

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	出芽酵母細胞分裂時のタンパク質分配の研究
Title(English)	
著者(和文)	杉山伸樹
Author(English)	Shinju Sugiyama
出典(和文)	学位:博士(理学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第11223号, 授与年月日:2019年6月30日, 学位の種別:課程博士, 審査員:伊藤 武彦,徳永 万喜洋,山口 雄輝,川上 厚志,立花 和則,田中 元雅
Citation(English)	Degree:Doctor (Science), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第11223号, Conferred date:2019/6/30, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Type(English)	Doctoral Thesis

博士学位論文

出芽酵母細胞分裂時のタンパク質分配の研究

東京工業大学 生命理工学院 生命理工学系

生命理工学コース

博士後期課程

杉山 伸樹

目次

要旨.....	2
1 章 序論	4
2 章 材料・方法	10
3 章 出芽酵母の既存・新生タンパク質分配のプロテオーム解析	27
背景	27
結果	27
考察	33
4 章 小胞体-細胞膜接触部位タンパク質の不均衡分配機構	37
背景	37
結果	38
考察	45
5 章 細胞膜結合タンパク質 Num1 の不均等分配機構と機能	50
背景	50
結果	52
考察	55
6 章 細胞膜 t-SNARE タンパク質 Sso1 の均等分配機構と機能	58
背景	58
結果	59
考察	63
7 章 結論	66
図表.....	68
参考文献	102
謝辞.....	114

要旨

出芽酵母は、母細胞から芽が出芽し、それが成長して細胞質分裂を経ることで娘細胞になるという非常に偏りの大きい細胞分裂を行う。この際、母細胞と娘細胞（芽）の間で、様々な生体分子やオルガネラが非対称に分布し、細胞極性や細胞老化、ストレス耐性などを制御することが知られている。また、この局在の偏りを形成する機構や、その機能には、高等真核生物の細胞内区画の形成や細胞極性生育、非対称分裂に保存されているものが多数存在する。しかし、出芽酵母の分裂時にどのようなドメインを持ったタンパク質が不均等に分配されるかはほとんど明らかになっておらず、タンパク質分配の機構や機能の解明の妨げとなっていた。そこで本研究では、出芽酵母の 1 回の細胞分裂における既存・新生タンパク質の分配を網羅的に解析することで、タンパク質分配の機構や機能について新たな知見を得ることを目指した。

既存・新生タンパク質を異なる安定同位体を含むアミノ酸で標識し、母細胞と娘細胞それぞれでの既存タンパク質比率を質量分析器で定量した。これによって、細胞壁タンパク質、細胞膜貫通タンパク質、小胞体膜貫通ドメインと細胞膜結合ドメインの両方を持つタンパク質が不均等に分配されやすいことが明らかになった。小胞体膜貫通ドメインか細胞膜結合ドメインの片方だけを持つ小胞体-細胞膜接触部位タンパク質は均等に分配される傾向があったため、両方のドメインを持つことが小胞体-細胞膜接触部位タンパク質の不均等な分配を引き起こすことが示唆された。このことを元に、セプチンが、従来示唆されていた細胞膜や小

胞体膜の拡散障壁ではなく、細胞膜結合小胞体の分断によって、小胞体-細胞膜接触部位タンパク質の母細胞と芽の間の流出入を制限していることを明らかにした。

また、プロテオーム解析で、同じドメインを持つ他の大多数のタンパク質とは異なった分配を示すタンパク質を発見した。核やミトコンドリアの分配に関わる Num1 は、同定された膜貫通ドメインを持たない細胞膜タンパク質の中で唯一不均等に分配されることが示唆された。さらなる解析によって、既存タンパク質が不動な巨大構造体を形成し、新生タンパク質がアクチン依存的に芽に集積することで不均等に分配されることが明らかになった。さらに、既存 Num1 の不均等分配が、非発酵培地中でミトコンドリアを母細胞に留める役割があることが示唆された。

