

3Fa12 相互作用ドメイン過剰発現による出芽酵母オートファジー関連蛋白質間相互作用阻害の生化学的解析

○神谷 拓摩¹, 池内 暁紀², 山根 恒夫³, 中野 秀雄², 河原崎 泰昌¹
(¹静岡県大院生活健康・食品栄養, ²名大院・生命農, ³中部大院・応生)

【目的】ポストインタラクトームの課題の一つに、個々の相互作用が担う生物学的機能を解析する手法の開発がある。我々は相互作用ドメイン過剰発現に基づく相互作用の選択的破壊により、標的相互作用の機能解析が実行可能であることを示すため、出芽酵母オートファジー関連蛋白質群 (Atg12 系) の相互作用ネットワークを対象として研究を行ってきた。これまでの検討により、Atg12 系を標的とした相互作用ドメインの過剰発現は生育に影響を与えず、オートファジックボディ形成のみが特異的に阻害されることが示された。今回、過剰発現したドメインによる阻害機構を明らかにするため、生化学的手法を用いた解析を行った。

【結果】Atg12系蛋白質群の相互作用ドメインと標的の相互作用パートナーを共発現したところ、どのドメインもパートナーと共精製された。また、例えばAtg16の多量体化ドメインはAtg5と共精製されないなど、標的の相互作用能のみを保持していた。Atg12系蛋白質複合体を菌体より精製し、複合体中のサブユニット構成を調べたところ過剰発現したドメインが含まれていた。これらの結果から、相互作用ドメイン過剰発現によるオートファジーの阻害機構は、サブユニット間相互作用に対する物理的な干渉を介したドミナントネガティブなものであることを明らかにした。

Episomal expression of interaction domain from yeast autophagy-related(ATG) protein antagonize the intracellular interaction between the native proteins.

○Takuma KAMIYA¹, Akinori IKEUCHI², Tsuneo YAMANE³, Hideo NAKANO², Yasuaki KAWARASAKI¹
(¹Dept. FNS, GNES, US, ²Grad. Sch. Biol. Agr. Sci., Nagoya Univ., ³Grad. Sch. Appl. Biol., Chubu Univ.)

Key words interaction targeting, protein-protein interaction, autophagy, dominant negative inhibition

3Fa14 半定量的酵母2ハイブリッド系を用いた相互作用蛋白質の高速スクリーニング

神谷 拓摩¹, 小島 晃代², 杉本 佳乃子³, 池内 暁紀², 岩崎 雄吾², 中野 秀雄², 河原崎 泰昌^{1,3}
(¹静岡県大院・生活健康, ²名大院・生命農, ³静岡県大・食農)

【背景と目的】酵母2ハイブリッド系(Y2H)は強力な相互作用蛋白質のスクリーニングツールであるが、定量的なスクリーニングには手間がかかることが技術的課題であった。我々は、酵母選択培地上で安価・簡便に半定量的なスクリーニングを行える Y2H 系を開発することを目的として相互作用レポーターの改良を行った。

【方法と結果】糸状菌 *Aspergillus oryzae* より分泌性 β -ガラクトシダーゼ遺伝子 (lacA) を単離し、シグナル配列の最適化を行うことで、組換え酵母での分泌発現特性に優れた LacA3 変異体を取得した。この変異体酵素遺伝子を Y2H 系のプロモーター (GALI1UAS) の下流に連結し、種々の検討を行った。この組換え酵素は Gal4 の活性化に依存して酵母菌体外に分泌され、その分泌は増殖連動的であり、定量的であった。分泌された酵素は広い pH 域で安定であり、酵母培地とほぼ同じ pH5 付近に至適 pH を持つなど、Y2H のレポーターとして優れた性質を持っていた。この変異体酵素をレポーターとする Y2H 系を構築したところ、酵母選択培地上で得られる相互作用シグナル強度と実際の蛋白質間相互作用は良く相関した。既知蛋白質をベイトとして cDNA ライブラリの半定量的なスクリーニングを行ったところ、既知相互作用蛋白質を効率よく選択できた。

Semi-quantitative Y2H screening system based on fungal secretory galactosidase

Takuma Kamiya¹, Teruyo Ojima², Kanoko Sugimoto³, Akinori Ikeuchi², Yugo Iwasaki², Hideo Nakano², Yasuaki Kawarasaki^{1,3}
(¹Grad.Sch. Nutr. Environ. Sci., University of Shizuoka, ²Grad.Sch. Bio. Agr. Sci., Nagoya University, ³Dept. Food. Nutr. Sci., University of Shizuoka)

Key words fungal beta-galactosidase, protein-protein interaction, yeast two-hybrid screening, antagonist screening

3Fa13 鉄と硫黄で増殖した *Acidithiobacillus ferrooxidans* のペリプラズムタンパク質の解析

○上村 一雄, 野口 真一, 金尾 忠芳
(岡大院・自然・バイオ)

鉄酸化細菌 *Acidithiobacillus ferrooxidans* は、二価鉄および還元型硫黄化合物を唯一のエネルギー源とする好酸性の化学合成独立栄養細菌である。本菌の鉄代謝経路はこれまでの研究でほぼ解明されているが、硫黄代謝経路についてはまだ未解明の部分が多く残されている。鉄や硫黄化合物の酸化には、外膜やペリプラズムに存在する酵素やタンパク質が重要な役割を演じていることが明らかにされつつある。そこで、鉄あるいは硫黄化合物で培養した鉄酸化細菌のペリプラズム画分および外膜画分のプロテオーム解析を行い、硫黄代謝に関与する新たなタンパク質の同定を試みた。硫黄およびテトラチオン酸で発現が増加したタンパク質として、ABC トランスポーターのペリプラズム因子、チオ硫酸の代謝に関与するロダネース様タンパク質などが検出された。外膜タンパク質の解析では、元素硫黄およびテトラチオン酸で発現が増加する 43 kDa のタンパク質が、FadL ファミリータンパク質と同定された。大腸菌ではこのタンパク質は長鎖脂肪酸の取り込みに関与するとされているが、本菌は化学合成独立栄養細菌であるため、このタンパク質は硫黄化合物の取り込みに関与していることが示唆された。また、機能未知のタンパク質については当該遺伝子の前後の ORF を解析することによって、その機能の推定を行った。その結果、1 つは物質輸送に関連したタンパク質をコードする遺伝子を近傍に持っていた。もう 1 つは、酸化還元に関与するタンパク質がその近傍にコードされており、硫黄化合物の酸化への関与が示唆された。

Proteomic analysis of periplasmic proteins in *Acidithiobacillus ferrooxidans* grown on iron or sulfur

○Kazuo Kamimura, Sinichi Noguchi, Tadayoshi Kanao
(Dept. BioSci. Grad. Sch. Nat. Sci. Tech., Okayama Univ)

Key words *Acidithiobacillus ferrooxidans*, sulfur oxidation, proteomics