

# 出芽酵母の細胞壁合成チェックポイント制御因子の遺伝学的解析

学生証番号: 47-136301

生命応答システム分野 石井啓子

指導教官: 大矢禎一教授

## 【序論】

出芽酵母では細胞壁の合成が阻害されると、細胞壁合成チェックポイント制御機構により紡錘体が形成せずに細胞周期が G2 期で停止する。このチェックポイントが欠損すると、細胞壁合成阻害時でも紡錘体の形成が見られ、細胞周期は M 期まで進行することが知られている。この制御機構が異常になった変異株が現在までに 19 単離されており (Suzuki *et al.*, 2004; 今成深雪 修士論文, 2006; 菊地陽 博士論文, 2010)、その原因遺伝子は図 1 のような機能グループに分かれることがわかっている。しかしながら、グループ間の相互関係については今までほとんどわかっていなかった。

本研究では、二つのグループの変異株を組み合わせる二重変異株 (図 2) を作成し、この二重変異株の表現型から遺伝学的な関係を調べた。この結果から、グループ間の相互関係を明らかにするとともに、細胞壁合成チェックポイント機構の全体像について考察しようとした。

## 【結果と考察】

### 1. *CLB2* 転写因子はダイナクチン複合体の下流でチェックポイントを制御する

まず M 期サイクリン Clb2p の転写因子とダイナクチン複合体との関係を調べた。細胞壁の主要な構成成分を合成するグルカン合成酵素の温度感受性変異 (*fks1-1154 fks2Δ*、図では *fks1-1154* と略す) をバックグラウンドに持つ株の中で、チェックポイントの正の制御因子 Arp1p (ダイナクチン複合体の構成成分) の欠損変異 *arp1Δ* とチェックポイントの負の制御因子 Fkh2p (*CLB2* 転写因子) の欠損変異 *fkh2Δ* との二重変異株を作成した。なおチェックポイントにおける正と負の制御

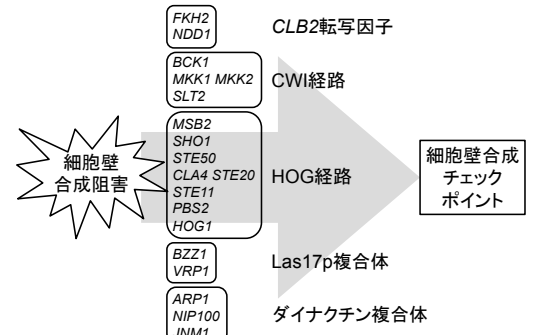


図 1. 細胞壁合成チェックポイント制御因子と機能グループ

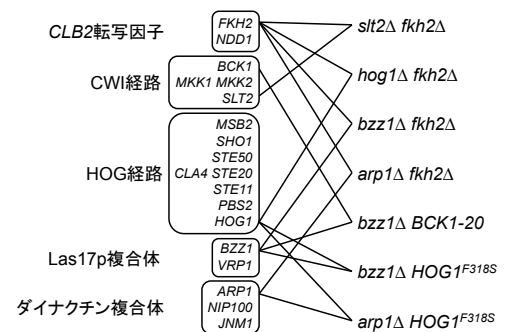


図 2. 本研究で用いた変異株

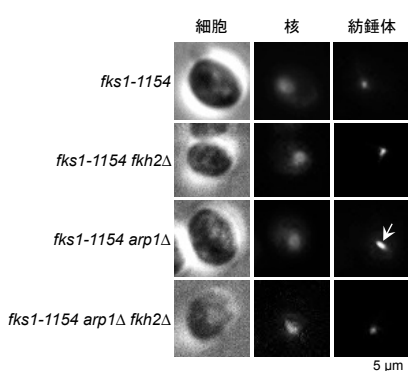


図 4. リリース150分後の細胞、核、紡錘体の状態  
伸長した紡錘体を矢印(←)で示した。

因子とはそれぞれ細胞周期を停止、および進行させる際に必要な

因子であり、両者の二重欠損変異株の紡錘体の表現型を調べること

で正と負の制御因子間の上下関係が明らかになると考えた。二重変異株の細胞をエルトリエーション法により G1 期に同調し、細胞壁の合成が阻害される制限温度下でリリースして 30 分おきにサンプルを回収・固定した。この時、大きな芽の形成が阻害されていたことから、チェックポイントが働くきっかけとなる細胞壁の合成

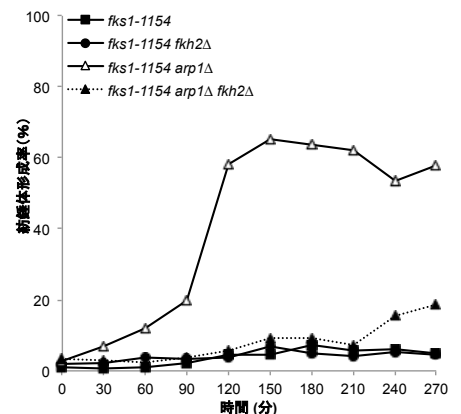


図 3. *ARP1* および *FKH2* 変異株、二重変異株とコントロール株の紡錘体形成率

阻害がおきていることがわかった。紡錘体を染色して蛍光顕微鏡で表現型を調べたところ、二重変異株では紡錘体形成は抑制されていることがわかり(図3、図4)、*fkh2Δ*によりチェックポイント機能が回復したことが示された。この結果から *CLB2* 転写因子である Fkh2p はダイナクチン複合体の下流で機能していることが示唆された。

