

論文審査の結果の要旨

氏名 河野 恵子

本論文は、二章からなる。その内容については以下のとおりである。

アクチン細胞骨格や細胞壁によって規定される出芽酵母の細胞形態は細胞増殖の過程で図1のように変化する。まず G_1/S 期の移行に伴いアクチン細胞骨格の極性形成や極性輸送が行われ、出芽が起こる。そして芽の成長が完了すると芽の根元にアクチン及びミオシンからなる収縮環が形成され、その収縮とその後の隔壁形成により新たな細胞を生じる。このように出芽酵母の形態形成は細胞周期に依存した厳密な制御を受けていると予想されるが、その分子レベルでのシグナル伝達経路は未解明な部分が多い。出芽酵母形態形成の中心因子である Rho1p は真核生物に広く保存された低分子量 GTPase であり、上流からのシグナルに応答して活性化型 (GTP 結合型) または不活性化型 (GDP 結合型) に変換され、下流へのシグナルのオン・オフを切り替える分子スイッチとして機能する。Rho1p の5つの標的タンパク質はいずれも直接的または間接的に細胞形態形成に関与しており、これらの標的タンパク質が制御する事象の中には細胞周期の時期特異的な調節を受けるものがあることが知られていたが、Rho1p それ自体の活性化と細胞周期との関連については報告がなかった。そこで、本研究では細胞周期依存的な Rho1p 活性制御におけるシグナル伝達経路に着目し、出芽酵母形態形成メカニズムの一端を明らかにすることを旨とした。

1. Rho1p 活性化の細胞周期時期特異性ならびに G_1/S 期における Rho1p 活性化機構

細胞内の活性化型 Rho1p 量を検出するため、活性化型 Rho1p と特異的に結合する Pkc1p の Rho1p 結合部位とグルタチオン-S-トランスフェラーゼとの融合タンパク質 (GST-Pkc1RBD) を使用したプルダウン法を確立した。この GST-Pkc1RBD は不活性化型 Rho1p とは相互作用せず、活性化型 Rho1p のみを酵母細胞破碎液からプルダウンすることが確認された。

次に、細胞周期進行の過程における活性化型 Rho1p の量的変動を検討する目的で、細胞を G_1 期で同調させ、その後細胞周期を再開させ時間を追ってプルダウンを行った。その結果、出芽時である G_1/S 期に活性化型 Rho1p 量のピークが存在することがわかった。また、細胞周期の後半部分における活性化型 Rho1p の量的変動を調べるため、細胞を G_2/M 期に同調させ、細胞周期を再開させて同様にプルダウンを行ったところ、細胞質分裂期にピークが存在することがわかった。さらに活性化型 Rho1p を特異的に認識する抗体を使用して細胞内局在を観察した結果、活性化型 Rho1p は G_1/S 期に出芽部位、細胞質分裂期に収縮環近傍に局在することが明らかになった。

Rho1p の活性制御が細胞周期依存的になされることが示唆されたため、細胞周期制御因子の関与を検討した。出芽酵母の細胞周期は細胞周期を通じて一定量存在するサイクリン依存性キナーゼ (CDK) Cdc28p と、時期特異的に発現する九つのサイクリンとの複合体によって制御される。そこで、それぞれのサイクリンが活性化型 Rho1p 量に及ぼす影響を検討したところ、 G_1/S 期のサイクリンをコードする *CLN2* の過剰発現により活性化型 Rho1p が増加することがわかった。さらに、M 期サイクリンをコードする *CLB2* を破壊した細胞で

活性化型 Rho1p が顕著に増加した。以上より活性化型 Rho1p は G₁/S 期に Cln2p/Cdc28p 依存的に増加し、Clb2p/Cdc28p 依存的に減少し、細胞質分裂期に再び増加すると考えられる。

次に G₁/S 期において Cln2p/Cdc28p 複合体から Rho1p 活性化へのシグナル伝達を仲介する因子の探索を行った。Rho1p と直接結合して活性を制御するタンパク質には、活性化因子である GDP/GTP 交換反応促進因子 (GEF)、不活性化因子である GTPase 活性促進因子 (GAP)、そして不活性化型 Rho1p を安定化させる GDP 乖離反応抑制因子 (GDI) の三種類が知られている。そこでまず活性化因子 GEF の関与を検討した。Rho1p の GEF は Rom1p、Rom2p、Tus1p の3つが知られている。これらの因子のうち、Tus1p が C 末端側に Cdc28p によるリン酸化のコンセンサス配列を有することがわかった。そこで G₁/S 期における Cln2p/Cdc28p 複合体からの Rho1p 活性化シグナルが Tus1p を介して伝達される可能性を検討した。