さらに、細胞膜 t-SNARE タンパク質の Sso1 は、パラログの Sso2 を含む多くの細胞膜貫通タンパク質が不均等に分配されたのに対して、均等に分配されることを発見した。これは、既存 Sso1 がエンドサイトーシスされた後にリサイクルされることで芽に移動するためであり、それによって芽での発現量が増え、エキソサイトーシスの効率が上昇することで偽菌糸形成時の細胞伸長が促進され、また細胞壁ストレス耐性が向上することが示唆された。

以上より、出芽酵母の細胞表面において既存・新生タンパク質の分配が多様な機構で制御され、多様な細胞機能を制御することを明らかにした。また、本論文での発見は、出芽酵母のみならず様々な真核生物の非対称分裂や細胞内区画化、細胞極性生育の研究に波及し、これまで説明の付かなかった生命現象や疾患の理解につながることを期待される。

1 章 序論

一部の生体分子やオルガネラが細胞内の特定の区画に偏って局在することがある。そのような局在の偏りは、神経細胞や上皮細胞などでの細胞内区画の形成、細胞の極性生育、減数分裂や分化・発生時の非対称分裂などを制御し、ガンや真菌症など様々な疾患に関わることが知られている (Campanale et al., 2017; Gonçalves and Pelletier, 2017; Neumuller and Knoblich, 2009; Riquelme et al., 2018; Sarto-Jackson and Tomaska, 2016)。従って、生体分子の偏りを形成・維持する機構や、その細胞機能への影響を明らかにすることは重要な研究課題である。

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は、そのような生体分子の局在の偏りの機構や機能を研究する際の優れたモデル生物である。出芽酵母は、母細胞から後に娘細胞になる芽が出芽するという非常に偏りの大きい細胞分裂を行う (Martin and Arkowitz, 2014)。この出芽の際には、Rho ファミリータンパク質の Cdc42 が出芽部位に蓄積し、対称性の破れを引き起こす (Martin and Arkowitz, 2014; Park and Bi, 2007)。Rho ファミリータンパク質によって決定された出芽部位からアクチンケーブルが伸び、分泌小胞がミオシンによって運搬されることで、細胞壁の再構築および細胞膜の拡張が行われる。また、芽には伝令リボ核酸 (messenger ribonucleic acid, mRNA) やタンパク質、染色体、オルガネラなどが拡散やモータータンパク質による輸送によって分配され、その後細胞質分裂を経て娘細胞となる (Knoblauch and Rachubinski, 2015)。さらに分裂後にも母細胞あるいは娘細胞に偏って局在する生体分子やオルガネラがあり、母細胞と娘細胞の間で分裂寿命やストレス耐性などの表現型に違いを生み出す (Higuchi-Sanabria et

al., 2014; Schneider et al., 2018)。

対称性の破れを引き起こし、母細胞と芽の間で生体分子やオルガネラを均等・不均等に分配する機構には、高等真核生物の細胞内区画の形成や、細胞極性形成、非対称分裂などに保存されているものが多数存在する (Neumuller and Knoblich, 2009; Sarto-Jackson and Tomaska, 2016)。また、出芽酵母は母細胞と娘細胞を形態や蛍光標識などによって容易に判別でき (Chin et al., 2008)、生体分子の局在の偏りが関わる生命現象を研究する上で、非常に有用なモデル生物である。

