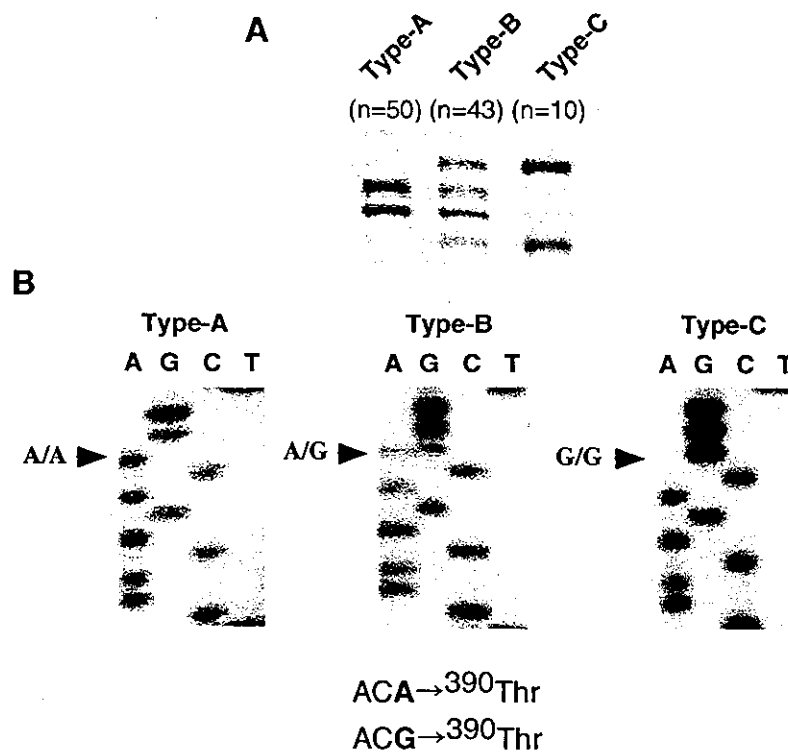


**Fig. 10 PCR-SSCP analyses of human metal transcription factor-1 (hMTF-1)**

(A) Examined regions of hMTF-1 for SSCP analysis. Each exon were amplified and each length of the PCR fragment is displayed as base pairs (bp). Exon 2, 9 and 11 were divided into two or three regions and amplified. (B) The SSCP band patterns of 10 subjects were indicated. Different SSCP patterns were observed only in exon 8 which encoded one part of acidic region.

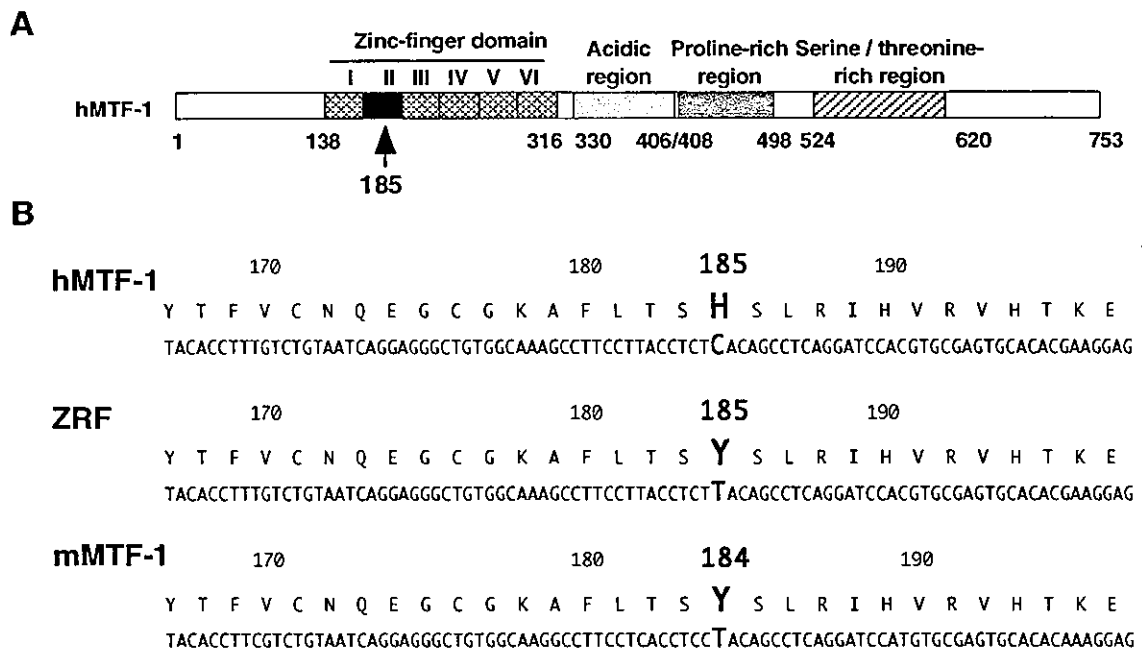


**Fig. 11** Examples of conformational variants in hMTF-1 exon 8 region detected through PCR-SSCP (A) and sequence analyses of the type A, B and C PCR reaction products (B)

(A) One hundred and three individuals were categorized in three SSCP patterns. (B) Point mutation at third nucleotide of codon 390 (A→G) was indicated by arrow head in the sequence. Type A, B and C were showed A/A, A/G and G/G nucleotide at codon 390.

