

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K06641

研究課題名(和文) 出芽酵母におけるM期離脱シグナル伝達経路の非対称性の分子機構の解明

研究課題名(英文) Asymmetry in the Mitotic Exit Network in the budding yeasts

研究代表者

前川 裕美 (Maekawa, Hiromi)

九州大学・農学研究院・講師

研究者番号：80399683

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：モデル酵母*Saccharomyces cerevisiae*とは遠縁のメタノール資化酵母*Ogataea polymorpha*において、分裂後期のシグナル伝達経路とチェックポイントを解析した。モデル酵母と同様に、*O. polymorpha*のシグナル伝達経路はSPBに局在するが、キナーゼが一つ多く、またSPB局在には違いが見られた。モデル酵母とは異なり、*O. polymorpha*の2つのキナーゼは母細胞SPBにのみ局在・活性化されることが示唆された。本研究により、出芽酵母のシグナル伝達の分子構成・活性制御にはダイバーシティがあり、これらの変化は進化の比較的最近起こったことが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

モデル酵母*Saccharomyces cerevisiae*の細胞周期制御に重要なMEN、SPOCの分子制御機構については長年にわたり詳細に研究されてきたが、他の出芽酵母種での進化的保存性については十分な検証は行われてこなかった。本研究により、同じ子囊菌出芽酵母であってもシグナル伝達経路の分子構成・活性制御機構に違いが見られること、これらの違いが進化過程の比較的最近起こったことが明らかになったことは、分子機構の進化の理解に貢献するだけでなく、非モデル酵母の産業利用に向けた基礎生物学的研究の重要性を示したことに意義があった。

研究成果の概要(英文)：The Mitotic exit network (MEN) is a conserved signalling pathway essential for termination of mitosis in budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Most of MEN components are highly conserved in the methylotrophic budding yeast *Ogataea polymorpha*, but two essential kinases were identified, instead of Cdc15 kinase. The analysis of the conditional mutants for *OpHCD1* and *OpHcd2* revealed their roles in mitotic exit and cytokinesis. Unlike *ScCdc15*, the association of these two kinases with the SPBs is restricted to the SPB in the mother cell body, which suggests that the activation of these kinases may occur exclusively in the mother cell body. Such asymmetric SPB localisations are subject to different regulations to ensure the coordination of mitotic exit (ME)-signalling and cell cycle progression. Our study suggests that the diversity of the composition and molecular mechanisms to control the ME-signalling pathway occurred relatively recently during the evolution of budding yeast.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：Mitotic Exit Network yeast *Ogataea polymorpha* SPOC

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

細胞分裂においては、中心体は微小管形成中心 (MTOC) としてスピンドルに加えてアスター微小管形成も担っており、スピンドル配向制御に重要な役割を果たす。また、シグナル伝達経路などの様々な蛋白質相互作用の足場としての機能を果たしている。出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の分裂期離脱を制御するシグナル伝達経路 Mitotic Exit Network (MEN) は唯一の MTOC である SPB (Spindle Pole Body) に分裂期特異的かつ非対称に局在することが知られており、MEN 活性制御機構として、細胞膜局在蛋白質によって娘細胞側に活性化ゾーン、母細胞側に不活性化ゾーンが形成されるというゾーンモデルが提唱されていた。また、MEN の負の制御因子である Bub2-Bfa1 GAP 複合体の SPB 局在は娘細胞に偏った非対称性を示すが、スピンドル配向異常によりチェックポイント (SPOC) が活性化されると解消されることが知られている。このように、SPB 局在と非対称性は MEN 活性制御に重要であると考えられる。

