

論文審査の結果の要旨

氏名 菊地 陽

本論文は3章からなり、第1章では出芽酵母では **HOG** 経路の **SHO1 BRANCH** から **HOG1P MAPK** までの因子が細胞壁合成チェックポイント に関与していること、第2章では細胞壁合成停止時の **G1** 初期に **HOG1P MAPK** は弱いリン酸化を示し、その時期の **HOG1P MAPK** のキナーゼ活性は細胞壁合成チェックポイントに必要であること、第3章では **CWI** 経路の **SLT2P MAPK** も細胞壁合成チェックポイントに関与していることが述べられている。

植物、菌類などの真核生物やマイコプラズマを除く原核生物の細胞には細胞膜の外側を取り囲む強固な構造として細胞壁が存在している。細胞壁は細胞外に存在する細胞小器官であり、外界の物理的ストレスから身を守る外壁や細胞壁タンパク質の足場という重要な機能を持っている。出芽酵母においては娘細胞が出芽という形式で形成されるため、細胞周期の進行に伴う娘細胞の体積増加に合わせて適切な時期に適切な場所で細胞壁を合成する必要がある。もし細胞壁が正しく合成されない場合は、細胞周期の破綻を来す可能性があり、出芽酵母の生存にとって危機的状態となる。当研究室では、出芽酵母の細胞壁の主要な構成成分である **1,3-β-グルカン** の合成が停止した細胞では細胞周期が **M** 期に進行したことを示す紡錘体の形成や **M** 期サイクリン **CLB2P** の転写が抑制され、細胞周期が **G2** 期で停止していることを明らかにした。細胞壁合成チェックポイントと名付けられたこの現象は、他のチェックポイントと同様に、細胞壁の状態をモニターし、必要な場合には細胞周期を停止あるいは遅延させて秩序だった細胞増殖を保証するシステムと考えられる。

細胞壁合成チェックポイントが正常に機能するには、細胞壁という細胞の最外層の状態をモニターし、核という細胞の最奥部へ情報を伝達するシステムが必要であるが、この分子メカニズムについては未解明な部分が多い。申請者は、細胞表層の状態を監視して核へ情報を伝達する経路の一つに **MAPK** カスケードがあることから、細胞壁合成チェックポイントの情報伝達機構は **MAPK** カスケードが担っているのではないかと考えた。出芽酵母においては **5** 種類の **MAPK** と **6** つの **MAPK** カスケードが知られており、それぞれが異なる刺激に対して固有の応答を行っている。本研究では、様々な細胞外ストレスに応答して細胞周期を停止させる **MAPK** カスケードである **HOG** (**HIGH OSMOLARITY GLYCEROL**) 経路と **CWI** (**CELL WALL INTEGRITY**) 経路に着目し、これら **MAPK** カスケードと細胞壁合成チェックポイント機構との関係について詳細に調べることにより、細胞壁合成チェックポイント情報伝達機構の全体像解明に迫った。

1. **HOG** 経路の **SHO1 BRANCH** から **HOG1P MAPK** までの因子が細胞壁合成チェックポイ

ントに關与している

出芽酵母の **HOG** 経路は、その名前からもわかる通り高浸透圧ストレスに対して必要な経路である。この経路は **Pbs2P MAPKK** から上流には二つの経路がある。一つは **SHO1 BRANCH** であり、主に芽が形成される部分に局在し、高浸透圧時に活性化し **HOG1P MAPK** を介したリン酸化リレーによりグリセロール合成酵素遺伝子等の転写を増大させ、高浸透圧への耐性を持てるようにする。もう一方は **SLN1 BRANCH** と言い、低浸透圧時に細胞膜全体に分布している浸透圧センサー **SLN1P** から始まる多段階リン酸化リレー反応によって下流因子 **Ssk1P** を抑制し、それにより **HOG1P MAPK** を不活性化させ、反対に高浸透圧時には活性化させる。まず、この経路の中樞を担っている **HOG1P MAPK** が細胞壁合成チェックポイント機構に重要かどうかを調べるために、**HOG1** 遺伝子破壊株を作製して解析を行った。細胞壁合成チェックポイントが **HOG1** 遺伝子破壊株で機能しているかどうかは以下のようにして調べた。**FKS1** と **FKS2** は細胞壁の主要な構成成分である **1,3-β-グルカン** の合成酵素の触媒サブユニットをコードしているため、温度感受性変異を **FKS1** 遺伝子に導入した **FKS1-1154 ΔFKS2** 株 (以下 **FKS1-1154** 株と略す) は温度感受性増殖を示す。**FKS1-1154** 株はグルカン合成に欠損を持っているために、**G1** 期で同調し制限温度で培養すると、芽の形成が抑えられた細胞が蓄積し、紡錘体形成の直前の **G2** 期で細胞周期を停止する。一方、細胞壁合成チェックポイントの欠損もあわせ持つ株 (**FKS1-1154 wac1**) では制限温度下で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。従って細胞を **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ることができる。この方法により **HOG1** 破壊を導入した **FKS1-1154** 株は、チェックポイント欠損を示すことが知られている **FKS1-1154 wac1** 株と同様に紡錘体を形成した細胞の蓄積が見られた。このことは **HOG1P MAPK** が細胞壁合成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。さらに **Pbs2P MAPKK** を始め、上流の **SHO1 BRANCH** と **SLN1 BRANCH** の因子群、そして **HOG1P MAPK** の下流の主要な転写因子群に関しても同様に **FKS1-1154** 株に遺伝子破壊を導入してチェックポイントへの関与について調べた。その結果、**SHO1 BRANCH** 因子の破壊株で **HOG1** 破壊株同様の紡錘体を形成した細胞の蓄積が見られた。この結果から、**HOG** 経路の中で **SHO1BRANCH** の最上流に位置する **SHO1P** から **HOG1P MAPK** までの因子が細胞壁合成チェックポイント機構に關与していることが示唆された。

