

Fig. 8 Effect of deletion of *DIA2*, *FLM1*, *ELA1*, *GRR1*, *YDR219c*, *YDR306c*, *YJL149w* or *YJL204c* on MeHg sensitivity of yeast strain BY4742

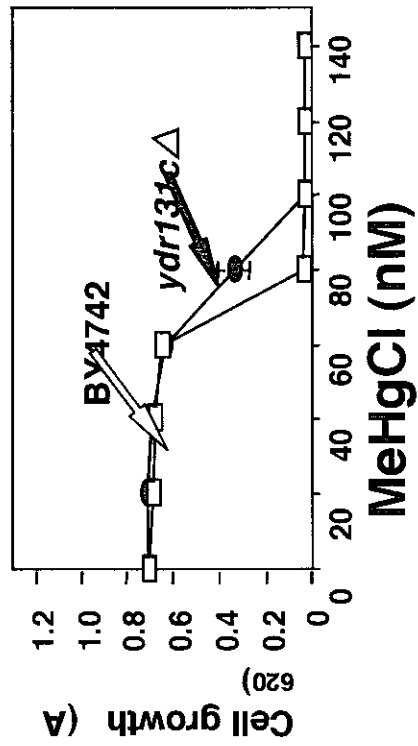
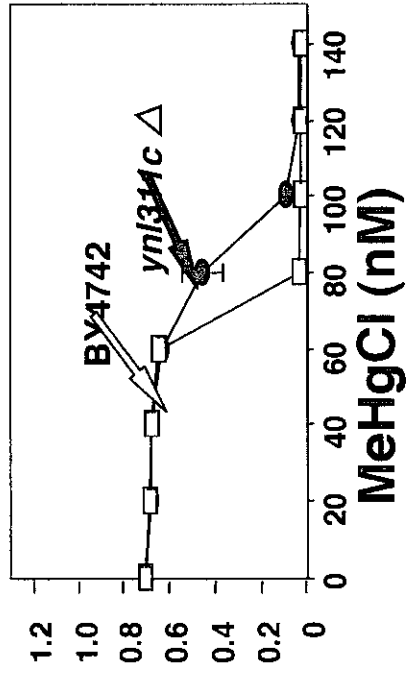


Fig. 9 Effect of deletion of *YDR131c* or *YNL311c* on MeHg sensitivity of yeast strain BY4742

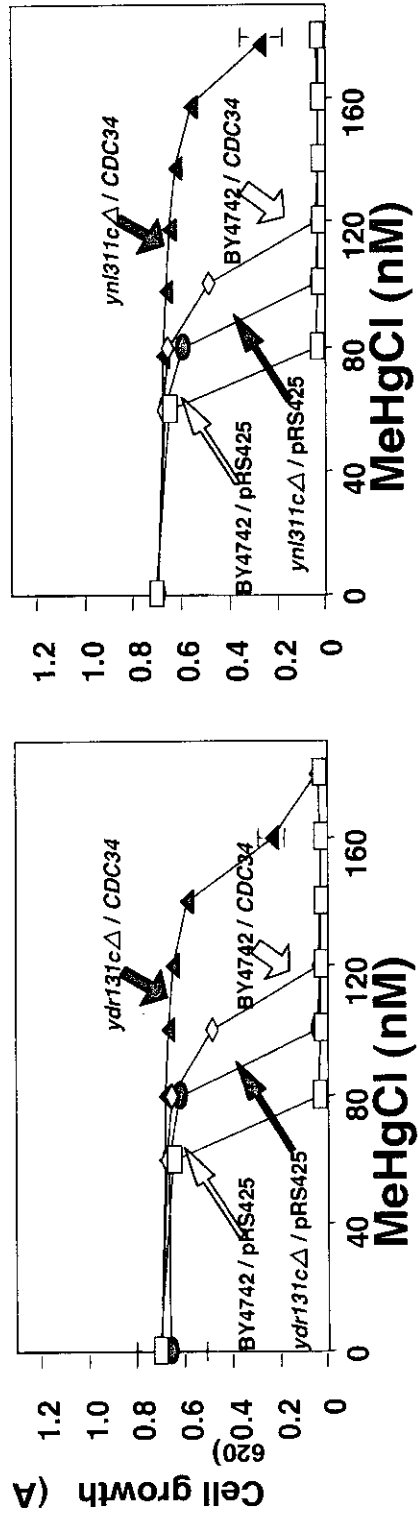


Fig. 10 Effect of deletion of YDR131c or YNL311c on MeHg sensitivity of yeast that overexpressed Cdc34