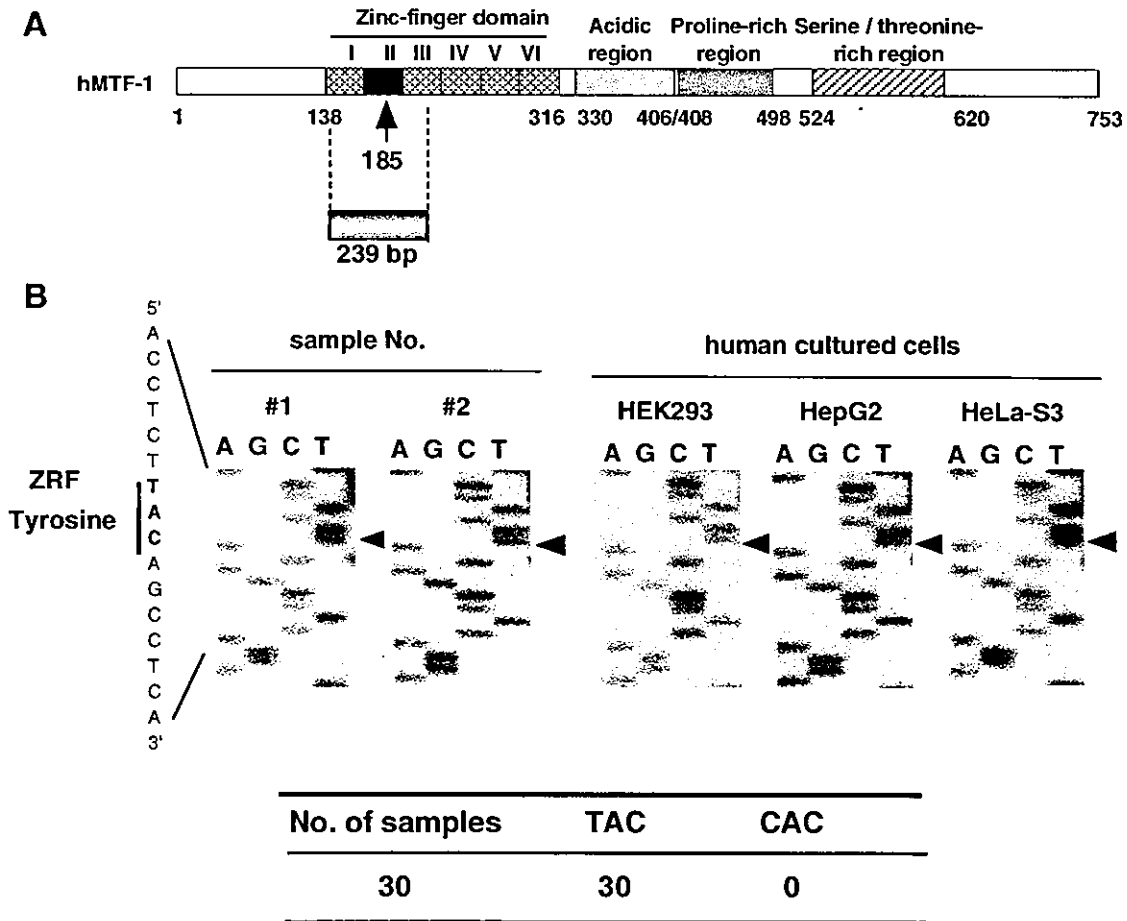
**Table 3.** Genotype and allele frequency of the polymorphisms at third nucleotide of codon 390 of hMTF-1 acidic region in 103 healthy individuals

| codon 390 | Genotype frequency |        |        | Allele frequency |       |
|-----------|--------------------|--------|--------|------------------|-------|
|           | A/A                | A/G    | G/G    | A                | G     |
|           | (n=50)             | (n=43) | (n=10) |                  |       |
|           | 0.482              | 0.425  | 0.093  | 0.694            | 0.306 |



**Fig. 12 Structural features of human MTF-1, ZRF and mouse MTF-1**

(A) Schematic representation of hMTF-1. (B) Nucleotides and amino acids sequences of the second zinc finger domain of hMTF-1, ZRF and mouse MTF-1. Amino acids are indicated in the one letter code above the nucleotide sequences.



**Fig. 13 Direct sequence analysis of the 239 bp fragment of second zinc finger domain in human MRE-binding transcription factor**

(A) Codon 185 in second zinc finger domain was indicated by arrow. (B) Sequence patterns of two typical Japanese out of thirty individuals, and three human cultured cells lines (293, HeLa-S3 and HepG2 cells) were indicated. First nucleotide in codon 185 are indicated by arrow head. All Japanese subjects and three human cultured cell lines showed the same sequence (TAC).

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

カドミウム耐性因子の遺伝子多型とその意義

分担研究者 久下周佐 東北大学大学院薬学研究科助教授  
（協力研究者 北 加代子 日本食品衛生協会リサーチレジデント）

前年度に一般的な日本人の遺伝子多型を検索し、カドミウム耐性因子であるメタロチオネイン（MT）の遺伝子プロモーター部分に一塩基変異のあることを見出した。そこで本変異の意義を調べるために、変異のあるプロモーターの下流にレポーター遺伝子を連結してメタロチオネイン合成能に与える影響を検討した。その結果、正常なプロモーターと比較してカドミウムによる誘導活性が有意に低いことが判明した。

A. 研究目的

メタロチオネイン（MT）は構成アミノ酸の約1/3をシステインが占め、しかもS-S結合を一つも持たないというユニークな特徴を有する生体防御蛋白質であり、組織中でカドミウムなどの有害重金属と強固に結合してその毒性の発現を抑制する。カドミウムは穀類中に比較的高濃度に存在するため、米類を多食する日本人は欧米人に比べて組織中カドミウム濃度が高い。カドミウム毒性の主要標的組織は腎臓であるが、日本人の腎臓中に蓄積しているカドミウムはそのほとんどがメタロチオネインに結合して存在しており、一般成人の腎臓中に蓄積しているカドミウムの濃度はメタロチオネイン遺伝子を欠損させたマウスを死に至らす濃度の数倍にもものぼる。したがってマウスと人間の種差を無視すれば、メタロチオネインは日本人の生存に不可欠な蛋白質と考えることができる。

