

役割を果たしている可能性が示された。そこで、その中でも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(Fig. 6-1)について、シグナル伝達の重要性を検討するために、遺伝子欠損酵母に主に上流の因子を高発現させて、亜ヒ酸感受性への影響を検討した。

BY4742 野生株に、*PKC1*, *MKK1* を高発現させたが、空ベクターを導入した際と亜ヒ酸感受性はほとんど変化がなかった。一方、BY4742 野生株に *SLT2* を高発現させると、若干だが野生株よりも亜ヒ酸耐性を示した(Fig. 7-1)。

野生株に高発現させた際、亜ヒ酸感受性に変化がみられた *SLT2* 高発現プラスミドと、野生株に高発現させると亜ヒ酸耐性を示すことが知られている *pRS425-SLG1*(大谷 2003)をそれぞれ、シグナル伝達経路において下流に位置する因子の欠損株に高発現させた。また、全く別の経路で機能すると考えられている Gim 複合体構成因子である *gim5*Δにも、*SLT2*, *SLG1* をそれぞれ高発現させた。その結果、*bni1* Δ、*gim5* Δに *SLT2* を高発現させると、空ベクターを導入した際と亜ヒ酸感受性に変化がなかった(Fig. 7-2)。 *SLG1* を *rom2* Δ、*slt2* Δ、*bni1* Δ、*gim5* Δに高発現させると、*gim5*

Δ以外は空ベクターを導入したものと比べ、亜ヒ酸耐性を示した(Fig. 7-2)。

また、*PKC1* は欠損のより致死となるが、*SLT2* 高発現により致死性が回復することが知られている。そこで、亜ヒ酸感受性について *PKC1* 欠損の効果を調べるために、*SLT2/pkc1* Δを作製し、耐性試験を行った。その結果 *SLT2/pkc1* Δは、やや生育が遅いものの、*SLT2/BY4742* と同程度の亜ヒ酸感受性を示した (Fig. 7-3)。

野生株に *SLT2* を高発現させると、若干だが野生株よりも亜ヒ酸耐性を示したことから、過剰な *Slt2* が存在した場合に *Slt2* が野生株よりも亜ヒ酸に対して防御的に働くと考えられる。しかし、*PKC1*, *MKK1* を野生株に高発現させた際は、空ベクターを導入した際とほとんど変化がなく、既に十分な量の因子が野生株内に存在していると考えられる。*MKK1* を高発現させた場合は、空ベクターを導入した際よりも亜ヒ酸高感受性を示すこともあった。*MKK1* は *MKK2* と機能が重複していると言われていたが、*MKK1* を高発現させると、機能が重複しているため *MKK2* の翻訳や機能が抑制されて *MKK2* が欠損した状態と類似の状態になる可能性や、機能は全く同じというわけではなく *MKK1* と *MKK2* の機能のバランスが重要であ

る可能性も考えられるが、高発現という特殊な状態で起きている現象なので、推測の域を脱しない。細胞骨格重合の制御を行うシグナル伝達経路の活性化と亜ヒ酸に対する防御との関係を調べるためにも、ドミナントポジティブタイプの変異体を発現させて解析する必要があるだろう。

*bni1*Δ、*gim5*Δに *SLT2* を高発現させると、空ベクターを導入した際と亜ヒ酸感受性に変化が無かった。*bni1*Δに関しては、Bni1 と Slt2 は複合体を形成するが、Slt2 から Bni1 にリン酸化を介したシグナルが伝わるという報告は今までにない。しかし、今回の結果から、*SLT2* がキナーゼであることを考慮に入れると、*BNI1* は *SLT2* の制御下にある可能性が考えられる。

また、*SLG1* を *rom2*Δ、*slt2*Δ、*bni1*Δ、*gim5*Δに高発現させると、*gim5*Δ以外は空ベクターを導入したものと比べ、亜ヒ酸耐性を示した。*SLG1* を野生株に高発現させると亜ヒ酸耐性となること、*SLG1* を *bck1*Δに高発現させても亜ヒ酸感受性に影響がないことが、当研究室における研究で以前示されており(大谷 2003)、今回もその結果が確認されている (data not shown)。このことをふまえると、亜ヒ酸に対する防御という点では、*SLG1* は *ROM2* を介さず、他の GDP/GTP exchange protein などの

機構を介して、または、直接 *BCK1* に作用し、シグナルを伝達している可能性が考えられる。

細胞骨格重合の制御を行うシグナル伝達経路はまだ未知な点が多く、*PKC1* を活性化すると考えられている因子は、*SLG1* の他に、*MID1*、*WSC2~5* など多数あるとされている (Heinisch JJ. et al.1999)。したがって、亜ヒ酸に対する防御機構として、このシグナル伝達系の上流に存在する因子は、*SLG1* 以外にも存在する可能性が考えられる。さらに、*BCK1* からまだ発見されていないシグナル伝達経路の分岐があり、亜ヒ酸に対する防御に関しては、*SLG1* は *BCK1* → *MKK1/2* → *SLT2* の伝達経路を活性化しない可能性も考えられる。

さらに興味深いことに、*gim5*Δに *SLT2*、*SLG1* を高発現させると亜ヒ酸耐性を示した今回の結果は、全く違う経路で働くと考えられていた *GIM5* が、亜ヒ酸防御においては、*SLT2* や *SLG1* の制御下にある可能性が示されたことである。以上の知見は、*SLG1* や *SLT2* を含むシグナル伝達経路がストレスに応じたアクチンの重合のみならず、アクチンなどの細胞骨格を構成する蛋白質の折畳みにも関与していることを示唆する結果である。

また、欠損により致死となる因子 *PKC1* は細胞骨格重合の制御を行う

シグナル伝達経路において重要な因子であると考えられているため、*pkc1*  $\Delta$  は亜ヒ酸感受性を示すと予想したが、*SLT2/pkc1*  $\Delta$  では、*SLT2/BY4742* と同程度の亜ヒ酸感受性を示した。もしかすると *SLT2* 高発現は、*pkc1*  $\Delta$  の致死性を回復させるのみではなく、亜ヒ酸感受性をも回復させてしまうのかもしれない。したがって何らかの方法で、亜ヒ酸感受性に関する *PKC1* の関与を検討する必要があると考えられる。

#### 4. 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細胞内ヒ素量の測定

細胞内ヒ素量を、直接測定するのではなく *ARR3* の転写活性を指標に間接的に測定した。*ARR3* は、亜ヒ酸を細胞外へ排出するトランスポーターをコードしており (Wysocki R. et al.1997)、これは、亜ヒ酸処理に依存にして転写量が上昇することが知られている (Maciaszczyk E. et al.2004)。

亜ヒ酸処理による *ARR3* プロモーターの転写活性の上昇を数値化するために、今回の実験ではその値を亜ヒ酸処理による転写活性比として求めた。すなわち *ARR3* の転写活性比は、亜ヒ酸処理時の  $\beta$ -Galactosidase activity を亜ヒ酸未処理時の  $\beta$ -Galactosidase activity で割った比

である。

*ARR3* のプロモーター領域を pMEL  $\beta 2$  の LacZ 遺伝子につなげたプラスミド (pARR3proLacZ) を導入した酵母では、処理した亜ヒ酸濃度に依存して転写活性比が上昇した。一方、図には示していないが、*ARR3* のプロモーターを持たない空ベクターを導入した酵母については、処理した亜ヒ酸濃度によらず、転写活性比は一定であり、その値は小さいものであった。また、亜ヒ酸処理により細胞内ヒ素量が野生株に比べ顕著に増加することが示された (横溝 2005) *hog1*  $\Delta$ 、野生株に比べ低下することが示された (横溝 2005) *fps1*  $\Delta$  に、pARR3proLacZ をそれぞれ導入したところ、*hog1*  $\Delta$  では野生株よりも高い転写活性比を、*fps1*  $\Delta$  では野生株よりも低い転写活性比を、それぞれ示した。

