

論文内容の要旨

論文題目

Transcriptional regulation of the M-phase cyclin in the yeast cell wall integrity checkpoint

(出芽酵母の細胞壁合成チェックポイントにおける M 期サイクリン転写制御に関する研究)

氏名 関谷 瑞穂

[序論]

細胞周期チェックポイントとは、出芽酵母において DNA 損傷および複製阻害を受けた場合に細胞周期が一時的に停止するという事象を説明するために、Hartwell と Weinert によって 1989 年に提唱された概念である。彼らによる「細胞周期において、後のイベントの開始は前のイベントの完了に依存する」という定義により、一時的な細胞周期の停止という事象に合理的な解釈が与えられた。その後、細胞内の様々な事象、例えば、細胞骨格、紡錘体の形成や位置、細胞壁などをモニターし、細胞周期を制御する因子および情報伝達機構をチェックポイント機構として総称するようになった。

細胞壁合成チェックポイントは近年、当研究室から報告されたチェックポイントである。出芽酵母の細胞壁構成成分は、芽（娘細胞）の成長部位で合成され、細胞壁へと組み込まれる。細胞壁合成に異常が生じた場合、細胞は十分な大きさの娘細胞を形成できず、ごく小さな芽をもった状態で細胞周期を停止する。このとき DNA およびスピンドル極体は複製されているが、紡錘体は形成されておらず、G2 期で細胞周期が停止している。この G2 期停止は、CLB2 の転写抑制により引き起こされている。Clb2p は M 期進行に重要な働きをするサイクリンの 1 つであり、サイクリン依存性キナーゼと複合体を形成して細胞周期進行の様々な現象を直接あるいは間接的に統御する、細胞周期制御の基幹因子である。細胞壁合成停止時の CLB2 抑制には CLB2 の正の転写因子である Fkh2p や、ダイナクチン複合体の関与が示唆されている。しかし細胞壁合成の異常がどのように核内へ伝達され、G2 期停止が達成されているのかは、大部分が未解明のままである。そこで本研究では M 期サイクリン転写制御因子に着目し、細胞壁合成停止時の G2 期停止がどのようなメカニズムで引き起こされるのかを明らかにすることを目的とした。

[結果と考察]

1. 細胞壁合成停止条件下におけるサイクリン発現の解析

出芽酵母では9種類のサイクリンが時期特異的に発現 (Cln1-3p は M/G1 期に、Clb5,6p は G1/S 期に、Clb3,4p は S/G2 期に、Clb1,2p は G2/M 期に発現) している。これらの中で Clb1-4p は M 期進入に重要であることが知られているが、細胞壁合成停止条件下において *CLB2* と同様に *CLB1,3,4* の転写が抑制されるのかは不明であった。そこで細胞壁の主要な構成成分である

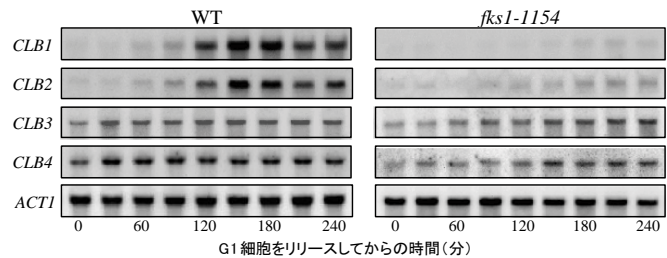


図1. 細胞壁合成停止条件下における *CLB* 遺伝子群の発現
G1期の野生型株 (WT) および細胞壁合成欠損株 (*fks1-1154*) を制限温度下にリリース後、各時間ごとにサンプルを採取した。サンプルから RNA を抽出し、ノーザン解析を行った。 *CLB1*、*CLB2* mRNA は、細胞壁合成停止条件 (細胞壁合成欠損株を制限温度で培養) において強く発現が抑制されている。

1,3-β-グルカン合成酵素に欠損をもつために細胞壁合成欠損株である温度感受性 *fks1-1154* (*fks1^{ts}* *fks2A*) 変異株を用いて、*CLB1-4* の発現を検証した。その結果、*CLB1* は *CLB2* と同様に細胞壁合成停止時に転写が抑制されていることが分かった (図 1)。一方 *CLB3*、*CLB4* は細胞壁合成停止時にも発現が見られた。

