9 (欠損で耐性→高発現で高感受性)

Sro9 の分子機能はほとんど知られていない(翻訳の正確性に関与か?)が、TBT 感受性が、その分子数に明らかに依存(欠損で耐性、高発現で高感受性)することから、その作用機構に興味もたれる。

Erg4 (欠損で高感受性→高発現で耐性)

エルゴステロール合成酵素 Erg4 は、過剰発現により酵母が TBT 耐性を示したが、その程度はごくわずかであった(Fig. 5-1(c))。これまでに、Erg4 の過剰発現酵母の表現型として、細胞中のエルゴステロール量が多くなることが示されている(33)。したがって、細胞膜形成に必要な量だけ

エルゴステロールが存在すれば、おそらくそれ以上増加しても TBT 感受性にはそれほど影響を及ぼさないと考えられる。

Tat1 (欠損で耐性→高発現で耐性)

アミノ酸トランスポーター Tat1 の高発現酵母は TBT に対して耐性を示した(Fig. 5-1(d))。Tat1 はこれまでに、FK506 (免疫抑制剤) および phenylbutyrate (抗癌作用をもつ薬物) に対しても今回の TBT の結果と同様に遺伝子欠損、高発現ともに薬剤耐性を酵母に与えることが報告されている(4, 34)。しかしながら、この機構については現在のところ全く不明である。

Ubc13, Mms2 (欠損で耐性→高発現で影響なし)

ユビキチン化に関与する因子 Ubc13 および Mms2 は、それぞれ単独で高発現させても酵母の TBT に対する感受性に影響を及ぼさなかった(Fig. 5-2(e), (f))。これまでに、Ubc13 は Mms2 とヘテロダイマーを形成し、ユビキチン転移酵素 (E2) として機能することが報告されている(19)。このため、Ubc13 または Mms2 をそれぞれ単独で高発現させても E2 としての機能を十分に発揮できず、そのため TBT 感受性に影響を与えない可能性が推測される。そこで、Ubc13 および Mms2 を共に高発現させた酵母

について TBT に対する感受性を調べた。その結果、Ubc13 および Mms2 を共に高発現した酵母は TBT に対して高感受性を示した(Fig. 6)。3-1-1 での検討では、Ubc13, Mms2 いずれの遺伝子欠損株も TBT に対して耐性を示し(Fig. 3-1(f), 3-2(l))、その耐性度はほとんど同程度であった。したがって、Ubc13 および Mms2 は、Ubc13-Mms2 複合体として作用することにより、酵母の TBT 感受性に影響を与えると考えられる。

2. 酵母の TBT に対する感受性に影響を与える因子の検討

本研究により TBT に対する酵母の感受性に影響を与えることが判明した因子の中にアミノ酸トランスポーター Tat1 およびエルゴステロール合成酵素 Erg4 が含まれていた。両因子には、それぞれ同様の作用または同様の機構に関する蛋白質の存在が知られている。そこで Tat1 および Erg4 以外の因子と TBT 毒性の関係をそれぞれ検討した。

2-1 アミノ酸トランスポーターを欠損した酵母株の TBT に対する感受性

Tat1 は、amino acid-polyamine-choline (APC) family に属するアミノ酸トランスポーターであり、主にチロシン、トリプトファンなどの輸

送を行っている(4)。酵母には APC family に属する因子が 24 種存在し(35)、その中には Tat1 と類似の構造をもち、輸送する基質が重複するアミノ酸トランスポーターが存在する(35, 36)。また、3-1-1 で述べたスクリーニングにおいて、アミノ酸トランスポーターの転写を制御する因子 Dal81(13)、およびアミノ酸トランスポーターのエンドサイトーシスに関与する因子 Bul1(21, 22)が同定されている。したがって、他のアミノ酸トランスポーターの中にも、酵母の TBT 感受性に影響を与える因子が存在する可能性が考えられる。

3-1-1 のスクリーニングでは、レプリカプレート作製の際に酵母のプレートへの転写量に多少が生じ、偽陽性が多数得られた。また、実際には TBT 感受性に影響を与えたにもかかわらず見逃したのも少なくないと思われる。そこで、APC family に属する因子のなかで、欠損が致死ではない遺伝子の欠損株(21 種)について TBT に対する感受性を再び検討した。その結果、Bap2 及び Lyp1 を除く APC family に属する因子を欠損した酵母の感受性は、野生株とほぼ同様であった(Figs. 7-1 (a)~(e), 7-2 (g)~(i), (k)~(n), 7-3 (o)~(v))。Bap2 欠損株は野生株と比較してあたかも高感受性のような結果が得られ

たが (Fig. 7-1(f)48 hr)、Bap2 欠損株は薬剤未添加でも、増殖が極めて遅いため (Fig. 7-1 (f)24 hr) その判定は困難である。また、Lyp1 欠損株は、TBT 未添加時の増殖が野生株と比較して速い (Fig. 7-2(j))。そのため、TBT 添加後 48 時間培養したときの生存曲線では、野生株に比べてやや耐性のような結果となったが、やはり耐性の判断は困難であった。以上の結果から、Tat1 以外の APC family に属するアミノ酸トランスポーターの遺伝子欠損は酵母の TBT 感受性にそれほど大きな影響をあたえないと考えられる。

アミノ酸トランスポーター群は細胞の栄養状態に対応して発現量および細胞内分布が変化し、その機能が厳密に制御されている (13, 37, 38)。一種類のアミノ酸トランスポーターを欠損または高発現させることによる細胞の栄養状態の変化が、他のアミノ酸トランスポーターの発現および細胞内分布に影響を与えることも考えられる。そのため、Tat1 欠損および Tat1 高発現が酵母の TBT 感受性に与える影響が他のアミノ酸トランスポーターの影響を介したものである可能性も否定できない。しかし、少なくとも今回の結果から、Tat1 以外のアミノ酸トランスポーター 1 種類の発現が失われただけでは TBT に対