そこでストレス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 *ROM2*, *BCK1*, *SLT2*, *BNI1* の遺伝子欠損株について、pARR3proLacZ を導入して転写活性比を求めたところ、野生株と同程度、または若干低い値を示した (Fig. 9)。

#### 5. 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亜ヒ酸処理によるアクチン分布の変化

亜ヒ酸処理が細胞骨格に対してどのような影響をもたらすのかを細胞レベルで検討することを目的とし、細胞骨格を形成する蛋白質の一つであるアクチンを染色して観察を行った。また、ストレスに応答して細胞骨格の重合の制御に関与するシグナル伝達経路中の因子の欠損株においても、亜ヒ酸処理によるアクチンの細胞内分布の変化を観察した。

Fig. 10, 11 に示す写真の、左側が微分干渉(DIC)による細胞の像、右側が Phalloidin-Alexa によりアクチンを染色した蛍光像であり、蛍光像中の白く見える部位がアクチンの凝集を示している。まず、ヒートショックによりアクチンが細胞全体に斑点状に点在するという報告があるため(Delley PA. et al.1999)、ポジティブコントロールとして、ヒートショックによるアクチンの分布の変化を観察した。Delley PA.らによるこの報告では、野生株(JK9-3da 株)ではアクチンの斑点状の点在が観察され、*rom2* Δ (AS138-1b 株)では斑点状の点在が観察されないという結果であった。しかしながら、BY4742 株を用いた本論文

の実験では、ヒートショックにより野生株、*rom2* Δ とともにアクチンの斑点状の点在が観察され、両者間には大きな差は観察されなかった。また、ヒートショックをかけていない酵母では、アクチンは、出芽中の細胞では出芽部位に局在することが観察された。この結果を、Fig. 10 に示す。

さらに、亜ヒ酸の効果について、BY4742 野生株、*rom2* Δ、*slt2* Δ、*bni1* Δを用いて、同様にアクチンの分布の変化を観察した。その結果、亜ヒ酸未処理の場合には、どの株も、アクチンは、出芽中の細胞では出芽部位に局在した。一方、3 mM 亜ヒ酸で3時間処理したところ、野生株、*rom2* Δ、*slt2* Δ、*bni1* Δ全てにおいて、細胞全体に斑点状の点在が観察された。しかし、野生株とこれらの欠損株間でアクチンの分布の変化に大きな差は見られなかった (Fig. 11)。

