

学 位 論 文 題 名

細胞極性形成における

Cdc42 small GTPase の局在制御機構

学位論文内容の要旨

〔目的と背景〕

あらゆる細胞は、細胞運動、細胞間相互作用、形態変化や細胞内物質輸送など、様々な場面で非対称な形態や細胞内物質の不均等な分布を示す。このような現象を細胞が極性を有するという。細胞極性形成を成立させる細胞内分子機構において中核的な働きを有する因子として、Cdc42を始めとする Rho family small GTPase が知られている。多様な生物種において、Cdc42 の細胞極性形成における機能が明らかにされ、付随して Cdc42 に特異的な活性化因子 GEF や不活性化因子 GAP、下流のエフェクターについて多くの分子種が同定され、その制御機構や作用機能が明らかになってきた。しかし、細胞極性形成機構においてその根幹とも言える“Cdc42 や関連分子の極性化や活性化が時間的・空間的にどのように制御されているのか”については、多くの細胞系において未解明のままである。出芽酵母は Cdc42 が最初に発見された生物種であり、Cdc42 の局在制御機構について詳細な検討が重ねられてきた。最近の報告によれば、Cdc42 の出芽部位への局在化には従来まで解析されてきた Cdc24 GEF や Bem1 スカフォールド系による Cdc42 の細胞膜上へのリクルートに加え、アクチンケーブルに依存した、V 型ミオシンによって運ばれる小胞輸送系も働いていることが解ってきている。

従来の研究がアクチン・ミオシン輸送系の寄与を考慮せずに、Cdc42 の極性化機序を解析してきたことを鑑みると、アクチン系の影響を抑圧した実験系で再度 Cdc42 の極性化を検討しなおすことで、アクチン系の相補的影響下で隠れている副次的な Cdc42 極性化因子の働きを顕在化できるのではないかと考えられた。そこで本研究は、アクチンによる局在化とは独立したメカニズムで Cdc42 の極性化に関わる遺伝子を、既に細胞極性関連遺伝子として解析された遺伝子群の中から新たに洗い出すことを目的に開始した。

〔結果〕

細胞極性関連の変異株を用意し、アクチン重合阻害剤 Latrunculin-A (Lat-A) で処理することにより Cdc42 の極性部位への局在が損なわれるような株のスクリーニングを試行した。GFP-Cdc42 は蛍光が微弱であるためスクリーニングには適さないと考え、Cdc42 の下流因子の 1 つである Spa2 に GFP 標識したものをマーカーとして採用した。その結果、*cdc24-10*, *bem1Δ*, *gic1Δ gic2Δ* 遺伝子が同定された。*CDC24* は *CDC42* 活性化因子 GEF であり、*BEM1* は *CDC42* のスカフォールドとして作用することが知られていた。*GIC1 GIC2* は *CDC42* のエフェクター上に保存された GTP-*CDC42* 結合モチーフ (CRIB motif) を有することを構造的特徴として見出された遺伝子であるが、他に既知ドメインを有しておらず、その機能が出芽の初期過程に必要であることは示されていたが、分子レベルでの役割は未解明のままであった。スクリーニング結果は、

GIC1 GIC2 もまた出芽形成部位への Cdc42 のリクルート、維持、安定化のいずれかに作用している可能性を示唆するものであった。

そこで、次に検討対象を bud の初期形成期に限定し、アクチン非存在下で Spa2-GFP の極性化が損なわれているかを検討した。α-factor 処理により細胞周期の G1 期でアレストさせた後に、Lat-A 存在下、非存在下で細胞を同調培養し Spa2-GFP の局在を検討したところ、野生型株と比較して Lat-A 存在下で *gic1Δ gic2Δ* および *cdc24-10* 変異株では Spa2-GFP の極性化は顕著に阻害されることが示された。この結果は、Gic1 Gic2 が Cdc24 と同様にアクチンとは独立した経路で Spa2-GFP の極性局在を制御する因子であることを示唆しているため、Gic1 Gic2 はまた Cdc42 の極性局在に対しても何らかの働きを有している可能性が考えられた。そこで Gic1 Gic2 の Cdc42 極性化に果たす役割を解析することにした。