する感受性に大きな変化は生じないと考えられる。

2-2 エルゴステロール合成経路酵素 Erg4 が TBT 感受性に及ぼす影響とその機構の解析

a) エルゴステロール合成経路に変異を持つ酵母株の TBT に対する感受性

ERG4 遺伝子欠損酵母が TBT に対して高い感受性を示すことが本研究で明らかとなった (3-1-1)。Erg4 は sterol C-24 reductase であり、酵母の主要なステロールであるエルゴステロールの合成の最後の段階で働いている (24, 25)。ERG4 遺伝子欠損株は、エルゴステロールの合成ができないため (25)、細胞中のエルゴステロール欠乏が酵母の TBT に対する感受性を高める可能性が考えられる。

そこで、エルゴステロール合成経路に関与する他の因子の遺伝子欠損株のうち、致死ではないものについて、TBT に対する感受性を検討した。Fig. 8(A)に示すようにエルゴステロール合成経路の後期の段階では、ザイモステロールが Erg6, Erg2, Erg3, Erg5 および Erg4 による修飾をうけ、エルゴステロールが合成される。TBT 感受性試験の結果、ERG3, ERG5, ERG6 遺伝子欠損株は、いずれも若干増殖が遅いものの (Fig. 8(B)-24

hr), 48 時間培養後の結果では、低濃度の TBT (2 μ M) 存在下でそれぞれが高感受性を示した。また、*ERG2* 遺伝子欠損株も、TBT に対してやや高感受性となった(Fig. 8(B)-48 hr)。したがって、*Erg4* の変異だけでなくエルゴステロール合成経路に変異をもつ他の変異体も酵母の TBT 感受性に影響を与えると考えられる。

b) *ERG4* 遺伝子欠損による酵母の TBT 感受性増強機構に *Pdr5* が及ぼす影響

これまでに、エルゴステロールの合成経路に関与する因子の欠損株は、様々な薬物に対して感受性を示すことが知られている(24)。その原因として、これら因子の欠損によって、一部の薬剤の膜透過性が高まることが報告されている(24)。また、エルゴステロール合成経路の変異体では、酵母の多剤耐性因子であるトランスポーター *Pdr5* の薬物排出活性が低いことが示されている(39)。そこで、*ERG4* と *PDR5* の両遺伝子を同時に欠損した株を作製し、*PDR5* 遺伝子が欠損した条件下での TBT 感受性に及ぼす *Erg4* の効果を調べた。その結果、*ERG4*・*PDR5* 二重欠損株は *PDR5* 遺伝子欠損株と比べてやや高い TBT 感受性を示した(Fig. 9(b))。しかしその感受性増大の程度は、

ERG4 遺伝子欠損株と野生株を比較した時(Fig. 9(a))と比べるとごくわずかであった。以上の結果から、*ERG4* 遺伝子欠損による酵母の TBT 感受性増強機構に *Pdr5* が関与する可能性が考えられる。

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

3-2-2 b)の結果から、*ERG4* 遺伝子欠損による酵母の TBT 感受性増強機構に *Pdr5* が関与することが示唆された。TBT 耐性因子である *Pdr5* は ATP-binding cassette transporter であり、TBT の細胞外へ排出を促進することによって、酵母に TBT 耐性を与えることが予想される。そこで、*ERG4* 遺伝子の欠損が細胞内 TBT 蓄積量に及ぼす影響を検討した。その結果、*ERG4* 遺伝子欠損株を TBT で 3 時間処理した際の細胞内スズ量は野生株に比べて約 2 倍高い値を示した(Fig. 10)。しかし、*PDR5* 遺伝子欠損株を用いた場合には、*ERG4* 遺伝子を欠損させても細胞内スズ量は有意な上昇を示さなかった。この結果から、*Erg4* 欠損による細胞内スズ蓄積量の増加は、主に *Pdr5* に帰因すると考えられる。また、これまでに TBT 感受性であることが知られていた *PDR5* 遺伝子欠損株は、細胞内スズ蓄積量が野生株に比べ約 2.5 倍多い

ことが示された。この結果は、Pdr5 が TBT の細胞外への排出を行うトランスポーターであるという仮説を支持している。

3. 遺伝子高発現株を用いた酵母の TBT 耐性に関与する遺伝子の検索およびその TBT 耐性獲得機構の解析

1-1 では遺伝子欠損株を用いたスクリーニングにより、酵母の TBT 感受性に影響を与える因子を 20 種見いだした。しかし、遺伝子の欠損により TBT 未添加時でも酵母の増殖に影響が認められる場合や、他に機能が重複する因子が存在するために 1 種類のみを欠損しただけでは、影響が現れないといった問題が生じる。そこで、酵母の TBT 感受性に影響を与える因子をさらに検索するために、遺伝子ライブラリーのランダム導入法を用いて、高発現によって酵母に TBT 耐性を与える因子のスクリーニングを行った。

3-1 高発現により酵母に TBT 耐性を与える因子のスクリーニング

高発現により酵母に TBT 耐性を与える遺伝子のスクリーニング

TBT 耐性に関与する酵母遺伝子を Fig. 11 に示した方法によって検索した。すなわち、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酵母 (BY4742 株) に導入し、親株が生育できない濃度 (6, 7, 8 μ M) の TBT 存在下で生存可能な形質転換体を得た。これら耐性酵母からプラスミドを回収し、親株に再導入して TBT に対する感受性を調べたところ、空ベクターである YEp13 を導入した酵母に比べて明らかな耐性を示す酵母株が 2 種存在した (Fig. 12)。この 2 種の酵母株に挿入されているプラスミド中に TBT 耐性に関わる遺伝子断片が含まれると考えられる。

TBT 耐性を与えるプラスミドに含まれる酵母遺伝子断片の解析

TBT 耐性に関与する遺伝子断片を酵母ゲノムライブラリーから検索した結果、2 種のプラスミド (TBTr-1, TBTr-2) を得た。そこで、これら 2 種のプラスミド中に含まれる酵母遺伝子断片の塩基配列解析を行い、TBT 耐性を与える遺伝子の同定を行った。

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 TBTr-1 フラグメントおよび TBTr-2 フラグメントの両端から数百 bp の塩基配列を決定した後に、この配列を *Saccharomyces* Genome Database (<http://www.veastgenome.org/>)

