

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 6 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24570214

研究課題名(和文)出芽酵母 *Hansenula polymorpha* における細胞核分配機構の解明研究課題名(英文) Mechanism of nuclear segregation in the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*

## 研究代表者

前川 裕美 (Maekawa, Hiromi)

大阪大学・工学(系)研究科(研究院)・寄附講座准教授

研究者番号：80399683

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：メタノール資化酵母 *Hansenula polymorpha* を細胞増殖や性分化の制御機構の解析を行った。まず、実験系の整備のために接合型決定機構の解析を行った。a型及びalpha型の2つの接合型遺伝子は同一染色体上に存在し、一方のみが発現していた。また、接合条件下では2つのMAT間領域の逆位によりMATの位置が交換されるという新規の接合型変換機構を明らかにした。また、他の出芽酵母とは異なり細胞周期初期には細胞核の位置が決まっていなかったことが分かった。細胞質微小管及びその機能する場であるSPBの構造や構成因子の解析から、SPBの細胞質側の構造と機能が細胞周期により制御されていることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：The methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* was established as a model system. Towards this end, I first investigated the previously uncharacterized mating type determination system and the mechanism of self-fertility, and revealed a novel mating type switching system where only one of two mating type loci is transcriptionally active and the chromosomal inversion of their intervening region causes the switching of the mating type identity. This chromosomal inversion-based mechanism represents a novel form of mating type switching that requires only two MAT loci. I also investigated the regulation of nuclear segregation. In *H. polymorpha*, unlike in other budding yeast, the nuclear position is not tightly regulated in early stages of the cell cycle, which is due to the poor function of cytoplasmic microtubules. Microscopic analyses of spindle pole bodies (SPB) suggested the structure and function of the cytoplasmic side of SPB is cell cycle regulated.

研究分野：細胞生物学

キーワード：酵母 細胞周期 微小管 接合型 メタノール資化酵母

## 1. 研究開始当初の背景

細胞分裂は染色体DNAをはじめ、細胞骨格や細胞内小器官などの様々な細胞内構造を含む細胞の全構成要素を二分割する過程である。染色体DNAは細胞分裂に先立って複製した後2等分されるため、2つの娘細胞は同一のコピーを持つ。一方、細胞核などの細胞内構造は必ずしも2等分割ではなく、非対称分裂においては非対称に分配される。つまり、これらの分配様式は細胞の極性や細胞分裂の対称性により調節されていると考えられる。出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は優れたモデル生物であり、染色体分配のみならず細胞内小器官の分配機構についての研究も盛んに行われ理解が進んでおり、細胞核の娘細胞への分配のためには微小管とアクチンという2つの細胞骨格系を協調させる機構が重要な役割を果たしている (Kar9 経路) ことが明らかになっていった。また、分配が完了するまで細胞周期の進行を停止させるスピンドル配向チェックポイントも機能しており、娘細胞への細胞核の分配を保証していることが知られていた。このような *S. cerevisiae* における細胞核の分配機構の概容は非対称分裂の一例として広く認知されているものの、これらの機構はどの程度、あるいはどの面が他の酵母にも共通のものであるかは検証されていなかった。実際、近縁の他種酵母のゲノム情報解析結果から、一部の因子は保存されていない可能性が考えられた。そこで、子囊菌酵母に共通の機構を理解するためには *S. cerevisiae* 以外の出芽酵母を用いた研究が有効であると考えられたが、細胞周期や細胞増殖の研究の多くは *S. cerevisiae* の近縁種で行われてきていた。

*Saccharomycotina* 亜門の中では *S. cerevisiae* とは進化的に離れた酵母として *Hansenula polymorpha* などのメタノール資化酵母が知られており、外来蛋白質生産などの産業的に有用な側面の研究が盛んであった。しかし、細胞増殖制御のモデル生物としての整備は十分でなかった。

