

った。Reg1 欠損酵母では、Snf1 kinase complex のキナーゼ活性が亢進しており、Mig1 の活性が抑制されているため、Mig1 高発現による亜ヒ酸耐性が認められないと考えられる。以上の結果から、Reg1 欠損は Snf1 kinase complex の Mig1 のリン酸化（不活性化）を亢進することによって亜ヒ酸毒性を増強すると考えられる。また、亜ヒ酸処理によって、Mig1 のリン酸化が亢進することが明らかとなった。したがって、リン酸化を介した Mig1 の不活性化が、亜ヒ酸の毒性発現においても重要な役割をしている可能性が考えられる。また、Reg1 の欠損により、Mig1 のリン酸化の亢進が認められた。Reg1 欠損酵母は恒常的に亜ヒ酸耐性因子である Mig1 のリン酸化（不活性化）が亢進しているため、亜ヒ酸に対して高い感受性を示すのかもしれない。また、ヒト細胞において、PP1 の阻害剤である tautomycin が亜ヒ酸感受性を増大させることが明らかとなった。したがって、酵母細胞のみならずヒト細胞においても PP1 complex が亜ヒ酸発現機構に関与している可能性が考えられる。

#### A. 研究目的

我々は全ゲノム配列が決定されており、遺伝的解析が容易な出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) を真核細胞生物のモデルとして用い、ヒ素化合物の中でも特に毒性の強い3価の無機ヒ素である亜ヒ酸の毒性発現機構の全容解明を目指している。これまでに、欠損により出芽酵母の亜ヒ酸に対する感受性を増強させる細胞内因子として同定した因子の中に Reg1 がある。Reg1 はホスファターゼ活性を持つ Glc7 と protein phosphatase type 1 (PP1) complex を形成しており、Reg1 欠損により PP1 complex の活性が低下することが知られている。PP1 complex は出芽酵母の糖代謝を司る Ser/Thr キ

ナーゼである Snf1 kinase complex の脱リン酸化を促進し、その kinase 活性を抑制している。しかしながら、これまでに PP1 complex と薬毒物感受性との関係についてはほとんど検討されていない。そこで、本研究では、PP1 complex と亜ヒ酸毒性増強機構との関わりについて検討をした。

#### B. 実験方法

##### 1. 酵母への plasmid の導入

酵母の形質転換は酢酸リチウム法により行った。YPAD 培地 2 mL で一晚培養した酵母を YPAD 培地 50 ml で  $2 \times 10^6$  cells/mL となるように希釈し、 $1 \times 10^7$  cells/mL となるまで培養した。その後、集菌した酵母を 100 mM の酢酸リチウ

ム溶液で  $1 \times 10^9$  cells/mL となるように懸濁し 30°C で 15 分間インキュベートした。この懸濁液 50  $\mu$ L に DNA を 0.5  $\mu$ g、熱変性させた salmon sperm DNA を 50  $\mu$ g、40% polyethylene glycol (4000) を 300  $\mu$ L 加え、30°C で 30 分間インキュベートした。さらに、42°C で 15 分間、heat shock を行った後に集菌し、滅菌水 200  $\mu$ L に懸濁して全量を SD 寒天培地に播き、30°C で 48 時間培養して得られたコロニーを plasmid 導入酵母とした。

## 2. 酵母の各種薬剤に対する感受性の検討

酵母を SD 培地で一晚培養した後、この培養液を SD 培地で  $1 \times 10^4$  cells/180  $\mu$ L となるように希釈した。この希釈培地を 96 well plate に  $1 \times 10^4$  cells/well になるように添加後、さらに薬物溶液を 20  $\mu$ L (亜ヒ酸；最終濃度 0~2 mM) (塩化カドミウム；最終濃度 0~25  $\mu$ M) (塩化銅；最終濃度 0~6 mM) (メチル水銀；最終濃度 0~140 nM) (塩化亜鉛；最終濃度 0~14 mM) を添加して 30°C で 48 時間培養した。その後、600 nm における吸光度を Benchmark Plus™ (Bio-Rad) で測定して酵母の増殖を調べた。

## 3. 二重欠損酵母株の作成 (*snf1* $\Delta$ *reg1* $\Delta$ )

分裂酵母 (*Saccharomyces pombe*)

由来の *HIS5* 遺伝子を持つ plasmid pUG27 のプロモーターおよびターミネーターの塩基配列と、欠損株で用いた kanamycin 耐性遺伝子 *kanMX4* のプロモーターおよびターミネーターの塩基配列が同じであることを利用して、*HIS5* 遺伝子マーカーによる gene disruption cassette の作成を行った。Complete set of *Saccharomyces cerevisiae* gene deletion strains (Euroscarf) の *SNF1* 遺伝子欠損株に、PCR で増幅した *HIS5* フラグメントを酢酸リチウム法により導入し、得られた histidine 非要求性コロニーを kanamycin 耐性遺伝子マーカーが *HIS5* マーカーに置き換わった *SNF1* 遺伝子欠損株 (*snf1::HIS5*) 候補とした。

Kanamycin 耐性遺伝子マーカーの *HIS5* マーカーへの置換を確認するために glass beads 法によって遺伝子欠損株候補から chromosomal DNA の回収を行った。得られた chromosomal DNA を template として *SNF1* 遺伝子の外側に設計した primer (*SNF1*-A) を用いて PCR を行い、その PCR 産物の大きさをアガロース電気泳動で調べることにより、*HIS5* マーカーによって *SNF1* 遺伝子が置換されたことを確認した。また、この PCR 産物を二重欠損株の作成に用いた。

作製した *SNF1* 遺伝子欠損株作製用カセットを酢酸リチウム法により

*REG1* 遺伝子欠損株 (*reg1::kanMX4*) に導入し、得られた histidine 非要求性コロニーを遺伝子欠損株 (*reg1::kanMX4*, *snf1::HIS5*) 候補とした。*SNF1* 遺伝子の欠損の確認を行うために glass beads 法によって遺伝子欠損株候補から chromosomal DNA の回収を行った。得られた chromosomal DNA を template として *SNF1* 遺伝子の外側に設計した primer (*SNF1-B*) を用いて PCR を行い、その PCR 産物の大きさをアガロース電気泳動で調べることにより、*HIS5* マーカーによって *SNF1* 遺伝子が置換された酵母 (*reg1::kanMX*, *snf1::HIS5*) が作製されたことを確認した。

#### 4. 二重欠損酵母株の作成 (*mig1Δ reg1Δ*)

*SNF1*, *REG1* 二重欠損酵母株の作成と同様の方法で作成した。Complete set of *Saccharomyces cerevisiae* gene deletion strains (Euroscarf) の *REG1* 遺伝子欠損株 (*reg1::kanMX4*) に、PCR で増幅した *HIS5* フラグメントを酢酸リチウム法により導入し、kanamycin 耐性遺伝子マーカーを *HIS5* マーカーに置き換えた。

#### 5. 大腸菌への plasmid の導入および精製

コンピテントセル (XL-1 Blue) 溶

液 100  $\mu$ L に plasmid DNA 溶液 1  $\mu$ L 添加し、氷上で 30 分間静置した後に 42°C で 45 秒間、heat shock を与え、再び氷上で 2 分間静置した。その後、アンピシリン 100  $\mu$ g/mL を含む LB 寒天培地に播き、37°C で 12 時間培養した。形成されたコロニーをアンピシリン 100  $\mu$ g/mL を含む LB 培地 2 mL で 12 時間培養した後に、Gene Elute Plasmid Mini-Prep Kit (Sigma) を用いて、大腸菌より plasmid DNA を精製した。

