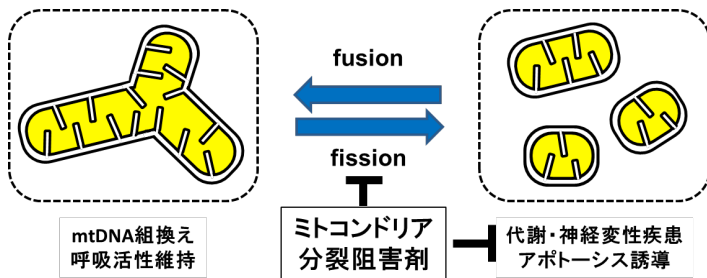


AID system を用いたミトコンドリア分裂阻害剤のスクリーニング

吉田 圭佑 (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

ミトコンドリアは常に融合と分裂を繰り返す極めて動的なオルガネラであり、ATP 産生を始めとする細胞内の様々な機能に関わっている。ミトコンドリアの形態は融合と分裂のバランスによって維持されており、融合が活性化するとネットワーク様のミトコンドリアが、分裂が活性化すると断片化したミトコンドリアが形成される。この融合と分裂のバランスが崩壊し、分裂に偏ると好気呼吸に伴う活性酸素によって障害を受けたミトコンドリア DNA を修復することが出来なくなる。そのため好気呼吸機能が低下し、代謝疾患や神経変性疾患などの様々な疾患を引き起こすことが知られている。このことからミトコンドリア分裂阻害剤は、未だ不明な点の多いミトコンドリア分裂の分子機構の解明への糸口を与えるばかりでなく、代謝疾患や神経変性疾患の治療薬となることが期待される。



酵母ミトコンドリア融合に関わるタンパク質の一つに Fzo1p がある。fzo1 遺伝子を破壊した酵母のミトコンドリアは融合が出来ず、好気呼吸活性を失う。そのため解糖系を利用できる醗酵性培地 (グルコース) で生育できるものの、グリセロールなどの非醗酵性炭素源の培地では生育が出来なくなる。一方、ミトコンドリア分裂に関わる Fis1p の遺伝子を、fzo1 遺伝子と同時に破壊すると、ミトコンドリアの融合と分裂のバランスが回復し、好気呼吸活性が維持され、非醗酵性培地で生育出来るようになることが知られている¹⁾。このことから非醗酵性培地では生育出来ない Fzo1p 破壊株も、ミトコンドリア分裂阻害剤を添加すると生育が回復することが予想される。

以上の背景の元、Fzo1p が条件依存的に破壊・分解される変異株を用いてミトコンドリア分裂阻害剤のスクリーニングを行うことにした。今回、Fzo1p を特定の条件下に分解する方法として AID system²⁾を用いた。この system は植物のオーキシシンシグナル伝達経路を利用したタンパク質分解系であり、植物由来の F-box タンパク質 TIR1p とインドール酢酸 (IAA) 存在下、AID タグを融合した目的タンパク質はポリユビキチン化され、プロテアソーム系で速やかに分解される。本研究では薬剤探索を行うことから、当研究室で開発した多剤超感受性酵母³⁾を親株として用い、ミトコンドリア分裂阻害剤の探索を行った。

材料

TIR1p 発現多剤超感受性酵母 dTC090 (*MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 pdr3Δ0 pdr8Δ0 pdr1Δ0 yrr1Δ0 snq2Δ0 pdr5Δ0 pdr10Δ0 yor1Δ0 pdr15Δ0 pdr11Δ0 pdr12Δ0 aus1Δ0 RME1(ins-308A) tub3Δ::OsTIR1*)

方法

1. FZO1-AID 株の作製

TIR1p 発現多剤超感受性酵母を親株とし、Fzo1p の C 末端に AID タグが融合した FZO1-AID 株を cassette PCR 法にて作製した。作製した株では IAA 依存的に FZO1-AIDp が分解され、グリセロール培地での生育が阻害されることを確認した。

2. 薬剤スクリーニング

FZO1-AID 株を、化合物を含む IAA 含有、または不含のグリセロール培地で 3 日間振盪培養した。IAA 含有グリセロール培地での生育を指標に、ミトコンドリア分裂阻害活性を示す化合物を探索した。

3. ミトコンドリア形態観察

ミトコンドリア分裂阻害剤存在下ではミトコンドリアが分裂する条件下でも分裂が起こらないと考えられる。そこでミトコンドリア形態が観察しやすい HeLa 細胞を用い、候補化合物の分裂阻害活性を検討した。候補薬剤を 1 時間前処理後、ミトコンドリア分裂を誘導する過酸化水素を 4 時間処理した。ミトコンドリアは MitoRed を用いて染色し、蛍光顕微鏡で形態を観察した。

結果・考察

詳細は発表会にて報告する。

参考文献

- 1) AD. Mozdy, JM. McCaffery, JM. Shaw. "Dnm1p GTPase-mediated mitochondrial fission is a multi-step process requiring the novel integral membrane component Fis1p." *J. Cell Biol.*, **151**, 367-380 (2000)
- 2) K. Nishimura, T. Fukagawa, H. Takisawa, T. Kakimoto, M. Kanemaki. "An auxin-based degron system for the rapid depletion of proteins in nonplant cells." *Nature Methods*, **6**, 917-922 (2009)
- 3) T. Chinen, Y. Ota, Y. Nagumo, H. Masumoto, T. Usui. "Construction of multidrug sensitive yeast with high sporulation efficiency." *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **75**, 1588-1593 (2011)