このようなことから、我々は日本人腎臓

中のメタロチオネイン濃度を測定したところ、その濃度が高いグループと低いグループの2群に分類され、しかもこの分類は腎臓中のカドミウム蓄積量には無関係であることを見いだした。この事実は、日本人の中にメタロチオネイン濃度が低く、カドミウムによる障害を受けやすいと考えられる一群が存在する可能性を強く示唆している。腎臓機能障害は日本人に比較的多い疾患であるが、その原因の一つにメタロチオネインの合成異常によるカドミウム障害の発現が含まれる可能性も否定できない。

そこで本研究は、日本人におけるメタロチオネイン合成異常者の存在を明らかにし、そのメカニズムを解明すると共に、腎臓機能障害の発症とメタロチオネイン合成異常との関係を検討し、さらに、メタロチオネイン合成異常の診断方法を確立することを目的とする。

昨年度の研究によって、プロモーター部の転写開始点から上流5塩基目にアデニン

からグアニンへの一塩基置換のあることが明らかとなった。そこで本年度はこの一塩基変異がプロモーター活性に与える影響をレポーターアッセイで検討した。

## B. 研究方法

### トランジェントレポータージーンアッセイ

hMT-IIA プロモーター領域 (-202~+20) の下流にレポーター遺伝子である Lac Z を連結した野生型 (WT) および変異型 (mut) の 2 種類のプラスミドを作製した。まず、これら 2 種類のプロモーター一部を PCR により作製した。即ち、WT のプロモーターは 293 細胞から単離した genomic DNA を鋳型に、また mut プロモーターはコアプロモーターがホモ変異型であったサンプルを鋳型にし、下記のプライマーで PCR 反応 (95°C / 30 秒、96°C / 30 秒、61°C / 30 秒、72°C / 30 秒を 30 回繰り返した) を行い、pGEM-T easy vector にクローニングした。なお、挿入した PCR 産物の塩基配列をシーケンサーにより調べ、塩基配列に相違のないことを確認した。

KpnI/hMT-IIA pro-F : 5'-CGGGGTACCGGGCCCGCCTTCAGGGA  
ACTG-3'

BamHI/hMT-IIA pro (+1)-R : 5'-CGCGGATCCGGACTTGGAGGAGGCG  
TGGT-3'

次に、それぞれのプロモーターを KpnI-BamHI 処理により切り出し、pcDNA3.1/lac Z を ApaI-BamHI 処理することにより切り出した Lac Z 遺伝子と共に pcDNA3.1/hygro  $\alpha$  (CMV(-)) の KpnI/ApaI 領域に挿入し、最終的に

pcDNA3.1/hMT-IIA pro (WT)/lac Z および pcDNA3.1/hMT-IIA pro (mut)/lac Z プラスミドを構築した。

レポータージーンアッセイは、293 細胞を  $4 \times 10^4$  個/well になるよう 24 well plastic plate に播き、37°C、5 % CO<sub>2</sub> 存在下で 24 時間培養後、1 well あたり 0.1  $\mu$ g のレポータープラスミドおよび導入補正用に用いた pGL-EF1 $\alpha$  (EF-1 $\alpha$  プロモーターの下流にルシフェラーゼ遺伝子を発現させたプラスミド) 0.1  $\mu$ g を 0.6  $\mu$ l の Fugene 6 (Boehringer) を含む D'MEM (-) 20  $\mu$ l に混ぜ、これを細胞に滴下して遺伝子を導入した。

12 時間培養後、種々の濃度の薬物を含む D'MEM (+) を 400  $\mu$ l/well 加えてさらに 24 時間培養した。培養終了後、氷冷 PBS (-) で well 内を洗浄し Reporter Lysis Buffer (Promega) を 100  $\mu$ l/well 加え、凍結 (-80°C、30 min) 融解 (25°C、20 min) して細胞を回収した。この細胞懸濁液 45  $\mu$ l に等量の 0.2 % (w/v) o-nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside (ONPG) 発色液を加え 37°C で反応させた後、マイクロプレートリーダー (SLT Lab instruments) で 405 nm の吸光度を測定しプロモーター活性とした。一方、ルシフェラーゼアッセイは、細胞懸濁液 45  $\mu$ l にルシフェリン (Reconstituted Substrate, Promega) を 10  $\mu$ l 加えて、蛍光プレートリーダー (Spectra Max Gemini XS, Molecular Devices 社製) で発光強度を測定し、導入効率の補正に使用した。HepG2 細胞においても同様の手順で遺伝子を導入したが、HepG2 細胞では  $8 \times 10^4$  個/well になるように播き、導入したプラスミド

DNA はおのこの 0.2  $\mu$ g、Fugene 6 は 1.2  $\mu$ l 使用した。

### ゲルシフトアッセイ

$^{32}$ P 標識オリゴヌクレオチドプローブの作製

#### <試薬>

Adenosine 5'-triphosphate (ATP)-[ $\gamma$ - $^{32}$ P] EasyTides™ (第一化学薬品)

T4 Polynucleotide Kinase (New England Biolabs)

MicroSpin G-50 Columns (Amersham Pharmacia Biotech)

#### <方法>

500 pmol のセンスおよびアンチセンスオリゴヌクレオチド (下記) をアニーリングバッファー (200 mM Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM MgCl<sub>2</sub>, 500 mM NaCl) 中で 95°C で 5 分間熱変性させ、30 分間かけて徐々に温度を 45°C まで下げてアニーリングさせた。このオリゴヌクレオチド 2 pmol に 0.5  $\mu$ l の 10 x T4 polynucleotide kinase buffer、5 U の T4 polynucleotide kinase、740 kBq の [ $\gamma$ - $^{32}$ P]-ATP を加え、37°C、30 分反応した。70°C、10 分間反応して酵素を失活させ、MicroSpin G-50 Columns を用いて過剰の [ $\gamma$ - $^{32}$ P]-ATP を除去した。プローブの比活性 (cpm/ $\mu$ l) は、液体シンチレーションカウンター (Beckman LS6500) でチェレンコフ光を測定して求めた。

