

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増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。

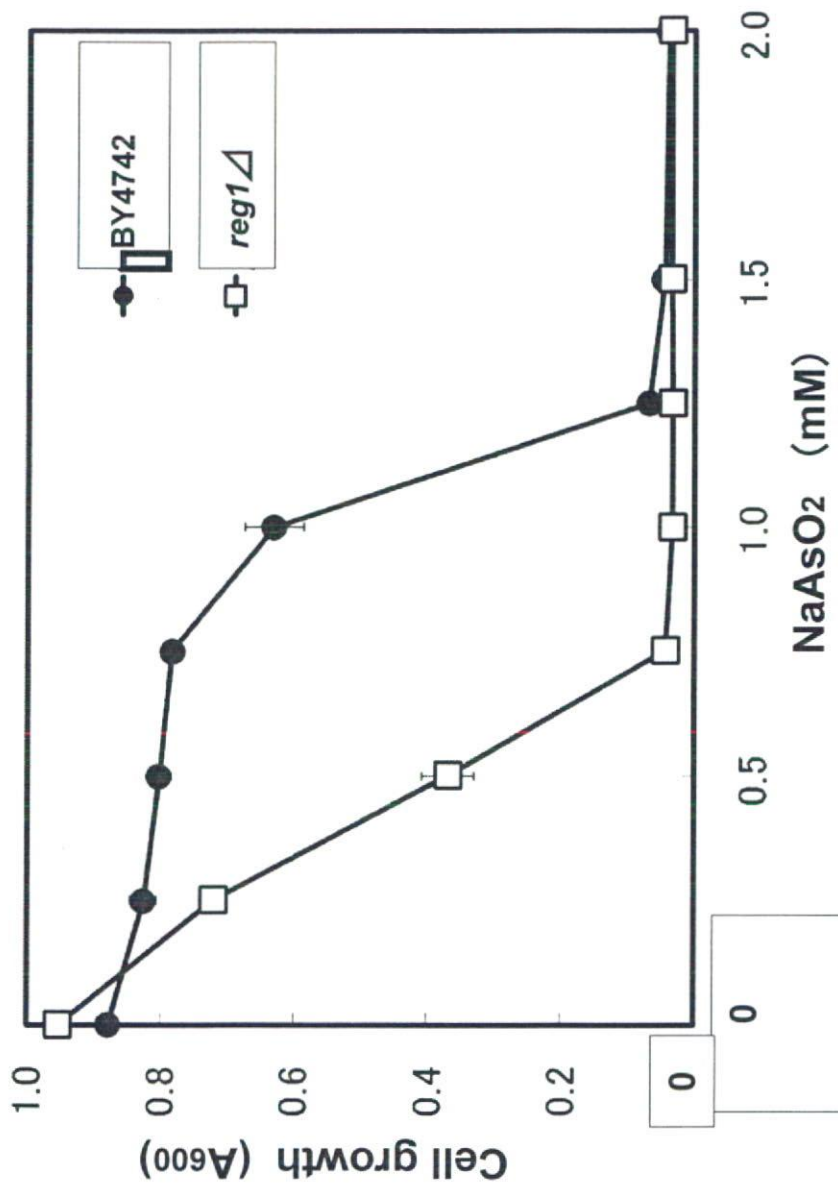
#### D. 研究発表

1. 論文発表  
なし。

#### 2. 学会発表

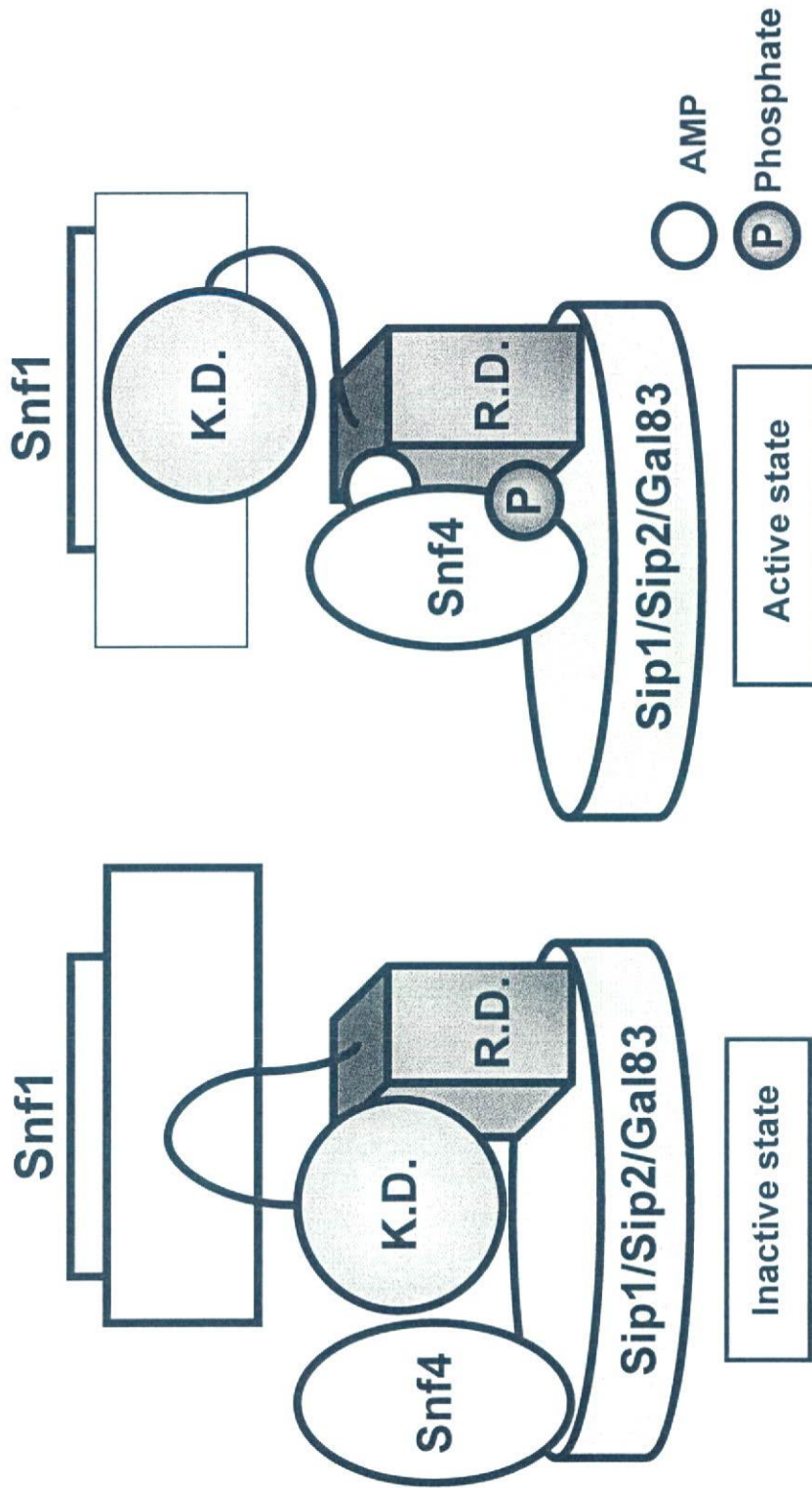
宮永直幸、丹羽貴子、高橋 勉、永沼章：酵母の糖代謝因子 Snf1 活性と亜硫酸毒性の関わり。日本薬学会第 128 年会，2008.

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.

