

験 (寒天培地)

酵母を SD 培地で一晚培養後、 1×10^7 , 2×10^6 , 4×10^5 , 8×10^4 cells/mL となるように SD 培地で希釈し、アドリアマイシンを含む寒天培地に $5 \mu\text{L}$ スポットした (final : 5×10^4 , 1×10^4 , 2×10^3 , 4×10^2 cells/spot)。その後、 30°C で 48 時間培養し、観察した。

3. Glass beads 法による酵母 genomic DNA の抽出

YPAD 培地 2 mL で一晚培養した酵母を集菌し、滅菌水で洗浄した後に $200 \mu\text{L}$ の breaking buffer に懸濁した。懸濁液に $200 \mu\text{L}$ の PCI と適量の glass beads を加え、3 分間攪拌することにより酵母を粉碎後、 $20,000 \times g$ で 10 分間遠心分離し、上清を回収し、当量の 2-プロパノール、および NaCl 溶液 (最終濃度 ; 0.1 M) を加えて 5 分室温で放置した。その後、 $20,000 \times g$ で 10 分間遠心分離を行い、genomic DNA を沈殿させ、70%エタノールで洗浄後、TE buffer に溶解した。

4. 二重欠損酵母の作製

分裂酵母 (*Saccharomyces pombe*) 由来の *HIS5* 遺伝子を持つ plasmid pUG27 のプロモーターおよびターミネーターの塩基配列と、遺伝子欠損株ライブラリーの酵母の kanamycin 耐性遺伝

子 *kanMX4* のプロモーターおよびターミネーターの塩基配列が同じであることを利用し、*HIS5* 遺伝子マーカーによる gene disruption cassette の作製を行なった。Complete set of *saccharomyces cerevisiae* gene disruption strains (Euroscarf) の各遺伝子欠損株に PCR で増幅した *HIS5* フラグメントを酢酸リチウム法により導入し、得られた histidine 非要求性コロニーを kanamycin 耐性遺伝子マーカーが *HIS5* マーカーに置き換わった遺伝子欠損株候補とした。

Kanamycin 耐性遺伝子マーカーの *HIS5* マーカーへの置換を確認するために、glass beads 法によって遺伝子欠損株候補から chromosomal DNA の回収を行なった。得られた chromosomal DNA を template として目的の遺伝子の外側の配列に設計した primer の PCR を行い、その PCR 産物の大きさをアガロース電気泳動で調べることにより、*HIS5* マーカーによって各遺伝子が置換されたことを確認した。また、この PCR 産物を二重欠損株の作製に用いた。

作製した各遺伝子欠損株作製用カセットを別の遺伝子欠損酵母に酢酸リチウム法により導入した。YPAD 培地 2 mL で一晚振盪培養した酵母を 5×10^6 cells/mL となるように希釈し、 30°C で 3 時間培養した。その後、集菌

した酵母を酢酸リチウム溶液で 2.0×10^9 cells/mL となるように懸濁し、 30°C で 15 分間インキュベートした。この懸濁液 $50 \mu\text{L}$ に chromosomal DNA を $1.0 \mu\text{g}$ 、加熱変性サケ精子 DNA を $50 \mu\text{g}$ 、40% polyethylene glycol (4000) を $300 \mu\text{L}$ 加え、 30°C で 30 分間インキュベートした。さらに、 42°C で 15 分間 heatshock を行なった後に集菌し、滅菌水 100L に懸濁して全量を SD 寒天培地に塗布し、 30°C で 48 時間培養した。そして、ここで得られた histidine 非要求性コロニーを遺伝子欠損株候補とした。各遺伝子の欠損を確認するために、glass beads 法によって遺伝子欠損株候補から chromosomal DNA の回収を行なった。得られた chromosomal DNA を template として各遺伝子のさらに外側に設計した primer を用いて PCR を行い、その PCR 産物の大きさをアガロース電気泳動で調べることにより、*HIS5* マーカーによって各遺伝子が欠損された酵母が作製されたことを確認した。

C. 結果・考察

1. アドリアマイシン耐性に関わる脱ユビキチン化酵素の検索

アドリアマイシン耐性に関わる脱ユビキチン化酵素を明らかにするため、17 種類の脱ユビキチン化酵素をそれ

ぞれ欠損させた酵母のアドリアマイシン感受性を検討した。その結果、廣瀬らのスクリーニングで同定された Ubp2, Ubp6 および Ubp14 の 3 種に加えて、Ubp4 を欠損させた酵母もアドリアマイシンに対して耐性を示すことが明らかとなった (Fig. 2-1)。

一方、Ubp3, Ubp7 および Ubp13 の欠損は酵母にアドリアマイシン高感受性を与えるということが明らかとなった (Fig. 2-1)。

次に、アドリアマイシン耐性獲得機構における各脱ユビキチン化酵素の相互関係を調べるために、2 種類の脱ユビキチン化酵素を同時に欠損させた酵母を作製し、液体培地におけるアドリアマイシン感受性を調べた。その結果、Ubp2/Ubp4、Ubp2/Ubp6 および Ubp4/Ubp14 の二重欠損株は、それぞれの単独欠損株に比べ、高いアドリアマイシン耐性を示した (Fig. 2-2-A)。また、Ubp6/Ubp14 の二重欠損株は wild type と同程度のアドリアマイシン感受性を示し、Ubp6 および Ubp14 それぞれの単独欠損によるアドリアマイシン耐性が認められなかった (Fig. 2-2-B)。Ubp4/Ubp6 および Ubp2/Ubp14 の二重欠損株に関しては、growth が遅く、アドリアマイシン感受性を検討することはできなかった。

2. 脱ユビキチン化酵素欠損によるア

ドリアマイシン耐性獲得機構の解析

脱ユビキチン化酵素が欠損すると、ユビキチン前駆体のプロセッシングやユビキチン化蛋白質からのユビキチンの解離ができなくなるため、細胞内のユビキチン量が減少することが知られている。そこで、細胞内ユビキチン量の低下がアドリアマイシン感受性に影響を与える可能性を考え、脱ユビキチン化酵素欠損株にポリユビキチン Ubi4 を高発現させて、アドリアマイシン感受性を調べた。その結果、Ubi4 の高発現は Ubp2 および Ubp6 の欠損によるアドリアマイシン耐性に影響を与えなかった (Fig. 3-1)。

既知のアドリアマイシン耐性獲得機構として、細胞内抗酸化機構の亢進、細胞外へのアドリアマイシンの排出促進などが知られている。そこで次に、これら既知のアドリアマイシン耐性獲得機構と脱ユビキチン化酵素欠損によるアドリアマイシン耐性獲得機構の関係を検討した。アドリアマイシン耐性を示す脱ユビキチン化酵素欠損酵母の、他の酸化ストレス誘導物質（過酸化水素とパラコート）に対する感受性を調べたところ、Ubp2, Ubp6, Ubp14 欠損酵母は両物質に対して耐性を示さなかった。また、Ubp4 欠損株は過酸化水素に対しては wild type とほぼ同程度の感受性を示したが、パラコートに対しては逆に高感受性を示し

