
メチル水銀毒性の発現機構解明とその応用

(課題番号 15209004)

平成15年度～平成17年度科学研究費補助金

(基盤研究(A)) 研究成果報告書

平成18年4月

研究代表者 永沼 章
(東北大学大学院薬学研究科教授)

メチル水銀毒性の発現機構解明とその応用

(課題番号 15209004)

平成15年度～平成17年度科学研究費補助金

(基盤研究(A)) 研究成果報告書

平成18年4月

研究代表者 永沼 章
(東北大学大学院薬学研究科教授)

はしがき

中枢神経障害を主症状とする水俣病は、メチル水銀による環境汚染が原因となって引き起こされた公害病として良く知られている。現在、メチル水銀による環境汚染が特に発展途上国などで極度に進行しており、世界的な環境問題としてWHOや米国EPAがメチル水銀の摂取基準値の制定に取り組んでいる。しかしながら、メチル水銀毒性の発現機構は水俣病の発症から40年以上も経過した現在も不明のままであり、解明のための糸口さえほとんど得られていない。我々は、メチル水銀の毒性発現機構を解明するために、出芽酵母を用いてメチル水銀耐性に関わる遺伝子の検索を行い、Cdc34（ユビキチン転移酵素）がメチル水銀毒性に対する防御因子として機能することを初めて見出した（Mol. Pharmacol., 2002）。Cdc34はヒトにも相同蛋白質が存在し、ヒトCdc34をヒト由来培養細胞中に高発現させても顕著なメチル水銀耐性が認められることから、Cdc34は酵母からヒトに至る真核生物全般でメチル水銀毒性に対する防御因子として機能していると考えられる。我々はこのCdc34によるメチル水銀毒性防御機構について分子レベルで詳細に検討し、Cdc34がある種の特異的な蛋白質（ここでは仮にX-蛋白質と呼ぶことにする）のユビキチン化を促進することによってプロテアソームでのX-蛋白質の分解を促し、その結果としてメチル水銀毒性が軽減されることを既に明らかにしている。これらの知見は、水俣病発症から約半世紀が経過して初めて得られた「メチル水銀毒性の発現機構解明の突破口」となり得る新事実であり、今後の検討によっては半世紀間の謎を一気に解き明かすことができる画期的な発見として高い評価を受けている。

上述の知見およびその他の詳細な検討結果から、メチル水銀はX-蛋白質に何らかの修飾（例えばリン酸化）を与え、この修飾を受けたX-蛋白質（修飾X-蛋白質と呼ぶ）が細胞内に蓄積することによって細胞障害が生じることが強く示唆されている。一方ユビキチンシステムは、この修飾X-蛋白質をユビキチン化することによって修飾X-蛋白質の分解を促し、その結果としてメチル水銀毒性に対して防御的に機能している（FASEB J., 2002）。したがって、このX-蛋白質の同定がメチル水銀毒性の発現機構解明のための扉を開ける「鍵」となることは間違いない。

そこで本研究では、メチル水銀毒性の標的分子と考えられるX-蛋白質を同定すると共に、

修飾 X-蛋白質による細胞障害発現機構を明らかにして、メチル水銀毒性の発現機構とそれに対する防御機構を解明することを目的とする。

研究組織

- 研究代表者：永沼 章 (東北大学大学院薬学研究科・教授)
研究分担者：久下周佐 (東北大学大学院薬学研究科・助教授)
研究分担者：大橋一晶 (大阪大学大学院薬学研究科・助手)
研究分担者：黄 基旭 (東北大学大学院薬学研究科・助手)

交付決定額 (配分額)

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 15 年度	15,800,000	4,740,000	20,540,000
平成 16 年度	15,000,000	4,500,000	19,500,000
平成 17 年度	8,200,000	2,460,000	10,660,000
総 計	39,000,000	11,700,000	50,700,000

研究発表

(1) 学会誌等

1. Hwang, G. W., Furuoya, Y., Hiroshima, A., Furuchi, T. and Naganuma, A.: Overexpression of Bop3 confers resistance to methylmercury in *Saccharomyces cerevisiae* through interaction with other proteins such as Fkh1, Rts1 and Msn2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 330, 378-385 (2005).
2. Hwang, G. W., Sasaki, D. and Naganuma, A.: Overexpression of Rad23 confers resistance to methylmercury in *Saccharomyces cerevisiae* via inhibition of the degradation of ubiquitinated proteins. *Mol. Pharmacol.*, 68, 1074-1078 (2005).
3. Naganuma, A. and Hwang, G. W.: Identification of intracellular factors influenced in sensitivity of cells to methylmercury. *Proceedings of NMID Forum 2005* (eds. by Yasutake, A. and Hachiya, N.), National Institute for Minamata Disease, pp75-78 (2005).
4. Naganuma, A.: Biological interaction of dietary metals., *J. Toxicol. Sci.*, 28, 249 (2003).

5. Naganuma, A., Hwang, G. W. and Furuchi, T.: Intracellular factors involved in methylmercury toxicity in yeast., In: Proceedings of International Symposium on Bio-Trace Elements 2002 (eds. By Enomoto, S. and Seko, Y.), Riken, Saitama, pp.69-70, (2003).

(2) 口頭発表

1. 佐々木大祐、黄 基旭、永沼 章: 酵母におけるメチル水銀耐性因子 Rad23 の機能ドメイン解析. フォーラム 2003 : 衛生薬学・環境トキシコロジー2003.
2. 小田部 希、黄 基旭、古尾谷祐子、山本玲子、永沼 章: Msn2 高発現によるメチル水銀毒性増強機構の解明. フォーラム 2003 : 衛生薬学・環境トキシコロジー2003.
3. 石田洋輔、黄 基旭、永沼 章: メチル水銀毒性に対して防御的に作用する酵母 F-box 蛋白質の検索. フォーラム 2003 : 衛生薬学・環境トキシコロジー2003.
4. 佐々木大祐、黄 基旭、永沼 章: メチル水銀毒性に対する防御機構であるユビキチンプロテアソームシステムにおける酵母 Rad23 の役割. メタロチオネイン 2003, 2003.
5. 永沼 章: 食品中微量元素の相互作用. 第 30 回日本トキシコロジー学会学術年会, 2003.
6. 佐々木大祐、黄 基旭、永沼 章: 酵母のメチル水銀耐性因子 RAD23 の機能ドメイン解析. 第 42 回日本薬学会東北支部大会, 2003.
7. 佐々木大祐、黄 基旭、永沼 章: Rad23 高発現によるメチル水銀耐性機構におけるユビキチン・プロテアソームシステムの関与. 第 76 回日本生化学会大会, 2003.
8. 石田洋輔、黄 基旭、永沼 章: メチル水銀毒性防御機構に関する F-box 蛋白質の同定. 第 76 回日本生化学会大会, 2003.
9. 佐々木大祐、黄 基旭、永沼 章: 酵母のメチル水銀耐性獲得機構における Rad23 と Png1 の関係. 日本薬学会第 124 年会, 2004.
10. 石田洋輔、黄 基旭、永沼 章: F-box 蛋白質によるメチル水銀毒性防御機構の解明. 日本薬学会第 124 年会, 2004.
11. 村井康高、黄 基旭、永沼 章: メチル水銀感受性に関わる遺伝子の検索. 日本薬学会第 124 年会, 2004.
12. 石田洋輔、黄 基旭、永沼 章: F-box 蛋白質の高発現によるメチル水銀毒性軽減作用. フォーラム 2004 : 衛生薬学・環境トキシコロジー, 2004.
13. 村井康高、黄 基旭、永沼 章: 酵母でのメチル水銀毒性発現におけるゴルジ体から

- 液胞への物質輸送システムの関与. フォーラム 2004: 衛生薬学・環境トキシコロジー, 2004.
14. 石田洋輔、黄 基旭、永沼 章: メチル水銀耐性獲得における F-box 蛋白質の役割. 第 43 回日本薬学会東北支部大会, 2004
 15. 村井康高、黄 基旭、永沼 章: メチル水銀毒性における液胞への物質輸送システムの関与. 第 43 回日本薬学会東北支部大会, 2004.
 16. 芥川正明、黄 基旭、小田部 希、山本玲子、永沼 章: Msn2 高発現によるメチル水銀高感受性に関与する因子の解析. 第 77 回日本生化学大会, 2004.
 17. Hwang, G. W., Furuchi, T. and Naganuma, A.: Ubiquitin-proteasome system as a cellular defense mechanism against methylmercury-induced cytotoxicity. FIP2004 (New Orleans, USA), 2004.
 18. 石田洋輔、黄 基旭、永沼 章: 酵母 F-box 蛋白質、Yil097c および Yil224w、によるメチル水銀毒性軽減機構の解析. 日本薬学会第 125 年会, 2005.
 19. 荻原 庸介、黄 基旭、永沼 章: 酵母のメチル水銀毒性を増強させる因子の検索. 日本薬学会第 125 年会, 2005.
 20. 芥川正明、黄 基旭、小田部 希、山本玲子、永沼 章: 酵母での Msn2 高発現によるメチル水銀毒性増強機構における Sok2 の役割. 日本薬学会第 125 年会, 2005.
 21. 村井康高、黄 基旭、永沼 章: エンドソームへの蛋白質の取り込みに関わる Vps27-Hse1 複合体とその結合蛋白質 Ynr005c のメチル水銀毒性発現における役割. 第 28 回日本分子生物学会年会, 2005.
 22. 荻原庸介、黄 基旭、永沼 章: メチル水銀毒性増強蛋白質 Whi2 がパルミトイルトランスフェラーゼ Akr1 の機能に与える影響. フォーラム 2005: 衛生薬学・環境トキシコロジー, 2005.
 23. 村井康高、黄 基旭、永沼 章: エンドソーム上に存在する蛋白質選別輸送システムによるメチル水銀毒性の増強機構: 基質認識に関わる Vps27 の関与様式. フォーラム 2005: 衛生薬学・環境トキシコロジー, 2005.
 24. 廣瀬知子、黄 基旭、永沼 章: 酵母 F-box 蛋白質 Ufo1 の高発現によるメチル水銀耐性とその機構解析. 第 44 回日本薬学会東北支部大会, 2005.
 25. 荻原庸介、黄 基旭、永沼 章: ユビキチン転移酵素 Cdc34 の高発現によるメチル水銀毒性軽減機構: メチル水銀毒性増強蛋白質 Whi2 の役割. 第 44 回日本薬学会東北支部大会, 2005.
 26. Yousuke Ogiwara, Gi-Wook Hwang, Akira Naganuma: Functional analysis of

- proteins that degraded by ubiquitin-proteasome system and involved in enhancement of methylmercury toxicity. 第 78 回日本生化学大会, 2005.
27. 黄 基旭：メチル水銀に対する感受性決定要因としてのユビキチン・プロテアソームシステム. 第 32 回日本トキシコロジー学会学術年会, 2005.
 28. 荻原庸介、黄 基旭、永沼 章：ユビキチン・プロテアソームシステムで分解されるメチル水銀毒性増強蛋白質の検索. 第 32 回日本トキシコロジー学会学術年会, 2005.
 29. 村井康高、黄 基旭、永沼 章：メチル水銀が酵母細胞内の物質輸送に与える影響. 第 32 回日本トキシコロジー学会学術年会, 2005.
 30. 黄 基旭：メチル水銀毒性発現に関わる分子メカニズム. 日本薬学会第 126 年会, 2006.
 31. 村井康高、黄 基旭、永沼 章：Vps27/Hse1 複合体によるメチル水銀毒性増強に関わる蛋白質の同定. 日本薬学会第 126 年会, 2006.
 32. 荻原庸介、黄 基旭、永沼 章：酵母パルミトイルトランスフェラーゼ Akr1 の欠損によるメチル水銀毒性増強機構の解析. 日本薬学会第 126 年会, 2006.
 33. 李 辰竜、黄 基旭、石田洋輔、永沼 章：ピルビン酸によるメチル水銀毒性増強機構の解析. 日本薬学会第 126 年会, 2006.
 34. 黄 基旭、永沼 章：メチル水銀の細胞毒性に対するユビキチン・プロテアソームシステムの防御作用とその機構. 第 76 回日本衛生学会総会, 2006.

(3) 出版物

1. 黄 基旭、永沼 章：水銀 Hg, 生命元素辞典、桜井 弘編、オーム社、192-196 (2005) .

研究成果による工業所有権の出願・取得状況

なし

研究成果

ユビキチン・プロテアソームシステムによる分解を受けるメチル水銀毒性増強蛋白質の検索

我々はメチル水銀毒性に対する防御機構を明らかにするために出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) を用いてメチル水銀耐性に関わる遺伝子の検索を行い、メチル水銀耐性遺伝子として、*CDC34* や *GFAI* などを同定することに成功している (Furuchi et al., 2002; Miura et al., 1999)。*CDC34* はユビキチン転移酵素 Cdc34 をコードする遺伝子でありユビキチン・プロテアソームシステムに関わっている (Goebel et al., 1988)。ユビキチン・プロテアソームシステムとは真核生物に広く保存されている蛋白質分解経路で、ユビキチン活性化酵素である E1、ユビキチン転移酵素の E2、ユビキチンリガーゼの E3 という三つの酵素の連続した働きによって細胞内で蛋白質にユビキチンを連結する。ここでユビキチン化された蛋白質は、プロテアソームによって認識され、分解される (Glickman et al., 2002; Hershko et al., 1998; Pickart et al., 2001) (Fig. 1)。我々は Cdc34 高発現酵母によるメチル水銀耐性獲得機構の解析を行い、ユビキチン・プロテアソームシステムがメチル水銀毒性に対する防御機構として重要な役割を果たしていることをはじめて明らかにし (Hwang et al., 2002)、このユビキチン・プロテアソームシステムによって分解される蛋白質がメチル水銀の毒性発現に関与している可能性を強く示唆した。ユビキチンシステムの構成因子中には、分解される基質蛋白質を認識して、直接結合する F-box 蛋白質が存在し、酵母では 17 種類が知られている (Bai et al., 1996; Feldman et al., 1997; Skowyra et al., 1997; Patton et al., 1998) (Fig. 2)。そこで、この F-box 蛋白質と結合し、メチル水銀毒性の発現に関与する蛋白質の同定を試みた。

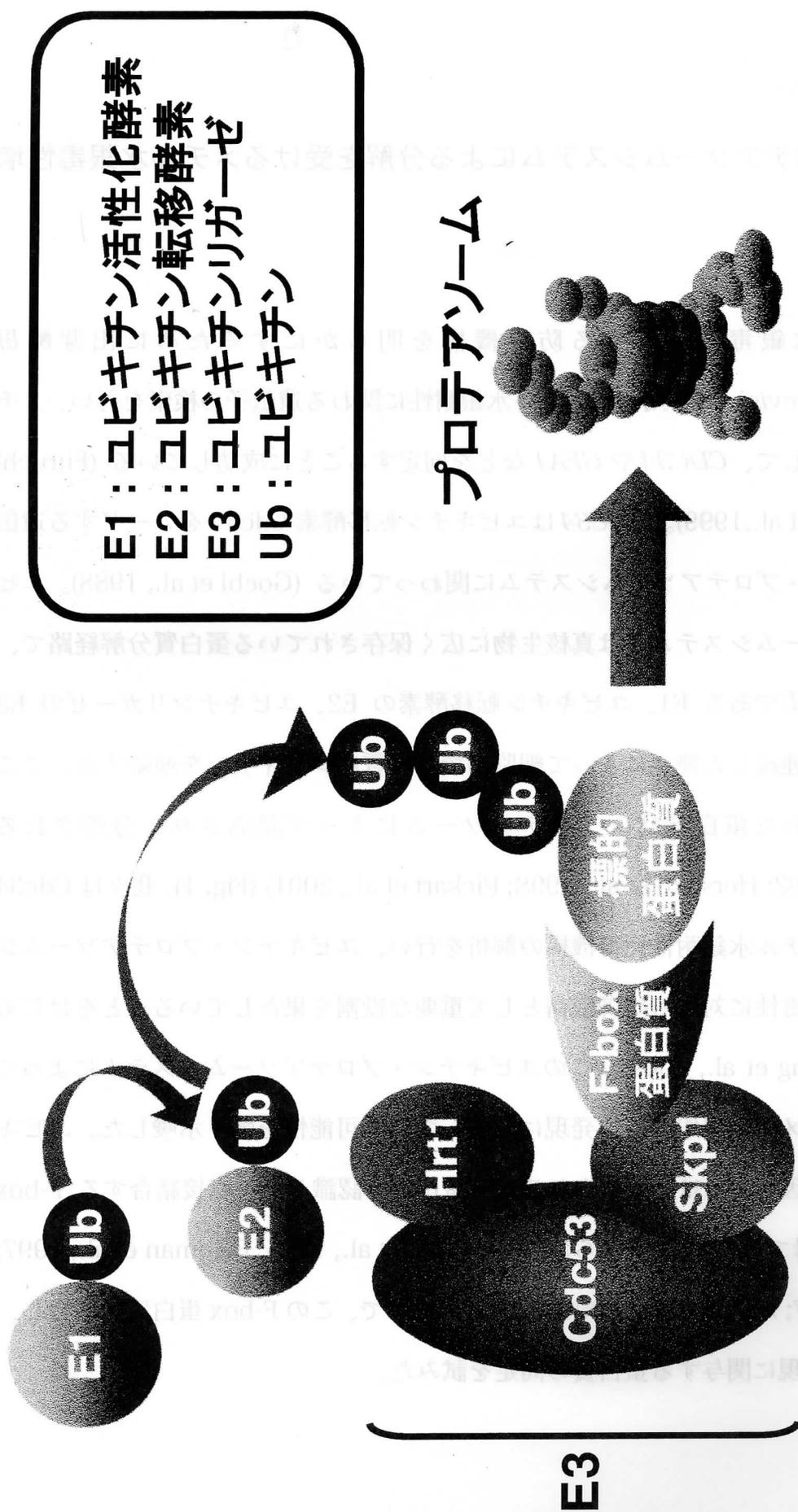


Figure 1. ユビキチン・プロテアソームシステム

ユビキチン活性化酵素であるE1、ユビキチン転移酵素のE2、ユビキチンリガーゼのE3という三つの酵素の連続した働きによって細胞内で蛋白質にユビキチンが連結され、これが分解シグナルとして働き、プロテアソームによる認識を受けて、分解が生じる

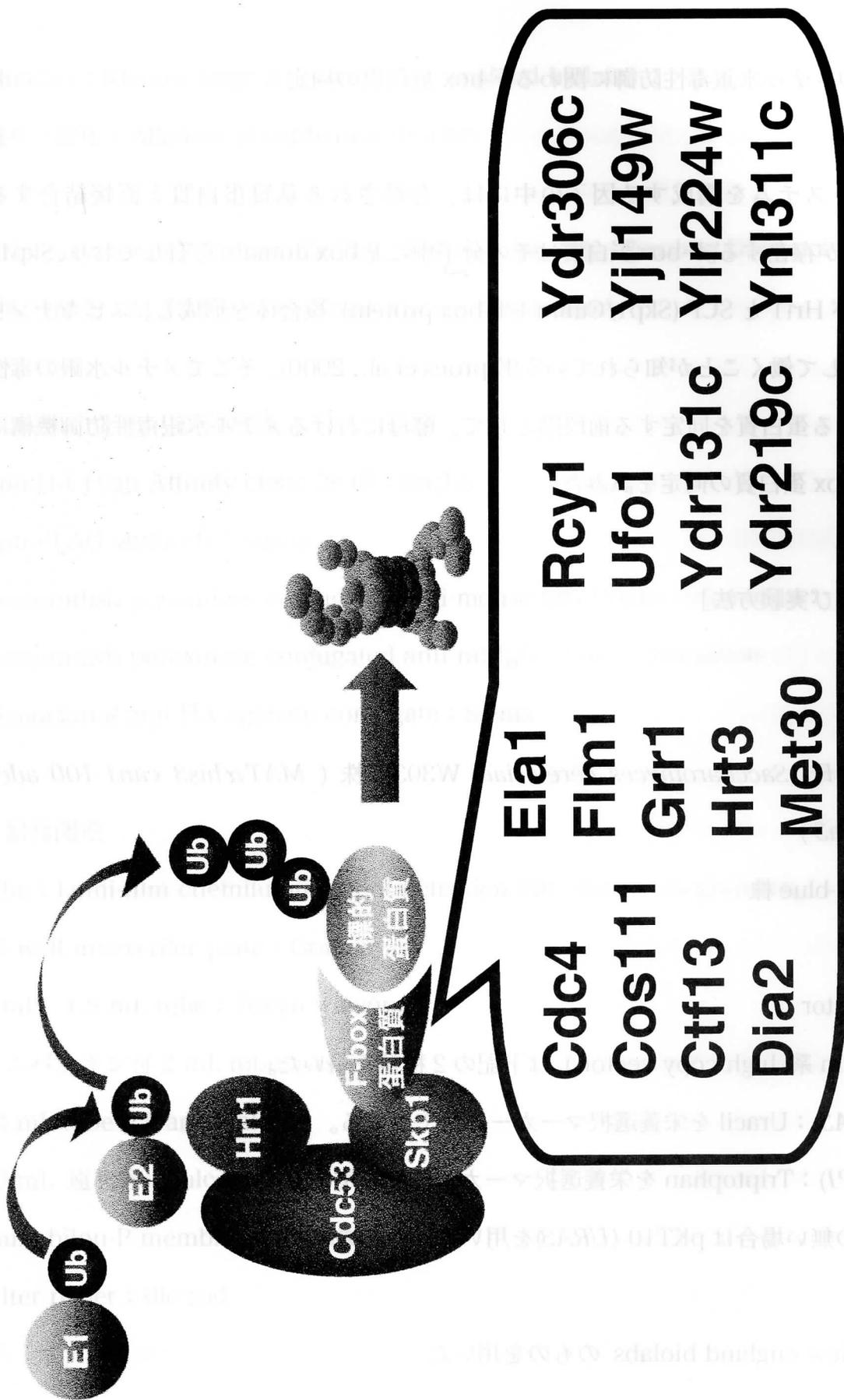


Figure 2. 酵母のF-box蛋白質ファミリー

ユビキチンシステムの構成因子中には、分解される基質蛋白質と直接結合するF-box蛋白質が存在し、酵母では17種類のF-box蛋白質が知られている。

(1) 酵母のメチル水銀毒性防御に関わる F-box 蛋白質の同定

[目的]

ユビキチンシステムを構成する因子の中には、分解される基質蛋白質と直接結合する F-box 蛋白質が存在する。F-box 蛋白質はその分子中に F-box domain を有しており、Skp1、Cdc53 および Hrt1 と SCF (Skp1/Cullin 1/F-box protein) 複合体を形成し、ユビキチンリガーゼ E3 として働くことが知られている (Kiproes et al., 2000)。そこでメチル水銀の毒性発現に関与する蛋白質を同定する前段階として、酵母におけるメチル水銀毒性防御機構に関与する F-box 蛋白質の同定を試みた。

[実験材料及び実験方法]

1. 実験材料

・生物材料

酵母：出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) W303B 株 (*MAT α his3 can1-100 ade2 leu2 trp1 ura3*)

大腸菌：XL1-blue 株

酵母発現 Vector

pKT10 (2 μ m 系 high-copy vector) は下記の 2 種類を用いた。

pKT10 (*URA3*) : Uracil を栄養選択マーカーとして用いる。

pKT10 (*TRP1*) : Tryptophan を栄養選択マーカーとして用いる。

*特に記載の無い場合は pKT10 (*URA3*)を用いているものとする。

制限酵素：New england biolabs のものを用いた

Blunting : Klenow large fragment (New england biolabs)

脱リン酸化 : Alkaline phosphatase (Roche)

DNA polymerase : Takara *Ex Taq*, Takara *LA Taq*, *Pyrobest* DNA polymerase

逆転写酵素 : M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen)

Western blotting 関連抗体

Anti-HA High Affinity clone 3F10 : Roche

Anti-FLAG antibody : Sigma

Horseradish peroxidase conjugated anti-mouse IgG : Dako cytometry

Horseradish peroxidase conjugated anti-rat IgG : Dako cytometry

Monoclonal anti-HA agarose conjugate : Sigma

・ 器具関連

Film : Lumi-film chemiluminescent detection film (Roche diagnostics)

96 well micro-titer plate : Greiner

2 mL、1.5 mL tube : Tokyo watson

ゴムパッキン付 2 mL tube : Assist

14 mL tube (clear) : Falcon

50 mL 遠沈管 : Falcon

Immobilon-P membrane : Millipore

Filter paper : Bio-rad

・機器関連

イオン交換水、Milli-Q 水 : Millipore

吸光光度計 : DNA 濃度測定用 DU 640 spectrophotometer (Beckman)

酵母濁度測定用 Benchmark plus (Bio-rad)

96 well shaker : Iwaki

振盪培養用 shaker : Taitec

気相 incubater : Sanyo

遠心分離機 : MX-200 (Tomy 精工)

ビーズ式細胞破碎装置 : MS-100R (Tomy 精工)

Mini disk rotor : Bio craft

電気泳動装置 : Bio craft

Transfer 装置 : wet (Bio-rad)、semi-dry (Nippon-eido)

PCR 装置 : Mastercycler gradient (Eppendorf)

定量 PCR 装置 : i-cycler (Bio-rad)

UV transilluminator : 3 UV transilluminator NLMS-20E 型 (UVP)

Auto-sequencer : CEQ™ 2000XL (Beckman)

・キット類

DNA ligation kit ver.2 : Takara

ECL reagent : Amersham pharmacia biotech

GeneClean II kit : Takara

Plasmid purification : GenElute™ Plasmid Miniprep Kit (Sigma)

Protein assay kit : Bio-rad

Sequence kit : CEQ2000 Dye Terminator Cycle Sequencing with Quick Start Kit

(Beckman)

定量 PCR kit : iQ™ SYBR Green supermix (Bio-rad)

・ 試薬関連

Acrylamide-HG : Wako

Agarose : Nacalai

Ampicillin sodium salt : Nacalai

Ammonium persulfate : Life technologies

Bromophenol blue : Wako

D-(+)-glucose : Nacalai

Dithiothreitol (DTT) : Invitrogen

10 mM dNTP Mix, PCR grade : Invitrogen

Ethanol : Nacalai

Ethidium bromide (EtBr) : Gibco

Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) : Wako

Ethylendiamine-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid (TEMED) : Wako

Glass beads : Sigma

Glycine : Wako

Glycerol : Wako

Lithium acetate : Nacalai

Magnesium chloride hexahydrate ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) : Nacalai

2-Mercaptoethanol : Nacalai

N-N'-Methylenebis-acrylamide : Wako

Methylmercury chloride : Wako

Oligo(dT)₁₂₋₁₈ Primer : Invitrogen

Phenol : Nacalai

Polyethylene glycol : Nacalai

Polyoxyethylene sorbitan monolaurate (Tween20) : Nacalai

Potassium chloride : Nacalai

RNase H : Invitrogen

Skim milk : 雪印乳業

Sodium chloride : Nacalai

Sodium lauryl sulfate (SDS) : Nacalai

Tris (hydroxymethyl) aminomethane : Nacalai

10×Tris-buffered saline : Bio-rad

・ Buffer 関連

Yeast extract-peptone-dextrose (YPD) 培地 : 1% Bacto-yeast extract, 2% Bacto-peptone, 2% glucose, 40 mg/mL adenine

Synthetic dextrose (SD) 培地 : 0.67% yeast nitrogen base, 2% glucose, 40 mg/mL adenine, 20 mg/mL histidine, 60 mg/mL leucine, 40 mg/mL tryptophan, 20 mg/mL uracil, 1.3 g/L dropout powder

Luria-Bertani (LB) 培地 : 1% Bacto-tryptone, 0.5% Bacto-yeast extract, 1% NaCl, pH7.5

蛋白質抽出用 Buffer C : 20 mM Tris-HCl (pH7.5), 1 mM EDTA, 5 mM MgCl₂, 50 mM KCl,
5% glycerol

SDS-PAGE 濃縮ゲル調整用 Buffer : 0.5 M Tris-HCl (pH6.8), 0.4% SDS

分離ゲル調整用 Buffer : 1.5 M Tris-HCl (pH8.8), 0.4% SDS

2×Sample buffer : 12.5% 濃縮ゲル調整用 Buffer, 10%glycerol, 2%SDS, bromophenol
blue

TES solution : 10 mM Tris-HCl (pH7.5), 10 mM EDTA, 0.5%SDS

Transfer Buffer

Wet 用 : 200 mM Glycine, 25 mM Tris-HCl

Semi-dry 用 : 25 mM Tris-HCl, 250 mM Glycine, 0.02% SDS

TBS : 20 mM Tris-HCl (pH7.5)、150 mM NaCl

TTBS : 0.05% Tween20/TBS

Blocking solution TBS 系 : Nacalai (1 次抗体希釈用)

Blocking solution : 5% skim milk/TBS

1 次抗体用 solution : blocking solution TBS 系(Nacalai)+0.05% NaN₃

2 次抗体用 solution : 0.5% skim milk/TBS

2. 実験方法

2-1 酵母発現 plasmid の作成

Cdc4、Cos3、Grr1、Met30、Ylr224w、FLAG-tag 融合 Ylr224w および HA-tag 融合 Skp1 を酵母で発現させるための発現 plasmid は、酵母 2 μ 系 vector pKT10 (HA-tag 融合 Skp1 のみ pKT10 (*TRPI*)) の制限酵素 *Pvu*II 認識部位に、PCR によって増幅したそれぞれの ORF を挿入する方法で作製した。PCR は酵母 chromosomal DNA を template とし、以下に示す primer と反応条件を用いて行った。反応後、それぞれの PCR 産物をアガロース電気泳動後、目的サイズの DNA 断片をゲルより切り出し、GeneClean II kit を用いて精製した。得られた DNA 断片と、予め *Pvu*II で切断後精製しておいた pKT10 を DNA ligation kit ver.2 を用いて以下の用量で連結し、大腸菌 (XL1-blue) に導入した (Hanahan et al., 1983)。Competent cell 溶液 50 μ L にプラスミド溶液を加え、氷上に 30 分静置した後、42°C で 45 秒間の熱ショックをかけ、さらに氷上に 2 分間静置した後、ampicillin sodium salt 100 μ g/mL を含む LB 寒天培地に塗布し、37°C で一晩培養した。形成されたコロニーを ampicillin sodium salt 100 μ g/mL を含む LB 培地 2 mL で一晩振盪培養した後、GenElute™ Plasmid Miniprep Kit (Sigma) を用いて大腸菌より plasmid を回収した。塩基配列は sequence により確認した。発現は酵母株に導入後、以下に示す primer を用いた定量的 RT-PCR 法によって確認し、FLAG もしくは HA-tag 融合蛋白質については各々の抗体を用いた Western blotting で確認した。

Ctf13、Ela1、Ufo1、Ydr219c および Yjl149w を酵母で発現させるための発現 plasmid は、PCR によって増幅したそれぞれの ORF を pGEM-T Easy vector を用いて TA cloning を行った後、制限酵素 *Eco*RI で切断後、予め *Eco*RI で切断後精製しておいた pKT10 と連結する方法で作製した。PCR は以下に示す primer を用いて行った。発現は酵母株に導入後、以下に示す primer を用いた定量的 RT-PCR 法によって確認した。

Dia2を酵母で発現させるための発現plasmidは、PCRによって増幅したそれぞれのORFをpTarget vectorを用いてTA cloningを行った後、制限酵素 *Sal I* / *Xho I* で切断後、予め *Sal I* で切断し、脱リン酸化処理後精製しておいた pKT10 と連結する方法で作製した。PCR は以下に示す primer を用いて行った。発現は酵母株に導入後、以下に示す primer を用いた定量的 RT-PCR 法によって確認した。

Fln13 および Rcy1 を酵母で発現させるための発現 plasmid は、PCR によって増幅したそれぞれの ORF を pTarget vector を用いて TA cloning を行った後、制限酵素 *BamH I* で切断後 blunting を行い、さらに *Kpn I* で切断後、予め *EcoR I* で切断後 blunting を行い、さらに *Kpn I* で切断後精製しておいた pKT10 と連結する方法で作製した。PCR は以下に示す primer を用いて行った。発現は酵母株に導入後、以下に示す primer を用いた定量的 RT-PCR 法によって確認した。

Hrt3、FLAG-tag 融合 Hrt3、Ydr131c、Ydr306c は Ynl311c を酵母で発現させるための発現 plasmid は、PCR によって増幅したそれぞれの ORF を pTarget vector を用いて TA cloning を行った後、制限酵素 *Kpn I* / *Xho I* で切断後、予め *Kpn I* / *Xho I* で切断後精製しておいた pKT10 と連結する方法で作製した。PCR は以下に示す primer を用いて行った。発現は酵母株に導入後、以下に示す primer を用いた定量的 RT-PCR 法によって確認し、FLAG tag 融合蛋白質については抗 FLAG 抗体を用いた Western blotting で確認した。

PCR 反応条件

94°C 5 min

↓

94°C 30 sec

55°C 1 min

]

72°C 1 min/kb of DNA length 30 cycles

↓

72°C 5 min

反応溶液組成

Template DNA: 0.5 μ g

Polymerase: 0.5 μ L

Primer (100 pM) : 各 0.1 μ L

2.5 mM dNTP mix: 5 μ L

10 \times PCR buffer: 5 μ L

計 50 μ L になるように Milli-Q 水を加えた

高発現ベクター作成用 Primer

yCDC4

Sense: 5'-GGCAAAAATTACGCTGTACG-3'

Antisense: 5'-TGCTTATTCTCTCTGGGAAAGG-3'

yCOS3

Sense: 5'-CTCGAAGCAAGAGGGGAAAAG-3'

Antisense: 5'-TGCTGTAAAAGAGAGCAGGC-3'

yCTF13

Sense: 5'-TGACTGTGAGTCCCCAGAAGT-3'

Antisense: 5'-TAAAATACCGCCGGTTTTCC-3'

yDIA2

Sense: 5'-GACATGCAAAAATGATTAGCC-3'

Antisense: 5'-AGGATACTGCATTATCATCAG-3'

yELA1

Sense: 5'-AAATCGATTGATGTCGAGAT-3'

Antisense: 5'-GCCTTCGGAGTTGGGTTACT-3'

yFLM13

Sense: 5'-TTAGTTACTAAAAGGCTCACA-3'

Antisense: 5'-TGCTACTTTTGGAAACCTCC-3'

yGRR1

Sense: 5'-GTTTTGCGGTTTCCTTTATAC-3'

Antisense: 5'-GGACAGTAAGTATTCAATGA-3'

yHRT3

Sense: 5'-CCATAAGCTAAACTCAAGG-3'

Antisense: 5'-AACAACTGCAAAAAACATCG-3'

FLAG-yHRT3

Sense:

5'-AACTCAAGGAGCAAATGGACTACAAGGATGACGATGACAAGATAGTAGATT
ATGAAAA-3'

Antisense: 5'-AACAACTGCAAAAAACATCG-3'

yMET30

Sense: 5'-GGGTGTGTGTTTGGTGATTTA-3'

Antisense: 5'-CAAGAAAAGACCACACACAGG-3'

yRCY1

Sense: 5'-AAACCAAAGAAAACAAAAGC-3'

Antisense: 5'-TCCGCACTTCATACCTAT-3'

yUFO1

Sense: 5'-CCGACACTAGGGAATAAGACA-3'