#### D. 研究発表

なし。

#### E. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

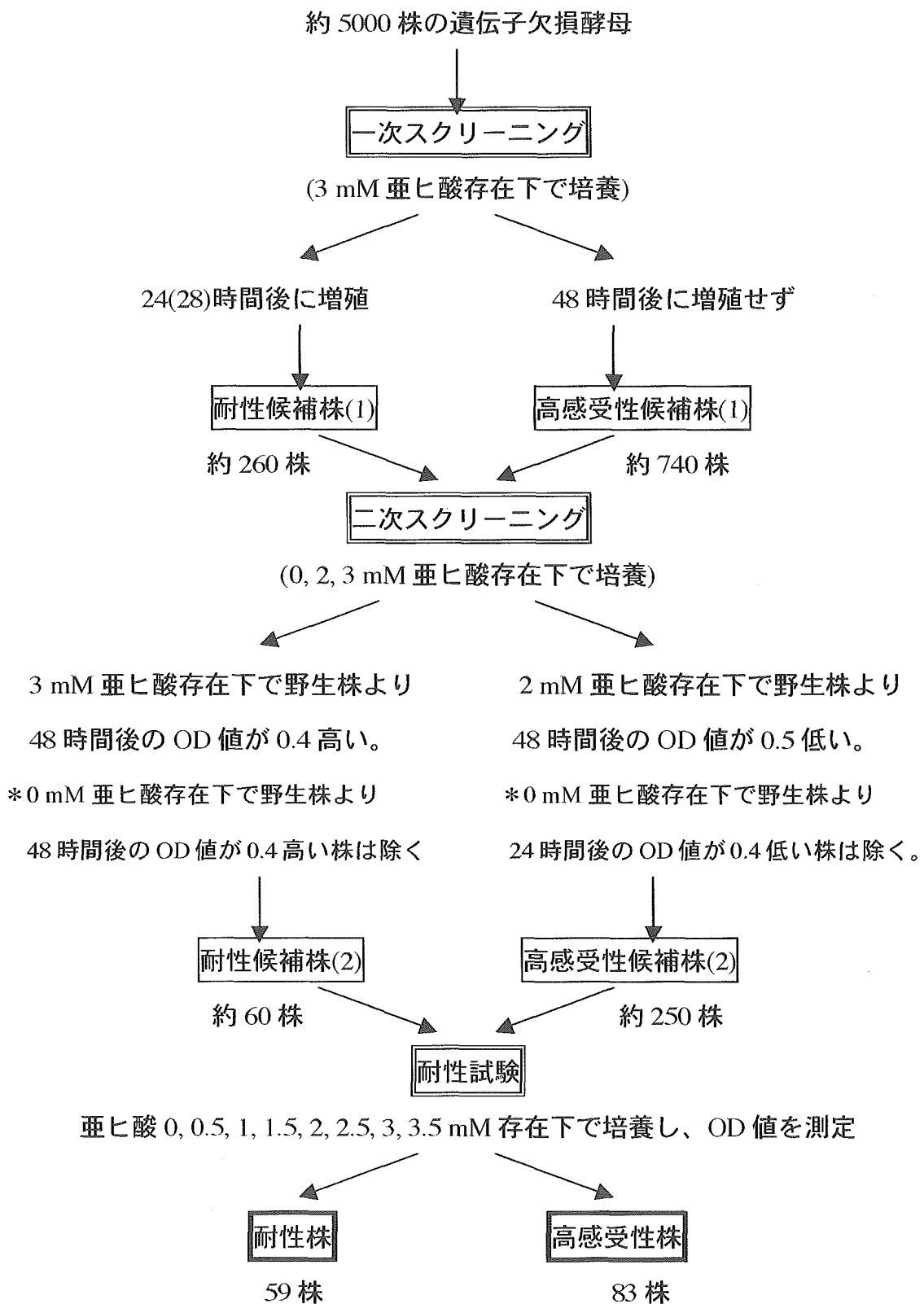


Fig. 1 遺伝子欠損酵母を用いた亜ヒ酸感受性に影響を与える  
遺伝子群のスクリーニングの流れ

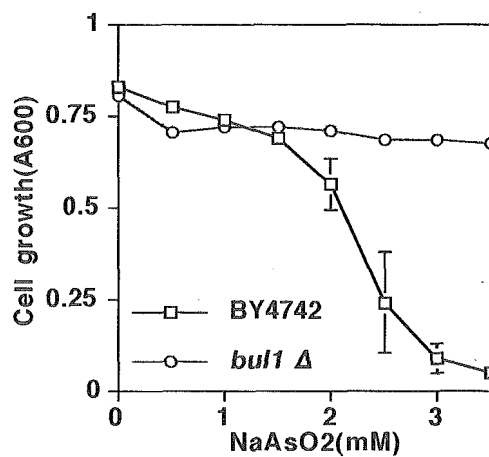
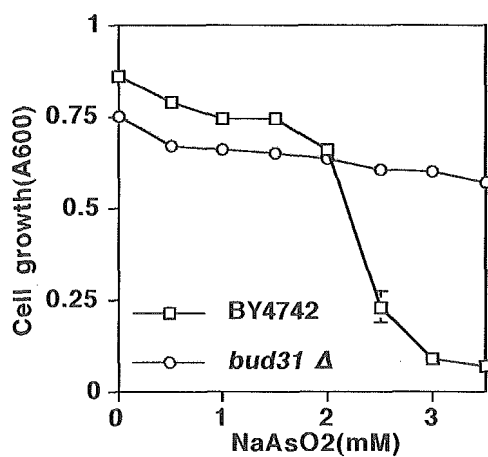
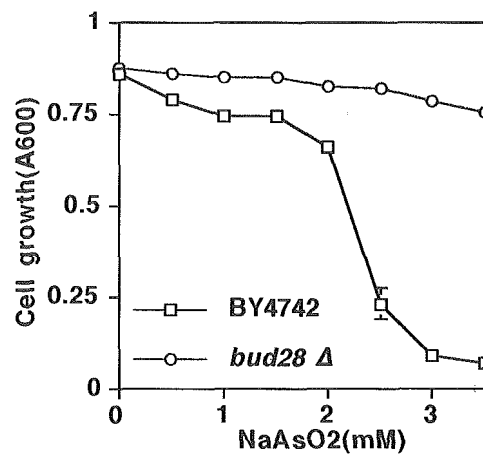
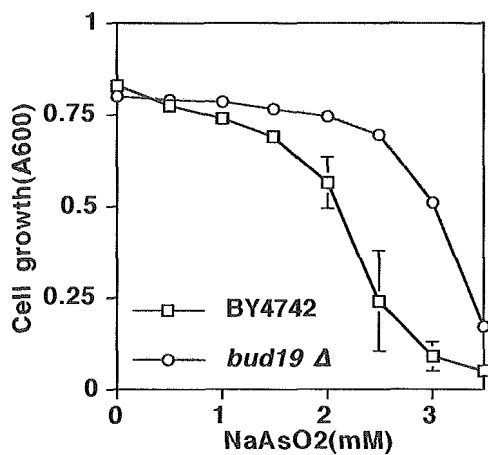
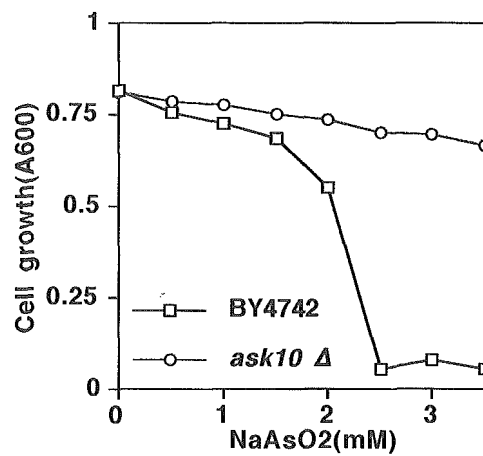
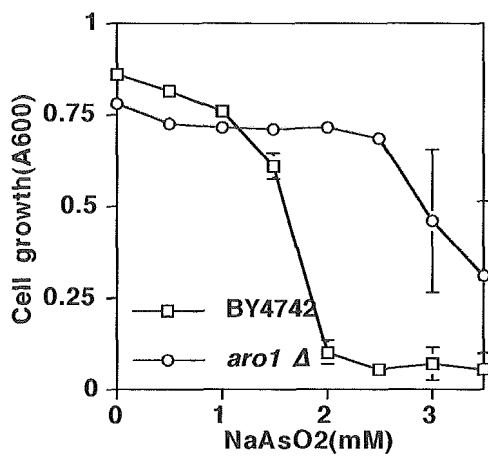


