

2 次抗体には horseradish peroxidase conjugated anti-mouse IgG (Cappel) を用いた。

6. Cdc34 高発現によるメチル水銀耐性獲得におけるプロテアソーム活性の役割

それぞれの酵母の single colony を SD (-leu) 培地 2 ml に植菌し 30℃で一晩振盪培養した後、この培養液をプロテアソーム阻害剤である carbobenzoxy-leuciny-l-leuciny-l-leucinal (MG132、Affiniti) (100 倍濃度の dimethyl sulfoxide (DMSO、Nacalai) 溶液として調製) を最終濃度 0、50、100 μ M 含む SD (-leu) 培地で 1×10^4 cells/ 180μ l になるように希釈した。MG132 は野生型酵母の細胞膜を通過できないために、本研究では、膜透過性を高めるために ergosterol 合成に関与する酵素 *ERG6 (ISE1)* 遺伝子の欠損株を用いた。

プロテアソーム変異株のメチル水銀感受性は、control 株である WCG4a と、プロテアソームの subunit である *PRE1* の missense mutant でプロテアソーム活性が低い WCG4-11a (University of Stuttgart の W. Heinemeyer 博士より供与された) を塩化メチル水銀 (final 1、3 μ M) 含む YPD 寒天培地に細胞数が 5×10^4 、 5×10^3 、 5×10^2 / 5μ l になるように spotting し、30℃で 72 時間生育させることにより調べた。

7. Northern blotting

酵母を 2 ml の YPD 培地に植菌し 30℃で一晩振盪培養した後に、 5×10^6 cells/ml を 40 ml の YPD 培地に移し、30℃で 3 時間振盪培養した。次に塩化メチル水銀 (final 0~100 nM) を添加して 90 分間培養した後に、2,300xg、4℃で 5 分間遠心した。得られた沈殿に 10 ml の冷滅菌蒸留水を加えて振盪した後に、2,300xg、4℃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、RNA extraction buffer、glass-beads および phenol/chloroform (1:1) を加え、激しく混和した後、15,000xg、10 分間遠心して上清を得た。この上清を ethanol によって沈澱させ、total RNA を抽出した。RNA (25 μ g) に sample buffer (6.4% formaldehyde、48% formamide、MOPS buffer (20 mM 3-(*N*-morpholino) prophanesulfonic acid (pH7.0)、5 mM NaOAc、1 mM EDTA) を加え、65℃、15 分熱変性させた後に、agarose ゲル (1.2%) を用いて電気泳動を行った。泳動終了後、10 x SSC (150 mM NaCl、150 mM sodium citrate) を用い Nytran nylon membrane (Scheicher & Schuell) に transfer した。この membrane を hybridization buffer (7% sodium dodecylsulfate (SDS)、50% formamide、2% blocking reagent (Boehringer)、0.1% sodium *N*-lauroylsarcosylate、57.7 mM Na_2HPO_4 、42.3 mM NaH_2PO_4 、5 x SSC)

中で、50℃、1時間振盪後、DIG 標識した DNA probe を加えて、50℃、12時間振盪した。この membrane を 0.1% SDS を含む 2 x SSC 中で15分、さらに0.1% SDS を含む 0.5 x SSC 中で50℃、1時間振盪して洗浄した。次に、membrane を blocking 溶液 (0.15 M NaCl, 0.1 M maleic acid (pH7.5), 1% blocking reagent) 中で、30分間 incubate した後に、0.075 U/ml の anti-digoxigenin-alkaline phosphatase Fab fragments (Boehringer) を含む blocking 溶液中で30分間 incubate した。Membrane を洗浄 buffer (0.3% tween20, 0.15 M NaCl, 0.1 M maleic acid (pH7.5)) 中で30分振盪後、CDP-Star (Boehringer) を基質として発光させ、Lumi Film (Boehringer) に露光して検出した。

8. Human CDC34 (hCDC34) の cloning

HEK (Human Embryonic Kidney) 293 細胞の total RNA を抽出し、それを逆転写酵素 (Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase, Gibco) を含む反応溶液中で 42℃、1時間 incubate して一本鎖 cDNA を合成した。この cDNA を template とし、PCR を行った。PCR 産物は pTarget vector を用いて TA cloning を行った後、insert は制限酵素 *KpnI/XhoI* で切断し、mammalian 発現 vector である pcDNA3.1-hygro vector に subcloning した。TA cloning 後 hCDC34 の塩基配列

を sequence により確認した

9. 細胞培養および hCdc34 高発現細胞の作製

HEK293 細胞は、Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM、日水製薬) に 0.06% L-glutamine、100 U/ml penicillin G sodium (Gibco)、100 μ g/ml streptomycin sulfate (Gibco) および 10% fetal bovine serum (JRH Bioscience) を添加した培地を用いて、37℃、5% CO₂ 存在下で培養した。

8 で cloning した pcDNA3.1-hCDC34 および空 vector である pcDNA3.1 を TransIT™ (Mirus) を用いて HEK293 細胞に導入した。各 transfectant は hygromycin (500 μ g/ml) で selection することにより作製した。これらの細胞から Isogen (Nippon Gene) を用いて total RNA を抽出して、Roche diagnostics DIG system により Northern blotting を行い、hCDC34 mRNA の発現を確認した。

10. hCdc34 高発現細胞におけるメチル水銀に対する感受性

HEK293細胞の stable transfectant を 5×10^2 cells/90 μ l/well になるように 96-well plate に播き、37℃、5% CO₂ 存在下で24時間培養後、塩化メチル水銀 (final 0~2 μ M) を含む DMEM を 10 μ l/well ずつ添加してさらに7日間培養した。培養終了後、Alamar Blue (TREK Diagnosis Systems)

を10 μ l/well添加し、37°C、5% CO₂存在下で3時間incubateした後に、蛍光plate reader (Spectra Max Gemini XS、Molecular Devices) で蛍光を測定した (excitation, 544 nm; emission, 590 nm)。