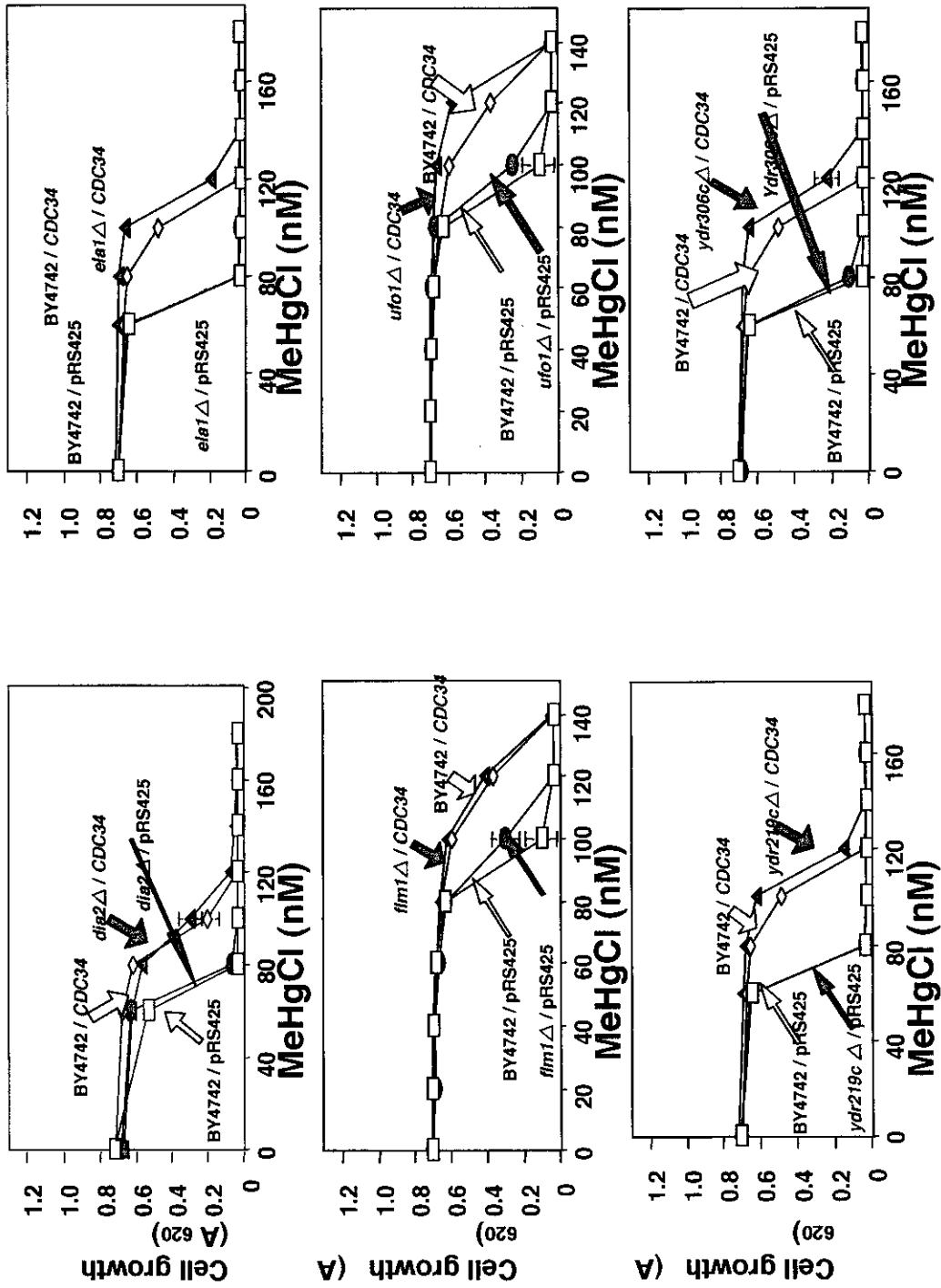


Fig. 11-1 Effect of deletion of *DIA2*, *ELA1*, *FLM1*, *UFO1*, *YDR219c* or *YDR306c* on MeHg sensitivity of yeast that overexpressed Cdc34

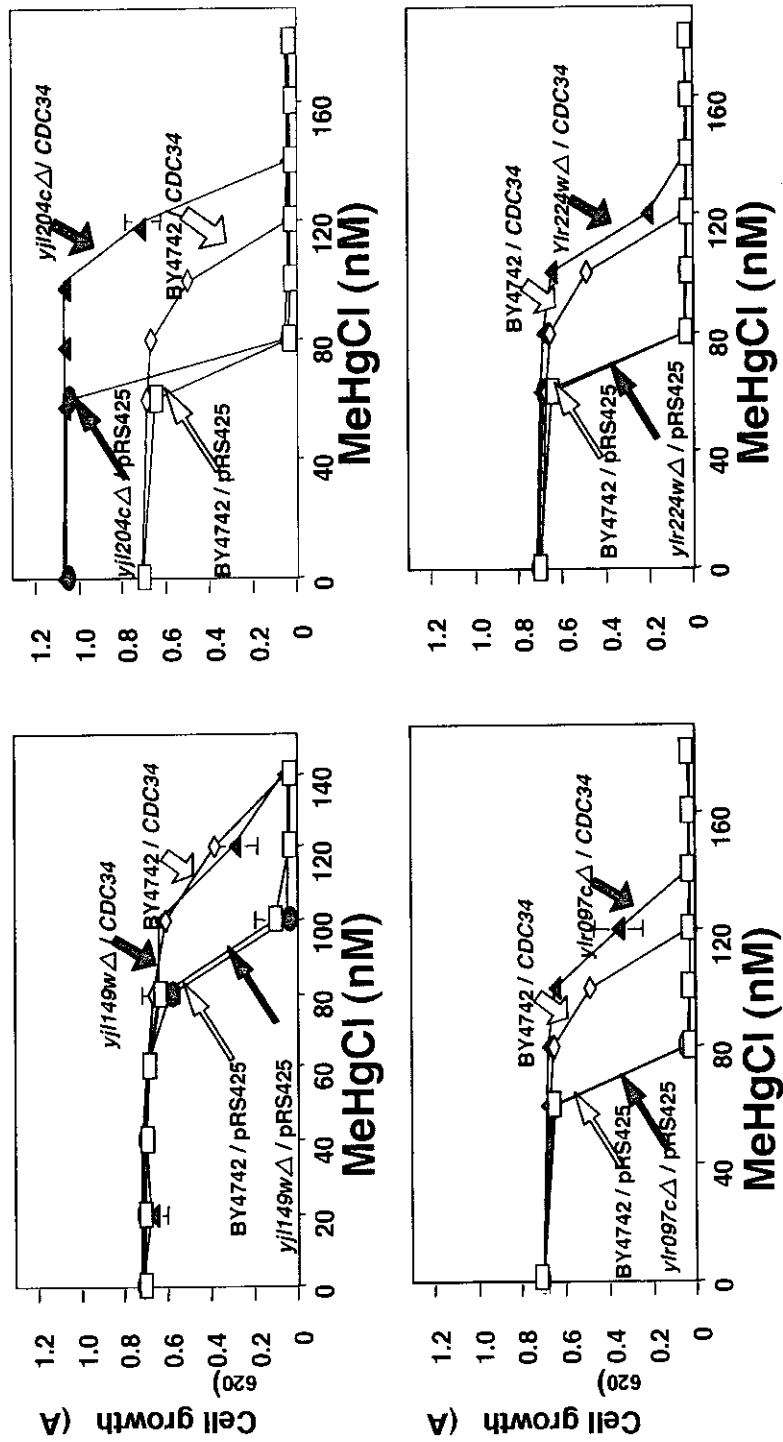


Fig. 11-2 Effect of deletion of *YJL149W*, *YJL204C*, *YLR097C* or *YLR224W* on MeHg sensitivity of yeast that overexpressed *Cdc34*

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

Cdc34トランスジェニックマウスの作成

分担研究者 黄 基旭 東北大学大学院薬学研究科教務職員

昨年度の検討により、Cdc34の高発現が特定の蛋白質のユビキチン化を促進してプロテアソームでの分解を促すことによってメチル水銀の毒性発現が抑制されることが既に判明している。また、Cdc34はヒトにも存在することから、ヒトCdc34をヒト由来細胞に高発現させたところ、酵母の場合と同様な顕著なメチル水銀耐性が認められた。そこで、Cdc34の意義を個体レベルで検討するために、Cdc34を高発現するトランスジェニックマウスの作成を試みた。

A. 研究目的

Cdc34の意義を個体レベルで検討するために、Cdc34を高発現するトランスジェニックマウスを作成する（Cdc34は生存に必須の蛋白質であり、ノックアウトマウスは作成できない）。

