

## 論文内容の要旨

論文題目 Study of glucan synthase involved in the formation of the spore wall in *Saccharomyces cerevisiae*

(出芽酵母の胞子壁形成過程におけるグルカン合成酵素に関する研究)

氏名 石原 聡

### 序論

配偶子形成は有性生殖を行う真核生物に共通する生命現象である。単細胞真核生物である出芽酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)の倍数体は、栄養が枯渇した際に減数分裂を行って配偶子を形成し、次世代ゲノムを保護するために胞子壁と呼ばれる堅牢な構造体を構築する。減数分裂後に形成される胞子壁には配偶子を外的環境変化から保護する機能があると考えられている。これまでの研究から、出芽酵母の胞子壁形成に必須なタンパク質として、胞子壁形成の出発点となる中心体に局在するタンパク質(Knop and Strasser, 2000; Tachikawa *et al.* 2001; Cwoluccio *et al.* 2004)、輸送に関わるタンパク質(Neiman, 1998; Felder *et al.* 2002)、キチンやジチロシンなどの多糖類の合成酵素(Valdivieso *et al.* 1991; Briza *et al.* 1988)などが必須であると報告されてきた。しかし、グルコースのポリマーである 1,3-β-グルカン(以下、グルカン)については胞子壁の主要な構成成分であるにも関わらず、胞子壁形成における重要性を表す知見はほとんどなかった。出芽酵母のグルカン合成酵素に関する研究は、従来は体細胞分裂時の細胞を用いて行われており、細胞膜に局在する触媒サブユニット Fks1p、Fks2p が酵素活性を担うことが明らかになっている(Inoue *et al.* 1995; Mazur *et al.* 1995)。私は博士課程において、グルカンの胞子壁形成時の局在を調べることから研究を始め、出芽酵母のグルカン合成酵素触媒サブユニットをコードする遺伝子 *FKS1* 及び *FKS2*、さらに *FKS1* と *FKS2* に相同性がある機能未知遺伝子 *FKS3* に着目し、それぞれの遺伝子が胞子壁形成時に果たす役割について解析を行った。

### 結果と考察

#### (1) 胞子形成過程におけるグルカンの局在

胞子壁は体細胞分裂時の細胞壁と類似の成分で構成される内側の二層と胞子壁特異的な成分で構成される外側二層から成り、生化学的な解析からグルカンは主に内側の層を構成して胞子壁乾重量の約 55%を占めることが報告されている(Briza *et al.* 1988)。抗グルカン抗

体による免疫電顕で胞子壁形成時におけるグルカンの局在を調べたところ、前胞子膜にはグルカンは存在せず(図 1 A)、胞子壁の成熟に従って胞子壁の内側に存在するようになり(図 1 B)、さらに胞子壁が厚くなると胞子壁全体にグルカンのシグナルが観察された(図 1 C-E)。

### (2) グルカン合成酵素の触媒サブユニットの発現と遺伝子破壊株の表現型

出芽酵母のグルカン合成酵素の触媒サブユニットをコードする遺伝子には 2 つの遺伝子 (*FKS1*, *FKS2*) が知られており、それに加えて機能未知な相同遺伝子 (*FKS3*) がゲノム上に存在している (Mazur *et al.* 1995)。これらの遺伝子の発現をノーザンプロットにより解析した。*FKS1* の転写量は減数分裂の進行とともに減少し、*FKS2* の転写量は胞子形成培地に移すと徐々に上昇した。一方、*FKS3* の転写は体細胞分裂時では観察されないが胞子形成培地に移すと転写が上昇した(図 2)。このことから、減数分裂時には *FKS2* と *FKS3* の転写が上昇して、*FKS1* の転写は抑制されることが明らかになった。