(倫理面への配慮)

本研究では動物等は使用せず、生物として酵母のみを用いる。したがって、倫理面への配慮を必要としない。

C. 結果・考察

1. Cdc34 高発現酵母のメチル水銀に対する感受性

Cdc34 高発現酵母をメチル水銀 (final 50 nM) を含む寒天培地に細胞数が 5×10^4 、 5×10^3 、 5×10^2 、 $5 \times 10^1/5 \mu$ l になるように spotting して生育させることによりメチル水銀に対する感受性を調べた。その結果、寒天培地においても Cdc34 高発現酵母は空 vector を導入した control 株に比べて明らかな耐性を示すことが確認された (Fig. 2)。

メチル水銀以外の水銀化合物および他の重金属に対する Cdc34 高発現酵母の感受性を pRS425 のみを導入した酵母を対照として検討した。その結果、Cdc34 高発現酵母は水銀化合物である無機水銀や pCMB および重金属であるカドミウムに対して耐性を示した (Fig. 3)。さらに、活性酸素種の一つである過酸化水素や酸化ストレスを誘導するパラコートに対しても耐性を示した

(Fig. 4)。しかし、Cdc34 高発現酵母は alkyl 化剤で発がん性物質でもある methyl methanesulfonate や superoxide anion を生成する menadione、酸素と反応して alkylperoxyl radical や hydroperoxide を生成する AAPH (Fig. 4) や紫外線 (data not shown) に対しては交叉耐性を示さなかった。一方、種々の制がん剤に対する感受性を調べたところ、DNA に架橋を形成する cisplatin、活性酸素を生成する peplomycin、alkyl 化剤である mytomyacin C、nucleotide 代謝拮抗剤である 5-fluorouracil および DNA に intercalate する adriamycin に対しても Cdc34 高発現酵母はほとんど耐性を示さなかった (Fig. 5)。これらの結果から、Cdc34 高発現酵母は水銀化合物やカドミウムといった重金属および過酸化水素やパラコートなどの酸化ストレス誘導剤に対して耐性を示すものと思われる。

2. メチル水銀耐性に関与する Cdc34 domain の解析および細胞内でのユビキチン化蛋白質量の変動

メチル水銀耐性に必要な domain を検索するため、Cdc34 の様々な変異体を高発現する酵母を作製し、それら酵母のメチル水銀に対する感受性を調べた。Cdc34 を含めて E2 は遺伝子ファミリーを形成しており、全ての E2 においては Fig. 6 に示すような catalytic domain が保存されている。この catalytic domain 中には、ユビキチンとの

thioester 結合に必須な cysteine が存在する。そこでまず、ユビキチン結合部位である cysteine を alanine に置換した mutant を作製したところ、この酵母はメチル水銀に対して耐性を示さなかった (Fig. 7a)。このことから、Cdc34 とユビキチンとの結合がメチル水銀耐性に必要である可能性が考えられる。

しかし、高発現した Cdc34 のユビキチン結合部位である cysteine にフリーのメチル水銀がトラップされて、細胞内のフリーのメチル水銀濃度が減少し、その結果としてメチル水銀の毒性発現が抑制されるという可能性も否定できない。Cdc34 が E2 としてユビキチン転移機能を示すためには E3 との結合が必須であり、Cdc34 の 171-209 aa (Fig. 6) がその結合領域に相当する。また、unique insert 中にある三つのアミノ酸 (glutamate 109, aspartate 111, glutamate 113) も Cdc34 の E2 としての機能に必須とされている。そこで、ユビキチン結合部位の cysteine は保持し、E3 結合領域を欠損させた mutant、あるいは unique insert 中の三つのアミノ酸をすべて alanine に置換させた mutant (Fig. 6) をそれぞれ高発現させた酵母を用いてメチル水銀に対する感受性を調べた。その結果、いずれの mutant を高発現させた酵母もメチル水銀に対して耐性を示さなかった (Fig. 7a)。以上の結果は、Cdc34 高発現によるメチル水銀耐性には、Cdc34 がユビキチンおよび E3 と結合することが必要であるこ

とを示しており、Cdc34 の E2 としての機能であるユビキチン転移反応がメチル水銀耐性に必須であると考えられる。

次に、これらの酵母より細胞抽出液を調製し、multiubiquitin specific antibody を用いた immunoblotting により、細胞内でユビキチン化された蛋白質の総量を測定した。その結果、Cdc34 高発現酵母ではユビキチン化蛋白質量が control 酵母に比べて著しく高かったが、メチル水銀に対して耐性を示さなかった Cdc34 の mutant を高発現させた酵母ではユビキチン化蛋白質量が control 酵母とほとんど同程度であった (Fig. 7b)。この結果も、Cdc34 の E2 としての作用すなわち、ユビキチン転移反応の亢進が酵母にメチル水銀耐性を与える可能性を強く支持している。なお、ユビキチンシステムでは E2 以外にも複数の蛋白質 (E1, E3) が関与しているが、本研究結果は、Cdc34 が高発現するだけでユビキチン化反応が促進されることを示している。

3. ユビキチンシステム構成因子の高発現酵母のメチル水銀に対する感受性

Cdc34 を介する蛋白質のユビキチン化には、E1 である Uba1 および E3 複合体の一つである SCF (Skp1, Cdc53/cullin, F-box protein) が関与し、この E3 複合体は四つの subunit (Cdc53, Skp1, Hrt1, F-box protein) からなることが知られている (Fig. 1)。そこで、この酵素群の各構成因子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、E2 以外の因子の中では、E1 である Uba1 を高発現させた酵母のみがメチル水銀に対して若干耐性を示したものの、他の因子の高発現は酵母のメチル水銀耐性にほとんど影響を与えなかった (Fig. 8a)。またこれらの酵母内の蛋白質のユビキチン化量を調べたところ、E2 である Cdc34 を高発現している酵母のみで、顕著な上昇が認められた (Fig. 8b)。