た (Fig. 3-2-A)。また、DNA 傷害剤であるシスプラチンおよびブレオマイシンに対して、Ubp2, Ubp6, Ubp14 欠損株は wild type とほぼ同程度の感受性を示した。また、Ubp4 欠損株はシスプラチンに対しては wild type と同程度の感受性を示したが、ブレオマイシンに対しては高感受性を示した (Fig. 3-2-B)。

さらに、脱ユビキチン化酵素欠損によるアドリアマイシン耐性獲得が細胞外へのアドリアマイシン排出の促進によるものである可能性を考え、各脱ユビキチン化酵素欠損酵母の細胞内アドリアマイシン蓄積量を検討した。その結果、いずれの欠損株も wild type に比べ細胞内アドリアマイシン蓄積量が減少することではなく、Ubp6 欠損株は逆に蓄積量の増加が観られた (Fig. 3-3)。

D. 考察

出芽酵母に存在する 17 種類の脱ユビキチン化酵素のうち、Ubp2, Ubp4, Ubp6 および Ubp14 の欠損が酵母にアドリアマイシン耐性を与え、また、Ubp3, Ubp7 および Ubp13 の欠損が酵母のアドリアマイシン毒性を増強することが明らかとなった。

アドリアマイシン感受性に影響を与えることが明らかとなった脱ユビキチン化酵素は、Table 1 および Table 2

に示したように、様々な基質タンパク質の分解調節や活性調節を介して多様な経路において重要な役割を果たしている。したがって、各脱ユビキチン化酵素はそれぞれ異なる基質の制御を介してアドリアマイシン感受性決定機構に関与している可能性が考えられる。Ubp2/Ubp4、Ubp2/Ubp6 および Ubp4/Ubp14 の二重欠損酵母は、それぞれの単独欠損酵母に比べ、さらに高いアドリアマイシン耐性を示した。このことから、各脱ユビキチン化酵素はそれぞれ異なる機構でアドリアマイシン耐性に関与していると考えられる。

また、Ubp6/Ubp14 を同時に欠損させた場合には、アドリアマイシン感受性はほとんど変化せず、それぞれの脱ユビキチン化酵素欠損によるアドリアマイシン耐性が認められなくなった。Ubp6 欠損株で認められる表現型（翻訳阻害剤 anisomycin 高感受性）が、Ubp14 の同時欠損によって回復することが知られている。したがって、Ubp6 と Ubp14 は互いの機能に影響を与え合いながら、アドリアマイシン耐性獲得機構に関わっている可能性も否定できない。

脱ユビキチン化酵素欠損によるアドリアマイシン耐性獲得に細胞内ユビキチンレベルの低下が関わっている可能性が考えられたが、ポリユビキチ

ンである Ubi4 の高発現は Ubp2 および Ubp6 の欠損によるアドリアマイシン耐性に影響を与えなかった。したがって、少なくとも Ubp2 および Ubp6 の欠損によるアドリアマイシン耐性獲得機構に、細胞内ユビキチン量の減少は関与していないと考えられる。

また、アドリアマイシン耐性を示す脱ユビキチン化酵素欠損酵母は酸化ストレス誘導物質である過酸化水素とパラコートに対し耐性を示さなかった。したがって、各脱ユビキチン化酵素欠損酵母が全ての酸化ストレス誘導物質に対して耐性を示すわけではないことから、脱ユビキチン化酵素欠損によるアドリアマイシン耐性獲得に細胞内抗酸化機構の亢進は関与していないと考えられる。さらに各脱ユビキチン化酵素欠損酵母は、アドリアマイシンと同じく DNA 傷害作用を持つ制癌剤であるシスプラチンおよびブレオマイシンに対して耐性を示さないことから、脱ユビキチン化酵素欠損による耐性獲得は、アドリアマイシンに比較的特異的な現象であると考えられる。

細胞外へのアドリアマイシン排出促進がアドリアマイシン耐性の獲得に関与することが知られているが、各脱ユビキチン化酵素欠損酵母の細胞内アドリアマイシン蓄積量は wild type に比べ減少することはなかった。この

結果から、脱ユビキチン化酵素の欠損は細胞内アドリアマイシン蓄積量を低下させることなく酵母にアドリアマイシン耐性を与えると考えられる。脱ユビキチン化酵素欠損によるアドリアマイシン耐性獲得機構は、既知のアドリアマイシン耐性獲得機構とは異なり、これまで知られていない全く新しい耐性獲得機構である可能性が考えられる。

