

【序論】

センサータンパク質は、細胞が環境変化等のストレスに曝された場合にそれを検知し、適切な応答を開始させるという重要な役割を担っている。出芽酵母の Msb2p と Hkr1p は生存に必須な高浸透圧に対する応答経路、High osmolarity glycerol (HOG) 経路のセンサータンパク質候補である。Msb2p と Hkr1p は遺伝学的な研究により、センサータンパク質として考えられている。しかしながら、*in vivo* でのセンサータンパク質の性質を調べる系が存在しなかったため、そのセンシング機構は不明であった。そこで近年、一分子の機械的性質を調べることのできる原子間力顕微鏡を用いた、センサータンパク質の *in vivo* での機械的性質測定系が確立された (Dupres *et al.*, 2009)。この研究では、測定用に修飾した、低浸透圧等の細胞壁ストレスを感知するセンサータンパク質 Wsc1p がフックの法則に従うばね状の性質を持ち、そのばね定数は細胞壁ストレス下において低下することが示された。またそのばねの性質にはセリン-スレオニンリッチドメイン (STR) への糖鎖付加が重要であることも明らかとなった。さらなる研究において、Wsc1p はその N 末端で細胞壁のグルカン鎖と結合し、ストレスにより細胞壁の受ける張力を感知し、構造変化を引き起こし、下流因子へとシグナルを伝える、というモデルが考えられた。ここで、Msb2p や Hkr1p は膜一回貫通タンパク質であるという点、Wsc1p のばねの性質に必須な STR を持つという点において、Wsc1p と構造的に類似する。そのため私はこれらのタンパク質も Wsc1p と同様に特徴的な機械的性質を有すると考えた。一方で Wsc1p と Msb2p・Hkr1p はそれぞれ全く逆の低浸透圧と高浸透圧ストレスを感知するセンサータンパク質である。そのためこれら三つのセンサータンパク質の性質を比較することで、これらに共通する必須な機能と、それぞれの特異的な機能を明らかにすることができるかと考えた。そのため本研究では Msb2p と Hkr1p のセンシングメカニズムを明らかにすることを目的として、原子間力顕微鏡を用いた機械的な性質測定のための発現プラスミドを作成し、融合タンパク質の機能と局在を確認した。

【結果と考察】

1. MSB2 と HKR1 融合タンパク質を発現するプラスミドの作成

原子間力顕微鏡による測定のためには、細胞壁外部にセンサータンパク質が露出し、原子間力顕微鏡のカンチレバーで感知できることが必要である。そのため、センサータンパク質の伸長と、ニッケル-ニトリロ三酢酸 (NTA-Ni) 処理したカンチレバーと結合するヒスチジンタグの付加が必要となる(図 1)。

そこでまず MSB2 と HKR1 を pRS415 ベクターに導入した。次に図 1 の Dupres *et al* (2009)における

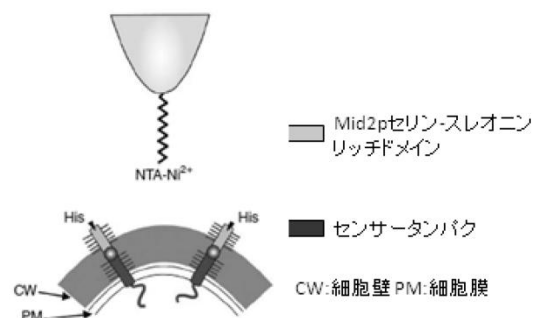


図 1 原子間力顕微鏡による機械的性質の測定モデル (Dupres *et al.*, 2009)

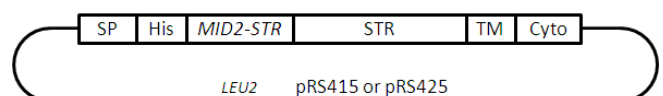


図 2 発現プラスミドの模式図 MSB2 と HKR1 のそれぞれについて作成した。また MSB2 については、pRS425 にも導入した。SP: シグナルペプチド His: 8×His-Tag MID2-STR: MID2 セリン-スレオニンリッチドメイン STR: MSB2 または HKR1 のセリン-スレオニンリッチドメイン TM: 膜貫通ドメイン Cyto: 細胞質ドメイン

