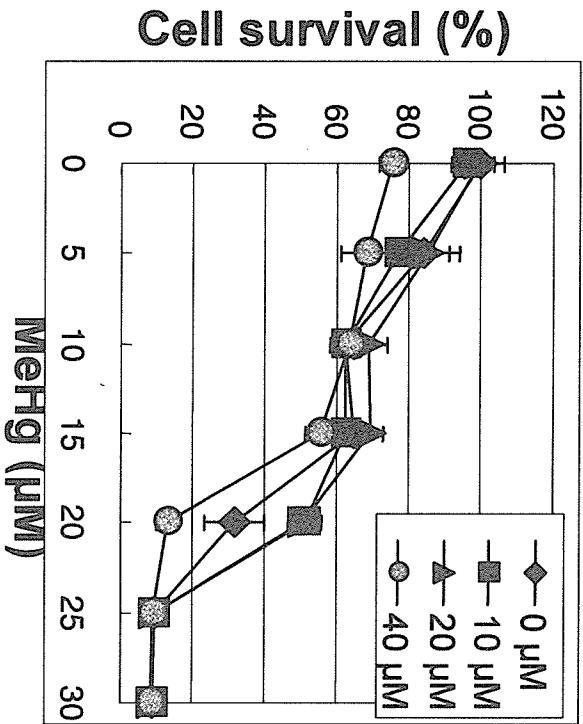
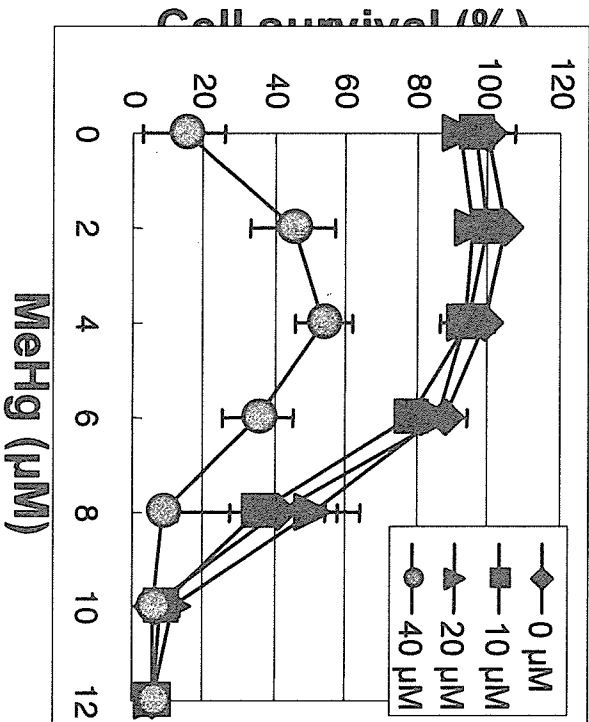


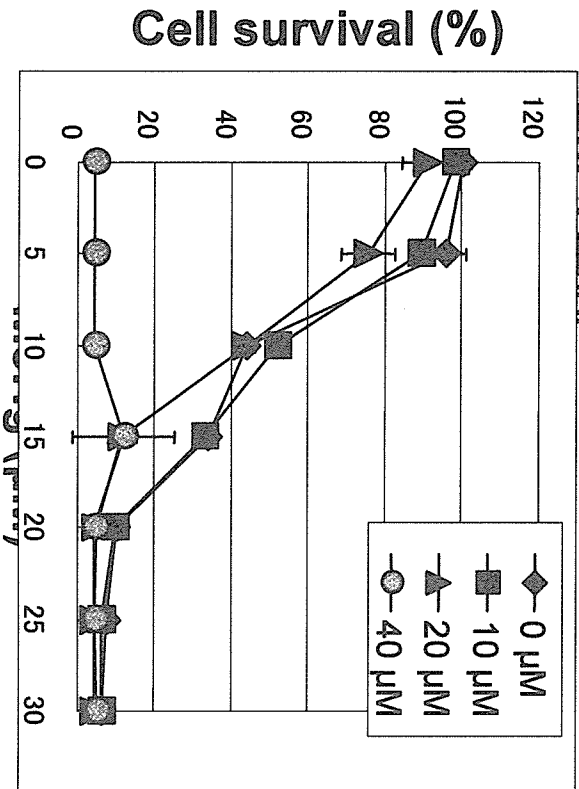
HEK293細胞



SH-SY5Y細胞



HeLa細胞



PC12細胞

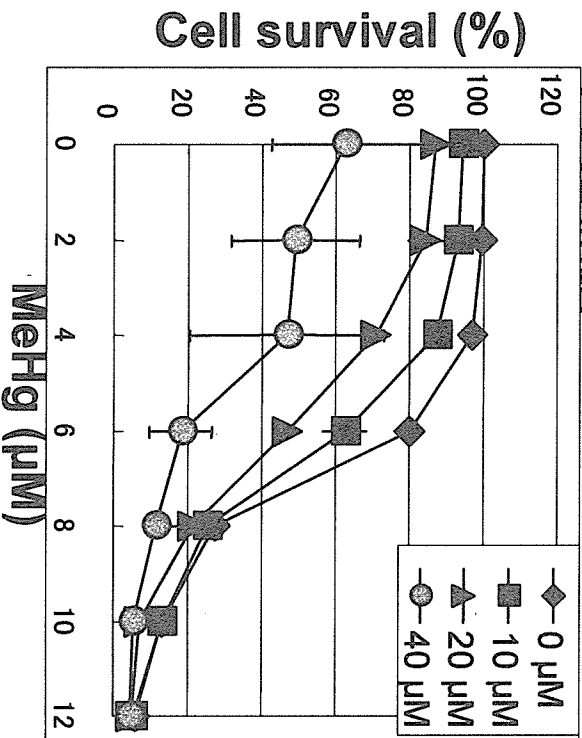


Fig.7 Dihydrosphingosine処理が種々の培養細胞のメチル水銀感受性に与える影響

2×10⁴ cells/80 μl/well (HEK293細胞、PC12細胞)、5×10⁴ cells/80 μl/well (SH-SY5Y細胞)、および1×10⁴ cells/80 μl/well (HeLa細胞)となるように細胞を96 well plate にまいた後、24 時間後に各濃度の塩化メチル水銀およびdihydrosphingosine で処理した。細胞の生存率はFig.2と同様の方法で検討した。

