

Fig. 21 Sensitivity of *VAC1* or *VPS45* deletion mutant to paraquat

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
（分担）研究報告書

メチル水銀毒性防御機構に関与するF-box蛋白質の同定

分担研究者 黄 基旭 東北大学大学院薬学研究科教務職員

我々は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、ユビキチン転移酵素 Cdc34 をコードする遺伝子である *CDC34* を見いだした。酵母を用いた検討により、Cdc34 は蛋白質のユビキチン化を促進することによってメチル水銀毒性に対して防御的に作用することが判明している。これらの結果は、細胞内にメチル水銀の毒性を増強させる蛋白質が存在し、メチル水銀に曝露された細胞はこの蛋白質のユビキチン化を促進させることによって本蛋白質の分解を促しメチル水銀の毒性を軽減しているという可能性を示唆している。そこでこのメチル水銀毒性を増強させる蛋白質を同定することを目的として、ユビキチン化反応において基質蛋白質の認識を担うサブユニットである F-Box 蛋白質の中からメチル水銀毒性の防御に関わる F-Box 蛋白質分子種を検索した。その結果、数種の F-Box 蛋白質が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。これら F-Box 蛋白質と結合する蛋白質を調べることによって、メチル水銀の毒性を増強させる目的蛋白質を同定できるものと期待される。

A. 研究目的

水銀化合物は農業、工業などの分野で幅広く使用されているため環境を汚染する可能性が高い。環境中で水銀化合物は微生物により容易にメチル水銀となり、河川や海洋中でメチル水銀はプランクトン中に高度に濃縮され、さらにプランクトンを捕食する魚類に濃縮される。この捕食の連鎖関係によってメチル水銀は濃

縮されていき、大型魚類中には海水中の百万倍以上の濃度のメチル水銀が蓄積することになる。また、メチル水銀は脂溶性が高いため、ヒトにおいても蓄積され感覚麻痺、言語障害、運動失調、視野狭窄、難聴などの重篤な中枢神経障害を引き起こすことが知られている（Castoldi *et al.*, 2001, Sanfeliu *et al.*, 2001, 矢ヶ崎ら, 1995）。特に妊娠中の女性が魚類

を多く摂取することにより、メチル水銀が胎盤移行し脳が未発達な胎児に影響を与え、生まれてくる子供に脳障害を引き起こす危険性があると考えられる。メチル水銀中毒は世界各国での報告があり、日本においても水俣病の原因物質であることが知られている。現在日本では水銀の廃棄等が規制されているため、新たな水銀中毒の発症者は出ていないが、水銀による環境汚染は今なお世界中で進んでいて、大きな社会問題となっている。しかし、メチル水銀による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。

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っている。酵母は分子生物学的に扱いやすい生物であり、外来遺伝子を発現させたり、染色体上の遺伝子を欠損させることが容易である事と、真核単細胞生物であり、ヒトなどの哺乳動物と機能的に共通する遺伝子が存在している事より、実験材料として有用な生物である。その遺伝子検索の結果、メチル水銀耐性遺伝子として、*CDC34*等を同定することに成功している (Furuchi *et al.*, 2002)。*CDC34*はユビキチン

転移酵素(E2)をコードしてい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おいて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 (Hershko *et al.*, 1998) (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が示唆された。すなわち、メチル水銀の毒性発現機構として、メチル水銀が何らかの細胞内蛋白質を修飾し、この修飾蛋白質が細胞毒性を引き起こす一方、ユビキチン・プロテアソームシステムがこの修飾蛋白質を分解することによってメチル水銀毒性に対する防御機構として機能する可能性を示してきた (Hwang *et al.*, 2002) (Fig. 2)。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蛋白質が存在する。F-box

蛋白質の中には、もともとcyclin Fで見つかったdomainと似た配列である約50アミノ酸残基から成るF-box domainを有しており、このdomainを介してE3の構成因子の一つであるSkp1と結合する。酵母ではdatebase (proteome (<https://www.incyte.com/proteome/>) より17種類のF-box蛋白質が知られている (Bai *et al.*, 1996, Feldman *et al.*, 1997, Skowyra *et al.*, 1997) (Fig. 3)。したがって、メチル水銀毒性に対する防御機構に関わるF-box蛋白質を同定することにより、このF-box蛋白質と結合するメチル水銀の細胞内標的分子を同定できる可能性があり、メチル水銀毒性の発現機構が明らかになるものと期待される。そこで、酵母におけるメチル水銀毒性防御機構に関わるF-box蛋白質の同定を試みた。

B. 研究方法

1. F-box 蛋白質発現 plasmid の作製

F-box 蛋白質をコードする遺伝子を酵母 chromosomal DNA を template とした PCR により cloning した。それぞれの PCR 産物は pTarget vector (Promega) (*DIA2*; *YDR306c*; *YLR097c*; *YNL311c*)あ

るいは pGEM-T EASY vector (Promega) (*CTF13*; *ELA1*; *UFO1*; *YDR219c*; *YJL149w*; *YLR224w*)を用いて TA cloning を行った後、適当な制限酵素 (*CTF13*, *ELA1*, *UFO1*, *YDR219c*, *YJL149w*, *YLR224w*-*EcoRI*; *DIA2*-*SaII* / *XhoI*; *YDR306c*, *YLR097c*, *YNL311c*-*KpnI* / *XhoI*) で切断後、酵母発現 vector である pKT10 に subcloning した。用いた primer は以下に記した。

pKT10-CTF13 sense ; 5'-TGACTGTGAGTCCCCAGAAGT-3'
antisense ; 5'-TAAAATACCGCCGGTTTTCC-3'
pKT10-DIA2 sense ; 5'-GACATGCAAAATGATTAGCC-3'
antisense ; 5'-AGGATACTGCATTATCATCAG-3'
pKT10-ELA1 sense ; 5'-AAATCGATTGATGTCGAGAT-3'
antisense ; 5'-GCCTTCGGAGTTGGGTTACT-3'
pKT10-UFO1 sense ; 5'-CCGACACTAGGGAATAAGACA-3'
antisense ; 5'-TGCTCTTCCAAATGTACATAC-3'
pKT10-YDR219c sense ; 5'-ATAGTTCCTTCAACCACATAG-3'
antisense ; 5'-AAAGTCGGTTTGAGGCGTTT-3'

