

ヒ酸処理によってもヒートショックなどの場合と同様にアクチンの点状分布化が起こることが判明した (Figure 10)。しかし、Pkc1-MAPK pathway の最上流に位置してヒ素毒性の軽減に関与する Slg1 を欠損させた酵母では亜ヒ酸処理によるアクチンの点状分布化は認められなかった (Figure 10)。

3-2. 亜ヒ酸が GFP-Slg1 の細胞内分布に与える影響

Slg1 もアクチンと同様に、通常は bud tip 等に局在しているが、ヒートショック等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、亜ヒ酸が Slg1 の細胞内分布に及ぼす影響を検討するために、Green fluorescent protein (GFP) を C 末端に融合させた Slg1 (GFP-Slg1) を Slg1 欠損酵母中に発現させた。その結果、GFP-Slg1 は主に bud tip に分布し、一部は細胞膜にも存在が認められた (Figure 11)。この酵母を亜ヒ酸で処理したところ、GFP-Slg1 の bud tip への局在は認められなくなり、細胞膜や細胞質内全体にその分布が広がった (Figure 11)。なお、GFP のみを Slg1 欠損酵母中に発現させた際には、GFP は細胞質内全体に分布し、亜ヒ酸で処理してもその分布はほとんど変動しなかった (Figure 11)。

以上の結果は、亜ヒ酸がヒートショックや界面活性剤処理と同様に、Slg1 およびアクチンの細胞内分布を変動させることを示している。この現象が Slg1 が示す亜ヒ酸に対する防御作用に関与しているのかもしれないが、現状ではその機構は不明であり、今後の検討が必要である。

3-3. 亜ヒ酸が Slg1 mRNA および Slg1-HA 蛋白質の細胞内レベルに与える影響

マグネシウムやカフェインによって Slg1 mRNA レベルが増加することが知られている (Jacoby *et al.*, 1998)。そこで、亜ヒ酸が Slg1 mRNA のレベルに与える影響を Northern blotting により検討したところ、亜ヒ酸処理による Slg1 mRNA レベルの変動はほとんど認められなかった (Figure 12)。次に、Slg1 欠損酵母に Slg-HA を発現させ、Immunoblotting によって Slg1-HA 蛋白質レベルを検討したところ、亜ヒ酸濃度依存的な Slg1-HA 蛋白質レベルの減少が観察された (Figure 12)。これらの結果から、亜ヒ酸は転写には影響を与えず、翻訳または翻訳後修飾に影響を与えることによって Slg-HA 蛋白質レベルを減少させていると考えられる。

酵母において翻訳後修飾により蛋白

質が分解される際には、主に proteasome 系または液胞での分解が関与している。そこで、亜ヒ酸による Slg1 蛋白質レベルの減少と液胞系との関係を検討したところ、蛋白質の液胞への輸送 (Doa4) および液胞での分解 (Pep4) に関与する因子の同時欠損により、野生型酵母で認められる亜ヒ酸による Slg1-HA 蛋白質レベルの減少がほとんど認められなくなった (Figure 13)。一方、亜ヒ酸による Slg1 蛋白質レベルの減少と proteasome 系との関係を検討するために、proteasome inhibitor である MG132 で酵母を処理したところ、MG132 による影響はほとんど認められなかった (data not shown)。これらのことから、

D. 研究発表

1. 論文発表

なし。

2. 学会発表

丹羽 貴子、黄 基旭、永沼 章：ヒ素耐性因子 Slg1 の作用機構解析. フォーラム 2006 ; 衛生薬学・環境トキシコロジー, 2006.

丹羽貴子、黄 基旭、大橋一品、永沼章：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. 第32回日本トキシコロジー学会学術年会,

亜ヒ酸による Slg1-HA 蛋白質の減少には主に液胞系での分解系が関与していると考えられる。

3-4. CD43 ノックダウンまたは CD43 高発現が亜ヒ酸感受性に与える影響

Slg1 のヒトホモログである CD43 を siRNA 法によりノックダウンした Flp-In-Jurkat 細胞は、酵母の場合と同じく亜ヒ酸高感受性を示した (Figure 14)。また、CD43 を高発現させた Flp-In-Jurkat 細胞も、酵母の場合と同様に亜ヒ酸耐性を示した (Figure 15)。

このことから、Slg1 のヒトホモログである CD43 を介したシグナル伝達も、ヒト細胞においてヒ素毒性の軽減に関与していると考えられる。

2006.

E. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

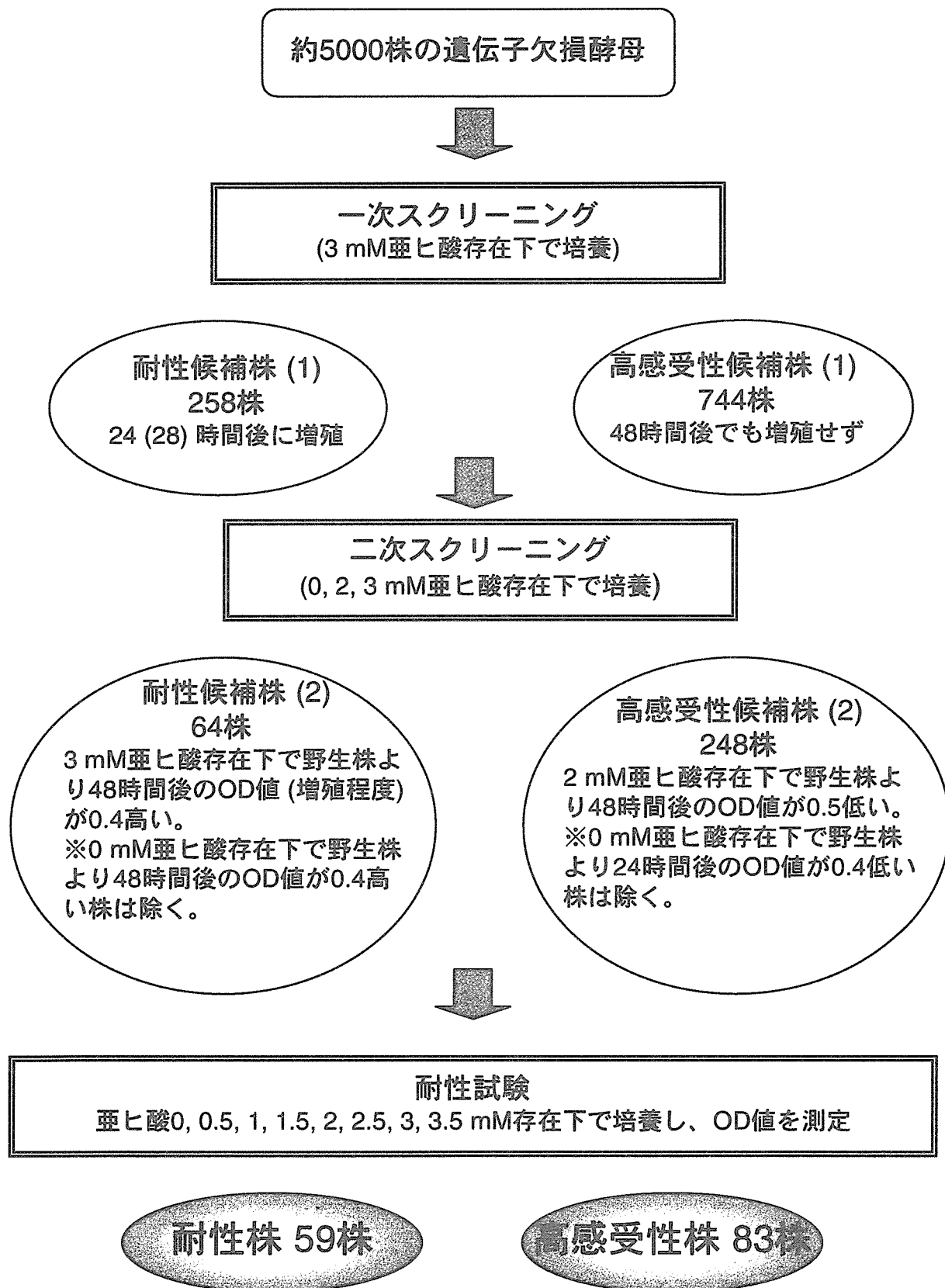


Figure 1. 遺伝子欠損酵母ライブラリーを用いた酢ヒ酸感受性に影響を与える遺伝子群のスクリーニングの流れ

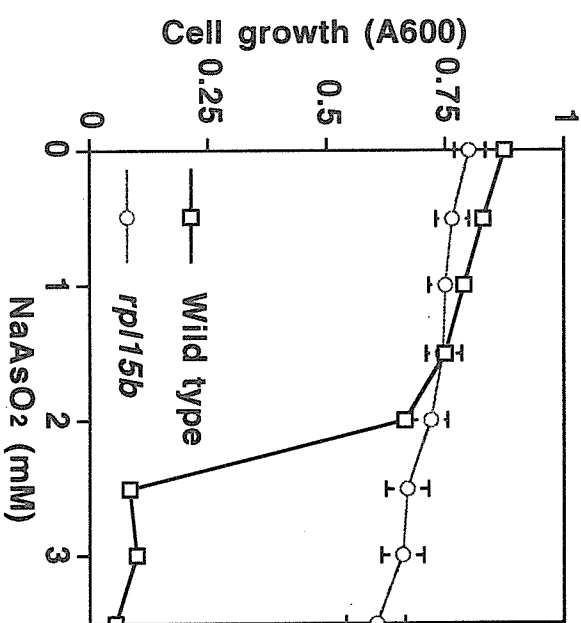
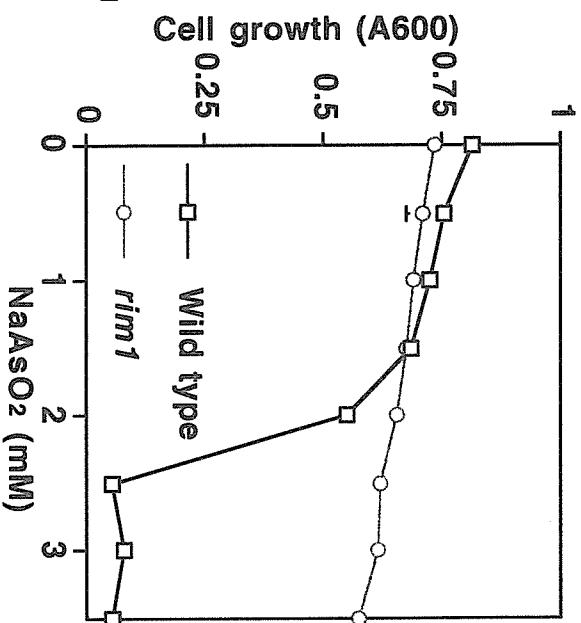
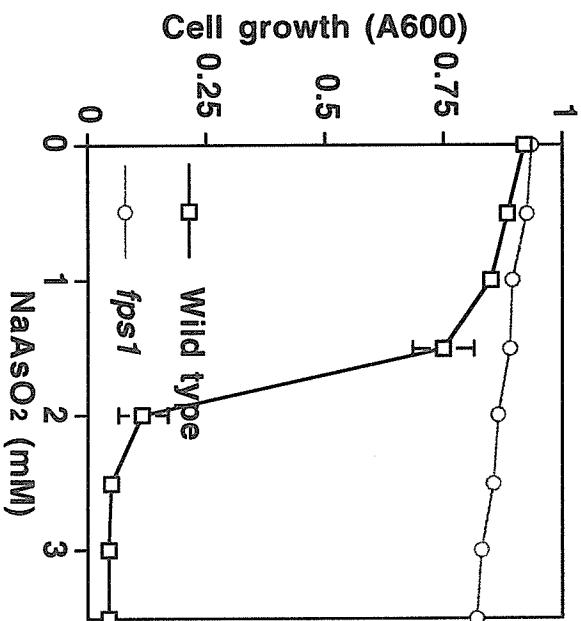
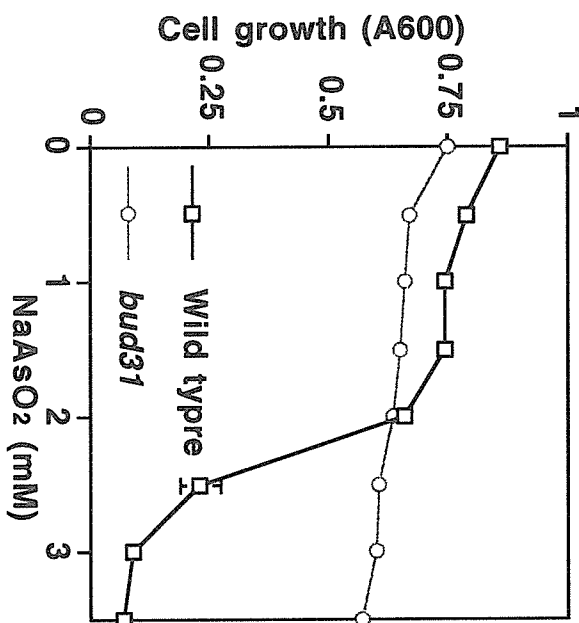
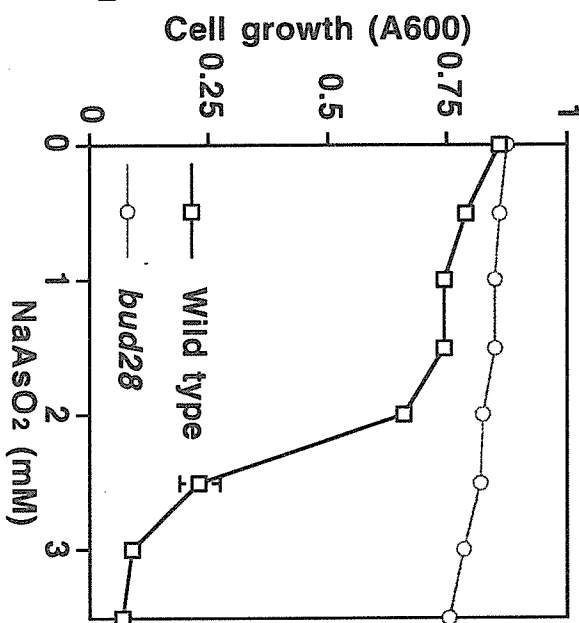
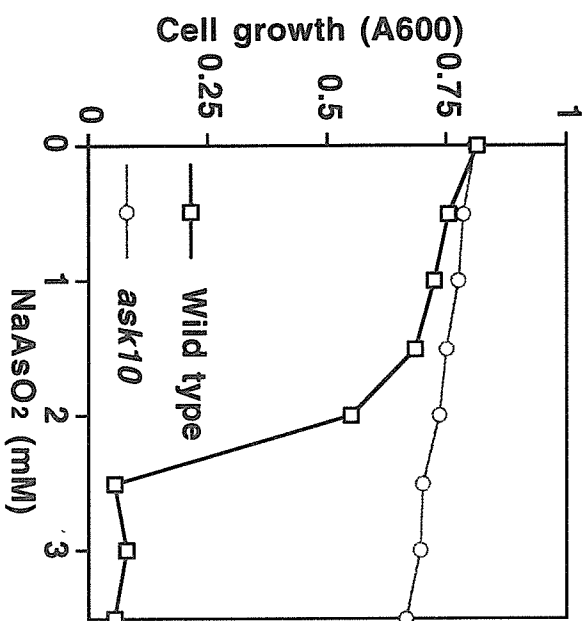


Figure 2. 欠損により酵母に亜ヒ酸耐性を与える遺伝子
 1×10⁵ cells / wellの酵母に0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5 mM とするよう亜ヒ酸を加え、30°Cで48 hr 培養後、酵母の増殖を600 nmの吸光度をもとに判定した。