Fig. 2-1 欠損により酵母に亜ヒ酸耐性を与える遺伝子

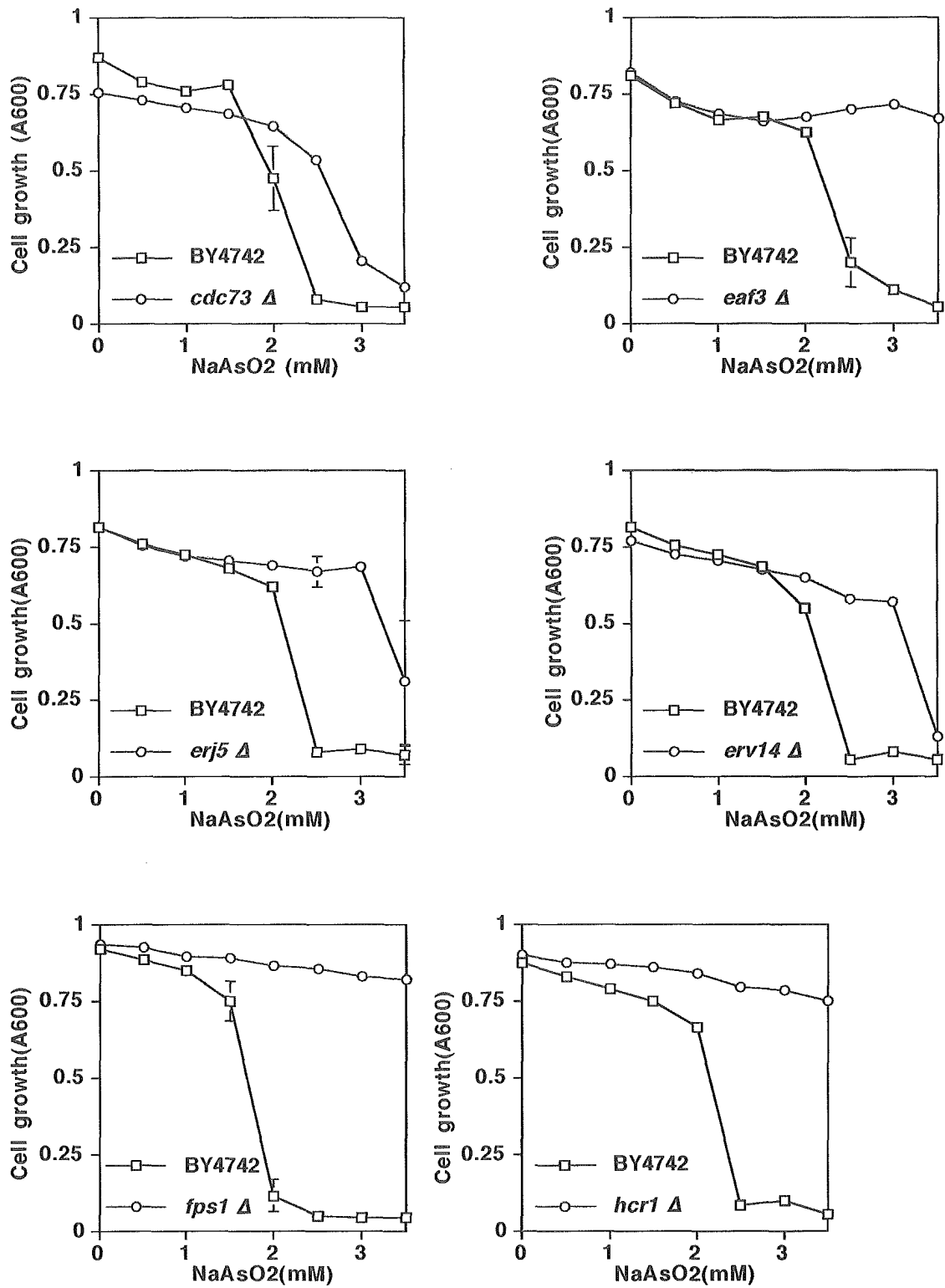


Fig. 2-2 欠損により酵母に亜ヒ酸耐性を与える遺伝子

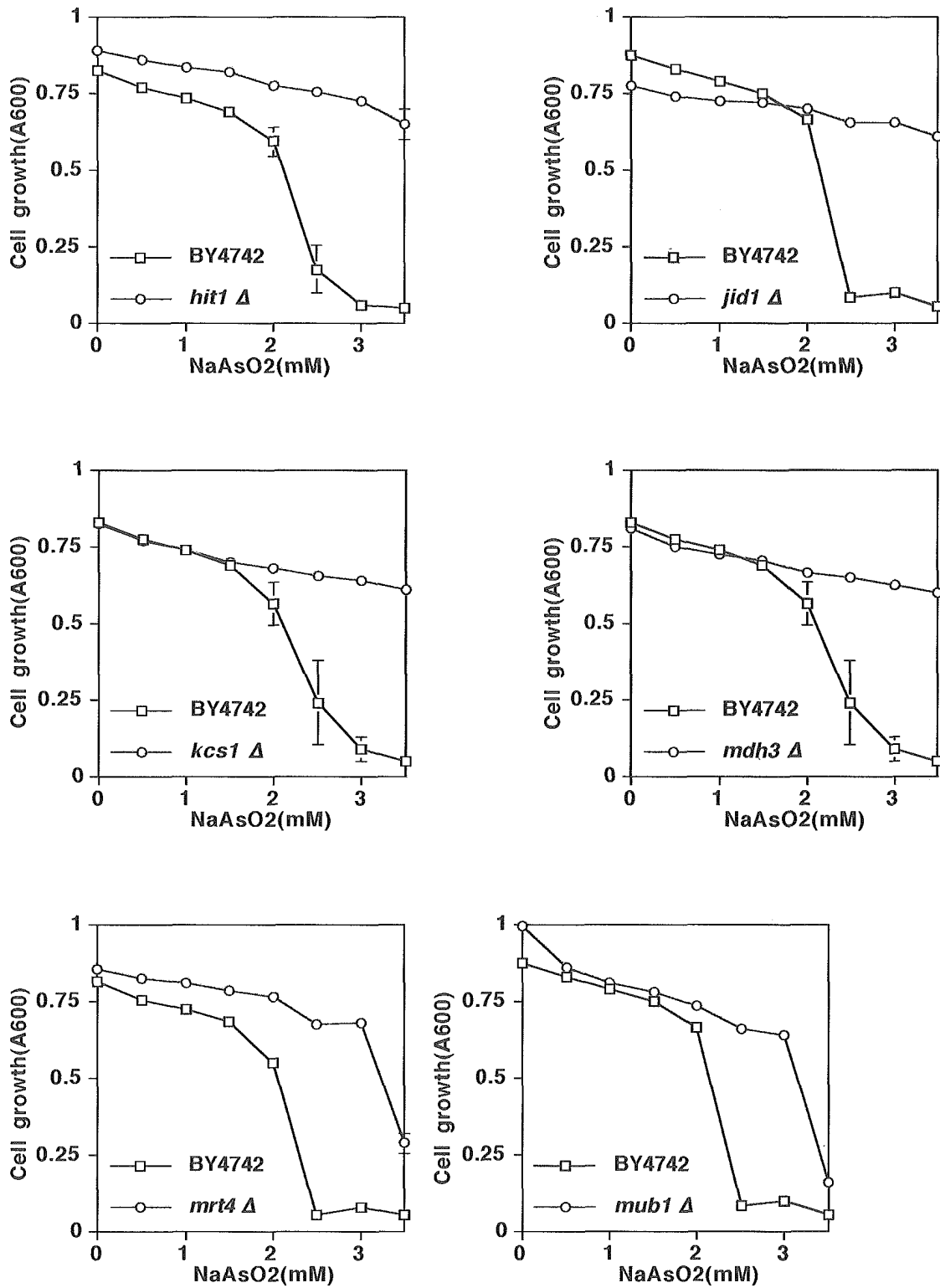


Fig. 2-3 欠損により酵母に亜ヒ酸耐性を与える遺伝子