一方、E2 は遺伝子ファミリーを形成しており、出芽酵母ではメチル水銀耐性因子として見出した Cdc34 以外にも、12 個の E2 様遺伝子が同定されている。そこで、いくつかの E2 の分子種を高発現させた酵母を作製し、これらの酵母を用いてメチル水銀に対する感受性を調べた。その結果、Cdc34 (Ubc3 と呼ばれる) を高発現させた酵母よりもその程度は劣るものの、Ubc4、5、7 の高発現によっても、メチル水銀耐性が認められた (Fig. 9a)。ここで認められた耐性度の差は、恐らく各 E2 分子種の基質特異性の差を反映しているものと考えられる。さらに、これらの酵母内のユビキチン化蛋白質量を調べたところ、メチル水銀に対して耐性を示した E2 の分子種を高発現させた酵母においてもユビキチン化蛋白質量の増加が認められた (Fig. 9b)。以上の結果は、E2 がユビキチン化反応の律速蛋白質である可能性を初めて示唆するものであり、E2 の高発現は細胞内における蛋白質のユビキチン化を促進させることによって、

メチル水銀毒性に対して防御的に作用するものと考えられる。

4. メチル水銀による細胞内でのユビキチン化蛋白質量の変動

メチル水銀は SH 基との結合性が強く、特に SH 酵素はメチル水銀によって強く阻害されることが知られている。したがって、SH 酵素の一つである Cdc34 のユビキチン転移活性がメチル水銀によって直接的に阻害されるという可能性も否定できない。この場合、Cdc34 高発現酵母では Cdc34 活性が阻害されるのに必要なメチル水銀濃度が control 細胞に比べて高くなるために耐性を示すことになる。そこで、メチル水銀の添加が細胞内での蛋白質のユビキチン化量におよぼす影響について検討したところ、control 酵母および Cdc34 高発現酵母共に細胞内のユビキチン化蛋白質量はメチル水銀添加によって減少することはなく、むしろ僅かに増加した (Fig. 10)。この結果から少なくとも、メチル水銀は Cdc34 を含む E2 のユビキチン転移活性を阻害しないものと考えられる。

5. メチル水銀に対する耐性獲得とプロテアソーム活性との関係

ユビキチン化された標的蛋白質は最終的にプロテアソームに認識されて速やかに分解される。そこで、プロテアソームによる分解がメチル水銀に対する耐性獲得に及ぼす影響を調べた。まず、プロテアソーム阻

害剤である MG132 を用いて、プロテアソームによる分解が Cdc34 高発現によるメチル水銀耐性獲得におよぼす影響を検討したところ、MG132 非存在下では、Cdc34 の高発現が酵母にメチル水銀耐性を与えたが、50 μ M または 100 μ M の MG132 処理によって、Cdc34 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. 11)。

さらに、プロテアソーム活性が低い酵母 (WCG4-11a) を用いてメチル水銀に対する感受性を調べた。ここで用いた WCG4-11a 株はプロテアソームの subunit である *PRE1* の missense mutant であり、低プロテアソーム活性を示すことが知られている。その結果、control 酵母である WCG4a 株に比べて WCG4-11a 株はメチル水銀に高感受性を示した (Fig.12)。このことから、Cdc34 高発現によるメチル水銀耐性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須であると考えられる。また、Cdc34 が関与するユビキチン-プロテアソームシステムがメチル水銀に対する防御機構として重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

6. メチル水銀によるユビキチンシステム構成遺伝子誘導の影響

ストレス応答に関わる因子の中には、ストレスにより発現が上昇するものが存在することが知られている。そこで、ユビキチンシステムに関わる各遺伝子の発現に対するメチル水銀の影響を Northern blotting

により検討した。その結果、メチル水銀添加により *CDC34* (*UBC3*)、*UBC4*、*UBC7* の mRNA レベルが上昇することが判明した。また、E1 である *UBA1* の mRNA レベルもメチル水銀添加によって若干の上昇を示した (Fig. 13)。この結果から、ユビキチンシステムはメチル水銀によるストレスに応答して誘導される防御機構として機能する可能性も考えられる。

7. hCdc34 高発現細胞のメチル水銀に対する感受性

ヒトなどの高等動物においても、より多くの E2 遺伝子が存在することが知られている。そこで、ヒトの *CDC34* (*hCDC34*) を HEK293 細胞に導入し、hCdc34 高発現細胞を作製した。まず、それぞれの hCdc34 高発現細胞における *hCDC34* の発現を Northern blotting 法で確認した結果、vector のみを導入した細胞に比べ、*hCDC34* を導入した細胞では、*hCDC34* mRNA の増加が認められた (Fig. 14a)。これらの hCdc34 高発現細胞を用い、メチル水銀に対する感受性を検討したところ、hCdc34 を高発現させた細胞の全てがメチル水銀に対して耐性を示した (Fig. 14b)。このことから、ヒトにおいても Cdc34 が関与するユビキチン-プロテアソームシステムがメチル水銀の毒性軽減機構として働いている可能性が考えられる。

D. 結論

ユビキチン転移酵素の一つである Cdc34 の高発現によるメチル水銀耐性獲得機構を検討し、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していることが初めて示唆された。ユビキチン-プロテアソームシステムが関与するメチル水銀の毒性発現機構およびそれに対する防御機構として以下のような可能性が考えられる。すなわち、ある種の特定の蛋白質がメチル水銀によって何らかの修飾を受け、この修飾蛋白質が細胞内に蓄積することによって細胞障害が引き起こされる。一方、メチル水銀によって修飾を受けた蛋白質のユビキチン化を介したプロテアソームでの分解の促進がメチル水銀毒性に対して防御的に作用する。したがって、メチル水銀により分解が促進される蛋白質を同定することによって、メチル水銀毒性の発現機構が解明できる可能性がある。さらに、ヒトの細胞を用いた実験系においても Cdc34 が関与するユビキチン-プロテアソームシステムがメチル水銀の毒性軽減機構として働いている可能性が示唆された。したがって、メチル水銀によって修飾を受けてユビキチン化される標的蛋白質をヒト細胞中で同定することによって、ヒトにおけるメチル水銀の細胞内標的分子が明らかになるものと期待される。

E. 健康危険情報

特になし。

F. 研究発表

1. 論文発表

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

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

Naganuma, A., Furuchi, T., Miura, N., Hwang, G. W. and Kuge, S.: Investigation of intracellular factors involved in methylmercury toxicity. *Tohoku J. Exp. Med.*, 196, 65-70 (2002).