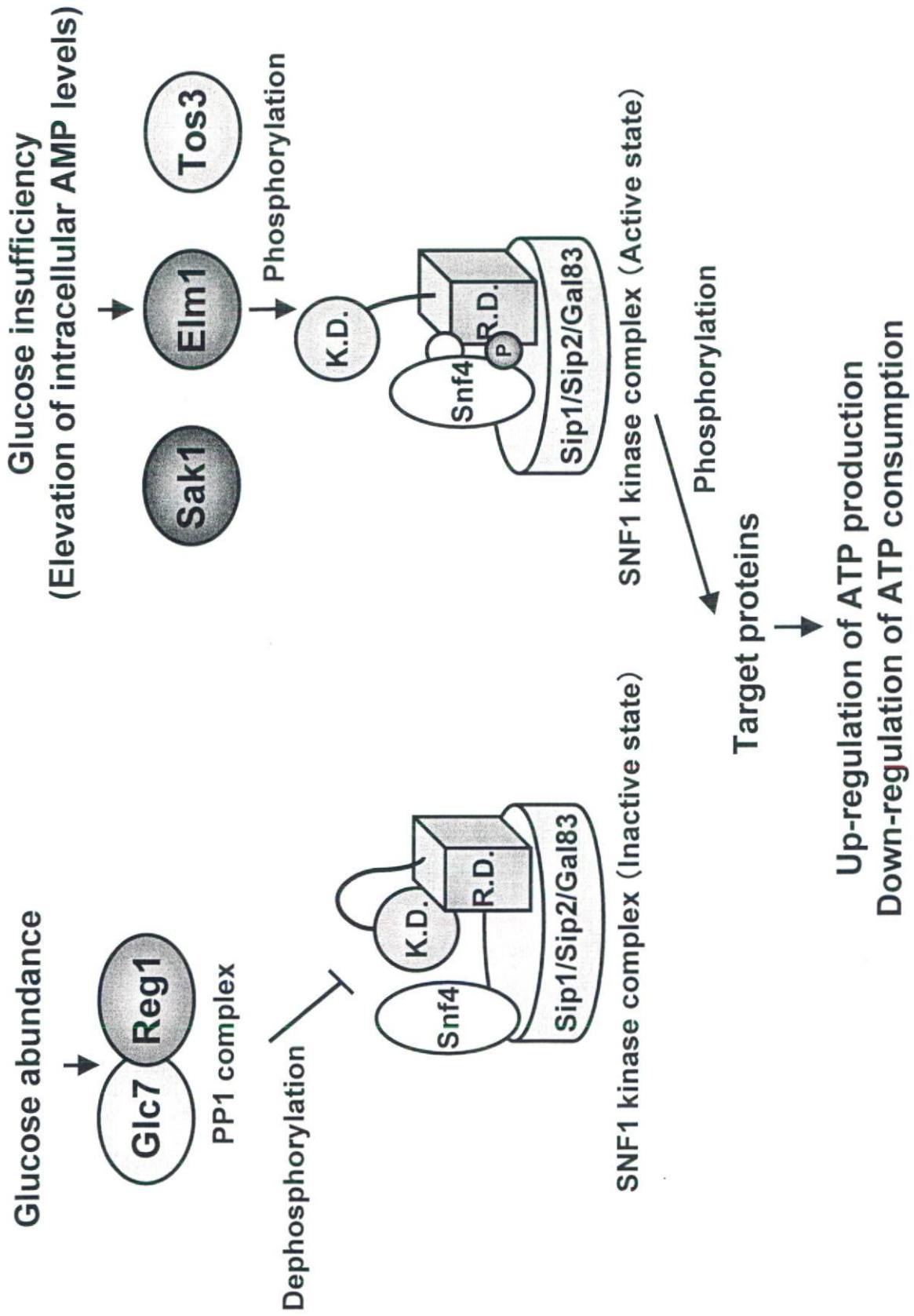
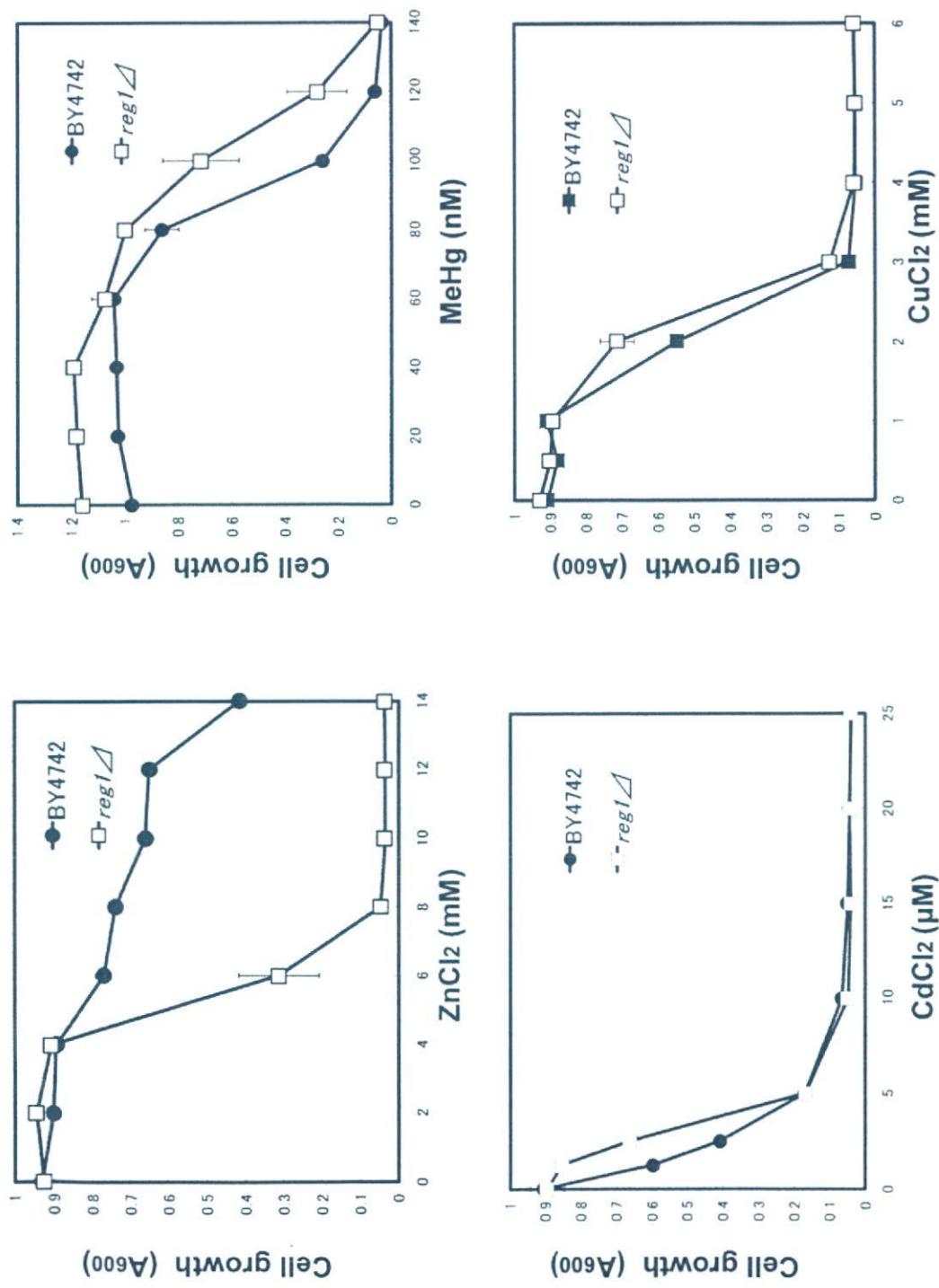
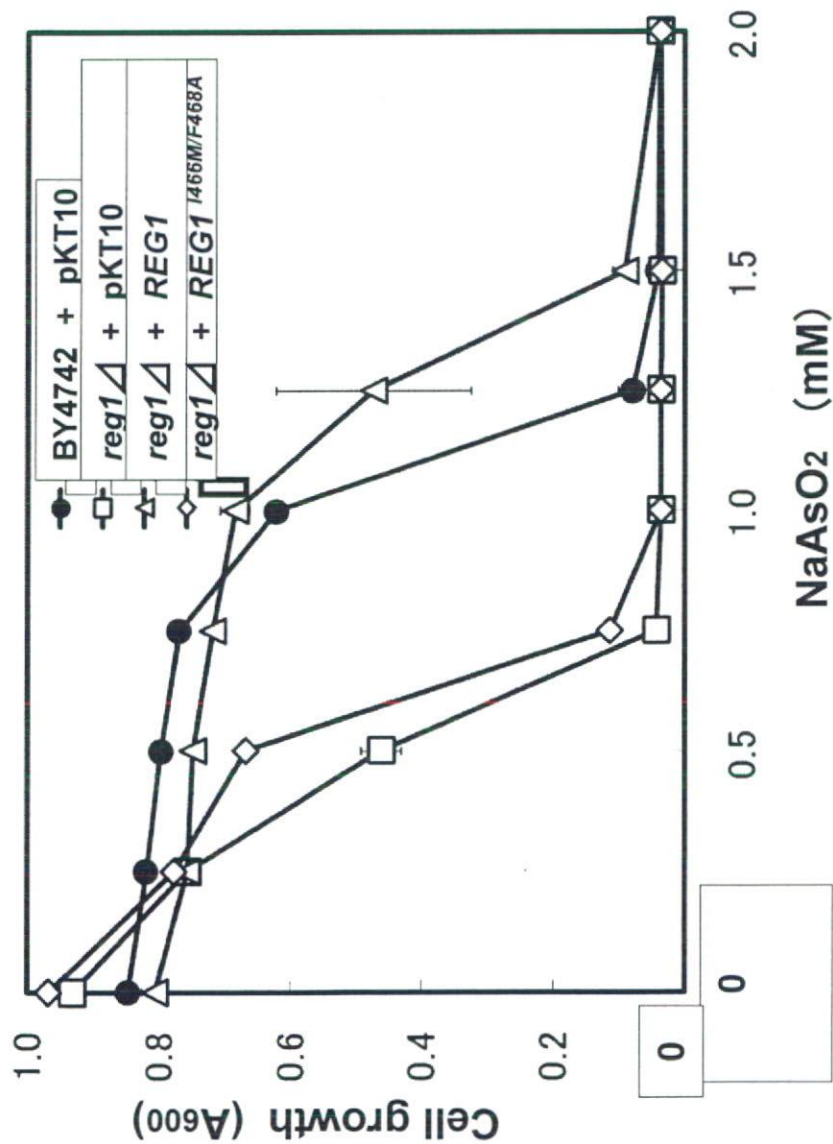


