

## 主論文

# 線虫 JNK 経路と Fos/HDAC リプレッサー複合体による ストレス応答遺伝子発現制御機構

名古屋大学大学院 理学研究科 生命理学専攻

服部 鮎奈

## 主論文目次

	開始ページ
要旨	3
序論	4
結果	8
考察	26
材料と方法	32
謝辞	42
参考文献	43
図の説明	48
図	58

## 要旨

JNK MAP キナーゼ (MAPK) 経路は、ストレス応答で中心的な役割を果たす細胞内シグナル伝達経路である。個体レベルでの機能解析に適した線虫 *C. elegans* にも、MLK-1 MAPKKK、MEK-1 MAPKK、KGB-1 MAPK から構成される JNK 経路が存在し、重金属ストレス応答を制御している。我々は、KGB-1 がリン酸化する標的因子として bZIP 型転写因子 Fos の線虫ホモログである FOS-1 を同定した。また、DNA マイクロアレイを用いた解析により、KGB-1 依存的に重金属ストレスによって発現が誘導される遺伝子として *kreg-1/2* (*KGB-1-regulated gene*) を同定し、それらが、重金属ストレスに対する耐性獲得に機能することを見いだした。FOS-1 は、ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) の線虫ホモログである HDA-1 を *kreg-1* プロモーター部位にリクルートすることで、*kreg-1* 遺伝子発現を抑制していた。KGB-1 によって FOS-1 がリン酸化されると、FOS-1 のホモダイマー形成が阻害され、その結果プロモーター抑制が解除された。HDA-1 は FOS-1 による転写抑制におけるコリプレッサーとして *kreg* 遺伝子の発現抑制を行っていると考えられる。以上の研究結果から、線虫 JNK 経路は Fos のリン酸化を介して Fos/HDAC リプレッサー複合体を阻害し、*kreg* 遺伝子発現を誘導することで、ストレス応答機構を制御していることを明らかにした。

## 序論

MAPK(Mitogen-Activated protein kinase)経路は、酵母から哺乳類に至る真核生物において高度に保存された細胞内シグナル伝達系で、外界からの様々な刺激を細胞内部に伝えている。MAPK カスケードは、MAP キナーゼ(MAPK)、MAPK キナーゼ(MAPKK)、MAPKK キナーゼ(MAPKKK)の 3 種のキナーゼから構成される。MAPKKK は MAPKK の活性化ループ内のセリン／スレオニン残基をリン酸化することで活性化する。活性化型 MAPKK は MAPK の活性化ループ内の TXY 配列に存在するスレオニンとチロシン残基をリン酸化して活性化する[1, 2]。そして活性化型 MAPK は転写因子などの標的因子をリン酸化することでその機能を調節する。加えて、このカスケードを負に制御する因子として MAPK を脱リン酸化する MAPK ホスファターゼ(MAPK phosphatase; MKP)が存在する[1, 2]。これら一連のリン酸化反応と脱リン酸化反応によって細胞外からのシグナルが正確に細胞内へ伝えられることで、生体は適切な応答ができる。これまでの研究から、MAPK はそのコンセンサス配列を構成するアミノ酸残基のタイプにより、extracellular signal-regulated protein kinase(ERK)型、c-Jun N-terminal kinase(JNK)型、p38 型の三種類のサブファミリーに大別されている。ERK 型 MAPK は MAPKK である MEK および MAPKKK である Raf とキナーゼ経路を構成し、様々な増殖因子により活性化して増殖や分化を誘導する。一方、JNK 型、及び p38 型 MAPK は細胞に対するストレスや炎症性サイトカインによって活性化し、ストレス応答やアポトーシスを制御する。哺乳動物には JNK1、JNK2 および JNK3 の 3 つの JNK が存在するが、これらの

JNK を活性化する MAPKK は MKK4 と MKK7 である。また哺乳動物の p38 は p38a、p38b、p38 $\gamma$ 、p38 $\delta$  の4つがあるが、p38 を活性化する MAPKK は MKK3, MKK4, MKK6 である [1, 2]。またこれらの MAPKK は、MEKK、ASK、TAK、MLK、DLK、TAO などの異なるサブファミリーに属する MAPKKK によりリン酸化されて活性化する。

キイロショウジョウバエ *Drosophila* や線虫 *C. elegans* などのモデル生物は、遺伝学的解析と生化学的解析を個体レベルで行えることから、JNK シグナル伝達経路の作用機序の研究に優れている [3, 4]。また近年の研究から、JNK MAPK シグナル伝達経路を構成する因子は線虫から哺乳類まで高度に保存されていることが示唆されている。線虫 JNK 経路の一つとして、MLK-1 (MAPKKK)、MEK-1 (MAPKK)、KGB-1 (MAPK) からなる KGB-1 経路が存在する [5]。KGB-1 経路は、銅やカドミウムなどの重金属に対するストレス応答や小胞体ストレス、およびバクテリアポア形成毒素に対する転写調節制御に機能することが知られている [5, 6, 7, 8]。これまでの当研究室での解析により、KGB-1 経路周辺で重金属ストレス応答に機能する因子として *shc-1*、*max-2*、および *mig-2* が同定された [5, 6, 7]。*shc-1*、*max-2*、および *mig-2* は、それぞれ哺乳類アダプタータンパク質 Shc、Ste20 ファミリーキナーゼ、および Rac ファミリーに属する small GTPase の線虫ホモログをコードしている。SHC-1 は、MEK-1 MAPKK と MLK-1 MAPKKK のアダプタータンパクとして機能し、KGB-1 経路の活性化に必須である。MAX-2 は MAP4K として機能しており、MLK-1 をリン酸化し活性化する。MIG-2 は MAX-2 に結合することによって、MAX-2 の活性を制御している。また、KGB-1 経路を負に制御する因子として、哺乳類 MAPK ホ

スファターゼ MKP-7 の線虫ホモログ VHP-1 が同定された[7]。VHP-1 は重金属ストレス応答において KGB-1 の脱リン酸化を介して、KGB-1 経路を負に制御している。このように KGB-1 上流で機能する因子については明らかになりつつある。しかしながら、KGB-1 のリン酸化標的因子、またはその下流で機能している因子については全くわかっていない。

これまでに、JNK のリン酸化標的因子として多くの因子が同定されている。その一つとして、ATF1 や Jun といった bZIP 型転写因子が知られている [9,10]。bZIP 型転写因子は、ホモダイマーおよびヘテロダイマー化し、AP-1 (activating protein-1) 複合体を形成する。そして bZIP ドメインを介して DNA に結合することで標的遺伝子の転写制御を行う[9, 10]。これまでの研究から、外界からの刺激により活性化した JNK が AP-1 をリン酸化することで、標的遺伝子の発現を調節することがわかっている[11, 12]。クロマチンダイナミクスは遺伝子発現制御において非常に重要であることから、AP-1 結合因子としてクロマチンの修飾やリモデリングを担う因子の探索が行われた。その結果、ヒストン脱アセチル化酵素(histone deacetylase; HDAC)が、JNK 経路を負に制御していることが明らかにされている[13, 14]。脱リン酸化型の Jun は HDAC と結合し、HDAC をプロモーター付近ヘリクルートすることで標的遺伝子の転写を負に制御している。一方で、Jun はリン酸化されると標的遺伝子のプロモーターへの結合が阻害される。その結果、HDAC を標的遺伝子のプロモーターヘリクルートできなくなり、発現抑制が解除される[15, 16]。これらの研究から、JNK シグナル伝達経路による細胞応答において、クロマチンダイナミクスが重要な役割を担うことが示唆された。

重金属ストレス応答における KGB-1 経路の役割を解明するため、我々は KGB-1 結合因子を探索した。その結果、KGB-1 が結合し、リン酸化する標的因子として bZIP 型転写因子 Fos の線虫ホモログである FOS-1 を同定した。また、DNA マイクロアレイを用いた解析により、KGB-1 依存的に重金属ストレスによって発現が誘導される遺伝子として *kreg-1/2* (*KGB-1-regulated gene*) を同定し、それらが、重金属ストレスに対する耐性獲得に機能することを見いだした。FOS-1 は、ヒストン脱アセチル化酵素である HDA-1 を *kreg-1* プロモーター部位にリクルートすることで、*kreg-1* 遺伝子発現を抑制していた。KGB-1 によって FOS-1 がリン酸化されると、FOS-1 のホモダイマー形成が阻害され、その結果プロモーター抑制が解除された。HDAC は FOS-1 による転写抑制におけるコリプレッサーとして *kreg* 遺伝子の発現抑制を行っていると考えられる。以上の研究結果から、線虫 JNK 経路が Fos のリン酸化を介して Fos/HDAC リプレッサー複合体を阻害し、*kreg* 遺伝子発現を誘導することで、ストレス応答機構を制御していることを明らかにした。

## 結果

### KGB-1 は FOS-1 と結合する

KGB-1 経路新規因子を探索する目的で、yeast two-hybrid 法を用いて KGB-1 結合因子を探索した。一般的に、キナーゼとその基質の結合は一過的であり、キナーゼは基質をリン酸化すると速やかに解離すると考えられている。そこで今回のスクリーニングでは、KGB-1 と基質の結合を保持するためにキナーゼ活性を持たない KGB-1 [KGB-1 kinase negative (KN)]をベイトとして、線虫 cDNA library をスクリーニングした。その結果、KGB-1 結合因子の候補として 10 因子を同定した(Table 1)。その中の一つが、哺乳類 bZIP 型転写因子 Fos の線虫ホモログ FOS-1 であった[10, 17]。Fos は MAPK の標的因子として広く知られていることから、我々は FOS-1 が KGB-1 のリン酸化標的因子である可能性を検討することにした。線虫 FOS-1 はロイシンジッパー領域を含む DNA 結合ドメインである bZIP ドメインにおいて哺乳類 Fos と 46%の類似性を示す(Figure 1)。また FOS-1 の C 末端領域には MAPK のリン酸化コンセンサス配列が複数存在した(Figure 1)。*fos-1* 遺伝子からは異なった第一エクソンを持つ *fos-1a* と *fos-1b* という 2 つのアイソフォームが転写されることがわかっている[17]。*fos-1a* からは第一エクソンに含まれるスタートコドンから 467 アミノ酸のタンパク質が翻訳される。一方、*fos-1b* からは 331 アミノ酸のタンパク質が翻訳される。FOS-1a の N 末端 136 残基は FOS-1a に特異的であるのに対して、FOS-1a の C 末端 331 残基は FOS-1b と完全に一致している。



また、*fos-1a* の発現が anchor cell や生殖腺細胞のみに限定されていることに対して、*fos-1b* はほぼすべての細胞で発現している[17]。KGB-1 経路構成因子は線虫内で一様に発現が見られることから、KGB-1 と FOS-1b (以下 FOS-1 と表記)の関係性について解析を行うことにした。

まず、アフリカミドリザル腎臓由来の培養細胞である COS-7 細胞を用いて免疫沈降実験を行い、KGB-1 と FOS-1 の相互作用を確認した。COS-7 細胞に、HA タグした KGB-1 (HA-KGB-1)と T7 タグした FOS-1 (T7-FOS-1)を過剰発現させた。抗 HA 抗体を用いて HA-KGB-1 を免疫沈降し、抗 T7 抗体を用いて T7-FOS-1 の共沈降が見られるか検討した。その結果、KGB-1 と共発現させたときのみ FOS-1 が共沈降した(Figure 2)。このことから、KGB-1 と FOS-1 が物理的に結合することが確認された。

## KGB-1 は FOS-1 をリン酸化する

KGB-1 と FOS-1 が結合することから、FOS-1 は KGB-1 のリン酸化標的因子である可能性が考えられた。COS-7 細胞に KGB-1 と KGB-1 活性化因子である MEK-1 を共発現させると、FOS-1 のバンドシフトが見られた(Figure 3A, レーン 2)。このバンドシフトは脱リン酸化酵素であるアルカリホスファターゼ処理によって抑制された(Figure 3A, レーン 3)。また、MEK-1 と FOS-1 のみを共発現させた場合には、FOS-1 のバンドシフトは見られなかったことから(Figure 3B)、FOS-1 は KGB-1 によってリン酸化されることが示唆された。

そこで、次に KGB-1 による FOS-1 のリン酸化部位を探索した。MAPK は、その標的因子の高度に保存されている Ser/Thr-Pro モチーフをリン酸化することが知られている。FOS-1 には、6 ヶ所の Ser/Thr-Pro モチーフ [Ser(154)-Pro, Thr(278)-Pro, Thr(283)-Pro, Thr(304)-Pro, Thr(316)-Pro, Thr(318)-Pro] が存在する(Figure 1)。そこで、まず 6 ヶ所全てのセリンとスレオニンをアラニンに置換した FOS-1 変異体(FOS-1 6A)を作製し、バンドシフトが変化するか検討した。その結果、KGB-1 と MEK-1 を共発現させても、FOS-1 6A はバンドシフトを起こさなかった(Figure 3D, レーン 12)。このことから、FOS-1 のリン酸化部位は上記の 6 アミノ酸の中に存在することが示唆された。そこで、リン酸化部位を決定するために、6 ヶ所のセリン/スレオニンのいくつかをアラニンに置換した複数の FOS-1 変異体を作製し、バンドシフトに変化が見られるか検討した。その結果、FOS-1 (T304A T316A T318A)変異体を KGB-1 および MEK-1 と共発現させたところ、野生型 FOS-1 と比べ、バ

ンドシフトがほとんど見られなくなった(Figure 3E, レーン 9)。このことから、304番目、316番目、318番目のスレオニンがKGB-1によってリン酸化されている可能性が示唆された。さらにこれら3つのスレオニンの1つずつをアラニンに置換した単独変異体を作製し、バンドシフトに変化が見られるか検討した。その結果、FOS-1 (T304A)変異によってFOS-1のバンドシフトが強く抑圧された(Figure 3C, レーン 3 と Figures 3D, 3E)。以上の結果から、主に304番目のスレオニンがKGB-1によってリン酸化されていることが予測された。

KGB-1 が FOS-1 の304番目のスレオニンをリン酸化しているかを確認するため、304番目のスレオニンがリン酸化された状態のFOS-1を特異的に認識する抗リン酸化型FOS-1 Thr-304抗体を作製し、ウェスタンブロッティングを行った。その結果、KGB-1に活性がない状態ではFOS-1の304番目のスレオニンのリン酸化は見られなかった(Figure 3C, レーン 1)。これに対し、活性化状態のKGB-1の存在下ではThr-304リン酸化型FOS-1が顕著に検出された(Figure 3C, レーン 2)。一方、野生型FOS-1の代わりにFOS-1 (T304A)を用いた場合、活性化状態のKGB-1存在下でもThr-304リン酸化型FOS-1は検出されなかったことから(Figure 3G, レーン 3)、この抗体が304番目のスレオニンのリン酸化を検出していることが確認された。これらの結果から、FOS-1はKGB-1によって304番目のスレオニンをリン酸化されていると考えられる。

Fosファミリーは、ダイマーを形成しDNAに結合することで、標的遺伝子の転写調節を行うことが知られている[9,10,18]。そこで、我々は線虫FOS-1

がホモダイマーを形成するか検討した。COS-7 細胞に、GFP と FLAG タグした FOS-1 (GFP-FLAG-FOS-1) と T7-FOS-1 を過剰発現させた。抗 GFP 抗体を用いて GFP-FLAG-FOS-1 を免疫沈降し、抗 T7 抗体を用いて T7-FOS-1 の共沈降が見られるか検討した。GFP-FLAG タグを付加することで分子量が増加することから、GFP-FLAG-FOS-1 と T7-FOS-1 を別々のバンドとして検出することが可能になっている。その結果、T7-FOS-1 が GFP-FLAG-FOS-1 と共沈降してくることが明らかになった (Figure 3F, レーン 1, 2)。このことから、FOS-1 がホモダイマーを形成している可能性が示唆された。次に、KGB-1 によるリン酸化が FOS-1 の自己会合に影響を与えるか検討した。活性化状態の KGB-1 の存在下では GFP-1-FLAG-FOS-1 と共沈する T7-FOS-1 量の減少が見られたのに対し、KGB-1 に活性がない状態では共沈する T7-FOS-1 量の減少は見られなかった (Figure 3F, レーン 3, 4)。また、共沈する T7-FOS-1 の 304 番目のスレオニンのリン酸化状態を抗リン酸化 FOS-1 T304 抗体を用いて検討したところ、リン酸化型 T7-FOS-1 は共沈していないことが明らかになった (Figure 3F, レーン 3)。これらの結果は FOS-1 リン酸化が FOS-1 の自己会合を阻害していることを示している。

## FOS-1 は重金属ストレス応答に寄与する

KGB-1 経路は重金属ストレス応答に機能しており、KGB-1 経路構成因子の欠失変異体は重金属に高い感受性を示し、重金属存在下では成虫まで発生できない[5,6,7]。そこで、FOS-1 も重金属ストレス応答に関与するか検討した。これまでに分離されてきた FOS-1 変異体は不妊であり、*fos-1* 変異体由来の胚を回収できないため、重金属感受性を調べられない。そこで、feeding RNAi 法を用いて *fos-1* の機能阻害を行い、重金属感受性を調べた。線虫では食餌として 2 本鎖 RNA を発現する大腸菌を用いると、RNAi 効果が全身に広がり、個体レベルでの表現型を観察できる。野生型系統では、銅存在下・非存在下に関わらず 90%以上の個体が成虫まで発生する。これに対して、*kbg-1(km21)*欠失変異体は銅非存在下では 90%以上の個体が成虫まで発生するに対して、40  $\mu$ M 銅存在下では 50%程度の個体しか成虫まで発生しない。一方、野生型系統に FOS-1 の機能阻害を行った場合、銅の有無にかかわらずほとんどの個体が成虫まで発生した(Figure 4)。FOS-1 の機能阻害によって重金属感受性が見られないことから、FOS-1 は KGB-1 の下流で重金属ストレス応答を促進していないことが示唆された。そこで次に、FOS-1 が重金属ストレス応答を負に制御している可能性を考えた。この可能性を検討するため、*kbg-1* 変異体に FOS-1 の機能阻害を行い、重金属感受性を調べた。*kbg-1(km21)*変異体に FOS-1 の機能阻害を行うと、*kbg-1(km21)*変異体の示す重金属感受性が抑圧され、銅の有無に関わらずほとんどの個体が成虫まで発生した(Figure 4)。このことから、KGB-1 は FOS-1 への負の制御を介して、重金属ストレス応答を行っていることが示唆さ

れた。

次に、重金属ストレス応答における KGB-1 による FOS-1 の制御が 304 番目のスレオニンのリン酸化を介しているかを検討した。野生型系統においては、重金属存在下では KGB-1 が活性化し、FOS-1 をリン酸化することで重金属ストレス応答を制御しており、一方、*kbg-1(km21)*変異体では、FOS-1 がリン酸化されないため重金属感受性を示すと予想される。したがって、野生型系統にリン酸化されない FOS-1 を過剰発現させた場合、重金属感受性を示すことが期待された。この可能性を検討するため、野生型系統に、野生型 FOS-1 および非リン酸化型 FOS-1 (T304A) をヒートショックプロモーター(*Phsp-16*)を用いて過剰発現させたときの重金属感受性を調べた。野生型 FOS-1 を過剰発現させたときには、銅の有無に関わらずほとんどの個体が成虫まで発生した。これに対し、FOS-1 (T304A) を過剰発現させたときには、銅非存在下と比べて、銅存在下で成虫まで発生する個体は 50% 程度まで減少した (Figure 5)。この結果から、FOS-1 T304A の過剰発現によって重金属感受性が誘導されることが示唆された。これらの結果から、KGB-1 は FOS-1 の 304 番目のスレオニンのリン酸化を介して FOS-1 を負に制御することで、重金属ストレス応答に機能していることが示唆された。

### ***kreg-1* 遺伝子は KGB-1 により転写が制御される**

KGB-1/FOS-1 経路が、どのようにして重金属ストレス応答に寄与しているかを調べるため、銅処理および KGB-1 活性に依存して発現量が変化する遺伝子を DNA マイクロアレイにより探索した (Figure 6 と Tables 2, 3)。このスクリーニングから、KGB-1 によって発現を制御されている遺伝子として、6 つの *kreg* (*KGB-1 regulated gene*) 遺伝子群を同定した (Figure 7 と Table 4)。さらに、そのうちの 2 つの遺伝子は、銅存在下で発現量が増加したことから、これらの遺伝子を *kreg-1* および *kreg-2* として解析を行うことにした (Figure 7 と Table 4)。*kreg-1* (F53A9.2) は 83 アミノ酸からなるヒスチジンを多く含んだ新規タンパク質をコードしており、*kreg-2* は線虫 lysozyme (*lys-3*) をコードしている。まず、リアルタイム RT-PCR (qRT-PCR) をもちいてマイクロアレイの結果を確認した。野生型の線虫においては、*kreg-1/2* の発現は銅によって誘導されるのに対し、*kgb-1* (*km21*) 変異体においては、銅の有無に関わらずほとんど発現が見られなかった (Figure 7)。そこで次に、*kreg-1/2* 遺伝子が重金属ストレス応答に機能しているか検討するため、feeding RNAi 法を用い KREG-1 および KREG-2 の機能阻害を行い、重金属感受性を調べた。その結果、*kreg-1* および *kreg-2* の RNAi により部分的な重金属感受性が見られた (Figure 8)。これらの結果から、*kreg-1/2* 遺伝子は重金属存在下で KGB-1 により発現を誘導され、ストレス除去に機能する事が示唆された。

*kreg-1/lys-3* は、lysozyme をコードしており、細菌感染防御に機能することが予想されている [19]。このことから、細菌感染が重金属感受性に関与して

いる可能性が考えられた。そこで、生存している状態の細菌と、熱処理によって殺菌した状態の細菌をそれぞれ線虫に与えたときに、重金属感受性に変化が見られるか検討した。その結果、熱処理を行って細菌感染が起こらないようにしても、*lys-3* 変異体の示す重金属感受性は熱処理を行わない場合と同程度であった(Figure 9)。以上のことから、細菌の有無は重金属感受性には関係しないことが示唆され、LYS-3 がどのようにして重金属ストレス応答に寄与しているかは不明なままである。

KGB-1 経路による *kreg-1* 遺伝子の発現制御機構を解明するため、*kreg-1* 遺伝子上流配列約 2.8kbp をクローニングし、その下流に蛍光タンパク質遺伝子である *venus* を付加したレポーター遺伝子 *Pkreg-1::venus* を作製した。レポーター遺伝子を保持する線虫 N2; *Ex[Pkreg-1::venus]* を蛍光顕微鏡で観察した。野生型の線虫内では、主に咽頭と尾付近の腸において VENUS の弱い発現が見られた。野生型の線虫に銅処理をおこなうと、腸における VENUS の蛍光強度は大きく増加した(Figure 10)。このことから、qRT-PCR の結果と同様に *kreg-1* 遺伝子は重金属ストレス依存的に腸で転写が誘導されることが明らかになった。次に、*kreg-1* 遺伝子の重金属ストレス依存的発現上昇に KGB-1 が必要であるかを検討した。レポーター遺伝子を保持した *kgb-1* 変異体 (*kgb-1(km21); Ex[kreg-1p::venus]*) を作製し、観察したところ、VENUS タンパク質の蛍光強度が著しく減少しており、銅存在下でも発現の誘導は見られなかった (Figure 10)。さらに、KGB-1 を負に制御するホスファターゼである VHP-1 の機能阻害を行うと、野生型線虫では VENUS の蛍光が増加したのに対し、*kgb-1(km21)* 変異体では VENUS の蛍光増加は見られなかった(Figure 10)。



これらの結果から、*Pkreg-1::venus* は、重金属ストレス存在下において、KGB-1 経路の活性化を介して発現が誘導されることが分かった。

## FOS-1 は *kreg-1* 遺伝子のリプレッサーとして機能する

次に、FOS-1 が *kreg-1* 遺伝子の転写制御に機能しているのか検討した。レポーター遺伝子を保持する野生型の線虫に FOS-1 の機能阻害を行うと、銅非存在下にも関わらず VENUS タンパク質の蛍光強度が上昇した(Figure 11)。また、*fos-1* RNAi による *kreg-1* および *kreg-2* 遺伝子の発現変化は qRT-PCR においても確認された(Figure 12)。これらの結果より、FOS-1 は KGB-1 経路による *kreg-1* 遺伝子の発現誘導を抑制している可能性が示唆された。この仮説を調べるため、*kbg-1(km21)*変異体に FOS-1 の機能阻害を行ったところ、野生型に行った際と同様に、VENUS タンパク質の蛍光強度が上昇した(Figure 11)。すなわち、*kbg-1(km21)*変異により減少した *kreg-1* の発現が FOS-1 の機能阻害によって抑圧された。以上の結果より、FOS-1 は KGB-1 の下流で *kreg-1* 遺伝子の転写制御を負に制御していることが考えられる。