以下に本研究で用いたオリゴヌクレオチドを記した。-5A は野生型、-5g は変異型を示す。また MRE-p はコアプロモーター中の MRE 様配列を示している。

MRE-a

Sense oligonucleotide : 5'-gatccGGG  
CTT TTG CAC TCG TCC CGG CTC  
TTa-3'

Antisense oligonucleotide : 5'-  
gatctAAG AGC CGG GAC GAG TGC  
AAA AGC CCg -3'

MRE-p (-5A)

Sense oligonucleotide : 5'-GCC GCG  
CTG CAC TCC ACC ACG CCT CC-3'

Antisense oligonucleotide : 5'-GGA  
GGC GTG GTG GAG TGC AGC GCG  
GC-3'

MRE-p (-5g)

Sense oligonucleotide : 5'-GCC GCG  
CTG CGC TCC ACC ACG CCT CC-3'

Antisense oligonucleotide : 5'-GGA  
GGC GTG GTG GAG cGC AGC GCG  
GC-3'

TATA (-5A)

Sense oligonucleotide :

5'-CTA GCT ATA AAC ACT GCT TGC  
CGC GCT GCA CTC CAC CAC GCC TCC  
T

Antisense oligonucleotide :

5'-TTG GAG GAG GCG TGG TGG AGT  
GCA GCG CGG CAA GCA GTG TTT  
ATA G

TATA (-5g)

Sense oligonucleotide :

5'-CTA GCT ATA AAC ACT GCT TGC



CGC GCT GCG CTC CAC CAC GCC TCC  
T

Antisense oligonucleotide :

5'-TTG GAG GAG GCG TGG TGG AGC  
GCA GCG CGG CAA GCA GTG TTT  
ATA G

#### 核抽出液の調製

293細胞を  $6 \times 10^5$  個/dish になるように 60 mm plastic dish に播き、37°C、5% CO<sub>2</sub> 存在下で 24 時間培養後、種々の濃度の ZnCl<sub>2</sub> を含む D'MEM (+) に置き換え、さらに 4 時間培養した。培養終了後、細胞を回収し、氷冷 cell lysis buffer (10 mM (2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethanesulfonic acid (HEPES)-KOH (pH 7.6), 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 % (v/v) Nonidet P40, 0.5 mM DTT, 0.2 mM PMSF, 2 μg/ml aprotinin, 2 μg/ml leupeptin および 2 μg/ml pepstatin A) に懸濁した後に 10 秒間攪拌し、遠心 (2,000 x g, 1 min, 4°C) によって核画分を沈殿させた。ここに nuclear extract buffer (20 mM HEPES-KOH (pH 7.6), 400 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 25 % glycerol, 0.5 mM DTT, 0.2 mM PMSF, 2 μg/ml aprotinin, 2 μg/ml leupeptin および 2 μg/ml pepstatin A) を加え懸濁後、4°C で 30 分間穏やかに攪拌し、遠心 (20,000 x g for 15 min at 4°C) して得られた核抽出液 10 μg をゲルシフトアッセイに使用した。

#### 標識 MRE-a/MTF-1 に対するコンペティションアッセイ

核抽出成分 10 μg を 23 μl の binding buffer (12 mM HEPES (pH 7.6), 12 %

glycerol, 5 mM NaCl, 50 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.6 mM DTT, 100 μM ZnSO<sub>4</sub>, 3 μg Poly (dI-dC)·Poly (dI-dC)) 中で氷上に静置後、10,000 cpm/μl の <sup>32</sup>P 標識 MRE-a プローブを 2 μl 加えて室温で 20 分間反応した。なお、コンペティションアッセイでは、核抽出液を加える前に過剰量 (25~250 倍モル) の未標識のオリゴヌクレオチドを加えた。反応終了後 4.0 % (w/v) ポリアクリルアミドゲル (100 μM ZnSO<sub>4</sub>, 1 x TGE buffer (25mM Tris HCl (pH 8.5), 190 mM glycine, 0.5 mM EDTA) で 120 V, 90 分間泳動した。泳動バッファーには 100 μM ZnSO<sub>4</sub> を含む 1 x TGE buffer を用いた。泳動終了後、ゲルを乾燥させ、オートラジオグラフィーを行いバンドを検出した。

#### 標識した TATA box を含むプローブと結合蛋白に対するコンペティションアッセイ

核抽出成分 10 μg を 23 μl の binding buffer (12 mM HEPES (pH 7.6), 12 % glycerol, 5 mM NaCl, 50 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.6 mM DTT, 3 μg Poly (dI-dC)·Poly (dI-dC)) 中で氷上に静置後、10,000 cpm/μl の <sup>32</sup>P 標識 TATA (-5A) および TATA (-5g) プローブを 2 μl 加えて室温で 20分間反応した。なお、コンペティションアッセイは上記と同様に行なった。反応終了後4.0 % (w/v) ポリアクリルアミドゲル (0.25 x TBE buffer (22.25 mM Tris-borate (pH 8.0), 0.5 mM EDTA), 5 mM magnesium acetate)で120 V, 100分間泳動した。泳動バッファーには5 mM magnesium acetateを含む0.25 x TBE bufferを用いた。泳動終了後、ゲルを乾燥