細胞壁合成停止条件下において *CLB1*、*CLB2* は共に発現が抑制されたが、これら両方の抑制が細胞周期停止に必要であるのか、あるいはどちらかへの抑制がより重要であるのかを調べるため、*CLB1* または *CLB2* を過剰発現させ、細胞壁合成チェックポイントに対する影響を調べた。*CLB2* を過剰発現すると細胞壁合成停止条件下における細胞周期停止が起こらないこと (チェックポイントの欠損) が知られているが、*CLB1* の過剰発現はチェックポイントの欠損を引き起こさなかった。

これらの結果は、細胞壁合成停止条件下における G2 期停止には、M 期サイクリンの中でも *CLB2* の発現を抑制することが最も重要である可能性を示している。

2. 細胞壁合成停止条件下における *CLB2* 転写因子群の解析

CLB2 mRNA 量は主として転写によって調節されている。これまでに *CLB2* 転写因子は、負の転写因子が 2 種 (*Sin3p*、*Rpd3p*)、正の転写因子が 3 種 (*Mcm1p*、*Fkh2p*、*Ndd1p*) 報告されている。これらの中で、*Fkh2p* は過剰発現によって細胞壁合成チェックポイントの欠損を引き起こすことが知られている。そこで *Fkh2p* 以外の転写因子の細胞壁合成チェックポイントへの関与について解析した。

まず、負の転写因子である *Sin3p*、*Rpd3p* の関与を調べた。*Sin3p*、*Rpd3p* は複合体を形成し、ヒストン脱アセチル化酵素として機能することで、*CLB2* を含む多くの遺伝子の転写抑制に関与している。*CLB2* 転写抑制に関しては、G1 期に *CLB2* プロモーターに結合し、G1 期での発現を抑制していること、S 期以降はプロモーターから解離することが報告されている。*SIN3*、*RPD3* を細胞壁合成欠損株中で破壊し、細胞壁合成チェックポイントへの影響を検証したところ、これらの欠損は細胞壁合成チェックポイントの欠損を引き起こすことが分かった (図 2a)。このとき *CLB2* mRNA の蓄積も見られた。しかし *fks1-1154* 株を用いたクロマチン免疫沈降 (ChIP) アッセイの結果、*Sin3p*、*Rpd3p* は細胞壁合成停止条件下で *CLB2* プロモーター上にリクルートされていないことが分かった。これらの結果は、*Sin3p*、*Rpd3p* は細胞壁合成チェックポイントに関与するが、細胞壁合成停止条件下における *CLB2* 発現の抑制は *Sin3p*、*Rpd3p* が *CLB2* プロモーター上に結合し

続けることによって行われているのではないことを示している。Sin3p、Rpd3p 複合体はヒストン脱アセチル化酵素としてクロマチンと相互作用することにより転写調節を行っていることを考え合わせると、細胞壁合成停止条件下における *CLB2* 発現抑制は Sin3p、Rpd3p を介しているのではないことが示唆される。

次に、正の転写因子について解析を行った。Mcm1p、Fkh2p、Ndd1p は G2 期以降、複合体を形成し、*CLB2* の転写を強く誘導することが報告されている。*FKH2* は過剰発現によって細胞壁合成チェックポイントの欠損を引き起こすことも知られている。そこで *NDD1*、*MCM1* についても過剰発現が細胞壁合成チェックポイントに与える影響を検証した。その結果、*NDD1* が過剰発現によりチェックポイントの欠損を引き起こすことが分かった (図 2b)。また *NDD1* の過剰発現では、*FKH2* 過剰発現時と同様に、*CLB2* mRNA が蓄積していること、一方チェックポイントの欠損を引き起こさない *MCM1* の過剰発現は *CLB2* mRNA の蓄積を引き起こさないことも見いだした。

これら *CLB2* 転写因子群を用いた解析により、Sin3p、Rpd3p は細胞壁合成停止条件下での *CLB2* 発現抑制に関与していないことが示唆された。さらに、細胞壁合成停止条件下では *FKH2*、*NDD1* の転写抑制が起きていること、細胞壁合成チェックポイントがこれらの遺伝子発現を抑制することで *CLB2* 発現を転写レベルで制御している可能性が示された。