B. 研究方法

1) 導入DNAの構築

神経系における細胞で主に発現することが知られているCa²⁺/カルモジュリン依存性のプロテインキナーゼIIのプロモーターおよびヒトgrowth hormoneのポリA付加部位を有するpCaMPhpAベクターにイントロンを含むヒトCDC34のcDNAを導入した。

2) 大腸菌へのplasmidの導入

Competent cells 溶液 200 μl に上述の plasmid 溶液 10 μl を加え、氷上に 30 分間静置した後、42℃で 45 秒間の heat shock をかけ、さらに氷上に 2 分間静置した。この溶液に SOC 培地 0.8 ml を加え 37℃で 1 時間培養した後、ampicillin sodium salt 100 μg/ml を含む LB 寒天培地に塗布し、37℃で一晩培養した。形成された colony を ampicillin sodium salt 100 μg/ml 含む LB 培地 10 ml で一晩振盪培養した。

3) 導入DNAの精製

大腸菌からプラスミド DNA 精製は QIAGEN Plasmid Kit を用いて行った。精製したプラスミド DNA よりベクター由来の配列を除去するために、

制限酵素 (*Hind*III) で処理してからアガロースゲル電気泳動を行った。その後、Gene Clean II Kit によって DNA 断片を精製し、エタノール沈殿を行った後 10 mM Tris-HCl (pH7.5) / 0.25 mM EDTA 溶液 (0.22 μ m のフィルターを通したもの) に最終濃度 30 μ g/ml になるように調整した。

4) マウス受精卵への遺伝子の導入

約 400 個の C57BL/6 マウス受精卵にマイクロインジェクション法のより注入し、それを仮親マウスの卵管内に移植して出産させた。

5) ゲノム DNA の調製

マウスの尾を滅菌刃で 5~10 mm 採取し、エッペンドルフ型チューブに入れ、300 μ l の Tissue buffer (50 mM Tris-HCl, 100 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1% SDS)、18 μ l の Proteinase K (20 mg/ml) を加え、55°C で 3 時間から一晩おく。その後、300 μ l の中性フェノールを加え攪拌した後、12,000 xg で 5 分間遠心して水層を取り、これに chloroform/isoamylalcohol (24:1) 300 μ l を加え攪拌した後 12,000 xg で 5 分間遠心して水層のゲノム DNA 溶液 200 μ l を得た。このゲノム DNA 溶液をエタノール沈殿により濃縮し、

導入遺伝子の検出に用いた。

6) PCR 法による導入遺伝子の検出

マウス固体のゲノム内に取り込まれたヒト *CDC34* 遺伝子を検出するために導入遺伝子を検出する特異的なプライマーオリゴヌクレオチドセットを用いて PCR 法によって検出した。用いたプライマーオリゴヌクレオチドセットは以下に記した。

CAMHuCDC34-F3	:
actgggacatgagcaccagga	
hCDC34-N-R	:
tcaggagggagatcacactca	
hmCDC34-M-F	:
aactgggaggtggccatctt	
hmCDC34-M-R	:
ttggtcttcacgcagtactcg	

7) 脳組織から総 RNA の抽出

約 50 mg の脳組織に 1 ml の ISOGEN 溶液を加え、氷上で 1 分間ホモジナイズ、その溶液に 0.2 ml のクロロホルムを加えて激しく攪拌し、室温で 3 分間放置後、12,000xg で 15 分間遠心分離した。分離した水層 0.5 ml に同量のイソプロパノールを加えて混和後、室温で 10 分間放置し、12,000 xg で 10 分間遠心分離し、沈殿した total RNA 画分を得た。この沈殿を 75%エタノール溶液で洗浄し、乾燥後 Molecular grade water(M.G.W)

に溶解し、260 nm の吸光度値から RNA 濃度を算出した。

8) 定量 PCR 法による CDC34 の発現確認

3 μ g の total RNA に oligo-dT primer (50 ng/ μ l) 1 μ l 及び滅菌精製水を加え全量を 12 μ l にし、70°C、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 5x First-strand buffer 4 μ l、0.1 M DTT 2 μ l、10 mM dNTP 1 μ l を加えて 42°C で 5 分間インキュベートした後に逆転写酵素 (moloney murine leukemia virus reverse transcriptase : M-MLV RT ; Gibco) を 200 units 加えて 42°C で 60 分間、70°C で 15 分間インキュベートして cDNA を調製した。この cDNA をテンプレートとし核酸検出・定量用蛍光試薬 iQ SYBR Green Supermix (Bio-rad) および各種のプライマーオリゴヌクレオチドをそれぞれ最終濃度が 400 nM になるように加え、反応溶液を調整した。PCR は iCycler iQ Detection System (Bio-rad) で行い、経時的に蛍光の変化の検出を行った。用いたプライマーオリゴヌクレオチドセットは以下に記した。

hmCDC34-M-F (定量 PCR 用) :
aactgggaggtggccatctt

hmCDC34-M-R (定量 PCR 用) :

ttggtcttcacgcagtactcg

C. 結果・考察

約400個のC57BL/6マウスの受精卵にマイクロインジェクション法によりヒトCDC34遺伝子を導入し、それを仮親マウスの卵管内に移植することで、雄40匹、雌22匹が生まれた。これらのマウスの尾からゲノムDNAを調製し、PCR法を用いてゲノム内へのヒトCDC34遺伝子の導入を確認した。その結果、生まれた雄40匹、雌22匹中で雄10匹、雌4匹のゲノム内にヒトCDC34遺伝子の導入が認められた。また、ヒトCDC34遺伝子を導入したマウス3匹 (line 48, 49, 50) の脳組織から総RNAを抽出し、定量PCR法によるCDC34 mRNAの発現を検討したところ正常なマウスに比べて約2~5倍程度の上昇が認められた