させ、オートラジオグラフィーを行いバンドを検出した。

#### (倫理面への配慮)

本研究ではヒトの遺伝子解析を行ったが、実施に当たっては倫理委員会で承認された方法に従い、提供者に研究内容を十分に説明してインフォームドコンセントを得た。なお、試料提供者、その家族、血縁者、その他関係者の人権および利益の保護の取り扱いには十分に配慮し、個人情報には求めなかった。

### C. 結果・考察

#### MT遺伝子コアプロモーター上の一塩基置換がプロモーターかっせに与える影響

hMT-IIA 遺伝子のコアプロモーター上に認められる一塩基多型が Zn および Cd による転写誘導活性に与える影響をレポータージーンアッセイ法により検討した。その結果、HepG2 細胞では、野生型 (-5A) および変異型 (-5g) とともに、Zn, Cd の濃度依存的に転写活性が増加したものの、野生型に比べ変異型ではいずれの濃度においてもその値は低値を示した (Fig. 1)。また、293 細胞においても HepG2 細胞と同様の結果が得られた (Fig. 2)。従って、本研究によって見出されたコアプロモーター上の一塩基置換が重金属による MT 遺伝子の転写活性化に抑制的に働く可能性が考えられる。

転写活性の抑制の原因として、一塩基置換が転写因子 (群) のコアプロモーター配列への結合に影響を与えている可能性が考えられることから、次にゲルシフトアッセイ法によりこれら転写因子 (群) の結合に

対する影響を検討した。なお、前述したように hMT-IIA のコアプロモーター上には MRE 様配列が存在し、本研究で見出された一塩基置換は MRE のコンセンサス配列である TGCRNC の R (A or G) の部位に相当する (Fig. 3)。緒言で述べたように MRE には転写因子である MTF-1 が結合することが知られている。そこで先ず、この一塩基置換が MTF-1 の結合に与える影響を、コンペティションアッセイ法により検討した。hMT-IIA プロモーター上に複数存在する MRE の中で、MTF-1 と最も強固に結合することが知られている MRE-a を  $^{32}\text{P}$  で標識してプローブとして用い、核抽出液 (100, 250  $\mu\text{M}$  の  $\text{ZnCl}_2$  で処理した細胞から調製) と反応させたところ、これまでの報告と同様に亜鉛の濃度依存的な MTF-1 の標識 MRE-a に対する結合活性の上昇が確認された (Fig. 4, lane 1-3)。過剰量 (250 倍モル) の未標識 MRE-a プローブで予め処理することによりこのバンドは完全に消失したことから、ここで観察されたシフトバンドは MTF-1 と MRE-a の複合体であると考えられる (Fig. 4, lane 4)。そこでこの MTF-1/MRE-a 複合体に対し未標識の野生型 (-5A) および変異型 (-5g) の MRE 様配列プローブを用いたコンペティションアッセイを行ったところ、両プローブともに 250 倍量加えてもこの結合を全く阻害しなかった (Fig. 4, lane 5-8)。このことから検討したコアプロモーター領域の MRE 様配列には MTF-1 は結合しないことが示唆され、一塩基置換による転写活性の違いに MTF-1 は関与していないものと考えられる。

上述のように一塩基置換が認められた領

域は基本転写因子(群)が結合する領域でもある。従って一塩基置換によりこれら転写因子(群)のこの領域への結合活性が低下する可能性も考えられる。そこで野生型および変異型のそれぞれのプローブを標識し、293細胞の核抽出液と反応させたが、両プローブに特異的に結合する因子の存在は認められなかった(データ示さず)。コアプロモーター上に変異が生じた場合、TFIID(TATA boxに結合するTATA binding proteinとそれに結合するTATA associated proteinからなる複合体)をはじめとする基本転写因子群とRNA polymerase IIによる転写開始複合体の形成に影響を与えることが報告されている。先に用いた両プローブにはTATA boxは含まれていないことから、新たにTATA boxを含む野生型(TATA(-5A))および変異型(TATA(-5g))の2種類のプローブを作製し(Fig. 5A)同様の検討を行った。その結果、標識したTATA(-5A)を用いてゲルシフトアッセイを行うことにより、Zn処理の有無に関わらず、293細胞の核抽出液中にTATA(-5A)プローブと結合する因子の存在が認められた(Fig. 5B, lane 1-3)。さらに未標識の野生型プローブと変異型プローブを用いて、このバンドに対するコンペティションアッセイを行ったところ、TATA(-5A)では25倍モル添加で結合が阻害されたのに対し、TATA(-5g)プローブでは50倍モル共存させても阻害はほとんど認められなかった(Fig. 5B, lane 5-8)。なお、MTF-1との結合が認められた上記のMRE-aをここに100倍モル加えても阻害は認められなかった(Fig. 5B, lane 4)。標識TATA(-5A)プロ

ープと核内因子との結合がZn添加による影響を受けなかったことから、basal levelの転写にこの一塩基置換が影響を及ぼしている可能性が考えられる。そこで次にTATA(-5A)とTATA(-5g)プローブをそれぞれ標識し、Zn処理をしていない293細胞の核抽出液と反応させたところ、変異型であるTATA(-5g)でも結合する因子の存在は認められたものの、その結合量は野生型であるTATA(-5A)に比べ有意に低いことが確認された(Fig. 12C, lane 1, 2)。さらに、標識した野生型TATA(-5A)プローブと核内因子との結合に対して、TATA boxを含まない未標識の野生型(-5A)及び変異型(-5g)によるコンペティションアッセイを行ったところ、それぞれを100倍モル過剰に共存させても、結合の阻害認められなかった(Fig. 5C, lane 4-7)。以上の結果から、本研究で見出したMT遺伝子プロモーター上の一塩基置換は、このコアプロモーターに結合するbasal levelの転写に関わる転写因子(群)の結合量の低下を引き起こし、それが重金属で誘導した際の転写活性に影響を与えている可能性が考えられる。