酵母の SPB 複製は保存的であるためスピンドル両端を形成する 2 つの SPB には新旧があり、*S. cerevisiae* では古い SPB が選択的に娘細胞に挿入されるという分配様式をとることが知られている。正常な細胞分裂には MEN 非対称性が必須であると考えられるが、SPB 新旧は反転可能であり、MEN と SPB の非対称性の関係については不明な点が多い。細胞質微小管が重要であると考えられるが、*S. cerevisiae* では細胞周期を通じて細胞質微小管が機能していることに分子機構解明の困難さがあった。また、これらの非対称性が進化的に保存されているかについては検討されていなかった。これらの問題を解決するためには、*S. cerevisiae* とは進化的に離れた別の出芽酵母種での研究が必要であると考えられた。そこで、細胞周期毎に SPB 構造の一部が作り直され、分裂後期直前まで cMTs が不安定であるメタノール資化酵母 *Ogataea polymorpha* に注目した。

### 2. 研究の目的

- (1) MEN 非対称性の分子機構の解明と進化的保存性の検証
- (2) MEN 非対称性と関連するスピンドル配向チェックポイント (SPOC) の制御機構の解明

### 3. 研究の方法

(1) アミノ酸配列の相同性検索により、*O. polymorpha* の MEN のホモログを取得し、遺伝子機能欠損の表現型とタンパク質の細胞内局在を解析した。必須遺伝子の解析には、新たに作製した *O. polymorpha* 用のツールにより構築した条件欠失変異株を用いた。細胞内局在解析には GFP, RFP 等との融合遺伝子を構築し、生細胞での顕微鏡観察を行なった。

(2) 相同性検索により *O. polymorpha* の SPOC 因子ホモログを取得し、遺伝子機能欠損の表現型とタンパク質の細胞内局在を解析した。また、SPOC 因子の機能が進化的に保存されているかを検証するために、*S. cerevisiae* SPOC 欠損細胞中で *O. polymorpha* の SPOC 因子

ホモログを発現させた。

#### 4. 研究成果

(i) *O. polymorpha* の MEN 相同経路の構成遺伝子配列の取得: ホモロジー検索から *TEM1*, *BUB2*, *BFA1*, *CDC5*, *MOB1*, *DBF2* を同定した。また、*CDC15* キナーゼと類似性の高い 2 つのキナーゼ遺伝子を *HCD1*, *HCD2* とした。Hcd1 はアミノ酸配列・ドメイン構造から分裂酵母 SIN 経路を構成する Sid1 と類似しており、*O. polymorpha* は分裂酵母 SIN 経路と同様に 2 つのキナーゼを擁する MEN 相同経路を持つと考えられた。以下、Mitotic Exit Signaling (MES) 経路と称する。

(ii) 条件遺伝子欠失変異株構築と表現型の解析: *S. cerevisiae* の MEN と相違点が見られた 2 つのキナーゼの遺伝子を欠失させたところ、いずれも生育に必須であった。表現型解析には条件変異株が必要なため、ATP アナログ感受性変異 (as 変異) を導入したところ、1NM-PP1 存在下での増殖が著しく遅延する *hcd1-as* 変異株を取得した。*hcd1-as* 変異株は分裂後期遅延の表現型を示しており、M 期離脱制御に関与することが示唆された。Tet-OFF プロモーターを用いた遺伝子シャットオフ・システムとオーキシングロンを組み合わせた iAID システムを *O. polymorpha* 用に適合させたツールを作成し、iAID-*hcd2-as* 変異株を得た。薬剤添加により *hcd1-as* 変異株と同様の分裂後期遅延の表現型を示したことから、*HCD1*, *HCD2* は共に MES を構成する因子であることが示唆された (図 1)。