pKT10-YDR306c sense ; 5'-
CATATCAACCACAGTACTCAG-3'

antisense ; 5'-
CACTGACTCTTATAAAACAAA-3'

pKT10-YJL149w sense ; 5'-
CACAGTGTTTACAACCTCAGC-3'

antisense ; 5'-
TATTTGAAGGGGAGTTGA-3'

pKT10-YLR224w sense ; 5'-
ATTGGCGCAAAGAAGACAGA-3'

antisense ; 5'-
GCATAGACGTATATACACAT-3'

pKT10-YLR097c sense ; 5'-
CCATAAGCTAAACTCAAGG-3'

antisense ; 5'-
AACAACTGCAAAAAACATCG-3'

pKT10-YNL311c sense ; 5'-
ACGTTCAAACCAACCGAATC-3'

antisense ; 5'-
AAAGTCCACTACAAAAAGTCA-3'

ウム溶液で 2×10^9 cells/ml になるように懸濁した。この懸濁液 50 μ l に酵母 plasmid DNA を 1 μ g、加熱変性サケ精子 DNA 50 μ g および 40% polyethyleneglycol (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 heat shock をかけた後に集菌し、SD 寒天培地上に塗布し、30°C で二日間培養した。この際、vector として用いた pKT10 中には uracil 合成酵素をコードする遺伝子 (*URA3*) が組み込まれているため、plasmid が導入された酵母 (形質転換体) のみが uracil を含まない培地中でも生育可能となる。また、pRS425 中には leucine 合成酵素をコードする遺伝子 (*LEU2*) が組み込まれているため、plasmid が導入された酵母 (形質転換体) のみが leucine を含まない培地中でも生育可能となる。

2. 酵母への plasmid の導入

酵母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 W303B 株を完全培地である YPD 培地 3 ml に植菌し一晩振盪培養した後、この培養液を YPD 培地で 2×10^6 cells/ml に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集菌し、100 mM 酢酸リチ

3. 定量 PCR 法による発現確認

Control および F-box 蛋白質高発現酵母をそれぞれ 2 ml の SD (-ura) 培地に植菌し 30°C で一晩振盪培養した後、 5×10^6 cells/ml を 50 ml の SD (-ura) 培地に移し、30°C で 3 時間振盪培養した。この培養液を、2,300xg、4°C で 5 分間遠心し、その沈殿に 10 ml の冷滅菌蒸留水を加えて振盪した後、2,300xg、4°C で 5 分間遠心して沈

殿として集菌した。得られた菌体に、400 μ l TES(10mM Tris·HCl(pH7.5), 10mM EDTA, 0.5% SDS)溶液を加え、さらに 400 μ l の acid phenol(phenol(ナカライテスク)30g に滅菌蒸留水を加え 50 ml にし、65°C 加温し phenol を溶解した後に 4°C にしたもの)を加え 65°C、1 時間加温した。その間 10 分毎に激しく攪拌することを 6 回繰り返した。その後、15,000xg、5 分間遠心して得られた水層に acid phenol 400 μ l を加えて再び 15,000xg、5 分間遠心して水槽を回収した。この溶液を ethanol によって沈澱させ、total RNA を抽出した。次に total RNA 3 μ g に oligo dT primer(0.5 μ g / μ l)1 μ l および滅菌蒸留水を加えて全量が 12 μ l となるように調製し、70°C で 10 分間インキュベートした後に 1 分間氷冷した。この溶液に 1st strand buffer 4 μ l、0.1 M DTT 2 μ l および 10 mM dNTP 1 μ l を加え、42°C で 5 分間インキュベートした後に、Moloney murine virus reverse transcriptase (M-MLV RT) 200 u 加え、42°C で 60 分間、70°C で 15 分間インキュベートした後に氷冷し RNase H 1 unit 加え 37°C で 20 分間インキュベートしたものを cDNA とした。この cDNA を template として The SYBR green PCR master mix および ACT1 ある

いは CTF13、DIA2、ELA1、UFO1、YDR219c、YDR306c、YJL149w、YLR224w、YLR097c、YNL311c の primer を最終濃度が 400 nM になるように反応溶液を調整した。なお、PCR の条件は 94°C 10 分間の反応を行い、続いて 94°C 30 秒、55°C 30 秒、74°C 30 秒の反応を 40 cycle 行った。このとき、経時的に蛍光の変化の検出を行った。また、cDNA が PCR によって目的の DNA が増幅したかどうかは融解曲線を調べることにより確認した。なお、この定量 PCR 法の結果は内標準対照遺伝子として一般的に発現量が一定であると考えられている ACT1 を用いて標準化した。用いた primer は以下に記した。

ACT1 sense ; 5'-
CAAGAGGACAGATACTACCAA-3'
antisense ; 5'-
AGCAGTAAGCGTGAAAAATCT-3'
pKT10-CTF13 sense ; 5'-
ATGCCTTCITTTCAATCCTGTT-3'
antisense ; 5'-
GCAATCATAGCGCAACCAAA-3'
pKT10-DIA2 sense ; 5'-
AGAACAATAAATAACACCCCGA-3'
antisense ; 5'-
AGCACGCACAGATGTTATCCA-3'
pKT10-ELA1 sense ; 5'-
CAAACACTATGTGAAATCTCA-3'

antisense ; 5'-
TTTTTCTCTTTCTTGCTGC-3'
pKT10-UFO1 sense ; 5'-
CTTGGTATTGCAGGACCTT-3'
antisense ; 5'-
CTACCAAACACTGCAGCATT-3'
pKT10-YDR306c sense ; 5'-
CAAACAAATCACGACCCAAG-3'
antisense ; 5'-
ATGGCGTACCAGTTTCTGCAA-3'
pKT10-YDR219c sense ; 5'-
TTGTAGTGTACAGATGCCGCT-3'
antisense ; 5'-
ACCAGGGATATGTTGTGACT-3'
pKT10-YJL149w sense ; 5'-
TGCCATTTCAAGATTATTTTC-3'
antisense ; 5'-
TCACTACATTTGAGTCGTTCA-3'
pKT10-YLR097c sense ; 5'-
AGATTATGAAAAGGACCCTAG-3'
antisense ; 5'-
GCAGGGTTGAAGTTCAGCATT-3'
pKT10-YLR224w sense ; 5'-
CGATAGCAGCTTGATGGATT-3'
antisense ; 5'-
TTCCTCCTGGACCAAAAAGTT-3'
pKT10-YNL311c sense ; 5'-
CGGTTGCAATTGTTTGGTAG-3'
antisense ; 5'-
CGTTTTGGAAAAGGAACTCA-3'

