



分裂酵母における低分子量Gタンパク質Rab5を介したシグナル伝達の分子機構

塚本, 雄太

(Degree)

博士 (理学)

(Date of Degree)

2015-03-25

(Date of Publication)

2021-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第6326号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1006326>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



博 士 論 文

分裂酵母における低分子量 G タンパク質 **Rab5** を介した
シグナル伝達の分子機構

平成 2 7 年 1 月

神戸大学大学院理学研究科

塚本 雄太

目次

要旨	3
略語説明	5
第1章 分裂酵母の Rab5 ホモログである Ypt5 の機能解析	
1.1 序論	6
1.2 結果	
1.2.1 <i>ypt5</i> 突然変異株における高濃度イオンストレスに対する応答と液胞タンパク質輸送	8
1.2.2 <i>ypt5</i> 突然変異株の細胞形態とアクチン細胞骨格	8
1.2.3 生化学的な分画による Ypt5 の局在	9
1.2.4 液胞膜近傍の Ypt5 の局在	9
1.3 考察	9
1.4 図	12
第2章 Ypt5 の活性化因子候補 Vps901 と Vps902 の機能解析	
2.1 序論	18
2.2 結果	
2.2.1 Vps901 と Vps902 の局在	19
2.2.2 <i>vps9</i> 遺伝子破壊株における増殖と細胞形態	19
2.2.3 <i>vps9</i> 遺伝子破壊株における性分化と高濃度イオンストレスに対する応答	20
2.2.4 <i>vps9</i> 遺伝子破壊株における液胞タンパク質輸送と液胞形態	20
2.3 考察	21
2.4 図	25
第3章 Ypt5 の下流因子候補 Pep7 と Aut12 の機能解析	
3.1 序論	33
3.2 結果	
3.2.1 Pep7 と Aut12 の局在	34
3.2.2 Pep7 と Ypt5 との相互作用	34
3.2.3 <i>pep7</i> 遺伝子破壊株と <i>aut12</i> 遺伝子破壊株における増殖と細胞形態	34
3.2.4 <i>pep7</i> 遺伝子破壊株と <i>aut12</i> 遺伝子破壊株における 性分化と高濃度イオンストレスに対する応答	35
3.2.5 <i>pep7</i> 遺伝子破壊株と <i>aut12</i> 遺伝子破壊株における液胞タンパク質輸送と液胞形態	35
3.3 考察	36
3.4 図	39

総括	47
図	49
材料と方法	50
表	57
謝辞	63
参考文献	64

要旨

低分子量 G タンパク質の Rab ファミリーは、選択的な膜輸送の制御において重要な役割を担っている。Rab5 は哺乳動物細胞において、初期エンドソームに局在し、エンドソーム融合の制御に機能している。他にもファゴソーム成熟、アクチン骨格系の再構成、染色体整列の制御などにも Rab5 が関与していることが報告されており、Rab5 が細胞内で様々な役割を担っていることが予想される。しかしながら、Rab5 がどのようなシグナル伝達によって多様な機能を制御しているのか、その分子機構について詳しいことはほとんど何も分かっていない。本研究では、分裂酵母に存在するただ 1 つの Rab5 ホモログである Ypt5 とその上流および下流の候補因子について機能解析を行うことによって、Rab5 シグナル伝達系の解析を行った。

第 1 章では、*ypt5* 突然変異株である *ypt5-909* 株の表現型解析と Ypt5 の局在解析を行った。先行研究により、*ypt5-909* 株が細胞の増殖、細胞の形態形成、性分化、高濃度イオンストレスに対する応答、エンドサイトーシス、液胞の形態形成などの様々な細胞機能に異常を示すことが明らかになっている。本研究では、*ypt5-909* 株のさらなる表現型解析を行い、*ypt5-909* 株が小胞体から液胞へのタンパク質輸送や、種々の高濃度金属イオンに対する応答に異常を示すことを見出した。さらに、*ypt5-909* 株の細胞の体積は野生型株の細胞と比べて顕著な差が見られないこと、アクチン細胞骨格の局在に異常が見られることを明らかにした。また、細胞成分の分画実験によって、Ypt5 が膜画分に局在すること、変異によって膜へ局在できなくなることが判明した。Ypt5 の多くは液胞膜の細胞質側に集積して局在していることが、蛍光観察と輝度解析によって示された。

第 2 章では、Ypt5 の上流で活性化因子としてはたらくと考えられる Vps901 と Vps902 について、局在解析と遺伝子破壊株の表現型解析を行った。Vps901 と Vps902 は、Rab5 を特異的に活性化すると考えられているドメイン構造 (VPS9 ドメイン) をもち、このドメイン構造をもつ因子は分裂酵母において Vps901 と Vps902 の 2 つのみである。蛍光観察により、Vps901 と Vps902 はそれぞれ、Ypt5 との部分的な共局在が観察された。また、Vps901 と Vps902 の部分的な共局在も見られた。*vps901* 遺伝子破壊株において、性分化、高濃度イオンストレスに対する応答、液胞融合に異常が見られた一方で、*vps902* 遺伝子破壊株は明らかな表現型を示さなかった。しかしながら、*vps901 vps902* 二重破壊株においては、*vps901* 遺伝子破壊株が示した表現型よりも重篤な異常を示したことに加え、増殖や細胞形態にも異常が見られた。また、液胞膜の染色による蛍光観察および透過電子顕微鏡による観察により、*vps901 vps902* 二重破壊株の細胞は、野生型株の細胞がもつ液胞に相当する構造体をもたないことが判明した。

第 3 章では、Ypt5 の下流ではたらくエフェクター因子であると考えられる Pep7 と Aut12 について、局在解析および遺伝子破壊株の表現型解析を行った。Pep7 は、出芽酵母の Rab5 エフェクター Vac1p のホモログであり、FYVE ドメインをもつ。Aut12 は、哺乳動物などの Rab5 エフェクター Mon1 のホモログである。蛍光観察により、Pep7 と Aut12 はそれぞれ Ypt5 との共局在が観察され、その局在は Ypt5 依存的であった。*pep7* 遺伝子破壊株、*aut12* 遺伝子破壊株は、性分化、高濃度イオンストレスに対する応答、液胞の形態形成、液胞タンパク質の輸送にそれぞれ異なる異常を示した。

第1章から第3章までの結果より、分裂酵母の Rab5 シグナル伝達系の因子は多様な細胞機能を制御していることが判明した。本研究の結果から、*ypt5-909*株の細胞形態異常は、アクチン細胞骨格系が正しく局在できないことによって生じるものと考えられ、Ypt5 がアクチンの局在を制御することで細胞形態形成に関与していることが示唆された。また、*ypt5-909*株では変異をもった Ypt5 が膜に局在できなくなっていることが判明した。*ypt5-909*株が様々な細胞機能について異常を示すことと、変異をもった Ypt5 が膜局在に異常を示すことから、Ypt5 が正しく機能するためには、Ypt5 が適切に膜へ局在することが重要であることが考えられた。また、本研究では Ypt5 の上流因子であるとされる Vps901 と Vps902 について、*vps901* 遺伝子破壊株、*vps902* 遺伝子破壊株、*vps901 vps902* 二重破壊株の表現型を解析することによって、2つの VPS9 タンパク質が協調して多様な細胞機能を制御していることが考えられた。そして、性分化などのいくつかの細胞機能においては、主に Vps901 がはたらき、Vps902 は補助的に機能することが *vps901* 遺伝子破壊株、*vps902* 遺伝子破壊株、*vps901 vps902* 二重破壊株の表現型から示唆された。また、*vps901 vps902* 二重破壊株は *ypt5-909*株とよく似た表現型と示したことから、Vps901 と Vps902 はいずれも Ypt5 の制御に関与していることが考えられた。また、Ypt5 の下流の因子であると考えられる Pep7 と Aut12 については、Ypt5 が関与する機能において、*pep7* 遺伝子破壊株と *aut12* 遺伝子破壊株の表現型がそれぞれ異なっていたことから、Pep7 と Aut12 が Ypt5 からそれぞれ異なるシグナルを受けとって機能していることが予想され、Ypt5 は異なるエフェクター因子に異なるシグナルを伝えることで多様な機能を制御していることが示唆された。

本研究によって、分裂酵母における唯一の Rab5 ホモログである Ypt5、Ypt5 の上流ではたらくと考えられる Vps901 と Vps902、Ypt5 の下流ではたらくと考えられる Pep7 と Aut12 という Rab5 シグナル伝達系の因子が、細胞の形態形成、性分化、高濃度イオンストレスに対する応答、液胞の形態形成、液胞への膜輸送などの多様な細胞機能に関与していることが明らかとなり、これらの多様な細胞機能は Rab5 シグナル伝達系の因子間の時空間的なシグナル伝達によって制御されていることが考えられた。

略語説明

AAA	<u>A</u> TPases <u>a</u> ssociated with diverse cellular <u>a</u> ctivities
CORVET	<u>c</u> lass C <u>c</u> ore <u>v</u> acuole/ <u>e</u> ndosome <u>t</u> ethering
CPS	<u>c</u> arboxypeptidase <u>S</u>
CPY	<u>c</u> arboxypeptidase <u>Y</u>
CUE	<u>c</u> oupling of <u>u</u> biquitin conjugation to <u>E</u> R degradation
ESCRT	<u>e</u> ndosomal <u>s</u> orting <u>c</u> omplex <u>r</u> equired for <u>t</u> ransport
GAP	<u>G</u> TPase- <u>a</u> ctivating <u>p</u> rotein
GDI	<u>G</u> DP <u>d</u> issociation <u>i</u> nhibitor
GDP	<u>g</u> uanosine <u>d</u> iphosphate
GEF	<u>g</u> uanine nucleotide <u>e</u> xchange <u>f</u> actor
GFP	<u>g</u> reen <u>f</u> luorescent <u>p</u> rotein
GTP	<u>g</u> uanosine <u>t</u> riphosphate
HOPS	<u>h</u> omotypic fusion and vacuole <u>p</u> rotein <u>s</u> orting
IAHSP	<u>I</u> nfantile-onset <u>a</u> scending <u>h</u> ereditary <u>s</u> pastic <u>p</u> araplegia
MVB	<u>m</u> ulti <u>v</u> esicular <u>b</u> ody
SNARE	<u>s</u> oluble <u>N</u> -ethylmaleimide-sensitive-factor <u>a</u> ttachment protein <u>r</u> eceptor

第1章 分裂酵母の Rab5 ホモログである Ypt5 の機能解析

1.1 序論

真核生物の細胞は、核、小胞体、ゴルジ体、リソソーム、液胞などの、膜で区画化された細胞内小器官をもっており、これらの細胞内小器官が担う役割はそれぞれ異なっている。DNA を内包した細胞核では遺伝情報の保存や複製が行われ、小胞体では脂質やタンパク質の合成が、ゴルジ体では脂質やタンパク質の修飾が、リソソーム、液胞では物質の貯蔵や分解がそれぞれ行われている。細胞内小器官それぞれが異なる役割を持つためには、機能を果たすために必要な物質が、各細胞内小器官に適切に存在しなければならない。細胞膜の構造はリン脂質二重層であり、細胞の中と外、また細胞内小器官の中と細胞質は、膜によって空間的に隔離されている。膜を隔てた空間へ物質を移動させるための方法の1つとして小胞輸送の機構があり、運ばれる物質を包み込んだ膜が供与側の空間から膜小胞として出芽し、膜小胞が標的となる空間の膜と融合することによって、物質を移動させる。新しく合成されたタンパク質や細胞外の物質を目的の場所へ運ぶためには、選択的な小胞輸送の機構が必須であり、低分子量 G タンパク質の Rab ファミリーが、輸送小胞の出芽、輸送、標的膜への繫留と融合の各段階で機能している[1]。

低分子量 G タンパク質は、分子量が 2 万から 3 万程度の単量体であり、Rab ファミリーの他に、細胞の増殖や分化を制御する Ras ファミリー[2]、細胞質分裂、細胞運動、細胞形態などを制御する Rho ファミリー[3]、核へのタンパク質輸送に関与する Ran ファミリー[4]などがある。低分子量 G タンパク質は、グアノシン二リン酸 (guanosine diphosphate: GDP) またはグアノシン三リン酸 (guanosine triphosphate: GTP) と特異的に結合し、どちらのグアニンヌクレオチドと結合しているかによって活性の状態が異なり、GDP 結合型は不活性型、GTP 結合型は活性型である (図 1A)。不活性型の GDP 結合型の低分子量 G タンパク質は、GDP が GTP に交換されることによって活性型となる。この GDP から GTP への交換は、グアニンヌクレオチド交換因子 (guanine nucleotide exchange factor: GEF) によって引き起こされる (図 1A)。活性型の低分子量 G タンパク質は、スイッチ I (または G2)、スイッチ II (または G3) と呼ばれる領域の構造が変化することによって、エフェクター因子と相互作用できるようになり、シグナルが下流に伝えられる[5]。活性型の低分子量 G タンパク質は、自身の GTP アーゼ活性により、GTP を GDP に加水分解することによって不活性型となる。この GTP の加水分解は、GTP アーゼ活性化タンパク質

(GTPase-activating protein: GAP) によって促進される (図 1A)。このように、低分子量 G タンパク質は、結合しているグアニンヌクレオチドによって活性のオン、オフが制御されることから、シグナル伝達における分子スイッチであるとも言われている。

Rab ファミリータンパク質は、哺乳動物細胞において 60 種類以上が同定され、それぞれが細胞内小器官の膜に特徴的に局在している。たとえば、Rab1 は小胞体とゴルジ体に、Rab6 はゴルジ体に、Rab7 は後期エンドソームに局在している[6]。ほとんどすべての Rab にはカルボキシル末端に脂質修飾部位 (XCC モチーフ、もしくは CXC モチーフ) があり、脂質修飾部位における 1 つまたは 2 つのシステインがゲラニルゲラニル化されることによって、Rab が膜に局在することができると考えられている[6]。Ras ファミリーにも、カルボキシル末端に脂質修飾部位 (CAAX モチーフ) があるが、Ras ではカルボキシル末端の 3 アミノ酸 (AAX) がプロセシングを受けて除かれることと、システインがファルネシル化されることが、Ras の膜局在に必要であると考えられている[2]。

Rab の脂質修飾においては、Ras の脂質修飾における末端アミノ酸除去のような機構は報告されていない。

哺乳動物細胞に 60 種類以上存在する Rab の中で、出芽酵母や分裂酵母の細胞にも保存されている Rab は、Rab1, Rab5, Rab6, Rab7, Rab8, Rab11 の 6 種であり [7]、これら 6 種の Rab は、1 つの真核細胞の生命を維持するために、特に重要な Rab であると考えられる。その 1 つである Rab5 は、哺乳動物細胞において初期エンドソームに局在し [8]、エンドソーム融合 [9,10]、ファゴソーム成熟 [11]、オートファゴソームの形成 [12] などに加え、膜輸送機構とは一見直接的な関連性がなさそうなアクチン骨格系の再構成 [13] や染色体整列 [14,15] のような機能にも関与すると考えられている。また、キイロショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* の Rab5 遺伝子が neoplastic tumor suppressor gene である [16] という報告もある。これらの事実から、Rab5 は多様な細胞機能の制御を担うことが考えられる。しかしながら、Rab5 が細胞内で、どのようにシグナルを受け取り、いかにして下流へシグナルを伝えることでどんな機能が発現するのか、という Rab5 シグナル伝達系と機能発現の関係についての詳細な分子機構は明らかにされていない。

哺乳動物には 3 つの Rab5 ホモログ (Rab5A, Rab5B, Rab5C) が存在する (図 1B)。多様な機能を制御している Rab5 が、どのようなシグナル伝達機構によってそれぞれの機能を発現しているのかを理解するためには、3 つの Rab5 それぞれのシグナル伝達すべてを考慮しなければならないが、3 つの Rab5 シグナル伝達の機構を網羅的に調べた報告は現在されていない。また、哺乳動物には、Rab5 を制御する因子の数が多し。VPS9 ドメインを含むタンパク質は、Rab5 に対して特異的なグアニンヌクレオチド交換活性 (GEF 活性) をもつと考えられており [17]、哺乳動物において少なくとも 10 個存在する (図 1B)。Rab5 とその制御因子の数が多しにより、Rab5 が、どのように制御され、どんなシグナルを何に伝えるか、という Rab5 シグナル伝達系を理解するために考慮すべきシグナル伝達経路の数も多い。このことは、Rab5 のシグナル伝達機構の理解が進んでいない一因になっていると考えられる。

ゲノムプロジェクトにより、分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* のゲノム上にある Rab5 ホモログをコードする遺伝子は *ypt5⁺* 遺伝子 1 つだけであると予測されている (図 1B)。加えて、分裂酵母の VPS9 タンパク質は Vps901 と Vps902 の 2 つのみである [18] (図 1B)。Rab5 が 1 つ、その GEF が 2 つと、Rab5 シグナル伝達に関連すると考えられる因子数が少ない分裂酵母は、Rab5 のシグナル伝達系を理解するために考慮すべきシグナル伝達経路の数も少ない。このことよって分裂酵母は、Rab5 のシグナル伝達系を単純化して考えることができるため、シグナル伝達系の解析を行うモデルとして適していると考えられる。

ypt5⁺ 遺伝子は生存に必須の遺伝子であることが報告されているが [19,20]、生存可能な *ypt5* 突然変異株である *ypt5-909* 株が単離されている [21]。*ypt5-909* 株は、窒素源飢餓の条件下で生存率が低下する変異体として単離された温度感受性株で、Ypt5 の脂質修飾部位における最初のシステインがアルギニンに置換した点変異体である [21] (図 2A)。*ypt5-909* 株の表現型解析によって、*ypt5-909* 株が細胞増殖、細胞の形態形成、性分化、エンドサイトーシス、液胞の形態形成、液胞融合に異常があることが明らかにされた [22]。*ypt5* 突然変異株が様々な表現型を示すという事実により、分裂酵母の細胞においても、Rab5 が多様な機能を制御していることが考えられる。また、緑色蛍光タンパク質 (green fluorescent protein: GFP) と融合させた Ypt5 (GFP-Ypt5) が細胞内でドット状の蛍光シグナルを示すこと、そして *ypt5-909* 株において GFP-Ypt5 のドット状の蛍光が

失われることが観察されている[22]。私は、Ypt5 がいかんして多様な機能を制御しているのかを理解するために、*ypt5-909*株の表現型と Ypt5 の局在について、より詳細な解析を行った。

1.2 結果

1.2.1 *ypt5* 突然変異株における高濃度イオンストレスに対する応答と液胞タンパク質輸送

分裂酵母における Rab5 のホモログは Ypt5 のみである (図 1B)。Ypt5 の脂質修飾部位の最初のシステインがアルギニンに置換した点変異体である *ypt5-909*株は (図 2A)、様々な細胞機能に異常を示す。

*ypt5-909*株は高濃度の Ca^{2+} や K^{+} によって増殖が阻害される[22]。膜輸送に関連する因子の変異体が高濃度の Ca^{2+} に対して感受性を示すことについては多くの報告があるが、他にも Mn^{2+} や Zn^{2+} などの金属イオンの高濃度ストレスに対しても膜輸送に関わる因子の変異体が感受性を示す例がある[23]。Ypt5 が Ca^{2+} と K^{+} 以外の高濃度イオンに対しても応答するかどうかについて検討するために、*ypt5-909*株を様々な高濃度イオン含有培地で増殖させた。その結果、*ypt5-909*株は高濃度の Mn^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} 含有培地においても増殖が阻害された (図 2B)。この結果から、Ypt5 は多様なイオンストレス条件に応答して機能していることが考えられた。

*ypt5-909*株はエンドサイトーシスに異常があり[22]、細胞外から物質を取り込む過程に Ypt5 が関与していることが考えられる。エンドサイトーシス経路以外の膜輸送においても Ypt5 が機能するかどうかについて調べるために、小胞体から液胞への小胞輸送における Ypt5 の機能について、カルボキシペプチダーゼ S (carboxypeptidase S: CPS) を輸送マーカーとして利用して観察を行った。CPS は、新しく合成された後、アミノ末端の膜貫通領域を介して小胞体膜に局在する。その後、ゴルジ体に運ばれ、後にユビキチン化されて多胞体 (multivesicular body: MVB) の内部小胞にとりこまれ、液胞内へと輸送され、液胞内でプロセッシングを受けて成熟型となる[24,25]。野生型細胞に Ub-GFP-CPS を発現させると、液胞膜の内部に Ub-GFP-CPS の蛍光シグナルが見られる (図 3 上)。*ypt5-909*株において、Ub-GFP-CPS は細胞質や液胞外のドット状に蛍光シグナルを示し (図 3 下)、CPS が液胞内へ正しく輸送されていないことが考えられた。この観察によって、Ypt5 が多胞体を介した液胞へのタンパク質輸送に関与していることが考えられた。

1.2.2 *ypt5* 突然変異株の細胞形態とアクチン細胞骨格

*ypt5-909*株は細胞形態にも異常を示す。分裂酵母の細胞形態は円筒型であるが、*ypt5-909*株の細胞は、野生型細胞に比べて丸い[22]。*ypt5-909*株の細胞が形態異常を示す原因を探るため、まずは *ypt5-909*株の細胞と野生型株の細胞それぞれの体積を測定し、比較を行った。コールターカウンターを用いてそれぞれ 10^5 個における細胞の体積を測定したところ、*ypt5-909*株は $120 \sim 160 \mu\text{m}^3$ の細胞が野生型細胞よりもやや多かったが、全体としては *ypt5-909*株と野生型株における細胞の体積に大きな違いは見られなかった (図 4A)。次に、*ypt5-909*株におけるアクチン細胞骨格に異常がないか調べた。分裂酵母の細胞にはアクチンパッチ、アクチンリングと呼ばれる特徴的なアクチンの構造体が見られる。アクチンパッチは、分裂酵母が極性成長によって細胞を伸張させる際の成長端や、エンドサイトーシスが起こる部位に集積する構造体であり、アクチンリングは、細胞質分裂時に集積して収縮環を構成する構造体である[26,27]。蛍光標識ファロイジンによってアクチンを染色することでアクチンの局在を観察したところ、*ypt5-909*株の細胞において、アクチンリ

ングは野生型の細胞と同様に見られた一方、細胞極のアクチンパッチの数は野生型株の細胞に比べて著しく少なかった (図 4B)。 *ypt5-909* 株の細胞では、アクチンパッチが細胞極へと適切に局在できなくなっていることが考えられた。これらの結果から、Ypt5 はアクチン骨格系の局在を制御することで、細胞形態形成に関与している可能性が示唆された。

1.2.3 生化学的な分画による Ypt5 の局在

蛍光タンパク質 GFP を融合させた Ypt5 (GFP-Ypt5) はドット状の蛍光シグナルを示す一方、脂質修飾部位に点変異を持つ Ypt5 に GFP を融合させた GFP-Ypt5-909 はドット状の蛍光シグナルを失う [22] (図 4B)。 Ypt5 の局在についてより詳細な情報を得るために、生化学的アプローチによる Ypt5 の局在解析を行った。野生型株と *ypt5-909* 株それぞれの細胞を、酵素処理によって細胞壁を分解し、ホモジナイザーを用いて細胞を破砕した後、段階的な遠心分離を行うことによって細胞成分を分画し、ウェスタンブロット解析で Ypt5 がどの画分に存在するのかを調べた。その結果、Ypt5 は P13 膜画分および可溶性画分に検出された (図 5)。 P13 膜画分は、出芽酵母において小胞体や液胞が回収される画分であり [28]、Ypt5 はこれらの膜に局在していることが考えられた。さらに、P13 画分における Ypt5 の量が *ypt5-909* 株において減少していたことから、*ypt5-909* 株では、脂質修飾部位に変異をもつ Ypt5 が膜に適切に局在できなくなっていることが考えられた (図 5)。

1.2.4 液胞膜近傍の Ypt5 の局在

GFP-Ypt5 は、細胞内でドット状の蛍光シグナルを示し、このドットは液胞膜周辺に見られるものが多い (図 6A 左写真)。 GFP-Ypt5 のドット状の蛍光シグナルと液胞膜との局在関係を調べるために、蛍光観察と画像解析を行った。ゲノム上の *ypt5* 遺伝子プロモーターから GFP-Ypt5 を発現させる細胞株 (GFP-*ypt5* インテグランド株) の液胞膜を FM4-64 蛍光色素によって染色し、2 種類の蛍光を観察した。取得した蛍光画像を解析し、GFP と FM4-64 それぞれの輝度値のピークの距離を測定した (図 6 中央写真、右グラフ)。液胞膜近傍に局在する GFP-Ypt5 について、50 例の輝度解析を行った結果、GFP-Ypt5 の輝度値のピークは、液胞膜 (FM4-64) の輝度値のピークと一致しているもの、または液胞膜の外側方向に数ピクセルだけ離れているものが過半数を占めた。このことから、液胞膜近傍における GFP-Ypt5 は、液胞膜の細胞質側に局在していることが考えられた。

1.3 考察

本章では、*ypt5* 突然変異株である *ypt5-909* 株における表現型の解析と Ypt5 の局在解析を行った。

ypt5-909 株の表現型解析により、Ypt5 は高濃度の Ca^{2+} , K^{+} に加え、 Mn^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} という様々なイオンストレスに対して応答して機能することが考えられた (図 2)。 Ypt5 という 1 種類の因子が、多種類のストレスに応答して機能するシグナル伝達の経路は、ストレス条件によってそれぞれ異なっていることが予想される。異なるストレス条件に対し、Ypt5 がそれぞれどのように対処しているのかについては、Ypt5 から下流へのシグナル伝達についての解析が特に重要になると考えられる。エフェクター因子の高濃度ストレスに対する応答については第 3 章で述べる。

ypt5-909 株において Ub-GFP-CPS の蛍光シグナルが液胞内に観察されなかったことから、Ypt5

は CPS の液胞への輸送に必要であることが考えられた (図 3)。CPS は、小胞体からゴルジ体、そして多胞体を経て液胞へと運ばれるタンパク質である。多胞体の形成にはたらく因子 (ESCRT (endosomal sorting complex required for transport) 複合体の構成因子や、ESCRT の解離にはたらく AAA (ATPases associated with diverse cellular activities) 型の ATPase) の遺伝子を破壊することによって、CPS の輸送に異常が見られる [24]。出芽酵母や分裂酵母では、多胞体形成に関わる因子の変異体において、Ub-GFP-CPS の蛍光シグナルがドット状に集積して見られ、これは class E コンパートメントと呼ばれる [24,29]。class E コンパートメントは、多胞体を正しく形成することができない結果として生じる構造体であると考えられている。ypt5-909 株においても、ドット状の蛍光シグナルを示す Ub-GFP-CPS は一部観察されたが、ほとんどの蛍光シグナルは細胞質全体に見られ、多胞体形成に関わる因子の変異体とは異なる Ub-GFP-CPS の蛍光シグナルを示した。このことから、Ypt5 が CPS の輸送経路において、多胞体形成とは別の段階で機能していることが示唆された。また、ypt5-909 株で見られるドット状の Ub-GFP-CPS 蛍光シグナルが class E コンパートメントであれば、Ypt5 が多胞体形成にも関与していることが考えられるが、class E コンパートメントと同等のドット状蛍光シグナルであるかどうかの根拠はなく、全く別の構造体である可能性もある。このことについて確かめるには、電子顕微鏡を用いた観察などのさらなる解析が必要になると考えられる。

本章では、ypt5-909 株の細胞に形態異常が見られる原因を調べるために、体積測定とアクチン局在解析を行った (図 4)。野生型株と ypt5-909 株の細胞の体積が大きく異ならなかった事実によって、ypt5-909 株の細胞は、萎縮したり膨張したりすることで形が変化しているのではなく、細胞が自身の形態を適切に維持することができなくなっているという可能性が考えられた。アクチンの局在解析によって、細胞を形づくるのに重要な細胞骨格系の 1 つであるアクチンが、ypt5-909 株の細胞で適切に局在できなくなっている様子が観察された。この結果から、Ypt5 がアクチン骨格系の局在を制御していることが考えられ、Ypt5 はアクチンを正しく局在させることで細胞形態形成に関与しているということが示唆された。一般的に、細胞の形態形成は低分子量タンパク質の Rho ファミリーによって制御されていると考えられている。線虫 *Caenorhabditis elegans* では、Rho ファミリーである CED-10 の下流エフェクター因子が、Rab5 の活性化にはたらくと考えられる VPS9 タンパク質の RIN-1 であることが見出されている [30] が、分裂酵母において、Ypt5 が伝えるシグナルと Rho ファミリーが伝えるシグナルとの関連性は現時点で不明である。

