



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。



(別紙様式3)

塚本： NO.1

論文内容の要旨

氏名 塚本雄太

専攻 生物学専攻

論文題目 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

指導教員 宮本 昌明 准教授

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

塚本： NO.2

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、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考えられる 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。

氏名	塚本雄太		
論文題目	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		
審査委員	区分	職名	氏名
	主査	准教授	宮本昌明
	副査	教授	前川昌平
	副査	教授	三村徹郎
	副査	教授	菅澤薫
要 旨			
<p>真核生物の細胞増殖の制御、形態形成や運動の制御、細胞内膜輸送制御、核輸送制御に関わるシグナル伝達経路において、低分子量 G タンパク質が中心的な役割を果たしていることが知られている。低分子量 G タンパク質は、アミノ酸配列が高度に保存された巨大なファミリーを形成し、その構造の類似性の分類から、いくつかのサブファミリーによって構成される。しかもそれぞれのサブファミリーは特定の細胞機能を持つとされ、例えば Ras サブファミリーは細胞の増殖制御に、Rho サブファミリーは細胞の形態形成や運動の制御に、Rab サブファミリーは細胞内膜輸送の制御に、Ran サブファミリーは核輸送制御の制御を行っている。これらの低分子量 G タンパク質はグアニンヌクレオチドを結合し、普段の活性のない状態 (OFF) では GDP が結合され、活性化された状態 (ON) では GTP が結合されて、ON と OFF をくり返すことにより、いわばシグナル伝達の「分子スイッチ」として働いている。低分子量 G タンパク質を活性化する因子としては、グアニンヌクレオチド交換因子 (Guanine nucleotide exchange factor: GEF) が知られており、G タンパク質に結合した GDP を GTP に交換することによって G タンパク質を活性化状態にしている。特定の低分子量 G タンパク質サブファミリーには特定の GEF が存在することが知られているが、G タンパク質サブファミリー、GEF とともに複数がゲノム上にコードされていて、多彩な細胞機能において、どの G タンパク質がどの GEF によって活性化され、その結果としてどのような下流因子 (エフェクター因子) にシグナルが伝わり細胞の応答につながっているのかは、いまだその詳細が明らかになっていない。本論文は、単純なモデル生物として分裂酵母を用い、エンドサイトーシスをはじめとする細胞内膜輸送経路を制御すると考えられる Rab5 (分裂酵母では Ypt5) を中心として、その活性化因子の候補である Vps901 と Vps902、下流因子の候補である Pep7 と Aut12 との細胞内シグナル伝達経路における関係を明らかにしたものである。</p> <p>本論文は、第1章の Ypt5 に関する機能解析、第2章の Ypt5 活性化因子候補である Vps901、Vps902 に関する機能解析、第3章の Ypt5 下流因子候補である Pep7、Aut12 に関する機能解析の全3章、及び総括で構成されている。</p> <p>第1章では、ypt5 突然変異体である ypt5-909 細胞の表現型を詳しく調べることによって、分裂酵母に唯一存在する Rab5 である Ypt5 の細胞内シグナル伝達経路における役割を明らかにしている。ypt5-909 細胞の表現型解析によって、Ypt5 は高濃度の Mn²⁺、Cu²⁺、Zn²⁺イオンストレスに対する応答、液胞タン</p>			

氏名	塚本雄太
<p>パク質輸送の制御、細胞形態の制御に重要な役割を果たしていることが分かった。特に細胞形態の制御においては、細胞骨格であるアクチン再構成制御に関与することを明らかにした。分裂酵母細胞は棒状の形態をしているが、長軸方向に沿って細胞が成長する。成長端にはアクチンパッチと呼ばれる構造が形成されるが、このアクチンパッチの形成に Ypt5 が重要な役割を果たすことを明らかにした。このことは細胞内膜輸送制御に関わる Rab5 が、アクチン細胞骨格系を介して細胞の形態制御にも関与することを初めて示した点で重要である。また、蛍光タンパク質を用いた細胞内局在解析から、Ypt5 は液胞膜上に存在することによって機能を発揮できることが <i>ypt5-909</i> 細胞を用いた観察によって分かった。</p>	
<p>第2章では、Ypt5 の活性化因子と考えられる GEF である Vps901 と Vps902 の Ypt5 を介したシグナル伝達経路における関係を、主に変異体を作成し、表現型を調べることによって解析した。Rab5 を活性化する因子に共通に見られるのが VPS9 ドメインであり、分裂酵母には VPS9 ドメインをコードする遺伝子は、Vps901 と Vps902 の2つのみがゲノム上、知られている。これらの遺伝子変異株や二重変異株を作成し、それぞれの表現型を <i>ypt5</i> 変異株の表現型と比較することによって明らかにした。Vps901 は栄養（窒素）源枯渇によって誘導される細胞の接合と胞子形成、カルシウムなどのイオンストレス応答などに主に働いていることが判明したが、細胞の増殖制御、形態制御、ナトリウムイオンやコバルトイオン、マンガニオンなどのイオンストレス応答、液胞の形成においては Vps901 と Vps902 が協調して働いていることが明らかになった。2つの異なる蛍光タンパク質を用いた局在解析から、Vps901、Vps902、Ypt5 がそれぞれ相互に共局在する膜小胞が観察され、細胞内空間において動的にこれらの因子が共局在することによってシグナルを伝えることを初めて明らかにした。</p>	
<p>第3章では、Ypt5 の下流因子と考えられる Pep7 と Aut12 の Ypt5 を介したシグナル伝達経路における関係を、主に変異体を作成し、その表現型を調べることによって解析した。変異体解析の結果、Pep7、Aut12 は、栄養（窒素）源枯渇によって誘導される性分化、イオンストレス応答、液胞タンパク質の輸送、液胞の形態形成において、それぞれ異なる関与の仕方をしている、即ち Ypt5 からのシグナルを分け合っていて受けていることが強く示唆された。またこれらの下流因子の局在は Ypt5 依存的であり、Ypt5 からのシグナルを受ける仕組みについて考察するにあたって示唆に富む結果を得ている。</p>	
<p>総括においては、第1章から第3章までの結果をふまえ、Vps901、Vps902 から Ypt5、そして Pep7、Aut12 にいたるシグナル伝達経路についてまとめた。Vps901 と Vps902 は協調して Ypt5 を活性化し、Ypt5 からのシグナルは Pep7 と Aut12 に異なる機構で異なるシグナルとして伝わり細胞の形態形成、性分化過程、ストレス応答、液胞形態形成の制御を行っていることが判明した。</p>	
<p>以上のように、本研究は、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経路について、関わる上流活性化因子、下流因子との関係を分子遺伝学的、細胞生物学的な手法を用いて研究したものであり、多様な細胞機能に関わるシグナル伝達経路におけるそれぞれの因子の役割と関係について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、学位申請者の塚本雄太は、博士(理学)の学位を得る資格があると認める。</p>	