4. 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, 1993) によって行った。まず、single colony を SD 培地 2 ml に植菌し、30℃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。

5. PCR による遺伝子欠損の確認

Complete set of *Saccharomyces cerevisiae* deletion strains は遺伝子欠損酵母のライブラリーであり、欠損した遺伝子が選択マーカーとしてのジェネティシン耐性遺伝子に置き換わっている。そこで、遺伝子の欠損酵母の chromosomal DNA を抽出し、それを template として、その遺伝子の外側に設定した primer を用いて遺伝子領域を PCR により増幅し、得られた PCR 産物の大きさをアガロースゲル電気泳動で調べることにより、目的遺伝子欠損の有無を確認し

た。用いた primer は以下に記した。

FLM1 sense ; 5'-
TTAGTTACTAAAAGGCTCACA-3'

antisense ; 5'-
TGCTACTTTTGAAAACCTCC-3'

GRR1 sense ; 5'-
GTTTTGCGGTTTCCTTTATAC-3'

antisense ; 5'-
GGACAGTAAGTATTCAATGA-3'

YDR131c sense ; 5'-
TTTGAAAGGGCCCGAAAA-3'

antisense ; 5'-
TAACCGCCATGTCTCACAGTA-3'

YJL204c sense ; 5'-
AAACCAAAGAAAACAAAAGC-3'

antisense ; 5'-
TCCGCACTTCATACCTAT-3'

なお、DIA2、ELA1、UFO1、YDR219c、
YDR306c、YJL149w、YLR224w、
YLR097c、YNL311c については 2-
2-1 で用いた primer と同様のものを
用いた。

6. YBR203w、YLR097c、YLR224w 三重欠損株の作製

3. で得られた PCR 産物を、酢酸リ
チウム法により当研究室により既に
作製されていた YBR203w (廣島ら、
2001) に導入した。この PCR 産物は
ジェネティシン耐性遺伝子を含み、
その両端部に標的遺伝子部位での組

換えに必要な YLR224w 遺伝子との
相同配列を持っている。これによっ
て得られたジェネティシン耐性の
colony を、遺伝子欠損株の候補 clone
とし、chromosomal DNA を抽出し、
PCR により、目的遺伝子欠損の有無
を確認した。次に、1. で得られた
pTarget-YLR097c を YLR097c 遺
伝子の中で切断される制限酵素
(NruI) で処理したものと、pYES2 の
plasmid から制限酵素(ApaI/NheI)
処理により得られた URA3 マーカー
を ligation した plasmid を作製した。
targeting vector はこの plasmid を
template として PCR により合成し
た。ここで合成した targeting vector
は、その両端部に標的遺伝子部位で
の組換えに必要な YLR097c 遺伝子と
の相同配列を持っている。この PCR
産物を、酢酸リチウム法により先の
二重欠損酵母に導入することによっ
て得られた uracil 非要求性の colony
を、遺伝子欠損株の候補 clone とし、
chromosomal DNA を抽出し、PCR
により、目的遺伝子欠損の有無を確
認した。これにより、YBR203w、
YLR097c、YLR224w の三重欠損酵
母を作製した。

7. 酵母のメチル水銀に対する感受 性

酵母の single 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 SD 培地で 1×10^4 cells/ $180 \mu\text{l}$ になるように希釈した。この希釈培養液を 96-well plate に $180 \mu\text{l}$ 添加後、塩化メチル水銀（最終濃度 $0 \sim 140 \text{ nM}$ ） $20 \mu\text{l}$ を添加し 30°C で 48 時間培養後、 620 nm の吸光度を測定して酵母の増殖を調べた。なお、対照として vector のみを導入した酵母を用いた。

C. 結果・考察

1. F-box 蛋白質高発現のメチル水銀毒性に対する影響

F-box 蛋白質を高発現させることにより F-box 蛋白質の基質認識が亢進し、細胞内で蛋白質の分解が促進されることが考えられることから、F-box 蛋白質発現ベクターを作製し、それにより F-box 蛋白質高発現酵母を得た。定量 PCR 法による発現確認をしたところ、F-box 蛋白質高発現酵母の mRNA の量は vector のみを導入した酵母と比べて、約 30 から 50 倍であった。

次に、F-box 蛋白質高発現酵母を用いてメチル水銀毒性に対する感受性を検討した。その結果、Ctf13、Dia2、Ela1、Ydr306c、Ydr219c、Yjl149w、Ynl311c は高発現させても酵母のメチル水銀毒性に対する感受性は親株とほとんど同じであった (Fig. 4)。

一方、Ufo1、Ylr097c および Ylr224w について検討したところ、Ufo1 高発現酵母がメチル水銀毒性に対して若干の耐性を示し、Ylr097c または Ylr224w 高発現酵母では顕著な耐性が認められた (Fig. 5)。この結果から、F-box 蛋白質である Ufo1、Ylr097c、Ylr224w を高発現させることによって、ユビキチンシステムにおける F-box 蛋白質の基質認識が亢進し、メチル水銀により修飾された細胞毒性を引き起こす細胞内蛋白質の分解が促進され、メチル水銀毒性に対して耐性を示す可能性が考えられる。したがって、これまでに当研究室で明らかにされている Ybr203w (廣島ら, 2001) に加え、Ufo1、Ylr097c、Ylr224w は現在のところ機能未知であるが、これら 3 種の F-box 蛋白質もメチル水銀毒性に対する防御機構に関与するものと考えられる。

