

## 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24年 5月 7日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2011

課題番号：20380063

研究課題名（和文） 酵母の細胞極性制御に関する基礎および応用研究

研究課題名（英文） Basic and applied research on cell polarity control in yeast

研究代表者

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

研究成果の概要（和文）：

本研究では、酵母を用いて、細胞極性と細胞周期との連携制御機構について解析した。具体的には、細胞極性の確立・維持に重要な MOR 経路において、新規な構成分子を同定し、また、MOR 経路と細胞質分裂の開始を制御する SIN 経路とのクロストークが M 期から間期への移行制御に重要であることを示した。さらに、カルシニューリンが DNA 複製チェックポイントと微小管依存的細胞極性変換制御系とをつなぐ、新規経路（CCT 経路：Cds1-Calcineurin-TIPs）を見いだした。本経路のすべての構成分子は進化上保存されていることから、本経路がヒトにも存在し、かつ、本知見が癌の治療法の開発など医療分野に役立つことを期待している。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we analyzed the coordinated regulation between cell polarity and the cell cycle in yeast. We have identified a novel molecule in the MOR (Morphogenesis Orb6 Network) pathway that is important for establishment/maintenance of cell polarity in fission yeast, and showed that the mitosis-to-interphase transition is coordinated by crosstalk between the SIN (Septation Initiation Network) and MOR pathways. Further, we found a new CCT (Cds1-Calcineurin-TIPs) pathway, in which calcineurin ensures a link between the DNA replication checkpoint and microtubule-dependent polarized growth in fission yeast. As all the molecules in the CCT pathway are conserved ubiquitously, it is hoped that the similar mechanism is operational in human beings and new cancer therapeutics would be developed based upon this finding.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
2009年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2010年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2011年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
年度			
総計	14,800,000	4,440,000	19,240,000

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物化学

キーワード：情報伝達、細胞極性、チェックポイント

## 1. 研究開始当初の背景

すべての真核細胞は固有の細胞形態を有し、それは細胞の機能と密接に関係している。

細胞形態を決定する重要な因子が細胞極性である。細胞極性は細胞周期と連動し、適切に制御されることから、両者の連携制御機構

の存在が示唆されるが、その詳細は不明な点が多い。我々は、ヒトのモデル生物である酵母に着目し、細胞極性と細胞周期との連携制御機構を解析してきた。分裂酵母の細胞極性は、細胞周期の3つのステージ（1：確立・維持、2：変換/NETO、3：消失）で制御される（図1）。

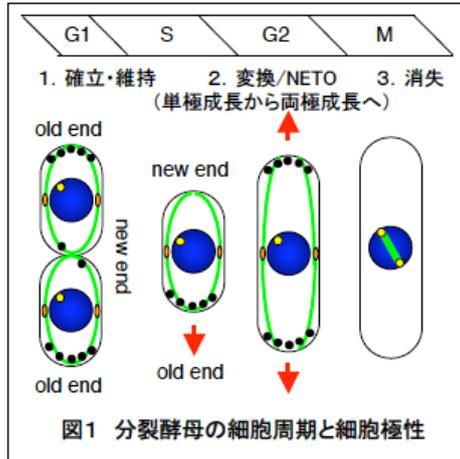


図1 分裂酵母の細胞周期と細胞極性

近年の我々の解析から、細胞極性の確立・維持に必須な MOR (Morphogenesis Orb6 Network: Pmo25-Nak1-Mor2-Orb6) 経路を見だし（図2）、MOR 経路が SIN (Septation Initiation Network) 経路により制御されることを示した。しかし、両経路のクロストーク、その生理的意義は不明であった。また、細胞極性の変換/NETO の遂行には、DNA 複製の完了が必要なことから、この時期に、DNA 複製と細胞極性制御とをつなぐシグナル経路の存在が示唆されてきたが、その実体は不明であった。