## 2. *CLB2* 転写因子は Las17p 複合体、CWI 経路、HOG 経路の下流でチェックポイントを制御する

次に転写因子と他のグループとの関係を調べるため、*arp1Δ*を使った実験の時と同様にチェックポイントの正の制御因子の欠損変異である *bzz1Δ* (*Las17p* 複合体の構成因子の欠損変異)、*hog1Δ* (HOG 経路 MAPK の欠損変異)、*slt2Δ* (CWI 経路 MAPK の欠損変異)と、前述の負の制御因子の欠損変異 *fkh2Δ*との二重変異株を作成し、その表現型を調べた。その結果、全ての二重欠損株での紡錘体形成は抑制されていることがわかり、*fkh2Δ*によりチェックポイント機能が回復したことが示された。したがって、*CLB2* 転写因子である Fkh2p は CWI 経路、HOG 経路、*Las17p* 複合体の下流で機能していることが示唆された。

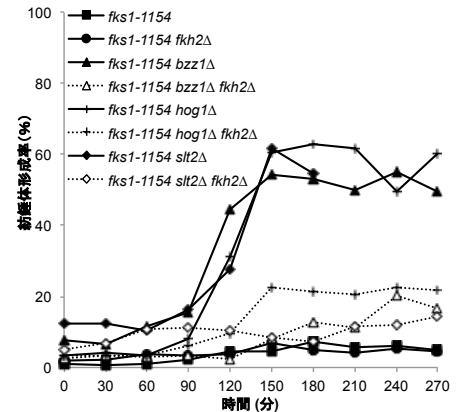


図5. *BZZ1*、*HOG1*、*SLT2*および*FKH2*変異株、二重変異株とコントロール株の紡錘体形成率

## 3. *Las17p* 複合体は *HOG1* 経路と *CWI* 経路の間でチェックポイントを制御する

ダイナクチン複合体と *Las17p* 複合体は物理的に相互作用することがわかっている(Wang *et al.*, 2012; Uetz and Hughes, 2000)。そこで *Las17p* 複合体の構成因子である *Bzz1p* を代表として選び、*Las17p* 複合体と HOG 経路の関係を調べた。*Bzz1p* と *Hog1p* はいずれもチェックポイントの正の制御因子であるため、正の制御因子 *Bzz1p* の欠損変異株 *bzz1Δ*と正の制御因子 *Hog1p* を活性化させる恒常的活性型アリル (*Hog1<sup>F318S</sup>*)との二重変異株を作成した。すると *Hog1<sup>F318S</sup>* を導入しても、依然として紡錘体の形成が認められた(*bzz1Δ HOG1<sup>F318S</sup>*、図6)ことから、*Hog1p* は *Las17p* 複合体の上流で働いていることが示唆された。一方、*Bzz1p* と *CWI* 経路で働く *Bck1p* の間で同様の実験を行ったところ、*Bck1p* の恒常的活性型アリル (*BCK1-20*)は *bzz1Δ*で見られる紡錘体の形成を抑制した (*bzz1Δ BCK1-20*、図6)。この結果から、*CWI* 経路は *Las17p* 複合体の下流で機能していることが示唆された。以上の結果から *Las17p* 複合体は、HOG 経路と *CWI* 経路の間で機能していることが示唆された(図7)。

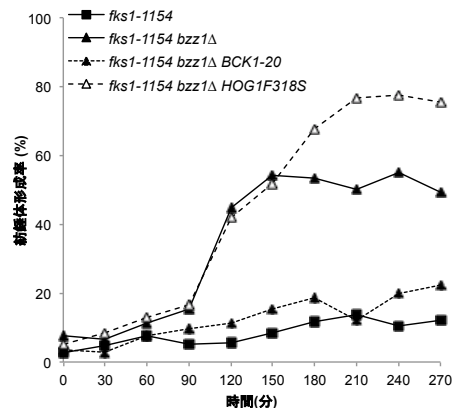


図6. *BZZ1*および*HOG1*、*BCK1*変異株、二重変異株とコントロール株の紡錘体形成率

### 【まとめ】

出芽酵母の細胞壁合成チェックポイントは、HOG 経路から *Las17p* 複合体/ダイナクチン複合体、*CWI* 経路の順で機能し、さらにその下流で *CLB2* 転写因子 Fkh2p が制御されていることが示唆された。

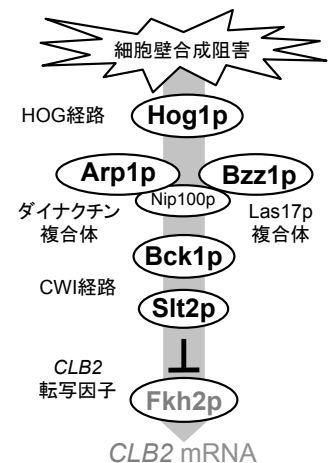


図7. 細胞壁合成チェックポイントのシグナル伝達経路のモデル