*kreg-1* 遺伝子は KGB-1 経路下流で銅によって腸で発現を誘導されることから、腸において KGB-1 が活性化されることがストレス除去に重要である可能性が考えられた。実際、KGB-1 活性化因子である MEK-1 MAPKK は、腸での発現が確認されている[6, 20]。しかし、当研究室では以前、*mek-1* 変異体の示す重金属感受性は、MEK-1 の表皮特異的な発現によってレスキューすることを報告している[6]。そこで、MEK-1 を腸特異的に発現させることによっても、*mek-1* 変異による重金属感受性の表現型をレスキューできるか調べた。腸特異的に発現誘導する *elt-2* プロモーターの下流に *mek-1* cDNA をつなげたコンストラクトを保持した *mek-1(ks54); Ex[Pelt-2::mek-1]*は、重金属感受性を示さなかつ

た(Figure 13)。以上の結果から、腸において KGB-1 経路が活性化することで、*kreg-1* 遺伝子の転写調節を介して重金属ストレス応答を制御していることが示唆された。また、*Pkreg-1::venus* レポーターは表皮での発現に必要な領域を欠損していると考えられた。

Fos は Jun や他の bZIP 型転写因子とダイマー化し、AP-1 複合体を形成することで遺伝子発現制御をおこなうことが知られている[9, 10, 18]。哺乳類やショウジョウバエと同様に、線虫の FOS-1 と JUN-1 もヘテロダイマー化することが分かっている[18, 21]。そこで、線虫 JUN-1 が、FOS-1 と同様に *kreg-1* 遺伝子発現制御に機能しているか検討するため、JUN-1 の機能阻害を行った。しかし、JUN-1 機能阻害による *Pkreg-1::venus* の蛍光増加は見られなかった(Figure 14)。ATF-7 は bZIP 転写因子のひとつで、PMK-1 p38 経路による自然免疫反応に寄与する[22]。そこで、*Pkreg-1::venus* を保持した *atf-7(qd22)* 変異体において VENUS の蛍光を観察したが、野生型と比べて変化は見られなかった(Figure 14)。加えて、JUN-1 の機能阻害や *atf-7* 変異は、*kbg-1(km21)* 変異体の示す重金属感受性を抑圧しなかった(Figure 15)。これらの結果から、JUN-1 と ATF-7 は、KGB-1 経路による重金属ストレス応答に関与していないと考えられる。

次に、FOS-1 が *kreg-1* 遺伝子の転写を直接制御しているかを調べるために、*kreg-1* 遺伝子のプロモーター内に FOS-1 の認識配列があるか探索した。Fos の bZIP ドメインは、TPA-responsive element (TRE) と呼ばれる TGA(C/G)TCA コンセンサス配列に結合する[23]。*kreg-1* 遺伝子のプロモーターには、TRE (TGAGTCA) が 2 ヶ所存在していた(Figure 16)。2 ヶ所とも翻

訳開始点から約 200 bp 上流に存在しており、訳開始点から遠位に存在しているものから順に、TRE1、TRE2 とした。この配列を介して FOS-1 が *kreg-1* 遺伝子の発現抑制を行っているかを検討するため、TRE1、TRE2 をそれぞれ欠かせたレポーター遺伝子 (*Pkreg-1Δtre1::venus* と *Pkreg-1Δtre2::venus*) を作製し、線虫内の蛍光を観察した。その結果、野生型において、*Pkreg-1Δtre1::venus* の蛍光は全長プロモーターと比較して変化がなかった (Figure 17)。一方、*Pkreg-1Δtre2::venus* は、野生型において、重金属ストレス非存在下にも関わらず、全長プロモーターと比較して顕著に蛍光強度が増加しており、*kbg-1(km21)*変異による発現低下もみられなかった (Figure 17)。さらに、*Pkreg-1Δtre2::venus* を保持する野生型の線虫に FOS-1 の機能阻害を行っても、全長プロモーターで見られたよう顕著な発現増加は見られなかった (Figure 19)。この結果から、FOS-1 が *kreg-1* 遺伝子の発現を抑制するために TRE2 が必要であり、FOS-1 は TRE2 に結合し、*kreg-1* 遺伝子の発現を抑制する可能性が示唆された。

FOS-1 が TRE2 部位に直接結合しているかを検討するため、クロマチン免疫沈降 (ChIP) アッセイを行った。ヒト胎児由来腎臓 293 (human embryonic kidney 293; HEK293) 細胞に、*Pkreg-1::venus* と T7-FOS-1 または T7-hGrhl2 を共発現させた。抗 T7 抗体を用いて T7-FOS-1 および T7-hGrhl2 を免疫沈降し、qPCR を用いて DNA の共沈降が見られるか検討した。その結果、TRE1 と TRE2 部位を含む DNA 断片が FOS-1 と共沈降することが明らかになった (Figure 18)。一方で、ネガティブコントロールに用いた T7-hGrhl2 は TRE 部位と結合しなかった (Figure 18)。また、*Pkreg-1Δtre1::venus* を用いたときに

は、*kreg-1* プロモーターと T7-FOS-1 との共沈降が見られたが、*Pkreg-1Δtre2::venus* を用いたときには共沈しなかった(Figure 18)。これらの結果から、FOS-1 は TRE2 部位を介して *kreg-1* プロモーターと結合することが明らかになった。

前述したとおり、FOS-1 の自己会合は、KGB-1 による FOS-1 T304 のリン酸化により阻害される。そこで次に我々は、FOS-1 のリン酸化状態の変化は、*kreg-1* プロモーターTRE2 部位への結合に影響するか検討した。T7-FOS-1 を過剰発現させた COS-7 細胞の細胞抽出液を蛍光標識したプローブとインキュベートし、ゲルシフトアッセイを行った。その結果、TRE2 配列を持つプローブは、T7-FOS-1 を発現させた細胞抽出液中とインキュベートするとシフトバンドが見られたことから、FOS-1 が TRE2 プローブと結合することが示唆された。一方で、6塩基の TRE 配列を欠失させた $\Delta tre2$ プローブと FOS-1 は結合しなかった(Figure 19A, レーン 1, 2, 5)。さらに、TRE 配列を TGAGTCA から AAGCTTA へ置換し、AP-1 と DNA の結合が阻害される変異を加えた mutantTRE2 プローブを作製した [24]。FOS-1 と mutantTRE2 プローブは結合しなかったことから、FOS-1 は TRE2 配列を認識して結合していることが示唆された(Figure 19A, レーン 6)。加えて、T7-FOS-1 によって見られた TRE2 プローブのシフトバンドは、抗 T7 抗体を加えることでスーパーシフトしたことから、この複合体に T7-FOS-1 が含まれていることが証明された。また、MEK-1 と KGB-1 を共発現させると、FOS-1 と TRE2 プローブの結合が減少した(Figure 19B, レーン 1-3)。この減少は、KGB-1 KN を用いた時には見られなかったことから(Figure 19B, レーン 4)、KGB-1 による FOS-1 リン酸化は、

FOS-1 の標的遺伝子プロモーターとの結合を阻害することが示唆された。これらの結果より、KGB-1 経路はリン酸化によって FOS-1 の自己会合を阻害することで、FOS-1 のプロモーターへの結合を阻害し、その結果、標的遺伝子の発現を促進することが示唆された。

## HDA-1 は KGB-1 経路下流で *kreg-1* 遺伝子発現誘導に対し抑制的に機能する

これまでの結果から、通常状態では脱リン酸化型の FOS-1 が *kreg-1* 遺伝子のプロモーター内に存在する TRE2 に結合し、*kreg-1* 遺伝子の転写を抑制していること、一方で重金属ストレス存在下では、KGB-1 により FOS-1 がリン酸化され、リン酸化型となった FOS-1 はリプレッサーとしての機能を失い、*kreg-1* 遺伝子の転写が促進されるということが考えられる。しかしながら、FOS-1 がどのようにして *kreg-1* 遺伝子の転写を抑制しているのかは不明のままである。

クロマチンダイナミクスは遺伝子発現制御において非常に重要であることから、AP-1 結合因子としてクロマチンの修飾やリモデリングを担う因子の探索が広く行われた[13-16, 25, 26]。自然免疫において、AP-1 はクラス 1 ヒストン脱アセチル化酵素である HDAC1 を抗菌性タンパク質をコードする遺伝子のプロモーターへリクルートすることが報告されている[26]。HDAC1 はヒストンを脱アセチル化することで抗菌性タンパク質をコードする遺伝子のエピジェネティックな転写抑制を行う[26]。そこで、線虫重金属ストレス応答においても、HDAC が FOS-1 と協調して *kreg-1* 遺伝子の転写制御を行っている可能性をレポーターアッセイ系で検討した。線虫には、HDAC のホモログとして HDA-1、HDA-2、HDA-3 が存在している[27,28]。野生型の線虫に HDA-1 の機能阻害を行った結果、*Pkreg-1::venus* の発現量が著しく上昇した(Figure 20)。また、*kgb-1(km21)*変異による *Pkreg-1::venus* の発現低下は、HDA-1 の機能阻害によって抑圧され、*Pkreg-1::venus* の発現が増加した (Figure 20)。また、

TRE2 部位の欠失によって発現が増加している *Pkreg-1Δtre2::venus* に HDA-1 機能阻害を行っても、さらなる発現上昇はほとんど見られなかった (Figure 20)。このことから、HDA-1 による *kreg-1* 遺伝子発現抑制は、TRE2 部位を介して行われていることが示唆された。さらに、HDA-1 の機能阻害によって、*kreg-1*、*kreg-2* 遺伝子の発現が増加することを qRT-PCR によって確認した (Figure 21)。このことから、HDA-1 は *kreg-2* 遺伝子の発現に対しても抑制的に機能していると考えられた。

次に、FOS-1 が HDA-1 と結合するか検討した。HEK293 細胞に、T7-FOS-1 と FLAG-HDA-1 を過剰発現させた。抗 FLAG 抗体をもちいて FLAG-HDA-1 を免疫沈降し、抗 T7 抗体を用いて、T7-FOS-1 の共沈降が見られるか検討したところ、T7-FOS-1 の共沈は見られなかった (Figure 22, レーン 1)。しかしながら、T7-FOS-1 と FLAG-HDA-1 とともに、*Pkreg-1::venus* を共発現させると、FOS-1 と HDA-1 の相互作用が確認された (Figure 22, レーン 3)。この相互作用は、*Pkreg-1Δtre2::venus* を用いたときには見られなかったことから (Figure 22, レーン 4)、HDA-1 と FOS-1 は *kreg-1* プロモーター上で結合していることが示唆された。

これまでの結果から、HDA-1 が KGB-1 経路下流で FOS-1 と協調して機能することが示唆された。そこで、HDA-1 が KGB-1 経路下流で重金属ストレス応答に機能しているか検討するため、野生型と *kgb-1(km21)* 変異体に HDA-1 機能阻害を行ったときの重金属感受性を調べた。野生型において HDA-1 機能阻害を行っても重金属感受性はみられなかった。一方で、*kgb-1(km21)* 変異体に HDA-1 機能阻害を行うと、銅の有無でほとんど生存率に変化がみられなかった



(Figure 23)。すなわち、*kqb-1(km21)*変異体の示す重金属感受性を抑圧していた。以上の結果より、HDA-1 は FOS-1 同様、重金属ストレス応答を負に制御していることが明らかになった。

## 考察

JNK MAP キナーゼ (MAPK) 経路は、ストレス応答で中心的な役割を果たす細胞内シグナル伝達経路である。線虫では、KGB-1 JNK MAPK 経路が存在し、重金属ストレス応答を制御している[5, 6, 7]。今回我々は、bZIP 型転写因子 Fos の線虫ホモログである FOS-1 と、ヒストン脱アセチル化酵素(HDAC) の線虫ホモログである HDA-1 が KGB-1 経路下流で重金属ストレス応答を制御していることを見いだした (Figure 24)。ストレスが存在しない状態では、FOS-1 と HDA-1 は重金属ストレス耐性遺伝子の発現を協調的に抑制している。一方、ストレス存在下では、活性化した KGB-1 が FOS-1 をリン酸化する。リン酸化された FOS-1 はホモダイマー形成を阻害されるため、HDA-1 を標的遺伝子のプロモーター部位にリクルートできなくなる。その結果、ストレス耐性遺伝子の発現が誘導されることが明らかになった。

## KGB-1 経路下流の標的遺伝子の同定

KGB-1 JNK MAPK 経路による重金属ストレス応答機構の作用機序を解明する上で、KGB-1 によって発現を促進されるストレス応答遺伝子の同定は不可欠である。我々は、野生型系統と *kgb-1* 変異体を比較して、KGB-1 経路によって発現量が制御される遺伝子 *kreg-1* と *kreg-2/lys-3* を同定した。両者とも、KGB-1 経路依存的に重金属刺激により発現が誘導されることが、および両者の発

現がストレス存在下での個体の生存に必要であることが明らかになった。以上の結果から KGB-1 の活性化は、これらのストレス耐性タンパク質の発現を誘導することで、重金属ストレスの除去に作用することが示唆された。

では、ストレス耐性遺伝子はどのようにして、重金属ストレスを除去するのだろうか。KREG-1 は、ヒスチジンが豊富なポリヒスチジン領域を持つ。このような領域は、金属イオン( $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ など) と結合し、金属イオンをキレートする作用を持つことが知られている[29]。実際に、ピロリ菌(*H. pylori*) がもつ Hpn は、ポリヒスチジン領域を持った 60 アミノ酸のタンパク質をコードしており、大腸菌に発現させた Hpn は銅と優先的に結合し、大腸菌の銅耐性を上昇させることが報告されている[30]。これらの知見から、我々は、Hpn と同様に KREG-1 もポリヒスチジン領域を介して、銅と結合しキレートすることで、銅耐性を誘導しているのではないかと推測している。

## KGB-1 経路における FOS-1 の役割

今回我々は、KGB-1 下流因子として、bZIP 型転写因子である FOS-1 を同定した。FOS-1 は KGB-1 と結合し、KGB-1 によって C 末端側に存在するスレオニンをリン酸化されることが明らかになった。哺乳類において、Fos は Jun とヘテロダイマー化し、AP-1 複合体を形成する[18,23]。bZIP 型転写因子には、塩基性領域とロイシンジッパーモチーフという隣接する 2 つのドメインが保存されており、それぞれ、DNA 結合とダイマー形成に必要である。線虫において

も、貯精嚢特異的に発現する *plc-1* 遺伝子の転写のアクチベーターとして FOS-1 と JUN-1 からなるヘテロダイマーが機能していることが知られている [21]。加えて、ゲノムワイド RNAi スクリーニングにより、*fos-1* と *jun-1* が KGB-1 経路によるバクテリアポア形成毒素応答に関与することが報告されている [8]。このことから、おそらく JNK-AP-1 経路は、転写制御を介してバクテリアポア形成毒素の除去に機能していると考えられる。しかしながら、今回の解析から、KGB-1 経路による重金属ストレス応答機構に JUN-1 は関与していないことが明らかになった。そして我々は、FOS-1 はホモダイマー化することで、標的遺伝子の転写のリプレッサーとして働くことを示した。したがって、FOS-1 ダイマー化は標的遺伝子のプロモーター領域への結合促進に寄与していること、また、おそらくダイマーを形成するパートナー因子によって、FOS-1 がアクチベーターとして機能するかリプレッサーとして機能するかが決定され则认为られる。

線虫 ATF-7 や酵母 Sko1p などの bZIP 型転写因子はリン酸化状態によって転写のリプレッサーとなるか、アクチベーターとなるかを切り替えることが示唆されている [22,31]。病原体感染によって、PMK-1 p38 MAPK 経路が活性化されると、ATF-7 は PMK-1 によってリン酸化され、リプレッサーからアクチベーターへと変換される [22]。酵母 Sko1p は浸透圧ストレス存在下において、Hog1p MAPK にリン酸化され、リプレッサーからアクチベーターへと変換される [31]。我々は、FOS-1 の機能阻害によって *kgb-1* 変異体の示す重金属感受性が抑圧されることを見いだしたが、野生型系統において FOS-1 を機能阻害しても重金属感受性に変化は見られなかった。このことは、重金属ストレス応答に

において、FOS-1 は KGB-1 経路下流でリプレッサーとしてのみ機能していることを強く示唆しており、FOS-1 による重金属ストレス応答では転写制御活性の転換は起こらないと考えられる。

本研究における生化学的解析から、KGB-1 による FOS-1 のリン酸は、FOS-1 のホモダイマー形成を阻害することで標的遺伝子のプロモーター部位への結合を阻害することが明らかになった。おそらく、FOS-1 はダイマー化することで DNA への親和性が増すことが予想される。これらのことから、我々は以下のモデルを想定している。重金属ストレスによって活性化した KGB-1 は FOS-1 をリン酸化する。リン酸化した FOS-1 はダイマーからモノマーに変換することで、プロモーターへの結合力が減少する(Figure 24)。

### KGB-1 経路下流で機能する FOS-1/HDA-1 による遺伝子発現制御メカニズム

FOS-1 はどのようにして *kreg-1* 遺伝子の転写のリプレッサーとして働くのだろうか？我々の結果から、ヒストン脱アセチル化酵素である HDA-1 が FOS-1 と協調的に機能することで、*kreg-1* 遺伝子の発現を抑制していることが示唆された(Figure 24)。これまでに、多数の転写因子がヒストンアセチル化を制御するタンパク質複合体を特定の部位にリクルートする役目を担うことが報告されている。アセチル基転移酵素がヒストンのアセチル化を促進することで転写を誘導するのに対し、ヒストン脱アセチル化酵素である HDAC は転写を抑制する。これらのことから、FOS-1 が HDA-1 を *kreg-1* 遺伝子のプロモーター部位にリ

クルートすることで、転写のリプレッサーとして働くことが示唆される。したがって、KGB-1 は FOS-1/HDA-1 リプレッサー複合体による転写抑制を解除することによって *kreg-1* 遺伝子発現を誘導していると考えられる(Figure 24)。すなわち、通常の状態では、FOS-1 はホモダイマーを形成して *kreg-1* プロモーター内の TRE2 部位に結合している。ダイマー化した FOS-1 は HDA-1 のプロモーターへのリクルートを促進する。そして、FOS-1/HDA-1 リプレッサー複合体は重金属ストレス非存在下での *kreg* 遺伝子群の不必要な発現を抑制している。一方、重金属ストレス存在下では、KGB-1 が FOS-1 をリン酸化する。リン酸化された FOS-1 はホモダイマー形成を阻害されることで、HDA-1 を *kreg* プロモーター部位にリクルートできなくなる。その結果、*kreg* 遺伝子群の発現抑制が解除され、*kreg-1* 遺伝子が発現する。

これまでに Fos のリプレッサーとしての機能はショウジョウバエを用いた研究で報告されている[14]。ショウジョウバエにおいて、HDAC は非リン酸化型 DFos によってプロモーター部位にリクルートされ、その標的遺伝子の転写を抑制している。JNK によって DFos がリン酸化されると、HDAC が解離するだけでなく、アセチル化転移酵素を誘導することで、標的遺伝子の転写効率を促進させる。それと比較すると、我々が今回発見した、線虫 FOS-1 のリン酸化によるホモダイマー形成の阻害、およびそれに続く DNA 結合能低下と HDAC との相互作用低下というメカニズムは新しい知見である。ショウジョウバエ Fos と線虫 FOS-1 を比較すると、bZIP 領域は相同性を示すものの、bZIP 領域以外のアミノ酸配列に明確な相同性はみられず、それぞれのリン酸化部位も保存されていない[32]。にもかかわらず、JNK が Fos を基質としてリン酸化し、

Fos/HDAC レプレッサー複合体に影響を与えるという作用機序は、線虫とショウジョウバエにおいて保存されていた。このことは、JNK シグナル伝達経路が bZIP 型転写因子である Fos ファミリー因子の活性を制御するという機構が種を超えて保存されていたことを示している。

今回我々は、KGB-1 が FOS-1/HDA-1 リプレッサー複合体の解離を誘導することで、ストレス応答因子の発現を促進する機構を報告した。この発見は、個体におけるストレス応答機構の詳細を解明した新たな知見である。今後は、*kreg* 遺伝子群がどのようにして重金属ストレスを除去するのか、その作用メカニズムを探ることで、JNK シグナル伝達経路によるストレス応答制御の全容が解明されたいと考える。

## 材料と方法

### プラスミドと変異導入

#### 1. pBTM116-KGB-1 K67R

酵母発現用 pBTM116-KGB-1 K67R は、pBTM116 vector 内にある LexADNA 結合領域(DNA-binding domain; DBD)をコードする領域の後ろに、キナーゼドメインの ATP 結合モチーフ内のリジンをアルギニンに置換した KGB-1 (K67R)をインフレームで挿入し、作製した。

#### 2. pCMV-HA-KGB-1 WT および KN

培養細胞発現用プラスミド pCMV-HA-KGB-1 WT および KN は、CMV プロモーターにより発現制御されている HA tag 発現 vector に、*kgb-1 (WT)* cDNA および *kgb-1 (K67R)* cDNA を挿入し作製した。

#### 3. pCMV-FLAG-MEK-1

培養細胞発現用プラスミド pCMV-FLAG-MEK-1 は、CMV プロモーターにより発現制御されている FLAG タグ発現ベクターに、*mek-1* cDNA を挿入し作製した。

#### 4. pCMV-T7-FOS-1, pCMV-GFP-FLAG-FOS-1

培養細胞発現用プラスミド pCMV-T7-FOS-1 および pCMV-GFP-FLAG-FOS-1 は、CMV プロモーターにより発現制御されている



T7 タグ発現ベクターおよび、GFP-FLAG 発現ベクターに、*fos-1b* cDNA を挿入し作製した。

#### 5. pCMV-T7-hGrhl2, pCMV-GFP-FLAG-HDA-1

*hGrhl2* および *hda-1* の cDNA は、ヒト cDNA ライブラリーまたは、線虫 cDNA ライブラリーからクローニングした。シーケンスを確認後、CMV プロモーターにより発現制御されている T7 タグ発現ベクターおよび、FLAG タグ発現ベクターに導入した。

#### 6. pPD49.78-T7-FOS-1 WT、T304A

上記の pCMV-T7-FOS-1 WT、T304A から、PCR 法により T7 タグを含む FOS-1 を増幅し、ヒートショックプロモーターにより発現制御される pPD49.78 ベクターに T7-FOS-1 WT、T304A を挿入し作製した。

#### 7. *Pkreg-1::venus*

線虫 DNA から *kreg-1* 遺伝子のコーディング領域の上流 2.8kbp を *kreg-1* プロモーターとしてクローニングした。クローニングした *kreg-1* プロモーターを Gateway cloning technology (Invitrogen) を用いて *venus* の上流に挿入し、*pDEST-Pkreg-1::venus* を作製した。

#### 8. *Pelt-2p::mek-1::venus*

*elt-2* プロモーターを含む 2.9kbp の DNA フラグメントと、*mek-1* コーディ

ング領域および *venus* コーディング領域を融合させた。*Pmek-1::mek-1::venus* は以前報告した方法で作製した[6]。

9. *Psur-5::sur-5::gfp*, *Pttx-3::gfp*

体細胞の核で GFP が発現する *sur-5p::sur-5::gfp* および、AIY ニューロンで GFP が発現する *Pttx-3::gfp* をインジェクションマーカーとして使用した [33,34]。

実験に用いた線虫の系統

株	遺伝子型
Bristol N2	wild-type
KU21	<i>kgb-1 (km21)</i>
FK171	<i>mek-1 (ks54)</i> <i>atf-7 (qd22)</i>
GR1373	<i>eri-1 (mg366)</i>
FX0505	<i>lys-3 (tm2505)</i>

線虫の飼育

線虫の飼育は、基本的に S. Brenner の方法に従った。飼育培地に関しては

S. Brenner の方法を一部改変し、NGM プレート [1l あたり Bacto-peptone 2.5g、Bacto-Agar 17g、NaCl 3g、オートクレーブ後に 1M K-phosphate (pH 6.0) 25ml、1M  $\text{CaCl}_2$  1.0ml、1M  $\text{MgSO}_4$  1.0ml, 5mg/ml コレステロール 1.0ml を加えたもの] に大腸菌 OP50 を適量塗ったものを用いた。飼育温度は 16 度または 20 度で行った[35]。作製したプラスミドはインジェクションマーカーとともに、野生型が young adult の時期に生殖腺に注射した[36]。

### 使用した抗体

抗リン酸化型 FOS-1 抗体は、FOS-1 タンパクの C 末端側と対応する配列を持つ、合成したリン酸化ペプチド CSNTGL(P)TPSGQP [(p), phosphorylated] を抗原として作製した。抗 HA 抗体は 16B12 (Covance)、抗 FLAG 抗体は M2 (Sigma)、抗 T7 抗体(Novagen)、および抗 GFP 抗体(Clontech)を使用した。

