

論文の内容の要旨

論文題目 分裂酵母の接合因子受容体 Map3pの C 末端細胞質領域の機能解析

氏名 廣田 耕志

指導教官 山本 正幸

G タンパク質と共役した 7 回膜貫通型受容体の分子生物学的解析は出芽酵母において広範な知見の集積があるが、なお未解明の部分は多く、高等真核生物での解析からの結果と符合しない点も多い。本研究では、出芽酵母とともに優れたモデル生物として知られる分裂酵母において、接合過程において機能するフェロモン受容体の詳細な解析を試みた。分裂酵母は栄養源枯渇条件において接合および減数分裂を行う。接合因子シグナルの伝達は、接合型の異なる細胞の存在の認識に関わるとともに、接合体における減数分裂の開始にも必須である。接合に際して、 h^+ 型細胞は P 因子を放出し、それは h 型細胞の細胞表面に発現している受容体 Mam2 により受容される。同様に h 型細胞の放出する M 因子は h^+ 型細胞の Map3 により受容される。接合因子のシグナルは、受容体に共役している 3 量体 G タンパク質を介して MAPK 経路に伝達され、下流の遺伝子の転写を誘導する。

接合因子 M-factor の受容体 Map3 の C 末端欠損変異受容体 Map3-dn9 は、優性に接合を阻害するが減数分裂の開始には影響しない。Map3-dn9 変異細胞では、接合および減数分裂に関わる遺伝子の転写誘導は起こるが、接合因子に応答した接合管伸長を行えない。このことから、Map3 の C 末端部位は MAPK 経路へのシグナルの伝達には不必要であるが、接合管形成に必要であると示される。Map3-dn9 変異細胞では、細胞の一部分からの接合管の形成は出来ないが、細胞体積を全体的に大きくさせることは可能であった。このことから、細胞の伸長を誘導するシグナル経路そのものを Map3-dn9 が阻害しているのではなく、接合管形成部位を一部位に決定し、その部位からの伸長の開始を始めることが出

来なくなっていると推測される。*h*型細胞に *map3* を異所発現させると、細胞が多方向に伸長するオートクリン反応を示すが、*map3-dn9* を異所発現させた場合には、細胞が大きく膨れ上がった。オートクリン反応の生理的意味合いについては不明であるが、*h*型細胞内で作り出された M 因子の濃度が微妙に濃い部位から Map3 分子は伸長を誘導するが、Map3-dn9 分子は M 因子の濃度勾配を感知できず、細胞全体が大きくなっていると解釈できる。Map3-dn9 変異細胞は接合管伸長不能であるが、*gap1Δ*変異によりこの形質は抑圧されることがわかり、*gap1Δ*変異を持つ Map3-dn9 変異細胞における接合管の伸長方向が、M 因子の濃度の濃い方向になるのか調べたところ、Map3-dn9 変異細胞はランダム方向に接合管を伸長した。以上の観察より、Map3-dn9 変異細胞は接合管形成不能であるが、細胞の伸長そのものが阻害されているのではなく、接合因子の濃度勾配に応じて接合管形成部位を決定する過程が阻害されていることが示唆される。

接合条件下での Map3 および Map3-dn9 の局在を調べたところ、Map3 は接合管を形成する部位に局在し、接合の進行とともに内在化した。一方、Map3-dn9 は、細胞膜上全域に存在し、内在化は見られなかった。さまざまな Map3 の C 末端欠損変異株を解析した結果、内在化、および接合管伸長に必須なモチーフは特定できず、C 末端部分全体の構造的保持がこれらの機能に必須であることが示唆された。また、Map3-dn9 の欠失部分に P-factor 受容体 Mam2 の C 末端をはめ込んだキメラタンパク質 Map3-mam は正常に機能し、内在化されたことから、Mam2 の C 末端も同様の機能を果たしていることが示唆された。このようなアミノ酸配列上の類似性が見られない Mam2 の C 末端による機能の代替は、受容体 C 末端領域の機能には特定のアミノ酸ドメインではなく、C 末端領域全体の構造の保持が重要であることを強く支持する。出芽酵母の α 因子受容体 Ste2 では、C 末端領域の K 残基のユビキチン化が受容体の内在化に必須であることが知られるが、Map3 の C 末端領域にある K 残基をすべて R 残基に置換しても、内在化にほとんど影響しなかった。このことから、Map3 の C 末端を介する内在化の制御機構には K 残基のユビキチン化は重要でないことが示唆される。

