

出芽酵母を用いたアクチン変異体のサブレッサー解析

湯本 天嗣 (筑波大学 生物学類)

指導教員：中野 賢太郎 (筑波大学 生命環境系)

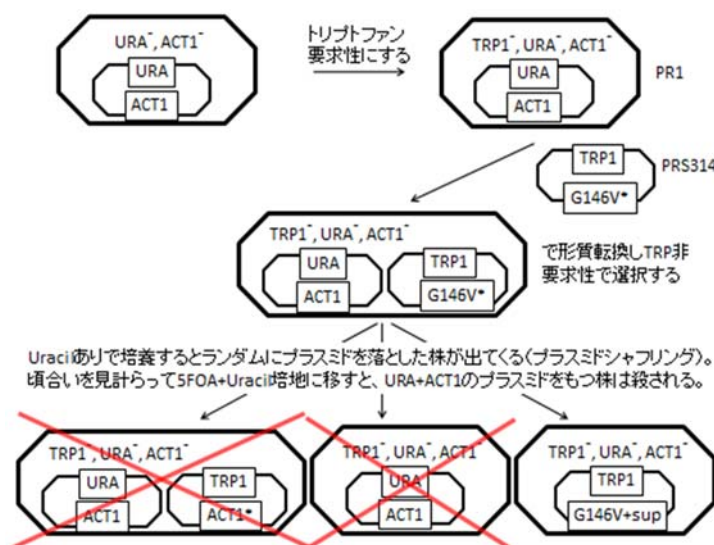
背景・目的

アクチンは非常に多機能なタンパク質で、アクチン単量体同士が重合してアクチンフィラメントを形成し、筋収縮や細胞骨格系の構築など生命活動に重要な様々な運動に関与している。アクチンの多機能性は、それぞれ特異的なアクチン結合タンパク質 (ABP) との相互作用に依存することがわかっているが、同一細胞中に存在するアクチンフィラメントが異なる ABP と相互作用するメカニズムのひとつとして、アクチンフィラメントの構造多型性が重要であることが近年分かってきた。ABP との相互作用でアクチンフィラメントの構造が協同的に変化することで ABP とのアフィニティーが変化し、その状況に適した機能を選択できることが示唆されている (e.g., Uyeda et al., 2011)。

粘菌アクチン ACT15 の N 末端 4 アミノ酸を酵母アクチン ACT1 のものに換えた Y-AR での G146V 変異アクチンは野生型酵母アクチンに対して優性阻害を示し、野生型アクチンと共重合したアクチンフィラメントは協同的な構造変化ができなくなることが分かっている (Noguchi et al., 2010)。これはアクチン分子のサブドメイン間のヒンジ部分の変異により分子内での構造変化の自由度が下がったためにアクチンフィラメント全体で構造を変化しづらくなったのだと考えられる。

本研究では、このようなアクチンフィラメントの構造変化に影響を与える変異アクチンに対してサブレッサー変異を見つけ出すことを目的とし、そのスクリーニング系を構築した。サブレッサー変異とは、ある変異が原因で生じた表現形の変化を打ち消すような変異のことで、G146V 変異に対する分子内サブレッサー変異はヒンジ部分の分子内構造との相互作用を示唆し、またサブレッサー変異アクチン単体でのアクチンの表現型が変化する可能性がある。このようなサブレッサー変異を解析することによってアクチンフィラメントの構造変化について新たな知見の手がかりになることを期待する。

材料と方法



サブレッサーのスクリーニングには 5FOA セレクションを用いる。

前提として、酵母の増殖においてアクチンは必須であることと、5-fluoroorotic acid (5FOA) という薬剤は *URA3* 存在下で毒性のある物質に変わることを利用する。ゲノムの *URA3* と *ACT1* を破壊しこれらをプラスミドで保持するトリプトファン要求性の出芽酵母株 PR1 を *TRP1* とランダムに変異を加えた G146V-*YAR* が乗ったプラスミドで形質転換する。これを TRP-URA⁺ の培地でしばらく培養し、5FOA を添加した TRP-URA⁺ の寒天培地に播種すると、*TRP1* と変異アクチン遺伝子を持つプラスミドを保持し、かつ G146V の阻害作用が打ち消されアクチンの機能が回復した株のみがコロニーを形成する。

：サブレッサー変異ライブラリの作成

G146V 変異アクチンへのランダムな変異の導入は Error Prone PCR (EPPCR) で行った。この PCR 産物を megaprimer とし、pRS314 を鋳型とした megaprimer 法の改変法を用いて 5' 末端と 3' 末端に相同部位も持った線状の DNA を作成した。この DNA で酵母を形質転換した際に両端の相同部位で相同組換えを起こして環状プラスミドになる。

：形質転換と 5FOA セレクション

酢酸リチウム法を用いて線状ライブラリ DNA を酵母へ導入し、ウラシルを加えた SD 培地で 2 日間培養後 5FOA プレートに播種し、生じたコロニーからサブレッサー候補を得た。

結果

：EPPCR の最適化

サブレッサー解析を行うに当たってアクチンコード領域 1133bp 当たり 1,2 個程度のエラー率に調整する必要があった。EPPCR の反応液中のエラー率に影響する MnCl₂ の最適な濃度を実際に EPPCR を行って配列を解析することにより求めた。その結果、MnCl₂ 終濃度 0.1 mM において 1133bp 当たり平均 1.85 個のエラー数となったのでこの MnCl₂ 濃度を採用した。

：5FOA セレクション

5FOA セレクションによって多数のコロニーが生じ、ここから得られたサブレッサー候補を解析した結果、G146V の Valine が Glycine に戻ったリバータントが得られたが、他には pRS314 上の *YAR* が PR1 の *ACT1* で組換わったプラスミドがバックグラウンドとして多数現れたため、サブレッサー変異を得ることができなかった。これは PR1 上の *ACT1* と pRS314 上の *YAR* が共通のプロモーター・ターミネーターをもつため線状ライブラリ DNA を導入した際に両者の間で相同組換えが起き、pRS314 に *ACT1* が混入してしまったためだと考えた。そこでこのバックグラウンドを除去するために、pRS314 の *YAR* のターミネーター領域を酵母 *TDH3* のターミネーター領域に置換したプラスミドを作成し、再度 5FOA セレクションを行った。

この 5FOA セレクションで多数のコロニーが生じ、現在これらのサブレッサー候補について解析している。