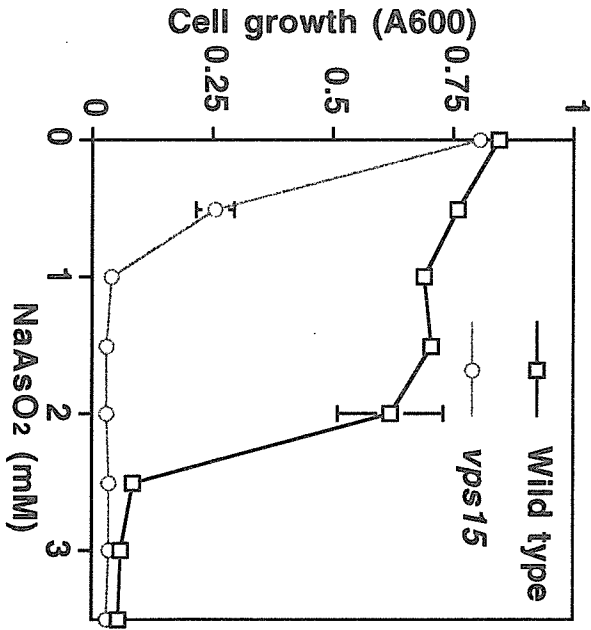
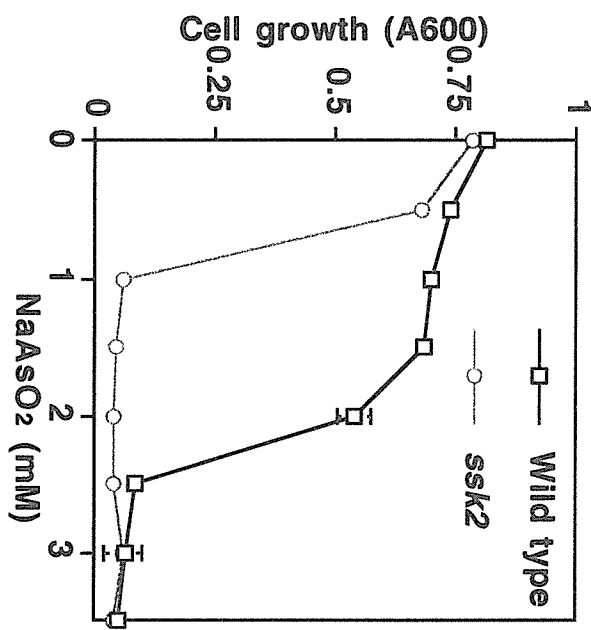
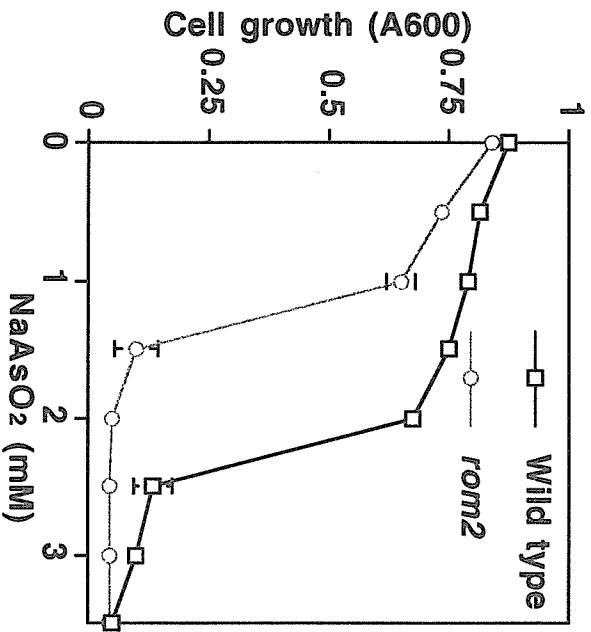
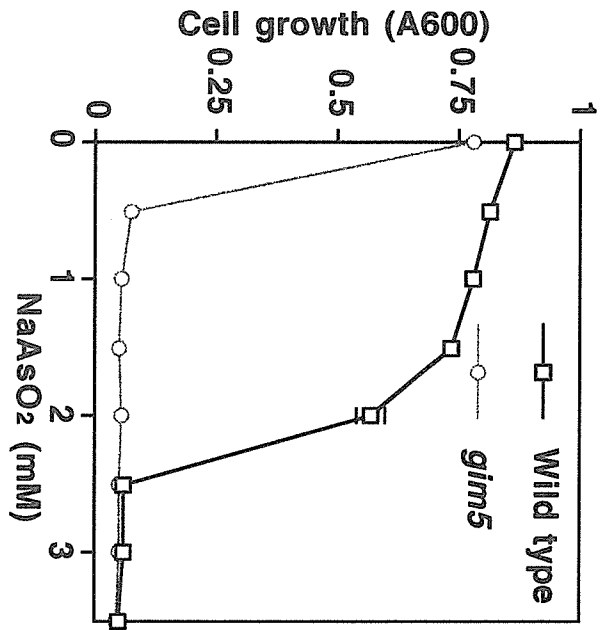
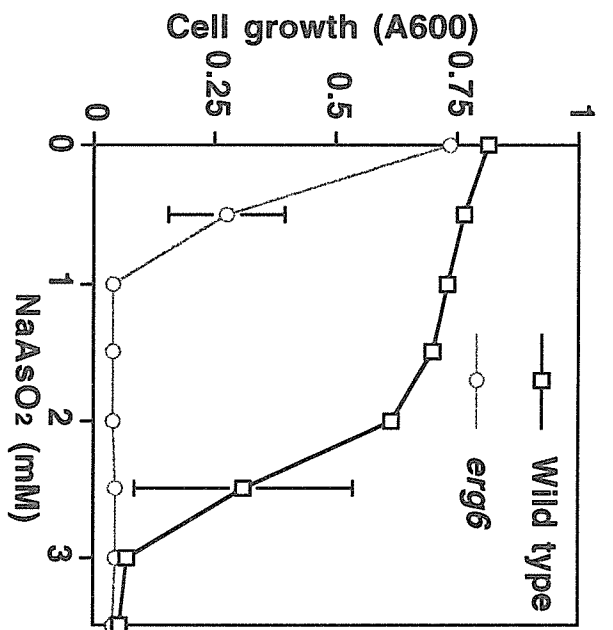
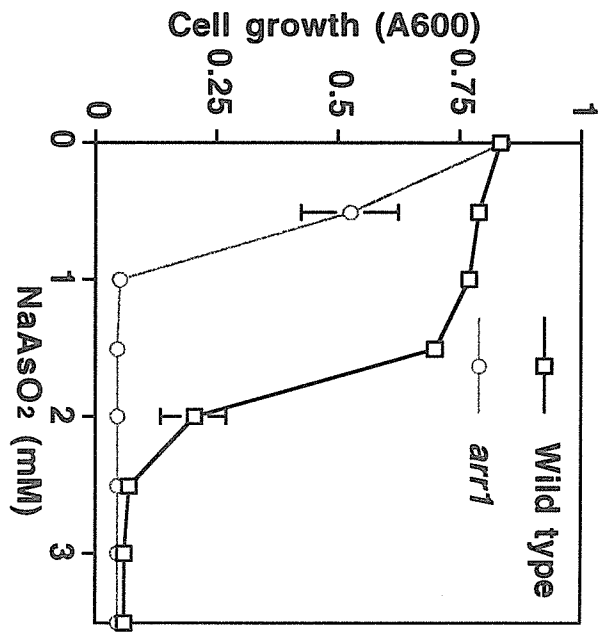


Figure 3. 欠損により酵母に亜硫酸高感受性を与える遺伝子
 1×10⁵ cells / wellの酵母に0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5 mMとなるように亜硫酸を加え、30°Cで48 hr培養後、酵母の増殖を600 nmの吸光度をもとに判定した。

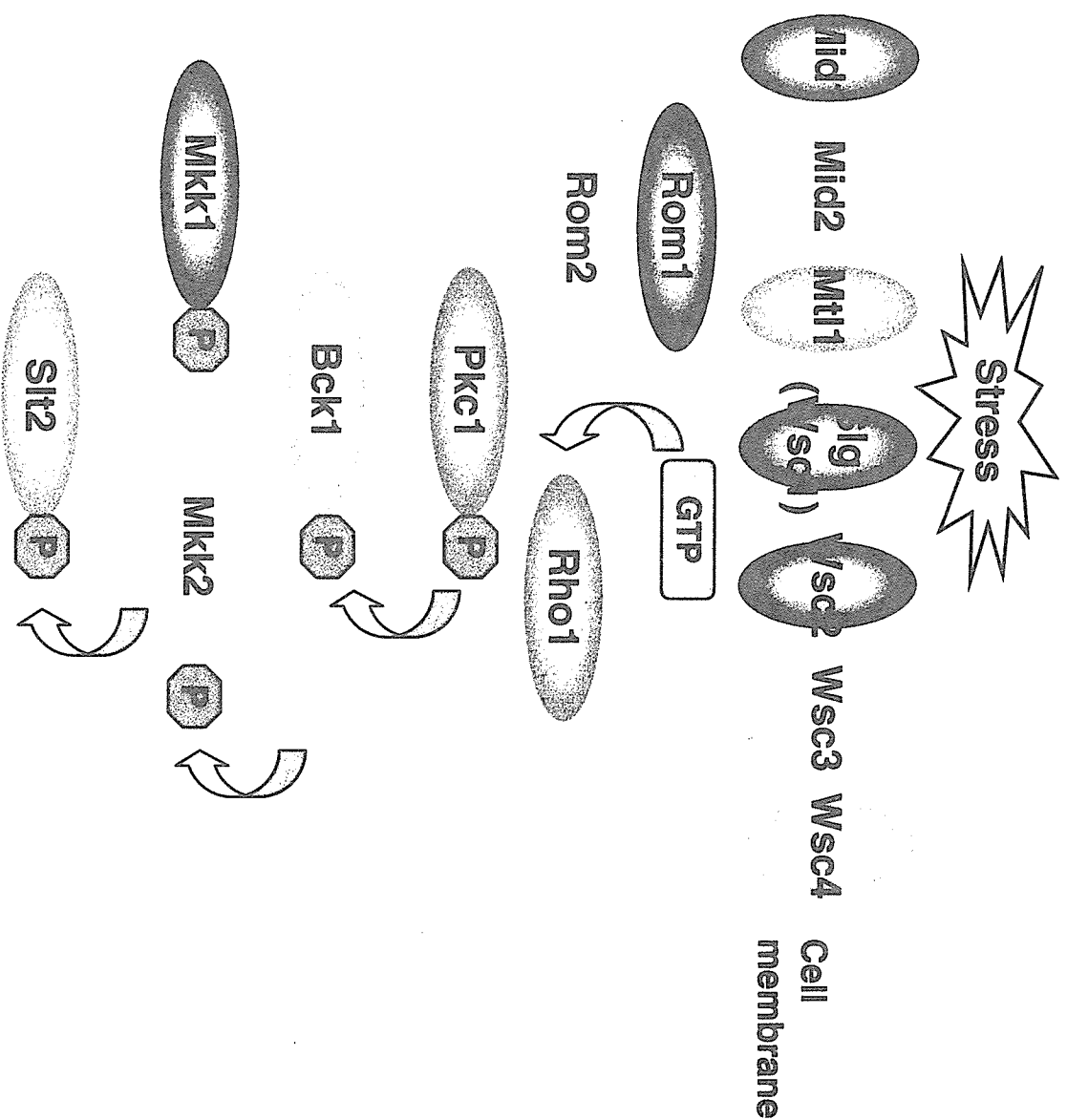


Figure 4. 酵母細胞内におけるPkc1-MAPK pathway

酵母細胞内におけるPkc1-MAPK pathwayはストレス感知受容体、small GTPase、Pkc1、MAPK cascadeの順でシグナルが伝わる。

Slg1 (Wsc1), Wsc2, Wsc3, Wsc4, Mid1, Mid2, Mit1 : ストレス感知膜受容体、Rom1, 2 : GDP/GTP exchange factor、Rho1 : small GTPase. 欠損で致死、Pkc1 : Protein kinase. 欠損で致死、Bck1 : MAPKKK、Mkk1, 2 : MAPKK、Sit2 : MAPK

