

Fig. 2-3 欠損により酵母にアドリアマイシン高感受性を与える遺伝子

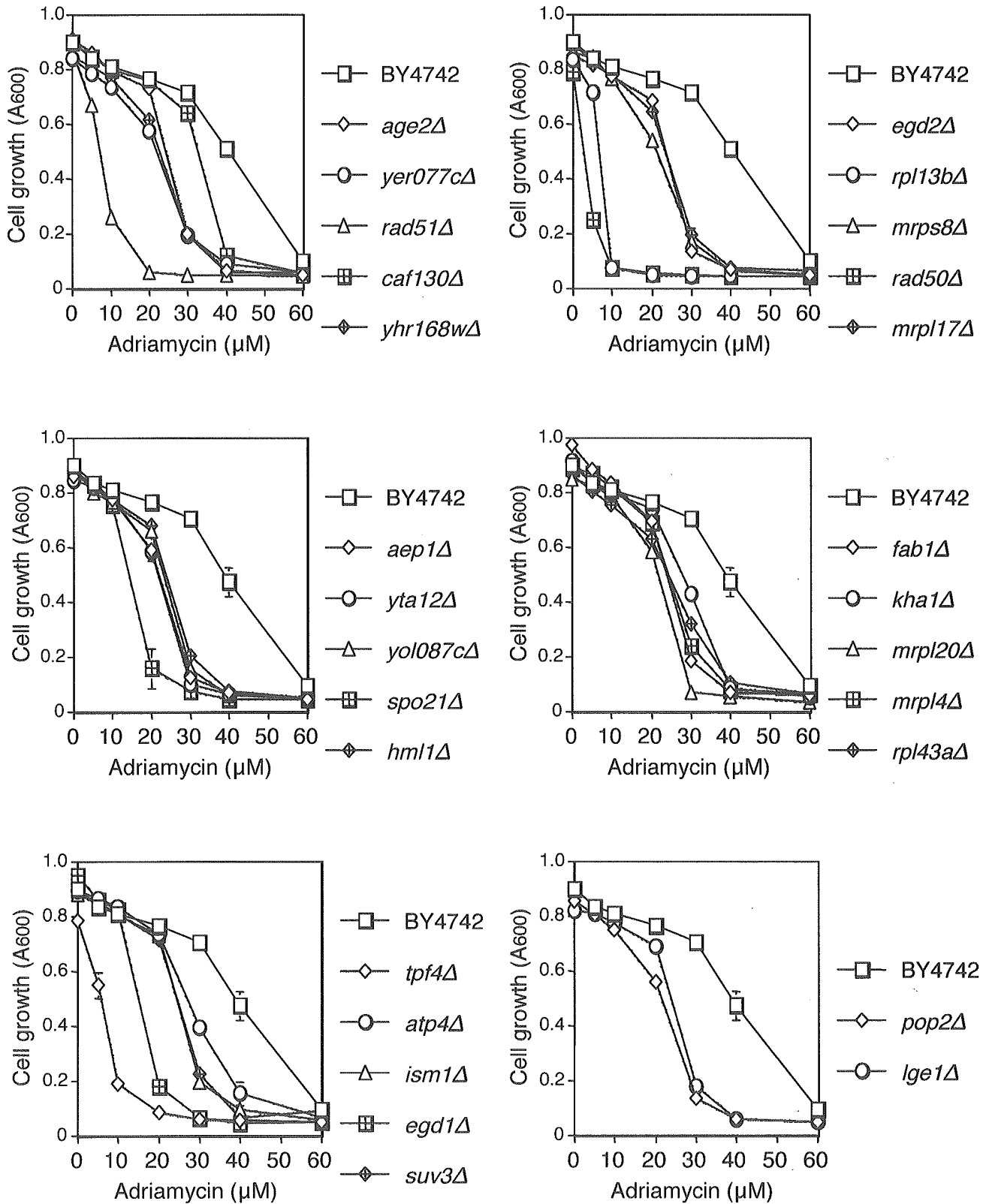


Fig. 2-4 欠損により酵母にアドリアマイシン
高感受性を与える遺伝子

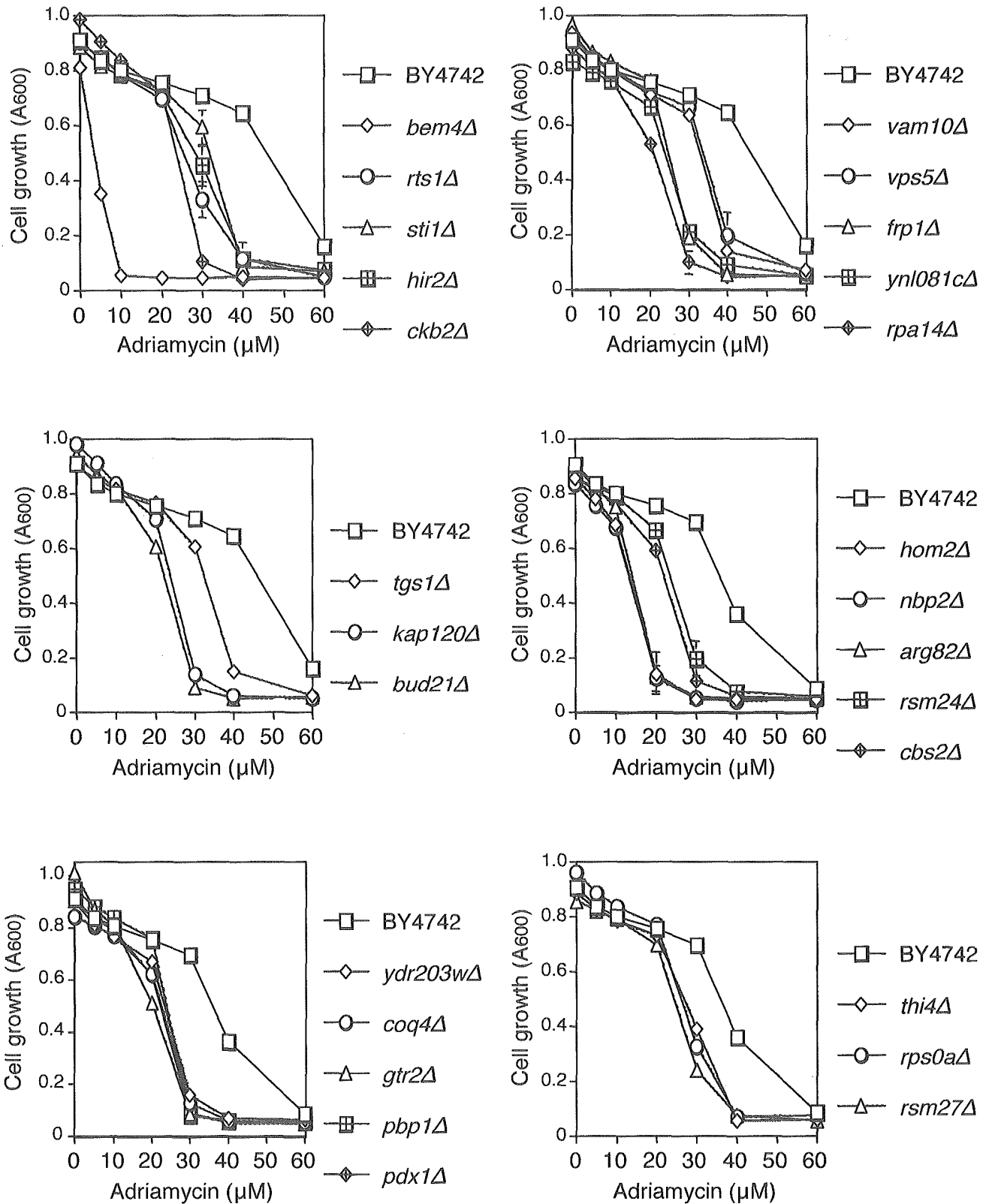


Fig. 2-5 欠損により酵母にアドリアマイシン
高感受性を与える遺伝子

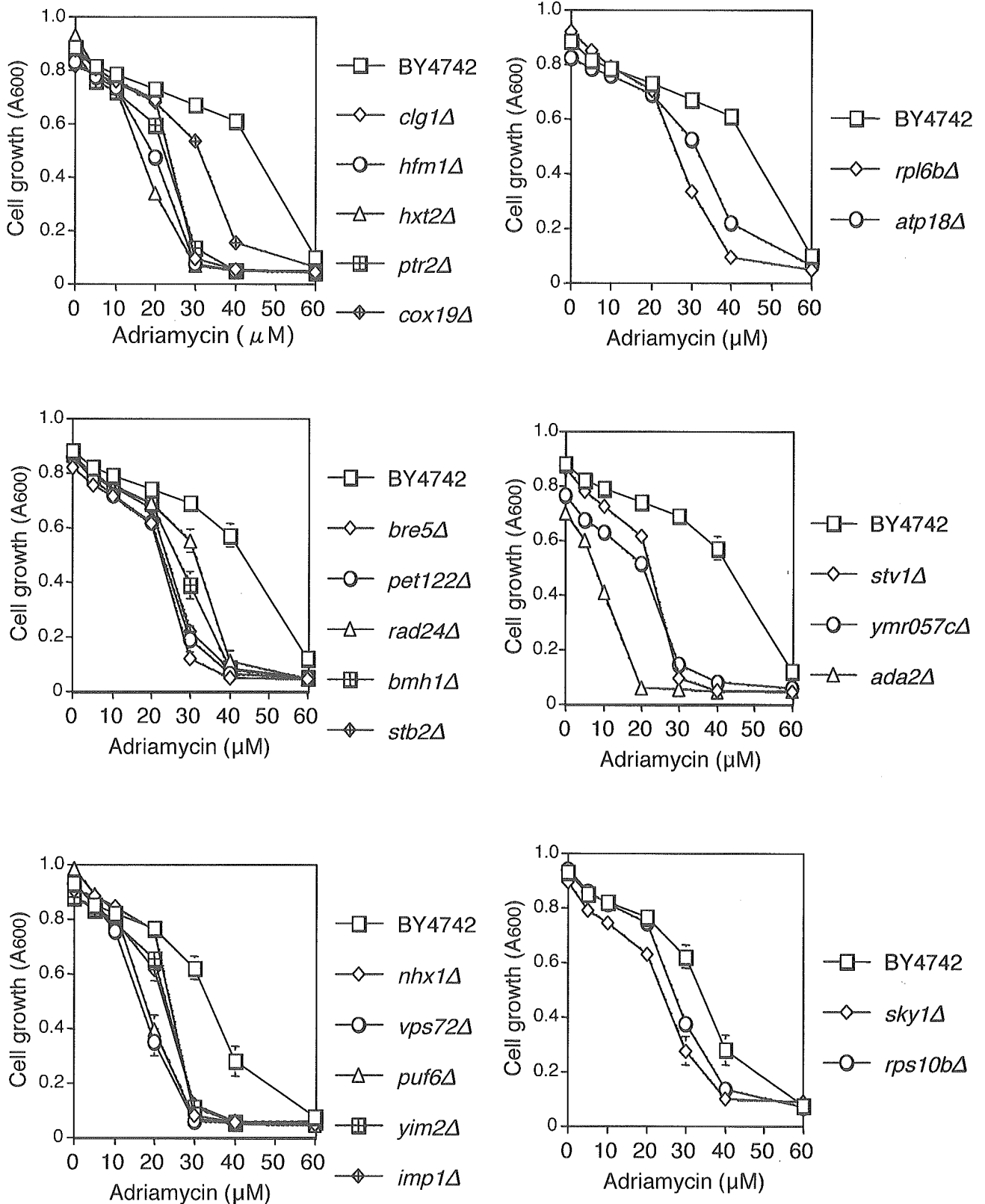


Fig. 2-6 欠損により酵母にアドリアマイシン
高感受性を与える遺伝子

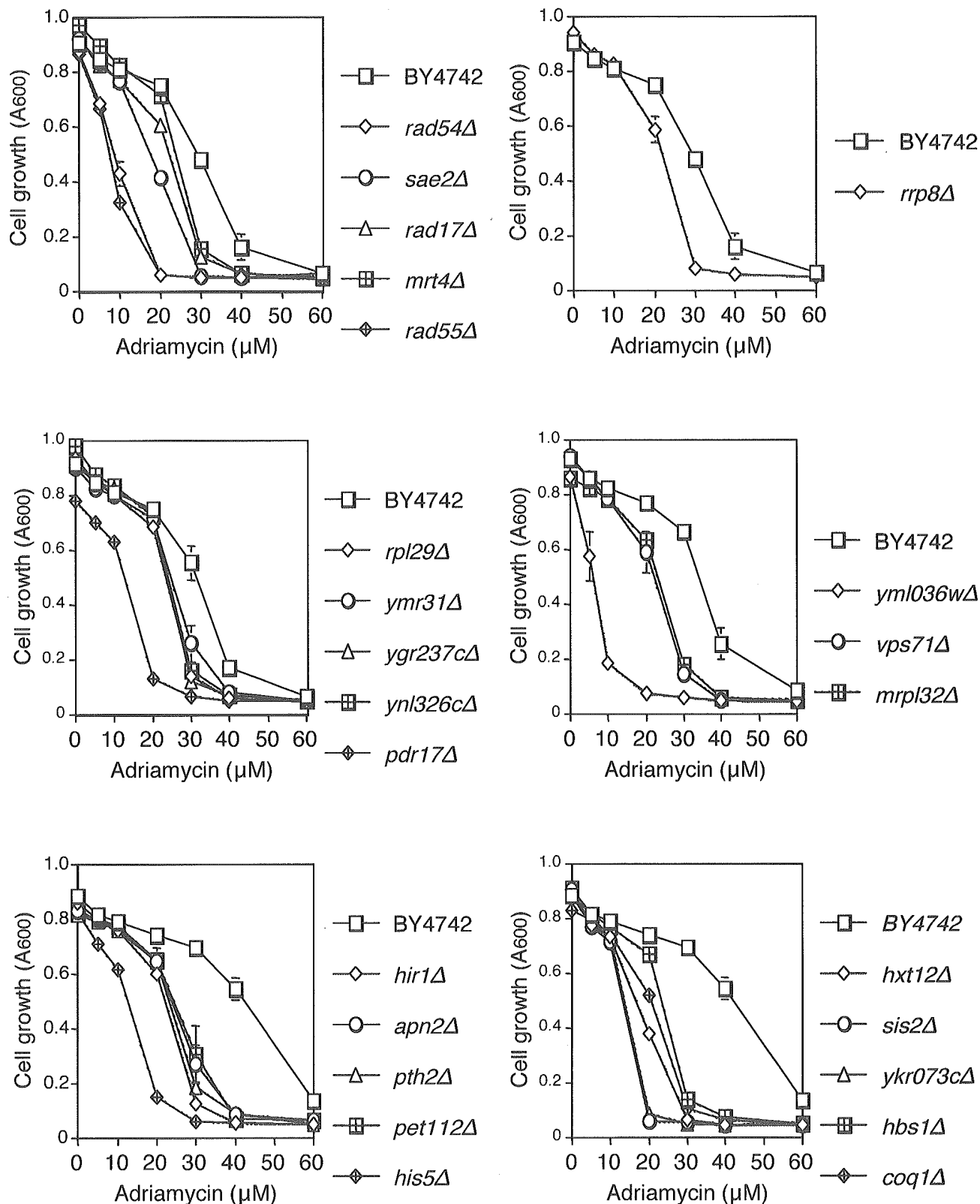


Fig. 2-7 欠損により酵母にアドリアマイシン高感受性を与える遺伝子

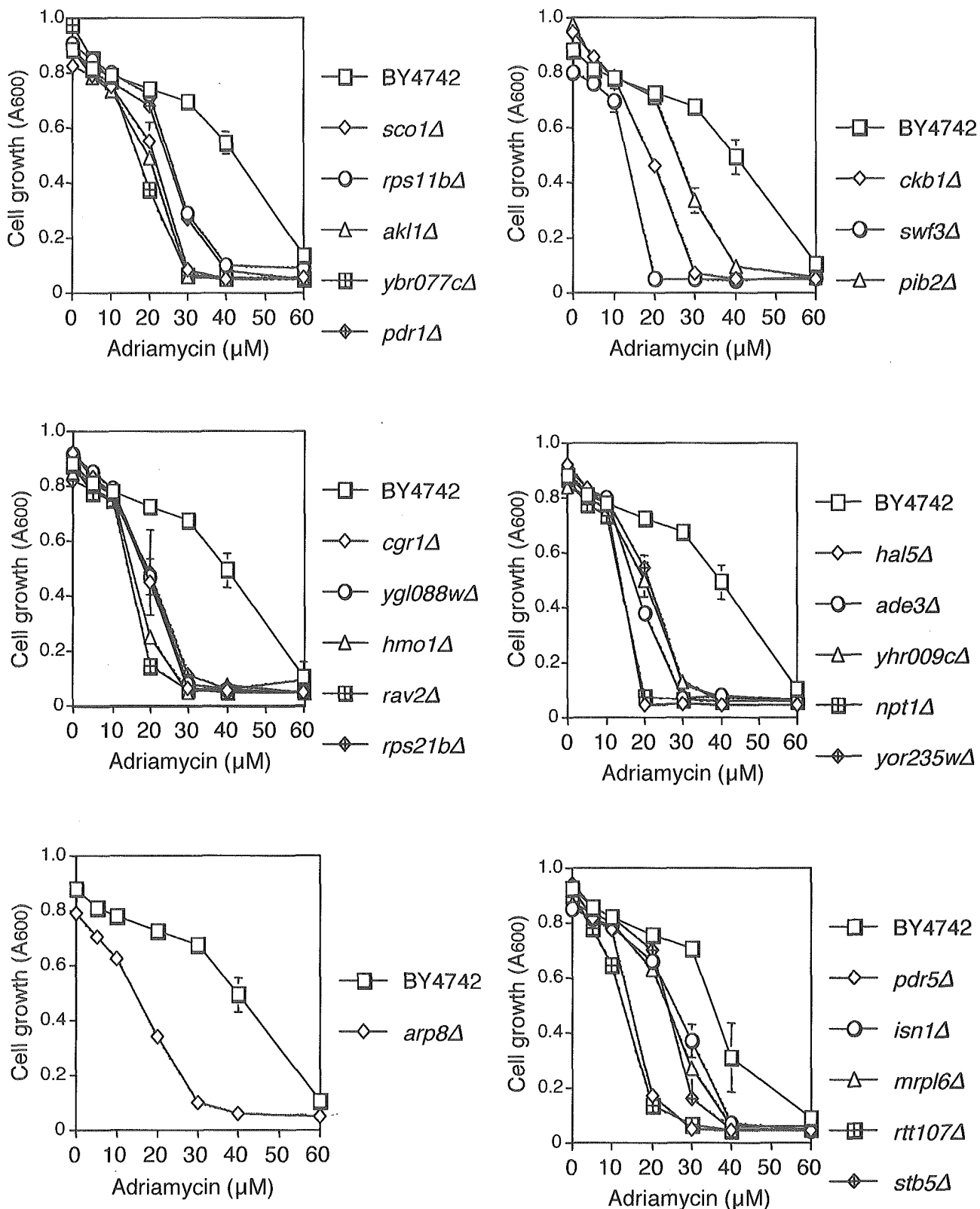


Fig. 2-8 欠損により酵母にアドリアマイシン
高感受性を与える遺伝子

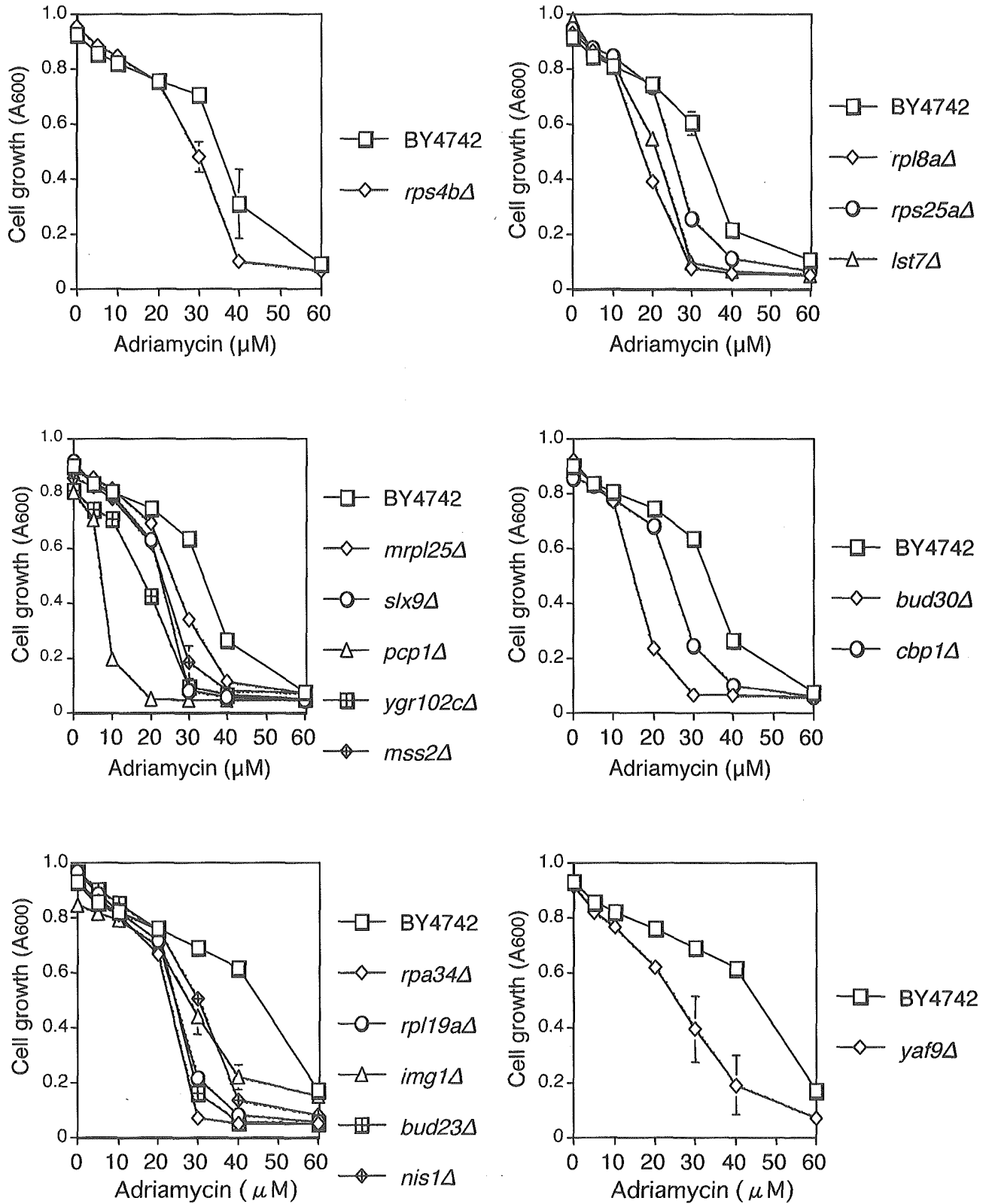


Fig. 2-9 欠損により酵母にアドリアマイシン
高感受性を与える遺伝子

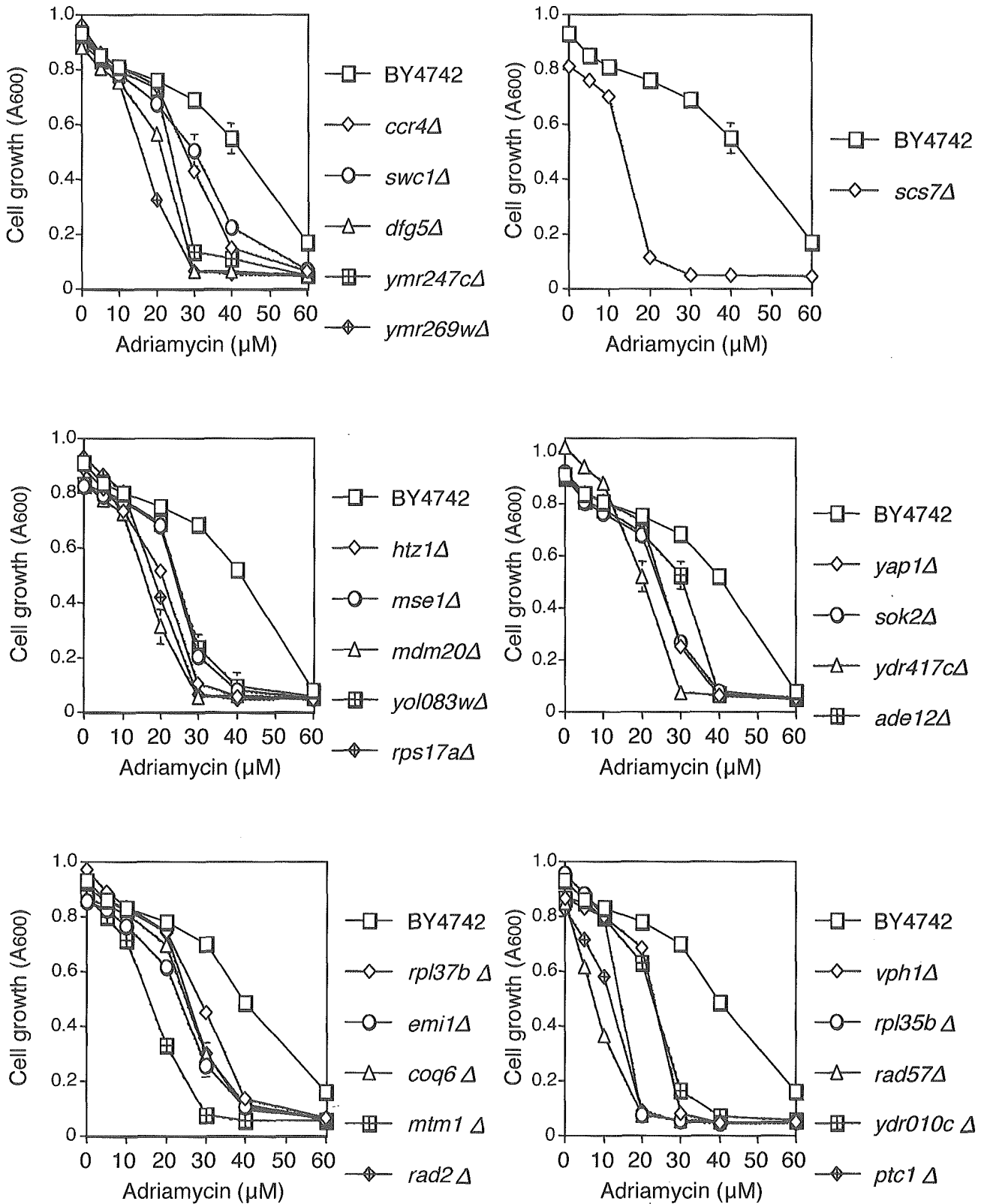


Fig. 2-10 欠損により酵母にアドリアマイシン
高感受性を与える遺伝子

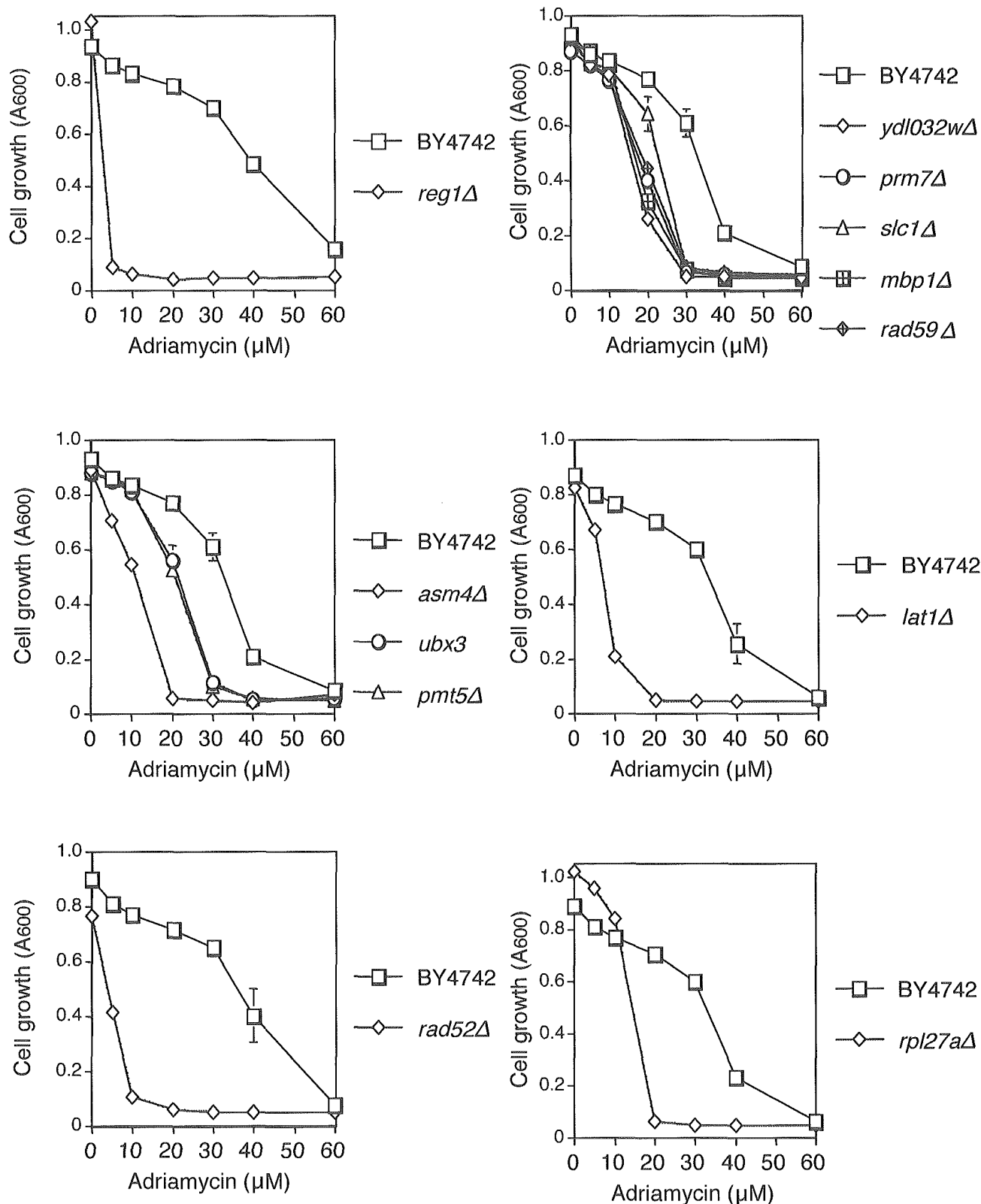


Fig. 2-11 欠損により酵母にアドリアマイシン
高感受性を与える遺伝子