#### D. 健康危険情報

特になし。

#### E. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし。

##### 2. 学会発表

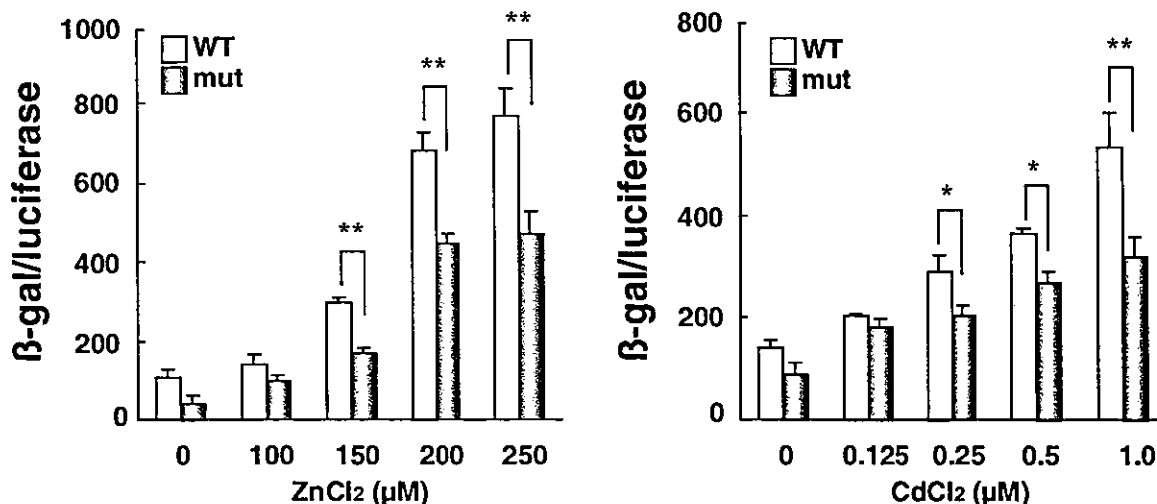
北 加代子、久下周佐、永沼 章: RNA干渉法によるヒトメタロチオネインの発現抑制系の構築. メタロチオネイン2003,

2003.

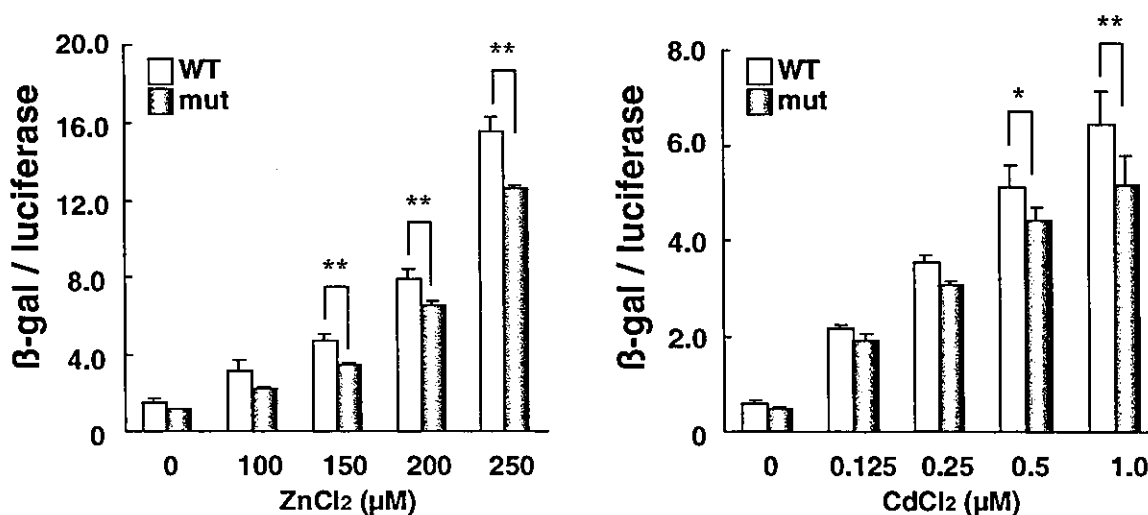
北 加代子、久下周佐、永沼 章: RNA干渉法によるヒトメタロチオネインの発現抑制の試み. 第76回日本生化学会大会, 2003.

北 加代子、久下周佐、永沼 章: ヒト細胞中の主要なメタロチオネイン分子種の発現を抑制した細胞株の樹立とその応用. 日本薬学会第124年会, 2004.

F. 知的財産権の出願・登録状況  
なし。



**Fig. 1** Effects of zinc and cadmium on wild-type or mutant hMT-IIA promoter activity in HepG2 cells. HepG2 cells ( $8 \times 10^4$ ) were incubated for 24 h and transfected with two different pcDNA3.1/MT-pro/lacZ reporter genes each containing wild-type or mutant nucleotide at -5 position in hMT-IIA promoter region and with a luciferase expression plasmid (pGL3 basic/hEF-1  $\alpha$ ) as an internal control to estimate transfection efficiency. After the cell cultured in each metal-containing medium for 24 h,  $\beta$ -galactosidase activities were determined. Values are normalized with luciferase activity and indicated as  $\beta$ -galactosidase / luciferase. Open column ; transfected with wild-type promoter, closed column ; transfected with mutant promoter. Significant difference were compared with no metal-treated control. \* ;  $p < 0.001$ , \*\* ;  $P < 0.0001$