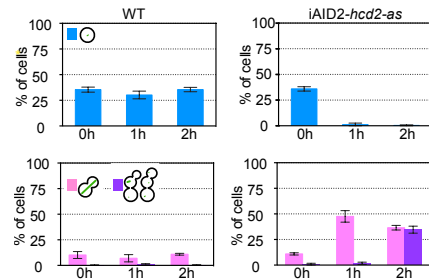


図 1 OpHcd2変異株は分裂後期が遅延する

(iii) MES 因子の細胞内局在の解析: GFP を用いて Hcd1, Hcd2 の細胞内局在を調べたところ、分裂後期に母細胞中の SPB にのみ集積していた (図 2)。このことは、両方の SPB に局在する *S. cerevisiae* の MEN キナーゼである Cdc15 と異なっており、*O. polymorpha* の MES 活性化制御では母細胞でのみ起こる可能性が示唆された。Hcd2 は Tem1 GTPase 活性化により SPB に局在するのに対して、Hcd1 の SPB 局在は Tem1 活性化に加えて分裂期キナーゼ Cdc5 (Polo キナーゼ) も必要である。*S. cerevisiae* Cdc15 キナーゼが SPB に局在するためには、Tem1 活性化と Polo キナーゼ活性の両方が必要であり、SPB の位置情報と細胞周期の情報を統合することが示されている。*O. polymorpha* の MES では前者を Hcd2 が、後者を Hcd1 が担っており、出芽酵母進化の過程で 2 つの Hcd キナーゼの役割が Cdc15 キナーゼに集約されたと考えられる。ゲノム情報から、出芽酵母の中で MEN 型経路を持つものは *S. cerevisiae* 近縁種に限られており、2 キナーゼ (Hcd1, Hcd2) → 1 キナーゼ (Cdc15) への変化は比較的新しい出来事であると考えられる。

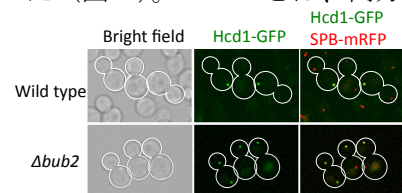


図 2 OpHcd1は分裂後期特異的にmSPBに局在する

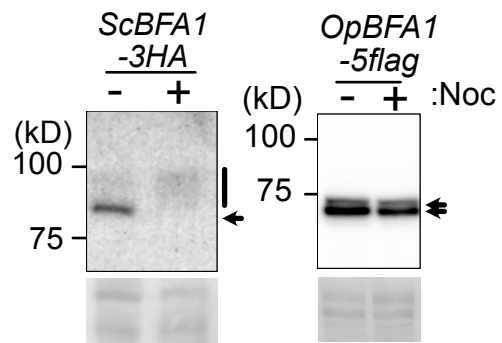
り SPB に局在するのに対して、Hcd1 の SPB 局在は Tem1 活性化に加えて分裂期キナーゼ Cdc5 (Polo キナーゼ) も必要である。*S. cerevisiae* Cdc15 キナーゼが SPB に局在するためには、Tem1 活性化と Polo キナーゼ活性の両方が必要であり、SPB の位置情報と細胞周期の情報を統合することが示されている。*O. polymorpha* の MES では前者を Hcd2 が、後者を Hcd1 が担っており、出芽酵母進化の過程で 2 つの Hcd キナーゼの役割が Cdc15 キナーゼに集約されたと考えられる。ゲノム情報から、出芽酵母の中で MEN 型経路を持つものは *S. cerevisiae* 近縁種に限られており、2 キナーゼ (Hcd1, Hcd2) → 1 キナーゼ (Cdc15) への変化は比較的新しい出来事であると考えられる。出芽による細胞分裂様式において、MEN 型と MES/SIN 型シグナル伝達の機能的な違

いがあるかは不明であり、今後の検討が必要である。

(iv) *O. polymorpha* のスピンドル配向チェックポイント：*S. cerevisiae* は SPOC 制御の鍵である Kin4 キナーゼと SPOC 機能を持たないパラログ ScFrk1 を持つのに対して、*O. polymorpha* はホモログが一つのみ存在する (*OpFRK1*)。高頻度にスピンドル位置・配向異常が生じる *Op\_kar9* 欠失変異のバックグラウンドでは、*Op\_bfa1* 欠失変異株と *Op\_frk1* 欠失変異株は共に増殖が遅延し、SPOC 欠損の典型的な細胞形態が観察された。*O. polymorpha* においても Kin4 様キナーゼと Bub2-Bfa1 GAP 複合体を必須因子とする SPOC 様の機構が働いていることが示唆された。

