

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 20 日現在

機関番号：12601

研究種目：特定領域研究

研究期間：2007～2011

課題番号：19057002

研究課題名（和文） 細胞の形態とサイズの細胞周期制御の分子機構

研究課題名（英文） Cell cycle regulation of cell morphology and cell size

研究代表者

大矢 禎一 (OHYA YOSHIKAZU)

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・教授

研究者番号：20183767

研究成果の概要（和文）：

出芽酵母の細胞壁合成チェックポイントは、細胞壁合成が停止することにより細胞周期の進行が G2/M で停止するという新規チェックポイントである。このチェックポイントに関わる新規因子を 18 個同定し、細胞壁から核内への細胞内シグナル伝達系や転写因子の関与を証明した。特に転写因子の特定のリン酸化サイトがチェックポイント制御に重要な働きをしていることを見いだした。これらの因子は、ヒトなど様々な生物における細胞で高度に保存されている。したがって我々の研究は細胞壁を有する生物だけに留まらず、他の生物における増殖制御機構に関する知見に貢献すると期待している。

研究成果の概要（英文）：

Cell wall integrity checkpoint is one of the cell cycle checkpoints in *Saccharomyces cerevisiae*. When the cell wall synthesis is perturbed, cell cycle progression stopped before nuclear division. We identified 18 genes involved in the cell wall integrity checkpoint. We showed that the checkpoint required the kinase signaling pathway that transduced signal from the cell wall to the nucleus. We also showed that phosphorylation of the transcription factor is also important for regulation of G2/M cyclin, a key regulatory factor of the checkpoint.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	16,200,000	0	16,200,000
2008 年度	16,200,000	0	16,200,000
2009 年度	16,200,000	0	16,200,000
2010 年度	15,200,000	0	15,200,000
2011 年度	15,200,000	0	15,200,000
総計	79,000,000	0	79,000,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：出芽酵母・細胞壁・細胞周期

細胞形態・画像解析

1. 研究開始当初の背景

従来、細胞周期の研究では、DNA 複製、染色体凝集、染色体分配、細胞質分裂などの事象を対象にした研究が広く行われてきたが、

最近になって、細胞増殖サイクルを可能にする空間（場）の提供という観点から、細胞周期に依存した細胞のサイズや形態形成の研究が脚光を浴びてきている。研究代表者と分

担者は、それまで単細胞生物である出芽酵母と分裂酵母の特徴を生かして、細胞周期と細胞空間形成の連携に関する研究を行ってきた。

研究代表者は、新規細胞周期チェックポイントである細胞壁チェックポイントの存在を証明するとともに、細胞周期エンジンである CDK から細胞壁と細胞空間の形成に重要な働きを持つ Rho 型 GTPase に細胞周期シグナルが伝達されることを示した。出芽酵母の細胞壁は細胞増殖サイクルを可能にする空間（場）を外側から保障しているが、その合成過程は細胞周期の制御を受けているだけでなく、細胞周期進行をフィードバック制御していることを明かにした。一方、研究分担者は、分裂酵母では Cdc25 や Wee1 などの主要な細胞周期制御分子が、何によってどのように調節されるかは不明な点が多かったが、wee1 変異様の細胞サイズの減少する温度感受性の変異体 wel (wee1-like mutant) を取得し、Wee1 の制御因子の候補を取得してきた。

2. 研究の目的

細胞の形態形成は単細胞生物では細胞の空間確保という観点から重要であり、細胞周期と共役すると共に、栄養増殖と接合の切り換えにおいてダイナミックに変化することが知られている。一方多細胞生物では細胞の空間形成という観点から重要であり、細胞の数や細胞の機能分化の制御とともに多細胞集団の構築にとって極めて重要な意味を持っている。そこで我々は細胞の形態形成のメカニズムを細胞の運命を規定している「細胞周期制御」という観点から出芽酵母を使って研究することにした。その中でも特に細胞壁チェックポイントに関する研究に焦点をあてた。酵母における細胞の形態形成は、栄養増殖と接合の切り換えにおいて重要な役割を果たしている。また、細胞の空間形成は、細胞の数や細胞の機能分化の制御とともに多細胞生物における多細胞集団の構築にとっても極めて重要な要素である。したがって、この研究から細胞の運命を規定する「細胞周期」についてより深い理解が得られるものと考えられる。