Fig. 3. Glucose signaling transduction pathway in *Saccharomyces cerevisiae* .

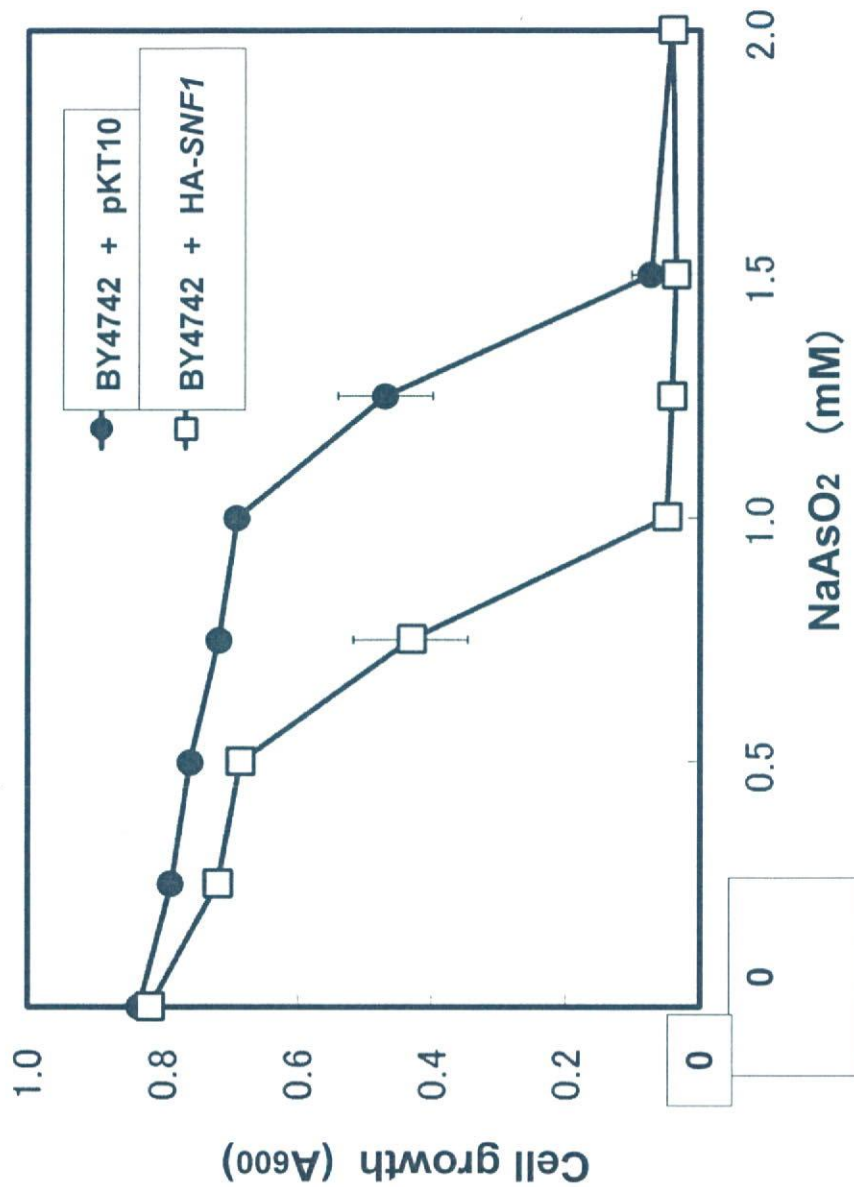


**Fig. 4. Effect of disruption of *REG1* on the sensitivity of yeast cells to metals.** Yeast cells with disrupted genes for *REG1* were grown in SD medium containing ZnCl<sub>2</sub>, MeHg, CdCl<sub>2</sub> or CuCl<sub>2</sub> as indicated. After 48-hr incubation, absorbance at 600 nm was measured spectrophotometrically. 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.



