

## 論文の内容の要旨

### 論文題目

Identification and characterization of Myo2 pathway on mitochondrial distribution  
in *Saccharomyces cerevisiae*

(出芽酵母ミオシン Myo2 のミトコンドリア分配に関わる機能の同定と  
制御機構の解析)

氏名 伊藤 敬

### 序論

生物界には様々な形の細胞が存在する。細胞はそれぞれの形をつくり出し保つために、必要な物質やオルガネラを輸送し細胞表面を局所的に成長させる機構を持っている。この機構は細胞内極性の確立と、それに従った輸送の二つの機構にわけることができる。出芽酵母は出芽によって娘細胞をつくり出すので、表層成長が芽（娘細胞）に特異的に起こること、オルガネラが母細胞から芽に分配されることが必要である。そのため、母細胞において細胞内極性の確立、極性に従ったアクチン骨格の配向がおこなわれ、アクチン骨格依存的に分泌小胞やオルガネラが芽に運ばれている。この輸送機構について現在までに様々な解析がおこなわれている。分泌小胞や、液胞、late Golgi、ペルオキシソームなどのオルガネラは V 型ミオシンである Myo2 によって運ばれていることが明らかになっている。紡錘体の方向性を決定する細胞質微小管の芽の方向への伸長誘導はアクチン骨格に依存しており、Myo2 が関与している。ミトコンドリアもアクチン骨格依存的に芽に分配されるが、その詳細な機構は明らかでない。

Myo2 は N 末端から、アクチンケーブルおよび ATP と結合しモーター活性を持つモータードメイン、モーター活性を調節する IQ モチーフ、二量体形成に必要なコイルドコイルドメイン、そして C 末端にテイルドメインを持つ。Myo2 はテイルドメインでオルガネラに存在する標的タンパク質に結合し、オルガネラを輸送すると考えられている。しかし、Myo2 の輸送するオルガネラは上記のように複数存在し、それぞれのオルガネラの標的タンパク質も同定されておらず、Myo2 の輸送制御にテイルドメインが重要なはたらきをしていると推定されるもの

の詳細な機構は不明である。

私は修士課程において、Myo2 のテイルドメインと結合し、Myo2 の機能を高進させる因子として Ypt11 を同定した。Ypt11 が Myo2 のテイルドメイン機能の制御をになう因子だと考え、Ypt11 が細胞内のどのような現象に関わるのかということを中心に解析を進めた。

## 結果と考察

1, Ypt11 は Myo2 との結合を介してミトコンドリア分配に関わる。

*ypt11* 破壊株は野生株とくらべて生育に顕著な差が見られないが、*YPT11* の過剰発現は生育を阻害する。この生育阻害は、Myo2 のテイルドメインとの結合が必要であり、Myo2 を介しておこなわれることを明らかにした（修士課程）。したがって、*YPT11* 過剰発現時において、Myo2 機能にかかわりのある核、液胞、アクチン、の観察をおこなったが、野生株とくらべて顕著な差は見られなかった。しかし、ミトコンドリアの分配に関して異常が観察された。野生株のミトコンドリアは母細胞が出芽すると、小さな芽の時期から芽に入り込み、芽の成長とともにほぼその細胞体積に比例した量のミトコンドリアが存在するように分配される。しかし、*YPT11* を過剰発現させた細胞では、娘細胞に過剰にミトコンドリアが存在している像が得られた。さらに、*ypt11* 破壊株を観察すると、小さな芽の時期においてミトコンドリアの芽への分配が行われていない細胞の割合が多くなっていた。また、Myo2 の関わるその他のオルガネラ分配に関しては液胞、核、ゴルジ体に関して異常は観察されず、アクチン骨格にも異常は観察されなかった。これらの結果より、Ypt11 はミトコンドリア分配特異的に、促進的な機能を持つことが明らかになった。

次に、Ypt11 のミトコンドリア分配機構に関して Myo2 との結合が必要であるか調べた。*myo2-338* 変異は *YPT11* の過剰発現による生育阻害を解除する *myo2* 変異株として単離した。テイルドメインに変異を持ち、Ypt11 と Myo2 の two-hybrid 法による結合が見られない。この *myo2-338* 株の中で *YPT11* を過剰発現すると、野生株の場合には観察される、芽に過剰にミトコンドリアが分配されている細胞の比率は極端に減少し、*YPT11* の過剰発現はミトコンドリアの分配に影響をおよぼさなかった。この結果から Ypt11 のミトコンドリア分配機能は Myo2 との結合を介していることが示唆される。

## ミトコンドリア分配に欠損を示す *myo2* 変異株

私は修士課程で *ypt11* 破壊株と合成致死を示す *myo2* 変異として *myo2-573* 変異を単離しており、*myo2-573* 株のミトコンドリア分配について調べてみた。すると、*myo2-573* 細胞が生育できる 25℃においても、ミトコンドリアが芽に分配されず、母細胞の芽から離れた部位に蓄積していた。この時、アクチン骨格は野生株と同様に極性を持っていた。さらに、Myo2 の関わ