を利用して検索した。その結果、これらプラスミドが含む酵母ゲノム断片の染色体上での位置は、TBTr-1が酵母第 XV 染色体の 624729 番から 619040 番の塩基配列、TBTr-2 が酵母第 X 染色体の 280905 番から 289551 番の塩基配列であった。それぞれのゲノム断片に含まれる遺伝子を上記のデータベースで調べたところ、TBTr-1には *PDR5* の ORF のみが含まれており(Fig.13)、TBTr-2には、*IML2*、*ARP4*、*SCP160* の 3 つの ORF が存在した(Fig14(A))。TBTr-1に含まれる *PDR5* 遺伝子はその産物が前述したように既に TBT 耐性因子としての報告がある(8)。Pdr5 は、酵母に多剤耐性を与える ATP-binding cassette transporter であり、細胞膜に存在する Pdr5 が TBT の細胞外への排出を促進することによって酵母に TBT 耐性を与えると考えられる。

TBTr-2 フラグメントに含まれる TBT 耐性に関与する遺伝子の同定

TBTr-2 中には、*IML1*、*ARP4*、*SCP160* の 3 つの ORF が含まれていることが明らかになった。そこで、TBT 耐性遺伝子を同定するために、TBTr-2 由来の 2 種のプラスミドを作製した(Fig. 14(A))。一方のプラスミド (YEp13-F1) は *IML2* を含み、

もう一方 (YEp13-F2) は *SCP160* および *ARP4* の一部を含む。得られたプラスミドを親株に導入して TBT に対する感受性を調べたところ、YEp13-F2 を導入した酵母が TBT 耐性を示した(Fig. 14(B))。TBTr-2 は *ARP4* の一部を含むが、*SCP160* 遺伝子のみを含む pRS425-F3 プラスミドを導入した酵母も TBT に対して耐性を示した(Fig. 14(C))ことから、Scp160 の高発現が酵母に TBT 耐性を与えることが明らかとなった。

Scp160 は RNA 結合蛋白質であるとの報告がある(40)が、その機能はよくわかっていない。しかし、最近、yeast two-hybrid system により、今回同定されたもう 1 つの耐性因子である Pdr5 に結合する蛋白質の 1 つとして Scp160 が同定された(41)。

3-2 Scp160 高発現による TBT 耐性獲得機構の解析

a) 酵母の Scp160 高発現による耐性獲得機構に Pdr5 が及ぼす影響

高発現により酵母に TBT 耐性を与える因子として Scp160 および Pdr5 を同定したが、この両者が細胞内で結合することが報告されたことから、酵母の Scp160 過剰発現による耐性獲得に Pdr5 が関与する可能性を考え、*PDR5* 遺伝子欠損酵母に Scp160 を

過剰発現させて TBT に対する感受性を検討した。

その結果、*PDR5* 遺伝子欠損酵母に *Scp160* を高発現させても、その TBT 感受性はコントロール(*PDR5* 遺伝子欠損株)とほぼ同様であった(Fig. 15)。したがって、酵母の *Scp160* 高発現による耐性獲得には *Pdr5* が必須であると考えられる。*Scp160* は *Pdr5* と結合することによって、*Pdr5* による細胞外への TBT 排出活性を促進させ、その結果として酵母に TBT 耐性を与える可能性が考えられる。

b) *Scp160* 高発現が *Pdr5* のトランスポーター活性に与える影響

Pdr5 は蛍光物質であるローダミン 6G を基質として細胞外へ排出することが報告されている(42)。そこで、ローダミン 6G の排泄量を指標として、*Scp160* の高発現が *Pdr5* 活性におよぼす影響を検討した。あらかじめローダミン 6G を取り込ませた細胞からのローダミン 6G の排泄を蛍光強度により測定したところ、*Scp160* 高発現酵母は、コントロールであるベクター (pRS425) のみを導入した酵母 (pRS425/BY4742) に比べて多量のローダミン 6G を細胞外に排出した (Fig. 16)。また、*PDR5* 遺伝子欠損株では、*Scp160* 高発現による蛍光強度の増加は認められな

った(Fig. 16)。これらの結果から、*Scp160* は *Pdr5* による細胞外への TBT の排出を促進することにより酵母に耐性を与えると考えられる。

これまで、*Scp160* が *Pdr5* と結合する蛋白質であるとの報告はあったものの *Scp160* が *Pdr5* の活性に与える影響は検討されていなかった。本研究結果は、*Scp160* が *Pdr5* の薬物排出活性を促進する機能を持つことをはじめて示すものである。

参考文献

- 1 Ivan J. Boyer Toxicity of dibutyltin, tributyltin and other organotin compounds to humans and to experimental animals *Toxicology*, 55 (1989) 253 – 298
- 2 T. Horiguchi, C. Hyeon-Seo, H. Shiraishi, Y. Shibata, M. Soma, M. Morita and M. Shimizu Field studies on imposex and organotin accumulation in the rock shell, *Thais clavigera*, from the Seto Inland Sea and the Sanriku region, Japan, *The Science of The Total Environment*, 214, 1-3, 18, 65-70 (1998)
- 3 Bressa G, Hinton RH, Price SC, Isbir M, Ahmed RS, Grasso P, Immunotoxicity of tri-n-butyltin

