

## 分裂酵母形態形成変異株 *las11* の原因遺伝子の同定

新井 冬結 (筑波大学生物学類) 指導教員: 中野 賢太郎 (筑波大学生命環境系)

### 背景・目的

生物の組織や器官を形成する細胞は、それぞれ特有の形状をとる。細胞の形は機能と密接に関係するため、細胞がその形状を決める仕組みの解明は、細胞生物学の大切な課題の1つである。細胞が形状を決める上で、細胞内に極性が生じる必要がある。その形成を制御し維持することは、生物が生命活動を行う上で重要である。ヒトにおいても細胞の極性形成の異常によって、様々な病気が引き起こされることが知られている。

本研究で用いた分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* は、円筒形の形状を呈する細胞である。分裂酵母は、細胞の長軸に沿った細胞極性を有し、その細胞端に細胞壁合成酵素や小胞等を局在化し、細胞が伸長する(図1)。一定の長さになると核分裂を引き起こし、続いて細胞中央に隔壁をつくり、2つの娘細胞に分裂する。これらの細胞成長と分裂が規則正しく行われることから、分裂酵母は細胞の極性形成や形態形成の分子機構を研究するためのモデル生物として広く知られている。

これまでに分裂酵母の分子遺伝学的研究により、いくつかの細胞極性の制御に関わる遺伝子が同定されている。例えば、分裂酵母の *orb6* は、細胞形態が球状になってしまう変異体である。その原因遺伝子がコードする Orb6 はタンパク質キナーゼであり、アクチン細胞骨格を細胞の先端に局在させることで細胞領域を規定し、エキソサイトーシスに関わる膜関連タンパク質や細胞壁合成酵素の輸送を促進することで細胞の伸長成長を制御すると考えられている。この研究成果は、分裂酵母の形態形成変異株の原因遺伝子の同定とその機能解析が、形態形成のメカニズムを解明する重要なアプローチとなることを示している。分裂酵母には、*orb6* 変異体の他にも、レモンのような形態を示す変異体や細胞体が屈曲する変異株など、様々な細胞形態の異常な変異株が存在する。

私が所属する研究室では、以前に細胞形態が球状になる *las11* という変異体が単離されている(図2)。*las11* は、野生株をニトロソグアニジンで処理し、変異を誘発した細胞の集団から、アクチン重合阻害剤(ラトランキュリン A)に対して超感受性を示す変異株として得られた株である。その原因遺伝子や形態異常を示す原因については未だ解明されていない。そこで私は、*las11* の原因遺伝子の表現型の解析を進めた。

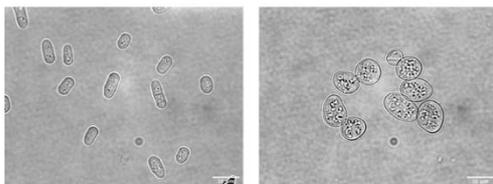


図2 野生株(左)および *las11*(右)の明視野画像

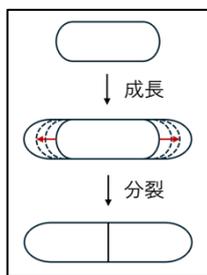


図1 分裂酵母の形状と成長パターン

雑実験を行った。分裂酵母には *h1* と *h2* という接合型があり、それらを栄養飢餓下に置くと、異なる接合型の細胞同士が接合し、減数分裂を経て4つの胞子を形成する。その過程で遺伝子の組換えが起きる。注目している遺伝子とマーカー遺伝子が連鎖していなければ、親株とは異なる遺伝子の組み合わせを持つ胞子が50%の確率で生じる。逆にこれらの遺伝子が完全に連鎖していれば、親株と同じ遺伝子の組み合わせの胞子だけができる。このことを利用し、胞子の遺伝子型の分離比を確認して遺伝子間の連鎖の程度を調べ、マーカー遺伝子に対する目的の遺伝子間の物理的距離を推測することを目指した。

MEA培地上で親株となる2種類の細胞株(*las11* と目的のマーカー遺伝子を持つ細胞)を混合し、30°Cで一晩培養した後、顕微鏡を用いて十分に接合したことを確認した。その数日後に、接合した細胞から生じた胞子嚢をβ-Glucuronidaseで処理し、細胞壁を破壊し胞子を取り出した。さらにエタノールを最終濃度30%になるように加えることで残存している親細胞を死滅させ、YE培地上に胞子を播種した。25°Cで5~6日間培養し、胞子が発芽して形成されたコロニーを複数単離した。そして各コロニーの表現型を確認し、遺伝子型の分離比を調べた。

### ② 表現型の解析

野生株と *las11* を25°Cと37°C(3時間及び一晩)で培養した細胞について、隔壁およびアクチン繊維を染色し、蛍光顕微鏡で観察した。ホルマリン固定液で細胞を固定し、PBSで細胞を洗浄した後、隔壁にはカルコフルオールを、アクチン繊維には蛍光ファロイジンをを用いて染色し、蛍光顕微鏡で観察した。

### 結果・考察

#### ① ランダムスポア解析による原因遺伝子の同定

*las11(las11<sup>+</sup>ade6M216 leu1-32)* と JY336(*las11<sup>+</sup>ade6M210 leu1-32*) の接合により、第3染色体上にある *ade6* と *las11* が連鎖しているか否かを調べた。胞子の表現型から推察される遺伝子型の分離比は表1のようになった。

表1 *las11* と *ade6* の分離比

子の遺伝子型	1回目	2回目
	コロニーの数と割合	コロニーの数と割合
<i>las11<sup>+</sup>ade6M210 leu1-32</i>	59個(49.2%)	49個(40.8%)
<i>las11<sup>+</sup>ade6M216 leu1-32</i>	15個(12.5%)	9個(7.5%)
<i>las11<sup>-</sup>ade6M210 leu1-32</i>	7個(5.8%)	4個(3.3%)
<i>las11<sup>-</sup>ade6M216 leu1-32</i>	39個(32.5%)	58個(48.3%)

親株とは異なる遺伝子型の胞子が全体の約11~18%できたことから、*las11* は *ade6* と連鎖しており、第3染色体上に存在する可能性が高いと考えられる。今後、第3染色体上に存在する他のマーカー遺伝子を用いて交雑実験を行い、遺伝子座の位置をさらに絞り込んでいく計画である。

#### ② 表現型の解析

隔壁およびアクチン繊維について、現在観察を続けている。

### 方法

#### ① ランダムスポア解析による原因遺伝子の同定

分裂酵母の変異体の原因遺伝子を同定する方法として、原因遺伝子が染色体のどこに存在しているかを決定するために、細胞の交