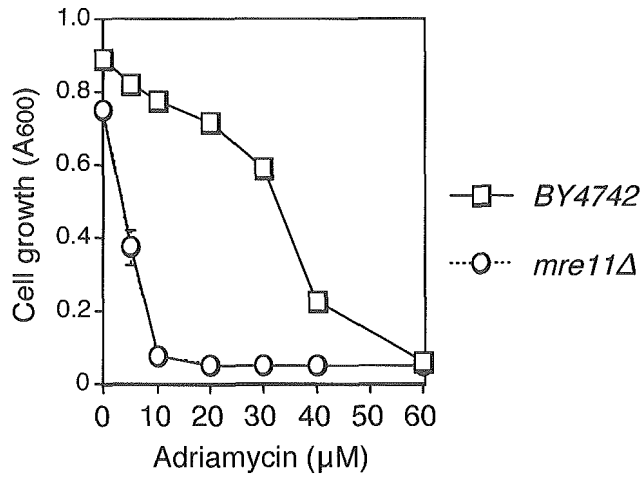


Fig. 2-12 欠損により酵母にアドリアマイシン
高感受性を与える遺伝子

Table 1 欠損により酵母にアドリアマイシン耐性を与える遺伝子

【ユビキチン・プロテアソーム経路】

BUL1, RPN13, UBI4, UBP2, UBP6, UBP14

【エンドサイトーシス&細胞骨格形成】

ARC18, EDE1, END3, LSB3, RVS161, RVS167

SAC6, SHE4, SLA1, SLA2, SRV2, VRP1

【その他】

APQ12, CKA2, FEN1, FRE2, FYV8, IPK1, KEM1, NAM2

QCR10, RAD7, RAS2, REF2, RPL34A, SIZ1, STM1, VPS75

YAL031c, YDL146w, YGL072c, YGL250w, YIL077c

YKL115c, YNL063w, YNL136w

Table 2 欠損により酵母にアドリアマイシン高感受性を与える遺伝子

【細胞内情報伝達系】

BEM4, SAC7, PTC1, NBP2

【DNA修復】

RAD51, RAD54, RAD55, RAD57

【糖代謝】

REG1, HXK2, HXT12

【リボソーム蛋白質】

RPL13B, RPL35A

【その他】

EGD1, HAL5, HIS5, NEW1, NPT1, PCP1, PDR5

RAV2, SCS7, SIS2, SPO21, YKR073c, YOR235w