#### 6. *SNF1* および *REG1* 高発現 plasmid (*SNF1-HA-pKT10*, *REG1-HA-pKT10*) の作製

酵母の chromosomal DNA を template として、以下に示す primer を用いて *SNF1*、*REG1* の ORF 領域を PCR (Polymerase: Pyrobest) により増幅した。得られた PCR 産物は 0.8% アガロースゲル電気泳動後に、目的サイズの DNA をアガロースゲルから切り出し、GeneClean II kit (Bio 101) を用いて精製した。得られた PCR 産物を *EcoR* I で切断し、*EcoR* I および *Pvu* II で切断した pKT10 ベクターに DNA ligation Kit Ver. 2.1 (Takara) を用いて連結した。その後、大腸菌に plasmid DNA を導入し、GeneElute Plasmid Mini-Prep Kit (Sigma) を用いて精製した。

## 7. MIG1 高発現 plasmid (MIG1-HA-pKT10) の作製

Yeast ORF Collection (Open Biosystems) の MIG1-BG1805 vector を template として、以下に示す primer を用いて MIG1 の ORF および HA tag 部分を PCR (Polymerase : PrimeSTAR) により増幅した。得られた PCR 産物は 0.8% アガロースゲル電気泳動後に、目的サイズの DNA をアガロースゲルから切り出し、GeneClean II kit (Bio101) を用いて精製した。得られた PCR 産物を *PvuII* で切断した pKT10 ベクターに DNA ligation Kit Ver. 2.1 (Takara) を用いて連結した。その後、大腸菌にプラスミド DNA を導入し、GeneElute Plasmid Mini-Prep

## 8. 変異プラスミドの作製 (SNF1<sup>K84R</sup>-HA-pKT10、SNF1<sup>T210A</sup>-HA-pKT10 および REG1<sup>I466M/F468A</sup>-HA-pKT10)

*SNF1*-HA-pKT10、*REG1*-HA-pKT10 を template として、変異を挿入するため以下に示す primer を用いて *SNF1*<sup>K84R</sup>-HA-pKT10、*SNF1*<sup>T210A</sup>-HA-pKT10 および、*REG1*<sup>I466M/F468A</sup>-HA-pKT10 を PCR (Polymerase : Pyrobest) により増幅した。得られた PCR 産物は 0.8% アガロースゲル電気泳動後に、目的サイズの DNA をゲルから切り出し、GeneClean II kit (Bio 101) を用いて精製した。得られた PCR 産物を *Dpn I* で処理する

ことにより、template として用いた変異をもたない *SNF1*-HA-pKT10、*REG1*-HA-pKT10 を切断した。その後、制限酵素反応液をコンピテントセル 100  $\mu$ L に加え、GeneElute Plasmid Mini-Prep Kit (Sigma) を用いて精製した。変異の確認はシーケンス解析により行った。

## 9. 総蛋白質抽出

酵母を 2mL の SD 培地で一晚培養した後、細胞数をカウント後、 $10^7$  cells/mL になるように 10ml の SD 培地に希釈し、さらに 30°C で 3 時間培養した。その後、集菌し、滅菌水で洗浄後、10% TCA 500  $\mu$ L 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 TE 100  $\mu$ L を加えた。4,000 rpm, 5 min, 4°C で酵母を破碎後、Lysis buffer 25  $\mu$ L を加え 100°C, 5 min で boil した。15,000 rpm, 5 min 遠心分離し、上清を細胞抽出液とした。

## 10. 亜ヒ酸処理による Mig1 リン酸化への影響の検討

酵母に Mig1-HA 蛋白質をコードする遺伝子を組み込んだ vector を導入し、SD 培地で一晚培養した。その後、50ml の SD 培地に植菌し、一晚培養した。細胞数をカウント後、 $10^7$  cells/mL になるように希釈し、さらに 30°C で 3 時間培養した。その後、最終濃度が 0,

0.5, 1.0, 2.0 mM になるように亜硝酸を添加して 90 min 培養した。集菌し、滅菌水で洗浄後、10% TCA 500  $\mu$ L 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 TE 100  $\mu$ L を加えた。4,000 rpm, 5 min, 4°C で酵母を破碎後、Lysis buffer 25  $\mu$ L を加え 100°C, 5 min で boil した。15,000 rpm, 5 min 遠心分離し、上清を細胞抽出液とした。

#### 1.1. Immunoblotting

10%のポリアクリルアミドゲルを用いて 120V で電気泳動を行った。SDS-PAGE 後、セミドライ型ブロッキング装置を用いてポリアクリルアミドゲルに含まれる蛋白質を PVDF 膜に transfer した。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、振盪して wash した後に、HRP 標識化 2次抗体 (5000 倍希釈) に浸し 1hr 振盪した。TTBS で 3 回、TBS で 1 回、振盪して wash した後に、ImmobilonWerstern を用いて化学発光させ、Versa Doc Model 5000 (Bio-rad) により検出した。

#### 1.2. 細胞培養

ヒト胎児腎由来 HEK293 細胞は

Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) に 0.06 % L-glutamine、100 U/ml penicillin G sodium、100  $\mu$ g/ml streptomycin sulfate および 10 % fetal bovine serum を添加した培地を用いて、37°C、5 % CO<sub>2</sub> 存在下で培養した。

#### 1.3. Tautomycin (PP1 阻害剤) がヒト培養細胞の亜硝酸感受性に与える影響の検討

HEK293 細胞を  $5 \times 10^3$  cells / 80  $\mu$ L D' MEM / well になるように 96 well plate に播いた。37°C、5%CO<sub>2</sub> で 24 時間培養した後、tautomycin (最終濃度 0, 100, 200, 300 nM) を 10  $\mu$ l/well ずつ添加した。12 時間後、亜硝酸 (最終濃度 0, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6  $\mu$  M) を 10  $\mu$ l/well ずつ添加し、48 時間培養後に alamer blue assay によって、細胞の生存率を測定した。

#### C. 結果・考察

##### 1. Reg1 欠損による亜硝酸毒性増強機構の解析

欠損により出芽酵母の亜硝酸に対する感受性を増強させる細胞内因子として同定された Reg1 (Fig. 1) はホスファターゼ活性を持つ Glc7 と protein phosphatase type 1 (PP1) complex を形成しており、Reg1 が欠損すると PP1 complex の活性が低下する。

PP1 complex によって活性が負に制御される Snf1 kinase complex は、Snf1、Snf4 および Sip1/Sip2/Gal83 から構成される Ser/Thr キナーゼである。細胞内のグルコースレベルが低下すると、ATP の消費が増加するため細胞内の AMP レベルが上昇する。細胞内 AMP レベルの上昇により、Snf1 の regulatory domain が上流のキナーゼ (Sak1、Elm1 および Tos1) によりリン酸化され、kinase domain が regulatory domain から解離することによって、Snf1 kinase complex は活性化状態となる (Fig. 2 参照)。一方、Reg1 は Snf1 の kinase domain と結合し Glc7 を Snf1 にリクルートすることによって Snf1 の脱リン酸化を促進し、Snf1 kinase complex の活性を抑制している (Fig. 3 参照)。そこで、Reg1 による亜ヒ酸毒性軽減機構の解明を目的として、亜ヒ酸毒性発現機構における Reg1 と Snf1 の関係について検討した。

#### 1-1. Reg1 欠損が他の金属感受性に与える影響

Reg1 欠損酵母の他の金属に対する感受性を調べたところ、カドミウム、銅、メチル水銀に対する感受性は野生型の酵母とほぼ同程度だった (Fig. 4)。また、Reg1 欠損酵母は亜鉛に対して高