- oxide (TBTO) and tri-n-butyltin chloride (TBTC) in the rat. *J Appl Toxicol*, 11(6), 397-402, (1991)
- 4 Schmidt, A., Hall, M. N., and Koller, A. Two FK506 resistance-conferring genes in *Saccharomyces cerevisiae*, *TAT1* and *TAT2*, encode amino acid permeases mediating tyrosine and tryptophan uptake. *Mol Cell Biol* 14, 6597-606 (1994).
- 5 Abe, F., and Iida, H. Pressure-induced differential regulation of the two tryptophan permeases *Tat1* and *Tat2* by ubiquitin ligase *Rsp5* and its binding proteins, *Bul1* and *Bul2*. *Mol Cell Biol* 23, 7566-84. (2003).
- 6 Ozcan, S., and Johnston, M. Function and regulation of yeast hexose transporters. *Microbiol Mol Biol Rev* 63, 554-569 (1999).
- 7 Petit, T., Diderich, J. A., Kruckeberg, A. L., Gancedo, C., and Van Dam, K. Hexokinase Regulates Kinetics of Glucose Transport and Expression of Genes Encoding Hexose Transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 182, 6815-6818 (2000).
- 8 Golin, J., Ambudkar, S. V., Gottesman, M. M., Habib, A. D., Sczepanski, J., Ziccardi, W., and May, L. Studies with Novel *Pdr5p* Substrates Demonstrate a Strong Size Dependence for Xenobiotic Efflux. *J. Biol. Chem.*, 278: 5963 - 5969. (2003)
- 9 Wolfger, H., Mahe, Y., ParleMcDermott, A., Delahodde, A., and Kuchler, K. The yeast ATP binding cassette (ABC) protein genes *PDR10* and *PDR15* are novel targets for the *Pdr1* and *Pdr3* transcriptional regulators. *FEBS Lett* 418, 269-274 (1997).
- 10 Katzmann, D. J., Burnett, P. E., Golin, J., Mahe, Y., and Moye-Rowley, W. S. Transcriptional control of the yeast *PDR5* gene by the *PDR3* gene product. *Mol Cell Biol* 14, 4653-61 (1994).
- 11 Bourdineaud, J. P., De Sampaio, G., and Lauquin, G. J. A *Rox1*-independent hypoxic pathway in yeast. Antagonistic action of the repressor *Ord1* and activator *Yap1* for hypoxic expression of the *SRP1/TIR1* gene. *Mol Microbiol* 38, 879-90. (2000).
- 12 Schmitt, A. P., and McEntee, K. *Msn2p*, a zinc finger DNA-

- binding protein, is the transcriptional activator of the multistress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 5777-82 (1996).
- 13 Bernard, F., and Andre, B. Genetic analysis of the signalling pathway activated by external amino acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* 41, 489-502. (2001).
- 14 Pan, X., and Heitman, J. Sok2 Regulates Yeast Pseudohyphal Differentiation via a Transcription Factor Cascade That Regulates Cell-Cell Adhesion. *Mol Cell Biol* 20, 8364-8372 (2000).
- 15 Conlan RS, Tzamarias D. Sfl1 functions via the co-repressor Ssn6-Tup1 and the cAMP-dependent protein kinase Tpk2. *J Mol Biol.* Jun 22;309(5):1007-15. 2001
- 16 Cecile M. Pickart Ubiquitin in chains. *Trends in Biochemical Sciences* 15 (2) : 184-90 (2003)
- 17 Springael, J. Y., Galan, J. M., Haguenaer-Tsapis, R., and Andre, B. NH₄⁺-induced down-regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* Gap1p permease involves its ubiquitination with lysine-63-linked chains. *J Cell Sci* 112, 1375-1383 (1999).
- 18 Brusky, J., Zhu, Y., and Xiao, W. *UBC13*, a DNA-damage-inducible gene, is a member of the error-free postreplication repair pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* 37, 168-174 (2000).
- 19 Hofmann, R. M., and Pickart, C. M. Noncanonical *MMS2*-encoded ubiquitin-conjugating enzyme functions in assembly of novel polyubiquitin chains for DNA repair. *Cell* 96, 645-653 (1999).
- 20 Yashiroda, H., Oguchi, T., Yasuda, Y., Toh-*EA*, and Kikuchi, Y. Bull1, a new protein that binds to the Rsp5 ubiquitin ligase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 16, 3255-63 (1996).
- 21 Umehayashi, K., and Nakano, A. Ergosterol is required for targeting of tryptophan permease to the yeast plasma membrane. *J Cell Biol* 161, 1117-31. (2003).
- 22 Helliwell, S. B., Losko, S., and Kaiser, C. A. Components of a ubiquitin ligase complex specify polyubiquitination and

- intracellular trafficking of the general amino acid permease. *J Cell Biol* 153, 649–62. (2001).
- 23 Byrd, C., Turner, G. C., and Varshavsky, A. The N-end rule pathway controls the import of peptides through degradation of a transcriptional repressor. *Embo Journal* 17, 269–77 (1998).
- 24 Mukhopadhyay, K., Kohli, A., and Prasad, R. Drug susceptibilities of yeast cells are affected by membrane lipid composition. *Antimicrob Agents Chemother* 46, 3695–705. (2002).
- 25 Zweytick, D., Hrastnik, C., Kohlwein, S. D., and Daum, G. Biochemical characterization and subcellular localization of the sterol C-24(28) reductase, Erg4p, from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 470, 83–87 (2000).
- 26 Bind Zhang and Andrew C. Zelhof Amphiphysins : Raising the BAR for Synaptic Vesicle Recycling and Membrane Dynamic. *Traffic* 3 : 452–460 (2002)
- 27 Munn, A. L., Stevenson, B. J., Geli, M. I., and Riezman H *end5*, *end6*, and *end7*: mutations that cause actin delocalization and block the internalization step of endocytosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 6, 1721–42 (1995).
- 28 Diffley, J. F., and Stillman, B. A close relative of the nuclear, chromosomal high-mobility group protein HMG1 in yeast mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 7864–8 (1991).
- 29 Zelenaya-Troitskaya, O., Newman, S. M., Okamoto, K., Perlman, P. S., and Butow, R. A. Functions of the high mobility group protein, Abf2p, in mitochondrial DNA segregation, recombination and copy number in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 148, 1763–1776 (1998).
- 30 Lorberg, A., Schmitz, H. P., Jacoby, J. J., and Heinisch, J. J. Lrg1p functions as a putative GTPase-activating protein in the Pkc1p-mediated cell integrity pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Genet Genomics* 266, 514–26. (2001).
- 31 Sobel, S. G., and Wolin, S. L. Two yeast La motif-containing proteins are RNA-binding proteins that associate with

- 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 Kolaczowski 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、大橋一晶、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、大橋一晶、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。

