

学位論文題名

Cdc50p, a conserved endosomal membrane protein,
controls polarized growth in *Saccharomyces cerevisiae*

(endosome に存在し、保存されている蛋白質である Cdc50p は
出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の極性成長を制御する)

学位論文内容の要旨

緒言

生物の初期発生から形態形成時において個々の細胞は極性を有し、様々な組織や器官を形成する。また体細胞においても極性は存在し、神経や上皮系の細胞はその典型で、癌細胞では細胞極性の乱れが顕著に認められる。細胞極性の確立は、細胞表面のある部分が特徴的な役割を持ち始める一連の流れの始まりと言える。このような細胞極性、すなわち非対称的な細胞骨格構造、細胞内輸送、生態膜構造などは、特徴的な極性を持つ actin 細胞骨格系に制御されている。

本研究で用いられた出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は細胞および細胞骨格系の制御を研究するためには非常に優れたモデル生物である。*Saccharomyces cerevisiae* は細胞壁が局所的に伸展した結果である出芽によって成長し、この出芽は極性を有する細胞内輸送によって成り立っている。このような細胞内輸送に関連して、細胞が成長する際に actin は2つの形態をとり、actin patch および actin cable といわれる。出芽の際には actin patch と actin cable は芽の先端に局在し、芽を長軸方向に極性を持って伸ばす役割を持つ。

出芽の開始は Rho family small GTPase である Cdc42p や、Cdc42p の guanine nucleotide exchange factor である Cdc24p の活性化によるものであり、さらに下流の複雑に絡み合った様々な蛋白質へのシグナルを介して極性が制御される。このような細胞極性を制御する蛋白質の多くは、それ自身も芽の先端や cytokinesis の部位などに極性を持って存在する。しかし、これらの蛋白質がどのような仕組みで極性を持つようになっているのかについては、ごく一部のものを除いては不明である。

本論文では細胞周期に関する変異体として発見された CDC50 遺伝子について、細胞極性の面から機能解析した。cdc50 変異体は低温では小さな芽を出した状態で成長が停止し、actin patch の極性は消失する。さらに極性をもつはずの Bni1p や Gic1p も通常とは異なる位置に存在する。我々の実験結果から Cdc50p は細胞極性を制御する新しい蛋白質であることが示唆された。

実験結果

MYO3 と MYO5 は出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の type I myosin をコードしている。コードされたそれぞれの蛋白質 Myo3p と Myo5p は actin patch の形成を制御している。本実験では、Myo5p の温度感受性変異体である myo3 myo5-360 株を用いて、その温度感受性を抑圧する遺伝子を検索した結果、8種類の遺伝子を認めた。その1つが CDC50 である。CDC50 は 391 アミノ酸からなる蛋白質 (Cdc50p) をコードしており、分裂酵母、線虫、ショウジョウバエ、ヒトまでホモログを持ち、種を越えて保存されている。また、アミノ酸配列からは膜蛋白質であると予想された。

我々は CDC50 遺伝子の欠損株 (cdc50 株) を作製し、Cdc50p の機能を解析した。cdc50 株は 18°C の低温において小さな芽を出した状態で成長を止めた。また、野生株では楕円形に近い形態であるが、cdc50 株はやや円形に近い形であった。成長を停止した状態の cdc50 株で、本来極性をもつはずの actin と myosin (Myo5p) は極性を失い、細胞全体に散在していた。その他、Bni1p、Gic1p などは極性を失いながら、それぞれ特徴的な構造をなしていた。cdc50 株が極性成長を失った原因として、その

regulator が適当な位置に存在できないことにあると示唆された。

Cdc50p は膜蛋白質であることが予想されていたが、実際に細胞内の局在を探索した。蛍光染料を用いた形態学的な観察では Cdc50p は late endosomal/prevacuolar compartment に存在すると考えられた。さらに生化学的な分析を加えた。まず、界面活性剤を用いた可溶性から、アミノ酸配列で予想された通り、膜蛋白質であることが証明された。続いて、sucrose による濃度勾配沈降によっていずれの細胞内小器官と同じ動向を示すのかを調べたところ、endosomal/prevacuolar compartment の marker と同じ挙動を示した。

