

学位論文題名

She4p/Dimlp interacts with the motor domain  
of unconventional myosins in the budding yeast,  
*Saccharomyces cerevisiae*

(出芽酵母 She4p/Dimlp と非筋ミオシンの  
モータードメインとの相互作用)

学位論文内容の要旨

【目的と背景】

エンドサイトーシスはすべての真核生物で見られる過程であり、受容体のダウンレギュレーションや細胞外物質の取り込みなどに重要な役割を果たしている。増殖因子受容体のエンドサイトーシス異常が細胞癌化に重要な役割を果たしている可能性が指摘されており、エンドサイトーシスのメカニズムの解明が期待されている。エンドサイトーシスのメカニズムの一端を解明するにあたり、分子遺伝学的解析が速やかにかつ明確に行うことができることから、分子細胞生物学領域で多くの研究室で用いられている出芽酵母をモデル生物として使用した。

出芽酵母の *DIMI* はエンドサイトーシスに必要な因子として同定され、*DIMI* 遺伝子の単離により *SHE4* 遺伝子と同一であることが明らかとなっている。*SHE4* 遺伝子は、接合型変換と呼ばれる一種の性変換を制御している *ASH1* のメッセンジャーRNA (mRNA) の極性化に必要な因子として別のグループによりほぼ同時期に単離されている。She4 を欠損する株 (*she4Δ*変異体) においては生育が温度感受性となること及びアクチン細胞骨格の極性に異常が見られることが知られている。また、She4/Diml 蛋白は線虫の UNC-45、フンタマカビの CRO1、分裂酵母の Rng3p と高い相同性を有し、保存された領域は UCS(UNC-45/CRO1/SHE4)ドメインといわれている。UCS ドメインを有する蛋白はヒトにまで保存されているが、その機能は解明されていない。

一方、モーター蛋白のひとつであるミオシンは筋ミオシン以外にも様々な細胞や生物種で同定され、様々な細胞機能に関与していることが解明されつつあり、癌細胞の転移・浸潤といった過程にも関与している可能性が指摘されている。出芽酵母には *MYO1* から *MYO5* まで 5 種のミオシンが存在することが明らかとなっており、なかでも I 型ミオシンである *MYO3* と *MYO5* はエンドサイトーシスとアクチン細胞骨格の極性形成に、V 型ミオシンである *MYO4* は *ASH1* mRNA の極性化に必要なことがわかっている。

## 【結 果】

Yeast Two-hybrid 法を用い She4 蛋白と相互作用する蛋白を探索した結果、She4 が Myo3 と Myo5 (Myo3/5)のモータードメインと相互作用することが明らかとなった。Myo3/5 モーターのうち She4 と相互作用する領域は、アクチン繊維と相互作用する領域とオーバーラップしていた。さらに、*she4Δ*変異体では、Myo3 モーターはアクチンと相互作用できなかった。逆に She4 を過剰発現すると、Myo3 モーターとアクチンの相互作用は増強された。また、*she4Δ*変異体で I 型ミオシンの局在を観察したところ、I 型ミオシンとアクチン繊維との共局在に異常がみられた。これらのことから She4 は I 型ミオシンとアクチン繊維の相互作用を正に制御している可能性が考えられた。また、Myo5 のモーター領域に無作為に変異を導入し、*she4Δ*変異体の温度感受性を回復させるような MYO5 優性変異を単離することに成功した。これらの MYO5 優性変異は、*she4Δ*変異体の温度感受性ばかりではなくエンドサイトーシス異常及びアクチン細胞骨格の極性異常をも回復させ得るものであった。このことから、*she4Δ*変異体におけるエンドサイトーシス異常及びアクチン細胞骨格の極性異常は Myo3/5 の機能異常によると考えられた。最近、線虫の UNC-45 は筋ミオシンのモータードメインと高温依存性に相互作用し、分子シャペロンとして機能していることが報告されている。そこで、She4p 蛋白と Myo5p 蛋白の相互作用の温度依存性を検討したところ、She4 と Myo5 は 4℃よりも 30℃でより良く相互作用した。このことから She4 は Myo3/5 の分子シャペロンとして機能している可能性が示唆された。

また、ミオシンのモータードメインは比較的よく保存されていることから、She4 蛋白が出芽酵母の他のミオシンと相互作用するかどうかを Yeast Two-hybrid 法を用いて検討した。すると She4 は Myo3/5 のみならず、他のすべてのミオシンモーターと相互作用することが明らかとなった。さらに、*she4Δ*変異体では *ASH1* mRNA の極性化に関与する Myo4 の局在に異常がみられた。このことから、*she4Δ*変異体における mRNA の極性異常は Myo4 の機能異常によると考えられた。

## 【考 察】

本論文により、She4 蛋白はミオシンモーターと広く相互作用し、それらの機能に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。She4 はミオシンモーターの分子シャペロンとして機能している可能性が示唆され、ミオシン Myo3/5 を介してエンドサイトーシスに関与していると考えられた。高等生物においても She4 類似蛋白はおそらく同様の機構で機能していると考えられ、ヒト She4 が多種類のミオシンの働きに必要であるものと考えられる。ミオシンは細胞骨格関連の多彩な機能を担っており、今後は She4-ミオシン系の異常と細胞の癌化との関連の解明が期待される。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 長 嶋 和 郎