永沼 章、黄 基旭: メチル水銀の毒性発現機構. *医学のあゆみ*, 202, 895-898 (2002).

2. 学会発表

黄 基旭、松本京子、古地壯光、永沼 章: Cdc34 高発現が HEK293 細胞のメチル水銀感受性に及ぼす影響. 日本薬学会第 122 年会, 2002.

黄 基旭、永沼 章: メチル水銀に対する
細胞内防御機構としてのユビキチンシステ
ム. 第 25 回日本分子生物学会年会, 2002.

G. 知的財産権の出願・登録状況
なし。

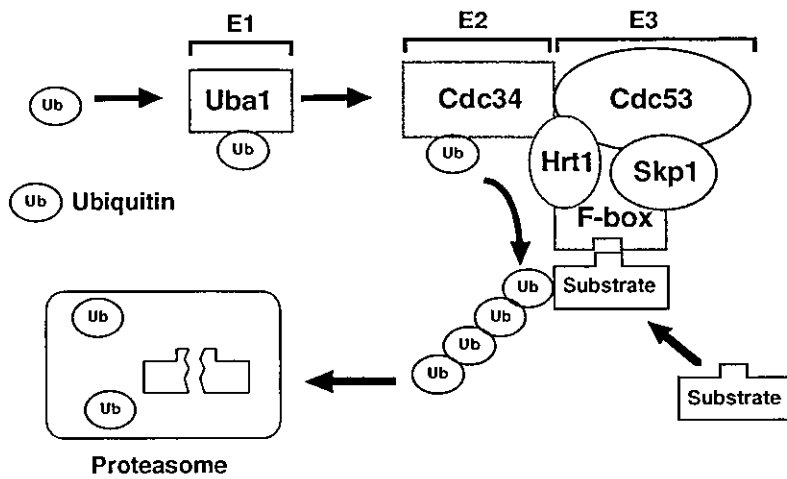


Fig. 1. Ubiquitin-proteasome system. Ubiquitin is activated initially by ubiquitin-activating enzyme (E1) via formation of a thioester bond with this enzyme. The activated ubiquitin is then transferred to one of a large number of distinct ubiquitin-conjugating enzymes (E2s) by transthiolation. The E2 enzymes then catalyze the ubiquitination of substrate proteins either directly or in conjunction with one of a number of distinct ubiquitin-ligases (E3s) which are composed of multiple proteins. The ubiquitination of a substrate protein is followed by degradation of the protein by the proteasome.

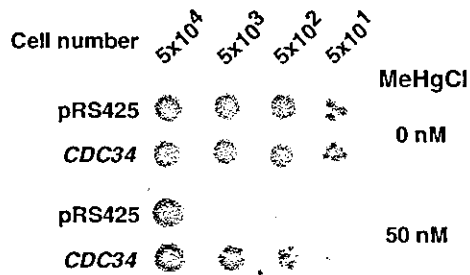


Fig. 2. Effects of the overexpression of Cdc34 on the sensitivity of yeast cells to MeHg. Yeast strains carrying pRS425 (control) or pRS425-CDC34 were grown on a plate of agar-solidified SD (-leu) medium for 3 days with or without MeHgCl.

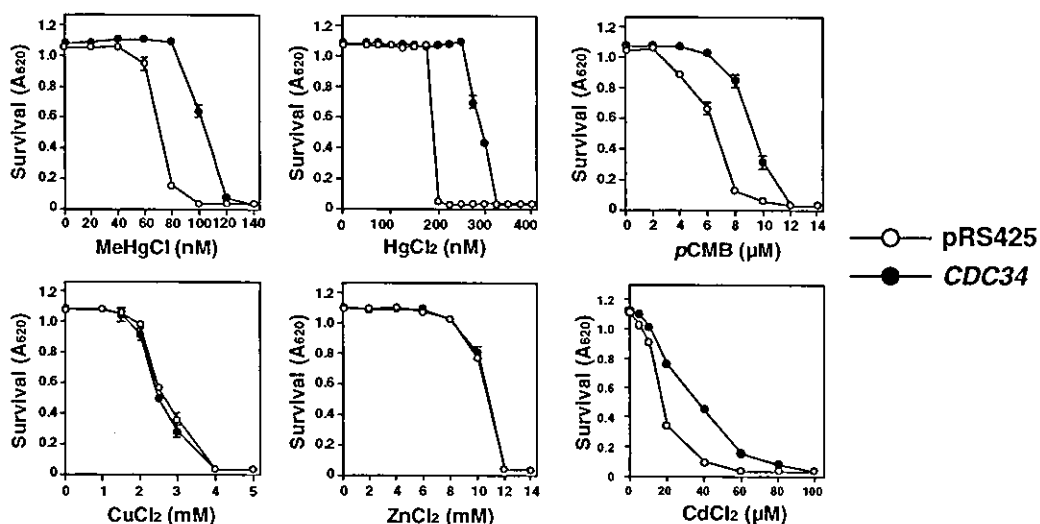


Fig. 3. Sensitivity of yeast cells that overexpressed Cdc34 to various metal compounds. Yeast cells carrying pRS425 (control) or pRS425-CDC34 (p1P1-F2) were grown in SD (-leu) medium that contained methylmercuric chloride (MeHgCl), mercuric chloride (HgCl₂), *p*-chloro-mercuribenzoate (pCMB), copper chloride (CuCl₂), zinc chloride (ZnCl₂) or cadmium chloride (CdCl₂). After a 48-hr incubation, absorbance at 620 nm was measured spectrophotometrically. Each point and bar represent the mean value and S. D. of results from four cultures. The absence of a bar indicates that the S. D. falls within the symbol.