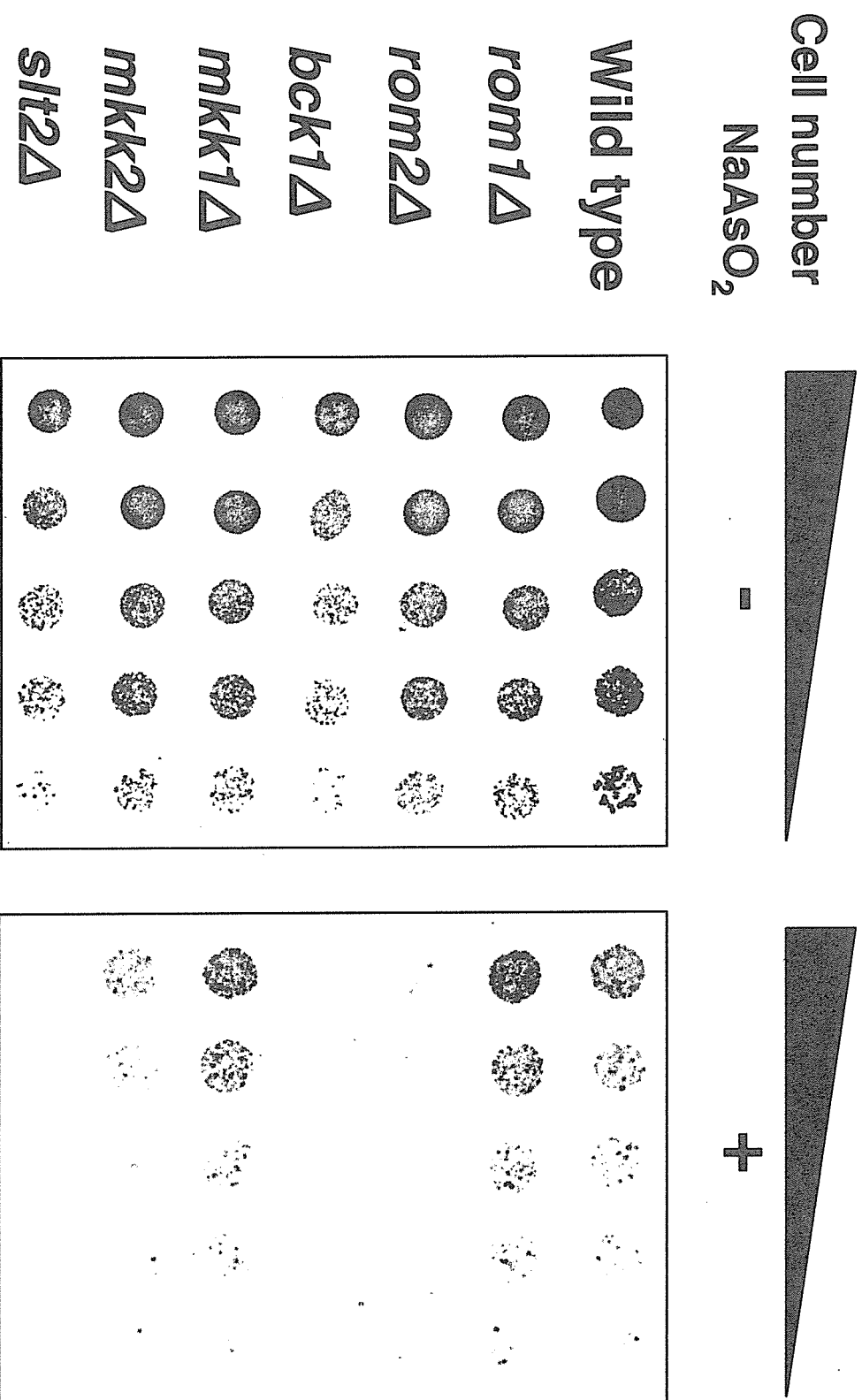


Figure 5. Pkc1-MAPK pathwayに關与する因子の欠損が亜ヒ酸感受性に与える影響
 亜ヒ酸 (0, 1.5 mM) を含む寒天培地上に、酵母を 1×10^5 , 5×10^4 , 1×10^4 , 5×10^3 , 1×10^3 cells / spot になるようにスポットテイングし、30°Cで48 hr 静置培養した。

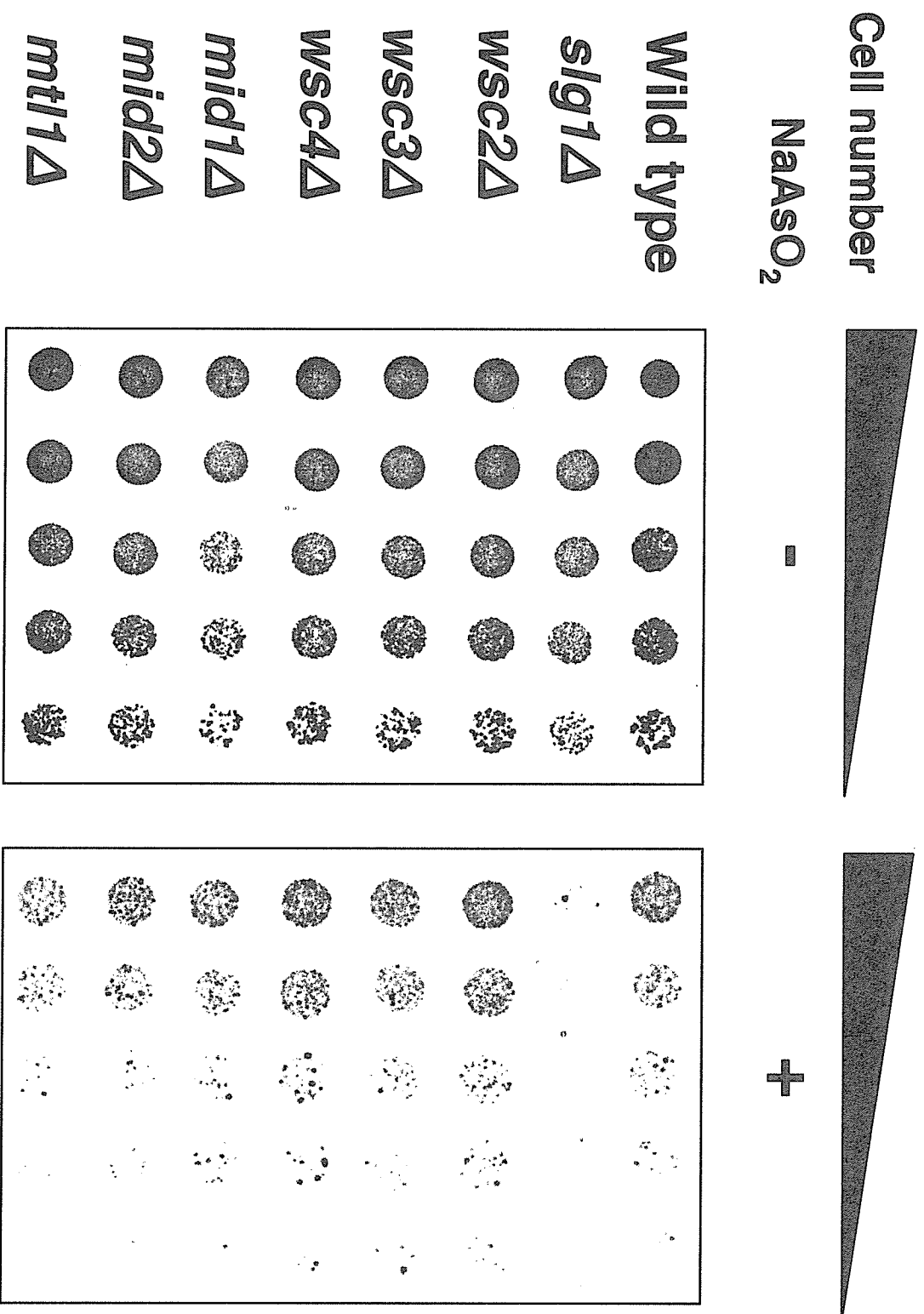


Figure 6. Pkc1-MAPK pathway 上流のストレス感受容体の欠損が亜ヒ酸感受性に与える影響
 亜ヒ酸 (0, 1.5 mM) を含む寒天培地上に、酵母を 1×10^5 , 5×10^4 , 1×10^4 , 5×10^3 , 1×10^3 cells / spot になるようにスポットインゲルし、30°C で 48 hr 静置培養した。