分画実験の結果から、Ypt5 が膜に局在すること、そして Ypt5 は脂質修飾部位の変異によって膜に適切に局在できなくなることが示唆された (図 5)。蛍光観察で、GFP-Ypt5 がドット状の蛍光シグナルを示し、GFP-Ypt5-909 ではドット状の蛍光シグナルが失われるということ [22] と、今回の分画実験の結果を合わせて考えると、GFP-Ypt5 は膜構造体に集積して局在することが予想される。GFP-Ypt5 のドット状蛍光シグナルの多くは、液胞膜近傍に観察され、これらは液胞膜の細胞質側に局在していることが、輝度解析の結果から考えられた (図 6)。ypt5-909 株の表現型から Ypt5 は液胞の形態形成、液胞融合を制御していると考えられている [22]。Ypt5 は液胞膜上に局在することで、液胞の形態形成や液胞融合に何らかのはたらきをしていることが予想される。また、GFP-Ypt5 は、液胞膜以外においてもドット状の蛍光シグナルを示している。液胞膜近傍以外に局在する Ypt5 は、液胞形態形成や液胞融合ではない機能 (たとえば増殖や細胞の形態形成など) を制御している可能性が考えられる。これらのことをより詳細に検討するには、GFP-Ypt5 の挙動を、他の因子や

細胞内小器官と同時にリアルタイムで観察する実験が必要であると考えられる。また、分画実験において、野生型の Ypt5 は可溶性画分にも検出されている (図 5)。GDP 型の Rab は、GDP 解離阻害因子 (GDP dissociation inhibitor: GDI) と結合することによって、細胞質に存在すると考えられていることから [6]、可溶性画分に検出された Ypt5 は GDP 型の Ypt5 であるとも考えられる。

ypt5-909 株における変異部位は脂質修飾部位であり、ヌクレオチドやエフェクター因子との結合に関連するという報告が無い部位であるにも関わらず、*ypt5-909* 株は様々な表現型を示す。この事実から、Ypt5 が機能を果たすためには、Ypt5 が適切な膜に局在することが必要であることが強く示唆される。GFP-Ypt5 の蛍光シグナルはドット状に観察されるが、液胞膜の細胞質側に局在するものもあれば、そうでないものがあるように、観察されるドット状シグナルの実体はそれぞれ異なっている可能性が高い。Ypt5 が局在する膜構造は一体どういうものか、そしてそれぞれの膜構造において Ypt5 はどういった機能を担っているのかを知ることは、今後の研究の課題である。

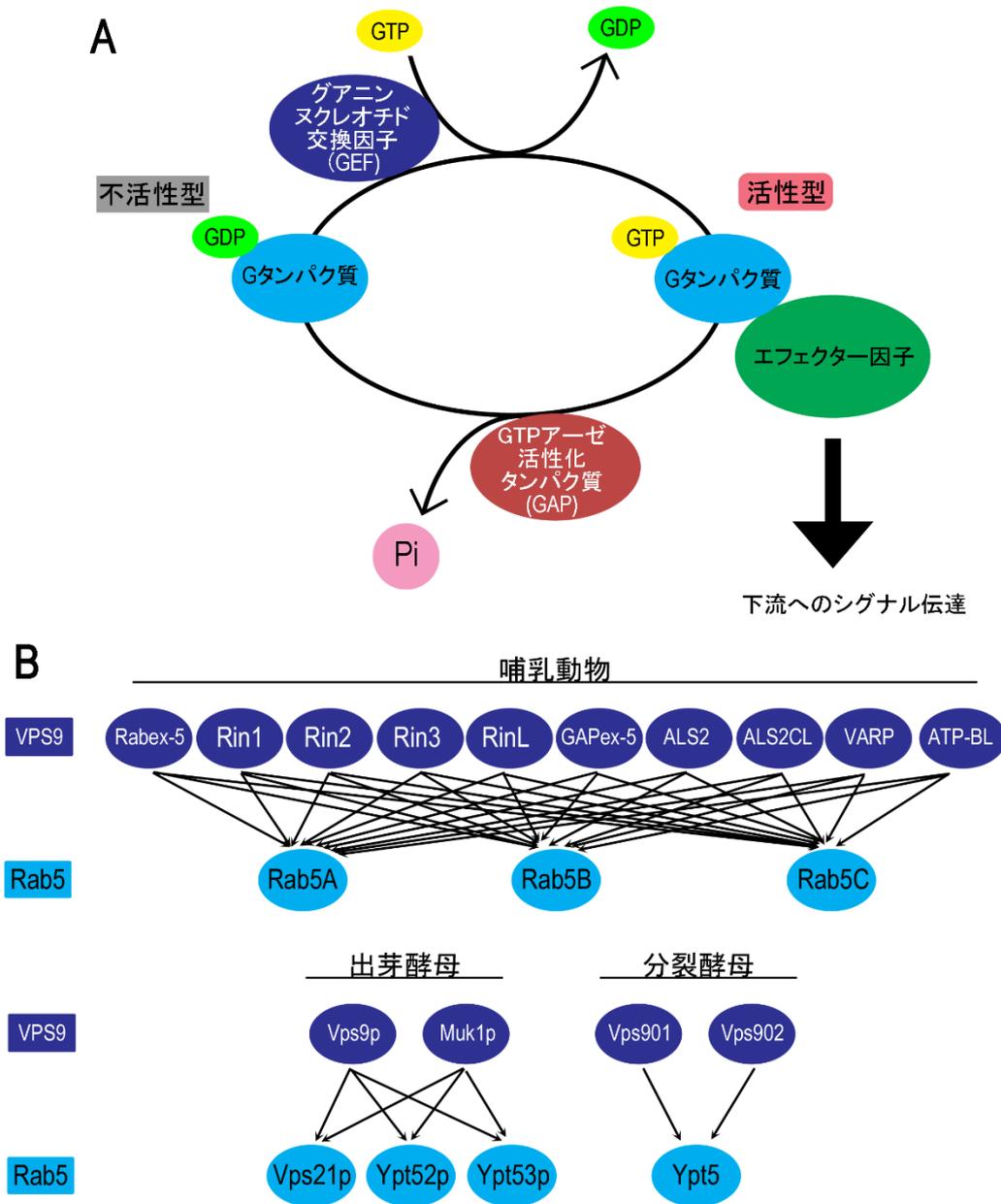


図 1. 低分子量 G タンパク質の活性サイクル、Rab5 と VPS9 タンパク質

(A) 低分子量 G タンパク質には、不活性型の GDP 結合型状態と活性型の GTP 結合型状態がある。GDP が GTP に交換されることで活性型の GTP 型となり、GDP/GTP 交換反応はグアニンヌクレオチド交換因子 (GEF) によって引き起こされる。活性型の低分子量 G タンパク質は、エフェクター因子と相互作用することにより下流にシグナルを伝える。低分子量 G タンパク質自身の GTP アーゼ活性によって GTP が加水分解されて GDP となることで不活性型となる。GTP の加水分解は、GTP アーゼ活性化タンパク質 (GAP) によって促進される。(B) 哺乳動物細胞、出芽酵母、分裂酵母における Rab5 と VPS9 タンパク質。哺乳動物細胞や出芽酵母には Rab5 ホモログが 3 つ存在するが、分裂酵母の Rab5 ホモログは Ypt5 ひとつだけである。また、Rab5 に対するグアニンヌクレオチド交換活性 (GEF 活性) をもつと考えられている VPS9 ドメインをもつタンパク質は、哺乳動物に少なくとも 10 個存在するが、分裂酵母には 2 つ (Vps901 と Vps902) のみである。

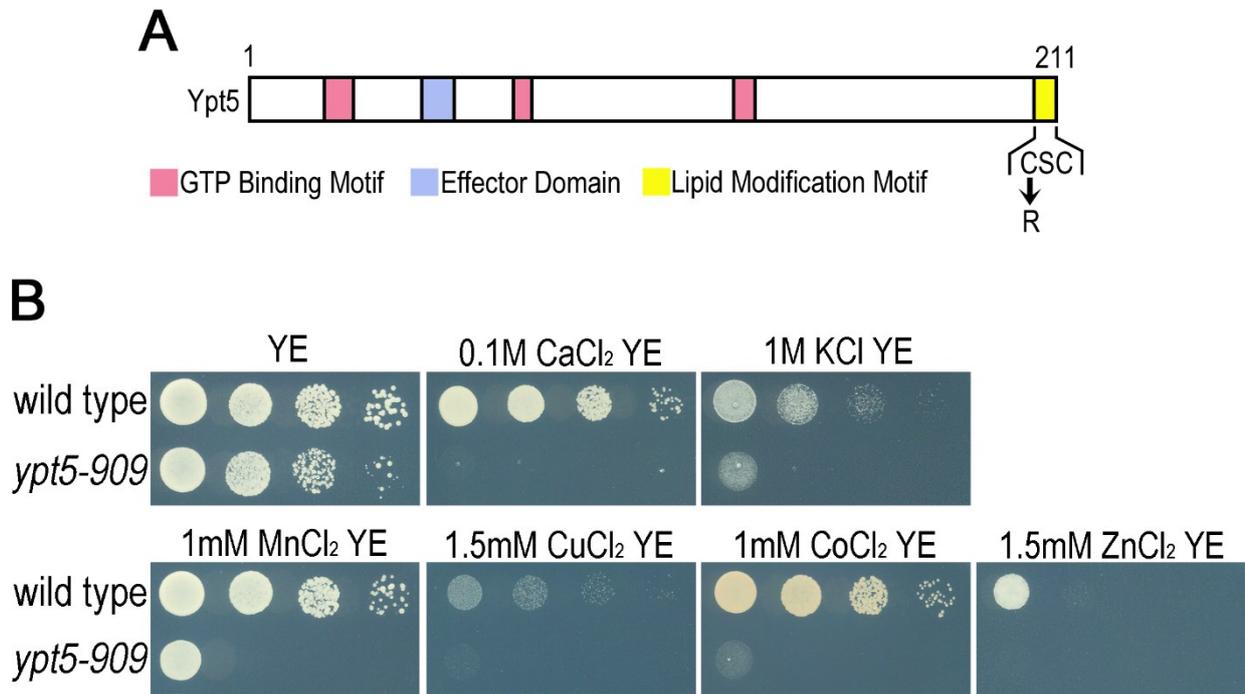


図 2. *ypt5* 突然変異株における高濃度イオンストレスによる増殖阻害

(A) Ypt5 の構造と *ypt5-909* 株の変異部位。 *ypt5* 突然変異株である *ypt5-909* 株は、Ypt5 の脂質修飾部位における 209 番目のシステインがアルギニンに置換している。示したモチーフ、ドメインは UniprotKB データベースで予測されたもの (<http://www.uniprot.org/uniprot/P36586>)。 (B) 4×10^4 , 4×10^3 , 4×10^2 , 4×10 個の細胞 (wild type: TN8, *ypt5-909*: KS2) を、図に示した各種培地にスポットし、26°C に 3 日間静置培養した。

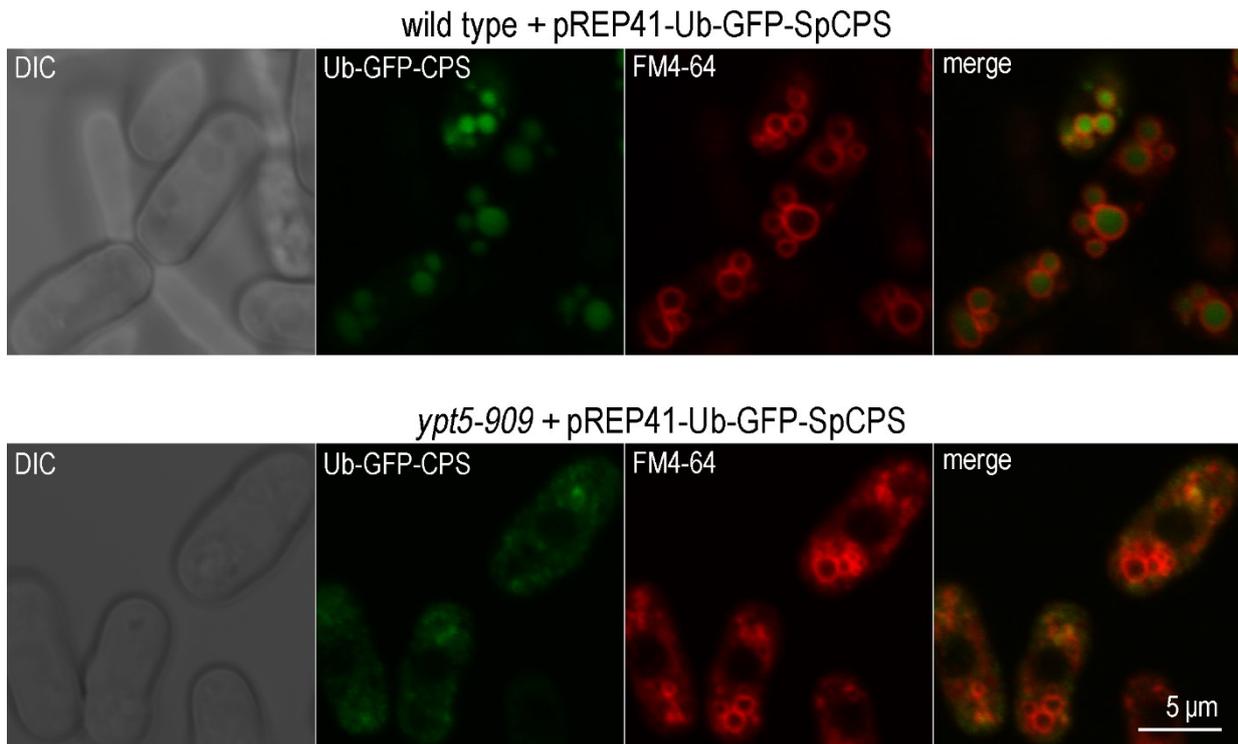


図 3. *ypt5* 突然変異株における液胞タンパク質 CPS の輸送異常

Ub-GFP-CPS (ゴルジ体から多胞体経路を介して液胞へ輸送されるタンパク質) をプラスミドにより発現させた細胞 (wild type: TN8, *ypt5-909*: KS2) の液胞膜を、FM4-64 蛍光色素で染色し、二重蛍光の観察を行った。DIC: 微分干渉顕微鏡観察。

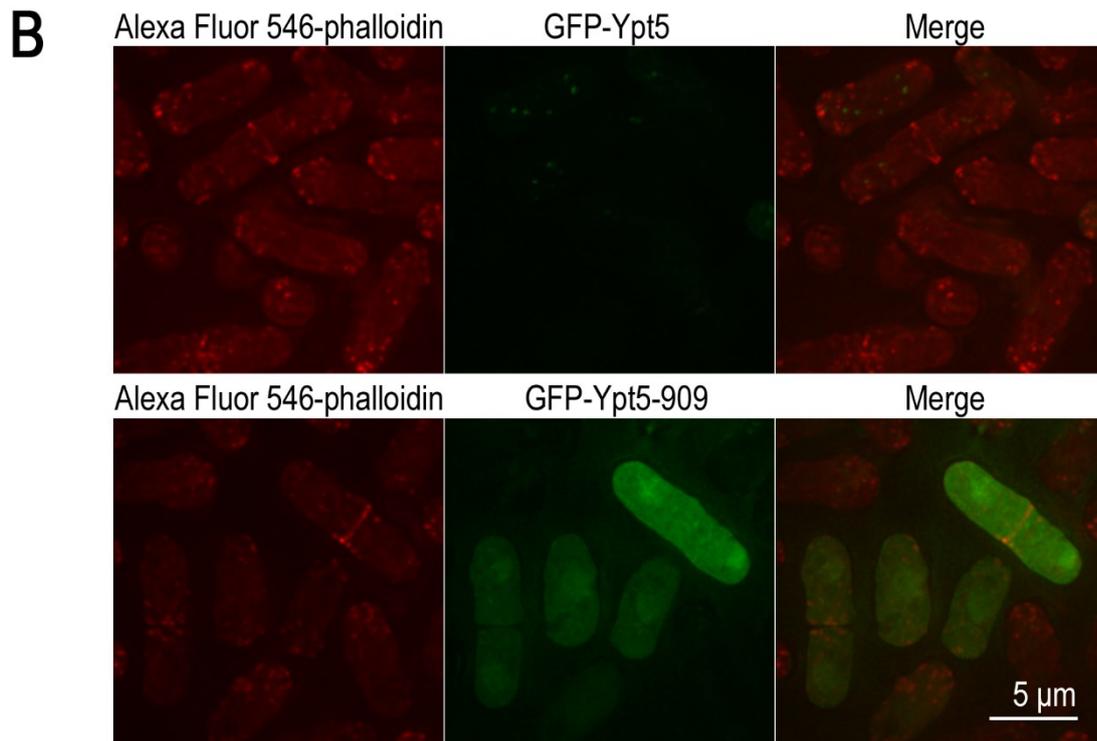
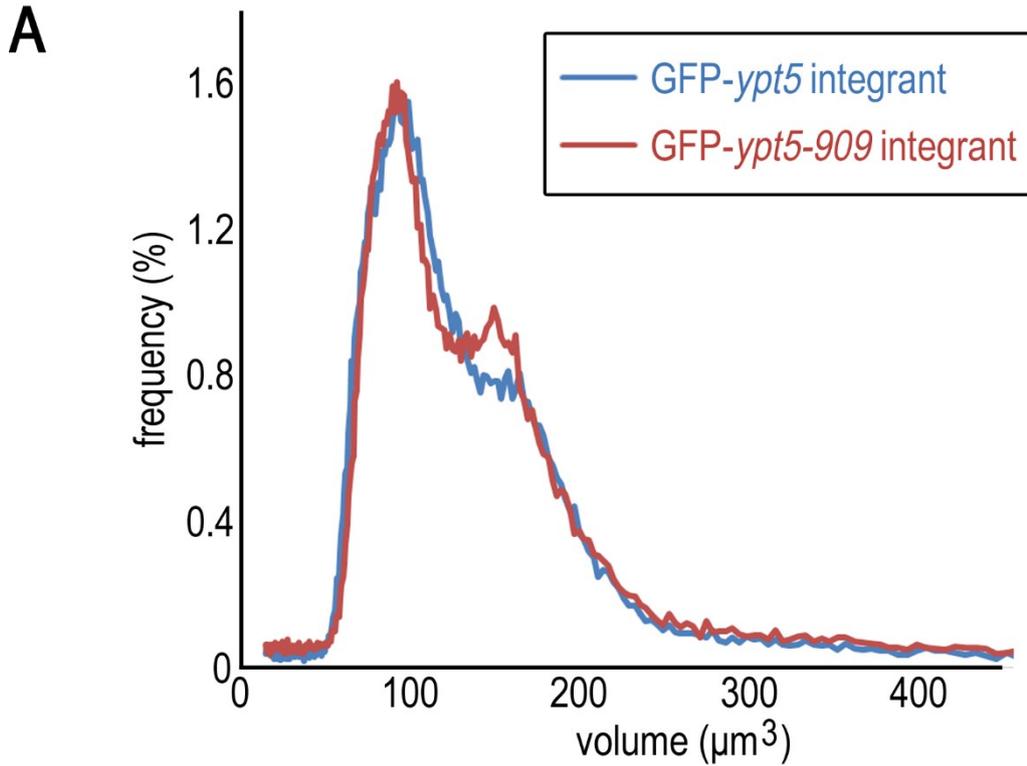


図 4. *ypt5* 突然変異株における細胞の体積とアクチン局在

(A) 対数増殖期における 10^5 個の細胞 (GFP-*ypt5* integrant: CK002, GFP-*ypt5-909* integrant: CK003) の体積を、コールターカウンターを用いて測定した。(B) 対数増殖期の細胞 (CK002, CK003) をホルマリンで固定し、蛍光標識ファロイジンを用いてアクチンを染色した。蛍光観察によって多面画像を取得し、デコンボリューション処理を行った後、画像の重ね合わせ処理を行った。

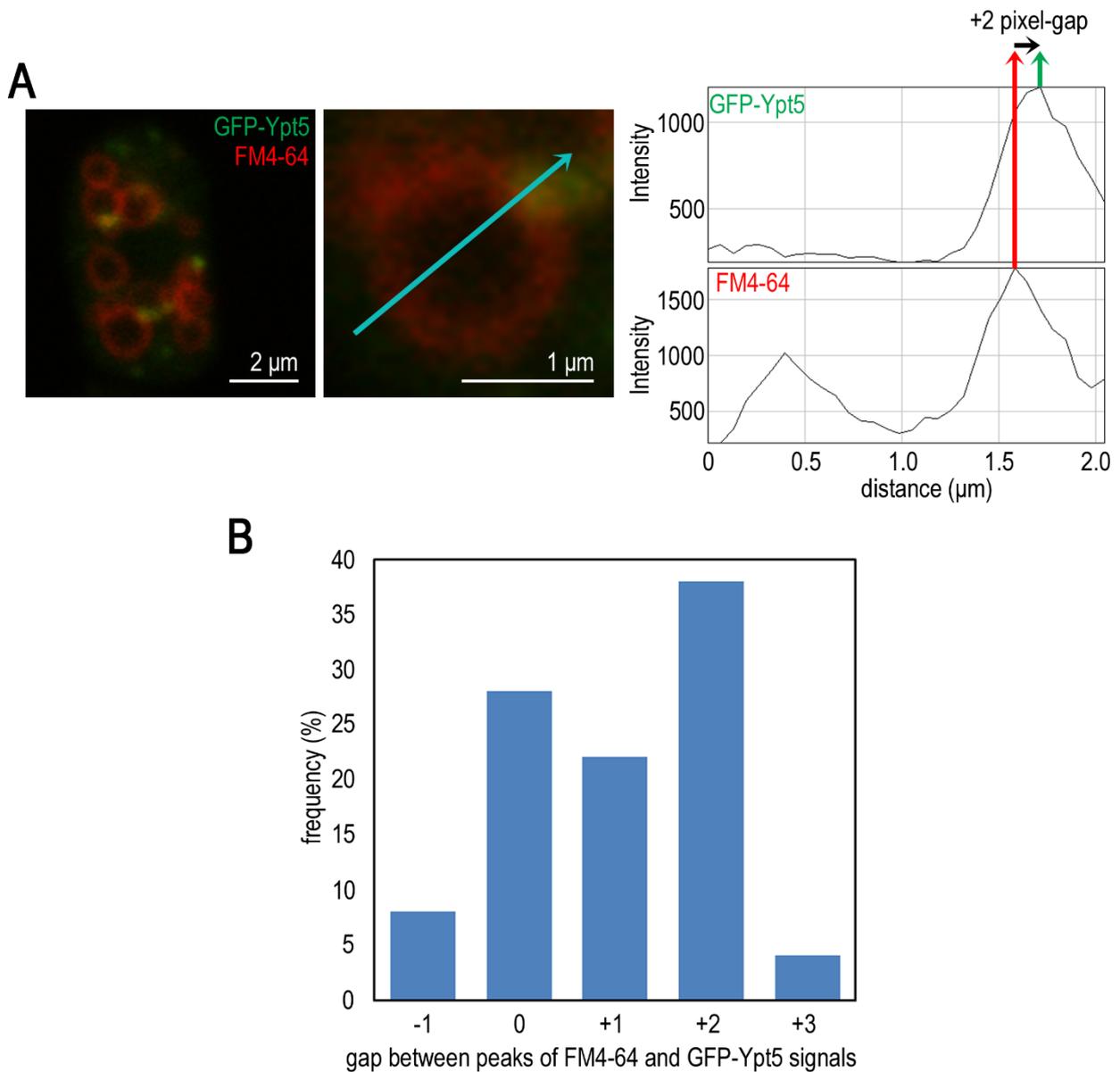


図 6. 液胞膜の近傍に見られる Ypt5 の局在

(A) 対数増殖期の GFP-*ypt5* インテグランド株 (CK002) の液胞膜を FM4-64 蛍光色素で染色し、蛍光観察を行った。GFP-Ypt5 のドット状シグナルの多くは、液胞膜周辺に見られる (左の写真)。液胞膜周辺における GFP-Ypt5 の蛍光シグナルと液胞膜 (FM4-64) の蛍光シグナルの距離を、画像解析によって測定した。測定方法は、水色の矢印 (右の写真) のように ROI (Region Of Interest) を選択し、ROI 上の GFP-Ypt5 と FM4-64 の輝度の分布を ImageJ ソフトウェアによってプロットし (GFP-Ypt5: 上のグラフ、FM4-64: 下のグラフ)、輝度のピーク値の距離を測定した。(B) GFP-Ypt5 と FM4-64 における輝度のピーク値の距離を輝度解析によって 50 例測定した結果の分布。

第2章 Ypt5の活性化因子候補 Vps901とVps902の機能解析

2.1 序論

GDP結合型の低分子量Gタンパク質は不活性型であり、GDPがGTPに交換されることによって活性型となる(図1A)。低分子量Gタンパク質におけるGDPからGTPへの交換は、グアニンヌクレオチド交換因子(GEF)が作用することによって引き起こされる(図1A)。低分子量Gタンパク質がシグナル伝達の分子スイッチとして適切に機能するためには、活性化因子としての役割を担うGEFのはたらきが極めて重要である。

ヒトのRabex-5[31]、出芽酵母のVps9p[32]は、不活性型のGDP結合型Rab5に結合し、特異的なグアニンヌクレオチド交換活性(GEF活性)を示すことが報告された。これらの因子には共通のドメイン構造があり、このドメインはVPS9ドメインと名づけられた。後に、VPS9ドメインをもつタンパク質(VPS9タンパク質)が、Rab5に対してGEF活性を示すという報告が様々な種で報告され、現在では、VPS9タンパク質はRab5に対するGEF活性をもつ活性化因子であると考えられている[17]。

VPS9タンパク質は、酵母から高等動物に至るまで様々な種で同定されており、多様な生体機能に関与している。出芽酵母のVps9pは液胞へのタンパク質輸送やオートファジーに必要であり[33,34]、キイロショウジョウバエ*Drosophila melanogaster*のRabex-5遺伝子はneoplastic tumor suppressor geneであり[35]、シロイヌナズナ*Arabidopsis thaliana*のVPS9a遺伝子は胚形成に必須である[36]。哺乳動物のVPS9タンパク質については、RIN1が上皮成長因子の取り込みやエンドソーム融合にはたらくこと[37]、またALS2のVPS9ドメイン内における変異が乳児発症上行性遺伝性痙性対麻痺(Infantile-onset ascending hereditary spastic paraplegia: IAHS)の原因であること[38]などが報告されている。

哺乳動物には、少なくとも10個のVPS9タンパク質が存在することが、Pfamデータベース(<http://pfam.xfam.org/>)によって予想されており(図1B)、そのほとんどが、Rab5に対してGEF活性を持つことが報告されている(Rabex-5[31]、RIN1[37]、RIN2[39]、RIN3[40]、RINL[41]、GAPex-5[42]、ALS2[43]、ALS2CL[44]、VARP[45])が、3つのRab5(Rab5A, Rab5B, Rab5C)すべてについて調べられているのは一部の報告のみである。また哺乳動物では、VPS9タンパク質が、Rab5と系統学的に近縁なRab(Rab5 subfamily GTPase)[46]に対してもGEF活性を示す例がいくつか報告されている。Rabex-5はRab17, Rab21, Rab22a, Rab31[41,46]に対して、RIN3はRab21, Rab22a, Rab31[41]に対して、RINLはRab21, Rab22a, Rab31[41]に対して、VARPはRab21に対して[45]、それぞれGEF活性が確認されている。哺乳動物において、10個のVPS9タンパク質が、3つのRab5やRab5に近縁なRabに対し、どのようなシグナル伝達機構によって活性の制御を行っているかは統一的には理解されておらず、またこれら10個のVPS9タンパク質間の関係性を網羅的に調べた研究は報告されていない。

分裂酵母のゲノム上で、VPS9タンパク質をコードする遺伝子はvps901⁺とvps902⁺の2つのみである[18](図1B)。VPS9タンパク質が2つ、Rab5が1つである分裂酵母は、VPS9タンパク質とRab5との関係性を調べるうえでも、VPS9タンパク質間の関係性を調べるうえでも、モデルとして適していると考えられる。vps901遺伝子破壊株の表現型解析により、Vps901は液胞タンパク質の輸送や、液胞融合などに異常があることが明らかになっている[18]。Vps902については、

vps902 遺伝子破壊株が CPY の輸送に異常を示さず[18]、Vps902 が担う役割は明らかになっていない。

私は、分裂酵母における 2 つの VPS9 タンパク質である Vps901 と Vps902 の機能とその関係性を調べるために、Vps901 と Vps902 の局在解析、および *vps9* 遺伝子破壊株 (*vps901* 遺伝子破壊株、*vps902* 遺伝子破壊株、*vps901 vps902* 二重破壊株) の表現型の解析を行った。

2.2 結果

2.2.1 Vps901 と Vps902 の局在

VPS9 タンパク質は、Rab5 に対して特異的なグアニンヌクレオチド交換活性 (GEF 活性) をもつと考えられている[17]。分裂酵母の VPS9 タンパク質は、Vps901 と Vps902 の 2 つのみである[18]。

