

Possible involvement of Bzz1p in the cell wall integrity checkpoint

(出芽酵母の細胞壁チェックポイントにおける Bzz1p の働きに関する研究)

2006 年 3 月修了 先端生命科学専攻

学生証番：46507 生命応答システム分野 今成深雪

指導教官：大矢禎一教授

序論

細胞が正確に自己複製をおこない、生存可能な次世代の細胞を生み出すためには、細胞周期の事象が適切な時期に正確に起きる必要がある。細胞周期の事象の適切な順序を保証し監視するための機構は細胞周期チェックポイントと呼ばれ、細胞周期のある事象に異常が起こった時、異常が修正されその事象が完了するまで細胞周期の進行を停滞させることによって細胞の生存を保証している。出芽酵母では DNA 損傷や DNA 複製、アクチン骨格、スピンドル形成などのチェックポイントが明らかにされてきたが、当研究室はこれら既知のチェックポイントとは異なる、細胞壁の異常をモニターする新規チェックポイント機構の存在を明らかにした (Suzuki *et al.*, 2004)。

細胞壁チェックポイントは、細胞壁の合成障害が起きると細胞周期を G2 期で停止し、生存率を維持する。このとき、M 期に進行したことを示す目印ともなる紡錘体（スピンドル）の形成が障害される。一方、チェックポイントに欠損を持つ株では細胞壁合成障害下でも紡錘体が形成され細胞周期が異常に進行する結果として生存率の低下が起きることをすでに報告している。この細胞壁チェックポイント機構にはダイナクチン複合体 (Arp1p, Jnm1p, Nip100p) がフォークヘッド転写因子 Fkh2p を介しサイクリン Clb2p の発現を制御していることが確認されている。こうして断片的にチェックポイントに関与する因子は明らかにされつつあるが、シグナル伝達経路の全体像を解明するためには新たな構成因子の発見が必要である。そこで本研究では、ダイナクチン複合体と物理的に作用し、かつ細胞膜など細胞表層に局在するタンパクに注目し、これらが細胞壁チェックポイントに関与するかを解析した。

結果と考察

1. 細胞壁チェックポイントにおける新規因子探索のためのストラテジー

我々はチェックポイントの構成因子の一部であるダイナクチン複合体と物理的に相互作用するタンパク質に注目した。ダイナクチン複合体の構成因子 Arp1p, Jnm1p, Nip100p と物理的に相互作用するタンパク質は、網羅的な研究から 22 個が現在までに報告されている (Uetz *et al.*, 2000; Ito *et al.*, 2001; Hazbun *et al.*, 2003; Helen *et al.*, unpublished)。これらの中には細胞膜付近に局在する Bzz1p, Sro77p, Rho2p, End3p, Smilp, Gon7p が含まれていた。私はこれらの中に細胞壁チェックポイントに関与する因子が含まれている可能性が高いと考え、まずこれらの遺伝子の欠損株が細胞壁チェックポイントに欠損を示すか検証した。

2. Bzz1p は細胞壁チェックポイントに関与する。

1. で注目したタンパク質が細胞壁合成チェックポイントに関与するかを調べるために、*fks1-1154* 株（細胞壁の主要な構成成分である 1,3-β-グルカン合成酵素の触媒サブユニット、FKS1 遺伝子の温度感受性変異株）のバックグラウンドで *BZZ1*, *SRO77*, *RHO2*, *END3* 遺伝子をそれぞれ破壊した。*fks1-1154* 株を制限温度下におくと芽の形成が抑えられ、チェックポイントが働いて紡錘体形成前で細胞周期を停止する。*fks1-1154 Δrho2* 株はこれまでに報告されている *fks1-1154* 株の表現型と同様に制限温度下で成熟した芽を形成せず、紡錘体の形成も見られなかった。これに対して、*fks1-1154 Δbzz1* 株は制限温度下で成熟した芽を形成で

きないのにも関わらず紡錘体を形成した。このことは**bzz1**変異株では細胞壁チェックポイントが欠損していることを示すものである(図1)。また**fk1-1154 Δend3**と**fk1-1154 Δsro77**株は30%程度の細胞が紡錘体を形成し、細胞壁チェックポイントに部分的な欠損を示す可能性があることが明らかになった。

SMI1と**GON7**については、**fk1-1154**株中で遺伝子を破壊することができなかったため、野生型である**FKS1**株中で遺伝子を破壊し、細胞壁合成阻害剤であるEchinocandin Bを用いることで細胞壁合成を停止させ、細胞壁チェックポイントに欠損を示すか調べた。その結果、**SMI1**と**GON7**は細胞壁の合成阻害下で紡錘体を形成せず細胞壁合成チェックポイントに関与しないことが示された。(図2)

fk1-1154 Δbzz1株の表現型をさらに確認するために、**BZZ1**遺伝子を**FKS1**株中で破壊し、Echinocandin Bを用いて同様の実験を行った。その結果、**FKS1 Δbzz1**株ではEchinocandin B存在下でも紡錘体を形成し、細胞壁チェックポイントに欠損を示した。この結果から、**Bzz1p**が細胞壁チェックポイントに関与していることが強く示唆された。(図2)

