

# 論文審査の結果の要旨

氏名 鈴木 元治郎

本論文は、一章からなる。その内容については以下のとおりである。

全ての細胞において、適切な形態を形成することは細胞の機能にきわめて重要である。単細胞真核生物である出芽酵母が体細胞分裂時に示す形態は比較的単純な楕円球型であるが、その形態形成には様々なタンパク質が複雑に相互作用し制御している。そのため出芽酵母の形態に異常が生じる変異株の解析により、様々なタンパクの様々な機能に関する情報が得られることが期待される。我々の研究室では情報生命専攻の森下研究室と共同で出芽酵母の遺伝子破壊株形態情報データベースを構築した。これは出芽酵母の全非必須遺伝子破壊株のアクチン、核、細胞壁を染色・撮影し、その画像を画像処理プログラムによって処理することで得られた全変異株の定量的な形態情報を有するデータベースである。このデータベースにより出芽酵母の形態形成制御メカニズムに関する様々な面白い知見が見出されることが期待されるが、これには一つの欠点が存在している。それは、少数ではあるが正確に画像処理されない変異株が存在するという点である。著しく異常な形態を示す変異株は、その特異な形態ゆえに画像処理プログラムで正しく認識されないことがある。しかし、そのような変異株こそ出芽酵母の形態形成の制御に大きな欠損があると期待され、本研究ではそのような変異株の解析から形態形成制御メカニズムの一端を明らかにすることを目指した。全4,722遺伝子破壊株のうちプログラムで認識することが出来なかったのは *ace2*, *snf2*, *tpd3*, *tus1* の4株であり、これらの変異株では細胞が著しく凝集していた。また、多くのパラメーターで異常を示す変異株のうち *akr1* 変異株は非常に奇異な形態を示し、多くの細胞がプログラムで正しく認識されていないことがわかった。そこで本研究では *akr1* 変異株に着目し、この変異株を詳細に解析することにより形態形成制御の一端を明らかにすることを目指した。

*Akr1p* は、真核生物で広く保存されたタンパクで、ヒトではホモログとして *HIP14* が知られている。*Akr1p* は6つの *ankyrin repeat*、6つの膜貫通ドメインを持ち、また *DHHC* システインリッチドメインと呼ばれるドメインを持つ。*Akr1p* の機能としてはターゲットタンパクのシステイン基にパルミトイル酸を付加するパルミトイル酸転移酵素であることがわかっており、カゼインキナーゼ I である *Yck2p* をパルミトイル化し、細胞膜へ局在させることが知られている。まず *AKR1* 遺伝子の一部を欠失した欠失変異株を作成し、その表現型を解析することとした。図2に示すような変異株を作成し、各変異株について細胞形態、高温での生育、*Yck2p* の局在について解析を行った。細胞形態の表現型を定量的に解析するために、アクチン、核、細胞壁を三重染色した細胞の写真を撮影し、プログラムで解析することにより501のパラメーターからなる定量的データを得た。それらのうち各変異株の

特徴を良く表していると考えられる二つのパラメーター(D14-1;母細胞の核の大きさ、C115;母細胞の細長さ)を利用して、各変異株の平均値をプロットした。作成した*akr1*変異株の形態は大きく4つのグループに分けることができた。グループIでは野生型と変わらない形態を示し、これらの株は温度感受性を示さなかった。グループIIは核の大きさが大きくなる傾向がある変異株であり、表現型の強さに従って温度感受性を示した。グループIIIは細長い形態を示す変異株であり、これらの株は温度感受性を示した。 $\Delta akr1$ 株を含んでいるグループIVは二つのパラメーターが大きく変化している変異株であり、全ての株で温度感受性を示した。次に全ての変異株でYck2pの局在を調べたところ、グループIII及びIVの全ての変異株では局在が異常になっていたが、グループI及びIIの全ての変異株では正常な細胞膜への局在が観察された。

グループIIの変異株ではネックが太くなる傾向も観察されたため、細胞質分裂に重要な役割を果たしているセプチンの形成に異常が生じているのではないかと考えた。そこでグループIIに属する $\Delta 206-242$ においてセプチンの局在を調べたところ、この株ではセプチン形成に異常を示す細胞が多く存在した。セプチンに異常が生じる変異株では出芽酵母のWEE1ホモログであるSWE1を破壊することにより異常な形態が抑圧されることが報告されている。そこでグループII、III、IVから $\Delta 206-242$ 、 $\Delta 174-207$ 、 $\Delta akr1$ においてSWE1との二重破壊株を作成しその形態を調べた。図4に示すように $\Delta 206-242$ はグループIIからIへ、 $\Delta akr1$ はグループIVからIIIへ動いた。しかし $\Delta 174-207$ はグループIIIに留まったままだった。以上より、グループIIおよびIVの変異株では、セプチン形成に異常があり、Swe1p依存的な制御機構により細胞形態が異常になっていると考えられる。