Vps901 と Vps902 の局在を調べるために、GFP 遺伝子を *vps901+* または *vps902+* の遺伝子座に挿入し、それぞれ自身のプロモーターによって Vps901-GFP または Vps902-GFP の融合タンパク質が発現する株 (*vps901*-GFP インテグランド株、*vps902*-GFP インテグランド株) を作製し、蛍光観察を行った。対数増殖期の栄養細胞では、Vps901-GFP、Vps902-GFP はどちらもドット状の蛍光シグナルを示した (図 7B)。また、窒素源枯渇条件で培養することによって性分化を誘導して観察したところ、接合した細胞や孢子にもドット状の蛍光シグナルが見られた (図 7C)。

Vps901-GFP と Vps902-GFP が示すドット状の蛍光シグナルは、GFP-Ypt5 が示すシグナルと似ている[22]。そこで、Vps901 または Vps902 と Ypt5 との局在の関係性を調べるために、両方の蛍光融合タンパク質を発現させる *vps901*-GFP mCherry-*ypt5* インテグランド株、*vps902*-GFP mCherry-*ypt5* インテグランド株を作製し、それぞれ自身のプロモーターから発現される蛍光融合タンパク質の二重蛍光観察を行った。Vps901-GFP と mCherry-Ypt5、および Vps902-GFP と mCherry-Ypt5 は部分的な共局在が見られた (図 7D 上、中央)。このことから、Vps901 と Ypt5、および Vps902 と Ypt5 は同じ膜構造体において機能することが予想された。また Vps901 と Vps902 の局在の関係性を調べるために、*vps901*-GFP *vps902*-mCherry インテグランド株を作製して二重蛍光観察を行った。Vps901-GFP と Vps902-mCherry は部分的な共局在が見られ (図 7D 下)、この結果により分裂酵母における 2 つの VPS9 タンパク質である Vps901 と Vps902 が同一の膜構造体に局在して機能することが示唆された。

2.2.2 *vps9* 遺伝子破壊株における増殖と細胞形態

Vps901 と Vps902 の機能を調べるため、それぞれの遺伝子破壊株における表現型の解析を行った。*vps901* 遺伝子破壊株、*vps902* 遺伝子破壊株の増殖について調べたところ、栄養豊富な寒天培地上でどちらも増殖に異常は見られなかった (図 8A)。しかしながら、*vps901 vps902* 二重破壊株における増殖について調べると、30°C において増殖に異常が見られ、37°C ではまったく増殖が見られなかった (図 8A)。*vps901 vps902* 二重破壊株の増殖についてより詳しく調べるために、栄養豊富な液体培地で培養したところ、*vps901 vps902* 二重破壊株は増殖が遅く、培養液における細胞の飽和濃度が低かった (図 8B)。この結果から、Vps901 と Vps902 は協調して細胞増殖に関与していることが考えられた。次に、細胞の形態を観察すると、*vps901 vps902* 二重破壊株は野生型細胞と異なり、やや丸い細胞形態を示した (図 9A)。対数増殖期の細胞 200 個の長軸と短軸の長さを測定すると、*vps901* 遺伝子破壊株、*vps902* 遺伝子破壊株の細胞はいずれも野生型株の細胞と差は見

られなかった (図 9B)。一方、*vps901 vps902* 二重破壊株の細胞は、長軸の長さが短く、短軸の長さが長いことから、長軸と短軸比の値は、野生型細胞よりも 1 (円形) に近い値を示した (図 9B)。これらのことから Vps901 と Vps902 が協調して細胞の形態形成にはたらいっていることが考えられた。また、*vps901 vps902* 二重破壊株の細胞形態異常について詳細に調べるため、アクチン細胞骨格の局在を観察した。蛍光標識ファロイジンによってアクチンを染色して蛍光観察を行ったところ、*vps901 vps902* 二重破壊株の細胞におけるアクチンリングおよびアクチンパッチの局在は野生型株の細胞と似ており、アクチン局在に異常は見られなかった (図 9C)。このことから、Vps901 と Vps902 は、アクチンの局在制御とは異なる方法で細胞形態形成に関わっていることが考えられた。

2.2.3 *vps9* 遺伝子破壊株における性分化と高濃度イオンストレスに対する応答

ypt5-909 株において性分化を誘導すると、接合効率が低く、また孢子形成が全く見られない[22]。Vps901、Vps902 が性分化過程の制御に関与しているかどうかを調べるために、*vps901* 遺伝子破壊株、*vps902* 遺伝子破壊株、*vps901 vps902* 二重破壊株について、窒素源を枯渇させることによって性分化を誘導した。*vps901* 遺伝子破壊株の接合率、孢子形成率は野生型株よりも低かったが、*vps902* 遺伝子破壊株は野生型株と明らかな違いがみとめられなかった (図 10)。また、*vps901 vps902* 二重破壊株においては、ほとんど接合が見られず、孢子形成が全く見られなかった。この結果により、性分化過程に、Vps901 が関与していること、Vps901 と協力して Vps902 が補助的に機能することが示唆された。

ypt5-909 株が、高濃度のイオンストレスに対して感受性を示すことについては、第 1 章で記述したとおりである[22] (図 2B)。Vps901 と Vps902 が高濃度のイオンストレスに対して応答しているかどうかを知るために、それぞれの遺伝子破壊株の高濃度イオンに対する感受性を調べた。*vps901* 遺伝子破壊株において、高濃度の Ca^{2+} , K^+ , Cu^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} による増殖の阻害が見られたが、*vps902* 遺伝子破壊株はいずれのイオンストレスに対しても感受性を示さなかった (図 11)。*vps901 vps902* 二重破壊株は、高濃度の Ca^{2+} , K^+ , Cu^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} によって、*vps901* 遺伝子破壊株よりも大きく増殖が阻害され、高濃度の sorbitol と Na^+ , Mn^{2+} に対しても感受性を示した。この結果から、高濃度の多様なストレス条件に対して、Vps901 が応答していることに加え、Vps902 も協調して関与していることが考えられた。

2.2.4 *vps9* 遺伝子破壊株における液胞タンパク質輸送と液胞形態

第 1 章の結果から、Ypt5 が液胞タンパク質である CPS の輸送に必要であることが考えられる (図 3)。また、Vps901 も CPS の輸送に必須であることが報告されている[18]。*vps902* 遺伝子破壊株における CPS 輸送について調べたところ、Ub-GFP-CPS の蛍光シグナルが液胞内に見られたことから、Vps902 は CPS 輸送に必要ではないことが考えられた (図 12)。

ypt5-909 株は、不均一な大きさの液胞をもっており、液胞融合に異常がある[22]。また、*vps901* 遺伝子破壊株は、液胞融合に異常を示す[18]。Vps902 の液胞形態形成に関する役割を知るために、VPS9 タンパク質の遺伝子の破壊株における液胞形態と液胞融合について調べた。分裂酵母の細胞は、水などの低浸透圧条件下で液胞融合が起こる[47]。*vps9* 遺伝子破壊株における細胞の液胞膜を FM4-64 蛍光色素で染色することで液胞の形態を可視化し、さらに水処理による低浸透圧刺激で液胞融合を誘導した (図 13A)。*vps902* 遺伝子破壊株は、液胞融合の誘導によって、液胞数と液胞の

大きさが野生型株と同様に有意に変化したことから、液胞融合には異常は見られなかった (図 13A,B)。しかしながら、*vps901 vps902* 二重破壊株において、明確な液胞構造がほとんど見られず、水処理による低浸透圧刺激によって液胞融合を誘導した条件においても、目立った変化は無かった (図 13A)。このことから、*vps901 vps902* 二重破壊株が正常な液胞をもっていない可能性が考えられた。このことを確かめるために、*vps901 vps902* 二重破壊株の細胞内構造を、電子顕微鏡を用いて観察することを試みた。観察のための固定処理は、凍結置換法によって行い、透過型の電子顕微鏡を用いて観察した。野生型の細胞では、電子密度の高い液胞構造が見られたが (図 14A)、*vps901 vps902* 二重破壊株において同様の構造は見られなかった (図 14B)。その代わりに、*vps901 vps902* 二重破壊株で、電子密度の低い小さなコンパートメントが多数見られた (図 14B)。加えて、野生型株の細胞には見られない、電子密度の高い中空の粒子状の構造体が細胞質に多数見られ (図 14B 拡大写真矢印)、巨大化した小胞体のような膜構造も観察された。また、野生型株の細胞を水処理による低浸透圧刺激を加えて液胞融合を誘導したものでは、巨大化した液胞が見られたが、内部の電子密度が低くなっていた (図 14C)。このことは、液胞の内部環境が融合前後で変化していることを反映しているものと思われる。*vps901 vps902* 二重破壊株では、水処理による低浸透圧刺激を加えることで、電子密度の低いコンパートメントが凝集しているように見えた (図 14D)。これらのことから、*vps901 vps902* 二重破壊株の細胞は、野生型株の細胞にある液胞と同等の構造体をもたないことが考えられ、Vps901 と Vps902 が協調して液胞の形態形成に重要な役割を担っていることが示唆された。

2.3 考察

本章では、Ypt5 上流の活性化因子の候補因子である Vps901 と Vps902 について、局在解析と遺伝子破壊株の表現型解析を行った。

蛍光観察の結果から、Vps901 と Vps902 はドット状のシグナルを示し、部分的に Ypt5 と共局在していることが考えられた (図 7)。第 1 章の結果から、Ypt5 が膜構造体に局在していることが考えられることから、Vps901 と Vps902 も膜に局在していると予想される。また、Vps901 と Vps902 は、全てが Ypt5 と共局在しているわけではない (図 7D)。この事実は、Vps901 および Vps902 が、Ypt5 と同一の膜構造ではたらくのは一過的であることを示していると考えられる。蛍光観察において、Vps901、Vps902、Ypt5 はいずれもドット状のシグナルを示すが、Vps901 と Ypt5 が共に集積して見られるもの、Vps902 と Ypt5 が共に集積して見られるもの、Vps901 と Vps902 が共に集積して見られるもの、それぞれが単独で集積して見られるものがあり、それぞれが別々の機能に関与している可能性がある。これら 3 つのタンパク質の挙動を同時にリアルタイムで解析することができれば、より詳細な事実を知ることができると考えられる。

先行研究と本章に記載した実験により、*ypt5-909* 株と *vps901 vps902* 二重破壊株において細胞形態に異常を示すことが明らかになった。これらのことから、Ypt5 が Vps901 と Vps902 からシグナルを受け取り、細胞形態形成を制御していることが考えられる。*ypt5-909* 株と *vps901 vps902* 二重破壊株はどちらも長軸が短く、短軸が長いという細胞形態の異常を示すが、*ypt5-909* 株ではアクチン細胞骨格の局在に異常が見られたのに対し、*vps901 vps902* 二重破壊株のアクチンの局在には明らかな異常が見られなかった。このことから、Ypt5 は Vps901 と Vps902 非依存的にアクチンの局在を制御することが示唆された。アクチン局在について、Ypt5 が Vps901 と Vps902 以外の因

子からシグナルを受け取る可能性も考えられる。Ypt5 にシグナルを伝達する VPS9 タンパク質以外の因子の存在があるかどうかを知るためには、Ypt5 と相互作用する因子のスクリーニングをすることが今後必要となってくると考えられる。*vps901 vps902* 二重破壊株における細胞形態の異常は、アクチン局在とは別の原因によって生じていることが考えられる。*ypt5-909* 株、*vps901 vps902* 二重破壊株のように、細胞の形が丸くなるような分裂酵母の変異体は他にも報告があり、多胞体形成に関わる ATP アーゼをコードする *vps4* 遺伝子、膜融合に重要な繫留複合体である HOPS (homotypic fusion and vacuole protein sorting) 複合体および CORVET (class C core vacuole/endosome tethering) 複合体の構成因子をコードする *vps16* 遺伝子、HOPS 複合体の構成因子をコードする *vps41* 遺伝子、エンドサイトーシスに関わる因子をコードする *end4* 遺伝子の破壊株などが丸い細胞形態を示す[48]。細胞形態が丸い分裂酵母変異体の中には、アクチンとは別の細胞骨格である微小管の局在に異常を示す変異体もある[48]。*vps901 vps902* 二重破壊株および *ypt5-909* 株の微小管局在については、今後明らかにしたい課題である。

CPS の輸送について、*vps902* 遺伝子破壊株では異常が見られなかった (図 12)。先行研究では、本章で用いた *vps901* 遺伝子破壊株と異なる方法で作製した *vps901* 遺伝子破壊株において、CPS の輸送に異常が見られることが報告されている[18]。本章においても、*vps901* 遺伝子破壊株で CPS 輸送に異常が見られ、報告されている事実と一致した (図 12)。*vps901 vps902* 二重破壊株においては、FM4-64 染色によって明確な液胞構造が見られないので、液胞タンパク質である CPS が液胞に輸送されているかどうかについて判断できないが、Ub-GFP-CPS のシグナルは *vps901* 遺伝子破壊株と似ており、主に細胞質全体に見られ、ドット状に集積したシグナルも見られた (図 12)。*vps901 vps902* 二重破壊株における FM4-64 は、部分的に集積して見られた。FM4-64 が集積したシグナルと、Ub-GFP-CPS が集積したシグナルはあまり重なっていないように見えた (図 12)。

先行研究では、本章で用いた *vps901* 遺伝子破壊株と異なる方法で作製した *vps901* 遺伝子破壊株において、液胞融合に異常があることを報告している[18]。本研究では、液胞の数や大きさを計測することによって、液胞融合についてより詳細に調べた。*vps901* 遺伝子破壊株では、液胞融合誘導によって液胞の大きさと数に有意な差が見られたことから、液胞融合自体は起こっていると考えられる (図 13B)。しかしながら、液胞融合誘導後の液胞の大きさが野生型細胞に比べて小さく、野生型にくらべて、効率的な液胞融合が起こっていないことが考えられる。また、*vps901 vps902* 二重破壊株の細胞では、FM4-64 によって明確な液胞構造がほとんど見られなかった (図 13A)。このことから、*vps901 vps902* 二重破壊株は液胞をもたないという可能性、液胞はあるが FM4-64 を液胞に運ぶことができないという可能性の 2 つの仮説が考えられた。FM4-64 を正しく輸送できない可能性を考慮すると、他の液胞マーカーを用いた実験を行ったとしても、同じ理由によって液胞への輸送に異常がある可能性を排除できない。そこで、液胞マーカーを用いずに液胞構造があるかどうかを観察する方法として、電子顕微鏡による観察を試みた。電子顕微鏡によって観察した *vps901 vps902* 二重破壊株の細胞は、野生型細胞で見られた液胞と同等の構造をもたなかった (図 14)。その代わりに、電子密度の低いコンパートメントが多数散見された。このコンパートメントは、液胞融合を誘導すると局所的に凝集し、膜融合前の繫留の状態で止まっているようにも見える。*vps901 vps902* 二重破壊株で見られる電子密度の低いコンパートメントは、野生型細胞がもつ液胞の前駆体のような構造体なのかもしれない。また、*vps901 vps902* 二重破壊株において、電子密度の高い粒子状の構造体が、細胞質に多数見られた (図 14B 拡大写真の矢印)。似たような構造体は

出芽酵母の Vps9p や Vps21p (Rab5 ホモログ) にも見られているが[33,49]、その実体は明らかにされていない。出芽酵母の変異体の報告と異なる点として、*vps901 vps902* 二重破壊株で見られる粒子状の構造体は中空構造になっているように見える。これは、固定法の違い (出芽酵母変異体は化学固定、分裂酵母の *vps901 vps902* 二重破壊株は凍結置換法による固定) によって見え方が異なっている可能性が考えられる。

vps901 遺伝子破壊株は、接合効率、高濃度の Ca^{2+} , K^+ , Cu^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} ストレスに対する応答、CPS の輸送、液胞融合に異常を示す一方、*vps902* 遺伝子破壊株は明らかな表現型を示さなかった (図 10-13)。このことから、2 つの VPS9 タンパク質が担う役割は異なっていると考えられる。しかしながら、*vps901 vps902* 二重破壊株が、接合効率、高濃度の Ca^{2+} , K^+ , Cu^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} ストレスに対する応答において、*vps901* 遺伝子破壊株よりも重篤な異常を示したことから (図 10,11)、Vps902 は、接合や高濃度の Ca^{2+} , K^+ , Cu^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} ストレスに対する応答について、部分的に Vps901 の機能を補助していることが考えられる。また、*vps901 vps902* 二重破壊株が増殖、細胞形態、胞子形成、高濃度 sorbitol や高濃度 Na^+ , Mn^{2+} のストレスに対する応答、液胞形態形成に異常を示したことから (図 8-11,13,14)、これらの機能について、Vps901 と Vps902 が協調して機能していることが示唆される。

vps901 vps902 二重破壊株は、増殖、細胞形態、性分化、高濃度イオンストレスに対する応答、液胞形態などに異常を示し (図 8-14)、これらの表現型は、*ypt5-909* 株の表現型とよく似ている [22]。このことから、Vps901 と Vps902 はどちらも Ypt5 の制御に関わっていることが考えられる。しかし、*vps901* 遺伝子破壊株と *vps902* 遺伝子破壊株の表現型を比べると、Rab5 の制御には主に Vps901 が関与し、Vps902 は補助的に関わっているという可能性が考えられる。Vps901 と Vps902 のはたらきの違いについて考慮するためには、Vps901 および Vps902 における、Ypt5 との物理的な結合や、Ypt5 に対するグアニンヌクレオチド交換活性 (GEF 活性) などについて調べる必要がある。また、第 1 章で記述したように、Ypt5 が細胞内で機能するためには、Ypt5 が適切に局在することが重要であることが考えられる。哺乳動物では、VPS9 タンパク質 Rabex-5 を、ミトコンドリアへの局在化シグナルを利用した方法でミトコンドリアに異所的に局在させることで、Rab5 もミトコンドリアに異所的局在をするようになるという報告がある [50]。哺乳動物の Rabex-5 と Rab5 の例のように、VPS9 タンパク質によって Ypt5 の局在が制御されるかどうかについて、今後明らかにしたい。

vps901 vps902 二重破壊株は、高濃度 sorbitol による高浸透圧ストレスに対して増殖が阻害されることや、液胞を形成できないことなど、*ypt5-909* 株には見られない異常を示した。この原因について大きく 2 つの可能性が考えられる。1 つの可能性は、*ypt5-909* 株が遺伝子破壊株ではないことにより、いくつか機能を残していることが原因であるというものである。*ypt5*⁺ 遺伝子を破壊した分裂酵母は致死となることから、*ypt5-909* 株においては、変異をもった Ypt5 が何らかの機能を有していることが考えられる。*ypt5-909* 株は、Ypt5 の脂質修飾部位に変異をもつ変異体であるが、Ypt5 の活性部位など他の部分の構造に変異をもつ *ypt5*⁺ 遺伝子の突然変異体を作製し解析することができれば、Ypt5 の役割についてより深く迫ることができると思われる。もう 1 つの可能性は、Vps901 と Vps902 が Ypt5 以外の因子を制御しているというものである。VPS9 タンパク質からのシグナルは、基本的に Rab5 のグアニンヌクレオチド交換活性のみが考慮されるが、他の方法でシグナルを伝達していることは有り得る。たとえば、足場やアダプターとして機能することで、他の因子の局

在を制御することなどが考えられる。Vps901 と Vps902 が相互作用する他の因子を探索することによって、より詳細な事実が判明する可能性が考えられる。

vps901 遺伝子破壊株と *vps902* 遺伝子破壊株の表現型が異なっていることから、Vps901 と Vps902 の担う機能が異なることが予想される。その違いがいかなる原因によって生じているのかについて明らかにすることができれば、あらゆる真核生物に複数存在する VPS9 タンパク質が、細胞内においてどのような機構で役割の分担をしているのかを知る糸口になると考えられる。

Vps901 と Vps902 の大きな違いとして、Vps901 のみが CUE (coupling of ubiquitin conjugation to ER degradation) ドメインと呼ばれるユビキチン結合ドメインをもっているということがある [18] (図 7A)。CUE ドメインは出芽酵母の Vps9p にもある。Vps9p の CUE ドメインについては、モノユビキチンとポリユビキチンどちらも結合すること [51,52]、CUE ドメイン同士で二量体を形成して 1 つのユビキチン分子を包み込むように結合すること [53]、エンドサイトーシスに関与すること [54]、GEF 活性を調節していること [55] などの報告がある。分裂酵母の Vps901 における CUE ドメインについては、Vps901 の CUE ドメインを欠損させてもカルボキシペプチダーゼ Y (carboxypeptidase Y: CPY) の液胞への輸送に異常は見られず [18]、機能については未だ不明である。蛍光観察によって Vps901 と Vps902 は部分的に共局在していることが考えられたが (図 7D 下)、共局在せずに Vps901 単独で集積しているシグナル、Vps902 単独で集積しているシグナルも見られ、それぞれ異なる機能に関与している可能性が考えられる。また、2 つの VPS9 タンパク質の Ypt5 に対する GEF 活性に違いが見られるかについても今後調べる必要がある。

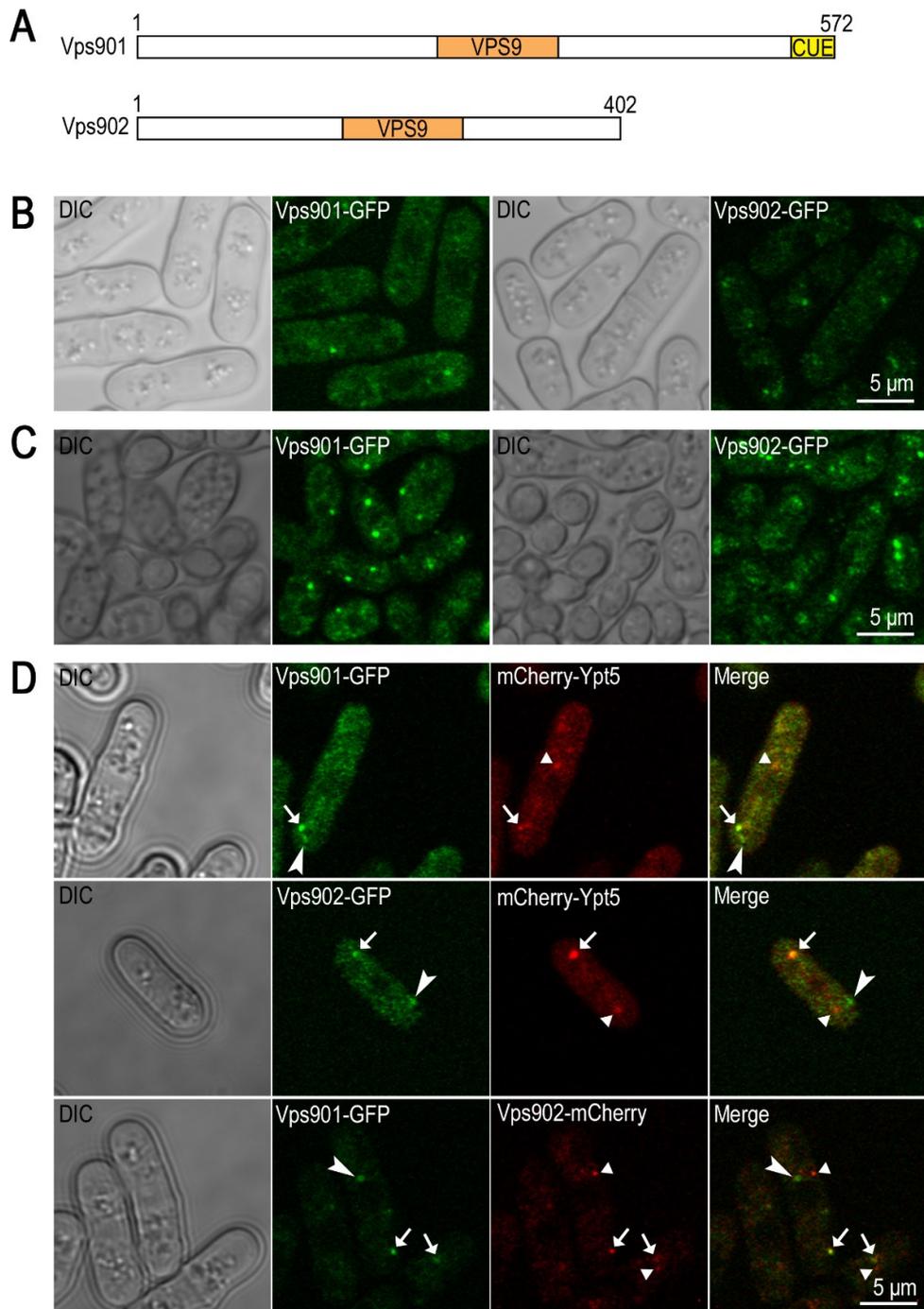


図 7. Vps901、Vps902 タンパク質の構造と細胞内局在

(A) Vps901、Vps902 タンパク質の構造。どちらも VPS9 ドメインをもっており、Vps901 のみカルボキシル末端にユビキチン結合ドメインの CUE ドメインをもつ。いずれも Pfam データベースで予測されたドメインを示す。(B) 対数増殖期の細胞 (*vps901*-GFP integrant: YT004, *vps902*-GFP integrant: YT015) の蛍光観察を行った。(C) 窒素源枯渇培地で培養することで性分化を誘導した細胞 (YT004, YT015) の蛍光観察を行った。(D) 対数増殖期の細胞 (*vps901*-GFP mCherry-*ypt5* integrant: YT008, *vps902*-GFP mCherry-*ypt5* integrant: YT016, *vps901*-GFP *vps902*-mCherry integrant: YT011) の蛍光観察を行った。共局在が見られたドット状蛍光シグナルを矢印で、共局在していないドット状蛍光シグナルを矢頭または正三角形で示した。DIC: 微分干渉顕微鏡観察。

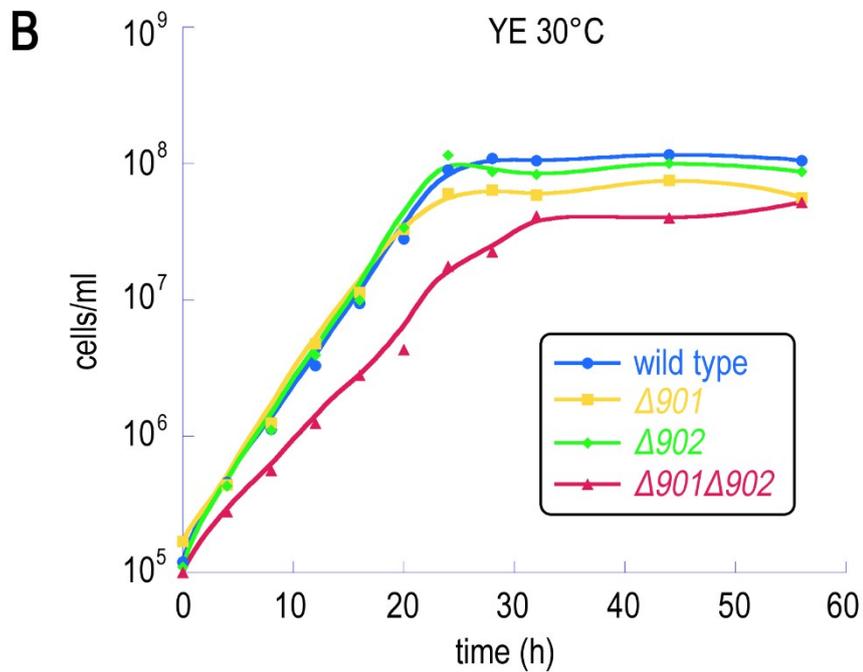
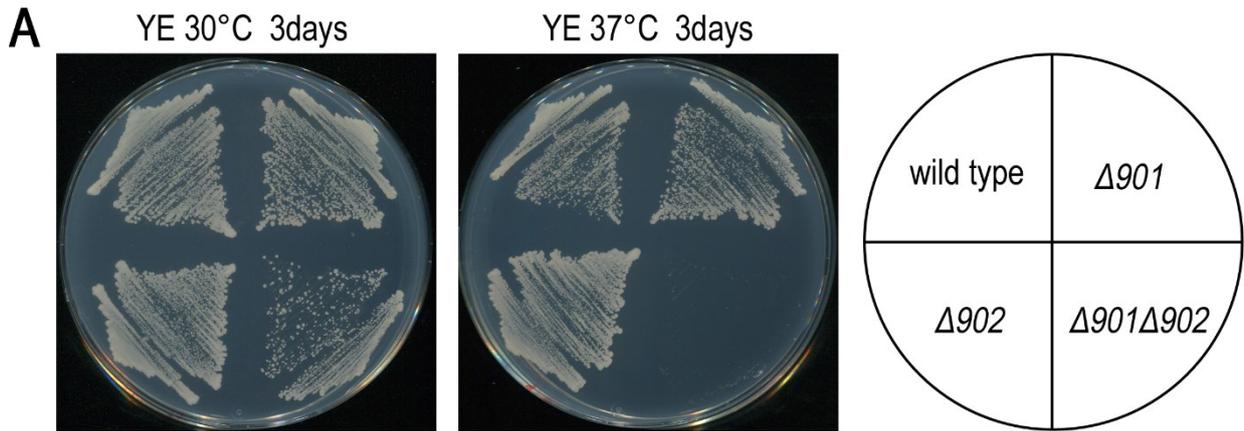