**Fig. 2** Effects of zinc and cadmium on wild-type or mutant hMT-IIA promoter activity in 293 cells. 293 cells ( $4 \times 10^4$ ) were incubated for 24 h and transfected with two different pcDNA3.1/MT-pro/lacZ reporter genes each containing wild-type or mutant nucleotide at -5 position in hMT-IIA promoter region and with a luciferase expression plasmid (pGL3 basic/hEF-1  $\alpha$ ) as an internal control to estimate transfection efficiency. After the cell cultured in each metal-containing medium for 24 h,  $\beta$ -galactosidase activities were determined. Values are normalized with luciferase activity and indicated as  $\beta$ -galactosidase / luciferase. Open column ; transfected with wild-type promoter, closed column ; transfected with mutant promoter. Significant difference were compared with no metal-treated control. \* ;  $p < 0.001$ , \*\* ;  $P < 0.0001$

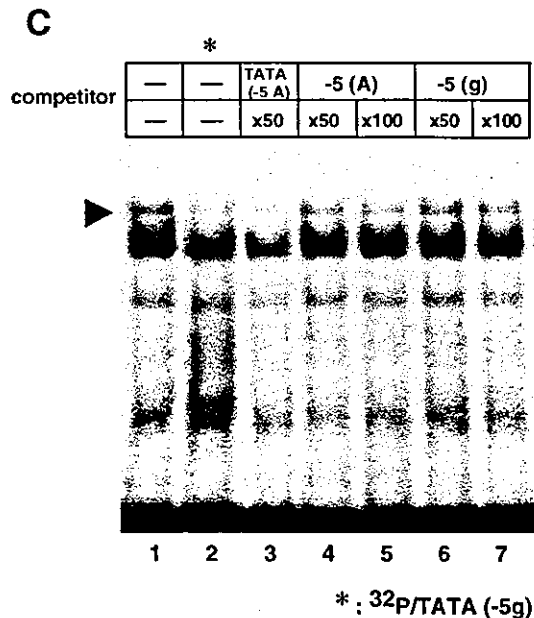
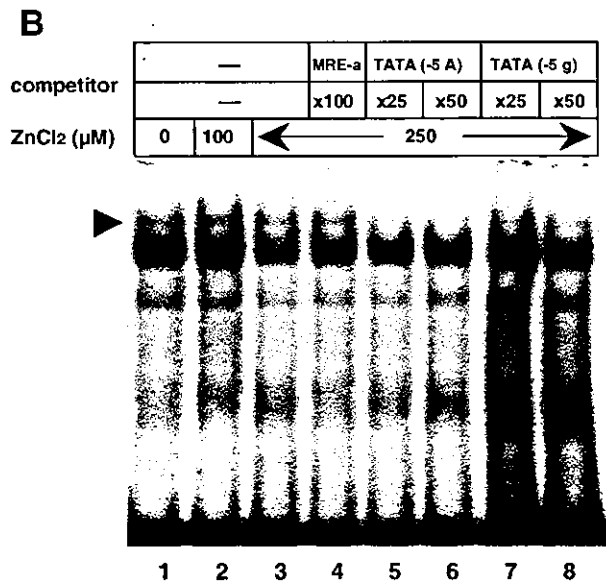


**A**

-5      +1

Wild-type TATA (-5 A) 5'-CTAGCTATAAACACTGCTTGCCGCGCTGCACTCCACCACGCCTCCT-3'

mutant TATA (-5 g) 5'-CTAGCTATAAACACTGCTTGCCGCGCTGCGCTCCACCACGCCTCCT-3'



**Fig. 5 Detection of protein from nuclear extract of zinc treated 293 cells by core promoter region including TATA box**

(A) Oligonucleotide probe includes hMT-IIA core promoter sequence -34 to +12 which containing TATA box sequence (under line). Wild-type (TATA (-5A)) and mutant (TATA (-5g)) oligonucleotide probe containing adenine and guanine nucleotide at -5 (bold symbol) relative to the transcription start site (+1). Sequences for upper strands were indicated. (B) Nuclear extracts obtained from zinc treated 293 cells were incubated with <sup>32</sup>P-labelled double-stranded wild-type TATA (-5A) oligonucleotide and run on 4% polyacrylamide gel. Binding proteins were indicated by arrow head. A 25- and 50-fold molar excess of non-labelled wild-type (lane 5,6) and mutant (lane 7,8) oligonucleotide and 100-fold molar excess of non-labelled MRE-a were mixed with nuclear extract of 250 μM ZnCl<sub>2</sub> treated 293 cells. (C) Nuclear extracts obtained from non-treated 293 cells were incubated with <sup>32</sup>P-labeled double-stranded wild-type TATA (-5A) (lane 1, 3-7) or mutant TATA (-5g) (lane 2) oligonucleotide and run on 4% polyacrylamide gel. Binding proteins were indicated by arrow head. A 50-fold molar excess of non-labelled wild-type TATA (-5A) or 50 and 100-fold molar excess of wild-type -5A (lane 4,5) and mutant -5g (lane 6,7) probe which each of them dose not containing TATA box were mixed with nuclear extract of 293 cells.

### III. 研究成果の刊行に関する一覧表



研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

なし。

雑誌

| 発表者氏名   | 論文タイトル  | 発表雑誌名                          | 巻号  | ページ     | 出版年  |
|---|---|--------------------------------|-----|---------|------|
| Furuchi, T.,<br>Hwang, G. W.<br>and<br>Naganuma,<br>A.          | Overexpression of the ubiquitin-conjugating enzyme Cdc34 confers resistance to methylmercury in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 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 |
| Ohashi, K., Kajiya, K., Inaba, S., Hasegawa, T., Seko, Y.,      | Copper (II) protects yeast against toxicity of cisplatin independently of induction of  | Biochem. Biophys. Res. Commun. | 310 | 148-152 | 2003 |

