

## 論文の内容の要旨

論文題目 分裂酵母の接合過程における細胞融合に関わる遺伝子の解析

氏名 倉橋洋史

膜融合は様々な生命活動にみられる重要な現象である。膜融合は、高等生物においては受精や骨格筋細胞を形成するための筋芽細胞の融合に重要な役割を果たす。一方、細胞極性の確立は、細胞の形態の維持や成長方向の決定、さらにタンパク質の局所的な輸送などに関わっており、生物体において重要な現象である。細胞極性の形成には細胞骨格が非常に重要な役割を持つことが知られている。本研究では、酵母の接合過程における細胞融合という現象を用いて、細胞極性と細胞膜の融合という二つの問題を扱った。

本研究の研究対象とした分裂酵母は、栄養源が豊富な条件下では、通常一倍体で生育し、均等な細胞分裂によって増殖する。しかし、栄養源飢餓条件下では、その環境に耐えるために胞子を形成する。胞子形成のためには、まず二つの細胞が接合し、細胞融合、核融合を行って二倍体の細胞になり、その後に減数分裂を行う。細胞融合には、細胞壁の分解と細胞膜の融合の2段階が必要とされる。細胞壁の分解は、外界の浸透圧によって傷つけられやすい過程であるため、高度に制御されていなければならない。つまり接合部位においてのみ局所的に細胞壁の分解が行われ、且つ、時間的にも短時間に限られると思われる。

分裂酵母においてこれまでに、細胞融合不能の遺伝子として報告されているのは *fus1* のみである。*Fus1p* は、出芽酵母で細胞融合に関わっている *Bni1p* と同様に、FH ドメインを持つ *formin family* に属している。また分裂酵母では、FH ドメインと相互作用すると考えられているアクチン結合タンパク質のプロフィリン(*Cdc3p*)が、細胞融合に関わることも示

されている。アクチン脱重合剤を加えることによっても分裂酵母は細胞融合不能になることから、アクチンフィラメント（F-アクチン）が細胞融合に重要な役割を持つことが示唆されている。本研究では、分裂酵母の接合過程における細胞融合の分子的な機構を明らかにするため、新たな細胞融合不能（*fus*）遺伝子3種をクローニングし、その解析を行った。

当研究室では今井により、細胞融合に欠損を持つ新規の変異体株6種(*fus2-fus7*)が分離されていた。第2章において *fus4-1* 変異体に分裂酵母ライブラリーを導入し、相補するプラスミドを得たところ、それらにはトロポミオシンをコードする *cdc8* が挿入されていた。そこで温度感受性変異株の *cdc8-27* と *fus4-1* の遺伝的距離を調べたところ、すべての四分子で、細胞融合不能と生育の温度感受性が2対2に分かれる両親型を示した。すなわち、*fus4* 遺伝子はトロポミオシンをコードする *cdc8* 遺伝子であると考えられた。以後、*fus4-1* 変異を *cdc8-F41* と呼ぶことにする。

*cdc8-F41* 変異体は接合に際して前接合子の状態で停止する。この時に細胞質が混合しているかいないかをマーカータンパク質を用いて確認したが、細胞質は混合せずに止まっていることが判明した。Calcofluor White で細胞壁を染色すると、*cdc8-F41* では細胞壁が十分に分解せずに残っていた。*cdc8-F41* は温度感受性の *cdc8-27* とは異なり、どの生理的な温度でも生育することができたが、野生型よりは生育速度が遅かった。さらに *cdc8-F41* は細胞分離せず枝分かれした異常な形態を示した。*cdc8-27* では制限温度の 35℃で細胞質分裂ができずにダンベル型の形態を示すことが知られている。*cdc8-27* を半制限温度で培養すると、*cdc8-F41* で観察された異常な形態の細胞が出現した。また半制限温度で接合させると、細胞融合に欠損の見られることが判明した。このことから、細胞融合における Cdc8p の機能と、生育における機能とは分離できないもので、*cdc8-F41* はいかなる生理的温度においてもその機能に部分的に欠損がある特異なアリルであると思われた。

*cdc8-F41* 変異アリルの変異位置を同定したところ、134番目のアミノ酸のミスセンス変異であった。変化したアミノ酸残基は、出芽酵母の二つのトロポミオシン Tpm1p と Tpm2p にも保存されていて、機能的に重要な部位と思われる。さらに温度感受性株の *cdc8-27* の突然変異位置を決定したところ、129番目のアミノ酸のミスセンス変異であった。

Cdc8p の特異的なドメインが、細胞融合不能の原因になっている可能性を調べるため、*cdc8<sup>+</sup>* に対して PCR によりランダムに突然変異を入れ、それを染色体に組み込むことにより新しい *fus* 変異体をスクリーニングした。その結果、新しい3種類のアリルが得られた。いずれもミスセンス変異で、全長にわたって散らばっていた。さらに、これら全ての変異体は生育にも影響を与えた。このことから、細胞融合に必要な Cdc8p の領域と生育に必要な領域は分離できないことが示唆された。

野生型の Cdc8p の量が減少したときに生じる影響を見るため、*cdc8* のプロモーターを、チアミンで制御できるプロモーターに置換した株を作製した。Cdc8p の発現を減少させた対数増殖期の細胞では枝分かれ型が増加した。さらに発現を減少させるとダンベル型細胞になった。この現象は半制限温度から制限温度にかけての *cdc8-27* の表現型に類似している。しかし、接合に関しては、*cdc8-27* とは異なり、枝分かれ型になる程度に Cdc8p を減少させても細胞融合不能の細胞は現れず、効率よく接合を完了した。細胞融合不能の表現型が現れるのは、ダンベル型になり始める段階よりもさらに Cdc8p を減少させなければならなかった。