感受性を示した。したがって、Reg1 は、亜ヒ酸および亜鉛の毒性に対して比較的特異的に軽減作用を示すものと考えられる。

#### 1-2. Protein phosphatase type 1 (PP1) complex と亜ヒ酸毒性との関わり

前述のように、Reg1 は Glc7 とともに PP1 complex を形成しており、ホスファターゼ活性を有する Glc7 を Snf1 へリクルートする役割を担っている。Reg1 中の Glc7 との結合部位の変異 (Reg1<sup>I466M/F468A</sup>) は PP1 complex のホスファターゼ活性を低下させることから、PP1 complex のホスファターゼ活性には Glc7 と Reg1 の結合が重要であると考えられている。そこで、Reg1 が示す亜ヒ酸毒性軽減作用における PP1 complex 活性の関与を調べるため、Reg1 中の Glc7 との結合部位の変異が亜ヒ酸感受性に与える影響を検討した。その結果、Reg1 欠損酵母に野生型の Reg1 を高発現させることによって Reg1 欠損による亜ヒ酸毒性増強作用が認められなくなったが、Reg1 欠損酵母に Reg1 変異体 (Reg1<sup>I466M/F468A</sup>) を高発現させても、Reg1 欠損酵母の亜ヒ酸感受性はほとんど変化しなかった (Fig. 5)。このことから、Reg1 が欠損すると PP1 complex のホスファタ

一ゼ活性の低下するために亜ヒ酸に対して高感受性を示すようになると考えられる。なお、Glc7は酵母の生存に必須の因子で欠損することができないため、今回は検討を行わなかった。

### 1-3. Reg1欠損による亜ヒ酸毒性増強機構におけるSnf1の関与

Snf1 kinase complexは $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ サブユニット（それぞれSnf1、Sip1/Sip2/Gal83、Snf4）から構成されるSer/Thrキナーゼで、出芽酵母の糖代謝調節に関与している。Snf1 kinase complexは細胞内のATPレベルが低下（細胞内グルコースレベルの低下）すると、キナーゼサブユニットであるSnf1のregulatory domain中の210番目のスレオニン残基がリン酸化されることで活性化状態となる（Fig. 2参照）。一方、Reg1はSnf1のkinase domainと結合しGlc7をSnf1にリクルートすることによってSnf1の脱リン酸化を促進し、Snf1 kinase complexの活性を抑制することが知られている（Fig. 3参照）。Fig. 5の結果から、Reg1欠損によるPP1 complexのホスファターゼ活性の低下が、酵母の亜ヒ酸感受性を上昇させる可能性が示された。したがって、Reg1欠損時には、Snf1 kinase complexの活性化状態が維持され、それに伴って下流へのシグナル

伝達が亢進されることによって亜ヒ酸毒性が増強される可能性が考えられる。そこで、Reg1欠損による亜ヒ酸毒性増強とSnf1 kinase complexとの関係を検討した。

Snf1 kinase complexのキナーゼ本体であるSnf1を高発現させることによって、細胞内のSnf1 kinase complexの活性上昇が期待できる。そこで、まず、Snf1高発現が酵母の亜ヒ酸感受性に与える影響を検討した。その結果、Snf1の高発現により、酵母が高い亜ヒ酸感受性を示すようになった（Fig. 6）。一方、Snf1を欠損させても酵母の亜ヒ酸感受性はほとんど変化しなかったが、Reg1欠損酵母のSnf1をさらに欠損させたところ、Reg1欠損による亜ヒ酸毒性増強作用が一部軽減された（Fig. 7）。これらの結果は、Reg1欠損による亜ヒ酸毒性増強作用にSnf1が部分的に関与していることを示唆している。なお、Snf1の欠損は酵母の亜ヒ酸に対する感受性にほとんど影響を与えなかったが、本研究で用いたSD培地中には十分量のグルコースが含まれているので、本実験条件下においては正常酵母のSnf1 kinase complexの活性は非常に低く維持されており、そのためにSnf1欠損の影響が認められなかったものと考えられる。この高グルコース存在時において、Reg1欠損によってSnf1のリン酸化の

亢進が認められたことから (Fig. 8)、本条件下でも Reg1 が欠損すれば Snf1 kinase complex の活性は上昇すると考えられる。

次に、Snf1 kinase complex のキナーゼ活性の関与を調べるため、Snf1 kinase complex の Ser/Thr キナーゼとしての機能が低い 2 種類の変異型 Snf1 (Snf1<sup>K84R</sup>; kinase domain の変異、Snf1<sup>T210A</sup>; リン酸化部位の変異) を、それぞれ Reg1/Snf1 二重欠損酵母に高発現させてその亜ヒ酸感受性を検討した。その結果、Reg1/Snf1 二重欠損酵母に野生型 Snf1 を高発現させた場合は、Reg1 単独欠損酵母と同様に亜ヒ酸高感受性が認められたが、野生型の代わりに変異型 Snf1 を高発現させた場合には、いずれの変異型 Snf1 の高発現によっても Reg1/Snf1 二重欠損酵母の亜ヒ酸感受性にほとんど影響が認められなかった (Fig. 9)。以上のことから、Reg1 欠損による亜ヒ酸の毒性増強は Snf1 kinase complex のキナーゼ活性の過剰な亢進による可能性が考えられる。

## 2. 亜ヒ酸毒性増強に関わる Snf1 kinase complex の下流因子の検索およびその作用機構解析

Snf1 kinase complex の活性化が亜ヒ酸毒性を増強する可能性が示唆された。したがって、Snf1 kinase

complex の下流因子の中に亜ヒ酸毒性の増強に関わる蛋白質が存在していると考えられる。そこで次に、これまでに報告されている Snf1 kinase complex の下流因子と亜ヒ酸毒性との関わりについて検討した。

### 2-1. 亜ヒ酸毒性増強に関わる Snf1 下流因子の検索

Snf1 kinase complex の下流因子として Mig1、Mig2、Mig3、Nrg1、Nrg2、Cat8、Adr1、Gln3 および Sip4 が知られている。これら因子の各欠損酵母の亜ヒ酸感受性を検討したところ、Mig1 のみが欠損により酵母の亜ヒ酸感に対する受性を上昇させ、その他の因子の欠損は亜ヒ酸感受性にほとんど影響を与えなかった (Fig. 10)。以上のことから、Mig1 が亜ヒ酸毒性増強に関わる Snf1 の下流因子の一つであると考えられる。

### 2-2. Reg1 欠損による亜ヒ酸毒性増強機構における Mig1 の関与

Mig1 は、糖代謝に関与するタンパク質群 (Gal1、Suc2、Mal1 など) の転写抑制因子で、Snf1 kinase complex によってリン酸化されることで核から細胞質への移行が亢進し、その活性が抑制される。Reg1 欠損による亜ヒ酸毒

性増強機構における Mig1 の関わりを明らかにするため Reg1/Mig1 二重欠損酵母を作製し、亜ヒ酸感受性を調べた。その結果、Reg1 欠損酵母の Mig1 をさらに欠損させても、Reg1 欠損酵母の亜ヒ酸感受性はほとんど影響を受けなかった (Fig. 11)。この結果は、Mig1 および Reg1 の欠損が同一の経路を介して亜ヒ酸の毒性を増強している可能性を示唆している。

次に、Mig1 の高発現が亜ヒ酸感受性に与える影響について検討したところ、Mig1 の高発現酵母は、亜ヒ酸耐性を示すことが明らかになった (Fig. 12)。一方、Reg1 欠損酵母に Mig1 を高発現させた場合には Mig1 高発現による亜ヒ酸耐性はほとんど認められなかった (Fig. 13)。Reg1 欠損酵母では、Snf1 kinase complex のキナーゼ活性が亢進しており、Mig1 の活性が十分に抑制されているため、Mig1 高発現による亜ヒ酸耐性が認められないと考えられる。以上の結果から、Reg1 が欠損すると、Snf1 kinase complex による Mig1 のリン酸化 (不活性化) が亢進することによって亜ヒ酸毒性を増強すると考えられる (Fig. 14)。