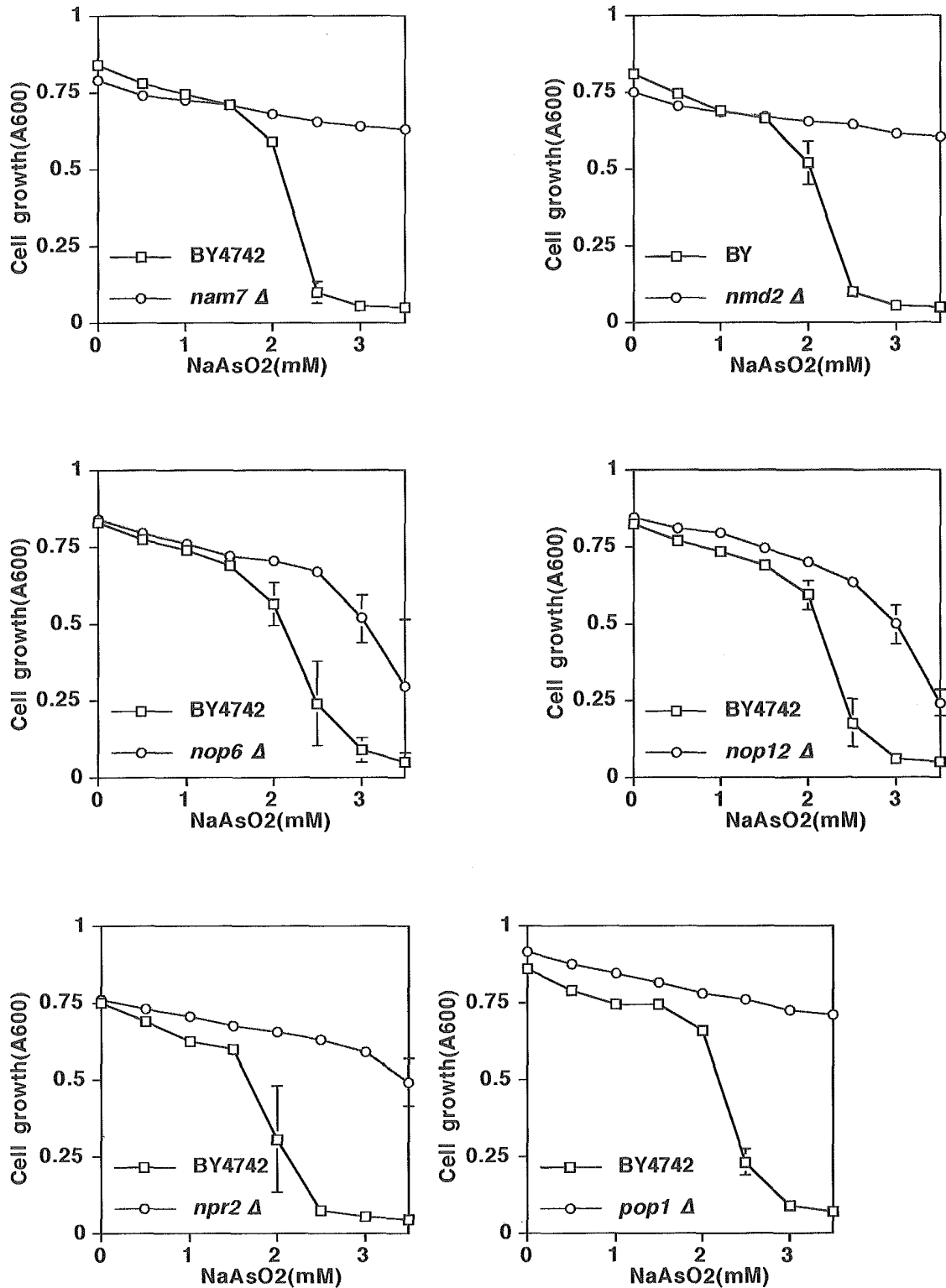


Fig. 2-4 欠損により酵母に亜ヒ酸耐性を与える遺伝子

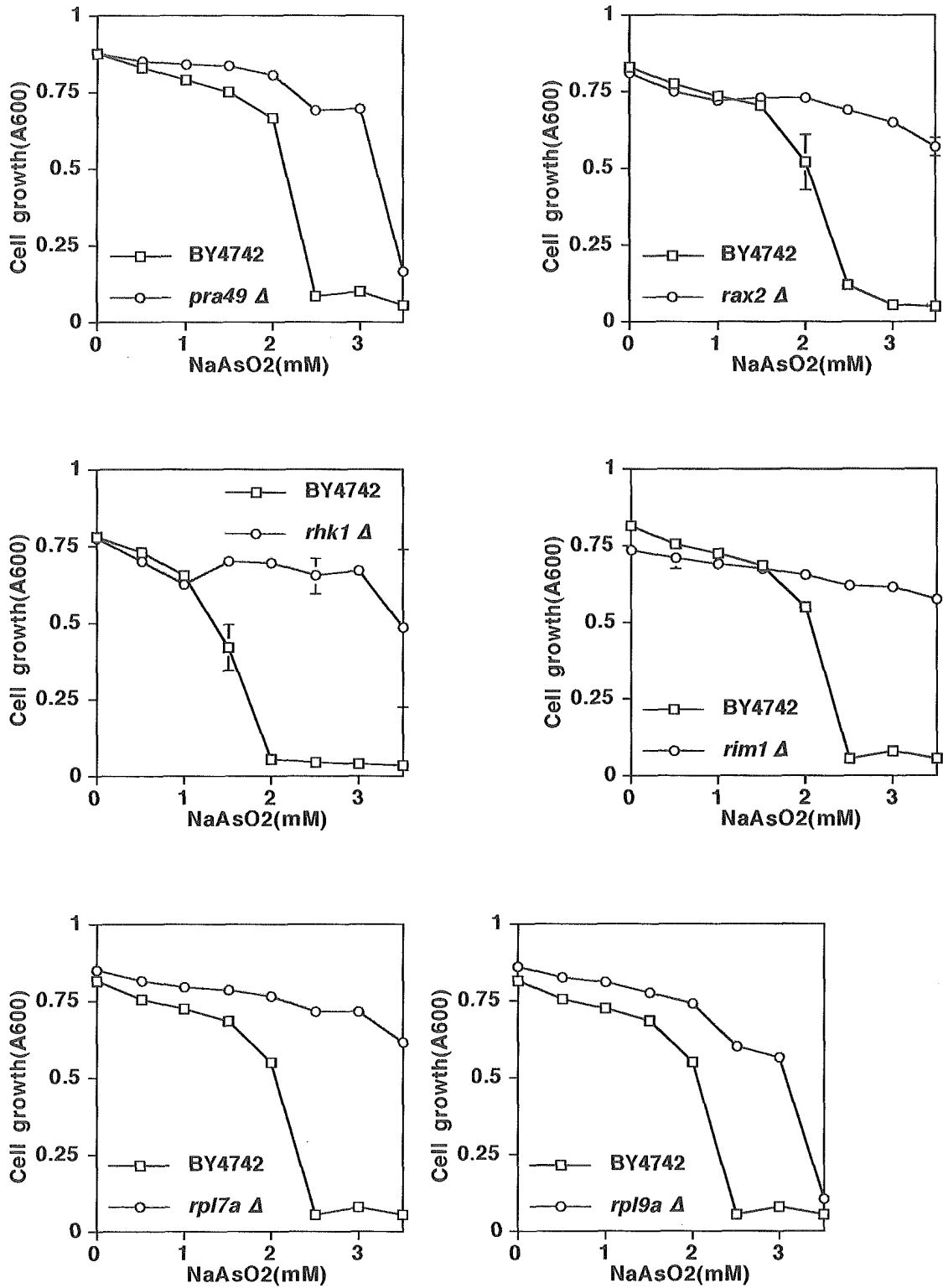


Fig. 2-5 欠損により酵母に亜ヒ酸耐性を与える遺伝子

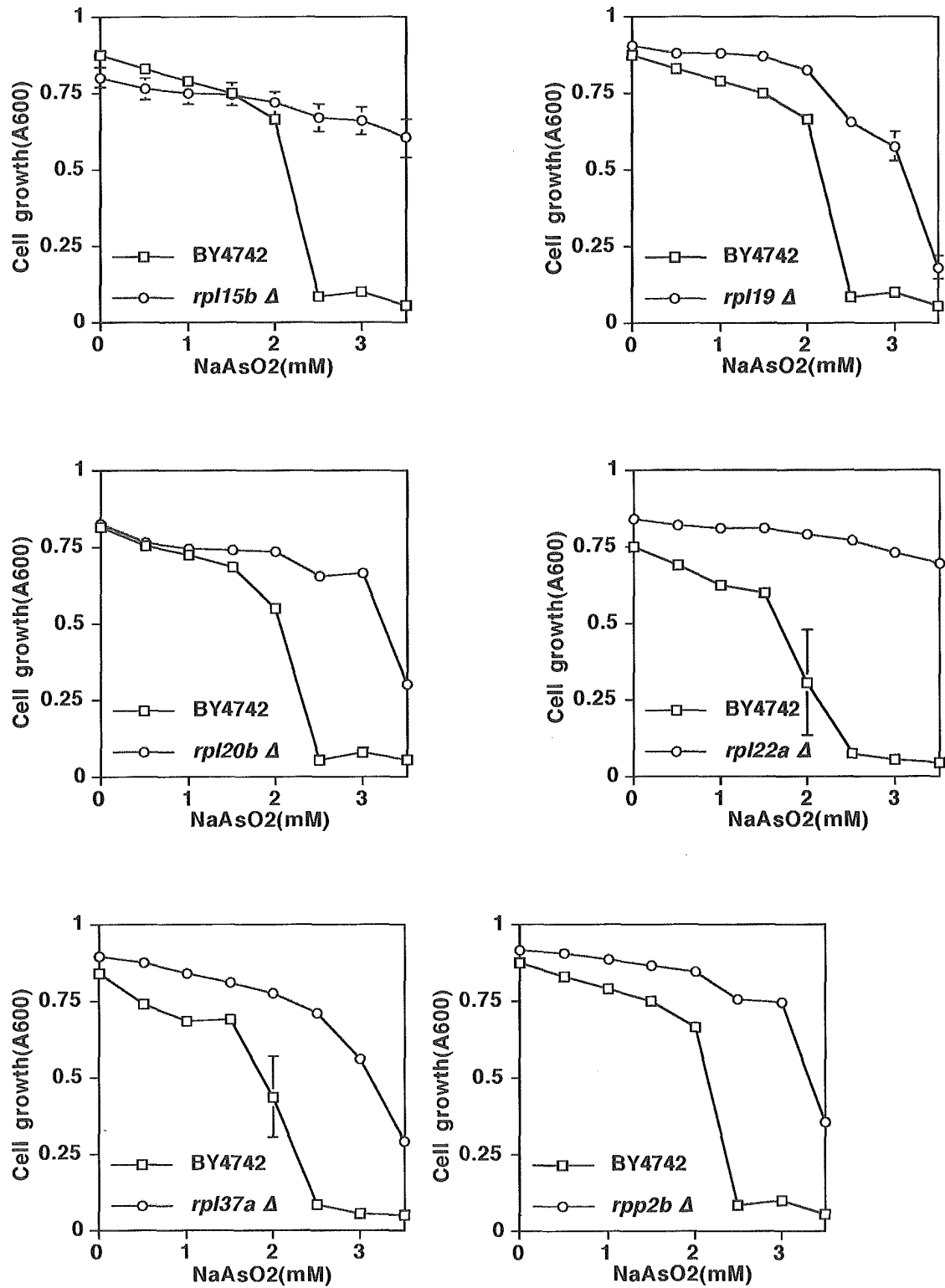


Fig. 2-6 欠損により酵母に亜ヒ酸耐性を与える遺伝子

