

論文の内容の要旨

応用生命科学専攻

平成15年度博士課程 進学

大西雅之

指導教員 福井泰久

論文題目 Functional analysis of septins in fission yeast sporulation

(分裂酵母の孢子形成におけるセプチンの機能解析)

分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* は通常一倍体で増殖を行うが、窒素源の枯渇などに応答して接合・孢子形成を行い、悪環境に対応する。孢子形成は接合後の二倍体核が二回の減数分裂によって4個の一倍体核へと分配され、それぞれを前孢子膜 (forespore membrane, FSM)が取り囲んで孢子膜を形成、その後細胞壁が合成されることで完了する。孢子形成は配偶子形成の重要な一過程であり、また細胞の分化や新規オルガネラ形成のモデルと考えることが出来る。当研究室ではその中でも FSM の伸長過程に注目し、新規の生体膜形成メカニズムを解明するための題材として使用している。

FSM の伸長の過程は主に電子顕微鏡による観察によって詳細に観察されている。減数第二分裂中期に紡錘極体が構造変化を起こし、その最も細胞質側に分泌されてきた小胞が homotypic fusion することによって FSM の前駆体となる脂質二重膜が形成される。減数分裂の進行に伴って FSM は核を取り囲むようにして伸長してゆき、球体状の孢子膜になる。二重膜内腔に孢子壁物質が蓄積することで成熟した孢子となる。正しく孢子を形成するためには FSM の伸長は厳密に制御されているはずであり、特に柔軟な膜構造が定まった形態と大きさの孢子膜を作るメカニズムは大きな謎であるが、これまでに詳細は知られていなかった。

当研究室では分裂酵母のフォスファチジルイノシトール 3-キナーゼ (PtdIns 3-kinase)遺伝子 *pik3⁺* を破壊した株ではFSMの伸長に異常が生じることに着眼し、その詳細が検討された。執筆者はこれまでに*pik3Δ*株のFSMの形態を蛍光顕微鏡観察によって解析し、(1)伸長初期に膜の成長が止まり、小さな球体を核近傍に形成する。(2)伸長方向が正しく規定されず、核を取り囲まない。(3)核を取り囲むことに成功したFSMも、伸長端に泡状の構造を作り、結果生存不能の孢子となる。という3種類の表現型を示すことを明らかにしてきた。さらに、*pik3⁺*の下流でエフェクターとして働く可能性を示唆されていた*vps5⁺*、*vps17⁺*および*vps27⁺*についても同様の解析を行い、*vps5Δ*、*vps17Δ*が上記(1)、*vps27Δ*が上記(3)の表現型を示すことなどを明らかにした。PtdIns 3-kinaseはフォスファチジルイノシトール3リン酸(PtdIns(3)P)を膜上に産生する酵素であり、上記の下流因子は全てPtdIns(3)P結合ドメインを持ち、栄養増殖期のタンパク質輸送においてエン

ドソーム周辺で機能することが知られていることから、分裂酵母はこのシステムをFSMへの膜/タンパク質輸送に利用していると考えられた。しかしながら、これらの研究からも直接的にFSMの形態を制御するメカニズムの解明には至っていない。

FSM が正しい形態をとるためには何らかの骨格タンパク質の関与が考えられる。近年、アクチン、微小管、中間系フィラメントに加えて新たな骨格タンパク質としてセプチンが注目されている。セプチンは出芽酵母において発見され、植物以外の真核生物に広く保存されていることが知られている。性質としては一般に複数種のセプチンタンパク質がヘテロオリゴマーを形成し、これが重合することでフィラメント構造をとる。多くの場合セプチンは膜と結合した状態で存在することから、膜上の骨格と考えることが出来る。出芽酵母ではいくつかのセプチンタンパク質が胞子膜上に局在することが報告されているが、その役割は不明であった。分裂酵母ではセプチンに関する研究はほとんどなされていなかったが、胞子形成時特異的に発現が上昇する遺伝子群の中にいくつかのセプチン遺伝子が存在していることが報告されていた。これらの情報から、本研究ではセプチンが FSM の形態を制御する骨格として働いていると仮説を立て、解析を行った。

1 . セプチンは伸長中の FSM を裏打ちする馬蹄形構造を形成し、伸長方向を規定する。

分裂酵母のゲノムデータベース上にはセプチンと予想される遺伝子が7つ存在し、*spn1⁺-spn7⁺*と命名されていた。これら全ての遺伝子についてGFP融合型タンパク質を発現させたところ、Spn2p, Spn5p, Spn6p, Spn7pの4つが核を取り囲むリング状の局在を示した。さらに各遺伝子の破壊株を作成したところ、*spn2Δ, spn5Δ, spn6Δ, spn7Δ*株は接合子中の胞子の数が少なくなるという表現型が観察された。また、Spn2pはSpn1p, Spn3p, Spn4pとともに増殖時の分裂面および接合面にリングを形成し、これらの破壊株では細胞質分裂の遅れと接合面の拡張不能という表現型が観察された。以上のことからSpn1p-Spn4pの組み合わせが栄養増殖から接合に、Spn2p, Spn5p, Spn6p, Spn7pの組み合わせが胞子形成において機能するサブセットになっていると考えられる。FSMマーカーとの共染色やタイムラプス観察の結果、セプチンは伸長しているFSMの赤道面を裏打ちするように馬蹄形のフィラメント状構造を形成し、最終的にリングとなることがわかった。またセプチン破壊株ではFSMの伸長そのものはおこるが、その方向性が規定されなくなっており、伸長初期の段階で核と反対方向へと進んでしまっていた。これらのことから、セプチンは膜と結合してその伸長方向を規定する因子であると考えられる。

