

# 論文審査の結果の要旨

氏名 五十嵐 亮二

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。

細胞周期が秩序正しく進行するために、真核細胞は細胞周期チェックポイント制御機構を有している。既に先行研究によって、DNA の複製や損傷、アクチン細胞骨格の動態、紡錘体の形成などを監視し、それらの過程に異常が生じた場合、細胞周期の進行を一時的に停止させることにより正常な細胞周期の進行を保障することが知られている。

出芽酵母は細胞の最も外側を細胞壁によって覆われており、細胞壁の構成成分は出芽部位において合成され、再構築されることが知られている。我々は出芽酵母において、この細胞壁の形成過程が新しい細胞周期チェックポイント制御により監視されていることを明らかにし、「細胞壁チェックポイント」と名づけて、その分子機構の解明に向けて研究を行ってきた。細胞壁チェックポイントは 1,3- $\beta$ -グルカンやマンノプロテインなどの細胞壁成分の合成を監視し、異常があれば細胞周期を G2 期で停止させる制御機構である。さらに、細胞壁チェックポイントの変異株 (*wac1* 株=Cell wall integrity checkpoint 欠損) を取得し、解析を行ったところ、この変異株は細胞壁合成の停止時に細胞周期の進行を止めることができず、娘細胞の形成が不完全な状態で M 期へと進行してしまうことが示された。また、この変異株ではアクチンに相同性を持つタンパク質 Arp1p の 268 番目のアミノ酸残基に置換が起きていることが明らかになり、Arp1p がチェックポイントの制御において重要な役割を担っている可能性が示唆された。しかしながら細胞壁チェックポイントが Arp1p を介してどのようにチェックポイント制御を行っているのかについては明らかになっていなかった。そこで本研究では、細胞壁チェックポイントにおいて Arp1p がどのようにして機能しているのかを調べることにより、このチェックポイントの分子メカニズムの一端を明らかにすることを目的とした。

一般に、Arp1p は Nip100p や Jnm1p を始めとした複数のタンパク質を結合して Dynactin と呼ばれる複合体を形成することが出芽酵母をはじめとした複数の生物で知られている。出芽酵母では Dynactin 複合体は、微小管のモータータンパク質複合体である Dynein (Dyn1p, Pac11p) の活性化を行い、Num1p, Pac1p, Bik1p と協同して芽の先端から微小管を通じて核を引き寄せることにより M 期における核の娘細胞への移行、分配の過程に機能している。そこで本研究では、まず始めに Dynein/Dynactin およびその関連因子が細胞壁チェックポイントに必要なかどうかを調べた。そのために、これらの因子の遺伝子破壊株を作製して解析を行った。

*FKS1* は細胞壁の主要な構成成分である 1,3- $\beta$ -グルカンの合成酵素の触媒サブユニットをコードしており、グルカン合成に欠損を持つ *fks1-1154* 温度感受性変異株を制限温度下で培養すると、芽の形成が抑えられた細胞が蓄積し、これらの細胞は紡錘体形成の直

前の G2 期で、細胞周期を停止する。一方、細胞壁チェックポイントの欠損株では細胞周期の進行を停止することができずに紡錘体を形成した細胞が蓄積する。細胞を G1 期で同調させ、制限温度で培養し経時的に紡錘体を形成した細胞の割合を観察することにより、変異株がチェックポイントに欠損を示すかどうかを調べたところ、*wac1* 変異株や *arpl* 破壊株と同様に Dynactin 複合体の構成因子である *nip100* 破壊株、*jnm1* 破壊株においても紡錘体を形成した細胞の蓄積が見られた。このことは Arp1p だけではなく Nip100p と Jnm1p を含む Dynactin 複合体が細胞壁チェックポイントの機能に必要であることを示唆している。それに対して、Dynein の構成因子および Num1p, Pac1p, Bik1p の破壊株はチェックポイントに欠損を示さなかった。さらに、微小管の重合阻害剤である Nocodazole を添加した場合でも、チェックポイント制御は正常に起こった。このことから、Dynactin 複合体は、Dynein およびその関連因子を介さないメカニズムでチェックポイント制御に機能している可能性が考えられた。

Arp1p は Dynein を介した核移行機能とは異なる分子機構によって細胞壁チェックポイントに機能しているのかどうかをさらに遺伝学的に検証するために、チェックポイントと核移行の機能が Arp1p の分子内で分離可能かどうかを調べた。そのために、Arp1p のアミノ酸配列上で電荷を持つアミノ酸のクラスターを選択し、それぞれをアラニンに置換した 32 種類の変異アレルをもつ株を作製し、それぞれにおいてチェックポイントと核の移行機能が正常であるかどうかを調べた。

