

学位論文題名

The upstream regulator, Rsr1p, and downstream effectors, Gic1p and Gic2p, of the Cdc42p small GTPase coordinately regulate initiation of budding in *Saccharomyces cerevisiae*

(低分子量 G 蛋白質 cdc42p の上流調節因子 Rsr1p と  
下流標的因子 Gic1p、Gic2p は、協調的に働いて  
出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の出芽開始を制御する)

学位論文内容の要旨

緒言

あらゆる細胞は、細胞運動、細胞間相互作用、形態変化や細胞内物質輸送など、様々な場面で非対称な形態や細胞内蛋白質の不均等な分布を示す。このような現象を細胞が極性を有するといひ、アクチン細胞骨格系が関与しているが、全体として small GTPase を介した細胞内シグナル伝達系により巧妙に制御されている。また、癌細胞では細胞の極性異常が認められるが、その原因には不明な点が多い。

本研究で用いた出芽酵母 *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り、出芽と呼ばれる極性成長過程を解析することで真核細胞の細胞骨格系制御機構の基本原則を明らかにできると考えられる。

この出芽という極性成長の開始において中心的な役割を果たしているのが Rho family small GTPase に属する Cdc42p である。Cdc42p は guanine nucleotide exchange factor である Cdc24p の働きにより活性化されるが、その Cdc24p を出芽位置に導くとされているのが Ras family に属する Rsr1p であり、出芽における一連の蛋白質の働きの中で Cdc42p の上位に位置していると考えられる。一方 Gic1/2p は Cdc42p と結合することで見いだされた蛋白質であり、Cdc42p からのシグナルを下流に伝えるための effector として機能していると推定されている。しかしこれらおよび出芽に関わる他の多くの蛋白質がいかに相互作用し、どのような仕組みで極性を確立するのかについては、まだ多くが不明である。

本論文では Cdc42 の effector のなかで比較的新しく、機能解析も進んでいない Gic1/2p に注目した。gic1/2 変異株と合成致死となる変異遺伝子のスクリーニングを契機として、Cdc42p を中心とした細胞極性形成の機能解析を試みた。その結果 gic1/2 変異体は Cdc42p よりさらに上流で機能しているとされる rsr1 の変異体と合成致死となることが見いだされた。この関係は Cdc42p の他の effector には見られない固有のものであり、さらに gic1/2 rsr1 変異体では Cdc42p の他の effector の局在に乱れを生じていた。これらの実験結果から我々は、Rsr1p と Cdc24p により極性と活性を制御された Cdc42p が Gic1/2p の働きでより安定的に effector と局在し続けることで出芽開始が可能となると考えている。

実験結果

gic1gic2 変異体はそれだけでは出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の出芽という極性成長過程に影響は及ぼさない。しかしさらにもう 1 つ、ある遺伝子の変異が加わることによって成長できなくなる、すなわち合成致死になるとすればその遺伝子の機能は GIC1/2 の機能と関連性をもつ可能性がある。本実験では、まず gic1gic2 変異株を用いて合成致死遺伝子をスクリーニングすることから始めた。その結果、BUD2、BUD5 という 2 つの遺伝子を同定した。これらはそれぞれ、出芽位置の決定に重要な役割を果たしている G protein Rsr1p の GTPase-activating protein、GDP/GTP exchange protein として知られている。従って rsr1 変異体も gic1gic2 変異体と合成致死になると予想し、実際に 3 重変異体は 3 0

度で成長できなくなることが確認された。

次に我々は *rsr1gic1gic2* 変異株がなぜ生育できなくなるのか形態学的に解析した。そしてこの株が出芽不可能となり、細胞は極性を失い等張性に膨化していく様子を確認した。また一旦出芽した細胞はその時点で *Rsr1pGic1/2p* を失ったとしても細胞分裂、核分裂までサイクルが回ることから、*RSR1GIC1GIC2* が芽の成長と分裂にはあまり関与せず、出芽の最初のポイントで何らかの役割を果たしていると考えられた。