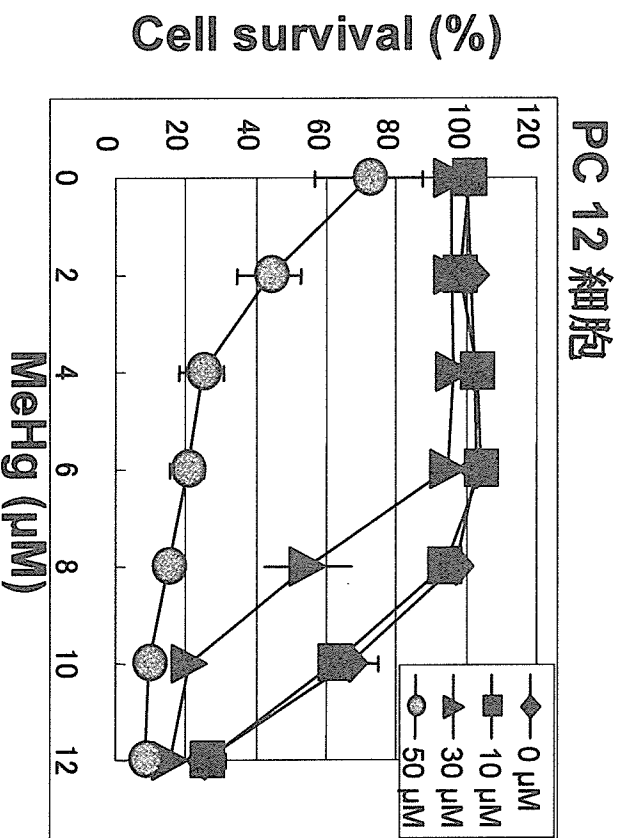
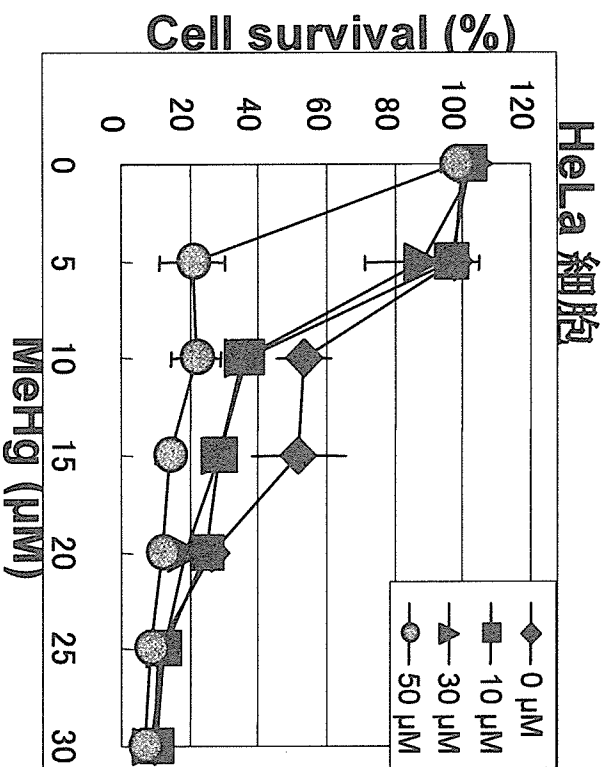
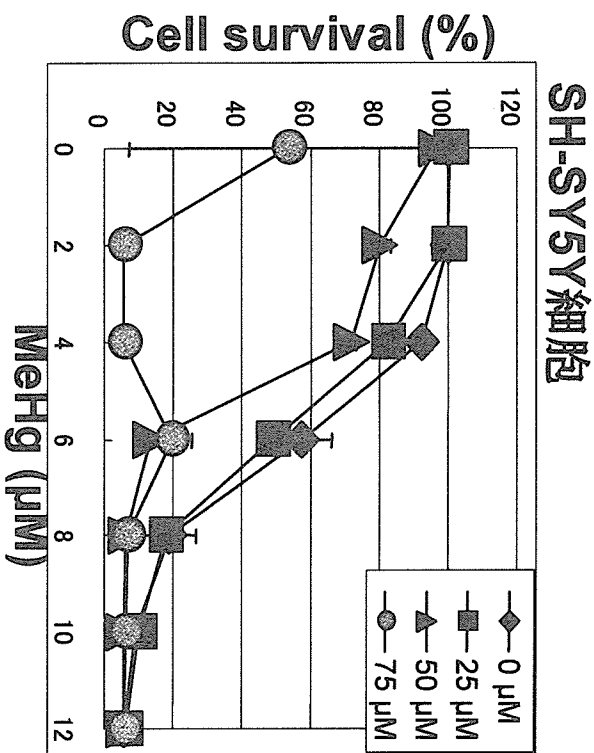
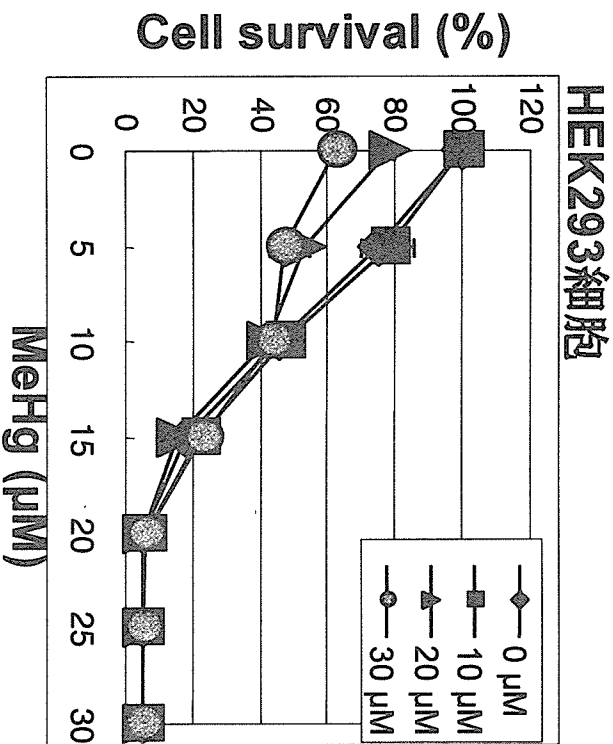


Fig. 8 セラミド処理が種々の培養細胞のメチル水銀感受性に与える影響

2×10⁴ cells/80 μl/well (HEK293細胞、PC12細胞)、5×10⁴ cells/80 μl/well (SH-SY5Y細胞)、および1×10⁴ cells/80 μl/well (HeLa細胞)となるように細胞を96 well plateにまいた後、24時間後に各濃度の塩化メチル水銀およびceramideで処理した。細胞の生存率はFig.2と同様の方法で検討した。

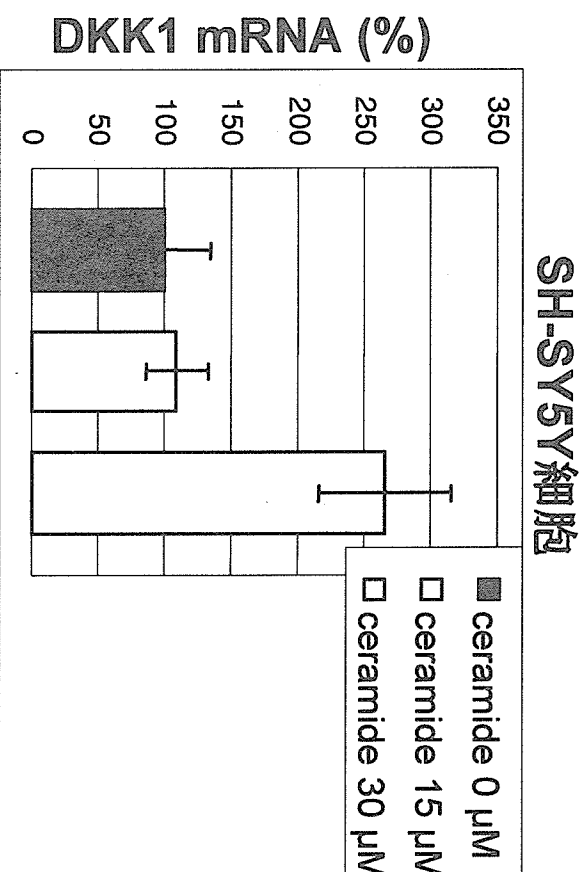
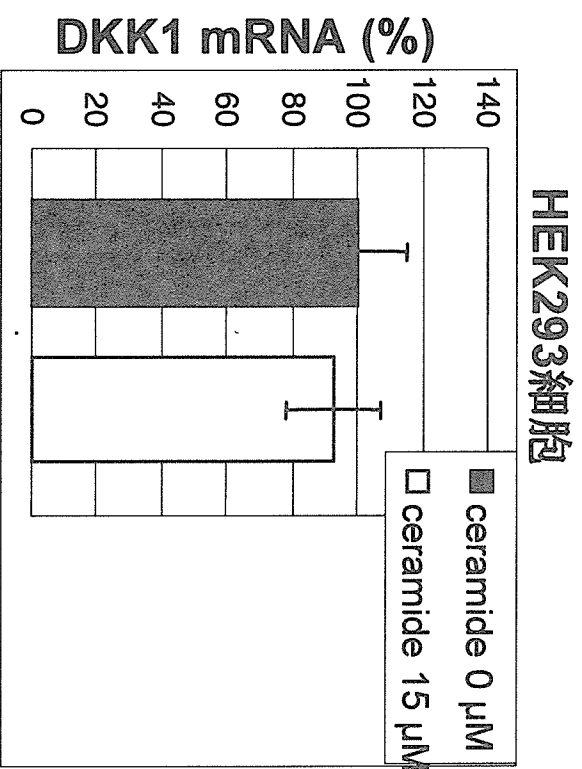
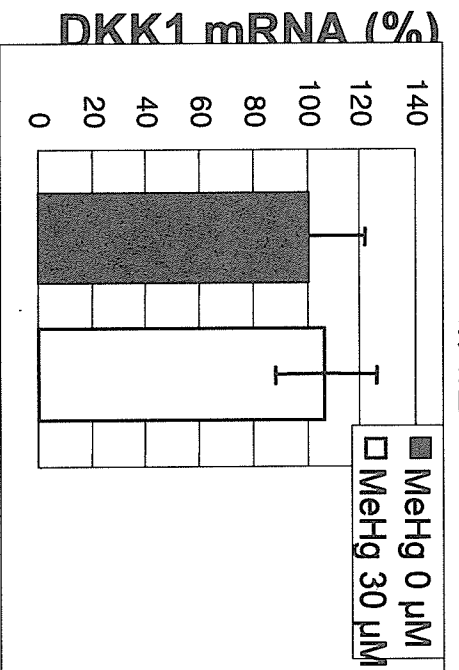