次に、それぞれの遺伝子破壊変異をホモで持つ二倍体で作成した。いずれの株も染色体分配、前胞子膜形成までは正常に進行していたが、胞子を電子顕微鏡で観察したところ、*fks2* 株と *fks3* 株で表現型が観察された。*fks2* 株の胞子では外周部にチューブ状の構造体が見られ、胞子壁が不均一であることがわかった(図 3 A, B)。*fks3* 株の胞子では胞子内の一部が胞子壁に貫入したり、壁が部分的には肥大化したり薄くなるなどの異常な胞子壁が観察された(図 3 C, D)。胞子は体細胞分裂時の細胞と比較してエーテルなどに耐性になることが報告されている (Dawes and Hardie, 1974)。そこで胞子形成後の細胞をストレス条件下におき生存率を測定した。*fks2* 株、*fks3* 株が生成する胞子はヒートショックやエーテルなどのストレスに感受性を示し、これらの刺激後に胞子を発芽させると、野生型の胞子と比べて胞子の生存率が著しく低下した(図 4)。一方、*fks1* 株が生成する胞子はこれらのストレスに対して野生型と同様の生存率を示した(図 4)。以上の結果から、栄養増殖において主に機能している *FKS1* は胞子形成時に機能していないのに対して、*FKS2*、*FKS3* は減数分裂時に発現して胞子壁形成に重要な機能があることが示唆された。

### (3) *FKS2* の胞子壁形成に関わる機能

*FKS2* の胞子壁形成に関わる役割を遺伝学的な相互作用から調べた。*fks2* 株に *FKS1*、*FKS2*、*FKS3* の 3 種類の遺伝子を持つハイコピープラスミドを導入したところ、*fks2* 変異は *FKS2* の過剰発現だけでなく、*FKS1* を過剰発現することによって部分的に抑圧された。この結果から、*FKS1* と *FKS2* の遺伝子産物の間には重複する機能があると考えた。*FKS2* のプロモーターの下流に *FKS1* の ORF 部分をつなぎ、このキメラ遺伝子を持つ株の胞子の表現型を調べた。キメラ遺伝子を持つプラスミドをゲノム上の *FKS1* と *FKS2* を欠損した株に形質転換して、胞子形成後のストレス感受性を調べたところ、*FKS2* プロモーターに *FKS1* を持つ株の胞子は、ストレスに対して野生型とほぼ同じ生存率を示した。一方、*FKS1* プロモーターに *FKS2* 遺伝子を持つ株の胞子はストレスに感受性を示し生存率が低下した。以上の

結果から、正常な胞子壁形成には *FKS2* プロモーターによるグルカン合成酵素をコードする遺伝子の転写が重要であることが明らかになった。

#### (4) *FKS3* の胞子壁形成に関わる機能

*fks3* 遺伝子破壊株が胞子壁形成時に表現型を示したことから、さらに詳しく解析した。*fks3* 株に *FKS3* の過剰発現した胞子でのみ生存率の回復が見られ、*FKS1*、*FKS2* の過剰発現では感受性を示した。このことから *Fks3p* は *Fks1p* や *Fks2p* とは異なる機能を持つと予想した。栄養増殖時に *Fks3p* が発現するようにプロモーターを *FKS1* に置換したキメラ遺伝子 (*pFKS1-FKS3*) を作成し、*Fks3p* の機能を検証した。グルカン合成酵素の温度感受性株 (*fks1-1154 fks2*) に *pFKS1-FKS3* を過剰発現したところ制限温度において致死性を回復した(図 5 A)。これまで、*fks1-1154 fks2* 変異株の温度感受性を多コピーで抑圧する遺伝子として 7 つのグルカン合成酵素の上流で働く因子をコードする遺伝子が報告されている (Sekiya-Kawasaki *et al.* 2002)。そこで、*pFKS1-FKS3* が *FKS1* やその上流の因子に正に働く機能があると考えて、細胞あたりのグルカン量とグルカン合成酵素活性を検討した。制限温度で *fks1-1154 fks2* 株では芽の先端にグルカンが局在できないが、*pFKS1-FKS3* の発現により相補されてグルカンの局在が観察できた(図 5 B)。さらに、グルカン特異的な染色試薬で細胞全体のグルカン量を計ったところ、グルカン量が低下する *fks1-1154 fks2* 株と比べて、*pFKS1-FKS3* を発現した株ではグルカン量が野生型程度にまで回復していた(図 5 C)。しかし、*in vitro* のグルカン合成酵素活性は *fks1-1154 fks2* 株と同程度で、グルカン合成酵素活性へ直接の影響はなかった。最後に、グルカン合成酵素の制御サブユニットである *Rho1p* (Qadota *et al.* 1996) との関係調べた。活性化型の *Rho1p* を発現しても、*pFKS1-FKS3* を発現しても同様にグルカン量は増加したが、両者を同時に発現したところ相乗的な効果がなく、それぞれを単独で発現した場合と同程度であった。以上の結果から、*Fks3p* にグルカン合成酵素活性はないが、*Rho1p* の活性化を介して *Fks1p* にポジティブに働く機能があると予想している。