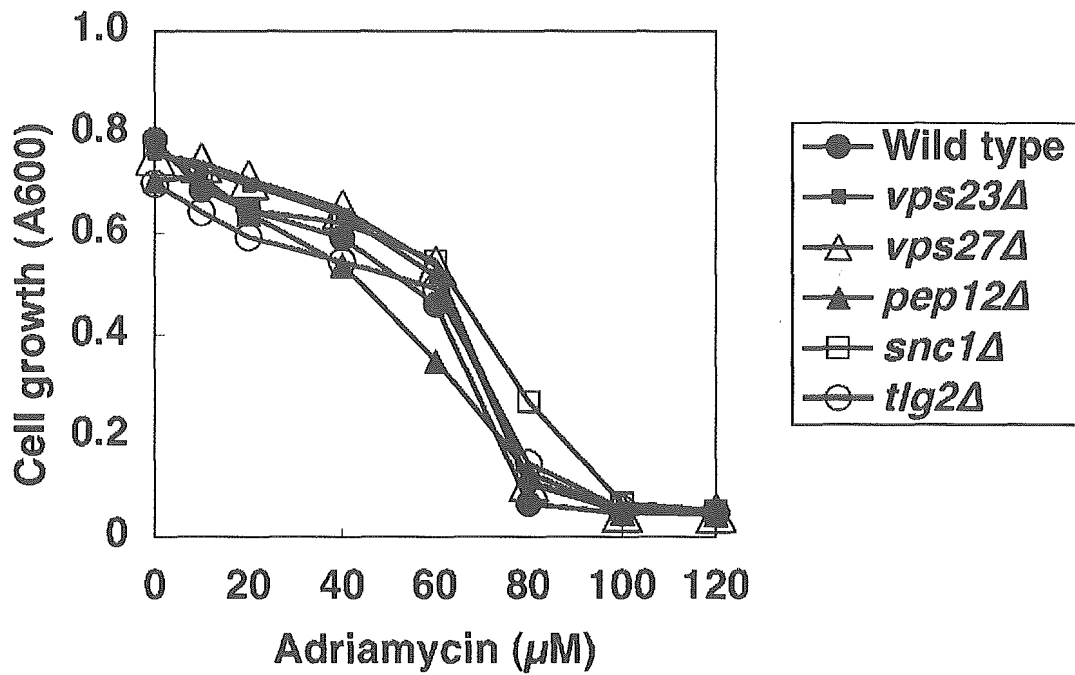


Fig. 3 エンドサイトーシスの post-internalization step に関与する因子の欠損がアドリアマイシン感受性に及ぼす影響

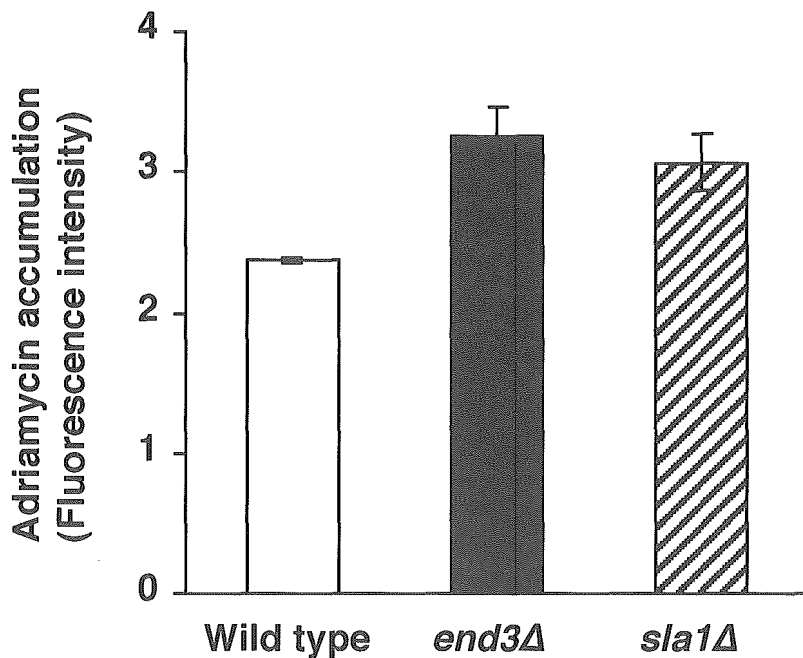


Fig. 4 エンドサイトーシスの internalization step に関与する因子 (End3 および Sla1) の欠損がアドリアマイシンの細胞内蓄積量に及ぼす影響

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

ヒ素感受性に影響を与える遺伝子群の検索とその作用機構解析

分担研究者 大橋一晶 東北大学大学院薬学研究科助手

近年途上国の一部で、ヒ素による地下水汚染とそれによる健康障害が問題となっている。しかし、ヒ素による細胞毒性発現機構は不明な点が多い。そこで、我々は遺伝学的解析が容易な出芽酵母を用いて、欠損により酵母細胞の亜ヒ酸感受性に影響を及ぼす遺伝子を検索した。出芽酵母は約 6000 の遺伝子を持つが、そのうち欠損可能な約 5000 の遺伝子をそれぞれ欠損させた酵母(約 5000 株)の中から、亜ヒ酸耐性株および感受性株をそれぞれ単離した。その結果、欠損により亜ヒ酸感受性に影響を及ぼす因子として、細胞骨格の形成や機能調節に関与する因子群、蛋白質の細胞内輸送に関与する因子群および蛋白質合成に関与する因子群がそれぞれ比較的多数同定された。