

平成 21 年 6 月 2 日現在

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19370074

研究課題名（和文） 出芽酵母細胞の形態形成に関する研究

研究課題名（英文） Cell Cycle Regulation of Cell Morphology in *Saccharomyces cerevisiae*

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：

真核単細胞のモデルである出芽酵母を用いて、「細胞周期進行」という時間軸に添って細胞の形態形成が正しく起きるメカニズムを解明することを本研究の目的にした。そのためには、(1)細胞壁合成などの細胞形態形成がうまく行かない時に細胞周期を停止する機構と、(2)細胞周期進行とともに細胞の形態形成が起きる機構を明らかにすることが必要である。我々は細胞壁合成チェックポイントの研究を行い、複数の核移行の過程がこれに関与することを明らかにした。また G1/S 期のサイクリン依存性タンパク質リン酸化酵素が細胞形態形成の制御因子である Rho1p の活性化に直接影響を与えることを明らかにした。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になっている。したがって、本研究計画で行った細胞周期と「細胞の空間形成」の連携に関する研究は、他の研究との有機的な結合により、真核細胞の運命を決める細胞周期についてより深い理解が得られるものであった。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	9,000,000	2,700,000	11,700,000
2008 年度	5,400,000	1,620,000	7,020,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,400,000	4,320,000	18,720,000

研究分野：分子遺伝学

科研費の分科・細目：生物科学・分子生物学

キーワード：細胞壁、出芽酵母、細胞周期チェックポイント、Rho1p、シグナル伝達、紡錘極体

## 1. 研究開始当初の背景

全ての真核細胞は固有の形をしており、細胞の形は生物の機能と密接に関係している。1665年のロバート・フックによる細胞の発見以来、細胞の形態形成は

多くの生物学者の興味の対象になってきた。動物では細胞骨格が、植物と菌類では細胞壁と細胞骨格が細胞の形を規定していることを考えると、細胞壁の合成および細胞骨格の制御が重要であることは間違いない。し

かしながら、細胞増殖や分化というような時間軸に添った「細胞の形態形成」過程に対する全体理解は不十分であった。一方、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。

## 2. 研究の目的

申請者は、真核単細胞のモデルである出芽酵母を用いて、「細胞周期進行」という時間軸に添って細胞の形態形成が正しく起きるメカニズムを解明することを本研究の目的にした。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の研究は、歴史的には細胞骨格の動的変動が細胞周期依存的な事象であるという発見 (Adams and Pringle, 1984) に端を発し、先端成長が G1 サイクリン / CDK の制御下にあること、先端成長時のアクチンケーブルの形成にはポリリゾームという高分子複合体が関係していること (Sagot et al., 2002)、G1 サイクリン / CDK に依存した先端成長の制御過程に多くの遺伝子産物が関与している等の発見がなされてきた。研究代表者は、今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。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 (Suzuki et al. 2004 Nat. Cell Biol.) 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実験的に示している (Yoshida et al. 2006 Science)。

研究のゴールを以下のとおり据えた。

(1) 細胞壁チェックポイントに関する研究 (研究テーマ1) では、新しい細胞周期チェックポイントに研究の焦点を絞り、その分子機構の解明を行う。細胞壁チェックポイント機構の重要な素過程である、ダイナクチンと相互作用する細胞壁チェックポイントに関

する因子の研究、M 期サイクリン転写活性の制御機構の研究、チェックポイント制御における HOG 経路の関与についてという3つの課題について、集中的に研究を行った。

(2) 細胞周期に依存した空間形成に関する研究 (研究テーマ2) では、出芽酵母の遺伝子破壊株セットにイメージプロセッシングプログラムシステムを応用して、細胞周期進行依存的な空間形成に欠損がある変異株を解析する。サイクリンから細胞形態形成の制御因子へのシグナル伝達経路を特定することによって、酵母の空間形成の機構を明らかにする。

酵母細胞の形態形成は、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になっている。したがって、本研究計画で行う細胞周期と「細胞の空間形成」の連携に関する研究は、他の研究との有機的な結合により、真核細胞の運命を決め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

細胞壁チェックポイントに関する研究では、細胞壁合成チェックポイントが核への移行に参与する可能性について遺伝学的アプローチにより研究を行った。細胞周期に依存した空間形成に関する研究では、サイクリンから Rho1p GTPase へのシグナル伝達機構を生化学的、遺伝学的に明らかにした。

## 4. 研究成果

(1) 細胞壁チェックポイントに関する研究 (研究テーマ1)

