

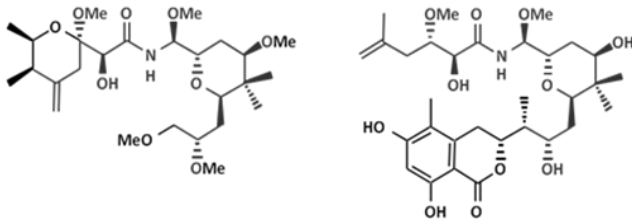
Irciniastatin A/Psymberin 耐性酵母の解析

島田 悟 (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

Irciniastatin A (以下 ISA、別名 psymberin) は抗腫瘍活性、タンパク質合成阻害活性を持つ Pederin 類¹⁾ に属する海産由来の天然小分子化合物である。しかしながら従来の pederin 類にはない非環式、及び dihydroisocoumarin 様側鎖を持ち、他の pederin 類よりも強い細胞毒性を動物細胞に示す²⁾ ことから、その標的分子・作用機構には興味を持たれている。



Pederin

Irciniastatin A (ISA)

そこで ISA の作用機構を検討したところ、タンパク質合成を阻害すること、ミトコンドリアから ROS 生産を介して p38/JNK 長期活性化とアポトーシスを誘導することが明らかになった³⁾。さらに、ISA がタンパク質合成阻害を示したことから chemical footprinting (リボソームと薬剤の結合を検討する手法の一つ) を行ったところ、25S rRNA に ISA 結合によるシグナルが検出された (Ota Y., 未発表)。以上の結果は ISA はリボソームに直接結合し、タンパク質合成を抑えることを示しているものの、他の pederin 類と比べて強い細胞毒性を示す理由は不明のままである。

以上の背景の元、我々は多剤超感受性酵母⁴⁾ を用いて、優性耐性変異株からの標的分子同定を試み、現在解析を進めている。一方、最近、多細胞生物のモデル生物である線虫 *C. elegans* を用いた解析から、リボソーム大サブユニット構成タンパク質である *RPL41* 中の P56L 変異が ISA 耐性を付与するとの報告がなされた²⁾。そこで ISA 優性耐性酵母の解析とともに、*RPL41* パラログである出芽酵母 *RPL42A* 遺伝子に P56L 変異を導入し、その薬剤感受性を検証することにした。

材料

- 多剤超感受性出芽酵母株

薬剤非特異的耐性に関わる 12 遺伝子を破壊する事で、多くの薬剤に対し、高い感受性を示す株

- pRS315, pRS305

ロイシンマーカー (*LEU2*) を持つ、単コピー型、及びゲノム挿入型の出芽酵母—大腸菌シャトルベクター

方法

実験 1：優性耐性変異株からの標的分子同定

先行研究によって得られていた ISA 優性耐性変異株の戻し交配を行い、ISA 特異的耐性変異の絞り込みを行った。

実験 2：変異 *rpl42A* 発現酵母の作製と ISA 耐性検討

- 方法 1-1：*rpl42A* (P56L) 発現 plasmid の作製

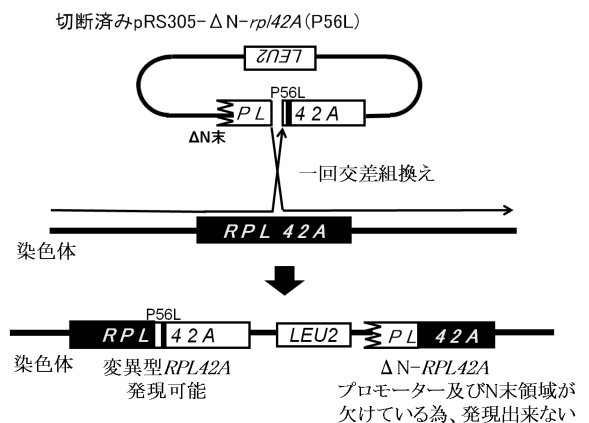
RPL42A 及び *rpl42A* (P56L) を pRS315 に組み込み、pRS315-*RPL42A*、pRS315-*rpl42A* (P56L) を作製した。

- 方法 1-2：ゲノム組込型 *rpl42A* (P56L) 発現 plasmid 作製

RPL42A 及び *rpl42A* (P56L) の N 末を欠失させ、pRS305 に組み込んだ pRS305- Δ N-*rpl42A*、及び pRS305- Δ N-*rpl42A* (P56L) を作製した。作製した plasmid は変異部位より N 末側にある制限酵素部位で消化した。

- 方法 2：*RPL42A* (P56L) 株の作製

方法 1-1 で作製した plasmid 及び pRS315、また方法 1-2 で作製した消化済みのゲノム組込み型 plasmid を多剤超感受性株に形質転換した。N 末欠失型 *rpl42A* は一回交差組換えによりゲノムに挿入され、変異型のみを発現する株が得られる (下図)。



- 方法 3：*RPL42A* (P56L) 株の薬剤感受性試験

形質転換体を液体培養後、希釈系列を作製し、濃度の異なる ISA を含む寒天培地に 3 μ l ずつ添加した。2 日間培養後、plasmid の種類ごとに薬剤感受性の比較を行った。

結果と考察

詳細は研究発表会にて紹介する。

参考文献

- Burres NS., et al., Antitumor activity and mechanism of action of the novel marine natural products mycalamide-A and-B and onnamide. *Cancer Res.*, **49**, 2935-2940 (1989).
- Wu CY., et al., Studies toward the unique pederin family member psymberin: structure-activity relationships. *J. Am. Chem. Soc.*, **134**, 18998-19003 (2012)
- Chinen T., et al., Irciniastatin A induces JNK activation that is involved in caspase-8-dependent apoptosis via the mitochondrial pathway. *Toxicol. Lett.*, **199**, 341 - 346 (2010)
- Chinen T., Ota Y., Construction of Multidrug Sensitive Yeast with High Sporulation Efficiency. et al., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **75**, 1588-1593 (2011)