2. メチル水銀毒性に対する防御機構に関与する F-box 蛋白質をコードする遺伝子欠損のメチル水銀毒性に対する影響

F-box 蛋白質がプロテアソームによって分解される基質蛋白質と直接結合することから、メチル水銀毒性に対する防御機構に関与する F-box 蛋白質をコードする遺伝子を欠損さ

せた酵母は野生株と比較してメチル水銀毒性に対してより感受性になる可能性が考えられる。そこで高発現によって酵母にメチル水銀耐性を与えた4種のF-box蛋白質をそれぞれ欠損させた場合のメチル水銀毒性に対する感受性を検討した。その結果、いずれのF-box蛋白質の欠損株においてもメチル水銀毒性に対する感受性は変わらなかった (Fig. 6)。この結果から、メチル水銀の毒性軽減には一つのF-box蛋白質ではなく、複数のF-box蛋白質が関与している可能性が考えられる。そこで次に、*YBR203w*、*YLR097c*、*YLR224w* 三重欠損株を作製し、メチル水銀毒性に対する感受性を検討した。その結果、この三重欠損株のメチル水銀毒性に対する感受性は野生株と同じであった (Fig. 7)。しかし、*Ufo1*をはじめ、これら3種以外にメチル水銀毒性に対する防御機構に関与するF-box蛋白質はまだ存在する可能性もあり、これらの多くを同時に欠損させないとメチル水銀毒性に対する影響は認められないかもしれない。

3. F-box 蛋白質をコードする遺伝子欠損のメチル水銀毒性に対する影響

高発現によって酵母にメチル水銀耐性を与えるF-box蛋白質以外に、

欠損させても酵母が生存可能なF-box蛋白質をそれぞれ欠損させた株におけるメチル水銀毒性に対する感受性を検討した。その結果、*DIA2*、*ELA1*、*GRR1*、*FLM1*、*UFO1*、*YDR219c*、*YJL149w*、*YJL204c*、*YLR097c*、または*YLR224w*を欠損させた株はメチル水銀毒性に対する感受性に変化はなかった (Fig. 8)。一方、*YDR131c*または*YNL311c*欠損株はメチル水銀毒性に対して若干の耐性を示した (Fig. 9)。F-box蛋白質同士が競合することによって、他のF-box蛋白質の機能が阻害されるという報告があるため (Chiho *et al.*, 2002)、*Ydr131c*および*Ynl311c*もメチル水銀毒性に対する防御機構に関与するF-box蛋白質と競合することによって、その機能を阻害する可能性も考えられる。一方、E2であるユビキチン転移酵素はユビキチン化反応における律速酵素であり、E2の一つである*Cdc34*高発現が細胞内でのユビキチン化を促進させることにより、酵母にメチル水銀耐性を与えることが当研究室によって明らかにされている (Hwang *et al.*, 2002)。先程示された、*Ydr131c*と*Ynl311c*は共にメチル水銀毒性に対する防御機構に関与するF-box蛋白質の機能を阻害する可能性が考えられるので、*YDR131c*または*YNL311c*欠損株は、

野生株に Cdc34 を高発現させた際に認められるメチル水銀耐性より強い耐性を示す可能性が考えられる。そこで、YDR131c または YNL311c 欠損株に Cdc34 を高発現させてメチル水銀毒性に対する感受性を検討した。その結果、YDR131c および YNL311c 欠損株に Cdc34 を高発現させた酵母は野生株に Cdc34 を高発現させた酵母に比べて、より顕著な耐性を示した (Fig. 10)。この結果は Ydr131c および Ynl311c がメチル水銀毒性に対する防御機構を抑制するという可能性を強く示唆している。

4. F-box 蛋白質をコードする遺伝子欠損株における Cdc34 高発現のメチル水銀毒性に対する影響

Cdc34 (ユビキチン転移酵素の一種) 高発現によるメチル水銀耐性獲得はメチル水銀によって修飾される未知蛋白質の分解促進によるものと考えられる。一方、F-box蛋白質はユビキチン化される蛋白質と直接結合することが知られており、F-box蛋白質をコードする遺伝子を欠損させた株にCdc34を高発現させて獲得する耐性の程度が野生株にCdc34を高発現させた場合に比べて低い可能性が考えられる。そこで、F-box蛋白質をコードする遺伝子の欠損株におけるCdc34高発現のメチル水銀毒

性に対する感受性を検討した。その結果、DIA2、ELA1、FLM1、UFO1、YDR219c、YDR306c、YJL149w、YJL204c、YLR097cまたはYLR224w遺伝子欠損株にCdc34を高発現させた株と野生株にCdc34を高発現させた株のメチル水銀毒性に対する感受性はほとんど同じであった (Fig. 11-1, 2)。以上の結果から、Cdc34高発現によるメチル水銀獲得機構においても複数のF-box蛋白質が関与している可能性が考えられる。

参考文献

- 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., Ceccaelli S. and Manzo L. (2001). *Brain Research Bulletin*, **55**, 197-203
- Chiho I., Kin-ichiro K., Takashi T., Kei-ichi N. (2002). Isolation and Characterization of a Novel F-Box Protein F Pof10 in Fission Yeast. *Biochem Biophys Res Commun*,

290, 1399-1407

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

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

Gietz D., St Jean A., Wood RA. and Schiestl RH. (1992). Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acid Res.* **20**, 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.

Hershko A. and Ciechanover A.

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

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. and Naganuma A. (2002). A ubiquitin-proteasome system is responsible for the protection of yeast and human cells against methylmercury. *FASEB J.* 16, 709-711.

Sanfeliu C., Sebastia J., Kim SU. (2001). *Neuro Toxicology*, **22**, 317-327

Skowyra 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

廣島綾乃. 新規メチル水銀耐性遺伝子

の検索. (2001). 東北大学薬学部卒業論文.