## 2. 研究の目的

(1) *H. polymorpha* のモデル系としての整備を進める。

*H. polymorpha* は自家接合できるホモタリック株であるが、モデル系としての有用性を高めるために自家接合できないヘテロタリック株を作製をする。

*H. polymorpha* では不十分である薬剤耐性マーカーや迅速な融合遺伝子等の構築システムを整備する。

細胞内構造を蛍光タンパク質を用いて可視化する。

(2) *H. polymorpha* において細胞核が細胞周期のどの時期に娘細胞側に方向づけられ分配されるかを明らかにし、細胞核を分配する分子機構が保存されているかを明らかにする。*S. cerevisiae* における細胞核分配は、細胞骨格が関与する細胞核を娘細胞に引っ張る機構 (Kar9 経路) と、細胞核が娘細胞に達するまで細胞周期制を停止させるチェックポイント機構に分けることができる。近縁種のゲノム解析から、*H. polymorpha* においては、これらに関わる重要な因子の多くは保存されていると予想される。そこで、保存されている因子の細胞内での挙動と変異株の表現型を解析し、*H. polymorpha* の細胞核分配機構の分子実体を明らかにする。また、

*S. cerevisiae* においては、細胞核の分配には SPB が重要な役割を果たしているが、*H. polymorpha* では SPB 構成因子の保存性は低く、SPB の分子構成は大きく異なっていると考えている。そこで、電子顕微鏡を用いて SPB の構造を解析するとともに、SPB 構成因子を同定し、SPB の構造的な違いと機能的な共通性を対比させる。これにより、出芽酵母の非対称分裂を成功させるために重要な要因を明らかにする。

### 3. 研究の方法

#### (1) *H. polymorpha* のモデル系としての確立

ヘテロタリック株の単離：*H. polymorpha* はホモタリックであるが、遺伝学的解析のためには自家接合性を持たないヘテロタリック株の方が有利である。そこでヘテロタリック株の単離を目指して、まず、胞子形成培地上で接合・減数分裂が不能になった変異株の中から、野生型株との交雑では接合・減数分裂能を示すものを選択する。*H. polymorpha* の接合型はそれぞれ 2 つのアレルを持つ 2 つの接合型遺伝子座により決定されているが、このうちの 1 つは塩基配列は既に報告されている。そこで、候補変異株の接合型遺伝子座の塩基配列を検討し、接合型変換が起こらなくなっている変異株を選択する。

新たな薬剤耐性マーカーの導入と各種タグ用カセットシリーズの構築：*S. cerevisiae* で確立しているものを参考に、遺伝子破壊や各種タグ用のカセットシリーズを構築し研究の効率化を目指す。予備的実験から *H. polymorpha* は多くの抗生物質に感受性を示すことが分かっている。そこで、既存の耐性遺伝子のプロモーターを改変し *H.*

*polymorpha* 細胞中で発現する新たな薬剤耐性遺伝子を構築する。次に、各種タグと薬剤耐性遺伝子を隣接させた「カセット」のシリーズを構築し、PCR を用いた迅速な染色体上の遺伝子改変法を確立する。

細胞周期の同調法の確立：細胞周期の同調は細胞核分配の研究には必須である。そこで、*S. cerevisiae* での手法を参考に、CDC20 遺伝子などの細胞周期制御因子の活性を制御することにより細胞周期を停止・再開できる細胞を構築する。この方法でうまく同調できない場合には、栄養飢餓条件により増殖停止を誘導する方法も試みる。

細胞内構造の可視化：チューブリン、ヒストン、核膜孔蛋白質と蛍光蛋白質との融合蛋白質を細胞内で発現させ、微小管、染色体、核膜のマーカーとする。これらを用いて細胞核分配を生細胞中で経時的に観察する実験系を確立する。

#### (2) Kar9 経路およびスピンドル配向チェックポイントに関わる因子の単離と解析

Kar9 経路に関わる因子群 (Kar9, Bim1, Cdk1, Cib4, Myo2, Kip2) およびのスピンドル配向チェックポイント因子 (Bub2/Bfa1, Kin4, Spc72) の *H. polymorpha* における相同遺伝子を、アミノ酸配列やゲノム上の遺伝子配置の類似性に基づいて同定し、PCR により遺伝子を取得する。これらの遺伝子破壊株を作成し、表現型を調べる。また、細胞内局在を明らかにするために GFP 融合遺伝子を作成し、*H. polymorpha* ゲノムに挿入した細胞を作成し、GFP 融合蛋白質の細胞周期における細胞内局在変化、細胞周期の進行と細胞核分配をタイムラプスにより観察する。