細胞骨格に関与するものとしては、ストレスに応答した細胞骨格形成蛋白質の重合調節に関与する Bck1,Rom2,Slt2 や、チュブリンのシャペロンとして機能する Gim 複合体構成因子 Pac10,Gim4,Gim5 が得られ、これらの因子を欠損した酵母はいずれも亜ヒ酸に対して高い感受性を示した。酵母では熱ショックや細胞壁分解処理などのストレスによりアクチンが細胞中に斑点状に点在するようになることが知られている。今回得られた因子中に細胞骨格に関連する因子が多数得られたことから、酵母を亜ヒ酸処理した際のアクチンの挙動を観察したところ、アクチンの斑点状の点在が同様に観察された。以上の結果から、ヒ素毒性に対する防御機構としてアクチンの重合など細胞骨格の機能・制御が重要な役割を果たしている可能性が考えられる。

A. 研究目的

ヒ素(As)は、原子番号 33 の元素であり半金属に分類される。環境中には亜ヒ酸など As(III)やヒ酸など As(V)の形で存在し、半導体の材料、白血病の治療薬、顔料、農薬など、その用途は様々である。また、ヒ素は、微量ではあるが、日々の生活において、私たちが口にしているヒジキなどの食品中にも含まれている。

一方、ヒ素は、上述のように多様な有用性を持つものの、古くは毒薬として使用されたこともあり、金属中で最初にヒトの発癌物質として同定された物質でもある。さらに、近年、環境汚染という点では、南アジアなどの発展途上国の一部において、井戸水の過剰使用により地中のヒ素が滲み出し、大規模な地下水のヒ素汚染が問題となっている。その結果、汚染された井戸水の利用によるヒ素中毒が発生し、ヒ素による中毒に苦しむ人は約 700 万人とも言われている。また、日本においても数年前に和歌山でカレー毒物混入事件が発生し、ヒ素の毒性が社会的にクローズアップされたことは記憶に新しい。