矢ヶ崎修. 毒科学の基礎と実際. (1995). 日本毒科学会編 薬業時報社. P88-89

D. 研究発表

1. 論文発表

なし。

2. 学会発表

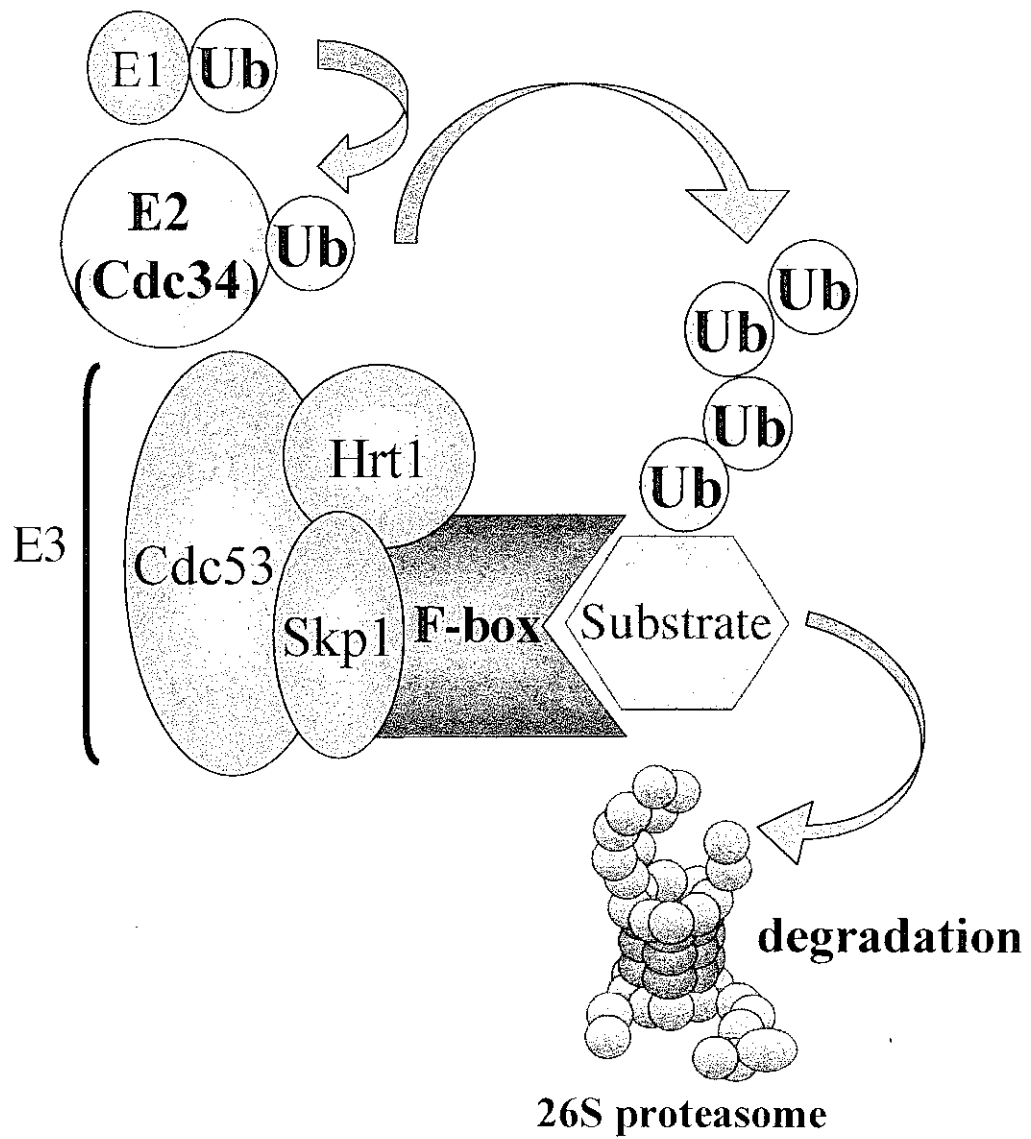
石田洋輔、黄 基旭、永沼 章: メチル水銀毒性に対して防御的に作用する酵母 F-box 蛋白質の検索. フォー

ラム 2003 : 衛生薬学・環境トキシコロジー2003.

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.

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.

E. 知的財産権の出願・登録状況
なし。



E1 : ubiquitin-activating enzyme
 E2 : ubiquitin-conjugating enzyme
 E3 : ubiquitin ligase
 Ub : ubiquitin