出芽酵母では様々な生体分子やオルガネラが不均等に分配されるが、その中でも以前の細胞周期から存在する既存タンパク質や新たに合成される新生タンパク質の母細胞と芽のいずれかへの不均等な分配が、多様な細胞機能を制御することが知られている。例えば、以前の細胞周期で作られた既存の紡錘極体の Nud1 は G1 期にリン酸化修飾を受けるが、G2 期に新たに合成される紡錘極体はリン酸化されないことが報告されている (Lengefeld et al., 2017) (図 3 A)。このリン酸化の有無が、既存の紡錘極体の芽への運搬と、新しく作られた紡錘極体の母細胞への滞留を制御し、核及び染色体の分配を引き起こす。また、以前の細胞周期で合成された既存の細胞膜上の輸送体は膜の流動性が小さいために拡散が遅く、母細胞に留まることが知られている (Eldakak et al., 2010; Singh et al., 2017) (図 3 B)。これによって、母細胞での輸送体の発現量が増えることで、分裂寿命が増減することが示唆されている (Eldakak et al., 2010; Henderson et al., 2014; Singh et al., 2017; Yang et al., 2015)。

また、出芽酵母の細胞分裂時には、母細胞と芽の間のくびれに局在するセプチンが、細胞膜や小胞体膜に局所的な拡散障壁を形成することで、一部の既存・新生膜タンパク質の不均等な分配を引き起こすことが示唆されている (Barral et al., 2000; Caudron and Barral, 2009; Takizawa et al., 2000) (図 4)。細胞膜や小胞体膜に拡散障壁が形成される機構は明らかになっていないが、セプチンや、セプチンと相互作用するタンパク質が膜脂質に結合することで、流動性の低い特定の脂質に富んだ膜マイクロドメインを形成するか、あるいは膜タンパク質と衝突することで拡散を制限する物理的障壁を形成するといった仮説が提唱されている (Faty et al., 2002) (図 4)。特に小胞体膜タンパク質のくびれでの流出入制限には、Bud1, Bud5, Bud6, Cdc24, Cdc42 などのタンパク質とスフィンゴ脂質が関わることから、Bud6 などが小胞体膜に結合し、スフィンゴ脂質に富んだドメインを形成することで、拡散障壁を形成することが示唆されている (Clay et al., 2014; Luedeke et al., 2005)。しかし、それらのタンパク質や脂質がセプチンと同じ経路で働いていることや、くびれに局所的に拡散障壁を形成していることを示す直接的な証拠はない。従って、セプチンがどのように膜タンパク質の不均等な分配を引き起こすのか、更なる解析が必要とされていた。

このように出芽酵母では様々な既存・新生タンパク質が不均等に分配されることが報告されているが、どのようなドメインを持つタンパク質が均等・不均等に分配されるかがほとんど明らかになっておらず、タンパク質分配の機構や機能の解明の妨げとなっていた。そこで、既存・新生タンパク質の分配を網羅的に解析し、タンパク質の分配を制御するドメインを発

見できれば、それがタンパク質分配の新規な機構や機能の解明につながることを期待された。

過去に、2つの研究が不均等に分配される既存・新生タンパク質の大規模な同定を報告している (Okada et al., 2017; Thayer et al., 2014)。Thayer らは、母細胞に蓄積する長寿命タンパク質を質量分析によって網羅的に同定した (Thayer et al., 2014)。この研究では、母細胞を回収するために細胞外部のタンパク質をビオチンによって標識した上で、前培養と異なる安定同位体で標識されたアミノ酸を含む培地中で約 18 回分裂させた。ビオチン標識された細胞を回収し、質量分析器で安定同位体の標識率からタンパク質ごとの古いタンパク質の比率を定量することで、分裂中に母細胞に留まり続ける長寿命タンパク質を同定した。質量分析の結果を蛍光顕微鏡観察で確認し、5 個の不均等分配されるタンパク質を発見した。しかし、この研究では約 18 回の細胞分裂の間に分解されない長寿命タンパク質のみが同定の対象となっており、1 回の細胞分裂でどのようなタンパク質が不均等に分配されるかは不明であった。