### (3) SPB 構成因子の同定および機能解析

*S. cerevisiae* では細胞核分配には SPB が重要な役割を果たしている。他種酵母で用いられている固定法・染色法を参考に、電子顕微鏡を用いて *H. polymorpha* の SPB 構造を観察する。大きさや形の変化及び SPB 複製の時期に注目して解析を行う。

SPB の構造と機能解析を行う構成因子を同定し、遺伝子破壊株の表現型を解析する。酵母の SPB は一般的に細胞機能は保存されているが構成蛋白質の保存性は低い。*H. polymorpha* のゲノムには SPB 構成因子の相同遺伝子は見つかっていない。しかし、チューブリン複合体サブユニットである Spc97 蛋白質は保存されている。そこで、GST-pull down 法などの生化学的手法及び酵母 Two-hybrid 法を用いて、Spc97 蛋白質と相互作用のある因子を単離・同定する。得られた候補蛋白質の GFP 融合蛋白質の局在を蛍光顕微鏡を用いて調べ、SPB の細胞質側に局在する因子を選別する。これら因子の遺伝子破壊株を作成し、細胞周期の進行及び細胞核分配に欠損が見られるかを調べる。

## 4. 研究成果

### (1) *H. polymorpha* の細胞増殖研究のための分子細胞生物学的解析ツールの確立

遺伝子破壊や蛍光タンパク質等のタグを付与するための Tool-box の整備を行った。既に使用されているゼオシン耐性マーカーの他に、新たに *S. cerevisiae* で使われているハイグロマイシン耐性遺伝子、clonNAT 耐性遺伝子が選択マーカーとして有効に使用できることを確かめた。また、*S. cerevisiae*

で用いられている G418 耐性を付与する kanMX6 遺伝子は *H. polymorpha* では耐性付与の効率が低かったが、*H. polymorpha* の *TEF1* 遺伝子プロモーターを用いることにより効率を改善することができた。

遺伝子破壊を効率よく行うためには非相同性組換えを抑制された Ku80 遺伝子破壊株を用いることが有効であることが報告された。しかし、Ku80 遺伝子破壊株では減数分裂後の孢子生存率が著しく低いため、二倍体を親株とした遺伝子破壊には適さなかった。そこで、で確立した複数の薬剤耐性マーカーを組み合わせることで野生型 Ku80 遺伝子を再導入するという手順を確立した。これにより、増殖遅延の表現型等により一倍体では遺伝子破壊が困難な遺伝子についても破壊株の作製を効率よく行うことが可能となった。

*H. polymorpha* のドラフトゲノム配列から alpha-チューブリン (HpTUB1)、ヒストン H3 (HpHHT1)、セントロメア特異的ヒストン CENP-A の相同遺伝子 (HpCNP1)、Sfi1 蛋白質などの SPB 構成因子を見だし、GFP との融合遺伝子を作製することにより微小管、ゲノム DNA、セントロメア領域、SPB の可視化に成功した。

### (2) *H. polymorpha* の接合型変換機構の解明 接合型遺伝子座の同定と接合型遺伝子の機能解析

ドラフトゲノム配列解析を行なった結果、既に報告されていた接合型遺伝子座の近傍に第二の接合型遺伝子座を新たに見出した。2つの遺伝子座中の5つの接合型遺伝子の遺伝子破壊株を各々作製し、接合・減数分裂へ

の影響を調べたところ、a2 及び alpha1 は接合に必要であり、a1 及び alpha2 は減数分裂に必要であった。

逆位による新規接合型変換機構の解明  
RNA 解析により一倍体細胞では2つの接合型遺伝子座の一方のみが転写発現していることが分かった。異なる接合型遺伝子を発現している株間のゲノム構造を比較したところ、2つの接合型遺伝子座を含む約18 kbの染色体領域に逆位が見られ、セントロメア遠位の接合型遺伝子座のみが発現することが分かった。この領域の逆位は2つの接合型遺伝子座の染色体上の位置を交換するが、その結果として接合型が変換していた。さらに、逆位は接合条件である栄養飢餓により誘導されることが分かった。これらの結果から *H. polymorpha* では2つの接合型遺伝子の逆位による新規の機構により接合型変換を行うことによりホモタリズムの形質を示すことが明らかになった。更に、逆位不能変異株を作製することによりヘテロタリック株の取得にも成功した。