Fig. 1 Ubiquitin-proteasome system

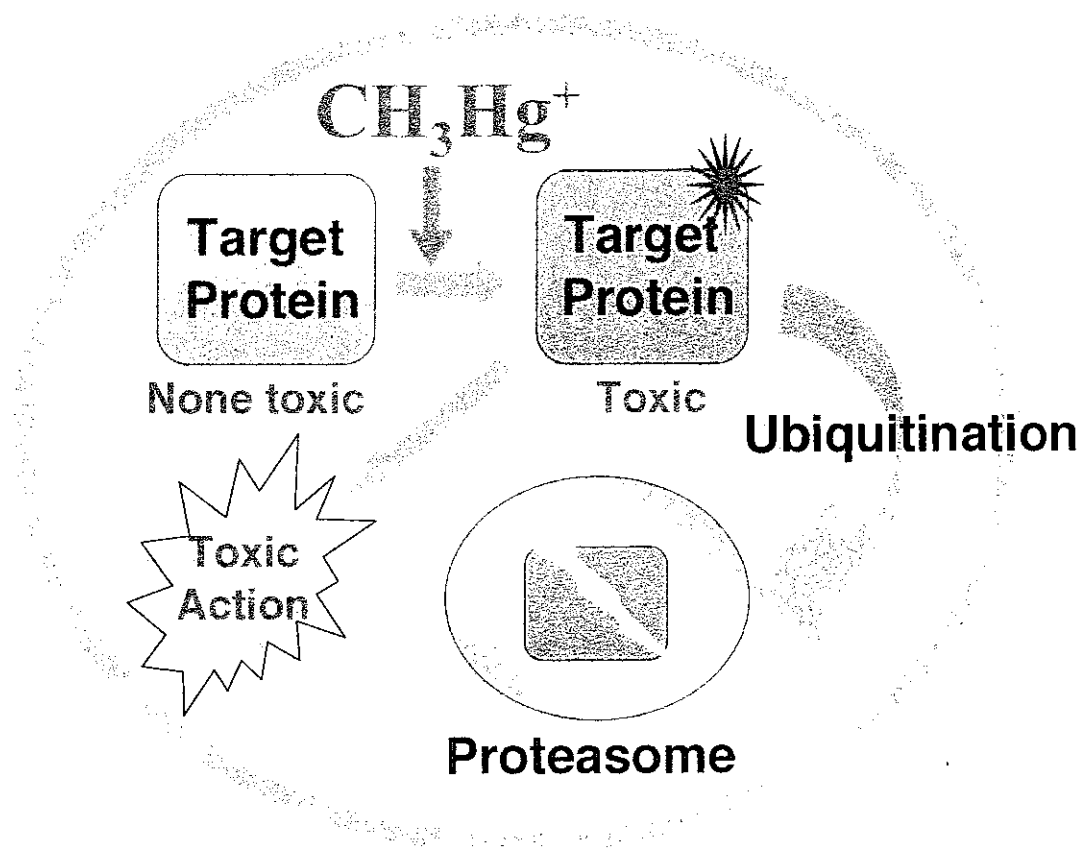


Fig. 2 The mechanism for MeHg toxicity and the defense against such toxicity

Cdc4	275	ITSLPF...EISLKIFNYLQFE.....DIINSLQVSNWVK..IIRK·STSLWKKL
Ctf13	9	FLELPI...DIRKEVYFHL DGNF.....CGAHPYPIDILYKSNDVELP·GKPSYKRS
Dia2	221	VGNLPT...EILPIIFQRFTTK.....ELVTLSLVCNKWRD·KILYH·LDCFQEF
Ela1	22	VSNVPY...HLLKRILQKV KIP.....QLLKLEKSN·VLL·IFDD·DELWLEF
Grr1	317	LNMLPS...EILHLILDKLNQKY.....DIVKFLTVSKLWA·EIIVK·ILYRPH
Fln1	16	IDHLPP...EIWLGISKLVGTS.....DLHNLCLINRRLYL·TITS·DEIWKRR
Met30	184	ISILPQ...ELSKILSYLDCQ.....SLCNATRVCRKWQK·LADD·DRVWYHM
Ufo1	8	LQDLPP...EILINIFSHLDEK.....DLFTLQELSTHFRN·LIHD·EELWKNL
Ybr203w	187	INDLPV...EIIAKILSEFELGRDQK...TLVRCLYVSKKFYK·ATK·IVLYRL
Ydr131c	2	FDKLPY...EIFQIAWRIPQE.....DKISLTYVCKRSYE·SIIP·FIYQNL
Ydr219c	17	LTNLPL...NLLFRILSHLDMN.....DLQNI GKTCTLLRM·LANE·NIVYRNA
Ydr306c	112	KMVL PW...EIQHRIIHYLDIPEKEEKLN [^] INMNYLLVCRNWYA·MCLP·KLYYAPA
Yj1149w	49	LTKLPD...ELMQEVFSHLPQP.....DRLQLCLVNKRLNK·IATK·LLYRRI
Yj1204c	4	LLKVP...EIVTNIASYLSTV.....DYSFQQVNKR VYA·IING·KNDSKYW
Ylr097c	100	LEILPD...DILLRIKKVILMSGE.....SWVNL SMTGSTFSK·LCFHD·SVPFKTF
Ylr224w	8	LMDLPL...EIHLSLLEYVPN.....ELRA·VNKYFY·VLHN·HSYKEK
Ynl311c	57	LMCLPT...KVL LLLIRLTDFN.....TLVTLCQVNSRFYN·LITN·EFLFQNV
Consensus		LSXLPX EILXKILSYLDXX DLLXLXXVCKRWYX LIDD DXLWKXL
		RT V DLI RVF HVE EIV V SRKFR IAEE E VFQ A
		A F VV NLI KIP SVI I N LN VLSS S IYR V
		V M Q NA T A K VT T FLN F
		F RF Y M
		W

An indication of 11 residues in Ydr306c is indicated (^).