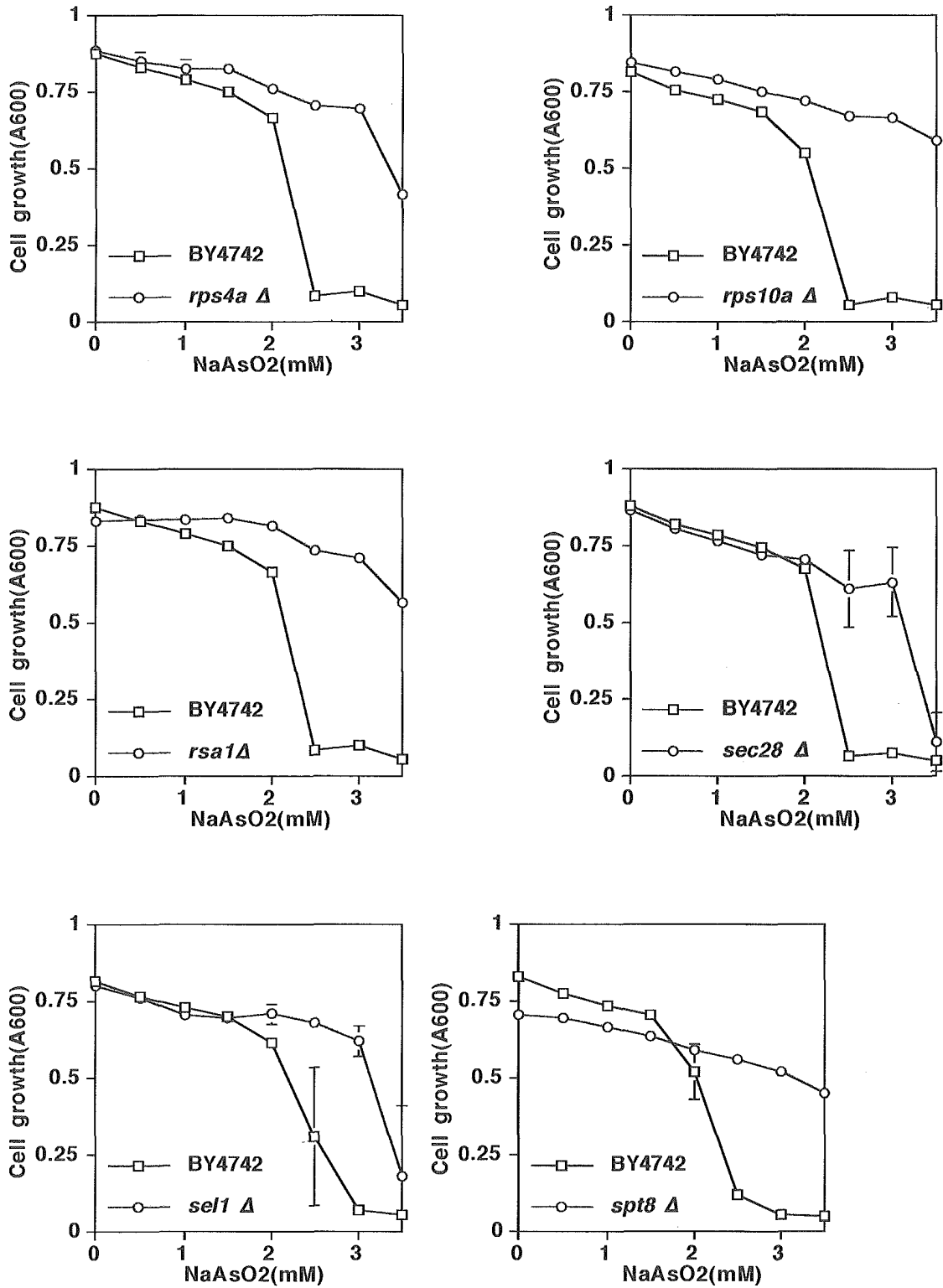


Fig. 2-7 欠損により酵母に亜ヒ酸耐性を与える遺伝子

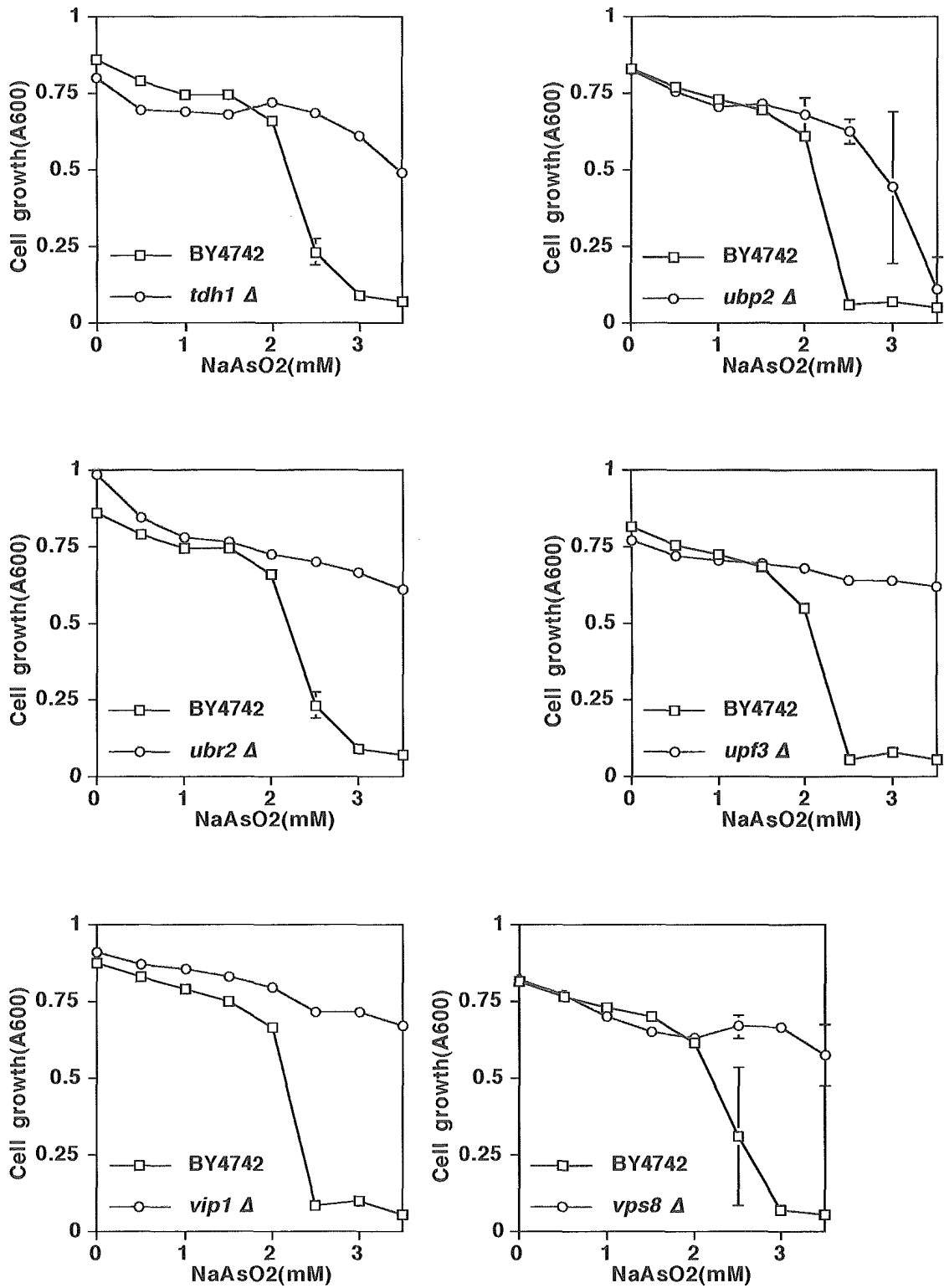


Fig. 2-8 欠損により酵母に亜ヒ酸耐性を与える遺伝子

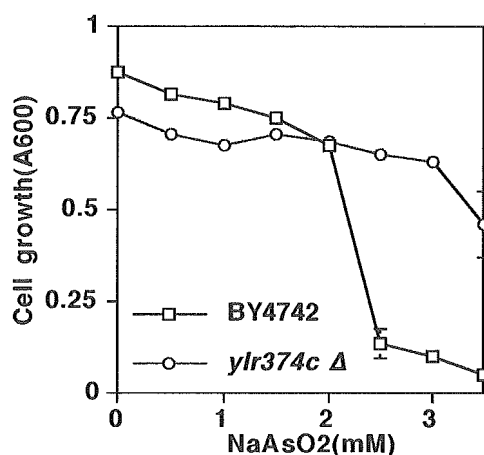