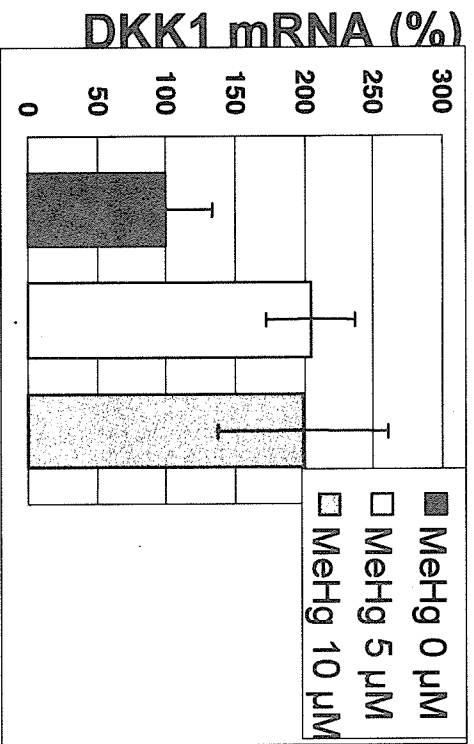
Fig. 9 セラミド処理がDKK1 mRNAレベルに与える影響

1×10⁶ cells/1.8 ml/well とするよう細胞をまいた後、24 時間後に各濃度のセラミドで48 時間処理し、全RNAを単離した。単離したRNAを用いて逆転写反応を行い、そのcDNAをtemplateとした定量PCR法によりDKK1mRNAレベルを測定した。(**; p<0.01, N.S.; No Significance)

HEK293細胞



SH-SY5Y細胞



HeLa細胞

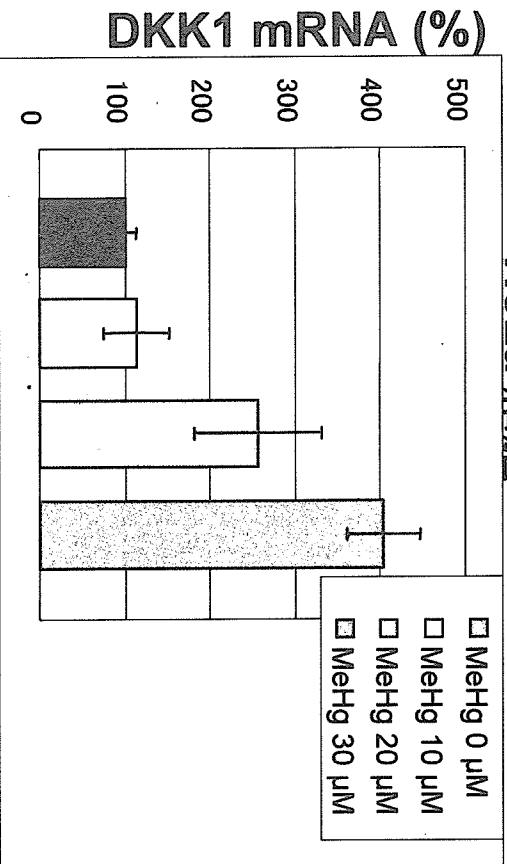


Fig.10 メチル水銀処理がDKK1 mRNAレベルに与える影響

1×10⁶ cells/1.8 ml/well となるように細胞をまいた後、24 時間後に各濃度のメチル水銀で 6時間処理し、全RNAを単離した。単離したRNAを用いて逆転写反応を行い、そのcDNAをtemplateとした定量PCR法によりDKK1 mRNAレベルを測定した。(*; p<0.05, **; p<0.01, N.S.; No Significance)

HEK293細胞

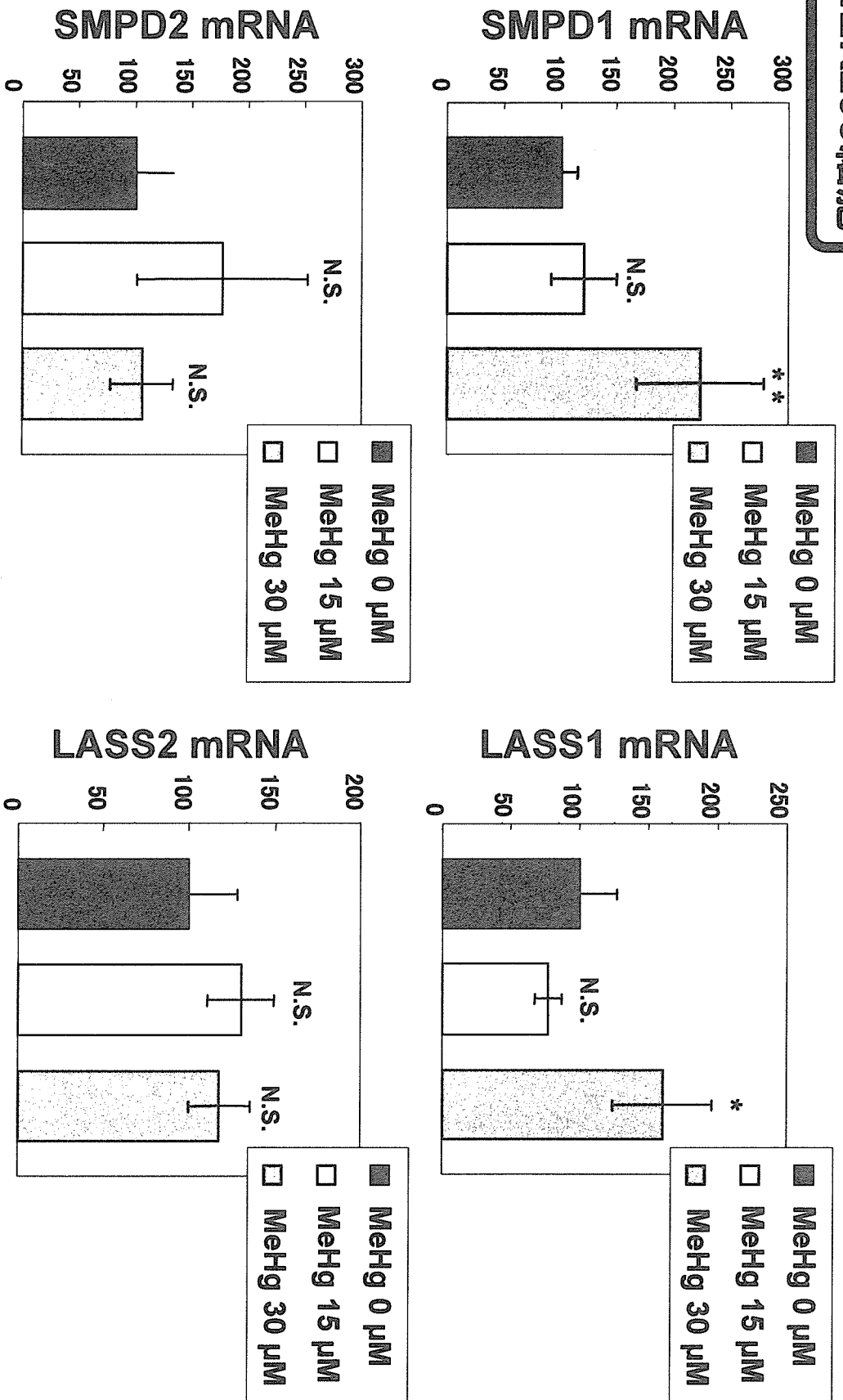


Fig.11 メチル水銀処理がHEK293細胞のセラミド産生酵素をコードする遺伝子のmRNAレベルに与える影響

1×10⁶ cells/1.8 mL/well となるようにHEK293細胞をまいた後、24 時間後に各濃度のメチル水銀で2時間処理し、全RNAを単離した。単離したRNAを用いて逆転写反応を行い、そのcDNAをtemplateとした定量PCR法により各mRNAレベルを測定した。(*; p<0.05, **; p<0.01, N.S.; No Significance)