### 重金属感受性の検討

重金属に対する感受性の解析は次に示すように行なった。各種個体の胚を 100  $\mu\text{M}$  硫酸銅存在下または非存在下の NGM プレートに移した。20°C で一日インキュベートした後、孵化した卵の数は孵化していない卵の数を測定することで決定した。卵が孵化してから 4 日後に成虫に生育した個体を測定した。*lys-3* 変異体に対する細菌感染の影響を検討する実験では NGM プレートを 60 度で 15 分熱処理することで添塗した大腸菌 OP-50 を殺菌してから用いた。

## RNAi を用いた重金属感受性の検討

*fos-1* RNAi クローンをプラスミドで保持した大腸菌株 HT115 (DE3) を用いた。プレートは、上述したプレート 1 l あたり、0.1M IPTG 10ml、25mg/ml カルベニシリン 1ml を加えたものを RNAi アッセイに使用した。さらに前述のプレートについて 40  $\mu$ M 硫酸銅または 100  $\mu$ M 存在下・非存在下で行った。

1 日目；RNAi アッセイ用のプレートを作製した。また、各遺伝子の RNAi クローンを保持した大腸菌株を 5mg/l アンピシリンを加えた LB プレートにストリークし、37 度で一晩培養した。

2 日目；コロニーを 5mg/l アンピシリンを加えた LB 培地で 37 度で 7 時間から 10 時間培養した。培養液を RNAi アッセイ用プレートに適量塗り、室温で一晩おいた。

3 日目；L4 から young adult の野生型系統および *kgb-1(km21)* 変異体を RNAi アッセイ用プレートにおいた。

4 日目；3 日目に虫をおいた RNAi アッセイ用プレートから新しい RNAi アッセイ用プレートに虫を移した。

5 日目；4 日目のプレート上にある胚を 50 個程度(A) 硫酸銅の入っているプレートと入っていない RNAi 用プレートにおいた。

6 日目；孵化していない胚(B)がある場合は、その数を数えた。

8 日目；成虫まで発生した個体数(C)を数えた。

9 日目；成虫まで発生した個体数(D)を数えた。

本実験では、陰門の形成を確認した時点で成虫になったと判断している。このアッセイを複数回行い、次に示す計算式で、重金属感受性を評価した。

$$(C+D) / (A-B) \times 100$$

さらに、上記の式で算出した銅存在下での生存率を銅非存在下での生存率で割ったものをグラフで表した。

### ヒートショックによる過剰発現系における重金属感受性の検討

100  $\mu$ M 硫酸銅存在下・非存在下で行った。まず、各系統を硫酸銅の入っていないプレートに植え継いだ。20 時間後に、そのプレート上にある胚を 50 個程度(A)硫酸銅の入っているプレートと入っていないプレートにおいた。胚をおき終わってから毎日 2 回 33 度 1 時間のヒートショックを行った。胚をおいた 24 時間後に、孵化していない胚(B)がある場合は、その数を数えた。それから 72 時間後(C)と 96 時間後(D)にそれぞれ成虫まで発生した個体の数を数えた。このアッセイを複数回行い、次に示す計算式で、重金属感受性を評価した。

$$(C+D) / (A-B) \times 100$$

さらに、上記の式で算出した銅存在下での生存率を銅非存在下での生存率で割ったものをグラフで表した。

### 実験に用いた培養細胞

アフリカミドリザル腎臓由来の COS-7 細胞および、ヒト胎児由来腎臓 293

(human embryonic kidney 293; HEK293)細胞を用いた。各細胞は 10% ウシ胎仔血清(fetal bovine serum)、50 unit/ml ペニシリンを含む Dulbecco's modified Eagle's medium を用い、37 度、5% CO<sub>2</sub> の条件下で培養した。

### RNA 回収とマイクロアレイ、qRT-PCR

各系統の成虫を 1mM 硫酸銅溶液で 1 時間インキュベートした。Total RNA は Trizol (Invitrogen)処理後、DNase、phenol/chloroform を用いて回収した。水に溶解した total RNA をマイクロアレイおよび qRT-PCR に使用した。マイクロアレイには、Affymetrix 社製の GeneChip を用いて Takara Bio Inc.で外注した。野生型と *kgb-1(km21)*変異体から回収した total RNA からビオチン標識した cRNA を作製し、Affymetrix Genechips の 22500 遺伝子に対するプローブとハイブリダイズさせた。qRT-PCR は SYBR Premix Ex Taq (Takara)と 7300 real-time RT-PCR system (Applied Biosystems)を用いて解析した。野生型サンプルの希釈系列からスタンダードカーブを作製し、*act-1* 遺伝子発現結果を用いてノーマライズした。

### *kreg* 遺伝子群の同定

マイクロアレイの結果から、KGB-1 経路依存的に銅処理によって発現が変化する遺伝子の同定を行った(Figure 6)。はじめに、野生型において銅処理によって発現が 2 倍以上増加する遺伝子を 334 遺伝子同定した(Table 2)。次に、KGB-1

経路依存的に発現が上昇する遺伝子を絞るため、銅処理を行った野生型と比べ銅処理した *kbg-1(km21)* 変異体で発現が 50%以下に減少している 66 遺伝子を同定した(Table 2)。さらに、銅処理なしでの野生型とくらべ、*kbg-1(km21)* 変異体で発現量が増加していない遺伝子 50 個を絞り込んだ(Table 2)。最後に、Wormbase により cDNA の発現が確認されており、野生型で銅処理により発現が増加している遺伝子 13 個を同定した(Table 3)。13 遺伝子を qRT-PCR によりより詳しく解析した結果、6 つの遺伝子が KGB-1 によって発現を制御される遺伝子として同定された(Table 4)。マイクロアレイの結果は、NCBI-GEO データベースに掲載した。

(アクセスナンバー GSE42703)

URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE42703>

## レポーターアッセイ

*Pkreg-1::venus* を保持した野生型および *kbg-1(km21)* 変異体を *vhp-1*, *fos-1*, *jun-1*, *atf-7* または *hda-1* RNAi を発現する大腸菌存在下で飼育し、孵化後 3 日目に、1mM 硫酸銅溶液で 1 時間インキュベートした。その後、線虫を NGM プレートに戻し、3 時間 20 度で飼育した。腸での VENUS の蛍光を強いもの、弱いもの、光らないものの 3 段階にクラス分けし、全体に占める個体の割合をグラフに示した。

## ホスファターゼ処理、免疫沈降実験および ChIP アッセイ

ホスファターゼアッセイは、細胞抽出液をアルカリホスファターゼ(NEB)処理ありとなしで、それぞれ 36 度 5 分インキュベートした。

COS-7 細胞からの免疫沈降実験は定法に倣った[37]。HEK293 細胞からの免疫沈降実験では、10 分室温で 1%パラホルムアルデヒド処理した細胞を、終濃度 0.125M のグリシンで 5 分インキュベートした後に回収した。ChIP アッセイは、ChIP-IT Express Enzymatic Shearing (Active Motif)を用いて行った。 $2 \times 10^8$  HEK293 細胞から得たクロマチン抽出液から抗 T7 抗体と protein G magnetic beads (VERITAS)を用いて overnight で免疫沈降を行った。免疫沈降物中の DNA-ヒストン複合体は 65 度でインキュベートし脱クロスリンクした。RNase A 処理と protease K 処理を行って精製した DNA を用いて qPCR を行った。

## ゲルシフトアッセイ

トランスフェクションした COS-7 細胞を lysis buffer(20 mM HEPES (pH 7.4), 150 mM NaCl, 12.5 mM  $\beta$ -glycerophosphate, 1.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 2 mM EGTA, 10 mM NaF, 2 mM dithiothreitol, 1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 100 units/ml aprotinin, 0.5% Triton X-100)を用いて溶解した。細胞抽出液と Cy5.5-ラベルしたプローブを Binding buffer(25 mM Tris (pH7.9), 250 mM KCl, 1 mM EDTA, 5% glycerol, 1 mM dithiothreitol, 0.25 mg/ml BSA, 0.1% Triton X-100 and 0.1  $\mu\text{g/ml}$



of poly(dI)·poly(dC))を用いて室温で 30 分インキュベートした。3-12%ポリ  
 アクリルアミドグラデエントゲルを用いて泳動した。スーパーシフトアッセイ  
 には、抗 T7 抗体または nomal mouse IgG (Santa Cruz) (1 µg per lane)を用  
 いた。用いたプローブの配列を以下に示す。

TRE2 probe ;                5'-AATTGCTGAGTCACAGACAT-3'

mutated TRE2 probe ;    5'-AATTGCAAAGCTTACAGACAT-3'

$\Delta$  TRE2 probe ;            5'-AAATAATTGCCAGACATTAC-3'

下線部に TRE2 部位を示す。

### **Yeast Two-hybrid Screening**

LexA DBD-KGB-1 (K67R)をベイトとして、線虫 cDNA ライブラリー  
 (pACTII)をスクリーニングした。ベイトプラスミドと、cDNA を酵母 L40 レポ  
 ーター系統に形質転換した。酵母はアミノトリアゾールを含むヒスチジン(一)  
 の選択培地に撒き、30 度で飼育した。再び選択培地に撒き直し、生えてきたコ  
 ロニーからライブラリー由来のプラスミドを回収し DNA シーケンスを行った。

## 謝辞

本研究を行うにあたり、私を支えて下さった方々に心より感謝いたします。

松本 邦弘 教授と久本 直毅 准教授には、常に適切なご指導及び助言をいただきました。水野 智亮 助教には、直接ご指導いただくとともに、本研究を技術面においても全面的にご支援いただきました。また、花房 洋 助教、辻 順 教授、伊藤 素行 教授、杉 拓磨 博士、山本 拓也 助教、白石 洋一 博士と黒岩 厚 教授には、技術的な支援と適切な助言をいただきました。また、研究室において快適な環境と多くの助言をいただきました分子第六講座のみなさまに深く感謝いたします。

## 参考文献

1. Chang L, Karin M (2001) Mammalian MAP kinase signaling cascades. *Nature* 410: 37–40.
2. Kyriakis JM, Avruch J (2001) Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev* 81: 807–869.
3. Noselli S, Agnès F (1999) Roles of the JNK signaling pathway in *Drosophila* morphogenesis. *Current Opinion in Genetics & Development* 9: 466–472.
4. Sakaguchi A, Matsumoto K, Hisamoto N (2004) Roles of MAP kinase cascades in *Caenorhabditis elegans*. *J Biochem* 136: 7–11.
5. Mizuno T, Hisamoto N, Terada T, Kondo T, Adachi M, et al. (2004) The *Caenorhabditis elegans* MAPK phosphatase VHP-1 mediates a novel JNK-like signaling pathway in stress response. *EMBO J* 23: 2226–2234.
6. Mizuno T, Fujiki K, Sasakawa A, Hisamoto N, Matsumoto K (2008) Role of the *Caenorhabditis elegans* Shc adaptor protein in the c-Jun N-terminal kinase signaling pathway. *Mol Cell Biol* 28: 7041–7049.
7. Fujiki K, Mizuno T, Hisamoto N, Matsumoto K (2010) The *Caenorhabditis elegans* Ste20-related kinase and Rac-type small GTPase regulate the c-Jun N-terminal kinase signaling pathway mediating the stress response. *Mol Cell Biol* 30: 995–1003.
8. Kao C-Y, Los FC, Huffman DL, Wachi S, Kloft N, et al. (2011) Global functional analyses of cellular responses to pore-forming toxins. *PLoS Pathog* 7: e1001314.
9. Karin M, Liu Z g, Zandi E (1997) AP-1 function and regulation. *Curr Opin Cell Biol* 9: 240–246.

10. Wagner EF (2001) AP-1--Introductory remarks. *Oncogene* 20: 2334–2335.
11. Peter K Vogt (2001) Jun, the oncoprotein. *Oncogene* 20, 2365-2377.
12. Weston CR, Davis RJ (2002) The JNK signal transduction pathway. *Current Opinion in Genetics & Development* 12: 14–21.
13. Zhang J, Kalkum M, Chait BT, Roeder RG (2002) The N-CoR-HDAC3 nuclear receptor corepressor complex inhibits the JNK pathway through the integral subunit GPS2. *Molecular Cell* 9: 611–623.
14. Miotto B, Sagnier T, Berenger H, Bohmann D, Pradel J, et al. (2006) Chameau HAT and DRpd3 HDAC function as antagonistic cofactors of JNK/AP-1-dependent transcription during *Drosophila* metamorphosis. *Genes Dev* 20: 101–112.
15. Ogawa S, Lozach J, Jepsen K, Sawka-Verhelle D, Perissi V, et al. (2004) A nuclear receptor corepressor transcriptional checkpoint controlling activator protein 1-dependent gene networks required for macrophage activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 14461–14466.
16. Weiss C, Schneider S, Wagner EF, Zhang X, Seto E, et al. (2003) JNK phosphorylation relieves HDAC3-dependent suppression of the transcriptional activity of c-Jun. *EMBO J* 22: 3686–3695.
17. Sherwood DR, Butler JA, Kramer JM, Sternberg PW (2005) FOS-1 promotes basement-membrane removal during anchor-cell invasion in *C. elegans*. *Cell* 121: 951–962.
18. van Dam H, Castellazzi M (2001) Distinct roles of Jun : Fos and Jun : ATF dimers in oncogenesis. *Oncogene* 20: 2453–2464.
19. Mallo GV, Kurz CL, Couillault C, Pujol N, Granjeaud S, et al. (2002) Inducible antibacterial defense system in *C. elegans*. *Current Biology* 12: 1209–1214.

20. Koga M, Zwaal R, Guan KL, Avery L, Ohshima Y (2000) A *Caenorhabditis elegans* MAP kinase kinase, MEK-1, is involved in stress responses. *EMBO J* 19: 5148–5156.
21. Hiatt SM, Duren HM, Shyu YJ, Ellis RE, Hisamoto N, et al. (2009) *Caenorhabditis elegans* FOS-1 and JUN-1 regulate plc-1 expression in the spermatheca to control ovulation. *Mol Biol Cell* 20: 3888–3895.
22. Shivers RP, Pagano DJ, Kooistra T, Richardson CE, Reddy KC, et al. (2010) Phosphorylation of the conserved transcription factor ATF-7 by PMK-1 p38 MAPK regulates innate immunity in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Genet.* 6: e1000892.
23. Chinenov Y, Kerppola TK (2001) Close encounters of many kinds: Fos-Jun interactions that mediate transcription regulatory specificity. *Oncogene* 20: 2438–2452.
24. Oommen KS, Newman AP (2007) Co-regulation by Notch and Fos is required for cell fate specification of intermediate precursors during *C. elegans* uterine development. *Development* 134: 3999–4009.
25. Munz C, Psichari E, Mandilis D, Lavigne A-C, Spiliotaki M, et al. (2003) TAF7 (TAFII55) Plays a Role in the Transcription Activation by c-Jun. *J Biol Chem* 278: 21510–21516.
26. Kim T, Yoon J, Cho H, Lee W, Kim J, et al. (2005) Downregulation of lipopolysaccharide response in drosophila by negative crosstalk between the AP1 and NF- $\kappa$ B signaling modules. *Nature Immunology* 6: 211–218.
27. Dufourcq P, Victor M, Gay F, Calvo D, Hodgkin J, et al. (2002) Functional requirement for histone deacetylase 1 in *Caenorhabditis elegans* gonadogenesis. *Mol Cell Biol* 22: 3024–3034.
28. Whetstine JR, Ceron J, Ladd B, Dufourcq P, Reinke V, et al. (2005) Regulation of tissue-specific and extracellular matrix-related genes by a class I histone deacetylase. *Molecular Cell* 18: 483–490.

29. Terpe K (2003) Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl Microbiol Biotechnol* 60: 523–533.
30. Ge R, Zhang Y, Sun X, Watt RM, He Q-Y, et al. (2006) Thermodynamic and kinetic aspects of metal binding to the histidine-rich protein, Hpn. *J Am Chem Soc* 128: 11330–11331.
31. Proft M, Struhl K (2002) Hog1 kinase converts the Sko1-Cyc8-Tup1 repressor complex into an activator that recruits SAGA and SWI/SNF in response to osmotic stress. *Molecular Cell* 9: 1307–1317.
32. Ciapponi L, Jackson DB, Mlodzik M, Bohmann D (2001) *Drosophila* Fos mediates ERK and JNK signals via distinct phosphorylation sites. *Genes Dev* 15: 1540–1553.
33. Hobert O, Mori I, Yamashita Y, Honda H, Ohshima Y, et al. (1997) Regulation of interneuron function in the *C. elegans* thermoregulatory pathway by the *ttx-3* LIM homeobox gene. *Neuron* 19: 345–357.
34. Gu T, Orita S, Han M (1998) *Caenorhabditis elegans* SUR-5, a novel but conserved protein, negatively regulates LET-60 Ras activity during vulval induction. *Mol Cell Biol* 18: 4556–4564.
35. Brenner S (1974) The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 77: 71–94.
36. Mello CC, Kramer JM, Stinchcomb D, Ambros V (1991) Efficient gene transfer in *C.elegans*: extrachromosomal maintenance and integration of transforming sequences. *EMBO J* 10: 3959–3970.
37. Kajino T, Omori E, Ishii S, Matsumoto K, Ninomiya-Tsuji J (2007) TAK1 MAPK kinase kinase mediates transforming growth factor-beta signaling by targeting SnoN oncoprotein for degradation. *J Biol Chem* 282: 9475–9481.

38. Sakamoto R, Byrd DT, Brown HM, Hisamoto N, Matsumoto K, et al. (2005)  
The *Caenorhabditis elegans* UNC-14 RUN domain protein binds to the  
kinesin-1 and UNC-16 complex and regulates synaptic vesicle localization.  
*Mol Biol Cell* 16: 483–496.

## 図の説明

### Figure 1: ヒト Fos と線虫 FOS-1 の構造

グレーの部分が塩基性領域とロイシンジッパーモチーフからなる bZIP ドメインを示している。FOS-1 内には、6 ヶ所の Ser/Thr-Pro モチーフ [Ser(154)-Pro, Thr(278)-Pro, Thr(283)-Pro, Thr(304)-Pro, Thr(316)-Pro, Thr(318)-Pro] が存在する。

### Figure 2: FOS-1 と KGB-1 の結合

COS-7 細胞に、T7-FOS-1、HA-KGB-1 を図に示す組み合わせで共発現させた。抗 HA 抗体による免疫沈降物と細胞抽出液(Whole cell extracts; WCE)を、抗 T7 抗体および抗 HA 抗体を用いたウエスタンブロッティングにより解析した。

### Figure 3: FOS-1 は KGB-1 によってリン酸化される

**(A-E) KGB-1 による FOS-1 のリン酸化** | COS-7 細胞に、T7-FOS-1、T7-FOS-1(T304A)、HA-KGB-1 WT および KN、FLAG-MEK-1 を図に示す組み合わせで共発現させた。パネルは上段から順番に、抗 T7 抗体、抗 HA 抗体、抗 FLAG 抗体を用いたウエスタンブロッティングの結果を示している。WCE をアルカリホスファターゼ(calf intestine alkali phosphatase ;CIAP)処理後、ウエスタンブロッティングにより解析した(A)。

**(F) FOS-1 ダイマー化は KGB-1 によるリン酸化によって阻害される** | COS-7 細胞に、T7-FOS-1 WT, GFP-FLAG-FOS-1 WT, HA-KGB-1 WT, HA-KGB-1



KN, FLAG-MEK-1 を図に示す組み合わせで共発現させた。抗 GFP 抗体による免疫沈降物と WCE を抗 GFP 抗体、抗 T7 抗体、抗 pFOS-1T304 抗体および抗 HA 抗体、抗 FLAG 抗体を用いたウエスタンブロッティングにより解析した。

**Figure 4: *kbg-1* 変異体の示す重金属感受性は FOS-1 の機能阻害によって抑圧される**

野生型(WT)、*kbg-1(km21)*変異体それぞれに対し、feeding RNAi 法による FOS-1 の機能阻害を行った。40  $\mu$ M 銅存在下・銅非存在下で卵から飼育した場合に、成虫まで発生する個体数を調べた。グラフは、銅存在下で成虫まで発生した個体の割合を、銅非存在下で成虫まで発生した個体の割合で割った値を示している。Student's t test を用いて有為差検定を行った。\*\*P < 0.01. NS, not significant.

**Figure 5: 重金属ストレス応答に対する FOS-1 T304 過剰発現の効果**

野生型 (WT) に extrachromosomal array として、外来遺伝子 (*Phsp-16::t7::fos-1* (WT)、*Phsp-16::t7::fos-1* (T304A)) を持たせた系統に対してヒートショックを行い、100  $\mu$ M 硫酸銅存在下・非存在下で胚から飼育した場合に、成虫まで発生する個体数を調べた。グラフは、銅存在下で成虫まで発生した個体の割合を、銅非存在下で成虫まで発生した個体の割合で割った値を示している。Student's t test を用いて有為差検定を行った。\*\*P < 0.01. NS, not significant.

### Figure 6: マイクロアレイスクリーニング

まず、野生型銅処理なしと比べて、銅処理ありで 2 倍以上発現が増加する 334 遺伝子を絞り込んだ。次に、334 遺伝子の中から、*kgb-1(km21)*変異体の銅処理ありと比べて、野生型銅処理ありで 2 倍以上発現が増加する 66 遺伝子を同定した。そして、66 遺伝子の中から、*kgb-1(km21)*変異体において銅処理の有無で発現が大きく変化しない 50 遺伝子を同定した。その後、qRT-PCR を用いてマイクロアレイの結果の確認を行った。

### Figure 7: マイクロアレイスクリーニングにより同定した遺伝子の qRT-PCR

野生型(WT)、*kgb-1(km21)*変異体を成虫まで飼育し、1mM 硫酸銅溶液で 1 時間の銅処理を行ったのち、total RNA を回収した。遺伝子の発現を qRT-PCR を用いて解析した結果、6 つの遺伝子を KGB-1 によって発現が制御されている遺伝子 *kreg* (*KGB-1-regulated gene*)として同定した。ANOVA test を用いて有為差検定を行った。\*P < 0.05, \*\*P < 0.01. NS, not significant.

### Figure 8: *kreg* 遺伝子の機能障害は重金属感受性を引き起こす

*eri-1* 変異体に対し、feeding RNAi 法による *kreg-1* および *kreg-2* 遺伝子の機能障害を行った。100  $\mu$ M 銅存在下・銅非存在下で卵から飼育した場合に、成虫まで発生する個体数を調べた。グラフは、銅存在下で成虫まで発生した個体の割合を、銅非存在下で成虫まで発生した個体の割合で割った値を示している。Student's t test を用いて有為差検定を行った。\*\*P < 0.01. NS, not significant.

### Figure 9: *lys-3* 変異体の示す重金属感受性に細菌感染は関与しない

野生型(WT)および *lys-3* 変異体を 100  $\mu$ M 銅存在下・銅非存在下で卵から飼育した場合に、成虫まで発生する個体数を調べた。また、卵を乗せる前のプレートを 60 度 15 分熱処理することで添塗した大腸菌 OP50 を殺菌し、重金属感受性に変化が見られるか検討した。

### Figure 10: 銅処理による *kreg-1* レポーターの発現変化

*Pkreg-1::venus* を保持した野生型(WT)および *kgb-1(km21)* 変異体に feeding RNAi 法で VHP-1 の機能阻害を行い、成虫まで発生した虫を回収後、1mM 硫酸銅溶液で 1 時間の銅処理を行った。その後、VENUS の蛍光を蛍光顕微鏡で観察した(A)。Scale bar: 100  $\mu$ m。また、VENUS の蛍光を強いもの、弱いもの、光らないものの 3 段階にクラス分けし、全体に占める個体の割合をグラフに示した(B)。

### Figure 11: FOS-1 は *kreg-1* 遺伝子の発現を抑制する

*Pkreg-1::venus* を保持した野生型(WT)および *kgb-1(km21)* 変異体に feeding RNAi 法で FOS-1 の機能阻害を行い、回収後、固定し、蛍光顕微鏡で観察した(A)。スケールバー: 100  $\mu$ m。VENUS の蛍光を強いもの、弱いもの、光らないものの 3 段階にクラス分けし、全体に占める個体の割合をグラフに示した(B)。

### Figure 12: FOS-1 は *kreg-1/kreg-2* 遺伝子の発現を抑制する

野生型(WT)、*kgb-1(km21)* 変異体に対し、feeding RNAi 法による FOS-1 の

機能阻害を行った。それぞれの虫を成虫まで飼育し、total RNA を回収した。*kreg-1* (A)および *kreg-2* (B)遺伝子の発現を qRT-PCR を用いて解析した。ANOVA test を用いて有為差検定を行った。\*\*P < 0.01. NS, not significant.

