

酵母のオルガネラサイズ制御機構の解析

久米 一規

広島大学大学院 統合生命科学研究科

研究の目的

膜型オルガネラ（以下、オルガネラ）は真核生物の細胞内で膜により区画化され、適切な大きさ（サイズ）で存在している。真核細胞はオルガネラを持つことで複雑な細胞機能の発現を可能にしていると考えられているが、オルガネラの構造変化と細胞機能との関連性については不明な点が多い。本研究では、分裂酵母を真核生物のモデルとして用いて、オルガネラサイズ制御機構の解明と当該機構の破綻による細胞機能への影響を調べることを目的としている。我々は、オルガネラの一つである核のサイズ制御機構を明らかにするために、これまでに分裂酵母を用いて、核サイズ異常変異体の機能解析を進めてきた^{1),2)}。そして、核が肥大化する変異体において、核サイズの異常に加えて、核以外のオルガネラ構造にも異常がみられることがわかってきた。そこで本研究では、核サイズ異常変異体における核と核以外のオルガネラに着目した解析を行い、複数オルガネラ間で形成されるオルガネラサイズ制御機構の実体解明を目指した。さらに、オルガネラサイズ制御の破綻による細胞機能への影響を明らかにするために、複数のオルガネラサイズが異常になる変異体を用いて、オルガネラサイズの異常が遺伝子発現や細胞増殖に与える影響を調べた。

方法

1. 生細胞でのオルガネラ観察と画像解析

核を蛍光タンパク質で標識した株（核膜に局在するタンパク質 Cut11 に GFP もしくは mCherry を融合した株）に各種オルガネラを特異的に染色する蛍光プローブを用いて、核と核以外のオルガネラを可視化した生細胞を光学顕微鏡で観察した。オルガネラ構造の解析には、Image J（フリーソフト）を用いた。蛍光プローブでの染色がうまくいかなかったオルガネラについては、オルガネラに特異的に局在するタンパク質に蛍光タンパク質（GFP もしくは mCherry）を融合した株を構築して観察に用いた。

2. 遺伝子発現解析および細胞増殖の検定

遺伝子発現解析は、対数増殖期の細胞から抽出した RNA を用いて、RNA-seq 解析により行った。細胞増殖の検定は、寒天培地上でのスポットアッセイにより行った。各種阻害剤として、DNA 合成阻害剤、DNA 複製阻害剤、タンパク質合成阻害剤、脂質合成阻害剤を使用した。酵母細胞の菌体数を 5×10^6 cells/ml になるように滅菌水に懸濁して、酵母エキスを含む合成培地上にスポットした。その後、25~36°C の異なる温度にて生育を評価した。

結果

1. オルガネラサイズ制御機構の解析

生細胞の核と核以外のオルガネラ構造を比較するために、核と核以外の主要なオルガネラ（脂肪滴、液胞、ミトコンドリア、小胞体）の一つを異なる蛍光にて同細胞内で可視化する条件を探索した。市販の蛍光プローブを試した結果、脂肪滴（BODIPY / Thermo Fisher Scientific）、液胞（FM4-64 / Thermo Fisher Scientific）、ミトコンドリア（MitoTracker / Thermo Fisher Scientific）それぞれを特異的に染色する各プローブが核との同時観察に有効であることがわかった。小胞体については、蛍光プローブ（ER-Tracker / Thermo Fisher Scientific）のシグナルが弱かったことから、小胞体に局在するタンパク質に蛍光タンパク質を融合した株を構築した。小胞体に局在する複数のタンパク質（Sec63、Elo2、Rtn1 など）について検討したところ、Elo2（Fatty acid elongase）に蛍光タンパク質を融合した株が核と小胞体の同時観察に有効であることがわかった。

上記の条件を用いて、野生株と核が肥大化する核サイズ変異体^{1),2)}における核と核以外のオルガネラの観察を行った。その結果、複数の核サイズ変異体において、野生株と比較して、液胞および脂肪滴の構造に違いがみられることがわかった。液胞については、核サイズ変異体の液胞サイズが、野生株の液胞サイズよりも約 1/2 程度に減少していた。脂肪滴については、脂肪滴のサイズに変化はみられなかったが、核サイズ変異体の細胞内の脂肪滴の数が、野生株の脂肪滴の数よりも減少していた。これらのことから、オルガネラ間のサイズ制御において、核と液胞、核と脂肪滴が機能関連することが示唆された。核と脂肪滴の関係について検証するために、核が肥大化する核サイズ変異体において、脂肪滴（貯蔵脂質）から構造脂質に変換する遺伝子を破壊した際の核サイズへの影響を調べた。その結果、二重変異体において、核肥大化が部分的に抑圧された。現在、液胞について同様の検証を進めている。

2. オルガネラサイズ制御の破綻による細胞機能への影響

これまでに選抜した核サイズ変異体の中から、複数のオルガネラでサイズ異常が観察される変異体を用いて、各種阻害剤を含む寒天培地上での生育を調べた。その結果、核が肥大化する核サイズ変異体は野生株と比較して、タンパク質合成阻害剤の存在下において、強い増殖悪化を示すことがわかった。次に、阻害剤存在下において最も顕著な増殖悪化を示した核サイズ変異体を用いて、遺伝子発現解析を行った。その結果、核サイズ変異体では野生株と比較して、発現が上昇、下降する遺伝子がそれぞれ 434、281 確認できた。これらの遺伝子について GO 解析を行った結果、発現が低下した遺伝子群の中には、転写や翻訳に関わる複数の遺伝子が含まれていることがわかった。今後、得られた結果をもとにして、オルガネラサイズ制御の破綻とこれらの表現型との関連性について詳細な解析を進める予定である。

結論

核が肥大化する核サイズ変異体では、核以外のオルガネラ（脂肪滴と液胞）の構造（サイズと数）に異常を示すことがわかった。この結果から、複数のオルガネラ間におけるサイズ制御機構の存在が示唆された。また、オルガネラサイズ制御が破綻した細胞は、転写や翻訳に関わる遺伝子群の発現変動を示すこと、タンパク質合成阻害剤に強い感受性を示すことがわかった。今後、これらの表現型とオルガネラサイズ制御の破綻との関連性について解析を進める予定である。

文献

- 1) Kume, K., Cantwell, H., Neumann, F.R., Jones, A.W., Snijders, A.P., and Nurse, P., (2017) A systematic genomic screen implicates nucleocytoplasmic transport and membrane growth in nuclear size control. *PLoS Genet.* 13(5)*e1006767.
- 2) Kume, K., Cantwell, H., Burrell, A., and Nurse, P., (2019) Nuclear membrane protein Lem2 regulates nuclear size through membrane flow. *Nat. Commun.* 10(1):1871.