

## Vicenistatin による出芽酵母膜形態異常

内海 由佳 (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】

Vicenistatin (Vic) は放線菌 *Streptomyces halstedii* HC-34 株の培養液から単離された 20 員環マクロラクタムであり、*in vivo*, *in vitro* で抗腫瘍活性を示すことが報告されている[1]。当研究室では本物質が動物細胞に初期エンドソーム由来の巨大な液胞様構造を短時間で誘導すること、その誘導には初期エンドソームの成熟に関わる rab5-PAS 経路の活性化、及び膜流動性の増加が関わっていることを明らかにしてきた[2]。しかしながら Vic による液胞様構造誘導機構や標的分子は不明のままである。そこで我々は Vic に対して高感受性を示す出芽酵母 *erg6* 破壊株を親株に、Vic 耐性変異株を取得することで、Vic 感受性に関わる遺伝子の同定・機能解析を進めている。一方、Vic が出芽酵母に対しても膜形態異常を引き起こすかどうかについては不明のままである。そこで本研究では Vic が出芽酵母 *erg6* 破壊株に対しても液胞膜形態の異常を誘導するか検討した。

## 【材料・方法】

材料:

## ・酵母株

細胞膜上に存在する薬剤排出ポンプ 8 つ、及びそれらの主要な転写因子 4 つを破壊した多剤感受性酵母株 OTA017 (BY4741 *pdr3Δ0 pdr8Δ0 pdr1Δ0 yrr1Δ0 snq2Δ0 pdr5Δ0 pdr10Δ0 yor1Δ0 pdr15Δ0 pdr11Δ0 pdr12Δ0 aus1Δ0 RME1 (ins-308A)*) を元株に以下の株を作成して用いた。

OTA017 *Δerg6::CgURA3*OTA017 *erg6Δ::CgURA3 SEC7-yeGFP-HIS3MX6*OTA017 *erg6Δ::CgURA3 SNX4-yeGFP-HIS3MX6*OTA017 *erg6Δ::CgURA3 VPH1-yeGFP-HIS3MX6*

## ・オルガネラ染色剤

液胞染色剤 FM4-64

DNA 染色剤 Hoechst33258

## ・細胞骨格阻害剤

微小管重合阻害剤 Nocodazole

アクチン重合阻害剤 Latrunculin A

方法:

## 1. 蛍光顕微鏡観察

OD<sub>600</sub> = 0.1 となるように YPD で培養した酵母に 3 μM Vic と 80 μM FM4-64 を 1 時間処理した後、PBS で 1 回洗浄し、YPD 培地に移し替えてさらに 2 時間培養した。その後、厚さ 0.1 mm のアガロースパッド上に集菌した酵母を固定し、蛍光顕微鏡を用いて観察を行った。

## 2. Hoechst33258 による核染色

上記 1 と同様、薬剤処理、及び 2 時間培養の後、菌体を 100 μl PBS に移し替えて 5 μg/ml Hoechst33258 を処理し、すぐに PBS で洗浄し、10-100 μl の PBS に移し替えて蛍光顕微鏡にて観察を行った。

## 3. 薬剤処理観察

Vic と Nocodazole または Latrunculin A を共処理することにより、液胞構造に対する微小管、アクチンの影響を調べた。

80 μM FM4-64 を 1 時間処理後、PBS で洗浄し、YPD 培地に移し替えて 15 μg/ml Nocodazole もしくは 3 nM Latrunculin A を処理した。1 時間培養後、3 μM Vic を加えて再び 1 時間培養し、蛍光顕微鏡で観察した。

## 【結果】

詳細は発表会にて報告する。

## 【参考文献】

[1] *J. Antibiot.*, **46**, 1076-1081 (1993)[2] *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **80**, 902-910 (2016)