

研究課題別研究評価

1. 研究課題:細胞の形態形成を決定する分子機構の研究

2. 研究者名:大矢禎一

3.研究のねらい

菌類や植物の細胞形態は、細胞骨格に加えて細胞の外側から形を決める細胞壁で規定されている。我々は出芽酵母を研究材料として細胞の形態形成を決定する分子機構を研究してきたが、その過程で低分子量 GTPase である Rho1p が細胞壁合成酵素であるグルカン合成酵素の活性化を行っていることを明らかにしてきた。本研究計画では、特にグルカン合成酵素による細胞の形態形成の制御機構、及びグルカン合成酵素へのシグナル伝達機構を解析した。

4.研究成果と自己評価

細胞壁は細胞外にあり、細胞内外からの圧力に抗して細胞の形態を保持している固い殻である。その固い殻がどのように合成されているかはほとんど不明であった。今回、グルカン合成酵素の触媒サブユニット Fksp に GFP (Green fluorescent protein) を融合させた Fks1p-GFP を作成し、触媒サブユニットの生細胞内における局在を観察した。その結果、細胞壁合成酵素がダイナミックに細胞膜上を移動することを発見した。生きた細胞中で 0.5 秒おきに連続して GFP 輝点を追うことにより、グルカン合成酵素が細胞膜表面を移動していることがわかった。出芽したばかりの小さな芽では、点状のシグナルが 1 秒間に数百ナノメートルの距離を動き回っていた。その動きは決して直線的ではなく、むしろランダムな動きであった。

既に細胞膜の表層近くでアクチン・パッチが同様な動きをすることが知られていること、およびアクチン・パッチとグルカン合成酵素の点状の局在は共局在していることから、アクチン・パッチの動きに連動して細胞膜上のグルカン合成酵素が移動していることが推測され、このことをアクチン・パッチの動きを止める酵母変異株を用いて証明した。さらに、この変異株を用いることにより、グルカン合成酵素の細胞膜上の移動を止めると、均一な細胞壁を形成できなくなり、異常な細胞壁を形成することを証明した。こうして、細胞壁合成の場が細胞膜上を移動していることを初めて明らかにし、細胞壁合成酵素が動くことの生理学的意義を示すことができた。

グルカン合成酵素へのシグナル伝達機構の解明に関しては、複数の観点から研究を行った。特に今回は、a) スフィンゴ脂質によるグルカン合成の制御、b) 細胞壁合成制御へのシグナルの遺伝学的解析、について研究を行った。

まず、グルカン合成酵素の活性制御機構としては、制御サブユニットである Rho1p による活性化以外の調節機構については全く知られていなかった。一方、1,3-β-グルカン合成酵素の活性に必要な因子として Gns1p が単離されていた。そこで、我々は、この Gns1p をより詳細に解析することによって、1,3-β-グルカン合成酵素の新たな調節機構、あるいは活性化機構の糸口が掴めるのではないかと考えた。gns1 遺伝子破壊株細胞を用いた酵素学的、また生化学的な解析から、スフィンゴ脂質の中間産物であるジヒドロスフィンゴシンがグルカン合成酵素活性を阻害すると結論づけた。

最後に、細胞壁合成酵素の変異株に対する多コピー抑圧変異を用いて、細胞壁合成へのシグナル伝達についての遺伝学的研究を行った。グルカン合成酵素の温度感受性変異の多コピー抑圧遺伝子として、MTL1、WSC1、WSC3、ROM2、LRE1、MSB1、ZDS1 の7遺伝子のコードする因子を新たに検出した。遺伝学的解析から、グルカン合成を正に制御する7つの因子は、グルカン合成酵素と Pkc1p の両経路の活性化に関わる因子

と、グルカン合成酵素だけに特異的に関与する因子に分類した。さらに、これらの因子の中には Rho1p の活性化に関与する因子と、それ以外の系に関与する因子があることが分かった。

今回の研究により、細胞壁の制御には従来考えられてきたような合成酵素の活性化というような単純なスカラー的な要素だけでなく、細胞膜上を動きながら数多くの上流因子の影響を受けつつ活性制御するという複雑なベクトル的な要素を加味しながら解析する必要があることが初めて明らかになり、この点は自分としても高く評価している。また、細胞壁の形成という細胞の外側でおきる現象が、実はアクチン細胞骨格と深い関係があることも明らかになった。今後は、細胞壁合成を細胞周期や芽の形成過程などの時間軸を加えながら解析するとともに、細胞骨格との連携、動的な制御を視野に入れて解析することにより、より深く細胞壁合成の分子メカニズムが理解されることになると考えている。

5. 領域総括の見解

細胞形態がどのようにして決められるかについて、分子遺伝学的解析の容易な出芽酵母を用いて研究している。まず、GFP 蛍光タンパク質を結合した細胞壁グルカン合成酵素の生細胞での動態から、本酵素がアクチン・パッチに乗って、細胞膜上を移動しながら均質な細胞壁を合成することを示している。さらにグルカン合成酵素の活性調節に関与する多くの因子の検出を行い、従来ほとんど不明であった細胞壁形成機構の解明に向かって、具体的な糸口を付けたことを評価したい。今後は(既に始められているが)、細胞壁の合成制御に関係する諸因子の時間的また物理的連携を調べることにより、総括的な知見が得られることを期待する。

6. 主な論文

Homma, K., Terui, S., Minemura, M., Qadota, H., Anraku, Y., Kanaho, Y., and Ohya, Y. (1998) Phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase localized on the plasma membrane is essential for yeast cell morphogenesis. *J. Biol. Chem.* 273, 15779-15786

Sekiya, -K. M., Botstein, D., and Ohya, Y. (1998). Identification of functional connections between calmodulin and the yeast actin cytoskeleton. *Genetics* 150, 43-58.

Okano, H., Cyert, M., and Ohya, Y. (1998). Importance of phenylalanine residues of yeast calmodulin for target binding and activation. *J. Biol. Chem.* 273, 26375-26382.

Helliwell S.B., Schmidt A., Ohya Y., and Hall M.N. (1998). The Rho1 effector Pkc1, but not Bni1, mediates signalling from Tor2 to the actin cytoskeleton. *Curr. Biol.* 5, 1211-1214.

Inoue, S.B., Qadota, H., Arisawa, M., Watanabe, T., and Ohya, Y. (1999). Prenylation of Rho1p is required for activation of yeast 1,3- β -glucan synthase. *J. Biol. Chem.* 274, 38119-38124.

7. その他

招待講演6件 うち国内4件、外国2件