図 8. *vps901 vps902* 二重破壊株における細胞増殖の異常

(A) 富栄養の寒天プレート培地において 30°C または 37°C で 3 日間培養した細胞 (wild type: TN4, $\Delta 901$: TM002, $\Delta 902$: TM006, $\Delta 901 \Delta 902$: YT017)。(B) 富栄養の液体培地において 30°C で振とう培養した細胞 (TN4, TM002, TM006, YT017) の増殖曲線。

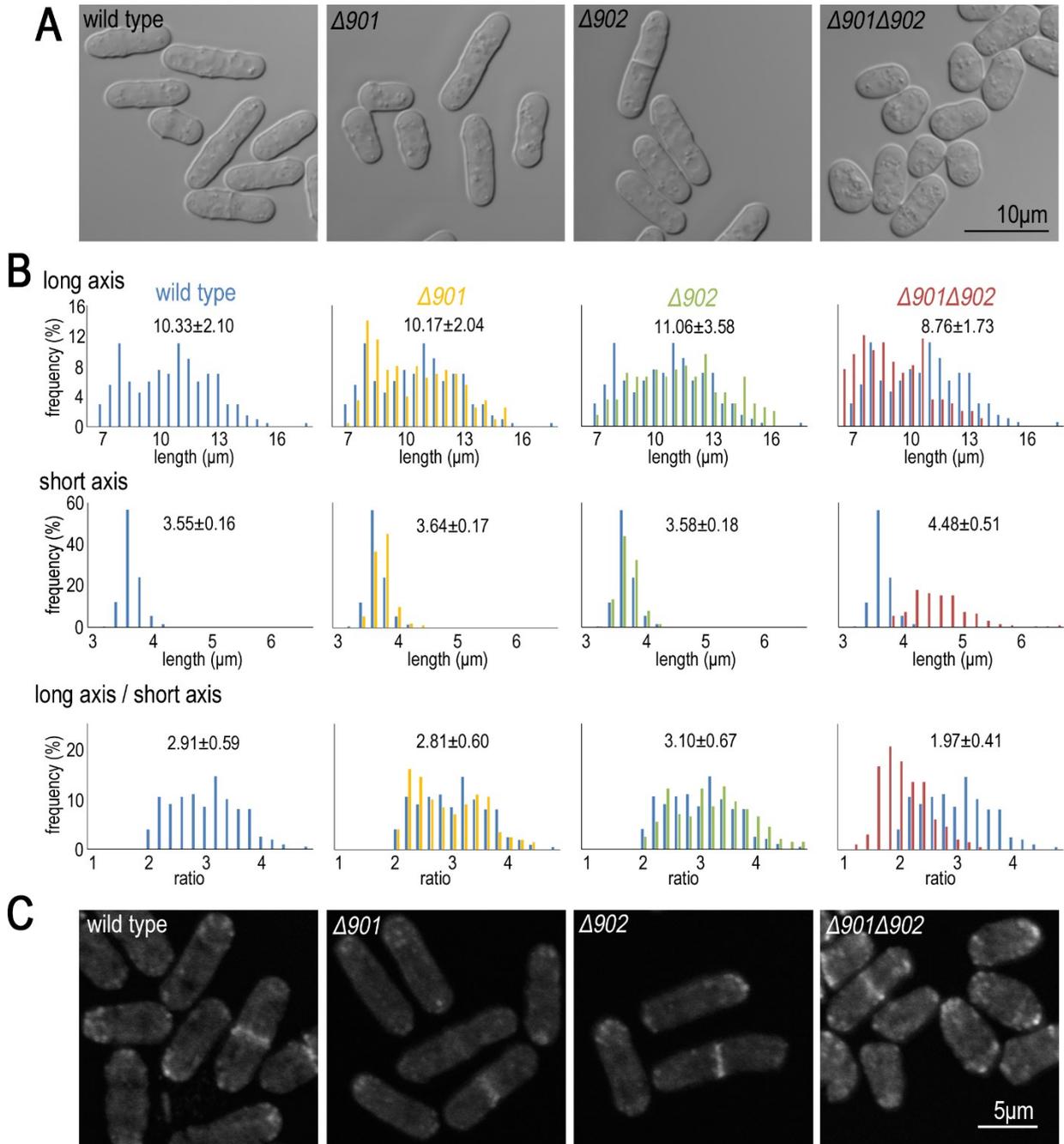


図 9. *vps901 vps902* 二重破壊細胞における形態異常

(A, B) 対数増殖期の細胞 (wild type: TN4, $\Delta 901$: TM002, $\Delta 902$: TM006, $\Delta 901\Delta 902$: YT017) 各 200 個ずつの長軸と短軸の長さを測定した。ヒストグラムに示した数値は、平均±標準偏差の値。
 (C) 対数増殖期の細胞 (TN4, TM002, TM006, YT017) をホルマリンで固定し、蛍光標識ファロイジンを用いてアクチンを染色した。蛍光観察によって多面画像を取得し、画像の重ね合わせ処理を行った。

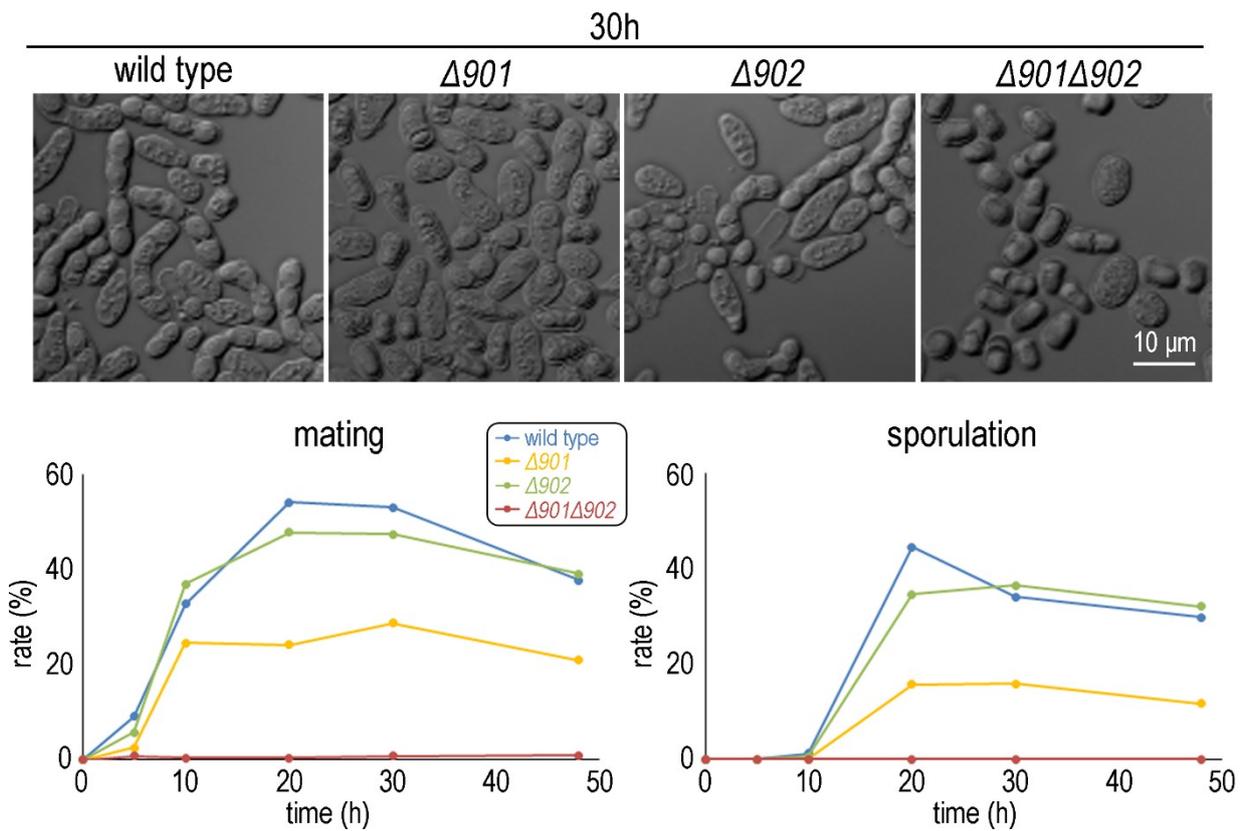


図 10. *vps901* 遺伝子破壊株、*vps902* 遺伝子破壊株、*vps901 vps902* 二重破壊株における性分化対数増殖期の細胞 (wild type: TN8, $\Delta 901$: TM003, $\Delta 902$: TM005, $\Delta 901\Delta 902$: YT018) を、窒素源が枯渇した培地で培養することにより性分化を誘導し、接合率、胞子形成率を計測した。

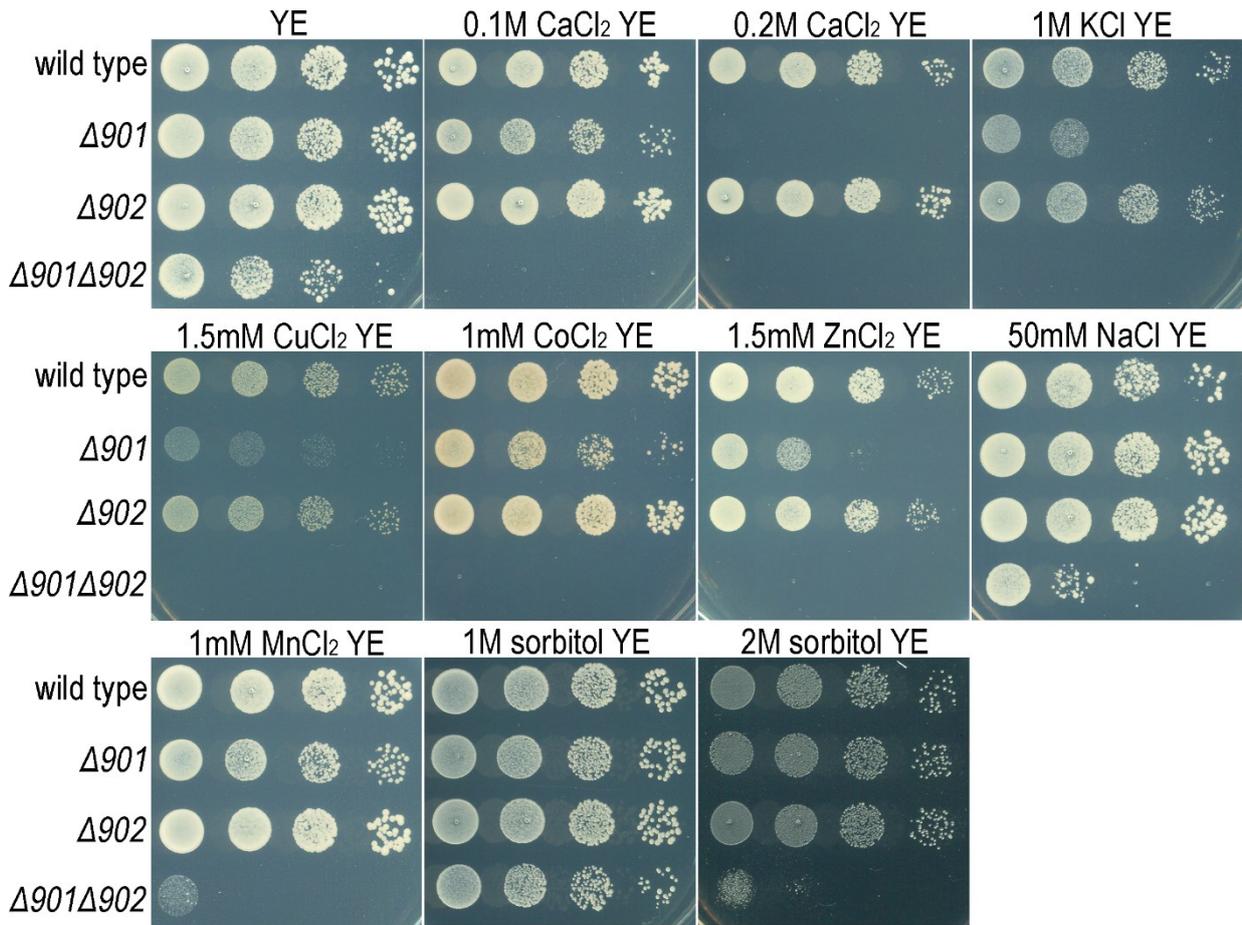


図 11. *vps901* 遺伝子破壊株、*vps902* 遺伝子破壊株、*vps901 vps902* 二重破壊株における高濃度イオンストレスに対する応答

4×10^4 , 4×10^3 , 4×10^2 , 4×10 個の細胞 (wild type: TN4, $\Delta 901$: TM002, $\Delta 902$: TM006, $\Delta 901 \Delta 902$: YT017) を、図に示した各種培地にスポットし、 30°C に 3 日間静置培養した。

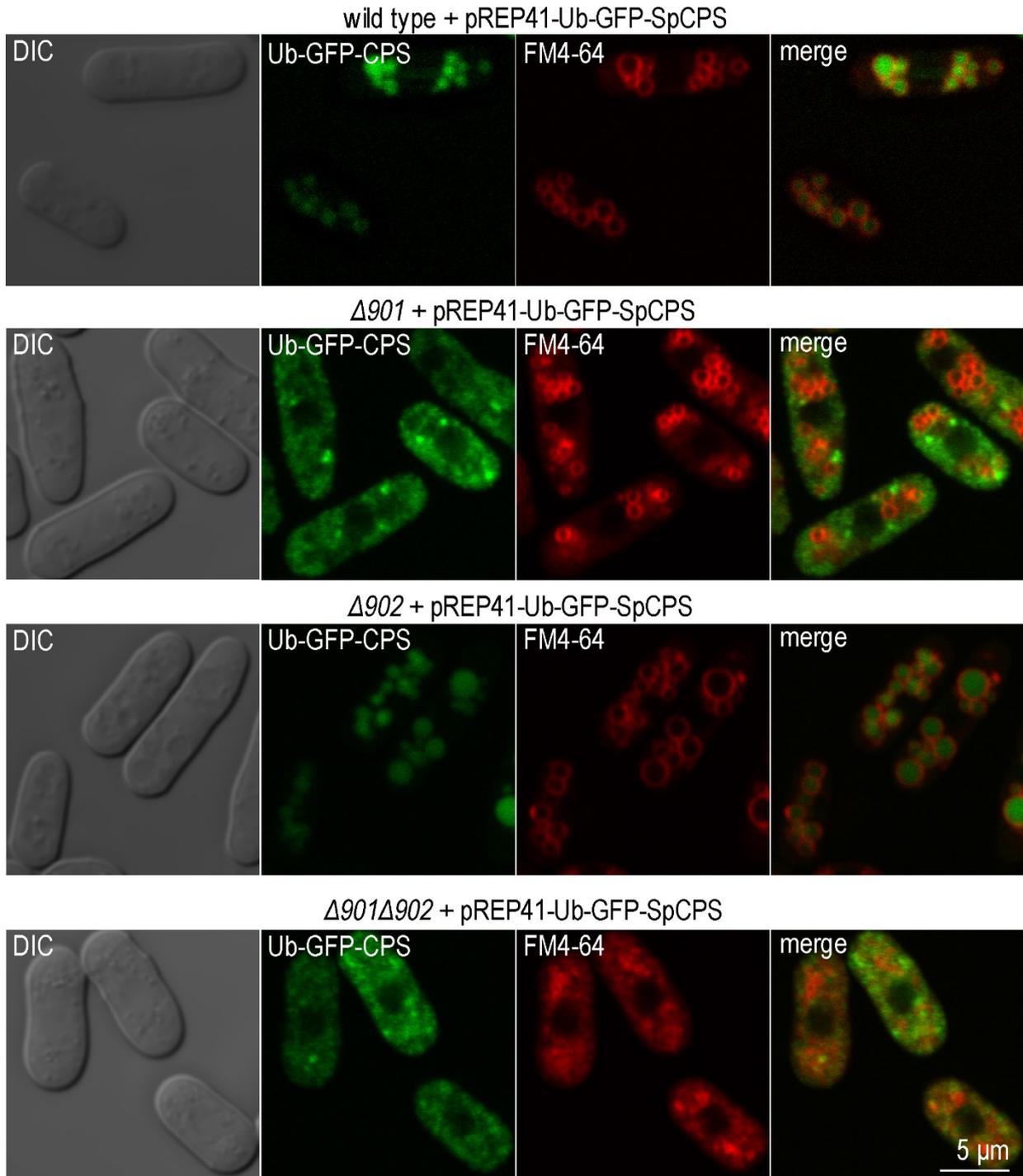


図 12. *vps901* 遺伝子破壊株、*vps902* 遺伝子破壊株、*vps901 vps902* 二重破壊株における液胞タンパク質 CPS の輸送
 ゴルジ体から多胞体を介して液胞へ輸送される Ub-GFP-CPS をプラスミドにより発現させた細胞 (wild type: TN4, Δ901: TM002, Δ902: TM006, Δ901Δ902: YT017) の液胞膜を、FM4-64 蛍光色素で染色して蛍光観察を行った。DIC : 微分干渉顕微鏡観察。

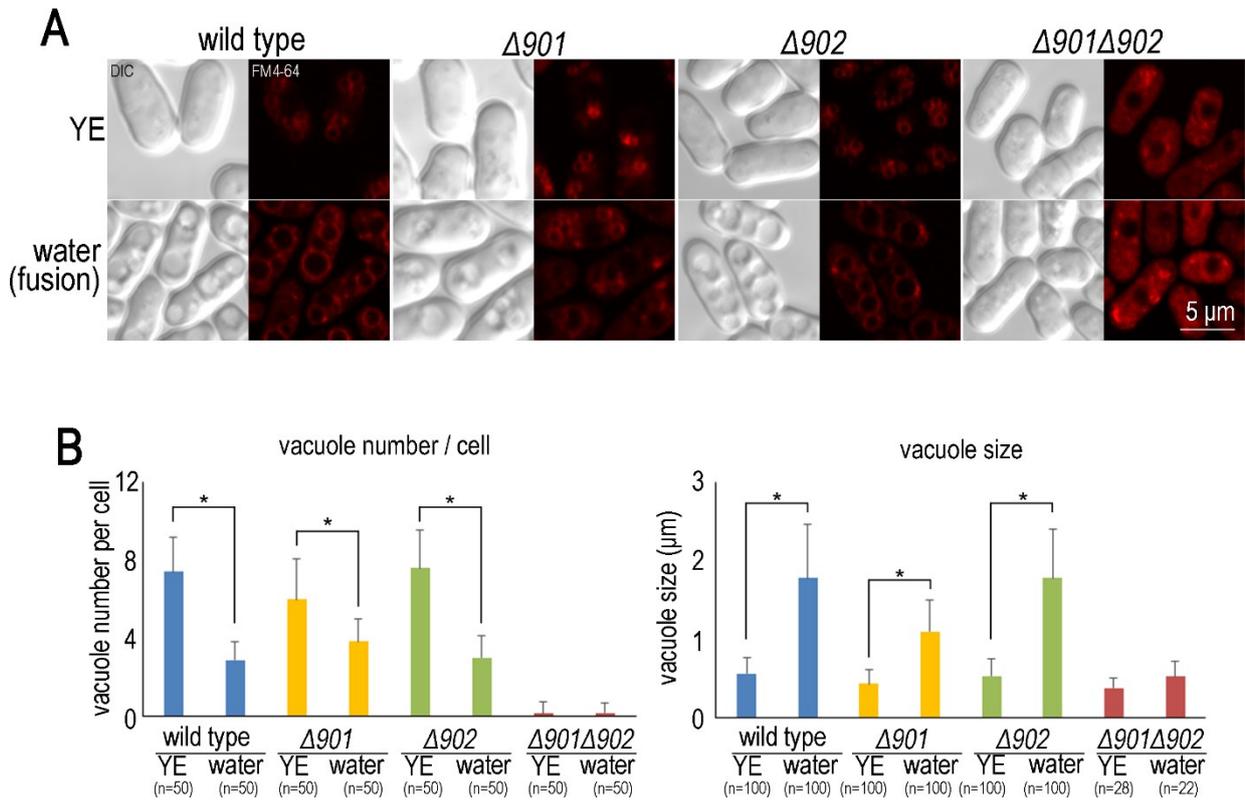


図 13. *vps901 vps902* 二重破壊株における液胞形態の異常

(A) 対数増殖期の細胞 (wild type: TN4, $\Delta 901$: TM002, $\Delta 902$: TM006, $\Delta 901 \Delta 902$: YT017) の液胞膜を FM4-64 によって染色し、蛍光観察を行った。また、培地を水に置換することで低浸透圧刺激を加え、液胞融合を誘導した。DIC: 微分干渉顕微鏡観察。(B) 1 細胞あたりの液胞数と液胞の大きさを計測した。それぞれ 50 細胞の液胞数と、100 個の液胞の大きさを測定した (ただし、*vps901 vps902* 二重破壊株は液胞がほとんど見られなかったため、YE で 28 個、water で 22 個のみ、液胞の大きさを測定した)。棒グラフは平均値を示し、エラーバーは標準偏差を示した。各株について、液胞融合誘導前のデータと誘導後のデータについてウェルチの t 検定を行い、 $p < 0.001$ であったものを「*」で示した。

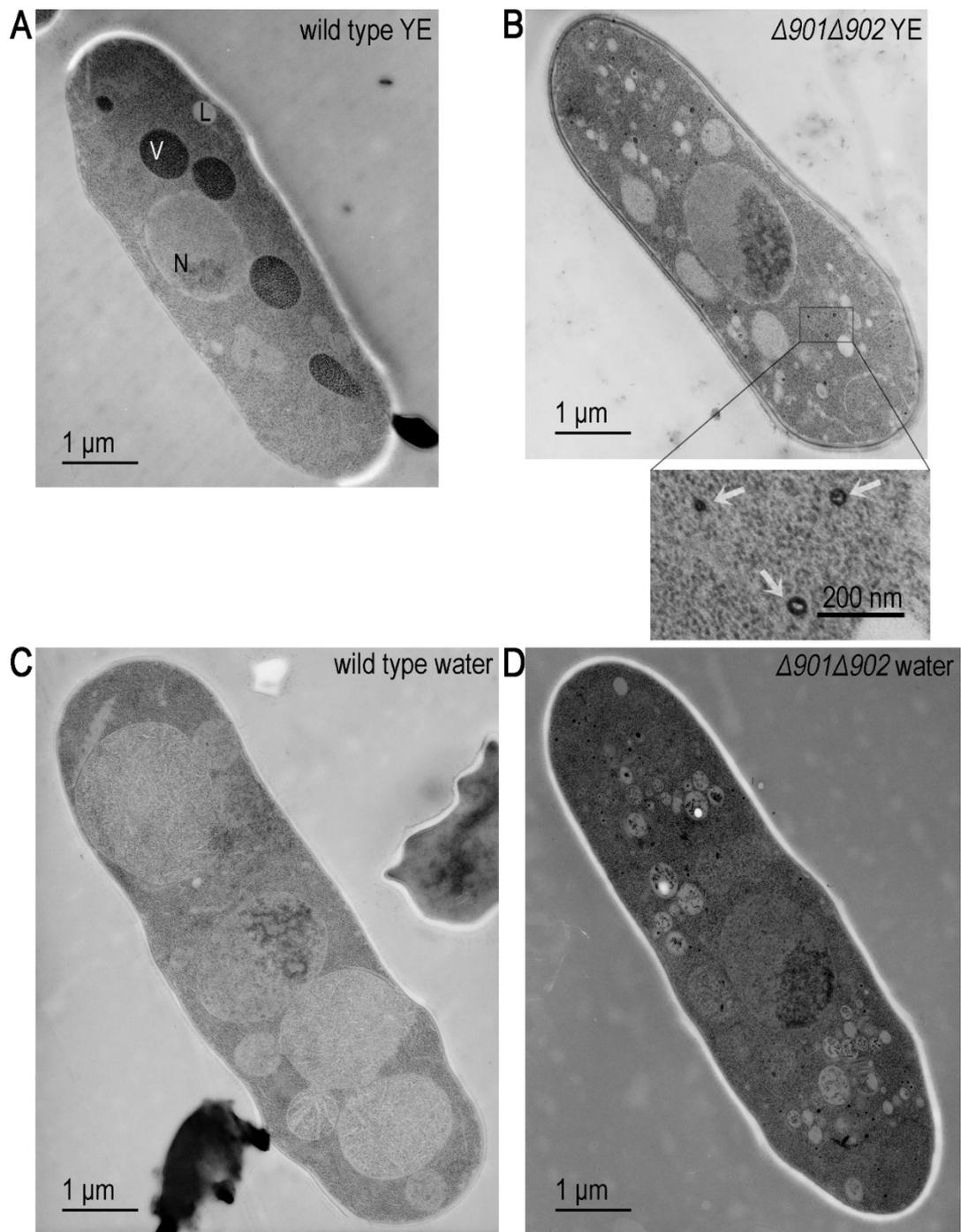


図 14. *vps901 vps902* 二重破壊株の細胞における液胞構造の異常

対数増殖期の細胞 (wild type: L968, $\Delta 901 \Delta 902$: YT003) を凍結置換法によって固定し、透過型電子顕微鏡で観察した。(A) 野生型株の細胞。液胞を V、核を N、脂肪滴を L と表記。(B) *vps901 vps902* 二重破壊株の細胞。拡大写真に示した矢印は、*vps901 vps902* 二重破壊株の細胞質に特徴的に見られた電子密度の高い中空の粒子状の構造である。(C) 水処理による低浸透圧刺激によって液胞融合を誘導した野生型細胞。(D) 液胞融合を誘導した *vps901 vps902* 二重破壊株。

第3章 Ypt5 の下流因子候補 Pep7 と Aut12 の機能解析

3.1 序論

活性型状態の低分子量 G タンパク質は、エフェクタータンパク質と呼ばれる下流因子と相互作用する。エフェクタータンパク質は、GTP 結合型の低分子量 G タンパク質と特異的に結合することで、低分子量 G タンパク質からのシグナルを下流に伝える (図 1A)。低分子量 G タンパク質から伝えられたシグナルを受け、実際にはたらくのはエフェクター因子であり、低分子量 G タンパク質が関与する機能とそのシグナル伝達機構の関係を明らかにするためには、下流エフェクター因子のはたらきを理解することが必要である。

哺乳動物の Rab5 エフェクター因子の 1 つに、EEA1 が知られている[56]。EEA1 には、FYVE ドメインという、システインを多く含んだジンクフィンガードメイン構造がある。このドメインは、Fab1、YOTB、Vac1、EEA1 に共通して見られたことから、それぞれの頭文字をとって「FYVE」ドメインと名づけられている[57]。FYVE ドメインは、生体膜を構成するリン脂質のホスファチジルイノシトール-3-リン酸と特異的に結合する[58]。哺乳動物における別の Rab5 エフェクターである Rabenosyn-5 も FYVE ドメインをもっている[59]。Rabenosyn-5 は、SM (Sec1/Munc18 ホモログ) タンパク質の hVPS45 と結合することから、Rab5 と SNARE (soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment protein receptor) を繋ぐアダプターとして機能すると考えられている[59]。キイロショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* の Rab5 エフェクター因子である Rabenosyn も Vps45 と結合し、また Rabenosyn 遺伝子と Vps45 遺伝子は neoplastic tumor suppressor gene であると報告されている[60]。出芽酵母にも FYVE ドメインをもつ Vps21p (Rab5) エフェクター因子の Vac1p がある[61]。Vac1p は、出芽酵母が増殖する際に、母細胞から娘細胞へ液胞を分配するために必要な因子であり[62]、高濃度のイオンストレスに対する応答や、液胞タンパク質の輸送にも機能している[23]。

また、哺乳動物には Mon1 という Rab5 エフェクター因子も同定されている[63]。Mon1 は Ccz1 と複合体を形成し、Mon1-Ccz1 複合体は Rab7 と相互作用する[63]。出芽酵母にも Mon1p と Ccz1p は存在し、Mon1p-Ccz1p 複合体が Ypt7p (Rab7) に対する GEF 活性を示す[64]。また、出芽酵母の Mon1p と Ccz1p はそれぞれオートファジーに必要な因子である[65,66]。シロイヌナズナ *Arabidopsis thaliana* においても SAND (Mon1 ホモログ) と CCZ1 が複合体を形成し、SAND-CCZ1 複合体が RAB7 に対する GEF 活性をもつことが明らかにされている[67]。他にも様々な Rab5 エフェクター因子が知られているが、Rab5 からのシグナルをどのように受け取って処理しているのかについて、統一的な理解はなされていない。

