

分裂酵母の胞子形成に関わる CDK/cyclin の分子構造解析

森山 直人 (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)

【背景と目的】

真核生物の細胞周期は、サイクリン依存性キナーゼ (CDK) とサイクリンの複合体による制御が広く保存されている。CDK はサイクリンと結合することで触媒作用を発揮し、サイクリンはそのターゲット特異性を決定する。CDK/cyclin 複合体は細胞周期の制御において中心的な機能を担っていることがよく知られているが、それ以外の生命現象にも関与する事例が多数報告されている。

分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* は、多くの細胞分裂の制御因子についての機能が解明されているモデル生物である。この生物には 8 種類の CDK が存在し、そのうちの Cdc2 が細胞周期を制御する主要な CDK として働いている。これ以外の 7 種類の遺伝子は細胞周期制御に必須ではない。

本研究では、分裂酵母の CDK のうち、Pef1 に着目した。Pef1 は、その遺伝子破壊株の表現型から、オートファジー、接合、減数分裂、コヒーシンの制御に関与していることが示唆されている。Pef1 は Cdc2 とアミノ酸配列の相同性が 52% であり、その立体構造は良く似ている。また、Pef1 は 3 つのサイクリン (Pas1, Clg1, Psl1) と結合することが報告されており、少なくともそのうちの 1 つは Cdc2 とも結合する。Pef1 と Cdc2 は、サイクリンをどのように区別し、細胞内で異なる機能を発揮しているのだろうか。この疑問を解決するため、私は Pef1/Cyclin 複合体の構造に注目した。本研究では、まず Pef1/Cyclin 複合体の構造を計算で予測した。そして、Pef1/Psl1 複合体について、その構造から結合に必要なと予想されるタンパク質の部位とそれを構成する重要なアミノ酸残基を予測し、変異型タンパク質を設計した。それらを野生型タンパク質を用いて、サイクリンとの結合性をプルダウン・ウエスタンブロット実験によって評価することで、相互作用に必要な結合部位の決定を試みた。

【方法】

① タンパク質発現プラスミドの作製

分裂酵母の *pef1+* や *psl1+* を発現するプラスミドを作製するため、GST あるいは strep タグを持つ pASG-IBA123 ベクターに、これらの遺伝子のコーディング領域を組み込んだ。そして、GST-Pef1、及び Psl1-strep を発現するようにした。

Psl1 の部位欠損、及び特定のアミノ酸残基の欠失する変異型遺伝子の作製には、inverse PCR 法を用いた。

② プラスミドの形質転換、タンパク質の抽出

作製したプラスミドを大腸菌 BL21 株に形質転換した。得られた形質転換体を培養し、tetracycline で外来タンパク質の発現を誘導した。集菌後、超音波破碎によってタンパク質を抽出した。

③ プルダウン・ウエスタンブロット実験

Psl1-strep のタンパク質抽出液と GST-Pef1 のタンパク質抽出液を混合し、4°C で一晩転倒混和した。この混合液にグルタチオンセファロースを加え、2 時間転倒混和した。これを洗浄バッファ

ーで 4 回ウォッシュし、これを SDS-PAGE、strep 抗体による抗体反応で結合を比較した。

【結果・考察】

詳細な結果については発表会にて報告する。