

学位論文題名

Septin ring assembly requires concerted action of polarisome components, a PAK kinase Cla4p, and the actin cytoskeleton in *Saccharomyces cerevisiae*

(出芽酵母のポラリソーム構成因子と PAK キナーゼ Cla4p はアクチン細胞骨格と強調してセプチンリング形成を制御する)

学位論文内容の要旨

【目的と背景】

細胞の極性形成は、アクチン細胞骨格の再編成や様々な極性関連蛋白質の機能を必要とする非常に複雑な過程である。本研究で用いた出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は、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、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。出芽酵母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。出芽開始前には出芽予定位置に向けてアクチン細胞骨格が再編成されると同時に、この位置にセプチンのリングが形成される。

セプチンは酵母からヒトまで進化的に強く保存された GTP 結合蛋白質ファミリーであり、線維状の構造体を構成し、細胞質分裂をはじめとするいろいろな生体反応において、多様な蛋白質の働く基盤となることが知られている。一方で、セプチンの異常が細胞癌化や神経性疾患に関与している可能性が指摘されており、セプチンの制御機構の解明が期待されている。

出芽酵母において、アクチンおよびセプチンの再編成には Rho type small GTPase である Cdc42p が必要である。GDP-GTP 交換反応促進蛋白質である Cdc24p により活性化された Cdc42p は、下流のエフェクターにシグナルを伝達して極性形成を制御する。これまでにアクチンの極性化に重要な様々な Cdc42p のエフェクターが明らかにされてきたが、どのようにして Cdc42p がセプチンリング形成を制御しているのかについては解明されていない。

今回、Cdc42p のエフェクターである Bni1p と Cla4p を欠損した細胞は、細胞形態及びセプチンリング形成が異常になり致死性を示すことを見出した。Bni1p はフォルミンファミリーに属し、Bud6p, Spa2p, Pea2p と共にポラリソームと呼ばれる蛋白質複合体を形成し、芽の先端成長に関与する。また Bni1p は、分泌小胞の輸送に重要な役割をするアクチンケーブルの形成に関与する。一方、Cla4p は、p21-activated kinase (PAK) に属し、細胞質分裂に関与する。生化学的性質が異なるこれらの蛋白質がどのようにセプチンリング形成に関与するのか検討した。

【結果】

本研究では、高温で Cla4p が分解される *cla4-75-td* 変異と *bni1* 欠失変異の二重変異株 (*bni1Δ cla4-75-td* 株) を用いて解析した。*bni1Δ cla4-75-td* 株は、温度感受性増殖を示し、細胞質分裂部位である bud neck の形成や neck filament の構成分子であるセプチンの局在に異常を示した。セプチンの GFP 融合蛋白質のタイムラプス観察から、*bni1Δ cla4-75-td* 株は、出芽開始時におけるセプチンリングの初期形成に異常を示した。したがって、Bni1p と Cla4p はセプチンリングの構造維持ではなくセプチンリングの初期形成に重複した機能を持つことが示唆された。

bni1Δ cla4-75-td 株の温度感受性増殖の原因が *BNI1* のどのドメインに関連するのか検討した。その結果、Bni1p のアクチン重合に関連する機能発現に必須のドメインである FH1 及び FH2 ドメインが必要であることが判った。したがって、Cla4p 欠損状態におけるセプチンリング形成には Bni1p のアクチン重合の機能が必要であると考えられた。また、Bud6p 結合ドメインや Spa2p 結合ドメインは高温下で必要であることが判った。これらのドメインはフォルミンの温度感受性増殖の抑圧には必要なかった。さらに、ポラリソーム構成因子 (*BUD6*, *SPA2*, *PEA2*) の欠失変異と *cla4* 欠失変異との二重変異株は、いずれも *bni1Δ cla4-75-td* 株と同様の表現型を示した。したがって、ポラリソームの integrity もまた、Cla4p 欠損状態におけるセプチンリング形成において重要であると考えられた。