Fig. 3 F-box alignment

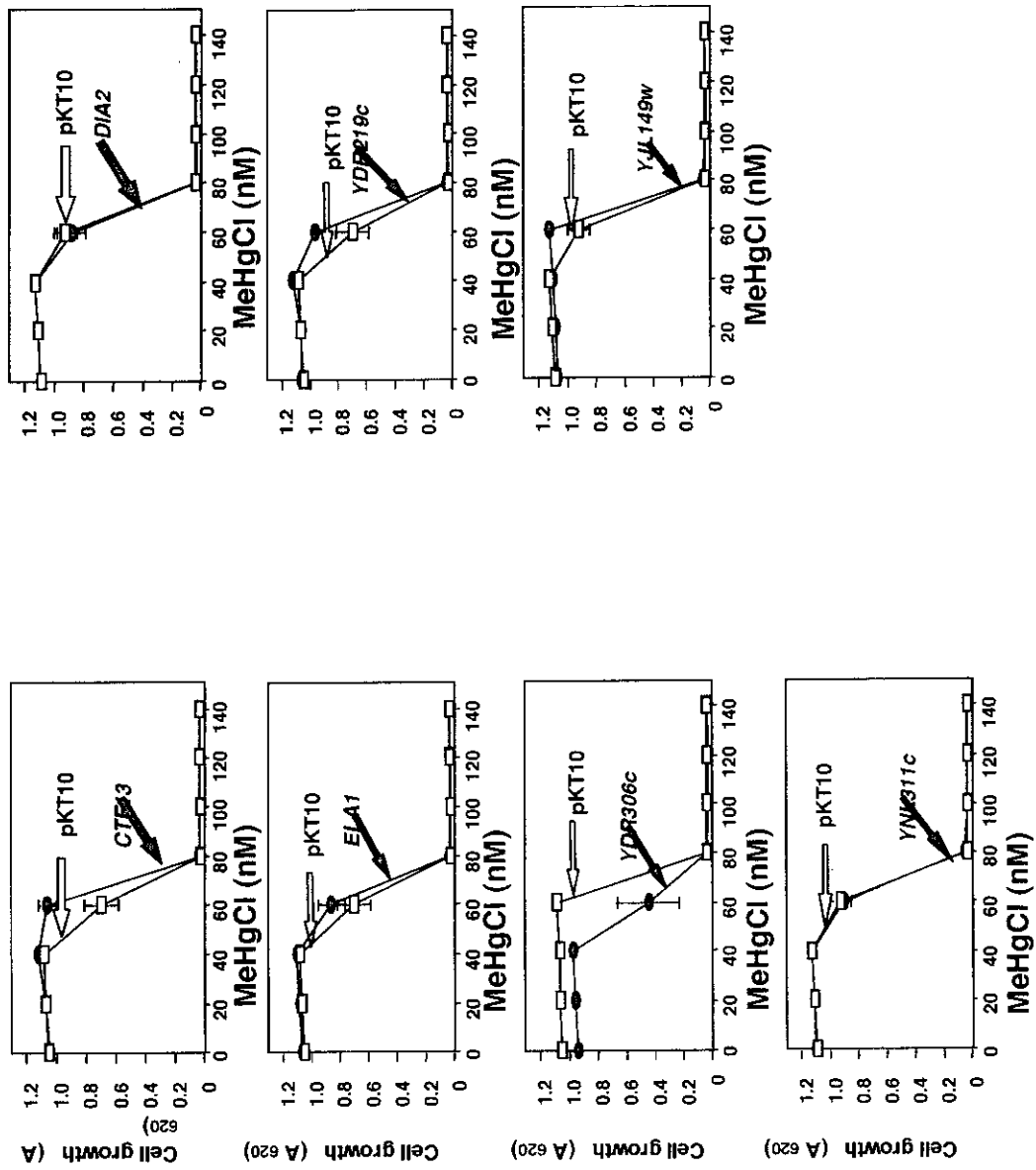


Fig. 4 Sensitivity of yeast cells that overexpressed Ct13, Dia2, Ela1, Ydr219c, Ydr306c, Yjl149w or Ynl311c to MeHg

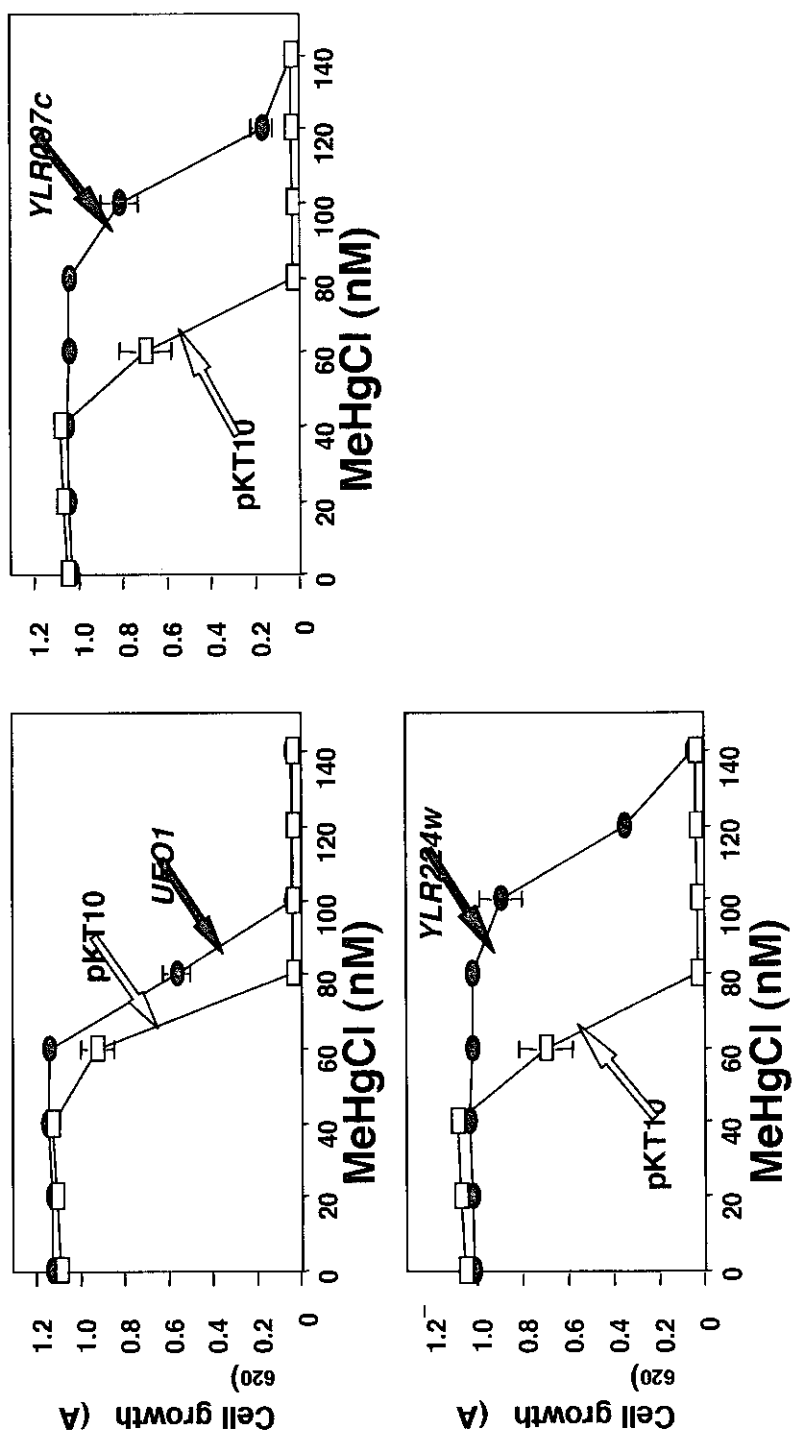


Fig. 5 Sensitivity of yeast cells that overexpressed Ufo1, Ylr097c or Ylr224w to MeHg