るオルガネラ分配のうち、核、液胞、分泌小胞、ゴルジ体について調べてみたが、そのどれにも異常は観察されなかった。これらのことから、*myo2-573* 変異による Myo2 機能の欠損は、ミトコンドリア分配に特異的なものであると考えられる。この *MYO2* の一遺伝子性の変異によってミトコンドリア分配に欠損を生ずるということは、今までに報告されてきた Myo2 の機能とは別に、Myo2 がミトコンドリア分配に機能を持つことを示している。

Mtm1 はミトコンドリア分配に関わる。

Ypt11 と Myo2 によるミトコンドリア分配機構に関わるその他の因子を単離する目的で、ミトコンドリア分配に特異的に欠損を持つ *myo2-573* 変異株の温度感受性を多コピーで抑圧する遺伝子 *MTM1* を単離した。*MTM1* は機能未知遺伝子であった。この遺伝子がミトコンドリア分配に機能を持つかを調べるために遺伝子破壊株を作成し、ミトコンドリア分配を調べた。細胞内のミトコンドリアを染色し観察すると、*mtm1* 破壊株は出芽して間もない小さな芽の細胞においてミトコンドリアの芽への分配に欠損があることが分かった。*MTM1* を過剰発現してみると、ミトコンドリアが芽に過剰に分配される細胞が観察された。これらより、*MTM1* がミトコンドリアの分配に関与していることが示唆された。また、*mtm1* 破壊は *myo2-573* 株の制限温度を下げず、*myo2-573* 細胞のミトコンドリア分配の欠損は *MTM1* の有無によって影響を受けなかった。これらの遺伝学的解析より、*MYO2* と *MTM1* はミトコンドリア分配に関して同一の経路で働いている因子であると考えられる。破壊株および過剰発現の表現型は *YPT11* と *MTM1* で酷似しているため、*YPT11* と *MTM1* の関係を調べるために二重破壊株を作成したところ、致死であった。この二重破壊株の表現型を調べる目的で制御可能なプロモーター下で発現する *MTM1* 遺伝子を、二重破壊株に導入し、*MTM1* 枯渇下で生育をとめる株を作成した。*MTM1* の発現をとめた細胞は 24 時間後に成長を停止し始めるが、それより早い時期 (3 時間後) において、ミトコンドリア分配に欠損が見られた。この時、ミトコンドリアは芽に分配されずに母細胞の芽から離れた部位に蓄積していた。この時点において核移行、液胞、分泌小胞の輸送や、アクチン骨格、Myo2 の局在に関して異常は観察されなかった。これらの結果から、Ypt11 と Mtm1 は共にミトコンドリア分配に機能しているが、その関与の仕方は並列的であり、片方が機能しない時はもう片方の機能によってミトコンドリア分配がおこなわれ、両方が欠損するとミトコンドリア分配がおこなわれなくなり生育をとめてしまうと考えられる。

Ypt11 と Mtm1 の局在。

Ypt11 と Mtm1 の細胞内での局在を間接蛍光抗体染色法により調べた。Ypt11 の N 末に HA タグをつけた HAYpt11 と、Myo2 の C 末に GFP をつけた Myo2GFP を細胞内で同時に発現させ、抗 HA 抗体により検出した。HAYpt11 は Myo2GFP と共局在を示し、芽の成長時には芽の

先端に、細胞質分裂時には芽の頸部に局在していた。また、GFP タグを N 末につけた Ypt11 を *myo2-338* 株の中で発現させると、芽の先端にも蛍光は観察されたが、核の周りや、細胞表面全体にも蛍光が観察された。これらの結果から、Ypt11 の局在には、Myo2 との結合が必要だと考えられた。また、Mtm1 の C 末に HA タグをつけた Mtm1HA を抗 HA 抗体により検出すると、芽の先端にドット状やライン状の蛍光が観察された。そこで、DAPI で DNA を染色してみると Mtm1HA の蛍光とミトコンドリア DNA の蛍光とが重なる、もしくは非常に近くに存在している細胞が観察された。この観察結果は Mtm1 がミトコンドリアに存在することを示唆している。さらに興味深いことに、Mtm1 の局在は芽に存在するミトコンドリアで強く観察された。この極性を持った局在は Mtm1 のミトコンドリア分配における機能を知る上で重要であると考えている。

#### まとめ

- ・ミトコンドリア分配にのみ欠損を示す *myo2* 変異株を単離し、今まで報告されていなかった Myo2 の機能であるミトコンドリア分配に関わる機能を同定した。
- ・Myo2 のミトコンドリア分配機能を特異的に促進する Myo2 テイルドメイン結合因子 Ypt11 を同定した。
- ・Ypt11 と同様な活性を持つと考えられる因子として Ylr190w を同定した。
- ・*YPT11* と *YLR190W* の二重破壊株が致死になったこと、二重破壊株はミトコンドリア分配特異的な欠損を持つことから、ミトコンドリア分配機構の必須な経路を明らかにした。
- ・今後、Myo2, Ypt11, Ylr190w の詳細な局在、ミトコンドリアの時間経過的挙動の解析をすすめることによって、ミトコンドリア分配機構のさらなる解明を行えると考えている。