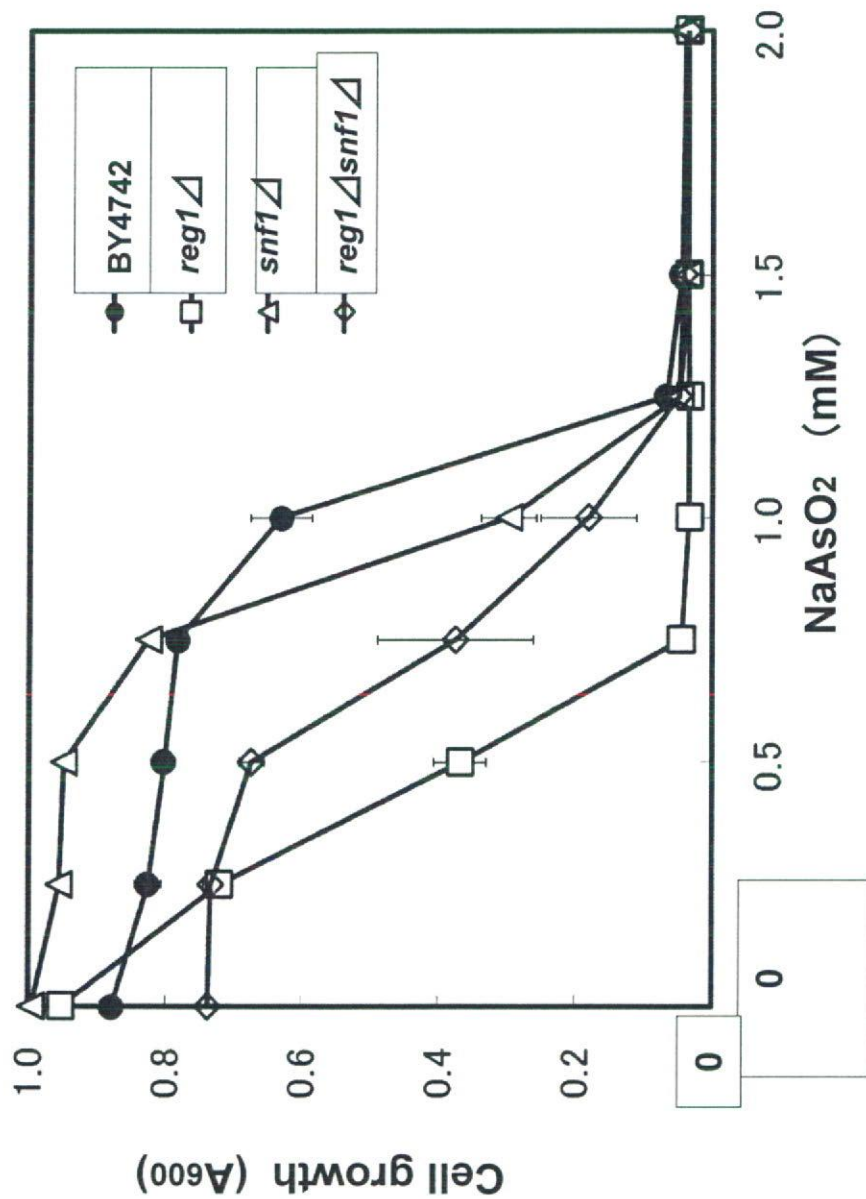


**Fig. 5. Effect of mutation of *REG1* on the sensitivity of yeast cells to NaAsO<sub>2</sub>.** Yeast cells with disrupted genes for *REG1*, were introduced plasmid pKT10, pKT10-*REG1*, pKT10-*REG1*<sup>I466M/F468A</sup>, and grown in SD (-Ura) medium containing NaAsO<sub>2</sub> as indicated. After 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.

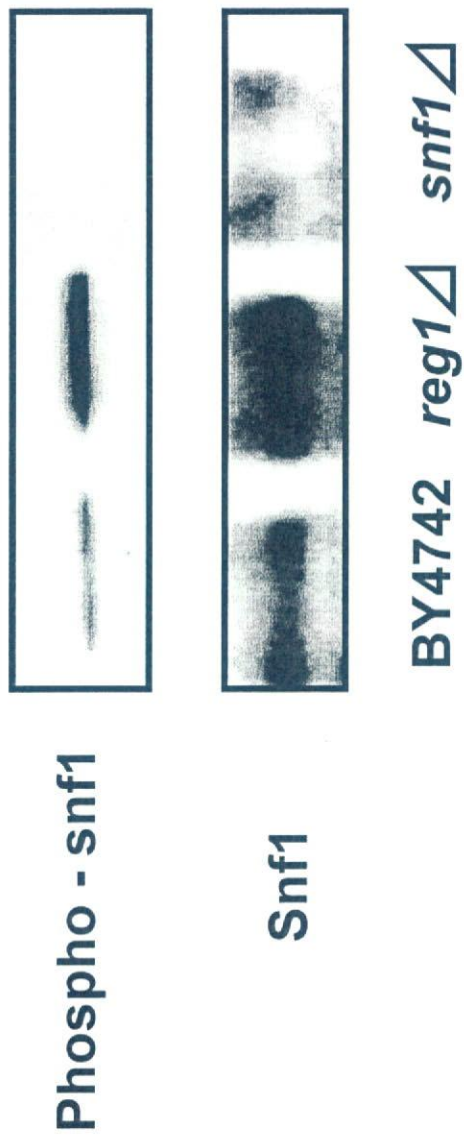


**Fig. 6. Effect of overexpression of SNF1 on the sensitivity of yeast cells to NaAsO<sub>2</sub>.** Yeast cells, were introduced plasmid pKT10, pKT10-SNF1, and grown in SD (-Ura) medium containing NaAsO<sub>2</sub> as indicated. After 48-hr incubation, absorbance at 600 nm was measured spectrophotometrically. 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.

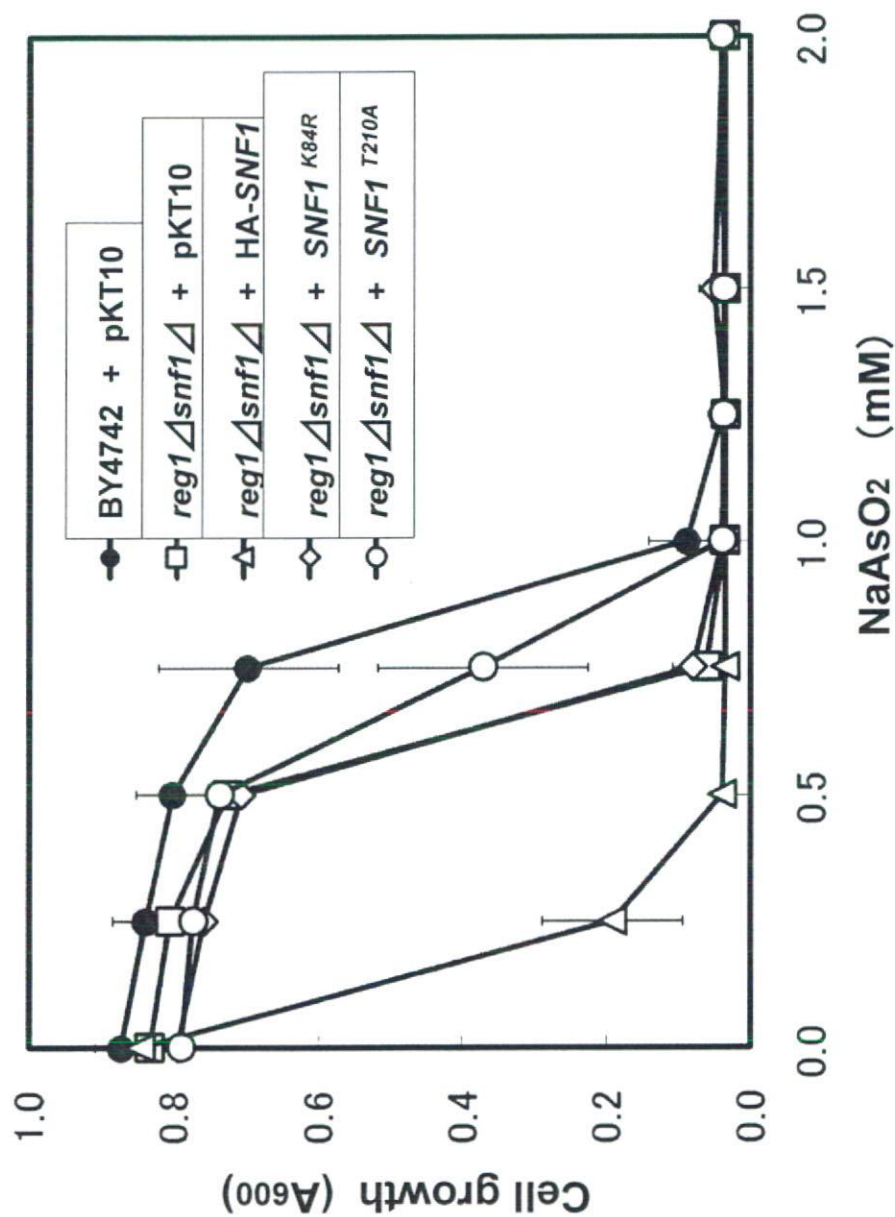




**Fig. 7. Effect of disruption of *REG1* and/or *SNF1* on the sensitivity of yeast cells to NaAsO<sub>2</sub>.** Yeast cells with disrupted genes for *REG1* and/or *SNF1* as indicated, were grown in SD medium containing NaAsO<sub>2</sub> as indicated. After 48-hr incubation, absorbance at 600 nm was 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.