3. 研究の方法

細胞壁合成チェックポイントは出芽酵母で我々が発見した新規細胞周期チェックポイントであり、本研究計画の中心課題である。細胞壁合成チェックポイントに関する研究では、1) 細胞表層の情報を核に伝達する MAPkinase 経路に注目した研究、2) M 期サイクリンの転写抑制機構、のふたつの観点から、主に出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を用いて研究を行った。

4. 研究成果

4-1. MAPkinase 経路に注目した研究

既に細胞壁合成停止時に M 期サイクリンの転写が抑制され、それにより細胞周期の進行が停止することが明らかになっていたが、M 期サイクリンの上流で働く因子についてはよく分かっていなかった。そこで我々はまず細胞表層の情報を核に伝達する MAPkinase 経路に注目して研究を行なった。全ての MAPkinase の遺伝子破壊株について、細胞壁合成チェックポイントが異常になっているかどうか調べた結果、高浸透圧ストレスに関係する HOG 経路と細胞壁応答に関係する CWI 経路の両方が関係していることが明らかになった。

HOG 経路は MAPkinase である Hog1p のひとつ上流が MAPKK の Pbs2p であり、さらにその上流には SHO1branch と SLN1branch という二つの経路がある。SHO1branch は、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て Hog1pMAPK 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る。SLN1branch は、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 Hog1pMAPK を不活性化させる。Hog1pMAPK や Pbs2pMAPKK だけでなく、どちらの上流因子が細胞壁合成チェックポイントに必要なかを調べた結果、SHO1branch を構成する全ての因子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になった。

次に、細胞壁合成停止時のどの時期に Hog1pMAPK が活性化されるかを調べた。細胞を G1 期で同調させ、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、細胞壁合成停止後 Hog1p は G1 初期に弱くリン酸化していることがわかった。またキナーゼ活性を失った hog1 変異株 (hog1-K52R と hog1-D144A) を用いて、Hog1pMAPK 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を示した。以上のことから、G1 初期における Hog1pMAPK 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。

もうひとつの MAPK 経路である CWI 経路も細胞壁合成チェックポイントに必要なため、HOG 経路と CWI 経路との関係を明らかにすることにした。CWI 経路の Slt2pMAPK が Hog1pMAPK の下流に位置しているのかを調べるため、細胞壁合成停止中のリン酸化 Slt2p 量を測定した。細胞を G1 期で同調させ、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、野生型株では全ての時間で Slt2pMAPK の弱いリン酸化が観察された。それに比べ細胞壁合成を停止すると 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* を破壊することで幾分抑えられることが明らかとなった。以上の結果から、細胞壁合成チェックポイント機構に重要な CWI 経路の Slt2pMAPK は Hog1pMAPK の下流に位置していることが明らかとなった。

4-2. M 期サイクリンの転写抑制機構

残された問題は、2つの MAPK が関与した後どのよう M 期サイクリンの転写抑制に結びつくかである。我々は、S 期に働く転写因子である Hcm1p の過剰発現が細胞壁チェックポイントの乗り越えを引き起こすことから、細胞壁合成停止時には Hcm1p 機能の阻害が重要であろうと考えた。実際に Hcm1p が活性化するとその下流で Fkh1p, Fkh2p, Ndd1p などの転写因子が活性化し、これらが M 期サイクリン Clb1p, Clb2p を発現誘導することを確かめることができた。また、細胞壁合成停止時には細胞内の Hcm1p タンパク質の量は変化せず、代わりに通常ならば S 期になると核に移行する Hcm1p の核局在化が見られなかったことから Hcm1p の核局在が妨げられていることが示唆された。最後の問題は、細胞周期進行や細胞壁合成停止時にどのように Hcm1p の機能が制御されているかである。我々は、質量分析 (LC-MS/MS) によるリン酸化部位の解析から Hcm1p には全部で 29 個のリン酸化サイトがあることを明らかにした。さらに全てのリン酸化サイトの変異株の解析から、G1-CDK サイクリンによって S369, S387, S496 がリン酸化されること、MAPkinase によって S61, S65, S66 がリン酸化されることが Hcm1p の正と負の制御に重要であることを突き止めた。