D. 研究発表

1. 論文発表

なし。

2. 学会発表

晴山聖子、廣瀬健一郎、高橋 勉、永沼 章：酵母におけるアドリアマイシン耐性獲得機構における脱ユビキチン化酵素の関与. 第46回日本薬学会東北支部大会, 2007

E. 知的財産権の出願・登録状況
なし。

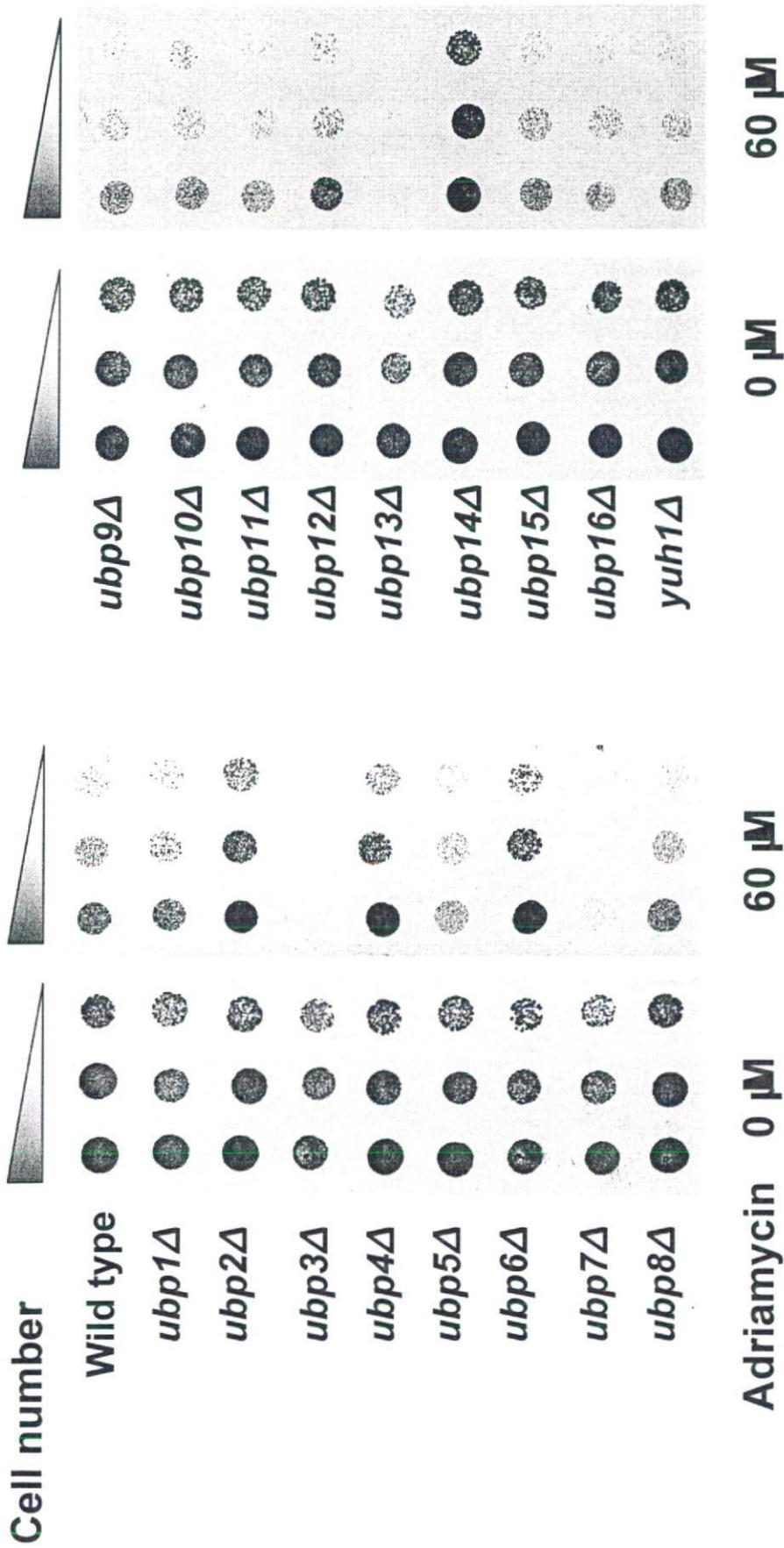


Fig. 2-1. 脱ユビキチン化酵素の欠損がアドリアマイシン感受性に与える影響

各脱ユビキチン化酵素欠損株をSD培地に 1×10^7 , 2×10^6 , 4×10^5 cells/mL となるように懸濁し、アドリアマイシンを含む寒天培地に5 μlスポットした(final : 5×10^4 , 1×10^4 , 2×10^3 cells/spot)。その後、30°Cで48時間培養し、観察した。

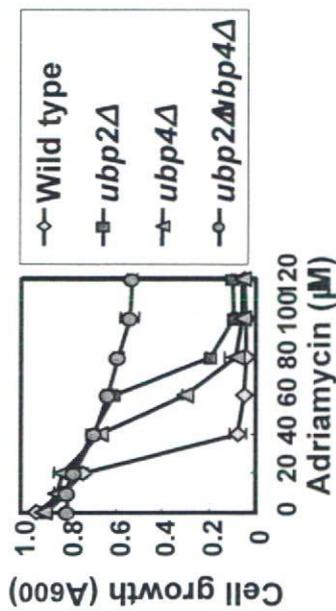
Table 1. 欠損により酵母にアドリアマイシン耐性を与える脱ユビキチン化酵素

	細胞内局在	細胞内における働き	参考文献
<i>UBP2</i>	細胞質	・ K63を介したポリユビキチン鎖の脱ユビキチン化	Kee Y. et al., 2006
<i>UBP4</i>	エンドソーム膜	・ DNA修復やキナーゼの活性化 ・ MVB (multivesicular body) pathwayにおける脱ユビキチン化	Amerik A. et al., 2000 Dupre S. et al., 2001
<i>UBP6</i>	プロテアソームと複合体を形成	・ K48に形成されたポリユビキチン鎖の脱ユビキチン化 ・ プロテアソームによるタンパク質分解の制御	Russell NS. et al., 2004
<i>UBP14</i>	細胞質	・ ポリユビキチン鎖の切断 ・ K29に形成されたポリユビキチン鎖の脱ユビキチン化	Russell NS. et al., 2004

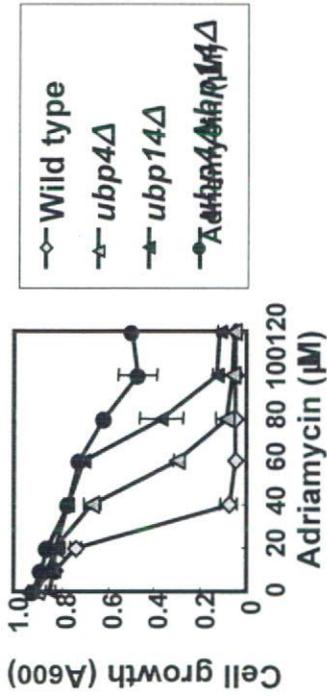
Table 2. 欠損により酵母にアドリアマイシン高感受性を与える脱ユビキチン化酵素

	細胞内局在	細胞内における働き	参考文献
<i>UBP3</i>	細胞質	・ 小胞体-ゴルジ体間の輸送 ・ クロマチンのサイレンシングの抑制	Li K. et al., 2007
<i>UBP7</i>	細胞質	・ Rsp5依存的なMVBによるCps1の輸送阻害	Ren J. et al., 2006
<i>UBP13</i>	不明	不明	—

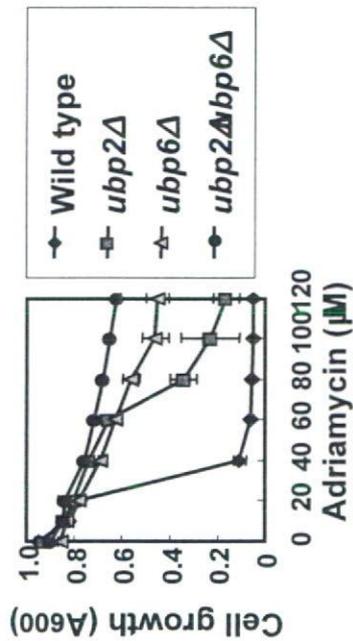
A. Ubp2とUbp4の関係



Ubp4とUbp14の関係



Ubp2とUbp6の関係



B.