3. 細胞壁合成停止条件下における転写因子Hcm1pの解析

細胞壁合成停止条件下において、*CLB2* の正の転写因子の発現が抑制されるメカニズムについて解析するために、発現調節部位に着目した。細胞壁合成停止条件下において発現が抑制される *FKH2*、*NDD1* のプロモーター領域には、HCM element と呼ばれる Hcm1p 結合領域が共通に存在していた。Hcm1p とは DNA 結合領域をもつタンパク質の 1 つであり、G1/S 期に発現し、S 期特異的な遺伝子の転写を制御している。また *HCM1* 欠損株では *FKH2*、*NDD1* の発現が抑制されることも報告されている。これらのことから、細胞壁合成停止条件下では、Hcm1p の機能が阻害されており、そのために Hcm1p 依存的発現を示す *FKH2*、*NDD1* の発現が低下したことが示唆された。

そこで、Hcm1p の過剰発現が細胞壁合成チェックポイントの欠損を引き起こすことが予想された。これについて検証した結果、Hcm1p の過剰発現は細胞壁合成チェックポイントの欠損を引き起こすことが示された (図 3)。これらの結果から、細胞壁合成停止によって引き起こされる M 期サイクリン *CLB2* の発現抑制に、Hcm1p 機能の阻害が重要であると考えられた。

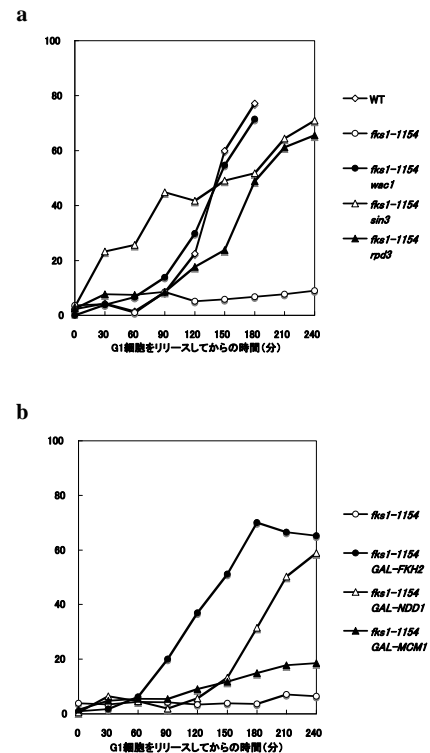


図2. *CLB2* 転写因子群が細胞壁合成チェックポイントに与える影響 (a)細胞壁合成欠損株において負の *CLB2* 転写因子を欠損させ、細胞壁合成停止時の紡錘体形成を観察した。 *sin3* および *rpd3* 欠損株では *wac1* 変異株 (細胞壁合成チェックポイント異常株)と同様、細胞壁合成チェックポイントの異常が起きていることが示された。(b)細胞壁合成欠損株において正の *CLB2* 転写因子を過剰発現させ、細胞壁合成停止時の紡錘体形成を観察した。 *NDD1*過剰発現株では *FKH2*過剰発現株と同様、細胞壁合成チェックポイントの異常が起きていることが示された。

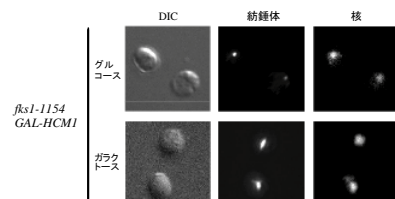


図3. *HCM1*の細胞壁合成チェックポイントへの関与がガラクトース誘導プロモーターによって Hcm1p を過剰発現させ、細胞壁合成停止時の紡錘体形成を観察した。 *HCM1* 過剰発現株では、細胞壁合成チェックポイントの異常が起きていることが示された。

次に、細胞壁合成停止条件下において、Hcm1p がどのように阻害されているかを検証した。まず、細胞壁合成停止条件下における Hcm1p タンパク質量を観察した。その結果、細胞壁合成停止条件下では細胞壁合成停止前と比べた Hcm1p 量に変化がなかったことから、Hcm1p は細胞壁合成停止条件下で、局在やリン酸化のような翻訳後レベルでの制御を受けている可能性が示唆された。そこで次に Hcm1p の局在を観察した。野生株において Hcm1p は、出芽の直前から小さな芽をもつ細胞の時期 (G1 後期から S 期に相当する) に核に強く局在することが観察された。しかし細胞壁合成欠損株では制限温度下で全ての時期を通じて、Hcm1p の核局在は見られなかった (図 4a)。このことは、細胞壁合成停止により Hcm1p の核局在が妨げられていることを示唆する。