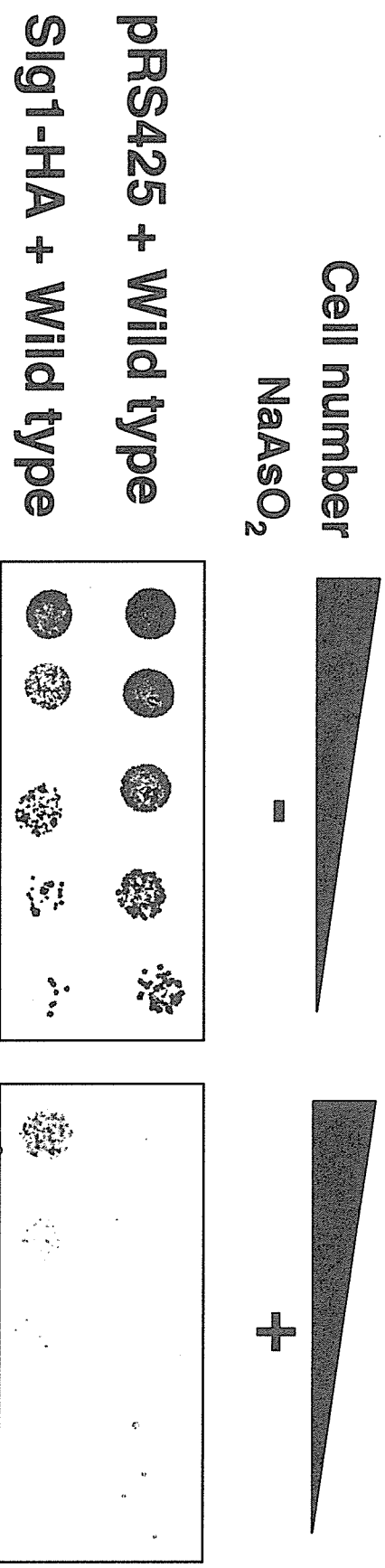
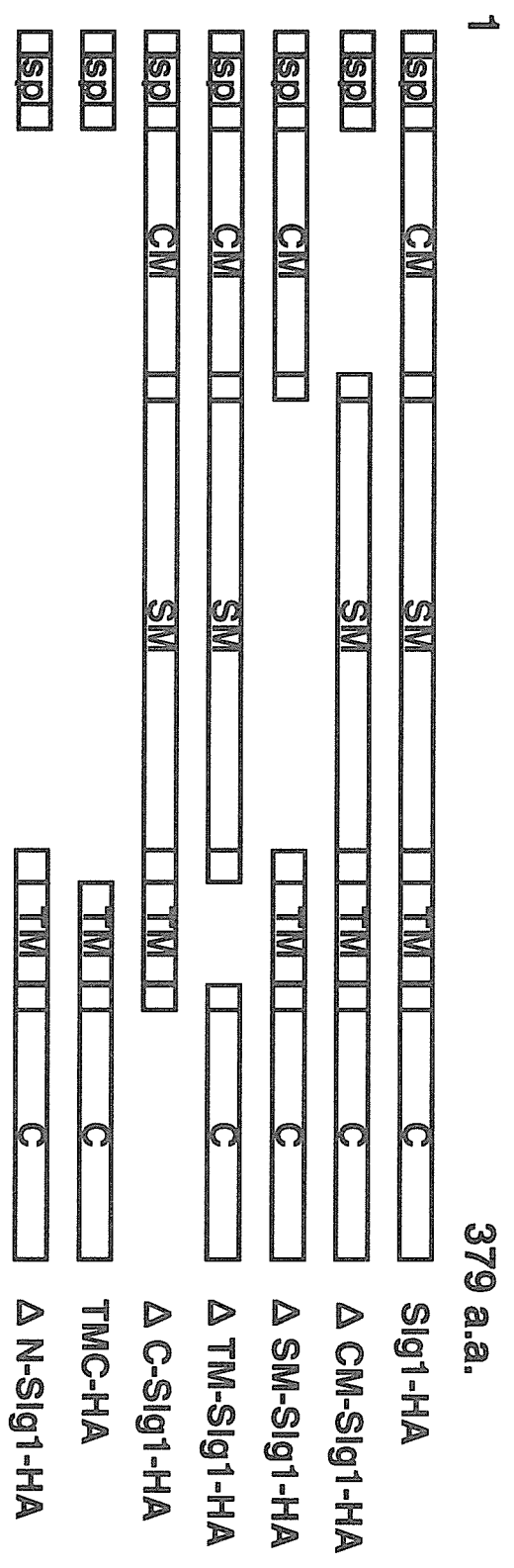


Figure 7. Slg1の高発現が亜ヒ酸感受性に与える影響

亜ヒ酸 (0, 1.5 mM) を含む寒天培地上に、酵母を 1×10^5 , 5×10^4 , 1×10^4 , 5×10^3 , 1×10^3 cells / spot になるようにスポットイングし、30°C で 48 hr 静置培養した。

A.



B.

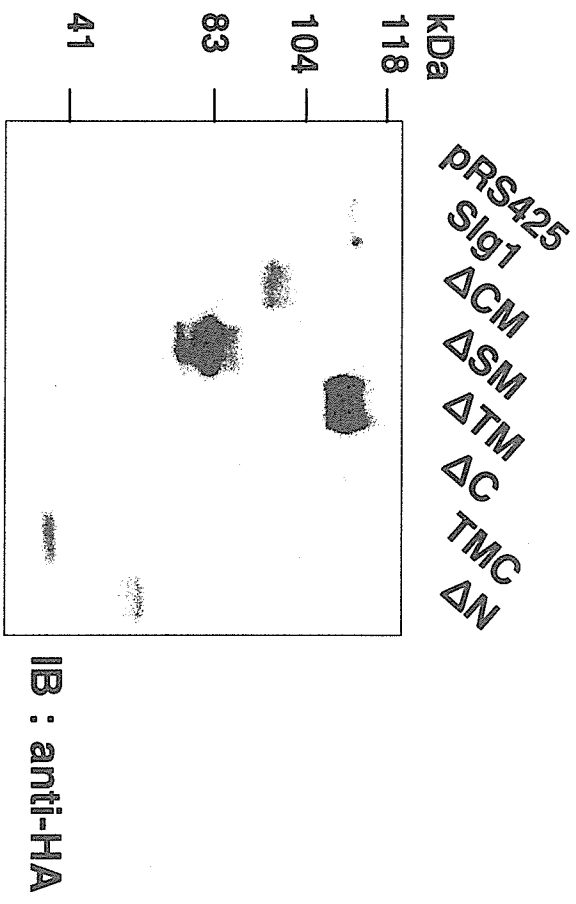


Figure 8. Slg1 truncation mutantsの発現確認

A. Slg1および様々なドメインを欠失させたSlg1 truncation mutants.

sp; signal peptide, CM; cysteine motif, SM; serine threonine motif, TM; transmembrane motif, C; C-terminus, N; N-terminus.