Antisense: 5'-TGCTCTTCCAAATGTACATAC-3'

yYDR131C

Sense: 5'-TTTGAAAGGGCCCGAAAA-3'

Antisense: 5'-TAACCGCCATGTCTCACAGTA-3'

yYDR219C

Sense: 5'-ATAGTTCCTTCAACCACATAG-3'

Antisense: 5'-AAAGTCGGTTTGAGGCGTTT-3'

yYDR306C

Sense: 5'-CATATCAACCACAGTACTCAG-3'

Antisense: 5'-CACTGACTCTTATAAAAACAAA-3'

yYJL149W

Sense: 5'-CACAGTGTTTACAACACTCAGC-3'

Antisense: 5'-TATTTGAAGGGGAGTTGA-3'

yYLR224W

Sense: 5'-ATTGGCGCAAAGAAGACAGA-3'

Antisense: 5'-GCATAGACGTATATACACAT-3'

FLAG-yYLR224W

Sense:

5'-AGAGATGGACTACAAGGATGACGATGACAAGAATCAGAGCGATAGCAGCT-3'

,

Antisense: 5'-GCATAGACGTATATACACAT-3'

yYNL311C

Sense: 5'-ACGTTCAAACCAACCGAATC-3'

Antisense: 5'-AAAGTCCACTACAAAAAGTCA-3'

ySKP1-HA

Sense: 5'-CTAACAACGTAGCGCAGAT-3'

Antisense:

5'-TAGGCTAAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTAACGGTCTTCAGCCCATTC
-3'

2-2 酵母への plasmid の導入

酵母 (W303B 株) の形質転換は酢酸リチウム法 (Gietz et al., 1992) により行った。まず、酵母株を完全培地である YPD 培地 2 mL に植菌し 30°C で一晩振盪培養した後、この培養液を YPD 培地で 2×10^6 cells/mL となるように希釈した。この希釈培養液 50 mL を 1×10^7 cells/mL になるまで振盪培養した後に集菌し、滅菌水で洗浄した。これを 100 mM 酢酸リチウム溶液で 2×10^9 cells/mL となるように懸濁し、気相中、30°C で 15 分間 incubate した。この懸濁液 50 μ L に該当遺伝子を組み込んだ発現 vector 1 μ g、加熱変性サケ精子 DNA 50 μ g および 40% polyethylene-glycol (4000) 300 μ L を加え、30°C で 30 分間 incubate した。その後、42°C で 15 分間の熱ショックをかけた後に集菌し、100 μ L の滅菌水で懸濁して SD 寒天培地に塗布し、30°C で 2 日間培養した。

2-3 酵母からの chromosomal DNA の抽出

酵母からの chromosomal DNA の抽出は glass-beads 法 (Hoffman et al., 1993) によ

って行った。まず、single colony を SD 培地 2 ml に植菌し、30°Cで一晩振盪培養した後、集菌して breaking buffer (92% Triton X-100、1% SDS、100 mM NaCl、10 mM Tris-HCl (pH8.0) 、 1 mM EDTA (pH8.0)) 200 μ l に懸濁した。これに phenol/chloroform/isoamylalcohol (25:24:1) 200 μ l および glass-beads 0.5 g を加え 3 分間激しく攪拌した後、12,000xg で 5 分間遠心して水層の plasmid 溶液を ethanol 沈殿し、滅菌蒸留水を加えて 300 μ l とした。

2-4 定量的 RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction) を用いた発現の確認

RT-PCR を用いた発現確認は、template として発現 plasmid を導入した酵母から抽出した RNA を鋳型に合成した cDNA を用いて、以下に示す反応条件にて行った。

酵母からの RNA 抽出

RNA 抽出は Hot phenol 法 (Schmitt et al., 1990) で行った。酵母株を SD 培地 2 mL に植菌し 30°Cで一晩振盪培養した後、この培養液を SD 培地 50 mL に再び植菌して 5×10^6 cells/mL となるまで培養した。Wash 後、TES solution と酸性 phenol を 400 μ L ずつ加え、10 分毎に攪拌をしながら計 60 分間、65°Cで加熱した。冷却後、遠心分離にて水層と油層に分離させ、水層を別のチューブに移した後に更に 400 μ L の酸性 phenol を加え攪拌した。遠心分離後、別チューブに移した水層に ethanol を加え RNA を沈殿させた。上清を捨て、沈殿物を 70% ethanol で wash 後、ethanol を極力除いた後に適量の滅菌水を加え、RNA 溶液とした。

cDNA の作製

上記で調整した RNA 溶液を $3\mu\text{g}/11\mu\text{L}$ となるように希釈し、これに $1\mu\text{L}$ の oligo(dT)₁₂₋₁₈ primer を加え、 70°C で 10 分間加熱した。冷却後、 $1\mu\text{L}$ の 10 mM dNTP mix、 $2\mu\text{L}$ の DTT、 $4\mu\text{L}$ の 5×First strand buffer を加え、 42°C で 5 分間 incubate した。incubate しながら M-MLV reverse transcriptase を $1\mu\text{L}$ 加え、1 時間以上 incubate を続け、逆転写を行った。逆転写終了後、 70°C で 15 分間加熱し、冷却後、 $0.26\mu\text{L}$ の RNase H を加え 37°C で 20 分間 incubate した。この溶液を cDNA 溶液とした。

定量 PCR

定量 PCR は Bio-rad I-cycler を用いて以下の反応条件で行った。

PCR 反応条件

95°C 3 min

↓

95°C 30 sec

55°C 30 sec

72°C 30 sec 40 cycles

↓

60°C 30 sec →plus 1°C 30 sec →plus 1°C 30 sec…to show melt curve

反応溶液組成

Template cDNA: $5\mu\text{L}$ (cDNA 溶液を 200 倍希釈し、使用した。100 倍,1000 倍,10000 倍希釈も作成し、検量線作成に用いた。)

iQTM SYBR Green supermix : $12.5\mu\text{L}$

Primer (1 pM) : 各 $0.75\mu\text{L}$ _____

計 50 μ L になるように Milli-Q 水を加えた

定量 PCR 用 primer

yCDC4 (定量 PCR)

Sense: 5'-TTTCCCTTAGCTGAGTTTCCA-3'

Antisense: 5'-AACTGGATGGAGGGTTTTGT-3'

yCÖS3 (定量 PCR)

Sense: 5'-GTCAAGTGCTTCAAGACTTCA-3'

Antisense: 5'-TGGAAGCCAAATCATCAGGA-3'

yCTF13 (定量 PCR)

Sense: 5'-ATGCCTTCTTTCAATCCTGTT-3'

Antisense: 5'-GCAATCATAGCGCAACCAAA-3'

yDIA2 (定量 PCR)

Sense: 5'-AGAACA AAAAATACACCCCGA-3'

Antisense: 5'-AGCACGCACAGATGTTATCCA-3'

yELA1 (定量 PCR)

Sense: 5'-CAAACACTATGTGAAATCTCA-3'

Antisense: 5'-TTTTTTCTCTTTCTTGCTGC-3'

yFLM1 (定量 PCR)

Sense: 5'-AACCTCTTTATGGTTGGTTC-3'

Antisense: 5'-TCTCCATTTTGCTCTTCTT-3'

yGRR1 (定量 PCR)

Sense: 5'-CAACAACCACAATGACAGCA-3'

Antisense: 5'-GTTGGTTGGCAAAGCGTTT-3'

yHRT3 (定量 PCR)

Sense: 5'-AGATTATGAAAAGGACCCTAG-3'

Antisense: 5'-GCAGGGTTGAAGTTCAGCATT-3'

yMET30 (定量 PCR)

Sense: 5'-GAGAGAGGCAAAGGATGATGA-3'

Antisense: 5'-ATGCCGATAGCAGAACTTGGT-3'

yRCY1 (定量 PCR)

Sense: 5'-GCTAAAAGTTCCCGAGATTGT-3'

Antisense: 5'-CAACGGTAAAATTTCAAAAG-3'

yUFO1 (定量 PCR)

Sense: 5'-CTTGGTATTGCAGGACCTT-3'

Antisense: 5'-CTACCAAACACTGCAGCATT-3'

yYDR131C (定量 PCR)

Sense: 5'-CCGCAGGAAGATAAAATTTTCG-3'

Antisense: 5'-GGGACATAATCTTTTCGGTGA-3'

yYDR219C (定量 PCR)

Sense: 5'-TTGTAGTGTACAGATGCCGCT-3'

Antisense: 5'-ACCAGGGATATGTTGTGACT-3'

yYDR306C (定量 PCR)

Sense: 5'-CAAACAAATCACGACCCAAG-3'

Antisense: 5'-ATGGCGTACCAGTTTCTGCAA-3'

yYJL149W (定量 PCR)

Sense: 5'-TGCCATTTCAAGATTATTTTC-3'

Antisense: 5'-TCACTACATTTGAGTCGTTCA-3'

yYLR224W (定量 PCR)

Sense: 5'-CGATAGCAGCTTGATGGATT-3'

Antisense: 5'-TTCCTCCTGGACCAAAAGTT-3'

yYNL311C (定量 PCR)

Sense: 5'-CGGTTGCAATTGTTTGGTAG-3'

Antisense: 5'-CGTTTTGGAAAAGGAACTCA-3'

2-5 F-box domain を欠失した truncation mutants の発現 plasmid の作製

Hrt3 または Ylr224w の F-box domain を欠失した truncation mutants は template として FLAG-Hrt3/pKT10 もしくは FLAG-Ylr224w /pKT10 を用い、以下に示す反応条件と primer で PCR を行い作成した。PCR によって増幅した後、制限酵素 *Kpn* I で処理した DNA 断片を連結することで F-box domain に相当する領域 (Hrt3 は 100-151 amino acids、Ylr224w は 8-45 amino acids; Patton et al., 1998) を欠失させた。塩基配列は sequence により確認した。発現は酵母株に導入後、抗 FLAG 抗体を用いた Western blotting で確認した。

PCR 反応条件 (変異導入)

95°C 30 sec

↓

95°C 30 sec

55°C 1 min

]

68°C 2 min/kb of plasmid length 18 cycles

↓

68°C 3 min

反応溶液組成

Template DNA: 0.5 μ g

Polymerase: 0.5 μ L

Primer (100pM) : 各 0.1 μ L

2.5 mM dNTP mix: 5 μ L

10 \times PCR buffer: 5 μ L

計 50 μ L になるように Milli-Q 水を加えた

Hrt3 または Ylr224w の F-box domain 欠失 truncation mutant 作成用 primer

yHrt3 (F-box domain 欠失)

Sense: 5'-GTGCCATTTAAAGGTACCGCGAAGTACATATATTC-3'

Antisense: 5'-CGTCAGGCAAGATGGTACCAATCCAGCAGGGTTG-3'

yYLR224w (F-box domain 欠失)

Sense: 5'-CCACAGCTATAAGGGTACCAGTTTGGCGTGG -3'

Antisense: 5'-CCAGTGGTAAATCGGTACCGCTGCTATCGCTC-3'

2-6 寒天培地での耐性試験

空ベクター-pKT10のみを導入した株、もしくは何らかの蛋白質をコードする遺伝子を組み込んだ pKT10 を導入した株、それぞれの株を SD 培地 2 mL に植菌し 30°C で一晩振盪培養した後、 1×10^6 cells を SD 培地 900 μ L に植菌した後、滅菌水または 10 μ M のメチル

水銀を 100 μ L 加えた (final : 0、1 μ M となる)。30°C で 3hr 静置培養した後、集菌し、100 μ L の滅菌水で懸濁し、 1×10^7 、 1×10^6 、 1×10^5 cells/mL となるようにそれぞれ希釈し、5 μ L スポットティングした。(final : 5×10^4 、 5×10^3 、 5×10^2 cells/spot となる)。気相インキュベーターを用いて 30°C で培養後、観察した。

2-7 液体培地での耐性試験

0、200、400、600、800、1000、1200、1400 nM にそれぞれ希釈したメチル水銀を 96 well micro-titer plate に 20 μ L ずつ分注する (final : 0、20、40、60、80、100、120、140 nM となる)。空ベクター-pKT10 のみを導入した株、もしくは何らかの蛋白質をコードする遺伝子を組み込んだ pKT10 を導入した株、それぞれの株を SD 培地 2 mL に植菌し 30°C で一晩振盪培養した後、 5.56×10^4 cells/mL となるように希釈し、96 well micro-titer plate にそれぞれの希釈系列に対して 3 well ずつ、1 well あたり 180 μ L 添加する (final : 1×10^4 cells/well となる)。気相インキュベーターを用いて 30°C、所定の時間(24、48 hr) 培養後、濁度を測定(A600)した。

2-8 MG132 存在下での液体培地での耐性試験

0、600、800、1000、1200、1400、1600、1800 nM にそれぞれ希釈したメチル水銀を 96 well micro-titer plate に 20 μ L ずつ分注する (final : 0、60、80、100、120、140、160、180 nM となる)。空ベクター-pKT10 のみを導入した株、もしくは何らかの蛋白質をコードする遺伝子を組み込んだ pKT10 を導入した株、それぞれの株を SD 培地 2 mL に植菌し 30°C で一晩振盪培養した後、 5.56×10^4 cells/mL となり、MG132 が 25 μ M となるように希釈し、96 well micro-titer plate にそれぞれの希釈系列に対して 3 well ずつ、1 well あたり 180 μ L 添加する (final : 1×10^4 cells/well となる)。気相インキュベーターを用い

て 30°C、24hr 培養後さらに MG132 を 50 μ M となるように添加し、30°C、48hr 培養後、濁度を測定(A600)した。

2-9 蛋白質抽出

空ベクター-pKT10のみを導入した株、もしくは何らかの蛋白質をコードする遺伝子を組み込んだ pKT10 を導入した株、それぞれの株を SD 培地 2 mL に植菌し 30°Cで一晩振盪培養した後、200 mL マイヤーに入れた 50 mL の SD 培地に再び植菌し、30°Cで OD が約 0.6~0.8 になるまで(約半日)振盪培養した。集菌し、滅菌水にて 2 回 wash 後、500 μ L の Buffer C に懸濁し、assist tube に移し、葉さじ約 2 杯分のグラスビーズを加えた。Tomy MS-100R を用いて 3 min, 4000 rpm で酵母を破碎後、12000 \times g, 30 min で遠心分離し、上清を 1.5 mL tube に移して再び 12000 \times g, 30 min で遠心分離を行った。先の操作を 2 度繰り返し、可溶性画分のみを採取した。蛋白質量を定量後、SDS-PAGE を行う全ての well の蛋白質量が一定となるように Buffer C と 2 \times sample buffer で希釈した。100°Cで 3 分間 boil し、SDS-PAGE 用 sample とした。

2-10 免疫沈降

空ベクター-pKT10のみを導入した株、もしくは何らかの蛋白質をコードする遺伝子を組み込んだ pKT10 を導入した株、それぞれを SD 培地 2 mL に植菌し 30°Cで一晩振盪培養した後、200 mL マイヤーに入れた 50 mL の SD 培地に再び植菌し、30°Cで OD が約 0.6~0.8 になるまで(約半日)振盪培養した。集菌し、滅菌水にて 2 回 wash 後、500 μ L の Buffer C に懸濁し、assist tube に移し、葉さじ約 2 杯分のグラスビーズを加えた。Tomy MS-100R を用いて 3 min, 4000 rpm で酵母を破碎後、12000 \times g, 30 min で遠心分離し、上清を 1.5 mL tube に移して再び 12000 \times g, 30 min で遠心分離を行った。先の操作を 2 度繰り返し、

可溶性画分のみを採取した。蛋白質量を定量後、2 mg/500 μ Lとなるように Buffer C で希釈し、約 20 μ L 分の予め TBS で 3 回 wash した anti-HA agarose beads を加え、4 $^{\circ}$ C で約半日間 incubate した。incubate 後、5 回 TBS で wash 後、beads を含めて全量が 70 μ L となるように TBS、2 \times sample buffer を加えた (beads : 20 μ L、TBS : 25 μ L、2 \times sample buffer : 25 μ L)。100 $^{\circ}$ C で 3 分間 boil し、SDS-PAGE 用 sample とした。このうち、1 well に対して 20 μ L を用いた。

2-11 SDS-PAGE

7.5% または 12.5% のポリアクリルアミドゲルを用いて 30 mA/枚で電気泳動を行った。

2-12 Transfer

SDS-PAGE 後、semi-dry 型 blotting 装置を用いた。

(条件 : 50 mA/枚, 3hr)。

2-13 Immunoblotting

Transfer 後の membrane を blocking solution に浸して約 6 hr、blocking した後に 1 次抗体液 (任意の希釈) に浸し、約半日間振盪した。TTBS で 2 回、TBS で 1 回、それぞれ 15 分間振盪して wash した後に HRP 標識化 2 次抗体液 (5000 倍希釈) に浸し、1 時間振盪した。TTBS で 2 回、TBS で 1 回、それぞれ 15 分間振盪して wash した後に ECL reagent を用いて化学発光させ、film に露光させて検出した。

[結果]

1. メチル水銀毒性防御機構に関与する F-box 蛋白質の同定

F-box 蛋白質を酵母に高発現させると、標的蛋白質のユビキチン化が亢進し、細胞内でその蛋白質の分解が促進されると考えられる。したがって、メチル水銀毒性防御機構に関与する F-box 蛋白質が高発現すれば、メチル水銀毒性発現に関与する蛋白質の分解が促進されるので、その酵母はメチル水銀に対して耐性を示すと予想される。そこで、メチル水銀毒性防御機構に関与する F-box 蛋白質を同定するために、17 種の F-box 蛋白質をそれぞれ高発現する酵母を作製して、メチル水銀毒性に対する感受性を検討した。その結果、Cos111、Ctf13、Dia2、Flm1、Met30、Ydr219c、Ydr306c または Yjl149w を高発現させても酵母のメチル水銀感受性に影響は認められず、Cdc4、Elal、Rcy1 または Ynl311c を高発現する酵母はメチル水銀耐性を示したものの、その程度はあまり強くなかった (Fig. 3)。それに対して Grr1、Hrt3、Ufo1、Ydr131c または Ylr224w の高発現酵母では顕著な耐性が認められた (Fig. 3)。これら 17 種の F-box 蛋白質を高発現する酵母のメチル水銀毒性に対する感受性を液体培地培養によっても検討したところ、Grr1、Hrt3、Ufo1 または Ylr224w の高発現酵母のみがメチル水銀耐性を示し、特に Hrt3 または Ylr224w の高発現酵母は強いメチル水銀耐性を示した (Fig. 4)。これらの結果から、Cdc4、Elal、Grr1、Hrt3、Rcy1、Ufo1、Ydr131c、Ylr224w および Ynl311c がメチル水銀毒性防御機構に関与する F-box 蛋白質である可能性が考えられ、特に Hrt3 および Ylr224w がメチル水銀毒性防御により大きく関与していると考えられる。

2. Hrt3 または Ylr224w 高発現を高発現させた酵母が示すメチル水銀耐性に及ぼすプロテアソーム阻害剤の影響

ユビキチンシステムによりユビキチン化された蛋白質は最終的にプロテアソームに認識

されて分解される。F-box 蛋白質である Hrt3 または Ylr224w の高発現によるメチル水銀耐性機構における、ユビキチン・プロテアソームシステムの関与の有無を明らかにするために、両 F-box 蛋白質を高発現させた酵母が示すメチル水銀耐性に及ぼすプロテアソーム阻害剤の影響を検討した。その結果、プロテアソーム阻害剤である MG132 存在下では、Hrt3 または Ylr224w の高発現によるメチル水銀耐性が認められなくなった (Fig. 5)。このことから、両 F-box 蛋白質高発現によるメチル水銀耐性獲得にはプロテアソームによるユビキチン化蛋白質の分解が必要であると考えられる。

3. F-box domain の欠失が Hrt3 および Ylr224w を高発現させた酵母の示すメチル水銀耐性に与える影響

F-box 蛋白質はその構造中の F-box domain を介して E3 複合体構成因子のひとつである Skp1 と結合し、SCF 複合体を形成すると考えられている (Fig. 1, Bai et al., 1996)。本研究で同定された Hrt3 および Ylr224w は共に F-box domain を有するものの、F-box 蛋白質として機能するか否かは検討されていない。そこで次に、Hrt3 または Ylr224w の高発現によるメチル水銀耐性獲得における SCF 複合体形成の必要性を検討した。まず、両 F-box 蛋白質の F-box domain を欠失させた変異体と Skp1 との結合を検討したところ、野生型の Hrt3 および Ylr224w は共に細胞内で Skp1 と結合したのに対し、F-box domain を欠失した変異体は共に Skp1 と結合しなかった (Fig. 6)。このことより Hrt3 および Ylr224w は F-box domain を介して Skp1 と結合し、SCF 複合体を形成すると考えられる。次に、これら変異体を高発現させた酵母のメチル水銀毒性に対する感受性を検討したところ、F-box domain を欠失することにより、Hrt3 または Ylr224w の高発現によるメチル水銀耐性が認められなくなった (Fig. 7)。したがって、Hrt3 および Ylr224w 高発現による酵母のメチル水銀耐性獲得には、F-box domain を介した SCF 複合体の形成が必要であると考え

られる。

[考 察]

メチル水銀毒性防御機構に関与する F-box 蛋白質の同定を目的として、全 F-box 蛋白質の中から酵母にメチル水銀耐性を与えるものを検索した。その結果、メチル水銀毒性防御機構に関与する F-box 蛋白質として、Cdc4、Elal、Grr1、Hrt3、Rcy1、Ufo1、Ydr131c、Ylr224w および Ynl311c が同定され、特にその中でも、Hrt3 および Ylr224w がメチル水銀毒性軽減に強く関与していることが示唆された。Hrt3 または Ylr224w 高発現によるメチル水銀耐性獲得には E3 複合体である SCF 複合体の形成が必要であり、さらに、プロテアソームの活性を阻害すると耐性が認められなくなることから、Hrt3 または Ylr224w が高発現すると、これら F-box 蛋白質が認識する蛋白質のユビキチン化の亢進によってそれら蛋白質のプロテアソームでの分解が促進され、その結果としてメチル水銀毒性が軽減されると考えられる。しかし、両 F-box 蛋白質の基質となる蛋白質は同定されてはいない。これら F-box 蛋白質の基質蛋白質の中にメチル水銀毒性の増強に関わる蛋白質が含まれるものと期待される。

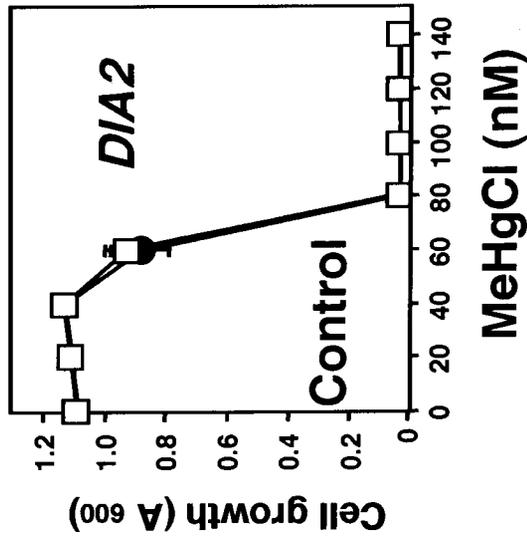
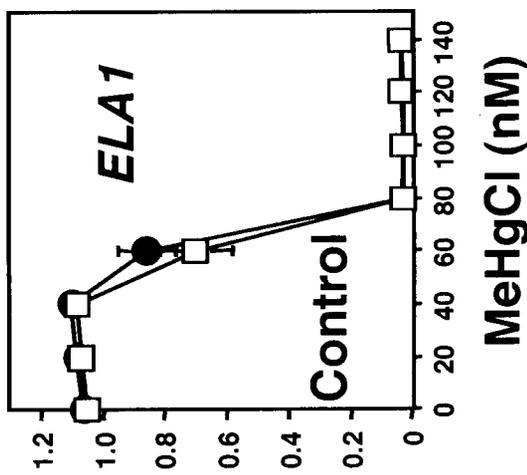
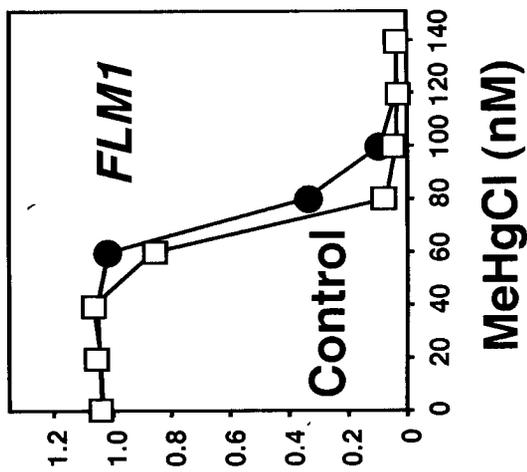
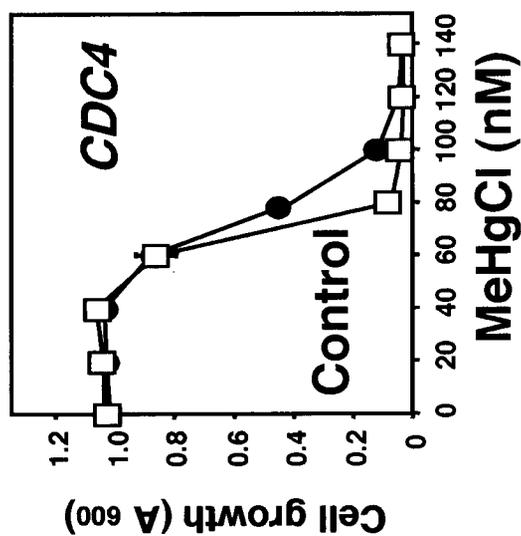
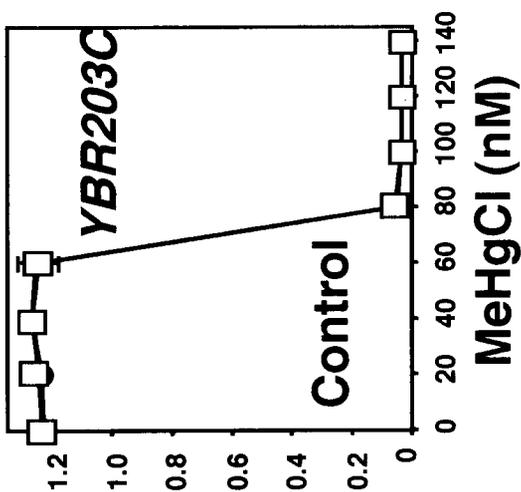
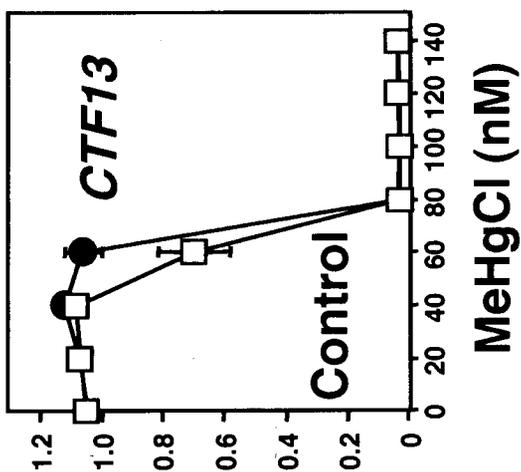


Figure 4-1. 液体培地培養でのF-box蛋白質高発現がメチル水銀毒性に与える影響

5 × 10⁴ cells/mLの酵母にfinal 0、20、40、60、80、100、120、140 nMとなるようにメチル水銀を加え、30°Cで48 hr培養後、濁度を測定 (A600) した。

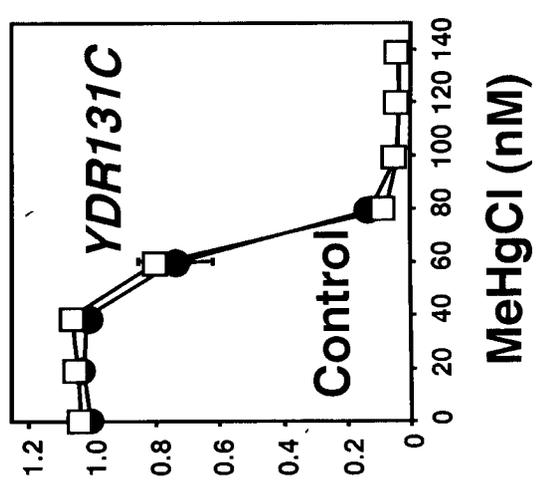
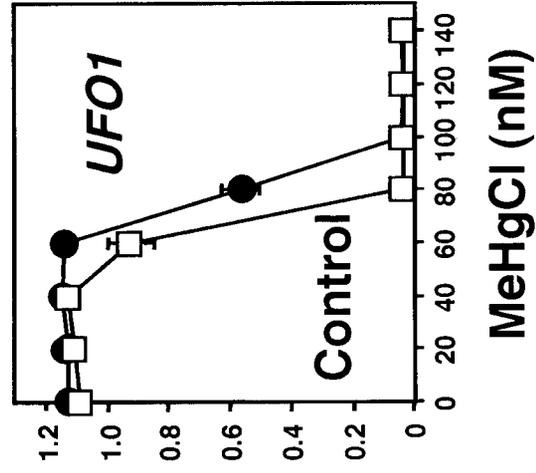
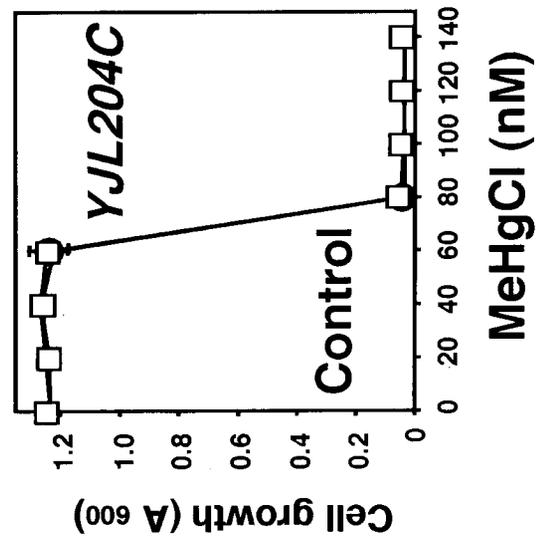
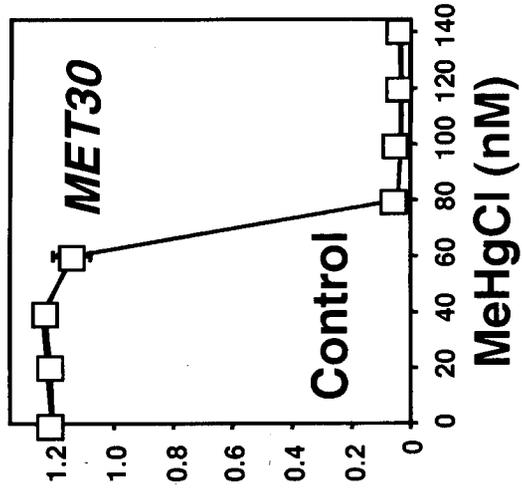
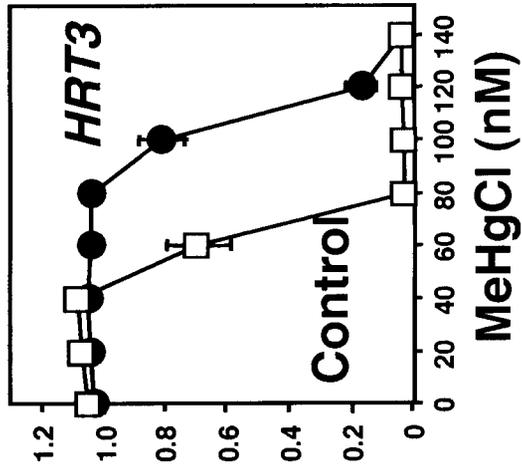
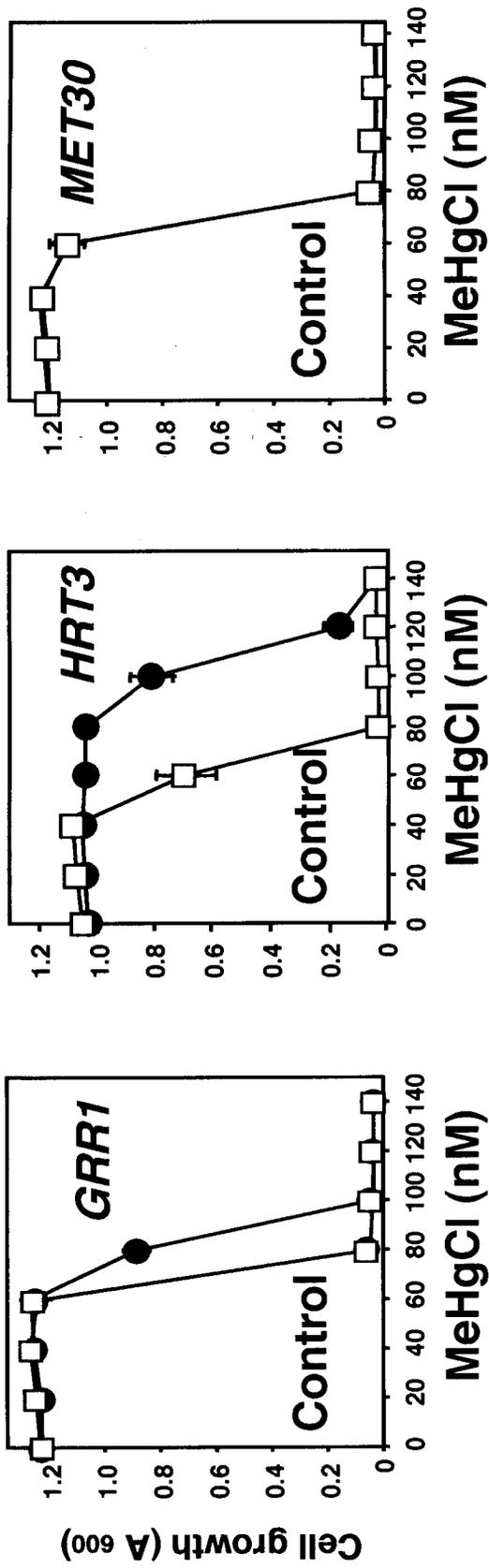


Figure 4-2. 液体培地培養でのF-box蛋白質高発現がメチル水銀毒性に与える影響 (続き)