Cdc50p が endosomal compartment に局在していることは、vacuole (液胞) の機能にも関わっていると予想された。野生株においては vacuole は小さなものが集合し、一つの大きなものを形成するが、cdc50 株では、小さなものが散在しているのみであった。機能的な差異について実験したところ、ともに内部は酸性であり、形態学的な違いのみであると考えられた。vacuole が断片化する変異体としては vps mutant が知られているが、cdc50 株も vps mutant に属するものか実験した。その結果、cdc50 株は小胞体からゴルジ体、さらにゴルジ体から vacuole への輸送が若干遅くなっているものの、従来の vps mutant に当てはまらない特殊な変異体であることが判明した。

cdc50 株の構造にさらに迫るために、電子顕微鏡で観察した。cdc50 株は低温で小胞が集簇し、異常に大きな膜様構造物が認められた。これらは cdc50 株に特徴的であり、野生株にはほとんど見られなかった。その正体は突き止めることができなかったが、おそらく微分干渉像 (DIC) で見られた断片化した vacuole を表していると考えている。

細胞表面のレセプターなどは endocytosis によって細胞内に取り込まれ、vacuole に運ばれることによって分解される。cdc50 株においてこの経路はどのようになっているのかについても調べてみた。まず細胞膜を染料 (FM4-64) で染めた後に培養することで、endocytosis が形態学的にどのように変化するのか観察した。低温下での cdc50 株では internalize されるものの、vacuole は形成せず、断片化していた。さらに細胞表面のレセプターを marker として分解される速度を測定したが、cdc50 株では低下していた。すなわち、Cdc50p は internalization 後の経路に関与していると考えられた。

考察

本実験では種を越えて保存されている膜蛋白質である Cdc50p を、細胞極性と膜輸送という両面から解析した。生化学的実験より膜蛋白質であることを明らかにし、さらにその局在は endosomal/prevacuolar compartment であることが判明した。当初、CDC50 遺伝子は MYO5 変異体の抑圧遺伝子として得られたものであったが、その一部の機能のみ抑圧することができる。また、cdc50 株では actin 細胞骨格系に異常をきたしている。つまり、CDC50 遺伝子は細胞極性に関与していると言える。さらに cdc50 株では細胞内輸送および vacuole の形成にも異常を来たす。このように CDC50 遺伝子は細胞骨格系、細胞極性という世界と、細胞内輸送という2つの世界をつなぐ新しい遺伝子であると言える。この CDC50 遺伝子は今回実験に用いた出芽酵母にとどまらず、高等生物であるヒトまで保存されており、今後、ヒトにおける細胞極性の形成の制御を解明する手がかりになるものと考えている。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 守 内 哲 也
副 査 教 授 田 中 一 馬
副 査 教 授 加 藤 紘 之

学 位 論 文 題 名

Cdc50p, a conserved endosomal membrane protein, controls polarized growth in *Saccharomyces cerevisiae*

(endosome に存在し、保存されている蛋白質である Cdc50p は
出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の極性成長を制御する)

真核生物では個々の細胞は極性を有し、様々な組織や器官を形成する。神経や上皮系の細胞はその典型で、癌細胞では細胞極性の乱れが顕著に認められる。このような細胞極性、すなわち非対称的な細胞骨格構造、細胞内輸送などは、特徴的な極性を持つ actin 細胞骨格系に制御されている。

本研究で用いられた出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は細胞骨格系の制御を研究するには非常に優れたモデル生物である。*S. cerevisiae* は細胞壁が局所的に伸展した結果である出芽によって成長し、この出芽は極性を有する細胞内輸送によって成り立っている。出芽の際に actin は芽の先端に局在し、芽を長軸方向に極性を持って伸ばす役割を持つ。

出芽の開始は Rho family small GTPase である Cdc42p や、Cdc42p の guanine nucleotide exchange factor である Cdc24p の活性化によるものであり、さらに下流の複雑に絡み合った様々な蛋白質へのシグナルを介して極性が制御される。このような細胞極性を制御する蛋白質の多くは、それ自身も芽の先端や cytokinesis の部位などに極性を持って存在する。しかし、これらの蛋白質がどのような仕組みで極性を持つようになっているのかについては、ごく一部のものを除いては不明である。

本研究では細胞周期に関する変異体として発見された CDC50 遺伝子について、細胞極性と膜輸送の両面から機能解析した。cdc50 変異体は低温では小さな芽を出した状態で成長が停止し、actin の極性は消失した。さらに極性をもつべき Bni1p や Gic1p も通常とは異なる位置に存在した。これらの研究結果から Cdc50p は細胞極性と膜輸送を制御する新しい蛋白質であることが示唆された。

