



Title	Isolation and characterization of a novel actin filament-binding protein from <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Author(s)	朝倉, 剛
Citation	大阪大学, 1999, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41609
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について をご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名	あま くら たけし 朝 倉 剛
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学位記番号	第 1 4 4 5 0 号
学位授与年月日	平成11年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科生理系専攻
学位論文名	Isolation and characterization of a novel actin filament-binding protein from <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (出芽酵母 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> の新規アクチン結合蛋白質の単離と性状解析)
論文審査委員	(主査) 教 授 高井 義美 (副査) 教 授 谷口 直之 教 授 松澤 佑次

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】

アクチン細胞骨格は、哺乳動物細胞では、細胞形態の変化や細胞運動、細胞質分裂など種々の重要な細胞機能を、出芽酵母では、出芽過程の制御をおこなっている。出芽酵母の出芽過程では、最初に出芽の成長する部分に cortical なアクチンパッチが形成され、そこからアクチンケーブルが形成される。そのアクチンケーブルに沿って分泌小胞が輸送され、芽が成長して娘細胞となる。娘細胞が成熟すると、今度はアクチンパッチは隔壁に移行して、そこからアクチンケーブルが形成され、最終的には細胞質分裂が引き起こされる。このような dynamic なアクチン細胞骨格による制御機構では、アクチン結合蛋白質が重要な役割を果たしている。現在までに、多くのアクチン結合蛋白質が見い出されているが、これらの蛋白質のみではアクチン依存性の細胞機能のすべてを理解することはできず、なお未確認のアクチン結合蛋白質が存在していると考えられる。

そこで、今回私は、出芽酵母において新規のアクチンフィラメント (F-アクチン) 結合蛋白質の同定と単離を目的として本研究をおこなった。

【方法ならびに成績】

1) 新規F-アクチン結合蛋白質 (ABP140) の同定と精製

F-アクチン結合蛋白質の同定は¹²⁵I 標識F-アクチンの blot overlay 法を用いておこなった。プロテアーゼ欠損株 (BJ5457) の酵母細胞から調製した細胞質分画に、SDS-PAGE で分子量が140kDa のバンドが認められ、この蛋白質を ABP140 と命名した。そして、酵母細胞の細胞質分画から、MonoS, hydroxyapatite, および TSKgel phenyl-5 PW カラムを用いた一連のカラムクロマトグラフィーの操作によって、ABP140 を高度に精製した。

2) ABP140の一次構造の決定

同定した140kDa の蛋白質の部分アミノ酸配列の解析をおこない、5つのペプチドのアミノ酸配列とN末端とアミノ酸配列を決定した。出芽酵母のゲノムデータベースを検索したところ、N末端と2つのペプチドは第15染色体に存在する ORF である YOR239w に、2つのペプチドは YOR240w に含まれていた。1つのペプチドは YOR239w の C 末端部と YOR240w の N 末端部とから構成されており、Leu⁷⁷に相当するコドン CTTA の部分で翻訳時に +1 frame shift が起きていると考えられた。以上の結果から、ABP140は628個のアミノ酸から構成される新規の蛋白質で、分

子量は71,484と計算された。また、既知のアクチン結合蛋白質とはホモロジーは認められなかった。

3) HA-ABP140融合蛋白質の作製

出芽酵母のゲノムからPCR法を用いてABP140をコードするDNAを単離し、酵母細胞(BJ5457)にHA-ABP140融合蛋白質を発現させた。この細胞の細胞質分画から、MonoS, hydroxyapatite, および Superdex200カラムを用いた一連のカラムクロマトグラフィーの操作によって、HA-ABP140融合蛋白質を精製した。

4) ABP140の性状解析

HA-ABP140融合蛋白質の精製標品を用いて、まず、¹²⁵I標識F-アクチンの blot overlay 法をおこなったところ、SDS-PAGEで140kDaに結合活性を示した。また、ABP140のF-アクチンへの結合はmyosin subfragment-1を過剰量加えると阻害されたことから、ABP140はF-アクチンの端ではなく側面に結合することが示された。つぎに、HA-ABP140とF-アクチンとの結合について、超遠心法(130,000xg, 20分間)にて検討した。HA-ABPはF-アクチンと共に沈降し、そのモル比は1:30であった。さらに、G-アクチンにHA-ABP140を付加して重合させ、falling ball法でアクチンの粘度に及ぼす影響を検討したところ、HA-ABP140はアクチンの粘度を時間依存的、濃度依存的に上昇させた。この際、透過電顕像では、F-アクチンの束形成が確認された。

5) ABP140の酵母細胞内での局在

ABP140の機能を遺伝学的に解析する目的で、ABP140遺伝子破壊株を作製した。この破壊株では、細胞の生育、温度感受性、細胞形態、およびF-アクチンの構造には異常は認められなかった。また、ABP140を強発現しても、同様に異常は認められなかった。つぎに、ABP140の酵母細胞内での局在を検討する目的で、ABP140遺伝子破壊株にHA融合ABP140遺伝子を導入して強発現させた株を作製した。この酵母細胞を、HAモノクローナル抗体およびrhodamine-phalloidinで2重染色をおこなった後、蛍光顕微鏡で観察すると、ABP140はアクチンパッチとケーブルに沿って局在することが明らかになった。

6) ABP140遺伝子とRho関連遺伝子との検討

私共は、出芽酵母の出芽過程が低分子量G蛋白質Rho1pによって制御されていることを明らかにしている。さらに、Rho1pの標的蛋白質の1つとしてBni1pを同定しており、このBni1pはprofilinに結合してアクチン細胞骨格を制御していることを明らかにしている。そこで、Two-hybrid systemを用いてABP140がRho1p, Bni1p, およびprofilinと直接結合するか否かを検討したが、ABP140はいずれの蛋白質とも結合しなかった。

【総括】

本研究では、出芽酵母の新規アクチン結合蛋白質ABP140を単離し、その一次構造を明らかにした。酵母のアクチン結合蛋白質の多くは哺乳細胞にそのホモログが認められるが、ABP140は他のアクチン結合蛋白質とは類似性がみられない全く新しい蛋白質であった。ABP140はin vitroでF-アクチンと直接結合し、弱い架橋作用を有しており、アクチン束形成に関与していることを明らかにした。さらに、蛍光免疫染色の結果から、in vivoでもアクチンに直接結合することが確認された。ABP140遺伝子破壊株での遺伝的な検討では、細胞形態やアクチンの構造には変化はみられなかった。しかしながら、アクチン結合蛋白質の中にはABP1の様に、単独の遺伝子破壊では変化はみられないが、他のアクチン結合蛋白質の遺伝子の2重破壊によって致死性を示すものもあるため、今後の検討を要する。

論文審査の結果の要旨

本申請者は、本研究により、¹²⁵I標識F-アクチン blot overlay 法を用いて、出芽酵母からF-アクチン結合蛋白質ABP140を精製し、その遺伝子を単離して一次構造を明らかにするとともに、性状についても解析した。その結果、ABP140は他のアクチン結合蛋白質と類似性を認めない全く新しい蛋白質であること、および、F-アクチンと直接結合してF-アクチンの束形成に作用していることを明らかにした。さらに、実際、酵母細胞において、ABP140はF-アクチンと共にアクチンパッチとケーブルに局在することも明らかにした。

本研究は、実験結果自体の意義もさることながら、今後の発展性も期待できるものがあり、生命科学への貢献度が極めて高い研究であると言える。したがって、学位授与に値するものとする。