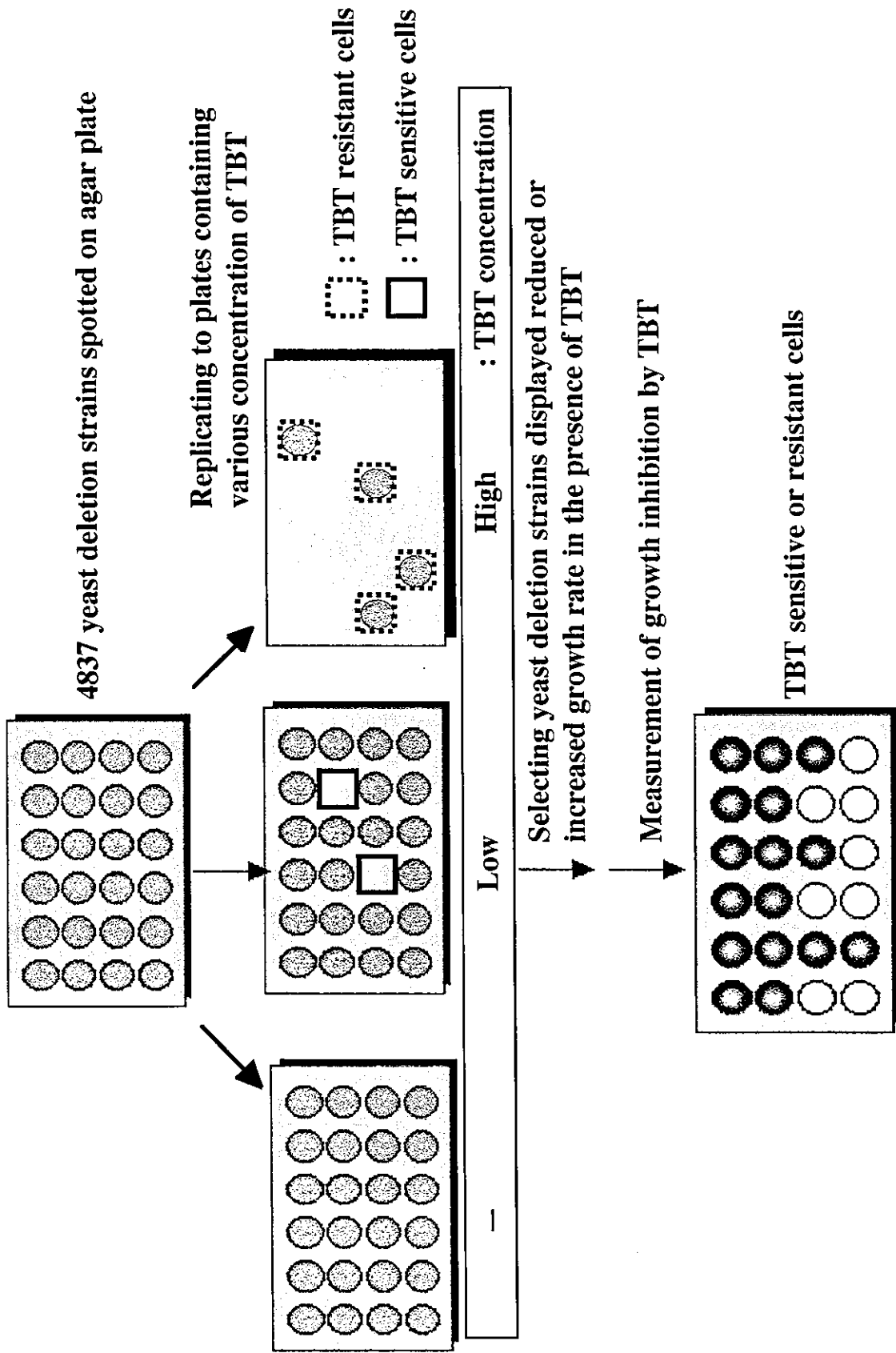


Fig. 1. 酵母遺伝子欠損株を用いたTBT感受性に影響を与える因子のスクリーニング方法

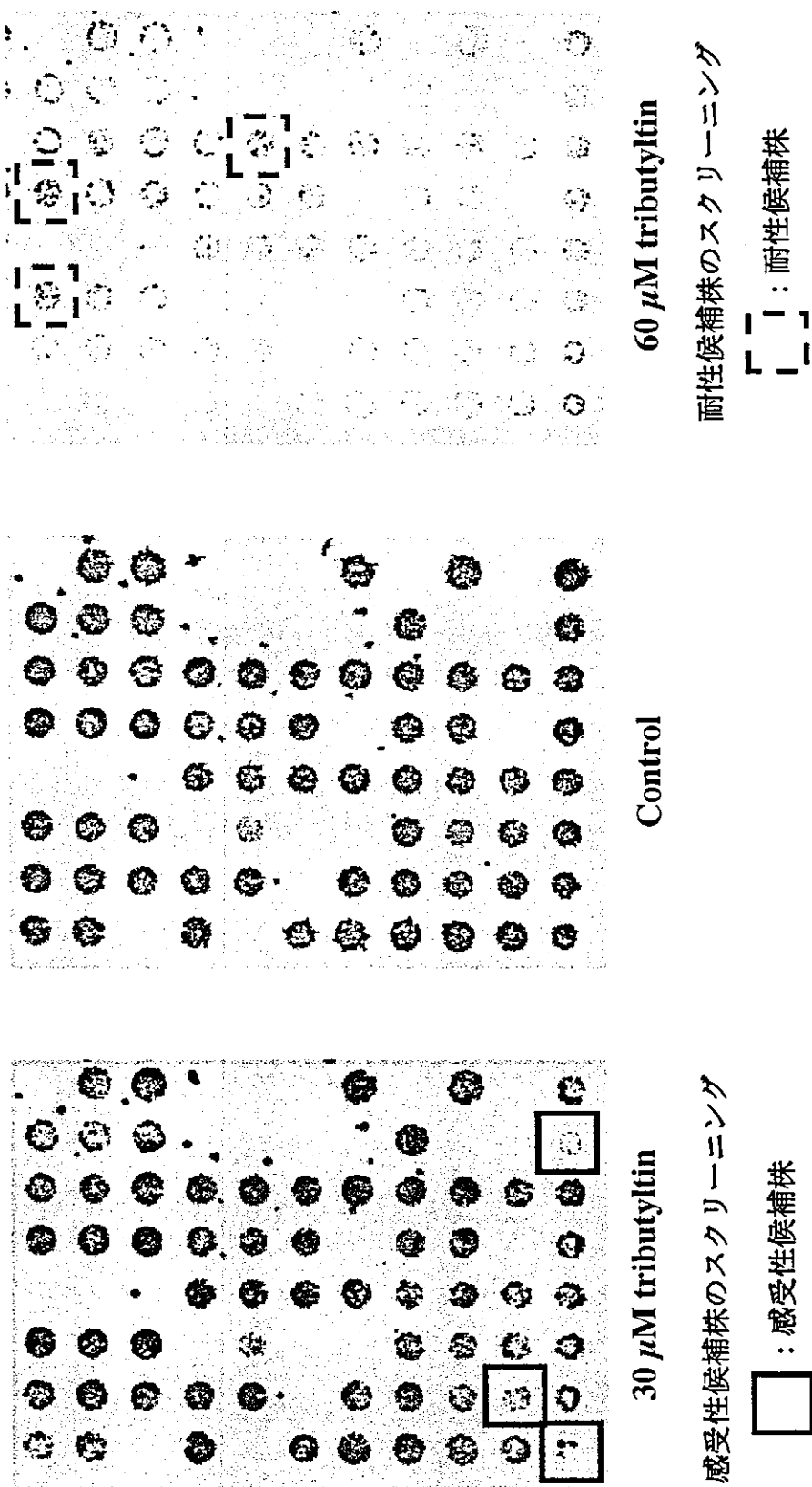


Fig. 2. TBT存在下での遺伝子欠損株の増殖への影響

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 