細胞壁合成チェックポイント機構に参与する核輸送因子の同定をおこなった。細胞壁合成チェックポイントでは、細胞壁の合成阻害という細胞表層でおこる異常が、細胞周期の停止を引き起こす。その細胞周期の停止の一つの原因として強く示唆されている機構が、M 期サイクリン Clb2p の転写抑制である。そのため、細胞表層でお

この事象が情報伝達機構を通じて核内に輸送され転写抑制を引き起こすことが考えられた。そこで、細胞壁合成チェックポイントの情報伝達機構解明のため、出芽酵母において同定されている15の核輸送タンパク質に着目し、それらの細胞壁合成チェックポイント機構への関与について検証した。

#### Kap142pは細胞壁合成チェックポイント機構に関与する

Arp1pと相互作用があることが知られている核輸送因子、Srp1pとそのヘテロ二量体対応因子Kap95pがそのチェックポイント機構に関与することが示され、Arp1pの核内への移行とチェックポイント機構の相関が示唆されている。そこで、Srp1pと同様に核輸送のImportとExportの両方にたずさわることが知られているKap142pを解析した。その結果、KAP142を欠損することで、細胞壁合成チェックポイント誘発時に紡錘体の形成が観察され、Kap142pが細胞壁合成チェックポイント機構に関与することが示唆された。Kap142pは多くの(既知のもので10以上)タンパク質の局在変化を制御する因子である。その中でも、G1/S期に働く転写因子であるSwi6pの核外への輸送を担っており、細胞壁合成チェックポイントが正しく細胞周期を制御するには、それらの因子の核外への輸送が重要ではないかということが考察された。

#### 核輸送のImportに関わるNmd5p、Kap114pは細胞壁合成チェックポイント機構に関与する

核輸送のImportに関わる因子について解析した。当研究室においてHigh Osmolarity Glycerol (HOG)キナーゼ経路のMAPキナーゼであるHog1pが細胞壁合成チェックポイント機構に関与することが示されており、その核内への輸送に関与するNmd5pのチェックポイントにおける役割が予想された。表1に示す因子の解析の結果、そのNmd5pに加えて、Kap114pがそのチェックポイント機構に関与することが示唆された。Kap114pはHistoneの構成因子であるH2AとH2BやTATA-binding proteinの核内への輸送を司ることが知られており、それらの異常な制御が細胞壁合成チェックポイント機構に影響したと考えられた。

#### 核輸送のExportに関わる因子のうちKap120pは細胞壁合成チェックポイント機構に関与する

同様に、核輸送のExportに関わることが知られている因子について解析した。その結果、Kap120pのチェックポイントへの関与が示唆された。Kap120pについては、多くのことは知られていないが、核輸送因子はそのターゲットを共有する場合が多くあることが知られている。そのため、他の核輸送因子と重複したターゲットを持つ可能性がある。実際に、細胞壁チェックポイントが誘発される際に、Kap120pの欠損株はKap142pの欠損株と同様に異常に伸長した芽を持つことがわかり、これらのターゲットが重複している可能性が示唆された。

#### (2)細胞周期に依存した空間形成に関する研究(研究テーマ2)

アクチン細胞骨格や細胞壁によって規定される出芽酵母の細胞形態は細胞増殖の過程で図1のように変化する。まずG1/S期の移行に伴いアクチン細胞骨格の極性形成や極性輸送が行われ、出芽が起こる。そして芽の成長が完了すると芽の根元にアクチン及びミオシンからなる収縮環が形成され、その収縮とその後の隔壁形成により新たな細胞を生じる。このように出芽酵母の形態形成は細胞周期に依存した厳密な制御を受けていると予想されるが、その分子レベルでのシグナル伝達経路は未解明な部分が多い。出芽酵母形態形成の中心因子であるRho1pは真核生物に広く保存された低分子量GTPaseであり、上流からのシグナルに応答して活性化型(GTP結合型)または不活性化型(GDP結合型)に変換され、下流へのシグナルのオン・オフを切り替える分子スイッチとして機能する。Rho1pの5つの標的タンパク質はいずれも直接的または間接的に細胞形態形成に関与しており、これらの標的タンパク質が制御する事象の中には細胞周期の時期特異的な調節を受けるものがあることが知られていたが、Rho1pそれ自体の活性化と細胞周期との関連については報告がなかった。そこで、本研究では細胞周期依存的なRho1p活性制御におけるシグナル伝達経路に着目し、出芽酵母形態形成メカニズムの一端を明らかにすることを目指した。