|  |   |  |     |         |      |
|--|---|--|-----|---------|------|
| Furuchi, T. and Naganuma, A..  | metallothionein and inhibition of platinum uptake   |  |     |         |      |
| Suzuki, T., Aguia, M., Togawa, T., Naganuma, A., Nishio, K. and Tanabe, S. | MRP5b/SMRP mRNA is highly expressed in metallothionein-deficient mouse liver  | J. Health Sci.   | 49  | 524-526 | 2003 |
| Naganuma, A., Hwang, G. W. and Furuchi, T.                                 | Intracellular factors involved in methylmercury toxicity in yeast   | Proceedings of International Symposium on Bio-Trace Elements 2002 (Eds. By Enomoto, S. and Seko, Y.), Riken, Saitama |     | 69-70   | 2003 |
| Hwang, G. W. Furuoya, Y. Hiroshima, A. Furuchi, T. and Naganuma, A.        | Overexpression of Bop3 confers resistance to methylmercury in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> through interaction with other proteins such as Fkh1, Rts1 and Msn2 | Biochem. Biophys. Res. Commun.   | 330 | 378-385 | 2005 |

## IV. 研究成果の刊行物・別刷

# Overexpression of the Ubiquitin-Conjugating Enzyme Cdc34 Confers Resistance to Methylmercury in *Saccharomyces cerevisiae*

TAKEMITSU FURUCHI, GI-WOOK HWANG, and AKIRA NAGANUMA

Laboratory of Molecular and Biochemical Toxicology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Tohoku University, Sendai, Japan

Received October 5, 2001; accepted January 11, 2002

This article is available online at <http://molpharm.aspetjournals.org>

## ABSTRACT

A search was made for genes that confer resistance to methylmercury in yeast using a genomic DNA library derived from *Saccharomyces cerevisiae*. The genomic library was introduced into yeast and transformants that grew in the presence of a normally toxic concentration of methylmercury were selected. We sequenced the genomic DNA fragment in the plasmid from the clone with the highest resistance to methylmercury and analyzed the sequence for presence of an open reading frame that might confer resistance to methylmercury. We identified a gene, *CDC34* (also known as *UBC3*), that increased resistance to methylmercury when overexpressed in yeast. *CDC34* encodes a ubiquitin-conjugating enzyme; such proteins play im-

portant roles in the selective targeting of proteins for degradation. Overexpression of *UBC4* and of *UBC7*, two other genes for ubiquitin-conjugating enzymes, also conferred resistance to methylmercury. Yeast strains transformed with the *CDC34* gene were resistant not only to methylmercury but also to mercuric chloride and *p*-chloromercuribenzoate. To our knowledge, this is the first demonstration that overexpression of genes for ubiquitin-conjugating enzymes confers resistance to xenobiotics. Our results suggest that ubiquitination system might be involved in protection against the toxicity of mercury compounds, such as methylmercury, in eukaryotic cells.

Methylmercury, an environmental contaminant (Akagi and Naganuma, 2000), causes severe neurological disorders in humans (Takeuchi, 1982). Considerable individual variation in the sensitivity of humans to methylmercury has been reported (Tsubaki, 1968; Clarkson, 1972). Species- and strain-specific differences in toxic doses of methylmercury have also been observed in animals (Nordberg and Skerfving, 1972; Iverson et al., 1973; Soares et al., 1973). However, the reasons for differences in sensitivity to methylmercury remain to be clarified. In cultured cells, the toxicity of methylmercury also depends on the type of cells (Miura et al., 1994; Miura, 2000). It seems likely that levels of expression of certain gene(s) that protect cells against methylmercury toxicity might be involved in the differences in the sensitivity of different lines of cells to this mercury compound. Therefore, in the present study, we searched for novel genes that confer resistance to methylmercury in yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) because yeast has been established as a model organism in which powerful genetic approaches can be used to elucidate fundamental but complex eukaryotic processes.

## Materials and Methods

**Transformation.** Yeast cells were transformed with a genomic DNA library as described previously (Miura et al., 1999; Naganuma et al., 2000). The yeast genomic DNA library (Furuchi et al., 2001) was prepared by cloning size-fractionated *Sau3A* I fragments (5 to 10-kbp in length) into the *Bam*HI cloning site of the *LEU2*-based multicopy plasmid YEpl3. This library was introduced into *Saccharomyces cerevisiae* W303B (*MATa* his3 can1-100 ade2 leu2 trp1 ura3) by the lithium acetate procedure (Gietz et al., 1992; Miura et al., 1999). Transformants were grown in synthetic dextrose (SD) medium without leucine (-Leu).

**Selection of Genes That Confer Resistance to Methylmercury.** The above-described Leu<sup>+</sup> transformants were cultured ( $1 \times 10^5$  cells/200  $\mu$ l/well) in SD (-Leu) medium for 24 h at 30°C in the presence of methylmercury (0.4  $\mu$ M) in 96-well plates for 24 h. Transformed cells that rapidly grew and formed aggregates in the presence of methylmercury were isolated from individual wells and plated on agar-solidified SD (-Leu) medium at a cell density of  $5 \times 10^3$  cells per 10-cm plate. After incubation for 24 h at 30°C, colonies were collected and their sensitivity to methylmercury was examined. The sensitivity of yeast cells from each colony was determined by culturing cells ( $1 \times 10^5$  cells/200  $\mu$ l) in SD (-Leu) medium that contained various concentrations of methylmercury for 48 h. We chose eight colonies that were strongly resistant to methylmercury and isolated plasmids from them as described by Hoffman (1993). Then the plasmids were amplified in *Escherichia coli* (Miura et al.,

This work was supported by grant-in-aid 12470091 for Scientific Research from the Ministry of Education, Science, Sports and Culture of Japan (to A.N.).

**ABBREVIATIONS:** SD, synthetic dextrose; SG, synthetic galactose; PCR, polymerase chain reaction; ORF, open reading frame.