### Figure 13: 腸特異的な *mek-1* 遺伝子の過剰発現による重金属感受性の検討

野生型(WT)および、*mek-1(ks54)*変異体に *Pmek-1::mek-1::venus* または *Pelt-2::mek-1::venus* を保持させた系統を 100  $\mu$ M 銅存在下・銅非存在下で卵から飼育した場合に、成虫まで発生する個体数を調べた。Student's t test を用いて有為差検定を行った。\*\*P < 0.01. NS, not significant.

### Figure 14: JUN-1 と ATF-7 は *kreg-1* 遺伝子の発現に関与しない

*Pkreg-1::venus* を保持した野生型(WT)および *kgb-1(km21)*変異体に feeding RNAi 法で JUN-1 および ATF-7 の機能阻害を行い、回収後固定し、蛍光顕微鏡で観察した。VENUS の蛍光を強いもの、弱いもの、光らないものの3段階にクラス分けし、全体に占める個体の割合をグラフに示した。

### Figure 15: JUN-1 と ATF-7 は重金属ストレス応答に寄与しない

(A) JUN-1 の重金属ストレス応答への寄与 | 野生型(WT)、*kgb-1(km21)*変異体それぞれに対し、feeding RNAi 法による JUN-1 の機能阻害を行った。40  $\mu$ M 銅存在下・銅非存在下で卵から飼育した場合に、成虫まで発生する個体数を調べた。Student's t test を用いて有為差検定を行った。\*\*P < 0.01. NS, not significant.

**(B) ATF-7 の重金属ストレス応答への寄与** | 野生型(WT)、*atf-7(qd22)*変異体、*kbg-(km21)*変異体および *kbg-1; atf-7* 二重変異体を 40  $\mu$ M 銅存在下・銅非存在下で卵から飼育した場合に、成虫まで発生する個体数を調べた。Student's t test を用いて有為差検定を行った。\*\*P < 0.01. NS, not significant.

#### Figure 16: *kreg-1* プロモーターの模式図

クローニングした約 2.8Kbp の *kreg-1* プロモーター内には青で示す部分に、2 つの Fos 認識配列である TRE 部位が存在する。

#### Figure 17: TRE 部位の欠失による *kreg-1* レポーターの発現変化

*Pkreg-1 $\Delta$ tre1::venus* または *Pkreg-1 $\Delta$ tre2::venus* を保持した野生型(WT)および *kbg-1(km21)*変異体の成虫を回収後、固定し、VENUS の蛍光を蛍光顕微鏡で観察した(A)。Scale bar: 100  $\mu$ m。また、VENUS の蛍光を強いもの、弱いもの、光らないものの 3 段階にクラス分けし、全体に占める個体の割合をグラフに示した(B)。

#### Figure 18: FOS-1 は *kreg-1* プロモーターの TRE2 部位に結合する

HEK293 細胞に *Pkreg-1::venus*、T7-FOS-1 および T7-hGrhl2 を図に示す組み合わせで共発現させた。Chromatin Immunoprecipitation Assays (ChIP) アッセイを行うため、抗 T7 抗体を用いた免疫沈降物に対して quantitative PCR を行った。T7-FOS-1 および T7-hGrhl2 のタンパク発現量はウエスタンブロッティングにより確認した。

**Figure 19: FOS-1 の TRE2 結合能に対する KGB-1 によるリン酸化の効果**

COS-7 細胞に、T7-FOS-1, HA-KGB-1 WT, HA-KGB-1 KN, FLAG-MEK-1 を図に示す組み合わせで共発現させた。ゲルシフトアッセイを行うため、細胞抽出液を蛍光標識した TRE2 プローブとインキュベーションした。さらに結合反応液中に抗 T7 抗体または normal mouse IgG を加えた(A)。T7-FOS-1、HA-KGB-1 および FLAG-MEK-1 のタンパク発現量はウェスタンブロッティングにより確認した。

**Figure 20: HDA-1 の機能阻害による *kreg-1* レポーターの発現変化**

*Pkreg-1::venus* を保持した野生型(WT)および *kgb-1(km21)* 変異体に feeding RNAi 法で HDA-1 の機能阻害を行い、回収後、固定し、蛍光顕微鏡で観察した(A)。Scale bar: 100  $\mu$ m。VENUS の蛍光を強いもの、弱いもの、光らないものの3段階にクラス分けし、全体に占める個体の割合をグラフに示した(B)。

**Figure 21: HDA-1 機能阻害による *kreg-1/kreg-2* 遺伝子発現への影響**

野生型(WT)、*kgb-1(km21)* 変異体に対し、feeding RNAi 法による HDA-1 の機能阻害を行った。それぞれの虫を成虫まで飼育し、total RNA を回収した。*kreg-1* (A)および *kreg-2* (B)遺伝子の発現を qRT-PCR を用いて解析した。ANOVA test を用いて有為差検定を行った。\*P < 0.05, \*\*P < 0.01. NS, not significant.

### Figure 22: HDA-1 と FOS-1 の結合

HEK293 細胞に *Pkreg-1::venus*、T7-FOS-1、FLAG-HDA-1 を図に示す組み合わせで共発現させた。抗 FLAG 抗体による免疫沈降物と細胞抽出液を、抗 T7 抗体および抗 FLAG 抗体を用いたウエスタンブロッティングにより解析した。

### Figure 23: *kgb-1* 変異体の示す重金属感受性は HDA-1 の機能阻害によって抑圧される

野生型(WT)、*kgb-1(km21)*変異体それぞれに対し、feeding RNAi 法による HDA-1 の機能阻害を行った。40  $\mu$ M 銅存在下・銅非存在下で卵から飼育した場合に、成虫まで発生する個体数を調べた。グラフは、銅存在下で成虫まで発生した個体の割合を、銅非存在下で成虫まで発生した個体の割合で割った値を示している。

### Figure 24: モデル図

通常の状態では、FOS-1 はホモダイマーを形成し、*kreg* 遺伝子プロモーター内の TRE2 部位に結合している。ダイマー化している FOS-1 は HDA-1 をリクルートすることでプロモーター部位に脱アセチル化を促進し、*kreg* 遺伝子の発現を抑制している(左図)。一方、重金属存在下では活性化した KGB-1 が FOS-1 の 304 番目のスレオニンをリン酸化する。リン酸化された FOS-1 はダイマー形成を阻害されるため、HDA-1 をリクルートできなくなる。その結果、FOS-1/HDA-1 リプレッサー複合体がプロモーター部位から解除され、*kreg* 遺伝子が発現することで重金属ストレス応答が誘導される(右図)。

## 表の説明

### Table 1: yeast two-hybrid screening により KGB-1 と結合した因子

KGB-1 をベイトとして、KGB-1 結合因子を、線虫 cDNA ライブラリーを用いてスクリーニングした。その結果、KGB-1 結合因子として 10 種類のタンパク質を同定した。

### Table 2: マイクロアレイスクリーニングにおける候補遺伝子の絞り込み

#### 野生型において銅処理の有無で発現が上昇する遺伝子

マイクロアレイスクリーニングにより、野生型において銅処理なしと比べて、銅処理ありで発現が 2 倍以上増加した遺伝子として 334 遺伝子を同定した(黒)。

#### 野生型銅処理ありと比べ *kgb-1* 変異体銅処理ありで発現が減少する遺伝子

334 遺伝子の中から、野生型銅処理ありと比べ *kgb-1(km21)* 変異体銅処理ありで発現が 1/2 以下に減少した遺伝子として 66 遺伝子を同定した(青)。

#### 銅処理なしの basal の発現が野生型とくらべ *kgb-1* 変異体で減少している遺伝子

66 遺伝子の中から、銅処理なしの basal の発現が野生型とくらべ *kgb-1(km21)* 変異体で増加しない遺伝子を 50 遺伝子同定した(赤)。

### Table 3: 銅処理により顕著に発現増加が見られた上位 13 遺伝子



Table 2 の 50 遺伝子の中から、cDNA の存在が確認されている遺伝子を調べ、その中から、銅処理により顕著に発現増加が見られる上位 13 遺伝子を同定した。

#### **Table 4: *kreg-1* 遺伝子群**

Table 3 の中から、qRT-PCR によって銅処理によって KGB-1 依存的に発現が誘導されることが確認できた 6 遺伝子を *kreg* 遺伝子群(*KGB-1-regulated gene*)として命名した。

# Figure 1

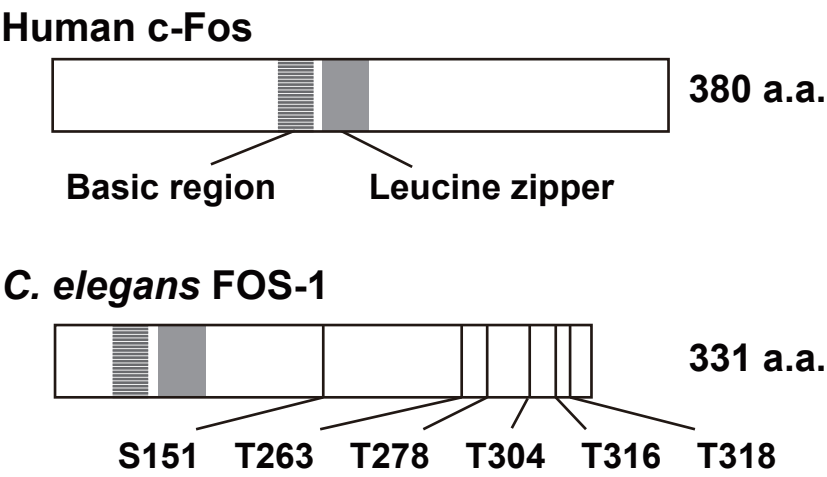


Figure 2

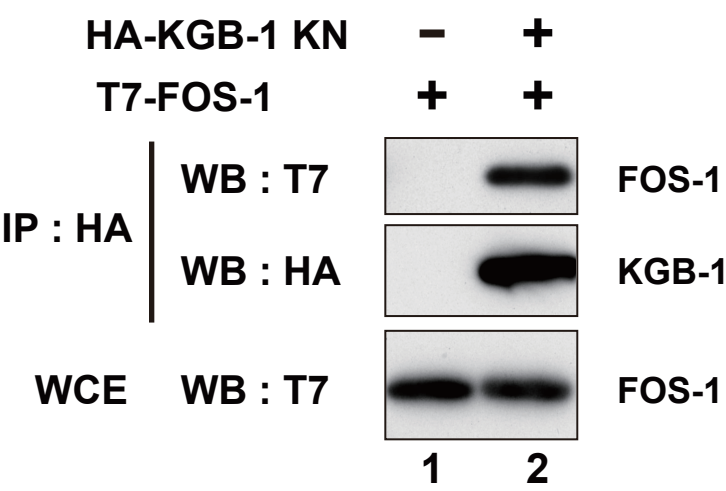
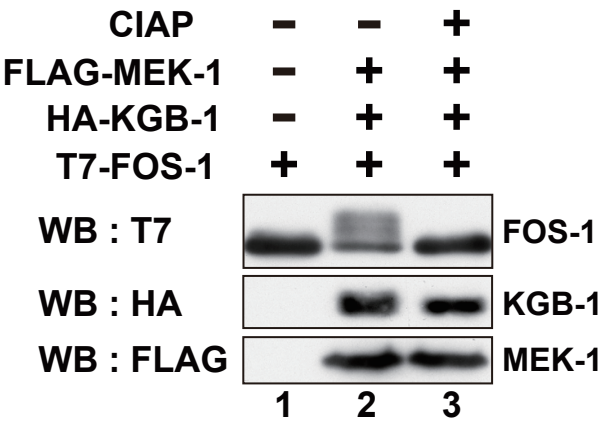
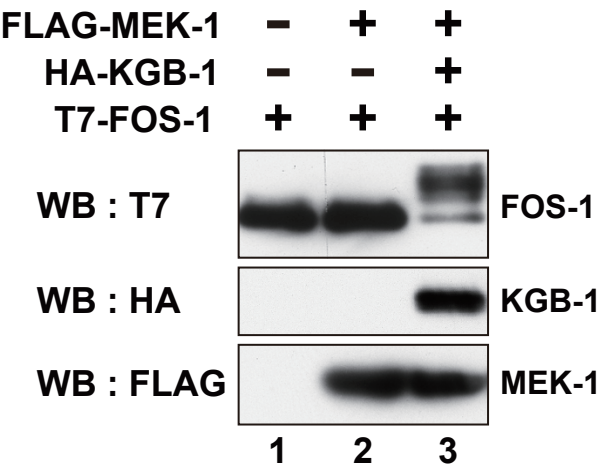


Figure 3

A



B



C

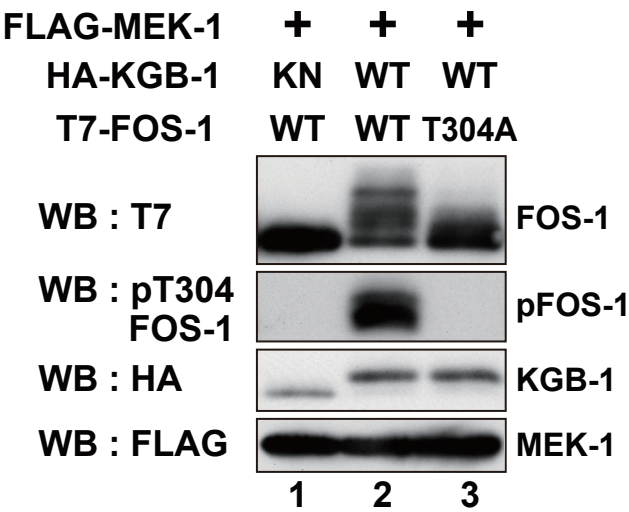
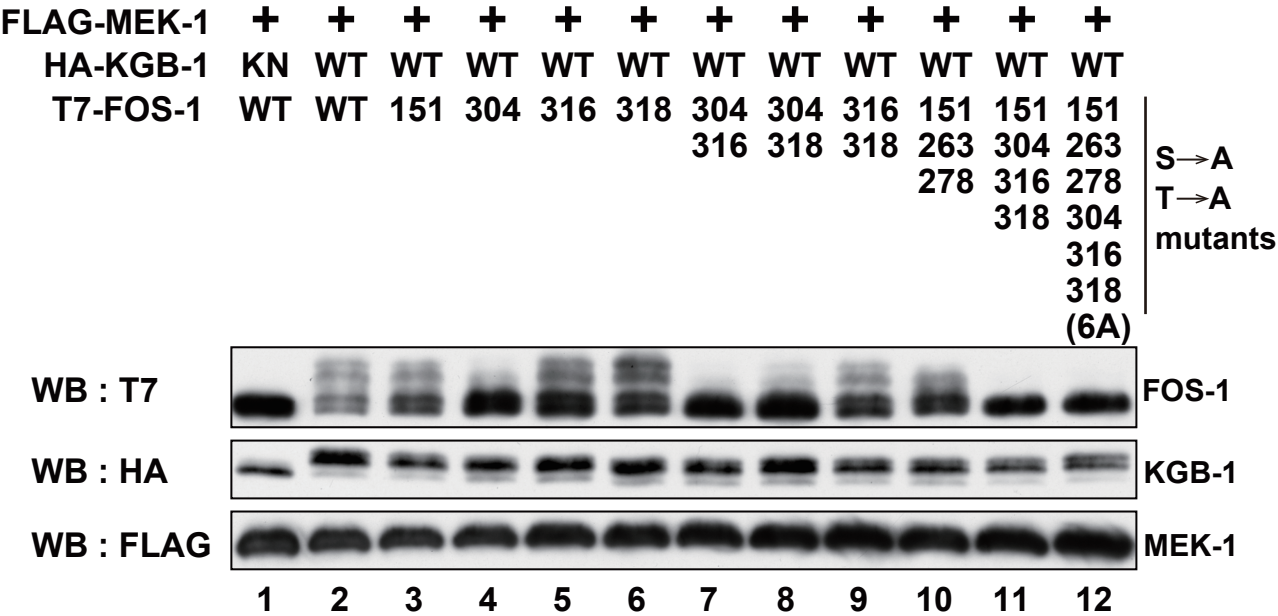


Figure 3

D



E

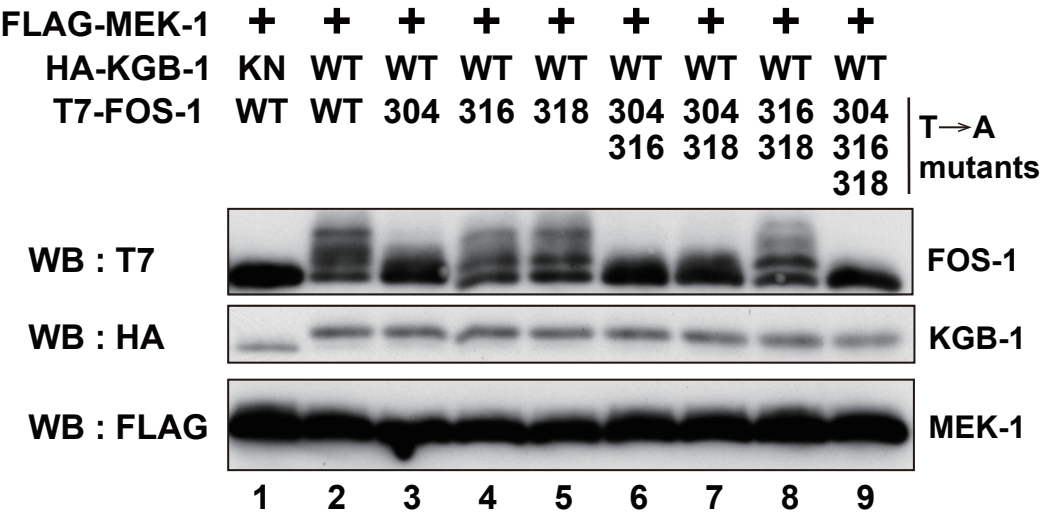


Figure 3

F

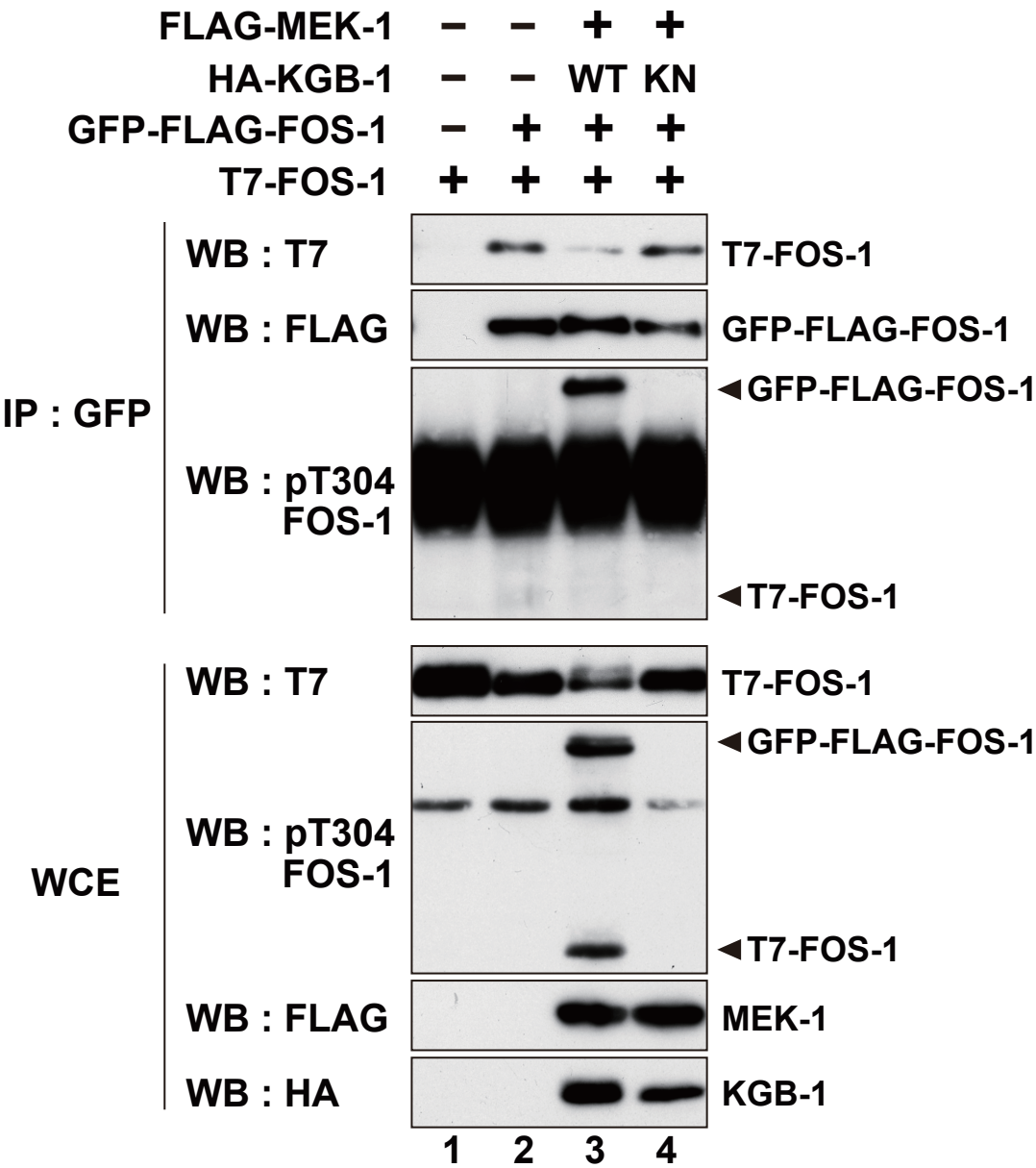


Figure 4

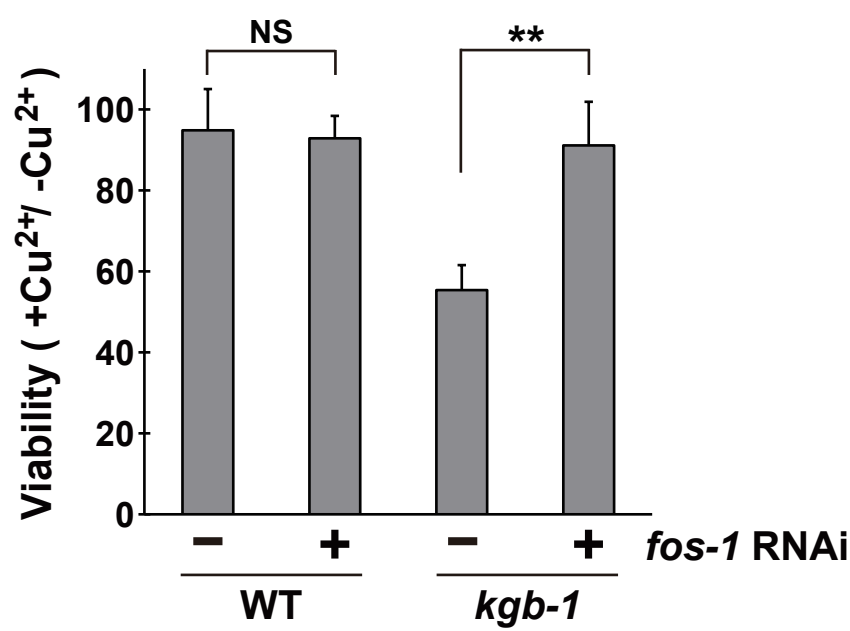
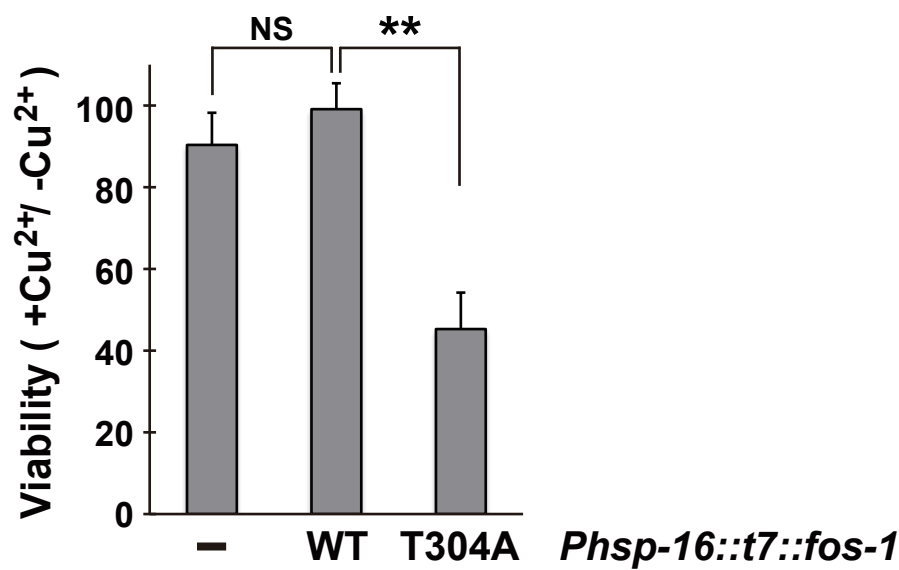