出芽の過程で機能する *Gic1/2p* 以外の *Cdc42p* 周辺の蛋白質について *rsr1* と遺伝学的に相互作用があるか検討した。*cla4*, *bnil* は *rsr1* と合成致死とはならず、*Cdc42p* の effector の中で *GIC1/2* だけが *RSR1* に対して特異性を示していた。また *Cdc42p* と結合できなくなった *GIC1* 変異株を用いた検討から、*Gic1/2p* の出芽における役割は *Cdc42p*-GTP と結合すること、すなわち *Cdc42p* の effector であることによって果たされていると考えられた。

スクリーニングの過程で判明していたことであるが、*rsr1gic1gic2* の致死性は *Cdc42p* を過剰に発現させることで抑圧することができる。この現象を理解するために他の effector の変異も持たせた次のような株、*rsr1gic1gic2bnil*, *rsr1gic1gic2cla4*, *rsr1gic1gic2ste20*, に *Cdc42p* を過剰発現させてみたところ、いずれの株においてもその致死性は抑圧された。このことは *Cdc42p* の過剰発現が *Cdc42p* 以下の特定の pathway、例えば *Bni1p* や *Cla4p* を介した系、を増幅させて *rsr1gic1gic2* の致死性を抑圧しているのではないことを示している。つまり *rsr1gic1gic2* では *Cdc42p* の発現量そのものが低下しているか、あるいはその局在に問題が生じているか、いずれかの可能性が考えられる。そこでまず *rsr1gic1gic2* 株において *Cdc42p* の発現量低下が見られるか検討したが、*gic1gic2* 株との間に差は見られなかった。次に *Cdc42p* に GFP 蛍光蛋白質をつけて直接その局在を観察しようと試みたが条件が整わず、データは得られなかった。そこで *Bni1p* と *Cla4p* という2つの *Cdc42p* effector の局在（これらは芽の先端において *Cdc42p* と共局在する）を観察した。そして *rsr1gic1gic2* 変異株において *Bni1p* と *Cla4p* が非局在化する率が高くなることを確認した。これは間接的な所見ではあるが、*Cdc42p* の局在そのもの、あるいは *Cdc42p* と *Bni1p*, *Cla4* 複合体の安定性が低下していることを示していると考えられる。

#### 考察

本研究で申請者は、*Cdc42p* の上流因子と下流因子が協調して働いて、これが *Cdc42p* の正常な functioning に必須であること、また *Rsr1p* は出芽開始場所の決定についてのみ機能していると考えられていたが、実際には出芽そのものにも一定の役割を果たしていることを明らかにした。また *Cdc42p* が出芽開始点に局在し、安定的に他の effector と相互作用するために *Gic1/2p* が重要である可能性が示され、このような例はこれまで報告されておらず、*Gic1p/Gic2p* が effector としてユニークな機能を有していることを示唆している。*Cdc42p* は動物細胞でも細胞極性形成の key regulator であることが報告されており、本研究で見出された結果が細胞極性形成の基本メカニズムとして重要なものであること、さらにその異常が、癌細胞の極性異常に関連し、癌細胞の遊走や接着といった転移のメカニズムの解明にも貢献することが期待される。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 葛 卷 暹  
副 査 教 授 田 中 一 馬  
副 査 教 授 加 藤 紘 之

## 学位論文題名

The upstream regulator, Rsr1p, and downstream effectors, Gic1p and Gic2p, of the Cdc42p small GTPase coordinately regulate initiation of budding in *Saccharomyces cerevisiae*

(低分子量 G 蛋白質 cdc42p の上流調節因子 Rsr1p と  
下流標的因子 Gic1p、Gic2p は、協調的に働いて  
出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の出芽開始を制御する)

あらゆる細胞は、細胞運動、細胞間相互作用や細胞内物質輸送など、様々な場面で非対称な形態や細胞内蛋白質の不均等な分布を示す。このような現象を細胞が極性を有すると言ひ、アクチン細胞骨格系が関与しているが、全体として Rho ファミリーの低分子量 G 蛋白質を介した細胞内シグナル伝達系により巧妙に制御されている。一方、癌細胞ではこの Rho ファミリー系の制御異常の可能性が指摘されており、同蛋白質が細胞内でどの様に機能しているのか、他の蛋白質といかに相互作用しているのかを知ることは癌制御のための大きな知見になると考えられる。

