

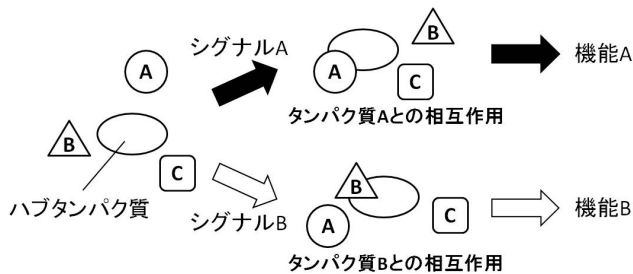
アクチン作用薬耐性酵母から精製したアクチンの特性

鏡 大志郎 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 臼井 健郎 (筑波大学 生命環境系)

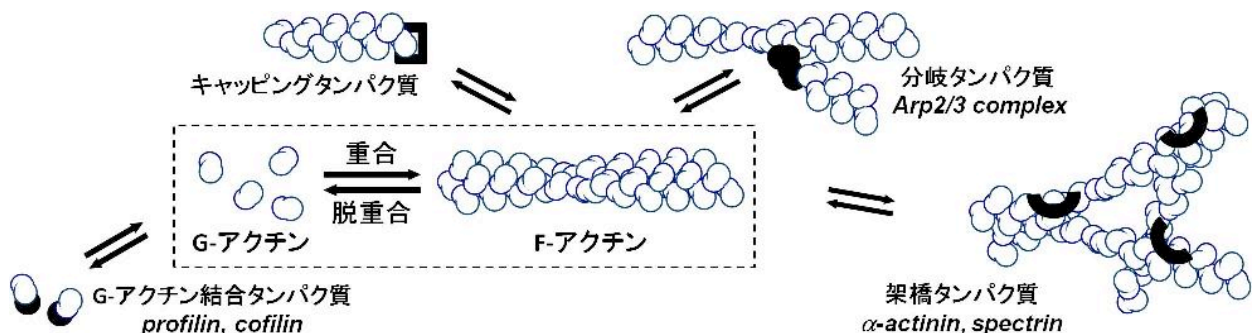
背景・目的

タンパク質は細胞内に高密度、かつ多量に存在する生体高分子であり、安定な複合体を形成して機能を果たしていることはよく知られている。しかしながら最近、一過的な結合・解離といったタンパク質-タンパク質相互作用 (protein-protein interaction: PPI) を頻繁に行っていることが明らかになってきた。このような結合・解離は決してランダムに起きているわけではなく、外的要因や細胞種、発生段階、細胞周期といった細胞の状況、リン酸化等の修飾や他の結合タンパク質の存在といった細胞内での状況などの様々な条件により制御されている¹⁾。特にシグナル伝達系では一つのタンパク質が異なる複数のタンパク質との間で PPI を起こす“ハブタンパク質”と呼ばれるタンパク質が存在し、外部のシグナルを柔軟かつ迅速に細胞内部に伝達している。



しかし、上記のような一過的な PPI の機能解析は一般に困難が伴う。特にハブタンパク質の機能解析では、遺伝子破壊や RNA 干渉によるタンパク質発現阻害では複数の PPI が同時に消失してしまうため、特定の PPI 機能の解析は不可能である。このような場合、特定の相互作用のみを阻害、あるいは強める小分子化合物が有用なツールとなる。例えば免疫抑制剤である FK-506 が結合した FKBP は calcineurin と PPI ができるようになるため、FK-506 は calcineurin の機能解析によく用いられている。しかし一般的に PPI は扁平かつ広い接触面同士が弱い結合により結合しているため、わずかな接触面しか持たない小分子化合物は結合することができず、阻害剤開発は困難なことが多い。

アクチンは細胞骨格の 1 つで、細胞内で重合・脱重合を繰り返して、細胞運動や細胞分裂、細胞の形態変化などの様々な生命現象において重要な役割を担っている。細胞内でのアクチン重合は、非常に多くのアクチン結合タンパク質 (Actin-binding proteins: ABPs) により、時空間的に制御されている (下図)。このことは、アクチンは ABPs との PPI によって重合・脱重合動態が制御されているともいえる。またアクチン重合そのものも、G-アクチン同士の PPI であると考えられる。



このような観点で既存のアクチン作用薬を見ると、アクチン重合阻害剤 latrunculin A は G-アクチンに結合し G-アクチン同士の PPI を弱めており、重合促進・安定化剤である jasplakinolide は F-アクチンのアクチン-アクチン界面に結合し、その PPI を強めているといえる。

本研究室では、薬剤耐性に関わる 12 遺伝子を破壊した多剤超感受性酵母を作成し、薬剤解析に用いている²⁾。昨年、この多剤超感受性酵母を用いて、アクチン作用薬に対し超感受性や耐性を示す、変異型アクチンのみを発現する酵母の作製に成功した (仙波 2011 年度卒論発表会)。今回これらの酵母の中から薬剤耐性を示した変異型アクチン発現酵母に着目し、精製酵母アクチンを用いて薬剤耐性機構を明らかにすることを目的に研究を行った。

方法

1. 酵母アクチンの精製

野生型アクチン、またはアクチン作用薬耐性変異型アクチンのみを発現する酵母より、DNase I カラム及び陰イオン交換カラムを用いて酵母アクチンを精製した。

2. アクチン同士の相互作用 (アクチン重合) に対する影響

精製したアクチンに塩、及び薬剤を加え 25°C で 1 時間反応後、超遠心 (48,000 rpm, 40 分) し、上清と沈殿に分けた。これらを SDS-PAGE した後、CBB 染色により観察した。

3. アクチンと ABPs との相互作用に対する影響

ABPs の一つである spectrin のアクチン結合ドメインのみからなる minispectrin と F-アクチンを混合し、25°C で 30 分反応後、薬剤を加えさらに 30 分反応させた。超遠心 (48,000 rpm, 40 分) し上清と沈殿に分け、これらを SDS-PAGE した後、CBB 染色により観察した。

結果・考察

詳細は発表会にて紹介する。

参考文献

- 1) De Las Rivas J., and Fontanillo C., Protein-Protein Interactions Essentials: Key Concepts to Building and Analyzing Interactome Networks. *PLoS Comput. Biol.*, **6**(6): e1000807. (2010)
- 2) Chinen T., et al., Construction of Multidrug Sensitive Yeast with High Sporulation Efficiency. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **75**, 1588-1593 (2011)