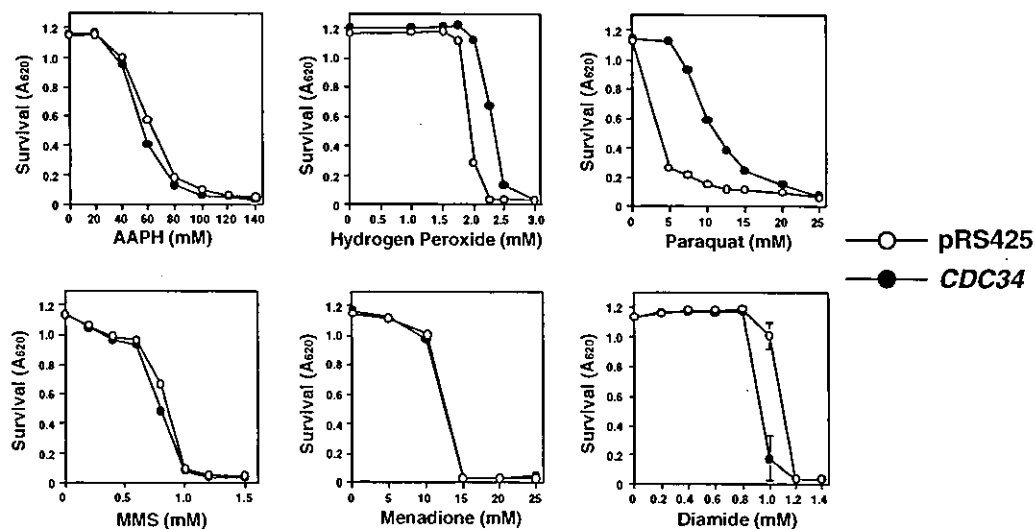


Fig. 4. Sensitivity of yeast cells that overexpressed Cdc34 to various oxidative-stress inducing agents. Yeast cells carrying pRS425 (control) or pRS425-CDC34 (p1P1-F2) were grown in SD (-leu) medium that contained 2,2'-azobis(2-amidinopropane)dihydrochloride (AAPH), hydrogen peroxide, paraquat, methyl methanesulfonate (MMS), menadione or diamide. After a 48-hr incubation, absorbance at 620 nm was measured spectrophotometrically. Each point and bar represent the mean value and S. D. of results from four cultures. The absence of a bar indicates that the S. D. falls within the symbol.

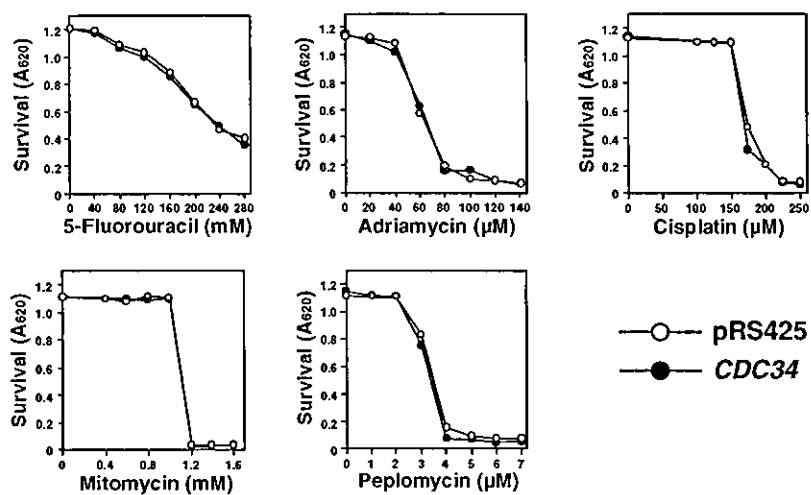


Fig. 5. Sensitivity of yeast cells that overexpressed Cdc34 to various anticancer drugs. Yeast cells carrying pRS425 (control) or pRS425-CDC34 (p1P1-F2) were grown in SD (-leu) medium that contained 5-fluorouracil, adriamycin, cisplatin, mitomycin or peplomycin. After a 48-hr incubation, absorbance at 620 nm was measured spectrophotometrically. Each point and bar represent the mean value and S. D. of results from four cultures. The absence of a bar indicates that the S. D. falls within the symbol.

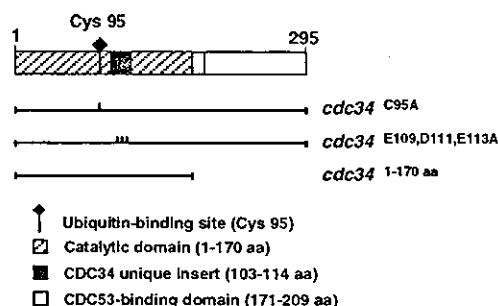


Fig. 6. Structural domains of Cdc34 and construction of mutant proteins. Cdc34 has only one cysteine moiety, located at position 95, and this cysteine moiety is known to be the binding site for ubiquitin. The altered amino acids are located in a 12-residue segment of Cdc34 that is not found in most other E2s and might be involved in the unique activity of Cdc34.