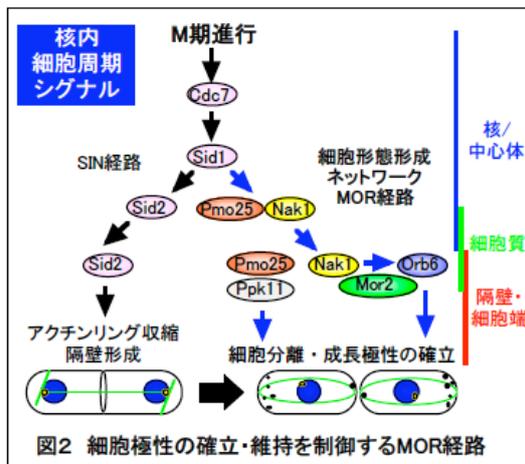


図2 細胞極性の確立・維持を制御するMOR経路

## 2. 研究の目的

本研究では、分子遺伝学的解析手法が可能な酵母を用いて、従来の細胞極性制御機構の解明をさらに進めるとともに（基礎研究）、その成果を、細胞極性制御に重要なシグナル伝達分子を標的とする生理活性物質探索系へと展開する（応用研究）。

## 3. 研究の方法

酵母を用いた分子遺伝学的解析手法により、細胞極性制御機構の解明（基礎研究）とその成果の医薬探索系への利用（応用研究）を目指す。具体的には、以下の3つのテーマを設定し研究を展開した。1）細胞極性の確立・維持に必須な MOR 経路の下流分子の同定と SIN 経路とのクロストークの生理的意義の解明、2）細胞極性の変換/NETO の制御機構の解明、3）細胞極性制御分子を標的とする医薬探索系の開発。各々のテーマについて、遺伝学・生化学・分子生物学・細胞生物学、全ての手法を駆使し、解析を進めた。

## 4. 研究成果

主要な研究成果の概要を項目毎に記載する。  
1) MOR 経路の新規分子の同定（発表論文7、図2）

MOR 経路の下流分子として、新規 GCK/Ppk11 を同定した。本分子は Pmo25 と結合し、細胞形態形成機構（細胞分離・成長極性の確立）において MOR 経路の補助的機能を担うことを示した。

2) MOR 経路と SIN 経路とのクロストークの生理的意義の解明（発表論文6、8、図3）

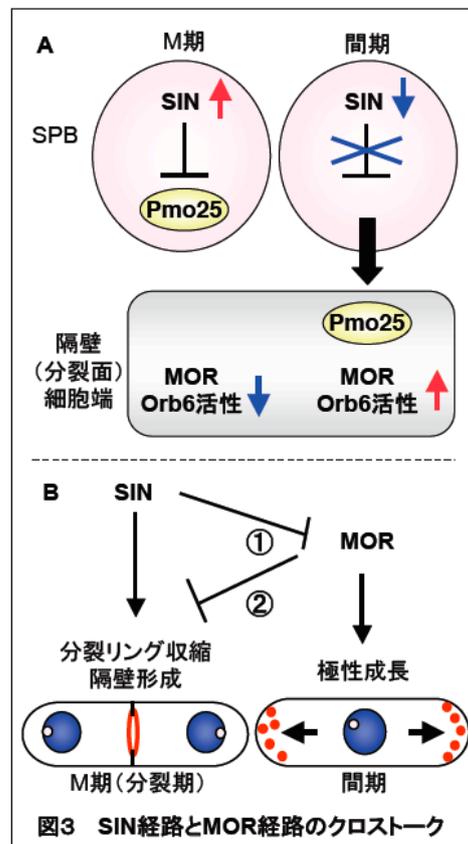


図3 SIN経路とMOR経路のクロストーク

MOR 経路の最上流分子 Pmo25 は、M 期には SPB に局在し、間期には隔壁部位あるいは細胞端に局在する。また、MOR 経路の下流分子である Orb6 のキナーゼ活性は、M