Ubp6とUbp14の関係

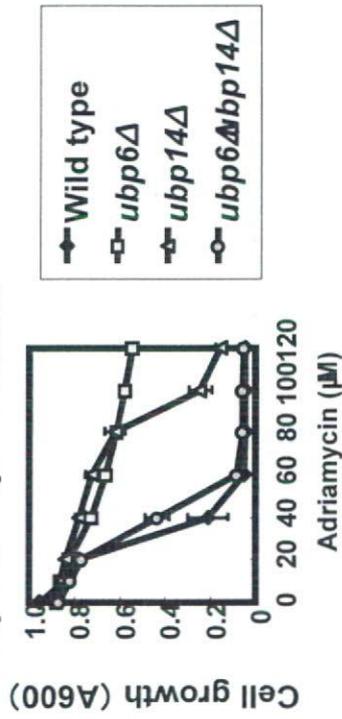
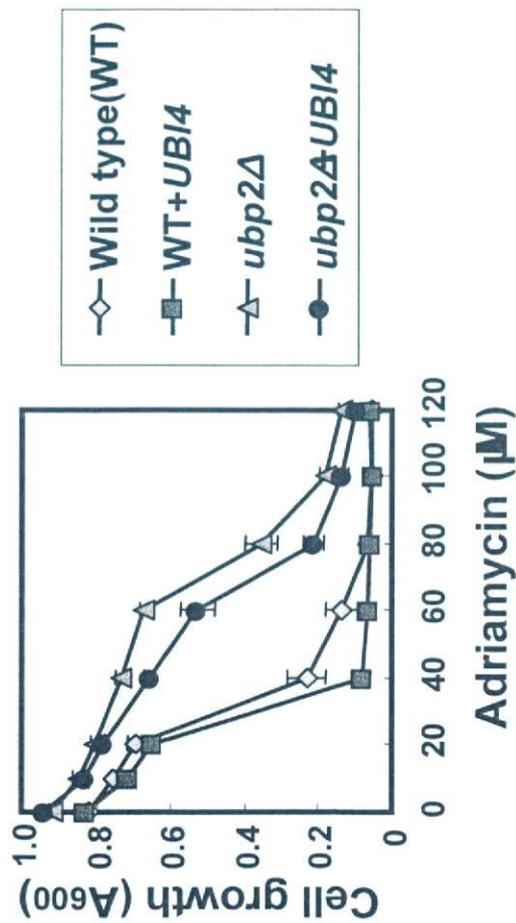


Fig. 2-2. アドリアマイシン耐性獲得機構における各脱ユビキチン化酵素の相互関係

各酵母をSD培地で一晚培養後、 1×10^4 /180μLとなるようにSD培地で希釈して、96-well plateに各濃度(0~120 μM)のアドリアマイシン溶液を20mLずつ添加した後、さらに各酵母の希釈液を180μLずつ加え、30°Cで48時間培養した。その後、600 nmにおける吸光度を測定して酵母の増殖を調べた。



Ubi4 : Polyubiquitin

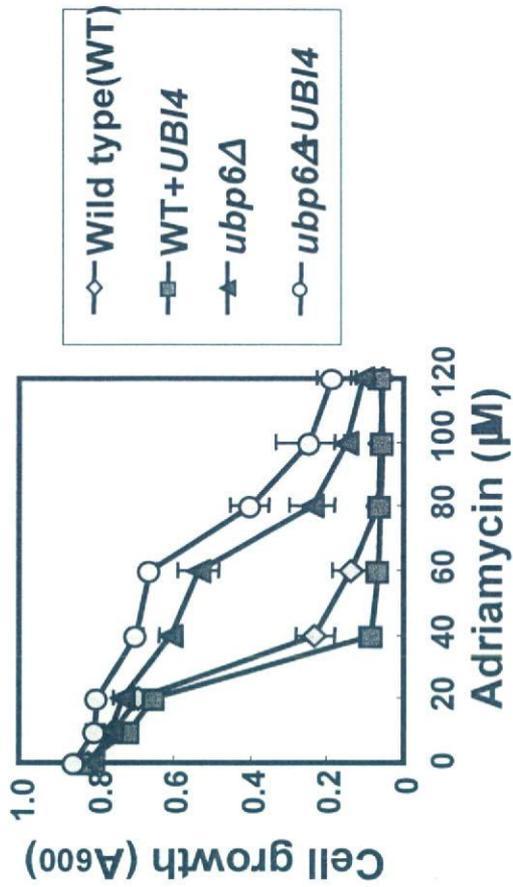


Fig. 3-1. ユビキチン高発現が脱ユビキチン化酵素欠損によるアドリアマイシン耐性獲得機構に与える影響

各酵母をSD培地で一晚培養後、 $1 \times 10^4/180 \mu\text{M}$ となるようにSD培地で希釈した。96-well plateに各濃度(0~120 μM)のアドリアマイシン溶液を20 μl ずつ添加した後、さらに各酵母の希釈液を180 μl ずつ加え、30°Cで48時間培養した。その後、600 nmにおける吸光度を測定して酵母の増殖を調べた。

A. 脱ユビキチン化酵素の欠損が酸化ストレス誘発物質に対する感受性に与える影響



B. 脱ユビキチン化酵素の欠損がDNA傷害剤に対する感受性に与える影響

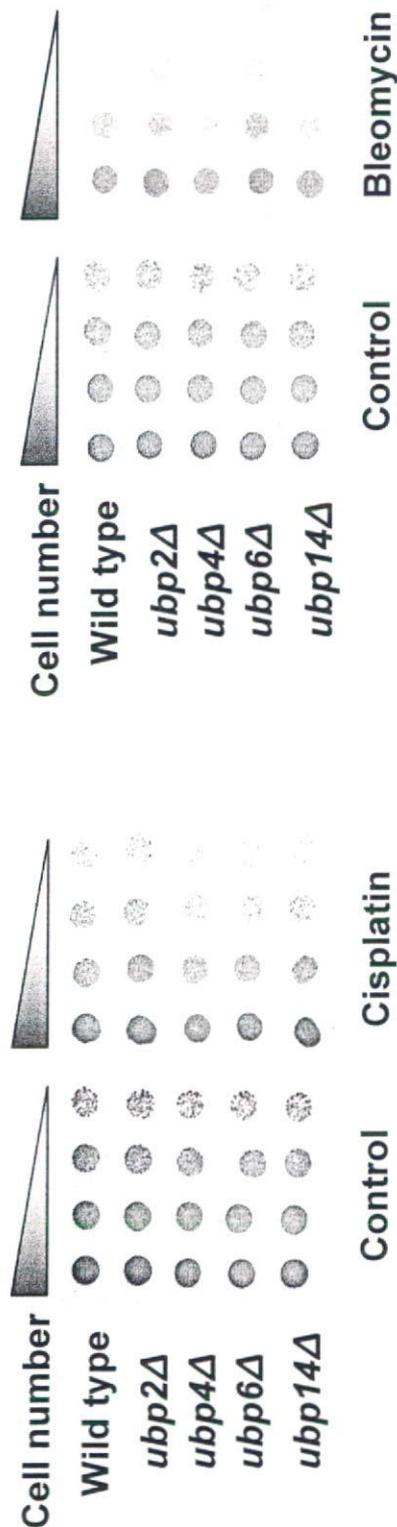


Fig. 3-2. 脱ユビキチン化酵素欠損株の各薬毒物に対する感受性

酵母の培養液をSD培地で 1×10^7 , 2×10^6 , 4×10^5 , 8×10^4 cells/mLになるように希釈し、過酸化水素(0.5 mM)、パラコート(0.5 mM)、シスプラチン(200 μ M)、ブレオマイシン(10 μ g/mL)を含むSD寒天培地に5 μ Lスポットした (final : 5×10^4 , 1×10^4 , 2×10^3 , 4×10^2 cells/spot)。その後、30°Cで48時間培養し、観察した。