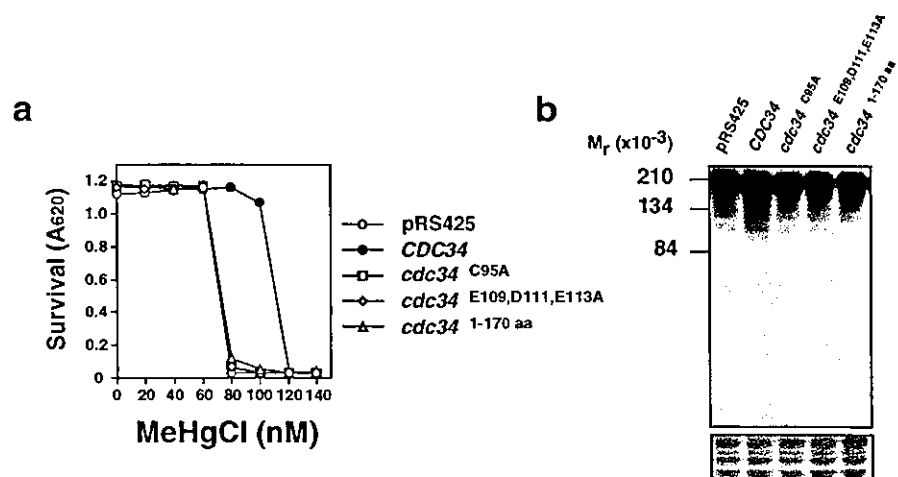


Fig. 7. Effects of overexpression of Cdc34 or its mutants on the sensitivity of yeast cells to MeHg and ubiquitination of proteins. a, Yeast strains carrying pRS425 (control), pRS425-CDC34, pRS425-cdc34 C95A, pRS425-cdc34 E109, D111, E113A or pRS425-cdc34 1-170 aa were grown in SD (-leu) medium in the presence of various concentrations of MeHgCl. After a 48-hr incubation, absorbance was measured at 620 nm. Each point and bar represent the mean value and S.D. of results from three cultures. The absence of a bar indicates that the S.D. falls within the symbol. b, Lysates of these cells were subjected to immunoblotting analysis with multiubiquitin-specific antibody. Staining with Coomassie blue (lower panel) is shown as an indication of the amount of total protein loaded.

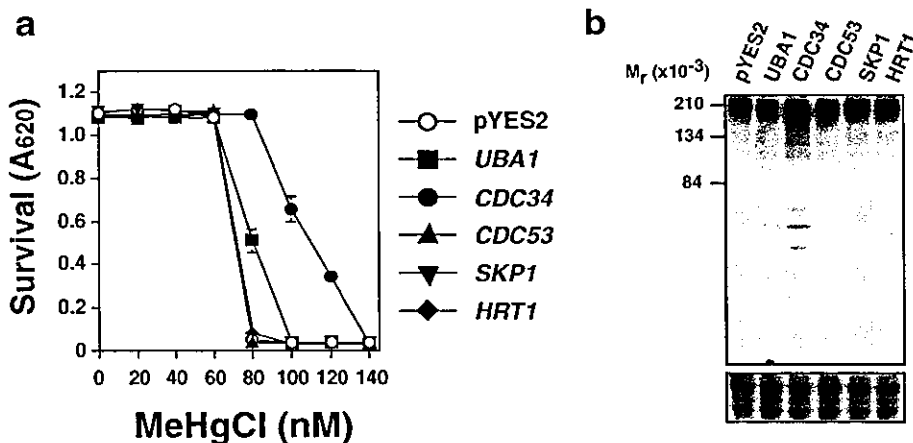


Fig. 8. Effects of overexpression of component proteins of the ubiquitin system on sensitivity to MeHg and ubiquitination of proteins. a, Yeast cells harboring pYES2 (control), pYES2-UBA1, pYES2-CDC34, pYES2-CDC53, pYES2-SKP1 or pYES2-HRT1 were cultured in SG (-ura) medium in the presence of various concentrations of MeHgCl. After a 48-hr incubation, absorbance was measured at 620 nm. Each point and bar represents the mean value and S.D. of results from three cultures. The absence of a bar indicates that the S.D. falls within the symbol. b, Lysates of these cells were subjected to immunoblotting analysis with multiubiquitin-specific antibody. Staining with Coomassie blue (lower panel) is shown as an indication of the amount of total protein loaded.

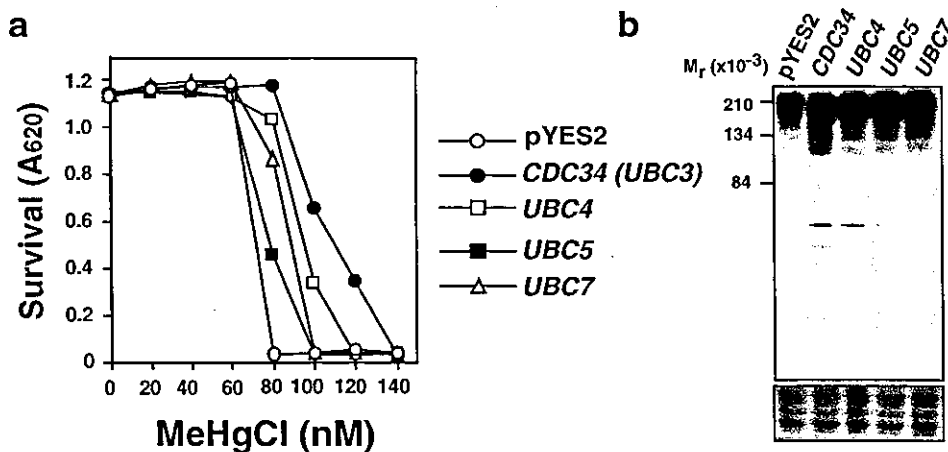


Fig. 9. Effects of overexpression of Cdc34 (Ubc3), Ubc4, Ubc5 or Ubc7 on sensitivity to MeHg and ubiquitination of proteins. a, Yeast cells carrying pYES2, pYES-CDC34, pYES-UBC4, pYES-UBC5 or pYES-UBC7 were grown in SG (-ura) medium that contained methylmercuric chloride (MeHgCl). After a 48-hr incubation, absorbance at 620 nm was measured spectrophotometrically. Each point and bar represent the mean value and S. D. of results from four cultures. The absence of a bar indicates that the S. D. falls within the symbol. b, Lysates of these cells were subjected to immunoblotting analysis with multiubiquitin-specific antibody. Staining with Coomassie blue (lower panel) is shown as an indication of the amount of total protein loaded.