期では低く、間期では高くなる。さらに、SIN 経路は、M 期での Pmo25 の SPB への局在と、間期での Orb6 キナーゼの再活性化に重要である (図 3 A)。そこで、MOR 経路と SIN 経路とのクロストークの生理的意義を解析するため、間期で SIN 経路を構成的に活性化し、MOR 経路への影響を調べた。その結果、SIN 経路の構成的活性化は、Pmo25 の SPB への局在と Orb6 キナーゼ活性の低下、さらに、細胞極性欠損を誘導した。また、SIN 経路の変異体での分裂リング収縮の欠損は、MOR 経路の変異により抑圧された。以上より、M 期において SIN 経路は MOR 経路を阻害することにより、分裂リング収縮に続く隔壁形成を推進し、一方、間期では、MOR 経路が分裂リング収縮を阻害し極性成長を促進していることが示唆された (図 3 B)。つまり、MOR 経路と SIN 経路とのクロストークが、M 期から間期への移行制御に重要であることがわかった。

### 3) DNA 複製と細胞極性変換制御系をつなぐ新経路の発見 (発表論文 1, 5, 図 4)

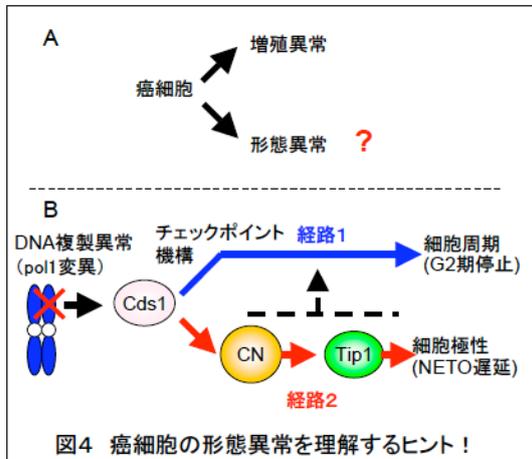


図 4 癌細胞の形態異常を理解するヒント!

癌細胞では増殖異常とともに形態異常も示す。その増殖異常は、チェックポイント経路による細胞周期調節機構の欠損に起因するが、形態異常の原因は不明な点が多い (図 4 A)。

我々は、高温で単極成長様式 (NETO 遅延) のまま増殖停止する DNA polymerase- $\alpha$  変異体の NETO 遅延機構を解析した。その結果、DNA 複製異常時に、チェックポイント経路の Cds1 キナーゼが、カルシニューリン (CN) をリン酸化することにより活性化し、続いて、CN が微小管末端結合分子 + TIPs の構成分子 Tip1 を脱リン酸化することにより、微小管から細胞端への Tip1 の移動を妨げ、結果として、微小管ダイナミクスの低下を伴う、NETO 遅延を誘導することを見いだした (図 4 B)。本経路 (CCT 経路: Cds1-Calcineurin-TIPs) の発見により、チェックポイント経路が細胞周期のみならず細胞極性をも制御することを示した。さらに、

本経路のすべての構成分子は、ヒトにも存在することから、従来、不明であった、癌細胞の形態異常を理解するヒントになるのではないかと期待している。

### 4) 細胞極性の変換制御関連分子の探索 (発表論文 9)

成長極性の変換制御に重要なキナーゼを、非必須キナーゼ破壊体ライブラリーから、網羅的に探索した。その結果、NETO 遂行の正および負の制御因子や、さらに、G1 期の単極成長の維持に必須な因子など、それぞれ複数の候補キナーゼを選抜した。