Figure 5





# Figure 6

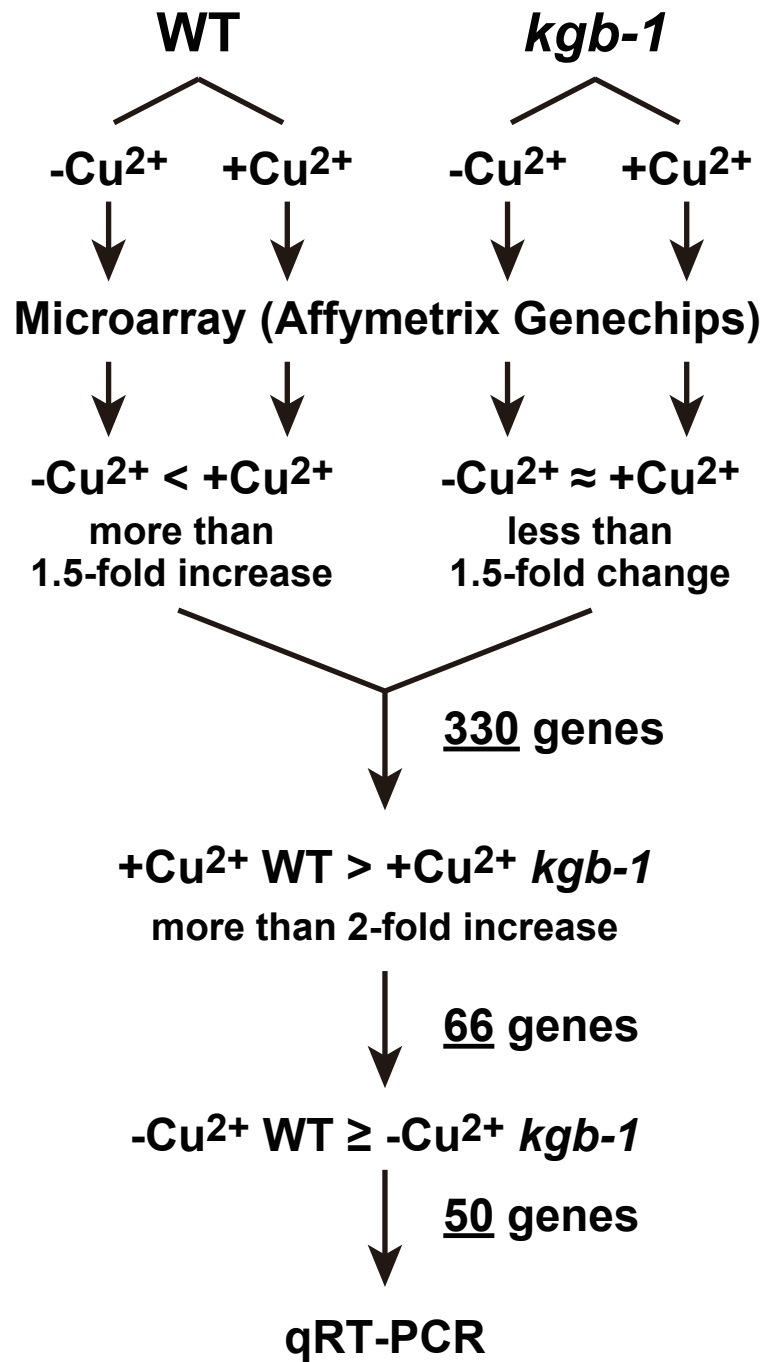


Figure 7

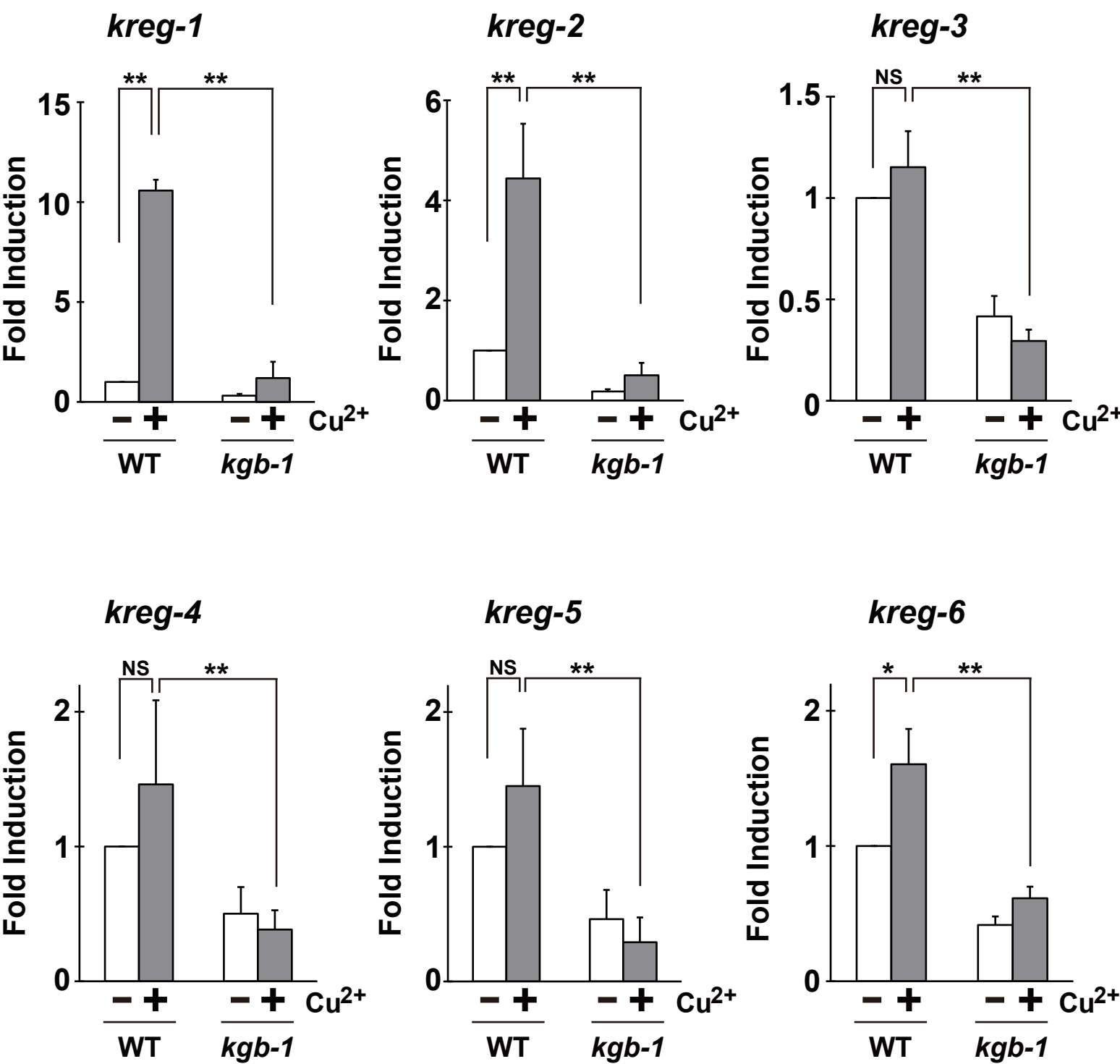


Figure 8

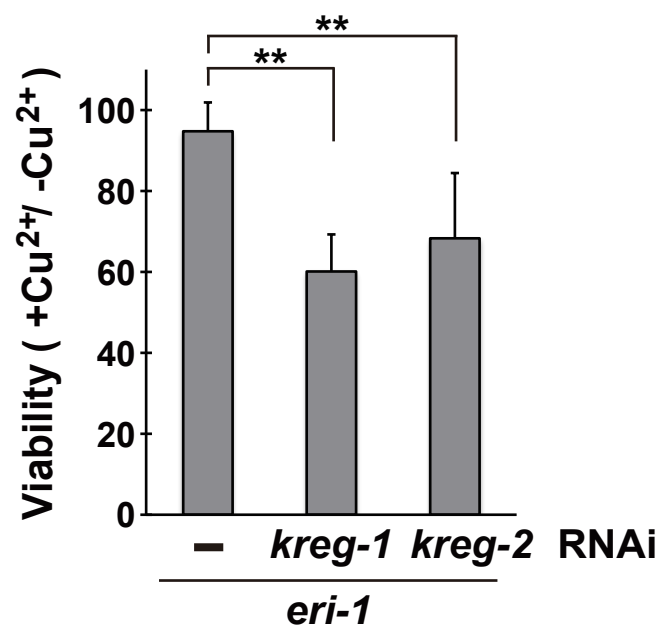


Figure 9

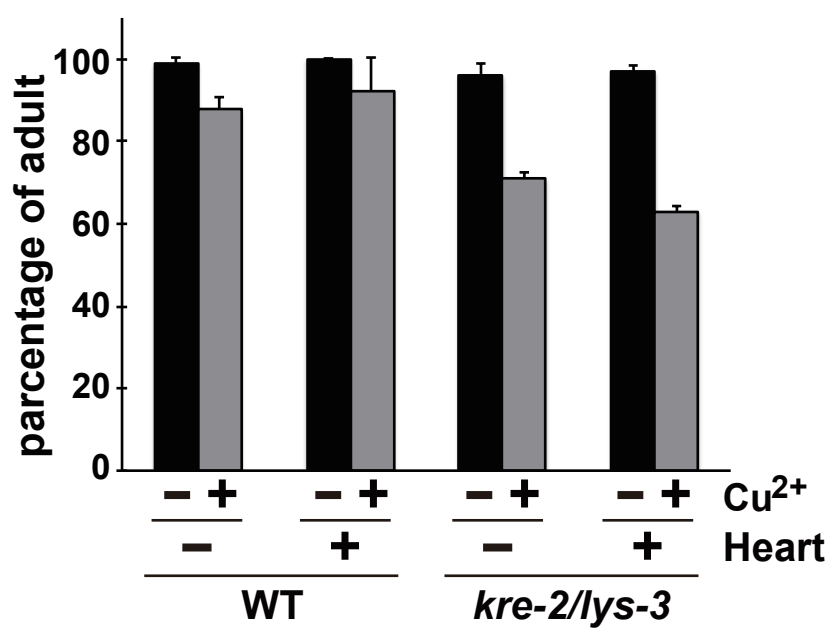
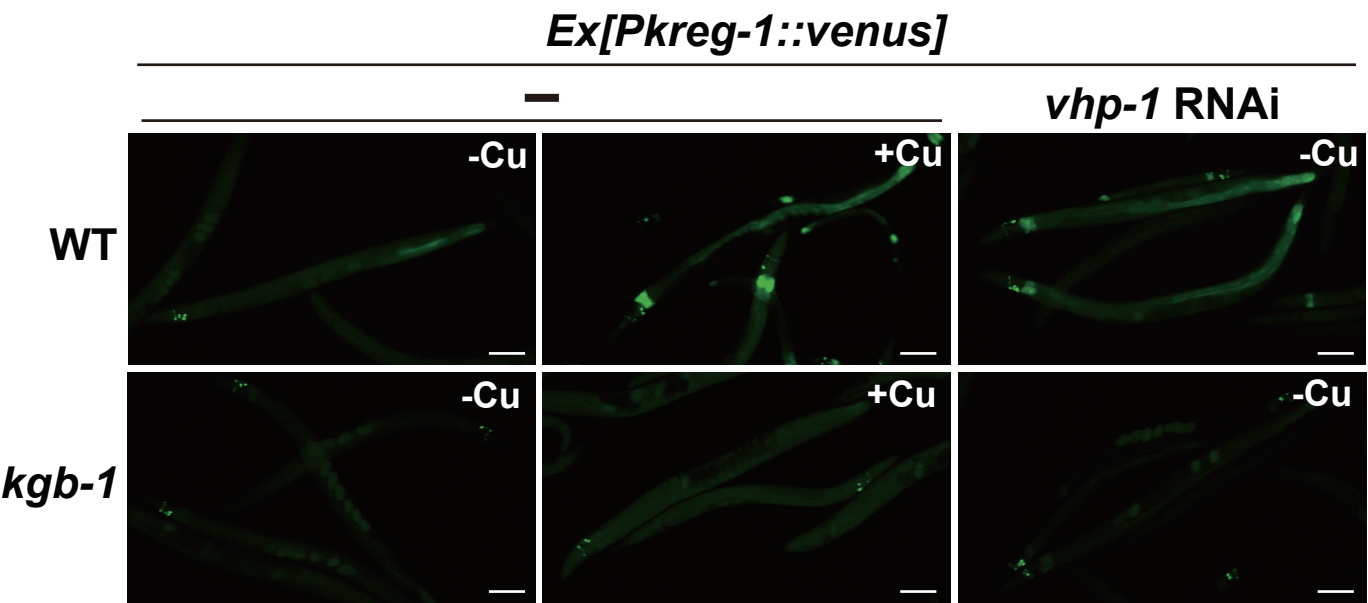
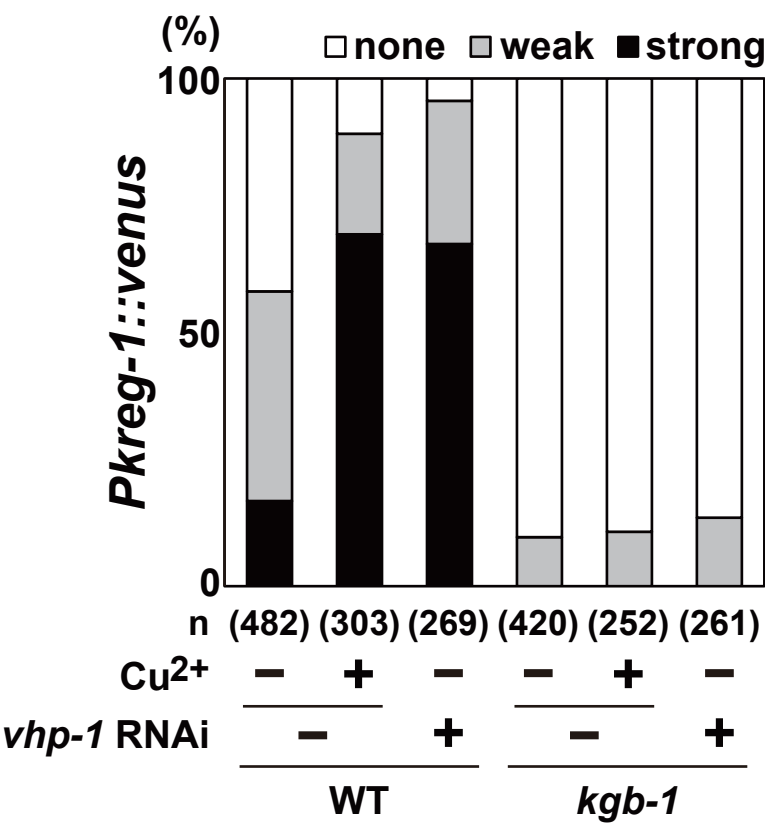


Figure 10

A

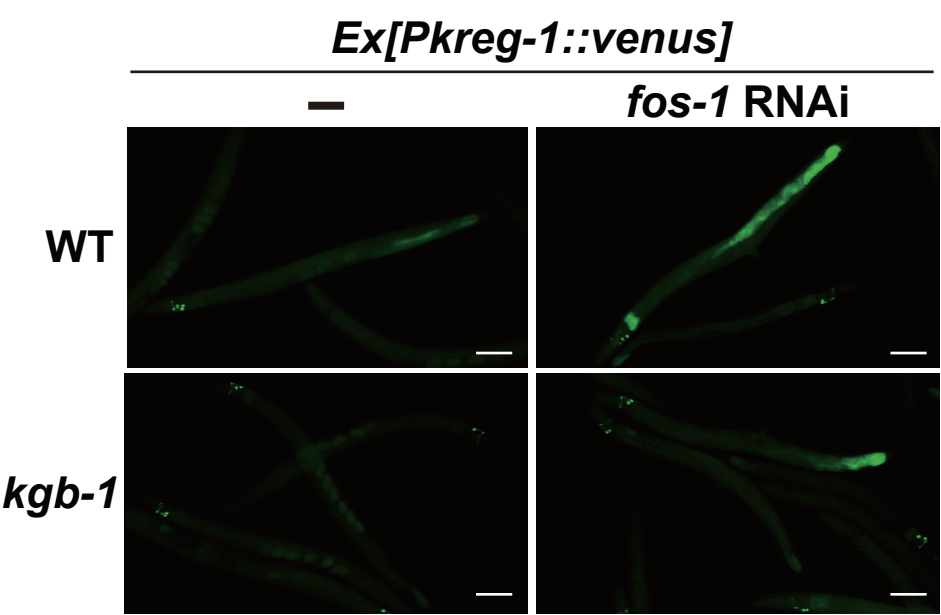


B



# Figure 11

A



B

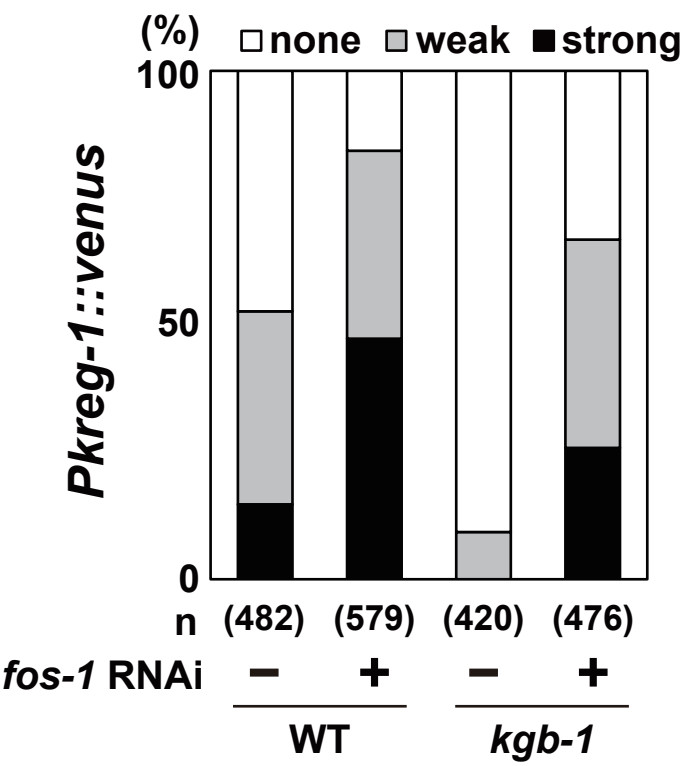
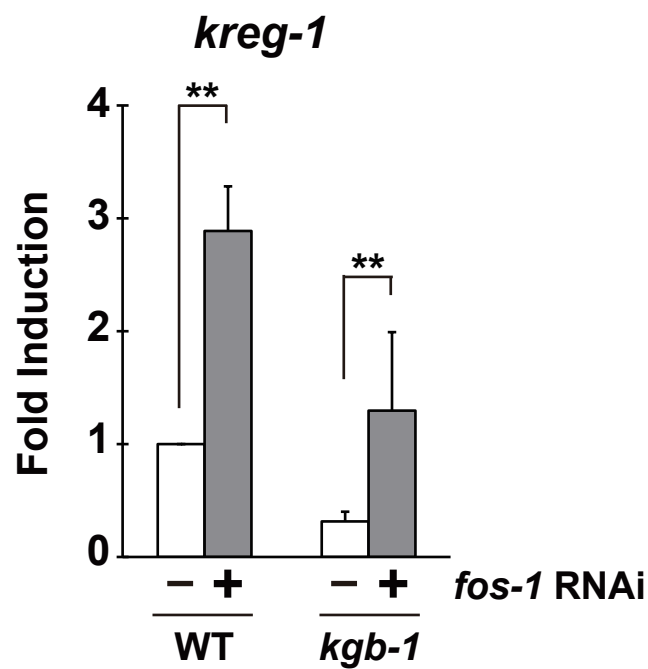


Figure 12

A



B

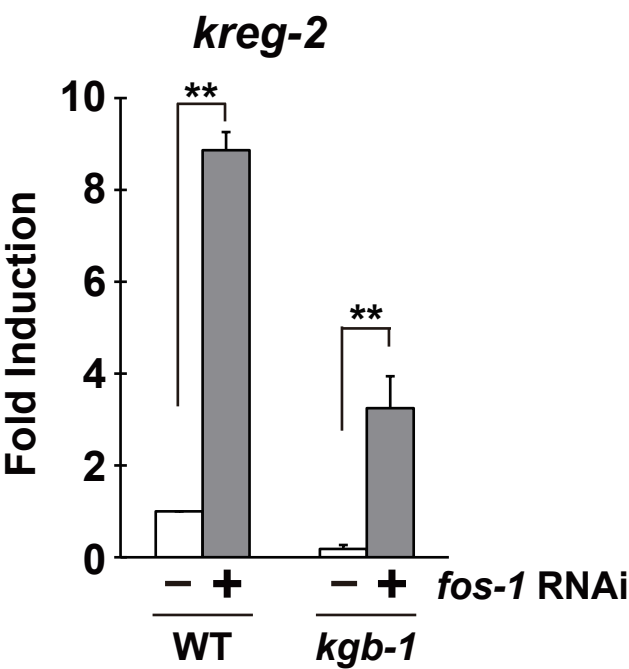


Figure 13

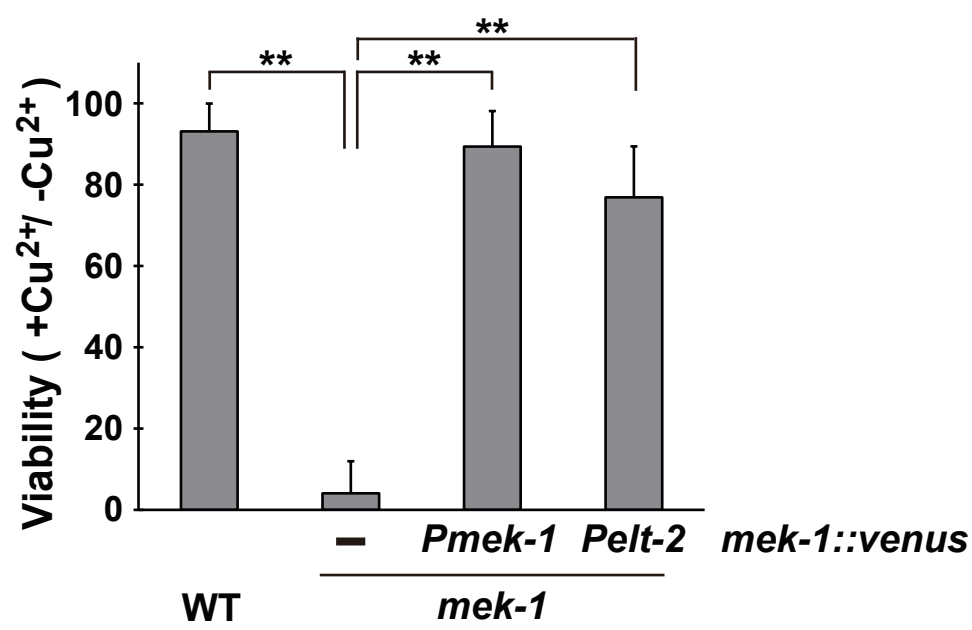




Figure 14

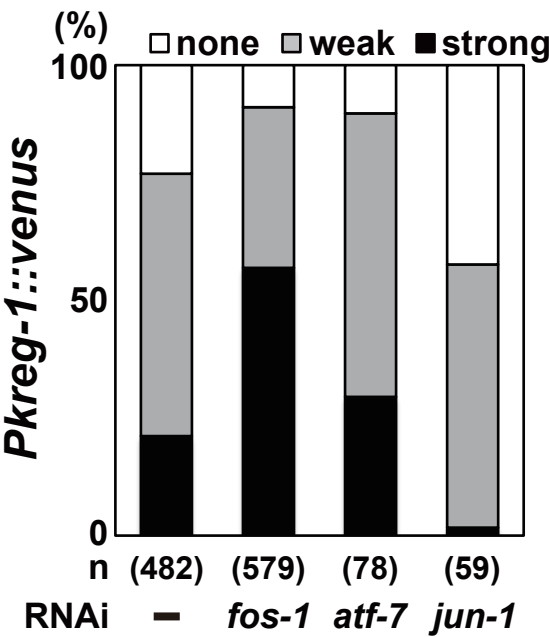
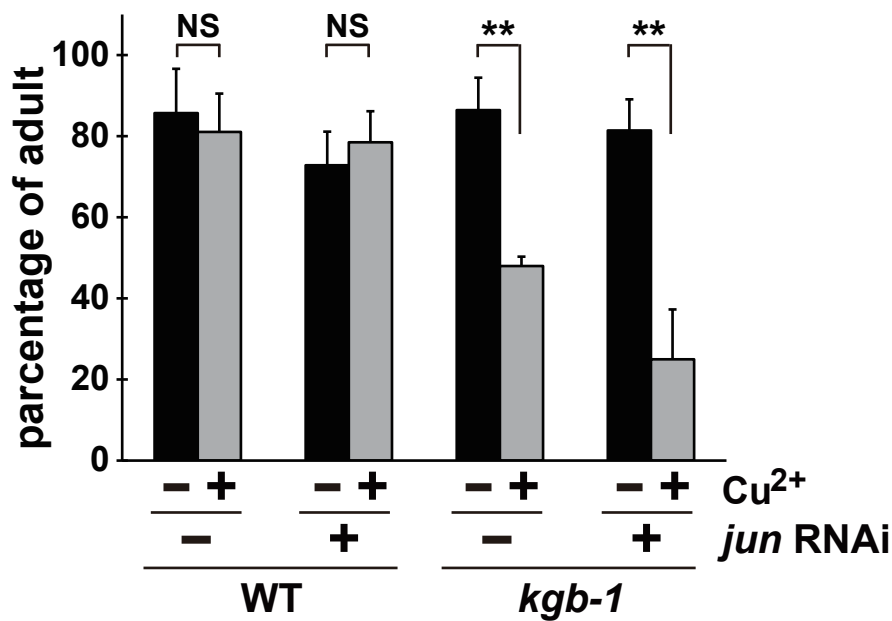
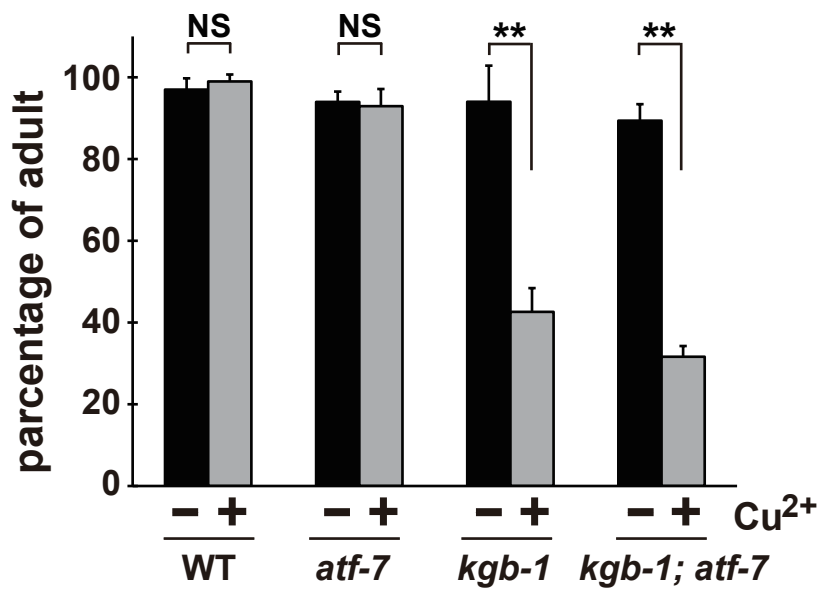