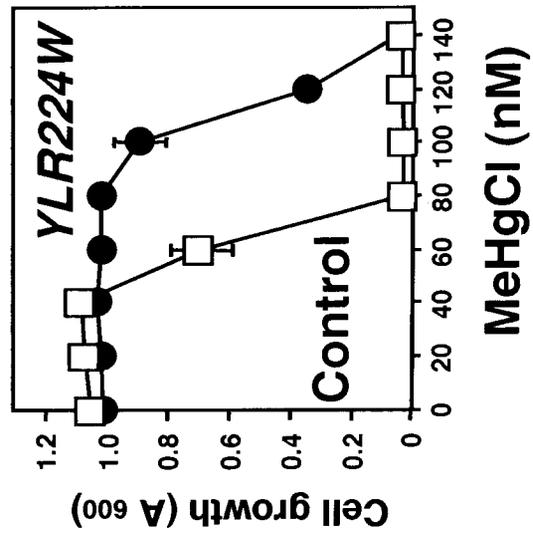
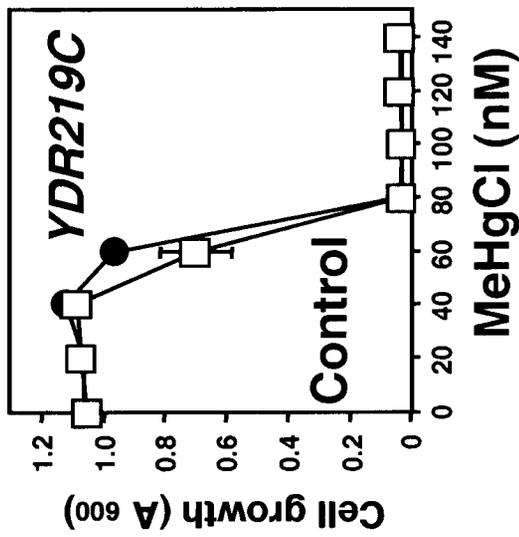
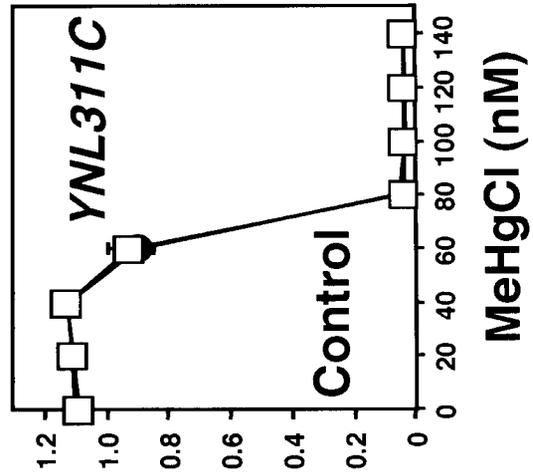
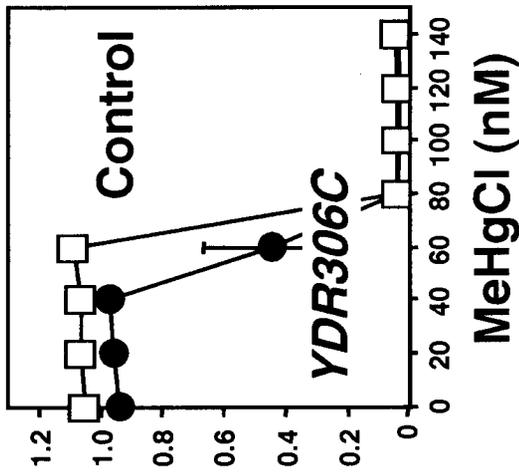
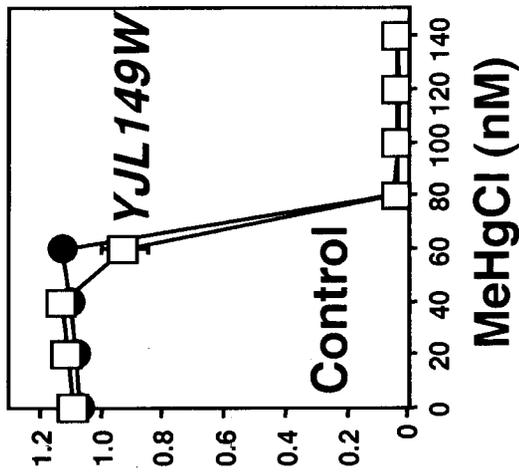


Figure 4-3. 液体培地培養でのF-box蛋白質高発現がメチル水銀毒性に与える影響 (続き)

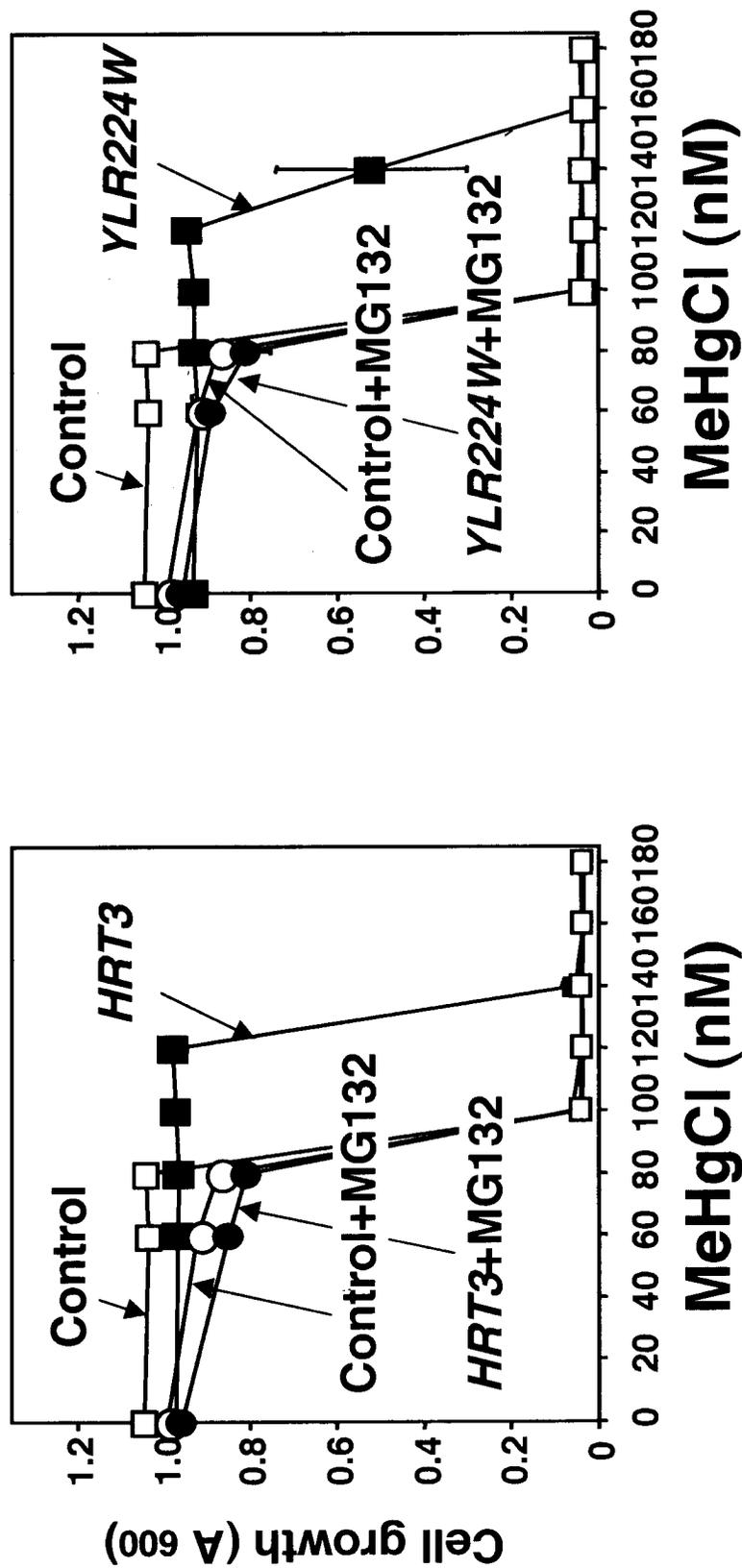
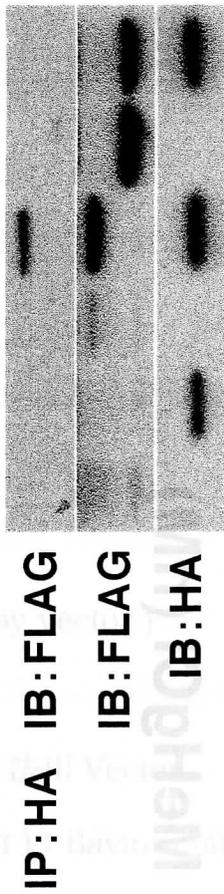


Figure 5. Hrt3またはYlr224w高発現酵母が示すメチル水銀耐性に及ぼすプロテアソーム阻害剤(MG132)の影響

5 × 10⁴ cells/mLの酵母にfinal 0、60、80、100、120、140、160、180 nMとなるようにメチル水銀とfinal 25 μMとなるようにMG132を加え、30°Cで24 hr培養後、さらにfinal 50 μMとなるようにMG132を加え、30°Cで48 hr培養後、濁度を測定(A600)した。

Skp1-HA	-	+	-	+	-	+	-	+
Hrt3-FLAG	-	-	+	+	-	-	-	-
Hrt3 ^{FΔ} -FLAG	-	-	-	-	+	+	-	+



Skp1-HA	-	+	-	+	-	+	-	+
Y1r224w-FLAG	-	-	+	+	-	-	-	-
Y1r224w ^{FΔ} -FL	-	-	-	-	+	+	-	+

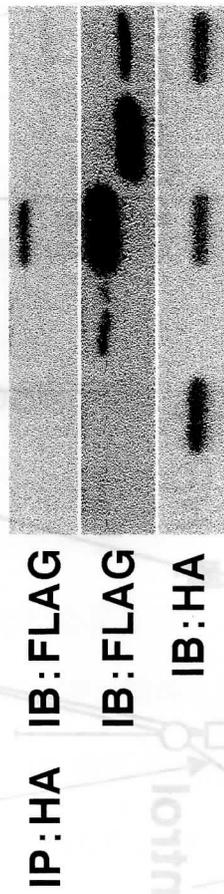


Figure 6. F-box domainを欠失することがHrt3およびY1r224wとSkp1との結合に与える影響

Skp1-HAとHrt3-FLAGあるいはY1r224w-FLAGをそれぞれ単独、もしくは共に高発現させた酵母の抽出液について抗HA抗体で免疫沈降を行った後に抗FLAG抗体を用いたWestern blottingで細胞内のHrt3およびY1r224wとSkp1との結合を検討した。Hrt3^{FΔ}およびY1r224w^{FΔ}は共にF-box domain欠変異体。

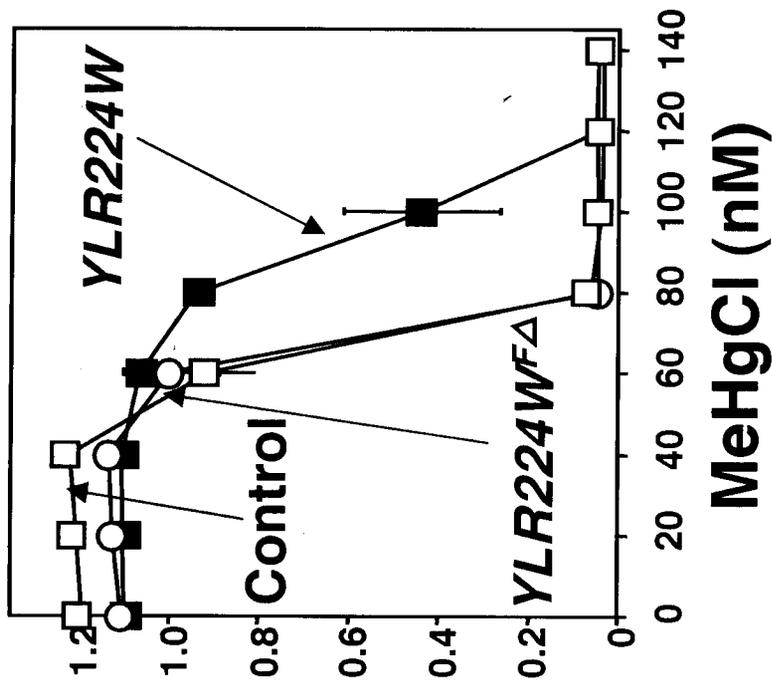
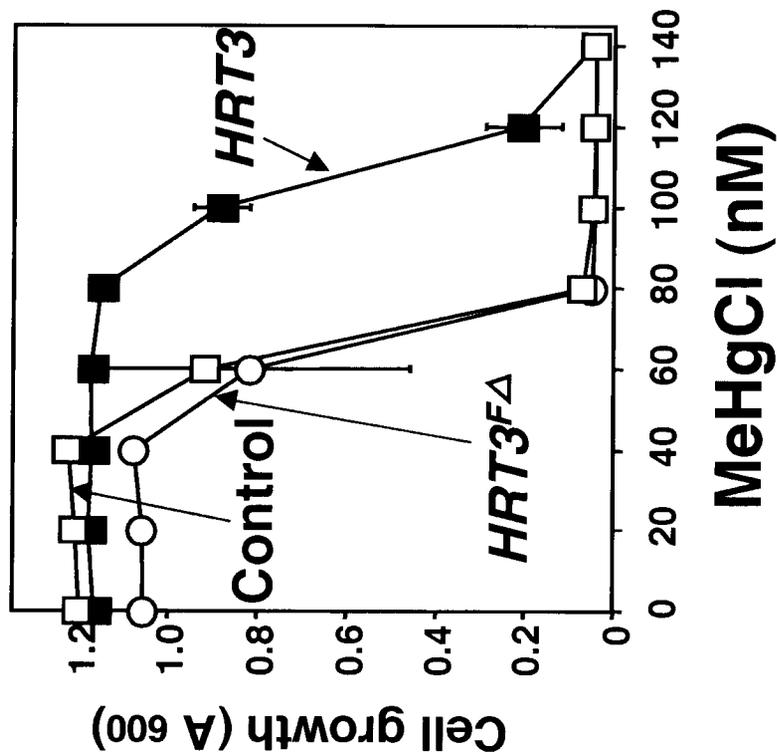


Figure 7. F-box domainを欠失することがHrt3およびYlr224wを高発現した酵母の示すメチル水銀耐性に与える影響

F-box domainを欠失したHrt3またはYlr224wを高発現させた酵母について、Figure 4と同様の方法でメチル水銀感受性を検討した。

(2) Hrt3 または Ylr224w が認識するメチル水銀毒性発現に関与する蛋白質の同定

[目的]

Hrt3 または Ylr224w が認識する蛋白質のプロテアソームによる分解が促進されることによってメチル水銀の毒性が軽減される可能性が示唆された。この Hrt3 または Ylr224w が認識する基質の中には、メチル水銀毒性発現に関与し、ユビキチン・プロテアソームで分解される蛋白質が含まれている可能性が高い。そこで、Hrt3 または Ylr224w が認識する基質蛋白質の同定を試みた。

[実験材料及び実験方法]

1. 実験材料

・生物材料

酵母：出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) AH102 株

酵母発現 Vector

pRS314 (low-copy vector)

Yeast two-hybrid 法用 Vector

pAS1-CYH2 (bait) : Baylor college of medicine

pACT2 (pray) : Baylor college of medicine

Western blotting 関連抗体

Anti-HA Affinity Matrix : Roche (ユビキチン化検出時に用いた)

MG132：ペプチド研究所

1, 10-phenanthroline monohydrate：Nacalai

Ubiquitin aldehyde：MBL

2. 実験方法

2-1 酵母発現 plasmid の作成

Dld3、Eno2、Grs1 およびそれぞれの HA-tag 融合蛋白質を酵母で発現させるための発現 plasmid は、pKT10 (*TRPI*)の制限酵素 *PvuII* 認識部位に、PCR によって増幅したそれぞれの ORF を挿入する方法で作成した。PCR は以下に示す primer を用いて行った。塩基配列は sequence により確認した。発現は酵母株に導入後、以下に示す primer を用いた定量的 RT-PCR 法によって確認し、HA-tag 融合蛋白質については抗 HA 抗体を用いた Western blotting で確認した。

発現量を抑えた HA-tag 融合 Dld3、Eno2、Grs1 を酵母で発現させるための発現 plasmid は low copy vector である pRS314 に cloning した。pRS314 の制限酵素 *PvuII* 認識部位に pKT10 の GAP-DH のプロモーターとターミネーターを制限酵素 *BamHI* / *HindIII* により切り出し、blunting したフラグメントを挿入した。この plasmid の GAP-DH のプロモーターとターミネーターの間に存在する制限酵素 *PvuII* 認識部位に PCR によって増幅したそれぞれの ORF を挿入する方法で作製した。PCR は以下に示す primer を用いて行った。塩基配列は sequence により確認した。発現は酵母株に導入後、抗 HA 抗体を用いた Western blotting で確認した。

Yeast two-hybrid system で用いた plasmid は pAS1-CYH2 の制限酵素 *Nco I* / *Sal I* 認識部位に PCR によって増幅したそれぞれの ORF を GAL4 DNA binding domain と frame が合うように挿入する方法で作成した。PCR によって増幅した後、制限酵素 *Nco I* / *Sal I*

で処理した DNA 断片と、予め *Nco* I / *Sal* I で切断後精製しておいた pAS1-CYH2 と連結し、第二章と同様の方法で F-box domain を欠失する方法で作製した。PCR は以下に示す primer を用いて行った。塩基配列は sequence により確認した。発現は酵母株に導入後、抗 HA 抗体を用いた Western blotting で確認した。

高発現ベクター作成用 Primer

yDLD3

Sense: 5'-GATTCAAGGCTTAAAGACAGCA-3'

Antisense: 5'-GGGTTTGCTCTTTGAAAGTTAA-3'

yDLD3-HA

Sense: 5'-GATTCAAGGCTTAAAGACAGCA-3'

Antisense:

5'-AAGTTCAAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTAAATGTACTTGTATGGGT
TTAAG-3'

yENO2

Sense: 5'-CACCAAGCAACTAATACTATAACATAC-3'

Antisense: 5'-GCAGAAAAGACTAATAATTCTTAG-3'

yENO2-HA

Sense: 5'-CACCAAGCAACTAATACTATAACATAC-3'

Antisense:

5'-CACTTTAAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTACAACCTTGTCACCGTGGT
G-3'

yGRS1

Sense: 5'-CTCTCAGATTGTTAAAAAATCGGTT-3'

Antisense: 5'-TGGCGATATATAGTTAAAATTAAGTCA-3'

yGRS1-HA

Sense: 5'-CTCTCAGATTGTTAAAAAATCGGTT-3'

Antisense:

5'-TTATTTAAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTAGTCAGTTTCAGCTTCAGC
T-3'

Yeast two-hybrid 法用 plasmid

yHRT3

Sense: 5'-GTCACCATGGAAATGATAGTAGATTATGAAAAG-3'

Antisense: 5'-GTCAGTCGACTCATCCAGGATCCTTGAAA-3'

yYLR224W

Sense: 5'-GTCACCATGGAGATGAATCAGAGCGATAG-3'

Antisense: 5'-GTCAGTCGACTCATCTTCGAAGATAAGGG-3'

定量 RCR 用 primer

yDLD3 (定量 PCR)

Sense: 5'-AGCAATATCAATGCCCTAAGG-3'

Antisense: 5'-GGGAAAGGCAAGTCCTTCAA-3'

yENO2 (定量 PCR)

Sense: 5'-ATGATTGCTCCAACCTGGTGCT-3'

Antisense: 5'-TCTGGGTTCTTGAAGTCCAA-3'

yGRS1 (定量 PCR)

Sense: 5'-TTCCTTTTTGCCTCGTGATG-3'

Antisense: 5'-CAGATCTATCAGCACATCCGA-3'

2-2 Yeast two-hybrid 法

Yeast two-hybrid 法用 vector である pAS1-CYH2 に *HRT3* または *YLR224W* を cloning した vector と、酵母 cDNA library が cloning されている pACT2 vector を、酢酸リチウム法により酵母 AH109 株に導入し、histidine を含まない SD 寒天培地で培養した。ここで用いた AH109 株は *GAL4* 上流の活性化配列に制御されているレポーター遺伝子 *HIS3* を持っているため、陽性 clone は histidine を含まない SD 寒天培地で生育可能である。ここで得られた colony を 2 ml の SD 培地に植菌し一晩振盪培養した後、この培養液を再度、histidine を含まない SD 寒天培地に塗布し、培養した。ここで生育した酵母について、plasmid を単離し、再度酵母に導入して、得られた colony を 2 ml の SD 培地に植菌し一晩振盪培養した後、この培養液を再度、histidine を含まない SD 寒天培地に塗布し、培養した。ここで生育した clone について、その pACT2 の insert を sequence により確認し、その遺伝子を決定した。

2-3 細胞内でのユビキチン化検出

(1) の実験方法で示した免疫沈降と同様にして行った。ただし、Buffer C には 1, 10-phenanthroline monohydrate を 1 mM となるように加えた。また、免疫沈降の時に、ubiquitin aldehyde を 2 mM となるように加えた。

2-4 Transfer

ユビキチン化蛋白質量測定の場合、SDS-PAGE 後、wet 型 blotting 装置を用いて immobilon-P membrane に blotting した (条件 : 450 mA, 12 hr)。

[結 果]

1. Hrt3 または Ylr224w と結合する蛋白質の yeast two-hybrid 法による検索

Hrt3 または Ylr224w が認識する基質蛋白質を明らかにするために、まず両蛋白質とそれぞれ結合する蛋白質を yeast two-hybrid 法を用いて検索した。Hrt3 は約 53 万、Ylr224w は約 34 万の形質転換体を用いて検索した。このうち、Hrt3 については 2 個、Ylr224w については 1 個の陽性 clone が得られた。これら clone 中に導入された plasmid を単離し、その sequence から insert を確認したところ、Hrt3 を bait とした clone に関しては *DLD3* および *GRS1* が、Ylr224w を bait とした clone に関しては *ENO2* の cDNA がそれぞれ挿入されていた。細胞内でのこれらの蛋白質間の結合を検討するために、Dld3、Grs1 および Eno2 に HA-tag を融合させた蛋白質と Hrt3 および Ylr224w に FLAG-tag を融合させた蛋白質を高発現させたところ、Hrt3 と Dld3 または Grs1、および Ylr224w と Eno2 との結合がそれぞれ確認された (Fig. 8)。

2. Hrt3 または Ylr224w 高発現が Dld3、Grs1 および Eno2 の細胞内濃度に与える影響

Hrt3 と Dld3 または Grs1、および Ylr224w と Eno2 との結合は確認できたが、Dld3、Grs1 および Eno2 が Hrt3 または Ylr224w によって認識され、分解される基質であるとは限らない。もし、Dld3 および Grs1 が Hrt3 の、または Eno2 が Ylr224w の認識する基質であるのならば、Hrt3 または Ylr224w を高発現することによって、Dld3、Grs1 および

Eno2 のユビキチン化が亢進し、プロテアソームでの分解促進によって細胞内レベルが減少するはずである。そこで、Dld3、Grs1 および Eno2 に HA-tag を融合させた蛋白質と Hrt3 および Ylr224w を高発現させた酵母の抽出液について抗 HA 抗体を用いた Western blotting で Dld3、Grs1 または Eno2 の細胞内レベルを検討した。なお、細胞内レベルの変動をより確実に観察するために、発現量が少ない low-copy plasmid である pRS314 を Dld3、Grs1 および Eno2 の発現用 plasmid として用いた。その結果、Dld3、Grs1 および Eno2 のそれぞれ単独発現時に見られた細胞内レベルは、Hrt3 または Ylr224w を同時に高発現させることによって減少した (Fig. 9)。この結果から、Dld3 および Grs1 は Hrt3 の、または Eno2 は Ylr224w の認識する基質であると考えられる。

3. Hrt3 または Ylr224w の基質認識特異性

ユビキチンリガーゼ E3 は基質認識特異性が高いことが知られている (Glickman et al., 2001)。したがって、Hrt3 が認識する基質と Ylr224w が認識する基質は異なると予想される。そこで逆の組み合わせである Hrt3 と Eno2、または Ylr224w と Dld3 および Grs1 との結合を免疫沈降-Western blotting 法で検討した。その結果、いずれの場合も細胞内での結合は確認できなかった (Fig. 10)。また、Hrt3 高発現が Eno2 の、または Ylr224w 高発現が Dld3 および Grs1 の細胞内レベルに与える影響も検討したが、Dld3、Grs1 および Eno2 のそれぞれ単独発現時に見られた細胞内レベルは Ylr224w または Hrt3 との同時高発現によってほとんど変動しなかった (Fig. 11)。したがって、Dld3 および Grs1 は Hrt3 によって、また、Eno2 は Ylr224w によって特異的に認識される基質であると考えられる。

4. Dld3、Grs1 および Eno2 高発現酵母のメチル水銀に対する感受性

メチル水銀毒性防御機構に関与する F-box 蛋白質である Hrt3 または Ylr224w の基質で

あることが判明した Dld3、Grs1 および Eno2 とメチル水銀毒性との関係を検討するために、これら蛋白質を高発現させた酵母を作製して、メチル水銀毒性に対する感受性を調べた。その結果、Dld3、Grs1 および Eno2 を高発現させた酵母はいずれも control 酵母に比べてメチル水銀毒性に対して高い感受性を示した (Fig. 12)。このことから、これら蛋白質はメチル水銀の毒性発現に関与し、ユビキチン・プロテアソームシステムでのこれら蛋白質の分解促進がメチル水銀毒性の軽減をもたらすものと考えられる。

5. Dld3、Grs1 および Eno2 のユビキチン化

Dld3、Grs1 および Eno2 がユビキチン・プロテアソームシステムで分解される可能性が示唆された。そこで、これら蛋白質の細胞内でのユビキチン化を検討した。Dld3、Grs1 および Eno2 に HA-tag を融合させた蛋白質を高発現する酵母の抽出液について抗 HA 抗体で免疫沈降を行った後に抗ユビキチン抗体、または抗 HA 抗体を用いた Western blotting によりそれぞれの蛋白質のユビキチン化を検出した。その結果、抗ユビキチン抗体、または抗 HA 抗体によっていずれの蛋白質も高分子量側にスメア状のバンド (様々な数のユビキチンが連結された蛋白質の存在による) が検出された (Fig. 13)。Dld3 および Grs1 は Hrt3 が、Eno2 は Ylr224w が特異的に認識する基質蛋白質であることから、プロテアソーム阻害剤である MG132 存在下において、Hrt3 または Ylr224w を高発現させた時、抗ユビキチン抗体を用いた Western blotting で検出される Dld3、Grs1 または Eno2 の量 (ユビキチン化蛋白質量) は増大するはずである。そこで、MG132 存在下における、Hrt3 または Ylr224w 高発現が Dld3、Grs1 または Eno2 のユビキチン化量に与える影響を検討したところ、Dld3 および Grs1 のそれぞれ単独発現時に見られたユビキチン化量は Hrt3 との同時高発現によって増大することが確認された (Fig. 14)。

[考 察]

Hrt3 または Ylr224w が認識する基質蛋白質を明らかにするために、yeast two-hybrid 法による検索を行い、Hrt3 と結合する蛋白質として Dld3 および Grs1 が、また、Ylr224w と結合する蛋白質として Eno2 はがそれぞれ同定された。これら蛋白質がいずれも細胞内でユビキチン化されることも確認され、Hrt3 または Ylr224w の基質蛋白質であることが明らかになった。Hrt3 および Ylr224w は共にこれまで F-box 蛋白質としての機能は検討されておらず、本知見は両 F-box 蛋白質の基質を明らかにした最初のものである。Dld3、Grs1 および Eno2 は共にメチル水銀毒性の増強に関与し、ユビキチン-プロテアソームシステムによる分解を受けることから、ユビキチンシステムの活性亢進は、これら蛋白質の分解を促進させ、その結果としてメチル水銀毒性を軽減するものと考えられる。

Dld3 は D-lactate dehydrogenase であり、D-lactose から pyruvate への変換反応に関与している (Chelstowska et al., 1999)。Grs1 は glycyl-tRNA synthetase であり tRNA に glycine を結合させる機能を担っている (Turner et al., 2000)。また、Eno2 は解糖系に関与する酵素である (McAlister et al., 1982)。解糖系は glucose の代謝経路であり、glucose は何段階かの反応を経て glycerate-2-phosphate となり、さらに、phospho-enol-pyruvate となった後に pyruvate へと代謝される (Fraenkel, 2003)。Eno2 は glycerate-2-phosphate から phospho-enol-pyruvate への変換に関わる酵素である。

Eno2 は glucose が pyruvate に代謝される途中段階に関わり、Dld3 は D-lactose の pyruvate への変換に関与する酵素であることから、どちらも高発現すると細胞内の pyruvate 生成が増加すると考えられる。したがって、細胞内での pyruvate 生成の増加がメチル水銀毒性を増強する可能性が考えられる。

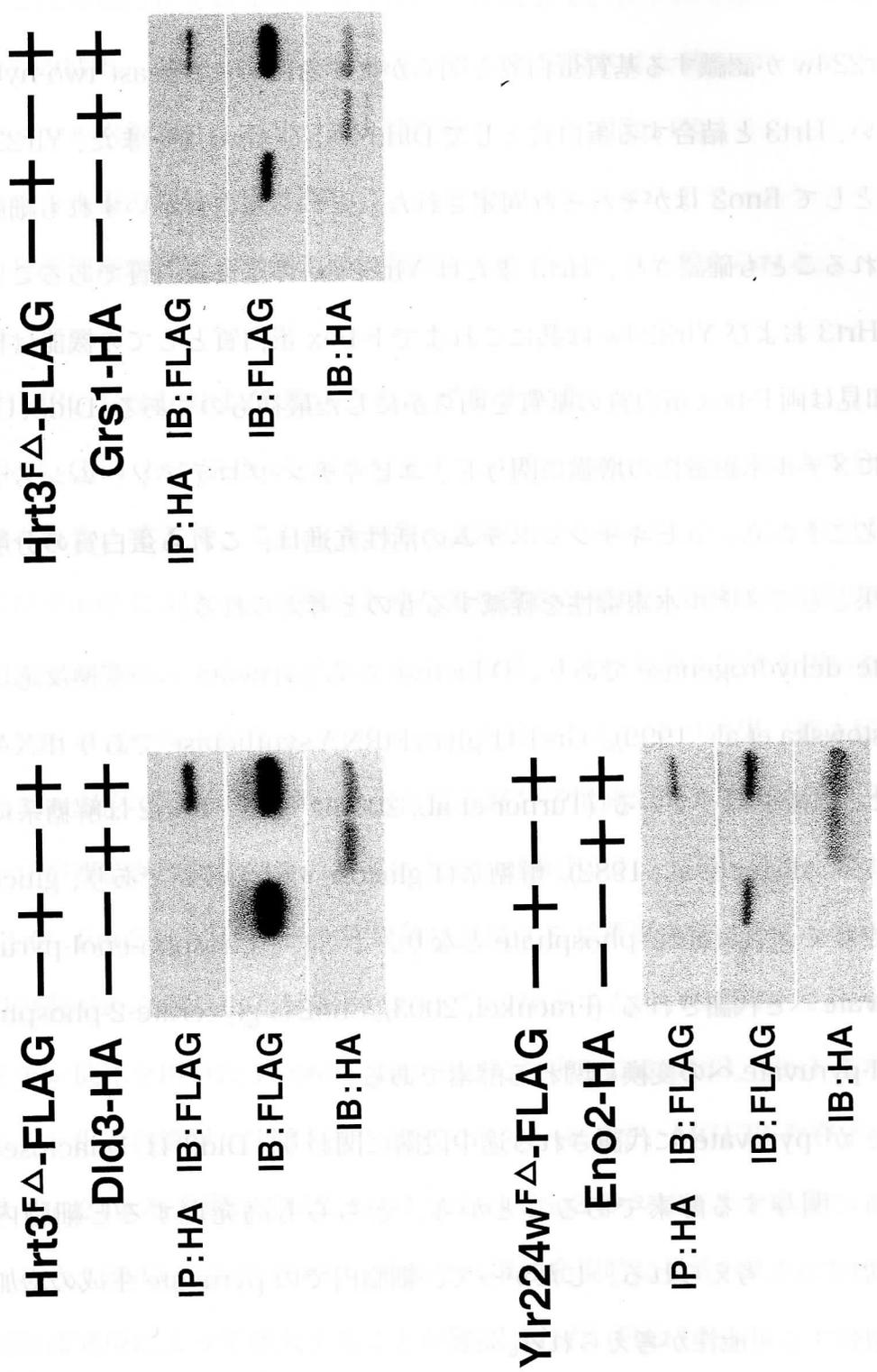


Figure 8. Hrt3とDld3およびGrs1、またはYlr224wとEno2との結合

Dld3、Grs1およびEno2にHA-tagを融合させた蛋白質とHrt3およびYlr224wにFLAG-tagを融合させた蛋白質を
 高発現させた酵母の抽出液について抗HA抗体で免疫沈降を行った後に抗FLAG抗体を用いたWestern
 blottingで細胞内のHrt3とDld3またはGrs1およびYlr224wとEno2との結合を確認した。

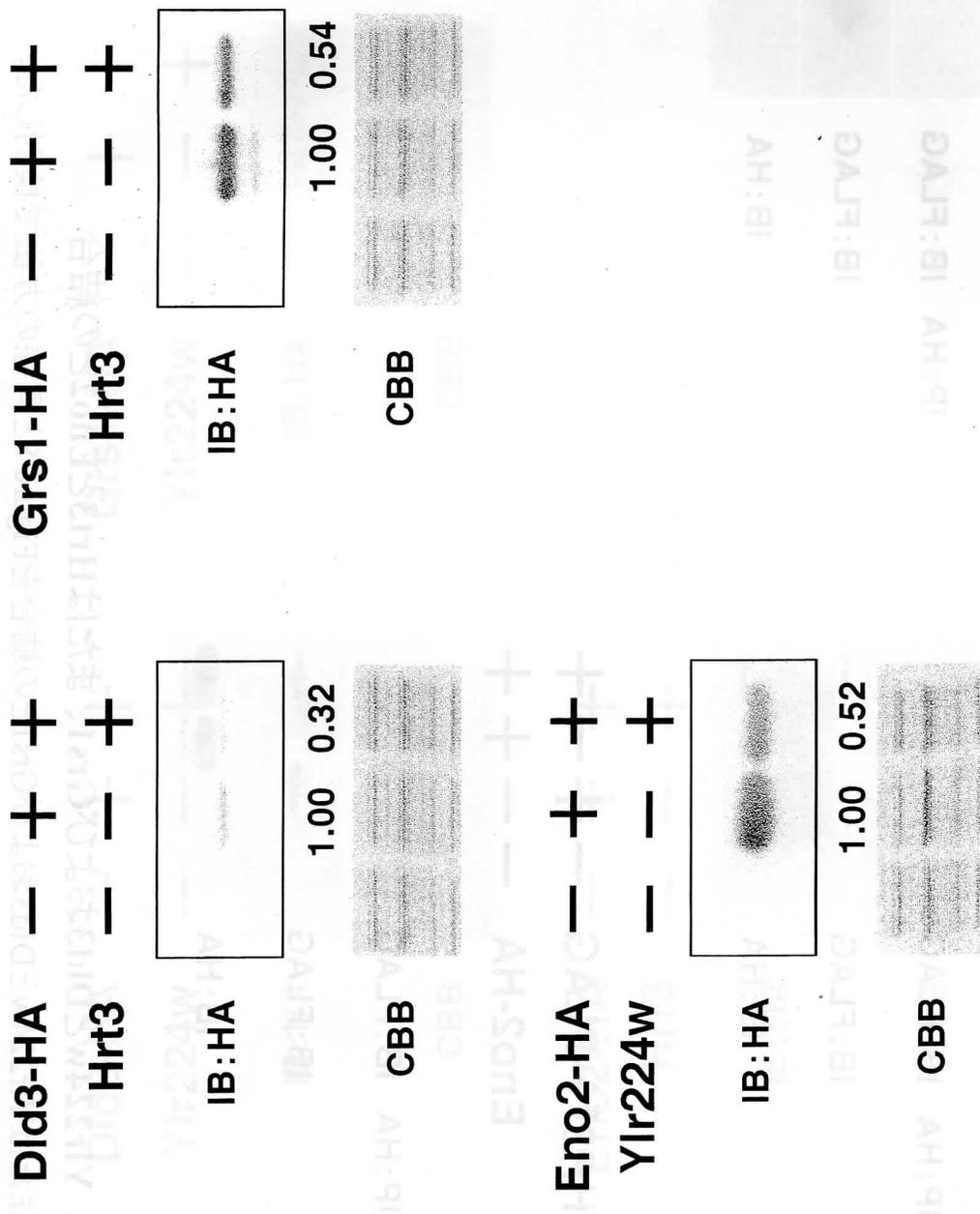


Figure 9. F-box protein overexpression in Dld3, Grs1, and Eno2 strains. The figure shows Western blot analysis of F-box protein overexpression in Dld3, Grs1, and Eno2 strains. The figure is divided into three main sections. The top section shows Dld3-HA and Grs1-HA strains, with Hrt3 as a control. The middle section shows Eno2-HA and Ylr224w strains, with Ylr224w as a control. Each section includes an IB:HA panel with a boxed region and a CBB panel. Quantification values are provided for the IB:HA bands: 1.00 and 0.32 for Dld3-HA, 1.00 and 0.54 for Grs1-HA, 1.00 and 0.52 for Eno2-HA, and 1.00 and 0.52 for Ylr224w. The '+' and '-' signs indicate the presence or absence of the respective protein in each lane.