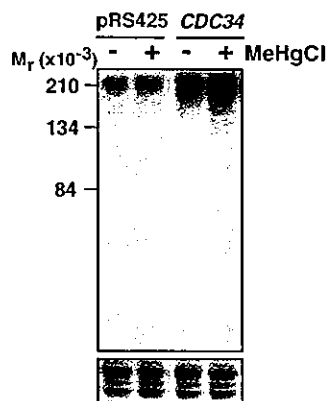


Fig. 10. Effects of MeHg on the ubiquitination of proteins. Yeast cells carrying pRS425 (control) or pRS425-CDC34 were cultured for 3-hr in the presence or absence of MeHgCl (100 nM). Lysates of these cells were subjected to immunoblotting analysis with multiubiquitin-specific antibody. Staining with Coomassie blue (lower panel) is shown as an indication of the amount of total protein loaded.

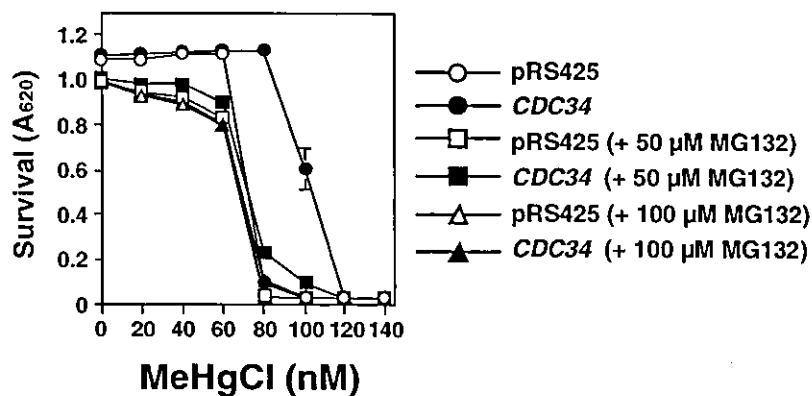


Fig. 11. Effects of MG132 (proteasome inhibitor) on Cdc34-mediated MeHg resistance in yeast cells. Yeast *erg6* cells that harbored pRS425 (control) or pRS425-CDC34 were grown in SD (-leu) medium, with or without the proteasome inhibitor MG132, in the presence of various concentrations of MeHgCl. After a 48-hr incubation, absorbance was measured at 620 nm. Each point and bar represent the mean value and S.D. of results from three cultures. The absence of a bar indicates that the S.D. falls within the symbol.

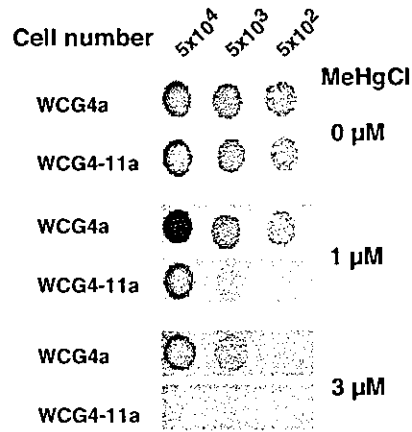


Fig. 12. Effects of proteasome activity on sensitivity to MeHg in yeast cells. Yeast WCG4a cells (control) and WCG4-11a cells (proteasome defective cells) were grown on a plate of agar-solidified YPD medium for 3 days with or without MeHgCl and then the plate was photographed.

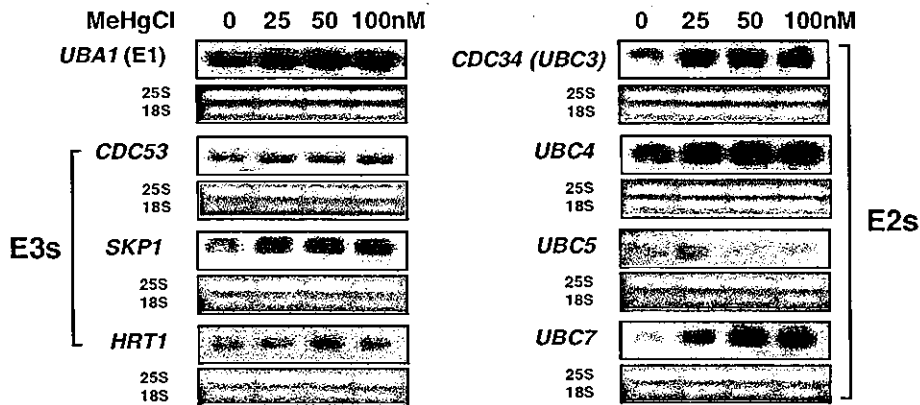


Fig. 13. Effects of MeHg on the levels of transcripts of the component genes of the ubiquitin system. Each lane was loaded with 20 μg of total RNA extracted from yeast cells (W303B) after treatment with methylmercuric chloride (MeHgCl) for 90 min. The bands of 25S and 18S RNA (lower panel) provide an indication of the amount of total RNA loaded in each lane.