Figure 15

A

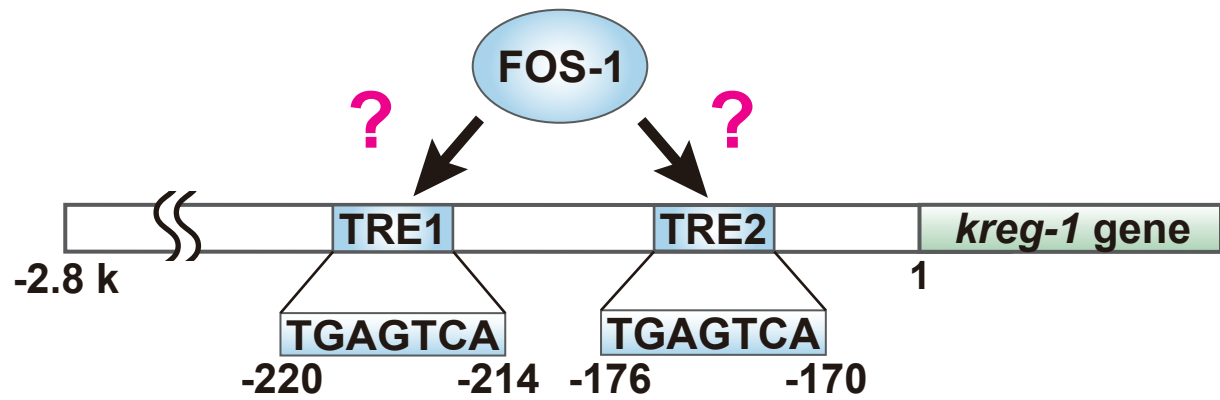


B



# Figure 16

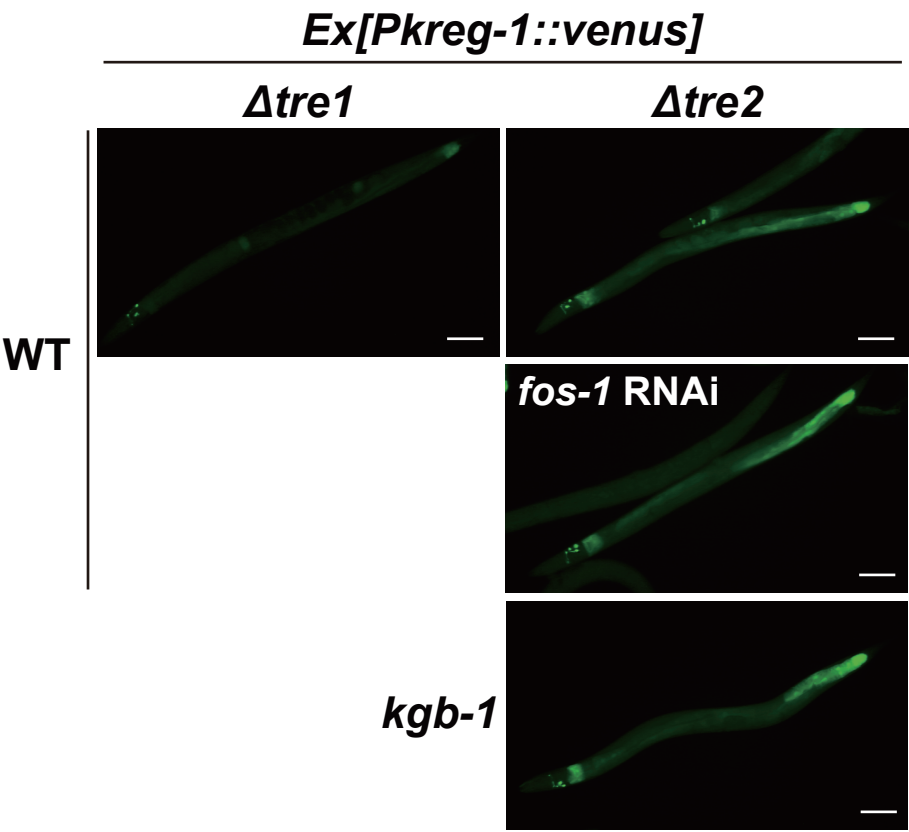
*kreg-1* promoter



TRE : Fos binding consensus sequence

Figure 17

A



B

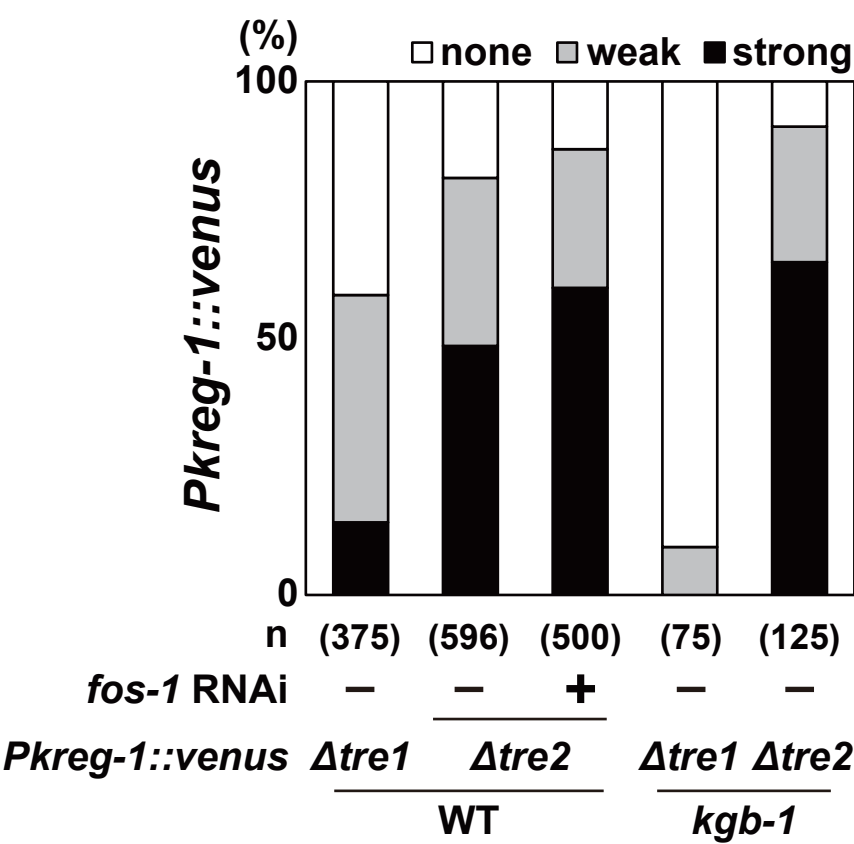
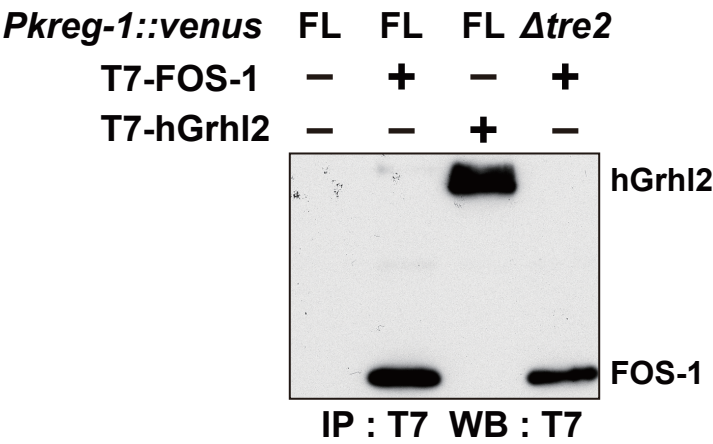
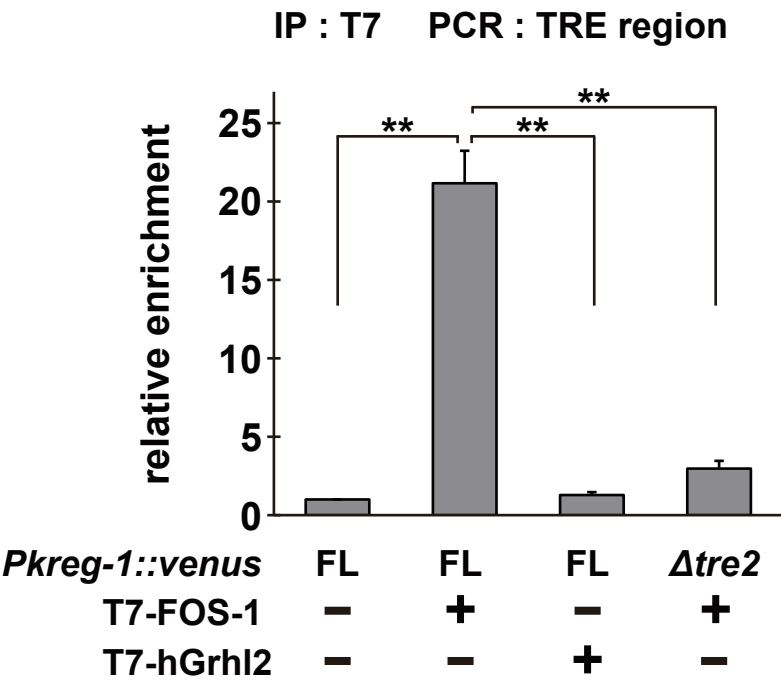
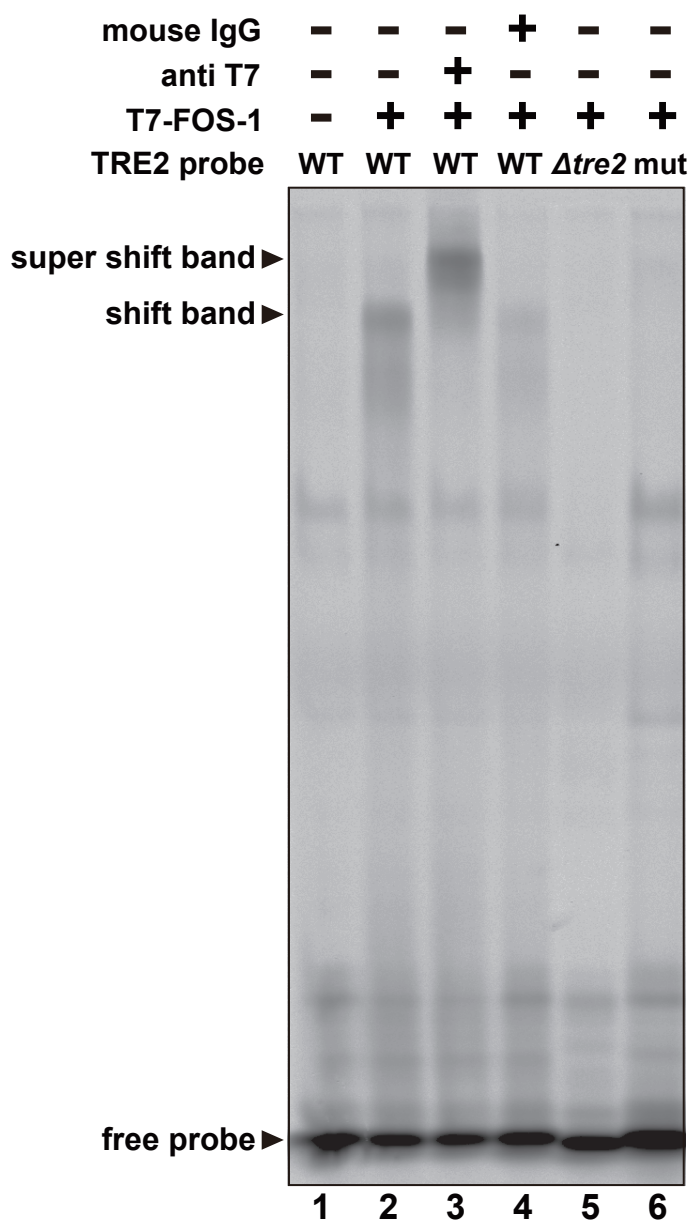


Figure 18



# Figure 19

A



B

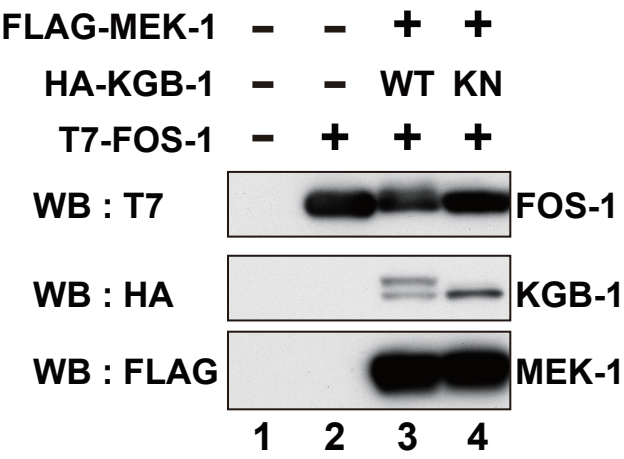
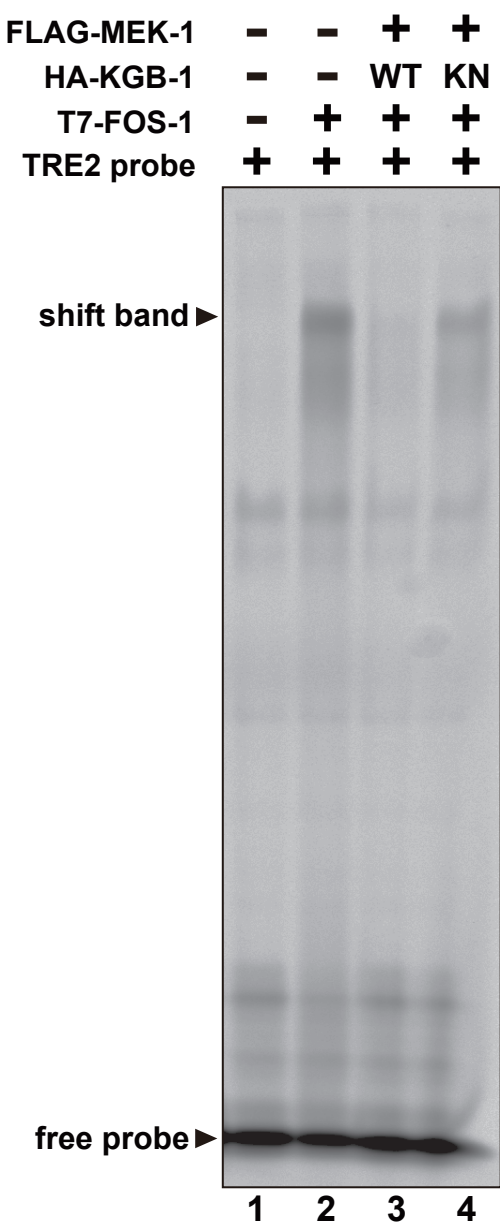
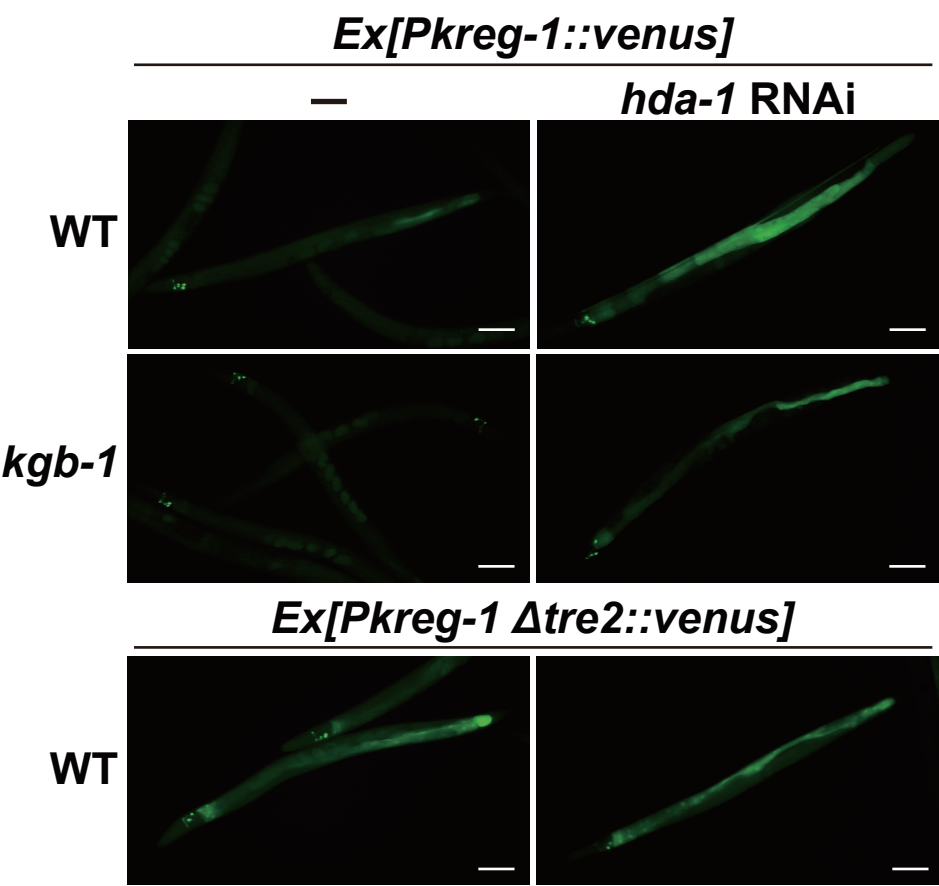


Figure 20

A



B

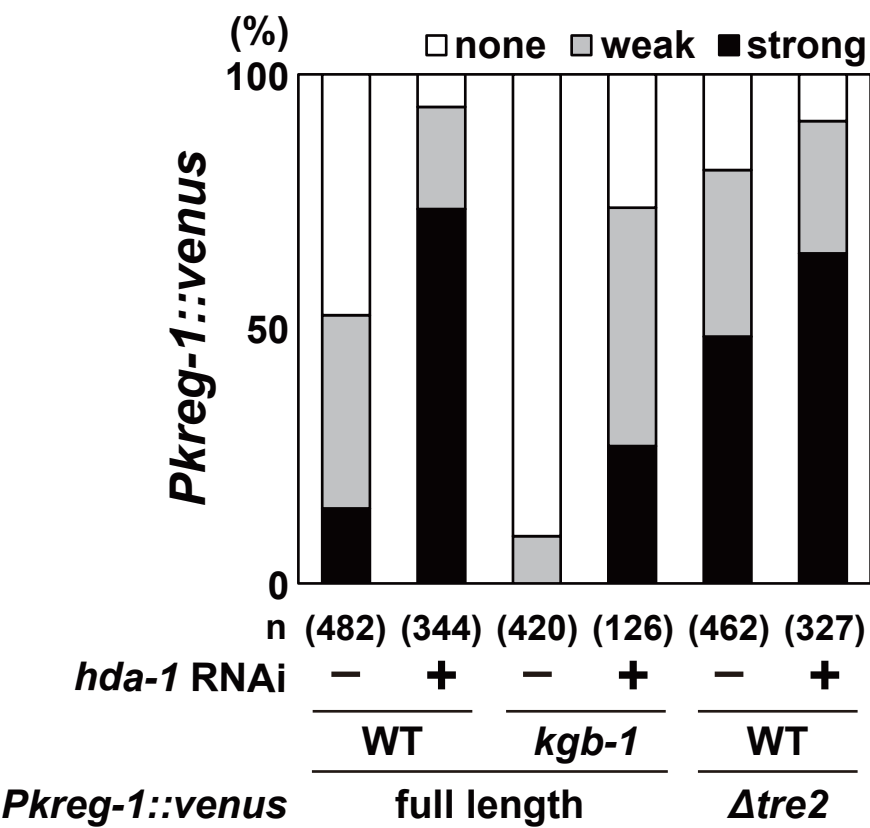
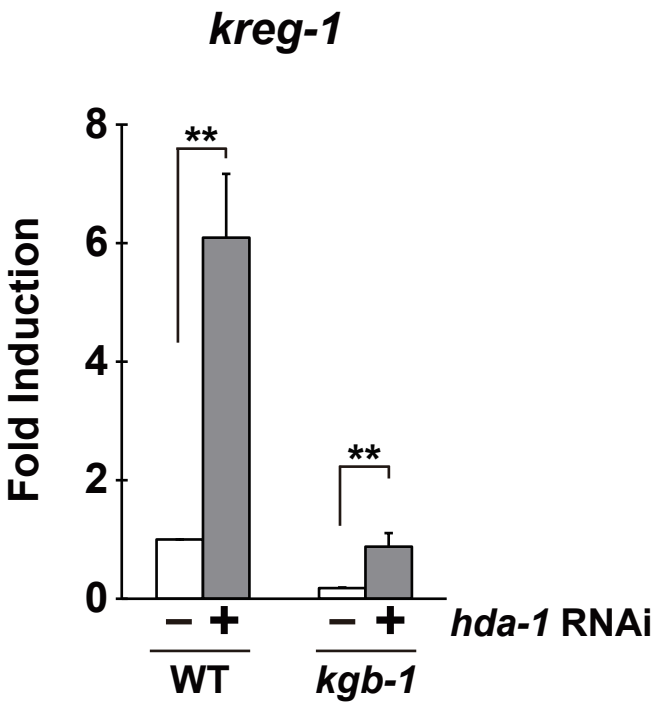


