

細胞周期依存的な先端成長に異常を示す出芽酵母非必須遺伝子破壊株の網羅的解析

2006年3月修了 先端生命科学専攻 46559 渡邊街香 (指導教員 大矢禎一教授)

キーワード ; 出芽酵母、細胞形態、先端成長、細胞周期、網羅的解析

【序論】

先端成長は、細胞の一部が特定の方向に成長して突起状の構造を生み出す成長様式であり、神経細胞における軸索の成長、高等植物の受精時における花粉管伸長など、幅広い生物種において観察される生命現象である。出芽によって増殖する単細胞真核生物である出芽酵母においても、細胞増殖時に先端成長は観察される。ただし出芽酵母の芽の形成時に見られる先端成長は、細胞周期依存的な事象であることが他の生物と大きく異なる特徴である。出芽酵母の増殖は、連続したいくつかの細胞周期依存的なステップから成り立っている (図 1)。G₁ 期の終わりに出芽が開始し、S 期になると芽は先端成長を行って一方向にのみ伸長する。その後、G₂ 期において先端成長は等方向成長へと切り替わり、芽全体が成長し母細胞と同様の形態をもつ娘細胞が形成される。その後、細胞質分裂が起こり、次世代の新たな 2 つの細胞を生じる。先端成長の際には、アクチン細胞骨格形成の足場となるアクチンパッチと呼ばれる特殊な構造体は芽の先端にのみ局在し、新たに合成された細胞膜や細胞壁成分はアクチン細胞骨格に沿って芽の先端へと選択的に輸送される。一方、等方向成長の際にはアクチンパッチは芽の細胞表層全体に局在し、細胞膜や細胞壁成分は芽の全域に向かって輸送される。出芽酵母の細胞増殖時に見られる先端成長には、細胞周期制御において重要な役割を果たす G₁ サイクリンが関与していることが古くから知られていた (Lew and Reed, 1993)。G₁ サイクリンは先端成長に必要な正の制御因子であり、出芽酵母の G₁ サイクリンである Cln2p の発現量を人為的に増加させると先端成長が促進され、細長い芽が形成される (Loeb *et al.*, 1999)。このような細胞周期依存的な先端成長の分子機構に関しては、未知の部分が多く残されている。そこで本研究では、定量的かつ客観的に取得された出芽酵母の形態情報をもとに、先端成長に関与する新規因子の取得を目指した。

【結果と考察】

1. 先端成長に異常を示す変異株の同定

先端成長が異常になると芽の細長さが変化することが予想されることから、本研究では芽の細長さを指標にして、先端成長の過程で働く因子を網羅的に同定することにした。因子の同定には遺伝学的方法を用い、出芽酵母の全非必須遺伝子破壊株 4,718 株を用いて芽が細長くなった変異株をスクリーニングした。芽の細長さの変化を主観的ではなく、客観的に同定するために、我々の研究室が共同で開発した、*CalMorph* というイメージプロセッシングプログラム (Ohtani *et al.* 2004) を利用した。変異株細胞の形態情報を *CalMorph* によって画像解析することにより、各変異株の 501 個のパラメータ情報を定量的に解析することができる。形態的な異常性が有意に認められるかどうかについては、100 回以上独立に測定して得られた野生株のデータにもとづき統計的手法を使って認定した。以上により、野生株と比較して有意に芽が丸い変異株を 35 株、芽が細長い変異株を 173 株同定した。

2. 芽の細長さに影響を及ぼす細胞機能

芽の細長さが異常になった変異株の中にどのような遺伝子機能の欠損株が含まれているかを解析した。芽が丸い変異株の中にはアクチン細胞骨格形成に関与するポラリソーム複合体やトロポ

ミオシン複合体の変異株が有意に蓄積していた (図 2)。一方、芽が細長い変異株の解析からは、非常に多岐にわたる細胞機能の欠損株が含まれていることがわかった。細胞周期制御、転写制御、染色体リモデリング、アクチン動態などのある程度予想できる機能の欠損株だけでなく、プロリン合成、リン酸代謝等、様々な細胞機能に関わる変異株が蓄積しており、先端成長に強く関与すると考えられる細胞機能が明らかになった。