B. HA-tagを融合させた様々なSlg1 truncation mutantsを発現するplasmidを導入した酵母の蛋白抽出液について、抗HA抗体を用いたImmunoblottingにより、それぞれのtruncation mutantsの発現を確認をした。

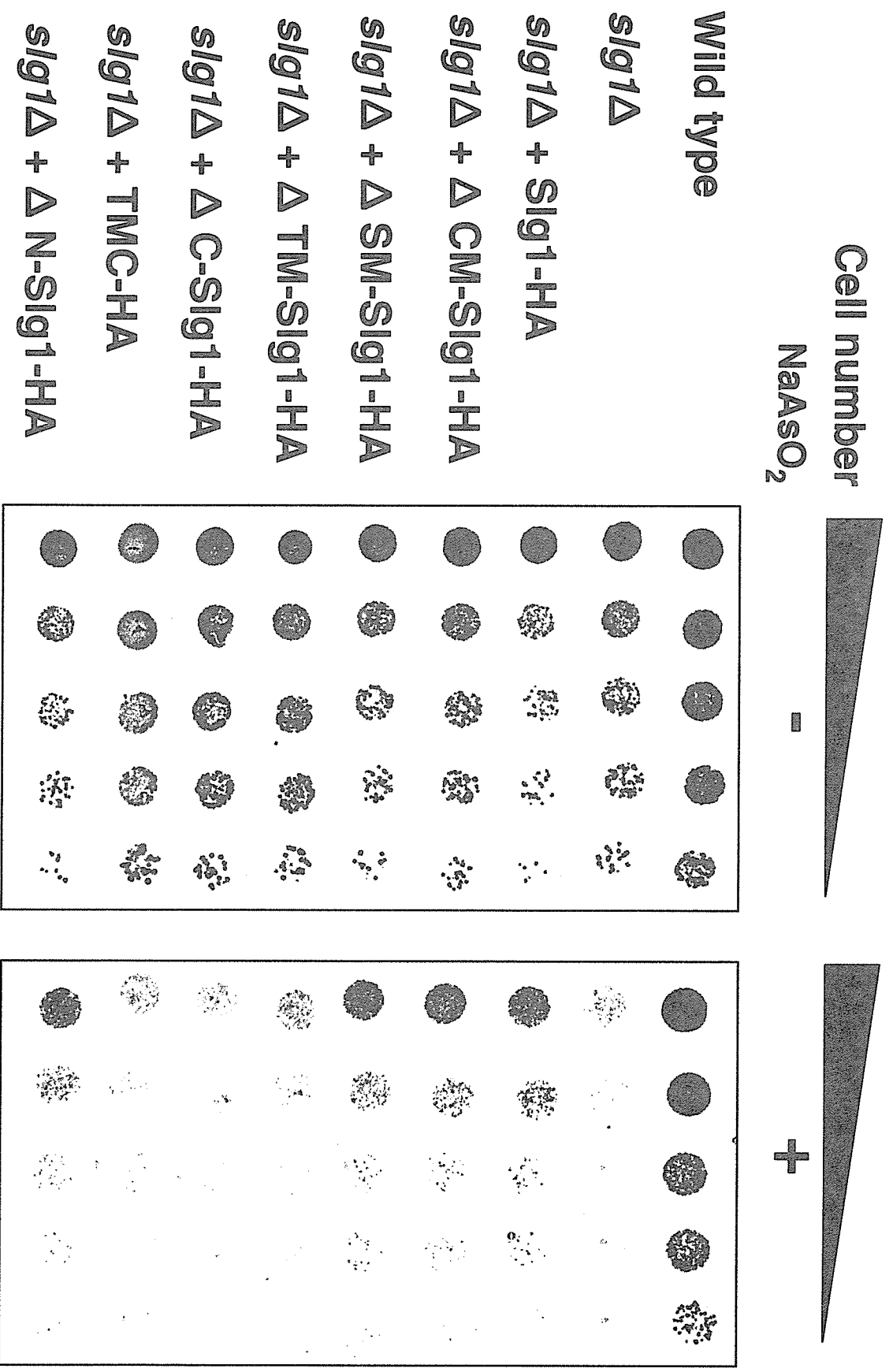


Figure 9. Slg1 欠損酵母が示す亜ヒ酸高感受性に及ぼす Slg1 truncation mutants 発現の影響
 様々な Slg1 truncation mutants を発現する plasmid を導入した Slg1 欠損酵母について、亜ヒ酸 (0, 1 mM) を含む寒天培地上に、酵母を 1×10^5 , 5×10^4 , 1×10^4 , 5×10^3 , 1×10^3 cells / spot になるようにスポットインキュベーションし、30°C で 48 hr 静置培養した。

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

Akl1 の高発現が酵母に与えるアドリアマイシン耐性機構の解析

分担研究者 久下周佐 東北大学大学院薬学研究科助教授
（協力研究者 高橋 勉 日本食品衛生協会リサーチレジデント）

高発現によって出芽酵母 にアドリアマイシン耐性を与える遺伝子として *AKL1* が同定された。Akl1 はその機能についての報告はほとんどないが、配列上の特徴からエンドサイトーシスなどの制御に関与している Ark/Prk kinase family の一つと考えられている。Ark/Prk kinase family (Ark1, Prk1 および Akl1)の中では Akl1 以外に、Prk1 が高発現によって酵母にアドリアマイシン耐性を与えた。Prk1 はエンドサイトーシスに関わる Sla1/Pan1/End3 complex 中の Sla1 および Pan1 をリン酸化して本 complex の解離を促すことが知られている。本研究によって、Akl1 が、Prk1 と同様に、Sla1/Pan1/End3 complex 中の Pan1 のリン酸化を促進し、細胞のエンドサイトーシス能の低下を引き起こすことが判明した。また、Sla1 または End3 を欠損させた酵母もそれぞれアドリアマイシン耐性を示し、両欠損酵母に Akl1 を高発現させてもアドリアマイシン耐性度の上昇は認められなかった。したがって、Akl1 は Pan1 をリン酸化することによって Sla1/Pan1/End3 complex が関与する細胞のエンドサイトーシス能を低下させることでアドリアマイシン毒性を軽減していると考えられる。また、ヒト Ark/Prk kinase family の一員である AAK1 を高発現させた HEK293 細胞がアドリアマイシン耐性を示すことも判明した。以上の結果からエンドサイトーシスが酵母細胞およびヒト細胞におけるアドリアマイシンの毒性発現に関与していると考えられる。

A. 研究目的

平成 17 年度の検討によって、エンドサイトーシスに関わるいくつかの因子の欠損が酵母をアドリアマイシンに対して高感受性にすることが判

明した。また、我々は、高発現によって酵母 にアドリアマイシン耐性を与える遺伝子として *AKL1* を同定した。Akl1 はその機能についての報告はほとんどないが、配列上の特徴からエン

ドサイトーシスなどの制御に関与する Ark/Prk kinase family の一つと考えられている。そこで、Akl1 とアドリアマイシン感受性との関係を検討した。

B. 研究方法

1. Akl1 point mutant 発現プラスミド (AKL1^{D181Y}) の作製

QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) のプロトコールに従って、template として pRS315-AKL1 を用いて PCR を行い、変異導入プラスミドを作製した。

2. Ark1 発現プラスミド (pRS315-ARK1, pRS425-ARK1) の構築

酵母 chromosome DNA を template に下記のプライマーを用いて PCR を行った。なお、PCR には TaKaRa Ex Taq™ (Takara) を用いた。PCR 産物は pTarget vector (Promega) を用いて TA クローニングを行い、pTarget-ARK1 を作製した。次に pTarget-ARK1 を *XhoI/NotI* で切断し、インサート部分 (3.1 kbp fragment) を pRS315 または pRS425 の *XhoI/NotI* site に挿入したものを pRS315-ARK1, pRS425-ARK1 とした。

3. Prk1 発現プラスミド (pRS315-PRK1, pRS425-PRK1) の構築

酵母 chromosome DNA を template に下記のプライマーを用いて PCR を行った。なお、PCR には Pyrobest® DNA polymerase (Takara) を用いた。PCR 産物を *EcoRI* で切断し、pRS314 の *SmaI/EcoRI* site に挿入し、pRS314-PRK1 を作製した。pRS314-PRK1 は *XhoI/NotI* で切断し、インサート部分 (3.5 kbp fragment) を pRS315 または pRS425 の *XhoI/NotI* site に挿入したものを pRS315-PRK1, pRS425-PRK1 とした。

4. Pan1-HA 発現プラスミド (pYES2-PAN1-HA) の構築

酵母 chromosome DNA を template に下記のプライマーを用いて PCR を行った。なお、PCR には TaKaRa Ex Taq™ (Takara) を用いた。PCR 産物は pGEM-T easy vector (Promega) を用いて TA クローニングを行い、pGEM-PAN1-HA を作製した。次に pGEM-PAN1-HA を *NotI* で切断し、インサート部分 (PAN1-HA: 4.5 kbp fragment) を pYES2 (2 μ m/pGAL1/URA3) の *NotI* site に挿入したものを pYES2-PAN1-HA とした。

5. Pan1-HA のリン酸化の検出

Pan1-HA を発現する酵母として、pYES2-PAN1-HA を導入した形質転換体を用いた。対数増殖期にある酵母 3 \times 10⁷ cells を SG (2% galactose, 3%

raffinose, ; -Leu, -Ura) 培地 30 ml に懸濁し、30°Cで4時間培養した。その培養液を集菌し、その沈殿を冷滅菌蒸留水で洗浄した後、冷10%TCAで再懸濁し4°Cで30分間インキュベートした。その後、集菌し、TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA) (pH 9.5) で2回、TE buffer (pH 7.5) で2回洗浄した後に、lysis buffer (10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 1 mM PMSF) に再懸濁した。この懸濁液に適当量のガラスビーズを加えて、4°C、30分間混和した後、20,000 x g, 20分間遠心し上清を細胞抽出液とした。この細胞抽出液に anti HA agarose beads (Sigma) を添加し、4°Cで12時間インキュベートした。さらに、遠心し、その沈殿に Sample Buffer を加えて、100°C、5分間の熱処理を行った。その後、遠心し、その上清を SDS-PAGE (7.5%) により分離した。泳動後のゲルは immobilon-P membrane (Millipore) に transfer した。この membrane を blocking solution (5% skin milk, 0.5% Tween20, TBS; Tris-buffered saline) 中でブロッキングし、1次抗体として rabbit anti-phosphothreonine antibody (Zymed) または rat anti-HA antibody (Roche)、2次抗体として peroxidase-conjugated goat

anti-rabbit immunoglobulins (Dako) または peroxidase-conjugated rabbit anti-rat immunoglobulins (Dako) を用いて immunoblotting を行った。さらに、ECL reagent (Amersham Pharmacia Biotech) を用いて化学発光させ、Lumi-Film Chemiluminescent Detection film (Roche) に露光して検出した。

