

出芽酵母の定量的な細胞形態に基づくグルカン合成酵素 Fks1p の機能解析

2010 年 3 月修了 先端生命科学専攻 岡田啓希 47-086314

生命応答システム分野 指導教官: 大矢禎一 教授

キーワード: *Saccharomyces cerevisiae*, cell wall, CalMorph, glucan synthesis

【序論】

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の Fks1p は、細胞壁の主要な構成成分を合成する 1,3-β-グルカン合成酵素 (GS) の触媒サブユニットである。したがって *FKS1* の欠損株は、グルカンの低下などの細胞壁に関する異常な表現型を示すが、同時に細胞壁とは無関係なエンドサイトーシスの異常も引き起こす。このことから Fks1p は多機能タンパク質であると考えられてきたが、分子内機能ドメインの同定や、機能同士の関係については明らかにはなっていない。

タンパク質の機能解析において、機能の欠損により引き起こされる表現型を指標とする遺伝学は有効な手段の 1 つである。しかしながら、多機能タンパク質の場合、その遺伝子の完全な欠損は複数の機能の欠損をもたらして複雑な表現型を引き起こすことから、解析が難しい。そのため多機能タンパク質の機能解明には点突然変異株の表現型解析が有効である。実際に複数の点突然変異株を用いて、表現型の違いに基づきカルモジュリン (Ohya and Botstein, 1994) や Rho1p (Saka *et al.* 2001) の細胞内機能の分類が可能であることが明らかになった。

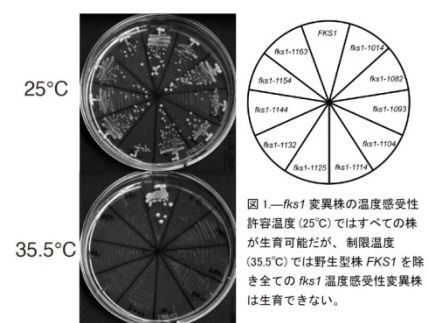
このような多機能タンパク質の突然変異を解析する上では、定量的な解析が有効である。ここで酵母の細胞形態は、細胞内イベントと密接に関係する表現型であること、さらに細胞内構造の蛍光顕微鏡画像および画像解析プログラム (CalMorph) を用いることで、定量的な情報として扱えることから、多機能タンパク質の表現型解析に適していると考えた。近年、遺伝子欠損株の定量的な形態情報を基に、それらの特徴の類似性を指標にして分類することで、機能的に関連する遺伝子クラスを検出できることが示されている (Ohnuki *et al.* 2007)。そこで本研究では、複数の *fks1* 温度感受性点突然変異株を、定量的な形態情報を指標にして分類することで、機能的に関連する変異位置を同定し、得られたドメインに関して生化学的および分子生物学的アプローチと組み合わせて Fks1p の機能解析を行った。

【結果と考察】

I. 複数の *fks1* 変異株の細胞形態の定量化と分類

Fks1p の複数の機能を分類し理解するために、本研究室で単離した 10 種類の *fks1* 温度感受性変異株を用いた。この株は、*FKS1* のホモログであり機能的に重複した *FKS2* を欠損させた上で、*FKS1* 遺伝子に点突然変異を導入した株である。これら

10 種類の *fks1* 温度感受性変異株を細胞形態の類似性に基づいて分類することにした。予期せぬ突然変異による細胞形態への影響を抑えるために、1 倍体変異株を掛け合わせてホモ 2 倍体の株を作成した。2 倍体株を増殖が阻害される温度条件 (35.5°C, 図 1) で培養、固定、染色を行った後に、蛍光顕微鏡画像を繰り返し (撮影 1 回につき 200 細胞以上、野生型株 20 回、変異株 5 回) 撮影した。得られた画像を基に、CalMorph を用いて細胞内構造 (細胞外形、核、アクチン細胞骨格) に関する 501 種類の定量的な情報 (パラメータ) を取得した。全パラメー



タのうち約半数は、正規分布に従わない性質をもつため、全パラメータの値をクラスカル・ウォリスの統計量を修正した順位和に基づく変数に変換することにより正規分布に近似した。変換した値を基に、細胞形態の類似性に基づくクラスター分析を行ったところ3つのクラスが検出された(図2)。各クラスでは、温度感受性の原因となる変異の位置が互いに近接していた(図3上)。さらにクラスごとに特徴的な細胞形態を示したことから(図3下)、Fks1pがドメインごとに異なる機能を持っていることが示唆された。