亜ヒ酸やヒ酸などの無機ヒ素は、人体に入ると、通常は消化器から吸収され、モノ・ジ・トリメチルの有機ヒ素の形で尿中に排泄される。また、大量摂取により、急性毒性としては、消化

器障害、腎臓障害、末梢血管の拡張などを引き起こすことや、慢性毒性としては、皮膚障害、知覚障害、皮膚癌、肺癌、肝癌などを引き起こすことが知られている。

また、細胞レベルにおけるヒ素の毒性としては、活性酸素種を産生すること、様々な細胞で MAP kinase cascade を含むシグナル伝達系を活性化すること、細胞の分化異常やアポトーシスなどを引き起こすことが知られている(Maeda H. et al.2001)。しかし、細胞内におけるヒ素の毒性発現機構およびヒ素に対する防御機構は不明な点が多い。

そこで、本研究では、細胞内におけるヒ素の毒性発現機構およびヒ素に対する生体防御機構を解明することを目的として、ヒ素化合物の中でも毒性の強い III 価の無機ヒ素である亜ヒ酸(NaAsO_2)を用いて研究を行った。まず、全ゲノムの塩基配列が解明されており、遺伝学的解析が比較的容易な出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)を用いて、亜ヒ酸感受性に影響を与える遺伝子群の検索を行った。その結果、欠損により酵母に亜ヒ酸耐性・高感受性を与える遺伝子が多数得られたが、なかでも、細胞骨格の機能や制御に関与する遺伝子が耐性・高感受性を含めて比較的多数得られた。そこで、これら細胞骨格の機能

や制御に関与する因子に焦点を絞り、細胞骨格の機能と亜ヒ酸毒性発現機構の関与について検討を行った。

B. 研究方法

1. 一次スクリーンリグに用いる亜ヒ酸濃度の条件検討

酵母 BY4742 野生株と、以前当研究室において同定された亜ヒ酸に対して強い感受性を示す *hog1Δ*(大谷 2003)と強い耐性を示す *fps1Δ*を、96 well plate 中で YPAD 培地中で confluent になるまで培養した。この培養液を YPAD 培地で 160 倍希釈した培養液 180 μ l と、亜ヒ酸(final 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5 mM) 20 μ l を加え、96 well plate 中で 30℃で培養した。

24 時間後に *fps1Δ*が成育し、*hog1Δ* と野生株が成育しない、また、48 時間後で *hog1Δ*が成育しない亜ヒ酸濃度を一次スクリーニングで用いることとした。

2. 欠損により亜ヒ酸感受性に影響を与える遺伝子の一次スクリーニング

スクリーニングで用いている遺伝子欠損酵母 Complete set of *Saccharomyces cerevisiae* gene deletion strains は、Euroscarf で作製されたものであり、遺伝子欠損部分がジェネティシン耐性遺伝子に置き