Cdc8p の接合中の局在を観察するため、抗 Cdc8p 抗体を用いて免疫染色を行った。Cdc8p は接合部位に局在しており、さらに細胞質に散らばって見える場合もあった。また BODIPY-FL-phalloidin で F-アクチンを共染色すると、F-アクチンはパッチ状に接合部位付近に局在したが、Cdc8p の強い蛍光とは重ならず、隣接した位置にあった。細胞融合に必要な Fus1p もまた、接合時に接合部位に局在する。接合中の *cdc8-F41* 変異株を観察したところ、Fus1p も F-アクチンパッチも野生株と同様の局在を示し、Cdc8p はこれらの局在には影響を与えないようであった。

以上、*fus4* は *cdc8* と同一遺伝子でトロポミオシンをコードしており、細胞融合に必須なことが示された。また、トロポミオシンは細胞質分裂に必要であることが知られているが、細胞融合はより少ない量で可能であることが示唆された。トロポミオシンはアクチン結合タンパク質であるが、接合管の先端ある Cdc8p は F-アクチンパッチと共局在しなかった。接合管上で細胞融合に働いている F-アクチン構造体は小さなもので、その構築に Cdc8p が関わっているのではないかと現在のところ考えている。

第3章では *fus2* 変異体株に分裂酵母ライブラリーを導入し、細胞融合不能を多コピーで相補する遺伝子をスクリーニングした。得られたプラスミドには SPAP7G5.03 が挿入されていたので、SPAP7G5.03 遺伝子破壊株を作製して表現型を調べたところ、細胞融合不能になった。SPAP7G5.03 と *fus2* の遺伝的距離を調べるためランダムスポア分析を行うと、すべての子孫のコロニーが細胞融合不能の表現型を示したので、SPAP7G5.03 遺伝子は *fus2* 遺伝子そのものであると考えられた。*fus2* 遺伝子の ORF は約 2.1kb であり、703 アミノ酸をコードしていると推測される。その産物は細胞融合に必要なことが知られている出芽酵母の Prm1p と相同性がある。Hydrophobicity 解析によると、Fus2p は7回貫通型膜タンパク質と予想された。*cdc8-F41* と同様に、*fus2* の前接合子において細胞質は混合していなかった。しかし、一方の細胞膜がもう一方へつきだしている様子の細胞が観察された。このような細胞では細胞壁が弱くしか染色されず、分解されているようであった。

*fus2* 遺伝子の発現パターンを調べた。接合・孢子形成を誘導する窒素源飢餓下におくと、2.5kb の mRNA の発現が誘導された。*fus2* 遺伝子の上流には、転写因子 Ste11p の DNA 結合領域の TR ボックスが3つあるため、*stell* 破壊株で *fus2* の発現パターンを調べたところ、2.5kb の mRNA は発現誘導はみられなかった。すなわち、窒素源飢餓条件特異的に発現する *fus2* 遺伝子の発現誘導は Ste11p に依存することが示された。Fus2-GFP の局在を観察したところ、対数増殖期の細胞では蛍光が認められなかったが、接合中の細胞では接合部位に Fus2-GFP の局在が観察された。

以上のことから、膜タンパク質をコードする *fus2* は、窒素源飢餓下で発現され、Fus2p は接合時には接合部位に局在していることが示された。また、細胞壁の分解は *fus2* 変異株でも進行したことから、Fus2p が細胞膜の融合に関わっている可能性が考えられた。

第4章では *fus5* 変異体株に分裂酵母ライブラリーを導入し、相補する遺伝子をスクリーニングした。得られたプラスミドの塩基配列を解析した結果、SPAC4D7.01c が挿入されていた。SPAC4D7.01c 遺伝子破壊株を作製して表現型を調べたところ、細胞融合不能になった。SPAC4D7.01c と *fus5* の遺伝的距離を調べるための四分子分析を行うと、24 個全てが両親型を示したので、SPAC4D7.01c 遺伝子は *fus5* 遺伝子そのものであると考えられた。

*fus5* 遺伝子の ORF は約 5.5kb であり、1811 アミノ酸をコードしていると推測される。産物は出芽酵母の Sec7p と相同性があり、SEC7 ドメインを持つ。SEC7 ドメインを持つタンパク質は、多種の生物に保存されていて、小胞輸送に必要な ARF (small GTPase) の GDP-GTP 交換因子であることが知られている。*fus5* の前接合子で細胞質が混合しているかどうかを調べたが、混合していなかった。しかし、*fus2* と同様に、一方の細胞膜がもう一方へつきだしている様子が観察された。このような細胞ではやはり細胞壁の染色が弱く、分解されているようであった。

これまでにクローニングできている他の *fus* 遺伝子 (*fus1*, *fus2*, *cdc8/fus4*) を *fus5* 変異株に導入し、多コピーで *fus5* を抑圧できるか確認したところ、*fus2* が *fus5* を多コピーで抑圧した。*fus2* と *fus5* の関係をさらに調べるため、変異株の接合実験を行った。*fus2* 変異体および *fus5* 変異体は、接合相手が正常なら、細胞融合が可能であった。*fus2* 変異体の接合相手が *fus5* 変異体である場合は、融合は効率的にいかなかった。*fus2 fus5* 二重変異体は、接合相手が野生型の場合、効率的に融合することができた。すなわち *fus2* と *fus5* は同一の機能発現に関わっている可能性が示唆された。

以上、*fus5* は小胞輸送調節因子として知られている small-GTPase の ARF に対する GDP/GTP 交換因子 (ARF-GEF) をコードすることが示唆され、さらに、Fus5p が Fus2p の輸送に関わっている可能性が考えられた。