SH-SY5Y細胞

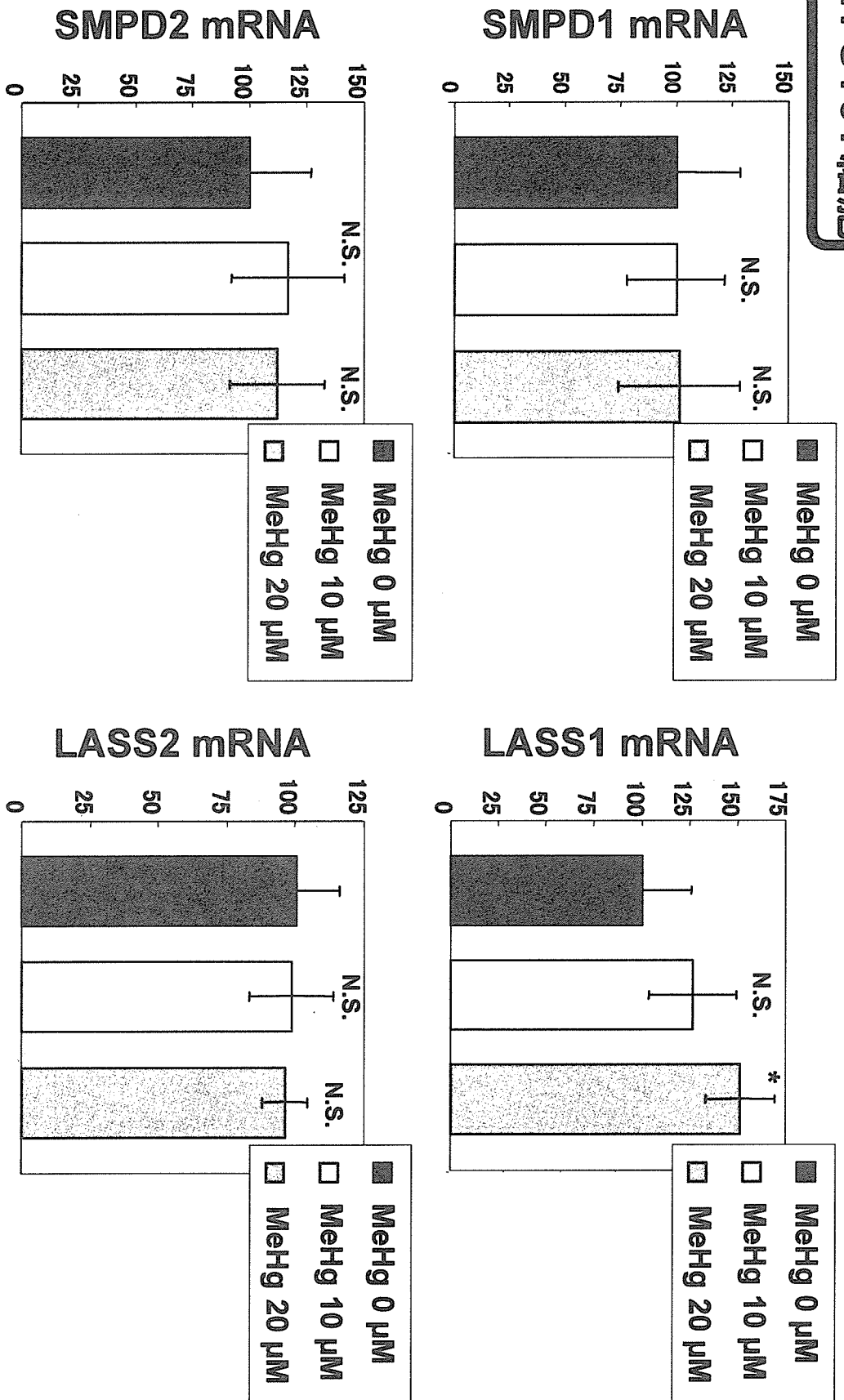


Fig. 12 マチル水銀処理がSH-SY5Y細胞のセラミド産生酵素をコードする遺伝子のmRNAレベルに与える影響

Fig. 11と同様の方法で各mRNAレベルを測定した。(*: p < 0.05, N.S.: No Significance)

HeLa細胞

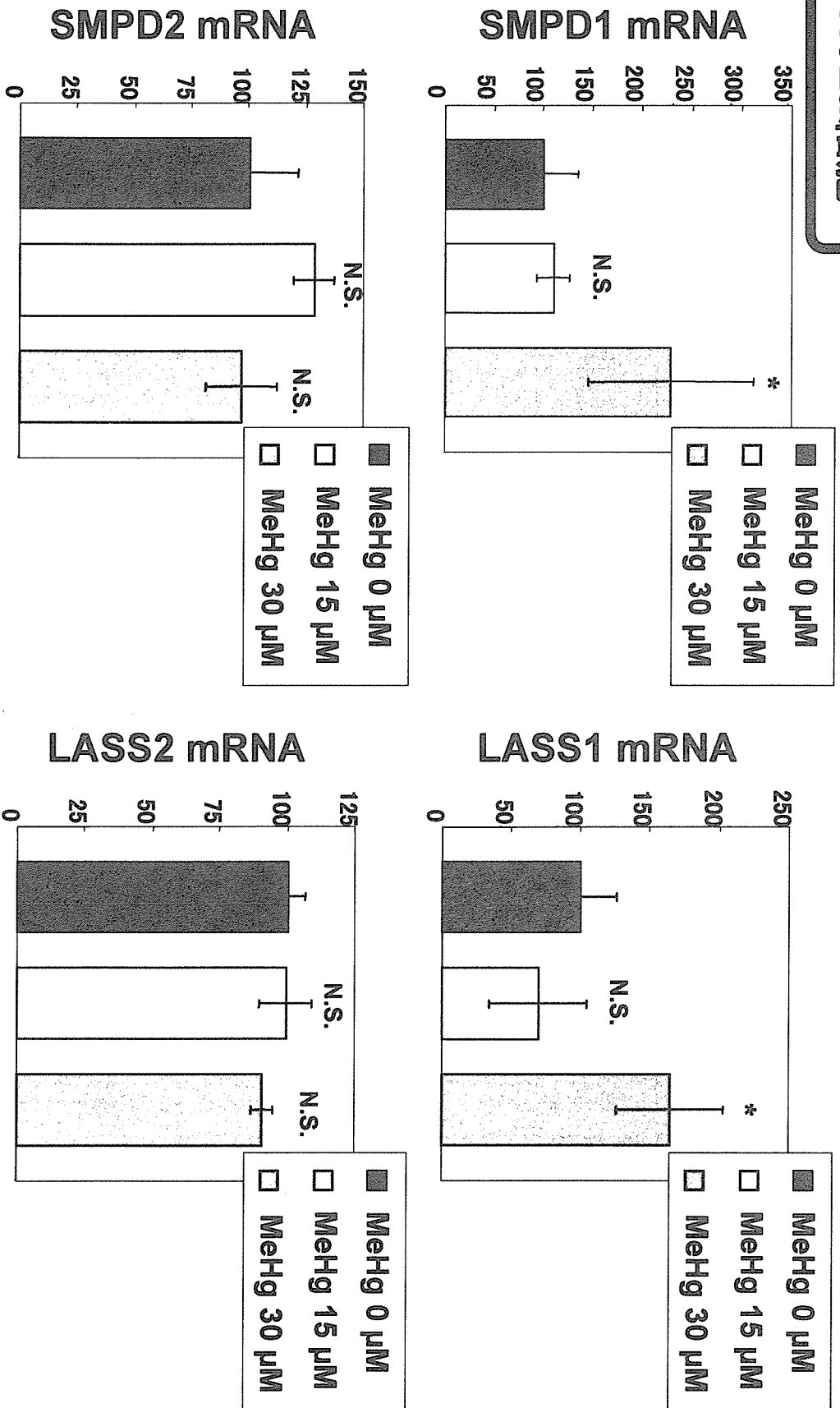


Fig.13 メチル水銀処理がHeLa細胞のセラミド産生酵素をコードする遺伝子のmRNAレベルに与える影響

Fig.11と同様の方法で各mRNAレベルを測定した。(*; p<0.05, N.S.; No Significance)