### 5) 細胞極性制御分子を標的とする医薬探索系の開発 (特許出願 1 件)

出芽酵母を用いて、カルシニューリン活性を抑制する物質のスクリーニング方法を開発した。

### 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)

1. Kume Kazunori, Koyano Takayuki, Kanai Muneyoshi, Toda Takashi, and Hirata Dai, Calcineurin ensures a link between DNA replication checkpoint and microtubule-dependent polarized growth, *Nature Cell Biology*, 査読有, 13, 2011, pp234-242
2. Ikebe Chio, Konishi Manabu, Hirata Dai, Matsuoka Takahiro, and Toda Takashi, Systematic localization study on novel proteins encoded by meiotically up-regulated ORFs in fission yeast. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 査読有, 75, 2011, pp2364-2370
3. Tsubakiyama Ryohei, Mizunuma Masaki, Gengyo Anri, Yamamoto Josuke, Kume Kazunori, Miyakawa Tokichi, and Hirata Dai, Implication of Ca<sup>2+</sup> in the regulation of replicative life span of budding yeast, *J. Biol. Chem.*, 査読有, 286, 2011, pp28681-28687
4. 水沼正樹, 平田 大, 出芽酵母の寿命研究の現状と展望, *日本醸造協会誌 (日本醸造学会)*, 査読無, 106, 2011, pp794-800
5. 久米一規, 平田 大, DNA 複製と細胞極性をつなぐ経路 癌細胞の異常な形を理解するヒント!, *細胞工学 (秀潤社)*, 査読無, 30, 2011, pp854-855
6. 久米一規, 五島徹也, 平田 大, 分裂酵母の 2 つの Hippo 関連経路のクロストーク, *実験医学 (羊土社)*, 査読無, 29, 2011, pp445-448
7. Goshima Tetsuya, Kume Kazunori, Koyano Takayuki, Ohya Yoshikazu, Toda Takashi,

- and Hirata Dai, Fission yeast Germinal Center (GC) kinase Ppk11 interacts with Pmo25 and plays an auxiliary role in concert with the morphogenesis Orb6 network (MOR) in cell morphogenesis, *J. Biol. Chem.*, 査読有, 285, 2010, pp35196-35205
8. Ray Samriddha, Kume Kazunori, Gupta Sneha, Ge Wanzhong, Balasubramanian Mohan, Hirata Dai, and McCollum Dannel, The mitosis-to-interphase transition is coordinated by crosstalk between the SIN and MOR pathways in *Shizosaccharomyces pombe*, *J. Cell Biol.*, 査読有, 190, 2010, pp793-805
9. Koyano Takayuki, Kume Kazunori, Konishi Manabu, Toda Takashi, and Hirata Dai, Search for kinases related to transition of growth polarity in fission yeast, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 査読有, 74, 2010, pp1129-1133
10. Kobayashi Yoshifumi, Inai Tomomi, Mizunuma Masaki, Okada Ichitaro, Shitamukai Atsunori, Hirata Dai, and Miyakawa Tokichi, Identification of Tup1 and Cyc8 mutations defective in the responses to osmotic stress, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 査読有, 368, 2008, pp50-55

[学会発表] (計3件)

1. Kume Kazunori, and Hirata Dai, The signaling pathway linking DNA replication to cell polarization, The 6th International Fission Yeast Meeting, 25-30 Jun 2011, Boston U.S.A.
2. Kume Kazunori, and Hirata Dai, The signaling pathway linking DNA replication to cell polarization, The 6th UK-Japan Cell Cycle Workshop, 10-14 Apr 2011, Ambleside UK
3. Kume Kazunori, and Hirata Dai, Growth polarity control through regulation of microtubule plus-end tracking proteins by checkpoint kinase, The 5th International Fission Yeast Meeting, 26-31 Oct 2009, Tokyo Japan

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: カルシニューリン活性を抑制する物質のスクリーニング方法

発明者: 平田 大、水沼正樹、久米一規

権利者: 広島大学

種類: 特許

番号: 特願 2012-046380

出願年月日: 2012年3月2日

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

<http://www.hiroshima-u.ac.jp/adsm/bio/saibou/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

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

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号:

### (3) 連携研究者

水沼 正樹 (MIZUNUMA MASAKI)

広島大学・大学院先端物質科学研究科・准教授

研究者番号: 10343295

久米 一規 (KUME KAZUNORI)

広島大学・大学院先端物質科学研究科・助教

研究者番号: 80452613