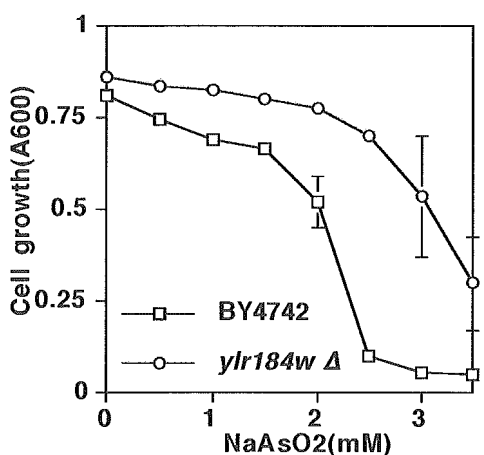
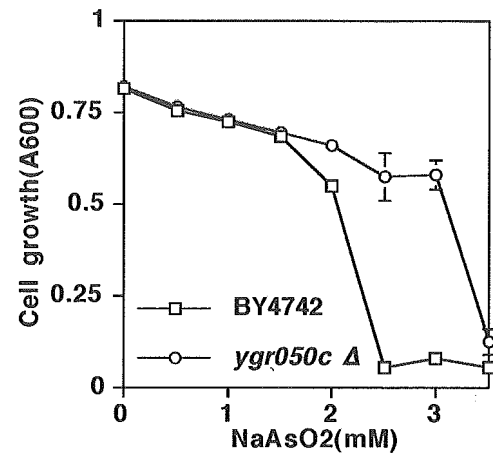
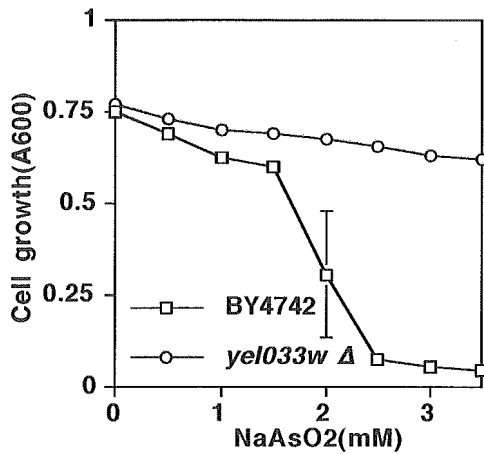
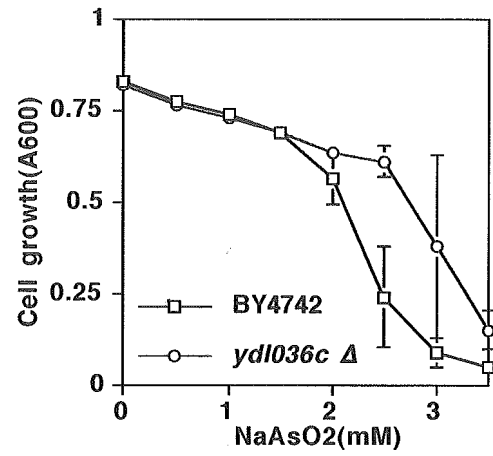
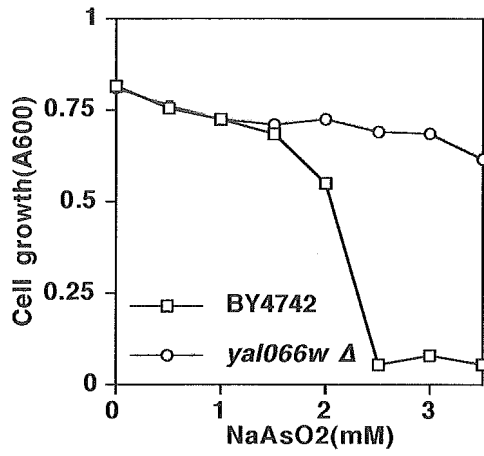