### 2-3. 亜ヒ酸が Mig1 のリン酸化に与える影響

これまでの検討から、Reg1 欠損によ

る亜ヒ酸毒性増強機構に Mig1 が関与していることが示された。そこで、亜ヒ酸が Mig1 のリン酸化に与える影響を検討したところ、亜ヒ酸濃度依存的に、高分子量側にバンドが見られ、Mig1 のリン酸化が亢進することが明らかとなった (Fig. 15)。したがって、リン酸化を介した Mig1 の不活性化が、亜ヒ酸の毒性発現においても重要な役割をしている可能性が考えられる。また、Reg1 の欠損により、Mig1 のリン酸化の亢進が認められた。Reg1 欠損酵母は恒常的に亜ヒ酸耐性因子である Mig1 のリン酸化 (不活性化) が亢進しているため、亜ヒ酸に対して高い感受性を示すのかもしれない。

Mig1 により転写抑制される因子の一つとして Fps1 が報告されている。Fps1 は細胞膜および液胞に存在するグリセロールトランスポーターであり、亜ヒ酸の細胞内への取り込みにも関与することが報告されている。

### 3. ヒト細胞における PP1 complex の機能低下が亜ヒ酸感受性に与える影響

ヒト細胞における PP1 complex と亜ヒ酸毒性との関わりを明らかにするため、PP1 の阻害剤である tautomycin がヒト培養細胞の亜ヒ酸感受性に与える影響について検討した。その結果、tautomycin の前処理によって HEK293

細胞の亜硫酸感受性が增大することが明らかとなった。(Fig. 16) したがって、ヒト細胞においても PP1 complex の機能低下が亜硫酸毒性を増強させると考えられる。Tautomycin 処理により Snf1 のヒトホモログである AMP-activated protein kinase (AMPK) がリン酸化されることが報告されていることから、ヒトの PP1 complex の機能低下も酵母細胞と同様の機構を介して亜硫酸毒性増強に関与している可能性が考えられる。

#### D. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし。

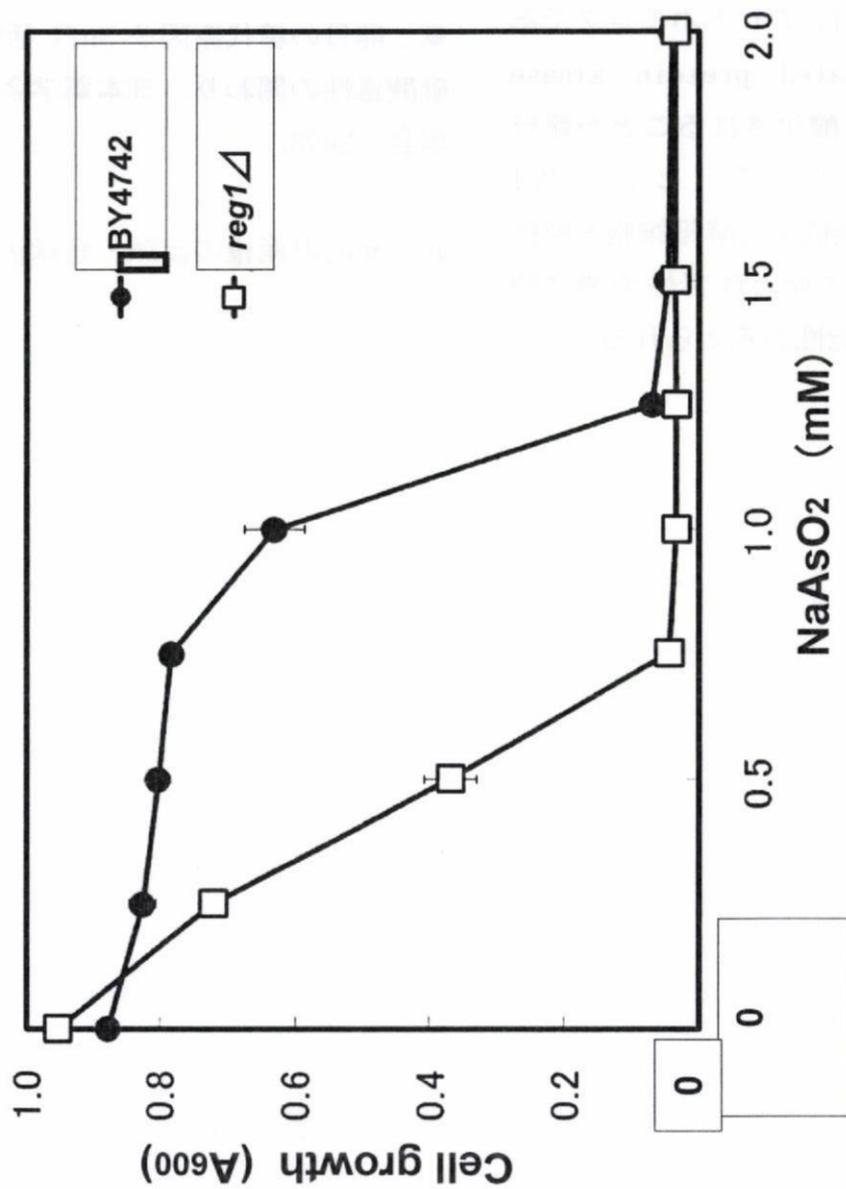
##### 2. 学会発表

宮永直幸、丹羽貴子、高橋 勉、永沼章：酵母の糖代謝因子 Snf1 活性と亜硫酸毒性の関わり. 日本薬学会第 128 年会, 2008.