Figure 21

A



B

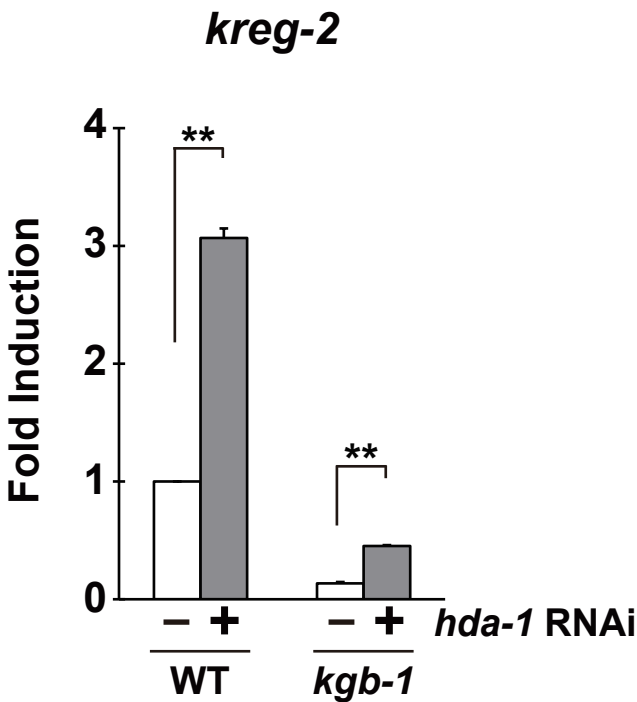




Figure 22

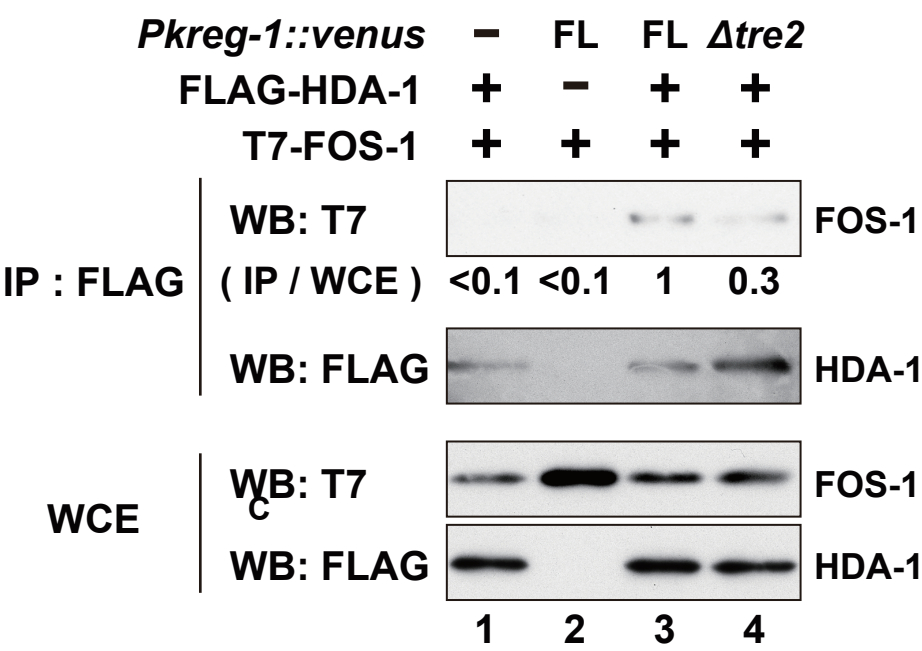


Figure 23

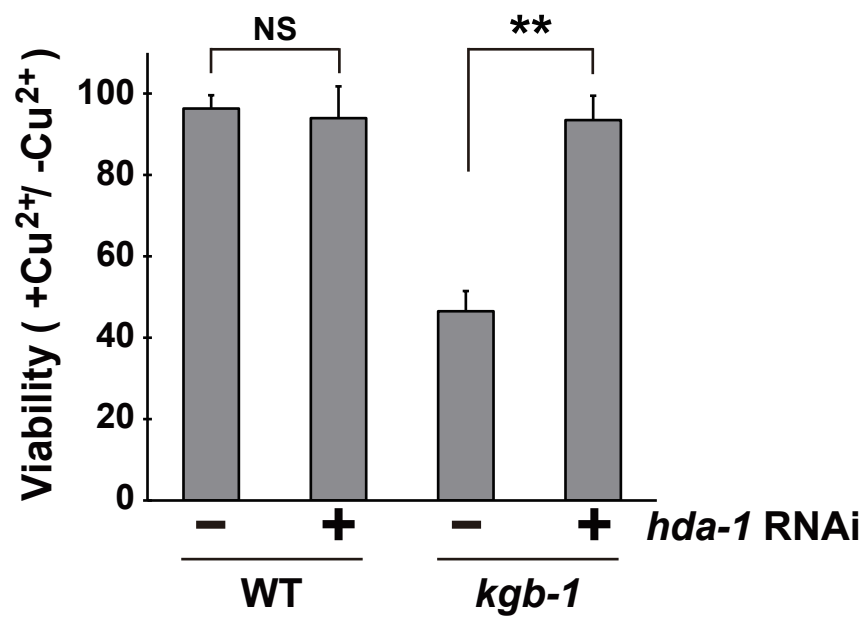
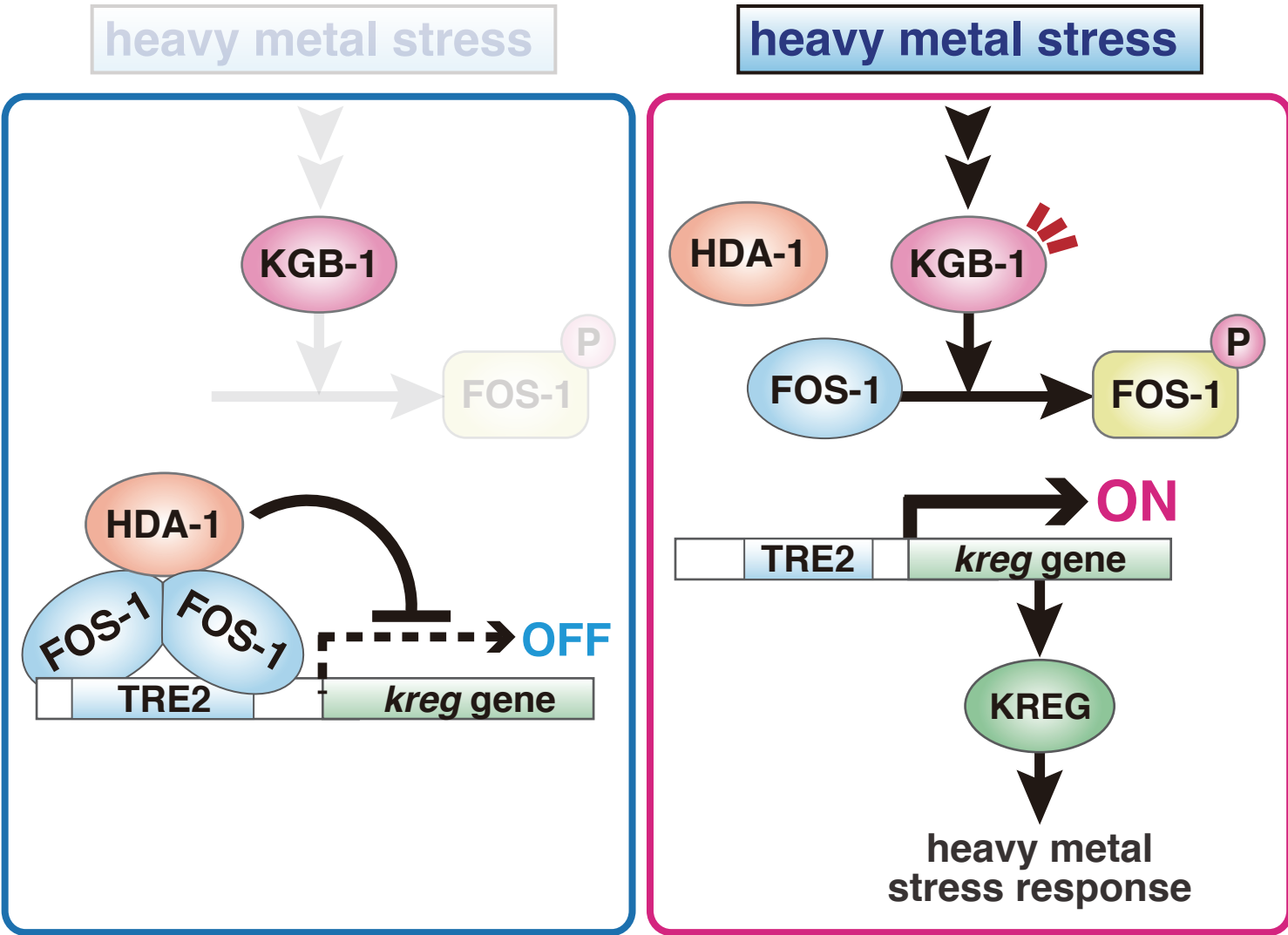


Figure 24



**Table 1. yeast two-hybrid screeningによって同定されたKGB-1と結合する因子**

Sequence nar	Gene name	Gene function
F07A11.2		two isoforms of a putative glucosamine-fructose 6-phosphate aminotransferase
F23F12.6	<i>rpt-3</i>	triple AATPase subunit of the 26S proteasome's 19S regulatory particle (RP) base subcomplex
F29G9.4	<i>fos-1</i>	basic region-leucine zipper (bZIP) transcription factors
F31E3.5	<i>eft-3</i>	translation elongation factor 1-alpha
F38B7.1b	<i>ccch-1</i>	CCCH tandem zinc finger (TZF) protein
F39B2.10	<i>dnj-12</i>	a protein containing a DnaJ ('J') domain
F45E1.7	<i>sdpn-1</i>	Protein kinase C and casein kinase substrate in neurons protein(Syndapin-I / PACSIN2)
F46F3.4	<i>ape-1</i>	ortholog of inhibitory p53-interacting protein (iASPP)
M04F3.5		I-BAR domain-containing protein
T07A9.9		Small GTP-binding protein domain

Table 2. マイクロアレイスクリーニングによる候補因子の絞り込み

Probe Set ID	Gene Title	Probe ID	Representative Public ID	UniGene ID
183676_s_at	NUclear localized Metal Responsive /// NUclear localized Metal Responsive /// locus:numr-2 /// locus:numr-1	Celegans _11957	F08F8.5	Cel.10634
182999_at	hypothetical protein /// status:Partially_confirmed	Celegans _11280	W06H8.2	Cel.1991
174957_s_at	O-ACyltransferase homolog /// locus:oac-31	Celegans _03238	CEK134A9R	Cel.5514
<a href="#">188371_at</a>	hypothetical protein	Celegans _16652	C08H9.4	Cel.34610
185003_s_at	O-ACyltransferase homolog /// locus:oac-31	Celegans _13284	F52F10.3	Cel.5514
<a href="#">179090_at</a>	hypothetical protein /// status:Partially_confirmed	Celegans _07371	F25B3.5	Cel.23959
176851_at	status:Partially_confirmed /// hypothetical protein	Celegans _05132	Y40B10A.6	Cel.1796
191074_at	UDP-GlucuronosylTransferase /// locus:ugt-3	Celegans _19355	ZC455.3	Cel.1360
186726_at	locus:nspe-1 /// hypothetical protein	Celegans _15007	Y38E10A.13	Cel.14104
178571_s_at	FIP (Fungus-Induced Protein) Related /// FIP (Fungus-Induced Protein) Related /// locus:fipr-22 /// locus:fipr-23	Celegans _06852	C37A5.2	Cel.19135
172220_x_at	FIP (Fungus-Induced Protein) Related /// locus:fipr-22 /// locus:fipr-23	Celegans _00501	C37A5.4	Cel.30395
190494_s_at	GLutamate Receptor family (AMPA)	Celegans _18775	B0280.12	Cel.19346
183442_at	hypothetical protein /// status:Partially_confirmed	Celegans _11723	K10D11.2	Cel.12610
<a href="#">174294_at</a>	hypothetical protein	Celegans _02575	C29800	Cel.6730
<a href="#">183813_at</a>	Serpentine Receptor, class X /// locus:srx-79	Celegans _12094	C01G10.2	Cel.9396
184961_s_at	Helix Loop Helix /// Helix Loop Helix /// locus:hlh-25 /// locus:hlh-27	Celegans _13242	C17C3.10	Cel.25856
<a href="#">178148_at</a>	F-box A protein /// locus:fbxa-187	Celegans _06429	F47H4.7	Cel.3510
172628_x_at	locus:nspe-5 /// hypothetical protein	Celegans _00909	Y38E10A.16	Cel.28111
178618_at	hypothetical protein /// status:Predicted	Celegans _06899	T05A6.4	Cel.27559
193418_s_at	Glutathione S-Transferase /// locus:gst-9	Celegans _21699	R05F9.5B	Cel.14654
192823_at	hypothetical protein /// Sodium/phosphate transporter protein	Celegans _21104	F41C3.2	Cel.36508
175928_at	---	Celegans _04209	Y73B3A.L	---
176680_at	hypothetical protein /// status:Confirmed	Celegans _04961	C45B2.2	Cel.11172
188116_at	Onchocerca Related Antigen family /// locus:ora-1	Celegans _16397	F57H12.3	Cel.12542
<a href="#">183134_at</a>	Novel Channel type/putative Nematode Calcium channel	Celegans _11415	C11D2.5	Cel.17060
174628_s_at	hypothetical protein /// status:Partially_confirmed	Celegans _02909	CEK006GYR	Cel.796
190585_at	OV-17 antigen precursor /// hypothetical protein	Celegans _18866	ZK970.7	Cel.13725
186012_s_at	hypothetical protein /// status:Confirmed	Celegans _14293	F57H12.6	Cel.12811
188836_at	hypothetical protein /// NADH oxidase	Celegans _17117	F56D5.3	Cel.12827
171941_s_at	hypothetical protein /// hypothetical protein /// Heat shock hsp70 proteins /// Heat shock hsp70 proteins	Celegans _00222	AV184408	Cel.7130
184224_at	status:Predicted /// hypothetical protein	Celegans _12505	Y45F10D.6	Cel.28186
193139_at	C-type LECTin /// locus:clec-22	Celegans _21420	F49A5.3	Cel.3490
<a href="#">189311_s_at</a>	LEThal	Celegans _17592	H19M22.2	Cel.19573
183126_s_at	hypothetical protein /// hypothetical protein /// Casein kinase /// status:Partially_confirmed	Celegans _11407	F54H5.2	Cel.14968
173398_s_at	CaenNaCin (Caenorhabditis bacteriocin) /// locus:cnc-7	Celegans _01679	AV198760	Cel.3431
190958_s_at	hypothetical protein /// hypothetical protein /// Heat shock hsp70 proteins /// Heat shock hsp70 proteins	Celegans _19239	F44E5.4	Cel.7130
190254_at	SKN-1 Dependent Zygotic transcript /// locus:sdz-8	Celegans _18535	C55A6.5	Cel.4353
<a href="#">180642_at</a>	hypothetical protein /// status:Confirmed	Celegans _08923	F53A9.2	Cel.23764
172386_x_at	Neuropeptide-Like Protein /// locus:nlp-30	Celegans _00667	B0213.5	Cel.30961
179084_at	hypothetical protein /// hypothetical protein /// status:Predicted	Celegans _07365	F22B3.5	Cel.26542
<a href="#">183223_at</a>	Serpentine Receptor, class X /// locus:srx-33	Celegans _11504	T01C4.3	Cel.27513
177903_s_at	O-ACyltransferase homolog /// locus:oac-14	Celegans _06184	F09B9.1	Cel.7973
182000_at	---	Celegans _10281	W03D2.3	---
<a href="#">189241_at</a>	hypothetical protein	Celegans _17522	C23H4.4	Cel.25890
187156_at	status:Partially_confirmed /// hypothetical protein	Celegans _15437	Y45G12C.1	Cel.1736
179204_s_at	hypothetical protein /// status:Confirmed	Celegans _07485	T27F2.4	Cel.2101
188698_s_at	hypothetical protein /// esterase	Celegans _16979	T28C12.4A	Cel.27893
188697_at	hypothetical protein	Celegans _16978	T28C12.4A	Cel.6534
181195_at	hypothetical protein	Celegans _09476	F56H11.2	Cel.27040
191383_at	Glutathione S-Transferase /// locus:gst-30	Celegans _19664	ZK546.11	Cel.13775
183180_s_at	hypothetical protein /// status:Partially_confirmed	Celegans _11461	H03G16.2	Cel.793
176824_at	status:Partially_confirmed /// hypothetical protein	Celegans _05105	Y40B10A.4	Cel.28142
176692_s_at	hypothetical protein /// status:Partially_confirmed	Celegans _04973	C45B2.1	Cel.11170

183381_at	hypothetical protein /// status:Partially_confirmed	Celegans_11662	C50F7.5	Cel.18214
179171_at	hypothetical protein /// status:Confirmed	Celegans_07452	T27F6.8	Cel.16671
188040_at	LIPaSe related	Celegans_16321	T12A7.4	Cel.12347
187927_at	EGg Laying defective	Celegans_16208	C50H2.2	Cel.4268
177530_at	Seven TM Receptor /// locus:str-198	Celegans_05811	ZK285.1	Cel.1301
190369_at	hypothetical protein /// 2 leucine rich domains	Celegans_18650	F10F2.4	Cel.19968
176826_at	status:Confirmed /// hypothetical protein	Celegans_05107	Y40B10A.2	Cel.1800
193004_at	hypothetical protein /// possible G protein coupled receptor	Celegans_21285	F59B2.13	Cel.24872
174456_at	GLutamate Receptor family (AMPA) /// locus:glr-4	Celegans_02737	C59681	Cel.19344
182733_at	O-ACyltransferase homolog /// locus:oac-6	Celegans_11014	C31A11.5	Cel.4626
183702_at	hypothetical protein /// status:Partially_confirmed	Celegans_11983	K05B2.4	Cel.727
191518_at	Seven TM Receptor /// locus:str-144	Celegans_19799	C09H5.5	Cel.2593
184851_at	hypothetical protein /// status:Predicted	Celegans_13132	T28A11.4	Cel.27884
185864_at	Serpentine Receptor, class R	Celegans_14145	K11D12.3	Cel.17865
176742_at	C-type LECTin /// locus:clcc-69	Celegans_05023	F56D6.1	Cel.34707
188934_at	UDP-GlucuronosylTransferase /// locus:ugt-13	Celegans_17215	H23N18.1	Cel.3228
181041_at	hypothetical protein /// status:Partially_confirmed	Celegans_09322	F09F9.3	Cel.11022
194157_s_at	FIP (Fungus-Induced Protein) Related /// locus:fipr-26	Celegans_22438	F53B6.8	Cel.18652
176349_s_at	hypothetical protein /// status:Partially_confirmed	Celegans_04630	T24E12.5	Cel.14301
182667_at	Serpentine Receptor, class R /// locus:srr-6	Celegans_10948	C13D9.1	Cel.4803
190816_at	Temporarily Assigned Gene name /// locus:tag-38	Celegans_19097	B0222.4	Cel.9457
189814_s_at	COLlagen /// locus:col-173	Celegans_18095	F41C6.5	Cel.1034
181354_at	hypothetical protein /// status:Partially_confirmed	Celegans_09635	F53G2.1	Cel.15005
172375_x_at	Neuropeptide-Like Protein /// locus:nlp-29	Celegans_00656	B0213.4	Cel.9467
193599_at	THaumatIN family /// locus:thn-3	Celegans_21880	F28D1.4	Cel.32616
173273_at	SYnthetic lethal with Mec /// locus:sym-1	Celegans_01554	CEC9713	Cel.8136
172627_x_at	status:Predicted /// hypothetical protein /// hypothetical protein	Celegans_00908	Y105C5A.13	Cel.23444
188002_at	POsterior Pharynx defect /// locus:pop-1	Celegans_16283	W10C8.2	Cel.19670
186211_at	status:Partially_confirmed /// hypothetical protein	Celegans_14492	Y60C6A.1	Cel.28349
174227_at	hypothetical protein	Celegans_02508	C57696	Cel.395
186301_at	Serpentine Receptor, class Z /// locus:srz-70	Celegans_14582	C09G12.6	Cel.25779
182428_s_at	LYSozyme /// locus:lys-3	Celegans_10709	Y22F5A.6	Cel.1915
180527_at	hypothetical protein /// status:Predicted	Celegans_08808	C09H5.1	Cel.25780
172240_x_at	CaeNaCin (Caenorhabditis bacteriocin) /// locus:cnc-7	Celegans_00521	F53H2.2	Cel.3431
176726_at	locus:xrn-1 /// XRN (mouse/S. cerevisiae) ribonuclease related	Celegans_05007	Y39G8C.1	Cel.6888
186214_at	hypothetical protein	Celegans_14495	Y41G9A.5	Cel.524
179422_s_at	hypothetical protein /// status:Partially_confirmed	Celegans_07703	M04C3.2	Cel.34233
183287_at	hypothetical protein	Celegans_11568	Y4C6B.2	Cel.12186
186352_at	hypothetical protein /// status:Partially_confirmed	Celegans_14633	T19D12.7	Cel.14344
180661_at	hypothetical protein /// status:Confirmed	Celegans_08942	W04E12.4	Cel.2023
184378_at	hypothetical protein /// status:Partially_confirmed	Celegans_12659	F54D12.5	Cel.14974
183728_at	Neuropeptide-Like Protein /// locus:nlp-24	Celegans_12009	F35B12.7	Cel.3761
182465_at	status:Partially_confirmed /// hypothetical protein	Celegans_10746	Y17D7B.3	Cel.1944
182357_at	Neuropeptide-Like Protein /// locus:nlp-26	Celegans_10638	Y43F8C.2	Cel.17961
177094_s_at	C-type LECTin /// locus:clcc-73	Celegans_05375	Y46C8AL.A	Cel.30497
172437_x_at	CaeNaCin (Caenorhabditis bacteriocin) /// locus:cnc-2	Celegans_00718	R09B5.3	Cel.2831
188217_at	PaTched Related family /// locus:ptr-22	Celegans_16498	Y80D3A.7	Cel.28746
179077_at	hypothetical protein /// status:Partially_confirmed	Celegans_07358	F53B7.4	Cel.3461
189566_at	CYtochrome P450 family /// locus:cyp-13A8	Celegans_17847	T10B9.4	Cel.14404
172343_x_at	Neuropeptide-Like Protein /// locus:nlp-31	Celegans_00624	B0213.6	Cel.6700
182815_at	hypothetical protein /// status:Confirmed	Celegans_11096	T24C4.4	Cel.27808
183090_s_at	status:Partially_confirmed /// hypothetical protein	Celegans_11371	ZK742.4	Cel.1271
172035_x_at	Nuclear Hormone Receptor family	Celegans_00316	10198019	Cel.17991
179909_at	O-ACyltransferase homolog /// locus:oac-20	Celegans_08190	F36G9.12	Cel.3700
190198_at	SULfate Permease family /// locus:sulp-4	Celegans_18479	K12G11.1	Cel.2994
188156_at	hypothetical protein /// carboxylesterase	Celegans_16437	C52A10.1	Cel.4404
184382_at	---	Celegans_12663	Y49F6C.1	---
177179_at	Drosophila SOS homolog /// locus:sos-1	Celegans_05460	Y61A9LA.G	Cel.19495
173792_s_at	hypothetical protein /// serine/threonine kinase	Celegans_02073	CEK039EZF	Cel.10790
181544_at	hypothetical protein	Celegans_09825	Y53F4B.6	Cel.13948
188035_at	Homolog of Odr-2(Two) /// locus:hot-5	Celegans_16316	K07A12.6	Cel.18539
193463_s_at	UNCoordinated	Celegans_21744	K11E8.1C	Cel.22903