分裂酵母の Rab5 ホモログは Ypt5 のみであり、Ypt5 が多様な機能を制御していることは第 1 章で記述したとおりである。多くの機能を制御する 1 つの Rab5 をもつ分裂酵母は、Rab5 から下流へのシグナル伝達を解析するためのモデルとして適しているといえる。分裂酵母には、Vac1p のホモログとして Pep7 が、Mon1 のホモログとして Aut12 がある。Pep7 は 2 つの FYVE ドメインと、Rabenosyn-5 と相同性をもつ配列をもつことが Pfam データベースによって予想されている (図 15A)。また、分裂酵母には Mon1 ホモログの Aut12 が存在するが、Ccz1 のホモログが存在しない。

私は、Pep7 と Aut12 を Ypt5 下流のエフェクター因子の候補と考え、Pep7 と Aut12 について、局在解析と遺伝子破壊株の表現型解析を行うことで、Ypt5 からエフェクター因子へのシグナル伝達について調べた。

3.2 結果

3.2.1 Pep7 と Aut12 の局在

Pep7 は、出芽酵母における Vps21p (Rab5) エフェクター因子 Vac1p[61]の分裂酵母におけるホモログであり、2つの FYVE ドメインをもつ (図 15A)。Aut12 は、哺乳動物における Rab5 エフェクターとして知られている Mon1[63]の分裂酵母におけるホモログである。Pep7、Aut12 を Ypt5 の下流ではたらくエフェクター因子の候補として考え、Ypt5 から伝えられるシグナルがどのように下流因子へと伝えられるのかを調べた。

Pep7 と Aut12 の局在を調べるため、それぞれのタンパク質に、蛍光タンパク質 mCherry を付加させ、GFP-*ypt5* インテグランド株に発現させて蛍光観察を行った。Pep7-mCherry、Aut12-mCherry はいずれもドット状の蛍光シグナルを示し、そのほとんどが GFP-Ypt5 のドットと共局在していた (図 15B 左)。このことから、Pep7 および Aut12 は Ypt5 と同一の膜構造体で機能していることが示唆された。また、Ypt5 が膜へ適切に局在できない *ypt5* 変異体である *ypt5-909* 株における Pep7-mCherry、Aut12-mCherry の局在を観察した。*ypt5-909* 株において、Pep7-mCherry、Aut12-mCherry はドット状の蛍光シグナルを示さず、GFP-Ypt5-909 と同様に、細胞質全体に拡がった蛍光シグナルを示した (図 15B 右)。この結果より、Pep7 と Aut12 の局在が Ypt5 に依存していることが示唆された。

3.2.2 Pep7 と Ypt5 との相互作用

エフェクター因子は、低分子量 G タンパク質の活性型に特異的に結合する。Pep7 と Ypt5 の物理的な相互作用について調べるため、組換えタンパク質を用いて、*in vitro* 結合実験を行った。GST-Ypt5 に GDP および GTP γ S (GTP の非加水分解型アナログ) を結合させた後、それぞれ Pep7-Myc-His と反応させ、グルタチオンが結合したビーズによって沈降させたサンプルに対し、抗 Myc 抗体を用いたウエスタンブロット解析を行った。Pep7 は、GTP アナログ結合型の Ypt5 と特異的に相互作用が見られたことから、Ypt5 のエフェクター因子であることが確かめられた (図 16)。

3.2.3 *pep7* 遺伝子破壊株と *aut12* 遺伝子破壊株における増殖と細胞形態

Pep7、Aut12 が細胞内で担う役割について知るために、*pep7* 遺伝子破壊株、*aut12* 遺伝子破壊株を作製し、表現型の解析を行った。栄養豊富な寒天培地 30°C において、*pep7* 遺伝子破壊株、*aut12* 遺伝子破壊株はどちらも増殖に異常は見られなかった (図 17A)。栄養豊富な液体培地においても、倍加時間や培養液における細胞の飽和濃度において、*pep7* 遺伝子破壊株と *aut12* 遺伝子破壊株はいずれも野生型株と差は無かった (図 17B)。栄養豊富な寒天培地 37°C においては、*pep7* 遺伝子破壊株は増殖に異常は見られなかったが、*aut12* 遺伝子破壊株において増殖の低下が見られた (図 17A)。次に、*pep7* 遺伝子破壊株、*aut12* 遺伝子破壊株の対数増殖期における細胞形態を観察した。いずれも、野生型株の細胞と似た形態を示した (図 18A)。長軸の長さ、短軸の長さについて計測

したところ、野生型株、*pep7*遺伝子破壊株、*aut12*遺伝子破壊株の間に目立った差はみとめられなかった (図 18B)。このことから、Pep7 と Aut12 は細胞形態形成には必須ではないことが考えられた。

3.2.4 *pep7*遺伝子破壊株と *aut12*遺伝子破壊株における性分化と高濃度イオンストレスに対する応答

*ypt5-909*株は接合効率が低く、胞子形成が見られず、性分化過程に異常がある[22]。Pep7 と Aut12 が性分化過程において機能するかどうかを検討するために、*pep7*遺伝子破壊株と *aut12*遺伝子破壊株を、窒素源枯渇培地で培養することで性分化を誘導し、接合率と胞子形成率を調べた。*pep7*遺伝子破壊株において、接合率と胞子形成率が野生型株よりも低かった。*aut12*遺伝子破壊株においては、*pep7*遺伝子破壊株よりもさらに低い接合効率を示し、胞子形成は見られなかった (図 19)。これらの結果から、Pep7 と Aut12 はともに効率的な接合に必要であり、さらに Aut12 が胞子形成に必須であることが考えられた。

*ypt5-909*株は高濃度 Ca^{2+} , K^+ , Mn^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} イオンストレスに対して感受性を示す[22] (図 2B)。*pep7*遺伝子破壊株と *aut12*遺伝子破壊株における高濃度 Ca^{2+} , K^+ , Mn^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} イオンストレスの感受性を調べた。高濃度 Mn^{2+} , Co^{2+} によって *pep7*遺伝子破壊株と *aut12*遺伝子破壊株いずれの増殖も阻害されなかった一方で、高濃度 Ca^{2+} , Zn^{2+} に対しては *pep7*遺伝子破壊株と *aut12*遺伝子破壊株いずれも感受性を示した (図 20)。また、高濃度 Cu^{2+} に対しては *pep7*遺伝子破壊株のみが、高濃度 K^+ に対しては *aut12*遺伝子破壊株のみが感受性を示した (図 20)。このことから、Pep7 と Aut12 は受けるイオンストレス条件によってそれぞれ異なるはたらきをしていることが考えられた。

3.2.5 *pep7*遺伝子破壊株と *aut12*遺伝子破壊株における液胞タンパク質輸送と液胞形態

*ypt5-909*株は液胞タンパク質 CPS の輸送に異常が見られている (図 3)。*pep7*遺伝子破壊株と *aut12*遺伝子破壊株における CPS の輸送について調べるために、Ub-GFP-CPS を発現させて観察した。*pep7*遺伝子破壊株においては、Ub-GFP-CPS の蛍光シグナルが細胞質に見られ、ドット状に集積した蛍光シグナルも見られた (図 21)。一部液胞内にもシグナルが見られており、*pep7*遺伝子破壊株において、部分的な CPS 輸送の異常があることが考えられた。*aut12*遺伝子破壊株においては、Ub-GFP-CPS の多くは、ドット状の蛍光シグナルを示し、細胞質にはほとんどシグナルが見られなかった (図 21)。また、*aut12*遺伝子破壊株においても、一部のシグナルは液胞内に見られており、CPS の輸送について部分的な異常をもつことが考えられる。*pep7*遺伝子破壊株と *aut12*遺伝子破壊株どちらも CPS の輸送に異常が見られたが、Ub-GFP-CPS の蛍光シグナルは異なって見られたことから、Pep7 と Aut12 はそれぞれ異なる機構によって CPS の輸送に関わっていることが示唆された。

*ypt5-909*株は不均一な大きさの液胞をもち、液胞融合に異常がある[22]。*pep7*遺伝子破壊株と *aut12*遺伝子破壊株における液胞形態と液胞融合について調べるために、FM4-64 蛍光色素によって液胞膜を染色し、水処理による低浸透圧刺激で液胞融合を誘導した。*pep7*遺伝子破壊株は、液胞融合の誘導によって、液胞の大きさと数が有意に変化し、液胞融合は起こっていると考えられた (図 22)。しかしながら、液胞融合誘導後において、*pep7*遺伝子破壊株における液胞の数と大きさ

は野生型株と差があり、野生型株に比べて効率的な液胞融合が起こっていないことが示唆された (図 22)。このことから、Pep7 は液胞融合の効率に関与していることが考えられた。また、*aut12* 遺伝子破壊株においても、液胞融合の誘導によって、液胞の大きさと数に変化が見られ、ある程度の液胞融合は起こっていると考えられた (図 22)。一方で、*aut12* 遺伝子破壊株の液胞は、液胞融合の誘導前も誘導後も、野生型株に比べて数が多く、大きさも小さかった (図 22)。この結果より、Aut12 は液胞の形態形成および液胞融合に関与していることが考えられた。

3.3 考察

本章では、Ypt5 下流のエフェクター因子であると考えられる Pep7 と Aut12 について、局在解析および遺伝子破壊株の表現型解析を行った。

蛍光観察により、Pep7 は Ypt5 依存的にドット状の蛍光シグナルを示した (図 15)。加えて、*in vitro* 実験において Pep7 が Ypt5 の GTP 型に直接結合したことから (図 16)、Pep7 は Ypt5 と結合することで、Ypt5 と共局在していると考えられる。一方で、Pep7 は Ypt5 との結合以外にも、Pep7 に含まれる FYVE ドメイン (ホスファチジルイノシトール-3-リン酸結合ドメイン) を介して、膜のホスファチジルイノシトール-3-リン酸に結合することで集積しているという可能性も考えられる。哺乳動物では、Rab5 が局在するエンドソーム膜のリン脂質組成が、Rab5 によって調整されていると考えられている。活性型の Rab5 はホスファチジルイノシトール-3-リン酸を産生する酵素 (ホスファチジルイノシトール-3-キナーゼ、ホスファチジルイノシトール-4-ホスファターゼ、ホスファチジルイノシトール-5-ホスファターゼ) と相互作用する [68,69]。Rab5 によって集められた酵素がホスファチジルイノシトール-3-リン酸を産生することで、Rab5 陽性エンドソームの膜にはホスファチジルイノシトール-3-リン酸が豊富に存在しており、FYVE ドメインのペプチドを発現させると、Rab5 陽性エンドソームに FYVE ドメインが集積する [69]。EEA1 や Rabenosyn-5 のような FYVE ドメインをもつ Rab5 エフェクターは、Rab5 と直接結合することに加え、Rab5 によって濃縮されたホスファチジルイノシトール-3-リン酸にも結合して、Rab5 陽性エンドソームに集積している可能性が考えられている。分裂酵母においても、Ypt5 が、自身が局在する膜構造の膜組成を調節してホスファチジルイノシトール-3-リン酸を濃縮しているならば、FYVE ドメイン含有因子が Ypt5 陽性の膜構造体に集積することが予想される。Ypt5 がホスファチジルイノシトール-3-リン酸を濃縮しているかどうかについて知るためには、FYVE ドメインのペプチドを発現させて Ypt5 と共局在するかどうかをみる方法などが考えられる。今後検討したい。

蛍光観察により、Aut12 も Ypt5 依存的に、ドット状の蛍光シグナルを示した。Aut12 は Ypt5 に直接結合することによって、Ypt5 と共局在していることが予想されるが、Ypt5 との物理的な相互作用は未だ確認できていないので、いずれ必ず確認しなければならない。

先行研究と本章の実験により、*ypt5-909* 株、*vps901* 遺伝子破壊株、*vps901 vps902* 二重破壊株、*pep7* 遺伝子破壊株、*aut12* 遺伝子破壊株はそれぞれ高濃度の Ca^{2+} をはじめとした様々なイオンストレスによって増殖阻害を示すことが明らかになった。分裂酵母において高濃度の Ca^{2+} に感受性を持つ変異体は、*vps33* [70]、*ste12* [71,72]、*vma1* [73]、*vma3* [73]、*ypt7* [74,75]、*pep12* [76] などが報告されている。これらの変異体は液胞形態もしくは液胞融合にも異常を示すことが分かっている。*ypt5-909* 株、*vps901* 遺伝子破壊株、*vps901 vps902* 二重破壊株、*pep7* 遺伝子破壊株、*aut12* 遺伝子破壊株においても液胞形態か液胞融合にそれぞれ異常を示したことから、高濃度のイオンス

トレスに対する応答と液胞形態の間には密接な関係があると予想される。液胞の形成や融合には、膜融合の機構が重要であり、膜融合には Rab タンパク質の他に、SNARE タンパク質のはたらきが必要である。Rab5 の下流に t-SNARE のシンタキシンが存在する例が、複数の種で報告されている。出芽酵母では、Vps21p (Rab5) のエフェクターの Vac1p が、Sec1 ファミリーの Vps45p と相互作用し[61]、Vps45p はシンタキシンホモログの Pep12p と相互作用する[77]。ショウジョウバエでは、Rbsn (Rabenosyn-5 ホモログ) は Rab5 の GTP 型に結合するエフェクターであり、かつ Vps45 と結合し、さらに Vps45 はシンタキシンホモログである Syx16 と結合する[60]。ヒトにおいても、Rab5 エフェクターの Rabenosyn-5 は hVPS45 と結合し、hVPS45 がいくつかのシンタキシンホモログと相互作用することが報告されている[59]。分裂酵母における Sec1 ファミリーの Vps45 について、*vps45* 遺伝子破壊株は液胞タンパク質 CPY の輸送、液胞形態形成に異常が見られている[78]。分裂酵母におけるシンタキシンホモログ Pep12 については、*pep12* 破壊株がイオンストレスに対する応答、液胞タンパク質 CPY の輸送、液胞形態形成に異常が見られている[76]。このように、Vps45 とシンタキシンの変異体における表現型は、Ypt5 シグナル伝達系の因子の変異体における表現型と似ていることから、分裂酵母においても「Rab5、FYVE ドメインをもつ Rab5 エフェクター因子、Vps45、シンタキシン」の一連の相互作用によって、Rab5 の下流で SNARE が機能している可能性が考えられる。

液胞タンパク質 CPS の輸送について、*pep7* 遺伝子破壊株と *aut12* 遺伝子破壊株はいずれも野生型細胞と異なる Ub-GFP-CPS の蛍光シグナルを示したが、*pep7* 遺伝子破壊株と *aut12* 遺伝子破壊株の蛍光シグナルはそれぞれ異なっていた (図 21)。*pep7* 遺伝子破壊株の蛍光シグナルは、ドット状のシグナルと細胞質全体に広がったシグナルが見られた。このような Ub-GFP-CPS の蛍光シグナルは、*ypt5-909* 株 (図 3) や、*vps901* 遺伝子破壊株、*vps901 vps902* 二重破壊株 (図 12) における Ub-GFP-CPS の蛍光シグナルと似ている。一方で、*aut12* 遺伝子破壊株では、細胞質にはあまり蛍光シグナルが見られず、多数のドット状蛍光シグナルを示した (図 21)。このようなシグナルの違いは、CPS 輸送における役割の違いを反映していると考えられる。Ub-GFP-CPS が液胞外におけるドット状に蛍光シグナルを示す例は、多胞体を形成する因子の遺伝子破壊株に顕著に見られ[24]、これは、出芽酵母で見られる class E コンパートメント[29]に相当すると考えられている。*aut12* 遺伝子破壊株で見られる Ub-GFP-CPS のドット状蛍光シグナルが、class E コンパートメントと同等のものであれば、Aut12 は、多胞体形成に関与していることが考えられる。*pep7* 遺伝子破壊株で見られるドットについても、このドットが class E コンパートメントであれば、Pep7 も多胞体形成に関与していると考えられるが、細胞質に蛍光シグナルが強いことから、多胞体形成よりも前の段階でも機能していることが予想される。*ypt5-909* 株や、*vps901* 遺伝子破壊株、*vps901 vps902* 二重破壊株における Ub-GFP-CPS と同様、*pep7* 遺伝子破壊株と *aut12* 遺伝子破壊株における Ub-GFP-CPS のドット状シグナルの正体は、今後明らかにしたい。

pep7 遺伝子破壊株と *aut12* 遺伝子破壊株は接合、高濃度 Ca^{2+} 、 Zn^{2+} に対する応答、CPS の輸送、液胞融合にそれぞれ異常を示したが、その異常の程度は異なっていた。これらの細胞機能について、Pep7 と Aut12 は機能的に重複している可能性と、独立して機能している可能性が考えられる。このことについて、考慮するには *pep7 aut12* 二重破壊株の表現型を解析すること、*pep7* 遺伝子破壊株に Aut12 を *aut12* 遺伝子破壊株に Pep7 を過剰発現させて機能を相補するか確かめることなどの実験が必要になる。また、Pep7 と Aut12 が機能する場所を明らかにすることで、それぞれの役割

をより詳細に特徴づけることができると考えられる。そのために、今後は Ypt5 も含めた、Pep7、Aut12 それぞれの局在をリアルタイムに追跡したい。

pep7 遺伝子破壊株は高濃度 Cu^{2+} に感受性を示した。*aut12* 遺伝子破壊株は、 37°C で増殖が阻害され、胞子形成が見られず、高濃度 K^{+} に感受性を示し、液胞形態に異常が見られた。これらの機能は、Pep7 と Aut12 がそれぞれ独立してはたらく機能であると考えられる。*pep7* 遺伝子破壊株、*aut12* 遺伝子破壊株において異常が見られなかった細胞機能、例えば栄養増殖、細胞形態形成、高濃度 Mn^{2+} 、 Co^{2+} に対する応答などは、Pep7 と Aut12 とは異なる未知のエフェクター因子が、Ypt5 からのシグナルを受け、機能していると考えられる。今後、Ypt5 との相互作用因子のスクリーニングなどにより、新たなエフェクター因子の探索が必要である。Rab5 エフェクターは、単独の因子だけでなく、CORVET やホスファチジルイノシトール-3-キナーゼなどのエフェクター複合体も報告されており [68,79]、エフェクター複合体が存在する可能性を考慮したスクリーニングが重要であると考えられる。

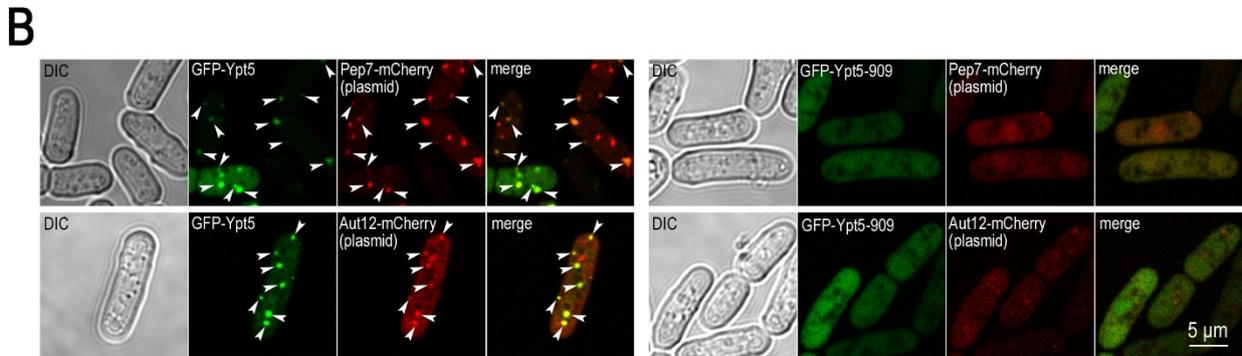
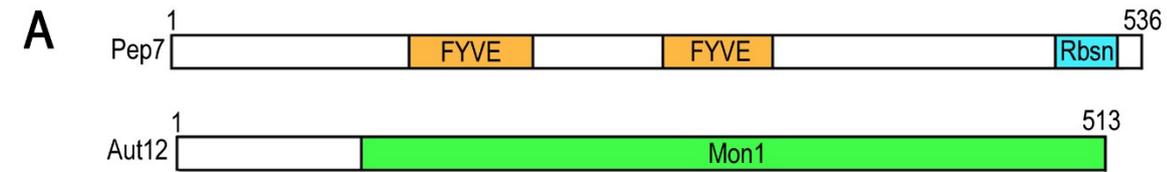


図 15. Pep7 と Aut12 タンパク質の構造と細胞内局在

(A) Pep7 と Aut12 タンパク質の構造。Pep7 は 2 つの FYVE ドメインと、Rabenosyn-5 と相同性のある配列を持つ。Aut12 は、Mon1 と相同性のある配列を持つ。いずれも Pfam データベースで予測されたドメインを示す。(B) Pep7-mCherry、Aut12-mCherry それぞれをプラスミドにより発現させた細胞 (GFP-*ypt5* integrant: CK002, GFP-*ypt5-909* integrant: CK003) を、対数増殖期に蛍光観察した。DIC : 微分干渉顕微鏡観察。

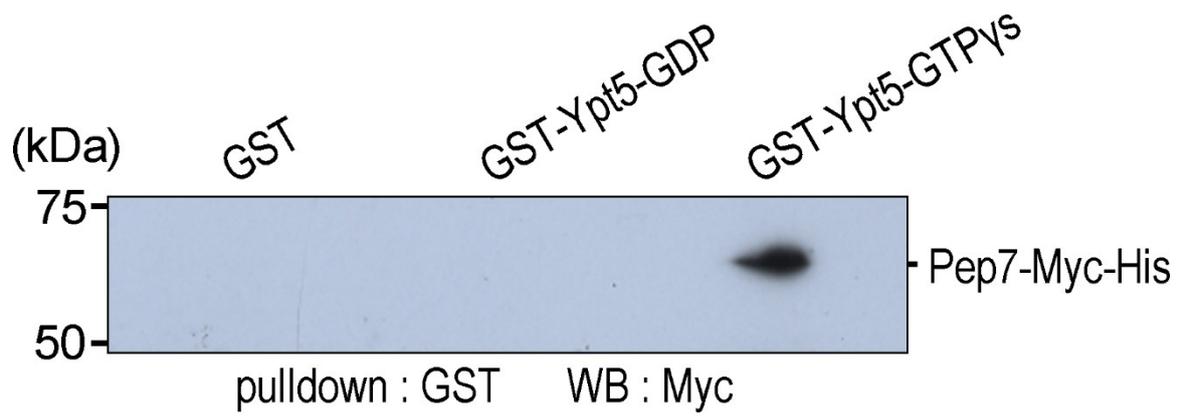


図 16. Pep7 と GTP 型 Ypt5 との特異的な結合

GST タンパク質、GDP を結合させた GST-Ypt5 タンパク質、GTP γ S (GTP の非加水分解型アナログ) を結合させた GST-Ypt5 タンパク質それぞれ 20 μ g に対し、等量の Pep7-Myc-His を含む溶液を反応させ、Glutathione Sepharose 4B によって沈降させたサンプルに対し、抗 Myc 抗体を用いてウエスタンブロット解析を行った。

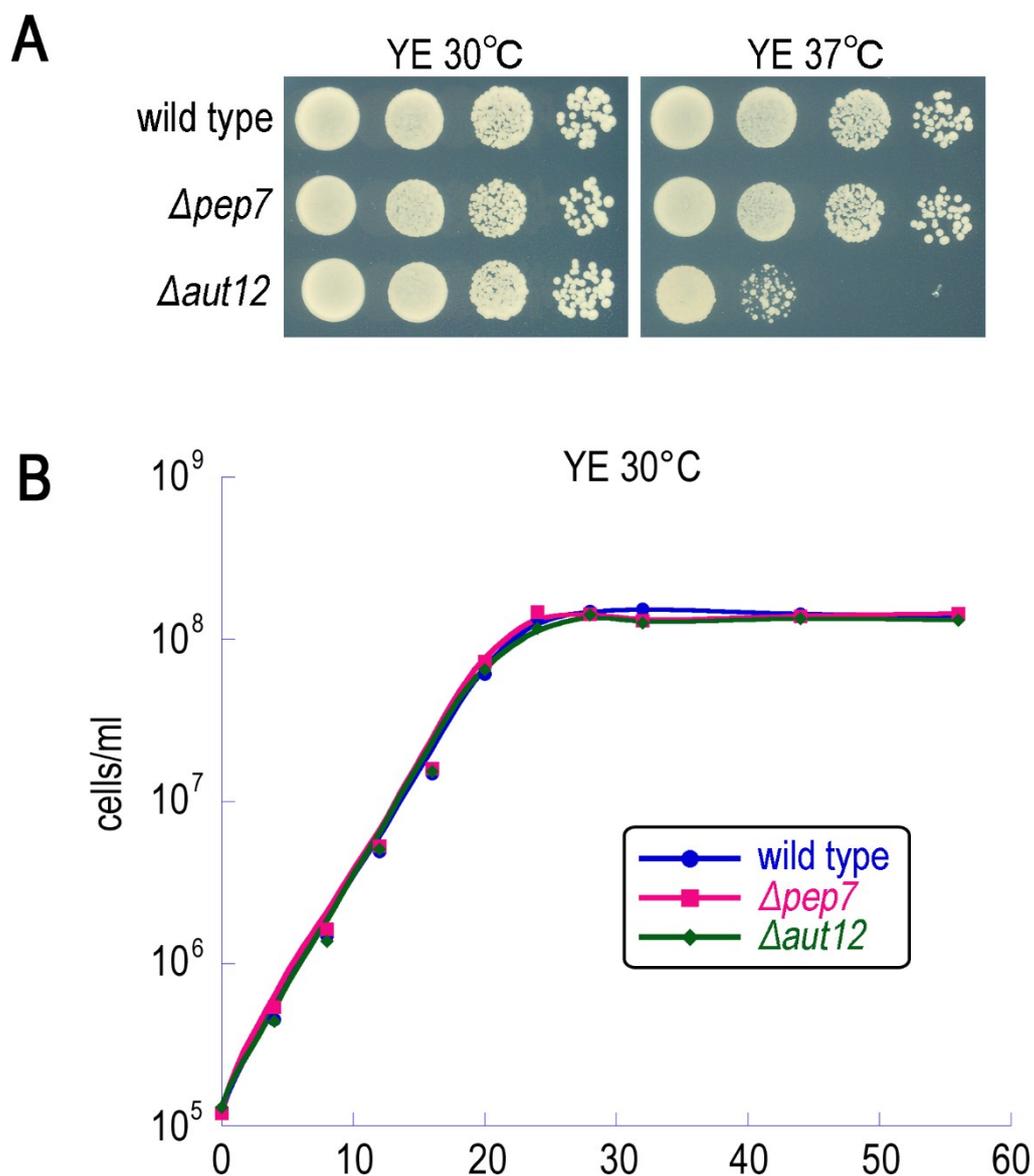


図 17. *pep7* 遺伝子破壊株、*aut12* 遺伝子破壊株における細胞増殖

(A) 4×10^4 , 4×10^3 , 4×10^2 , 4×10 個の細胞 (wild type: TN8, $\Delta pep7$: YT019, $\Delta aut12$: YT020) を、富栄養寒天培地にスポットし、30°C と 37°C に 3 日間静置培養した。(B) 栄養豊富な液体培地において 30°C で振とう培養を行った細胞 (TN8, YT019, YT020) の増殖曲線。