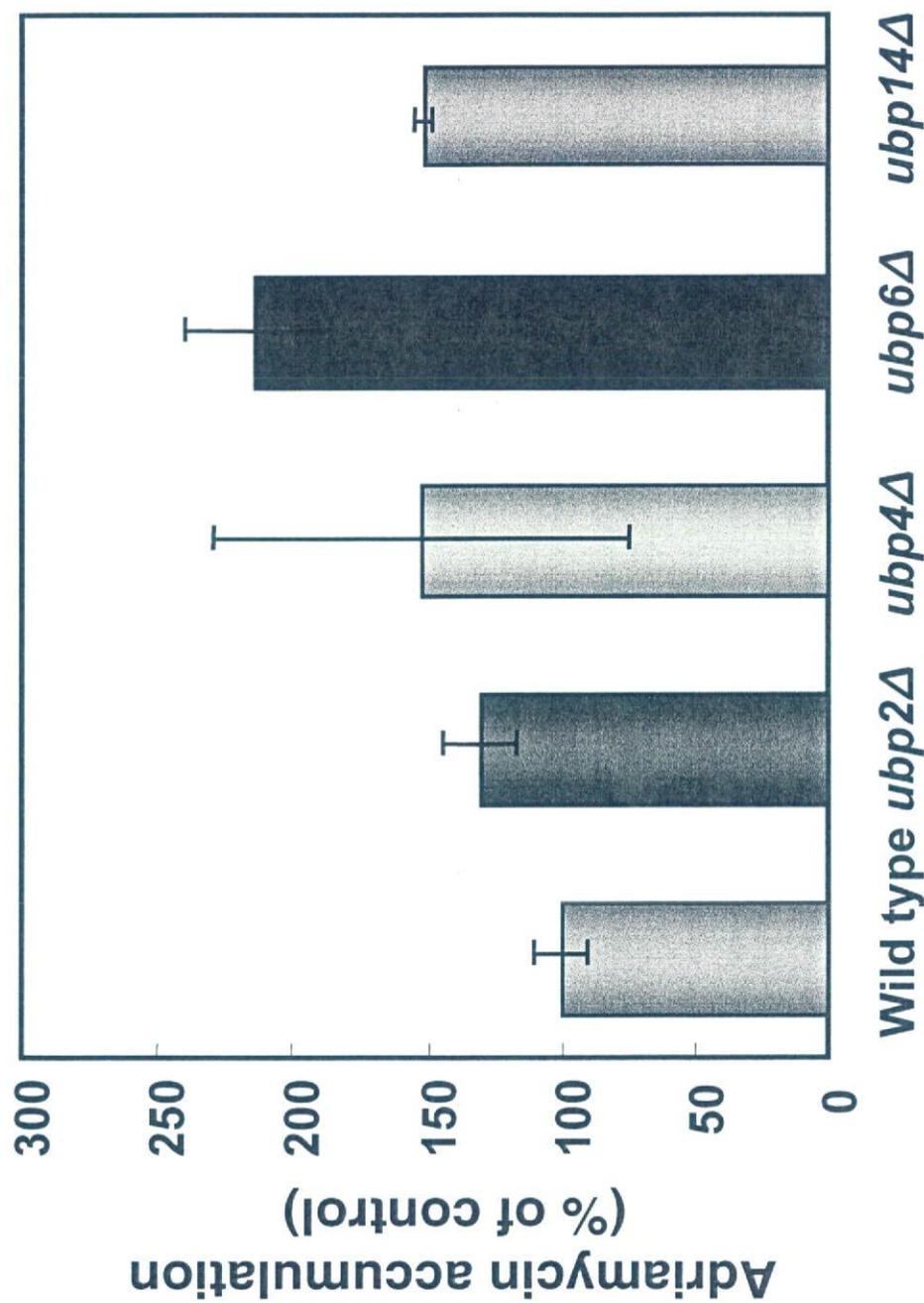


Fig. 3-3 脱ユビキチン化酵素の欠損が細胞内アドリアマイシン蓄積量に与える影響

酵母を80 μ Mのアドリアマイシン存在下で1時間培養後、洗浄し、200 μ LのPBSに再懸濁した。この懸濁液の蛍光強度をfluorescent plate reader (Spectra Max Gemini XS, Molecular devices) (励起波長; 472 nm, 吸収波長; 590 nm)を用いて測定した。

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
Hwang GW, Sasaki D, Naganuma A.	Overexpression of Rad23 confers resistance to methylmercury in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> via inhibition of the degradation of ubiquitinated proteins	Mol Pharmacol	68	1074-1078	2005
Hwang GW, Furuoya Y, Hiroshima A, Naganuma A et al.	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
Takahashi T, Furuchi T, Naganuma A	A novel role for Bsd2 in the resistance of <i>Saccharomyces cerevisiae</i> to adriamycin	J Cell Physiol	202	100-104	2005

Hwang GW, Ishida Y, Naganuma A	Identification of F-box proteins that are involved in resistance to methylmercury in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	FEBS Lett	580	6813-6818	2006
Hwang GW, Naganuma A	DNA microarray analysis of transcriptional responses of human neuroblastoma IMR32 cells to methylmercury	J Toxicol Sci	31	537-538	2006
Kimura A, Ohashi K, Naganuma A, et al.	Cisplatin-induced expression of iron-retaining genes FIT2 and FIT3 in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	J Toxicol Sci	31	287-290	2006
Miura N, Kanayama Y, Naganuma A, et al.	Characterization of an immortalized hepatic stellate cell line established from metallothionein-null mice	J Toxicol Sci	31	391-398	2006
Kita K, Miura N, Naganuma A, et al.	Potential effect on cellular response to cadmium of a single-nucleotide A → G polymorphism in the promoter of the human gene for metallothionein IIA	Hum Genet	120	553-560	2006