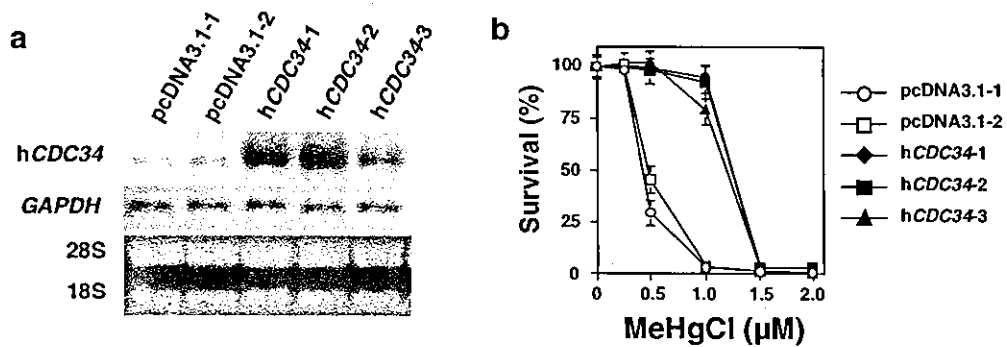


Fig. 14. Effects of overexpression of human Cdc34 (hCdc34) in HEK293 cells on the sensitivity to MeHg. a, Northern blotting analysis of hCDC34 mRNA. HEK293 cells were transfected with pcDNA3.1-hCDC34 or the pcDNA3.1 empty vector. Three clones of hCDC34 transfectants (hCDC34-1 to hCDC34-3) and two clones of cells transfected with the pcDNA3.1 empty vector (pcDNA3.1-1 and pcDNA3.1-2) were established. Each lane was loaded with 20 μg of total RNA extracted from the indicated transfectant. Bands of GAPDH mRNA and of 28S and 18S RNA are shown as indications of the amount of total RNA loaded. b, Sensitivity of each transfectant to MeHg. Each transfectant was cultured for 7 days in the presence of various concentrations of MeHgCl. Each point and bar represent the mean value and S.D. of results from three cultures. The absence of a bar indicates that the S.D. falls within the symbol.

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
（分担）研究報告書

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 μ l に上述の plasmid 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 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°C で 1 時間培養した後、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 colony を ampicillin sodium salt 100 μ g/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により注入し、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	:
tcaggagggatcacactca	
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 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ C で 60 分間、70 $^{\circ}$ 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。

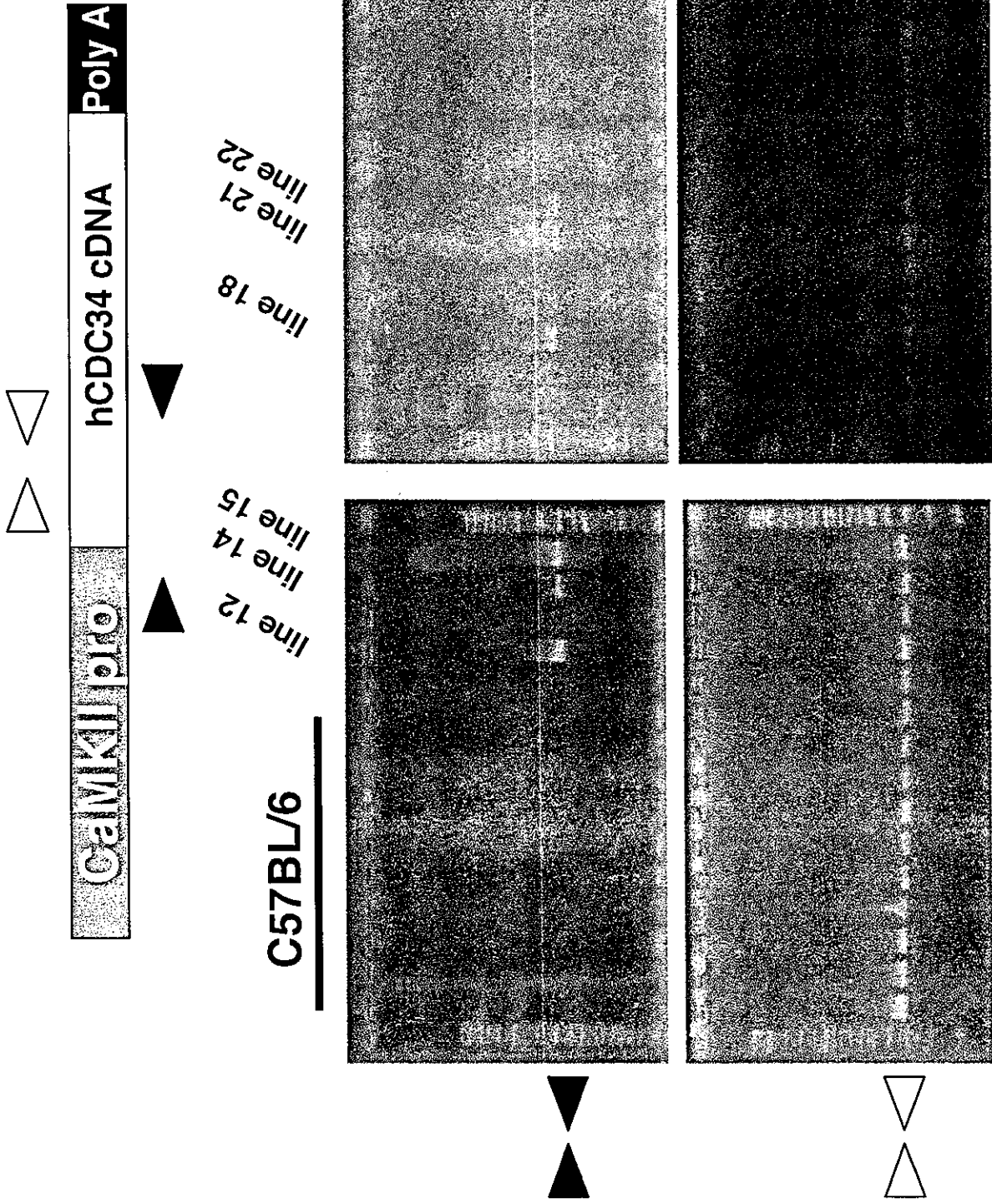


Fig. 1-1 PCR analysis of genomic DNA from hCDC34 transgenic lines