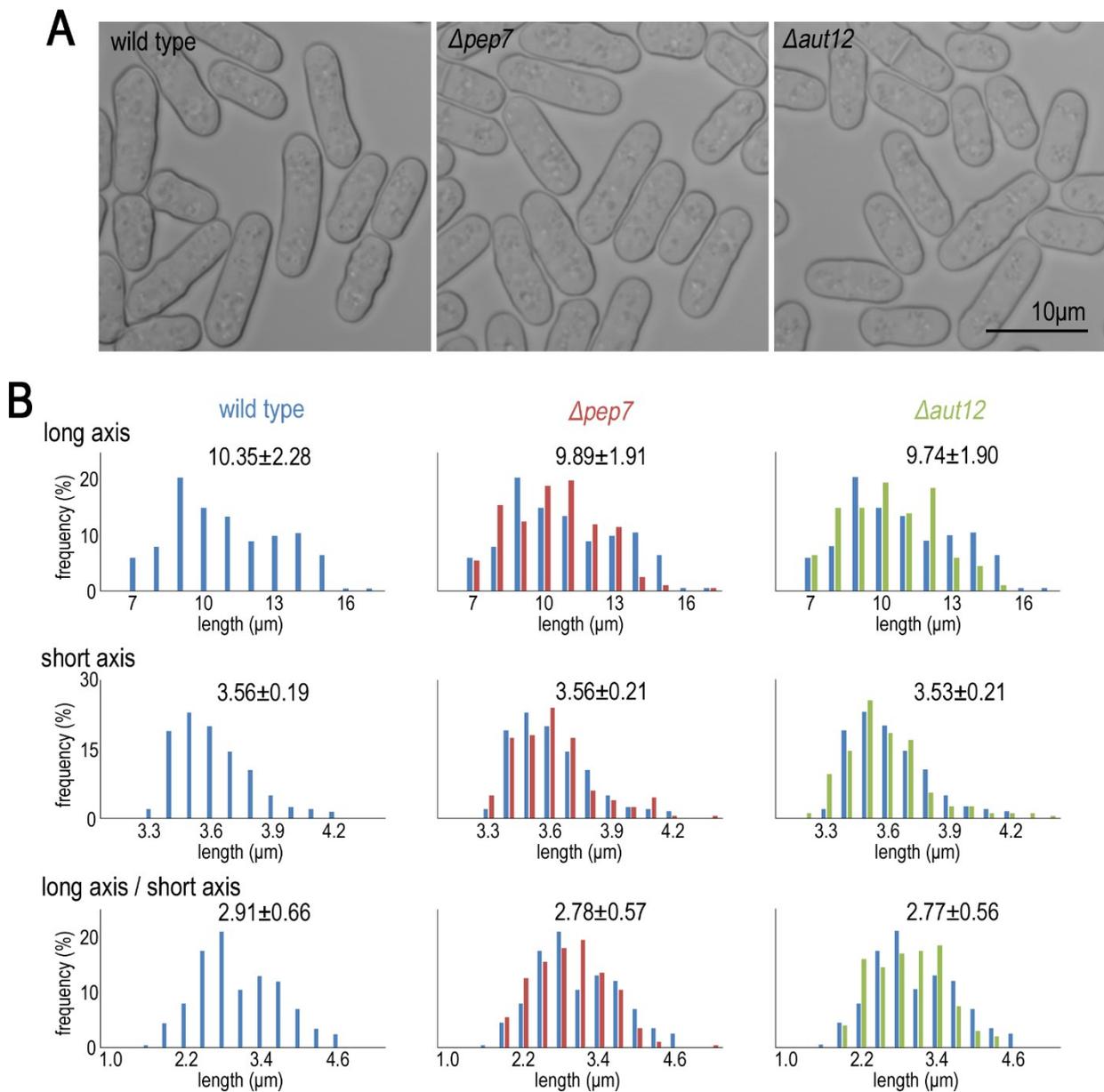


図 18. *pep7* 遺伝子破壊株、*aut12* 遺伝子破壊株における細胞形態

(A, B) 対数増殖期の細胞 (wild type: TNS8, $\Delta pep7$: YT019, $\Delta aut12$: YT020) の微分干渉顕微鏡観察を行った。200 細胞について、長軸と短軸の長さを測定した。ヒストグラムに示した数値は平均 ± 標準偏差の値。

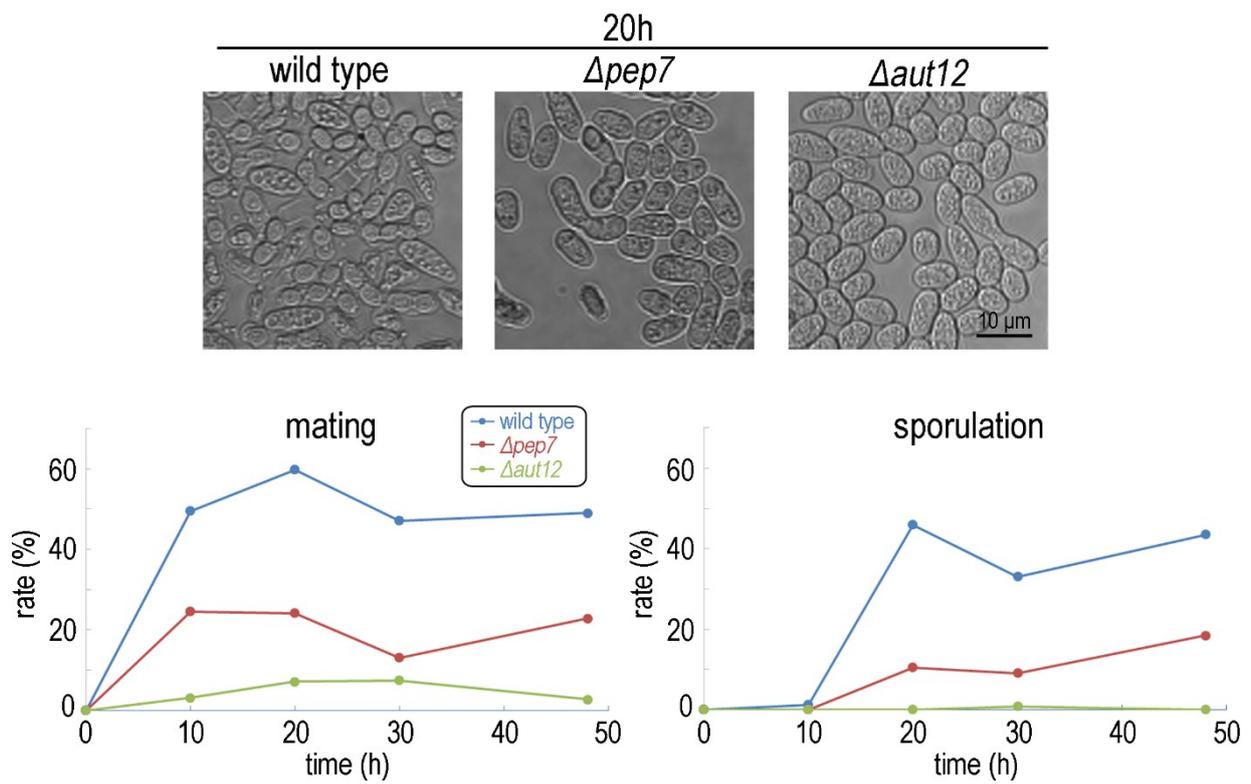


図 19. *pep7* 遺伝子破壊株、*aut12* 遺伝子破壊株における性分化の異常
 対数増殖期の細胞 (wild type: TN8, $\Delta pep7$: YT019, $\Delta aut12$: YT020) を、窒素源が枯渇した培地で培養することにより性分化を誘導し、接合率、孢子形成率を計測した。

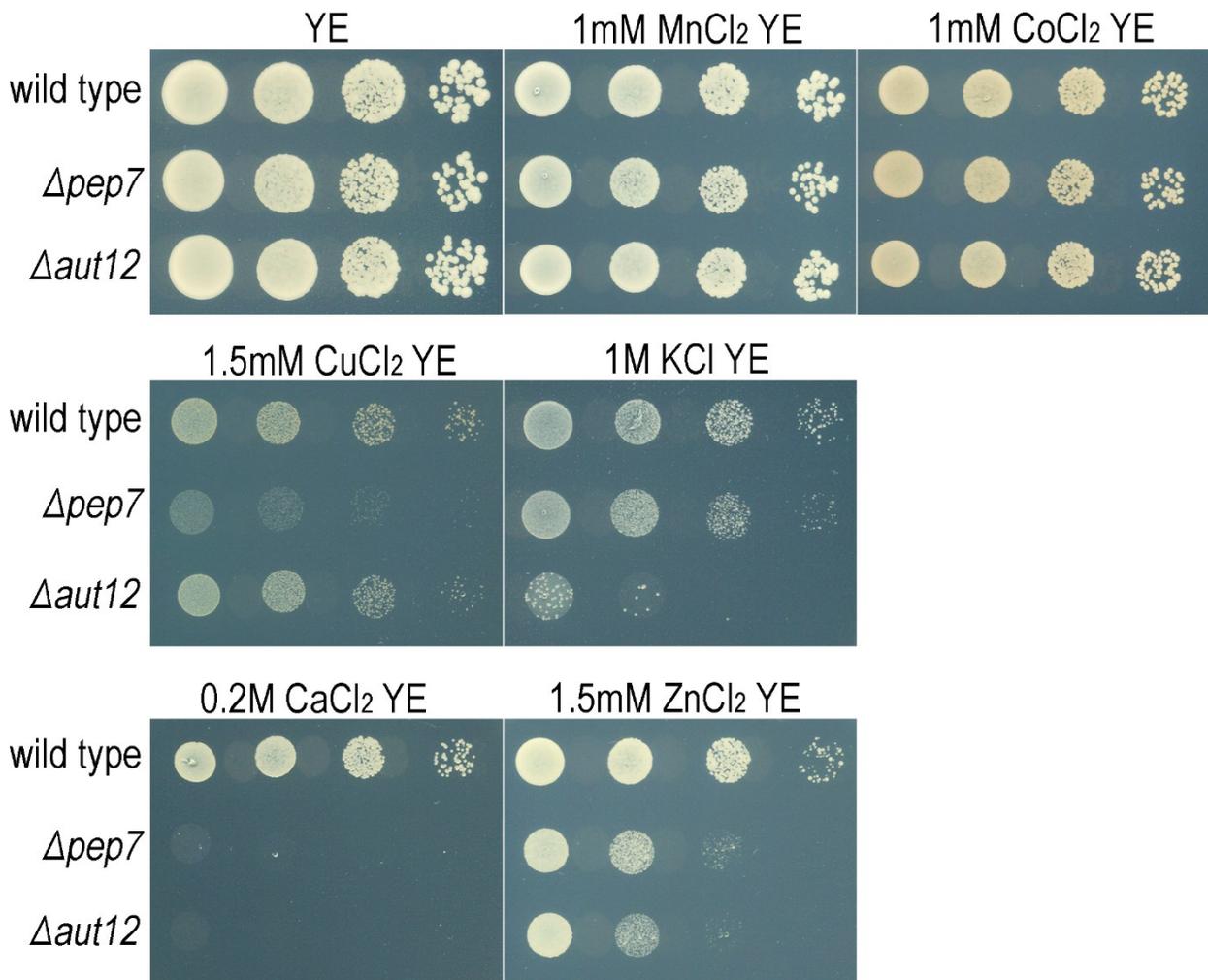


図 20. *pep7* 遺伝子破壊株、*aut12* 遺伝子破壊株における高濃度イオンストレスによる増殖阻害 4×10^4 , 4×10^3 , 4×10^2 , 4×10 個の細胞 (wild type: TN8, $\Delta pep7$: YT019, $\Delta aut12$: YT020) を、図に示した各種培地にスポットし、30°C に 3 日間静置培養した。

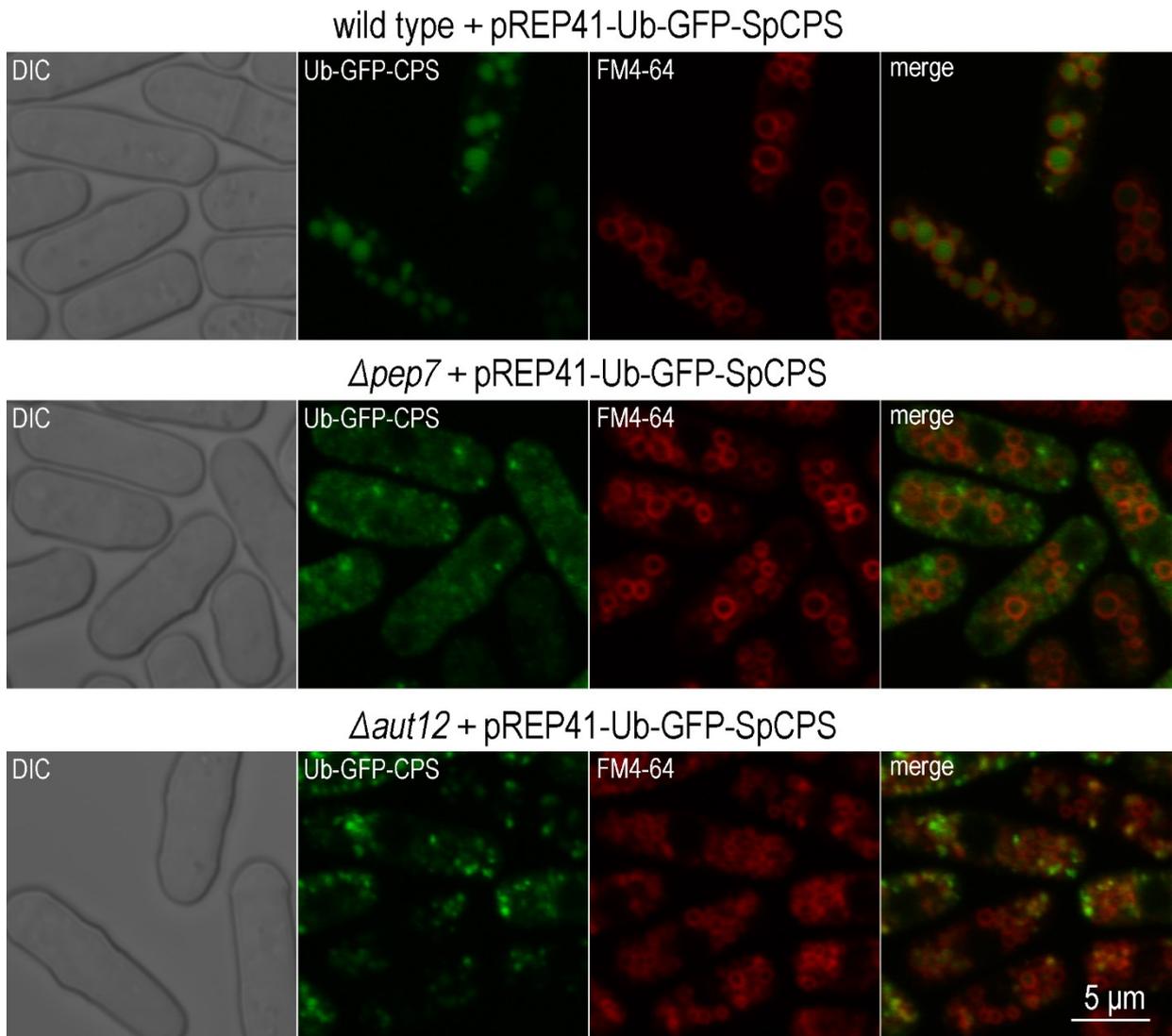


図 21. *pep7* 遺伝子破壊株、*aut12* 遺伝子破壊株における液胞タンパク質 CPS 輸送の異常
 ゴルジ体から多胞体を介して液胞へ輸送される Ub-GFP-CPS をプラスミドにより発現させた細胞
 (wild type: TN8, $\Delta pep7$: YT019, $\Delta aut12$: YT020) の液胞膜を、FM4-64 蛍光色素で染色して
 蛍光観察を行った。DIC：微分干渉顕微鏡観察。

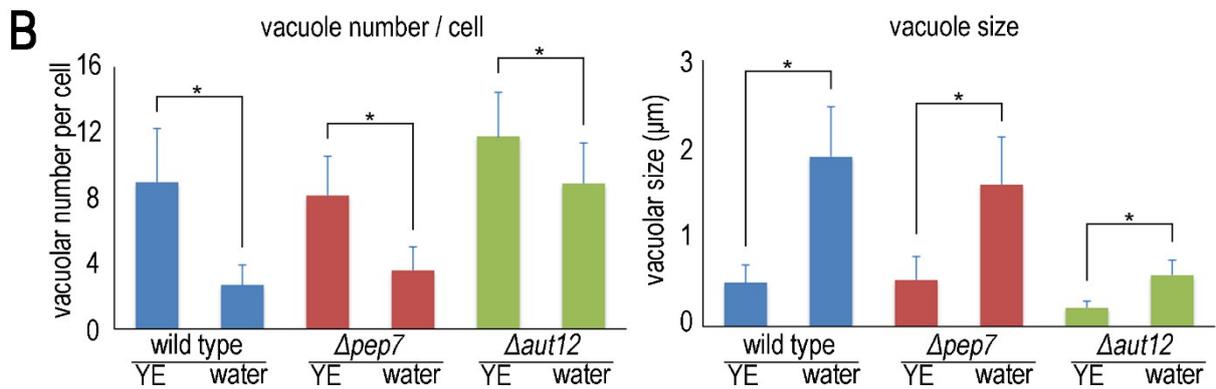
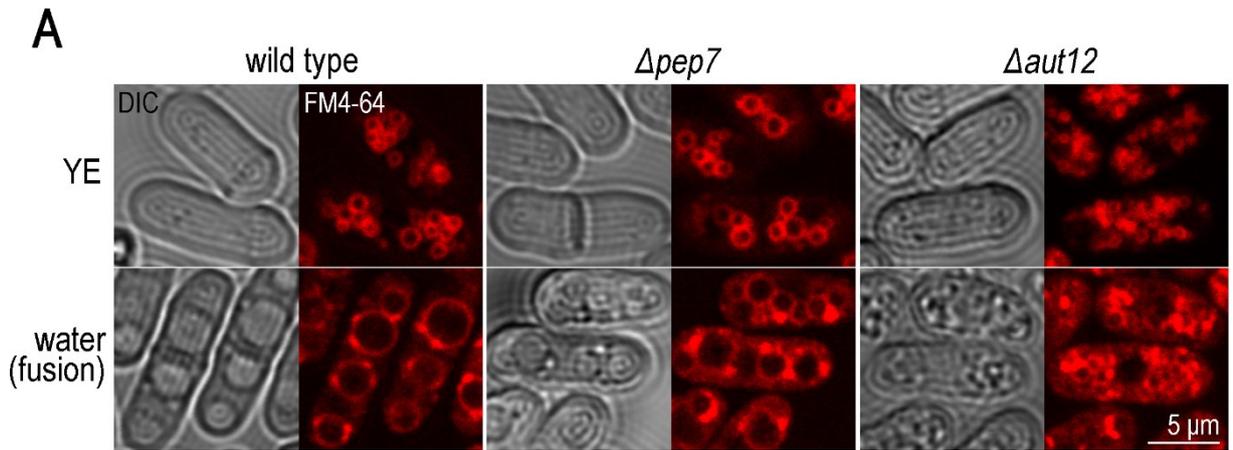


図 22. *pep7* 遺伝子破壊株、*aut12* 遺伝子破壊株における液胞形態形成の異常

(A) 対数増殖期の細胞 (wild type: TN8, $\Delta pep7$: YT019, $\Delta aut12$: YT020) の液胞膜を FM4-64 によって染色し、蛍光観察を行った。また、培地を水に置換することで低浸透圧刺激を加え、液胞融合を誘導した。DIC: 微分干渉顕微鏡観察。(B) 1 細胞あたりの液胞数と液胞の大きさを計測した。それぞれ 50 個の細胞における 1 細胞あたりの液胞数と、100 個の液胞の大きさを測定した。棒グラフは平均値を示し、エラーバーは標準偏差を示した。各株について、液胞融合誘導前のデータと誘導後のデータについてウェルチの t 検定を行い、 $p < 0.001$ であったものを「*」で示した。

4. 総括

本研究では分裂酵母における唯一の Rab5 ホモログである Ypt5、Ypt5 の上流因子と考えられる Vps901 と Vps902、Ypt5 の下流因子と考えられる Pep7 と Aut12 についての細胞機能に関する解析を行い、分裂酵母における Rab5 シグナル伝達系の因子が果たす役割について以下に示すことを明らかにした。

第 1 章では Ypt5 の機能と局在について、Ypt5 が、多様な高濃度イオンストレスに応答していること、小胞体から液胞への膜輸送に関わっていること、アクチン局在を制御していることが、本研究で判明した。特に Ypt5 によるアクチン局在の制御は、細胞の形態形成に重要であると考えられる。また、局在解析により、Ypt5 が液胞膜などの膜に局在すること、Ypt5 が機能するためには膜に局在することが重要であることが考えられた。

第 2 章では、Ypt5 の活性化因子と考えられる Vps901 と Vps902 の局在と機能について明らかにした。Vps901 と Vps902 がそれぞれ Ypt5 と部分的に共局在していることに加え、Vps901 と Vps902 も部分的に共局在していることが観察され、これらの因子が膜構造体で相互作用することによって多様な機能が発現していることが示唆された。Vps901 と Vps902 が協調して増殖、細胞形態形成、性分化、高濃度イオンストレスに対する応答、液胞形態形成などの様々な細胞機能に関与していることを明らかにした。特に、*vps901 vps902* 二重破壊株では液胞が見られず、このことから Vps901 と Vps902 は液胞形態形成に必須であることが考えられた。

第 3 章では、Ypt5 の下流因子であると考えられる Pep7 と Aut12 の局在と機能について解析を行った。Pep7 と Aut12 はどちらも、Ypt5 依存的に Ypt5 陽性の膜状構造体に局在することが観察された。また、*pep7* 遺伝子破壊株と *aut12* 遺伝子破壊株の表現型を解析することによって、Pep7 と Aut12 が性分化、高濃度イオンストレスに対する応答、液胞タンパク質の輸送、液胞の形態形成についてそれぞれ異なる機構で関与していることが考えられた。

第 1 章と第 2 章の結果から、*vps901 vps902* 二重破壊株の表現型は *ypt5* 突然変異株の表現型とよく似ていることが判明し、このことから Vps901 と Vps902 はどちらも Ypt5 の制御に関わっていることが考えられた。一方で、*vps901* 遺伝子破壊株と *vps902* 遺伝子破壊株の表現型に違いが見られたことにより、Vps901 と Vps902 が担う役割には差があることが示唆された。複数の VPS9 タンパク質の機能的な差異があることは、他の種においても報告があり [80]、どういう原因によって違いが生じるのかについては今後明らかにしていきたい。そのために、VPS9 タンパク質における、VPS9 ドメインあるいは VPS9 ドメイン以外の構造がどのように違うことで、機能的な差が生じるのか、また Rab5 に対する活性はどう違うのかを検討することは重要であると考えられる。分裂酵母における 2 つの VPS9 タンパク質と Ypt5 との結合性や活性化能には差があるのか、あるとすればどのような理由によって生じるのか判明すれば、複数の VPS9 タンパク質がどのように Rab5 を制御しているのかという基本的な素過程を理解するための重要な知見を得ることができる。そして、得られるであろう知見は分裂酵母のみにとどまらず、植物や高等動物においても応用して考えられる可能性が高い。

第1章と第3章から、Pep7とAut12という2つのYpt5エフェクター候補因子が、Ypt5が制御する細胞機能についてそれぞれ異なるはたらきをしていることが考えられた。このことによって、Ypt5は異なるエフェクターに異なるシグナルを伝えることで、複数の細胞機能を制御していると予想されるが、いかなる機構によってYpt5が異なるエフェクター因子と相互作用するのかについては今後明らかにすべき課題である。そのためには、Ypt5がいつ、どこで活性化され、どこで、どのエフェクター因子と相互作用するのかについて詳細に調べる解析を行うことが必要である。

低分子量Gタンパク質はGTPが結合している状態が活性型状態であるが、ATPアーゼがATPを加水分解することによってエネルギーを生じさせるようなはたらきをするわけではない。低分子量Gタンパク質におけるシグナル伝達とは、不活性型の状態で上流因子と結合し、活性型の状態で下流因子と結合する、というように、自身が分子スイッチとなってシグナルを受け渡すことであると予想される。つまり、低分子量Gタンパク質が機能するためには、適切な場所でシグナルを受け取って活性化されること、そして適切な場所で下流因子にシグナルを伝えることが重要であると考えられる。*ypt5*変異体の*ypt5-909*株が発現するYpt5-909が、脂質修飾部位に変異をもつことによって、適切な膜局在を失い、様々な細胞機能に異常が生じていたことは、*ypt5-909*株におけるYpt5が、シグナルを受け取るはずの場所に局在することができないこと、シグナルを受け渡すべき場所に局在できないことが考えられる。低分子量Gタンパク質の局在と活性は独立した構造によって担われているが、自身に関わる機能については大きな関連性があると考えられ、上流因子と下流因子はYpt5の局在と活性どちらにも影響を受ける可能性がある。本研究では、分裂酵母における1つの低分子量Gタンパク質、その上流と下流の候補因子が、多くの細胞機能を制御することを明らかにした。今後、Ypt5の活性や構造が、いつ、どこで、どのように変化することで、どの因子と関わるのかについて明らかにしていくことによって、分裂酵母における一連のRab5を介したシグナル伝達系の分子機構について理解が深まり、得られた知見を元に哺乳動物細胞をはじめとしたRab5を介した制御機構、および他の低分子量Gタンパク質を介した制御機構についても重要な知見が得られると考えている。

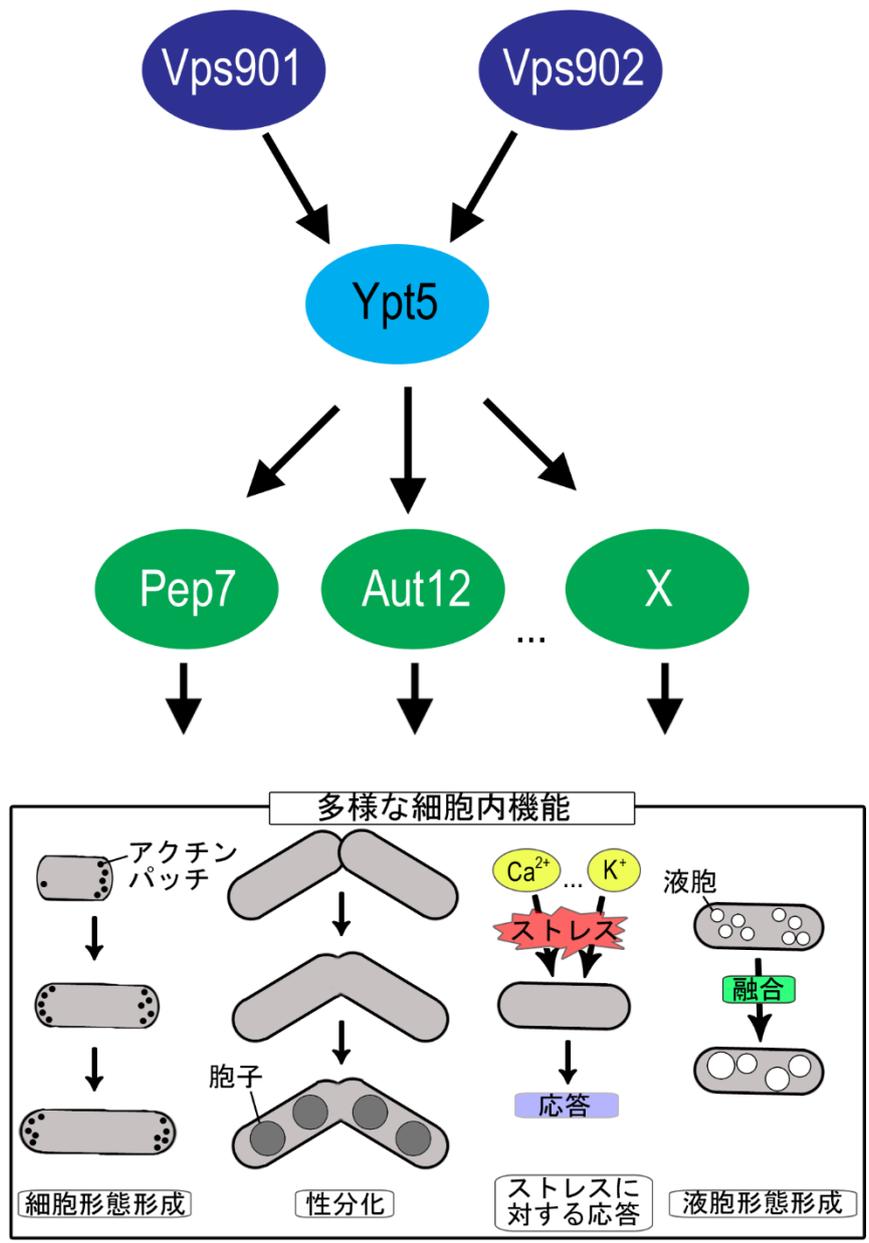


図 23. 分裂酵母における Rab5 シグナル伝達系のモデル

分裂酵母の Rab5 である Ypt5 は、上流因子であると考えられる Vps901 と Vps902 からシグナルを受け取り、下流因子であると考えられる Pep7 や Aut12 などのエフェクターに異なるシグナルを伝えるという時空間的なシグナル伝達機構によって、細胞の形態形成、性分化過程、ストレスに対する応答、液胞の形態形成などの様々な細胞機能を制御していることが考えられる。

材料と方法

分裂酵母株

本研究に用いた分裂酵母株を表 1 にまとめた。

本研究で作製した分裂酵母株の作製法を表 2 にまとめた。

プラスミド

本研究で用いたプラスミドは以下の通り。

【pREP41-Ub-GFP-SpCPS】

九州大学の竹川薫博士より供与された。分裂酵母発現ベクターpREP41 に、モノユビキチンと GFP とカルボキシペプチダーゼ S (CPS) の融合タンパク質をコードする塩基配列を挿入することにより作製された[24]。

【pIL(GFP-C)】

大阪市立大学中村太郎博士より供与された。pBluescript II KS ベクターの *Ssp* I 部位に *LEU2* マーカー遺伝子を、*Not* I / *Sac* I 部位に GFP 遺伝子をそれぞれ挿入することにより作製された。