Takahashi T, Furuchi T, Naganuma A	Endocytic Ark/Prk kinases play a critical role in adriamycin resistance in both yeast and mammalian cells	Cancer Res	66	11932-11937	2006
Kimura A, Ohashi K, Naganuma A	Cisplatin upregulates <i>Saccharomyces cerevisiae</i> genes involved in iron homeostasis through activation of the iron insufficiency-responsive transcription factor Aft1	J Cell Physiol	210	378-384	2007
Hwang GW	A ubiquitin-proteasome system as a factor that determine the sensitivity to methylmercury	Yakugaku Zasshi	127	463-468	2007
Hwang GW, Furuchi T, Naganuma A	Ubiquitin-conjugating enzyme Cdc34 mediates cadmium resistance in budding yeast through ubiquitination of the transcription factor Met4	Biochem Biophys Res Commun	363	873-878	2007
Hwang GW, Takahashi T, Kuge S, Naganuma A, et al.	siRNA-mediated inhibition of phosphatidylinositol glycan Class B (PIGB) confers resistance to methylmercury in HEK293 cells	J Toxicol Sci	32	581-583	2007

Kanda H, Miura N, Naganuma A, et al.	Downregulation of arginase II and renal apoptosis by inorganic mercury: overexpression of arginase II reduces its apoptosis	Arch Toxicol	82	67-73	2007
Tokuda E, Ono S, Naganuma A, et al.	Metallothionein proteins expression, copper and zinc concentrations, and lipid peroxidation level in a rodent model for amyotrophic lateral sclerosis	Toxicology	229	33-41	2007

IV. 研究成果の刊行物・別刷

Overexpression of Rad23 Confers Resistance to Methylmercury in *Saccharomyces cerevisiae* via Inhibition of the Degradation of Ubiquitinated Proteins

Gi-Wook Hwang, Daisuke Sasaki, and Akira Naganuma

Laboratory of Molecular and Biochemical Toxicology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Tohoku University, Sendai, Japan (G.-W.H., D.S., A.N.); and Tohoku University 21st Century COE Program "Comprehensive Research and Education Center for Planning of Drug Development and Clinical Evaluation", Sendai, Japan (G.-W.H., A.N.)

Received April 6, 2005; accepted July 5, 2005

ABSTRACT

We report here that overexpression of Rad23, a protein related to the ubiquitin-proteasome system, renders yeast cells resistant to methylmercury. Rad23 has three domains: two ubiquitin-associated (UBA) domains that bind to the multiubiquitin chain of ubiquitinated proteins and a single ubiquitin-like (UbL) domain that binds to proteasomes. To examine the mechanism of acquisition of methylmercury resistance that is induced by overexpression of Rad23, we expressed variants of Rad23 in which one or the other of the two types of domain was defective in yeast cells. In cells that overexpressed full-length intact Rad23, we detected elevated levels of intracellular ubiquitinated proteins, and the cells were resistant to methylmercury. In contrast, cells that overexpressed Rad23 with a defective UBA domain were not resistant to methylmercury and con-

tained control levels of ubiquitinated proteins. Yeast cells that overexpressed Rad23 with a defective UbL domain exhibited enhanced resistance to methylmercury and contained even higher levels of ubiquitinated proteins than cells that overexpressed intact full-length Rad23. Rad23 is known to have two mutually contradictory functions. It suppresses the degradation of ubiquitinated proteins by proteasomes via a mechanism mediated by the UBA domains, and it enhances the degradation of ubiquitinated proteins via a mechanism that is mediated by the UbL domain. Therefore, our findings suggest that Rad23 might induce resistance to methylmercury in yeast cells by suppressing the degradation of proteins that reduce the toxicity of methylmercury via a UBA domain-mediated mechanism.

Methylmercury is an important environmental pollutant, causing severe damage to the central nervous system as a result of passage across the blood-brain barrier (Clarkson, 2002; Castoldi et al., 2003; Sanfeliu et al., 2003). Many reports on methylmercury poisoning have been published, but mechanisms of methylmercury toxicity, as well as bio-defense mechanisms against this toxicity remain to be clarified.

We have been studying the genes that are involved in resistance to methylmercury in yeast, a eukaryotic unicellular organism whose gene products have many functional similarities to those of mammals, including humans (Miura et al., 1999; Naganuma et al., 2000, 2002; Furuchi et al., 2002; Hwang et al., 2002). We demonstrated that overexpres-

sion of Cdc34, a ubiquitin-conjugating enzyme (E2) that is a component of the ubiquitin-proteasome system, induces a resistance to methylmercury toxicity in yeast cells (Furuchi et al., 2002).

The ubiquitin-proteasome system is involved in the intracellular degradation of proteins (Hershko and Ciechanover, 1998; Pickart, 2001, 2004). In this system, multiple ubiquitin molecules are linked to substrate proteins by sequential reactions that are catalyzed by ubiquitin-activating enzyme (E1), ubiquitin-conjugating enzymes (E2), and ubiquitin ligases (E3). The multiubiquitin chain that has been attached to a protein in this way allows the ubiquitinated protein to be recognized by the 26S proteasome and degraded. When Cdc34 is overexpressed in cells, ubiquitination reactions are activated, and the degradation of certain proteins by the ubiquitin-proteasome system is enhanced (Hwang et al., 2002). The acquisition of resistance to methylmercury in Cdc34-overexpressing yeast cells requires the ubiquitin-conjugating activity of Cdc34 and the proteolytic activity of proteasomes (Hwang et al., 2002). Therefore, it seems likely that

This work was supported by Grant-in-Aid for Scientific Research (A) 15209004 from the Japan Society for the Promotion of Science and by Health and Labor Sciences Research Grants for Research on Risk of Chemical Substances from Ministry of Health, Labor and Welfare Japan.

Article, publication date, and citation information can be found at <http://molpharm.aspetjournals.org>.
doi:10.1124/mol.105.013516.

ABBREVIATIONS: UBA domain, ubiquitin-associated domain; UbL domain, ubiquitin-like domain; SD, synthetic dextrose; PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis; F, forward; R, reverse.

certain as-yet-unidentified proteins that increase methylmercury toxicity might exist in cells and that toxicity might be reduced by the enhanced degradation of such proteins, mediated by the ubiquitin-proteasome system, when Cdc34 is overexpressed (Hwang et al., 2002).

In the present study, we examined the effects of Rad23, which is known to interact with ubiquitinated proteins, on the acquisition of resistance to methylmercury by yeast cells. It has been reported that Rad23 has two mutually contradictory functions. One of the functions of Rad23 is the inhibition of elongation of the ubiquitin chain via binding to the ubiquitin moiety of ubiquitinated proteins (Ortolan et al., 2000; Bertolaet et al., 2001; Chen et al., 2001; Raasi and Pickart, 2003). Because proteasomes recognize multiubiquitinated proteins as substrates when more than a certain number of ubiquitin molecules have been attached (Pickart, 2001, 2004), it has been postulated that proteins can elude degradation by proteasomes when the elongation of ubiquitin chains is inhibited. The second function of Rad23 is the transportation of ubiquitinated proteins to proteasomes (Chen and Madura, 2002; Rao and Sastry, 2002; Lambertson et al., 2003). Rad23 binds to proteasomes, thereby enhancing the degradation of ubiquitinated proteins. Thus, Rad23 seems to regulate the degradation of ubiquitinated proteins via the mutually contradictory enhancement and suppression of such degradation. In this study, we found that overexpression of Rad23 renders yeast cells resistant to methylmercury, and, in contrast to overexpression of Cdc34, the resistance might be induced by suppression of the degradation of proteins that is mediated by the ubiquitin-proteasome system.