#### Rho1p活性化の細胞周期時期特異性ならびにG1/S期に

### おける Rho1p 活性化機構

細胞内の活性化型 Rho1p 量を検出するため、活性化型 Rho1p と特異的に結合する Pkc1p の Rho1p 結合部位とグルタチオン-S-トランスフェラーゼとの融合タンパク質 (GST-Pkc1RBD) を使用したプルダウン法を確立した。この GST-Pkc1RBD は不活性化型 Rho1p とは相互作用せず、活性化型 Rho1p のみを酵母細胞破碎液からプルダウンすることが確認された。

次に、細胞周期進行の過程における活性化型 Rho1p の量的変動を検討する目的で、細胞を G1 期で同調させ、その後細胞周期を再開させ時間を追ってプルダウンを行った。その結果、出芽時である G1/S 期に活性化型 Rho1p 量のピークが存在することがわかった。また、細胞周期の後半部分における活性化型 Rho1p の量的変動を調べるため、細胞を G2/M 期に同調させ、細胞周期を再開させて同様にプルダウンを行ったところ、細胞質分裂期にピークが存在することがわかった。さらに活性化型 Rho1p を特異的に認識する抗体を使用して細胞内局在を観察した結果、活性化型 Rho1p は G1/S 期に出芽部位、細胞質分裂期に収縮環近傍に局在することが明らかになった。

Rho1p の活性制御が細胞周期依存的になされることが示唆されたため、細胞周期制御因子の関与を検討した。出芽酵母の細胞周期は細胞周期を通じて一定量存在するサイクリン依存性キナーゼ (CDK) Cdc28p と、時期特異的に発現する九つのサイクリンとの複合体によって制御される。そこで、それぞれのサイクリンが活性化型 Rho1p 量に及ぼす影響を検討したところ、G1/S 期のサイクリンをコードする CLN2 の過剰発現により活性化型 Rho1p が増加することがわかった。さらに、M 期サイクリンをコードする CLB2 を破壊した細胞で活性化型 Rho1p が顕著に増加した。以上より活性化型 Rho1p は G1/S 期に Cln2p/Cdc28p 依存的に増加し、Clb2p/Cdc28p 依存的に減少し、細胞質分裂期に再び増加すると考えられる。

次に G1/S 期において Cln2p/Cdc28p 複合体から Rho1p 活性化へのシグナル伝達を仲介する因子の探索を行った。Rho1p と直接結合して活性を制御するタンパク質には、活性化因子である GDP/GTP 交換反応促進因子 (GEF)、

不活性化因子である GTPase 活性促進因子 (GAP)、そして不活性化型 Rho1p を安定化させる GDP 乖離反応抑制因子 (GDI) の三種類が知られている。そこでまず活性化因子 GEF の関与を検討した。Rho1p の GEF は Rom1p、Rom2p、Tus1p の 3 つが知られている。これらの因子のうち、Tus1p が C 末端側に Cdc28p によるリン酸化のコンセンサス配列を有することがわかった。そこで G1/S 期における Cln2p/Cdc28p 複合体からの Rho1p 活性化シグナルが Tus1p を介して伝達される可能性を検討した。

tus1 株の G1/S 期における活性化型 Rho1p 量をプルダウン法により調べたところ、野生株比べ顕著にピークが低下していた。さらに CLN2 過剰発現により対照の細胞では活性化型 Rho1p が増加するのに対し tus1 株では増加が見られなかったことから、Cln2p による活性化型 Rho1p 増加には Tus1p が必要であることが明らかになった。また Tus1-GFP は Cln2-HA/Cdc28p と共沈したことから、これらは細胞内で物理的に相互作用することがわかった。さらに Cdc28p によるリン酸化のコンセンサス配列を含む Tus1p の N 末端側 200 アミノ酸残基と GST との融合タンパク質 (GST-Tus1[N200]) を作製して精製し、これを基質とした in vitro のリン酸化実験を行った。その結果、GST-Tus1[N200] は Cln2p/Cdc28p 複合体によってリン酸化されることが示された。以上より、G1/S 期に Cln2p/Cdc28p 複合体が直接 Tus1p をリン酸化することで Rho1p が活性化されると考えられた。