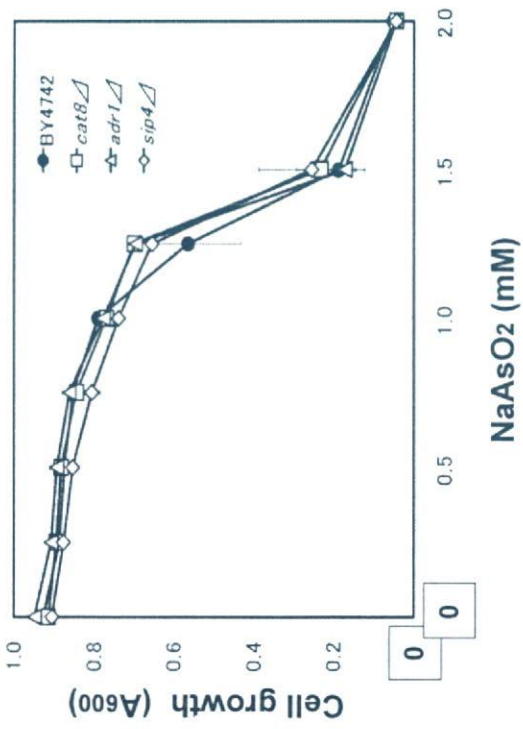
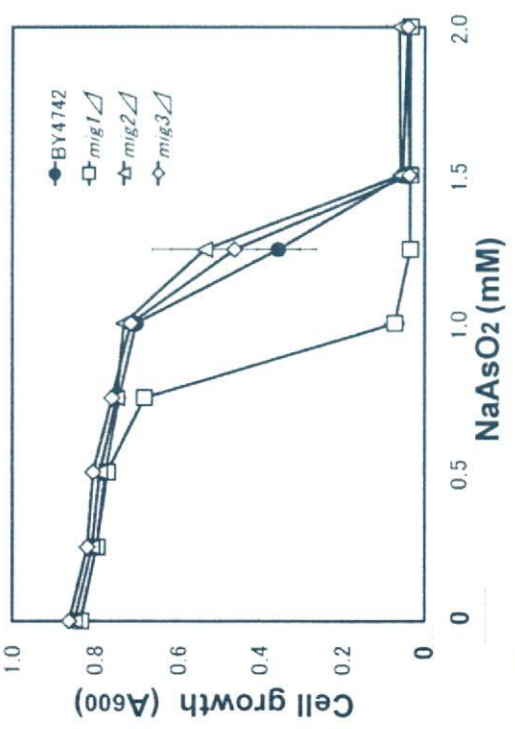
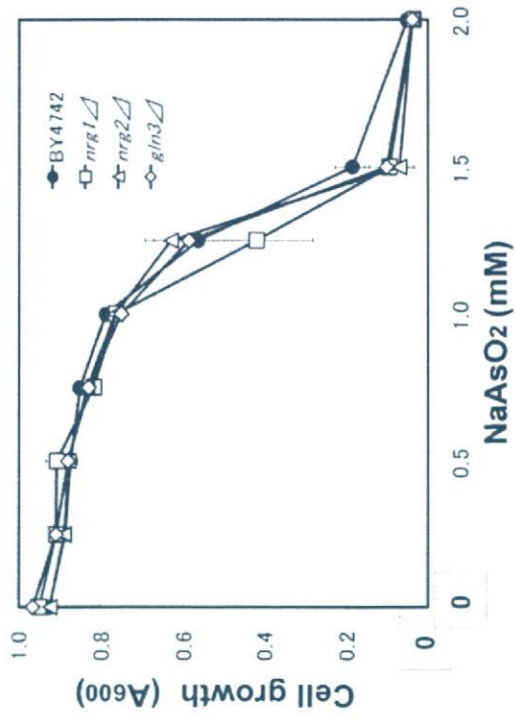


**Fig. 8. Effect of disruption of *REG1* on the phosphorylation of Snf1.** Lysates of yeast cells with disrupted genes for *REG1* or *SNF1* were separated by SDS-PAGE. Immunoblotting was carried out using Phospho-AMPK $\alpha$ (Thr172)(40H9) antibody or Snf1 (yK-16) antibody.

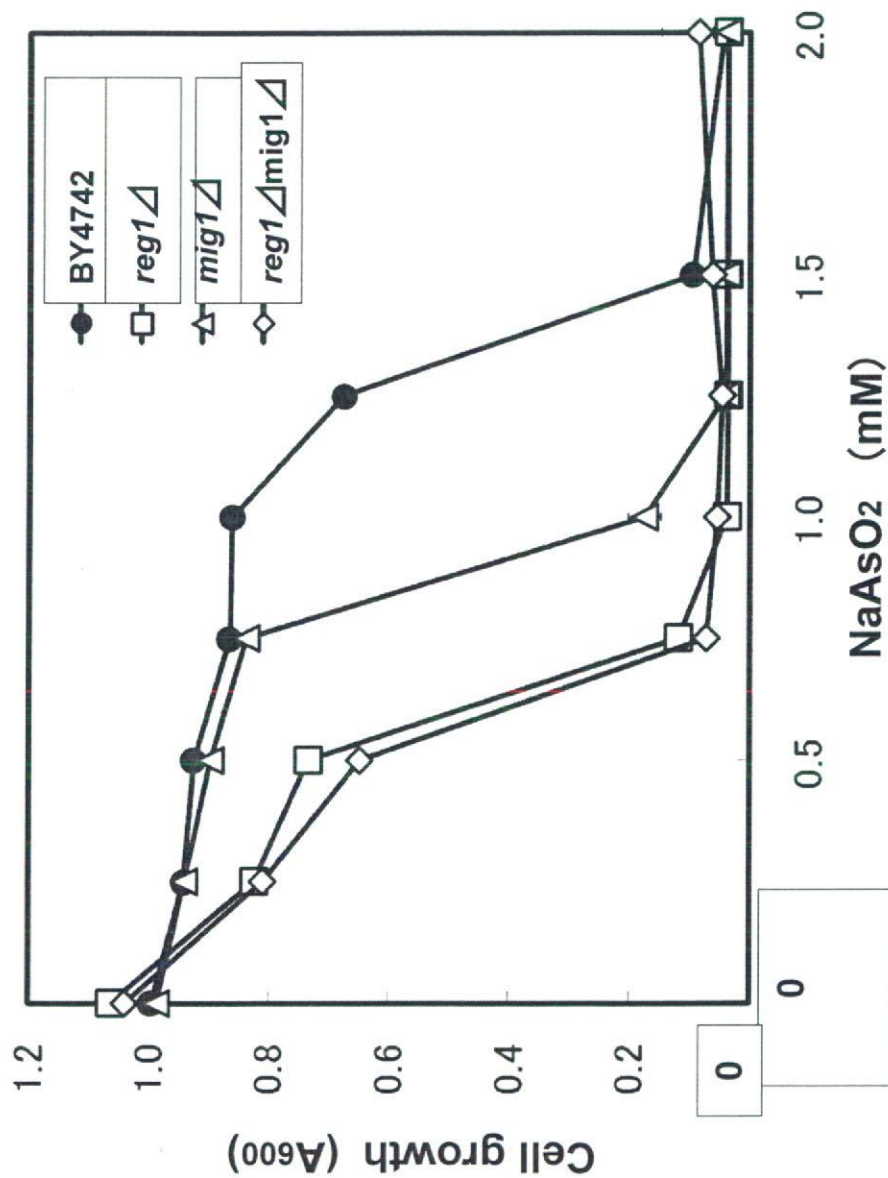


**Fig. 9. Effect of mutation of SNF1 on the sensitivity of yeast cells to NaAsO<sub>2</sub>.** Yeast cells, with disrupted genes for *REG1* and/or *SNF1* as indicated, were introduced plasmid pKT10, pKT10-*SNF1*, pKT10-*SNF1*<sup>K84R</sup>, pKT10-*SNF1*<sup>T210A</sup>, and grown in SD (-Ura) medium 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.