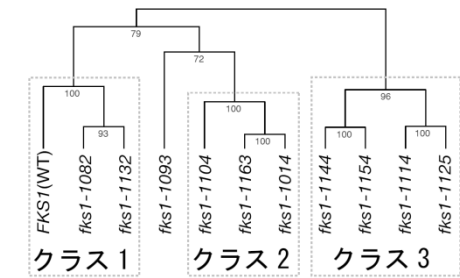


図2—*fks1* 変異株の細胞形態の類似性に基づくクラスター分析
マルチスケールブートストラップ法 ($p > 0.95$)

II. 各クラスにおける特徴的な表現型(図3)

上記解析によりドメインごとに異なる機能を持つことが示唆されたので、形態以外の表現型との比較を行い、各クラスにおける特徴的な表現型と機能との関係について調べた。クラス1に分類された2つの変異株は、*in vivo* のグルカン合成基質の取り込み量が低下していたことから、細胞内におけるグルカン合成に異常を示すことが明らかになった。クラス2に分類された3つの変異株は、アクチンの脱局在および大きく丸い細胞形態を示し、アクチン細胞骨格と非依存的に制御されるタンパク質 Spa2p の脱局在が見られたことから、細胞極性の喪失が示唆された。また、エンドサイトーシスの異常も観察された。クラス3に分類された4つの変異株は *in vitro* および *in vivo* で GS 活性が低下していた。また、エンドサイトーシスの異常も観察された。

III. 定量的な細胞形態を用いた関連解析

CalMorph を用いた形態情報の定量化の利点として、分類だけでなくその他の定量的な表現型との統計的な関連解析を行うことが出来る点が挙げられる。本研究で得られた形態情報パラメータの値と *in vitro* GS 活性の値との間の因果関係を調べたところ、GS 活性とアクチンの局在との間の相関関係が示された。実際に、野生型株を GS 阻害剤 (Echinocandin B) で処理することで、用量依存的にアクチンの脱局在が起きたことから GS 活性に依存したアクチン局在制御が示された。

【まとめ】

10 種類の *fks1* 変異株を細胞形態の類似性を基に 3 つのクラスに分けた。さらにクラスごとの変異株の変異の位置と、生化学的な表現型の解析結果に基づいて、Fks1p がもつ幾つかの機能ドメインを示した(図3)。本研究で用いた定量的な表現型データを基にしたタンパク質機能の解析方法は、多機能タンパク質の変異が示す複雑な表現型を分解して、その多機能性を明らかにするために有効な手段であることが明らかになった。

【論文】

Okada, H.*, Abe, M.*, Asakawa-Minemura, M., Hirata, A., Morishita, K., Qadota, H., Ohnuki, S., Nogami, S., and Ohya, Y. (2010) Multiple Functional Domains of the Yeast 1,3-β-Glucan Synthase Subunit Fks1p Revealed by Quantitative Phenotypic Analysis of Temperature-Sensitive Mutants. *Genetics*, in press, *: equally contributed

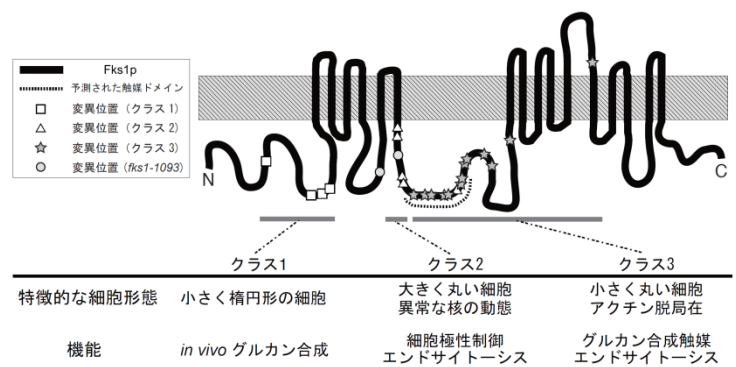


図3—予測された Fks1p 機能ドメインのモデル図
斜線を含む灰色の長方形は細胞膜、黒い曲線は Fks1p、曲線上のシンボルは *fks1* 変異株の変異の位置、黒い破線は予測された触媒ドメイン、をそれぞれ示している。