### 細胞質分裂期における Rho1p 活性化機構

細胞質分裂期に Rho1p を活性化する因子の探索を行った。これまでに Rho1p が細胞質分裂期のアクチンリング形成に重要であることが示されていることから、Rho1p 活性化因子の変異株はアクチンリング形成に欠損を示すことが期待された。既知の細胞質分裂期を制御する因子のうち、M 期から細胞質分裂期の様々な事象を制御するボロキナーゼをコードする CDC5 変異株においてアクチンリング形成に欠損が見られるという報告がなされていたため、CDC5 の温度感受性変異株 (cdc5-2 株) 及びコントロールとして CDC15 の温度感受性変異株 (cdc15-2 株) を用いて活性化型 Rho1p の細胞内局在を検討した。これら二つの株はいずれも制限温度下において M 期後期で細

胞周期を停止させるが、この時 cdc15-2 株では活性化型 Rho1p の局在が収縮環近傍に見られた細胞が 65%であったのに対し、cdc5-2 株では 8%にまで低下していた。さらにブルダウン法により検討したところ、cdc15-2 株に比べ cdc5-2 株では活性化型 Rho1p 量が顕著に減少していた。以上の結果より、Cdc5p が細胞質分裂時における Rho1p 活性化を制御することが示唆された。

さらに、rom1 株、rom2 株、tus1 株でも M 期後期におけるアクチンリング形成率を調べたところ、rom2 株が重篤な欠損を示した。そこでブルダウン法で解析した結果、rom2 株の細胞質分裂時における活性化型 Rho1p 量は野生株に比べ顕著に減少していることがわかった。また、この時 Rom2-GFP は活性化型 Rho1p と同様に収縮環近傍に局在した。以上の結果より、細胞質分裂期における Rho1p 活性化は Cdc5p 及び Rom2p により制御されることが明らかになった。Rom2p が Cdc5p との結合モチーフ及び Cdc5p によるリン酸化のコンセンサス配列を有することから、Cdc5p と結合してリン酸化された Rom2p により Rho1p が活性化され、アクチンリング形成を導くことが考えられた。

本研究では出芽酵母細胞の形態形成に重要な低分子量 GTPase Rho1p の細胞周期依存的活性制御機構に着目し、その上流のシグナル伝達経路を明らかにした。Rho1p は G1/S 期のサイクリン/CDK 複合体である Cln2p/Cdc28p にリン酸化された Tus1p によって活性化され、アクチン細胞骨格の極性形成や細胞壁合成を始めとする様々な事象を制御することで、芽の成長に寄与する。その後 Rho1p は M 期のサイクリン/CDK 複合体である Clb2p/Cdc28p 依存的に不活性化された後、細胞質分裂期にボロキナーゼ Cdc5p 及び Rom2p により再び活性化され、アクチンリング形成など細胞質分裂に重要な事象を制御すると考えられる。このように Rho1p は細胞周期の各ステージにおいて特異的な活性制御を受け、細胞形態形成の主要な制御因子として機能することが明らかになった。

## 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 10 件)

Negishi T, Nogami S, Ohya Y. Multidimensional quantification of subcellular morphology of *Saccharomyces cerevisiae* using CalMorph, the high-throughput image-processing program. *J Biotechnol.* 2009 141(3-4): 109-17 査読有

Kozone I, Ueda J, Watanabe M, Nogami S, Nagai A, Inaba S, Ohya Y. Takagi M, Shin-ya K, Novel 24-membered macrolides, JBIR-19 and -20 isolated from *Metarhizium sp.* fE61. *Journal of Antibiotics* 2009, 62(3)159-62 査読有  
Ohnuki S, Nogami S, Ohya Y. A microfluidic device to acquire high-magnification microphotographs of yeast cells. *Cell Div.* 2009, 4:5Epub 査読有

Watanabe M, Watanabe D, Nogami S, Morishita S, Ohya Y. Comprehensive and quantitative analysis of yeast deletion mutants defective in apical and isotropic bud growth. *Curr Genet.* 2009 in press  
査読有

Kono 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, 19(4) 1763-71 査読有  
Ohnuki S, Nogami S, Kanai H, Hirata D, Nakatani Y, Morishita S, Ohya Y. Diversity of Ca<sup>2+</sup>-induced morphology revealed by morphological phenotyping of Ca<sup>2+</sup>-sensitive mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic Cell*, 2007, 6(5):817-30 査読有

Kikuchi Y, Mizuuchi E, Nogami S, Morishita S, Ohya Y. Involvement of small GTPase Rpo1p in cell size control in yeast. *FEMS Yeast Res.* 2007, 7(4):569-78 査読有