アクチンケーブル形成に異常を示す *bni1-116* 変異と *cla4* 欠失変異との二重変異株もまたセプチンリング形成に異常を示した。さらにアクチン重合阻害剤を作用させた *cla4* 欠失変異株や、アクチンケーブルに関連した遺伝子の変異と *cla4* 欠失変異との二重変異株もセプチンリングを形成できなかった。したがって、Cla4p 欠損状態におけるセプチンリング形成に Bni1p に依存したアクチンケーブルが必要であると考えられた。

bni1Δ cla4-75-td 株の温度感受性増殖は、多コピーの *BEM3Δ1-114* と *RGA1Δ1-632* により抑圧された。*BEM3* と *RGA1* は Cdc42p の GTPase 活性促進蛋白質をコードするので、*bni1Δ cla4-75-td* 株では 活性型 Cdc42p が蓄積していると考えられた。また *bni1* 欠失変異株に活性型に固定された GFP-Cdc42^{G12V}p を過剰発現させたとき、セプチンリングに異常が生じたことから、*cla4* 欠失変異は活性型 Cdc42p を蓄積させる可能性が高いと考えられた。したがって、*BEM3Δ1-114* と *RGA1Δ1-632* は *cla4* 欠失変異側の異常を抑圧していると考えられた。

【考察】

本研究は、出芽酵母のセプチンリング形成において、ポラリソーム構成因子と Cla4p が重複した機能を持ち、さらにアクチン細胞骨格がこの過程に関与する可能性があることを初めて示唆した。哺乳類細胞では、アクチン結合蛋白質であるアニリンを介して、アクチン線維がセプチン線維の鋳型になることから、Bni1p が形成するアクチン構造体とポラリソームが直接的にセプチンリング形成に関与する可能性が考えられる。また、Bni1p が形成するアクチンケーブルは、セプチンリング形成に必要な因子の輸送に使われている可能性も考えられる。一方、Cla4p の機能の 1 つとして、セプチンを直接リン酸化することによるセプチンリングの固定化が提唱されている。また、セプチンリングの形成には活性型 Cdc42p と非活性型 Cdc42p のサイクリングが必要であると提唱されている。Cla4p は Cdc42p 結合蛋白質である Bem1p 及び Cdc24p と複合体を形成し、活性型 Cdc42p のダウンレギュレーションに働くと報告されており、Cla4p は Cdc42p の活性を調節することによっても、セプチンリングの形成を制御していると考えられる。したがって、Bni1p 依存的なアクチン構造体の欠損と活性型 Cdc42p の異常蓄積が、セプチンを

不安定にし、リング形成の異常を引き起こすと考えられる。セプチンの制御の基本メカニズムをさらに解析することは、セプチンの異常による疾患の原因解明の一助になると期待される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 野 口 昌 幸
副 査 教 授 志 田 壽 利
副 査 教 授 田 中 一 馬

学 位 論 文 題 名

Septin ring assembly requires concerted action of polarisome components, a PAK kinase Cla4p, and the actin cytoskeleton in *Saccharomyces cerevisiae*

(出芽酵母のポラリソーム構成因子と PAK キナーゼ Cla4p はアクチン細胞骨格と強調してセプチンリング形成を制御する)

セプチンは酵母からヒトまで広く保存されたフィラメント形成能を有する GTP 結合蛋白質であり、細胞質分裂や小胞輸送などに関与することが知られている。また、セプチンの異常が細胞癌化や神経変性疾患に関与している可能性が指摘されている。セプチンフィラメント形成の基本的メカニズム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、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。出芽酵母のセプチンフィラメント形成には Rho GTPase である Cdc42 が必要である。活性化した Cdc42 は、下流のエフェクターにシグナルを伝達してアクチン細胞骨格再編成、セプチンリング形成、成長部位への小胞の輸送と融合などを制御して出芽を開始する。エフェクターにはフォルミンである Bni1 や PAK キナーゼである Cla4 などがあるが、これらのエフェクターがどのようにしてセプチンリング形成を制御しているのかについては解明されていない。