野生型株および *gic1Δ gic2Δ* 株に GFP-CDC42 を導入し局在を検討したところ、Lat-A 存在下ではバルク培養条件、37℃ で G1 同調培養条件のいずれにおいても、野生型株と比較して *gic1Δ gic2Δ* 株の GFP-Cdc42 の極性局在が弱まっていることが明らかとなった。

Gic1 Gic2 が Cdc42 極性化の制御に寄与するためには Gic1 が極性局在することが必要条件と考えられる。そこで、Gic1 と Cdc42 との相互作用が Gic1 の極性局在に重要であるかどうかを検討するため、CRIB motif を欠損させた *gic1^{CRIBΔ}-EGFP* 変異体を作成し、その局在を調べた。野生型の Gic1-EGFP の極性局在と比較して、Gic1^{CRIBΔ}-EGFP は *gic1Δ gic2Δ* 変異株において極性局在が消失していたことから、Gic1 の極性局在には Cdc42 との相互作用が必須であることが示唆された。また、Gic1^{CRIBΔ}-EGFP は野生型の Gic1 あるいは Gic2 が存在すれば弱いながらも極性部位へ局在できることが明らかとなった。Gic1 と Gic2 は互いにタンパク質間相互作用を有するため、Cdc42 との相互作用せずとも Gic 間相互作用によって、Gic1^{CRIBΔ}-EGFP は極性部位へ局在できると考えられた。

出芽位置決定に関わる *RSR1* の変異は、*gic1Δ gic2Δ* 変異と同時に組み合わせると細胞の出芽欠損に伴い致死性を示すが、その原因が Cdc42 の出芽部位への局在欠損によるものかどうかは不明であった。そこで *pGAL1-GIC1 gic2Δ rsr1Δ* 株を用いて G1 同調培養実験における GFP-Cdc42 の局在を検討した。結果として、*pGAL1-GIC1 gic2Δ RSR1* 株では GFP-Cdc42 は極性化し、それに伴い出芽の開始が見られたが、*pGAL1-GIC1 gic2Δ rsr1Δ* では GFP-Cdc42 の出芽予定部位への局在化は見られず、従って出芽も起こらなかった。同様の実験を GFP-Cdc24, Spa2-GFP, GFP-Cdc12 (セブチンの一つ) を発現する細胞でも行ったところ、*pGAL1-GIC1 gic2Δ rsr1Δ* では、いずれの GFP 融合タンパク質も特定の細胞膜領域へは極性局在することはできなかった。

【考察】

本研究では、Gic1 Gic2 が、Rsr1 と協調して、Cdc42 の出芽部位への局在化に機能していることを明らかにした。*rsr1Δ* 変異が *gic1Δ gic2Δ* 変異に重ねられると Cdc42 の極性化が消失するという結果は、Gic1 Gic2 に GTP-Cdc42 を極性化部位へ局在させる機能が存在していることを示唆している。Rsr1 がそのエフェクターとして Cdc24 を認識、活性化し、Cdc42 が GTP 結合型になると Gic1 Gic2 がリクルートされる。この Gic1Gic2 は更なる Cdc42 分子の極性化を導くという positive feedback 機構の存在が示唆されているのかもしれない。Gic1 Gic2 がどのような分子機序で Rsr1 や Bem1 と協調的に働きこの機能を果たしているのかは、今後解明すべき重要な課題である。本論文で出芽酵母を用いて得られた知見がヒトをはじめとする高等細胞における細胞極性形成機構を解析するための契機となり、種々の疾患の分子機序を解明する上で有効に活用されることが期待される。