2. 細胞壁合成停止時の **G1** 初期に **HOG1P MAPK** は弱いリン酸化を示し、その時期の **HOG1P MAPK** のキナーゼ活性は細胞壁合成チェックポイントに必要である

1M ソルビトールのような高浸透圧下に酵母が曝された場合、**HOG** 経路はリン酸化リレーを介して **HOG1P MAPK** をリン酸化し情報伝達を行うことが知られている。もし、細胞壁合成チェックポイントの情報伝達が **HOG** 経路の **SHO1 BRANCH** から **HOG1P MAPK** までの因子間で行われているならば、その情報伝達はリン酸化で行われている可能性が高い。そこで細胞壁合成停止中の **HOG1P MAPK** のリン酸化状態を調べることにした。細胞を **G1** 期で同調させ、制限温度で培養し経時的に **HOG1P** 量およびリン酸化 **HOG1P** 量を抗 **HOG1P** 抗体及び抗リン酸化 **HOG1P** 抗体を用いた **WESTERN** 解析により調べたとこ

ろ、野生型に比べ **FKS1-1154** 株は 0 分から 30 分の間 (**G1** 初期) に弱いリン酸化をしていることがわかった。この弱いリン酸化は細胞壁合成阻害剤である **ECHINOCANDIN B (ECH B)** で野生型株を処理した場合も確認されることから、**HOG1P MAPK** の弱いリン酸化は細胞壁合成停止時に起こることが明らかとなった。この結果は細胞壁合成停止時に **HOG1P MAPK** がリン酸化シグナルを受けていることを示唆しており、**HOG1P MAP** キナーゼとして活性化していると考えられる。そこでキナーゼ活性を失った **HOG1** 変異株を用いて、**HOG1P MAPK** のキナーゼ活性が細胞壁合成チェックポイントに重要かどうか調べた。2 種類のキナーゼ活性を失った **HOG1** 変異アリル (**HOG1-K52R** と **HOG1-D144A**) を導入した **FKS1-1154** 株の細胞を **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したところ、この **HOG1P MAPK** のキナーゼ変異株は **HOG1** 破壊株と同様に紡錘体を形成した細胞の蓄積が見られた。このことから、**HOG1P MAPK** のキナーゼ活性が細胞壁合成チェックポイントに重要であることが明らかとなった。さらに、**HOG1P MAPK** のキナーゼ活性がどの時期に必要なか調べるために、**HOG1-AS** という変異を導入した株を作製した。この **HOG1-AS** 変異株は正常な **HOG1** 遺伝子保持株と同等の機能を有した **HOG1P** タンパク質を発現できる。しかしながら、**1MN-PP1** という強力な **ATP** の競合阻害剤を加えた場合のみ特異的に **HOG1P MAPK** のキナーゼ活性だけが抑えられるという変異株である。この変異を導入した **FKS1-1154** 株を **G1** 期同調させ、制限温度で培養し経時的に **1MN-PP1** を添加し、**240** 分培養後に紡錘体を形成した細胞の割合を調べたところ、制限温度下培養直後 (0 分) と **30** 分後の **HOG1P MAPK** のキナーゼ活性を阻害した細胞で高い紡錘体の形成率を示した。従って、細胞壁合成停止時の **G1** 初期 (**30** 分以内) の **HOG1P MAPK** のキナーゼ活性が細胞壁合成チェックポイントに重要であることが明らかとなった。また、高浸透圧処理によりリン酸化した **HOG1P MAPK** は核へ蓄積するが、細胞壁合成停止時には核への蓄積が見られなかった。これらの結果と、主要な **HOG1P MAPK** 下流転写因子の破壊を導入した **FKS1-1154** 株が紡錘体の形成率の増加を示さなかったことから、細胞壁合成停止が起こった場合、リン酸化を受けた **HOG1P MAPK** からの情報は転写因子ではない他の下流因子に伝達することが示唆された。

