

分裂酵母 Spa2 の局在・機能ドメインの解析

細川 愛里 (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

細胞がある方向に動き、成長し、他の細胞と相互作用するには、極性をもつ必要がある。また細胞分裂に際して、分裂位置の決定や、娘細胞に分化因子などを非対称に分配する際にも極性が大切である。一般的に細胞の極性は、シグナル伝達因子の細胞内局在や濃度勾配、細胞骨格の配向性などによりつくられる。出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* では、母細胞における出芽する位置の決定やそこに向けての物質輸送、芽が成長する過程に極性が必要である。出芽酵母の出芽には、ポラリソームというタンパク質複合体が関与することが知られている (Snyder & Davis, 1988; Sheu et al., 1998)。ポラリソームの構成成分の一つ Spa2p を欠損した細胞では、出芽位置の決定に異常が生じる (Snyder, 1989)。*SPA2* 相同遺伝子は菌類に広くみられる。

出芽酵母と系統が大きく離れた分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* は、円筒形の単純な極性をもつ細胞で、細胞極性の制御機構がよく調べられているモデル生物である。この細胞は、細胞周期によって伸長する細胞端が切り替わる。先行研究により、分裂酵母の Spa2p (以下、*SpSpa2*) を欠損した細胞は極性成長を続けられることが分かっている (Ren et al., 2015)。しかし興味深いことに、*SpSpa2* を過剰発現すると、細胞表面の一部において細胞壁が異常に肥厚化し、細胞質側へ陥入する現象が発見された (中野ら、未発表)。このような表現型については、他の菌類を通じても未だ報告がない。*SpSpa2* は菌類の Spa2 で広く保存された領域の SHD-I と Coiled-coil (CC)、そして出芽酵母にみられる SHD-V をもつ 659 アミノ酸のタンパク質である (図 1)。私は、*SpSpa2* の細胞内機能を明らかにするために、その局在ドメインと機能ドメインの同定を行った。

(Maundrell, 1989, 1993)。pREP1YFPSpa2 由来の各トランケートで形質転換した分裂酵母 (*leu1-32*) を、チアミンを抜いた MM 培地中で 24 時間培養し、過剰発現を誘導した。ホルマリン固定後、カルコフルオールホワイト (CW) で細胞壁を染色し、過剰発現時の細胞壁の異常陥入構造の形成の有無について調べた。

結果

〈局在ドメインの解析について〉

pREP1YFPSpa2 の各トランケートについて、細胞内局在を調べた結果、SHD-I を欠失した *SpSpa2* は細胞の成長端に局在しなくなった。一方、C 末端側から削ったトランケートでは、ある領域を境にさらに削ると局在が失われた。他のトランケートについても局在を調べた結果、CC の直後にある約 100 アミノ酸の領域が、SHD-I と共に *SpSpa2* の細胞内局在に必要なことが分かった。さらに、SHD-I とこの領域からなるコンストラクトを細胞に発現させた結果、細胞端や分裂面に局在が見られた。同様の実験を、*spa2Δ::ura4* でも行い、同じ結論を得た。

〈機能ドメインの解析について〉

pREP1YFPSpa2 の各トランケートを導入した細胞について、チアミンを除いた培地で培養した結果、SHD-I と本研究で同定した約 100 アミノ酸の領域を除いたトランケートを発現させると、細胞壁の異常陥入構造の形成が見られなくなることを突き止めた。従って、機能ドメインと局在ドメインが一致すると考えられた。*SpSpa2* は SHD-I や本研究で同定した約 100 アミノ酸の領域を介して、細胞内の物質輸送や細胞壁合成に必要なタンパク質や、それらの足場としてはたらく分子を細胞内の局限された領域に集積することで、細胞壁の異常陥入構造を形成するのかもしれない。

考察

トランケートを用いた実験結果から、私は SHD-I と約 100 アミノ酸からなる領域が局在に必要な十分であることを示すのに成功した。SHD-I と約 100 アミノ酸から成る領域をもつトランケートは *spa2Δ::ura4* でも局在できたことから、トランケートと内在性の Spa2 が複合体を形成して、内在性の Spa2 依存的に局在している可能性は排除できた。出芽酵母の Spa2p の出芽部位への局在には、Spa2 Box と呼ばれる CC の直後の約 100 アミノ酸の領域だけが局在に必要な十分であることが報告されている (Arkowitz & Lowe, 1997)。本研究で同定した *SpSpa2* の約 100 アミノ酸の領域は、出芽酵母の Spa2p と配列の保存性はあまり高くないが、類似した細胞機能を有する可能性がある。今後、これらの生物の Spa2 の局在に必要なアミノ酸残基の特定や、相互作用因子の同定が進むことで、Spa2 の局在化機構が同様であるか判明するものと思われる。一方、SHD-I は菌類の Spa2 で広く保存された領域である。今後、SHD-I と今回同定した局在化領域が、どのように過剰発現時に細胞壁の異常陥入構造を形成するか調べることで、酵母や真菌類に保存された Spa2 の細胞機能の理解が深まると思われる。

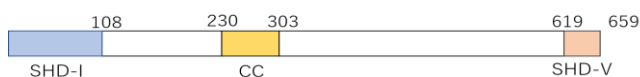


図 1 *SpSpa2* の各ドメインの名称と位置

方法

〈局在ドメインの解析〉

分裂酵母の外來遺伝子発現ベクター pREP1 を実験に用いた。このベクターはロイシン栄養要求性を相補するマーカー遺伝子 *LEU2* を有する。まず、YFP と *SpSpa2* の融合遺伝子を挿入したプラスミド pREP1YFPSpa2 から、inverse PCR によって任意の領域を削り取り、一連の *SpSpa2* のトランケートを発現するベクターを作製した。次に作成したベクターを用いて、酢酸リチウム法により分裂酵母のロイシン要求性株 *leu1-32*、あるいは *spa2* 破壊株 (*spa2Δ::ura4*) を形質転換した。そして、各トランケートの細胞内局在について、蛍光顕微鏡を用いて観察した。

〈機能ドメインの解析〉

pREP1 はチアミンを培地から抜くことで、*nmt1* プロモーターの下流に挿入した遺伝子をさらに強力に過剰発現できる