

平成 30 年度「地神芳文記念研究助成」

成果報告要旨

研究題目： オプトジェネティクスを用いた分裂酵母の細胞周期操作

研究者： 後藤祐平

所属： 基礎生物学研究所

細胞機能を人為的に操作して摂動を与えることは近代の生物学の基本的な手法であり、温度感受性変異などの遺伝学的手法や、薬剤による機能阻害など多種多様な方法が開発され用いられてきた。しかし、これらの手法はいずれも時間分解能や空間分解能、可逆性が低く、数秒で起こるような速い生物現象や、1細胞ごとにばらつきがあるような現象、また、摂動からの変遷を経時的に追ったりする解析には不十分であった。

光遺伝学 (Optogenetics) は光受容タンパク質を用いて細胞機能を操作する技術の総称であり、その高い時間分解能 (数ミリ秒～数秒)、可逆性、空間分解能などの利点から神経科学の分野で 2000 年代初頭から発展してきた。近年、細胞内シグナル伝達を光操作する手法も続々と発表されてきている。本研究では、高等植物がもつファイトクロム B (PhyB) に着目した。PhyB は赤色光 (630 nm) で活性化し Phytochrome Interacting Factor (PIF) と瞬時に結合し、また、近赤外光 (730 nm) の光で素早く解離する。現在発見されている光遺伝学ツールで唯一高速の可逆的操作が可能であり、赤色光を用いるために GFP 蛍光観察などの青や緑の光を用いる顕微鏡観察との相性が良い。

しかし、PhyB は光受容のためにフィコシアノビルリン (PCB) とよばれるテトラピロール発色団を必要とし、酵母はこれを生合成しない。そこで、本研究ではシアノバクテリアの PCB 生合成に関与する 4 つの遺伝子 HO1, PcyA, Fd そして Fnr を分裂酵母で発現させることで、分裂酵母細胞内でヘムから PCB を生合成し、PhyB を駆動させることに成功した。この PhyB を用いて細胞周期の制御を試みた。細胞周期チェックポイント機構のひとつであるスピンドル形成チェックポイント (SAC) の構成因子を PhyB-PIF により強制的に活性化させることで、赤色光と近赤外光により細胞周期を任意に ON/OFF することに成功し、この光駆動型の SAC を Opto-SAC と名付けた。Opto-SAC により活性化させた細胞を経時的に観察すると、細胞周期進行は抑えられているものの徐々に隔壁形成がおこり染色体が分離しないまま細胞質分裂がおこる表現型 (Cut) が見られた。おそらく、細胞質分裂は細胞周期チェックポイントとは独立にタイマーによって制御されていることが示唆される。最後に、光遺伝学の応用可能性についても議論したい。

平成 30 年度「地神芳文記念研究助成」

成果報告要旨

研究題目： 核膜と小胞体を構造的に分離・維持する分子基盤の解析

研究者： 平野 泰弘

所属： 大阪大学大学院生命機能研究科

核膜は二層の脂質二重膜（内膜、外膜）からなる膜構造で、外膜は小胞体と連続している。核膜と小胞体にはそれぞれ特異的に局在するタンパク質群が存在し、かつ機能も異なることから、核膜と小胞体を構造的・機能的に分離する機構が存在すると考えられているが、その実態については未解明な部分が多い。私は、核膜タンパク質 Lem2 と小胞体膜タンパク質 Lnp1 の二重破壊分裂酵母株では核膜近傍に異常発達した膜構造が現れ、非常に強い生育阻害が起こること、核膜タンパク質が核膜に留まらず小胞体にも分散してしまうことを見出しており、本研究では Lem2-Lnp1 が核膜と小胞体を分離・維持する分子機構の解析を行った。まず、異常膜構造の表現型を回復させる遺伝子群をマルチコピーサプレッサースクリーニングにより探索し、小胞体膜タンパク質 Apq12 を同定した。apq12 は lem2 との二重破壊で異常膜構造を引き起こしたが、lnp1 との二重破壊では膜構造の異常は認められなかったことから、Lnp1 の機能を相補することが分かった。Apq12 と Lem2 はそれぞれエンドソーム腔内小胞形成、細胞質分裂など、様々な膜分裂の最終過程に関与する endosomal sorting complex required for transport (ESCRT) -III 複合体構成タンパク質や ESCRT-III 複合体の解離と膜分裂を引き起こす AAA-ATPase の Vps4 と遺伝的相互作用を持つことが報告されていた。そこで、Lem2-Lnp1 とこれら因子との遺伝的関連を調べたところ、Vps4 の過剰発現で生育阻害が緩和されたことから、lem2lnp1 二重破壊では Vps4 の活性が低下し、ESCRT-III 複合体が壊されずに活性状態に維持されたため、膜分裂が完了せず、異常膜構造が生じたと考えられた。そこで、ESCRT-III 複合体構成タンパク質と Vps4 の細胞内局在を観察したところ、野生型では ESCRT-III 複合体と Vps4 はよく共局在したが、lem2lnp1 二重破壊では Vps4 は ESCRT-III 複合体と共局在しなかった。lem2lnp1 二重破壊株に Apq12 を過剰発現させると Vps4 と ESCRT-III 複合体の共局在が回復したことから、Lem2-Lnp1-Apq12 は協調して Vps4 を ESCRT-III 複合体に集積させ、ESCRT-III 複合体の機能調節を行うことで、核膜-小胞体の構造維持を行っていることが示唆された。