Dld3, Grs1, and Eno2 strains were fused with HA-tagged protein and Hrt3 or Ylr224w. The overexpression of the protein was detected by Western blotting with anti-HA antibody. The figure shows Western blot analysis of F-box protein overexpression in Dld3, Grs1, and Eno2 strains. The figure is divided into three main sections. The top section shows Dld3-HA and Grs1-HA strains, with Hrt3 as a control. The middle section shows Eno2-HA and Ylr224w strains, with Ylr224w as a control. Each section includes an IB:HA panel with a boxed region and a CBB panel. Quantification values are provided for the IB:HA bands: 1.00 and 0.32 for Dld3-HA, 1.00 and 0.54 for Grs1-HA, 1.00 and 0.52 for Eno2-HA, and 1.00 and 0.52 for Ylr224w. The '+' and '-' signs indicate the presence or absence of the respective protein in each lane.

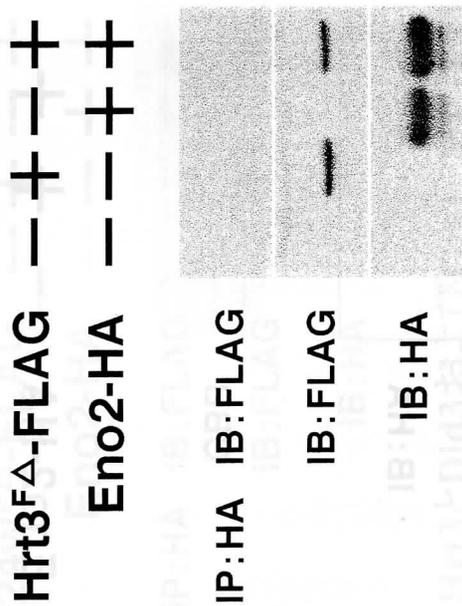
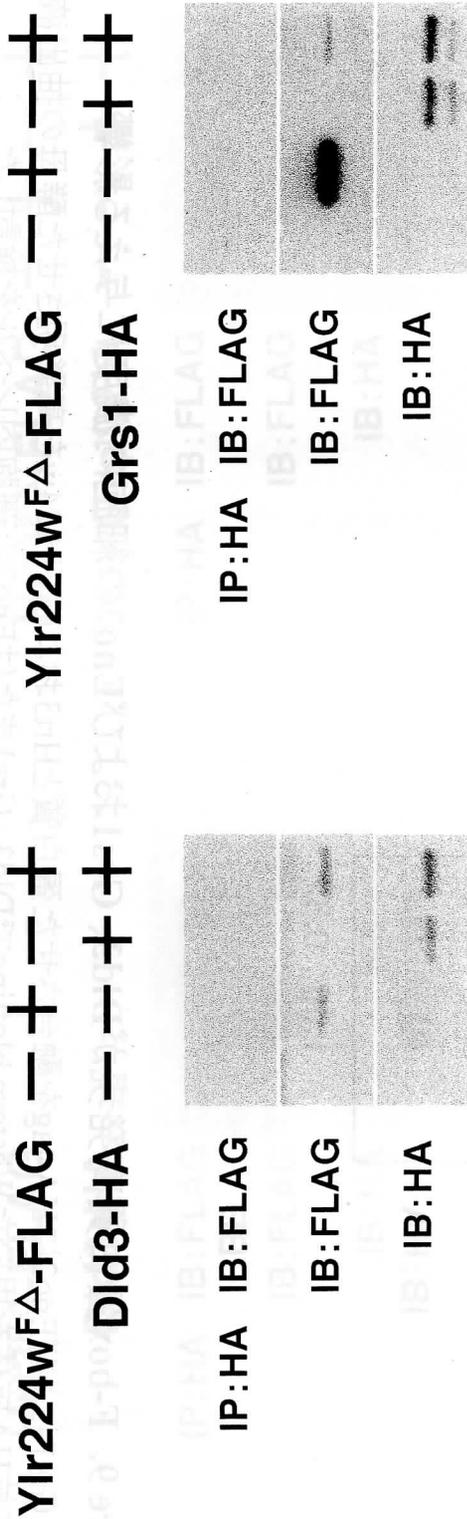


Figure 10. Ylr224wとDid3およびGrs1、またはHrt3とEno2との結合

Hrt3とEno2またはYlr224wとDid3およびGrs1との結合をFigure 8と同様の方法で検討した。

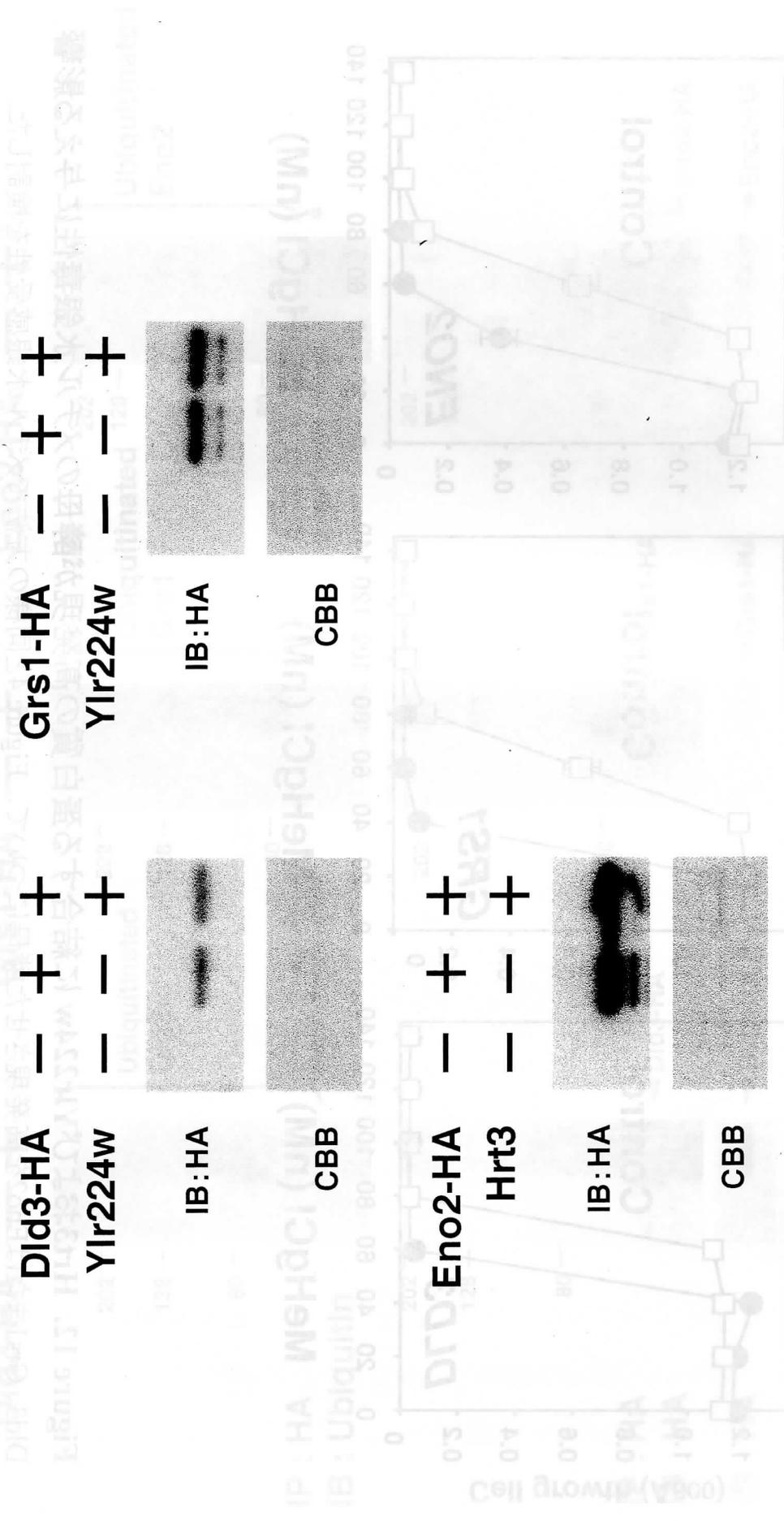


Figure 11. F-box 蛋白質高発現がDid3、Grs1およびEno2の細胞内濃度に与える影響

Hrt3高発現がEno2の、またはYlr224w高発現がDid3およびGrs1の細胞内レベルに与える影響をFigure 9と同様の方法で検討した。

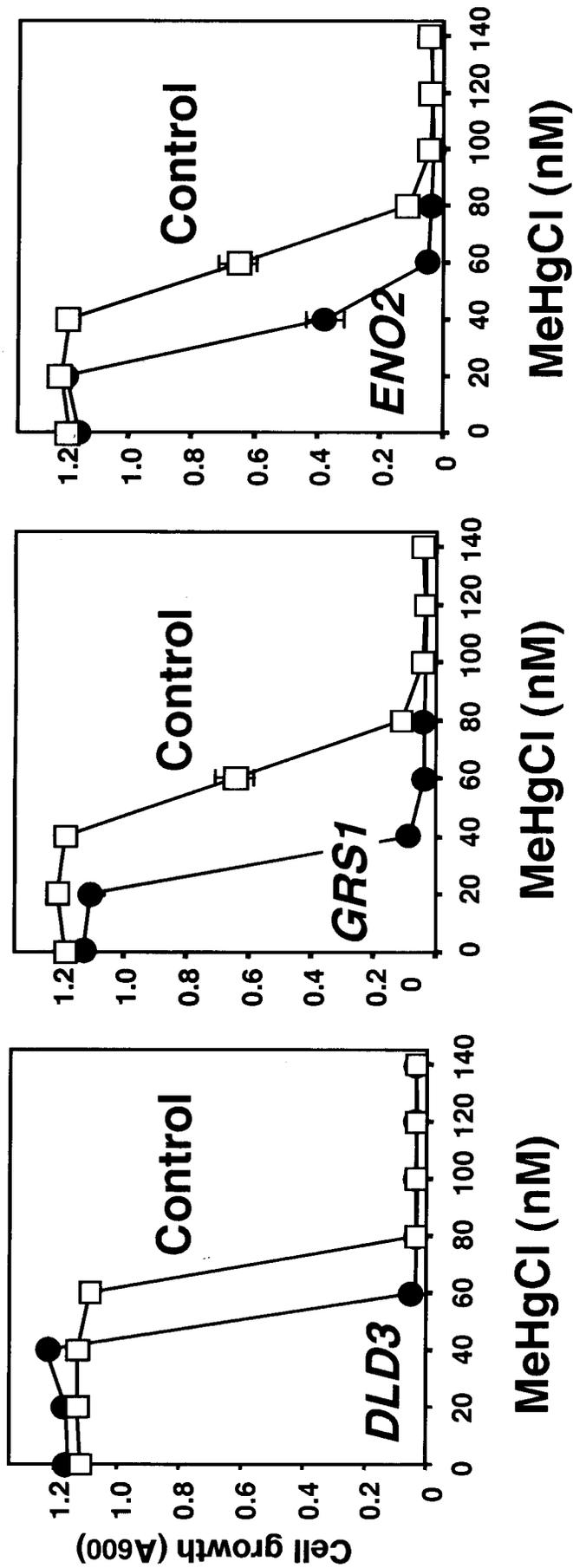


Figure 12. Hrt3およびYlr224w に結合する蛋白質の高発現が酵母のメチル水銀毒性に与える影響 Dld3、Grs1またはEno2を高発現させた酵母について、Figure 4と同様の方法でメチル水銀感受性を検討した。

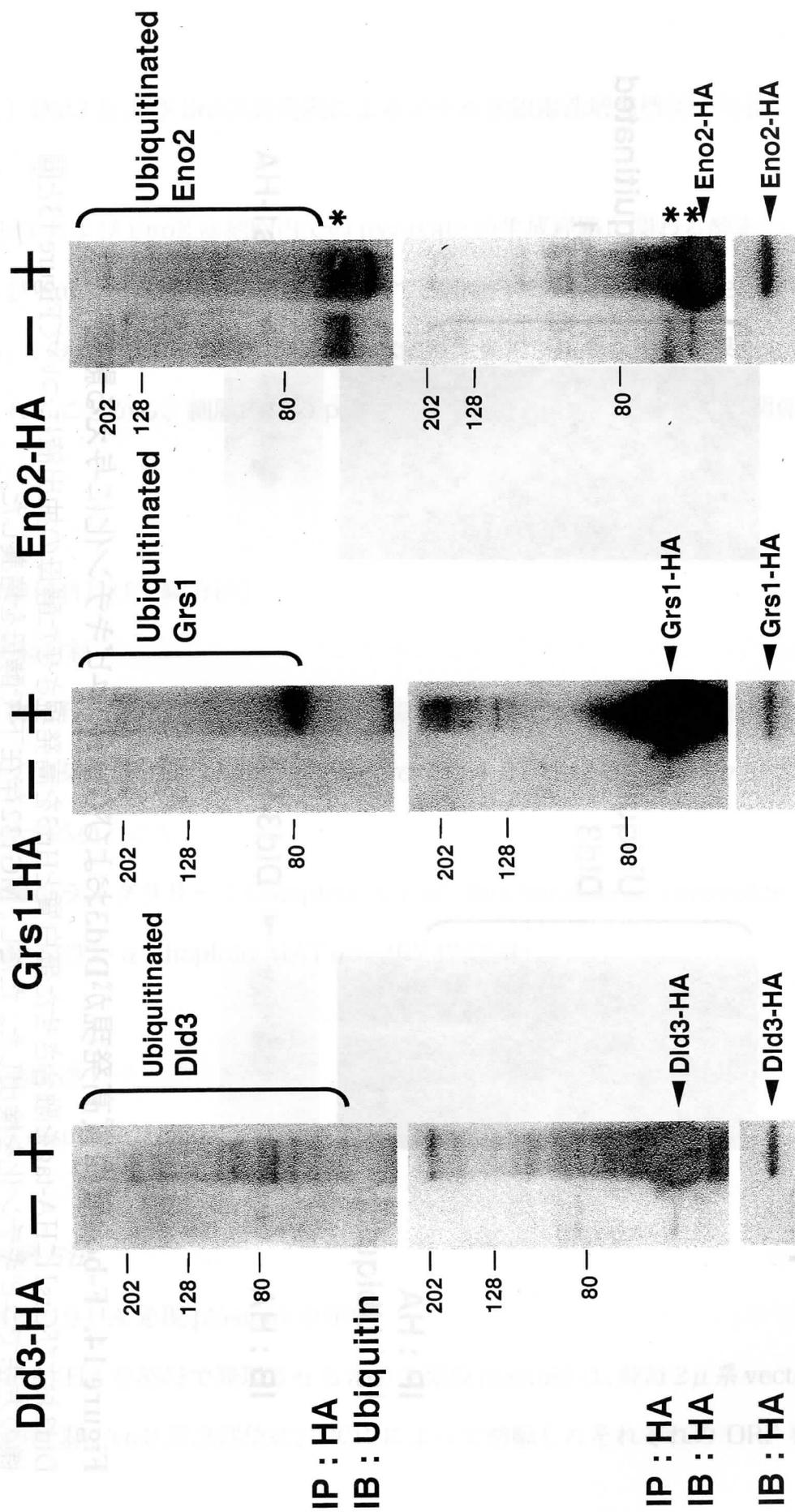


Figure 13. Dld3、Grs1およびEno2のユビキチン化

Dld3、Grs1およびEno2にHA-tagを融合させた蛋白高発現酵母の抽出液について抗HA抗体で免疫沈降を行った後に抗ユビキチン抗体を用いたWestern blottingによりそれぞれの蛋白質のユビキチン化を検出した。

* : 非特異的なバンド

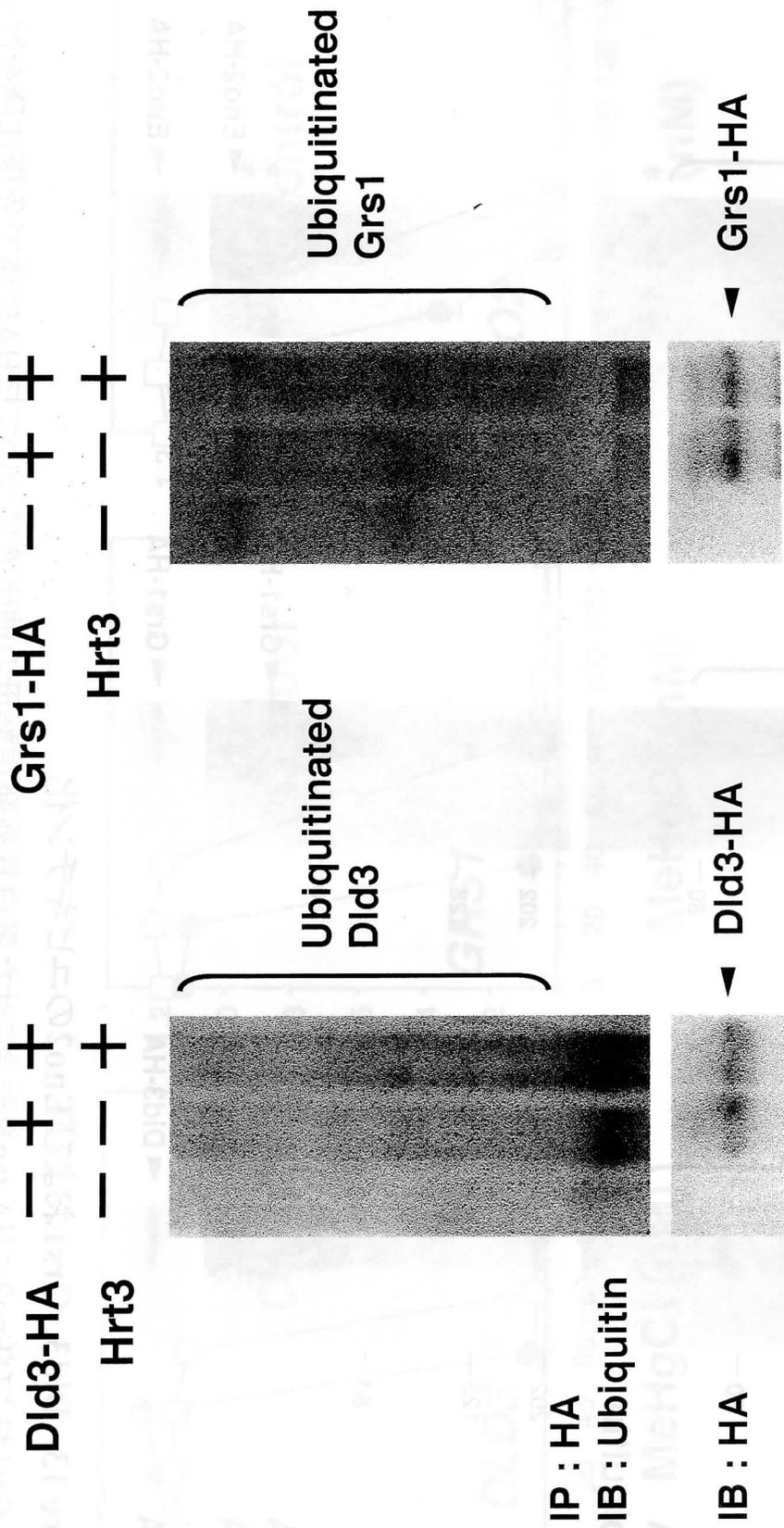


Figure 14. F-box蛋白質高発現がDid3およびGrs1のユビキチン化に与える影響

Did3およびGrs1にHA-tagを融合させた蛋白質とHrt3を高発現させた酵母の抽出液についてFigure 13と同様の方法でユビキチン化を検出した。ただし、MG132存在下で酵母を培養した。

(2) Dld3 および Eno2 高発現によるメチル水銀毒性増強機構の解析

[目的]

Dld3 および Eno2 は細胞内での pyruvate の生成経路に関わる酵素の一つであり、Dld3 および Eno2 を高発現することによって、細胞内での pyruvate の生成が増加すると考えられる。この pyruvate の増加がメチル水銀毒性発現に重要な役割を果たしている可能性が考えられることから、細胞内での pyruvate 生成とメチル水銀毒性との関係を検討した。

[実験材料及び実験方法]

1. 実験材料

・生物材料

酵母：出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) BY4742 株 (*MAT α his3 Δ 1 leu2 Δ 0 lys2 Δ 0ura3 Δ 0*)

欠損酵母ライブラリー：Complete set of *Saccharomyces cerevisiae* deletion strains: COMP-SET1 $\cdot\alpha$ (haploid MAT α) (BY4742 株)

・試薬関連

G418 disulfate : Nacalai

2. 実験方法

2-1 Cdc19-HA 発現 plasmid の作製

Cdc19-HA を酵母で発現させるための発現 plasmid は、酵母 2 μ 系 vector pKT10 (*TRP1*) の制限酵素 *Pvu*II 認識部位に、PCR によって増幅したそれぞれの ORF を挿入する方法で

作成した。PCR は以下に示す primer を用いて行った。塩基配列は sequence により確認した。発現は酵母株に導入後、抗 HA 抗体を用いた Western blotting で確認した。

Cdc19-HA 発現 vector 作成用 Primer

yCDC19-HA

Sense: 5'-GACACCAATCAAAACAAATAAAACATC-3'

Antisense: 5'-TTTTTAAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTAAACGGTAG
AGACTTGCAAAG-3'

2-2 ρ^0 細胞の作製

酵母 BY4742 株を $10\mu\text{g}/\mu\text{L}$ EtBr を含む 2mL SD 培地で 1 晩、アルミ箔で遮光しながら 30°C で振とう培養し、その培養液 $10\mu\text{L}$ を新たな $10\mu\text{g}/\mu\text{L}$ EtBr を含む 2mL SD 培地に植菌し、再度 1 晩培養した。この培養液 $10\mu\text{L}$ を、YPAD 寒天培地に塗布し、2 晩、 30°C で静置培養し、形成されたコロニーを、それぞれグルコースを含む YPAD 寒天培地とグルコースでなくグリセロールを含む寒天培地 (YPAG) に塗布し、グルコースを含む YPAD 寒天培地では生育できるが、グリセロールを含む YPAG 寒天培地では生育できないものを ρ^0 細胞とする。

2-3 Colony 形成を指標とした耐性試験

空ベクター pKT10 のみを導入した株、もしくは何らかの蛋白質をコードする遺伝子を組み込んだ pKT10 を導入した株、それぞれの株を SD 培地 2 mL に植菌し 30°C で一晩振盪培養した後、 1×10^6 cells を SD 培地 $920\mu\text{L}$ に植菌した後、滅菌水または $10\mu\text{M}$ のメチル水銀を $80\mu\text{L}$ 加えた (final : 0、800 nM となる)。 30°C で 3hr 静置培養した後、超音波処

理し、200 μ Lを YPAD 寒天培地に塗布し、30°Cで培養した後、顕微鏡で colony 形成の有無を観察した。

[結果]

1. Pyruvate 代謝に関わる酵素とメチル水銀毒性との関係

解糖系は glucose の代謝経路であり、glucose は何段階かの反応を経て glycerate-2-phosphate となり、Eno1 および Eno2 により phospho-enol-pyruvate となる。この phospho-enol-pyruvate はさらに、Cdc19 によって pyruvate に変換される (Fraenkel, 2003)。そこで、この Eno2 の下流の酵素である Cdc19 の高発現が酵母のメチル水銀感受性に与える影響を検討した。その結果、Cdc19 高発現酵母もメチル水銀に対して高い感受性を示すことが判明した (Fig. 15)。

解糖系によって glucose より生成された pyruvate は、ミトコンドリアの膜に存在するトランスポーターを介してミトコンドリアへ運ばれ、クエン酸回路で代謝されるが、そのトランスポーターとして Yil006w が同定されている (Hildyard et al., 2003)。そこで、pyruvate のミトコンドリアへの運搬とメチル水銀毒性との関係を検討するために、*yil006w* 欠損酵母のメチル水銀毒性に対する感受性を検討したところ、この欠損酵母はメチル水銀に対して耐性を示した (Fig. 16)。これらの結果より、ミトコンドリアの中により多くの pyruvate が流入することによってメチル水銀毒性発現が増強される可能性が考えられる。

2. ρ^0 細胞のメチル水銀に対する感受性

ミトコンドリアの中により多くの pyruvate が流入することがメチル水銀毒性が増強さ

れる可能性が考えられたので、ミトコンドリアの機能が欠失した酵母はメチル水銀毒性に対して耐性を示すと考えられる。 ρ^0 細胞はミトコンドリア機能を欠失した酵母であり、呼吸鎖が存在しないために、エネルギー供給を完全に解糖系に依存する酵母である (Goldring et al., 1970)。そこで、 ρ^0 細胞のメチル水銀毒性に対する感受性を検討したところ、 ρ^0 細胞はメチル水銀に対して耐性を示した (Fig. 17)。この結果は、ミトコンドリア中での pyruvate 利用がメチル水銀毒性の発現に重要な役割を果たしていることを示唆している。

[考 察]

Pyruvate 合成に関わる Cdc19 を高発現させた酵母は Eno2 および Dld3 同様、メチル水銀に対して高感受性を示し、pyruvate のミトコンドリアへの流入に重要なトランスポーターである Yil006w の欠損酵母およびミトコンドリア機能が欠失した ρ^0 細胞は共にメチル水銀に対して耐性を示した。細胞内で生成された pyruvate はミトコンドリアへ運搬される以外にアルコール発酵にも使われ、ethanol となる。しかし、アルコール発酵の最初のステップに関与する Pdc1 または Pdc5 をコードする遺伝子の欠損酵母は共にメチル水銀に対して高感受性を示した (data not shown)。これらの結果は全て、ミトコンドリア中への pyruvate 流入の促進がメチル水銀毒性の増強を引き起こすことを示唆している。哺乳動物細胞をメチル水銀で処理すると、細胞内の活性酸素濃度が増加するとの報告がある (Usuki et al., 1998)。ミトコンドリアに運搬された pyruvate は呼吸代謝によるエネルギー産生に使われるが、それに伴って活性酸素種も生成されることから、Eno2、Cdc19 および Dld3 高発現によるメチル水銀毒性増強機構にはミトコンドリア呼吸代謝を介した活性酸素種の生成増加が関与している可能性も考えられる。

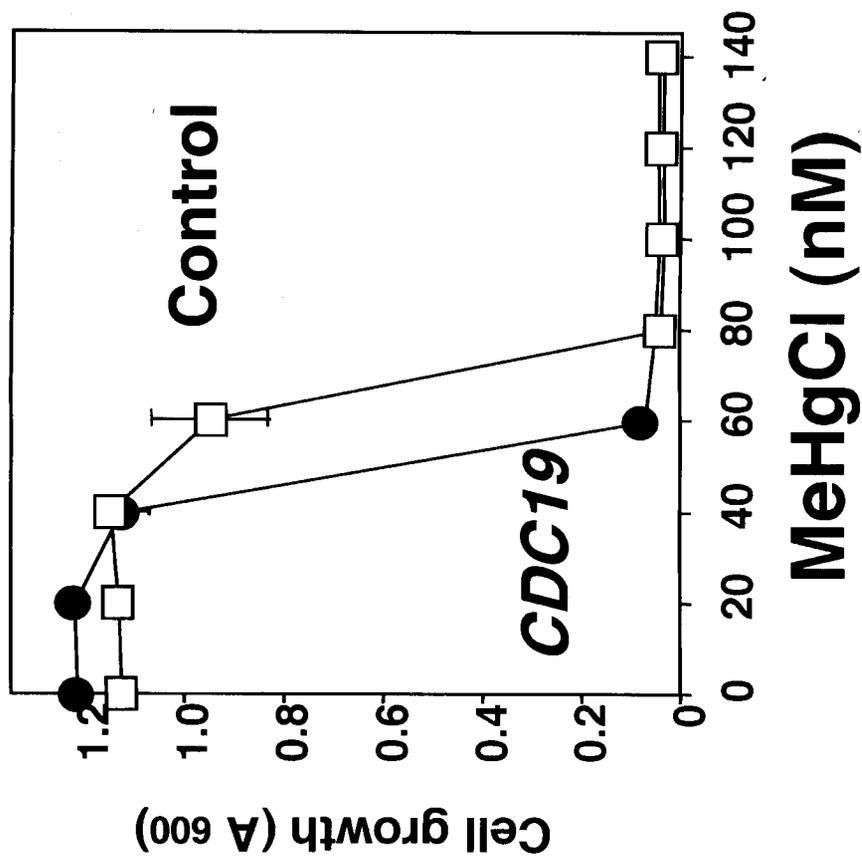
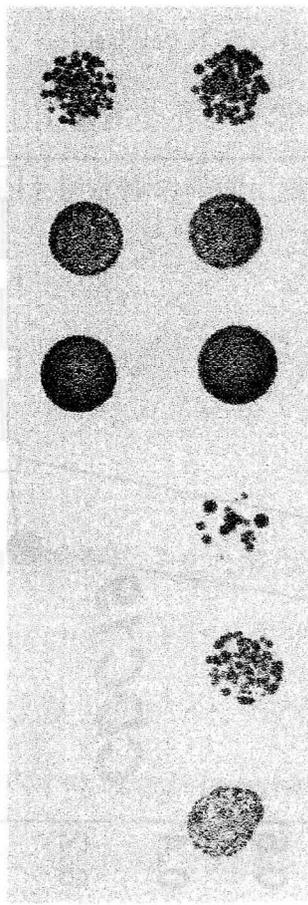


Figure 15. Cdc19高発現がメチル水銀毒性に与える影響

Cdc19を高発現させた酵母について、Figure 4と同様の方法でメチル水銀感受性を検討した。

5x10⁴ 5x10³ 5x10² 5x10¹

Cell number



Wild type

*yil006w*Δ

MeHgCl

Figure 16. *yil006w*遺伝子欠損がメチル水銀毒性に与える影響
*yil006w*遺伝子欠損酵母について、Figure 3と同様の方法でメチル水銀感受性を検討した。

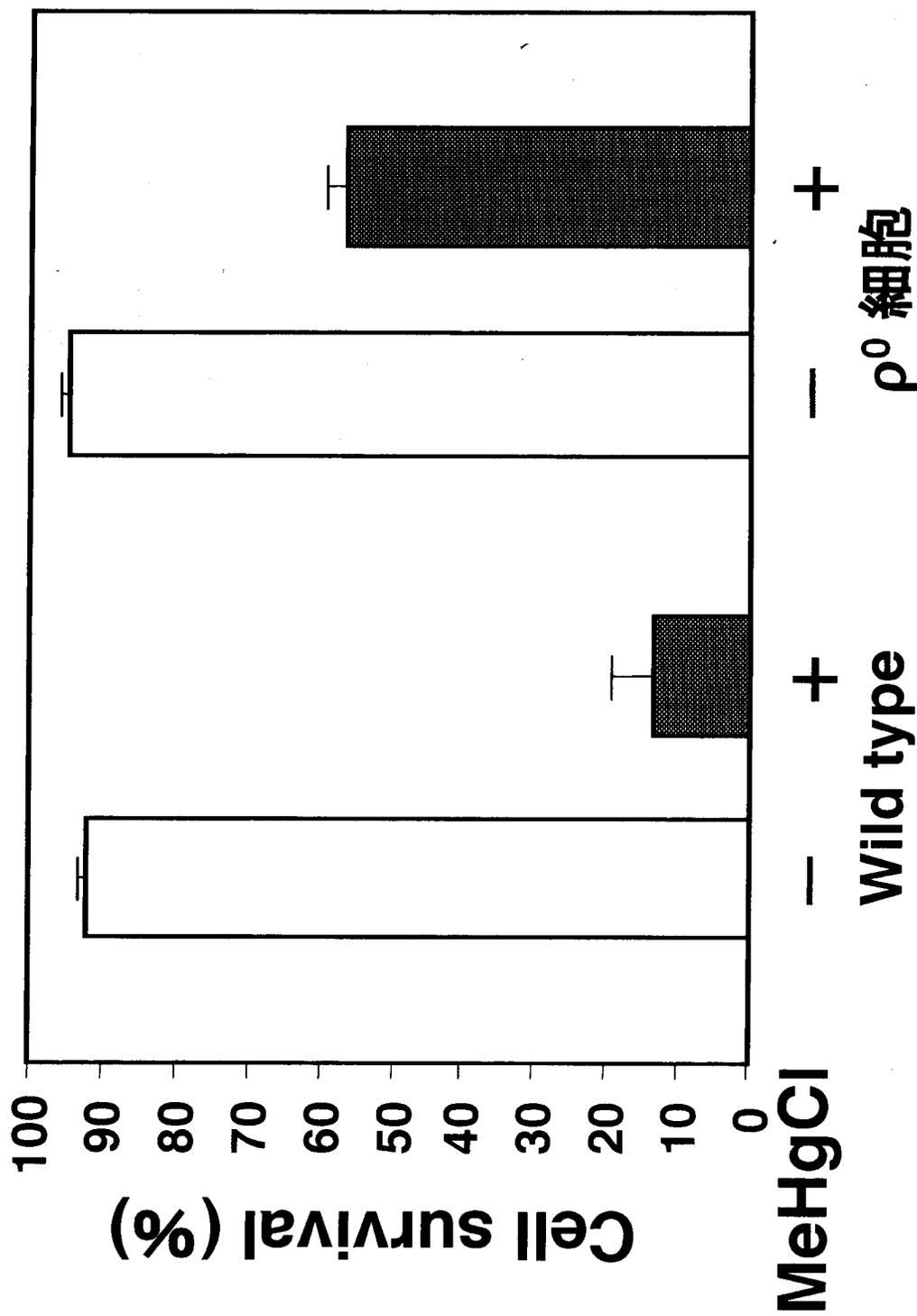


Figure 17. ミトコンドリア欠損がメチル水銀毒性に与える影響

1×10⁶cells/mLのp⁰細胞に滅菌水またはfinal 800nMとなるようなメチル水銀を加え、30°Cで3hr静置培養した後、YPAD plateに蒔き、30°Cで培養後、顕微鏡にてcolony形成を観察した。

(4) まとめ

メチル水銀はヒトに重篤な中枢神経障害を引き起こすことが知られているが、毒性発現機構およびそれに対する生体の防御機構は未だ解明されていない。本研究では、まず、酵母にメチル水銀耐性を与える F-box 蛋白質を検索し、高発現によって強いメチル水銀耐性を与える主な F-box 蛋白質として Hrt3 および Ylr224w を同定した。Hrt3 または Ylr224w の高発現によるメチル水銀耐性獲得には E3 複合体の形成が必要であることから、Hrt3 または Ylr224w を高発現させると、これら F-box 蛋白質の認識する蛋白質のユビキチン化が亢進し、それら蛋白質のプロテアソームにおける分解が促進されることによってメチル水銀毒性が軽減されるものと考えられる。

この Hrt3 または Ylr224w によって認識される基質の中に、メチル水銀毒性発現に関与する蛋白質が含まれている可能性が高い。そこで、Hrt3 または Ylr224w が認識する基質蛋白質を明らかにするために、yeast two-hybrid 法での検索を行い、Hrt3 により認識される蛋白質として Dld3 および Grs1 が、また、Ylr224w が認識する蛋白質として Eno2 が同定された。Dld3 は D-lactate dehydrogenase であり、D-lactose から pyruvate への変換反応に関与している。Grs1 は glycyl-tRNA synthetase であり tRNA に glycine を結合させる機能を担っている。Eno2 は enolase であり解糖系に関与する酵素である。これら三種の蛋白質を高発現させた酵母はどれもメチル水銀に対して高い感受性を示し、また、いずれの蛋白質も細胞内でユビキチン化された後にプロテアソームで分解される可能性が示唆された。Dld3 および Eno2 が高発現すると、細胞内での pyruvate の生成が増加すると考えられるので、この増加がメチル水銀毒性発現に重要である可能性が考えられる。解糖系における Eno2 の下流の酵素である Cdc19 を高発現させた酵母もメチル水銀に対して高感受性を示し、さらに、ミトコンドリア膜に存在する pyruvate トランスポーター Yil006w の欠損酵母とミトコンドリア機能を欠失した ρ^0 細胞はいずれの酵母もメチル水銀に対し

て耐性を示した。この結果は、ミトコンドリアへの pyruvate の流入促進がメチル水銀毒性の増強を引き起こすことを示唆している。ミトコンドリアでの pyruvate の代謝によって、エネルギーが産生されるが、同時に活性酸素種も生成される。ミトコンドリアでより多くの pyruvate が代謝されれば、細胞内の活性酸素種の生成量も多くなると考えられ、過剰な活性酸素種の生成はアポトーシスに繋がるとも考えられる。

本研究によって酵母のメチル水銀毒性防御機構に関与する F-box 蛋白質として、Hrt3 および Ylr224w が初めて同定された。F-box 蛋白質は哺乳動物細胞では 100 種以上存在するとも言われており、哺乳動物細胞において Hrt3 および Ylr224w の homologue を同定するのは難しいかもしれない。しかし本研究によって同定されたこれら F-box 蛋白質が認識する基質のうち、Eno2 および Grs1 は哺乳動物細胞においても homologue が存在する。神経細胞特異的に発現する enolase が存在することや、Grs1 の homologue である Gars は神経細胞でも発現しているため、脳に蓄積したメチル水銀は、今回酵母で示された同様の機構で神経細胞を傷害し、中枢神経障害を発症させる可能性も考えられる。

[引用文献]

Bai C., Sen P., Hofmann K., Ma L., Goebel M., Harper JW. and Elledge SJ. (1996). SKP1 connects cell cycle regulators to the ubiquitin proteolysis machinery through a novel motif, the F-box. *Cell*, 86, 263-274

Castoldi AF, Coccini T, Manzo L. Neurotoxic and molecular effects of methylmercury in humans. *Rev Environ Health*. 2003 Jan-Mar;18(1):19-31.