#### まとめ

- 1) 胞子壁合成過程において直鎖状の構成成分である 1,3-β-グルカンは前胞子膜の内側から出現して最終的に全体に分布する。
- 2) *FKS2*、*FKS3* は減数分裂時に転写量が上昇し、それぞれの遺伝子破壊株はストレスに感受性を示すことから、正常な胞子壁形成に両者は重要であることが明らかになった。
- 3) 胞子壁形成時に *FKS2* が持つ機能は 1,3-β-グルカンの合成であり、*FKS1* を減数分裂開始以降発現させることによって補うことができる。
- 4) *FKS3* を発現する細胞ではグルカン合成活性が検出できないことから、*FKS3* は、*FKS1* や *FKS2* とは異なる機能が胞子形成時にある。

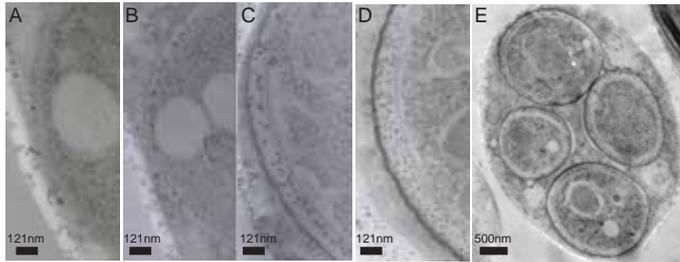


図1 胞子壁のグルカンは成熟とともに全体に局在する抗グルカン抗体による免疫電顕観察により、胞子壁におけるグルカンの局在を観察した。A; 薄い膜状の前胞子膜ではグルカンを観察できない。B, C, D; 胞子壁が厚くなることによってグルカンの内側から合成され壁全体に局在した。E; 胞子形成後の細胞全体を示す

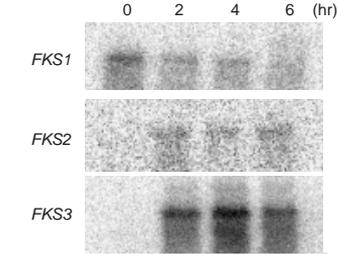


図2 減数分裂時のFKS1, FKS2, FKS3の転写酵母野生型株であるSK1株を用いて同調した減数分裂を行った。細胞を胞子形成培地に移した後に経時的にサンプリングしてmRNAを抽出して、各遺伝子のDNAプローブを用いてノーザンブロットを行った。減数分裂の進行に従ってFKS1は転写が抑制されるのに対して、FKS2とFKS3は転写が上昇した。