6. Lucifer yellow (LY-CH) の取込み

対数増殖期にある酵母の培養液 90 μ l に 10 μ l の 40 mg/ml の lucifer yellow CH (Molecular Probe) 水溶液を添加し、30°Cで2時間培養した。その後、集菌し、phosphate-buffered saline (PBS) で3回洗浄した後に、PBSに再懸濁した。この懸濁液を蛍光顕微鏡 DMIRE2 (Leica) で観察した (FITC 用フィルター L5S)。

(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

AKL1 の高発現が酵母にアドリアマイシン耐性を与えることが明らかとなった (Fig. 1)。また、*AKL1* 遺伝子をシングルコピー系プラスミド pRS315 を用いて発現させてもアドリ

アマイシン耐性が認められたことから、酵母がアドリアマイシン耐性を得るには野生株中の細胞内 Ak11 レベルが数倍上昇するだけで十分であると考えられる (see Fig. 3)。

Ak11 はそのアミノ酸配列上の特徴から、エンドサイトーシスの制御に関与するセリン/スレオニンキナーゼとして知られる Ark/Prk kinase family に分類されている。しかしながら、Ak11 の機能についてはほとんど解析されていない。そこで、まず Ak11 の高発現によるアドリアマイシン毒性軽減作用における Ak11 のキナーゼ活性の関与を調べるために Ak11 のキナーゼドメイン中の点変異体 (Ybr059c^{D181Y}) を発現するプラスミドを作製した。Ark/Prk kinase family はすべて N 末端側にキナーゼドメインを有しており、Prk1 の場合にはこのドメイン中に位置する 158 番目のアスパラギン酸 (D) のチロシン (Y) への置換によってキナーゼ活性が消失することが知られている。Ak11 の場合には、181 番目のアスパラギン酸 (Asp181) がこれに対応することから、このアスパラギン酸をチロシンに置換した点変異体 (Ak11^{D181Y}) を高発現させたところ、この酵母のアドリアマイシンに対する感受性は対照株とほぼ同程度であった (Fig. 2)。なお、後述するように Ak11 がキナーゼ活性

を有すること、および Asp181 がこのキナーゼ活性に必須なことを確認している (see Fig. 5a)。このことから Ak11 高発現によるアドリアマイシン耐性獲得には Ak11 のキナーゼ活性が必要であると考えられる。

Ak11 は Ark/Prk kinase family に属する Ark1 および Prk1 と相同性の高いキナーゼドメインを有していることから、Ark1 および Prk1 と同様の機能を有すると考えられる。そこで、Ark1 または Prk1 を高発現する酵母のアドリアマイシンに対する感受性を調べた。その結果、Ark1 高発現酵母の感受性は対照酵母と同程度であったが、Prk1 高発現酵母は Ak11 高発現酵母よりは弱いものの明らかなアドリアマイシン耐性を示した (Fig. 3A)。また、Ark/Prk kinase family をそれぞれ欠損させた酵母のアドリアマイシン感受性を調べたところ、Ark1 欠損酵母はわずかに高い感受性を示したのみであったが、Ak11 または Prk1 を欠損した酵母は著しく高い感受性を示した (Fig. 3B)。したがって酵母におけるアドリアマイシン毒性の発現に Ak11 と Prk1 が密接に関与しているが、Ark1 の関与は少ないものと考えられる。

Prk1 は Sla1/Pan1/End3 complex 中の Sla1 および Pan1 をリン酸化してこの complex の解離を促進することに

よってエンドサイトーシスを負に制御していると考えられている。Sla1/Pan1/End3 complex は解離するとその機能を失うため、Sla1 または End3 を欠損した細胞はエンドサイトーシス能が低い。なお、Pan1 は酵母の増殖に必須のタンパク質である。そこで、Sla1 および End3 をそれぞれ欠損した酵母のアドリアマイシン感受性を調べた。その結果、Sla1 および End3 の各欠損酵母は顕著なアドリアマイシン耐性を示した (Fig. 4)。また、Sla1 および End3 各欠損酵母にそれぞれ Ak11 を高発現させても耐性度の上昇は認められなかった (Fig. 4)。これらの結果から Ak11 高発現によるアドリアマイシン毒性軽減作用には Sla1 および End3 の存在が必須であると考えられる。

Ak11 高発現によるアドリアマイシン耐性に Pan1 および Sla1 のリン酸化を介した Sla1/Pan1/End3 complex の解離が関与している可能性が考えられたので、次に、C 末端に HA-tag を連結させた Pan1 (Pan1-HA) を発現する酵母を用いて Ak11 高発現が Pan1 のリン酸化に及ぼす影響を検討した。その結果、アドリアマイシン耐性を示す Ak11 および Prk1 の高発現酵母において Pan1-HA 蛋白質のリン酸化の促進がみられたが、アドリアマイシン耐性を示さない Ark1 の高発現および Ak11

の点変異体 (Ak11^{D181Y}) の高発現は Pan1-HA 蛋白質のリン酸化に影響を与えなかった (Fig. 5A)。以上の結果は Ak11 高発現によるアドリアマイシン耐性獲得に Pan1 のリン酸化が関与することを強く示唆している。

Prk1 の高発現は細胞のエンドサイトーシス能の低下を引き起こすことが知られているが、Ak11 高発現がエンドサイトーシスに与える影響について検討した例はない。そこで、蛍光色素 lucifer yellow の取込みを指標に Ak11 高発現酵母の液性エンドサイトーシス能を調べた。その結果、Ak11 高発現による lucifer yellow の取込み量の減少が認められ (Fig. 5B)、Ak11 高発現酵母も Sla1 欠損酵母と同様にエンドサイトーシス能が低下していることが明らかとなった。また、キナーゼ活性を持たないと考えられる Ak11 の点変異体 (Ak11^{D181Y}) の高発現酵母ではエンドサイトーシスの異常が認められなかった (Fig. 5B)。これらの結果から、Ak11 は Prk1 と同様に、Pan1 のリン酸化を介して Sla1/Pan1/End3 complex の解離を促進させることによって細胞のエンドサイトーシス能を負に制御しているものと考えられる。

酵母細胞において Ark/Prk kinase family の Prk1 および Ak11 がアドリアマイシン耐性獲得機構に関与する

ことが明らかとなった。哺乳動物細胞では adaptor-associated kinase 1 (AAK1) および cyclin-G-associated kinase (GAK) が Ark/Prk kinase family として知られている。また、AAK1 の高発現は transferrin receptor や low-density lipoprotein (LDL)-receptor related protein などの膜蛋白質のエンドサイトーシスを低下させることも報告されている。そこで、ヒト細胞におけるアドリアマイシン耐性獲得機構への Ark/Prk kinase family の関与を調べるため、HEK293 細胞に N 末端に HA-tag を連結させた AAK1 (HA-AAK1) を導入し (Fig. 6A)、アドリアマイシン感受性を検討した。その結果、AAK1 を高発現する HEK293 細胞もアドリアマイシン耐性を示した (Fig. 6B)。また、HEK293 細胞のみならず HeLa 細胞においても AAK1 高発現によるアドリアマイシン耐性が確認された (data not shown)。以上の結果から、酵母細胞のみならずヒト細胞においても Ark/Prk kinase family がアドリアマイシン耐性獲得に関与している可能性が考えられる。

本研究において、Ak11 の高発現が出芽酵母にアドリアマイシン耐性を与えることが判明した。Ak11 は N 末端にキナーゼドメインを有しており、そのアミノ酸配列上の特徴から、Ark/Prk kinase family に属するセリ

ン/スレオニンキナーゼと考えられている。Ark/Prk kinase family に属する蛋白質として Ak11 以外に Prk1 および Ark1 が知られているが、Prk1 および Ark1 はそれぞれ異なる蛋白質をリン酸化することが報告されている。本研究において、Prk1 の高発現は酵母にアドリアマイシン耐性を与えたものの、Ark1 の高発現は酵母のアドリアマイシン感受性に影響を与えなかった (Fig. 3A)。この結果は、Ak11 が Prk1 と同様の機構でアドリアマイシン耐性に関与している可能性を示唆している。