Chelstowska A, Liu Z, Jia Y, Amberg D, Butow RA. Signalling between mitochondria and the nucleus regulates the expression of a new D-lactate dehydrogenase activity in yeast. *Yeast*. 1999 Sep 30;15(13):1377-91.

Feldman RMR., Correll CC., Kaplan KB. and Deshaies RJ. (1997). A complex of Cdc4p, Skp1p, and Cdc53p/cullin catalyzes ubiquitination of the phosphorylated CDK inhibitor Sic1p. *Cell*, 91, 221-230

Fraenkel DG. The top genes: on the distance from transcript to function in yeast glycolysis. *Curr Opin Microbiol*. 2003 Apr;6(2):198-201.

Furuchi T, Hwang GW, Naganuma A. Overexpression of the ubiquitin-conjugating enzyme Cdc34 confers resistance to methylmercury in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Pharmacol*. 2002 Apr;61(4):738-741.

Gietz D, St Jean A, Woods RA, Schiestl RH. Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acids Res*. 1992 Mar;20(6):1425.

Goebel MG., Yochem J., Jentsch S., McGrath JP., Varshavsky A. and Byers B. (1988). The yeast cell cycle gene CDC34 encodes a ubiquitin-conjugating enzyme. *Science*. 9;241(4871):1331-1335.

Goldring ES, Grossman LI, Krupnick D, Cryer DR, Marmur J. The petite mutation in

yeast. Loss of mitochondrial deoxyribonucleic acid during induction of petites with ethidium bromide. *J Mol Biol.* 1970 Sep 14;52(2):323-35.

Glickman MH, Ciechanover A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev.* 2002 Apr;82(2):373-428.

Hanahan D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol.* 1983 Jun;166(4):557-580.

Hershko A. and Ciechanover A. (1998). The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem.* 67, 425-479.

Hildyard JC, Halestrap AP. Identification of the mitochondrial pyruvate carrier in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J.* 2003 Sep 15;374(Pt 3):607-11.

Hoffman CS. (1993). Preparation of yeast DNA, RNA, and proteins. In *Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel FM., Brent Kingston RE., Moor D., Seidman J G., Smith JA. and Struhl K., eds. (New York, John Wiley & Sons, Inc.), pp. 13.11-13.12

Hwang GW, Furuchi T, Naganuma A. A ubiquitin-proteasome system is responsible for the protection of yeast and human cells against methylmercury. *FASEB J.* 2002 May;16(7):709-711.

Kipreos ET, Pagano M. The F-box protein family. *Genome Biol.* 2000;1(5):REVIEWS3002. Epub 2000 Nov 10.

McAlister L, Holland MJ. Targeted deletion of a yeast enolase structural gene. Identification and isolation of yeast enolase isozymes. *J Biol Chem.* 1982 Jun 25;257(12):7181-8.

Miura N, Kaneko S, Hosoya S, Furuchi T, Miura K, Kuge S, Naganuma A. Overexpression of L-glutamine:D-fructose-6-phosphate amidotransferase provides resistance to methylmercury in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 1999 Sep 17;458(2):215-8

Patton EE, Willems AR, Tyers M. Combinatorial control in ubiquitin-dependent proteolysis: don't Skp the F-box hypothesis. *Trends Genet.* 1998 Jun;14(6):236-43.

Pickart CM. Ubiquitin enters the new millennium. *Mol Cell.* 2001 Sep;8(3):499-504.

Sanfeliu C, Sebastia J, Cristofol R, Rodriguez-Farre E. Neurotoxicity of organomercurial compounds. *Neurotox Res.* 2003;5(4):283-305.

Schmitt ME, Brown TA, Trumpower BL. A rapid and simple method for preparation of RNA from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* 1990 May;18(10):3091-2.

Skowrya D., Craig KL., Tyers M., Elledge SJ. and Harper JW. (1997). F-Box proteins are receptors that recruit phosphorylated substrates to the SCF ubiquitin-ligase complex. *Cell*, **91**, 209-219

Turner RJ, Lovato M, Schimmel P. One of two genes encoding glycyl-tRNA synthetase in *Saccharomyces cerevisiae* provides mitochondrial and cytoplasmic functions. *J Biol Chem*. 2000 Sep 8;275(36):27681-8.

Usuki F, Ishiura S. Expanded CTG repeats in myotonin protein kinase increase susceptibility to oxidative stress.

Neuroreport. 1998 Jul 13;9(10):2291-6.

メチル水銀毒性に影響を与えるユビキチン・プロテアソームシステム関連蛋白質の検索とその作用機構解析

我々は酵母を用いた検討によって、メチル水銀による細胞毒性 (1-3) がユビキチン・プロテアソームシステムによって軽減され、本システム活性の亢進した酵母がメチル水銀耐性を示すことを明らかにしている(4,5)。ユビキチン・プロテアソームシステムは、ある種の蛋白質の分解に関与する細胞内機能の一つである(6,7)。このシステムでは、ユビキチン活性化酵素(E1)、ユビキチン転移酵素(E2)、ユビキチンリガーゼ(E3)の連続した働きによって細胞内で分解される蛋白質に、まずユビキチンを連結させる。このユビキチン鎖が分解シグナルとして働き、26S プロテアソームに認識されることによって蛋白質分解が生じる。このユビキチン・プロテアソームシステムにおいてはユビキチン鎖の形成が重要で、ユビキチン鎖形成が促進されれば分解もそれに伴い増加し、ユビキチン鎖の形成が阻害されれば分解も起こらないことが知られている。ユビキチン・プロテアソームシステムは提唱されてから十数年と新しく、未知の部分が未だ多い機構であるが、関連因子の同定を始めとして、酵母からヒトに至るまで、多種多様な研究が成されている。酵母では、ユビキチン活性化酵素は1種類しか存在しないが、ユビキチン転移酵素は13種、ユビキチンリガーゼに至っては数十種が同定され、さらにこれら酵素にはそれぞれ基質特異性が存在することが示されつつある。つまり、それぞれの蛋白質の分解を担当する酵素が存在し、細胞内の状態に応じて分解の必要な蛋白質のみを分解することが可能な、複雑ではあるが合理的な機構が細胞内に存在する(8)。本研究では出芽酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)を用いて、この複雑なユビキチン・プロテアソームシステムに関与することが知られている因子群の中からメチル水銀感受性に影響を与える因子を検索し、その作用機構を明らかにすることによって、メチル水銀毒性軽減機構としての、ユビキチン・プロテアソームシステムの役

割の解明を目指した。

(1) 実験材料および実験方法

1. 実験材料

・生物材料

酵母：出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) W303B 株 (*MAT α his3 can1-100 ade2 leu2 trp1 ura3*)

大腸菌：XL1-blue 株

Vector：pKT10 (2μ m 系 high-copy vector) 下記の2種類を用いた。

pKT10(URA3)：Uracil を栄養選択マーカーとして用いる。

pKT10(TRP1)：Tryptophan を栄養選択マーカーとして用いる。

*特に記載の無い場合は pKT10(URA3)を用いているものとする。

Western blotting 関連抗体

Anti-HA High Affinity：Roche

Anti-FLAG antibody：Sigma

Anti-ubiquitin (polyclonal)：Sigma

Anti-ubiquitin (monoclonal)：Medical and biological laboratories

Horseradish peroxidase conjugated anti-mouse IgG：Daco cytometry

Horseradish peroxidase conjugated anti-rabbit IgG：Daco cytometry

Horseradish peroxidase conjugated anti-rat IgG：Dako cytometry

Monoclonal anti-HA agarose conjugate : Sigma

制限酵素 : New England Biolabs のものを用いた

DNA polymerase : Takara *Ex Taq*、*Pyrobest* DNA polymerase

逆転写酵素 : M-MLV reverse transcriptase (Invierogen)

・キット類

DNA ligation kit ver.2 : Takara

ECL reagent : Amersham Pharmacia Biotech

GeneClean II kit : Takara

Mutation kit : QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene)

Plasmid purification : GenElute™ Plasmid Miniprep Kit (Sigma)

Protein assay kit : Bio-Rad

Sequence kit : CEQ2000 Dye Terminator Cycle Sequencing with Quick Start Kit
(Beckman)

定量 PCR kit : iQ™ SYBR Green supermix (Bio-Rad)

・試薬関連

Acrylamide-HG : Wako

Agarose : Nacalai

Ampicilin sodium salt : Nacalai

Ammonium persulfate : Life Technologies

Bromophenol blue : Wako
Cycloheximide : Wako
D-(+)-glucose : Nacalai
Dithiothreitol(DTT) : Invitrogen
10mM dNTP Mix, PCR grade : Invitrogen
Ethanol : Nacalai
Ethylendiamine-N,N,N',N'-tetraacetic acid(EDTA) : Wako
Glass beads : Sigma
Glycine : Wako
Glycerol : Wako
Lithium acetate : Nacalai
Magnesium chloride hexahydrate($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) : Nacalai
2-Mercaptoethanol : Nacalai
N-N'-Methylenebis-acrylamide : Wako
Methylmercury chloride : Wako
Oligo(dT)₁₂₋₁₈ Primer : Invitrogen
Phenol : Nacalai
Polyethylene glycol : Nacalai
Polyoxyethylene sorbitan monolaurate (Tween20) : Nacalai
Potassium chloride : Nacalai
Rnase H : Invitrogen
Skim milk : 雪印乳業
Sodium chloride : Nacalai

Sodium lauryl sulfate (SDS) : Nacalai

Ethylendiamine-N,N,N',N'-tetraacetic acid (TEMED) : Wako

Tris(hydroxymethyl)aminomethane : Nacalai

10×Tris-buffered saline : Bio-Rad

・ Buffer 関連

Yeast extract-peptone-dextrose (YPD) 培地 : 1% Bacto-yeast extract, 2% Bacto-peptone, 2% glucose, 40 mg/mL adenine

Synthetic dextrose (SD) 培地 : 0.67% yeast nitrogen base, 2% glucose, 40 mg/mL adenine, 20 mg/mL histidine, 60 mg/mL leucine, 40 mg/mL tryptophan, 20 mg/mL uracil, 1.3 g/L dropout powder

Luria-Bertani (LB) 培地 : 1% Bacto-tryptone, 0.5% Bacto-yeast extract, 1% NaCl, pH7.5
蛋白質抽出用 Buffer C : 20 mM Tris-HCl(pH7.5), 1 mM EDTA, 5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 5% glycerol

SDS-PAGE 濃縮ゲル調整用 Buffer : 0.5 M Tris-HCl(pH6.8), 0.4% SDS

分離ゲル調整用 Buffer : 1.5 M Tris-HCl(pH8.8), 0.4% SDS

2×Sample buffer : 12.5% 濃縮ゲル調整用 Buffer, 10%glycerol, 2%SDS, bromophenol blue

TES solution : 10 mM Tris-HCl(pH7.5), 10 mM EDTA, 0.5%SDS

Transfer Buffer

wet 用 : 200 mM Glycine, 25 mM Tris-HCl

semi-dry 用 : 25 mM Tris-HCl, 250 mM Glycine, 0.02% SDS

TBS : 20 mM Tris-HCl(pH7.5)、150 mM NaCl

TTBS : 0.05% Tween20/TBS

blocking solution TBS 系 : Nacalai(1 次抗体希釈用)

blocking solution : 5% skim milk/TBS

1 次抗体用 solution : blocking solution TBS 系(Nacalai)+0.05% NaN_3

2 次抗体用 solution : 0.5% skim milk/TBS

・ 器具関連

Film : Lumi-film chemiluminescent detection film (Roche diagnostics)

96 well micro-titer plate : Grainer

2 mL、1.5 mL tube : Tokyo Watson

ゴムパッキン付 2 mL tube : Assist

14 mL tube(clear) : Falcon

50 mL 遠沈管 : Falcon

Immobilon-P membrane : Millipore

Filter paper : Bio-Rad

・ 機器関連

イオン交換水(ELIX)、Milli-Q 水 : Millipore

耐性試験用 Robot : Biomek 2000 (Beckman)

吸光光度計 : DNA 濃度測定用 DU 640 spectrophotometer (Beckman)

酵母濁度測定用 Benchmark plus (Bio-Rad)

96 well shaker : Iwaki

振盪培養用 shaker : Taitec

気相 incubater : Sanyo

遠心分離機 : MX-200 (Tomy 精工)

ビーズ式細胞破碎装置 : MS-100R (Tomy 精工)

Mini disk rotor : Bio craft

電気泳動装置 : Bio craft

Transfer 装置 : wet(Bio-Rad)、semi-dry(Nippon-Eido)

PCR 装置 : Mastercycler gradient (Eppendorf)

定量 PCR 装置 : i-cycler (Bio-Rad)

UV transilluminator : 3 UV transilluminator NLMS-20E 型 (UVP)

Auto-sequencer : CEQTM 2000XL (Beckman)

2. 実験方法

酵母発現 plasmid の作成

Rad23、Png1、及び Rad23 結合蛋白質を酵母で発現させるための発現 plasmid は、酵母 2 μ 系 vector pKT10 の制限酵素 *Pvu*II 認識部位に、PCR によって増幅したそれぞれの ORF を挿入する方法で作成した。PCR は酵母 chromosomal DNA を template とし、以

下に示す primer と反応条件を用いて行った。反応後、それぞれの PCR 産物をアガロース電気泳動後、目的サイズの DNA 断片をゲルより切り出し、GeneClean II kit を用いて精製した。得られた DNA 断片と、予め *Pvu*II で切断後精製しておいた pKT10 を DNA ligation kit ver.2 を用いて以下の用量で連結し、大腸菌(XL1-blue)に Hanahan らの方法(37)に従って導入した。Competent cell 溶液 50 μ L にプラスミド溶液を加え、氷上に 30 分静置した後、42°C で 45 秒間の熱ショックをかけ、さらに氷上に 2 分間静置した後、ampicillin sodium salt 100 μ g/mL を含む LB 寒天培地に塗布し、37°C で一晩培養した。形成されたコロニーを ampicillin sodium salt 100 μ g/mL を含む LB 培地 2 mL で一晩振盪培養した後、GenElute™ Plasmid Miniprep Kit (Sigma)を用いて大腸菌より plasmid を回収した。塩基配列は sequence により確認した。発現は酵母株に導入後、以下に示す primer を用いた定量的 RT-PCR 法によって確認し、FLAG もしくは HA tag 融合蛋白質については各々の抗体を用いた Western blotting で確認した。

PCR 反応条件

94°C 3 min

↓

94°C 30 sec

55°C 1 min

72°C 1 min/kb of DNA length 40 cycles

↓

72°C 3 min

反応溶液組成

Template DNA: 1 μ g

Polymerase: 1 μ L

Primer(100pM) : 各 1 μ L

2.5 mM dNTP mix: 5 μ L

10 \times PCR buffer: 5 μ L

計 50 μ L になるように Milli-Q 水を加えた

高発現ベクター作成用 Primer

yRAD23

Sense: 5'-CACAGAGCACACAAAGACAAC-3'

Antisense: 5'-GTGAAGATACTTCAAGCCA-3'

yFLAG-RAD23

Sense:5'-CATACAATAGAAAAATGGACTACAAGGATGACGATGACAAGGTTAG
CTTAACCTTTAA-3'

Antisense: 5'-GTGAAGATACTTCAAGCCA-3'

yDDI1

Sence: 5'-AAGTACATACCAAACATAACAGC-3'

Antisense: 5'-TACATACGTAGAGGCCGATCA-3'

yFLAG-DDI1

Sense:5'-AATATACGTAAAGATGGACTACAAGGATGACGATGACAAGGATTTA
ACAATTTCAAAC-3'

Antisense: 5'-TACATACGTAGAGGCCGATCA-3'

yDSK2

Sense: 5'-ACGGATCAAAGACACCGAAT-3'

Antisense: 5'-TTGCGGCATCTAGACGTTTA-3'

yRAD7

Sense: 5'-CGAAGTGTCTTTGTATAAGCT-3'

Antisense: 5'-CCGTTTTCTATCTAATACACG-3'

yRAD14

Sense: 5'-TTGGATCTTCGTAGTGAAGG-3'

Antisense: 5'-ACACAATCAAAACACCTTATT-3'

yRPL40A

Sense: 5'-TCCCATAGTTGAGACGACCAA-3'

Antisense: 5'-GATTGATTGGGCGAAACAGA-3'

yRPL40B

Sense: 5'-TTCAGCAAGAGGTAAAGCCA-3'

Antisense: 5'-CTTTGGATTTGTGGAGATCG-3'

yRPS1A

Sense: 5'-AAACAAGCACACGAATAACCA-3'

Antisense: 5'-CCTTTTTCTCTGTTCTTTCC-3'

yUFD2

Sense: CCACAAGTTGTTTAAGGGGAA

Antisense: TTGATTAGGGTCAATTTTGCA

yPNG1

Sense: 5'-TGAAGAAGGTAACAGGTGGA-3'

Antisense: 5'-TTCCTTACACATAATAATCAG-3'

yPNG1-HA

Sense: 5'-TGAAGAAGGTAACAGGTGGA-3'

Anrisesense:

5'-TTTTATTTCTCTAAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTATTTACC
ATCCTCC-3'

酵母への plasmid の導入

酵母(W303B 株)の形質転換は酢酸リチウム法(38)により行った。まず、酵母株を完全培地である YPD 培地 2 mL に植菌し 30°Cで一晩振盪培養した後、この培養液を YPD 培地で 2×10^6 cells/mL となるように希釈した。この希釈培養液 50 mL を 1×10^7 cells/mL になるまで振盪培養した後に集菌し、滅菌水で洗浄した。これを 100 mM 酢酸リチウム溶液で 2×10^9 cells/mL となるように懸濁し、気相中、30°Cで 15 分間 incubate した。この懸濁液 50 μ L に該当遺伝子を組み込んだ発現 vector 1 μ g、加熱変性サケ精子 DNA 50 μ g および 40% polyethylene-glycol (4000) 300 μ L を加え、30°Cで 30 分間 incubate した。その後、42°Cで 15 分間の熱ショックをかけた後に集菌し、100 μ L の滅菌水で懸濁して SD (–uracil, –tryptophan, or –uracil/tryptophan) 寒天培地に塗布し、30°Cで 2 日間培養した。

定量的 RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction)を用いた蛋白質高発現の確認

RT-PCR を用いた発現確認は、template として発現 plasmid を導入した酵母から抽出した RNA を鋳型に合成した cDNA を用いて、以下に示す反応条件にて行った。

酵母からの RNA 抽出

RNA 抽出は Hot phenol 法(39)で行った。酵母株を SD(–uracil, –tryptophan, or

-uracil/tryptophan)培地 2 mL に植菌し 30°Cで一晩振盪培養した後、この培養液を SD(-uracil, -tryptophan, or -uracil/tryptophan)培地 50 mL に再び植菌して 5×10^6 cells/mLとなるまで培養した。Wash 後、TES solution と酸性 Phenol を $400 \mu\text{L}$ ずつ加え、10 分毎に攪拌をしながら計 60 分間、65°Cで加熱した。冷却後、遠心分離にて水層と油層に分離させ、水層を別のチューブに移した後に更に $400 \mu\text{L}$ の酸性 Phenol を加え攪拌した。遠心分離後、別チューブに移した水層に Ethanol を加え RNA を沈殿させた。上澄を捨て、沈殿物を 70% Ethanol で wash 後、Ethanol を極力除いた後に適量の滅菌水を加え、RNA 溶液とした。

RT-PCR(逆転写)

上記で調整した RNA 溶液を $3 \mu\text{g}/11 \mu\text{L}$ となるように希釈し、これに $1 \mu\text{L}$ の oligo(dT)₁₂₋₁₈ Primer を加え、70°Cで 10 分間加熱した。冷却後、 $1 \mu\text{L}$ の 10 mM dNTP mix、 $2 \mu\text{L}$ の DTT、 $4 \mu\text{L}$ の 5×First strand buffer を加え、42°Cで 5 分間 incubate した。incubate しながら M-MLV Reverse transcriptase を $1 \mu\text{L}$ 加え、1 時間以上 incubate を続け、逆転写を行った。逆転写終了後、70°Cで 15 分間加熱し、冷却後、 $0.26 \mu\text{L}$ の Rnase H を加え 37°Cで 20 分間 incubate した。この溶液を cDNA 溶液とした。

定量 PCR

定量 PCR は Bio-Rad I-cycler を用いて以下の反応条件で行った。

PCR 反応条件

95°C 3 min

↓

95°C 30 sec

]

55°C 30 sec

72°C 30 sec 40 cycles

↓

60°C 30 sec →plus 1°C 30 sec →plus 1°C 30 sec…to show melt curve

反応溶液組成

Template cDNA: 5 μ L (cDNA 溶液を 200 倍希釈し、使用した。100 倍,1000 倍,10000 倍希釈も作成し、検量線作成に用いた。)

iQ™ SYBR Green supermix : 12.5 μ L

Primer(1 pM) : 各 0.75 μ L

計 50 μ L になるように Milli-Q 水を加えた

定量 RCR 用 primer

yRAD23

Sense: 5'-AATCTGCCTCTACACCGGGAT-3'

Antisense: 5'-CTTCTGGGTTTGCCATGATA-3'

yRAD7

Sense: 5'-ACAAATGTGTGGGCAGTTGAAC-3'

Antisense: 5'-AACATCCTCTTCATTGAATGGA-3'

yRAD14

Sense: 5'-CAGACCTAGCATAAGGAAACAAG-3'

Antisense: 5'- TGGATGCTCCTTAGAACACTGT-3'

yRPL40A

Sense: 5'-GGGTGATGCGACTTAACAGTC-3'

Antisense: 5'-CGTCTTCCAATTGCTTACCA-3'

yRPL40B

Sense: 5'-AATGTCGCATATGTGCTGAAGG-3'

Antisense: 5'-GATAGAGTTCTACCGTCTTCCAA-3'

yRPS1A

Sense: 5'-TTTGCTTGGCTGACTTACAGG-3'

Antisense: 5'-ATTGGGCCAAGGTAGATCCTT-3'

yUFD2

Sense: 5'-TTGAAGAGAAGATGGGATCTGAA-3'

Antisense: 5'-AAATCAGCGTTGTCCACGTT-3'

yPNG1

Sense: 5'-GAAAATATGACACCTCTGGGCA-3'

Antisense: 5'-AGATATATGGTTGGTCGAATGA-3'

yDDI1

Sense: 5'-GGCATCCCCCAAGATGAATAT-3'

Antisense: 5'-GACGGTAAAACCTGCATGGAA-3'

yDsk2

Sense: 5'-GACGGTGGTGCATTAAACAA-3'

Antisense: 5'-TGCATTAGTCCCTGCGTTGT-3'

QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit を用いた変異導入

Rad23 truncation mutants は QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit

(Stratagene) の protocol に従って、template として RAD23/pKT10 もしくは FLAG-RAD23/pKT10 を用い、以下に示す反応条件と primer で PCR を行い作成した。PCR 後、DpnI 処理にて鋳型 plasmid を消化した後に cloning を行い、変異の導入された plasmid を得た。変異によって導入された Sac \square site を利用して目的の領域を切り出し、その後連結することで各々の領域、UbL (2-76 amino acids; ref. 10)、UBA1 (147-186 amino acids; ref. 40)、UBA2 (356-395 amino acids; ref. 9) を欠失させた。

PngI truncation mutant も同様の反応条件と以下に示す primer を用いて、template として PNG1/pKT10 もしくは PNG1-HA/pKT10 Nhe I site を変異導入し作成した。PngI single amino acid mutant はそれぞれのアミノ酸を alanine で置換させるような primer を用いた。

変異導入後の塩基配列は sequence により確認した。発現は定量的 RT-PCR にて、FLAG-tag 融合蛋白質の発現は抗 FLAG 抗体を用いた western blot にて調べた。

Dsk2 の UBA ドメイン (328-371 amino acids; ref. 40) のみを Rad23 の UBA2 ドメインに置き換えたキメラ Rad23 を発現させる plasmid も同様に Sac \square site を導入し、組み換えることで作成した。

・ Site-Directed Mutagenesis

95°C 30 sec

↓

95°C 30 sec

55°C 1 min

68°C 2 min/kb of plasmid length 18 cycles

↓

68°C 3 min

Rad23 truncation mutant 作成用 primer

yRAD23 UbL domain 5'側

Sense:

5'-CAACATACAATAGAAAAATGGAGCTCTTAACCTTTAAAAATTTCAAG-3'

Antisense:

5'-CTTGAAATTTTTAAAGGTTAAGAGCTCCATTTTTCTATTGTATGTTG-3'

yFLAG-RAD23 UbL domain 5'側

Sense: 5'-CAAGGATGACGATGACAAGGAGCTCTTAACCTTTAAAAATTTTC-3'

Antisense:

5'-GAAATTTTTAAAGGTTAAGAGCTCCTTGTCATCGTCATCCTTG-3'

yRAD23 UbL domain 3'側

Sense: 5'-CATGGTTTCTCAAAAAGAGCTCACGAAGACCAAAGTAAC-3'

Antisense: 5'-GTTACTTTGGTCTTCGTGAGCTCTTTTTGAGAAACCATG-3'

yRAD23 UBA1 domain 5'側

Sense: 5'-CGGGATTCGTGGTGGGAGAGCTCAGGAACGAGACCATCGAG-3'

Antisense: 5'-CTCGATGGTCTCGTTCCTGAGCTCTCCCACCACGAATCCCG-3'

yRAD23 UBA1 domain 3'側

Sense: 5'-GAATATCTACTGATGGAGCTCCCAGAAAATCTGCGTC-3'

Antisense: 5'-GACGCAGATTTTCTGGGAGCTCCATCAGTAGATATTC-3'

yRAD23 UBA2 domain 5'側

Sense: 5'-CTTTCCAAGTTGACTATACCGAGCTCGACGATCAAGCTATTTTCGC-3'

Antisense:

5'-GCGAAATAGCTTGATCGTCGAGCTCGGTATAGTCAACTTGGAAAG-3'

RAD23 UBA2 domain 3'側

Sense: 5'-CAAATATTCTATTTCAGCGAGCTCGCCGACTGAGATTGTAG-3'

Antisense:

5'-CTACAATCTCAGTCGGCGAGCTCGCTGAATAGAATATTTG-3'

UBA1 Δ UBA2 Δ 作成用 primer

Sense: 5'-CACAGAGCACACAAAGACAAC-3'

Antisense: 5'-TCAGTCGGCATGGGGGGTATAGTCAACTTGGAAAG-3'

yDSK2-UBA domain primer

Sense: 5'-GTACGAGCTCCCGGAAGAACGCTATGAACATC-3'

Antisense: 5'-GTACGAGCTCGCCGTTTCAGTAGTGAATCAAGAG-3'

耐性試験

0、1、2、3、4、5、6、7 μ M にそれぞれ希釈したメチル水銀を 96 well micro-titer plate に 20 μ L ずつ分注する (final : 0、100、200、300、400、500、600、700 nM となる)。空ベクター pKT10 のみを導入した株、もしくは何らかの蛋白質をコードする遺伝子を組み込んだ pKT10 を導入した株、それぞれの株を SD 培地 2 mL に植菌し 30°C で一晚振盪培養した後、 5.56×10^5 cells/mL となるように希釈し、96 well micro-titer plate にそれぞれの希釈系列に対して 3 well ずつ、1 well あたり 180 μ L 添加する (final : 1×10^5 cells/well となる)。plate の周囲にビニールテープを巻いて密封後攪拌し、気相インキュベーターを用いて 30°C、所定の時間(24、48、72 hr)培養後、濁度を測定(A600)した。植菌後の操作

は全てロボット Biomek 2000 を用いた。

蛋白質抽出

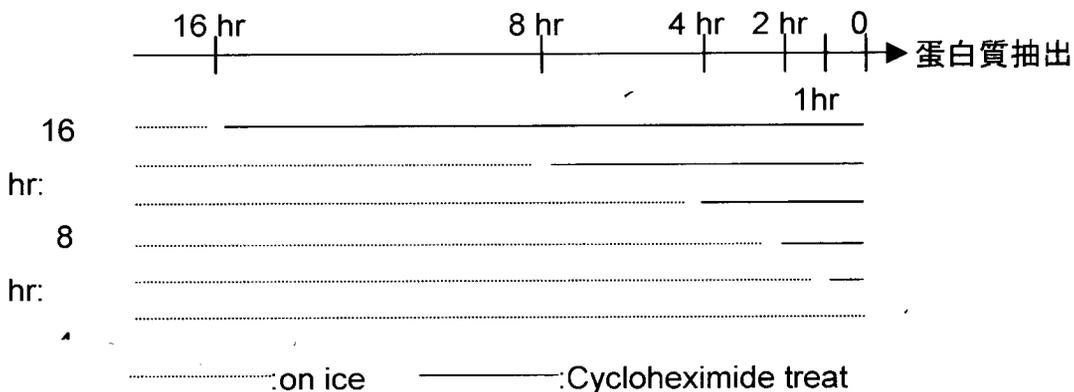
空ベクター-pKT10のみを導入した株、もしくは何らかの蛋白質をコードする遺伝子を組み込んだ pKT10 を導入した株、それぞれの株を SD 培地 2 mL に植菌し 30°C で一晩振盪培養した後、200 mL マイヤーに入れた 50 mL の SD 培地に再び植菌し、30°C で OD が約 0.6~0.8 になるまで(約半日)振盪培養した。集菌し、滅菌水にて 2 回 wash 後、500 μ L の Buffer C に懸濁し、assist tube に移し、葉さじ約 2 杯分のガラスビーズを加えた。Tomy MS-100R を用いて 3 min, 4000 rpm で酵母を破碎後、15000 rpm, 10 min で遠心分離し、上澄を 1.5 mL tube に移して再び 15000 rpm, 10 min で遠心分離を行った。先の操作を 2 度繰り返し、可溶性画分のみを採取した。蛋白質量を定量後、SDS-PAGE を行う全ての well の蛋白質量が一定となるように Buffer C と 2 \times sample buffer で希釈した。100°C で 3 分間 boil し、SDS-PAGE 用 sample とした。

蛋白質分解速度実験用の蛋白質抽出

PNG1-HA/pKT10(TRP1)を、pKT10 と共に導入した株、もしくは FLAG-RAD23/pKT10 と共に導入した株、それぞれを SD 培地 2 mL に植菌し 30°C で一晩振盪培養した後、200 mL マイヤーに入れた 50 mL の SD 培地に再び植菌し、30°C で OD が約 0.6~0.8 になるまで(約半日)振盪培養した。集菌後、12 mL の SD 培地に懸濁し、14 mL tube に 2 mL ずつ分注した後、氷上に 10 分放置した。10 mg/mL となるように滅菌水に溶解した Cycloheximide を 20 μ L 添加(final; 100 μ g/mL)後、30°C で所定の時間振盪培養し、蛋白質抽出と sample 調整は上記の要領で行った(volume は上記方法の 1/10 で行った)。

