

平成22年5月31日現在

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2007～2010

課題番号：19380056

研究課題名(和文) 蛍光偏光解消法によるユビキチン関連因子等の未知ターゲット探索

研究課題名(英文) Exploration of target proteins for ubiquitination using fluorescence anisotropy measurement

研究代表者

阿部 文快 (ABE FUMIYOSHI)

独立行政法人海洋研究開発機構・海洋・極限環境生物圏領域・チームリーダー

研究者番号：30360746

研究代表者の専門分野：細胞生物学、微生物学、分子遺伝学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：蛍光偏光解消法、時間分解測定、細胞膜物性、蛍光寿命、出芽酵母、ユビキチン機構、回転ブラウン運動、分子間相互作用

1. 研究計画の概要

酵母細胞を高圧培養すると、Trp 輸送体 Tat1 と Tat2 の分解が促進され Trp 飢餓に陥る。輸送体分解を担うのは Rsp5 ユビキチンリガーゼだが、圧力刺激を受け、いかにしてそれらをユビキチン化するのか？ターゲットの認識機構は謎である。本研究では、偏光解消法と時間相関単一光子計数法を用いてターゲットを同定する。すなわち蛍光標識 Rsp5 分子の回転運動から既知のターゲットの解離会合を定量解析するとともに、未知因子の探索を行う。特に Rsp5 は多様な膜タンパク質のユビキチン化を担っているため、膜構造そのものを調べる必要がある。そこで、蛍光異方性プローブ TMA-DPH を用い膜物性を計測する。すなわち、分子間相互作用の解析に先立って、時間分解蛍光偏光解消法の計測技術の開発を第一のゴールとした。

2. 研究の進捗状況

(1) 出芽酵母の細胞膜の動的構造を明らかにするため、時間分解蛍光偏光解消法を確立し、その応用を行った。具体的には、細胞膜を蛍光偏光プローブ TMA-DPH でラベルし、野生株とエルゴステロール合成変異株との膜の比較、および抗真菌剤フルコナゾール投与後の膜物性の変化を調べた。その結果、*erg2* 株では野生株と比べ膜の剛直性が低下し、脂質の回転ブラウン運動が増大していることがわかった。野生株にフルコナゾールを投与した場合にも膜の剛直性が劇的に低下し、このことがアゾール系抗真菌剤作用の実態であることが示唆された。以上の結果は、

酵母細胞が示す表現型を膜物性の観点から定量的に解釈した初めての成果であり、*Biochim Biophys Acta* および *Biochemistry* 誌に論文掲載している。

(2) 酵母 Rsp5 ユビキチンリガーゼと相互作用する因子として Sna3 が同定された。Sna3 はエンドソームや液胞に局在するタンパク質だが、細胞内における役割は不明のままだった。SNA3 遺伝子を過剰発現すると、トリプトファン輸送体 Tat2 の分解速度が低下し安定化することがわかった。Rsp5 結合タンパク質である Bul1 を欠損すると同様に Tat2 が安定化することから、Sna3 は Bul1 と競合して Rsp5 を負に制御していることが示唆された。Rsp5 は細胞内で多彩な役割を担っているが、ユビキチン化される基質の認識機構は未だ明らかとなっていない。本研究は、Sna3 が Rsp5 と Tat2 を介在して特異性を規定する因子であることを示唆している。以上の結果は、*FEBS Lett* 誌に論文掲載している。

(3) GFP とフルオロセインでラベルした様々なタンパク質について、分子量と回転相関時間の関係を調べた。その結果、分子量が1万程度までのタンパク質については、回転相関時間との間に直線関係が見られたが、より大きなタンパク質では成立しないことがわかった。よって、回転相関時間を指標にした分子間相互作用の解析は、ドメイン間のみで行うことが理想的であろう。

3. 現在までの達成度

②酵母生細胞における時間分解蛍光偏光解消法の測定技術の開発に成功し、国際誌に2報の論文を既に発表している。

4. 今後の研究の推進方策

時間分解蛍光偏光解消法の測定技術が確立されたので、今後は Rsp5 ユビキチンリガーゼの WW ドメインを精製し、これをフルオロセインなどで蛍光ラベルして回転相関時間を調べる。次いで、相互作用が予想されるタンパク質を混合し、回転相関時間がいかに変化するかを定量化する。こうした一連の研究により、ユビキチンリガーゼに関する分子間相互作用の実態が明らかとなるはずである。

5. 代表的な研究成果

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 12 件)

- (1) Hiraki, T. and Abe, F. Overexpression of *SMA3* stabilizes tryptophan permease Tat2, potentially competing for the WW domain of Rsp5 ubiquitin ligase with its binding protein Bull. FEBS Lett. 584 (2010), 55-60. 査読有り
- (2) Abe, F., Usui, K. and Hiraki, T. Fluconazole modulates membrane rigidity, heterogeneity and water penetration into the plasma membrane in *Saccharomyces cerevisiae*. Biochemistry 48 (2009), 8494-8504. 査読有り
- (3) Daicho, K., Makino, N. Hiraki, T., Ueno, M., Uritani, M., Abe, F. and Ushimaru, T. Sorting defects of the tryptophan permease Tat2 in an *erg2* yeast mutant. FEMS Microbiol. Lett. 298 (2009), 218-227. 査読有り
- (4) Abe, F. and Hiraki, T. Mechanistic role of ergosterol in membrane rigidity and cycloheximide resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. Biochim. Biophys. Acta 1788 (2009), 743-752. 査読有り
- (5) Abe, F. and Minegishi, H. Global screening of genes essential for growth in high-pressure and cold environments: searching for basic adaptive strategies using a yeast deletion library. Genetics 178 (2008), 851-872. 査読有り

[学会発表] (計 6 件)

- (1) 阿部文快、圧力とゲノムの摂動で測る細胞内のすき間、日本生化学会、2009年10月21日、ポートピアホテル、神戸
- (2) 阿部文快、高圧蛍光偏光解消法の開発と微生物細胞膜への圧力効果、第16回生物関連高圧研究会シンポジウム、2009年7月30日、産業技術総合研究所 臨海副都心センター、東京
- (3) 阿部文快、フルコナゾールによる細胞膜の動的構造変化と *erg3* 株の耐性、酵母遺伝学フォーラム、2009年7月29日、ノバホール、つくば
- (4) 阿部文快、圧力を用いて細胞内のすき間を測る日本分子生物学会、2008年12月11日、ポートピアホテル、神戸
- (5) 阿部文快、圧力生理学の挑戦 -細胞機能の新たな理解をめざして、酵母合同シンポジウム、2008年6月5日、甲南大学、神戸
- (6) 阿部文快、ナノ秒計測で探る細胞膜の動態と薬剤感受性、酵母遺伝学フォーラム、2008年9月11日、北海道大学、札幌

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 抗菌剤に対する微生物のMICを予測する方法

発明者: 阿部文快

権利者: 独立行政法人海洋研究開発機構

種類: 特許

番号: 特願 2008-231666

出願年月日: 2008年9月10日

国内外の別: 国内