tus1 株の G₁/S 期における活性化型 Rho1p 量をプルダウン法により調べたところ、野生株比で顕著にピークが低下していた。さらに *CLN2* 過剰発現により対照の細胞では活性化型 Rho1p が増加するのに対し *tus1* 株では増加が見られなかったことから、Cln2p による活性化型 Rho1p 増加には Tus1p が必要であることが明らかになった。また Tus1-GFP は Cln2-HA/Cdc28p と共沈したことから、これらは細胞内で物理的に相互作用することがわかった。さらに Cdc28p によるリン酸化のコンセンサス配列を含む Tus1p の N 末端側 200 アミノ酸残基と GST との融合タンパク質 (GST-Tus1[N200]) を作製して精製し、これを基質とした *in vitro* のリン酸化実験を行った。その結果、GST-Tus1[N200] は Cln2p/Cdc28p 複合体によってリン酸化されることが示された。以上より、G₁/S 期に Cln2p/Cdc28p 複合体が直接 Tus1p をリン酸化することで Rho1p が活性化されると考えられる。

2. 細胞質分裂期における Rho1p 活性化機構

細胞質分裂期に Rho1p を活性化する因子の探索を行った。これまでに Rho1p が細胞質分裂期のアクチンリング形成に重要であることが示されていることから、Rho1p 活性化因子の変異株はアクチンリング形成に欠損を示すことが期待された。既知の細胞質分裂期を制御する因子のうち、M 期から細胞質分裂期の様々な事象を制御するポロキナーゼをコードする *CDC5* 変異株においてアクチンリング形成に欠損が見られるという報告がなされていたため、*CDC5* の温度感受性変異株 (*cdc5-2* 株) 及びコントロールとして *CDC15* の温度感受性変異株 (*cdc15-2* 株) を用いて活性化型 Rho1p の細胞内局在を検討した。これら二つの株はいずれも制限温度下において M 期後期で細胞周期を停止させるが、この時 *cdc15-2* 株では活性化型 Rho1p の局在が収縮環近傍に見られた細胞が 65% であったのに対し、*cdc5-2* 株では 8% にまで低下していた。さらにプルダウン法により検討したところ、*cdc15-2* 株に比べ *cdc5-2* 株では活性化型 Rho1p 量が顕著に減少していた。以上の結果より、Cdc5p が細胞質分裂時における Rho1p 活性化を制御することが示唆された。

さらに、*rom1* 株、*rom2* 株、*tus1* 株でも M 期後期におけるアクチンリング形成率を調べたところ、*rom2* 株が重篤な欠損を示した。そこでプルダウン法で解析した結果、*rom2* 株の細胞質分裂時における活性化型 Rho1p 量は野生株に比べ顕著に減少していることがわかった。また、この時 Rom2-GFP は活性化型 Rho1p と同様に収縮環近傍に局在した。以上の結果より、細胞質分裂期における Rho1p 活性化は Cdc5p 及び Rom2p により制御されることが明らかになった。Rom2p が Cdc5p との結合モチーフ及び Cdc5p によるリン酸化のコンセンサス配列を有することから、Cdc5p と結合してリン酸化された Rom2p により Rho1p が活性化され、アクチンリング形成を導くことが考えられる。

本研究では出芽酵母細胞の形態形成に重要な低分子量 GTPase Rho1p の細胞周期依存的活性制御機構に着目し、その上流のシグナル伝達経路を明らかにした。Rho1p は G₁/S 期のサイクリン/CDK 複合体である Cln2p/Cdc28p にリン酸化された Tus1p によって活性化され、アクチン細胞骨格の極性形成や細胞壁合成を始めとする様々な事象を制御することで、芽の

成長に寄与する。その後Rho1pはM期のサイクリン/CDK複合体であるClb2p/Cdc28p依存的に不活性化された後、細胞質分裂期にポロキナーゼCdc5p及びRom2pにより再び活性化され、アクチンリング形成など細胞質分裂に重要な事象を制御すると考えられる。このようにRho1pは細胞周期の各ステージにおいて特異的な活性制御を受け、細胞形態形成の主要な制御因子として機能することが明らかになった。

なお、本論文の一部は松永理乃、平田愛子、鈴木元次郎、阿部充弘、大矢禎一との共同研究により行われたが、全て論文提出者が主体となって分析および検証を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

したがって、博士（生命科学）の学位を授与できると認める。