μM 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 μM TBT存在下で増殖した酵母株を耐性候補株 (□) とした。

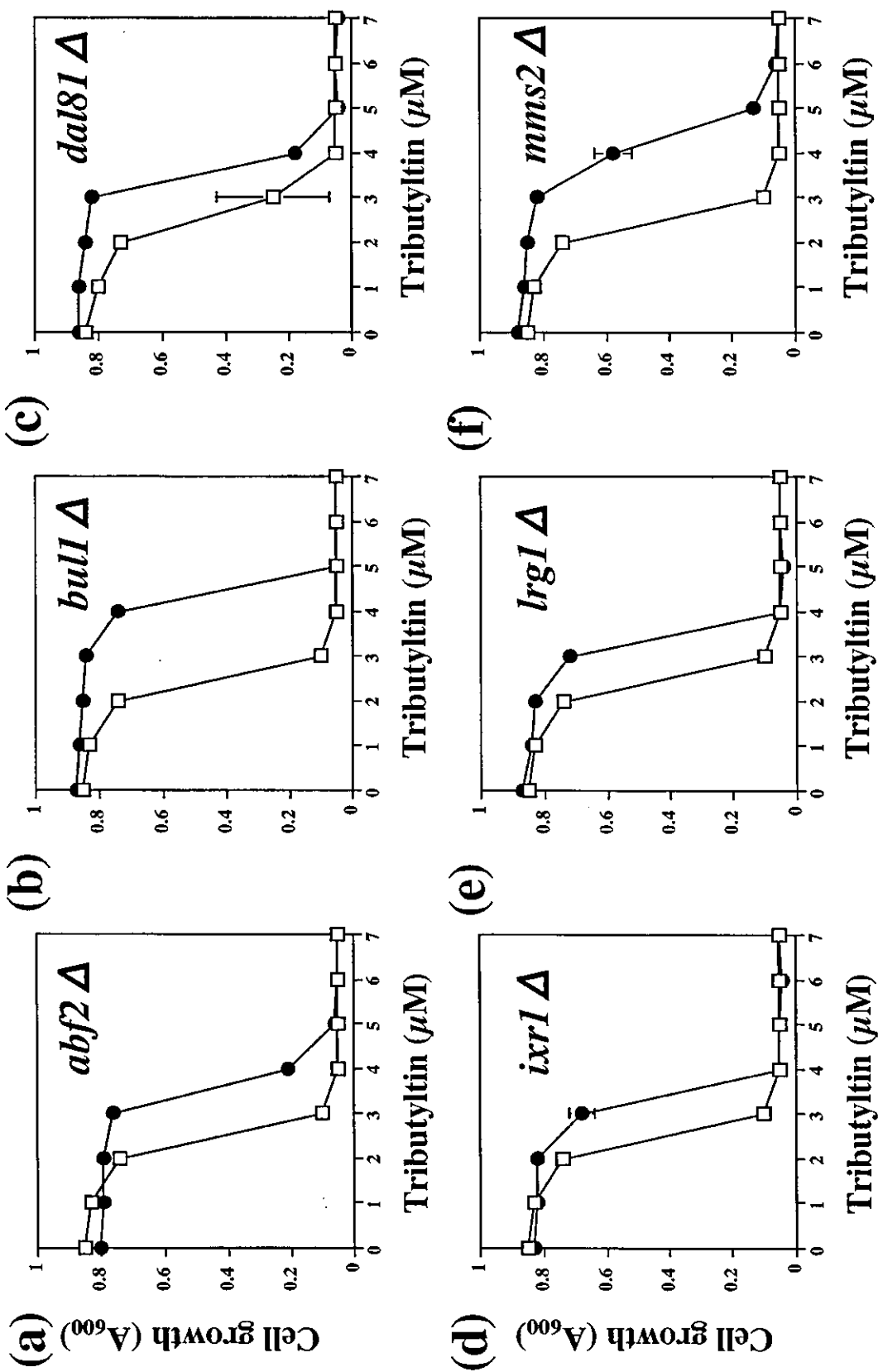


Fig. 3-1. TBTに対して耐性を示す遺伝子欠損株の生存曲線 (1)