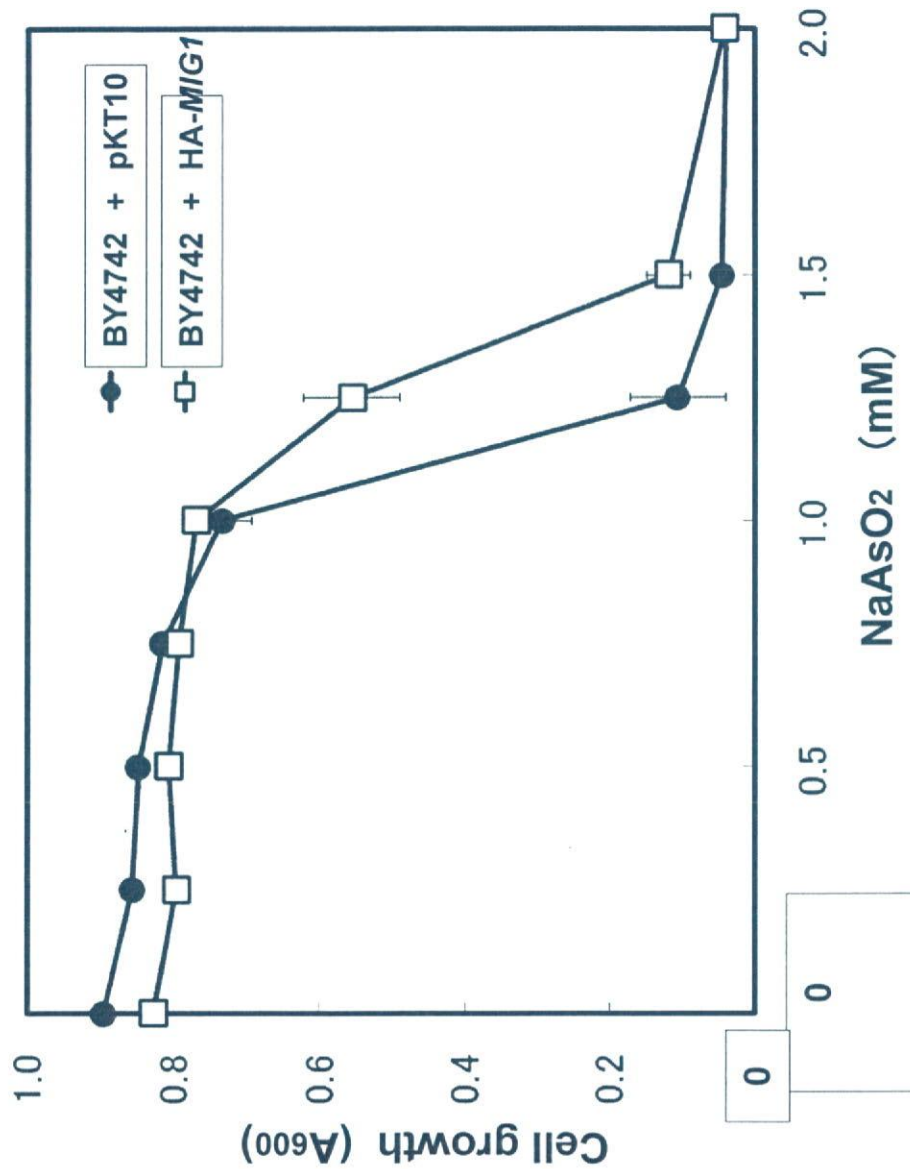




**Fig. 10. Effect of disruption of genes for Snf1 substrates on the sensitivity of yeast cells to NaAsO<sub>2</sub>.** Yeast cells with disrupted genes for Snf1 substrates were grown in SD medium containing NaAsO<sub>2</sub> as indicated. After 48-hr incubation, absorbance at 600 nm was measured spectrophotometrically. 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.

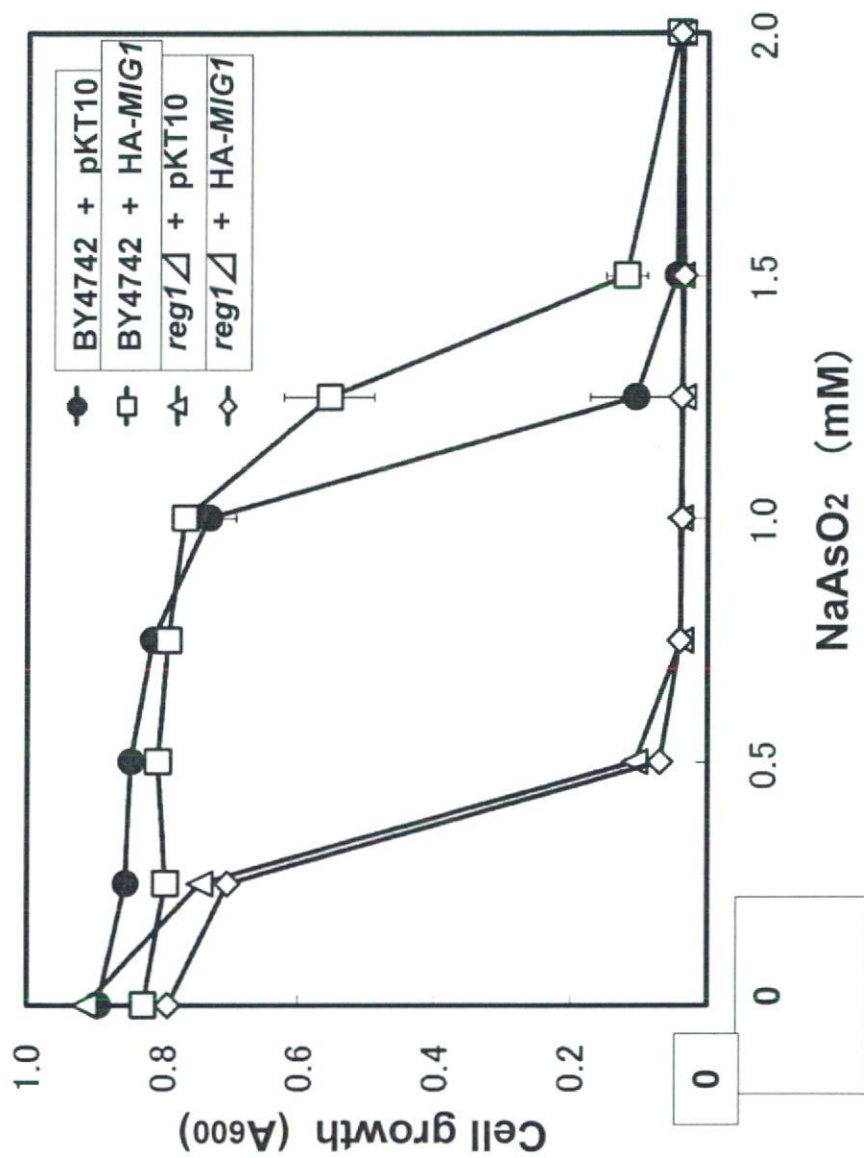


**Fig. 11. Effect of disruption of *REG1* and/or *MIG1* on the sensitivity of yeast cells to NaAsO<sub>2</sub>.** Yeast cells with disrupted genes for *REG1* and/or *MIG1* as indicated, were grown in SD medium containing NaAsO<sub>2</sub> as indicated. After 48-hr incubation, absorbance at 600 nm was 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. 12. Effect of overexpression of *MIG1* on the sensitivity of yeast cells to NaAsO<sub>2</sub>.** Yeast cells, were introduced plasmid pKT10, pKT10-*MIG1*, 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. 13. Effect of overexpression of *MIG1* on the sensitivity of yeast cells with disrupted genes for *REG1* to NaAsO<sub>2</sub>.** Yeast cells, were introduced plasmid pKT10, pKT10-*MIG1*, 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.