【pIL-vps902-GFP】

pIL(GFP-C)の *Xho* I / *Not* I 部位に、*vps902* 遺伝子を挿入することにより作製 (*vps902* 遺伝子は pBS II -*vps902* (後藤拓也 (神戸大学) より供与された) から *Xho* I / *Not* I 切断によって得た)。*vps902*-GFP インテグランド株 YT015 作製に使用した。

【pTN592】

大阪市立大学中村太郎博士より供与された。分裂酵母発現ベクターpREP81 に mCherry 遺伝子を挿入することにより作製された。

【p5'-mCherry-ypt5-ura4-3'】

GFP-*ypt5* インテグランド株作製用ベクターの p5'-GFP-*ypt5*-ura4-3' [22] から、GFP 遺伝子を *Xho* I / *Sal* I 切断によって切り出して除去し、GFP 遺伝子を除去した部位に mCherry 遺伝子を挿入することにより作製した (mCherry 遺伝子は、pTN592 を鋳型として、合成 DNA の mCherry-int-s と mCherry-int-a をプライマーとして用いた PCR によって増幅した)。mCherry-*ypt5* インテグランド株 YT014 作製に使用した。

【pBS II KS⁺-LEU2-vps902Tar】

vps902 遺伝子破壊株作製用ベクター[81]。*vps902*破壊株 YT002 作製に使用した。

【pBS II-pep7(SB)】

分裂酵母ゲノム DNA ライブラリー(*EcoR* I) を鋳型として、合成 DNA の Pep7-s と Pep7-a をプライマーとして用いた PCR によって増幅した *pep7* 遺伝子を、pBluescript II KS(+)ベクターの *Sal* I -*Bam* H I 部位 に挿入することにより作製。

【pTN592-pep7】

pBS II-pep7(SB)を鋳型として、合成 DNA の *pep7-mcherry-int-s* と *pep7-mcherry-int-a* をプライマーとして用いた PCR によって増幅した *pep7* 遺伝子を、pTN592 ベクターの *Xho* I /*Not* I 部位に挿入することにより作製。
Pep7-mCherry を分裂酵母細胞に強制発現させる際に使用した。

【pTN592-aut12】

分裂酵母の cDNA ライブラリーを鋳型として、合成 DNA の *aut12-s1* と *aut12-a1* をプライマーとして用いた PCR によって増幅した *aut12* 遺伝子を、pTN592 ベクターの *Xho* I /*Not* I 部位に挿入することにより作製。
Aut12-mCherry を分裂酵母細胞に強制発現させる際に使用した。

【pGEX-ypt5】

神戸大学宮本昌明博士より供与された。pGEX-6P-2 (GE Healthcare, Little Chalfont, UK, 28-9546-50)の *Sal* I /*Not* I 部位に *ypt5* 遺伝子を挿入することにより作製された。大腸菌で GST-Ypt5 を発現、精製する際に使用した。

【pBAD-pep7-MycHis】

pBS II-pep7(SB)を鋳型として、合成 DNA の Pep7-s と *pep7-a5* をプライマーとして用いた PCR によって増幅した *pep7* 遺伝子を pBAD/*Myc*-His (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA, V440-01) の *Xho* I /*EcoR* I 部位に挿入することにより作製。
Pep7-Myc-His を大腸菌で発現、精製する際に使用した。

【pBS-KS⁺-ura4-1】

東京大学岡山博人博士より供与された。pBluescript II KS(+)ベクターの *Hind* III 部位に *ura4⁺* 遺伝子を挿入することにより作製された。

【pBS II-pep7-ura4-Tar】

pBS-KS⁺-ura4-1 の *Bst* X I /*Pst* I 部位に *pep7* 遺伝子座の 5'flanking 配列を、*Sal* I /*Kpn* I 部位に 3'flanking 配列を挿入することにより作製した (5'flanking 配列は分裂酵母ゲノム DNA ライブラリー(*Sau*3A I)を鋳型として、合成 DNA の *pep7del5s* と *pep7del5a* をプライマーとして用いた PCR で増幅し、3'flanking 配列は野生型分裂酵母株 TN8 のから抽出したゲノム DNA を鋳型として、合成 DNA

の *pep7del3s* と *pep7del3a* をプライマーとして用いた PCR で増幅した)。 *pep7* 遺伝子破壊株 YT019 作製に使用した。

【pBS II-*aut12-ura4-Tar*】

pBS-KS⁺-*ura4-1* の *Kpn* I / *Xho* I 部位に *aut12* 遺伝子座の 5'flanking 配列を、*Pst* I / *Sac* I 部位に 3'flanking 配列を挿入することにより作製した (5'flanking 配列は分裂酵母ゲノム DNA ライブラリー(*Eco*R I)を鋳型として、合成 DNA の *aut12del5s* と *aut12del5a* をプライマーとして用いた PCR で増幅し、3'flanking 配列は分裂酵母ゲノム DNA ライブラリー(*Eco*R I)を鋳型として、合成 DNA の *aut12del3s* と *aut12del3a* をプライマーとして用いた PCR で増幅した)。 *aut12* 遺伝子破壊株 YT020 作製に使用した。

合成 DNA

本研究に用いた合成 DNA を表 3 にまとめた。

培地

YE 培地

(0.5% Yeast Extract (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA, 212750), 3% glucose)

YE 寒天培地は分裂酵母株の継代や実験の前培養などに使用。

YPD 培地

(1% Yeast Extract, 2% Peptone (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA, 211677), 2% glucose)

YPD 培地は、*ypt5-909* 株である KS2、CK003 の継代や実験の前培養に使用。

ME 培地

(3% Malt Extract (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA, 218630))

ME 培地は、分裂酵母株の孢子形成培地として使用。

MM 培地

(1% glucose, 7.3 mM KH₂PO₄, 2 mM MgSO₄, 0.68 mM CaCl₂, 1.7 mM NaCl, 37.8 mM (NH₄)₂SO₄, 0.04 μM biotin, 2.1 μM calcium pantothenate, 81.2 μM nicotinic acid, 55.5 μM *myo*-inositol, 8.1 μM H₃BO₄, 0.16 μM CuSO₄, 0.6 μM KI, 0.74 μM FeCl₃, 2.36 μM MnSO₄, 0.83 μM Na₂MoO₄)

MM 培地は、分裂酵母株の形質転換時の選択培地として使用。

SSL+N 培地

(1% glucose, 3 mM aspartic acid, 14.7 mM KH₂PO₄, 1.4 mM Na₂HPO₄, 25.9 mM

ammonium acetate, 0.075 mg/ml adenine, 2 mM MgSO₄, 0.68 mM CaCl₂, 0.04 μM biotin, 2.1 μM calcium pantothenate, 81.2 μM nicotinic acid, 55.5 μM *myo*-inositol, 8.1 μM H₃BO₄, 0.16 μM CuSO₄, 0.6 μM KI, 0.74 μM FeCl₃, 2.36 μM MnSO₄, 0.83 μM Na₂MoO₄, 1.4 μM ZnSO₄)

SSL+N 培地は、分裂酵母株の実験の前培養に使用。

SSL-N 培地

(1% glucose, 1.8 mM KH₂PO₄, 2 mM MgSO₄, 0.68 mM CaCl₂, 0.04 μM biotin, 2.1 μM calcium pantothenate, 81.2 μM nicotinic acid, 55.5 μM *myo*-inositol, 8.1 μM H₃BO₄, 0.16 μM CuSO₄, 0.6 μM KI, 0.74 μM FeCl₃, 2.36 μM MnSO₄, 0.83 μM Na₂MoO₄, 1.4 μM ZnSO₄)

SSL-N 培地は、分裂酵母株の孢子形成培地として使用。

分裂酵母は、基本的に 30°C で培養した。SSL-N 培地でする際は 28°C で培養した。*ypt5-909* 株である KS2、CK003 を培養する際は 26°C で培養した。合成培地の SSL+N 培地、SSL-N 培地、MM 培地には、培養する分裂酵母株の栄養要求性によって、0.025% leucine や 0.005% uracil を培地に添加した。

分裂酵母の形質転換

遺伝子破壊株の YT002、YT019、YT020 の作製用ベクター、蛍光タンパク質を遺伝子座に挿入したインテグランド株の YT015、YT014 の作製用ベクター、タンパク質発現ベクターである pREP41-Ub-GFP-SpCPS、pTN592-pep7、pTN592-aut12 を分裂酵母細胞に導入し、形質転換させるために、Okazaki らの酢酸リチウム法[82]にいくつか改変を加えて以下の方法で行った。対数増殖期まで培養した細胞を、DW で洗い、細胞の終濃度が 1.0×10^9 cells/ml となるように 0.1 M LiOAc (pH5.0) で再懸濁し、30°C (または 26°C) で 2 時間のインキュベーションを行った。その後、細胞懸濁液 0.1 ml に、導入する DNA 1 μg と、52% Polyethylene Glycol 4,000 (Wako, Osaka, Japan, 162-09115) 290 μl を加え、30°C (または 26°C) で 50 分間のインキュベーションを行った後、43°C で 15 分間の熱ショックを加えた。その後、30°C (または 26°C) で 10 分間のインキュベーションを行った後、YE 培地 (または YPD 培地) で 2 回洗い、1/2 YE 培地 (または 1/2 YPD 培地) に再懸濁し、30°C (または 26°C) で 1 時間振とう培養 (回復インキュベーション) を行った。その後、細胞懸濁液を寒天プレートの選択培地にまき、3~5 日間、30°C (または 26°C) でインキュベーションを行った後、培地に形成された形質転換体のシングルコロニーを単離した。遺伝子破壊株、インテグランド株の作製時には、単離したシングルコロニーを YE 培地で 3 回継代した後、再度選択培地で培養し、増殖が見られたクローンのみを単離した (インスタビリティテスト)。

光学顕微鏡を用いた観察法

GFP 融合タンパク質、mCherry 融合タンパク質、FM4-64 の蛍光シグナル、および微分干渉顕微鏡 (DIC) 観察は、共焦点レーザー走査型顕微鏡 FluoView FV1000 (Olympus, Tokyo, Japan) によって行った。対物レンズは、60 倍の水浸レンズ (NA = 1.20, UPLSAPO) を使用した。Alexa

Fluor 546 標識ファロイジンの蛍光観察は、FV1000 または、高解像度全視野蛍光顕微鏡の DeltaVision システム (Applied Precision, Issaquah, WA, USA) によって z 軸方向に沿って多面の画像を取得した。DeltaVision による観察は、100 倍の油浸レンズ (NA = 1.40, UPlanSApo) を使用し、撮影した多面画像を、softWoRX4.1.0 ソフトウェアを用いてデコンボリューション処理を行った。Alexa Fluor 546 標識ファロイジンの蛍光多面画像は、ImageJ ソフトウェアを用いて、重ね合わせの画像処理を行った。

スポットアッセイ

対数増殖期まで培養した細胞を、4 段階の濃度に希釈し、等量ずつ各種寒天培地へスポットした。各スポットの細胞数は、濃い順に 4×10^4 個、 4×10^3 個、 4×10^2 個、 4×10 個。

カルボキシペプチダーゼ S (CPS) 輸送

pREP41-Ub-GFP-SpCPS を導入した形質転換体を対数増殖期まで培養し、液胞膜を染色して、FV1000 で蛍光観察を行った (液胞膜の染色法は次の「液胞膜染色」の通り)。

液胞膜染色

膜親和性の FM4-64 蛍光色素 (Molecular Probes, Eugene, OR, USA, T-3166) [83]を用い、以下の方法で行った。対数増殖期の細胞培養液を、氷上に移し、FM4-64 を終濃度 $1.6 \mu\text{M}$ で加え、氷上で 30 分間静置した後、遠心して上清を除いた。YE で 1 回洗った後、YE で再懸濁し、 30°C (または 26°C) に遮光して 1 時間静置後、染色された液胞膜を FV1000 で蛍光観察した。液胞融合を誘導する際は、液胞膜染色後の細胞を集め、DW で 2 回洗った後、DW で再懸濁し、 30°C (または 26°C) に遮光して 2 時間静置した後、FV1000 で蛍光観察を行った。液胞の大きさ、数の測定には、ImageJ ソフトウェアを用いた。

細胞の体積の測定

対数増殖期まで培養した細胞の培養液を、弱い超音波処理で細胞の凝集を除いた後、コールターカウンター Multisizer 3 (BECKMAN COULTER Brea, CA, USA)を用い、 10^5 個の細胞の体積を測定した。

アクチン染色

Marks らの手法[26]を元に、いくつか改変を加えて以下の方法で行った。対数増殖期まで培養した細胞培養液に、中性緩衝ホルマリン液(pH7.4) (Wako, Osaka, Japan, 060-01721) を終濃度 5.3%で加え、室温で 1 時間、ローテーターで攪拌した。その後、PEM バッファー(100 mM PIPES-NaOH (pH 6.8), 1mM EGTA, 1 mM MgCl_2)で 3 回洗った後、PEM バッファー + 1% TritonX-100 で 30 秒以上透過処理を行い、PEM バッファーで 3 回洗った。その後、1.3 units の Alexa Fluor 546-labeled phalloidin (Molecular Probes, Eugene, OR, USA, A22283)を加え、室温で 2 時間、遮光しながらローテーターで攪拌した。染色した細胞は、DeltaVision システム、または FV1000 を用いて蛍光観察を行い、多面の画像を取得後、ImageJ ソフトウェアの Z project 処理によって画像の重ね合わせ処理を行った。

細胞の破碎と分画

対数増殖期まで培養した細胞 2.0×10^9 個を、DW で洗い、0.1M Tris-HCl (pH9.4) に懸濁し、DTT を終濃度 10mM で加え、30°C で 10 分間、ウォーターバスでインキュベーションを行った。その後、細胞を集め、スフェロプラスト培地 (2% グルコース、0.675% Yeast Nitrogen Base (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA, 291940)、1M sorbitol) に懸濁し、100 units の Zymolyase 20T (SEIKAGAKU CORPORATION, Tokyo, Japan, 120491) を加えて、30°C で 3 時間、ウォーターバスでインキュベーションを行った後、氷上に移し、予冷した 1.4M sorbitol の上に重層し、遠心して上清を除き、溶解バッファー (20 mM Hepes-KOH (pH6.8), 0.2 M sorbitol, 50 mM potassium acetate, 2 mM EDTA (pH 8.0), 1 mM DTT, 0.5 $\mu\text{g/ml}$ leupeptin, 1 $\mu\text{g/ml}$ aprotinin, 20 $\mu\text{g/ml}$ PMSF) を加え、 1×10^9 cells/ml に調整し、穏やかにピペティングを行った。その後、1 分間のホモジナイズを氷水で冷やしながら 5 回繰り返した (間隔は 1 分以上)。その後、サンプルを $1,000 \times g$ 、10 分間、4°C で遠心し、その上清を S1 とした。S1 を、20 mM Hepes-KOH (pH6.8), 80% sucrose の上に重層し、 $13,000 \times g$ 、15 分間、4°C に相当する遠心を行い、その上清を S13、沈殿を P13 とした。P13 には溶解バッファーを加え、遠心前の S1 と同じ容量にすることで、元の細胞に換算して 1×10^9 cells/ml となるように調整した。S13 を、20 mM Hepes-KOH (pH6.8), 80% sucrose の上に重層し、 $100,000 \times g$ 、1 時間、4°C で超遠心し、上清を S100、沈殿を P100 とした。P100 には溶解バッファーを加え、遠心前の S13 と同じ容量にすることで、元の細胞に換算して 1×10^9 cells/ml となるように調整した。各画分、元の細胞に換算して 1×10^9 cells/ml となるように調整した各画分を $18 \mu\text{l}$ ずつ (元の細胞に換算して 1.8×10^7 cells) について SDS-PAGE を行い、PVDF 膜に転写し、抗 GFP 抗体 (mouse monoclonal IgG1 κ (a mixture of two clones (7.1 and 13.1)), Roche, Mannheim, Germany, 11 814 460 001) を 1:1000 で処理し、二次抗体 (goat-anti mouse IgG-HRP, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA, sc-2055) を 1:1000 で処理し、検出試薬に Chemi-Lumi One L (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan, #07880) を用いてウェスタンブロット解析を行った。

GFP-Ypt5 と液胞膜 (FM4-64) の輝度解析

対数増殖期の GFP-ypt5 インテグランド株 CK002 を、FM4-64 で液胞膜を染色し、FV1000 で蛍光観察を行い、ImageJ ソフトウェアを用いて画像解析を行い、GFP と FM4-64 それぞれの蛍光輝度値のピークを比較した。ImageJ の line tool で選択した線状の ROI (Region Of Interest) 上の蛍光輝度値を、ImageJ の「Plot Profile」機能によって調べ、GFP と FM4-64 それぞれの蛍光輝度値のピークの距離を測定した。液胞近傍の GFP-Ypt5 について 50 例の解析を行い、GFP-Ypt5 と液胞膜 (FM4-64) の輝度ピークの距離を比較し、グラフ化した。

増殖曲線

対数増殖期まで培養した細胞を集め、終濃度 1×10^5 cells/ml で YE 培地に再懸濁し、30°C で振とう培養を行い、経時的に細胞濃度を測定した。再懸濁後の各時間における細胞の濃度の測定は、血球計算盤を用いて 2 回計測し、その平均値を算出した。

細胞の軸長計測

対数増殖期まで培養した細胞を、FV1000 を用いて微分干渉顕微鏡 (DIC) 観察を行い、取得した画像を、ImageJ ソフトウェアを用い、200 個の細胞について長軸の長さ、短軸の長さを計測した。

接合率、孢子形成率の検討

対数増殖期まで培養させた細胞 6×10^8 個を集菌し、SSL-N 培地で 2 回洗った後、SSL-N 培地に、終濃度 2×10^7 cells/ml で再懸濁し、28°C で振とう培養を行い、経時的に接合率と孢子形成率を測定した (500 細胞以上)。

電子顕微鏡を用いた観察

対数増殖期まで培養をした細胞を集め、半分は YE 培地で再懸濁し、残り半分は DW で懸濁した。DW で懸濁した細胞は、30°C で 2 時間のインキュベーションを行った。細胞懸濁液を、ホルムバーム膜ループ (直径 8mm の銅線) に薄く塗布し、液体プロパンで瞬間凍結させた。凍結させた細胞を、0.2% 酢酸ウランと 2% 四酸化オスミウムを含んだアセトンに移し、-85°C で 2 日間おいた。その後、-85°C からゆっくりと室温へ暖め、アセトンで洗った後、スーパー樹脂に包埋した。ウルトラミクロトーム EM UC6 (Leica, Wetzlar, Germany) を用いて超薄切片を作製し、クエン酸鉛染色を行った後、透過型電子顕微鏡 JEM-1230 (JEOL, Tokyo, Japan) を用い、80kV で観察を行った。

プルダウンアッセイ

大腸菌発現系により、GST、GST-Ypt5、Pep7-Myc-His を調製した。溶解バッファー (50mM Tris-HCl (pH8.0), 150mM NaCl, 5mM MgCl₂, 0.05% Nonidet P-40, 2μg/ml leupeptin, 2μg/ml aprotinin, 1mM PMSF) で平衡化した Glutathione Sepharose 4B (GE Healthcare, Little Chalfont, UK, 17-0756-01) を、20μg の GST または GST-Ypt5 と共に、ローテーターで 1 時間、4°C で反応、結合させた。その後、溶解バッファーで洗い、GST-Ypt5 を結合させた Glutathione Sepharose 4B について、以下の方法で GDP または GTPγS を結合させた。GST-Ypt5 を結合させた Glutathione Sepharose 4B をヌクレオチド除去バッファー (20mM Tris-HCl (pH7.5), 50mM NaCl, 2mM EDTA, 1mM DTT) に懸濁し、ウォーターバス 25°C で 15 分間インキュベーションを行った後、GDP または GTPγS を終濃度 200μM で加え、ウォーターバス 37°C で 15 分間インキュベーションを行った。その後、MgCl₂ を終濃度 10 mM で加え、氷上におき、溶解バッファーで洗った。次に、GST-Ypt5-GDP、GST-Ypt5-GTPγS、GST を結合させた Glutathione Sepharose 4B それぞれに、Pep7-Myc-His を加え、ローテーター 2 時間、4°C で反応させた。その後、洗いバッファー (50mM Tris-HCl (pH8.0), 150mM NaCl, 5mM MgCl₂, 0.05% Nonidet P-40) で洗った後、SDS-PAGE を行い、PVDF 膜に転写後、抗 Myc 抗体 (c-Myc (9E10), Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA, sc-40) を 1:1000 で処理、二次抗体 (goat-anti mouse IgG-HRP) を 1:1000 で処理し、検出試薬に Chemi-Lumi One L を用いてウエスタンブロット解析を行った。

株の名称	遺伝子型	出所
表 1	本研究で用いた分裂酵母株	
CK002	<i>h⁹⁰ leu1-32 ura4-D18 ypt5::GFP-ypt5<<ura4⁺</i>	片山修士論文[22]
CK003	<i>h⁹⁰ leu1-32 ura4-D18 ypt5::GFP-ypt5-909<<ura4⁺</i>	片山修士論文[22]
HT005	<i>h⁻ leu1-32 ura4-D18 vps901::vps901-GFP<<LEU2</i>	辻裕美
KS2	<i>h⁹⁰ leu1-32 ypt5-909</i>	柳田充弘博士
L968	<i>h⁹⁰</i>	NBRP
MM72-1D	<i>h⁻ leu1-32 ura4-D18</i>	NBRP
TG001	<i>h⁻ leu1-32 ura4-D18</i> <i>vps902::vps902-mCherry<<ura4⁺</i>	後藤拓也
TM002	<i>h⁻ leu1-32 ura4-D18 vps901::ura4⁺</i>	松田修士論文[84]
TM003	<i>h⁹⁰ leu1-32 ura4-D18 vps901::ura4⁺</i>	松田修士論文[84]
TM006	<i>h⁻ leu1-32 ura4-D18 vps902::ura4⁺</i>	松田修士論文[84]
TM007	<i>h⁺ leu1-32 ura4-D18 vps902::ura4⁺</i>	松田修士論文[84]
TM005	<i>h⁹⁰ leu1-32 ura4-D18 vps902::ura4⁺</i>	松田修士論文[84]
TN4	<i>h⁻ leu1-32</i>	NBRP
TN8	<i>h⁹⁰ leu1-32</i>	NBRP
TN29	<i>h⁹⁰ leu1-32 ura4-D18</i>	NBRP
YT002	<i>h⁻ leu1-32 ura4-D18 vps902::LEU2</i>	本研究
YT003	<i>h⁹⁰ leu1-32 ura4-D18 vps901::ura4⁺ vps902::LEU2</i>	本研究
YT004	<i>h⁹⁰ leu1-32 ura4-D18 vps901::vps901-GFP<<LEU2</i>	本研究
YT008	<i>h⁹⁰ leu1-32 ura4-D18 vps901::vps901-GFP<<LEU2</i> <i>ypt5::mCherry-ypt5<<ura4⁺</i>	本研究
YT011	<i>h⁹⁰ leu1-32 ura4-D18 vps901::vps901-GFP<<LEU2</i> <i>vps902::vps902-mCherry<<ura4⁺</i>	本研究
YT012	<i>h⁹⁰ leu1-32 ura4-D18</i> <i>vps902::vps902-mCherry<<ura4⁺</i>	本研究
YT014	<i>h⁹⁰ leu1-32 ura4-D18 ypt5::mCherry-ypt5<<ura4⁺</i>	本研究
YT015	<i>h⁹⁰ leu1-32 ura4-D18 vps902::vps902-GFP<<LEU2</i>	本研究
YT016	<i>h⁹⁰ leu1-32 ura4-D18 vps902::vps902-GFP<<LEU2</i> <i>ypt5::mCherry-ypt5<<ura4⁺</i>	本研究
YT017	<i>h⁻ leu1-32 ura4-D18 vps901::ura4⁺ vps902::ura4⁺</i>	本研究
YT018	<i>h⁹⁰ leu1-32 ura4-D18 vps901::ura4⁺ vps902::ura4⁺</i>	本研究
YT019	<i>h⁹⁰ leu1-32 ura4-D18 pep7::ura4⁺</i>	本研究
YT020	<i>h⁹⁰ leu1-32 ura4-D18 aut12::ura4⁺</i>	本研究

NBRP: ナショナルバイオリソースプロジェクト

柳田充弘博士 (沖縄科学技術大学院大学)

松田智、片山千紗子、辻裕美、後藤拓也 (神戸大学)

表 2 本研究で作製した分裂酵母株の作成方法と確認方法			
株の名称	株の説明	株の作製法	相同組換えの組換え部位の確認 PCR に用いた合成 DNA プライマー
YT002	<i>vps902</i> 遺伝子破壊株	TN29 に <i>Xba</i> I / <i>Xho</i> I で切断した pBS II KS ⁺ -LEU2- <i>vps902</i> Tar ベクターを導入し、相同組換え法によって作製	<i>vps902del-5</i> と LEU2-3D (5'側組換え部位確認) <i>vps902del-3</i> と LEU2-5D (3'側組換え部位確認)
YT017	<i>vps901 vps902</i> 二重破壊株	TM002 と TM007 とのかけ合わせによって作製	<i>vps901del-5</i> と <i>ura4-D3</i> (5'側の <i>vps901::ura4⁺</i> 組換え部位確認) <i>vps901del-3</i> と <i>ura4-D5</i> (3'側の <i>vps901::ura4⁺</i> 組換え部位確認) <i>vps902del-5</i> と <i>ura4-D3</i> (5'側の <i>vps902::ura4⁺</i> 組換え部位確認) <i>vps902del-3</i> と <i>ura4-D5</i> (3'側の <i>vps902::ura4⁺</i> 組換え部位確認)
YT018	<i>vps901 vps902</i> 二重破壊株	YT017 と TM005 とのかけ合わせによって作製	<i>vps901del-5</i> と <i>ura4-D3</i> (5'側の <i>vps901::ura4⁺</i> 組換え部位確認) <i>vps901del-3</i> と <i>ura4-D5</i> (3'側の <i>vps901::ura4⁺</i> 組換え部位確認) <i>vps902del-5</i> と <i>ura4-D3</i> (5'側の <i>vps902::ura4⁺</i> 組換え部位確認) <i>vps902del-3</i> と <i>ura4-D5</i> (3'側の <i>vps902::ura4⁺</i> 組換え部位確認)
YT003	<i>vps901 vps902</i> 二重破壊株	TM003 と YT002 とのかけ合わせによって作製	<i>vps901del-5</i> と <i>ura4-D3</i> (5'側の <i>vps901::ura4⁺</i> 組換え部位確認)

			vps901del-3 と ura4-D5 (3'側の <i>vps901::ura4</i> 組換え部位確認)
			vps902del-5 と LEU2-3D (5'側の <i>vps902::LEU2</i> 組換え部位確認)
			vps902del-3 と LEU2-5D (3'側の <i>vps902::LEU2</i> 組換え部位確認)
YT019	<i>pep7</i> 遺伝子破壊株	MM72-1D に <i>BstX</i> I / <i>Kpn</i> I で切断した pBS II- <i>pep7-ura4-Tar</i> ベクターを導入し、相同組換え法によって作製	<i>pep7del5s3</i> と ura4-D5 (5'側組換え部位確認) <i>pep7del3a3</i> と ura4-D3-2 (3'側組換え部位確認)
YT020	<i>aut12</i> 遺伝子破壊株	MM72-1D に <i>Sac</i> I / <i>Kpn</i> I で切断した pBS II- <i>aut12-ura4-Tar</i> ベクターを導入し、相同組換え法によって作製	<i>aut12-s7</i> と ura4-D3-2 (5'側組換え部位確認) <i>aut12-a4</i> と ura4-D5 (3'側組換え部位確認)
YT004	<i>vps901</i> -GFP インテグラント株	HT005 と TN29 とのかけ合わせによって作製	<i>Vps901-3s1</i> と GFP-a2 (5'側組換え部位確認)
YT015	<i>vps902</i> -GFP インテグラント株	TN29 に、 <i>BstAP</i> I で切断した pIL- <i>vps902</i> -GFP ベクターを導入し、相同組換え法によって作製	902g-1894 と GFP-a4 (5'側組換え部位確認)
YT012	<i>vps902</i> -mCherry インテグラント株	TG001 と TN29 とのかけ合わせによって作製	902g-1894 と mCherry-a46(5'側組換え部位確認)
YT014	mCherry- <i>ypt5</i> インテグラント株	MM72-1D に <i>Apa</i> I / <i>Sac</i> I で切断した p5'-m Cherry- <i>ypt5-ura4-3'</i> ベクターを導入し、相同組換え法によって作製	<i>Ypt5-del-5-3</i> と mCherry-a23 (5'側組換え部位確認)
YT008	<i>vps901</i> -GFP mCherry- <i>ypt5</i> インテグラント株	YT004 と YT014 とのかけ合わせによって作製	<i>Vps901-3s1</i> と GFP-a2 (5'側の <i>vps901-GFP</i> << <i>LEU2</i> 組換え部位確認) <i>Ypt5-del-5-3</i> と