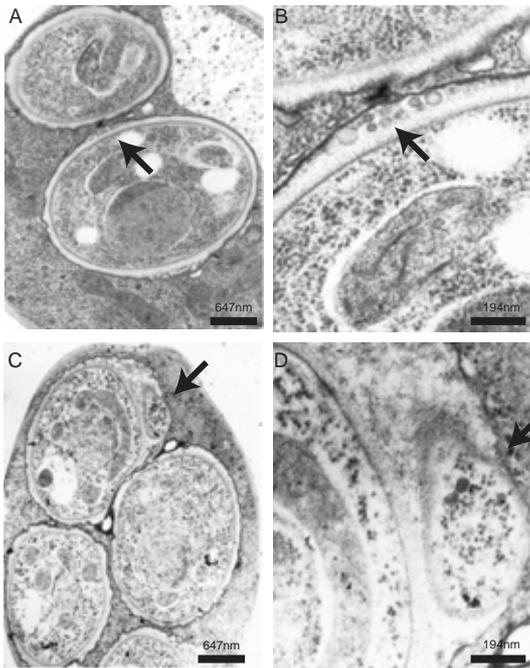


図3 *fks2*株と*fks3*株の形成する胞子壁の電子顕微鏡観察 A, B; *fks2*株の胞子壁。胞子壁の外周部にチューブ状の構造体が観察できる(矢印)。野生型の胞子壁(図1 E)と比較して不均一な構造になっていた。C, D; *fks3*株の胞子壁。胞子内の一部が胞子壁に貫入したり(矢印)や部分的には薄くなるなどの異常な形態の胞子壁が観察された。

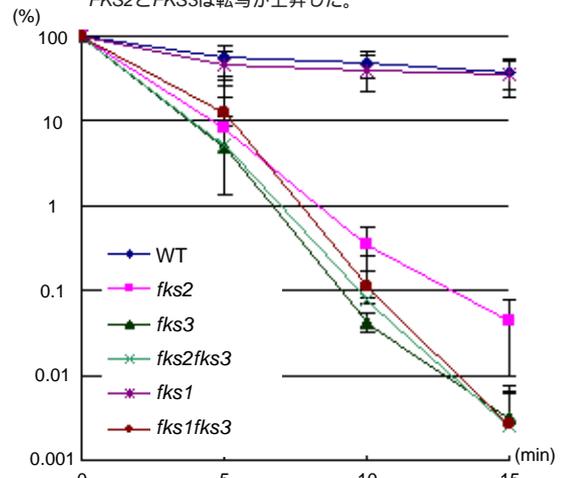


図4 ヒートショック後に発芽させた胞子の生存率胞子形成後のそれぞれの株の細胞を55℃でインキュベートし、一定時間ごとにサンプリングし、YPDプレート上で発芽したコロニーをカウントして生存率を調べた。WTと比較して、*fks2*株、*fks3*株では大きく生存率が低下しているが、*fks1*株はほぼ野生型と同じ生存率を示した。また、*fks2fks3*株、*fks1fks3*株は*fks3*株とほぼ同じ生存率を示し、相乗的な効果はなかった。

(A) *fks1-1154*変異株の温度感受性の抑圧

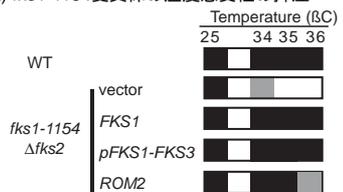
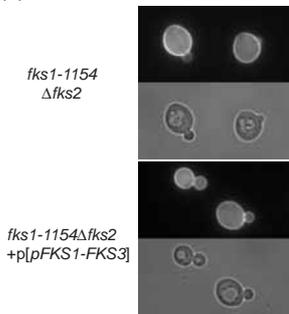


図5 *fks1-1154*株にpFKS1-FKS3を発現させた表現型 (A) FKS1, pFKS1-FKS3, ROM2の各遺伝子をハイコピープラスミドを発現させた*fks1-1154* $\Delta fks2$ 株の生育をYPDプレートで調べた。pFKS1-FKS3の発現によって温度感受性が抑圧された。(B) それぞれの細胞を制限温度で培養して、グルカン特異的な蛍光試薬アニンブルーで染色後、蛍光顕微鏡で観察した。*fks1-1154* $\Delta fks2$ 株で見られる芽の先端にグルカンの局在できない表現型は、pFKS1-FKS3の発現により相補されてグルカンを観察できた。(C) それぞれの株を25℃で培養して、アルカリ処理後にアニンブルーで染色し、細胞全体のグルカン量を計った。*fks1-1154* $\Delta fks2$ 株のグルカン量は低下していたが、pFKS1-FKS3の発現によりグルカン量が野生型程度に回復していた。

(B) 芽の先端のグルカン欠損の比較



(C) 細胞全体のグルカン量の比較