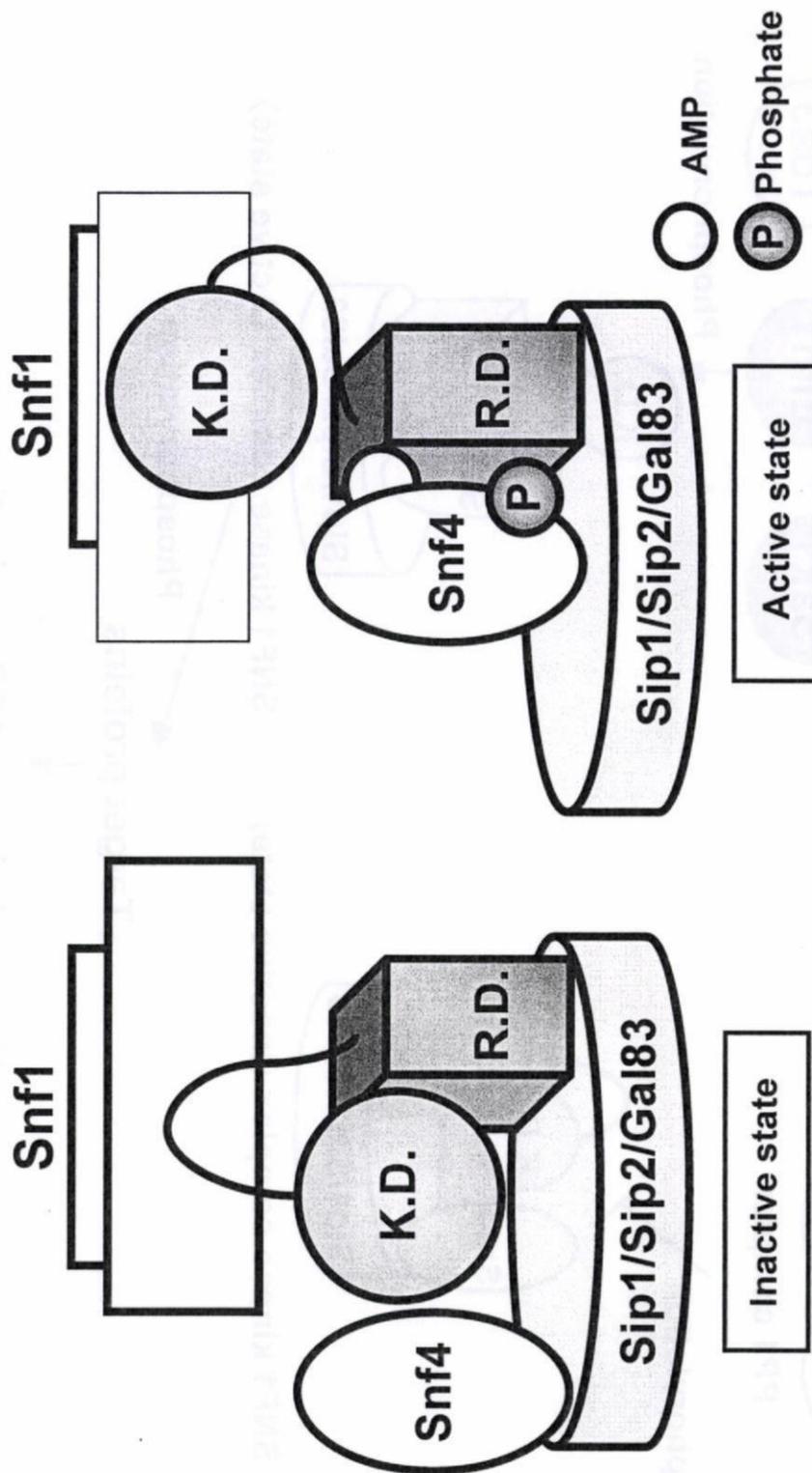
##### E. 知的財産権の出願・登録状況

なし。



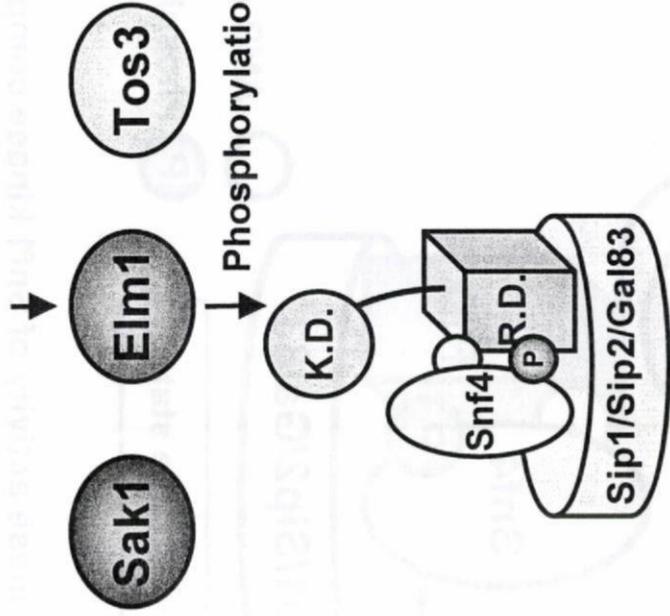


**Fig. 1. Effect of disruption of REG1 on the sensitivity of yeast cells to NaAsO<sub>2</sub>.** Yeast cells with disrupted genes for REG1 were grown in SD medium containing NaAsO<sub>2</sub>. After 48-hr incubation, absorbance at 600 nm was measured spectrophotometrically. Each point and bar represent the mean value and S.D. of result from four culture. The absence of a bar indicated that S.D. falls within the symbol.



**Fig. 2. Relationship between conformation and Ser/Thr kinase activity of Snf1 kinase complex.** In both the inactive and active conformations, the  $\beta$  subunits (Sip1, Sip2, or Gal83) act as a "scaffold" that links Snf1 and Snf4. In the inactive form, the kinase domain (K.D.) of Snf1 is inhibited by interaction with the regulatory domain (R.D.) on the same subunit. In response to an increase of intracellular AMP levels, regulatory domain is phosphorylated and bind AMP. In the consequence, the kinase domain of Snf1 dissociates from regulatory domain and Snf4 interacts with the Snf1 regulatory domain instead of the kinase domain. The Snf1 domain is now free to phosphorylate downstream targets.

**Glucose insufficiency**  
(Elevation of intracellular AMP levels)



SNF1 kinase complex (Active state)

