

## 分裂酵母の生存に必須な Rho1 の活性化促進因子の研究

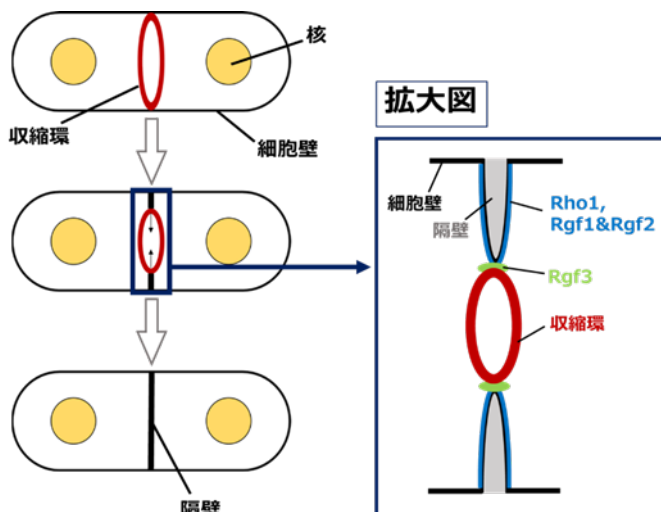
長谷川 咲希 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 中野 賢太郎 (筑波大学 生命環境系)

### 【研究背景と目的】

本研究で私は、細胞が分裂して増殖するという、生命にとって極めて基本的な現象を支える分子機構を探り、その成り立ちの理解を目指した。多くの細胞は、染色体を複製・分離した後2つに分裂する。動物の細胞では、アクチン繊維とミオシンIIを主成分とする収縮環を予定分裂面に形成し、その収縮と細胞膜の陥入(分裂溝)が進み、最終的に細胞体が2つに分かれる。一方、本研究の実験材料の分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* では、その細胞体が細胞壁に覆われており、分裂溝の進行には収縮環の収縮のみならず、隔壁の形成も伴う必要がある。おそらく、動物と酵母に共通の祖先型細胞では、収縮環を基盤とした分裂機構を採用しており、酵母に連なる系統では新たに隔壁形成による分裂機構を獲得したと推察できる。

低分子量 GTPase の1つである Rho は、アクチン細胞骨格の再編成等を制御する細胞内の分子スイッチであり、動物細胞の収縮環形成の制御において中心的な役割を担うことが知られている。興味深いことに、その分裂酵母のホモログである Rho1 は、細胞壁や隔壁の主成分である  $\beta$ -グルカンを合成する酵素を活性化する機能を担う。そのため、酵母の祖先が収縮環に加えて、隔壁形成を伴う分裂様式へと移行してきた要因として、Rho1 が  $\beta$ -グルカン合成酵素の活性化サブユニットという新たな分子機能を獲得した経緯は軽視できないだろう。それでは、分裂細胞において Rho1 の分子スイッチを入れるしくみはどうなっているのか。それが本研究の目指すところである。

最新の総説によれば、分裂酵母の Rho1 の活性化促進因子は Rgf1, Rgf2, 及び Rgf3 の3つである (Vicente-Soler *et al.*, 2021)。それらをコードする遺伝子の機能解析は既に行われており (Mutoh *et al.*, 2005)、*rgf1<sup>+</sup>* と *rgf2<sup>+</sup>* の2重遺伝子破壊株、あるいは *rgf3<sup>+</sup>* の単独遺伝子破壊株は致死性を示す。さらに、Rgf1 と Rgf2 は隔壁に沿って、Rgf3 は収縮環に局在するのが示されている (下図)。



分裂酵母の Rho1 とその活性化促進因子の局在様式

このことから、Rgf3 と異なる場所で Rgf1 と Rgf2 が Rho1 を活性化できるようになったことが、隔壁形成を伴う分裂酵母の分裂様式に重要なイベントであったことが推測できる。興味深いことに、Rgf1 と Rgf2 は、Rgf3 にみられない DEP ドメインを有する。他のタンパク質では、DEP ドメインが細胞膜に対して高い親和性を持つことが示されている (Ravala *et al.*, 2020)。そこで私は、分裂酵母 Rho1 の活性化促進因子の細胞機能と局在の違いについて、主にこの DEP ドメインの役割に注目して研究を進めることにした。

### 【方法】

#### 1) 遺伝子のクローニングと発現ベクターの構築

分裂酵母の *rgf1<sup>+</sup>*、*rgf2<sup>+</sup>*、及び *rgf3<sup>+</sup>* を PCR で増幅するため、ゲノム DNA と制限酵素サイトを付加した各遺伝子に特異的なプライマーを PCR 酵素 PrimeSTAR Max Premix を用いて反応した。その増幅産物を 10×A-attachment Mix で処理し、pT7Blue T-vector に Ligation Mix を用いて組込み、大腸菌に形質転換した。寒天培地上に形成された大腸菌コロニーを培養し、プラスミド DNA を回収し、制限酵素で処理した。その後、電気泳動で切断パターンを確認し、各遺伝子がクローニングできたことを確認した。更に DNA シーケンスを行い、PCR による塩基置換などが起きていないことを確認した。

次に、上記でクローニングした各遺伝子を制限酵素で処理し、自家蛍光タンパク質 YFP 遺伝子と共に、分裂酵母発現ベクター pREP1 に組み込んだ。

#### 2) DEP 欠損型タンパク質の局在観察のためのベクターの用意

1) で作製した pREP1-YEP-*rgf1<sup>+</sup>* 及び pREP1-YEP-*rgf2<sup>+</sup>* を鋳型として、inverse-PCR 法により DEP ドメインを欠損した変異プラスミドを作製した。

#### 3) 分裂酵母への遺伝子導入と蛍光顕微鏡による局在観察

各ベクターを、酢酸リチウム法により分裂酵母 *leu1-32* 変異株に形質転換した。得られた形質転換体について、それぞれの蛍光タンパク質の局在を蛍光顕微鏡を用いて観察した。

### 【結果・考察】

現在、2) と 3) の実験を進めており、詳細な結果については発表会にて報告する。