(v) SPOC の進化的保存性：*S. cerevisiae* 細胞中での *OpFRK1* 遺伝子高発現は細胞増殖を阻害し、その阻害効果は ScBub2-Bfa1 に依存することから、OpFrk1 は ScKin4 と相同の活性・機能をもつと考えられる。では、*S. cerevisiae* と同様に、Frk1 は Bfa1 を直接リン酸化して SPOC を活性化するのだろうか？ ScKin4 特異的な ScBfa1 リン酸化部位は OpBfa1 に保存されていないため、質量分析から OpBfa1 のリン酸化部位の同定したが、これまでにチェックポイントに重要な特異的リン酸化部位は見出せていない。電気泳動パターンからも OpBfa1 は ScBfa1 のような著しく高度なリン酸化を受けているとは考えられず (右図)、*O. polymorpha*

において Bfa1-Bub2 複合体は *S. cerevisiae* とは異なる制御を受ける可能性がある。これらの研究結果は、SPOC は出芽による細胞分裂に重要な進化的に保存された機構であること、SPOC の分子機構は進化過程で変遷した可能性を示している。進化的に離れた *S. cerevisiae* との比較により SPOC を活性化するシグナルの実体を明らかにすることを目指して、*O. polymorpha* の SPOC 分子機構の詳細を解明することが今後の課題である。



(vi) *S. cerevisiae* の KIN4 パラログ (*ScFRK1*) の細胞機能：*O. polymorpha* の *kar9 frk1* 二重変異株が示す増殖遅延の表現型は、*S. cerevisiae* の SPOC 因子である ScKIN4 によって抑圧されたが、非 SPOC 因子と考えられている *ScFRK1* によっても抑圧されることが分かった。そこで、*S. cerevisiae* において *kar9 kin4 frk1* 三重破壊株を作製したところ、*kar9 kin4* 二重破壊株よりも強い増殖遅延が見られた (図 3)。更に、顕微鏡観察から *ScFRK1* が SPOC に機能している