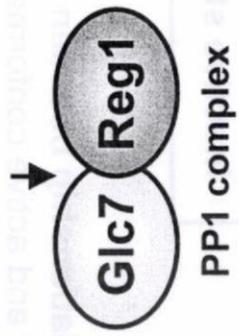
Phosphorylation

Target proteins

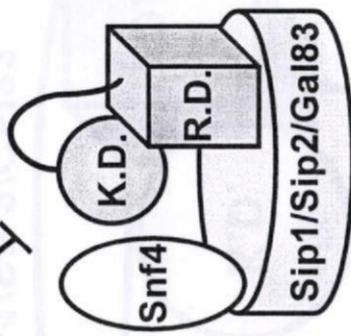
Up-regulation of ATP production

Down-regulation of ATP consumption

**Glucose abundance**

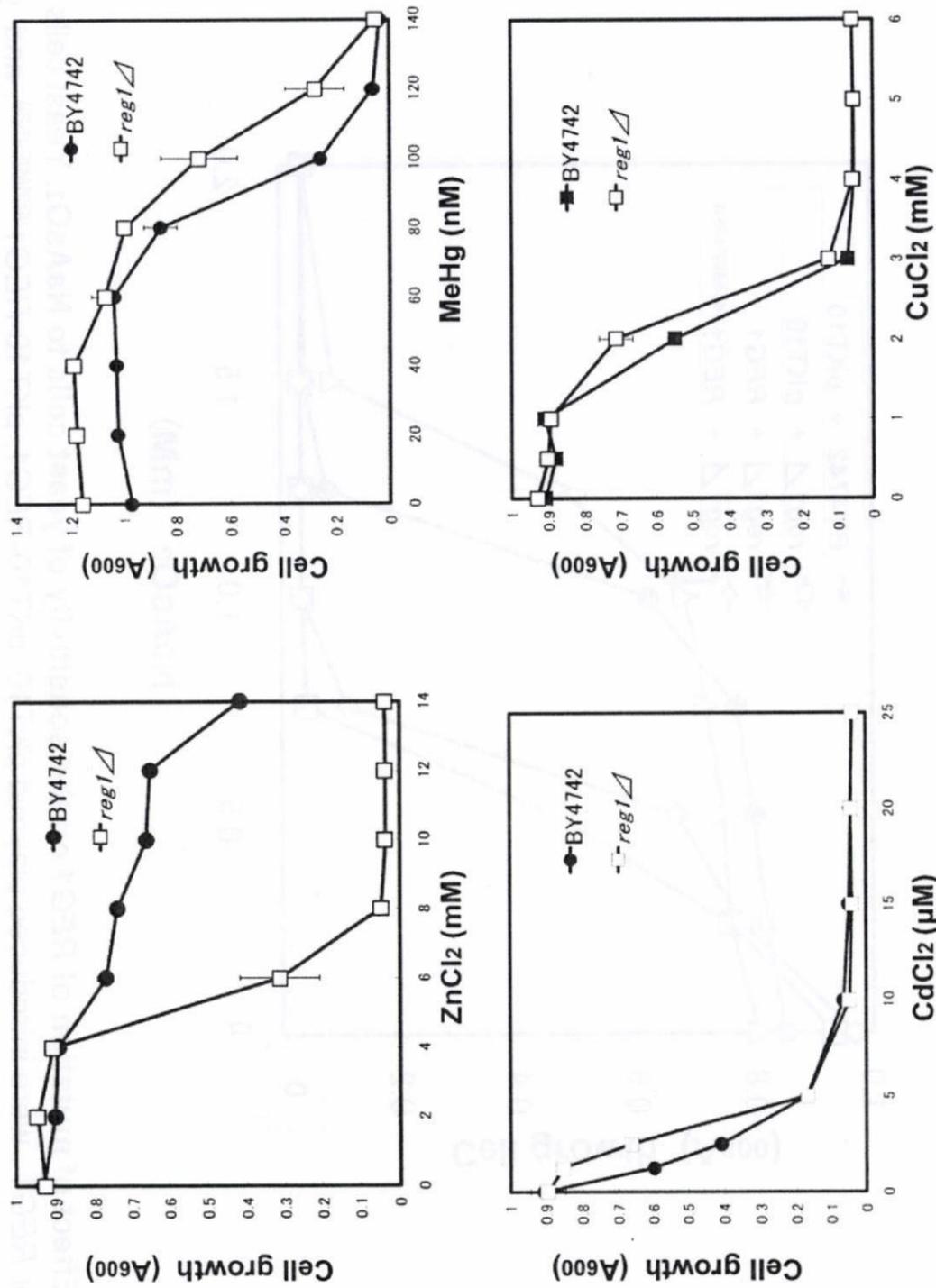


Dephosphorylation

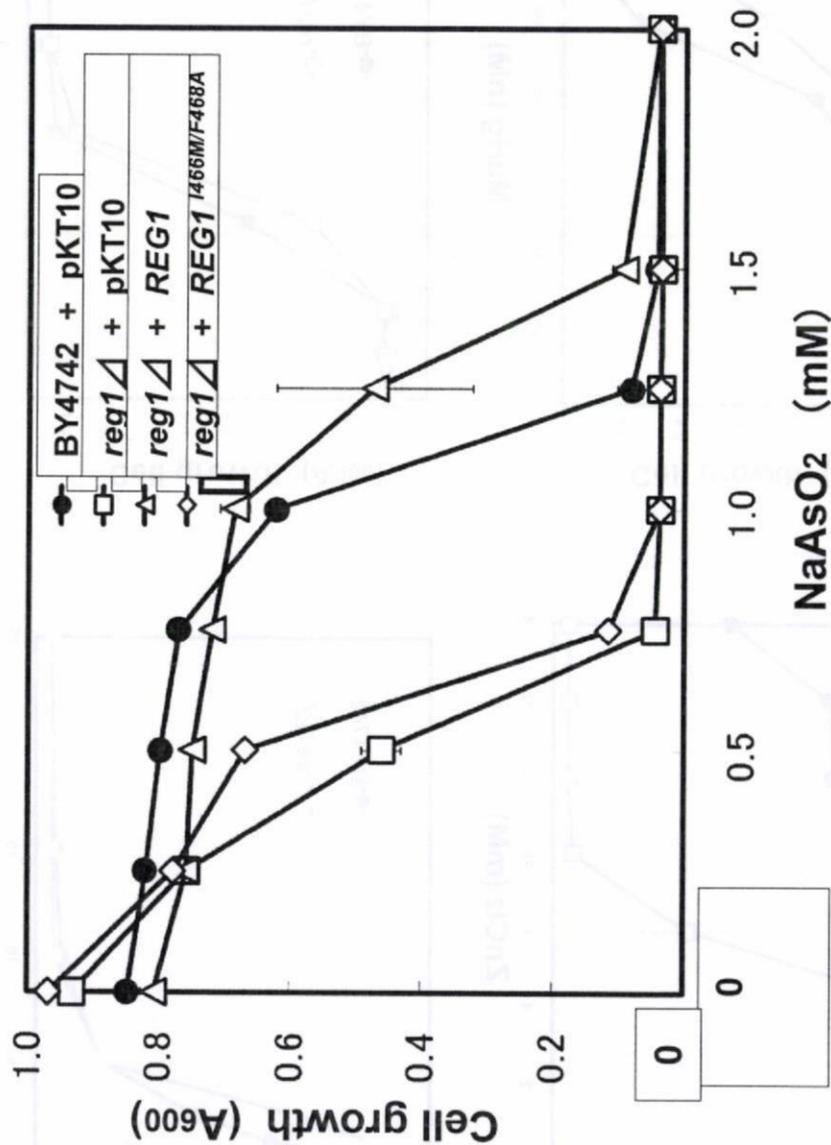


SNF1 kinase complex (Inactive state)

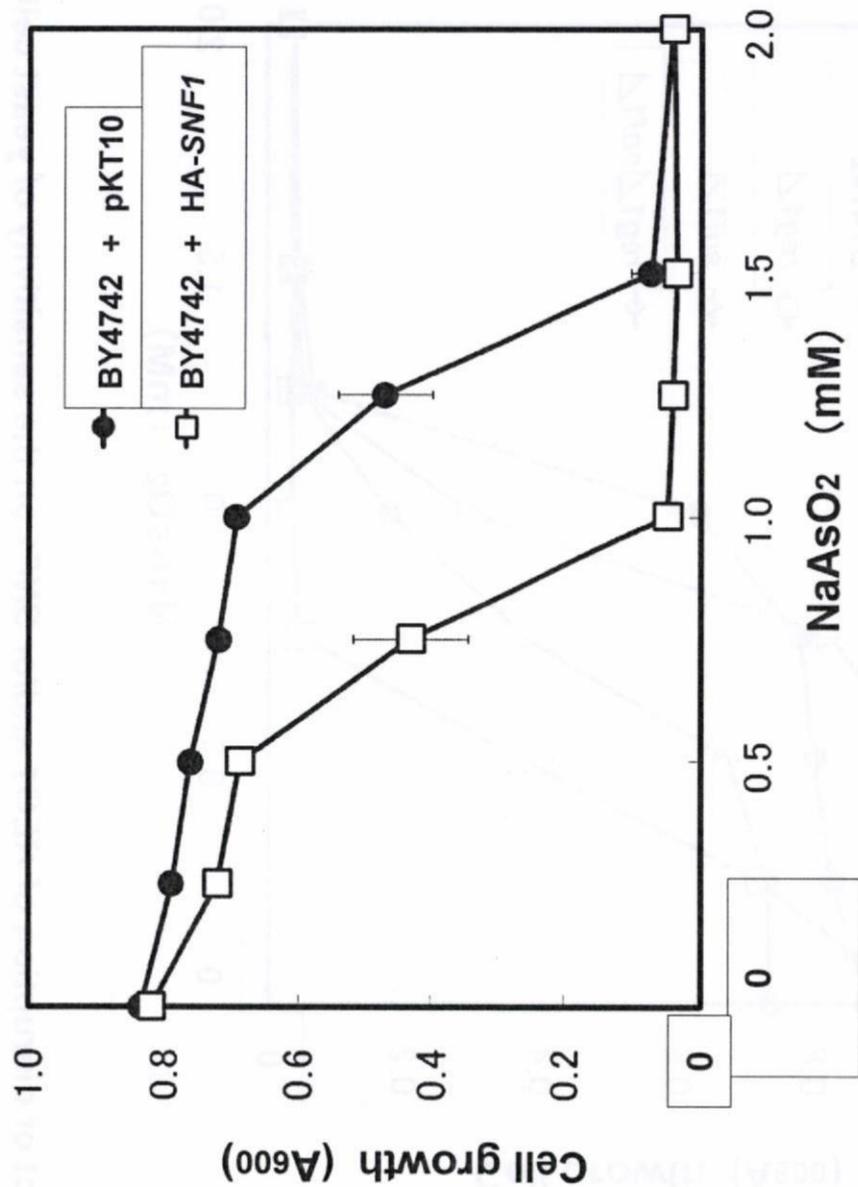
Fig. 3. Glucose signaling transduction pathway in *Saccharomyces cerevisiae*.