D. 研究発表

なし、

E. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

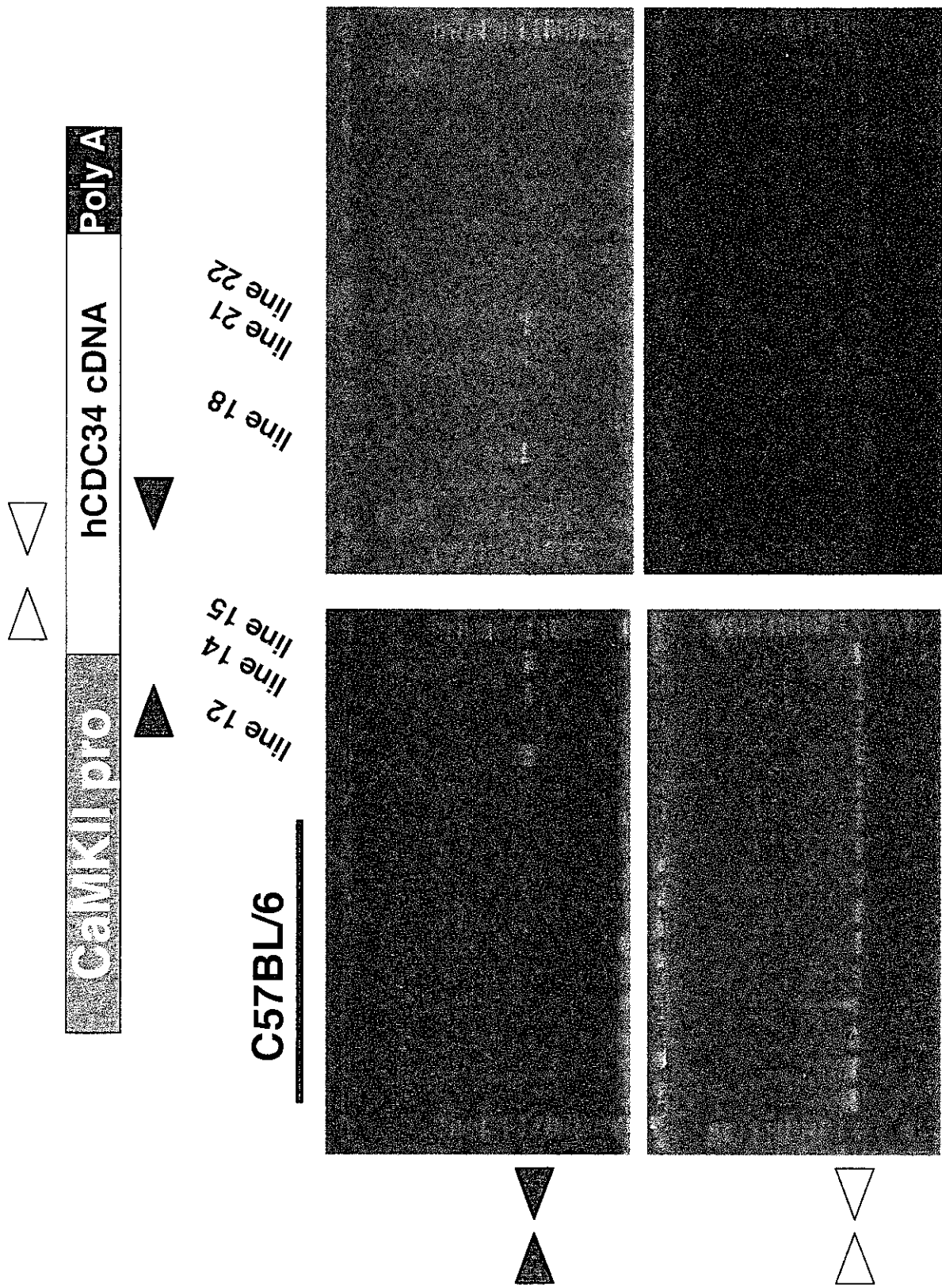


Fig. 1-1 PCR analysis of genomic DNA from hCDC34 transgenic lines

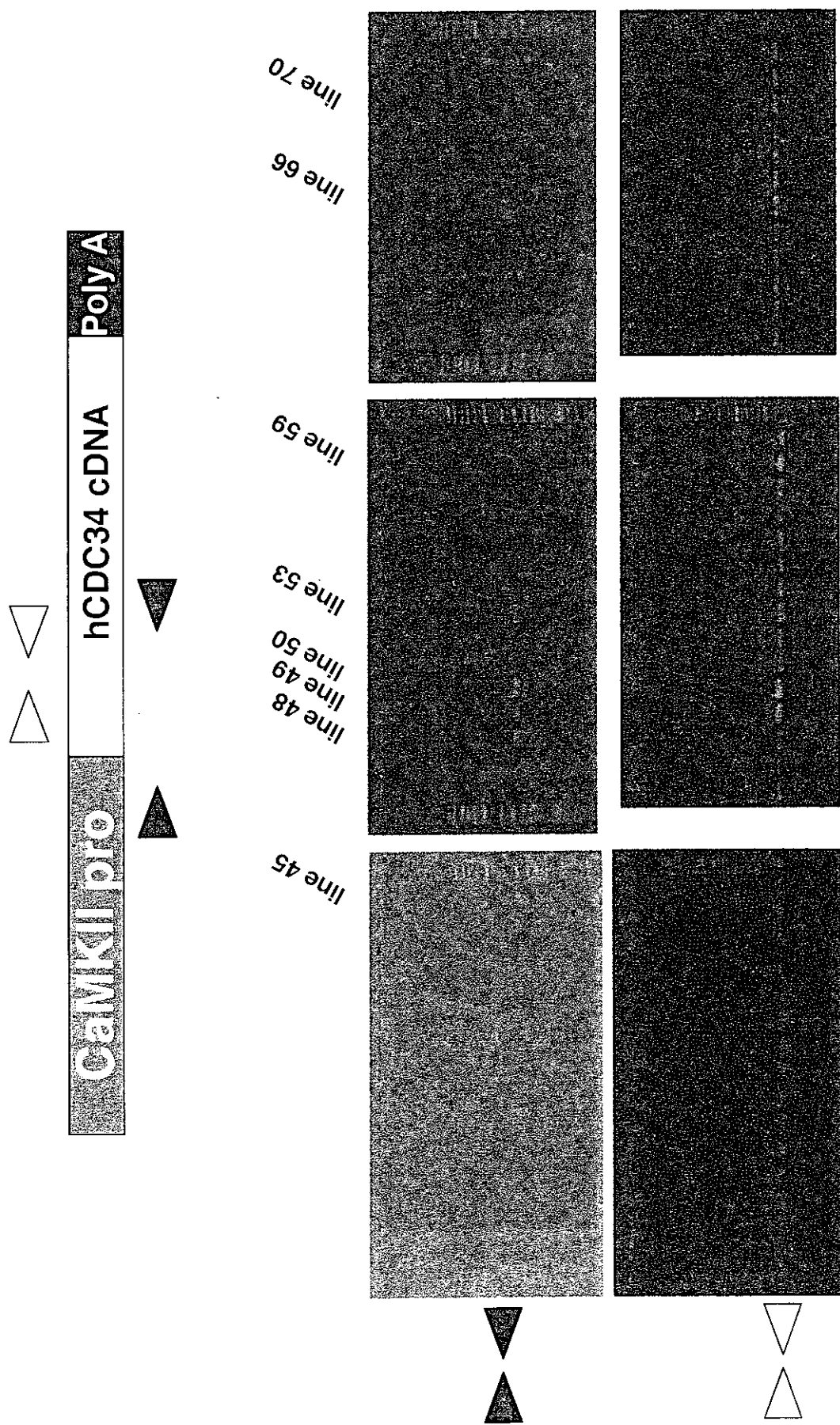


Fig. 1-2 PCR analysis of genomic DNA from hCDC34 transgenic lines

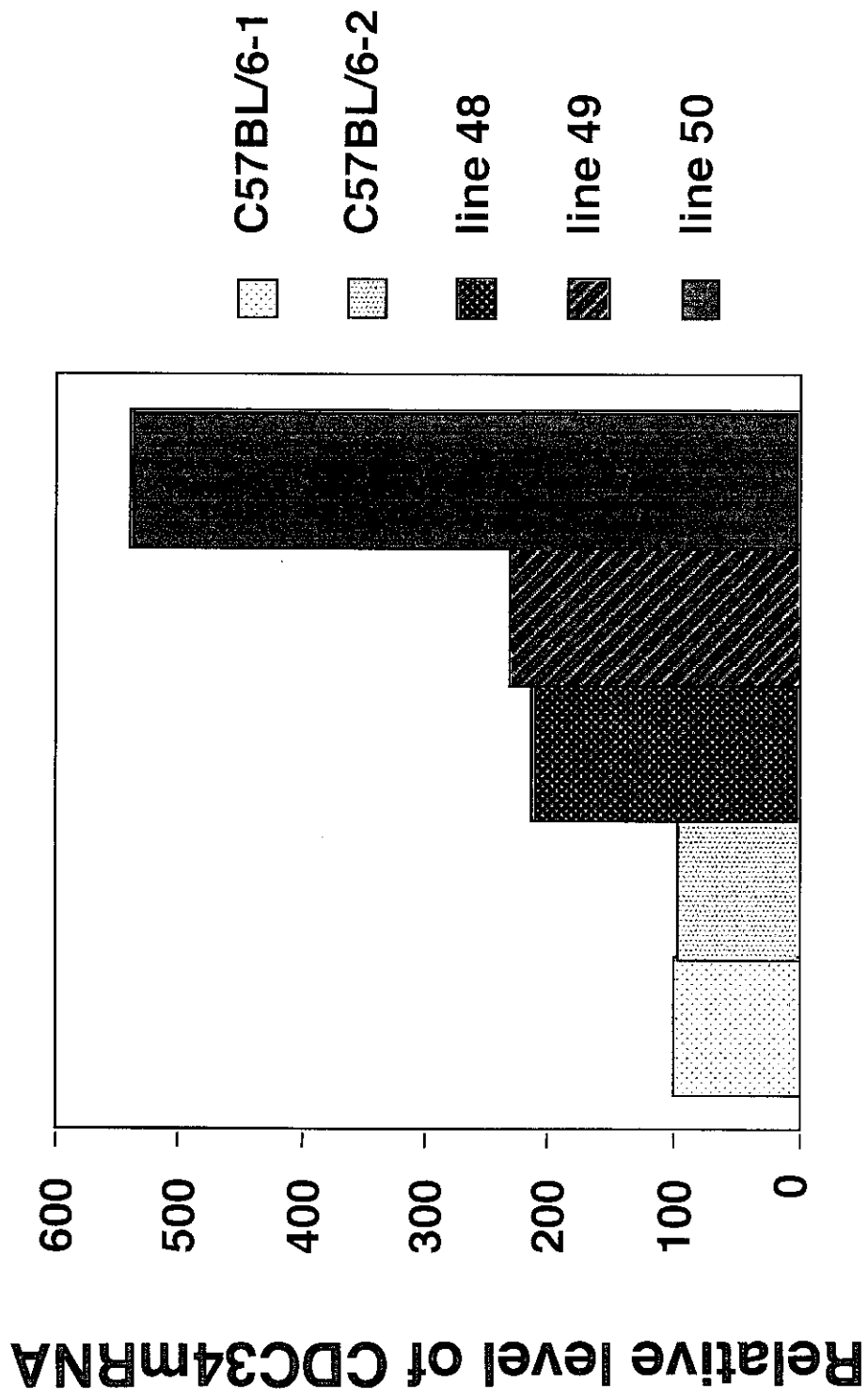


Fig. 2 Real-time PCR analysis of CDC34 mRNA from hCDC34 transgenic lines

Bop3が関与するメチル水銀耐性機構

分担研究者 黄 基旭 東北大学大学院薬学研究科教務職員

Bop3 結合蛋白質の中で Pam1 の欠損は Bop3 高発現によるメチル水銀耐性に影響を与えなかったが、Fkh1 または Rts1 の欠損によって部分的に Bop3 高発現によるメチル水銀耐性が減弱されることが判明し、Fkh1 および Rts1 が部分的に Bop3 高発現によるメチル水銀耐性に関与することが示唆された。また、Bmh2 およびその相同蛋白質 Bmh1 の欠損は Bop3 高発現によるメチル水銀耐性に影響を与えなかったが、両蛋白質は 93%の相同性を有しており、Bmh2 欠損時には Bmh1 がその機能を補っている可能性も考えられる。両者が同時欠損すると細胞は成育できないので、両者同時欠損の影響を調べられない。しかし、Bmh1 および Bmh2 と結合する蛋白質として Msn2, Msn4, Rtg3 が知られている。このうち Msn2 欠損によってのみ Bop3 高発現によるメチル水銀耐性の低下が観察された。したがって、Bop3 高発現によるメチル水銀耐性は、少なくとも Msn2, Fkh1 および Rts1 の 3 者が関与する複雑な機構によるものと考えられる。今後の本研究の進展によって Bop3 の新しい機能が明らかになるものと期待される。

A. 研究目的

平成14年度に実施した検索によって得られたメチル水銀耐性因子のひとつに Bop3 がある。この Bop3 は Pam1 の multicopy suppressor として同定された蛋白質であり、結合蛋白質として Bmh2, Fkh1 および Rts1 が報告されている。そこでこれら蛋白質と Bop3 との関係性をメチル水銀耐性を指標として検討した。