3. Las17p 複合体も細胞壁チェックポイントに関与する可能性がある。

出芽酵母の**Bzz1p**は**Las17p**と物理的に相互作用し、**Las17p**複合体を介してアクチンの重合を正に制御していると考えられている(Soulard, *et al.*, 2002 & 2005)。そこで私は**Bzz1p**が**Las17p**複合体に依存的に細胞壁チェックポイントに関与しているのかを調べるため、**Las17p**複合体の主要な構成因子である**VRP1**(verprolin)遺伝子を**fk1-1154**株中で破壊し、細胞壁チェックポイントに関与するかを解析した。この結果、**fk1-1154 Δvrp1**株は制限温度下で紡錘体を形成し、細胞壁チェックポイントに欠損を示すことが明らかになった。この結果は、**Las17p**複合体も細胞壁チェックポイントに関与していることを示唆している。

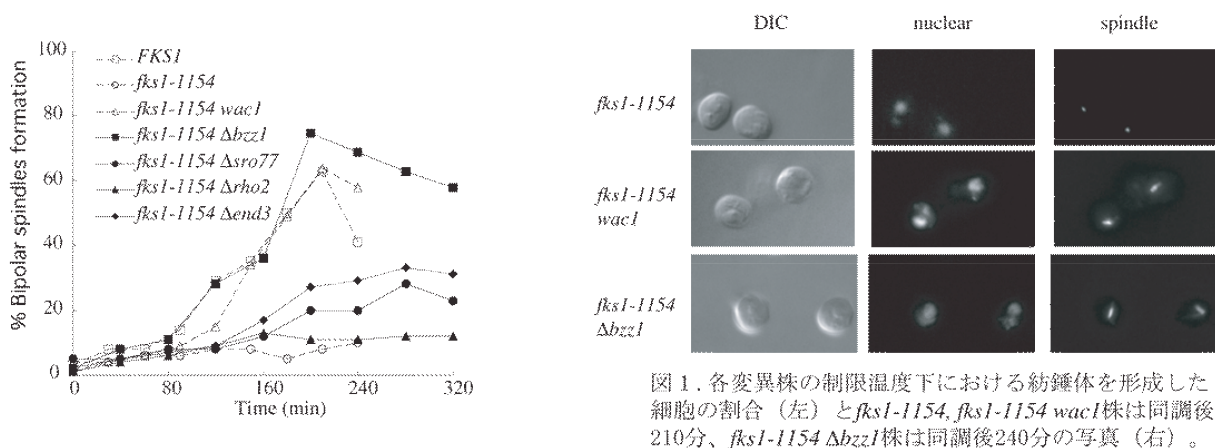


図1. 各変異株の制限温度下における紡錘体を形成した細胞の割合(左)と**fk1-1154**, **fk1-1154 wac1**株は同調後210分、**fk1-1154 Δbzz1**株は同調後240分の写真(右)。

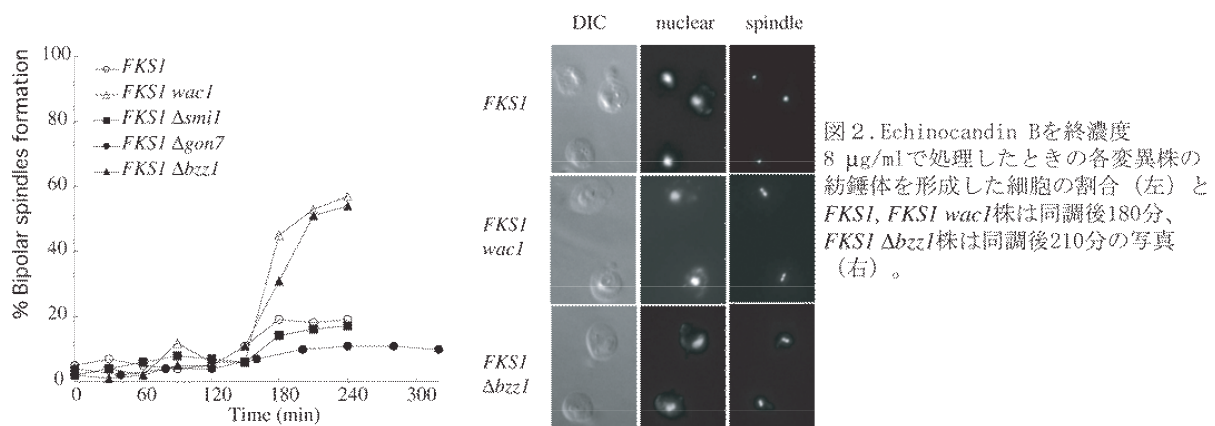


図2. Echinocandin Bを終濃度8 μg/mlで処理したときの各変異株の紡錘体を形成した細胞の割合(左)と**FKS1**, **FKS1 wac1**株は同調後180分、**FKS1 Δbzz1**株は同調後210分の写真(右)。