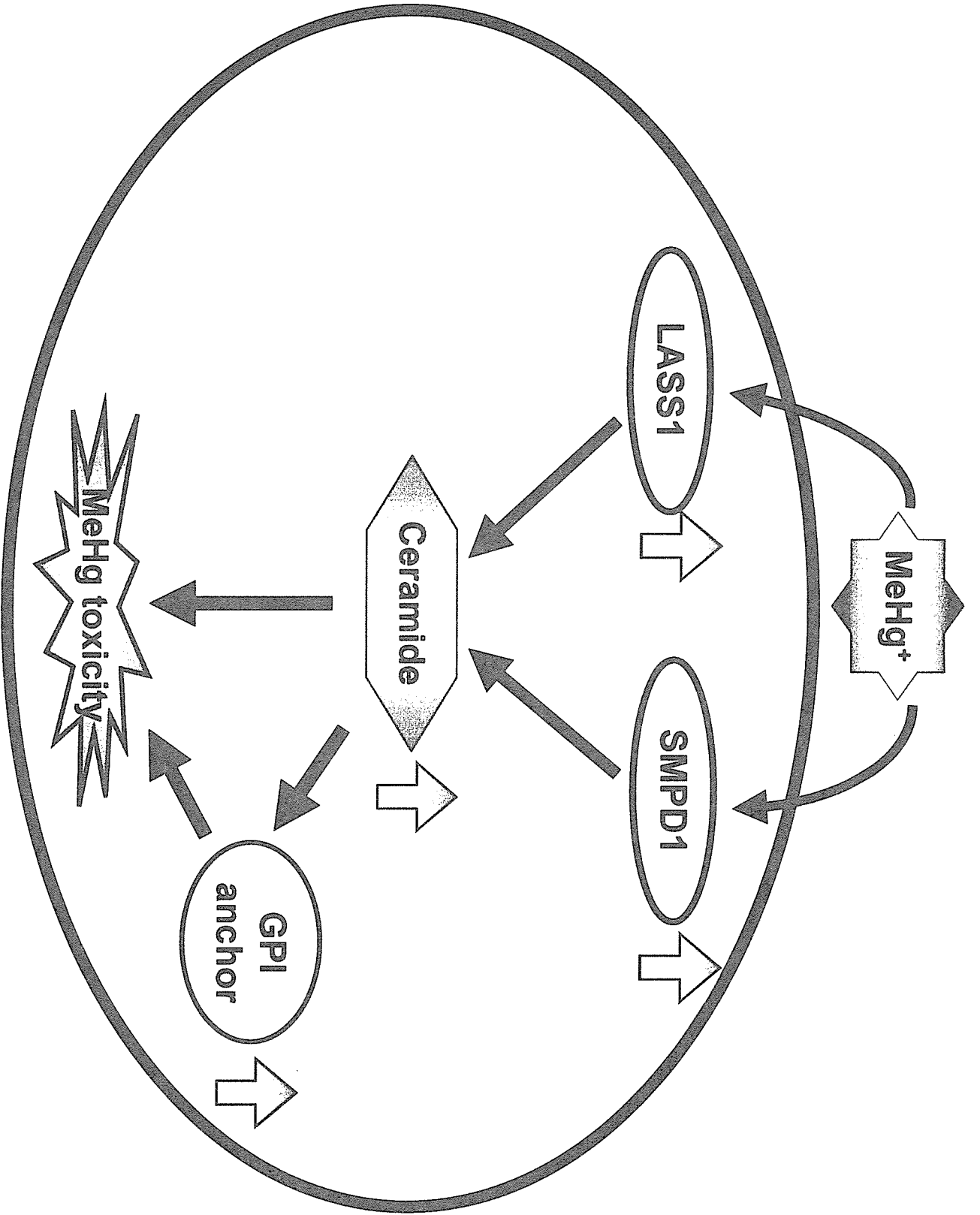


Fig.14 セラミドを介したメチル水銀毒性発現機構のモデル図

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

Slg1 欠損が酵母に与える亜ヒ酸高感受性機構の解析

分担研究者 黄 基旭 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

ヒ素による毒性発現機構およびそれに対する生体の防御機構はほとんど解明されていない。そこで本研究では、これらの機構を解明することを目的として、出芽酵母を用いて、欠損により亜ヒ酸感受性に影響を与える遺伝子群の網羅的検索を行った。その結果、欠損により酵母に亜ヒ酸耐性を与える遺伝子が59種、欠損により酵母に亜ヒ酸高感受性を与える遺伝子が83種同定され、その中の9割以上の因子ははじめて亜ヒ酸毒性に関与することが示されたものである。これらの因子の中には、細胞骨格の機能や制御に関与する因子をコードする遺伝子群が比較的多数含まれていた。細胞骨格は癌の転移・浸潤などといった癌の悪性化との関連も指摘されており、ヒ素が皮膚癌などの各種悪性腫瘍を引き起こすことから、本結果は亜ヒ酸毒性の発現機構およびそれに対する生体防御機構を解明するうえで興味深い知見である。

欠損により酵母に亜ヒ酸高感受性を与えることが判明した遺伝子の中に、ストレスに応答して細胞骨格の重合の制御などを行う Pkc1-MAPK pathway に関与する蛋白質をコードする遺伝子が複数含まれていたことから、本研究ではこの pathway と亜ヒ酸毒性との関係をさらに詳細に検討した。Pkc1-MAPK pathway では、①ストレス感知受容体 (Slg1、Wsc2、Wsc3、Wsc4、Mid1、Mid2、Mtl1)、②small GTPase である Rho1 とその制御因子 (Rom1、Rom2 など)、③protein kinase である Pkc1、④MAPK cascade (Bck1、Mkk1、Mkk2、Slt2)、の順にシグナルが伝わるということが知られている。Pkc1-MAPK pathway の上流には、種々のストレスを感知する複数の受容体が存在することから、まず、これら受容体の欠損が亜ヒ酸感受性に与える影響を検討した。その結果、Slg1 欠損酵母のみが高い亜ヒ酸感受性を示し、Slg1 を野生型酵母に高発現させた場合には亜ヒ酸耐性を示した。そこで、Slg1 高発現による亜ヒ酸耐性と Slg1 のドメインとの関係を調べるために、様々な Slg1 変異体を Slg1 欠損酵母内に発現

させて、亜ヒ酸に対する感受性を検討した。その結果、Slg1 による亜ヒ酸毒性の軽減には、Slg1 の transmembrane motif と細胞質側の C-terminus が重要であり、Slg1 は細胞膜上で下流の細胞内因子と相互作用することにより、亜ヒ酸毒性の軽減に寄与していることが示された。

通常時の出芽酵母では細胞分裂をする部位 (bud tip や bud neck) にアクチンおよび Slg1 が局在しているが、ヒートショックなどのストレスによってその分布が変化することが知られている。そこで、酵母内のアクチンおよび Slg1 の分布を観察したところ、亜ヒ酸処理によってもヒートショックと同様にアクチンおよび Slg1 の細胞内分布が変動することが判明した。一方、マグネシウムやカフェイン処理によって Slg1 mRNA レベルが増加することが知られている。そこで、亜ヒ酸が Slg1 レベルに与える影響を検討したところ、亜ヒ酸処理によって Slg1 mRNA レベルはほとんど変動しなかったが、Slg1-HA 蛋白質レベルの亜ヒ酸濃度依存的な減少が観察された。この現象は、プロテアソーム阻害剤の存在下でも依然認められたものの、小胞輸送による液胞での蛋白質分解に関わる因子を欠損させた酵母ではほとんど認められなかった。このことから、小胞輸送を介した液胞での蛋白質分解系が Slg1 蛋白質レベルの調節機構として重要な役割を果たしている可能性が考えられる。

また、Slg1 のヒトホモログである CD43 の発現をノックダウンさせた Jurkat 細胞が酵母の場合と同様に亜ヒ酸高感受性を示し、CD43 を高発現させた Jurkat 細胞は亜ヒ酸耐性を示した。したがって、ヒト細胞においても Slg1 のヒトホモログである CD43 を介したシグナル伝達がヒ素毒性の軽減に関与している可能性が考えられる。今後、CD43 とヒ素毒性との関わりを検討することによって、ヒト細胞におけるヒ素毒性発現機構および生体の防御機構が明らかになるものと期待される。

A. 研究目的

ヒ素 (As) は半導体の材料、防蟻剤、農薬および白血病の治療薬など様々な用途に利用されている。3 価の無機ヒ素である亜ヒ酸は特に毒性が強く、大量摂取による急性毒性として消化

器障害や腎臓障害などが、慢性毒性としては皮膚障害や各種癌などが知られている。また、亜ヒ酸の細胞毒性としても、酵素中のチオール基との反応による酵素活性阻害、活性酸素種の発生促進、シグナル伝達系の活性化によ