Fig. 2-9 欠損により酵母に亜ヒ酸耐性を与える遺伝子

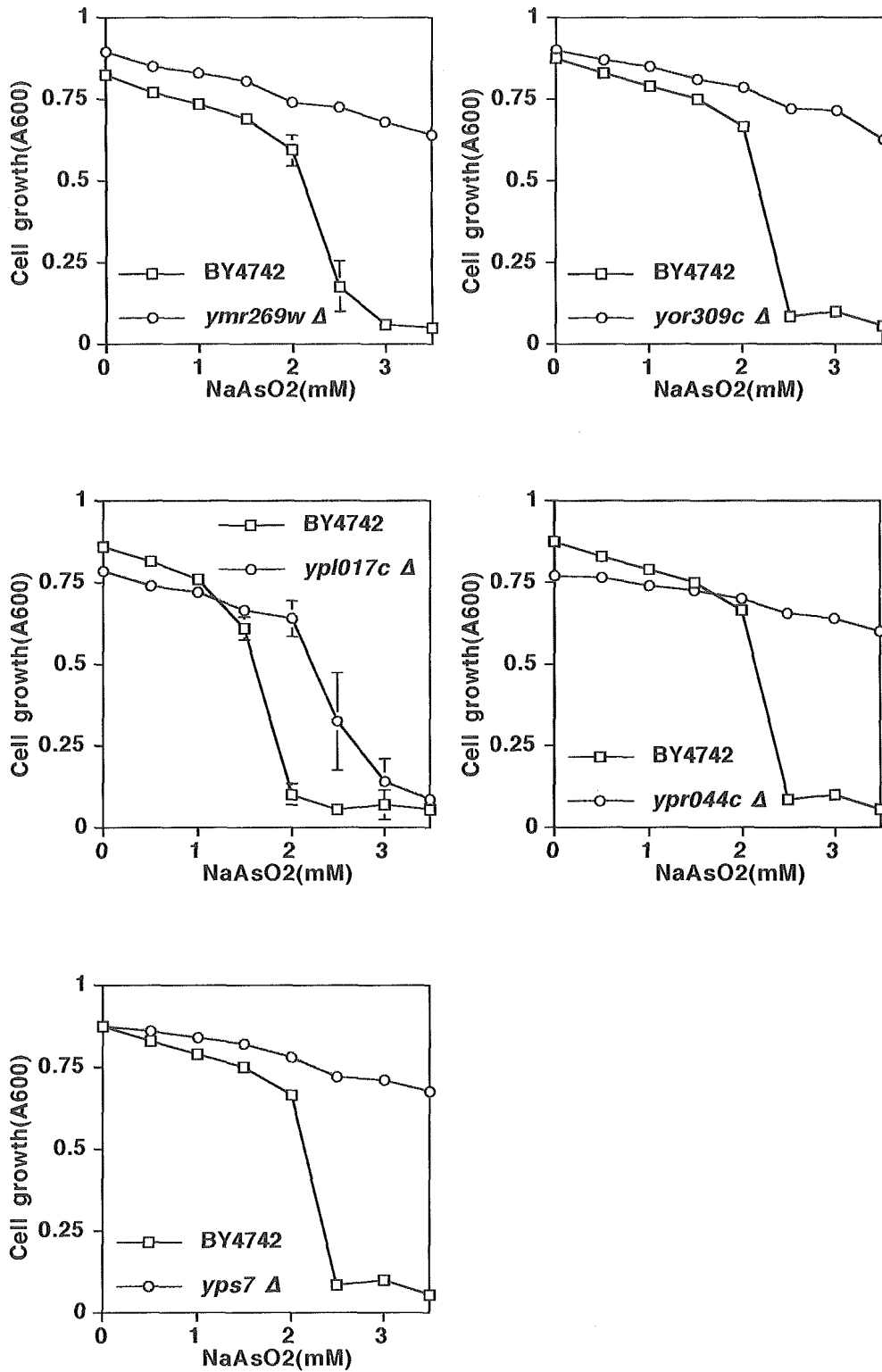


Fig. 2-10 欠損により酵母に亜ヒ酸耐性を与える遺伝子

Table. 1-1 欠損により酵母に亜硫酸耐性を与える遺伝子がコードする  
 蛋白の機能

遺伝子	機能
<i>ARO1</i>	Arom pentafunctional enzyme
<i>ASK10</i>	Potential transcription factor involved in Skn7p-mediated two-component regulatory system
<i>BUD19</i>	Protein that may be involved in bud site selection and bipolar budding pattern
<i>BUD28</i>	Protein that may be involved in bud site selection in diploid cells
<i>BUD31</i>	Protein that may be involved in polar bud site selection in diploids, has similarity to Xenopus G10, a developmentally-regulated protein that is thought to be involved in translation during oocyte maturation
<i>BUL1</i>	Protein involved in the ubiquitination pathway
<i>CDC73</i>	RNA polymerase II accessory protein, may be involved in transcription elongation
<i>EAF3</i>	Component of the NuA4 histone acetyltransferase complex
<i>ERJ5</i>	Protein containing a DnaJ domain, which are part of chaperone (protein folding) system that mediates interaction with heat shock proteins, has moderate similarity to uncharacterized <i>C. albicans</i> Ipf14630p
<i>ERV14</i>	Protein of ER-derived vesicles that is required for efficient degradation of soluble ER quality control substrates, has similarity to <i>Drosophila melanogaster</i> cni protein



Table. 1-2 欠損により酵母に亜ヒ酸耐性を与える遺伝子がコードする

## 蛋白の機能

遺伝子	機能
<i>FPS1</i>	Glycerol channel protein that is also involved in uptake of As <sup>3+</sup> and Sb <sup>3+</sup> , member of the major intrinsic protein (MIP) family of transmembrane channel proteins
<i>HIT1</i>	Protein required for growth at high temperature
<i>JID1</i>	Member of a DnaJ-like family of putative protein chaperones
<i>KCS1</i>	Inositol (1,2,3,4,5,6) hexaphosphate kinase, suppressor of temperature-sensitive growth and hyperrecombination in <i>pkc1-4</i> , involved in endocytosis
<i>MDH3</i>	Malate dehydrogenase, peroxisomal
<i>MRT4</i>	Protein involved in mRNA turnover
<i>MUB1</i>	Zinc finger protein, involved in the regulation of bud site selection
<i>NAM7</i>	Protein involved with Nmd2p and Upf3p in decay of mRNAs that contain premature nonsense codons
<i>NMD2</i>	Protein involved with Nam7p and Upf3p in decay of mRNA containing nonsense codons
<i>NOP12</i>	Protein important for the synthesis of 25S pre-rRNA
<i>NOP6</i>	Protein of the hydrophilin family, has an N-terminal RNA recognition (RRM) domain
<i>NPR2</i>	Nitrogen permease regulator
<i>POP1</i>	Protein component of both RNase P and RNase MRP, involved in both tRNA maturation (RNase P) and in 5.8S rRNA processing (RNase MRP)

Table. 1-3 欠損により酵母に亜硫酸耐性を与える遺伝子がコードする

## 蛋白の機能

遺伝子	機能
<i>RAX2</i>	Protein involved in bipolar budding
<i>RHK1</i>	Mannosyltransferase involved in N-glycosylation, <i>Hansenula mrakii</i> HM-1 killer toxin resistance protein
<i>RIM1</i>	Protein that binds single-stranded DNA, required for replication in mitochondria
<i>RPA49</i>	RNA polymerase I third largest subunit
<i>RPL15B</i>	Ribosomal protein L15 (yeast L13; YL10; rp15R; rat L15), nearly identical to Rpl15Ap
<i>RPL19B</i>	Ribosomal protein L19 (yeast L23; YL14; rp15L; rp33; rat L19), nearly identical to Rpl19Ap
<i>RPL20B</i>	Ribosomal protein L20, nearly identical to Rpl20Ap
<i>RPL22A</i>	Ribosomal protein L22, similar to Rpl22Bp
<i>RPL37A</i>	Ribosomal protein L37 (yeast L46; rat L37), nearly identical to Rpl37Bp
<i>RPL7A</i>	Ribosomal protein L7 (yeast L6; YL8A; rp11; <i>E. coli</i> L30; rat L7), nearly identical to Rpl7Bp
<i>RPL9A</i>	Ribosomal protein L9 (YL11; rp25; rp24; <i>E. coli</i> L6; rat L9), nearly identical to Rpl9Bp
<i>RPP2B</i>	Acidic ribosomal protein P2B (L45; YPA1; YL44C; YP2 beta; <i>E. coli</i> L12eIA; human and rat P2)
<i>RPS10A</i>	Ribosomal protein S10 (rat S10), nearly identical to Rps10Bp

Table. 1-4 欠損により酵母に亜硫酸耐性を与える遺伝子がコードする  
 蛋白の機能

遺伝子	機能
<i>RPS4A</i>	Ribosomal protein S4 (yeast S7; YS6; rp5; rat and human S4), identical to Rps4Bp
<i>RSA1</i>	Nucleoplasmic protein involved in assembly of 60S ribosomal subunits
<i>SEC28</i>	Coatomer (COPI) complex epsilon chain (epsilon-COP) of secretory pathway vesicles, required for retrograde transport from Golgi to endoplasmic reticulum
<i>SEL1</i>	Protein involved in secretion, may play a role in regulating membrane tethering and vesicle docking
<i>SPT8</i>	Component of the nucleosomal histone acetyltransferase complex (Spt-Ada-Gcn5-Acetyltransferase or SAGA) complex, member of TBP class of SPT proteins
<i>TDH1</i>	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 1, catalyzes the reversible oxidation and phosphorylation of D-glyceraldehyde-3-phosphate to 1,3-diphosphoglycerate in glycolysis
<i>UBP2</i>	Ubiquitin-specific protease (ubiquitin C-terminal hydrolase), cleaves at the C terminus of ubiquitin
<i>UBR2</i>	Member of the putative zinc finger in N-recognin family, has weak similarity to <i>S. pombe</i> Ubr1p, which is a putative component of ubiquitin protein ligase required for ubiquitin-proteasome dependent degradation of <i>S. pombe</i> Mei2p

Table. 1-5 欠損により酵母に亜ヒ酸耐性を与える遺伝子がコードする

## 蛋白の機能

遺伝子	機能
<i>UPF3</i>	Protein involved with Nam7p and Nmd2p in decay of mRNA containing nonsense codons
<i>VIP1</i>	Protein with possible methionine N(alpha)-acetyltransferase activity, involved in cortical actin function
<i>VPS8</i>	Protein involved in vacuolar sorting
<i>YAL066W</i>	Protein of unknown function
<i>YDL036C</i>	Protein with similarity to Rib2p
<i>YEL033W</i>	Protein required for invasive growth and pseudohyphal development
<i>YGR050C</i>	Protein of unknown function
<i>YLR184W</i>	Protein of unknown function
<i>YLR374C</i>	Protein of unknown function
<i>YMR269W</i>	Protein that may be involved in protein synthesis, rich in lysine and serine
<i>YOR309C</i>	Protein of unknown function
<i>YPL017C</i>	Protein containing a pyridine nucleotide-disulfide oxidoreductase domain, which bind NADH, and a pyridine nucleotide-disulfide oxidoreductase dimerization domain, has moderate similarity to dihydrolipoamide dehydrogenase ( <i>S. cerevisiae</i> Lpd1p)
<i>YPR044C</i>	Protein of unknown function
<i>YPS7</i>	Yapsin 7, GPI-anchored aspartyl protease