3. **CWI** 経路の **SLT2P MAPK** も細胞壁合成チェックポイントに関与している

上記の結果から **HOG** 経路が細胞壁合成チェックポイント機構に関与していることが明らかとなってきた。しかし、**HOG** 経路の主要転写因子群が細胞壁合成チェックポイントに関与していないことから、**HOG1P MAPK** の下流因子については不明のままであった。一方、昨年細胞壁溶解剤である **ZYMOLYASE** で処理するとそのシグナルは **SHO1 BRANCH** を通り **HOG1P MAPK** を弱くリン酸化し、その後 **CWI** 経路の **MAPK** である **SLT2P MAPK** を活性化させるという報告がなされた (**BERMEJO ET AL., 2008**)。そこで、まず一つの可能性として、**SLT2P MAPK** が **HOG1P MAPK** の下流で働くことを考えて、**SLT2P MAPK** が細胞壁合成チェックポイント機構に関与しているのか調べることにした。**HOG** 経路が外部の浸透圧変化等に応答し、細胞内イオンやグリセロール濃度を調節するのに重要な経路に対して、**CWI** 経路は熱や細胞壁のストレスを与える様な刺激に応答し、細胞壁関連遺伝子を発現することで、細胞壁をより強固にして細胞を守るのに重要な経路であ

る。この **CWI** 経路の中心因子である **SLT2P MAPK** の破壊株は、通常状態で生育できないため、高浸透圧下で前培養し、**G1** 期同調後、制限温度下通常培地での培養で経時的に紡錘体の形状を観察したところ、**SLT2** 破壊を導入した **FKS1-1154** 株で紡錘体の形成した細胞の蓄積が見られ、細胞壁合成チェックポイントに欠損を示した。この結果から、**SLT2P MAPK** も細胞壁合成チェックポイント機構に重要であることが示唆された。さらに、**SLT2P MAPK** が **HOG1P MAPK** の下流に位置しているのか調べるため、細胞壁合成停止中のリン酸化 **SLT2P** 量を調べることにした。細胞を **G1** 期で同調させ、制限温度で培養し経時的に細胞を回収し、リン酸化 **SLT2P** 量を抗リン酸化 **SLT2P** 抗体による **WESTERN** 解析で調べたところ、野生型株 (**FKS1**) では全ての時間で **SLT2P MAPK** の弱いリン酸化が観察された。酵母細胞が高温に曝された場合、**CWI** 経路が活性化し **SLT2P MAPK** をリン酸化させることが報告されている (**MARTIN ET AL., 1993**)。従って、野生型株で確認された **SLT2P MAPK** の弱いリン酸化は高温によるものだと考えられる。それに比べ **FKS1-1154** 株は **G1** 初期では野生型とあまり変わらなかったがその後、徐々にリン酸化 **SLT2P** 量が増えていくことがわかった。また、その増加するリン酸化 **SLT2P** 量は **HOG1** 破壊を導入した **FKS1-1154** 株で幾分抑えられることが明らかとなった。これらの結果から、**CWI** 経路の **SLT2P MAPK** も細胞壁合成チェックポイント機構に重要な因子であり、且つそれは **HOG1P MAPK** の下流に位置していることが明らかとなった。

本研究では細胞壁合成チェックポイント機構における情報伝達経路の解明を目指し、**MAPK** カスケードに着目した結果、細胞壁合成チェックポイント機構の情報伝達経路の一部を明らかにすることができた。さらに詳細な解析の結果から、細胞壁合成停止が起こった場合、**G1** 初期に **HOG** 経路の **SHO1 BRANCH** から **HOG1P MAPK** を介して **SLT2P MAPK** を活性化し、最終的に **CLB2MRNA** の転写を抑制することで細胞周期を **G2** 期で停止させるという細胞壁合成チェックポイント機構の情報伝達経路モデルを提唱した。**HOG1P MAPK** と **SLT2P MAPK** は、ヒトなど様々な生物における細胞で高度に保存されており、細胞壁合成チェックポイントのような細胞増殖制御に関して重要な因子である。これらの研究を通して、細胞壁を有する生物だけに留まらない新たな増殖制御機構に関する知見に貢献すると期待する。

なお、本論文第1章の一部は水内恵理、野上識、大矢禎一との共同研究であるが、論文提出者が主体となって分析及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。