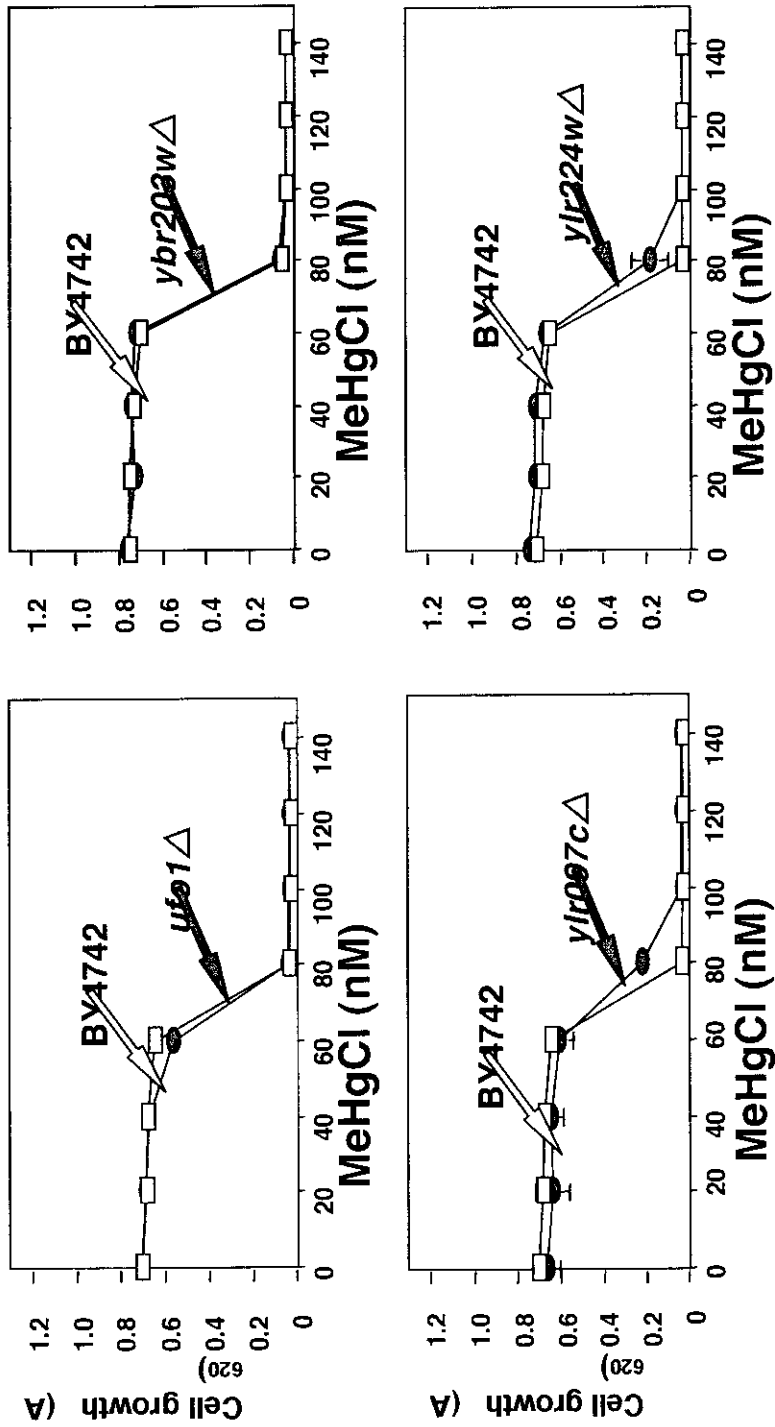


Fig. 6 Effect of deletion of *UFO1*, *YBR203w*, *YLR097c* or *YLR224w* on MeHg sensitivity of yeast strain BY4742

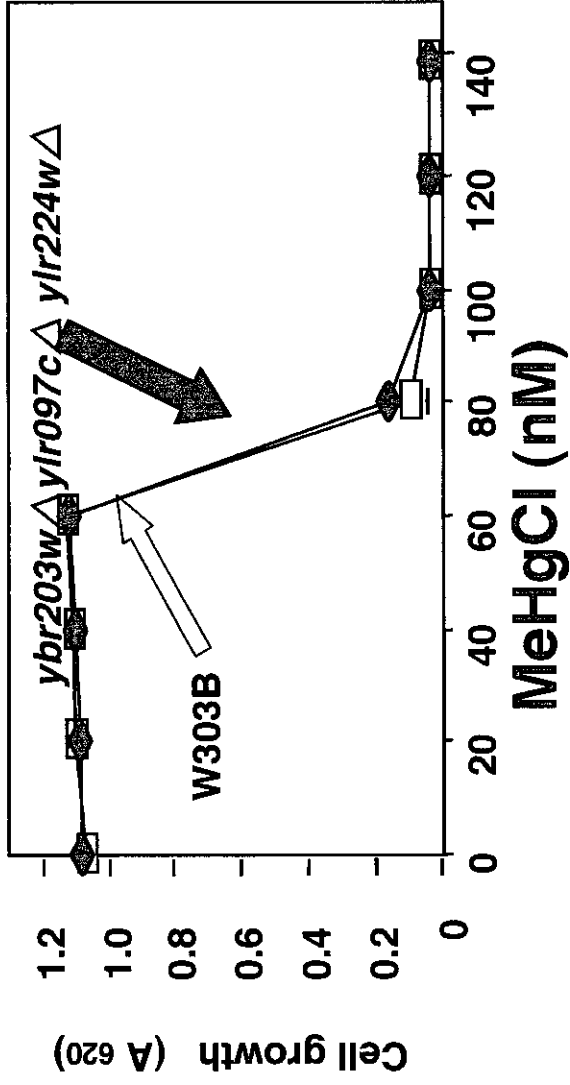


Fig. 7 Effect of triple deletion of YBR203W, YLR097c and YLR224w on MeHg sensitivity