* Cycloheximide 処理にかかる所定の時間を逆算して、蛋白質抽出が全て同時に行えるよ

うにした。処理待ちの Sample は氷上に静置しておいた。



免疫沈降

PNG1-HA/pKT10(TRP1)を pKT10 と共に導入した株、もしくは FLAG-RAD23/pKT10 と共に導入した株、それぞれを SD 培地 2 mL に植菌し 30°C で一晩振盪培養した後、200 mL マイヤーに入れた 50 mL の SD 培地に再び植菌し、30°C で OD が約 0.6~0.8 になるまで(約半日)振盪培養した。集菌し、滅菌水にて 2 回 wash 後、500 μ L の Buffer C に懸濁し、assist tube に移し、葉さじ約 2 杯分のグラスビーズを加えた。Tomy MS-100R を用いて 3 min, 4000 rpm で酵母を破碎後、15000 rpm, 10 min で遠心分離し、上澄を 1.5 mL tube に移して再び 15000 rpm, 10 min で遠心分離を行った。先の操作を 2 度繰り返し、可溶性画分のみを採取した。蛋白質量を定量後、2 mg/300 μ L となるように Buffer C で希釈し、約 20 μ L 分の予め TBS で 3 回 wash した anti-HA agarose beads を加え、4°C で約半日間 incubate した。incubate 後、5 回 TBS で wash 後、beads を含めて全量が 120 μ L となるように TBS、2 \times sample buffer を加えた(beads:20 μ L、TBS:50 μ L、2 \times sample buffer:50 μ L)。100°C で 3 分間 boil し、SDS-PAGE 用 sample とした。このうち、1 well に対して 10 μ L を用いた。

SDS-PAGE

12.5%のポリアクリルアミドゲルを用いて 30 mA/枚で電気泳動を行った。

Transfer

・ユビキチン化蛋白質質量測定の場合：

SDS-PAGE 後、wet 型 blotting 装置を用いて immobilon-P membrane に blotting した(条件：50 V, 8 hr)。

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

Immunoblotting

Transfer 後の membrane を blocking solution に浸して約 6 hr、blocking した後に 1 次抗体液(任意の希釈)に浸し、約半日間振盪した。TTBS で 2 回、TBS で 1 回、それぞれ 15 分間振盪して wash した後に HRP 標識化 2 次抗体液(5000 倍希釈)に浸し、1 時間振盪した。TTBS で 2 回、TBS で 1 回、それぞれ 15 分間振盪して wash した後に ECL reagent を用いて化学発光させ、film に露光させて検出した。

(1) Rad23 高発現酵母が示すメチル水銀耐性獲得機構の解析

[目的]

我々はユビキチン・プロテアソームシステムの構成因子の一つである、Cdc34 (ユビキチン転移酵素; E2) の高発現が酵母にメチル水銀耐性を与えることを見出している(4,5)。Cdc34 高発現によってユビキチン・プロテアソームシステムが亢進することから、細胞内にはメチル水銀の毒性を増強させる蛋白質が存在し、その蛋白質の分解が本システムによって促進されることのために Cdc34 高発現酵母がメチル水銀耐性を示す、という可能性が考えられる。しかし、メチル水銀の毒性を増強させる蛋白質や Cdc34 以外の毒性軽減に関わる蛋白質は同定されておらず、その詳細な機構は明らかになっていない。そこでユビキチン・プロテアソームシステムによる耐性獲得機構の解明の足がかりとして、出芽酵母における Cdc34 以外のユビキチン・プロテアソームシステム関連因子の中からメチル水銀感受性に影響を与える因子を検索し、その因子の耐性獲得機構について検討した。

[結果および考察]

1. 酵母にメチル水銀耐性を与えるユビキチン・プロテアソームシステム関連因子の検索

ユビキチン・プロテアソームシステム関連因子の中からメチル水銀感受性に影響を与える因子を検索した結果、Cdc34 高発現によって与えられる耐性割合には劣るものの、Rad23 の高発現が酵母にメチル水銀耐性を与えることを見出した(Figure 1)。Rad23 は、Pds1 という細胞周期を後期で止める作用のある因子の活性を調節している可能性(9)やヌクレオチド除去修復(NER; nucleotide excision repair)作用を有すること(10,11)など、多様な機能が報告されている蛋白質である。ユビキチン・プロテアソームシステムにおける

Rad23 の機能としては、

- ① ユビキチン化蛋白質のユビキチン部分と結合して、ユビキチン鎖の伸長を阻害する機能 (12,13,14,15)
- ② ユビキチン化された蛋白質のプロテアソームへの運搬機能(分解促進作用) (16,17)

二通りの報告がある。これらの報告は、ユビキチン鎖伸長を阻害して蛋白質の分解を抑制する機能と、ユビキチン化蛋白質のプロテアソームへの運搬を担うことにより、その蛋白質の分解を促進する、というこの相反する機能を Rad23 が持ち併せている可能性を示している(Figure 2)。何れにしろ、Rad23 の高発現がユビキチン・プロテアソームシステムに何らかの影響を与えることによって酵母にメチル水銀耐性を与える可能性は否定できない。

2. Rad23 高発現によるメチル水銀耐性獲得とユビキチン・プロテアソームシステムの関係

Rad23 は N 末端に UbL (Ubiquitin-Like) ドメインを持ち、中央付近および C 末端の 2 箇所に UBA (Ubiquitin-Associated) ドメインを持つことが知られており(14,18)、それぞれ UBA1、UBA2 と称されている(Figure 3)。UBA ドメインは Rad23 がユビキチンもしくはユビキチン化蛋白質のユビキチン部分と結合するために必要な領域であり、Rad23 が UBA ドメインを介してユビキチン化蛋白質と結合すると、それ以上のユビキチン鎖の伸長が阻害されるために、プロテアソームがこのユビキチン化蛋白質を基質として認識せず(プロテアソームに認識されるには十分な長さにユビキチン鎖が伸長することが必要とされる)、その結果として、プロテアソームによる蛋白質の分解が抑制される(12,13,15)。一方、UbL ドメインはユビキチンと相同性が高い領域であり、Rad23 はこのドメインを介してプロテアソームと結合(19,20,21)することによってユビキチン化蛋白質をプロテアソームに運ぶシャトルの役割を果たしている、と考えられている(16,17)。そこで、両ドメインをそ

それぞれ欠失させることによって、ユビキチン・プロテアソームシステムに関連する Rad23 の機能をそれぞれ喪失した truncation mutants (Figure 3)の高発現が、メチル水銀感受性に与える影響を検討した(Figure 4)。その結果、プロテアソームとの結合に重要なドメインである UbL ドメインを欠失させた蛋白質を高発現させた酵母は全長の Rad23 を高発現させた酵母よりも強いメチル水銀耐性を示した。また、UBA1 ドメイン欠失 Rad23 を高発現させた酵母は全長 Rad23 高発現酵母よりも耐性割合が弱く、UBA2 欠失 Rad23 高発現酵母のメチル水銀感受性はコントロールと変わらないレベルであった。両 UBA ドメインを共に欠失した Rad23 を高発現させた酵母のメチル水銀感受性もコントロールと同程度であった。このことから、Rad23 の C 末端に存在する UBA2 ドメインがメチル水銀耐性に重要であると考えられる。

次に、Rad23 の高発現が細胞内ユビキチン化蛋白質量に与える影響を調べたところ、Rad23 高発現によって細胞内ユビキチン化蛋白質量の顕著な増加が認められた(Figure 5)。そこで、各 truncation mutant 高発現酵母の細胞内ユビキチン化蛋白質量を調べたところ、全長の Rad23 を高発現させた酵母に比べて、UbL 欠失 Rad23 高発現によって酵母内ユビキチン化蛋白質量は増加し、UBA1 欠失 Rad23 高発現によって減少した(Figure 6)。また、UBA2 欠失 Rad23 高発現酵母ではさらに顕著な減少が認められた(Figure 6)。ユビキチン化蛋白質の分解阻害に必要な領域とメチル水銀耐性に必要な領域が一致したことから、Figure 2 に示した Rad23 の報告されている機能のうちのユビキチン化蛋白質分解阻害作用(Figure 2.の I)がメチル水銀耐性に関わっている可能性が考えられる。また、UbL ドメインを介するユビキチン化蛋白質のプロテアソームへの運搬の機能によって生じると考えられる蛋白質分解促進作用(Figure 2.の II)は逆にメチル水銀の毒性を増強させることが明らかとなった。

これらの結果より、Rad23 高発現は、何らかの蛋白質のプロテアソームにおける分解を

抑制することによってその蛋白質の細胞内濃度を維持し、その結果として酵母にメチル水銀耐性を与えるのかも知れない。

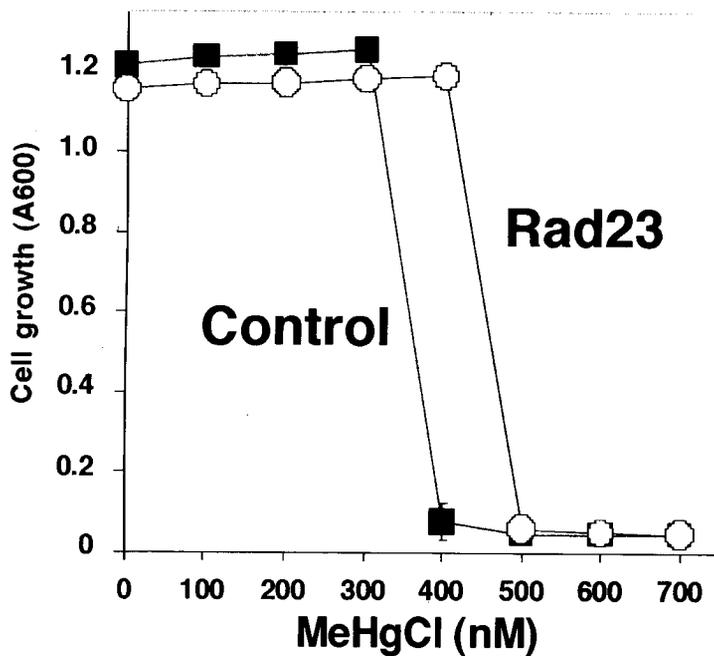


Figure 1. Effect of overexpression of Rad23 on sensitivity to methylmercury in yeast (*Saccharomyces cerevisiae*)

Yeast cells carrying plasmids *RAD23*-pKT10(Rad23;white circle) or pKT10(Control;black square), as indicated,were grown in SD(-uracil) medium that contained methylmercuric chloride (MeHgCl). After a 48-hr incubation, absorbance at 600 nm was measured spectrophosphometrically. Each point and bar represent the mean value and S. D. results from four cultures. The absence of a bar indicates that the S. D. falls within the symbol.

Ub: ubiquitin

E1: ubiquitin activating enzyme I. Prevent ubiquitin chain extension.

E2: ubiquitin conjugating enzyme

E3: ubiquitin ligase

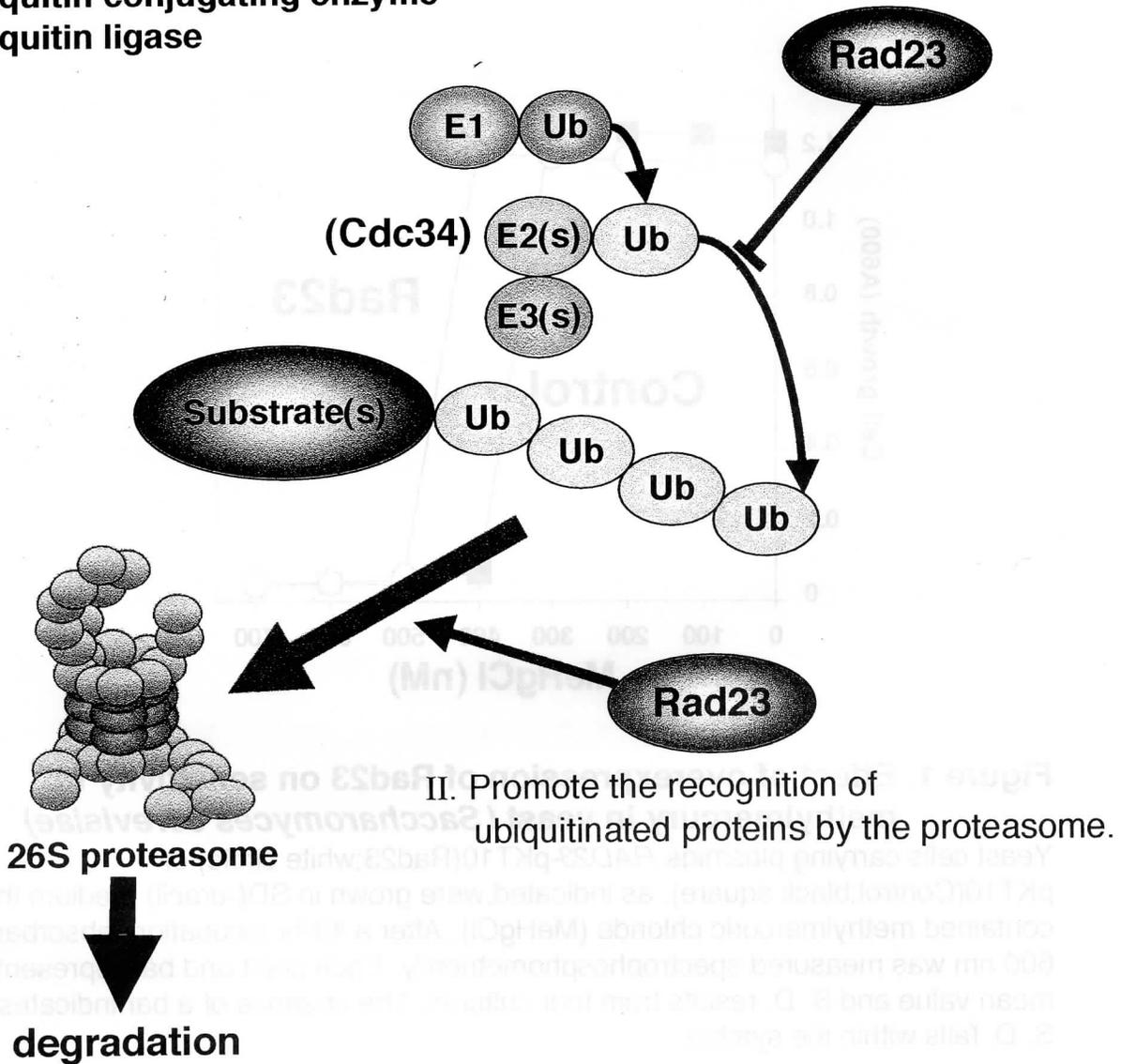


Figure 2. Roles of Rad23 in ubiquitin-proteasome system

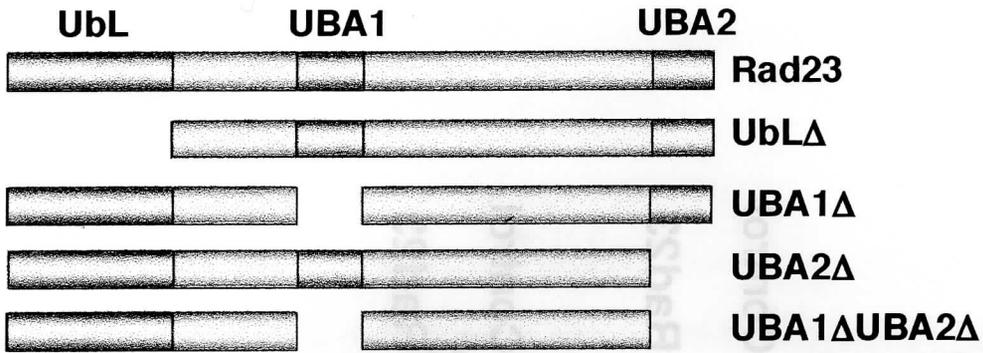


Figure 3. Truncation mutants of Rad23

UbL : Ubiquitin-like domain
 UBA : Ubiquitin-associated domain

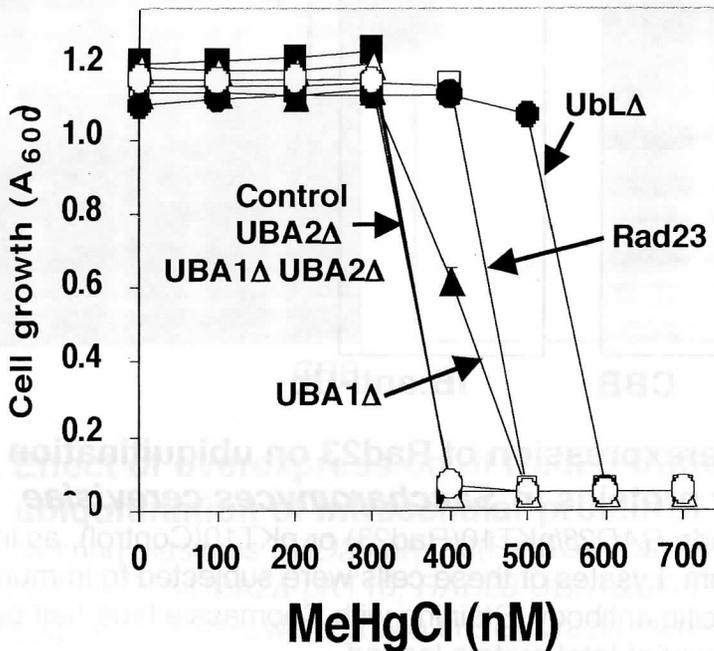


Figure 4. Effect of overexpression of Rad23-truncation mutants on sensitivity to methylmercury

Yeast cells carrying plasmids *RAD23*-pKT10 (Rad23;white square), *Rad23*-UbLΔ-pKT10 (UbLΔ;black circle), *RAD23*-UBA1Δ-pKT10 (UBA1Δ;black triangle), *RAD23*-UBA2Δ-pKT10 (UBA2Δ;white triangle), *RAD23*-UBA1ΔUBA2Δ-pKT10 (UBA1ΔUBA2Δ;white circle) or pKT10(Control;black square), as indicated, were grown in SD(-uracil) medium that contained MeHgCl. After a 48-hr incubation, absorbance at 600 nm was measured spectrophotometrically. Each point and bar represent the mean value and S. D. results from four cultures. The absence of a bar indicates that the S. D. falls within the symbol.

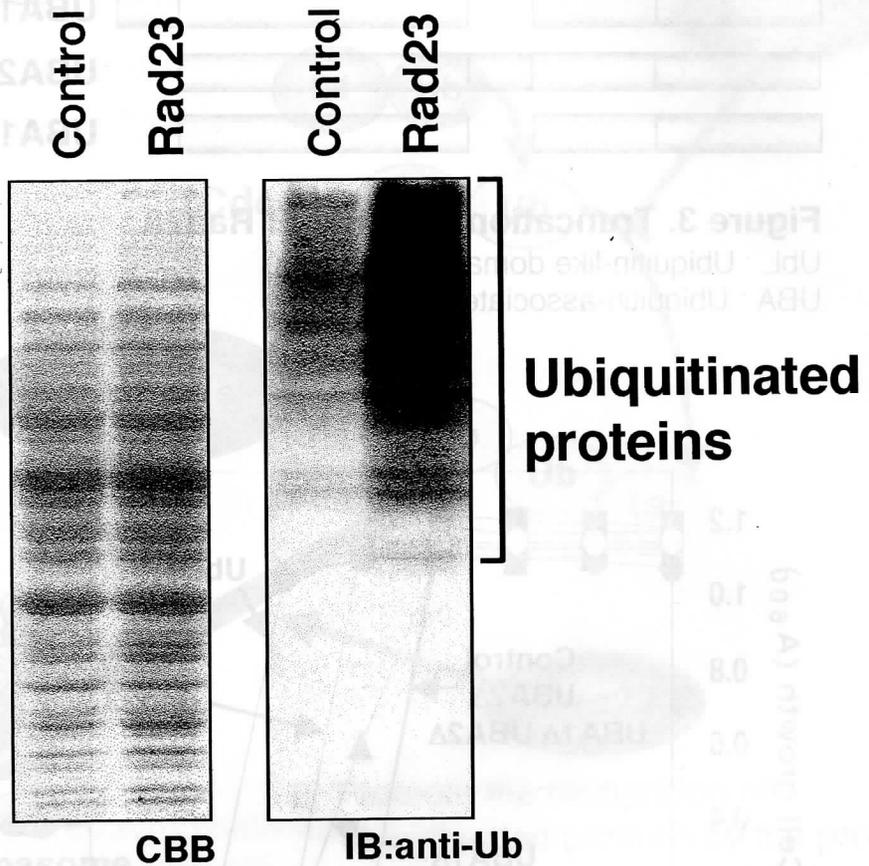


Figure 5. Effect of overexpression of Rad23 on ubiquitination of intracellular proteins in *Saccharomyces cerevisiae*

Yeast cells carrying plasmids *RAD23/pKT10*(Rad23) or *pKT10*(Control), as indicated, were grown in SD(-uracil) medium. Lysates of these cells were subjected to immunoblotting analysis with ubiquitin-specific antibody. Staining with Coomassie blue (left panel) is shown as an indication of the amount of total protein loaded.

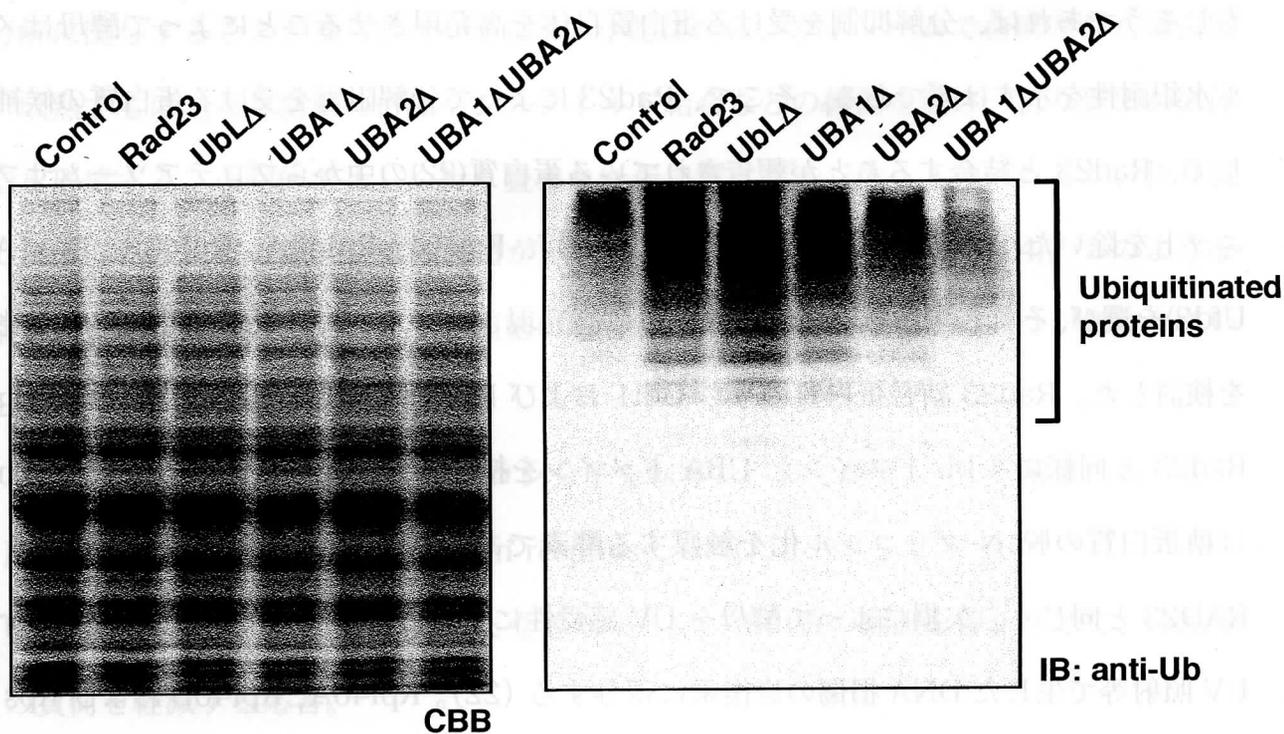


Figure 6. Effect of overexpression of Rad23-truncation mutants on ubiquitination of intracellular proteins

Yeast cells carrying plasmids *RAD23*-pKT10(Rad23), *Rad23*-UbL Δ -pKT10, *RAD23*-UBA1 Δ -pKT10, *RAD23*-UBA2 Δ -pKT10, *RAD23*-UBA1 Δ UBA2 Δ -pKT10 or pKT10(Control), as indicated, were grown in SD(-uracil) medium. Lysates of these cells were subjected to immunoblotting analysis with ubiquitin-specific antibody(right upper panel) and anti-FLAG antibody (right lower panel). Staining with Coomassie blue (left panel) is shown as an indication of the amount of total protein loaded.

(3) Rad23 結合蛋白質が酵母のメチル水銀感受性に与える影響

[目的]

(2) の結果より、Rad23 が細胞内における何らかの蛋白質の分解を抑制し、その蛋白質の細胞内濃度を維持することによって酵母がメチル水銀耐性を示す可能性が示唆された。もしそうであれば、分解抑制を受ける蛋白質自体を高発現させることによって酵母はメチル水銀耐性を示すはずである。そこで、Rad23 によって分解阻害を受ける蛋白質の候補として、Rad23 と結合することが報告されている蛋白質(22)の中からプロテアソームサブユニットを除いた 9 種(Ddi1、Dsk2、Png1、Rad7、Rad14、Rpl40A、Rpl40B、Rps1A、Ufd2)を選び、それら蛋白質をそれぞれ酵母に高発現させてメチル水銀感受性に与える影響を検討した。Rad23 結合蛋白質のうち Ddi1 および Dsk2 は Rad23 様蛋白質とも呼ばれ、Rad23 と同様に UbL ドメインと UBA ドメインを持つことが知られている (17)。Png1 は糖蛋白質の脱 N-グリコシル化を触媒する酵素である (23)。Rad7 および Rad14 は RAD23 と同じく、欠損によって酵母を UV 感受性にする遺伝子として同定されたもので、UV 照射等で生じた DNA 損傷の修復系に寄与する (22)。Rpl40A、Rpl40B および Rps1A はリボソーム蛋白質とユビキチン一個の融合蛋白質で、翻訳後に脱ユビキチン化酵素によってユビキチンが切り離され、それぞれの蛋白質として機能することが知られている(22)。

[結果および考察]

9 種類の Rad23 結合蛋白質、Ddi1、Dsk2、Png1、Rad7、Rad14、Rpl40A、Rpl40B、Rps1A および Ufd2 をそれぞれ酵母に高発現させ、メチル水銀感受性に与える影響を検討した結果、Ddi1、Png1 または Ufd2 を高発現させた酵母がメチル水銀耐性を示した(Figure 7-1)。一方、Dsk2 を高発現させた酵母は逆にメチル水銀に対して高い感受性を示した

(Figure 7-2)。なお、Rad7、Rad14、RpL40A、Rpl40B または Rps1A の高発現は酵母のメチル水銀感受性に殆ど影響を与えなかった(Figure 7-3)。

Png1 は蛋白質の脱N-グリコシル化を触媒する酵素(以下PNGase; peptide:N-glycanase enzyme) であり、細胞質において小胞体 (ER ; Endoplasmic Reticulum) における蛋白質分解に関与することが知られている(23)。小胞体では、リボソームで合成された蛋白質が、成熟するに当たり糖鎖の付加やジスフィルド結合などの修飾を受け、折り畳まれ立体構造を形成する。小胞体で正しく折り畳まれた蛋白質はゴルジ体へと運ばれるが、折り畳みに失敗した蛋白質は正しい立体構造がとれるまで小胞体に停留される(24)。このような異常蛋白質の小胞体内蓄積に対する細胞の応答としておおまかに以下の3つが知られている(25)。

- 1) 小胞体内に存在する小胞体シャペロン分子を転写レベルで誘導して、異常蛋白質の巻き戻しを図る応答 (unfolded protein response; UPR)。
- 2) Unfolded protein が蓄積したことを感知すると、蛋白質の翻訳を停止させて、小胞体の負荷を軽減する応答。
- 3) 異常蛋白質を細胞質に排出して、ユビキチン・プロテアソーム系 (ER-associated degradation system, ERAD) により分解する応答。

Png1 はこのうちの3)であるERADの過程において、糖蛋白質の糖鎖を外し、蛋白質分解を円滑に進める役割を果たす蛋白質である(23)。

Ddi1 はユビキチン・プロテアソームシステムに関与する因子であり、UbL ドメインおよびUBA ドメインを持つRad23様蛋白質として知られており、Rad23 とヘテロダイマーを形成する(26)。また、Rad23 と同じく細胞周期調節因子であるPds1の分解にも関わっている可能性のある因子である(9)。Ufd2 はユビキチン・プロテアソームシステムにおいてユビキチンリガーゼ(E3)として機能する蛋白質である(27,28,29)。

また、高発現によってメチル水銀に対して高い感受性を示した Dsk2 は Ddi1 と同じく Rad23 様蛋白質として知られ、微小管の形成に関わる因子であり、プロテアソームとの結合能も有する蛋白質である(30)。Dsk2 は高発現によって酵母の生育を阻害するとの報告もあり(31)、今回の結果は Dsk2 高発現が酵母の生育を阻害したことによって見かけ上メチル水銀高感受性を示したのかも知れない。

本検討で Ddi1、Png1 および Ufd2 がメチル水銀耐性因子として新たに同定された。これら蛋白質の細胞内でのユビキチン化および分解と Rad23 との関係を検討することによって、Rad23 高発現によるメチル水銀耐性獲得機構の糸口が見出されるものと期待される。

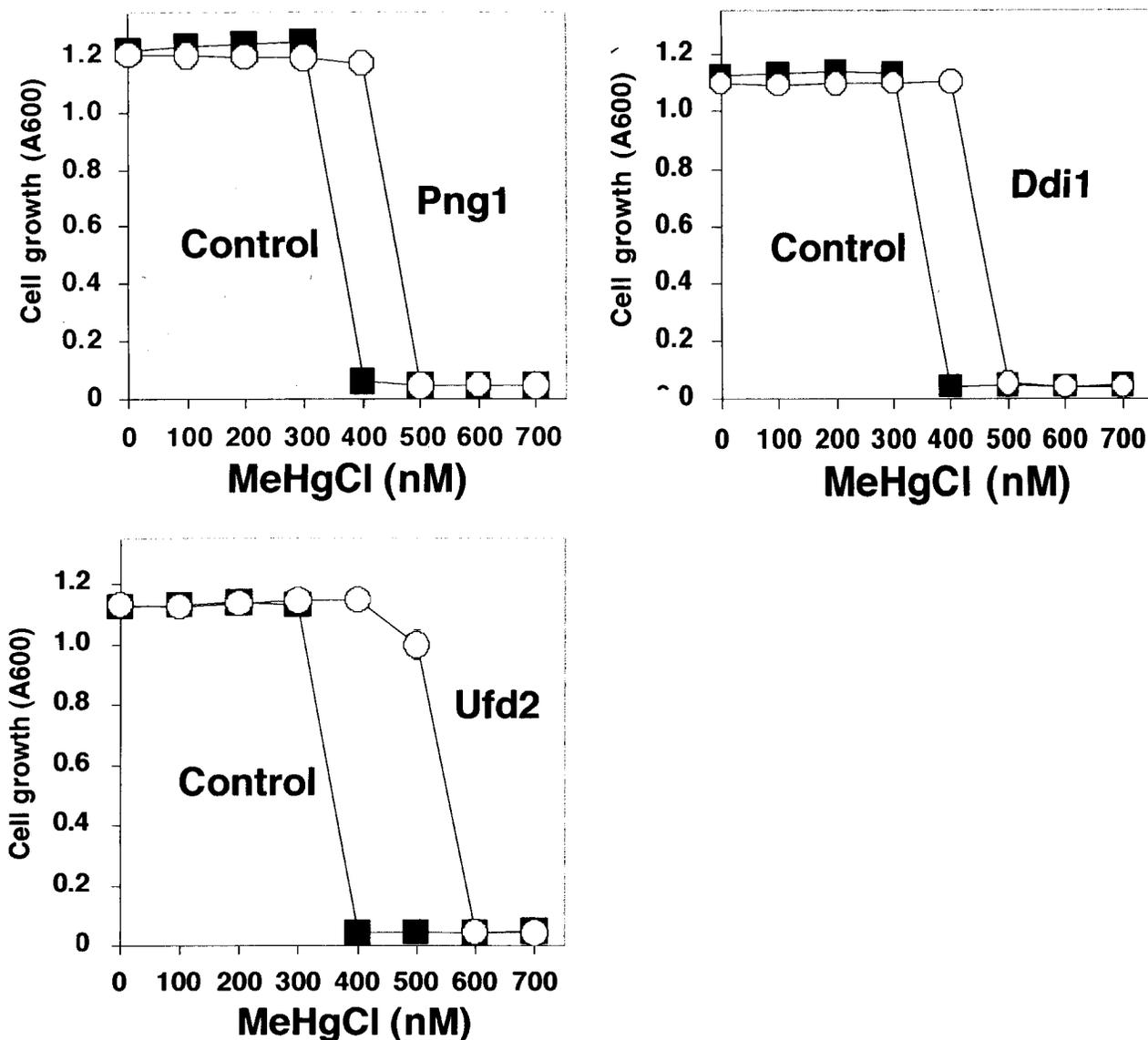


Figure 7-1. Effect of overexpression of Rad23-binding proteins on sensitivity to methylmercury

Yeast cells carrying plasmids *PNG1*-pKT10 (Png1), *DDI1*-pKT10 (*ddi1*), *UFD*-pKT10 (Ufd2) or pKT10(Control;black square), as indicated, were grown in SD(-uracil) medium that contained MeHgCl. After a 48-hr incubation, absorbance at 600 nm was measured spectrophotometrically. Each point and bar represent the mean value and S. D. results from four cultures. The absence of a bar indicates that the S. D. falls within the symbol.