るアポトーシス誘導 など、いくつかの知見が報告されている。一方、南アジアなどの発展途上国の一部においては、地下水のヒ素汚染により約数千万人～1億人の人々がヒ素中毒の危機に曝されており、大きな社会問題となっている。しかし、ヒ素による毒性発現機構およびそれに対する生体の防御機構はほとんど解明されていない。

そこで本研究では、亜ヒ酸による毒性発現機構およびそれに対する生体の防御機構を解明することを目的として、出芽酵母を用いて、欠損により亜ヒ酸感受性に影響を与える遺伝子群の網羅的検索を行い、さらに、同定された遺伝子産物の作用機構解析を行った。

なお、酵母は、遺伝子の導入や欠損が容易に行えるなど多くの利点を持つ真核細胞生物であり、遺伝子の多くがヒトなどの哺乳動物と機能的に共通することから、酵母を用いた研究で得られた知見がヒトの細胞機能の解析に大きく貢献してきた。したがって、本研究によって、酵母のみならず、ヒト細胞の亜ヒ酸感受性に影響を与える遺伝子が同定される可能性も十分に考えられる。

B. 実験方法

1. 出芽酵母の亜ヒ酸感受性に影響を与える遺伝子のスクリーニング

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スクリーニングは Figure 1 に示すように、1次スクリーニングおよび2次スクリーニングの順で行った。

1次スクリーニング

スクリーニングで用いた遺伝子欠損酵母 complete set of *Saccharomyces cerevisiae* gene deletion strains は遺伝子欠損部分がジェネティシン (G418 disulfate) 耐性遺伝子に置き変わっていることから、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。

96 well plate を用いてジェネティシン (final 400 $\mu\text{g} / \text{mL}$) を含んだ YPAD 培地 195 μL に complete set of *Saccharomyces cerevisiae* gene deletion strains 5 μL を添加し、30 $^{\circ}\text{C}$ 、48時間、confluent になるまで培養した後、その酵母培養液を約 12.5 倍希釈した。別の 96 well plate に希釈した培養液 16 μL (約 3×10^4 cells / well)、亜ヒ酸 (final 3 mM) 20 μL と YPAD 培地 165 μL を加えて 30 $^{\circ}\text{C}$ で培養した。

24 時間後に成育が見られた遺伝子欠損酵母および採り残しを考慮して 28

時間後に成育が見られた遺伝子欠損酵母を1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遺伝子欠損酵母を1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。

2次スクリーニング

1次スクリーニングで得られた亜ヒ酸耐性候補株 (1) および高感受性候補株 (1) と、対照となる野生型酵母を、YPAD 培地の 96 well plate 中で 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 96 well plate に加え、30 $^{\circ}$ 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、野生型酵母よりも 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 値が野生型酵母より 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、野生型酵母より

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 値が野生型酵母より 0.4 低い株は成育が遅い株として除いた。

その後、亜ヒ酸耐性候補株 (2) および高感受性候補株 (2) について亜ヒ酸に対する耐性試験を行い、亜ヒ酸耐性株および高感受性株を決定した。

2. 液体培地での亜ヒ酸に対する耐性試験

0、5、10、15、20、25、30、35 mM にそれぞれ希釈した亜ヒ酸を 96 well plate に 20 μ L ずつ分注した (final 0、0.5、1、1.5、2、2.5、3、3.5 mM となる)。対照として野生型酵母、または、それぞれの遺伝子欠損酵母の single colony を SD 培地 1 mL に植菌し 30 $^{\circ}$ C で一晩振盪培養した後、 5.56×10^5 cells / mL となるように希釈し、96 well plate にそれぞれの希釈系列に対して 3 well ずつ、1 well あたり 180 μ L 添加した (final 1×10^5 cells / well となる)。気相インキュベーターを用いて 30 $^{\circ}$ C、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。

3. Slg1-HA 酵母発現 plasmid の作製

Own promoter および terminator 制御下で C 末端側に HA-tag を融合させた Slg1 を酵母で発現させるための発現 plasmid は、最終的に pRS425 に cloning した。

まず、Slg1 の ORF 部分を酵母 chromosomal DNA を template とし、以下に示す primer と反応条件を用いて PCR により増幅した。PCR 産物を Xho I、Xba I で切断し、アガロース電気泳動後、DNA 断片をゲルより切り出し、GeneClean II kit を用いて精製した (Xho I -Slg1-HA-Xba I)。Xho I -Slg1-HA-Xba I を pBluescript SK (-) (pBS) に cloning した (Slg-HA / pBS)。次に、Slg1 の own terminator 部分を PCR で増幅させ、PCR 産物を Not I、Xba I で切断し、同様に精製した (Not I -terminator-Xba I)。Not I -terminator-Xba I を、Slg1-HA / pBS に cloning した (Slg1-HA-ter / pBS)。さらに、Slg1 の own promoter 部分を PCR で増幅させ、PCR 産物を Kpn I、Xho I で切断し、同様に精製した (Kpn I -promoter-Xho I)。Kpn I -promoter-Xho I を、Slg1-HA-ter / pBS に cloning した (pro-Slg1-HA-ter / pBS)。

pro-Slg1-HA-ter / pBS を Kpn I、Not I で切り出し、blanting し、同様に精製した (b-Kpn I -pro-Slg1-HA-ter-Not

I -b)。最後に、pRS425 を制限酵素 Pvu II により切り出し同様に精製し、b-Kpn I -pro-Slg1-HA-ter-Not I -b を挿入し、Slg1-HA / pRS425 を作製した。

なお、すべての cloning の際には、DNA ligation kit ver. 2 を用いて連結反応を行った。

Slg1-HA / pRS425 を大腸菌 (XL1-blue 株) に導入した (Hanahan, 1983)。Competent cell 溶液 50 μ L にプラスミド溶液を加え、氷上に 10 min 静置した。42°C で 45 sec の熱ショックをかけ、さらに氷上に 2 min 静置した後、ampicillin sodium salt 100 μ g / mL を含む LB 寒天培地に塗布し、37°C で一晩培養した。形成されたコロニーを ampicillin sodium salt 100 μ g / mL を含む LB 培地 2 mL で一晩振盪培養した後、GenEluteTM Plasmid Miniprep Kit (Sigma) を用いて大腸菌より plasmid を回収した。発現は酵母株に導入後、抗 HA 抗体を用いた Immunoblotting で確認した。

4. Slg1 の様々なドメインを欠質させた truncation mutants の発現 plasmid の作製

Slg1 の Cysteine motif (CM)、serine threonine motif (SM)、N-terminus (N)、transmembrane motif (TM)、C-terminus

(C)をそれぞれ欠失した truncation mutants は template として Slg1-HA / pRS425 を用い、PCR により増幅した。PCR によって増幅させた後、37°C で 1 hr 以上 Dpn I で処理し template を切断して、大腸菌に導入した。発現は酵母株に導入後、抗 HA 抗体を用いた Immunoblotting により確認した。

5. 酵母へのプラスミド DNA の導入

酵母の形質転換は酢酸リチウム法により行った。まず、酵母のシングルコロニーを YPAD 培地 2 mL に植菌し 30°C で数時間培養した後、この培養液を 1 mL の Milli-Q 水で洗い、100 mM 酢酸リチウム溶液に懸濁した。この懸濁液 20 μ L にプラスミド DNA、加熱変性サケ精子 DNA を加えて混合した。その後、50 % polyethyleneglycol : 1 M 酢酸リチウム : Milli-Q 水 = 8 : 1 : 1 の混合液を 120 μ L 加えて混合し、30°C で 30 分間インキュベートした。その後、42°C で 15 分間のヒートショックをかけた後に、1 mL の Milli-Q 水で洗い、適当な量の Milli-Q 水に懸濁して、SD 寒天培地上に塗布し、30°C で二日間培養した。

この際、ベクターとして用いた pRS425 中には、leucine 合成酵素をコードする遺伝子 (*LEU2*) が組み込まれ

ているため、プラスミドが導入された酵母 (形質転換体) のみが、leucine を含まない培地中でも生育可能となる。

6. 酵母からの総蛋白質抽出

空 vector のみを導入した酵母、もしくは何らかの蛋白質をコードする遺伝子を組み込んだ vector を導入した酵母の single colony を 2 mL の SD 培地に植菌し一晩振盪培養後、10 mL の SD 培地に再び集菌、30°C で OD が約 0.6 ~ 0.8 になるまで数時間振盪培養した。