B. 研究方法

1. 酵母への plasmid の導入

酵母の形質転換は酢酸リチウム法により行った。まず、酵母株を完全培地である YPD 培地 2 ml に植菌し 30℃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 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 になるように懸濁し、気相中、 30°C で 15 分間 incubate した。この懸濁液 $50 \mu\text{l}$ に該当遺伝子を組み込んだ発現 vector $5 \mu\text{l}$ 、加熱変性サケ精子 DNA $50 \mu\text{g}$ および 40% polyethylene-glycol (4000) $300 \mu\text{l}$ 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、 $100 \mu\text{l}$ の滅菌水で懸濁して SD (pRS425/-leu pKT10/-ura pYES2/-ura) 寒天培地に塗布し、 30°C で 2 日間培養した。

2. 遺伝子欠損株の作製

2-1. HIS3 マーカーによる作製

HIS3 マーカーを含む A397

plasmid を template として PCR を行い、それぞれの欠損株のマーカーを合成した。ここで合成した PCR 産物は、その両端部に標的遺伝子部位での組換えに必要な各遺伝子との相同配列を持っている。これらの PCR 産物を、酢酸リチウム法により W303B 株に導入することによって得られた histidine 非要求性 colony を、遺伝子欠損株の候補 colony とした。酵母からの遺伝子の回収は glass beads 法によって行った。まず、single colony を YPD 培地 2mL に植菌し、 30°C で一晩振盪培養した後に集菌し、breaking buffer $100 \mu\text{l}$ に伴濁し、

glass beads $0.3 \mu\text{g}$ および

phenol/chloroform/isoamylalcohol (25:24:1) $100 \mu\text{l}$ を加え激しく攪拌した後、遺伝子を含む上澄を得た。この上澄溶液を isopropanol 沈殿により濃縮し、 $300 \mu\text{l}$ の滅菌水を加え遺伝子溶液とした。ここで、得られた遺伝子溶液を template として、各遺伝子の外側に設定した primer を用いて標的遺伝子領域を PCR により増幅し、その PCR 産物の大きさを agarose 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。

2-2. URA3 マーカーによる作製

まず、URA3 マーカーを含む

targeting vector を作製した。pYES2 vector より URA3 マーカーを *NheI/ApaI* により切断し、0.8% アガロースゲル電気泳動を行い、目的のサイズの DNA をゲルから切り出し、GeneClean II Kit を用いて精製した。得られた URA3 マーカー断片を標的遺伝子が組み込まれた plasmid

(pKT10-MSN4 pTarget T-RTS1) の標的遺伝子内部に導入するため、それぞれ適当な制限酵素 (pKT10-MSN4: *SphI*, pTarget T-RTS1: *XbaI*) で切断し、0.8% agarose ゲル電気泳動を行い、目的のサイズの DNA をゲルから切り出し、

GeneClean II Kit を用いて精製した。これと先ほど得られた *URA3* マーカー断片を DNA ligation Kit Ver.2 を用いて連結した後、大腸菌 (XL-1) に Hanahan らの方法に従って導入した。コンピテントセル溶液 200 μ l にプラスミド溶液 10 μ l を加え、氷上に 30 分間静置した後、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。この溶液に SOC 培地 0.8 ml を加え、37°C で 1 時間培養した後、ampicillin sodium salt 50 μ g/ml を含む LB 寒天培地に塗布し、37°C で一晚培養した。形成されたコロニーを ampicillin sodium salt 50 μ g/ml を含む LB 培地 2 ml で一晚浸盪培養した後、GeneElute Plasmid Mini-Prep Kit (Sigma) を用いて大腸菌より plasmid を回収し、targeting vector とした。この plasmid を template として PCR を行い、それぞれの欠損株のマーカーを合成した。ここで合成した PCR 産物は、その両端部に標的遺伝子部位での組換えに必要な各遺伝子との相同配列を持っている。これらの PCR 産物を、酢酸リチウム法により W303B 株に導入することによって得られた uracil 非要求性 colony を、遺伝子欠損株の候補 colony とした。酵母からの遺伝子の回収は glass beads 法によって行った。まず、single colony を YPD

培地 2 ml に植菌し、30°C で一晚振盪培養した後に集菌し、breaking buffer 100 μ l に件濁し、glass beads 0.3 μ g および phenol/chloroform/isoamylalcohol (25:24:1) 100 μ l を加え激しく攪拌した後、遺伝子を含む上澄を得た。この上澄溶液を isopropanol 沈殿により濃縮し、300 μ l の滅菌水を加え遺伝子溶液とした。ここで、得られた遺伝子溶液を template として、各遺伝子の外側に設定した primer を用いて標的遺伝子領域を PCR により増幅し、その PCR 産物の大きさを agarose 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

2-3. Kanamycin 耐性遺伝子 (*KAN^r*) マーカーによる作製 *Saccharomyces cerevisiae* (BY4742) 株の遺伝子を

Kanamycin 耐性遺伝子マーカーで欠損させた COMP-SET1-A (EUROSCARF) を用い、それぞれの標的遺伝子の欠損株より chromosomal DNA を得た。これを template として PCR を行い、それぞれの欠損株マーカーを合成した。ここで合成した PCR 産物は、その両端部に標的遺伝子部位での組換えに必要な各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 W303B 株に導入することによって得られた Geneticin 耐性 (*KAN^r*) colony を、遺伝子欠損株の候補 colony とした。酵母からの遺伝子の回収は glass beads 法によって行った。まず、single colony を YPD 培地 2ml に植菌し、30℃で一晩振盪培養した後集菌し、breaking buffer 100 μ l に件濁し、glass beads 0.3 μ g および phenol/chloroform/isoamylalcohol (25:24:1) 100 μ l を加え激しく攪拌した後、遺伝子を含む上澄を得た。この上澄溶液を isopropanol 沈殿により濃縮し、300 μ l の滅菌水を加え遺伝子溶液とした。ここで、得られた遺伝子溶液を template として、各遺伝子の外側に設定した primer を用いて標的遺伝子領域を PCR により増幅し、その PCR 産物の大きさを agarose 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。

3. QuikChange™site-directed mutagenesis kit を用いた変異導入法

Bop3 mutant は QuikChange™site-directed mutagenesis kit (Stratagene) の protocol に従って、template として pRS425-BOP3 を用いて目的の塩基配列に *NheI* 部位を導入できるプライ

マーを設定し、PCR 反応を行い変異導入 plasmid を作製した。目的の制限酵素部位が導入されたことを制限酵素の切断により確認後、*NheI* で切断し、セルフライゲーションにより目的部位を欠失させた。その後、Bop3 mutant が正しく増幅されていることは sequence により確認した。