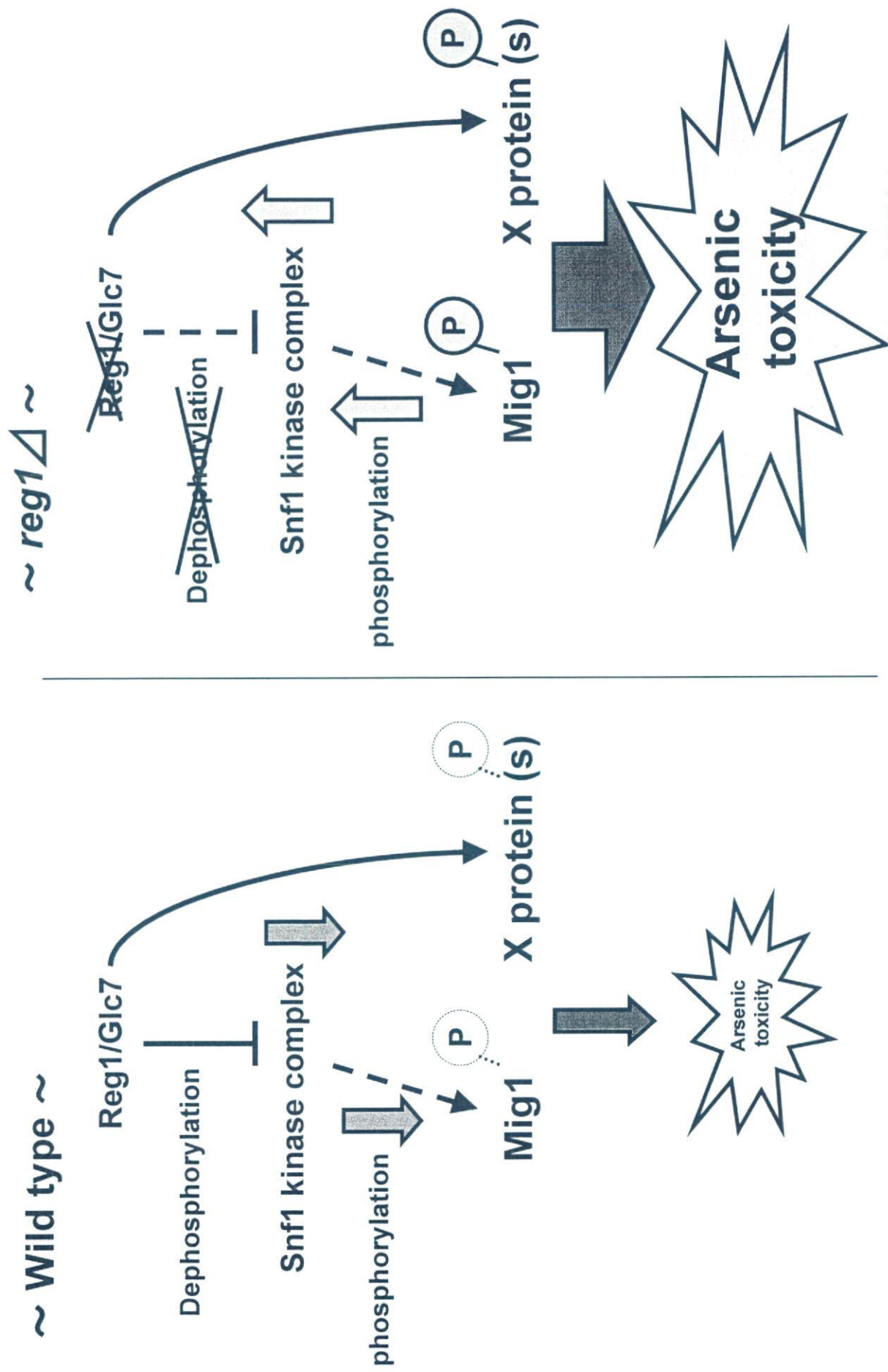
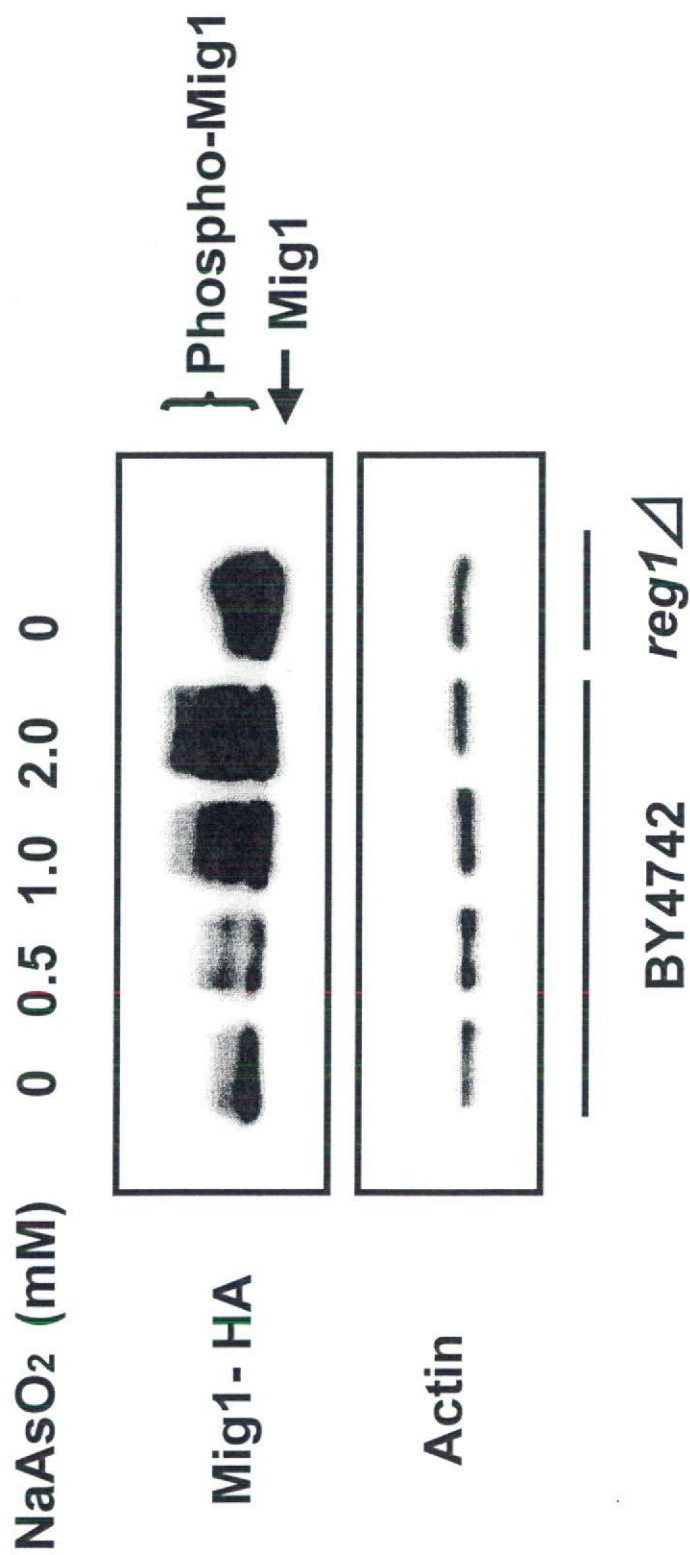
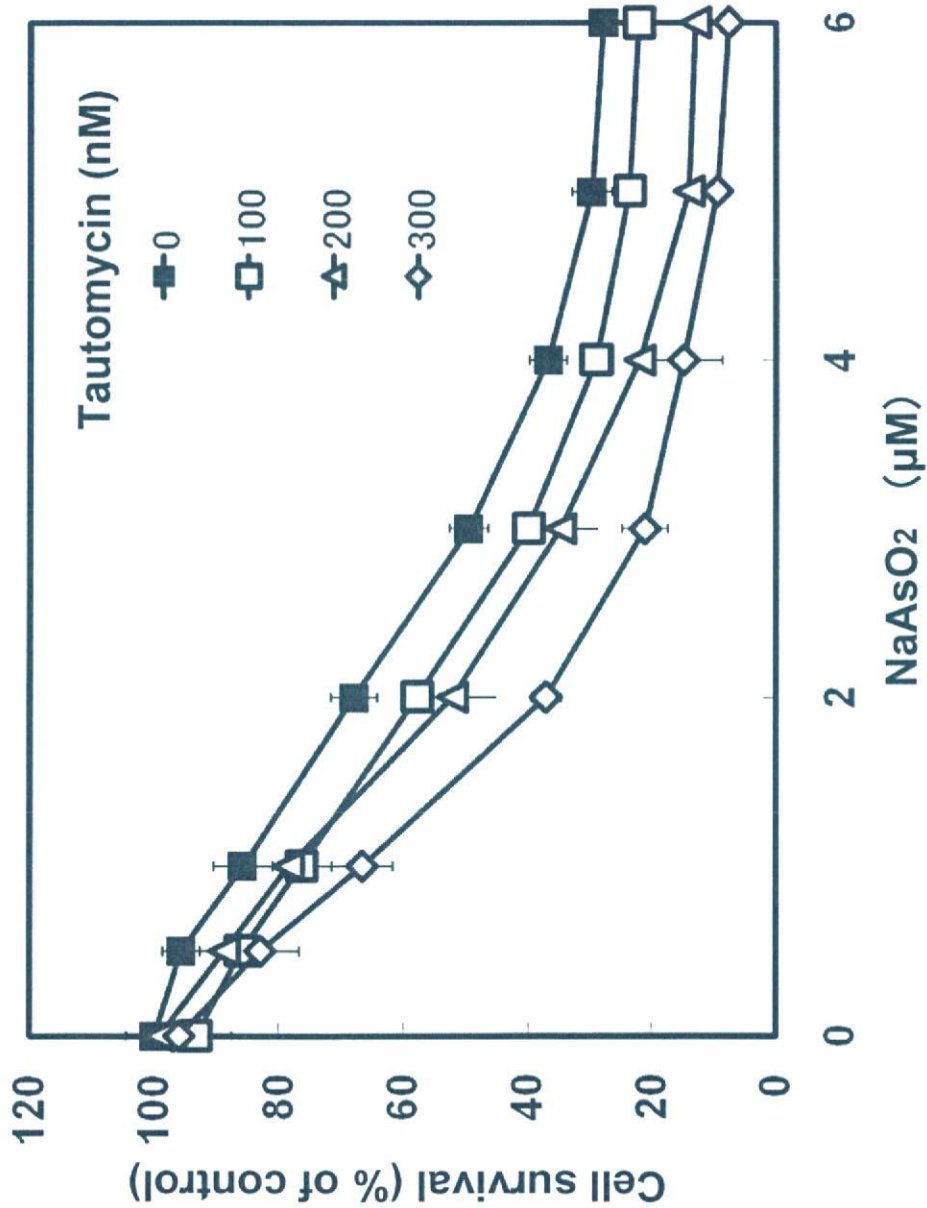