MYO3 と MYO5 は出芽酵母 *S. cerevisiae* の type I myosin をコードしている。コードされたそれぞれの蛋白質 Myo3p と Myo5p は actin patch の形成を制御している。本実験では、Myo5p の温度感受性変異体である myo3 myo5-360 株を用いて、その温度感受性を抑圧する遺伝子を検索した結果、8種類の遺伝子を認めた。その1つが CDC50 である。CDC50 は 391 アミノ酸からなる蛋白質 (Cdc50p) をコードしており、ヒトまで保存されている。また、アミノ酸配列からは膜蛋白質であると予想された。

まず CDC50 遺伝子の欠損株 (cdc50 株) を作製し、Cdc50p の機能を解析した。cdc50

株は 18℃の低温において小さな芽を出した状態で成長を止めた。また、野生株では楕円形に近い形態であるが、cdc50 株はやや円形に近い形であった。成長を停止した状態の cdc50 株で、本来極性をもたずの actin と myosin (Myo5p) は極性を失い、細胞全体に散在していた。その他、Bni1p、Gic1p などは極性を失いながら、それぞれ特徴的な構造をなしていた。cdc50 株が極性成長を失った原因として、その regulator が適当な位置に存在できないことにあると示唆された。

Cdc50p は膜蛋白質であることが予想されていたが、実際に細胞内の局在を探索した。蛍光染料を用いた形態学的な観察では Cdc50p は late endosomal/prevacuolar compartment に存在すると考えられた。さらに生化学的な分析では、まず、界面活性剤を用いた可溶性から、膜蛋白質であることが証明された。続いて、sucrose による濃度勾配沈降によっていずれの細胞内小器官と同じ動向を示すのかを調べたところ、endosomal/prevacuolar compartment の marker と同じ挙動を示した。

Cdc50p が endosomal compartment に局在していることは、vacuole (液胞) の機能にも関わっていると予想された。野生株において vacuole は一つの大きなものを形成するが、cdc50 株では、小さな小胞が散在しているのみであった。機能的な差異について実験したところ、ともに内部は酸性であり、形態学的な違いのみであると考えられた。

cdc50 株をさらに電子顕微鏡で観察した。cdc50 株は低温で小胞が集簇し、異常な膜様構造物も認められた。これらは cdc50 株に特徴的であり、野生株にはほとんど見られなかった。その正体は突き止めることができなかったが、おそらく微分干渉像 (DIC) で見られた小胞を表していると考えられる。

cdc50 株における endocytosis の経路も追跡した。低温下での cdc50 株では、細胞膜を染料 (FM4-64) で染めると、internalize されるものの、vacuole は形成せず、断片化していた。すなわち、Cdc50p は internalization 後の経路に関与していると考えられた。

本研究では種を越えて保存されている膜蛋白質である Cdc50p を、細胞極性と膜輸送という両面から解析した。生化学的実験より膜蛋白質であることを明らかにし、さらにその局在は endosomal/prevacuolar compartment であることが判明した。また、cdc50 株では actin 細胞骨格系に異常をきたしている。つまり、CDC50 遺伝子は細胞極性に関与していると言える。さらに cdc50 株では細胞内輸送および vacuole の形成にも異常を来す。このように CDC50 遺伝子は細胞骨格系、細胞極性という領域と、細胞内輸送という2つの領域をつなぐ新しい遺伝子であると言える。この CDC50 遺伝子は今回実験に用いた出芽酵母にとどまらず、高等生物であるヒトまで保存されており、今後、ヒトにおける細胞極性の形成の制御を解明する手がかりになるものと考えられる。

口頭発表において田中一馬教授より細胞極性と細胞内の膜輸送について両者の関係についての質問があった。つづいて加藤紘之教授より臨床応用を考えた場合の機序についての質問があった。また守内哲也教授より CDC50 蛋白質における膜の内外の構造に関する質問があったが、いずれの質問に対しても、申請者は誠意ある妥当な回答をし、発表の内容、主旨をよく理解していた。

細胞骨格系、細胞極性の制御と、細胞内輸送の制御という両面に関わる新しい遺伝子である CDC50 遺伝子の機能を解析した本研究の意義は大きく、審査員一同協議の結果、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ、申請者は博士 (医学) の学位授与に値するものと判定した。