191978_at	NCAM (neural cell adhesion molecule) homolog	Celegans_20259	F02G3.1	Cel.22670
184843_at	hypothetical protein	Celegans_13124	Y42G9A.3	Cel.8048
176662_at	---	Celegans_04943	Y71H2AM.H	---
185568_at	hypothetical protein /// status:Partially_confirmed	Celegans_13849	T28C12.1	Cel.27892
185657_at	hypothetical protein /// status:Partially_confirmed	Celegans_13938	C14C6.12	Cel.4769
183561_s_at	hypothetical protein /// status:Confirmed	Celegans_11842	F40F12.7	Cel.18119
184602_at	UDP-GlucuronosylTransferase /// locus:ugt-25	Celegans_12883	C10H11.3	Cel.19245
178138_at	hypothetical protein	Celegans_06419	F38B7.2	Cel.35616
177921_at	hypothetical protein /// status:Partially_confirmed	Celegans_06202	C44H4.4	Cel.33140
179305_at	status:Partially_confirmed /// hypothetical protein	Celegans_07586	ZK455.5	Cel.9224
193707_s_at	locus:wht-3 /// WHiTe (Drosophila) related ABC transporte	Celegans_21988	C16C10.12	Cel.10825
188992_at	hypothetical protein /// thioredoxin	Celegans_17273	K02H11.6	Cel.27173
175196_s_at	hypothetical protein	Celegans_03477	AV178783	Cel.19425
183069_at	Serpentine Receptor, class H /// locus:srh-296	Celegans_11350	Y94A7B.4	Cel.28479
188555_s_at	MEChanosensory abnormality	Celegans_16836	F14D12.4	Cel.7750
190676_at	UDP-GlucuronosylTransferase /// locus:ugt-40	Celegans_18957	F10D2.5	---
184313_s_at	hypothetical protein /// status:Partially_confirmed	Celegans_12594	K11H12.4	Cel.12603
186421_at	hypothetical protein	Celegans_14702	F21C10.3	Cel.24514
179162_at	Serpentine Receptor, class W /// locus:srw-51	Celegans_07443	F40D4.8	Cel.29360
178297_at	hypothetical protein /// status:Confirmed	Celegans_06578	T24B8.5	Cel.14306
181666_at	hypothetical protein /// status:Partially_confirmed	Celegans_09947	F31D5.5	Cel.24146
193686_at	See oma /// locus:moe-3	Celegans_21967	F32A11.6	Cel.15255
193537_s_at	K+/Cl- Cotransporter /// locus:kcc-3	Celegans_21818	K02A2.3	Cel.14834
179038_at	hypothetical protein /// status:Partially_confirmed	Celegans_07319	F26A3.5	Cel.18878
180053_at	hypothetical protein /// status:Partially_confirmed	Celegans_08334	K07H8.5	Cel.27248
179725_at	hypothetical protein /// hypothetical protein /// status:Partially_confirmed /// status:Predicted	Celegans_08006	F59H6.3	Cel.32538
180622_at	beta-LACTamase domain containing /// locus:lact-1	Celegans_08903	F46H5.8	Cel.985
179402_at	hypothetical protein /// status:Partially_confirmed	Celegans_07683	F52H3.5	Cel.15017
173786_s_at	status:Partially_confirmed /// hypothetical protein	Celegans_02067	CEK058C1R	---
184093_at	hypothetical protein /// status:Partially_confirmed	Celegans_12374	M01H9.1	Cel.12592
179020_at	hypothetical protein /// status:Confirmed	Celegans_07301	C08E8.3	---
183117_at	status:Confirmed /// hypothetical protein	Celegans_11398	ZK742.3	Cel.1272
188615_s_at	COLlagen /// locus:col-72	Celegans_16896	W09G10.1	Cel.14182
183230_at	hypothetical protein /// status:Predicted	Celegans_11511	R02E4.1	Cel.33971
180296_at	status:Partially_confirmed /// hypothetical protein	Celegans_08577	Y26D4A.2	Cel.16520
174960_at	COLlagen /// locus:col-97	Celegans_03241	CEK120B8R	Cel.9507
189344_s_at	CYtochrome P450 family /// locus:cyp-14A5	Celegans_17625	F08F3.7	Cel.4215
184191_at	CaeNaCin (Caenorhabditis bacteriocin) /// locus:cnc-4	Celegans_12472	R09B5.9	Cel.17984
176895_s_at	Let-23 Fertility effector/regulator	Celegans_05176	C46H11.4	Cel.19643
180401_at	hypothetical protein /// status:Partially_confirmed	Celegans_08682	F22F7.7	Cel.3926
173231_at	hypothetical protein /// status:Confirmed	Celegans_01512	C53226	Cel.34219
173497_s_at	status:Confirmed /// hypothetical protein	Celegans_01778	C69167	Cel.6108
180061_at	---	Celegans_08342	F56F4.7	---
189866_s_at	Temporarily Assigned Gene name /// locus:tag-224	Celegans_18147	B0496.8	Cel.13642
181164_at	hypothetical protein	Celegans_09445	C37H5.3	Cel.4561
191206_s_at	hypothetical protein /// G-protein coupled receptor	Celegans_19487	T02E9.3	Cel.2525
193187_s_at	Multidrug Resistance Protein family /// locus:mrp-2	Celegans_21468	F57C12.4	Cel.5119
177392_at	hypothetical protein /// status:Partially_confirmed	Celegans_05673	F07H5.6	Cel.23665
174228_at	hypothetical protein /// status:Partially_confirmed	Celegans_02509	C29568	Cel.6722
184650_at	F-box A protein /// locus:fbxa-160	Celegans_12931	C08E3.12	Cel.32816
184699_at	hypothetical protein /// status:Predicted	Celegans_12980	T06C12.12	Cel.27593
184176_at	TropoNin T	Celegans_12457	T08B1.2	Cel.8463
182561_at	status:Partially_confirmed /// hypothetical protein	Celegans_10842	Y11D7A.9	Cel.12148
172492_at	hypothetical protein /// status:Partially_confirmed	Celegans_00773	C46H11.1	Cel.23637
183815_at	TransThyretin-Related family domain /// locus:ttr-37	Celegans_12096	F21E9.3	Cel.1161
187183_s_at	hypothetical protein	Celegans_15464	F59B10.4	Cel.14912
192779_at	Prion-like-(Q/N-rich)-domain-bearing protein	Celegans_21060	W01B11.5	Cel.22454
172632_x_at	locus:nspe-4 /// hypothetical protein	Celegans_00913	Y38E10A.11	Cel.14106
173843_s_at	Kinase, GLH-Binding /// locus:kgb-1	Celegans_02124	AV197656	Cel.7426
177438_at	hypothetical protein	Celegans_05719	F58D5.2	Cel.18578
185671_s_at	hypothetical protein /// status:Partially_confirmed /// status:Predicted /// status:Predicted /// status:Predicted /// hypothetical protein /// hypothetical protein /// hypothetical protein	Celegans_13952	Y53F4B.26	---

173267_at	Propionyl Coenzyme A Carboxylase Beta subunit	Celegans_01548	CEK002A2R	Cel.19780
187775_at	hypothetical protein /// status:Partially_confirmed	Celegans_16056	F40B5.2	Cel.26751
189915_s_at	C-type LECTin /// locus:clcc-41	Celegans_18196	B0365.6	Cel.17827
179457_at	hypothetical protein /// status:Confirmed	Celegans_07738	B0024.4	Cel.9471
185145_at	status:Partially_confirmed /// hypothetical protein	Celegans_13426	Y46D2A.2	Cel.24132
182675_at	status:Partially_confirmed /// hypothetical protein	Celegans_10956	Y4C6B.3	Cel.12185
173773_s_at	ROlLer: helically twisted, animals roll when moving	Celegans_02054	C45838	Cel.6900
191414_s_at	Glutathione S-Transferase /// locus:gst-33	Celegans_19695	C02A12.1	Cel.9387
178017_s_at	hypothetical protein /// status:Confirmed	Celegans_06298	F01D5.1	Cel.15532
193060_at	RNase H /// locus:rnh-1.2	Celegans_21341	ZK938.7	Cel.28680
192392_at	SAPK/ERK kinase /// locus:sek-1	Celegans_20673	R03G5.2	Cel.7756
186950_at	hypothetical protein /// status:Confirmed	Celegans_15231	C05B5.6	Cel.10895
176743_s_at	C-type LECTin /// C-type LECTin /// locus:clcc-67 /// locus:clcc-69	Celegans_05024	F56D6.1	Cel.34707
192282_at	Nuclear Hormone Receptor family	Celegans_20563	R11G11.2	Cel.17988
188965_at	hypothetical protein /// LDL receptor	Celegans_17246	F55H12.3	Cel.18620
182826_at	F-box B protein /// locus:fbxb-52	Celegans_11107	K05F6.6	Cel.27221
187914_s_at	Suppressor Of Clr	Celegans_16195	AC7.2	Cel.18171
176694_at	F-box B protein /// locus:fbxb-97	Celegans_04975	C52E2.6	Cel.26177
186390_at	status:Partially_confirmed /// hypothetical protein	Celegans_14671	Y47H10A.5	Cel.16434
191994_at	Protein-tyrosine phosphatase /// hypothetical protein	Celegans_20275	Y113G7C.1	Cel.1441
178423_at	Serpentine Receptor, class W /// locus:srw-83	Celegans_06704	ZK262.6	Cel.28919
190905_at	TransThyretin-Related family domain /// locus:ttr-31	Celegans_19186	F58A3.5	Cel.834
181618_at	hypothetical protein	Celegans_09899	ZK418.2	Cel.9566
192165_s_at	hypothetical protein /// serine/threonine-protein kinase	Celegans_20446	K11C4.1	Cel.3020
190381_at	ASF-Like /// locus:asf1-1	Celegans_18662	C03D6.5	Cel.20355
183991_at	CUTiclin-Like /// locus:cut1-14	Celegans_12272	B0511.5	Cel.19288
175264_at	hypothetical protein	Celegans_03545	AU113052	Cel.5024
175554_s_at	hypothetical protein /// status:Confirmed	Celegans_03835	AU113674	Cel.6106
178957_s_at	hypothetical protein /// status:Partially_confirmed	Celegans_07238	F01G4.4	Cel.13188
179814_at	Serpentine Receptor, class TX /// locus:srtx-1	Celegans_08095	B0496.5	Cel.13645
187729_s_at	TREhalase /// locus:tre-5	Celegans_16010	C23H3.7	Cel.6374
188495_at	hypothetical protein /// permease	Celegans_16776	F09G2.3	Cel.4188
190987_at	hypothetical protein /// locus:pho-8	Celegans_19268	R13H4.3	Cel.2758
174021_at	Nuclear Hormone Receptor family /// locus:nhr-45	Celegans_02302	10198000	Cel.627
191007_at	Nuclear Hormone Receptor family /// locus:nhr-204	Celegans_19288	R02C2.4	Cel.36636
189538_s_at	Temporarily Assigned Gene name /// locus:tag-117	Celegans_17819	C01B7.4	Cel.31033
183692_s_at	hypothetical protein /// status:Partially_confirmed	Celegans_11973	R05A10.3	Cel.12523
193148_at	VH1 dual-specificity phosphatase family	Celegans_21429	F08B1.1	Cel.8018
189358_at	hypothetical protein /// glycogenin like	Celegans_17639	T10B10.8	Cel.36524
188059_at	PaTched Related family /// locus:ptr-23	Celegans_16340	ZK270.1	Cel.5865
175726_s_at	Nuclear Hormone Receptor family /// locus:nhr-3	Celegans_04007	10197966	Cel.19601
183324_at	hypothetical protein /// status:Partially_confirmed	Celegans_11605	K10D11.5	Cel.12607
177337_at	hypothetical protein	Celegans_05618	R52.2	Cel.35646
193679_s_at	Nuclear Hormone Receptor family /// locus:nhr-3	Celegans_21960	H01A20.1	Cel.19601
184241_at	hypothetical protein /// status:Partially_confirmed	Celegans_12522	W01B11.1	Cel.16640
190178_s_at	SULfate Permease family /// locus:sulp-2	Celegans_18459	F14D12.5	Cel.10988
180749_at	hypothetical protein /// status:Partially_confirmed	Celegans_09030	F22F7.4	Cel.26561
193002_at	locus:wee-1.1 /// WEE homolog	Celegans_21283	F35H8.7	Cel.14155
176209_at	status:Partially_confirmed /// hypothetical protein	Celegans_04490	Y58A7A.5	Cel.29271
189423_s_at	CREB Homolog	Celegans_17704	Y41C4A.4A	Cel.19765
176580_at	Ligand-Gated ion Channel /// locus:lgc-12	Celegans_04861	R13A5.4	Cel.36772
184914_at	F-box B protein /// locus:fbxb-10	Celegans_13195	T08E11.6	Cel.29037
175504_at	hypothetical protein /// status:Confirmed	Celegans_03785	AU114951	Cel.4033
185185_at	hypothetical protein	Celegans_13466	F59E11.7	Cel.3279
179650_at	hypothetical protein	Celegans_07931	K08D8.4	Cel.12648
189667_at	Cytochrome P450 family /// locus:cyp-36A1	Celegans_17948	C34B7.3	Cel.19160
180193_at	hypothetical protein /// status:Partially_confirmed	Celegans_08474	F14F9.4	Cel.4097
188238_at	TuBulin, Alpha /// locus:tba-5	Celegans_16519	F16D3.1	Cel.18930
189971_at	Enoyl-CoA Hydratase /// locus:ech-9	Celegans_18252	F01G10.3	Cel.13185
190852_at	Glutathione S-Transferase /// locus:gst-13	Celegans_19133	T26C5.1	Cel.14278
179587_at	hypothetical protein /// status:Partially_confirmed	Celegans_07868	F44F4.3	Cel.15110
176451_at	SlnA (Drosophila Seven In Absentia) Homolog /// locus:siah-1	Celegans_04732	Y37E11AR.D	Cel.7144
192333_at	ParaQuat (Methylviologen) responsive /// locus:pqm-1	Celegans_20614	F40F8.7	Cel.19517



185887_at	status:Predicted /// hypothetical protein	Celegans _14168	Y81B9A.1	Cel.33153
187412_at	hypothetical protein /// status:Partially_confirmed	Celegans _15693	C18H9.6	Cel.15805
183624_at	Downstream Of DAF-16 (regulated by DAF-16) /// locus:dod-22	Celegans _11905	F55G11.5	Cel.12849
174255_s_at	status:Partially_confirmed /// hypothetical protein	Celegans _02536	C35341	Cel.8073
184711_at	hypothetical protein /// status:Confirmed	Celegans _12992	C49G7.10	Cel.4467
180192_at	hypothetical protein /// status:Partially_confirmed	Celegans _08473	C49G7.5	Cel.23643
191871_s_at	CaDmium Responsive /// locus:cdr-4	Celegans _20152	K01D12.11	Cel.3192
187282_at	hypothetical protein /// status:Confirmed	Celegans _15563	F22B7.9	Cel.7563
190801_at	Nuclear Hormone Receptor family /// locus:nhr-182	Celegans _19082	F41B5.9	Cel.26784
185792_at	hypothetical protein	Celegans _14073	H12D21.10	Cel.3231
192962_at	hypothetical protein /// bacterial regulatory protein UHPC like	Celegans _21243	T11G6.3	Cel.12353
177913_at	Serpentine Receptor, class H /// locus:srh-216	Celegans _06194	T20B3.5	Cel.27743
184107_at	hypothetical protein /// status:Confirmed	Celegans _12388	K09D9.1	Cel.3050
190929_at	Glutathione S-Transferase /// locus:gst-14	Celegans _19210	F37B1.3	Cel.15201
181007_at	hypothetical protein /// status:Confirmed	Celegans _09288	F53A9.7	Cel.29412
174023_at	Nuclear Hormone Receptor family	Celegans _02304	4139079	Cel.22865
172901_x_at	Heat Shock Protein /// Heat Shock Protein /// locus:hsp-16.48 /// locus:hsp-16.49	Celegans _01182	T27E4.9	Cel.17997
171988_at	OSTeonectin (SPARC) related /// locus:ost-1	Celegans _00269	AV180507	Cel.17507
176304_at	status:Confirmed /// hypothetical protein	Celegans _04585	Y52E8A.3	Cel.13961
188788_at	abnormal DAuer Formation /// locus:daf-8	Celegans _17069	R05D11.1	Cel.167
178053_at	hypothetical protein /// status:Predicted	Celegans _06334	F10A3.7	Cel.26355
173098_at	Kex-2 Proprotein Convertase family	Celegans _01379	AV180073	Cel.22630
181520_at	Regulator of HYpoxia-inducible factor (hif-1) /// locus:rhy-1	Celegans _09801	W07A12.7	Cel.14204
178769_at	hypothetical protein /// status:Partially_confirmed /// status:Predicted /// hypothetical protein	Celegans _07050	B0019.3	Cel.30919
179226_at	hypothetical protein /// status:Partially_confirmed	Celegans _07507	C06B3.7	Cel.4880
184870_s_at	status:Partially_confirmed /// hypothetical protein	Celegans _13151	Y57G11A.2	Cel.11890
183639_at	hypothetical protein /// status:Confirmed	Celegans _11920	F13A7.11	Cel.4121
189989_s_at	C-type LECTin /// locus:clcc-55	Celegans _18270	R02D5.2	Cel.4208
181223_at	Nematode AStacin protease /// locus:nas-8	Celegans _09504	C34D4.9	Cel.20243
186036_at	Na/H eXchanger	Celegans _14317	C54F6.13	Cel.9291
174364_at	SCP(Small C-terminal domain Phosphatase)-Like phosphatase	Celegans _02645	C36060	Cel.22860
190776_at	ADP-Ribosylation Factor related /// locus:arf-1.1	Celegans _19057	F45E4.1	Cel.35305
173713_at	hypothetical protein	Celegans _01994	AV203658	Cel.14912
184048_s_at	status:Partially_confirmed /// hypothetical protein	Celegans _12329	ZK1225.5	Cel.36945
172241_x_at	FIP (Fungus-Induced Protein) Related /// locus:fipr-24	Celegans _00522	C37A5.8	Cel.19134
183744_at	hypothetical protein /// status:Partially_confirmed	Celegans _12025	F59A1.10	Cel.3306
183876_at	hypothetical protein /// status:Partially_confirmed	Celegans _12157	C07G3.2	Cel.36741
186820_at	hypothetical protein /// status:Partially_confirmed	Celegans _15101	E02C12.12	Cel.4275
185330_s_at	hypothetical protein	Celegans _13611	R02F11.3	Cel.6423
171928_x_at	hypothetical protein	Celegans _00209	AV180531	Cel.22762
174404_s_at	lipase related /// locus:lip-10	Celegans _02685	C57239	Cel.15410
192461_at	Pim (mammalian oncogene) Related Kinase /// locus:prk-2	Celegans _20742	F45H7.4	Cel.17141
191333_at	TransThyretin-Related family domain /// locus:ttr-26	Celegans _19614	Y51A2D.11	Cel.1646
189424_at	Defecation Suppressor of Clk-1 /// locus:dsc-1	Celegans _17705	C18B12.3	Cel.11326
180627_at	hypothetical protein /// status:Confirmed	Celegans _08908	K04F1.9	Cel.3140
192960_at	hypothetical protein /// Vertebrate galactoside-binding lectins	Celegans _21241	T02G6.7	Cel.27532
189805_at	RHo Guanine nucleotide exchange Factor /// locus:rhgf-1	Celegans _18086	F13E6.6	Cel.19990
176149_at	hypothetical protein	Celegans _04430	C05D10.5	Cel.5024
192208_s_at	DAP (Death Associated Protein kinase) Like Kinase	Celegans _20489	F33E2.2	Cel.24063
190708_at	Discoidin Domain Receptor /// locus:ddr-1	Celegans _18989	C25F6.4	Cel.11305
183379_at	hypothetical protein /// status:Confirmed	Celegans _11660	K01D12.9	Cel.3194
188646_at	hypothetical protein /// degenerin	Celegans _16927	R13A1.3	Cel.27483
182917_at	hypothetical protein /// status:Partially_confirmed	Celegans _11198	F37B12.1	Cel.15195
191038_at	TetraSPanin family /// locus:tsp-1	Celegans _19319	C02F5.8	Cel.9955
188976_s_at	hypothetical protein /// casein kinase	Celegans _17257	H05L14.1	Cel.18554
175833_s_at	Nuclear Hormone Receptor family	Celegans _04114	538372	Cel.19471
187935_s_at	PaTched Related family /// locus:ptr-8	Celegans _16216	F44F4.4	Cel.5505
183009_at	status:Confirmed /// hypothetical protein	Celegans _11290	Y38F1A.8	Cel.14089

173618_s_at	hypothetical protein /// status:Partially_confirmed	Celegans_01899	CEK016AZR	Cel.4917
184957_at	Seven TM Receptor /// locus:str-159	Celegans_13238	Y9C9A.18	Cel.28025
184208_at	status:Partially_confirmed /// hypothetical protein	Celegans_12489	Y17G7B.14	Cel.14135
191735_at	hypothetical protein	Celegans_20016	T03D8.6	Cel.2520
183963_at	hypothetical protein /// status:Confirmed	Celegans_12244	C29F9.2	Cel.19443
174377_at	hypothetical protein /// status:Confirmed	Celegans_02658	C58799	Cel.8026
183231_at	hypothetical protein /// status:Partially_confirmed	Celegans_11512	K01A2.3	Cel.32836
171891_at	---	Celegans_00172	CEK019C2R	---
180616_at	hypothetical protein /// status:Partially_confirmed	Celegans_08897	T22B7.3	Cel.310
185098_s_at	status:Partially_confirmed /// hypothetical protein	Celegans_13379	Y64G10A.6	Cel.11836
184533_at	hypothetical protein /// status:Confirmed	Celegans_12814	C17H12.8	Cel.13514
189703_at	hypothetical protein /// GTP-binding protein	Celegans_17984	T04H1.2	Cel.6177
172204_at	hypothetical protein /// status:Partially_confirmed	Celegans_00485	T22H2.4	Cel.31969
177772_at	hypothetical protein /// status:Partially_confirmed	Celegans_06053	T19A6.3	---
176295_at	F-box A protein /// locus:fbxa-74	Celegans_04576	Y22D7AR.E	Cel.9894
188704_s_at	hypothetical protein	Celegans_16985	F18A12.8	Cel.8808
176222_at	F-box A protein /// locus:fbxa-14	Celegans_04503	Y82E9BL.H	Cel.25270
193486_at	Nuclear Hormone Receptor family /// locus:nhr-45	Celegans_21767	F16H11.5	Cel.627
175245_at	Flavin-containing MonoOxygenase family /// locus:fmo-4	Celegans_03526	AU113264	Cel.17734
176410_at	hypothetical protein /// status:Partially_confirmed	Celegans_04691	C30F12.5	Cel.19183
171795_x_at	hypothetical protein /// status:Confirmed	Celegans_00076	C71115	Cel.143
183530_at	hypothetical protein /// status:Partially_confirmed	Celegans_11811	F40G9.6	Cel.26767
192634_at	Nuclear Hormone Receptor family	Celegans_20915	ZC410.1	Cel.22865
173615_s_at	status:Partially_confirmed /// hypothetical protein	Celegans_01896	C57056	Cel.24473
191088_at	FOS (B-Zip transcription factor) homolog	Celegans_19369	F29G9.4	Cel.3822
172427_x_at	Neuropeptide-Like Protein /// locus:nlp-28	Celegans_00708	B0213.3	Cel.9468
176256_s_at	status:Partially_confirmed /// hypothetical protein	Celegans_04537	Y58A7A.4	Cel.33060
185838_at	hypothetical protein /// status:Partially_confirmed	Celegans_14119	C23G10.5	Cel.10817
182431_at	O-ACyltransferase homolog /// locus:oac-42	Celegans_10712	T06C12.8	Cel.36609
177995_at	hypothetical protein /// status:Partially_confirmed	Celegans_06276	T06E4.7	Cel.27596
172605_x_at	Activated in Blocked Unfolded protein response /// Prion-like-(Q/N-rich)-domain-bearing protein /// Prion-like-(Q/N-rich)-domain-bearing protein /// Prion-like-(Q/N-rich)-domain-bearing protein /// Prion-like-(Q/N-rich)-domain-bearing protein /// locus:abu-5 /// locus:pqn-76 /// locus:pqn-78 /// locus:pqn-79 /// locus:pqn-90 /// locus:pqn-91	Celegans_00886	Y105C5A.4	Cel.28511
180453_at	hypothetical protein /// status:Confirmed	Celegans_08734	F53A9.1	Cel.23763
192896_at	hypothetical protein /// Zinc finger, C3HC4 type (RING finger)	Celegans_21177	F08G12.5	Cel.23669
180837_at	hypothetical protein /// TransThyretin-Related family domain /// locus:ttr-30	Celegans_09118	T08A9.2	Cel.20738
193542_at	Nuclear Hormone Receptor family /// locus:nhr-84	Celegans_21823	T06C12.7	Cel.2935
179353_at	status:Confirmed /// hypothetical protein	Celegans_07634	ZK550.5	Cel.11605
185253_at	hypothetical protein /// status:Confirmed	Celegans_13534	C37C3.10	Cel.4564

**Table 3. 銅処理により顕著に発現増加が見られた上位13遺伝子**

Sequence name	Gene name	Gene function
C06C6.5	<i>nrh-50</i>	nuclear hormone receptor family
C14C6.12		DUF19 like domain
F35B12.7	<i>nlp-24</i>	neuropeptide-like protein
F53A9.2		histidine rich glycoprotein
H23N18.1	<i>ugt-13</i>	UDP Glycosyltransferase family
K11H12.4		unknown
M04C3.2		helicase-like transcription factor
T24C4.4		unknown
T28A11.4		unknown
W04E12.4		unknown
Y105C5A.13		unknown
Y17D7B.3		unknown
Y22F5A.6		lysosome

**Table 4. *kreg*遺伝子群**

number	Sequence name	Gene name	Gene function
<i>kreg-1</i>	F53A9.2		histidine rich glycoprotein
<i>kreg-2</i>	Y22F5A.6	<i>lys-3</i>	lysozyme
<i>kreg-3</i>	K11H12.4		unknown
<i>kreg-4</i>	Y105C5A.12		unknown
<i>kreg-5</i>	Y105C5A.13		unknown
<i>kreg-6</i>	C06C6.5	<i>nrh-50</i>	nuclear hormone receptor family