可能性が示唆された。これは *S. cerevisiae* だけを対象にした SPOC 研究では見逃されてきた点であり、今後の詳細な解析が必要である。

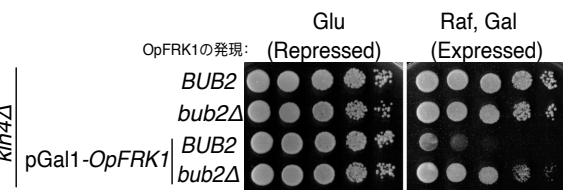


図3 *OpFRK1*過剰発現は*S. cerevisiae kin4Δ*株の増殖を阻害する

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Maekawa Hiromi, Jiangyan Shen, Takegawa Kaoru, Pereira Gislene	4. 巻 11
2. 論文標題 SIN-Like Pathway Kinases Regulate the End of Mitosis in the Methylophilic Yeast Ogataea polymorpha	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 1519
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cells11091519	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Fukunaga Takamasa, Tanaka Naotaka, Furumoto Toshio, Nakakita Shinichi, Ohashi Takao, Higuchi Yujiro, Maekawa Hiromi, Takegawa Kaoru	4. 巻 20
2. 論文標題 Characterization of N- and O-linked galactosylated oligosaccharides from fission yeast species	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 30172-9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbiosc.2020.03.008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Seike Taisuke, Maekawa Hiromi, Nakamura Taro, Shimoda Chikashi	4. 巻 132
2. 論文標題 The asymmetric chemical structures of two mating pheromones reflect their differential roles in mating of fission yeast	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Cell Science	6. 最初と最後の頁 jcs230722
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/jcs.230722	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Maekawa H, Takegawa K.	4. 巻 2132
2. 論文標題 Yeast Flocculin: Methods for Quantitative Analysis of Flocculation in Yeast Cells.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Methods Mol Biol	6. 最初と最後の頁 437-444
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/978-1-0716-0430-4_42	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fukunaga Takamasa, Ohashi Takao, Tanaka Yutaka, Yoshimatsu Tomoki, Higuchi Yujiro, Maekawa Hiromi, Takegawa Kaoru	4. 巻 134
2. 論文標題 Galactosylation of cell-surface glycoprotein required for hyphal growth and cell wall integrity in <i>Schizosaccharomyces japonicus</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 384 ~ 392
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbiosc.2022.07.014	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fukunaga Takamasa, Watanabe Masahiro, Nakamichi Yusuke, Morita Tomotake, Higuchi Yujiro, Maekawa Hiromi, Takegawa Kaoru	4. 巻 135
2. 論文標題 Mechanistic insights into <i>Schizosaccharomyces pombe</i> GT-A family protein Pvg3 in the biosynthesis of pyruvylated 1,3-galactose of N-linked oligosaccharides	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 423 ~ 432
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbiosc.2023.03.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fukunaga Takamasa, Sakurai Yuki, Ohashi Takao, Higuchi Yujiro, Maekawa Hiromi, Takegawa Kaoru	4. 巻 105
2. 論文標題 Overexpression of cell-wall GPI-anchored proteins restores cell growth of N-glycosylation-defective och1 mutants in <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Applied Microbiology and Biotechnology	6. 最初と最後の頁 8771 ~ 8781
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00253-021-11649-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fukunaga Takamasa, Tanaka Naotaka, Furumoto Toshio, Nakakita Shinichi, Ohashi Takao, Higuchi Yujiro, Maekawa Hiromi, Takegawa Kaoru	4. 巻 31
2. 論文標題 Substrate specificities of 1,2- and 1,3-galactosyltransferases and characterization of Gmh1p and Otg1p in <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Glycobiology	6. 最初と最後の頁 1037 ~ 1045
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/glycob/cwab028	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Maekawa Hiromi、Drummond Douglas R.	4. 巻 1
2. 論文標題 Microtubules in Non-conventional Yeasts	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Non-conventional Yeasts: from Basic Research to Application	6. 最初と最後の頁 237 ~ 296
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-3-030-21110-3_8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 前川 裕美、Lisa-Marie Heidemann、福山 和、Shen Jiangyan、竹川 薫、Gislene Pereira
2. 発表標題 メタノール資化酵母Ogataea polymorphaのM期制御機構の解析
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム第55研究報告会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 前川裕美
2. 発表標題 メタノール資化酵母Ogataea polymorphaのFlip-flop型接合型変換分子機構の解析
3. 学会等名 分子生物学会第45回年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 前川 裕美、Lisa-Marie Heidemann、福山 和、Shen Jiangyan、竹川 薫、Gislene Pereira
2. 発表標題 メタノール資化酵母Ogataea polymorphaのM期制御機構の解析
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム研究報告会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 前川裕美
2. 発表標題 メタノール産化酵母Ogataea polymorphaのFlip-flop型接合型変換分子機構の解析
3. 学会等名 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hiromi Maekawa
2. 発表標題 Mitotic exit may be regulated by a SIN-like signaling pathway in the budding yeast Ogataea polymorpha
3. 学会等名 the 15th International Congress on Yeasts (ICY) and the 30th International Conference on Yeast Genetics and Molecular Biologs (ICYGMB30) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 前川裕美
2. 発表標題 非モデル酵母におけるM期離脱シグナル伝達経路の解析
3. 学会等名 分子生物学会第43回年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 前川裕美
2. 発表標題 メタノール産化酵母Ogataea polymorphaのSPBに局在するSte20ファミリーキナーゼの解析
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム第52回研究報告会
4. 発表年 2019年



〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
ドイツ	University of Heidelberg			