Materials and Methods

Culture and Transformation of Yeast Cells. The strain of *Saccharomyces cerevisiae* used in this study was W303B (*MAT α his3 can1-100 ade2 leu2 trp1 ura3*) (Naganuma et al., 2000). Yeast cells were cultured at 30°C in synthetic dextrose (SD) medium. Plasmid DNA was introduced into W303B cells by the high-efficiency lithium acetate transformation method (Miura et al., 1999).

Construction of Plasmids. The *RAD23* and *FLAG-RAD23* genes were amplified by the polymerase chain reaction from yeast genomic DNA as template with the following oligonucleotides as primers: *RAD23-F*, 5'-CACAGAGCACACAAAGACAAC-3', and *RAD23-R*, 5'-GTGAAGATACTTCAAGCCA-3' for the *RAD23* gene; and *RAD23-FLAG-F*, 5'-CATACAATAGAAAAATGGACTACAAGGATGACGATGACAAGGTTAGCTTAACCTTTAA-3' and *RAD23-R* for the *FLAG-RAD23* gene. The amplified fragments of DNA were ligated into the pKT10 yeast expression vector. Sequences of constructs were verified with an automated sequencer.

Quantification of the Toxicity of Methylmercury in Yeast Cells. Yeast cells (10^5 cells/200 μ l) were cultured in SD (-Ura) liquid medium that contained methylmercuric chloride at various concentrations. To quantify cell growth, we measured the absorbance of the culture at 600 nm every 2 h for 48 h. For the colony-formation assay, we cultured yeast cells (10^6 cells/ml) in SD (-Ura) liquid medium that contained methylmercuric chloride (800 nM) for 3 h at 30°C. After treatment with methylmercuric chloride, yeast cells were seeded at a density of 10^3 cells per plate on agar-solidified SD (-Ura) medium, and formation of colonies was examined after culture for 2 days at 30°C. Yeast cells transformed with the pKT10 empty vector were used as controls.

Site-Directed Mutagenesis. Site-directed mutagenesis of the gene for Rad23 was performed as described elsewhere (Furuchi et al., 2004) with a kit for site-directed mutagenesis from Stratagene (Ce-

dar Creek, TX) according to the manufacturer's instructions. We constructed a variety of mutant *RAD23* or *FLAG-RAD23* genes by creating pairs of *SacI* sites in the open reading frame of the *RAD23* or *FLAG-RAD23* genes and excising the fragments between the respective pairs of *SacI* sites. We amplified fragments by polymerase chain reaction using plasmid pKT10-*RAD23* or pKT10-*FLAG-RAD23* as the template and the following oligonucleotides as primers: 5'UbL-F, 5'-CAACATACAATAGAAAAATGGAGCTCTTAACCTTTAAAAATTTCAAG-3'; 5'UbL-R, 5'-CTTGAAATTTTTAAAGGTTAAGAGCTCCATTTTTCTATTGTATGTTG-3'; 3'UbL-F, 5'-CATGGTTTCTCAAAAAGAGCTCACGAAGACCAAAGTAAC-3'; and 3'UbL-R, 5'-GTTACTTTGGTCTTCGTGAGCTCTTTTTGAGAAACCATG-3' for deletion of the UbL domain; 5'UBA1-F, 5'-CGGGATTCGTGGTGGGAGAGCTCAGGAACGACCATCGAG-3'; 5'UBA1-R, 5'-CTCGATGGTCTCGTTCCTGAGCTCTCCACCACGAATCCG-3'; 3'UBA1-F, 5'-GAATATCTACTGATGGAGCTCCAGAAATCTGCGTC-3'; and 3'UBA1-R, 5'-GACGCAGATTTCTGGGAGCTCCATCAGTAGATATTC-3' for deletion of the UBA1 domain; and 5'UBA2-F, 5'-CTTCCAAGTTGACTATACCGAGCTCGACGATCAGCTATTTTCGC-3'; 5'UBA2-F, 5'-GCGAAATAGCTTGATCGTTCGAGCTCGGTATAGTCAACTTGGAAAG-3'; 3'UBA2-F, 5'-CAAATATTCTATTCAGCGAGCTCGCCGACTGAGATTGTAG-3'; and 3'UBA2-R, 5'-CTACAATCTCAGTCGGCGAGCTCGCTGAATAGAATA-TTTG-3' for deletion of the UBA2 domain. After creation of each pair of *SacI* sites, the plasmid was cleaved with *SacI* and self-ligated. All mutations were confirmed by DNA sequencing. The resultant plasmids were designated pKT10-*FLAG-RAD23*^{UbL Δ} , pKT10-*FLAG-RAD23*^{UBA1 Δ} , pKT10-*FLAG-RAD23*^{UBA2 Δ} , and pKT10-*FLAG-RAD23*^{UBA1 Δ +UBA2 Δ} .

Immunoblotting. Cell extracts were prepared, and immunoblotting was performed as described elsewhere (Hwang et al., 2002). To quantify the total ubiquitinated proteins, we cultured yeast cells that overexpressed *FLAG-Rad23* or *FLAG-mutant Rad23* to the mid-logarithmic phase of growth in SD (-Ura) liquid medium and collected them by centrifugation. We suspended the cells in buffer C (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 50 mM KCl, 5% glycerol, 3 mM dithiothreitol, and the protease inhibitors phenylmethylsulfonyl fluoride and pepstatin A) and lysed them using glass beads. The cell extracts were fractionated by SDS-polyacrylamide gel (12.5%) electrophoresis (PAGE), and then bands of protein were transferred to an Immobilon-P membrane (Millipore Corporation, Billerica, MA) and subjected to immunostaining with *FLAG*-specific monoclonal antibodies (anti-*FLAG* M2; Sigma Chemical, St. Louis, MO) or multiubiquitin-specific monoclonal antibodies (clone FK2; MBL, Nagoya, Japan), which recognize multiubiquitin chains of the polyubiquitinated proteins but not free ubiquitin or the protein moieties (Fujimuro et al., 1994).

Results

We investigated the effects of overexpression of Rad23, which is a protein that interacts with the ubiquitin-proteasome system, on the sensitivity of yeast cells to methylmercury. As shown in Fig. 1, yeast cells that overexpressed Rad23 were much more resistant to methylmercury than were control yeast cells, which harbored the empty vector.