本研究によって、Ak11 が Prk1 と同様に、エンドサイトーシスに関与する Sla1/Pan1/End3 complex 中の Pan1 をリン酸化することが初めて明らかとなり、Asp181 がそのキナーゼ活性に必須であることも確認された (Fig. 5A)。Pan1 がリン酸化されると Sla1/Pan1/End3 complex は解離して活性を失うため、細胞のエンドサイトーシス能が低下し、そのために酵母がアドリアマイシン耐性を示すものと考えられる。

Sla1/Pan1/End3 complex はエンドサイトーシス経路中の internalization step の制御に関与することが知られている。このエンドサイトーシスの internalization step に関与する他の因子、すなわち

Sla2、Vrp1 または Rvs161 の各欠損酵母もそれぞれ顕著なアドリアマイシン耐性を示した (unpublished data)。また、エンドサイトーシスの post-internalization step に関与する Vps23 および Vps27 を欠損した酵母のアドリアマイシン感受性は対照酵母とほぼ同程度であった (data not shown)。したがって、エンドサイトーシス経路中の internalization step が抑制されるとアドリアマイシンの毒性が発現しにくくなると考えられる。

エンドサイトーシスは様々な物質の細胞内への取込みに関与することからエンドサイトーシスの低下によってアドリアマイシンの細胞内への取込みが減少する可能性が考えられる。また、エンドサイトーシスの低下が、アドリアマイシンの排出に関わるトランスポーターである Pdr5 の安定性を増大させるとの報告がある。しかしながら、Ak11 高発現による細胞内アドリアマイシン蓄積量の減少は認められず、むしろわずかな増加が観察された (data not shown)。したがって、Ak11 高発現酵母の示すアドリアマイシン耐性は少なくとも細胞内アドリアマイシン蓄積量の減少によるものではないと考えられる。Chen らはアドリアマイシン耐性因子として carcinoembryonic antigen に関連し

た膜蛋白質 p95 を同定している。この p95 の関与するアドリアマイシン耐性機構はほとんど解析されていないが、p95 の過剰発現細胞は細胞内のアドリアマイシン濃度が低下することなくアドリアマイシンに対して耐性を示す。Ak11 高発現によるエンドサイトーシス能の低下が、薬剤排出に関与しない p95 のような膜蛋白質の安定性を増大することで酵母にアドリアマイシン耐性を与えている可能性も考えられる。また、アドリアマイシンは細胞膜に障害を与えることが知られており、ある種のアドリアマイシン耐性細胞はこの細胞膜障害作用に抵抗性を示すことから、何らかの細胞膜の変化(脂質構成成分の変化など)がアドリアマイシン耐性に関与している可能性が示唆されている。脂質のホメオスタシスにエンドサイトーシスが関与しているとの報告があることから、エンドサイトーシスは脂質構成成分の制御を介してアドリアマイシン毒性発現に関わっているのかもしれない。

ヒト細胞においてアドリアマイシンが細胞骨格形成に障害を与えるとの報告がある。また、アドリアマイシンによる心毒性発現機構にアクチン骨格形成が関与しているとの報告もある。Ark1 および Prk1 はエンドサイトーシスの制御だけでなく細胞骨格形

成にも関与することが知られている。したがって、細胞骨格形成における Ark/Prk kinase family の機能がアドリアマイシン毒性に関与する可能性も否定できない。

一方、ヒト Ark/Prk kinase family の一員である AAK1 の高発現が HEK293 細胞および HeLa 細胞にアドリアマイシン耐性を与えることも判明した (Fig. 6)。AAK1 は adaptor protein である AP2 μ のリン酸化を介して、エンドサイトーシスの internalization step を制御していると考えられている。したがって、酵母細胞のみならずヒト細胞においてもキナーゼ依存的なエンドサイトーシスの制御機構がアドリアマイシン毒性発現機構に関与している可能性が考えられる。これまでにエンドサイトーシスとアドリアマイシン耐性の関係について検討した報告はなく、本研究結果はアドリアマイシンの新しい毒性発現機構および耐性獲得機構の解明に有用な知見を与えるものと考えられる。

D. 研究発表

1. 論文発表

Takahashi T, Furuchi T, Naganuma A, Endocytic Ark/Prk kinases play a critical role in adriamycin resistance in both yeast and mammalian cells,

Cancer Res 2006; 66: 11932-11937.

2. 学会発表

廣瀬健一郎、高橋 勉、永沼 章：酵母プロテインホスファターゼ Ptc1 欠損によるアドリアマイシン毒性増強機構におけるリボソーム蛋白質 Rpl12a および Rpl12b の関与. フォーラム 2006；衛生薬学・環境トキシコロジー, 2006.

高橋 勉、永沼 章：Akr/Prk kinases family 高発現によるドキソルビシン耐性. 第 65 回日本癌学会学術総会, 2006.

廣瀬健一郎、高橋 勉、永沼 章：酵母プロテインホスファターゼ Ptc1 欠損によるアドリアマイシン毒性増強機構の解析. 第 32 回日本トキシコロジー学会学術年会, 2006.

E. 知的財産権の出願・登録状況なし。

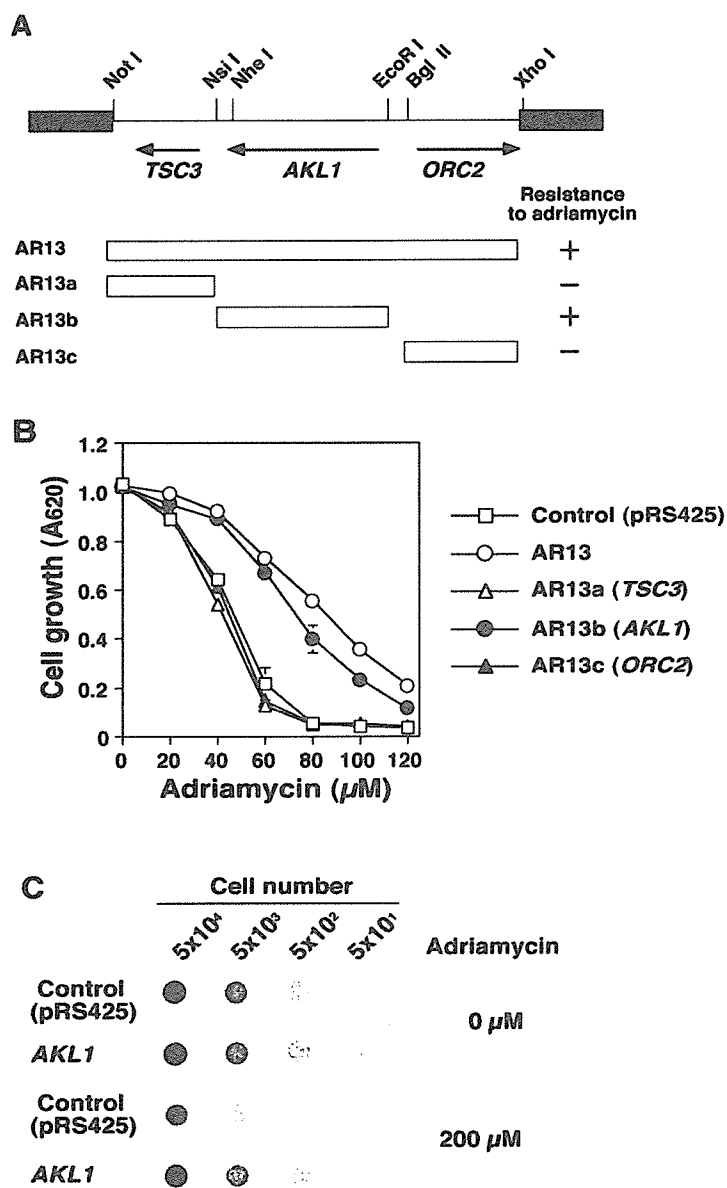


Figure 1 Identification of *AKL1* as an adriamycin-resistance gene. (A) Restriction map of the genomic DNA insert in plasmid AR13. The thick black line represents the vector pRS425; the thin line represents the genomic DNA insert. Vertical lines above the genomic DNA insert indicate the restriction sites used to generate different subclones. The ability of three subclones (AR13a, AR13b, and AR13c) to confer resistance to adriamycin is indicated (+, conferred resistance; -, did not confer resistance). ORFs are indicated by arrows that point in the direction of transcription, with the name of each ORF given below the respective arrow. (B) Sensitivity to adriamycin of yeast cells that harbored plasmids with the indicated inserts. Yeast strains (W303B) carrying plasmids AR13a, AR13b, AR13c, or pRS425 were grown in SD (-Leu) medium that contained adriamycin. After incubation for 48 hr at 30 °C, absorbance was measured spectrophotometrically at 620 nm. Each point represents the mean value of results from three cultures with S.D. (bar). The absence of a bar indicates that the S.D. falls within the symbol. (C) Effects of overexpression of *Akl1* on the sensitivity of yeast cells to adriamycin. Yeast cells were incubated in the presence of adriamycin for 3 h and washed with SD (-Leu) medium. Then yeast cells were grown on a plate of agar-solidified SD (-Leu) for 24 hr.