本研究において、Bni1 と Cla4 を同時に欠損した細胞は、細胞形態及びセプチンの局在が異常になり致死性を示すことを見出した。高温で Cla4 が分解される *cla4-td* 変異と *bni1* 欠損変異の二重変異株 (*bni1Δ cla4-td* 株) を作製し、高温にシフトした後のセプチンの局在を経時的に観察したところ、出芽開始時におけるセプチンリングの形成に異常を示した。したがって、Bni1 と Cla4 はセプチンリングの構造維持ではなくセプチンリングの形成に重複した機能を持つと考えられた。

Bni1 は幾つかの機能ドメインを有している。また、Bni1 は Bud6、Spa2、Pea2 と共にポラリソームと呼ばれる蛋白質複合体を形成する。Cla4 欠損状態におけるセプチンリング形成にどのドメインが必要か検討したところ、Bud6 結合ドメインや Spa2 結合ドメインが必要であった。さらに各ポラリソーム構成因子と Cla4 を同時に欠損した場合もセプチンリング形成ができなかった。したがって、Cla4 欠損状態におけるセプチンリング形成には、ポラリソーム構成因子が必要であり、さらに Bni1 が Bud6 や Spa2 と相互作用することが重要であると考えられた。

また Bni1 のアクチン重合に関わるドメインがセプチンリング形成に必要であった。アクチン重合阻害剤を作用させた *cla4* 欠損変異株や、アクチンケーブル関連遺伝子の変異に *cla4* 欠損変異を加えた変異株もセプチンリングを形成できなかった。したがって、Cla4 欠損状態におけるセプチンリング形成には、Bni1 によるアクチン重合活性が必要であると考えられた。

bni1Δ cla4-td 株の致死性は、*BEM3Δ1-114* と *RGA1Δ1-632* の過剰発現により抑圧された。*BEM3* と *RGA1* は Cdc42 の GTPase 活性促進蛋白質をコードするので、*bni1Δ cla4-td* 株では 活性型 Cdc42 が蓄積していると考えられた。また Cla4 は Cdc42 に対するネガティブフィードバック調節があり、活性型 Cdc42 のダウンレギュレーションに働くことが報告されている。*bni1* 欠損変異株に活性型に固定された Cdc42 を発現させたところ、セプチンリング形成に異常が生じた。したがって、*cla4* 変異は活性型 Cdc42 の異常蓄積を引き起こす可能性が示唆された。

本研究により、Cdc42 のエフェクターである Bni1 のアクチン重合活性と Cla4 のキナーゼ活性の両方がセプチンリング形成に必要であることが明らかとなった。また、この Bni1 の作用には、Bni1 が、Bud6 や Spa2 などのポラリソーム構成因子と相互作用することが重要であった。Bni1 が形成するアクチンケーブルは、セプチンの重合に必要な因子の輸送に関与する可能性が考えられた。さらに、Cdc42 の活性型と不活性型間のサイクリングがセプチンリング形成に必要であることが明らかとなり、Cla4 がこのサイクリングの調節に関与している可能性が示唆された。

口頭発表において、副査の志田教授より哺乳類のセプチンの役割について、またセプチンリング形成において Bni1 と Cla4 が 1 つの経路で働く可能性について質問があった。続いて副査の田中教授よりセプチンリング形成における Bni1 と Cla4 それぞれの役割について、また Cdc42 の GTPase 活性促進蛋白質により *bni1Δ cla4-td* 株の致死性が抑圧された時のセプチンリングの状態について質問があった。最後に主査の野口教授より本研究で行った幾つかの実験について技術的な側面から質問があった。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、セプチンフィラメント形成における基本メカニズムの一端を明らかとしたものとして高く評価され、今後セプチン異常による病態の解明に役立つ可能性が期待される。

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。