

## フォークヘッド型転写因子 FKHR と相互作用するタンパク質の探索

宮口 靖雄 (筑波大学 生物学類 4年) 指導教官: 坂本 和一 (筑波大学 生物科学系)

## 導入・目的:

FKHR はヒトの横紋筋肉種 (Rabdomyosarcoma) において多く変異が認められる癌抑制遺伝子の一つとして知られている。この FKHR は、フォークヘッドドメインと呼ばれる共通の DNA 結合ドメインを持つ転写因子で、主に動物細胞のアポトーシスや細胞周期停止または DNA 修復などに関わる遺伝子群の転写調節に機能している。

これまでの報告により、FKHR は、エストロゲンレセプター (ER) を始めとする様々な転写共役因子と結合することにより、タンパク質の修飾、核内への移行、転写活性の制御などが行なわれることが知られている。また FKHR 自身が co-activator や co-repressor となって他の転写因子の活性を制御しているという報告もある。このように FKHR と相互作用するタンパク質は数多く存在し、未だ同定されていない作用タンパクも多く存在して FKHR の機能発現に重要な働きをしているものと考えられる。従って、癌抑制を始めとする FKHR の機能メカニズムを知るためには、FKHR に結合する新たな相互作用タンパク質を網羅的に探索することが必要不可欠である。

そこで本研究では、yeast の two-hybrid 法を用い、FKHR のサブファミリーである FKHRL1 と相互作用する新規タンパク質因子の単離と同定を試みた。

## 実験:

FKHRL1 の DNA 結合領域を組み込んだ bait plasmid とマウスの肝臓 cDNA library (prey plasmid) とを Yeast 株 Y190 に transfection した。この Yeast を -H-L-W 培地により選択し、生えてきたコロニーを  $\beta$ -galactosidase 活性を指標に解析した。さらに、青色に呈色したコロニーから plasmid を回収して大腸菌株 HB101 に transfection し、-L 培地で選択を行なった。生えてきたコロニーから prey plasmid を回収し、塩基配列を決定した後に Blast で検索した。

## 結果・考察:

これまでの実験では、マウスの肝臓 cDNA library から約 15 ~ 20 個の遺伝子が単離できた。しかし予想に反して転写因子や転写共役因子などをコードする遺伝子は一つも含まれなかった。これは、FKHRL1 と作用タンパク質との間の結合性に原因するのかもしれない実験系自身の問題であるのか、現在のところ不明である。現在、回収した prey plasmid をもう一度 Yeast に入れ直し、 $\beta$ -gal assay の再現性を確認中である。今後これらのタンパク質が FKHRL1 と本当に相互作用することが確認され次第、FKHRL1 による機能発現にどのような影響を与えるか明らかにしていきたいと思う。