Suppression of the elongation of ubiquitin chain by Rad23 is mediated by two ubiquitin-associated (UBA) domains (UBA 1 and UBA2) (Fig. 2a). Rad23 binds to the ubiquitin moiety of ubiquitinated proteins via these domains, inhibiting the further elongation of ubiquitin chains (Ortolan et al., 2000; Chen et al., 2001; Raasi and Pickart, 2003). By contrast, the region of the Rad23 molecule that is required for the transportation of ubiquitinated proteins to proteasomes is the ubiquitin-like (UbL) domain that is located at the amino terminus (Elsasser et al., 2002; Saeki et al., 2002;

Walters et al., 2003). The UbL domain is strongly homologous to ubiquitin, and it has been postulated that Rad23 acts as a role as a shuttle that transports multiubiquitinated proteins to the proteasome by binding to the proteasome via this domain (Chen and Madura, 2002; Rao and Sastry, 2002).

To clarify the relationship between the toxicity of methylmercury and the two contradictory functions of Rad23, we investigated the sensitivity to methylmercury of yeast cells in which we overexpressed truncated variants of Rad23 that were defective in either the UbL domain or one or both of the UBA domains as FLAG-fusion proteins (Fig. 2a). We confirmed the expression of each truncated protein in the respective lines of yeast cells by Western blotting with FLAG-specific monoclonal antibodies (Fig. 2b). We found that yeast cells which overexpressed the Rad23 with a defective UbL domain (Ubl Δ) were more resistant to methylmercury than were the cells that overexpressed intact full-length Rad23 (Fig. 2c). In contrast, yeast cells that overexpressed Rad23 with a defective UBA1 domain (UBA1 Δ) were less resistant to methylmercury than cells that overexpressed intact full-length Rad23. Furthermore, yeast cells that overexpressed Rad23 with a defect only in UBA2 (UBA2 Δ) or with a defect in both UBA1 and UBA2 (UBA1 Δ + UBA2 Δ) were resistant only to a very low level of methylmercury (Fig. 2c). We obtained similar results with yeast cells that overexpressed the respective Rad23 mutants without the FLAG tag (data not shown). Our findings suggest that the UbL domain in Rad23 might be involved in the enhancement of methylmercury toxicity, whereas both the UBA1 and UBA2 domains might be involved in the acquisition of resistance to methylmercury

toxicity. Moreover, the UBA2 domain might be more intimately involved than the UBA1 domain. The observation that yeast cells which overexpressed intact full-length Rad23 were resistant to methylmercury (Fig. 1) indicates that the functions mediated by the UBA1 and UBA2 domains might dominate those mediated by the UbL domain with respect to the acquisition of resistance to methylmercury, at least when Rad23 is overexpressed.

Chen and Madura (2002) reported that overexpression of Rad23 increased the total amount of cellular multiubiquitinated proteins. Therefore, we examined the total amounts of ubiquitinated proteins in yeast cells that overexpressed the various truncated mutant forms of Rad23 as FLAG-fusion proteins. We found a marked increase in the total amount of ubiquitinated proteins in the yeast cells that overexpressed the intact full-length Rad23, as reported previously, and a still more marked increase in the total amount of ubiquitinated proteins in the yeast cells that overexpressed Rad23 with defect in the UbL domain (Fig. 3). In addition, we detected a marked reduction in the total amount of ubiquitinated proteins in the yeast cells that overexpressed Rad23 with a defect in either the UBA1 or the UBA2 domain. The extent of the reduction was higher when the defect was in UBA2 than when it was in UBA1 (Fig. 3). These results show clearly that the UbL domain of Rad23 plays a role in reducing the cellular level of ubiquitinated proteins, whereas the UBA1 and UBA2 domains play a role in the opposite phenomenon and increase levels of these proteins. Thus, our findings support the reported contradictory mechanisms of action of Rad23 in the degradation of ubiquitinated proteins.

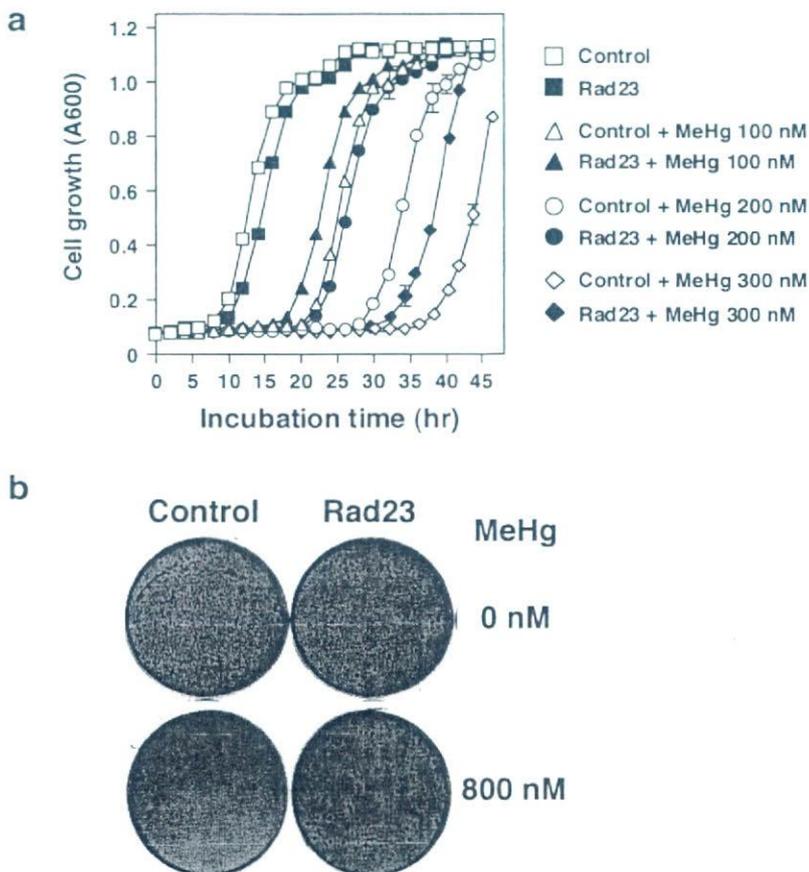


Fig. 1. Sensitivity of yeast cells that overexpressed Rad23 to methylmercury. **a**, yeast cells (10^5 cells/200 μ l/well) that harbored pKT10 or pKT10-RAD23 were cultured at 30°C in SD (-Ura) liquid medium that contained methylmercuric chloride (MeHg) at the indicated concentrations. Absorbance at 600 nm was measured spectrophotometrically every 2 h for 48 h. 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**, yeast cells (10^6 cells/ml) that harbored pKT10 or pKT10-RAD23 were cultured in SD (-Ura) liquid medium that contained 800 nM MeHg for 3 h at 30°C. After treatment with MeHg, yeast cells were seeded at a density of 10^3 cells per plate on agar-solidified SD (-Ura) medium, and formation of colonies was determined after incubation for 2 days at 30°C.