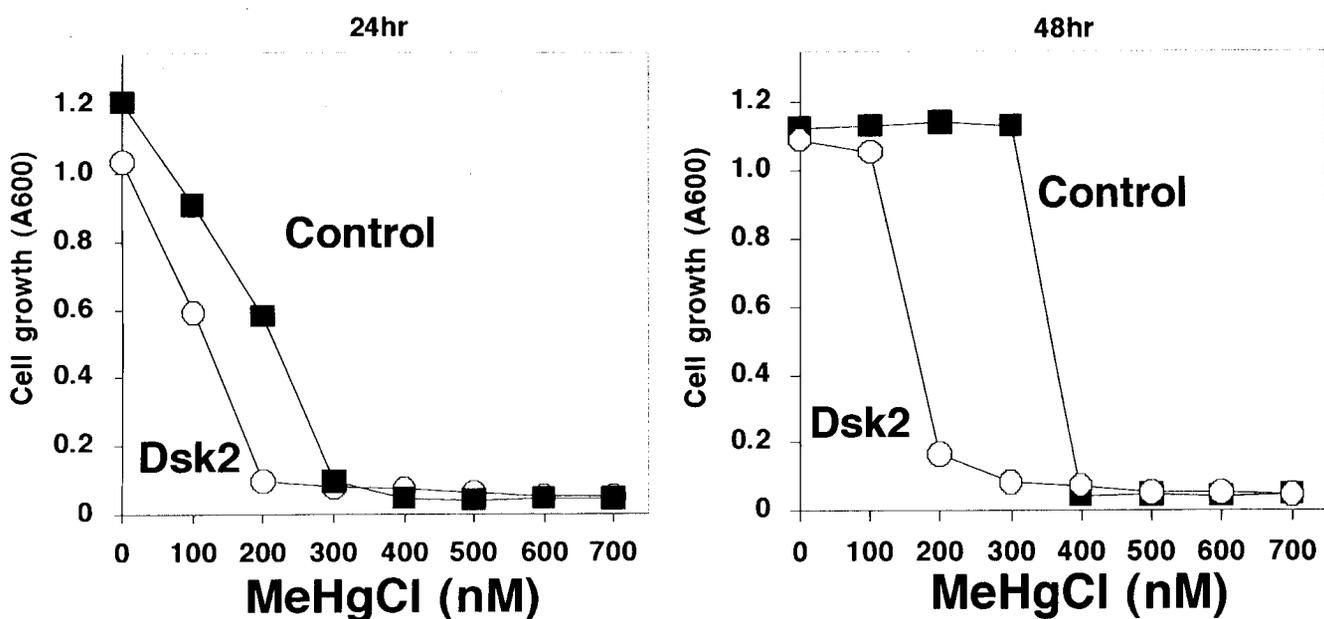


Figure 7-2. Effect of overexpression of Rad23-binding proteins on sensitivity to methylmercury

Yeast cells carrying plasmids *DSK2*-pKT10 (Dsk2) or pKT10(Control;black square), as indicated, were grown in SD(-uracil) medium that contained MeHgCl. After 24 and 48-hr incubation, absorbance at 600 nm was measured spectrophotometrically. Each point and bar represent the mean value and S. D. results from four cultures. The absence of a bar indicates that the S. D. falls within the symbol.

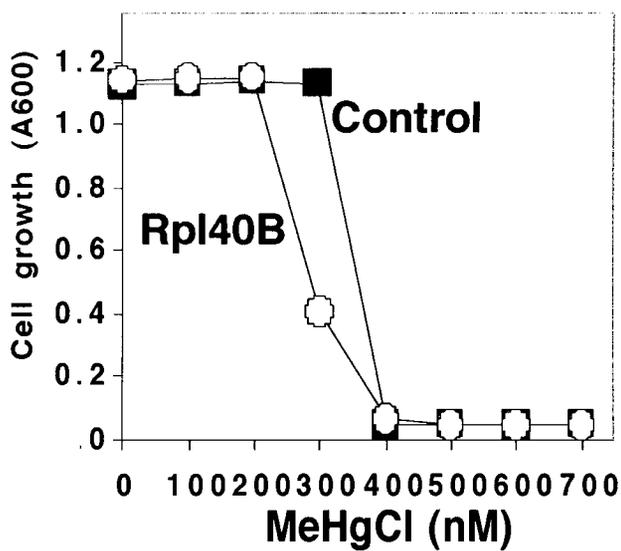
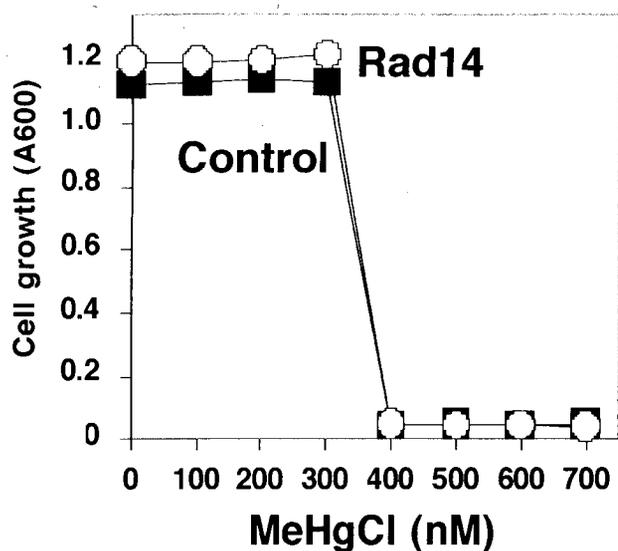
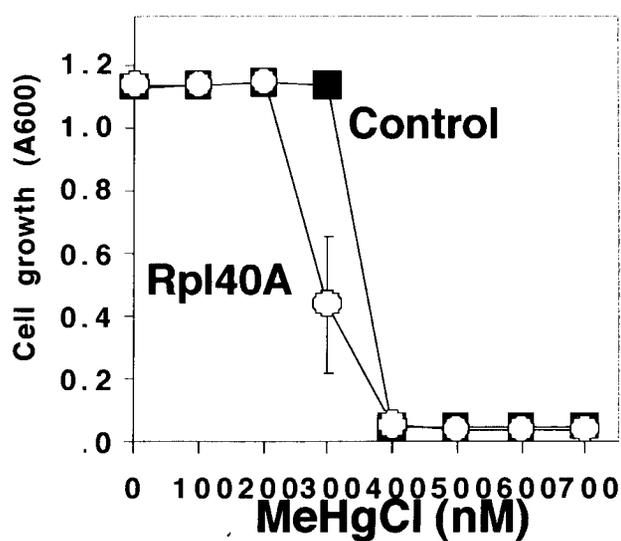
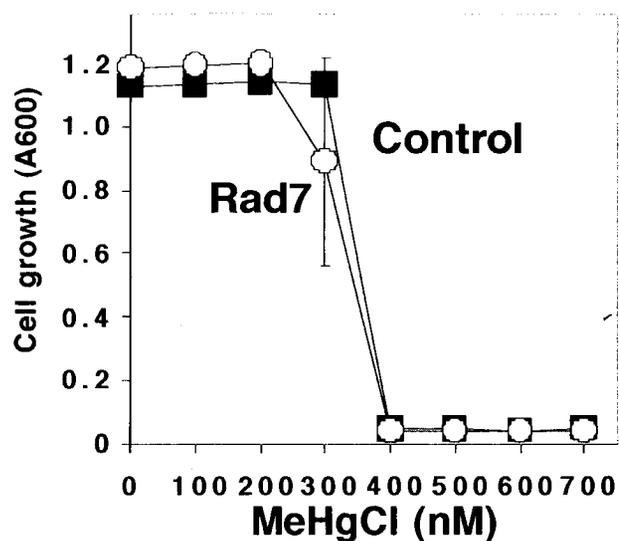
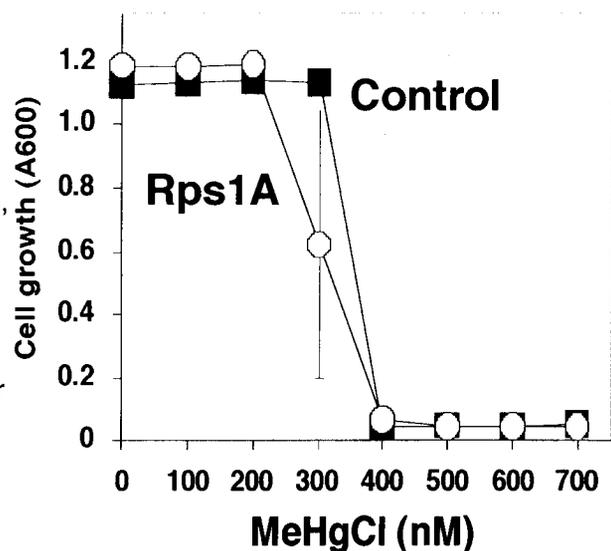


Figure 7-3. Effect of overexpression of Rad23-binding proteins on sensitivity to methylmercury

Yeast cells carrying plasmids *RAD7*-pKT10 (Rad7), *RAD14*-pKT10 (Rad14), *RPL40A*-pKT10 (Rpl40A), *RPL40B*-pKT10 (Rpl40B), *RPS1A*-pKT10 (Rps1A) or pKT10 (Control; black square), as indicated, were grown in SD(-uracil) medium that contained MeHgCl. After 24 and 48-hr incubation, absorbance at 600 nm was measured spectrophotometrically. Each point and bar represent the mean value and S. D. results from four cultures. The absence of a bar indicates that the S. D. falls within the symbol.



(4) 酵母のメチル水銀耐性獲得機構における Rad23 と Png1 の 関係

[目 的]

Rad23 がある種の蛋白質のプロテアソームにおける分解を抑制し、その蛋白質の細胞内濃度を維持することによってメチル水銀毒性に対して防御的に働く可能性が考えられ、その蛋白質候補として Png1、Ddi1 および Ufd2 が (3) で挙げられた。そこでまず、Png1 と Rad23 の関係について検討した。Png1 は細胞内で Rad23 と結合し得る蛋白質として報告されている(32)が、Png1 の細胞内濃度に対する Rad23 高発現の影響は検討されていない。そこで、Png1 の細胞内濃度と Rad23 の関係を検討した。さらに、Png1 の機能として報告されている PNGase 活性とメチル水銀耐性との関係を調べるために、PNGase 活性を喪失させた mutant を作製し、この mutant 高発現が酵母のメチル水銀感受性に与える影響についても検討した。

[結果および考察]

1. Rad23 高発現が細胞内の Png1 量に与える影響

Png1-HA を高発現させた酵母を用いて細胞内 Png1-HA 量の変化を検討したところ、FLAG-Rad23 の高発現による Png1-HA 量の顕著な増加が観察された(Figure 8)。この現象が、Rad23 の機能の一つである蛋白質分解阻害による可能性が考えられる。そこで次に、Rad23 の高発現が Png1 の細胞内分解速度に与える影響を検討した。Png1-HA 単独発現酵母および Png1-HA/FLAG-Rad23 共発現酵母をそれぞれ蛋白質合成阻害剤である cycloheximide で処理し、その後の細胞内 Png1-HA 量の変動を経時的に測定したところ、Png1-HA 単独発現酵母の Png1-HA 量は経時的に減少したのに対して、Png1-HA/FLAG-Rad23 共発現酵母では Png1-HA 量の減少が培養後 16 時間においても殆

ど認められなかった(Figure 9)。この結果から、Png1 が Rad23 によって分解阻害を受けている可能性が考えられる。

2 Png1 のユビキチン化

Rad23 はユビキチン化蛋白質の分解を阻害する機能を持つ蛋白質であることが報告されているが、これはユビキチン化蛋白質のユビキチン鎖部分に結合して、それ以上のユビキチン鎖の伸長を阻害することによるものと考えられる(12,15)。そこで、Png1-HA 単独発現酵母および Png1-HA/FLAG-Rad23 共発現酵母の抽出液について抗 HA 抗体で免疫沈降を行った後に抗 FLAG 抗体を用いた Western blotting により FLAG-Rad23 を検出したところ、Png1-HA/ FLAG-Rad23 共発現酵母でのみ FLAG-Rad23 のバンドが認められた(Figure 10)。同様に抗 HA 抗体または抗ユビキチン抗体を用いた Western blotting により Png-HA を検出したところ、Png1-HA 単独発現酵母において、抗 HA 抗体によって Png1-HA がスメア状に検出されると共に、抗ユビキチン抗体によってもユビキチン化蛋白質検出の際に現れるものと同様なスメア状のバンドが検出された。また、この抗ユビキチン抗体または抗 HA 抗体で検出された高分子量側のバンドは FLAG-Rad23 の共発現によってさらに濃くなった。これらの結果から、Png1 は細胞内でユビキチン化された後にプロテアソームで分解されるが、酵母に Rad23 を高発現させることによってユビキチン・プロテアソームシステムによる分解を免れ、その細胞内濃度が維持されることによって酵母がメチル水銀耐性を示すという可能性が考えられる。

3. Png1 のユビキチン結合部位 point mutation が細胞内 Png1 量に与える影響

ごく最近、Png1 がユビキチンと結合することが他のグループによって報告され、この結

合が Png1 の 110 番目のリシン残基を介したものである可能性がマスマスペクトル解析により示された(33)。そこでこのリシン残基をアラニンに置換したアミノ酸変異 mutant を作成し、Png1 のユビキチン化に対する影響を検討した。Png1 がユビキチンによる修飾後、分解される蛋白質であるならば、ユビキチン結合部位に変異を入れることによって分解シグナルとなるユビキチンが結合出来なくなるので Png1 の分解速度が遅延し、細胞内の Png1 量が増加すると考えられる。また Rad23 も、Png1 の 110 番目のリシン残基に結合したユビキチンに結合することで分解阻害機能を発揮すると考えられるので、Png1 のユビキチン結合部位に変異を入れることによって Png1 と Rad23 の結合にも影響が生じると考えられる。そこで Png1-HA、もしくは Png1 ユビキチン化部位の mutant(以下 Png1-HA/K110A) をそれぞれ単独、または Rad23 と共に高発現させた酵母の抽出液について抗 HA 抗体を用いた Western blotting により Png1-HA を検出したところ、Png1-HA または Png1-HA/K110A を FLAG-Rad23 と共に発現させた酵母両方で同様な Png1-HA 量の顕著な増加が認められた(Figure 11)。また、同じ抽出液について抗 HA 抗体で免疫沈降を行った後に抗 FLAG 抗体を用いた Western blotting により FLAG-Rad23 を検出したところ、Png1-HA または Png1-HA/K110A を FLAG-Rad23 と共に発現させた酵母両方で同様な FLAG-Rad23 のバンドが認められた(Figure 12)。抗 HA 抗体または抗ユビキチン抗体を用いた Western blotting により Png1-HA もしくは Png1-HA/K110A を検出したところ、Png1-HA もしくは Png1-HA/K110A を発現させた酵母において、検出されたユビキチン化 Png1 量にそれ程の違いが認められず、Png1-HA/K110A も正常な Png1 とほぼ同様な細胞内動向を示すことが判明した。

これらの結果より、Png1 のユビキチン結合部位は報告のある一箇所ではなく、よりユビキチン化されやすい他の部位の存在が示唆される。

4. Png1 の PNGase 活性が酵母のメチル水銀感受性に与える影響

Png1 は細胞内において糖蛋白質の脱 N-グリコシル化を担う PNGase 活性を持つことが知られている(23)。PNGase 活性の上昇が酵母にメチル水銀耐性を与える可能性を考え、PNGase 活性を喪失させるアミノ酸変異(34)を導入した Png1(以下 Png1/H218A、Png1/K235A)の高発現が酵母のメチル水銀感受性に与える影響を検討したところ、上記二種の変異 Png1 の高発現酵母はメチル水銀耐性を示さなかった(Figure 13)。この結果から、Png1 持つ活性である PNGase 活性が酵母のメチル水銀耐性獲得に必須である可能性が考えられる。Rad23 高発現によって細胞内濃度が維持された Png1 の量的な PNGase 活性の上昇が、メチル水銀によって何らかの修飾を受け、毒性を生じるようになった糖蛋白質の分解を促進し、毒性軽減に関与する可能性が考えられる。

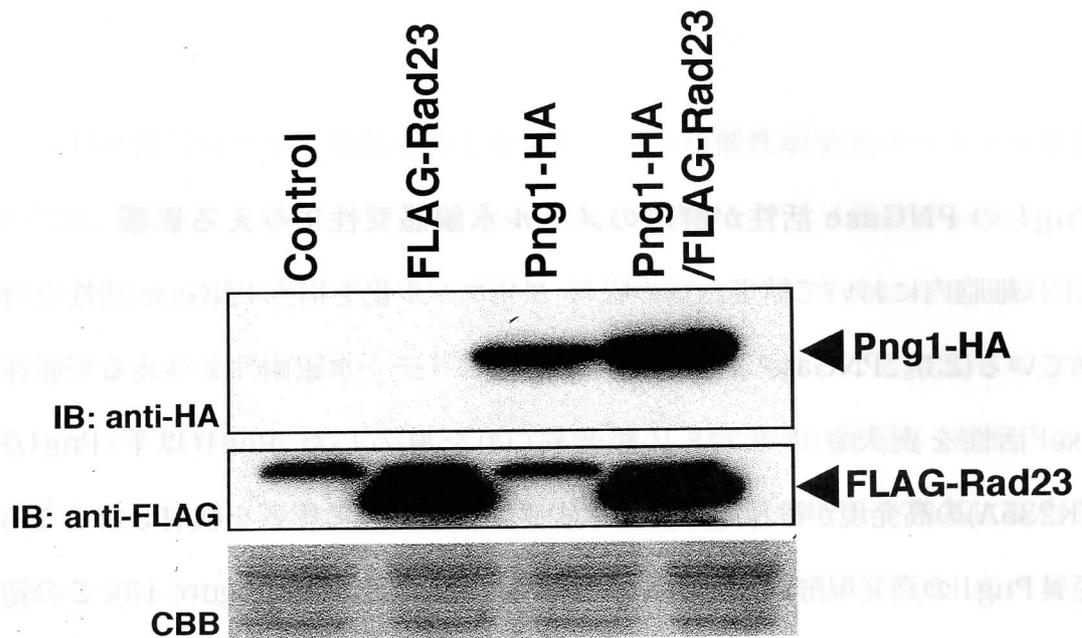


Figure 8. Effect of overexpression of Rad23 on Png1 concentration

Yeast cells carrying plasmids FLAG-*RAD23*-pKT10 /pKT10(Trp), pKT10/*PNG1*-HA-pKT10(Trp), FLAG-*RAD23*-pKT10 /*PNG1*-HA-pKT10(Trp) or pKT10/pKT10(Trp) (Control), as indicated, were grown in SD(-uracil, -tryptophan) medium. Lysates of these cells were subjected to immunoblotting analysis with anti-HA antibody (upper panel) and anti-FLAG antibody (middle panel). Staining with Coomassie blue (lower panel) is shown as an indication of the amount of total protein loaded.

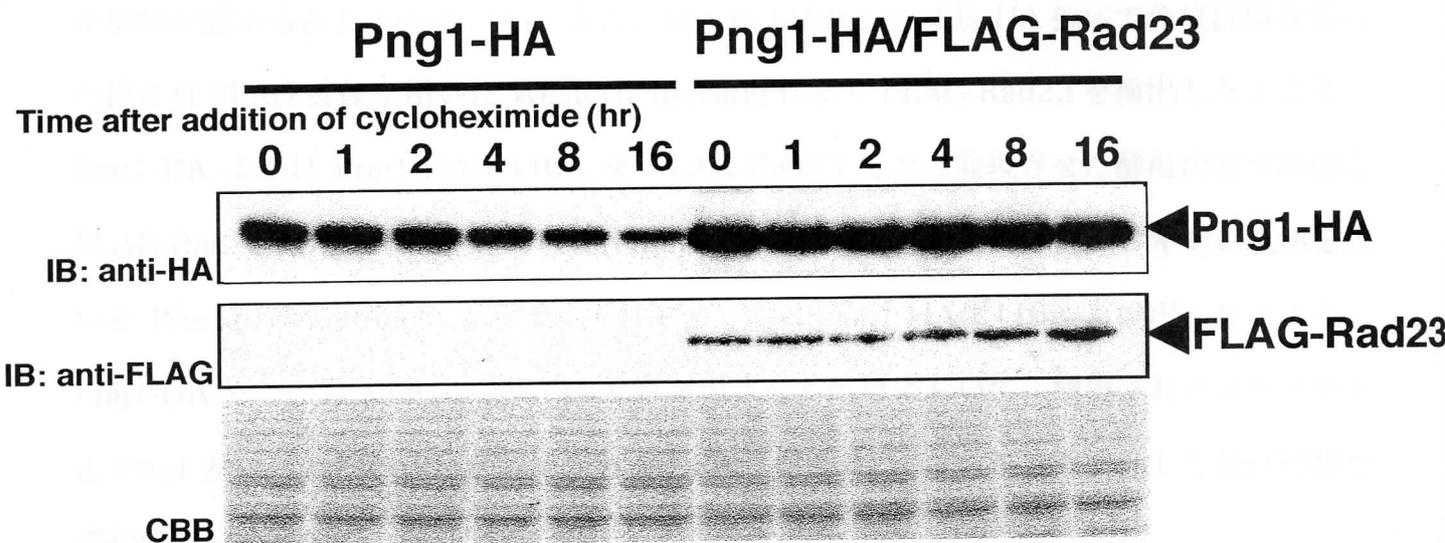


Figure 9. Effect of overexpression of Rad23 on Png1 turnover

Yeast cells carrying plasmids pKT10/*PNG1*-HA-pKT10(Trp) or FLAG-*RAD23*-pKT10 /*PNG1*-HA-pKT10(Trp) as indicated, were grown in SD(-uracil, -tryptophan) medium at the indicated time in the presence of 100 μ g/mL cycloheximide. Lysates of these cells were subjected to immunoblotting analysis with anti-HA antibody (upper panel) and anti-FLAG antibody (middle panel). Staining with Coomassie blue (lower panel) is shown as an indication of the amount of total protein loaded.

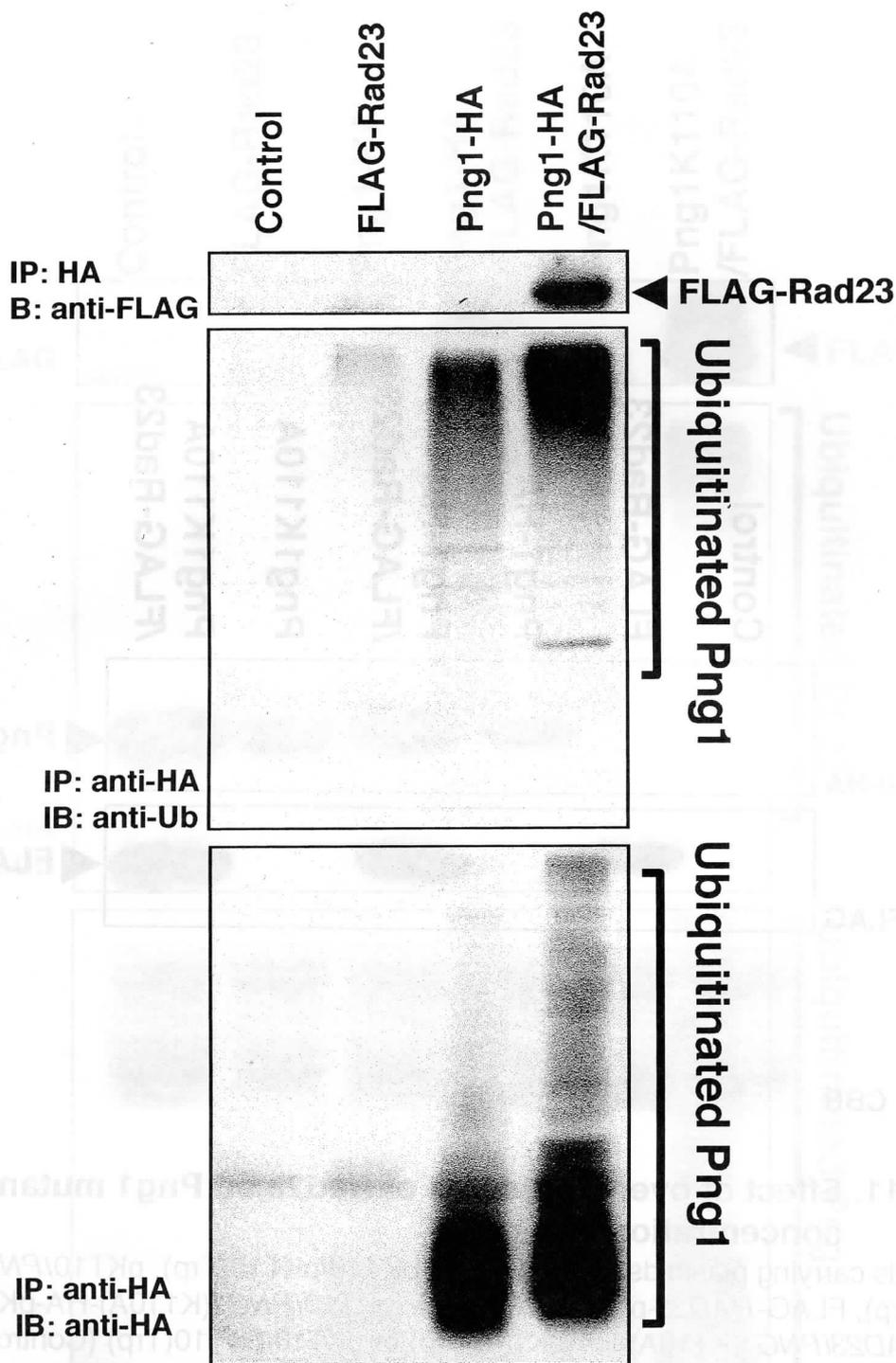


Figure 10. Effect of overexpression of Rad23 on the levels of Png1 ubiquitination

Yeast cells carrying plasmids FLAG-*RAD23*/pKT10(Trp), pKT10/*PNG1*-HA-pKT10(Trp), FLAG-*RAD23*-pKT10/*PNG1*-HA-pKT10(Trp) or pKT10/pKT10(Trp) (Control), as indicated, were grown in SD(-uracil,-tryptophan) medium. Lysates of these cells were immunoprecipitated with anti-HA agarose conjugate, and subjected to immunoblotting analysis with anti-FLAG antibody (upper panel), ubiquitin-specific antibody (middle panel) and anti-HA antibody (lower panel).

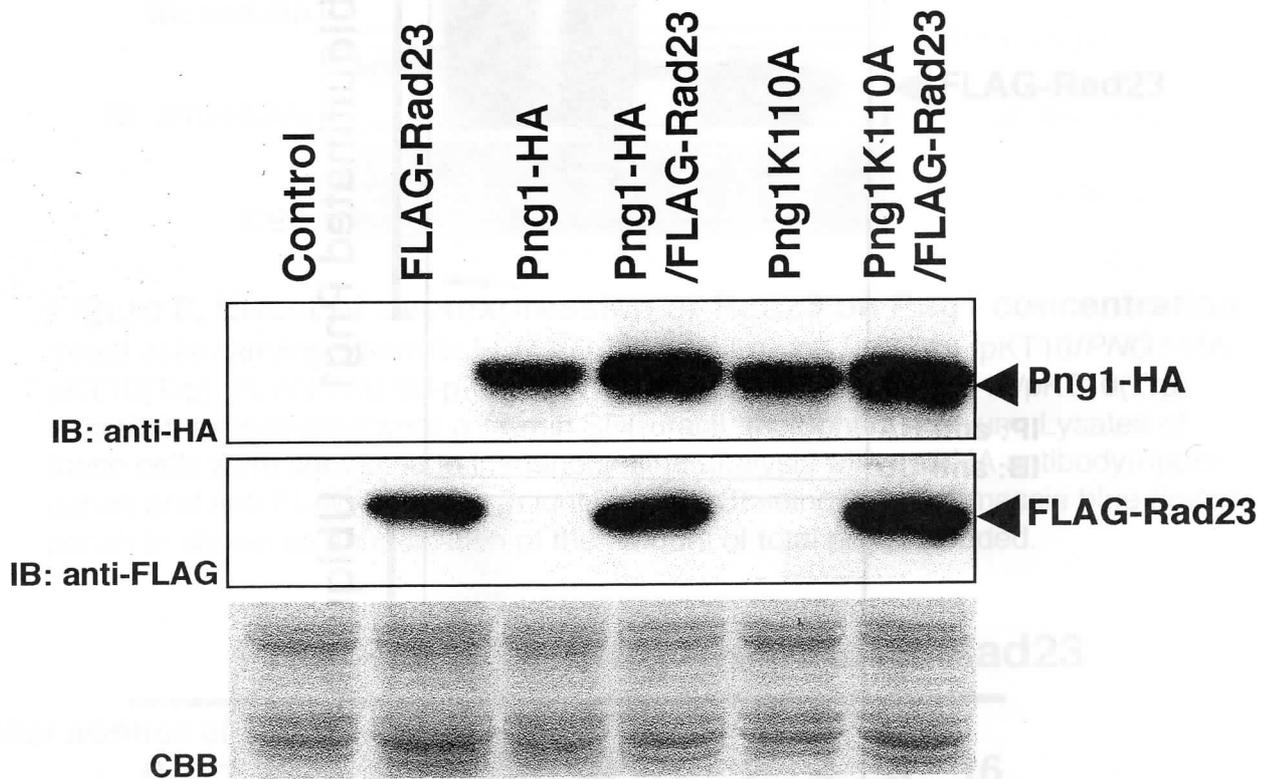


Figure 11. Effect of overexpression of Rad23 on Png1 mutant concentration

Yeast cells carrying plasmids FLAG-*RAD23*-pKT10/pKT10(Trp), pKT10/*PNG1*-HA-pKT10(Trp), FLAG-*RAD23*-pKT10/*PNG1*-HA, pKT10/*PNG1*(K110A)-HA-pKT10(Trp), FLAG-*RAD23*/*PNG1*(K110A)-HA-pKT10(Trp) or pKT10/pKT10(Trp) (Control), as indicated, were grown in SD(-uracil,-tryptophan) medium. Lysates of these cells were subjected to immunoblotting analysis with anti-HA antibody (upper panel) and anti-FLAG antibody (middle panel). Staining with Coomassie blue (lower panel) is shown as an indication of the amount of total protein loaded.

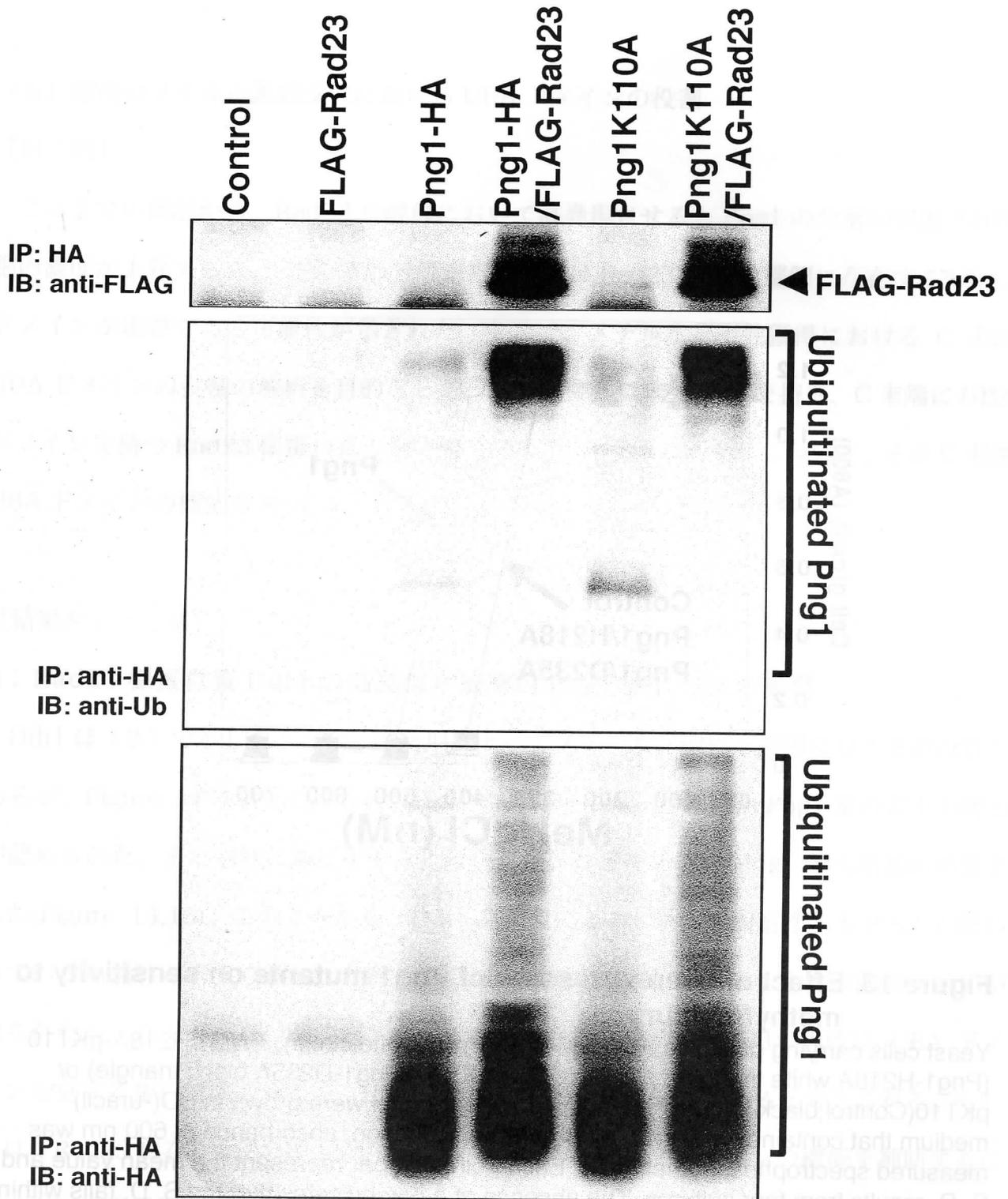


Figure 12. Effect of overexpression of Rad23 on the levels of ubiquitination of Png1 mutant

Yeast cells carrying plasmids FLAG-*RAD23*-pKT10/pKT10(Trp), pKT10/*PNG1*-HA-pKT10(Trp), FLAG-*RAD23*-pKT10/*PNG1*-HA-pKT10(Trp) or pKT10/pKT10(Trp) (Control), as indicated, were grown in SD(-uracil,-tryptophan) medium. Lysates of these cells were immunoprecipitated with anti-HA agarose conjugate, and subjected to immunoblotting analysis with anti-FLAG antibody (upper panel), ubiquitin-specific antibody (middle panel) and anti-HA antibody (lower panel).

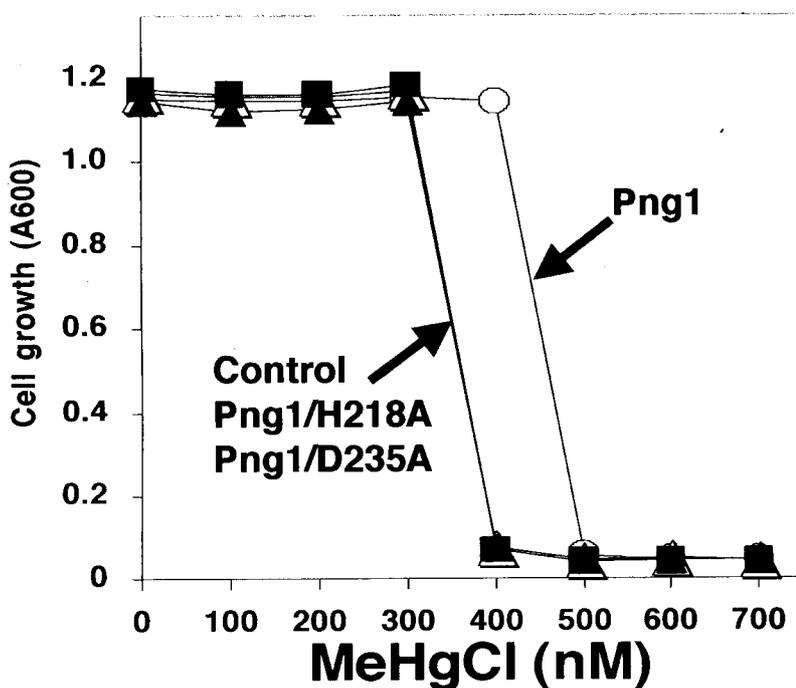


Figure 13. Effect of overexpression of Png1 mutants on sensitivity to methylmercury

Yeast cells carrying plasmids *PNG1*-pKT10 (Png1;white circle), *PNG1/H218A*-pKT10 (Png1-H218A;white triangle), *PNG1/D235A*-pKT10 (Png1-D235A;black triangle) or pKT10(Control;black square), as indicated upper panel,were grown in SD(-uracil) medium that contained MeHgCl. After a 48-hr incubation, absorbance at 600 nm was measured spectrophosphometrically. Each point and bar represent the mean value and S. D. results from four cultures. The absence of a bar indicates that the S. D. falls within the symbol.