グループIIIおよびIVの全ての変異株ではYck2pの局在が異常であったため、細胞が細長くなっているのはこの局在異常が原因となっているのではないかと考えた。そこでYck2pがAkr1p非依存的に膜へ局在できるようRas2pのC末を付加したYCK2CCIISを全ての変異株に導入したところ、全ての変異株でYck2pの細胞膜への局在が回復した。次にその時の形態変化を定量的に解析するため、 $\Delta 206-242$ 、 $\Delta 174-207$ 、 $\Delta akr1$ においてYCK2CCIISを発現させた時の形態を調べた。図4に示すように $\Delta 174-207$ はグループIIIからIへ、 $\Delta akr1$ はグループIVからIIへ動いた。しかし $\Delta 206-242$ はグループIIに留まったままだった。したがって、グループIIIおよびIVの変異株でみられる細胞が細長くなる形態の異常は、Yck2pの局在異常が原因であると考えられる。

以上の結果からAkr1pはSwe1p依存的な機構とYck2pの局在制御に関わる機構の少なくとも二つの系を介して形態形成制御に関わっていると考えられる。 $\Delta akr1$ 変異株ではこれらの複合的な欠損が生じており、他の変異株には観察されない著しい形態変異を示したと考えられる。

出芽酵母は適切な形態の芽を形成するために、G1/S期においては前方向へ向かい成長し、G2/M期になると等方向成長へと成長方向を切り替え楕円型の芽を形成する。グループIIIおよびIVに属する*akr1*変異株では細胞形態が細長くなり、この表現型はYck2pの局在に依存的事から、Yck2pが細胞の形態形成、特に芽の成長方向の切り替えに重要な役割を果たしているのではないかと考えた。そこで温度感受性を示し制限温度下で形態異常を示すことが知られている*yck2-2*変異株の制限温度下における芽の形成を定量的に解析した。図5に示すように、非制限温度下ではある時期から芽の細長さが一定に保たれていること

から、成長方向の切り替えが正常に起こり、等方向成長をしていることがわかる。一方、制限温度下では殆どどの細胞で芽の細長さが1をはるかに越えてしまうことから、Yck2pの機能が失われると成長方向の切り替えができず、前方向の成長が続いてしまうと考えられる。成長方向の切り替えはM期サイクリンClb2pとCDKの複合体によって引き起こされると考えられている。しかし核分裂が終了した細胞でもアクチンが先端に局在する異常な極性のものが多数見られること(図5)、Clb2p/CDKの活性を阻害するSWE1を破壊することにより極性異常が抑圧されないことから、*yck2-2*変異株ではClb2p/CDKが活性化されても先端成長をしていると予想される。したがって、Yck2pはCDKの活性制御とは異なる機構で成長方向の切り替えにおいて働いていると考えられる。

単細胞真核生物である分裂酵母は、出芽酵母同様モデル生物として利用されてきた。分裂酵母は棒体状の形態をしているが、細胞の形態形成過程には出芽酵母同様に厳密な制御を受けている。分裂直後の分裂酵母細胞は単極方向へ向かって成長するが、G2期の頃に両極方向への成長に切り替わり、核分裂が終了すると成長を停止し細胞分裂を行う。細胞の形態制御機構の保存性を検証するため、出芽酵母で今回明らかになった各因子が、分裂酵母の形態形成にも関与しているかを調べることにした。まず、出芽酵母同様に分裂酵母の細胞形態を定量的に解析するために、出芽酵母の形態認識プログラムを基にして、分裂酵母用の形態認識プログラムを澤井博氏と共同で開発した。次に分裂酵母のAKR1ホモログであるSPAC2F7.10を破壊した株を作成し、その表現型を観察した。その結果、倍数化しやすくなるという表現型は見出せたが、形態に大きな変化は見出せなかった。次にカゼインキナーゼIが分裂酵母の形態形成に関与しているかどうかを調べた。分裂酵母にはYCK2のホモログとして*ckil<sup>+</sup>*、*cki2<sup>+</sup>*、*cki3<sup>+</sup>*の3つの遺伝子が知られている。まず、それぞれの遺伝子を単独で破壊したが、それらの変異株では顕著な表現型は観察されなかった。次に*cki*遺伝子間での二重破壊株を作成し、形態を定量的に解析したところ、*ckilcki2*、*cki2cki3*変異株では細胞形態が長くなることがわかった。また、*ckilcki3*変異株で、細胞の増殖をプレート上で経時的に観察したところ、この変異株では成長方向の制御に欠損を持っていることがわかった。以上の結果から分裂酵母の形態形成においてもカゼインキナーゼIが何らかの役割を果たしていることがわかった。

なお、本論文は鈴木元治郎、野上謙、佐野史、大矢禎一の共同研究であるが、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。