Fukuda T, Ohya Y. Ohta K, Conditional genomic rearrangement by designed meiotic recombination using VDE(PI-SceI) in yeast. *Mol Genet Genomics*, 2007, 278(4):467-78 査読有

Nogami S, Ohya Y. Yvert G, Genetic complexity and QTL mapping of yeast morphological traits. *PLoS Genet*, 2007, 3(2):e31 査読有

Ishihara S, Hirata A, Nogami S, Beauvais A, Latge JP, Ohya Y. Homologous subunits of yeast 1,3-beta-glucan synthase are important for spore wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae* *Eukaryotic Cell*, 2007 6(2):143-56 査読有

### [学会発表](計 17 件)

Nogami S, Ohya Y. Quantitative morphological analysis of heterozygous mutants of yeast essential gene, 2008 Yeast Genetics and Molecular Biology Meeting, 2008.7.24, Toronto, CANADA

Ohnuki S, Ohya Y. Development of high-throughput microphotography system using microfluidic chip for large-scale phenotyping in budding yeast, 2008 Yeast Genetics and Molecular Biology Meeting, 2008.7.24, Toronto, CANADA

Negishi T, Ohya Y. The investigations of roles of yeast karyopherins in coupling cell wall synthesis and cell cycle progression through cell wall integrity checkpoint, 2008

Yeast Genetics and Molecular Biology Meeting, 2008.7.24,  
Toronto, CANADA

Ohya Y, Quantitative morphological analysis of yeast cells,  
2008 Yeast Genetics and Molecular Biology Meeting,  
2008.7.24,  
Toronto, CANADA

Ohya Y, Use of CalMorph for drug discovery, ISCB2008  
29th Annual Conference of the International Society for  
Clinical Biostatistics, 2008.8.20, Copenhagen, Denmark

Ohnuki S, Ohya Y, High-throughput microphotography  
system using microfluidic chip in budding yeast, ISCB2008  
29th Annual Conference of the International Society for  
Clinical Biostatistics, 2008.8.20, Copenhagen, Denmark

平田 愛子、大矢禎一、高浸透圧に対する 1,3-β-グル  
カン層の役割に関する超微形態学的研究、日本植物形  
態学会第 20 回大会、2008.9.24、高知

野上 識、大矢禎一、Quantitative morphological analysis  
of heterozygous mutants of yeast essential gene、第31回日  
本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同  
大会、2008.12.11、神戸

菊地 陽、大矢禎一、出芽酵母の細胞壁チェックポイ  
ントにおけるHog1p MAPKリン酸化の役割、第31回日  
本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同  
大会、2008.12.11、神戸

大貫 慎輔、大矢禎一、マイクロ流体チップ上におけ  
る細胞形態の直接観察のための酵母細胞姿勢制御、第  
31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会  
合同大会、2008.12.11、神戸

Ohya Y, Cell wall integrity checkpoint that monitors cell  
wall remodeling in *Saccharomyces cerevisiae*, The first  
International Fungal / Plant Cell Wall Meeting, 2007年3月  
12日, Biarritz, France

Ohya Y, Dynactin and its interacting molecules are involved  
in cell wall integrity checkpoint of *Saccharomyces  
cerevisiae*, The 2nd International Workshop on Cell  
Regulations in Division and Arrest, 2007年3月23日, 沖縄

Ohya Y, Cell wall checkpoint that cell wall integrity  
in *Saccharomyces cerevisiae*, First International  
Symposium on Plant and Yeast Polysaccharides, 2007  
年 8 月 26 日, Angret, France

Ohya Y, Chemical genomics to understand cell  
morphology of *Saccharomyces cerevisiae*, Symposium  
on Systems Biology Initiative, 2007年 11 月 18 日, 東  
京

菊地 陽、大矢禎一、出芽酵母の細胞壁チェックポイ  
ントにおける HOG 経路の役割、第 30 回日本分子生物  
学会年会・第 80 回日本生化学会大会、2007 年 12 月  
11 日、横浜

大貫 慎輔、大矢禎一、出芽酵母における大規模表現  
型解析のためのハイスループット高倍率顕微鏡撮影  
用マイクロ流体チップの開発、第 30 回日本分子生物  
学会年会・第 80 回日本生化学会大会、2007 年 12 月  
11 日、横浜

野上 識、大矢禎一、定量的形態情報に基づく出芽酵  
母の QTL 解析、第 30 回日本分子生物 学会年会・  
第 80 回日本生化学会大会、2007 年 1 月 11 日、横  
浜

〔その他〕

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

## 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

なし

### (3)連携研究者

なし