酵母を集菌し、10 mL の 1×PBS で洗浄後、10% TCA 1 mL を加え氷上に 30 min 放置した。TE で中性になるまで洗浄後、ガラスビーズと lysis buffer 100 μ L を加えた。1,500×g, 20 min, 4°C で酵母を破碎後、16,000×g, flash, 4°C で遠心し、上清をさらに 16,000×g, 30 min, 4°C で遠心し、その上清を Whole cell とした。DC protein assay kit を用いて総蛋白質量を定量した。1 well につき、総蛋白質量 20 μ g, 総容量 20 μ L となるように、Sample buffer, Milli-Q 水を添加した。100°C, 3 min で boil し、200×g, 5 min で遠心後、SDS-PAGE 用 sample とした。

7. SDS-PAGE

12.5 %のポリアクリルアミドゲルを

用いて 30 mA /枚で電気泳動を行った。

8. Transfer

SDS-PAGE 後、semi-dry 型 blotting 装置を用いた (条件：50 mA /枚, 3hr)。

9. Immunoblotting

Transfer 後の membrane を blocking solution に浸して 2 hr 以上 blocking した後に、1 次抗体液 (1000 倍希釈) に浸し約半日間振盪した。TTBS で 3 回、TBS で 1 回、それぞれ 5 min 振盪して wash した後に、HRP 標識化 2 次抗体液 (5000 倍希釈) に浸し 1 hr 振盪した。TTBS で 3 回、TBS で 1 回、それぞれ 5 min 振盪して wash した後に、Immobilon Werstern を用いて化学発光させ、Versa Doc Model 5000 (Bio-rad) により検出した。

10. 寒天培地での亜ヒ酸に対する耐性試験

酵母のシングルコロニーを 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 / $5 \mu\text{L}$ になるように希釈した。その培養液を用いて、96 well plate 上で、 $5 \mu\text{L}$ 当たり、 1×10^5 , 5×10^4 , 1×10^4 , 5×10^3 , 1×10^3 cells になるように Milli-Q 水で希釈した。亜ヒ酸 (final 0,

1, 1.5 mM) を添加した SD 寒天培地に $5 \mu\text{L}$ ずつ spot し、30°C で 48 時間培養した後、観察を行った。

11. 亜ヒ酸処理による GFP-Slg1 の細胞内分布への影響の観察

Slg1 欠損酵母に空 vector のみ、もしくは GFP-Slg1 蛋白質をコードする遺伝子を組み込んだ vector を導入し、それぞれ SD 培地 2 mL に植菌し 30°C で一晚振盪培養した。細胞数をカウント後、 10^7 cells / $900 \mu\text{L}$ になるようにメチオニンを含まない SD 培地で希釈し、30°C で 1 時間振盪培養し、GFP 融合蛋白質を誘導した。その後、最終濃度が 0, 1 mM になるように亜ヒ酸 $100 \mu\text{L}$ を培養液に添加し、90 min、30°C で処理した。

酵母を集菌し、上清を除いた後、SD 培地：37% ホルムアルデヒド液 = 9：1 を 1 mL を加え、1 時間 30°C で震盪し、固定を行った。これを $1 \times \text{PBS}$ で 3 回洗い、適量の $1 \times \text{PBS}$ に懸濁し、共焦点レーザー顕微鏡 (Olympus) を用いて観察を行った。対物レンズは 100 倍のものを用了。

12. 亜ヒ酸処理によるアクチンの細胞内分布への影響の観察

野生型酵母、または、Slg1 欠損酵母

をそれぞれ SD 培地 2 mL に植菌し 30°Cで一晩振盪培養した。細胞数をカウント後、 10^7 cells / 900 μ L になるように希釈し、30°Cで3時間振盪培養した。その後、最終濃度が 0,1 mM になるように亜ヒ酸 100 μ L を培養液に添加し、90 min、30°Cで処理した。

酵母を集菌し、上清を除いた後、SD 培地 : 37% ホルムアルデヒド液 = 9 : 1 を 1 mL を加え、1時間 30°Cで震盪し、固定を行った。これを 1×PBS で3回洗い、ペレットを 1×PBS 90 μ l に懸濁し、DMSO 10 μ l、Alexa Fluor 594 phalloidin 3 μ l を添加し、アルミで遮光しながら 2時間、30°Cで震盪した。その後、1×PBS で5回洗い、適量の 1×PBS に懸濁し、共焦点レーザー顕微鏡 (Olympus) を用いて観察を行った。対物レンズは 100 倍のものを用いた。

1.3. CD43 高発現 vector の作製

CD43 を Flp-In-Jurkat 細胞株で高発現させるための発現 vector は、最終的に pEF5 / FRT / V5-DEST (pEF5) に cloning した。

まず、CD43 の ORF 部分をヒト骨髄由来 cDNA を template とし、以下に示す primer と反応条件を用いて PCR により増幅した。PCR 産物を Kpn I、Not I で切断し、上記と同様の方法で

精製した (Kpn I -CD43-Not I (1))。Kpn I -CD43-Not I (1) を pBluescript SK (-) (pBS) に cloning した (CD43 / pBS)。上記と同様の方法で、CD43 / pBS を大腸菌 (XL1-blue) に導入し、大腸菌より plasmid を回収した。配列はシーケンスにより確認した。CD43 / pBS を Kpn I、Not I で切り出し、2-9 と同様の方法で精製した (Kpn I -CD43-Not I (2))。最後に、pEF5 を制限酵素 Kpn I、Not I により切り出し同様に精製し、Kpn I -CD43-Not I (2) を挿入し、CD43 / pEF5 を作製した。

なお、すべての cloning の際には、DNA ligation kit ver. 2 を用いて連結反応を行った。

1.4. CD43 高発現 Flp-In-Jurkat 細胞の作製

ゲノム上に組み換えサイトを持つ Flp-In-Jurkat 細胞 (Invitrogen) を 3×10^6 cells / 2 ml / well になるように 6 well plate に播き、RPMI 1640 w/o P/S、37°C、5% CO₂ 存在下で 24 時間培養した後、LipofectamineTM 2000 を用いて、リポフェクション法により、作製した CD43 / pEF5 を細胞に導入した。このとき、細胞内組み換え酵素を発現するプラスミド pOG44 も同時に、CD43 / pEF5 : pOG44 = 1 : 9 の量で導入した。

リポフェクションから、24 時間後に 10 cm シャーレにまき直し、さらに 96 時間後、hygromycin B を添加し、培地を交換しながら 2 週間程度セレクションを行った。その後、培養液を希釈し 96 well plate に播き、クローン化を行った。細胞が増殖している well 毎に、RNA を抽出し、定量 PCR を用いて、CD43 の発現確認を行った。また、組み換えの指標として、ゼオチン高感受性を確認した。

1 5. CD43 siRNA 発現 vector の作製

以下に示す CD43 の発現を抑制する si RNA primer を 95°C で 5 分間加熱した後、室温まで放冷してアニーリングさせた。T4PNK を用いて DNA 断片をリン酸化し、BamH I と Not I で切り出して精製した pFIV-H1 に、DNA ligation kit ver. 2 を用いて cloning した (si CD43 / pFIV-H1)。

1 6. CD43 ノックダウン Flp-In-Jurkat 細胞の作製

エレクトロポレーション法は、Microporator (Digital Bio Technology) を用いて行った。Flp-In-Jurkat 細胞を 1×10^5 cell になるように 1.5 mL tube にとり、960 g, 5 min で遠心し、上清を取り除いた。その後、resuspension buffer R

10 μ L に懸濁し、si RNA 発現 vector 0.5 μ g を添加し、1386 V, 30 m / s の条件で導入した。発現 vector は puromycin 耐性遺伝子を含んでいるため、vector の導入は 2 μ g / mL の puromycin dihydrochloride で処理することにより確認した。

(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群の検索

欠損により出芽酵母の亜ヒ酸感受性に影響を与える遺伝子群を検索するために、酵母が有する約 6000 種の遺伝子の中で欠損しても酵母が生存可能な遺伝子 (約 5000 種) を一つずつ欠損させた酵母株 (約 5000 株) について亜ヒ酸感受性を調べた。

欠損により酵母の亜ヒ酸感受性に影響を与える遺伝子群の 1 次スクリーニングでは、亜ヒ酸耐性候補株 (1) が 258 株、高感受性候補株 (1) が 744 株得られた。1 次スクリーニングで得られた遺伝子欠損酵母について 2 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 64 株、高感受性候補