2 . セプチンはイノシトールリン脂質を介して FSM と結合する。

セプチンが膜の骨格として機能するためには何らかの方法で FSM と結合することが必要となる。これまでいくつかのセプチンが膜上のイノシトールリン脂質と結合することが報告されていた。そこで、分裂酵母セプチンについて Protein-lipid overlay (PLO) assay を行った結果、胞子形

成時に働くセプチンのうち Spn2p と Spn7p が *in vitro* で PtdIns(4)P および PtdIns(5)P と結合することが明らかになった。Spn2p, Spn7p の N 末端部位には塩基性残基のクラスターが存在したが、これは Spn5p, Spn6p には見られなかったため、この領域でリン脂質と結合していると予想し、変異を導入したところ結合能が著しく低下した。野生型 Spn2p を変異 Spn2p と置き換えるとセプチン構造と FSM の結合が弱まり、結果膜の伸長方向が破壊株同様規定されなくなったため、*in vivo* でもリン脂質と結合していると考えられる。酵母においてはこれまでに PtdIns(5)P の存在は確認されていないため、おそらくセプチンは膜上の PtdIns(4)P と結合しているであろう。蛍光プローブの局在から、伸長する FSM 上に PtdIns(4)P が存在することも確認された。PtdIns(4)P を産生する酵素としては Pik1p, Stt4p があるが、*pik1Δ*株でも胞子膜上の PtdIns(4)P はなくならなかったため、おそらく Stt4p が重要であると思われるが、*stt4Δ*は致死であるため解析は不能であった。

3 . セプチン結合タンパク質の同定と機能解析

更なる解析のため、セプチン結合タンパク質を yeast two-hybrid screen によって探索した。Bait としては Spn2p, Spn5p, Spn6p, Spn7p を使用し、市販ライブラリおよび自作胞子形成時ライブラリをスクリーニングした。その結果、Spn2p 結合タンパク質として Moe1p (SPAC637.07)、Meu4p (SPAC1F8.05)および Plb1p (SPAC1A6.04c)が同定された。本研究では、分裂酵母および哺乳類に保存されている Moe1p について解析を行うこととした。Moe1p は一次配列上 eukaryotic translation initiation factor 3d (eIF3d)と高い相同性を持ち、Int6p/eIF3e とコンプレックスを形成して一部の transcript の翻訳を司っていることが報告されている。このコンプレックスは同時に 26S proteasome の 19S lid と結合し、cyclin Cdc13p や securin Cut2p を分解することで染色体分配を調節している。さらに Moe1p は Int6p の他に EB1 homolog Mal3p を介して微小管と結合することや、Cdc42 GEF Scd1p と結合することからアクチンとの関与も示唆されている。このように Moe1p は多機能タンパク質であり、さらにセプチンとの結合によって新たな働きをしていることが期待された。Moe1p と Spn2p の結合を確認したところ、免疫沈降実験、pull-down 実験ともに結合が検出されたため、これらは *in vivo* でも直接結合していると考えられた。次に遺伝学的にこれらの遺伝子の関係を調べた。*moe1Δ*株は微小管脱重合試薬 Thiabendazole (TBZ)に耐性を示したが、この耐性は *spn2+*を必要とした。しかし、*moe1Δ*株はもうひとつの微小管脱重合試薬 Carbendazim (MBC)には耐性を示さなかった。TBZ は MBC と違い、微小管脱重合作用の他に未知の作用機作によって細胞の増殖極性構築に影響することが報告されているため、*moe1Δ*, *spn2Δ*株について調べたところ、これらの株はともにアクチン骨格極性、細胞末端増殖極性に異常があることが明らかとなった。さらに胞子形成時の働きを調べようとしたが、Moe1p が多機能タンパク質であるため胞子形成以前の減数分裂過程に異常が多く、セプチンとの関連を調べることは

出来なかったため、結合変異遺伝子の作製を目標として、免疫沈降実験によって Spn2p の 550 aa ~600 aa の α -ヘリックス構造をとると予想される領域が Moe1p との結合に必要かつ十分であることを明らかにした。

まとめ

本研究では分裂酵母の胞子膜伸長機構に注目し、セプチン構造が膜上のイノシトールリン脂質と結合することで FSM の伸長方向を制御していることを明らかにした。このような因子の存在は古くから予想されていたが実際の報告はなく、本研究が膜の形態形成メカニズムの解明への重要な一歩となることが期待される。また複数の新規セプチン結合タンパク質を同定し、そのうちのひとつについては機能解析も行った。セプチンが他のタンパク質に対する足場として働く例は多数報告されており、胞子形成時にもこれらの結合因子がセプチンと結合して何らかの機能を果たしていることが予想される。