YT016	<i>vps902</i> -GFP mCherry- <i>ypt5</i> インテ グランド株	YT015 と YT014 との かけ合わせによって 作製	mCherry-a23 (5'側の <i>ypt5::mCherry-ypt5<<ura4</i> 組換え部位確認) 902g-1894 と GFP-a4 (5'側の <i>vps902-GFP<<LEU2</i> 組換え部位確認) Ypt5-del-5-3 と mCherry-a23 (5'側 の <i>ypt5::mCherry-ypt5<<ura4</i> 組換え部位確認)
YT011	<i>vps901</i> -GFP <i>vps902</i> -mCherry イ ンテグランド株	YT004 と YT012 との かけ合わせによって 作製	Vps901-3s1 と GFP-a2 (5'側の <i>vps901-GFP<<LEU2</i> 組換え部位確認) 902g-1894 と mCherry-a46 (5'側の <i>vps902::vps902-mCherry<<ura4</i> 組換え部位確認)

表 3	本研究で用いた合成 DNA
合成 DNA の名称	合成 DNA の配列
vps902del-5	5'-TTCGTCTTCTTCAGCGTCTT-3'
LEU2-3D	5'-AACCAAGGAAGTACAGGACAA-3'
vps902del-3	5'-ACTGCAAGCCCATCTTCGGA-3'
LEU2-5D	5'-ACCTGACCATTTGATGGAGT-3'
vps901del-5	5'-ATATTATTTCTGCTGCCATT-3'
ura4-D3	5'-GTGTTGGAACAGAATAAATT-3'
vps901del-3	5'-GTATTCCACATCGTAACTTG-3'
ura4-D5	5'-ATATAGCCAGTGGGATTTGT-3'
pep7del5s3	5'-CGCAAGGATCTTGAGTTGCA-3'
pep7del3a3	5'-TACTTGTGGTAACTGGCTCA-3'
ura4-D3-2	5'-TGAAAGATGTATGTAGATGA-3'
aut12-s7	5'-ACGAAGAAGTTCAGCAGCGA-3'
aut12-a4	5'-GCCATGTCCAACACCACATC-3'
Vps901-3s1	5'-TGGAAGAGAGAAAAGTTGAGC-3'
GFP-a2	5'-ATGCCGTTTCATATGATCTG-3'
902g-1894	5'-CCTATGCTAACATATTCTTA-3'
GFP-a4	5'-CATCCATGCCATGTGTAATC-3'
mCherry-a46	5'-TGCACCTTGAAGCGCATGAA-3'
Ypt5-del-5-3	5'-TCGTACTIONTTCAGTTGTCAA-3'
mCherry-a23	5'-CTTGATGATGGCCATGTTAT-3'
mCherry-int-s	5'-AACTCGAGATGGTGAGCAAGGGCGAGGA-3'
mCherry-int-a	5'-AAGTCGACCCCTTGTACAGCTCGTCCATGC-3'
Pep7-s	5'-AAGTCGACACAAAATGGTAAAAGACGTAT-3'
Pep7-a	5'-AAGGATCCTCAAATATCAAAAAGATCCA-3'
pep7-mcherry-int-s	5'-AACTCGAGAATGCAAAAATGGTAAAAGACG-3'
pep7-mcherry-int-a	5'-TAAAGCGGCCGCTAATATCAAAAAGATCCA-3'
aut12-s1	5'-AACTCGAGAATGGAACCAACATCTGAGCA-3'
aut12-a1	5'-TAAAGCGGCCGCCAAACGAAAGGTTTGT-3'
pep7-a5	5'-CGGAATTCATATCAAAAAGATCCAAGT-3'
pep7del5s	5'-CTTGCCACCGCGGTGGCAAATTTTCAAATA-3'
pep7del5a	5'-AACTGCAGAGTAATCCCTCTGAACTTGA-3'
pep7del3s	5'-ACGCGTCGACAGTTAATGTGTTGCGAAGGT-3'
pep7del3a	5'-TCTGGTACCCCGTTTTTCGTG-3'
aut12del5s	5'-AAGGTACCGTCGCCAACTTCATC-3'
aut12del5a	5'-AACTCGAGCAACTGGCTGTTTTTCATTAG-3'

aut12del3s 5'-AACTGCAGTAATGAGCATGTAAAGTT-3'

aut12del3a 5'-AAGAGCTCCATTACCTCCCAAT-3'

謝辞

本研究を進めるにあたり、多くの方々にご協力いただきました。

大阪市立大学の下田親先生には分裂酵母の DNA ライブラリーを提供していただきました。東京大学の岡山博人先生にはプラスミドを供与していただきました。沖縄科学技術大学院大学の柳田充弘先生と佐二木健一博士には分裂酵母株を提供していただきました。深く感謝申し上げます。

九州大学の竹川薫先生には、プラスミドを供与していただいたことに加えまして、研究について貴重なご意見をいただきました。神戸大学の鎌田真司先生には、コールターカウンターを使用させていただきました。大阪大学の篠原彰先生と篠原美紀先生には、DeltaVision システムによる観察について、顕微鏡システムの使用方法から実験方法にいたるまでご助言いただき、さらに研究についての価値ある議論をさせていただきました。奈良女子大学の野口哲子先生と鍵和田聡先生には、電子顕微鏡観察について、サンプル調製の初歩的なことから実際の観察、そして結果についての専門的なご意見を多数いただき、たいへんお世話になりました。大阪市立大学の中村太郎先生には、プラスミドを供与していただき、実験を進めるための多くのご助言を賜りました。神戸大学の郷達明博士には、実験手法や研究内容について多くのことを教えていただき、貴重な議論をさせていただきました。神戸大学の前川昌平先生と三村徹郎先生そして菅澤薫先生には本学位論文を審査していただき、多くのありがたいご意見をいただきました。みなさまには、研究のことばかりではなく、学生生活においてもたいへんお世話になりました。心より感謝申し上げます。

神戸大学の宮本昌明先生には、6年間にわたり、とても真摯にご指導いただきました。研究のことにとどまらず、本当に多くのことを勉強させていただき、海外での発表をはじめとして様々な経験をさせていただきました。深く感謝申し上げます。

最後に、先行研究によって礎を築かれた研究室の先輩方や研究室で苦楽をともにした学生とスタッフのみなさま、学生生活において心の支えとなってくれた友人と家族、ここにお名前を記すことができていないお世話になったみなさまのおかげで研究を続けることができました。心からの感謝を申し上げます。

参考文献

- [1] M. Zerial, H. McBride, Rab proteins as membrane organizers, *Nature reviews. Molecular cell biology* 2 (2001) 107-117.
- [2] D.R. Lowy, B.M. Willumsen, Function and regulation of ras, *Annu Rev Biochem* 62 (1993) 851-891.
- [3] A.B. Jaffe, A. Hall, Rho GTPases: biochemistry and biology, *Annu Rev Cell Dev Biol* 21 (2005) 247-269.
- [4] P.R. Clarke, C. Zhang, Ran GTPase: a master regulator of nuclear structure and function during the eukaryotic cell division cycle?, *Trends Cell Biol* 11 (2001) 366-371.
- [5] H.R. Bourne, D.A. Sanders, F. McCormick, The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism, *Nature* 349 (1991) 117-127.
- [6] H. Stenmark, Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic, *Nat Rev Mol Cell Biol* 10 (2009) 513-525.
- [7] J. Armstrong, Membrane traffic between genomes, *Genome Biol* 1 (2000) REVIEWS104.
- [8] P. Chavrier, R.G. Parton, H.P. Hauri, K. Simons, M. Zerial, Localization of low molecular weight GTP binding proteins to exocytic and endocytic compartments, *Cell* 62 (1990) 317-329.
- [9] J.P. Gorvel, P. Chavrier, M. Zerial, J. Gruenberg, rab5 controls early endosome fusion in vitro, *Cell* 64 (1991) 915-925.
- [10] C. Bucci, R.G. Parton, I.H. Mather, H. Stunnenberg, K. Simons, B. Hoflack, M. Zerial, The small GTPase rab5 functions as a regulatory factor in the early endocytic pathway, *Cell* 70 (1992) 715-728.
- [11] J.M. Kinchen, K.S. Ravichandran, Phagosome maturation: going through the acid test, *Nature reviews. Molecular cell biology* 9 (2008) 781-795.
- [12] A. Longatti, S.A. Tooze, Vesicular trafficking and autophagosome formation, *Cell death and differentiation* 16 (2009) 956-965.
- [13] L. Lanzetti, A. Palamidessi, L. Areces, G. Scita, P.P. Di Fiore, Rab5 is a signalling GTPase involved in actin remodelling by receptor tyrosine kinases, *Nature* 429 (2004) 309-314.
- [14] L. Capalbo, P.P. D'Avino, V. Archambault, D.M. Glover, Rab5 GTPase controls chromosome alignment through Lamin disassembly and relocation of the NuMA-like protein Mud to the poles during mitosis, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (2011) 17343-17348.
- [15] L. Lanzetti, A novel function of Rab5 in mitosis, *Small GTPases* 3 (2012) 168-172.
- [16] L. Menut, T. Vaccari, H. Dionne, J. Hill, G. Wu, D. Bilder, A mosaic genetic screen for *Drosophila* neoplastic tumor suppressor genes based on defective pupation, *Genetics* 177 (2007) 1667-1677.
- [17] D.S. Carney, B.A. Davies, B.F. Horazdovsky, Vps9 domain-containing proteins: activators of Rab5 GTPases from yeast to neurons, *Trends in cell biology* 16 (2006) 27-35.
- [18] M. Nakase, Y. Tsukamoto, A. Hosomi, T. Matsuda, M. Miyamoto, K. Takegawa, *CUE*

- Domain-Containing Protein Vps901 Is Required for Vacuolar Protein Transport in *Schizosaccharomyces pombe*, *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 76 (2012) 652-659.
- [19] D.U. Kim, J. Hayles, D. Kim, V. Wood, H.O. Park, M. Won, H.S. Yoo, T. Duhig, M. Nam, G. Palmer, S. Han, L. Jeffery, S.T. Baek, H. Lee, Y.S. Shim, M. Lee, L. Kim, K.S. Heo, E.J. Noh, A.R. Lee, Y.J. Jang, K.S. Chung, S.J. Choi, J.Y. Park, Y. Park, H.M. Kim, S.K. Park, H.J. Park, E.J. Kang, H.B. Kim, H.S. Kang, H.M. Park, K. Kim, K. Song, K.B. Song, P. Nurse, K.L. Hoe, Analysis of a genome-wide set of gene deletions in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*, *Nature biotechnology* 28 (2010) 617-623.
- [20] J. Armstrong, M.W. Craighead, R. Watson, S. Ponnambalam, S. Bowden, *Schizosaccharomyces pombe* ypt5: a homologue of the rab5 endosome fusion regulator, *Mol Biol Cell* 4 (1993) 583-592.
- [21] K. Sajiki, M. Hatanaka, T. Nakamura, K. Takeda, M. Shimanuki, T. Yoshida, Y. Hanyu, T. Hayashi, Y. Nakaseko, M. Yanagida, Genetic control of cellular quiescence in *S. pombe*, *J Cell Sci* 122 (2009) 1418-1429.
- [22] 片山千紗子, 分裂酵母 Ypt5(Rab5)の細胞機能における役割, 神戸大学大学院理学研究科生物学専攻 修士学位論文 (2010).
- [23] G.C. Webb, J. Zhang, S.J. Garlow, A. Wesp, H. Riezman, E.W. Jones, Pep7p provides a novel protein that functions in vesicle-mediated transport between the yeast Golgi and endosome, *Molecular biology of the cell* 8 (1997) 871-895.
- [24] T. Iwaki, M. Onishi, M. Ikeuchi, A. Kita, R. Sugiura, Y. Giga-Hama, Y. Fukui, K. Takegawa, Essential roles of class E Vps proteins for sorting into multivesicular bodies in *Schizosaccharomyces pombe*, *Microbiology* 153 (2007) 2753-2764.
- [25] G. Odorizzi, M. Babst, S.D. Emr, Fab1p PtdIns(3)P 5-kinase function essential for protein sorting in the multivesicular body, *Cell* 95 (1998) 847-858.
- [26] J. Marks, J.S. Hyams, Localization of F-Actin through the Cell-Division Cycle of *Schizosaccharomyces Pombe*, *European journal of cell biology* 39 (1985) 27-32.
- [27] D.R. Kovar, V. Sirotkin, M. Lord, Three's company: the fission yeast actin cytoskeleton, *Trends in cell biology* 21 (2011) 177-187.
- [28] K. Sato, S. Nishikawa, A. Nakano, Membrane protein retrieval from the Golgi apparatus to the endoplasmic reticulum (ER): characterization of the RER1 gene product as a component involved in ER localization of Sec12p, *Molecular biology of the cell* 6 (1995) 1459-1477.
- [29] C.K. Raymond, I. Howald-Stevenson, C.A. Vater, T.H. Stevens, Morphological classification of the yeast vacuolar protein sorting mutants: evidence for a prevacuolar compartment in class E vps mutants, *Molecular biology of the cell* 3 (1992) 1389-1402.
- [30] M. Doi, H. Minematsu, Y. Kubota, K. Nishiwaki, M. Miyamoto, The novel Rac effector RIN-1 regulates neuronal cell migration and axon pathfinding in *C. elegans*, *Development* 140 (2013) 3435-3444.
- [31] H. Horiuchi, R. Lippe, H.M. McBride, M. Rubino, P. Woodman, H. Stenmark, V. Rybin, M. Wilm, K. Ashman, M. Mann, M. Zerial, A novel Rab5 GDP/GTP exchange factor complexed to

- Rabaptin-5 links nucleotide exchange to effector recruitment and function, *Cell* 90 (1997) 1149-1159.
- [32] H. Hama, G.G. Tall, B.F. Horazdovsky, Vps9p is a guanine nucleotide exchange factor involved in vesicle-mediated vacuolar protein transport, *The Journal of biological chemistry* 274 (1999) 15284-15291.
- [33] C.G. Burd, P.A. Mustol, P.V. Schu, S.D. Emr, A yeast protein related to a mammalian Ras-binding protein, Vps9p, is required for localization of vacuolar proteins, *Molecular and cellular biology* 16 (1996) 2369-2377.
- [34] Y. Chen, F. Zhou, S. Zou, S. Yu, S. Li, D. Li, J. Song, H. Li, Z. He, B. Hu, L.O. Bjorn, Z. Lipatova, Y. Liang, Z. Xie, N. Segev, A Vps21 endocytic module regulates autophagy, *Mol Biol Cell* 25 (2014) 3166-3177.
- [35] C. Thomas, D. Strutt, Rabaptin-5 and Rabex-5 are neoplastic tumour suppressor genes that interact to modulate Rab5 dynamics in *Drosophila melanogaster*, *Dev Biol* 385 (2014) 107-121.
- [36] T. Goh, W. Uchida, S. Arakawa, E. Ito, T. Dainobu, K. Ebine, M. Takeuchi, K. Sato, T. Ueda, A. Nakano, VPS9a, the common activator for two distinct types of Rab5 GTPases, is essential for the development of *Arabidopsis thaliana*, *Plant Cell* 19 (2007) 3504-3515.
- [37] G.G. Tall, M.A. Barbieri, P.D. Stahl, B.F. Horazdovsky, Ras-activated endocytosis is mediated by the Rab5 guanine nucleotide exchange activity of RIN1, *Developmental cell* 1 (2001) 73-82.
- [38] S.M. Wakil, K. Ramzan, R. Abuthuraya, S. Hagos, H. Al-Dossari, R. Al-Omar, H. Murad, A. Chedrawi, Z.N. Al-Hassnan, J. Finsterer, S. Bohlega, Infantile-onset ascending hereditary spastic paraplegia with bulbar involvement due to the novel ALS2 mutation c.2761C>T, *Gene* 536 (2014) 217-220.
- [39] K. Saito, J. Murai, H. Kajiho, K. Kontani, H. Kurosu, T. Katada, A novel binding protein composed of homophilic tetramer exhibits unique properties for the small GTPase Rab5, *The Journal of biological chemistry* 277 (2002) 3412-3418.
- [40] H. Kajiho, K. Saito, K. Tsujita, K. Kontani, Y. Araki, H. Kurosu, T. Katada, RIN3: a novel Rab5 GEF interacting with amphiphysin II involved in the early endocytic pathway, *Journal of cell science* 116 (2003) 4159-4168.
- [41] H. Kajiho, S. Fukushima, K. Kontani, T. Katada, RINL, guanine nucleotide exchange factor Rab5-subfamily, is involved in the EphA8-degradation pathway with odin, *PloS one* 7 (2012) e30575.
- [42] C.M. Hunker, A. Galvis, I. Kruk, H. Giambini, M.L. Veisaga, M.A. Barbieri, Rab5-activating protein 6, a novel endosomal protein with a role in endocytosis, *Biochemical and biophysical research communications* 340 (2006) 967-975.
- [43] A. Otomo, S. Hadano, T. Okada, H. Mizumura, R. Kunita, H. Nishijima, J. Showguchi-Miyata, Y. Yanagisawa, E. Kohiki, E. Suga, M. Yasuda, H. Osuga, T. Nishimoto, S. Narumiya, J.E. Ikeda, ALS2, a novel guanine nucleotide exchange factor for the small GTPase Rab5, is implicated in endosomal dynamics, *Human molecular genetics* 12 (2003) 1671-1687.

- [44] S. Hadano, A. Otomo, K. Suzuki-Utsunomiya, R. Kunita, Y. Yanagisawa, J. Showguchi-Miyata, H. Mizumura, J.E. Ikeda, ALS2CL, the novel protein highly homologous to the carboxy-terminal half of ALS2, binds to Rab5 and modulates endosome dynamics, *FEBS letters* 575 (2004) 64-70.
- [45] X. Zhang, X. He, X.Y. Fu, Z. Chang, Varp is a Rab21 guanine nucleotide exchange factor and regulates endosome dynamics, *Journal of cell science* 119 (2006) 1053-1062.
- [46] S. Yoshimura, A. Gerondopoulos, A. Linford, D.J. Rigden, F.A. Barr, Family-wide characterization of the DENN domain Rab GDP-GTP exchange factors, *The Journal of cell biology* 191 (2010) 367-381.
- [47] N. Bone, J.B. Millar, T. Toda, J. Armstrong, Regulated vacuole fusion and fission in *Schizosaccharomyces pombe*: an osmotic response dependent on MAP kinases, *Current biology : CB* 8 (1998) 135-144.
- [48] J. Hayles, V. Wood, L. Jeffery, K.L. Hoe, D.U. Kim, H.O. Park, S. Salas-Pino, C. Heinricher, P. Nurse, A genome-wide resource of cell cycle and cell shape genes of fission yeast, *Open biology* 3 (2013) 130053.
- [49] B.F. Horazdovsky, G.R. Busch, S.D. Emr, VPS21 encodes a rab5-like GTP binding protein that is required for the sorting of yeast vacuolar proteins, *The EMBO journal* 13 (1994) 1297-1309.
- [50] J. Blumer, J. Rey, L. Dehmelt, T. Mazel, Y.W. Wu, P. Bastiaens, R.S. Goody, A. Itzen, RabGEFs are a major determinant for specific Rab membrane targeting, *J Cell Biol* 200 (2013) 287-300.
- [51] K.M. Donaldson, H. Yin, N. Gekakis, F. Supek, C.A. Joazeiro, Ubiquitin signals protein trafficking via interaction with a novel ubiquitin binding domain in the membrane fusion regulator, *Vps9p*, *Current biology : CB* 13 (2003) 258-262.
- [52] S.C. Shih, G. Prag, S.A. Francis, M.A. Sutanto, J.H. Hurley, L. Hicke, A ubiquitin-binding motif required for intramolecular monoubiquitylation, the CUE domain, *The EMBO journal* 22 (2003) 1273-1281.
- [53] G. Prag, S. Misra, E.A. Jones, R. Ghirlando, B.A. Davies, B.F. Horazdovsky, J.H. Hurley, Mechanism of ubiquitin recognition by the CUE domain of *Vps9p*, *Cell* 113 (2003) 609-620.
- [54] B.A. Davies, J.D. Topp, A.J. Sfeir, D.J. Katzmann, D.S. Carney, G.G. Tall, A.S. Friedberg, L. Deng, Z. Chen, B.F. Horazdovsky, *Vps9p* CUE domain ubiquitin binding is required for efficient endocytic protein traffic, *The Journal of biological chemistry* 278 (2003) 19826-19833.
- [55] T. Keren-Kaplan, I. Attali, K. Motamedchaboki, B.A. Davis, N. Tanner, Y. Reshef, E. Laudon, M. Kolot, O. Levin-Kravets, O. Kleinfeld, M. Glickman, B.F. Horazdovsky, D.A. Wolf, G. Prag, Synthetic biology approach to reconstituting the ubiquitylation cascade in bacteria, *The EMBO journal* 31 (2012) 378-390.
- [56] A. Simonsen, R. Lippe, S. Christoforidis, J.M. Gaullier, A. Brech, J. Callaghan, B.H. Toh, C. Murphy, M. Zerial, H. Stenmark, EEA1 links PI(3)K function to Rab5 regulation of endosome fusion, *Nature* 394 (1998) 494-498.

- [57] H. Stenmark, R. Aasland, B.H. Toh, A. D'Arrigo, Endosomal localization of the autoantigen EEA1 is mediated by a zinc-binding FYVE finger, *The Journal of biological chemistry* 271 (1996) 24048-24054.
- [58] V. Patki, D.C. Lawe, S. Corvera, J.V. Virbasius, A. Chawla, A functional PtdIns(3)P-binding motif, *Nature* 394 (1998) 433-434.
- [59] E. Nielsen, S. Christoforidis, S. Uttenweiler-Joseph, M. Miaczynska, F. Dewitte, M. Wilm, B. Hoflack, M. Zerial, Rabenosyn-5, a novel Rab5 effector, is complexed with hVPS45 and recruited to endosomes through a FYVE finger domain, *The Journal of cell biology* 151 (2000) 601-612.
- [60] H.A. Morrison, H. Dionne, T.E. Rusten, A. Brech, W.W. Fisher, B.D. Pfeiffer, S.E. Celniker, H. Stenmark, D. Bilder, Regulation of early endosomal entry by the *Drosophila* tumor suppressors Rabenosyn and Vps45, *Molecular biology of the cell* 19 (2008) 4167-4176.
- [61] G.G. Tall, H. Hama, D.B. DeWald, B.F. Horazdovsky, The phosphatidylinositol 3-phosphate binding protein Vac1p interacts with a Rab GTPase and a Sec1p homologue to facilitate vesicle-mediated vacuolar protein sorting, *Molecular biology of the cell* 10 (1999) 1873-1889.
- [62] L.S. Weisman, S.D. Emr, W.T. Wickner, Mutants of *Saccharomyces cerevisiae* that block intervacuole vesicular traffic and vacuole division and segregation, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87 (1990) 1076-1080.
- [63] J.M. Kinchen, K.S. Ravichandran, Identification of two evolutionarily conserved genes regulating processing of engulfed apoptotic cells, *Nature* 464 (2010) 778-782.
- [64] M. Nordmann, M. Cabrera, A. Perz, C. Brocker, C. Ostrowicz, S. Engelbrecht-Vandre, C. Ungermann, The Mon1-Ccz1 complex is the GEF of the late endosomal Rab7 homolog Ypt7, *Current biology : CB* 20 (2010) 1654-1659.
- [65] K. Meiling-Wesse, H. Barth, C. Voss, G. Barmark, E. Muren, H. Ronne, M. Thumm, Yeast Mon1p/Aut12p functions in vacuolar fusion of autophagosomes and cvt-vesicles, *FEBS Lett* 530 (2002) 174-180.
- [66] K. Meiling-Wesse, H. Barth, M. Thumm, Ccz1p/Aut11p/Cvt16p is essential for autophagy and the cvt pathway, *FEBS Lett* 526 (2002) 71-76.
- [67] K. Ebine, T. Inoue, J. Ito, E. Ito, T. Uemura, T. Goh, H. Abe, K. Sato, A. Nakano, T. Ueda, Plant vacuolar trafficking occurs through distinctly regulated pathways, *Curr Biol* 24 (2014) 1375-1382.
- [68] S. Christoforidis, M. Miaczynska, K. Ashman, M. Wilm, L. Zhao, S.C. Yip, M.D. Waterfield, J.M. Backer, M. Zerial, Phosphatidylinositol-3-OH kinases are Rab5 effectors, *Nature cell biology* 1 (1999) 249-252.
- [69] H.W. Shin, M. Hayashi, S. Christoforidis, S. Lacas-Gervais, S. Hoepfner, M.R. Wenk, J. Modregger, S. Uttenweiler-Joseph, M. Wilm, A. Nystuen, W.N. Frankel, M. Solimena, P. De Camilli, M. Zerial, An enzymatic cascade of Rab5 effectors regulates phosphoinositide turnover in the endocytic pathway, *J Cell Biol* 170 (2005) 607-618.
- [70] T. Iwaki, F. Osawa, M. Onishi, T. Koga, Y. Fujita, A. Hosomi, N. Tanaka, Y. Fukui, K. Takegawa,

- Characterization of vps33+, a gene required for vacuolar biogenesis and protein sorting in *Schizosaccharomyces pombe*, *Yeast* 20 (2003) 845-855.
- [71] K. Takegawa, T. Iwaki, Y. Fujita, T. Morita, A. Hosomi, N. Tanaka, Vesicle-mediated protein transport pathways to the vacuole in *Schizosaccharomyces pombe*, *Cell structure and function* 28 (2003) 399-417.
- [72] M. Morishita, F. Morimoto, K. Kitamura, T. Koga, Y. Fukui, H. Maekawa, I. Yamashita, C. Shimoda, Phosphatidylinositol 3-phosphate 5-kinase is required for the cellular response to nutritional starvation and mating pheromone signals in *Schizosaccharomyces pombe*, *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* 7 (2002) 199-215.
- [73] T. Iwaki, T. Goa, N. Tanaka, K. Takegawa, Characterization of *Schizosaccharomyces pombe* mutants defective in vacuolar acidification and protein sorting, *Mol Genet Genomics* 271 (2004) 197-207.
- [74] T. Iwaki, N. Tanaka, H. Takagi, Y. Giga-Hama, K. Takegawa, Characterization of end4+, a gene required for endocytosis in *Schizosaccharomyces pombe*, *Yeast* 21 (2004) 867-881.
- [75] J. Kashiwazaki, T. Iwaki, K. Takegawa, C. Shimoda, T. Nakamura, Two fission yeast rab7 homologs, ypt7 and ypt71, play antagonistic roles in the regulation of vacuolar morphology, *Traffic* 10 (2009) 912-924.
- [76] A. Hosomi, M. Nakase, K. Takegawa, *Schizosaccharomyces pombe* Pep12p is required for vacuolar protein transport and vacuolar homotypic fusion, *Journal of bioscience and bioengineering* 112 (2011) 309-314.
- [77] C.G. Burd, M. Peterson, C.R. Cowles, S.D. Emr, A novel Sec18p/NSF-dependent complex required for Golgi-to-endosome transport in yeast, *Molecular biology of the cell* 8 (1997) 1089-1104.
- [78] M. Miyatake, T. Kuno, A. Kita, K. Katsura, K. Takegawa, S. Uno, T. Nabata, R. Sugiura, Valproic acid affects membrane trafficking and cell-wall integrity in fission yeast, *Genetics* 175 (2007) 1695-1705.
- [79] K. Peplowska, D.F. Markgraf, C.W. Ostrowicz, G. Bange, C. Ungermann, The CORVET tethering complex interacts with the yeast Rab5 homolog Vps21 and is involved in endo-lysosomal biogenesis, *Dev Cell* 12 (2007) 739-750.
- [80] A.L. Paulsel, A.J. Merz, D.P. Nickerson, Vps9 Family Protein Muk1 Is the Second Rab5 Guanosine Nucleotide Exchange Factor in Budding Yeast, *The Journal of biological chemistry* 288 (2013) 18162-18171.
- [81] 辻裕美, 分裂酵母 Vps901、Vps902 の機能解析, 神戸大学大学院理学研究科生物学専攻 修士学位論文 (2009).
- [82] K. Okazaki, N. Okazaki, K. Kume, S. Jinno, K. Tanaka, H. Okayama, High-frequency transformation method and library transducing vectors for cloning mammalian cDNAs by trans-complementation of *Schizosaccharomyces pombe*, *Nucleic Acids Res* 18 (1990) 6485-6489.
- [83] T.A. Vida, S.D. Emr, A new vital stain for visualizing vacuolar membrane dynamics and

endocytosis in yeast, *The Journal of cell biology* 128 (1995) 779-792.

- [84] 松田智, VPS9 ドメインをコードする遺伝子の分裂酵母細胞における働き, 神戸大学大学院自然科学研究科生物学専攻 修士学位論文 (2007).