(5) 酵母のメチル水銀感受性における UBA ドメインの役割

[目的]

ここまでの検討から、Rad23 を酵母において高発現させると Png1 の分解が阻害され細胞内濃度が上昇すること、またその分解阻害作用には Rad23 の C 末端側に存在する UBA2 ドメインが重要である可能性が示された。そこで、メチル水銀耐性獲得における C 末端 UBA ドメインの役割の解析を目的として、N 末端に UbL ドメインを持ち、C 末端に UBA ドメインを持つ Rad23 様蛋白質として知られる Ddi1 および Dsk2 について、その C 末端 UBA ドメインの機能を Rad23 と比較した。

[結果および考察]

1. Rad23 様蛋白質 Ddi1 の高発現が細胞内 Png1 量に与える影響

Ddi1 は (2) で示したように、高発現によってメチル水銀耐性を酵母に与える蛋白質であるが、Figure 14 に示したように、Ddi1 の高発現によって細胞内 Png1 量の若干の増加が認められた。また同様にユビキチン化蛋白質量、ユビキチン化 Png1 量も増加が観察された(Figure 14,15)。このことから、Ddi1 高発現によるメチル水銀耐性にも Png1 が関わっている可能性が考えられる。ただし、Rad23 高発現酵母に見られるような顕著な増加が見られなかったことから、細胞内ユビキチン化蛋白質の分解阻害作用の程度は UBA ドメインを有する蛋白質間で異なり、Rad23 が特にその作用が顕著であると考えられる。もしくは、Rad23 に存在する UBA1 ドメインが C 末端の UBA2 ドメインの機能を補助することによって相乗的なユビキチン化蛋白質分解阻害作用を呈する可能性も否定できない。

2. Rad23 様蛋白質 Dsk2 の UBA ドメインが酵母のメチル水銀感受性に与える影響

Rad23 様蛋白質のうち Dsk2 を高発現させた酵母はメチル水銀に対して高感受性を示した。しかし Dsk2 を高発現させると生育阻害がかかることが報告されており、本研究で作成した Dsk2 高発現酵母においても明らかな growth の低下が観察された。このことから、Dsk2 高発現が示すメチル水銀感受性は見かけ上のものである可能性も考えられる。そこで、Dsk2 の UBA ドメインのみの役割を解析する目的で、Dsk2 の UBA ドメインのみを Rad23 の UBA2 ドメインに置き換えたキメラ Rad23 を酵母に高発現させてメチル水銀感受性に与える影響を検討したところ、顕著なメチル水銀耐性を示した(Figure 16)。この結果より、Rad23 高発現によって酵母に与えられるメチル水銀耐性は作用の大小こそあれ、UBA ドメインを持つ蛋白質が共通に持つ機能であるものと考えられる。

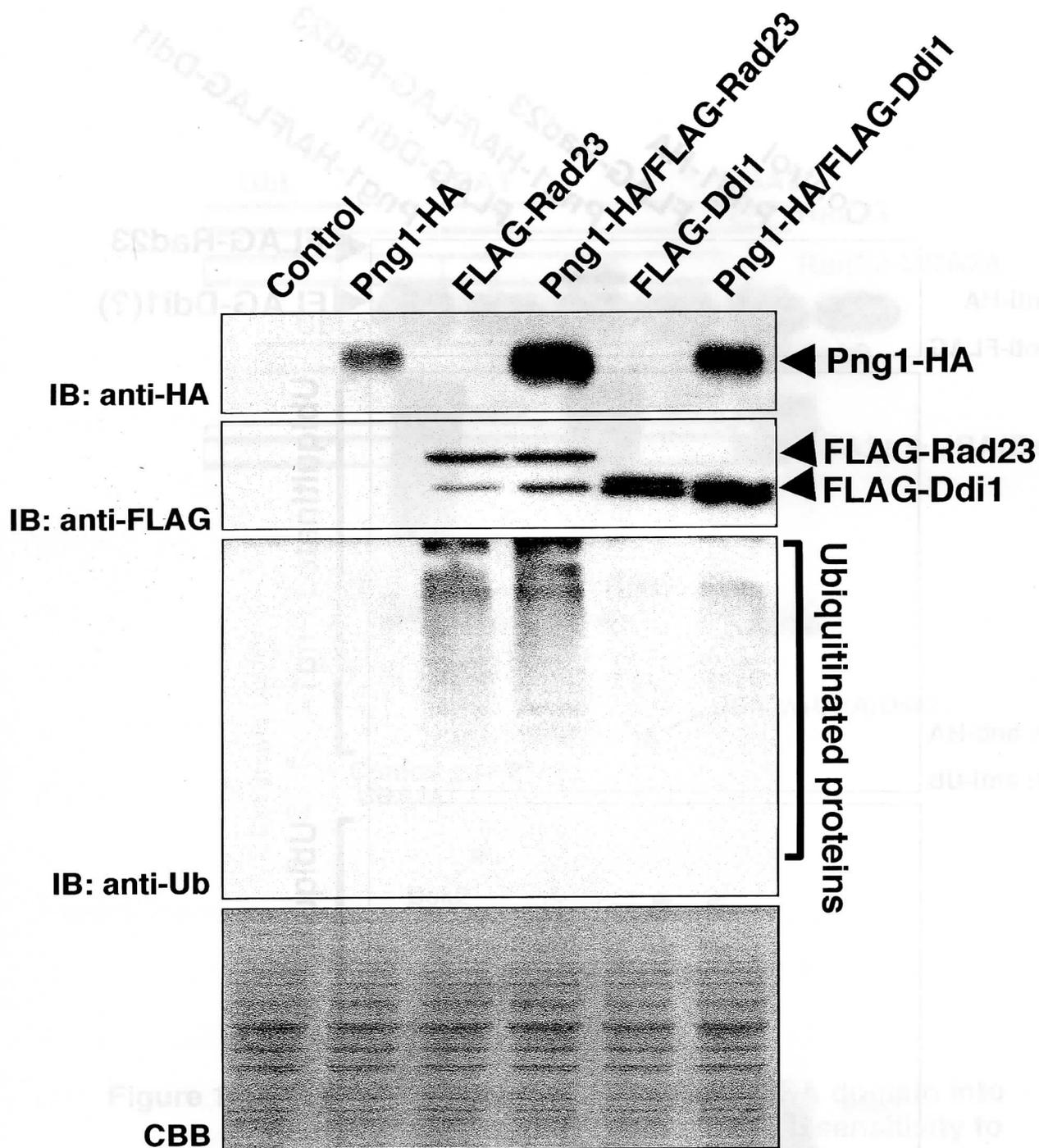


Figure 14. Effect of overexpression of Ddi1 on the ubiquitination of intracellular proteins

Yeast cells carrying plasmids FLAG-*RAD23*-pKT10, FLAG-*DDI1*-pKT10 or pKT10(Control) with *PNG1*-HA-pKT10, as indicated, were grown in SD(-uracil, -tryptophan) medium. Lysates of these cells were subjected to immunoblotting analysis with anti-HA antibody (upper panel) and ubiquitin-specific antibody (middle panel). Staining with Coomassie blue (lower panel) is shown as an indication of the amount of total protein loaded.

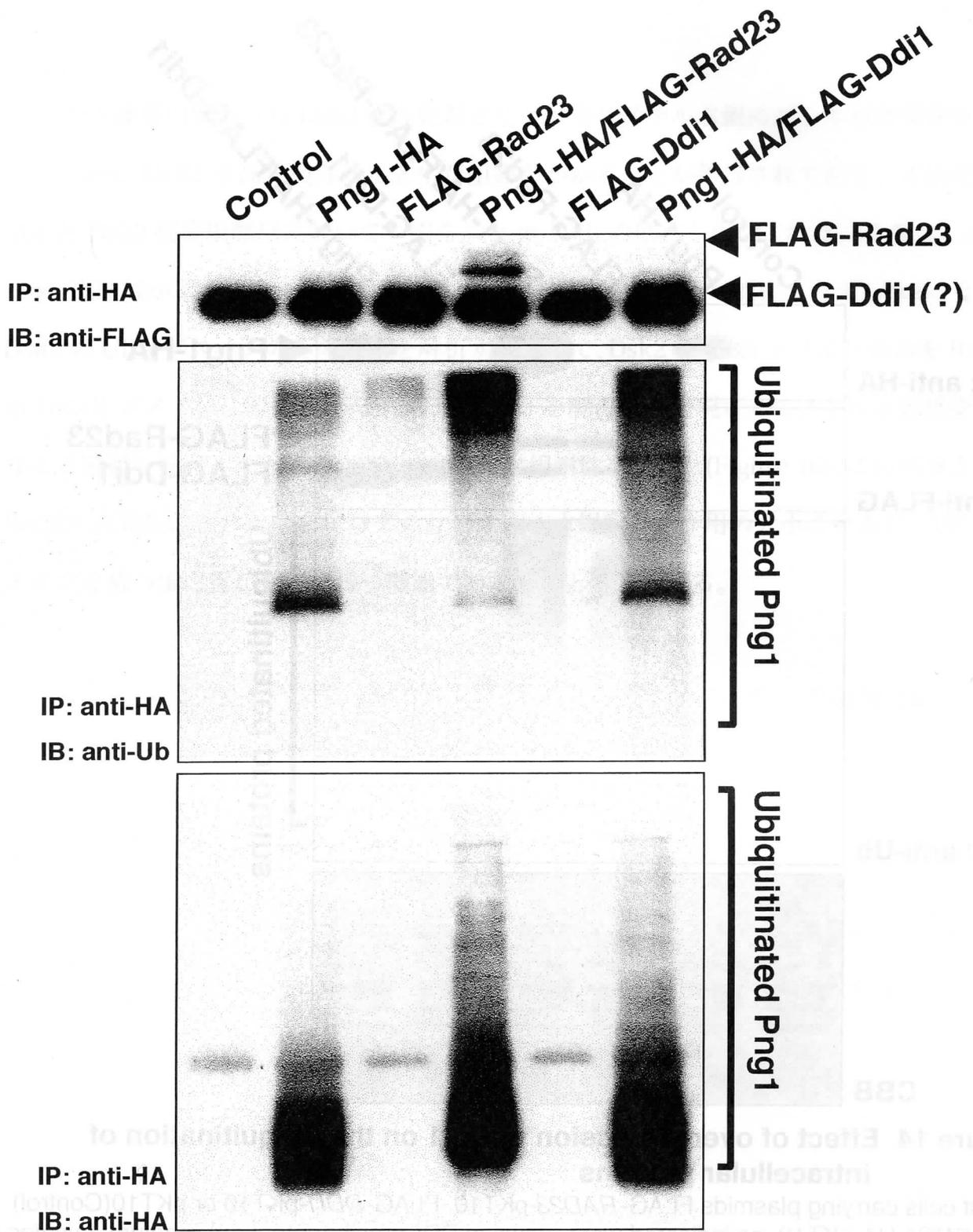


Figure 15. Effect of overexpression of Ddi1 on Png1 ubiquitination

Yeast cells carrying plasmids *FLAG-RAD23*-pKT10, *FLAG-DDI1*-pKT10 or pKT10(Control) with *PNG1*-HA-pKT10, as indicated, were grown in SD(-uracil, -tryptophan) medium. Lysates of these cells were immunoprecipitated with anti-HA agarose conjugate, and subjected to immunoblotting analysis with anti-FLAG antibody (upper panel), ubiquitin-specific antibody (middle panel), and anti-HA antibody (lower panel).

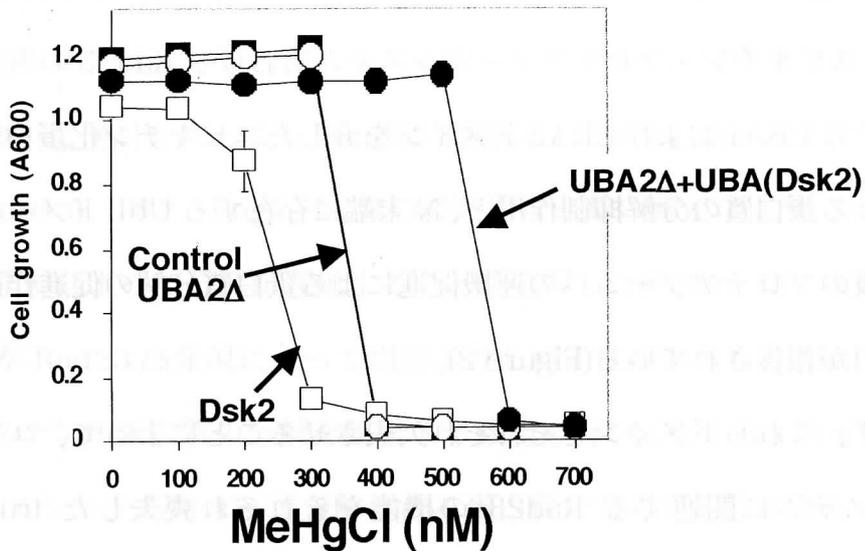
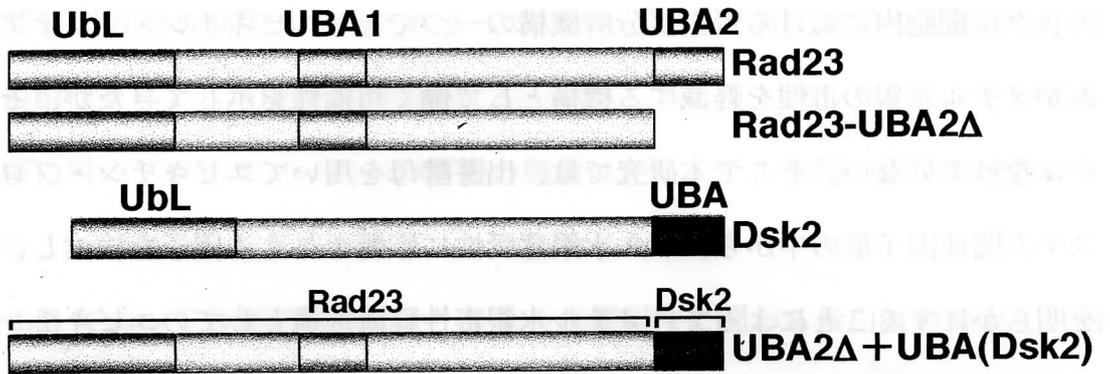


Figure 16. Effect of overexpression of Dsk2-UBA domain into Rad23-UBA2Δ-truncation mutants on sensitivity to methylmercury

Yeast cells carrying plasmids *Dsk2*-pKT10 (*Dsk2*), *Rad23*-UBA2Δ-pKT10 (UBA2Δ), *DSK2*-UBA into RAD23-UBA2Δ-pKT10 (UBA2Δ+UBA(*Dsk2*)) or pKT10(Control), as indicated upper panel, were grown in SD(-uracil) medium that contained MeHgCl. After a 48-hr incubation, absorbance at 600 nm was measured spectrophotometrically. Each point and bar represent the mean value and S. D. results from four cultures. The absence of a bar indicates that the S. D. falls within the symbol.

(6) まとめ

我々は細胞内における蛋白質分解機構の一つであるユビキチン・プロテアソームシステムがメチル水銀の毒性を軽減する機構として働く可能性を示してきたが、その詳細は明らかになっていない。そこで本研究では、出芽酵母を用いてユビキチン・プロテアソームシステム関連因子群の中からメチル水銀感受性に影響を与える因子を検索し、その作用機構を明らかにすることによって、メチル水銀毒性軽減機構としてのユビキチン・プロテアソームシステムの役割の解明を目指した。

その検索の結果、Rad23 の高発現が酵母にメチル水銀耐性を与えることを見出した (Figure 1)。ユビキチン・プロテアソームシステムにおける Rad23 の機能として、その構造中に存在する UBA1 および UBA2 ドメインを介したユビキチン化蛋白質のユビキチン鎖伸長阻害による蛋白質の分解抑制作用と、N 末端に存在する UbL ドメインを介したユビキチン化蛋白質のプロテアソームへの運搬促進による蛋白質分解の促進作用、という相反する二つの作用が報告されている (Figure 2)。

そこでまず、これらドメインをそれぞれ欠失させることによって、ユビキチン・プロテアソームシステムに関連する Rad23 の機能をそれぞれ喪失した truncation mutants (Figure 3) の高発現が、メチル水銀感受性および酵母内ユビキチン化蛋白質量に与える影響を検討した。その結果、UbL ドメインを欠失させた蛋白質を高発現させた酵母は全長の Rad23 を高発現させた酵母よりも強いメチル水銀耐性を示し、UBA1 ドメイン欠失 Rad23 を高発現させた酵母は全長 Rad23 高発現酵母よりも耐性割合が弱く、UBA2 欠失、もしくは両 UBA 欠失 Rad23 高発現酵母はメチル水銀耐性を殆ど示さなかった (Figure 4)。このことから、UBA2 ドメインがメチル水銀耐性に重要であり、UbL ドメインは逆にメチル水銀毒性軽減作用には抑制的であることが示された。一方、Rad23 高発現によって細胞内ユビキチン化蛋白質量の顕著な増加が認められた (Figure 5) が、この現象にも UBA2 ドメイ

ンが重要であることが示された(Figure 6)。このことから、ある種の蛋白質のプロテアソームにおける分解を Rad23 が抑制することによって、その蛋白質の細胞内濃度を維持し、酵母にメチル水銀耐性を与える可能性が考えられる。またこのとき、UbLドメインを介するユビキチン化蛋白質のプロテアソームへの運搬の機能は逆にメチル水銀の毒性を増強させる作用を有することが明らかとなった。

そこで、Rad23 によって分解阻害を受け、メチル水銀耐性に関わる蛋白質の検索を目的として、Rad23 との結合が報告されている蛋白質の中から高発現によって酵母にメチル水銀耐性を与える蛋白質を検索したところ、Ddi1、Ufd2 および Png1 が、それぞれ高発現によって酵母にメチル水銀耐性を与えることが判明した(Figure 7)。そこでまず、Png1 と Rad23 の関係について検討したところ、Rad23 高発現による細胞内 Png1 量の顕著な増加が認められた(Figure 8)。また、Png1-HA 量の経時的な変動の測定により、Png1-HA 量は FLAG-Rad23 高発現によって分解が遅延することが判明した(Figure 9)。これらの結果から、Png1 の分解が Rad23 高発現によって阻害される可能性が考えられる。

Rad23 はユビキチン化蛋白質の分解を阻害する機能を持つことから、Png1 がユビキチン・プロテアソームシステムによって分解される蛋白質である可能性が考えられる。そこで、Png1 が細胞内においてユビキチン化される蛋白質であるのかを検討したところ、Png1 はユビキチンによる修飾を受けることが判明した (Figure 10)。また、このユビキチン化 Png1 量は Rad23 高発現によって増加した。これらの結果から、Png1 はユビキチン・プロテアソームシステムによって分解されるが、Rad23 を高発現させることによって分解を免れ、その細胞内濃度が維持されることによって酵母がメチル水銀耐性を示すものと考えられる。

また、ごく最近 Png1 の 110 番目のリシン残基がユビキチン結合部位となり得ることが示された。そこで、この部位のアミノ酸変異 mutant を作成し、Png1 のユビキチン化に対

する影響を検討したところ、細胞内動向は正常な Png1 のユビキチン化量と同じ程度であった(Figure 11,12)。この結果より Png1 のユビキチン結合部位は報告のある一箇所ではなく、よりユビキチン化されやすい他の部位が存在する可能性が考えられる。

Png1 は糖蛋白質の脱 N-グリコシル化を触媒する酵素で、細胞質において ER degradation に関わることが知られている。そこで、PNGase 活性の上昇が酵母にメチル水銀耐性を与える可能性を考え、PNGase 活性を喪失させるアミノ酸変異を導入した変異 Png1 の高発現が酵母のメチル水銀感受性に与える影響を検討したところ、変異 Png1 の高発現は酵母にメチル水銀耐性を与えなかった(Figure 13)。この結果より、Png1 高発現によるメチル水銀耐性獲得に PNGase 活性が必須である可能性が考えられる。

メチル水銀耐性獲得には Rad23 の C 末端側の UBA2 ドメインが重要な役割を果たしている可能性が考えられる。そこで、Rad23 と同様に UBA ドメインを持つ蛋白質である Ddi1 および Rad23 の UBA2 ドメインを Dsk2 の UBA ドメインに置き換えたキメラ Rad23(Rad23-UBA2D+UBA(Dsk2))の高発現がメチル水銀感受性に与える影響について検討したところ、それぞれを高発現させた酵母もメチル水銀に対して耐性を示した(Figure 7, 16)。また、Ddi1 を高発現させることによって、細胞内 Png1 量の若干の増加および Rad23 には劣るもののユビキチン化 Png1 量の増加が認められた(Figure 15)。これらの結果より、UBA ドメインを有する蛋白質はその高発現によって酵母にメチル水銀耐性を与えることが明らかとなった。

以上の結果より、Figure 17 に示すようなモデルが考えられる。Png1 は通常状態では細胞内でユビキチン化された後に速やかにプロテアソームで分解されるが、酵母に Rad23 をはじめとする UBA ドメインを含む蛋白質を高発現させることによってユビキチン・プロテアソームシステムによる分解を免れ、その細胞内濃度が維持されることによって酵母がメチル水銀耐性を示すものと考えられる。Png1 は細胞内において unfolding または

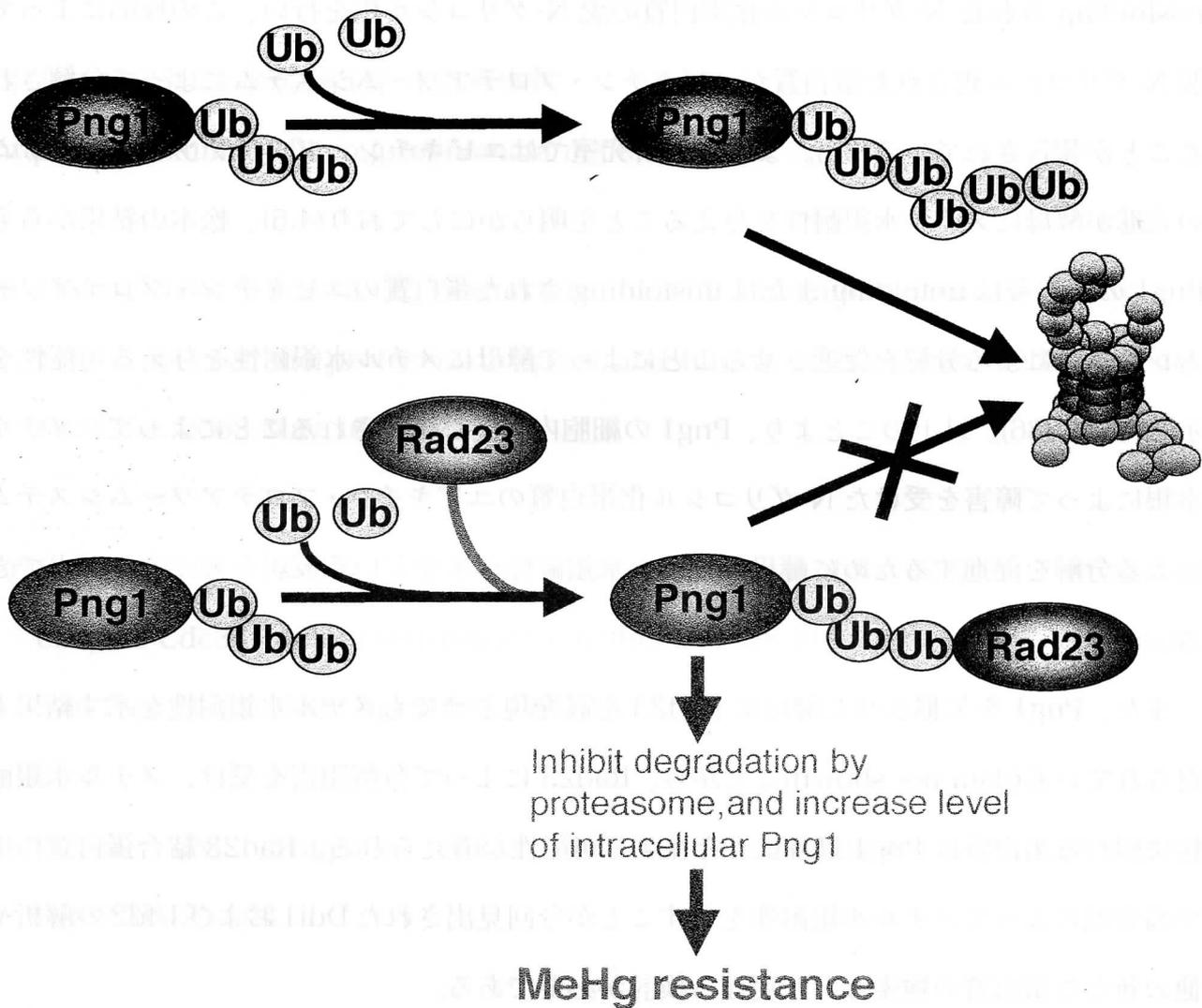


Figure 17. Model for Rad23-mediated resistance to methylmercury

misfolding された N-グリコシル化蛋白質の脱 N-グリコシル化を行い、この反応によって脱 N-グリコシル化された蛋白質がユビキチン・プロテアソームシステムによって分解されることが報告されている(35)。また、当研究室ではユビキチン・プロテアソームシステムの亢進が酵母にメチル水銀耐性を与えることを明らかにしており(4,5)、松本の結果からも Png1 の高発現は unfolding または misfolding された蛋白質のユビキチン・プロテアソームシステムによる分解を促進させることによって酵母にメチル水銀耐性を与える可能性を示している(36)。以上のことより、Png1 の細胞内濃度が維持されることによって、メチル水銀によって障害を受けた N-グリコシル化蛋白質のユビキチン・プロテアソームシステムによる分解を促進するために酵母がメチル水銀耐性を示すという仮説を考えることもできる。

また、Png1 を欠損させた酵母に Rad23 を高発現させてもメチル水銀耐性を示す結果も得られている(data not shown)ことから、Rad23 によって分解阻害を受け、メチル水銀耐性に関わる蛋白質は Png1 以外にも存在する可能性が考えられる。Rad23 結合蛋白質の中で高発現によってメチル水銀耐性を示すことが今回見出された Ddi1 および Ufd2 の解析や、他の新たな蛋白質の検索など、更なる検討が必要である。

[引用文献及びインターネットアドレス]

- 1) Castoldi AF, Coccini T, Manzo L. Neurotoxic and molecular effects of methylmercury in humans. *Rev Environ Health*. 2003 Jan-Mar;18(1):19-31.
- 2) Sanfeliu C, Sebastia J, Cristofol R, Rodriguez-Farre E. Neurotoxicity of organomercurial compounds. *Neurotox Res*. 2003;5(4):283-305.

3) 熊本日日新聞 水俣病百科 水俣病事典

<http://www.kumanichi.co.jp/minamata/m-jiten.html>

4) Hwang GW, Furuchi T, Naganuma A. A ubiquitin-proteasome system is responsible for the protection of yeast and human cells against methylmercury. *FASEB J.* 2002 May;16(7):709-711.

5) Furuchi T, Hwang GW, Naganuma A. Overexpression of the ubiquitin-conjugating enzyme Cdc34 confers resistance to methylmercury in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Pharmacol.* 2002 Apr;61(4):738-741.

6) Pickart CM. Ubiquitin enters the new millennium. *Mol Cell.* 2001 Sep;8(3):499-504.

7) 千葉智樹、田中啓二 ユビキチン様蛋白質とその蛋白質修飾システム
蛋白質・核酸・酵素 1999 May;44(6):744-751

8) Glickman MH, Ciechanover A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev.* 2002 Apr;82(2):373-428.

9) Clarke DJ, Mondesert G, Segal M, Bertolaet BL, Jensen S, Wolff M, Henze M, Reed SI. Dosage suppressors of *pds1* implicate ubiquitin-associated domains in

checkpoint control. *Mol Cell Biol.* 2001 Mar;21(6):1997-2007.

- 10) Watkins JF, Sung P, Prakash L, Prakash S. The *Saccharomyces cerevisiae* DNA repair gene RAD23 encodes a nuclear protein containing a ubiquitin-like domain required for biological function. *Mol Cell Biol.* 1993 Dec;13(12):7757-7765.
- 11) Schaubert C, Chen L, Tongaonkar P, Vega I, Lambertson D, Potts W, Madura K. Rad23 links DNA repair to the ubiquitin/proteasome pathway. *Nature.* 1998 Feb;391(6668):715-718.
- 12) Ortolan TG, Tongaonkar P, Lambertson D, Chen L, Schaubert C, Madura K. The DNA repair protein rad23 is a negative regulator of multi-ubiquitin chain assembly. *Nat Cell Biol.* 2000 Sep;2(9):601-608.
- 13) Chen L, Shinde U, Ortolan TG, Madura K. Ubiquitin-associated (UBA) domains in Rad23 bind ubiquitin and promote inhibition of multi-ubiquitin chain assembly. *EMBO Rep.* 2001 Oct;2(10):933-938.
- 14) Bertolaet BL, Clarke DJ, Wolff M, Watson MH, Henze M, Divita G, Reed SI. UBA domains of DNA damage-inducible proteins interact with ubiquitin. *Nat Struct Biol.* 2001 May;8(5):417-422.
- 15) Raasi S, Pickart CM. Rad23 ubiquitin-associated domains (UBA) inhibit 26 S proteasome-catalyzed proteolysis by sequestering lysine 48-linked polyubiquitin

- chains. *J Biol Chem.* 2003 Mar; 278(11): 8951-8959.
- 16)Chen L, Madura K. Rad23 promotes the targeting of proteolytic substrates to the proteasome. *Mol Cell Biol.* 2002 Jul;22(13):4902-4913.
- 17)Rao H, Sastry A. Recognition of specific ubiquitin conjugates is important for the proteolytic functions of the ubiquitin-associated domain proteins Dsk2 and Rad23. *J Biol Chem.* 2002 Apr;277(14):11691-11695.
- 18)Hofmann K, Bucher P. The UBA domain: a sequence motif present in multiple enzyme classes of the ubiquitination pathway. *Trends Biochem Sci.* 1996 May;21(5):172-173.
- 19)Elsasser S, Gali RR, Schwickart M, Larsen CN, Leggett DS, Muller B, Feng MT, Tubing F, Dittmar GA, Finley D. Proteasome subunit Rpn1 binds ubiquitin-like protein domains. *Nat Cell Biol.* 2002 Sep;4(9):725-730.
- 20)Walters KJ, Lech PJ, Goh AM, Wang Q, Howley PM. DNA-repair protein hHR23a alters its protein structure upon binding proteasomal subunit S5a. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Oct;100(22):12694-12699
- 21)Saeki Y, Sone T, Toh-e A, Yokosawa H. Identification of ubiquitin-like protein-binding subunits of the 26S proteasome. *Biochem Biophys Res Commun.*

2002 Aug; 296(4): 813-819.

22)Ptoteome bioknowledge Library
<https://www.incyte.com/control/tools/proteome>

23)Suzuki T, Park H, Lennarz WJ. Cytoplasmic peptide:N-glycanase (PNGase) in eukaryotic cells: occurrence, primary structure, and potential functions. FASEB J. 2002 May;16(7):635-641.

24)小胞体ストレス細胞死の分子機構と神経変性の抑制
<http://www.ncnp.go.jp/nin/guide/r5/momolab.outline2.htm>

25)Mori K. Tripartite management of unfolded proteins in the endoplasmic reticulum. Cell. 2000 May;101(5): 451-4.

26)Bertolaet BL, Clarke DJ, Wolff M, Watson MH, Henze M, Divita G, Reed SI. UBA domains mediate protein-protein interactions between two DNA damage-inducible proteins. J Mol Biol. 2001 Nov 9;313(5):955-963.

27)Hatakeyama S, Yada M, Matsumoto M, Ishida N, Nakayama KI. U box proteins as a new family of ubiquitin-protein ligases. J Biol Chem. 2001 Aug;276(35):33111-33120

- 28)Hatakeyama S, Nakayama KI. U-box proteins as a new family of ubiquitin ligases. *Biochem Biophys Res Commun.*2003 Mar 21;302(4):635-645.
- 29)Hatakeyama S, Nakayama KI. Ubiquitylation as a quality control system for intracellular proteins. *J Biochem (Tokyo).* 2003 Jul;134(1):1-8.
- 30)Funakoshi M, Sasaki T, Nishimoto T, Kobayashi H. Budding yeast Dsk2p is a polyubiquitin-binding protein that can interact with the proteasome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Jan;99(2):745-750.
- 31)Espinet C, de la Torre MA, Aldea M, Herrero E. An efficient method to isolate yeast genes causing overexpression-mediated growth arrest. *Yeast.* 1995 Jan;11(1):25-32.
- 32)Suzuki T, Park H, Kwofie MA, Lennarz WJ. Rad23 provides a link between the Png1 deglycosylating enzyme and the 26 S proteasome in yeast. *J Biol Chem.* 2001 Jun 15;276(24):21601-21607.
- 33)Peng J, Schwartz D, Elias JE, Thoreen CC, Cheng D, Marsischky G, Roelofs J, Finley D, Gygi SP. A proteomics approach to understanding protein ubiquitination. *Nat Biotechnol.* 2003 Aug;21(8):921-926.
- 34)Katiyar S, Suzuki T, Balgobin BJ, Lennarz WJ. Site-directed mutagenesis study of

- yeast peptide:N-glycanase. Insight into the reaction mechanism of deglycosylation. J Biol Chem. 2002 Apr;277(15):12953-12959.
- 35) Suzuki T, Yan Q, Lennarz WJ. Complex, two-way traffic of molecules across the membrane of the endoplasmic reticulum. J Biol Chem. 1998 Apr;273(17):10083-10086.
- 36) 松本 京子 ; 東北大学大学院薬学研究科修士論文 (2002)
- 37) Hanahan D. Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. J Mol Biol. 1983 Jun;166(4):557-580.
- 38) Gietz D, St Jean A, Woods RA, Schiestl RH. Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. Nucleic Acids Res. 1992 Mar;20(6):1425.
- 39) Schmitt ME, Brown TA, Trumpower BL. A rapid and simple method for preparation of RNA from Saccharomyces cerevisiae. Nucleic Acids Res. 1990 May;18(10):3091-2.
- 40) Saeki Y, Saitoh A, Toh-e A, Yokosawa H. Ubiquitin-like proteins and Rpn10 play cooperative roles in ubiquitin-dependent proteolysis. Biochem Biophys Res Commun. 2002 May;293(3):986-92.

本報告書収録の学術雑誌等発表論文は本ファイルに登録していません。なお、このうち東北大学在籍の研究者の論文で、かつ、出版社等から著作権の許諾が得られた論文は、個別に **TOUR** に登録しております。