本研究では細胞壁合成チェックポイント機構において、2つの MAPK カスケードのシグナル伝達と転写因子 Hcm1p の核移行制御が重要であることが明らかになった。これらの因子は、ヒトなど様々な生物における細胞で高度に保存されている。したがって我々の研究は細胞壁を有する生物だけに留まらず、他の生物における増殖制御機構に関する知見に貢献すると期待している。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 19 件)

①Iwaki A, Ohnuki S, Suga Y, Izawa S and

Ohya Y. Vanillin Inhibits Translation and Induces Messenger Ribonucleoprotein (mRNP) Granule Formation in *Saccharomyces cerevisiae*: Application and Validation of High-Content, Image-Based Profiling. PLoS ONE 2013 Apr 24;8(4):e61748 査読有 Doi:10.1371/journal.pone.0061748

②Negishi T and Ohya Y. The Cell Wall Integrity Checkpoint: Coordination between Cell Wall Synthesis and the Cell Cycle. Yeast Vol.27(2010)513-519 査読有 Doi:10.1002/yea.1795.

③Okada H, Abe M, Asakawa-Minemura M, Hirata A, Qadota H, Morishita K, Ohnuki S, Nogami S, Ohya Y. Multiple Functional Domains of the Yeast 1,3- β -Glucan Synthase Subunit Fks1p Revealed by Quantitative Phenotypic Analysis of Temperature-Sensitive Mutants Genetics 2010 Apr;184(4):1013-24, Epub 2010 Feb 1. 査読有 Doi: 10.1534/genetics.109.109892.

④Kono K, Nogami S, Abe M, Nishizawa M, Morishita S, Pellman D, Ohya Y. G1/S Cyclin-Dependent Kinase Regulates Small GTPase Rho1p through Phosphorylation of RhoGEF Tus1p in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol Biol Cell 2008 Apr;19(4):1763-71. Epub 2008 Feb 6. 査読有 Doi: 10.1091/mbc.E07-09-0950.

⑤Nogami S, Ohya Y, Yvert G Genetic complexity and QTL mapping of yeast morphological traits. Plos Genet. 2007 Feb 23;3(2):e31 査読有 doi:10.1371/journal.pgen.0030031

[学会発表] (計 53 件)

①Yoshikazu Ohya Image-based systems biology in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* 2012.08.21 ICSB The 13th International Conference on Systems Biology (招待講演) Toronto University (CANADA)

②Yoshikazu Ohya Chemical-genetic analysis on the elucidation of cell wall biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae* 2012.6.8 5th International Conference on Molecular Mechanisms of Fungal Cell Wall Biogenesis (招待講演) Hotel Zora, Kravata Conference Hall (CROATIA)

③Ohya Y Quantitative phenotyping of yeast glucan synthase mutants base on the cell morphology, 2011 Oct 9, 2nd International Fungal Cell Wall Meeting (招待講演) Giens (France)

④Ohya Y Dynactin and its interacting molecules are involved in cell wall integrity checkpoint of *Saccharomyces*

cerevisiae 2007年3月23日 2nd International Workshop on Cell Regulations in Division and Arrest OIST Seaside House (沖縄科学技術大学院大学シーサイドハウス), 沖縄

⑤Ohya Y Cell wall integrity checkpoint that monitors cell wall remodeling in Saccharomyces cerevisiae 2007年3月12日 The first International Fungal / Plant Cell Wall Meeting Village de Vancances Familiales de Anglet, Biarritz (France)

[産業財産権]

○出願状況 (計2件)

名称：細胞観察装置、細胞観察方法及びそのプログラム

発明者：大矢禎一 他

権利者：JST

種類：特許

番号：2012-259880

出願年月日：2012.11.28

国内外の別：国内

名称：細胞形態定量値を用いる酵母の生理状態の評価方法

発明者：大矢禎一、野上 識、大貫慎輔 (東京大学)、善本裕之、榎本賢一、堀越杏子 (キリンビール 醸造研究所)

権利者：キリンビール

種類：特許

番号：2009-0088

出願年月日：2009年7月27日

国内外の別：国内

[その他]

ホームページ等

<http://ps.k.u-tokyo.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大矢 禎一 (OHYA YOSHIKAZU)

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・教授

研究者番号：20183767

(2) 研究分担者

平田 大 (HIRATA DAI)

広島大学・大学院先端物質科学研究科・教授

研究者番号：30243603