Wsc1pと同様に、ベクターに導入した *MSB2* と *HKR1* のシグナルペプチド配列と STR 配列の間に、ヒスチジンタグと棒状構造の Mid2p の STR を酵母内相同組み替えによって導入し、発現プラスミド (pRS415MSB2-S/T-His, pRS415HKR1-S/T-His) を作成した (図 2)。また、原子間力顕微鏡による効率的な測定には、酵母母細胞に多数のセンサータンパクが存在する必要があるが、Msb2p は主に芽とその周囲に存在することが知られている。そのため、母細胞で多く合成させるため、pRS415MSB2-S/T-His から *MSB2* 融合遺伝子を制限酵素で切り出し、過剰発現用ベクターである pRS425 に導入したプラスミド (pRS425MSB2-S/T-His) を作成した (図 2)。また pRS415MSB2-S/T-His、pRS415HKR1-S/T-His と pRS425MSB2-S/T-His の配列をサイクルシーケンス法によって確認した。

2. Msb2p の機能の確認

作成した融合遺伝子は修飾を施されていることから、合成されるセンサータンパクの機能の確認をする必要がある。*MSB2* は、グアニン・ヌクレオチド交換因子である *CDC24* の変異による温度感受性のマルチコピーサプレッサーとして同定された遺伝子である (Bender *et al.*, 1989)。そこで pRS425MSB2-S/T-His で温度感受性株 *cdc24-4* を形質転換し、融合遺伝子とその温度感受性を相補するかどうかを試験した (図 3)。*cdc24-4* は 32°C では生育できるが、制限温度である 34°C では生育できない。一方で *MSB2* の融合遺伝子を持つ株は 34°C でも生育できた。このことから、修飾した Msb2p は機能を有していることが示された。

3. Msb2p の局在

Msb2p が母細胞に存在するか、また細胞壁の外部に出ているか確かめるために、*MSB2* 欠損株を pRS425MSB2-S/T-His で形質転換し、細胞壁のある状態で間接免疫染色を行った (図 4)。そのために、一次抗体として His.Tag monoclonal 抗体を、二次抗体として Alexa fluor 488 anti-mouse IgG を使用した。pRS425MSB2-S/T-His を導入した株では母細胞表面に蛍光が観察され、即ち融合タンパク質が母細胞に存在し細胞壁外部に露出していることを確認できた。

【まとめと今後の展望】

MSB2 と *HKR1* について、原子間力顕微鏡による測定用融合タンパク質発現用プラスミドの作成をした。また *MSB2* についてはその機能と局在、細胞壁外部への露出を確認した。また *HKR1* についても機能と局在を確認する予定である。

今後、実際の測定により、センサータンパク質の機能やセンシング機構の解明に繋がることが期待される。

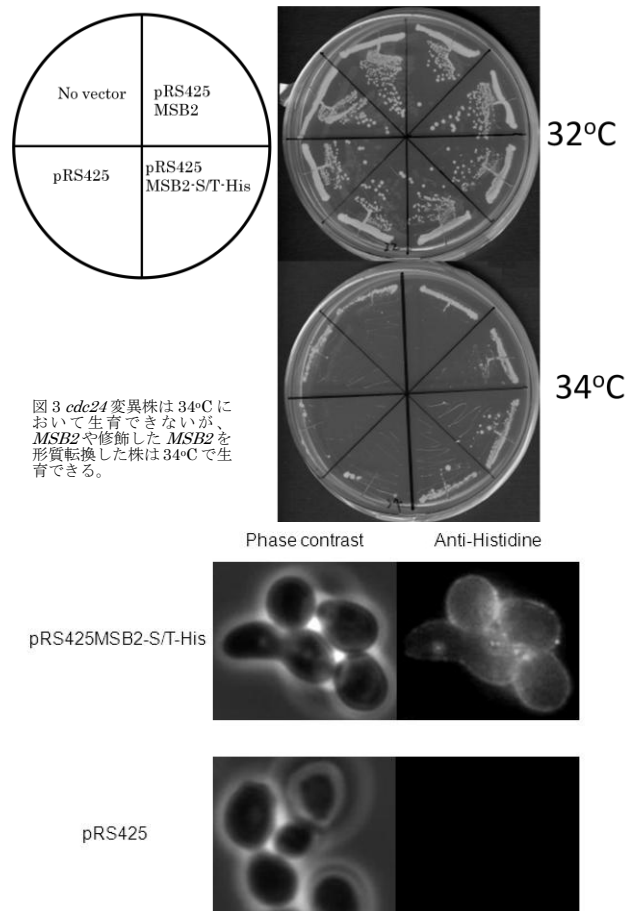


図3 *cdc24* 変異株は 34°C において生育できないが、*MSB2* や修飾した *MSB2* を形質転換した株は 34°C で生育できる。

図4 His.Tag抗体を使用した免疫染色