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 畠 山 鎮 次

副 査 教 授 田 中 一 馬

学 位 論 文 題 名

細胞極性形成における

Cdc42 small GTPase の局在制御機構

細胞極性の形成、すなわち細胞が非対称な構造を持つことは、酵母からヒトまですべての真核生物の生命活動に必要不可欠である。細胞極性形成の異常は、上皮組織の機能不全、癌細胞の運動能亢進、また神経細胞の形態不全などを引き起こすと考えられ、多様な遺伝子病への関与が示唆されている。これらの遺伝子病の原因を解明する基礎として、細胞極性の基本メカニズムの解明が重要である。細胞生物学的、分子遺伝学的な解析が迅速かつ確実に行える出芽酵母は、真核生物に普遍的な細胞メカニズムを内包する進化的プロトタイプである。特に、出芽と呼ばれる増殖過程は細胞極性形成過程と共役しており、内発的な極性形成機序を詳細に解明するための優れたモデル系と見なす事ができる。細胞極性形成を成立させる細胞内分子機構において中核的な働きを有する因子に Cdc42 - Rho family small GTPase がある。Cdc42 は酵母からヒトまで進化的に保存された遺伝子であり、局在化した Cdc42 はエフェクターを介してアクチン細胞骨格を再編成することで、その部位での極性成長を成立させる事が知られている。したがって、Cdc42 局在制御機構を解明することは、細胞極性形成の端緒を理解する中核と言える。酵母 Cdc42 の局在制御には、活性化因子 Cdc24 GEF と Bem1 スカフォールド系による Cdc42 の細胞膜上へのリクルートに加え、近年アクチン細胞骨格に依存した小胞輸送系も働いていることが報告されている。

本論文では、アクチン系の影響を抑圧した実験系で再度 Cdc42 の極性化を検討しなおすことで、アクチン系の相補的影響下で隠れている副次的な Cdc42 極性化因子の働きを顕在化できるのではないかと考えた。この仮説に基づき、アクチン細胞骨格に非依存的な細胞極性制御因子の探索を試行する事から実験を開始した。

既知の細胞極性関連の変異株を用意し、アクチン重合阻害剤 Latrunculin-A (Lat-A) 処理条件下で Cdc42 の極性部位への局在が損なわれるような株のスクリーニングをした。探索マーカーには Cdc42 の下流因子 Spa2-GFP を採用した。その結果、*cdc24-10*、*bem1Δ*、*gic1Δ gic2Δ* 遺伝子が同定された。一方、*Gic1/2* は活性化型 Cdc42 に特異的なエフェクターとして発見された遺伝子であり、アクチン骨格の再編成に寄与していると考えられてきたが、その分子機能は未解明のままであった。そこで本研究では *Gic1/2* に焦点を当て更なる解析を進めた。性フェロモン処理で出芽開始期に細胞周期を同調させた実験系で

検討した結果、Gic1/2 の欠損株はアクチン系を抑圧した条件下で Spa2 と Cdc42 を脱極性化する表現型を有することが明らかとなった。即ち、アクチン系による Cdc42 局在制御とは独立した機構で Gic1/2 は Cdc42 および下流因子 Spa2 の極性化を制御していることが示唆された。また Cdc42 の上流で位置情報を伝達する因子 Rsr1 と Gic1/2 の三重欠損株は Cdc42 とその関連極性制御因子の脱極性化を示すことを明らかにした。Rsr1 と Gic1/2 は各々単独欠損変異では生理的条件においては顕著な増殖異常を示さない非必須遺伝子であったが、三重欠損株は 30℃ 以上の高温培養条件で合成致死性を有し、25℃ の生理的条件では顕著な極性形成不全を示すことが明らかになった。以上の結果は、細胞極性の初期過程において、Cdc42 の極性化は、Rsr1-Gic1/2 機構とアクチン極性輸送機構という独立した機構によって共役的に制御され、結果としてロバストな極性形成が成立していることを示唆するものであった。

口頭発表において、副査の志田壽利教授から Rsr1 の局在制御機構について質問があった。続いて副査の畠山鎮次教授から Gic1/2 相互の蛋白質間相互作用の生理的意義について質問があった。次に、主査の野口昌幸教授から Spa2 マーカーと Cdc42 の共局在評価の妥当性について、ならびに Lat-A に代替する実験戦略の検討可能性について質問があった。最後に、副査の田中一馬教授から Gic1/2 が Cdc42 膜局在を制御する分子機構について質問があった。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。

この論文は、細胞極性形成における Cdc42 の局在が Rsr1 および Gic1/2 により制御されていることを明らかにしたものとして高く評価され、今後高等動物における Cdc42 局在制御機構の解明とその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。