Hcm1p の核局在の阻害が、細胞壁合成停止条件下での G2 期停止に重要であるのかを検証するために、核局在シグナル配列 (NLS) を *HCM1* に融合し、強制的に Hcm1p が核に局在することによる細胞壁合成チェックポイントへの影響を調べた。その結果、細胞壁合成停止条件下において、紡錘体の形成、つまり細胞壁合成チェックポイントの欠損が見られた (図 4b)。これらの結果は、細胞壁合成停止条件下では Hcm1p の核局在が阻害されていること、この阻害が G2 期停止に重要であることを示唆している。

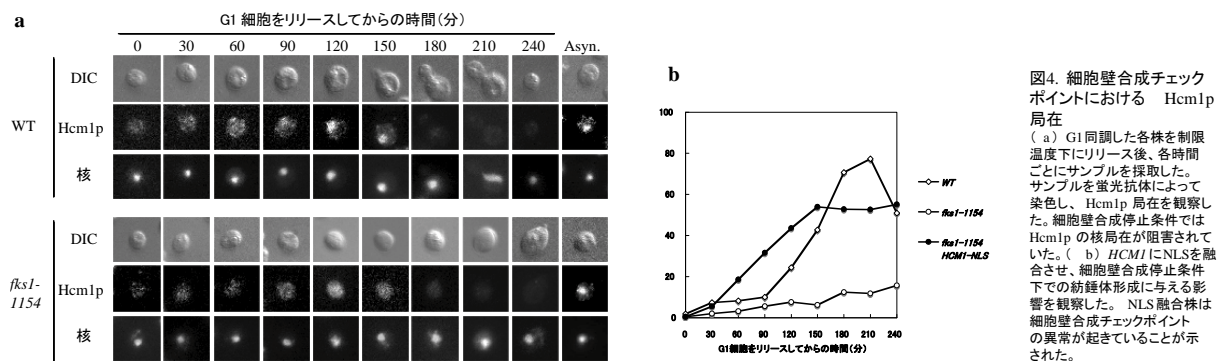


図4. 細胞壁合成チェックポイントにおける Hcm1p 局在
 (a) G1 同調した各株を制限温度下にリリース後、各時間ごとにサンプルを採取した。サンプルを蛍光抗体によって染色し、Hcm1p 局在を観察した。細胞壁合成停止条件下では Hcm1p の核局在が阻害されていた。(b) *HCM1* に NLS を融合させ、細胞壁合成停止条件下での紡錘体形成に与える影響を観察した。NLS 融合株は細胞壁合成チェックポイントの異常が起きていることが示された。

[結論]

本研究では、M 期サイクリンである *CLB2* の発現制御を手がかりとして、細胞壁合成停止条件下での G2 期停止のメカニズムについて解析し、その一端を明らかにした。細胞壁合成停止時にはサイクリン *CLB1*、*CLB2* の抑制が見られるが、*CLB2* の抑制が特に重要であることを示した。また、*CLB2* 転写因子群を網羅的に解析した結果から、これまで細胞壁合成チェックポイントへの関与が示唆されていた *FKH2* だけでなく、新たに *NDD1* も細胞壁合成停止条件下で抑制されていることを明らかにした。さらに細胞壁合成停止時には、*FKH2*、*NDD1* の転写に関与することが知られている Hcm1p の核局在が阻害されていること、Hcm1p の強制的な核局在はチェックポイント異常を引き起こすことを発見した。一連の結果から、細胞壁合成チェックポイントは、Hcm1p の核局在を阻害し、このことが *CLB2* 転写因子の発現抑制、そして *CLB2* の発現抑制を引き起こし、最終的に G2 期停止を導いているという仮説を提唱した。

[発表論文]

- 1) Sekiya, M., Nogami, S., and Ohya, Y. (2009). Transcription factors of M-phase cyclin *CLB2* in the yeast cell wall integrity checkpoint. *Genes Genet. Syst.* in press
- 2) Suzuki, M., Igarashi, R., Sekiya, M., Utsugi, T., Morishita, S., Yukawa, M., and Ohya, Y. (2004). Dynactin is involved in a checkpoint to monitor cell wall synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat. Cell Biol.* 6, 861-871.