本研究で用いた出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は細胞周期や細胞骨格系の制御を研究するために優れたモデル生物であり、事実、Rho ファミリーの Cdc42p およびその制御因子 Cdc24p は本生物で最初に発見された。従って、出芽酵母の極性成長過程を解析することで真核細胞の細胞骨格系制御機構の基本原則を明らかにできると考えられる。Cdc42はこの出芽開始において中心的な役割を果たしている。Cdc42p は Cdc24p の働きにより活性化される。一方 Gic1/2p は Cdc42p からのシグナルを下流に伝えるためのエフェクターとして機能していると推定されていた。しかしこれらが他の多くの蛋白質といかに相互作用し、極性を確立するののかについては、まだ多くが不明である。

本研究では Gic1/2p の変異と合成致死となる変異遺伝子のスクリーニングを契機として、Cdc42p を中心とした細胞極性形成の機能解析を試みた。その結果、Cdc42p の上流に位置する Rsr1p の変異が Gic1/2p の変異と合成致死になる、すなわち *rsr1gic1gic2* 変異株が増殖できないことが確認された。*rsr1gic1gic2* 変異株がなぜ生育できなくなるのか形態学的に解析したところ、この株が出芽不可能となり、細胞は極性を失い等張性に膨化していく様子を確認した。次に出芽の過程で機能する

Gic1/2p 以外の Cdc42p 周辺の蛋白質について rsr1 と遺伝学的に相互作用があるか検討した。cla4, bni1 は rsr1 と合成致死とはならず、Cdc42p のエフェクターの中で Gic1/2p だけが Rsr1 に対して特異性を示していた。さらに、rsr1gic1gic2 の致死性は Cdc42p を過剰に発現させることで抑圧することができることを明らかにした。この現象を理解するために他の effector の変異も持たせた 4 重変異株に Cdc42p を過剰発現させてみたところ、いずれの株においてもその致死性は抑圧された。このことは Cdc42p の過剰発現が Cdc42p 以下の特定の pathway、例えば Bni1p や Cla4p を介した系、を増幅させて rsr1gic1gic2 の致死性を抑圧しているのではないことを示している。すなわち、rsr1gic1gic2 では Cdc42p の発現量そのものが低下しているか、あるいはその局在に問題が生じているか、いずれかの可能性が考えられる。そこでまず rsr1gic1gic2 株において Cdc42p の発現量低下が見られるか検討したが、gic1gic2 株との間に差は見られなかった。次に Cdc42p の局在を観察しようとして試みたがデータが得られなかったため Bni1p と Cla4p という 2 つの Cdc42p エフェクターの局在（これらは芽の先端において Cdc42p と共局在する）を観察した。そして rsr1gic1gic2 変異株において Bni1p と Cla4p が非局在化する率が高くなることを確認した。これは間接的な所見ではあるが、Cdc42p の局在そのもの、あるいは Cdc42p と Bni1p, Cla4 複合体の安定性が低下していることを示していると考えられる。

本研究において、Cdc42p の上流因子と下流因子が協調して働いて、これが Cdc42p の正常な機能に必須であることが明らかとなった。Rsr1p は出芽開始場所の決定についてのみ機能していると考えられていたが、実際には出芽の開始そのものにも一定の役割を果たしていることが明らかとなった。また Cdc42p が出芽開始点に局在し、安定的に他のエフェクターと相互作用するために Gic1/2p が重要である可能性が示唆された。このような例はこれまで動物細胞を含めて報告されておらず、Gic1p/Gic2p がエフェクターとしてユニークな機能を有していることを示唆している。

口頭発表において田中一馬教授より Gic1/2p の作用機構についてどのようなモデルが想定できるかとの質問があった。続いて加藤紘之教授より癌との関連で考えた場合、本研究は癌化と転移浸潤のいずれを想定しているのか、また将来目指すべき方向性についての質問があった。また葛巻より、細胞分裂、またチェックポイント制御の観点から見て、本研究の結果はどのように解釈できるか、さらに、Rsr1p がヒト細胞でどのように作用するか、についての質問があった。これらに対して申請者は、自己の研究結果と文献的知識を基に誠実に、概ね妥当な回答を行った。

本研究は、細胞極性形成における新しいシグナル伝達機構の存在を明らかにした。また、同様の機構が動物細胞にも存在し、またその機構の異常が細胞の癌化にも寄与している可能性が期待できるものとして高く評価される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ、申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。