変わってはい。よって、この遺伝子欠損酵母はジェネティシンの含まれた培地でも成育が可能となる。

Complete set of *Saccharomyces cerevisiae* gene deletion strains 5 μ l を、96 well plate 中でジェネティシン(final 400 μ l/ml)を含んだ YPAD 培地で、30℃、48 時間、すなわち confluent になるまで培養した。亜ヒ酸(final 3 mM) 20 μ l と YPAD 培地 165 μ l を加えた 96 well plate に、約 12.5 倍希釈した培養液を 16 μ l 加え、それを 30℃で培養した。

24 時間後に成育が見られた欠損株、および、採り残しを考慮して 28 時間後に成育が見られた株を一次スクリーニングにおける亜ヒ酸耐性候補株(1)とした。一方、48 時間後でも成育がみられなかった欠損株を一次スクリーニングにおける亜ヒ酸高感受性候補株(1)とした。

3. 二次スクリーンリグに用いる亜ヒ酸濃度の条件検討

酵母 BY4742 野生株と、以前当研究室において同定された亜ヒ酸に対して強い感受性を示す *hog1Δ*(大谷 2003)と強い耐性を示す *fps1Δ*を、96 well plate 中で YPAD 培地で confluent になるまで培養した。この培養液を SD 培地で 600 倍希釈した培養液 180 μ l と、亜ヒ酸(final 0, 0.5, 1,

1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 5 mM) 20 μ l を加え、96 well plate 中で 30°C で培養した。48 時間後に酵母の増殖状態の指標となる 600 nm の吸光度を測定し、OD 値と酵母の亜ヒ酸感受性との相関を検討した。

4. 亜ヒ酸感受性に影響を与える遺伝子の二次スクリーニング

一次スクリーニングで得られた耐性・高感受性候補株(1)と、対照となる野生株を、96 well plate 中で YPAD 培地で confluent になるまで培養した。この培養液を SD 培地で 600 倍希釈した培養液 180 μ l と、亜ヒ酸(final 0, 2, 3 mM) 20 μ l を加え、96 well plate 中で 30°C で培養した。

48 時間後に酵母の増殖状態の指標となる 600 nm の吸光度を測定し、亜ヒ酸 3 mM 存在下において、野生株よりも OD 値が 0.4 高い株を亜ヒ酸耐性候補株(2)とした。ただし、亜ヒ酸 0 mM 存在下において、48 時間後に増殖状態の指標となる OD 値が野生株より 0.4 高い株は成育が速い株として除いた。

一方、48 時間後に酵母の増殖状態の指標となる OD 値を測定し、亜ヒ酸 2 mM 存在下において、野生株よりも OD 値が 0.5 低い株を亜ヒ酸高感受性候補株(2)とした。ただし、亜ヒ酸 0 mM 存在下において、24 時間後に増

殖状態の指標となる OD 値が野生株より 0.4 低い株は成育が遅い株として除いた。

5. 二次スクリーニングで亜ヒ酸耐性・高感受性候補株として選択された欠損酵母の亜ヒ酸に対する感受性

候補として同定した欠損株を、新たにグリセロールストックからジェネティシン入り YPAD 寒天培地上に広げ、欠損酵母のシングルコロニーを得た。

その後、SD 培地 1 ml に植菌し、30°C で一晚培養した後、この培養液を SD 培地で 1×10^5 cells/180 μ l になるように希釈した。96 well plate に亜ヒ酸(final 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5 mM)を 20 μ l/well ずつ添加した後に、希釈培養液を 180 μ l/well ずつ加え、30°C で 2 日間培養した後の酵母の増殖を 600 nm の吸光度をもとに判定した。なお、BY4742 野生株を実験の対照とした。

(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. 欠損により酵母の亜ヒ酸感受性に影響を与える遺伝子の検索

欠損により酵母の亜ヒ酸感受性に影響を与える遺伝子の一次スクリーニングでは、亜ヒ酸耐性候補株(1)が約 260 株、高感受性候補株(1)が約 740 株得られた。

一次スクリーニングで得られた遺伝子欠損株について OD 値を指標とする二次スクリーニングを行ったところ、亜ヒ酸耐性候補株(2)が約 60 株、高感受性候補株(2)が約 250 株得られた。

これら二次スクリーニングにより選別された遺伝子欠損株について、耐性試験を行った結果、欠損により酵母の亜ヒ酸感受性に影響を与える因子は計 142 種得られた。内訳は、亜ヒ酸耐性株が 59 株、高感受性株が 83 株であった。そのうち、約 9 割の遺伝子が、新規に欠損により酵母の亜ヒ酸感受性に影響を与えることが明らかとなった。

欠損により酵母の亜ヒ酸感受性に影響を与える遺伝子として、ユビキチン化に関与するもの、脂質合成に関与するもの、リボソーム蛋白をコードするもの、細胞内輸送に関与するもの、細胞骨格の機能や制御に関与するものなどが得られた。なかでも、亜ヒ酸耐性・高感受性を含め、細胞骨格の機能や制御に関与するものが比較的多数得られた。

細胞骨格の機能や制御に関与する

遺伝子としては、アクチンやチューブリンなど細胞骨格を構成する蛋白質の折畳みに関与する Gim 複合体を構成する因子、アクチン重合を促進する Arp2/3 複合体の構成因子、ヒートショックなど外界からの刺激に応答して細胞骨格の重合を制御するシグナル伝達経路中の因子、出芽位置の決定に関与する因子などが得られた。

なお、出芽部位の決定に関与する因子は、細胞骨格の機能や制御に関与する因子に含めたが、その理由として、細胞骨格は細胞の極性を形成しているが、そういった細胞の極性は出芽に関与しており、実際に遺伝子欠損により出芽部位に変異がみられる因子の中には細胞骨格の機能や制御に関与するものが含まれている(Ni L. et al.2001)ことから、細胞骨格と出芽とは密接な関係があると考えたためである。

各遺伝子欠損株の耐性試験の結果とその遺伝子がコードする蛋白質の説明は、耐性(Fig. 2-1~2-10, Table. 1-1~1-5)、高感受性(Fig. 3-1~3-14, Table. 2-1~2-9)の順に次ページから示す。

2. 細胞骨格制御に関与する因子群の遺伝子欠損酵母における亜ヒ酸感受性への影響

欠損により酵母の亜ヒ酸感受性に

影響を与える遺伝子群の検索により、亜ヒ酸耐性・高感受性を含め、細胞骨格の機能や制御に関与する因子が比較的多数得られた。

そこで、細胞骨格の機能や制御に関与する因子のうち、スクリーニングで得られなかった因子について、遺伝子欠損酵母を用いて亜ヒ酸感受性を検討した。特に、ヒートショックなど外界からの刺激に応答して細胞骨格の重合を制御するシグナル伝達経路中の因子、アクチンやチューブリンなど細胞骨格を構成する蛋白質の折畳みに関与する Gim 複合体を構成する因子、アクチンの重合を促進する Arp2/3 複合体の制御に関与する因子について、亜ヒ酸耐性試験を行い、亜ヒ酸感受性への寄与を解析した。

アクチンやチューブリンなど細胞骨格を構成する蛋白質の折畳みに関与する Gim 複合体の 6 つの構成因子 *YKE2*, *PAC10*, *GIM3*, *GIM4*, *GIM5*, *PFD1* のうち、スクリーニングの結果、4 つの因子 *PAC10*, *GIM4*, *GIM5*, *PFD1* の遺伝子欠損株が亜ヒ酸高感受性を示した。残る 2 つの因子 *YKE2*, *GIM3* はともに欠損により致死とはならないが、用いた遺伝子欠損株ライブラリーに存在するのは *YKE2* 欠損株のみであった。そこで *YKE2* について、亜ヒ酸感受性を調べたところ、他の構成因子と同様に、欠損により亜ヒ酸高