核の移行機能に欠損をもつ変異株では M 期後期において核の娘細胞への移行分配に欠損を示すため、母細胞に 2 核をもつ細胞が蓄積することが知られている。そこで同調細胞を用い、核分裂後に母細胞に 2 核をもつ細胞の割合を調べることにより核の移行機能の有無を判定した。また、チェックポイント機能については先の実験同様にグルカン合成を停止させ、紡錘体を形成した細胞の割合を調べることにより判定した。

興味深いことに、32 の変異株は、(1) チェックポイントと核の移行機能の両者に欠損をもつ変異株、(2) 両者の機能とも正常である変異株、(3) チェックポイントの機能にのみ欠損をもつ変異株 (*wac1*, *arpl-233*, *-236*, *263*)、(4) 核移行の機能にのみ欠損をもつ変異株 (*arpl-46*, *-251*, *-294*, *-326*, *-344*, *-368*, *-374*) の 4 種類の表現型に分類できることが分かった。(3) や (4) のように、二つの機能のうち一方だけが欠損している表現型を示す変異株が得られたことから、Arp1p は細胞壁合成チェックポイントと核移行に必要な機能を分子上の互いに異なる領域にもつ分子であることが明らかになった。また Arp1p の立体構造を予測して変異の部位を調べたところ、チェックポイント機能にのみ欠損を示すアレルでは変異部位が核の移行に関与する領域とは異なる部位でドメインを形成していることが分かった。これらのことから細胞壁チェックポイントと核の移行機能は互いに独立して制御されており、Arp1p はその 2 つの機能に対して分子内の異なる機能領域で関与していることが示唆された。

Dynein 非依存的な細胞壁チェックポイントの分子メカニズムを解明するために、チェックポイントに関与する新たな因子の取得を試みた。ダイナクチン複合体は多くのタンパク質と物理的に相互作用することが一般に知られており、出芽酵母においても網羅的 two-hybrid の研究などから Arp1p, Nip100p, Jnm1p に結合する因子の候補として 20 種類以上のタンパク質が明らかになってきている。我々はこれらのタンパク質に注目し、細

胞壁チェックポイントに必要であるかどうかを調べた。その中で、核膜孔を經由したタンパク質の核内輸送に関与する Srp1p (出芽酵母の Importin  $\alpha$  ホモログ) の温度感受性変異株 (*srp1-31* 株) において、グルカン合成の阻害剤 Echinocandin B (EchB) を作用させたところ、紡錘体を形成した細胞の蓄積が見られることを見いだした。Importin  $\alpha$  は Importin  $\beta$  と呼ばれる因子と協同して NLS (Nuclear Localization Signal) をもつタンパク質に結合することが知られている。そこで、出芽酵母における Importin  $\beta$  ホモログである Kap95p の温度感受性アレルを用い、チェックポイントへの関与を調べた。すると、*srp1-31* 株同様に、グルカン合成を停止させてからの時間経過とともに高頻度の紡錘体形成が見られた。これらの結果から、Dynactin 複合体は Srp1p/Kap95p を介する核膜孔を通じた核内輸送系を介して細胞壁チェックポイントに機能している可能性が初めて示された。

細胞壁チェックポイントにおける Dynactin 複合体の機能を明らかにするために、その局在性に注目した。Dynactin 複合体のサブユニットの一つである Jnm1p に 2HA タグを融合させ、蛍光抗体で染色することにより、タグ付き Jnm1p の細胞内局在をドット状の蛍光として観察することができた。Ech B を用いてグルカン合成を停止させ、G1 期で同調させた細胞を用いて経時的に Jnm1p の局在性を追跡したところ、チェックポイント正常株である *FKS1* 株では細胞のリリース直後から 120 分程度まではほとんどの Jnm1p が核表面に局在しており、それ以降になると核表面の局在は失われ、芽の先端付近に局在が集中することが解った。一方、チェックポイント欠損株である *FKS1 wac1* 株では G1 期で核表面に局在している Jnm1p は時間を経過しても局在性を変化させず、核表面に存在していた。また、同様に核膜孔を通じた核内輸送系が異常となるチェックポイント欠損株である *srp1-31* 株においては時間の経過とともに局在の消失が見られ、 *$\Delta$ arp1* 株においては局在そのものが観察できなかった。*wac1* 株においては Jnm1p の局在性が観察され、 *$\Delta$ arp1* 株では局在性が失われていたことから Jnm1p の細胞内局在化には Dynactin が複合体として機能していることが必要である可能性が考えられた。興味深いことに、チェックポイント欠損株である *wac1*,  *$\Delta$ arp1*, *srp1-31* 株すべてに共通して Jnm1p の芽の先端への局在性が失われていた。このことから細胞壁チェックポイントの確立には Dynactin が芽に局在していることが必要である可能性が考えられた。核と芽の先端への局在性をもつ Dynactin 複合体が細胞壁からのチェックポイントシグナルを核へと伝える機能を担っているのかもしれない。

なお、本論文は五十嵐 亮二、鈴木雅也、野上識、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。