副 査 教 授 藤 堂 省

副 査 教 授 田 中 一 馬

学 位 論 文 題 名

## She4p/Dim1p interacts with the motor domain of unconventional myosins in the budding yeast, *Saccharomyces cerevisiae*

(出芽酵母 She4p/Dim1p と非筋ミオシンの  
モータードメインとの相互作用)

エンドサイトーシスはすべての真核生物で見られる普遍的な現象であり、受容体の脱感作や細胞外物質の取込に重要な役割を果たしている。また、細胞増殖因子受容体のエンドサイトーシス異常が細胞癌化に重要な役割を果たしている可能性が指摘されている。本研究では、エンドサイトーシスのメカニズムの一端を解明するにあたり、分子遺伝学的解析が速やかにかつ明確に行うことができることから、分子細胞生物学領域で多くの研究室で用いられている出芽酵母をモデル生物として使用した。出芽酵母の She4/Dim1 はエンドサイトーシスに必要な因子として同定され、She4 を欠損する株 (*she4Δ*変異体) においては生育が温度感受性となること及びアクチン細胞骨格の極性に異常が見られることが知られている。また、She4 はメッセンジャーRNA (mRNA)の極性化に必要な因子として別のグループによりほぼ同時期に単離されている。また、She4/Dim1 蛋白は線虫の UNC-45、フタマカビの CRO1、分裂酵母の Rng3p と高い相同性を有し、保存された領域は UCS(UNC-45/CRO1/SHE4)ドメインといわれている。UCS ドメインを有する蛋白はヒトにまで保存されているが、その機能は解明されていない。

本研究において、Yeast Two-hybrid 法を用い She4 蛋白と相互作用する蛋白を探索した結果、She4 が I 型ミオシンである Myo3 と Myo5 (Myo3/5)のモータードメインと相互作用することが明らかとなった。Myo3/5 モーターのうち She4 と相互作用する領域は、アクチン繊維と相互作用する領域とオーバーラップしていた。さらに、*she4Δ*変異体では、Myo3 モーターはアクチンと相互作用できなかった。逆に She4 を過剰発現すると、Myo3 モーターとアクチンの相互作用は増強された。また、*she4Δ*変異体で I 型ミオシンの局在を観察したところ、I 型ミオシンとアクチン繊維との共局在に異常がみられた。これらのことから She4 は I 型ミオシンとアクチン繊維の相互作用を正に制御している可能性が考えられた。また、

Myo5 のモーター領域に無作為に変異を導入し、*she4Δ*変異体の温度感受性を回復させるような *MYO5* 優性変異を単離することに成功した。これらの *MYO5* 優性変異は、*she4Δ*変異体の温度感受性ばかりではなくエンドサイトーシス異常及びアクチン細胞骨格の極性異常をも回復させ得るものであった。このことから、*she4Δ*変異体におけるエンドサイトーシス異常及びアクチン細胞骨格の極性異常は Myo3/5 の機能異常によると考えられた。最近、線虫の UNC-45 は筋ミオシンのモータードメインと高温依存性に相互作用し、分子シャペロンとして機能していることが報告されている。そこで、She4 蛋白と Myo5 蛋白の相互作用の温度依存性を検討したところ、She4 と Myo5 は 4℃よりも 30℃でより良く相互作用し、非筋ミオシンの分子シャペロンである可能性が示唆された。

また、ミオシンのモータードメインは比較的よく保存されていることから、She4 蛋白が出芽酵母の他のミオシンと相互作用するかどうかを Yeast Two-hybrid 法を用いて検討した。すると She4 は Myo3/5 のみならず、他のすべてのミオシンモーターと相互作用することが明らかとなった。さらに、*she4Δ*変異体では mRNA の極性化に関与する Myo4 の局在に異常がみられた。このことから、*she4Δ*変異体における mRNA の極性異常は Myo4 の機能異常によると考えられた。

本研究により、She4 蛋白はミオシンモーターと広く相互作用し、それらの機能に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。She4 は、アクチンと Myo3/5 の相互作用に必要であったことからアクチン-ミオシン相互作用の制御あるいは活性化に関与している可能性が考えられた。また、Myo3/5 に構造変化をきたすと思われる変異により She4 の必要性が bypass されたこと、She4 と Myo3/5 の相互作用が温度依存性であったことから、She4 はミオシンの構造の変化や維持に関与している可能性が考えられた。高等生物においても She4 類似蛋白は、ミオシンを介して様々な細胞機能に関与している可能性が考えられた。

口頭発表において、藤堂省教授より本研究の成果に関して臨床的な将来展望について質問があった。続いて田中一馬教授より She4 欠損株でミオシンに生じている異常はどのようなものかについて質問があった。また長嶋和郎教授より Myo5 優性変異体が She4 欠損株の温度感受性を回復させる機構について質問があった。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、エンドサイトーシス関連因子 She4 と非筋ミオシンのモータードメインとの相互作用の意義を明らかとしたものとして高く評価され、今後高等生物における研究への発展が期待される。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。