### (3) *H. polymorpha*の細胞周期特異的な細胞質微小管制御

*S. cerevisiae* では細胞核は分裂中期にはバッドネックと呼ばれる将来の細胞質分裂部位近傍に位置することが知られている。しかし、*H. polymorpha* の細胞核はG1期から分裂後期開始まで母細胞中にランダムに位置していることが分かった。そこで、細胞周期における微小管配置を検討したところ、特にG1期からG2期初期にかけて細胞質微小管が著しく少なくなっていた。このことは細胞周期における微小管の制御に違いが見ら

れることを示唆している。

*S. cerevisiae* のSPB局在を示す因子の相同蛋白質の中で、Sfi1、Mps3、ガンマチューブリン複合体は細胞周期を通じて常にSPBへの局在が見られるのに対して、Spc72はG1期やG2期初期にはSPBへの局在性は低いが分裂後期直前になるとSPBによく集積していた。このことからSPB因子の一部は細胞周期に依存した局在制御を受ける可能性が示唆された。そこで、SPC72遺伝子を構成的な発現プロモーターを用いて野生型細胞中で構成的に発現させたところ、G1期においてもSPBに局在が見られ、細胞核の細胞内配置に変化が見られた。このことから細胞質微小管機能は、SPB因子の発現又は局在を制御することにより細胞周期依存的に調節されている可能性を示唆している。

G1期と分裂後期のSPBの構造を電子顕微鏡観察により比較したところ、細胞質側の外層の構造に違いが見られることが明らかになった。これらの結果は *H. polymorpha* ではSPBの細胞質側の構造と機能が細胞周期依存的に制御されていることを示唆している。これまで子囊菌酵母のモデルである *S. cerevisiae* を用いた研究から、他の真核細胞とは異なり出芽酵母ではSPBの構造は細胞周期で変化しないと考えられてきた。しかし、①-③の結果は *H. polymorph* に見られるSPBの活性制御を介した微小管機能制御は広く出芽酵母種に広く保存されている可能性を示している。

## 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 1 件)

Hiromi Maekawa and Yoshinobu Kaneko.  
Inversion of the chromosomal region  
between two mating type loci switches the  
mating type in *Hansenula polymorpha*. *PLoS  
Genetics* Vol.10 Issue 11. e1004796 (2014)  
doi: 10.1371/journal.pgen.1004796

〔学会発表〕(計 8 件)

結川直哉、中塚比呂記、周 瑩、中西洋  
一、前川裕美、金子嘉信、原島俊「メタノー  
ル資化酵母におけるリン酸シグナル伝達系  
遺伝子の遺伝学的同定」第35回日本分子生  
物学会年会、福岡

Hiromi Maekawa, Yoshinobu Kaneko ' The  
mode of nuclear segregation in the  
methylotrophic yeast *Hansenula  
polymorpha* '

第35回日本分子生物学会年会、福岡、

前川裕美、金子嘉信 「メタノー  
ル資化酵母の接合型遺伝子座の構造と転写解析」  
第8回ゲノム微生物学会、東京

前川裕美、金子嘉信 「メタノー  
ル資化酵母 *Hansenula polymorpha* における細胞核  
分配機構」酵母遺伝学フォーラム第46回研  
究報告会、仙台

前川裕美、金子嘉信 「メタノー  
ル資化酵母 *Hansenula polymorpha* の性決定とホモ  
タリズムの機構」酵母遺伝学フォーラム第47  
回研究報告会、東京

Hiromi Maekawa, Yoshinobu Kaneko  
' Inversion of the chromosomal region  
between two mating type loci switches the  
mating type in *Hansenula polymorpha* ' EMBO  
Conference series: Experimental  
Approaches of Evolution and Ecology,  
Heidelberg, Germany

前川裕美、金子嘉信 「メタノー  
ル資化酵母 *Hansenula polymorpha* の性決定と接合

型変換機構」第37回日本分子生物学会年会、  
横浜

Hiromi Maekawa, Yoshinobu Kaneko  
' Inversion-based mechanism of mating  
type switching in *Hansenula polymorpha* '  
The 28<sup>th</sup> Fungal Genetics Conference,  
Pacific Grove, USA

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

前川 裕美 (Maekawa, Hiromi)  
大阪大学・大学院工学研究科・寄附講座准  
教授  
研究者番号: 80399683

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし