

機関番号：32601

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）

青山学院大学・理工学部・准教授

研究者番号：30360746

研究成果の概要（和文）：

回転運動を指標にユビキチン関連因子と相互作用する分子を同定する試みである。方法論確立のため、まず酵母細胞膜の脂質回転運動を定量化したところ、ステロール異常で膜剛直性が失われアシル鎖の回転が増大していた。フルオロセイン標識したモデルタンパク質では、分子量 10 kDa 程度までは回転相関時間と分子量に相関が見られた。よって、ドメインごとの相互作用解析が有効であることが判明した。Rsp5 ユビキチンリガーゼと相互作用する Sna3 が得られた。本研究手法を用いて Rsp5-Sna3 間相互作用の詳細を解析する予定である。

研究成果の概要（英文）：

This study approaches the finding of novel factors that interact with ubiquitination-related proteins by monitoring the rotational motion of proteins. First, I established the experimental procedure to quantify the rotational motion of membrane lipids in yeast. The defect in ergosterol biosynthesis resulted in a decrease in membrane rigidity and an increase in the rotational lipid motion. The measurement of fluorescein-labeled model proteins suggests that this technique is valid for proteins of less than 10 kDa. Sna3 was identified as a factor that potentially interacted with Rsp5 ubiquitin ligase. In the future study, I investigate the molecular interaction between Rsp5 and Sna3 using the system employed in this study.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
2008 年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
2009 年度	3,100,000	930,000	4,030,000
2010 年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
年度			
総計	15,000,000	4,500,000	19,500,000

研究分野：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. 研究開始当初の背景

全ゲノム配列解読後、タンパク質機能の解明における律速段階は“ターゲットの同定”である。さらに未知遺伝子のタンパク質機能

はホモロジーから予測できない。本課題では、目的タンパク質のターゲット因子を“分子の回転ブラウン運動”を指標に *in vivo* で見いだす革新的な取り組みである。蛍光偏光解消

(fluorescence depolarization)法と時間相関単一光子計数法 (Time-Related Single Photon Counting, 以下 TCSPC) を酵母分子遺伝学と融合させた独創的なアプローチである。

2. 研究の目的

我々は出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* をモデルに、高圧適応機構の解明に取り組んできた。出芽酵母では高圧増殖の制限要因はトリプトファン (Trp) の取り込みである。細胞を高圧下で培養すると 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 Tat1 や Tat2 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。本研究の目的は、偏光解消法と TCSPC を用いて生細胞内でユビキチン関連タンパク質の真のターゲットやエフェクターを同定することにある。GFP 標識分子の回転運動変化からターゲット・エフェクターの網羅的探索を行うという取り組みである。

3. 研究の方法

(1) 細胞における TCSPC を用いた蛍光偏光解消法の確立

酵母細胞において、TCSPC で蛍光偏光解消法を実施した例はこれまでにないため、まず測定手段の確立を行う。脂質プローブの DPH や TMA-DPH は偏光性が大きく、脂質二重層の局所運動性の解析に汎用されている。これらのプローブを酵母細胞膜に導入し、定常光で偏光解消法を行った場合と TCSPC による解析を比較する。TCSPC は海洋研究開発機構が保有する FluoroCube (Horiba Jovin Ivon 社製) を用いて行う。両者のデータに整合性があることを確認した上で、GFP の偏光性を利用した解析に移行する。GFP をモノマー、ダイマーおよびトライマーとして酵母細胞内で発現させ、TCSPC でそれぞれの回転相関時間を求める。回転相関時間は分子量に反比例するので、トライマーで最も長くなることが予想される。

(2) 蛍光顕微 TCSPC 法技術の開発

細胞懸濁液を実験に用いる問題点は、細胞集団としての不均一性と 1 細胞内での不均一性を測定上、区別できない点にある。また、細胞内で複雑な局在を示すタンパク質の場合、顕微鏡下で可視化し、目的部位のみから情報を得ることが望ましい。そこで、オリンパス社の協力を得て倒立顕微鏡下で TCSPC を実現する技術開発を行う。ここで、酵母細胞は直径 5 μm と非常に小さいので、開発の初段階ではヒト培養細胞の HeLa 株など大型の細胞を適宜用いる。

(3) GFP-Rsp5 融合タンパク質の動態解析
蛍光顕微 TCSPC 法技術の実現に合わせ、GFP-Rsp5 融合タンパク質の発現ベクターを構築する。このタンパク質の回転相関時間を調べ、細胞内における回転運動のダイナミズムを解析する。

4. 研究成果

(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泡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。

(4) オリンパス倒立顕微鏡 IX71 にパルスレーザーを装着し、特注した偏光子を励起と蛍光側に設置した。これらを蛍光寿命測定装

置 FluoroCube に接続し、偏光解消法の時間分解測定を行った。材料として TMA-DPH でラベルした酵母細胞を用いた。その結果、蛍光寿命に関しては、これまで行ってきた細胞懸濁液による測定値とほぼ一致したが、回転相関時間をはじめとする偏光解消のパラメータを算出することはできなかった。おそらくこれは、対物レンズや複雑な経路を光が通る際、偏光面が次第にふれ、偏光解消されてしまったためと考えられる。今後は、対物レンズを含め、光路全体の見直しが必要となる。

5. 主な発表論文等

(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 13 件、全て査読有り)

- (1) Hiraki, T., Usui, K. and Abe, F. (2010) Overexpression of EAR1 and SSH4 that encode PPxY proteins in the multivesicular body provides stability of tryptophan permease Tat2 allowing yeast cells to grow under high hydrostatic pressure. *High Pressure Research* 30, 514-518.
- (2) Hiraki, T. and Abe, F. (2010) Overexpression of SNA3 stabilizes tryptophan permease Tat2, potentially competing for the WW domain of Rsp5 ubiquitin ligase with its binding protein Bull. FEBS Lett. 584, 55-60.
- (3) Abe, F., Usui, K. and Hiraki, T. (2009) Fluconazole modulates membrane rigidity, heterogeneity and water penetration into the plasma membrane in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry* 48, 8494-8504.
- (4) Daicho, K., Makino, N. Hiraki, T., Ueno, M., Uritani, M., Abe, F. and Ushimaru, T. (2009) Sorting defects of the tryptophan permease Tat2 in an *erg2* yeast mutant. *FEMS Microbiol. Lett.* 298, 218-227.
- (5) Abe, F., Van Prooyen, N., Ladasky, J. J. and Edidin, M. (2009) Interaction of Bap31 and class I MHC molecules and their traffic out of the endoplasmic reticulum. *J. Immunol.* 182, 4776-4783.
- (6) Abe, F. and Hiraki, T. (2009)

Mechanistic role of ergosterol in membrane rigidity and cycloheximide resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* 1788, 743-752.

- (7) Muthusamy, B-P, Raychaudhuri, S., Natarajan, P., Abe, F., Liu, K., Prinz, W. A. and Graham, T. R. (2009) Control of Protein and Sterol Trafficking by Antagonistic Activities of a P4-ATPase and Oxysterol Binding Protein Homologue. *Mol. Biol. Cell* 20, 2920-2931.
- (8) Guan, X., Souza, C., Pichler, H., Dewhurst, G., Schaad, O., Kajiwar, K., Wakabayashi, H., Ivanova, T., Castillon, G., Piccolis, M., Abe, F., Loewith, R., Funato, K., Wenk, M., and Riezman, H. (2009) Functional interactions between sphingolipids and sterols in biological membranes regulating cell physiology. *Mol. Biol. Cell* 20, 2083-2095.
- (9) Kawano, H., Takahashi, H., Abe, F., Kato, C., and Horikoshi, K. (2009) Identification and characterization of two alternative σ factors of RNA polymerase in the deep-sea piezophilic bacterium, *Shewanella violacea* strain DSS12. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 387, 200-202.
- (10) Ohmae, E., Tatsuta, M., Abe, F., Kato, C., Tanaka, N., and Kunugi, S., and Gekko, K. (2008) Effects of pressure on enzyme function of *Escherichia coli* dihydrofolate reductase. *Biochim. Biophys. Acta* 1784, 1115-1121.
- (11) Abe, F. and Minegishi, H. (2008) 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, 851-872.
- (12) Nishiguchi, Y., Miwa, T. and Abe, F. (2008) Pressure-adaptive differences in lactate dehydrogenases of three hagfishes: *Eptatretus burgeri*, *Paramyxine*

atami, and Eptatretus okinoseanus. Extremophiles 12, 477-480.

- (13) Abe, F. (2007) Induction of DAN/TIR yeast cell wall mannoprotein genes in response to high hydrostatic pressure and low temperature. FEBS Lett. 581, 4993-4998.

[学会発表] (計 9 件)

- (1) Abe, F. (2010) Spotlight lecture: Dynamics of microbial membranes under high pressure: a study using time-resolved fluorescence anisotropy measurement. 6th International Conference on High Pressure Bioscience and Biotechnology (HPBB2010) 2010, Freising, Germany (Aug. 29. 2010)
- (2) 阿部文快 (2009) 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 (神戸) 2009 年 10 月 21 日
- (3) 阿部文快 (2008) 圧力を用いて細胞内のすき間を測る、日本分子生物学会 (神戸) 2008 年 12 月 11 日
- (4) 阿部文快 (2008) 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 (神戸) 2008 年 6 月 5 日
- (5) 阿部文快 (2007) ユビキチン化による酵母トリプトファン輸送体の制御と動態-圧力生理学からのアプローチ、日本トリプトファン研究会第 29 回学術集会 (東京) 2007 年 12 月 8 日
- (6) 阿部文快 (2007) 酵母をモデルとした微生物に対する圧力効果の網羅的解析、日本高圧力討論会 (鳥取) 2007 年 11 月 20 日
- (7) 阿部文快 (2007) 圧力で探る生体膜と膜タンパク質のダイナミクス研究、2007 堀場雅夫賞受賞講演 (京都) 2007 年 10 月 17 日
- (8) 阿部文快 (2007) 高圧下におけるユビキチンシステムの生理機能解析とその応用、日本農芸化学会年会シンポジウム (東京) 2007 年 3 月 25 日
- (9) 阿部文快 (2007) 定量的蛍光イメージングからアプローチする酵母研究

一蛍光異方性と蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) の解析で何がわかるのか? 酵母研究会 (西宮) 2007 年 3 月 8 日

[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

[その他]

ホームページ URL:

<http://www.chem.aoyama.ac.jp/Chem/ChemHP/abeflab/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

阿部文快 (ABE FUMIYOSHI)

青山学院大学・理工学部・准教授

研究者番号: 30360746