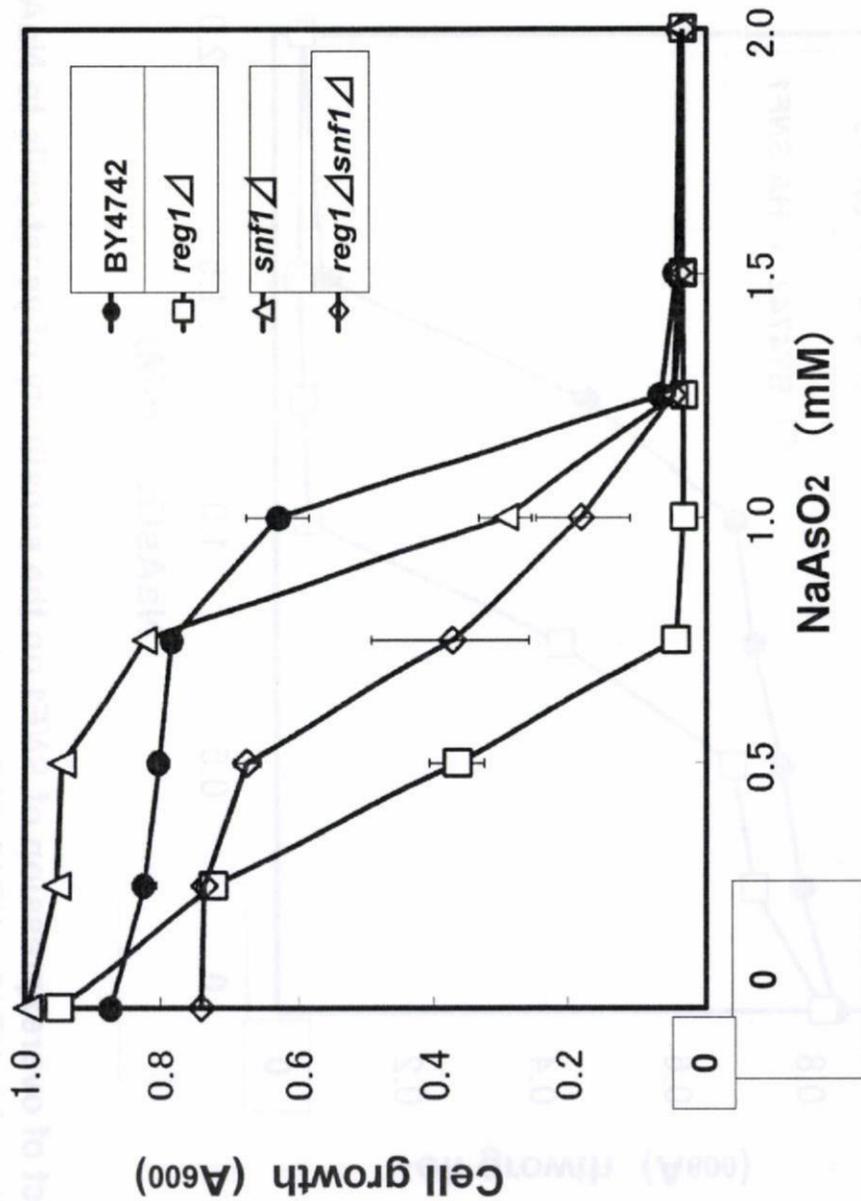
**Fig. 4. Effect of disruption of *REG1* on the sensitivity of yeast cells to metals.** Yeast cells with disrupted genes for *REG1* were grown in SD medium containing ZnCl<sub>2</sub>, MeHg, CdCl<sub>2</sub> or CuCl<sub>2</sub> as indicated. After 48-hr incubation, absorbance at 600 nm was measured spectrophotometrically. Each point and bar represent the mean value and S.D. of result from four culture. The absence of a bar indicated that S.D. falls within the symbol.



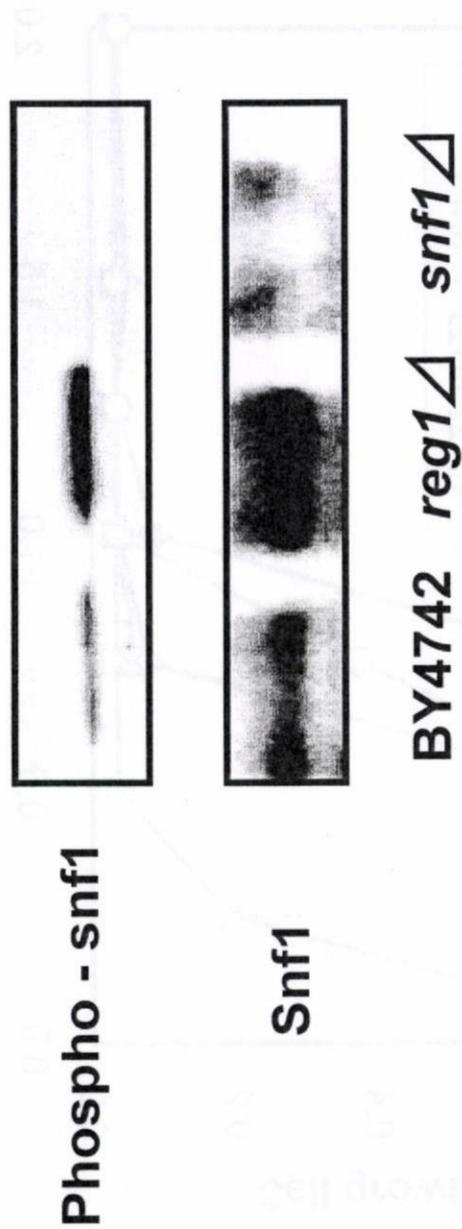
**Fig. 5. Effect of mutation of REG1 on the sensitivity of yeast cells to NaAsO<sub>2</sub>.** Yeast cells with disrupted genes for REG1, were introduced plasmid pKT10, pKT10-REG1, pKT10-REG1<sup>I466M/F468A</sup>, and grown in SD (-Ura) medium containing NaAsO<sub>2</sub> as indicated. After 48-hr incubation, absorbance at 600 nm was measured spectrophotometrically. Each point and bar represent the mean value and S.D. of result from four culture. The absence of a bar indicated that S.D. falls within the symbol.