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。

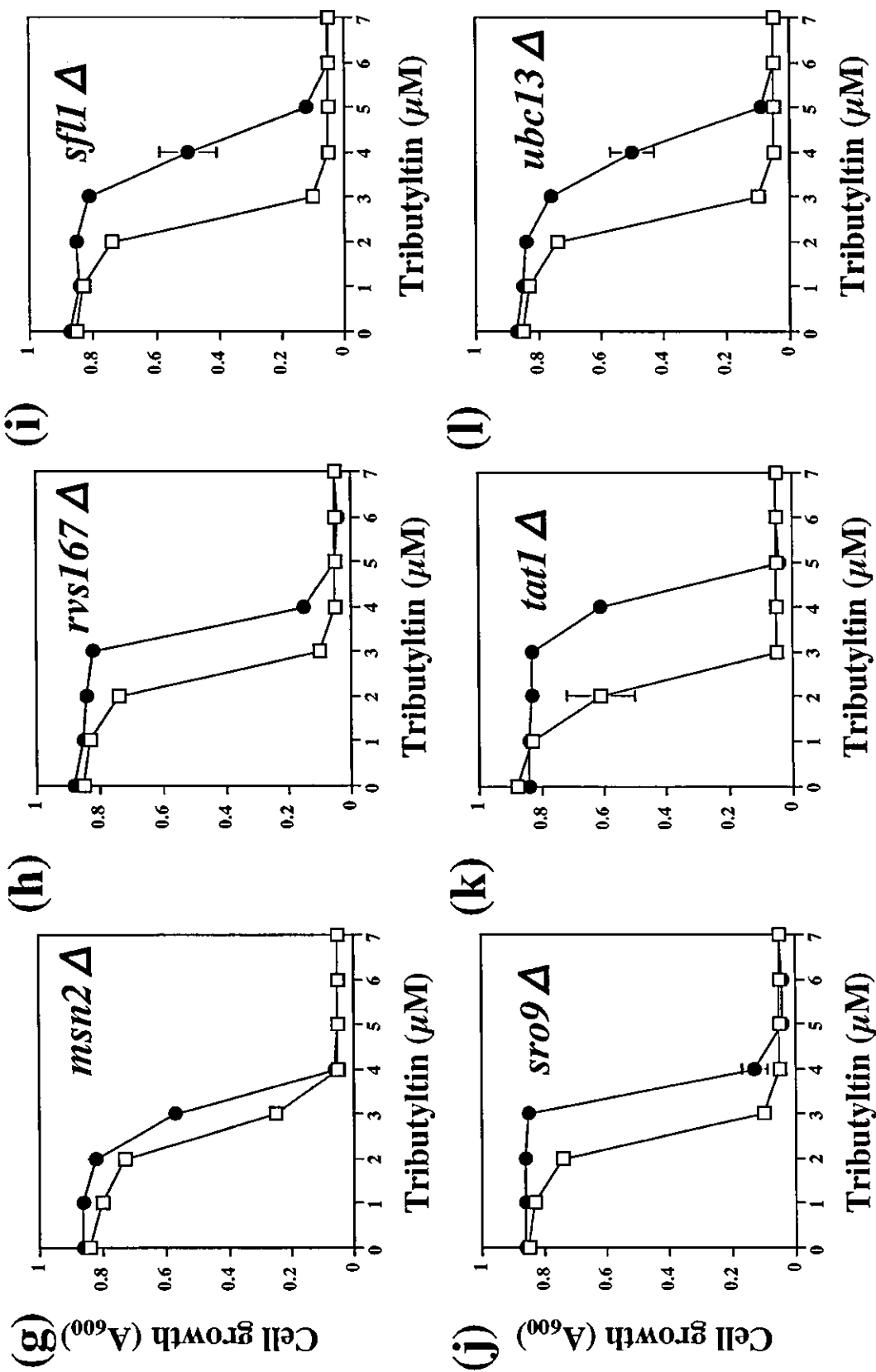


Fig. 3-2. TBTに対して耐性を示す遺伝子欠損株の生存曲線 (2)

酵母を96 well plate中で各濃度のTBT存在下48時間培養した後、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* Δ, (h) *rvs167* Δ, (i) *sfl1* Δ, (j) *sro9* Δ, (k) *tat1* Δ, (l) *ubc13* Δ, なお、(—□—) は親株 (BY4742)のTBT存在下での生存曲線を示す。

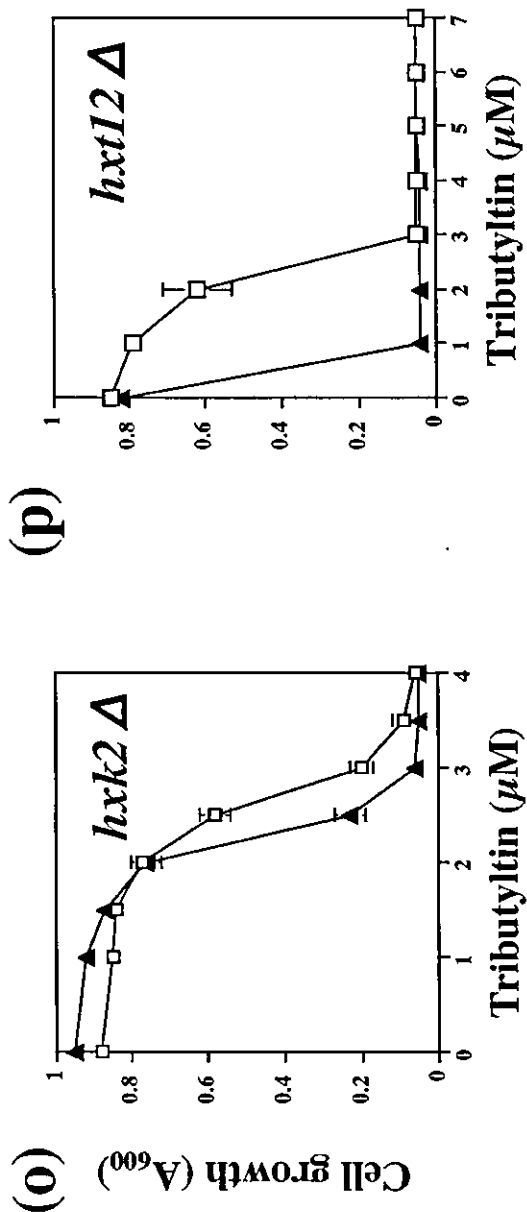
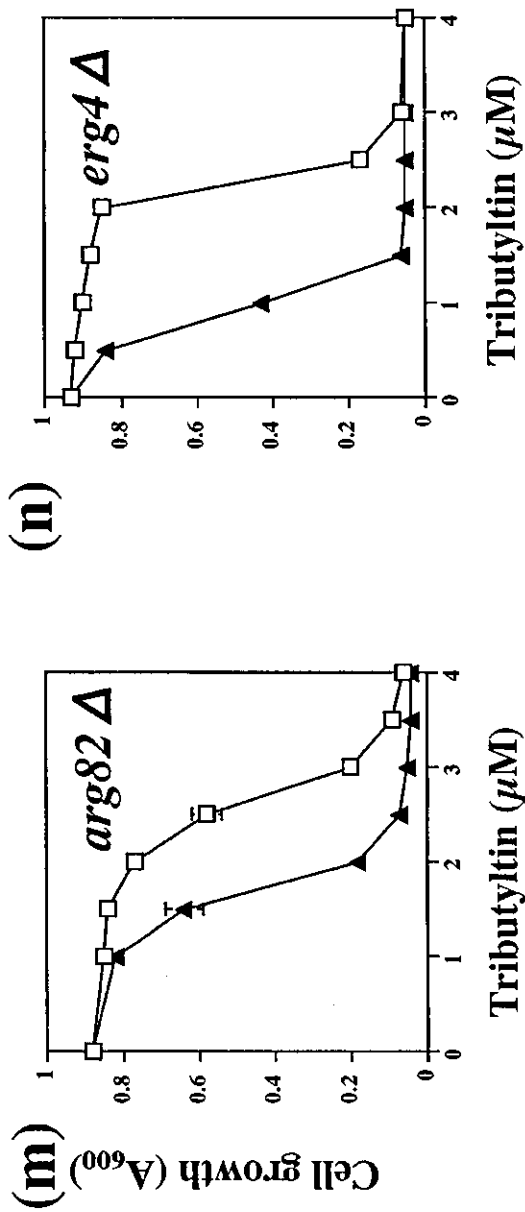