株 (2) が 248 株得られた。これら 2 次スクリーニングにより選別された遺伝子欠損酵母について、様々な濃度の亜ヒ酸存在下での感受性試験を行った結果、欠損により酵母に亜ヒ酸耐性を与える遺伝子が 59 種、欠損により酵母に亜ヒ酸高感受性を与える遺伝子が 83 種同定された。

欠損により酵母に亜ヒ酸耐性を与える遺伝子群として、リボソーム蛋白質をコードする遺伝子 (*RPL15B*、*RPL22A*、*RPL7A* など)、細胞骨格の機能や制御に関与する因子をコードする遺伝子 (*BUD28*、*BUD31*、*RAX2* など)などが含まれていた (Table 1)。これらのうち、特に強い亜ヒ酸耐性を示した欠損酵母の耐性度合いを Figure 2 に示した。一方、欠損により酵母に亜ヒ酸高感受性を与える遺伝子群としては、脂質合成に関与する因子をコードする遺伝子 (*ERG3*、*ERG5*、*ERG6* など)、ミトコンドリア関連因子をコードする遺伝子 (*TOM5*、*MDM10*、*MRP7* など)、細胞内小胞輸送に関与する因子をコードする遺伝子 (*DOA4*、*PEP5*、*VPS15* など)、転写関連因子をコードする遺伝子 (*ARR1*、*YAP1*、*SOK2* など)、シグナル伝達に関与する因子をコードする遺伝子 (*AKR1*、*HOG1*、*LTE1* など)、細胞骨格の機能や制御に関与する因子をコードする遺伝子 (*BCK1*、*GIM4*、*ROM2* など)などが含まれてい

た (Table 2)。そのうち、特に高い亜ヒ酸感受性を示した欠損酵母について、その感受性試験の結果を Figure 3 に示した。本研究によって、欠損することによって酵母の亜ヒ酸感受性に影響を及ぼす遺伝子が合計 142 種同定されたが、この中で既知の亜ヒ酸感受性決定因子は *Arr1*、*Yap1* および *Fps1* などごく一部であり、9 割以上の因子ははじめて亜ヒ酸毒性に関与することが示されたものである。特に、細胞骨格の機能や制御に関与する因子をコードする遺伝子群が比較的多数得られたことは亜ヒ酸の毒性発現機構および生体の防御機構を解明するうえで非常に興味深い。

2. ヒ素毒性と Pkc1-MAPK pathway との関係

2-1. Slg1 を介した Pkc1-MAPK pathway が亜ヒ酸感受性に与える影響

Figure 4 に示した Pkc1-MAPK pathway の中でヒ素毒性の軽減に関与する因子を同定するために、この経路に関与する因子のうち、遺伝子欠損により酵母が致死となってしまう *Rho1* および *Pkc1* 以外の因子をそれぞれ欠損させた酵母の亜ヒ酸感受性を野生型酵母と比較した (Figure 5)。その結果、

Rom1 および Mkk1 をそれぞれ欠損させた酵母の亜ヒ酸感受性は野生型酵母と同程度であったが、Rom2、Bck1、Mkk2、Slf2 を欠損させた酵母は野生型酵母に比べて亜ヒ酸高感受性を示した。Rom1 と Rom2、Mkk1 と Mkk2 はそれぞれ機能が重複していると報告されているが、その活性に違いがあるために、Rom1 と Mkk1 をそれぞれ欠損させた酵母は野生型酵母と同様の亜ヒ酸感受性を示し、Rom2 と Mkk2 の欠損酵母は亜ヒ酸高感受性を示したのかもしれない。なお、Rom1 と Rom2、Mkk1 と Mkk2 はそれぞれを同時に欠損させると酵母が成育できないため、二重遺伝子欠損酵母を用いた亜ヒ酸感受性の検討は行えなかった。以上の結果から、ヒ素毒性の軽減機構として Pkc1-MAPK pathway が重要な役割を果たしている可能性が考えられる。

Pkc1-MAPK pathway の上流には、種々のストレスを感知する複数の受容体が存在する。そこで次にこれら受容体の欠損が亜ヒ酸感受性に与える影響を検討した。その結果、Wsc2、Wsc3、Wsc4、Mid1、Mid2 および Mtl1 をそれぞれ欠損させた酵母は野生型酵母と同程度の亜ヒ酸感受性を示したが、Slg1 欠損酵母は高い亜ヒ酸感受性を示した (Figure 6)。Slg1 は野生型酵母に高発現させた場合には、空ベク

ターを導入した酵母に比べて亜ヒ酸耐性を示した (Figure 7)。これらの結果より、Pkc1-MAPK pathway の上流に存在する複数のストレス感知受容体のうち、Slg1 が特異的にヒ素毒性の軽減に関与していると考えられる。

2-2. ヒ素毒性軽減に関わる Slg1 のドメイン解析

Slg1 は細胞膜貫通型のストレス感知受容体であり、その構造は、細胞外から signal peptide (sp ; 8-16 amino acids)、cysteine motif (CM ; 22-100 amino acids)、serine threonine motif (SM ; 111-244 amino acids)、transmembrane motif (TM ; 263-287 amino acids)、細胞質内の C-terminus (C ; 300-378 amino acids) で構成されている (Figure 8)。SM は Slg1 の主な糖鎖修飾部位であり、また、細胞質内の C-terminus にはリン酸化サイトが有り、この部位のリン酸化は細胞内因子 Rom2 との相互作用を制御していると考えられている。そこで、Slg1 高発現による亜ヒ酸耐性とこれらのドメインとの関係を調べるために、これらのドメインをそれぞれ欠失した Slg1 変異体を HA-tag との融合蛋白質として Slg1 欠損酵母内に発現させて、亜ヒ酸に対する感受性を検討した (Figure 8)。Slg1 欠損酵母は Figure 6 に示したように野生型酵母に比べて

亜ヒ酸高感受性を示すが、そこに全長の Slg1-HA を導入することによって、若干の増殖抑制が認められたものの、Slg1 欠損酵母が示す亜ヒ酸高感受性の程度が低下した (Figure 9)。Cysteine motif および serine threonine motif をそれぞれ欠失させた Δ CM-Slg1-HA および Δ SM-Slg1-HA 変異体を導入した場合にも、全長の Slg1-HA の場合と同様に、Slg1 欠損酵母の亜ヒ酸高感受性の程度が低下した。しかし、transmembrane motif および C-terminus をそれぞれ欠失させた Δ TM-Slg1-HA および Δ C-Slg1-HA 変異体を導入した場合には、Slg1 欠損酵母の亜ヒ酸高感受性に変化が認められなかった (Figure 9)。これらのことより、Slg1 によるヒ素毒性の軽減には、Slg1 の transmembrane motif と細胞質側の C-terminus が重要であると考えられる。そこで、Slg1 の transmembrane motif および C-terminus を含む領域を HA-tag と融合させた変異体 (TMC-Slg1-HA) または、それに transmembrane motif から N 末側の 18 アミノ酸を含ませた Δ N-Slg1-HA を作製して亜ヒ酸感受性を調べた。その結果、TMC-Slg1-HA 変異体を導入しても、Slg1 欠損酵母が示す亜ヒ酸高感受性は影響を受けなかったのに対し、 Δ N-Slg1-HA 変異体を導入した場合には Slg1 欠損酵母の亜ヒ酸高感受性の程

度の低下が認められた (Figure 9)。これらのことから、Slg1 の細胞質側の C-terminus と transmembrane motif だけではヒ素毒性軽減作用は示さず、transmembrane の外側に位置する部位 (18 アミノ酸) も必要であることが示唆された。何れにしても、以上の結果から、Slg1 は細胞膜上で下流の細胞内因子と相互作用することにより、ヒ素毒性の軽減に寄与していると考えられる。

3. ヒ素毒性軽減機構における Slg1 / CD43 の役割

3-1. 亜ヒ酸が Pkc1-MAPK pathway を介したアクチンの脱局在化 (点状分布化) に与える影響

通常時の出芽酵母では細胞分裂をする部位 (bud tip や bud neck) にアクチンが局在しているが、ヒートショックや界面活性剤処理 (細胞壁分解) などのストレスが与えられると Slg1 依存的に Pkc1-MAPK pathway が活性化され、細胞膜上でアクチンの脱局在化 (点状分布化) を引き起こすことが知られている。そこで、アクチンと結合する phalloidin を蛍光試薬 Alexa Fluor 594 で標識した試薬を用いて、酵母内のアクチン分布を観察したところ、亜