3. 芽が丸い変異株の分類

先端成長期の長さに着目して同定された変異株を分類した。先端成長時の細胞では、芽の先端にのみアクチンパッチが局在化していることを利用して、そのような細胞の割合を調べた。その結果、*arc18*、*sac6* 変異株では有意にその割合が小さくなっていった。これらの因子はアクチン細胞骨格形成に関与することが知られていることから、これらの遺伝子の変異によって極性輸送ができないために芽が丸くなっていることが考えられる。

4. 芽が細長い変異株の分類

芽が細長い変異株の分類を行った。アクチンパッチの局在を利用して、細胞周期のどのような時期に先端成長が観察されるかを芽が細長い変異株で調べたところ、(1)細胞周期を通じて先端成長が見られる代表株を 5 株 (*arp8*, *akr1*, *arp5*, *tps1*, *ies6*)、(2)野生株では決して見られない、核分裂後の細胞においても先端成長が見られる代表株を 2 株 (*rrn10*, *paf1*)、(3)核分裂前の細胞において特に顕著な先端成長が見られる代表株を 4 株 (*ykl121w*, *bud13*, *ylr407w*, *swc3*) 認定した。この中の、(3)で認定した株については、G₁サイクリン Cln2p の高発現株と同様に細胞周期のシグナルが増強されて先端成長の機構に伝達されていることが予想された。また、芽が細長い変異株の中で先端成長が観察される核分裂前までの時期が長くなっている代表株を 5 株 (*clb2*, *rnr4*, *pet130*, *yke2*, *ylr407w*) 認定した。このグループの変異株には、M 期サイクリン *CLB2* の変異株が含まれていることからわかるように、核分裂の時期が遅れる、すなわち細胞周期の進行が遅れている変異株であることが示唆された。以上の結果から、出芽酵母の細胞周期に依存した先端成長の分子機構に関して異常を示す変異株を系統的に単離し、基本的な特徴付けを行うことができた。

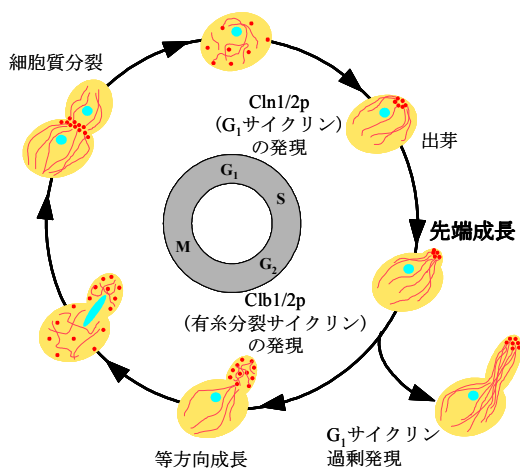


図 1. 出芽酵母における細胞周期依存的な形態形成過程

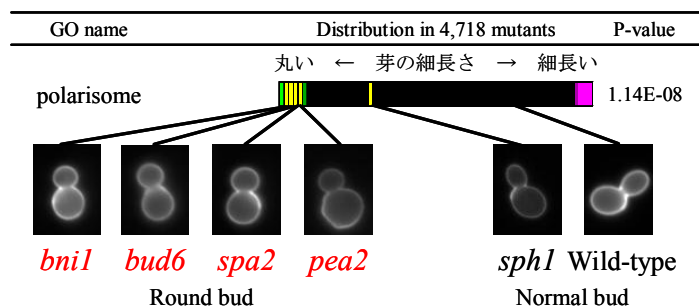


図 2. ポラリスーム変異株は丸い変異株に有意に蓄積している。ポラリスームに含まれる 5 個の遺伝子のうちの 4 個は、欠損すると芽が丸くなる。Sph1p は出芽時よりも接合突起形成時に機能している。