感受性を示した。Gim 複合体中の因子の欠損株について、耐性試験の結果を Fig. 4 に示す。

アクチン単体を重合し、枝分かれしたアクチン線維の生成を促進する Arp2/3 複合体 (Machesky LM. Et al.1999) に関しては、スクリーニングの結果、構成因子 *ARP2*, *ARP3*, *ARC35*, *ARC15*, *ARC18*, *ARC19*, *ARC40* のうち唯一欠損可能な因子である *ARC18* の遺伝子欠損株で亜ヒ酸高感受性を示した。Arp2/3 複合体を構成する因子について、欠損による亜ヒ酸感受性への影響を検討することは不可能であるので、この Arp2/3 複合体を活性化する因子として、*LAS17* (*S. cerevisiae* homolog of the human Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP)) (Kawai S. et al.2004)、*ABP1*, *LAS17* との相互作用が知られている *VRP1* (Kawai S. et al.2004)、互いに機能が重複している *MYO3*, *MYO5* (Kawai S. et al.2004) に着目し、さらに、*LAS17* の欠損により細胞外の物質を細胞内にとり込むエンドサイトーシスの機能が抑制されることから (Naqvi SN. Et al.1998)、エンドサイトーシスに関与する因子として *PAN1*, *SLA1*, *END3*, *ARK1* に着目し、そのうち欠損可能な遺伝子について亜ヒ酸感受性を検討した (Fig. 5-1)。また、アクチン重合を阻

害する因子 *CAP*, *CAP2* (Li R. et al.1995)についても検討を行った。その結果、*ABP1*, *MYO3*, *MYO5*, *ARK1*, *CAP1*をそれぞれ欠損した酵母では野生株と同程度の亜ヒ酸感受性を示し、*END3*を欠損した株では亜ヒ酸高感受性を、*VRP1*, *SLA1*を欠損した株では増殖がやや遅く亜ヒ酸高感受性を示した。また、*CAP2*を欠損した酵母では亜ヒ酸耐性を示した。Arp2/3複合体を制御する因子の欠損株についての耐性試験の結果を、Fig. 5-1~3に示す。

ヒートショックなど外界からの刺激に応答して細胞骨格の重合を制御するシグナル伝達経路中の因子については、欠損により致死となる *PKC1*, *RHO1*、機能が互いに重複した *MKK1*, *MKK2*を除く *ROM2*, *BCK1*, *SLT2*, *BNI1*が欠損した酵母では、スクリーニングの結果、亜ヒ酸高感受性を示した。そこで、*ROM2*の上流で機能すると考えられているストレス感知センサー *SLG1* (Heinisch JJ. et al 1999)、*BCK1*の下流に存在しており互いに機能が重複している *MKK1*, *MKK2*、また、*Slt2*, *Bni1*とアクチン細胞骨格において複合体を構成している *PEA2*, *SPA2* (Heinisch JJ. et al 1999)について、亜ヒ酸感受性を検討した(Fig. 6-1)。その結果、*MKK1*を除く全ての因子において、程度に差はあるものの、

欠損により酵母は亜ヒ酸高感受性を示した。シグナル伝達経路中の因子の遺伝子欠損株について、耐性試験の結果を Fig. 6-1~2 に示す。各遺伝子がコードする蛋白質の機能については、Table. 3-1~2 に示す。

アクチンやチューブリンなど細胞骨格を構成する蛋白質の折畳みに関与する Gim 複合体の構成因子 6 つ (*YKE2*, *PAC10*, *GIM3*, *GIM4*, *GIM5*, *PFD1*)のうち、遺伝子欠損株が作製されている *YKE2*, *PAC10*, *GIM4*, *GIM5*, *PFD1*の5つの因子は、遺伝子欠損により酵母は亜ヒ酸高感受性を示した。以上の結果から、Gim 複合体の機能が亜ヒ酸感受性に影響を与えている可能性が考えられる。したがって、アクチンやチューブリンなどのコンフォメーション保持が、亜ヒ酸毒性に対する防御に必要であろうと推測される。Gim 複合体と協力して蛋白質の折畳みを行う TRi 複合体(Siegers K. et al.1999)については、構成因子の全てが欠損により致死となる。

アクチンの重合に関与する Arp2/3 複合体と関連があると考えられる因子のうち、エンドサイトーシスに関与する *SLA1*, *END3*を欠損した株では、*sla1* Δ では増殖がやや遅いために高感受性になった可能性が考えられるが、亜ヒ酸高感受性を示した。エンドサイトーシスは細胞表面の形を変化

させて物質を取り込むために、アクチンの重合が重要な役割を果たしている。Arp2/3 複合体を活性化する因子の一つである *VRP1* を欠損した株では、亜ヒ酸高感受性を示したが、*sla1* Δ と同様に、増殖がやや遅いために高感受性になった可能性も否定できない。*myo3* Δ と *myo5* Δ では亜ヒ酸高感受性を示さず、野生株と同程度の亜ヒ酸感受性を示したのは、*MYO3* と *MYO5* は機能が重複しているため、一方の欠損ではもう一方が機能を補う可能性があると考えられる。したがって、二重欠損酵母を作製して亜ヒ酸感受性を検討する必要があると思われる。また、アクチンの重合を阻害する *CAP2* を欠損した酵母では亜ヒ酸耐性を示した。アクチン重合を促進する Arp2/3 複合体の構成因子 *ARC18* が欠損することにより亜ヒ酸高感受性を示し、アクチンの重合を阻害する *CAP2* を欠損した酵母では反対に亜ヒ酸耐性を示したことを考慮すると、アクチンの重合が起こることが亜ヒ酸に対して防御的に機能する可能性が考えられる。

ヒートショックなど外界からの刺激に応答して細胞骨格の重合を制御するシグナル伝達経路中の因子については、ストレス感知センサーの *SLG1*、*MKK1* と機能が重複している *MKK2*、*Slt2*、*Bni1* とアクチン細胞骨

格において複合体を構成している *PEA2*、*SPA2* は、感受性の程度に差はあるものの、欠損により酵母は亜ヒ酸高感受性を示した。*mkk1* Δ で亜ヒ酸高感受性を示さなかったのは、*MKK1* と *MKK2* とで機能が重複しているためであると考えられる。本来ならば二重欠損酵母を作製して亜ヒ酸感受性を検討する必要があると思われる。

以上の結果から、第一章で述べた通り、細胞骨格の機能や制御が亜ヒ酸に対する防御に重要な役割を果たしていると考えられる。

細胞骨格の重合を制御するシグナル伝達経路はヒートショックなど外界からの刺激に応答して細胞骨格の重合を制御することが知られているが(Delley PA. et al.1999)、経路中に欠損により致死となる因子が比較的少なく、MAP kinase cascade が含まれるため、ある程度解析が進んでいる。そこで、次章からは、この細胞骨格の重合を制御するシグナル伝達経路中の因子について解析した結果を示す。

3. 細胞骨格制御に関与するシグナル伝達経路中の遺伝子の欠損株におけるシグナル伝達経路上流の因子の高発現による影響

細胞骨格の機能や制御に関与する因子が亜ヒ酸に対する防御に重要な