

細胞壁異常陥入を引き起こす分裂酵母 Spa2 の機能解析

北園 和泉 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 中野 賢太郎 (筑波大学 生命環境系)

〈背景と目的〉

多くの細胞はその機能を発揮するために特有の形状をとり、また成長して分裂する際には、大きくその形態が変化する。これらの過程では、細胞膜、及び細胞膜内外のタンパク質や糖鎖などの生体物質の再編成が生じる。本研究で着目した Spa2 は、出芽酵母で最初に発見された極性決定に関わるポラリソーム複合体の主要構成タンパク質である。しかし、その機能は出芽酵母以外の生物では、ほとんど調べられていなかった。Spa2 は、N 末端側に SHD-I ドメインと Coiled-coil (CC) ドメイン、そして C 末端側に SHD-V ドメインを有し、これらの領域が他のタンパク質と連携して、細胞の極性決定に関与すると考えられる。本研究の先行研究により、分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* のその相同遺伝子 *spa2^Δ* を過剰発現すると、細胞壁が細胞内部に陥入する異常な構造が作られることが発見されている。この異常陥入は、細胞質分裂時の隔壁形成に通じるものがある。そこで私は、過剰発現した Spa2 が細胞膜の変形や細胞壁合成にどのように作用するのか、そのしくみを調べた。

〈方法〉

分裂酵母 *S. pombe* のロイシン栄養要求性株 *leu1-32* を、pREP1 をベースとした発現プラスミドを用いて形質転換した。得られた形質転換体を、チアミン存在下で、25°C で前培養した。その後、培地からチアミンを除去し、*nmt1* プロモータの下流にある *spa2^Δ* とその変異型遺伝子の過剰発現を誘導した。細胞壁は、カルコフルオールホワイト (CW) で染色し、蛍光顕微鏡を用いて観察した。

一連の点変異や欠失変異の導入は、inverse PCR 法を用いて行った。

〈結果〉

主に2つの方法で、Spa2 の作用発現機序を探った。1つは Spa2 と相互作用する因子に着目したものである。もう一方は、変異型遺伝子を作成し、その過剰発現の影響を調べることで、Spa2 の機能ドメインを明らかにすることである。以下に、順を追って説明する。

1) Cdc15 との関係について

分裂酵母の細胞質分裂に必須なタンパク質 Cdc15 は、脂質二重膜の変形を引き起こす F-BAR ドメインを N 末端側に、そして C 末端側には SH3 ドメインをもつ。一昨年、Cdc15 の SH3 ドメインに結合するタンパク質を網羅的に調べた論文が発表され、その中に Spa2 が含まれていた。そこで私は、過剰発現した Spa2 が Cdc15 を呼び寄せて、その F-BAR ドメインを介して脂質二重膜の変形を促し、細胞壁の異常陥入を形成する可能性を考えた。これを検証する目的で、Spa2 を過剰発現した細胞において、Cdc15-GFP の局在を調べた。その結果、過剰発現誘導後 18 時間位から、細胞壁の異常陥入が生じている部位に、Cdc15-GFP が局在するのが観察された。次に、この局在変化が Spa2 と Cdc15 の相互作用によるものが検討するため、それらの相互作用に重要な Spa2 の 191 番目のプロリン残基をアラニン残基と置換した。そして、Spa2^{P191A} 過剰発現細胞における Cdc15-GFP の局在を調べた。その結果、野生型遺伝子の半分程度の頻度で細胞壁の異常陥入は起きたものの、そこには Cdc15-GFP の集積は認められなかった。さらに、Cdc15 の機能が低下した温度感受性変異株 *cdc15-140* に、Spa2 を

過剰発現したが、細胞壁の異常陥入の形成が認められた。以上の結果、Cdc15 は、Spa2 の過剰産生に伴う細胞壁の異常陥入構造の形成に関係している可能性はあるものの、その存在は必須でないことが示された。つまり、Spa2 は Cdc15 と結合しなくても、別の因子に働きかけることで、脂質膜の変形や細胞壁合成を促進できると推察した。

2) Spa2 の機能ドメインの解析

各種トランケートを作成して過剰発現実験を行い、細胞壁の異常陥入構造の形成誘導に必要な Spa2 のドメインを体系的に調べた。その結果、SHD-I ドメインが、細胞壁の異常陥入の形成に必須なことが分かった。しかし、SHD-I ドメインのみの過剰発現では異常陥入が見られなかったため、それ以外の部分も大切な役割を担うと考えられた。このことは、SHD-I ドメインと CC ドメインからなるトランケートを過剰発現すると、細胞壁の異常陥入が生じることから支持される。しかし、CC ドメインだけを欠失した Spa2 を過剰発現した場合でも、細胞壁の異常陥入は起こる。そのため、細胞内で SHD-I ドメインが機能を発揮するには、CC ドメインで Spa2 が自己会合するか、あるいは特に目立ったモチーフなどはみられない分子の中央領域で別のタンパク質と相互作用することが必要だと推察した。

また、Spa2 の過剰発現に伴い、細胞増殖が抑制される。これまでは、細胞壁の異常陥入の形成が、細胞成長を阻害すると考えていた。しかし、今回の Spa2 のトランケートの一連の実験から、SHD-V ドメインが、細胞増殖の抑制に必要な且つ十分な領域であることが判明した。即ち、SHD-V ドメインのみを過剰発現した場合、細胞増殖は抑制されたが、細胞壁の異常陥入は形成されなかった。

〈考察〉

本研究の結果、Spa2 は SHD-I を介して細胞膜の変形や細胞壁合成の促進等を促すと考えられた。また SHD-V ドメインは、これとは別に細胞増殖に重要な因子と相互作用する可能性がある。今後、これらのドメインに結合するタンパク質を同定するなどして、それらの細胞内機能を解明することが大切だろう。

一方、上述したように、SHD-I と SHD-V の間に存在する領域が、Spa2 自身の自己会合や、あるいは他のタンパク質と結合することも、Spa2 の過剰発現による細胞壁の異常陥入構造の形成に重要であることが分かった。この現象に、Cdc15 が必須でなかったことから、SHD-I と SHD-V の間にある領域の役割には重複性がみられるのかもしれない。この機能の重複性は、実験結果を解釈する上では混乱をまねきやすいが、細胞内のタンパク質の働きにおいては極めて大切な性質である。つまり、鍵となるタンパク質が複数の因子と相互作用することで、より巧妙な細胞内機能を発揮でき、そのシステムに頑強性が賦与されるからである。今後、Spa2 と機能関連性が指摘されている Fic1 や Bud6 などのタンパク質についても、Spa2 過剰発現時の挙動を調べ、その存在が細胞壁の異常陥入構造の形成に必要なことが大切だろう。その結果、細胞の形態変化や細胞質分裂時にみられる細胞膜と細胞壁等の生体物質の再編成機構に働く因子の機能を、体系的に解き明かすことができると思われる。