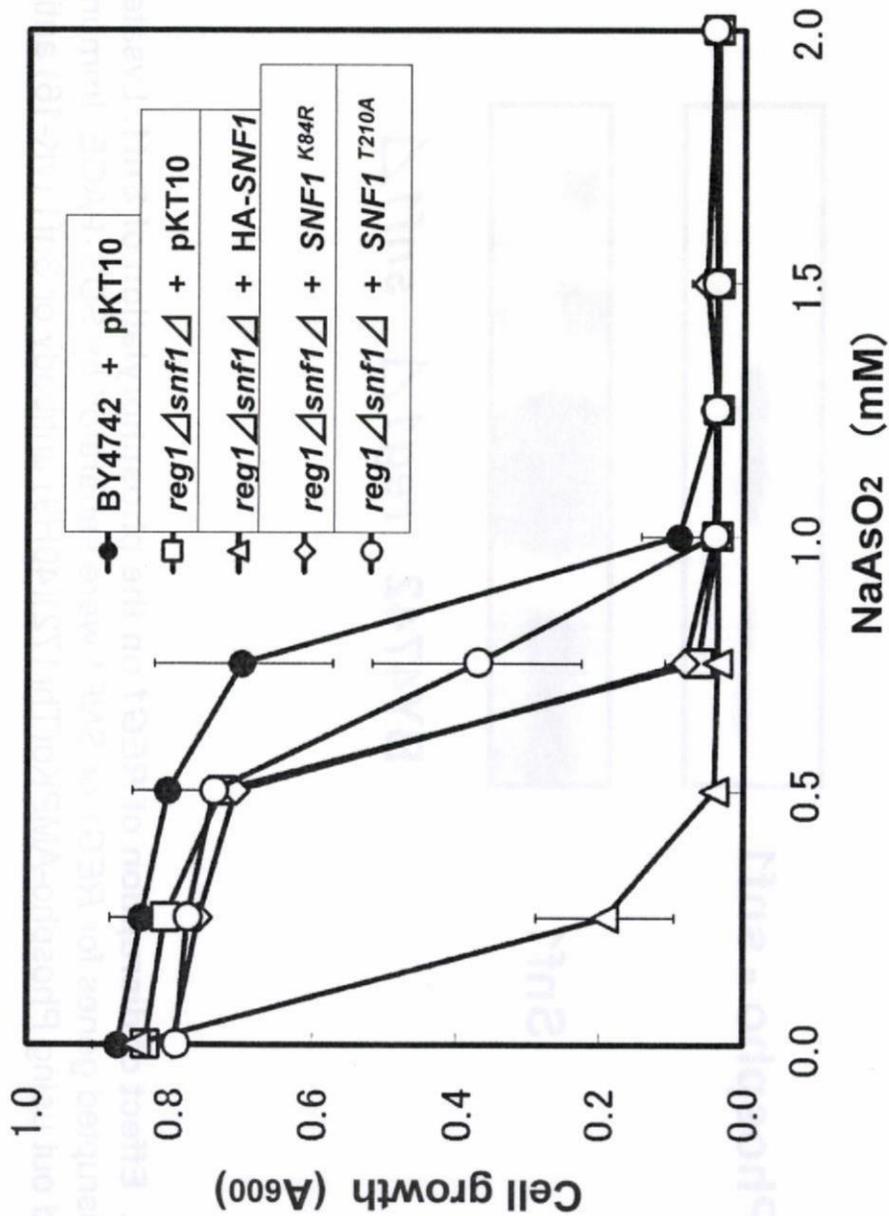
**Fig. 6. Effect of overexpression of SNF1 on the sensitivity of yeast cells to NaAsO<sub>2</sub>.** Yeast cells, were introduced plasmid pKT10, pKT10-SNF1, and grown in SD (-Ura) medium containing NaAsO<sub>2</sub> as indicated. After 48-hr incubation, absorbance at 600 nm was measured spectrophotometrically. Each point and bar represent the mean value and S.D. of result from four culture. The absence of a bar indicated that S.D. falls within the symbol.



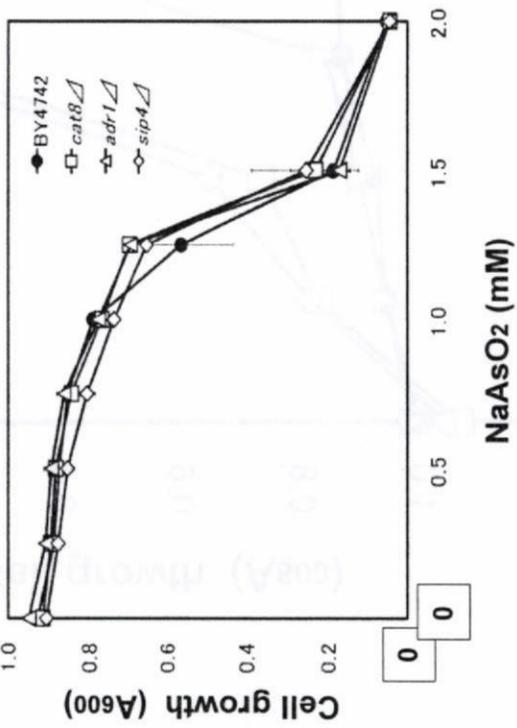
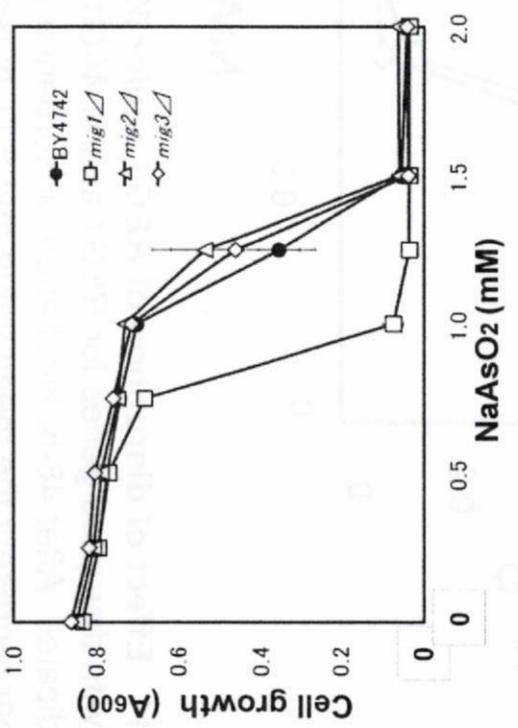
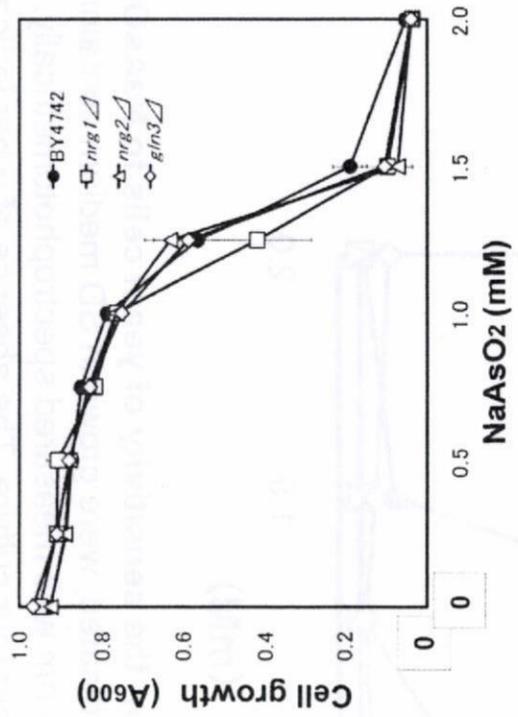
**Fig. 7. Effect of disruption of *REG1* and/or *SNF1* on the sensitivity of yeast cells to NaAsO<sub>2</sub>.** Yeast cells with disrupted genes for *REG1* and/or *SNF1* as indicated, were grown in SD medium containing NaAsO<sub>2</sub> as indicated. After 48-hr incubation, absorbance at 600 nm was measured spectrophotometrically. Each point and bar represent the mean value and S.D. of result from four culture. The absence of a bar indicated that S.D. falls within the symbol.



**Fig. 8. Effect of disruption of *REG1* on the phosphorylation of Snf1.** Lysates of yeast cells with disrupted genes for *REG1* or *SNF1* were separated by SDS-PAGE. Immunoblotting was carried out using Phospho-AMPK $\alpha$ (Thr172)(40H9) antibody or Snf1 (yK-16) antibody.



**Fig. 9. Effect of mutation of SNF1 on the sensitivity of yeast cells to NaAsO<sub>2</sub>.** Yeast cells, with disrupted genes for *REG1* and/or *SNF1* as indicated, were introduced plasmid pKT10, pKT10-*SNF1*, pKT10-*SNF1*<sup>K84R</sup>, pKT10-*SNF1*<sup>T210A</sup>, and grown in SD (-Ura) medium containing NaAsO<sub>2</sub> as indicated. After 48-hr incubation, absorbance at 600 nm was measured spectrophotometrically. Each point and bar represent the mean value and S.D. of result from four culture. The absence of a bar indicated that S.D. falls within the symbol.



**Fig. 10. Effect of disrupted genes for Snf1 substrates on the sensitivity of yeast cells to NaAsO<sub>2</sub>.** Yeast cells with disrupted genes for Snf1 substrates were grown in SD medium containing NaAsO<sub>2</sub> as indicated. After 48-hr incubation, absorbance at 600 nm was measured spectrophotometrically. Each point and bar represent the mean value and S.D. of result from four culture. The absence of a bar indicated that S.D. falls within the symbol.