4. *BMH2* 遺伝子およびそのホモログである *BMH1* 遺伝子の cloning および遺伝子を発現する plasmid の作製

Bop3 に結合する蛋白質として明らかになっている Bmh2 およびそのホモログである Bmh1 をコードする遺伝子を酵母 chromosomal DNA を template とし、以下に示す primer を用い、PCR により cloning した。それぞれの PCR 産物は 0.8% agarose ゲル電気泳動を行い、目的のサイズの DNA をゲルから切り出し、GeneClean II Kit を用いて精製した。得られた DNA を pGEM-T Easy vector (Promega) を用いて TA cloning を行った。各遺伝子の塩基配列は dideoxy sequence 法により確認した。次に酵母発現 vector である pKT10 に subcloning するため pGEM-T Easy-*BMH1* および pGEM-T Easy-*BMH2* と pKT10 を制限酵素 (*EcoRI*) で切断し、0.8%

アガロースゲル電気泳動を行い、目的のサイズの DNA をゲルから切り出し、GeneClean II Kit を用いて精製した。得られた DNA と pKT10 を DNA ligation Kit Ver.2 を用いて連結した後、大腸菌 (XL-1) に Hanahan らの方法に従って導入した。コンピテントセル溶液 200 μ l にプラスミド溶液 10 μ l を加え、氷上に 30 分間静置した後、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。この溶液に SOC 培地 0.8 ml を加え、37°C で 1 時間培養した後、ampicillin sodium salt 50 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 50 μ g/ml を含む LB 培地 2 ml で一晩浸盪培養した後、GeneElute Plasmid Mini-Prep Kit (Sigma) を用いて大腸菌よりプラスミドを回収した。BMH1、BMH2 の塩基配列は sequence により確認した。

5. MSN2 遺伝子およびその homologue である MSN4 遺伝子の cloning および遺伝子を発現する plasmid の作製

Bmh2 に結合する蛋白質として明らかになっている Msn2 およびその homologue である Msn4 をコードする遺伝子を酵母 chromosomal DNA

を template とし、以下に示す primer を用い、PCR により cloning した。それぞれの PCR 産物は 0.8% agarose ゲル電気泳動を行い、目的のサイズの DNA をゲルから切り出し、GeneClean II Kit を用いて精製した。得られた DNA を pGEM-T Easy vector (Promega) を用いて TA cloning を行った。各遺伝子の塩基配列は dideoxy sequence 法により確認した。次に酵母発現 vector である pYES2 および pKT10 に subcloning した。まず始めに、pGEM-T Easy-MSN2-1, pGEM-T Easy-MSN2-2 および pGEM-T Easy-MSN4-1, pGEM-T Easy-MSN4-2 と pYES2 をそれぞれを適当な制限酵素 (MSN2-1: *SacI/NcoI/AseI* MSN2-2: *NotI/AseI* pYES2: *SacI/NotI*, MSN4-1: *EcoRI/BsrBI* MSN4-2: *NotI/BsrBI* pYES2: *EcoRI/NotI*) で切断し、0.8% アガロースゲル電気泳動を行い、目的のサイズの DNA をゲルから切り出し、GeneClean II Kit を用いて精製した。得られた DNA と pYES2 を DNA ligation Kit Ver.2 を用いて連結した後、大腸菌 (XL-1) に Hanahan らの方法に従って導入した。コンピテントセル溶液 200 μ l にプラスミド溶液 10 μ l を加え、氷上に 30 分間静置した後、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。この溶液にSOC培地0.8 mlを加え、37°Cで1時間培養した後、ampicillin sodium salt 50 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 50 μ g/mlを含むLB培地2mlで一晩浸漬培養した後、GeneElute Plasmid Mini-Prep Kit (Sigma) を用いて大腸菌よりプラスミドを回収した。その後、pYES2-MSN2およびpYES2-MSN4を適当な制限酵素 (MSN2:NotI MSN4:EcoRI) を用いてpKT10にsubcloningした。MSN2,MSN4の塩基配列はsequenceにより確認した。

6. BOP1 遺伝子、BOP2 遺伝子 FKHI 遺伝子および RTS1 遺伝子の cloning および遺伝子を発現する plasmid の作製

Bop1 および Bop2 と Bop3 に結合する蛋白質として明らかになっている Fkh1 およびその Rts1 をコードする遺伝子を酵母 chromosomal DNA を template とし、以下に示す primer を用い、PCRにより cloning した。それぞれの PCR 産物は0.8% agarose ゲル電気泳動を行い、目的のサイズの DNA をゲルから切り出し、GeneClean II Kit を用いて精製した。得られた DNA を pTargetT vector

(Promega) を用いて TA cloning を行った。各遺伝子の塩基配列は dideoxy sequence 法により確認した。次に酵母発現 vector である pKT10 に subcloning するため pTargetT-BOP1、 pTargetT-BOP2、 pTargetT-FKHI および pTargetT-RTS1 と pKT10 を制限酵素 (KpnI/XhoI) で切断し、0.8% agarose ゲル電気泳動を行い、目的のサイズの DNA をゲルから切り出し、GeneClean II Kit を用いて精製した。得られた DNA と pKT10 を DNA ligation Kit Ver.2 を用いて連結した後、大腸菌 (XL-1) に Hanahan の方法に従って導入した。コンピテントセル溶液 200 μ l にプラスミド溶液 10 μ l を加え、氷上に30分間静置した後、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。この溶液にSOC培地0.8 mlを加え、37°Cで1時間培養した後、ampicillin sodium salt 50 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 50 μ g/ml を含むLB培地2mlで一晩浸漬培養した後、GeneElute Plasmid Mini-Prep Kit (Sigma) を用いて大腸菌よりプラスミドを回収した。Bop1 および Bop2 は定量 PCR 法 (実験方法 12 参照) によりそれぞれの mRNA 発現

を確認した。また、Fkh1 および Rts1 は Western blotting 法 (実験方法 14 参照) によって蛋白質の発現を確認した。

7. Yeast two-hybrid system における蛋白質結合実験に用いる plasmid の作製

Bop3 およびその結合蛋白質として明らかになっている Fkh1、Rts1、Bmh2 およびその homologue である Bmh1 をコードする遺伝子を酵母 chromosomal DNA を template とし、以下に示す primer を用い、PCR により cloning した。それぞれの PCR 産物は 0.8% アガロースゲル電気泳動を行い、目的のサイズの DNA をゲルから切り出し、GeneClean II Kit を用いて精製した。得られた DNA を pGEM-T Easy vector (Promega) を用いて TA cloning を行った。各遺伝子の塩基配列は dideoxy sequence 法により確認した。次に酵母 Two-hybrid system 用 vector である pDBLeu (*BOP3*) または pPC86 (*BMH1*, *BMH2*, *FKH1*, *RTS1*) に subcloning するため pGEM-T Easy-*BOP3*, pGEM-T Easy-*BMH1*, pGEM-T Easy-*BMH2*, pGEM-T Easy-*FKH1* および pTargetT-*RTS1* と pDBLeu および pPC86 を適当な制限酵素 (pGEM-T

