

Title	Dynamic localization and function of Bni1p at the sites of directed growth in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Author(s)	黒田, 公美
Citation	大阪大学, 2002, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43703
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	黒田 公 美
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 16821 号
学位授与年月日	平成14年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科生体制御医学専攻
学位論文名	Dynamic localization and function of Bni1p at the sites of directed growth in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . (出芽酵母 Bni1タンパク質の膜成長部位における動的な局在とその機能)
論文審査委員	(主査) 教授 高井 義美 (副査) 教授 中村 敏一 教授 米田 悦啓

論文内容の要旨

【目的】

出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) の細胞質分裂は、出芽と呼ばれる局所的な細胞膜の成長によって行われる。細胞周期の初期において、母細胞に内在する極性軸に応じて出芽予定部位が決定されると、この部位に特異的に細胞膜が成長し、芽(娘細胞)が形成される。芽の先端部分に極性化した成長によって、芽が母細胞と同じ程度にまで成長すると、成長方向の極性が二つの細胞間に移り、ここで細胞質分裂が行われる。この出芽過程において、アクチン系細胞骨格は常に局所的な成長の起こっている部位に集積し、物質輸送など膜の成長に必要な細胞機能をこの部位に極性化する役割を担っている。これまでの研究によって、低分子量Gタンパク質 Rho がこの過程のアクチン系細胞骨格の再編成を制御することが明らかになっている。出芽酵母の Rho ファミリーには Rho1、-2、-3、-4と Cdc42の5つがある。私共の研究室では、Rho1が出芽過程に必須であることを明らかにし、Rho1の標的蛋白質として Bni1を単離している。Bni1は酵母から哺乳動物にまで保存されている FH (form in-homology) protein ファミリーに属し、プロフィリンと結合してアクチン系細胞骨格の再編成を制御すると考えられる。

今回私は、Bni1の機能を解明する目的で、オワンクラゲの生体蛍光物質 Green fluorescent protein (GFP) と融合した GFP-Bni1を用いて、Bni1の生細胞内での動態および機能を解析した。

【方法ならびに成績】

1) *in vivo* 野生型酵母細胞における Bni1の動的局在

Bni1の生体内における動態を解析するため、Bni1と GFP の融合蛋白質 (GFP-Bni1) を野生型酵母株に発現させ、蛍光顕微鏡下で経時的観察を行った。GFP-Bni1のシグナルは、出芽の約8-10分前から次の出芽予定部位に集積し、芽が成長している間、芽の先端に局在した。そして細胞質分裂の10分程前にいったん細胞全体に分散した後、細胞質分裂部位に二重のリング状に集積した。細胞質分裂の進行とともに、リング状のシグナルは円板状に変化し、消退するとともに次の出芽予定部位に再び集積を開始した。このように、細胞周期を通じて GFP-Bni1は細胞の成長部位と一致して、極性をもって局在した。さらに出芽の初期段階における GFP-Bni1の挙動を詳細に検討したところ、GFP-Bni1は芽の細胞膜に沿って約10nm/sec の速度で動いており、この動きが細胞膜の局所的な成長方向と常に一致することが明らかになった。このことから、Bni1が細胞膜の局所的な成長に関与する可能性が示唆された。

2) *BNI1* 遺伝子欠損酵母株における細胞膜成長の極性

出芽酵母細胞壁の構成要素のパルスラベリング法により、野生型酵母では細胞膜の成長点が芽の先端部に明瞭に可視化された。しかし、*BNI1* 遺伝子欠損株では、成長方向の極性が失われ、芽全体が一様に成長していた。したがって *Bni1* は実際に酵母の極性を持った膜の成長を制御していることが示された。

3) *Bni1* の局在制御機構の解析

アクチン系細胞骨格は多くの蛋白質の極性をもった局在に必須である。そこで、*Bni1* の局在におけるアクチンの関与を検討した。出芽酵母の主要なアクチン系細胞骨格は、細胞膜表面に点状に局在するアクチンパッチと、これに連結した細い線維状のアクチンファイバーとからなるが、アクチンパッチの極性を急激な温度変化によって破壊しても、*Bni1* の局在は変化しなかった。一方、アクチンファイバーを完全に脱重合させるアクチンの阻害剤ラトランクリン A を酵母細胞に作用させると、*Bni1* の局在の極性は失われた。以上の結果から、*Bni1* の局在はアクチンパッチには依存しないが、アクチンファイバーには依存することが明らかになった。また、*Bni1* と直接結合する Rho 低分子 G 蛋白質が *Bni1* の局在に与える影響を、*rho1* および *cdc42* 変異株を用いて検討したところ、*Cdc42* が *Bni1* の極性をもった局在に必須であることが明らかとなった。一方、*Rho1* は *Bni1* の成長点への濃縮には関与しないが、細胞膜表面に沿った動きに必要であることが示唆された。さらに *Bni1* には、アクチン結合蛋白質 *pfy1* (プロフィリン) 及び *Bud6*、また細胞極性に関与する *Spa2* が直接に結合することが知られている。これらの遺伝子の変異株や、これらの遺伝子産物との結合ドメインを欠失した各種変異型 *Bni1* を用いて *Bni1* の局在を解析したところ、これらの因子のすべてが協調して *Bni1* の局在を制御していることが明らかとなった。

【総括】

本研究で私は、*Bni1* が常に細胞の成長点に一致して局在し、その部位において局所的な膜の成長を制御していることを明らかにした。すでに私共は *Bni1* がアクチン系細胞骨格の極性形成を制御していることを明らかにしているが、*Bni1* の局在もアクチンファイバーに依存しており、したがって *Bni1* とアクチン系細胞骨格は相互依存的関係にあることが今回示された。*Rho*、*Bni1* を含め、極性形成に重要な因子はアクチンの特定の構造を足場として集積し、極性の軸をこの部位に配向させることによって、協調的に膜の局所的な成長を制御すると考えられる。このような酵母で得られた知見は、より複雑な多細胞生物の細胞極性の形成機構を解析する上でも有用であると期待される。

論文審査の結果の要旨

本研究では、出芽酵母 *Rho1* の標的蛋白質である *Bni1* が細胞極性形成に果たす役割を解析した。本申請者は *Bni1* と GFP との融合蛋白質を用いた経時的蛍光顕微鏡システムによって *Bni1* の生細胞内での動的局在を観察することに成功した。この系を用いて、*Bni1* が常に細胞の成長点に一致して局在し、その部位において局所的な膜の成長を制御していることを明らかにした。また、*Bni1* がアクチン系細胞骨格の極性形成を制御していることがすでに報告されているが、本研究では *Bni1* の局在もアクチンファイバーに依存していることを示した。したがって *Bni1* とアクチン系細胞骨格は相互依存的関係にあることが明らかとなった。*Rho*、*Bni1* を含め、極性形成に重要な因子はアクチンの特定の構造を足場として集積し、さまざまな異なる種類の細胞内極性に必要な蛋白質複合体を形成すると考えられる。このような細胞極性は従来考えられていたような静的なものではなく、常に動的な蛋白-蛋白間相互作用によって維持されていることが本研究によって示唆された。

以上の知見は酵母細胞のみならず、より複雑な多細胞生物の細胞極性の形成機構を解析する上でも有用であると期待される。したがって本研究は学位授与に値すると認められる。