Fig. 14. A model for mechanism of enhancement of arsenic toxicity by disruption of REG1.



**Fig. 15. Effects of treatment with NaAsO<sub>2</sub> on the phosphorylation of Mig1.** Yeast cells expressing Mig1-HA were exposed to NaAsO<sub>2</sub> for 90 min. Immunoblotting was carried out using anti-HA antibody or anti-actin antibody.





**Fig. 16. Effect of tautomycin on the sensitivity of HEK293 cells to NaAsO<sub>2</sub>.** HEK293 cells were cultured in D'MEM medium. After 12-hr incubation with tautomycin, NaAsO<sub>2</sub> was added and cells were cultured for a further 48-hr. Cell viability was measured by the alamar blue assay. 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.

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

アドリアマイシン毒性の発現における脱ユビキチン化酵素の役割

分担研究者 久下周佐 東北大学大学院薬学研究科准教授

（協力研究者 高橋 勉 東北大学大学院薬学研究科助教）

我々はこれまでに、欠損によって酵母にアドリアマイシン耐性を与える細胞内因子として三種の脱ユビキチン化酵素(Ubp2, Ubp6, Ubp14)を同定している。そこで、アドリアマイシン耐性と脱ユビキチン化酵素の関係について検討した。出芽酵母に存在する17種類の脱ユビキチン化酵素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結果、スクリーニングによって同定されているUbp2, Ubp6, Ubp14に加えて、Ubp4の欠損も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。一方、欠損によりアドリアマイシン毒性を増強させる脱ユビキチン化酵素としてUbp3, Ubp7, Ubp13が同定された。アドリアマイシン耐性獲得機構における各脱ユビキチン化酵素間の相互作用を明らかにするため、欠損により酵母にアドリアマイシン耐性を与える各脱ユビキチン化酵素(Ubp2, Ubp6, Ubp4 およびUbp14)を二種類同時に欠損させた酵母(*ubp2Δ ubp4Δ*, *ubp2Δ ubp6Δ*, *ubp4Δ ubp14Δ*)のアドリアマイシン感受性を検討した。その結果、各二重欠損酵母はそれぞれの単独欠損酵母と比べ、相加的なアドリアマイシン耐性の増強を示した。したがって、これらの脱ユビキチン化酵素は、それぞれ異なる経路を介してアドリアマイシン毒性に関与している可能性が考えられる。脱ユビキチン化酵素の欠損によって、細胞内ユビキチン量が低下することが報告されているが、脱ユビキチン化酵素欠損酵母(*ubp2Δ*, *ubp6Δ*)にポリユビキチンUbi4を高発現させてもアドリアマイシン感受性に変化がなかったことから、Ubp2の欠損およびUbp6の欠損によるアドリアマイシン耐性獲得には、細胞内ユビキチン量の低下は関与しないと考えられる。さらに、脱ユビキチン化酵素欠損によるアドリアマイシン耐性獲得には既知のアドリアマイシン耐性獲得機構である細胞内抗酸化機構の亢進やアドリアマイシンの細胞外への排出の促進は関与していないことから、脱ユビキチン化酵素欠損によるアドリ



アマイシン耐性獲得機構は、これまで知られていない全く新しい耐性獲得機構である可能性が考えられる。

#### A. 研究目的

アドリアマイシンはアントラサイクリン系の制癌剤であり、悪性リンパ腫や乳癌、肺癌など様々な悪性腫瘍の治療に用いられる。アドリアマイシンの作用機序として、DNA インターカレーションによる核酸合成の阻害、DNA トポイソメラーゼの阻害、フリーラジカルの産生などが知られているが、不明な点も多い。

一方、アドリアマイシンを用いた癌治療において、心臓毒性や骨髄抑制などの副作用と並んで、アドリアマイシン耐性癌細胞の出現が問題となっている。癌細胞のアドリアマイシンに対する耐性獲得機構としては、P 糖蛋白質や multidrug resistance protein (MRP) などの ATP binding cassette (ABC) トランスポーターの過剰発現による薬剤の細胞外への排出促進がよく知られている。P 糖蛋白質による排出以外にもアドリアマイシン耐性に関わる因子は多数報告されているが、これらの機構だけでは説明できない耐性細胞も多く存在する。したがって、アドリアマイシン耐性獲得機構の全容解明が求められている。

我々は、全ゲノム配列が決定されており、遺伝学的な解析が容易な出芽酵

母を用いてアドリアマイシン感受性に影響を与える因子の網羅的な検索を行ない、欠損することで酵母にアドリアマイシン耐性を与える因子を 105 種同定している。その中には脱ユビキチン化酵素 (Deubiquitylating enzyme) が 3 種 (Ubp2, Ubp6, Ubp14) 含まれていたが、これまでに脱ユビキチン化酵素とアドリアマイシン耐性の関係についての検討例はない。そこで本研究では出芽酵母を用いて脱ユビキチン化酵素とアドリアマイシンとの関わりについて解析を行なった。

#### B. 実験方法

##### 1. 酵母のアドリアマイシン感受性試験 (液体培地)

酵母を SD 培地で一晚培養後、 $1 \times 10^4/180 \mu\text{L}$  となるように SD 培地で希釈した。96-well plate に各濃度 (0 ~ 120  $\mu\text{M}$ ) のアドリアマイシン溶液を 20  $\mu\text{L}$  ずつ添加した後、さらに各酵母の希釈液を 180  $\mu\text{L}$  ずつ加え、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。

##### 2. 酵母のアドリアマイシン感受性試験