近年、出芽酵母の α 因子受容体 Ste2 の解析から、この受容体は 2 量体化して

機能していることが示された。Map3-dn9 に相当すると考えられる Ste2 の C 末端欠損変異体である Ste2-T326 は膜上に強く局在し、内在化不能である。しかし野生型の Ste2 が発現している細胞内では、Ste2-T326 は内在化される。これは Ste2 と Ste2-T326 が複合体を形成し、Ste2 によって細胞内に取り込まれるためであることが示されている。そこで Map3-dn9 の膜局在が、Map3 の高発現により変化するのか調べた。*map3-dn9-GFP* 株(JW288)を、強力な *nmt1* プロモーター下で *map3* を発現するプラスミド rep1-w で形質転換したところ、*map3* の発現は Map3-dn9 の膜局在に影響しなかった。同様に、*map3-GFP* 株(JW287)を、強力な *nmt1* プロモーター下で *map3-dn9* を発現するプラスミド rep1-9 で形質転換したが、Map3 の内在化を阻害することはなかった。このような観察から、Map3 と Map3-dn9 は出芽酵母 Ste2 のような 2 量体形成を行わないことが示唆される。Ste2-T326 の効果は劣性であったが、Map3-dn9 の効果は優性であった。これは、以上のような両受容体の性質の違いによるものと考えられる。

map3-dn9 高発現株は接合不能であるが、これを多コピーで抑圧する遺伝子を見つけてスクリーニングしたところ、*ras1*、*byr1*、*scd1/rall* が得られた。これらの因子は Ras1 の関わるシグナル伝達系路上で働くもので、それらと受容体の関わりは興味深く、詳細な解析を行った。Byr1、Byr2 はそれぞれ MAPKK および MAPKKK であり、Ras1 は MAPK 経路へのシグナルを調節していることが知られている。MAPK 経路に関わる因子が得られたことは、Map3-dn9 は MAPK 経路へのシグナルを正常に伝達できることといった解析結果に矛盾するよう感じられる。接合時の Byr1、Byr2、Scd1 の局在を調べたところ、それぞれ接合部位に局在し、それらの接合部位への局在は、Map3 に依存し、Map3-dn9 により阻害された。以上の観察結果から、Byr1 や Byr2 は単に MAPK 経路上の因子としての働きだけでなく、接合部位で何らかの機能を果たしていることが示唆される。また、これらの因子の接合部位への局在が *map3-dn9* の高発現により乱され、その結果接合不能となっていると考えられる。Ras1 の局在は常に細胞膜全体に見られ、Map3 や Map3-dn9 により影響されなかった。Ras1 は得られた *map3-dn9* 多コピー抑圧遺伝子の内で最も強い抑圧能を示したが、Ras1 自体の

局在は Map3 や Map3-dn9 の影響を受けないことから、Ras1 は少なくとも、Map3 による局在レベルの制御は受けておらず、活性レベルでの制御が Map3 によりなされていると考えられる。そこで、*ras1* を高発現させ、Ras1 のシグナルが亢進した細胞条件における Byr1、Byr2、および Scd1 の局在を調べた。*ras1* を高発現させると、Scd1 および Byr2 は、増殖条件でさえ細胞膜上に局在するようになった。*map3-dn9* を高発現する細胞でも、Ras1 の高発現で Scd1、および Byr2 は膜に移行した。

前述のように、Map3-dn9 は接合管を形成することは出来ないが、細胞全体の膨張を誘導することから、顕微鏡下で検出できない微小レベルの Scd1 などの下流因子を、細胞膜上全体に引き寄せていることが推測される。これは細胞膜全域にひろがる Map3-dn9 も、Map3 同様に下流因子を細胞膜上に引き寄せ、下流因子も細胞膜全体に拡散したためであると解釈される。しかし、Ras1 シグナルの亢進によりこれらの下流因子は、強力に細胞膜上へ移行する。その結果、Scd1 などの下流因子の細胞膜上での活性が、接合を行うのに十分なレベルに達したために、Ras1 の高発現により Map3-dn9 変異細胞の接合不能は抑圧されたと考えられる。しかし、Ras1 により細胞膜上に局在した Scd1 や Byr2 は、接合部位のみでなく細胞膜上全域にみられたことや、Ras1 により *map3Δ* 変異を持つ Map3-dn9 変異細胞の接合不能も同様に抑圧されたことから、Ras1 により細胞の一部からの接合管伸長が回復する理由は不明であった。

以上の結果から以下のようなモデルが立てられる。Map3 は接合部位に一過的に局在し、膜上すべてに存在する Ras1 の内、接合部位にある分子を活性化し、接合部位で活性化を受けた Ras1 は下流の因子 (Scd1 や Byr2 など) を、この部位に引き寄せ、これらの因子はこの部位で接合管形成に関わる機能を果たす。このような機構により、接合因子の濃度の高い部位に下流因子を集中させ、この部位から接合管を形成させていると考えられる。接合因子の濃度が高い方向に接合相手が存在する確率は高く、その方向に接合管を伸長させることは合理的な機構であると考えられる。