Fig. 3-3. TBTに対して高感受性を示す遺伝子欠損株の生存曲線 (1)

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)。(—▲—) 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) *hxxk2* Δ , (p) *hxt12* Δ , なお、(—□—) は親株 (BY4742)のTBT存在下での生存曲線を示す。

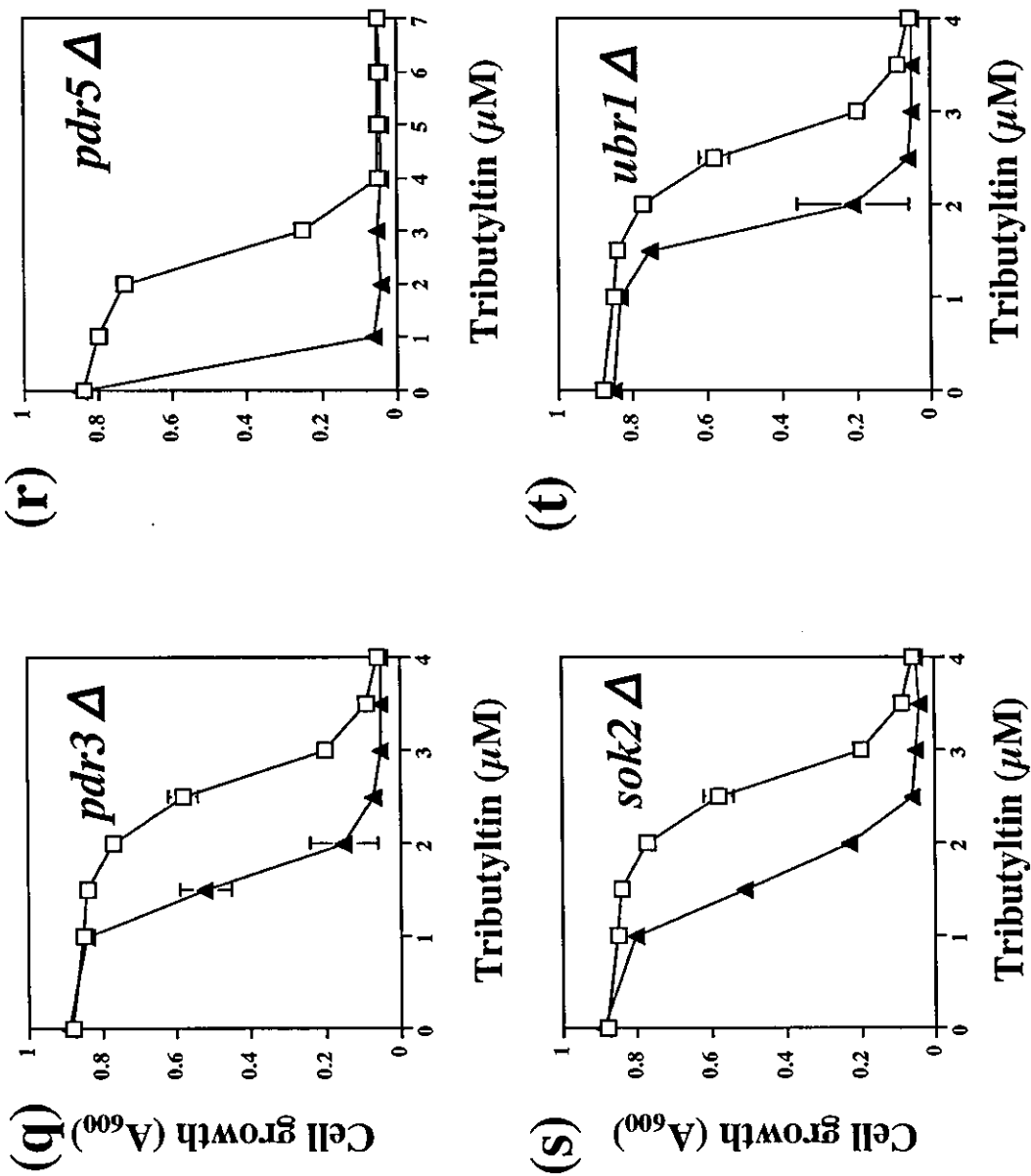


Fig. 3-4. TBTに対して高感受性を示す遺伝子欠損株の生存曲線 (2)

酵母を96 well plate中で各濃度のTBT存在下48時間培養した後、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。