Easy-*BOP3*, pDBLeu : *NheI/NotI*, pGEM-T Easy-*BMH1*, pGEM-T Easy-*BMH2*, pGEM-T Easy-*FKH1*, pTargetT-*RTS1*, pPC86 : *SalI/NotI*) で切断し、0.8% agarose ゲル電気泳動を行い、目的のサイズの DNA をゲルから切り出し、GeneClean II Kit を用いて精製した。得られた DNA と pDBLeu または pPC86 を DNA ligation Kit Ver.2 を用いて連結した後、大腸菌 (XL-1) に Hanahan らの方法に従って導入した。コンピテントセル溶液 200 μ l にプラスミド溶液 10 μ l を加え、氷上に 30 分間静置した後、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。この溶液に SOC 培地 0.8 ml を加え、37°C で 1 時間培養した後、ampicillin sodium salt 50 μ g/ml (pPC86, pPC86-*BMH1*, pPC86-*BMH2*, pPC86-*FKH1*, pPC86-*RTS1*) または Kanamycin sulfate 20 μ g/ml (pDBLeu, pDBLeu-*BOP3*) 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 50 μ g/ml, Kanamycin sulfate 20 μ g/ml を含む LB 培地 2 ml で一晩浸盪培養した後、GeneElute Plasmid Mini-Prep Kit (Sigma) を用いて大腸菌よりプラスミドを回収した。

8. Yeast two-hybrid system 用 plasmid の酵母への導入

酵母の形質転換は酢酸リチウム法により行った。まず、酵母 AH109 株を完全培地である YPD 培地 2 ml に植菌し 30℃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 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 になるように懸濁し、気相中、30℃で 15 分間 incubate した。この懸濁液 50 μ l に 8 で作製した酵母 Two-hybrid system 用 plasmid、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℃で 30 分間 incubate した。その後、42℃で 15 分間の heat shock をかけた後に集菌し、100 μ l の滅菌水で懸濁して SD (-leu, -trp) 寒天培地に塗布し、30℃で 2 日間培養した。

9. Yeast two-hybrid system における蛋白質結合実験

9 での形質転換により得られた colony を SD (-leu, -trp) 培地 2 mL で 1×10^8 cells/ml になるまで浸盪培養した後、SD (-leu, -trp) 寒天培

地および SD (-leu, -trp, -his) 寒天培地に塗布し、30℃で培養した。

10. GFP (green fluorescent protein) 融合遺伝子の作製

GFP (green fluorescent protein) 融合遺伝子の作製は pBlueScript-GFP536 plasmid を template とし PCR により行った。PCR 産物は 0.8% agarose ゲル電気泳動を行い、目的のサイズの DNA をゲルから切り出し、GeneClean II Kit を用いて精製した。得られた DNA を pGEM-T Easy vector (Promega)を用いて TA cloning を行った。その後、適当な制限酵素 (*Hind*III/*Bam*HI) で切断し、pKT10-MSN2 に subcloning した。GFP の塩基配列は sequence により確認した。

11. GFP-Msn2 融合蛋白質の局在変化の観察

10 で作製した pKT10-GFP-MSN2 を酢酸リチウム法により形質転換を行った。ここで得られた Colony を 2 ml の SD (-ura) 培地で一晩浸盪培養した後、その培養液を SD (-ura) 培地で 2 倍希釈しさらに log phase になるように 2 時間浸盪培養した。この培養液を 96-well plate に 180 μ l 添加後、塩化メチル水銀 (final 80 nM) 20 μ l を添加し 30℃で 5 min、

10 min、30 min 培養後、その培養液 5 μ l をスライドガラス上にスポットし、蛍光顕微鏡を用いて GFP の蛍光を観察した。

12. 定量 PCR 法

酵母を培養した後に total RNA を調整し cDNA を作製した。まず、3 μ g の total RNA にランダムプライマー (50 ng/ μ l) 1 μ l および滅菌精製水を加え全量を 12 μ l にし、70 $^{\circ}$ C、10 分間 incubate した後に 1 分間氷冷した。この溶液に 5 x First-strand buffer 4 μ l、0.1 M DTT 2 μ l、10 mM dNTP 1 μ l を加えて 25 $^{\circ}$ C で 5 分間 incubate した後に Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase (M-MLV RT)(Gibco) を 200 units 加えて 25 $^{\circ}$ C で 10 分間、42 $^{\circ}$ C で 50 分間、70 $^{\circ}$ C で 20 分間 incubate したものを cDNA とした。この cDNA を template とし iQ SYBR Green Supermix (BIO-RAD) およびそれぞれのオリゴヌクレオチドを最終濃度が 400 nM になるように反応溶液を調整した。PCR は iCycler iQ Detection System (BIO-RAD) で行い、経時的に蛍光の変化の検出を行った。cDNA が PCR によって単一のバンドとして増幅するかどうかを電気泳動で確認した。

13. 酵母のメチル水銀に対する感受性

酵母の single colony を SD 培地 2 ml に植菌し一晩振盪培養した後、この培養液を SD 培地で 1×10^5 cells/180 μ l になるように希釈した。この希釈培養液を 96-well plate に 1×10^5 cells/well になるように 180 μ l 添加後、塩化メチル水銀 (final 0~140 nM) 20 μ l を添加し 30 $^{\circ}$ C で 48 時間培養後、620 nm における吸光度を microplate reader で測定して酵母の増殖を調べた。

14. 蛋白質発現の確認 (Western-blotting 法)

酵母を 2 ml の SD 培地に植菌し 30 $^{\circ}$ C で一晩振盪培養した後、2,300xg、4 $^{\circ}$ C で 5 分間遠心し、その沈殿に 2 ml の冷滅菌蒸留水を加えて、振盪した後に、2,300xg、4 $^{\circ}$ C で 5 分間遠心して沈殿として集菌した。この操作を 2 回繰返して得られた菌体に lysis buffer (20 mM Tris-HCl (pH7.5)、1 mM EDTA、5 mM MgCl₂、50 mM KCl、5% glycerol、3 mM DTT、1 mM phenylmethylsulphonyl fluoride、1 μ g/ml pepstatin A) と glass-beads を加えて、40 分間、4 $^{\circ}$ C で混和した後に、20,000xg、4 $^{\circ}$ C で 10 分間遠心して、細胞抽出液とした。この細胞抽出液に電気泳動用 sample