岡田らは、より短い細胞周期での既存・新生タンパク質分配のプロテオーム解析を行った (Okada et al., 2017)。細胞周期を同調し、細胞外部のタンパク質をビオチンで標識し、安定同位体標識アミノ酸を含む培地中で約 1 細胞周期の間培養した。ビオチン標識された母細胞と標識されていない娘細胞を分画し、それぞれ質量分析器で安定同位体標識アミノ酸残基の比率を定量することで、既存・新生タンパク質の比を求めた。これによって、14 個の新規候補を含む 21 個の不均等分配されるタンパク質候補を同定した。しかし、母細胞と娘細胞は分裂後に異なる遺伝子が発現することが知られており (Shepard et al., 2003)、母細胞と娘細胞を分

画する際にタンパク質合成・分解によって既存・新生タンパク質の割合が変化している可能性があった。また、これら 2 つの報告ではいずれも不均等分配される既存タンパク質の同定に注力しており、均等分配されるタンパク質と不均等分配されるタンパク質にどのような違いがあるかが不明であった。

そこで、本研究では出芽酵母の 1 細胞周期における既存・新生タンパク質の分配を網羅的に解析し、均等・不均等に分配されるタンパク質に共通した局在・ドメインを見つけることでタンパク質分配を制御する機構を解明し、さらにタンパク質分配の新規な機能を発見することを目指した。第 3 章では既存・新生タンパク質分配のプロテオーム解析を行った。従来手法とは異なり、母細胞と娘細胞の分画中のタンパク質合成・分解の影響をなくすために、細胞分裂直後にメタノール固定を行い、1 細胞周期での既存・新生タンパク質分配を網羅的に解析する手法を確立した。確立した手法によって、36 個の新規候補を含む 56 個の不均等分配されるタンパク質候補を同定した。さらに、均等・不均等分配されるタンパク質の局在およびドメインの解析から、細胞壁局在タンパク質、小胞体膜貫通ドメインと細胞膜結合ドメインの両方を持つタンパク質、細胞膜貫通ドメインを持つタンパク質の既存・新生タンパク質が不均等に分配される傾向があることを明らかにした。第 4 章ではその内、小胞体膜貫通ドメインと細胞膜結合ドメインを持つタンパク質に着目し、くびれに局在するセプチンが細胞膜結合小胞体を分断することによって芽・母細胞間での流出入を制限することを明らかにした。第 5 章では、膜貫通ドメインを持たないにも関わらず、不均等に分配された細胞膜結

合タンパク質の Num1 に注目した。既存 Num1 は不動態を形成することで母細胞に留まり、新生 Num1 がアクチン依存的に芽に局在することを明らかにした。また、既存 Num1 の不均等分配に、非発酵培地中でミトコンドリアを母細胞に留める役割があることが示唆された。第 6 章ではエンドサイトーシスを介したリサイクルが細胞膜貫通タンパク質 Sso1 の均等分配を引き起こすことを発見した。さらに、この Sso1 のリサイクルが偽菌糸形成時の細胞伸長と、細胞壁ストレス耐性を制御することを明らかにした。

2 章 材料・方法

出芽酵母株とプラスミド

使用した出芽酵母株とプラスミドはそれぞれ表 1 と 2 に示した。すべての出芽酵母株は、S288C 株に由来する。

培地

培地の組成は表 3~8 に示した。

固体培地には 2% アガロースを添加した。また、炭素源には培地の名前の最後に D が付いているものは 2% グルコースを、R が付いているものは 2% ラフィノースを、GR が付いているものは 2% ガラクトースと 2% ラフィノースを。Gly が付いているものは 3% グリセロールを用いた。

mSC 培地でのメチオニン要求性株 (*met15Δ*) の培養には、20 mg/L の L-メチオニン (ナカライテスク) を添加した。pRS315, pRS316 ベクターを持つ株の培養にはそれぞれ L-ロイシンまたはウラシルを除いた培地を用いた。質量分析のサンプル作成の際には、アルギニン-プロリン変換を避けるために (Bendall et al., 2008)、400 mg/L の L-プロリン (ナカライテスク) を添加した。また、安定同位体標識の際には、L-リシン一塩酸塩と L-アルギニンの代わりに $^{13}\text{C}_6^{15}\text{N}_2$ -リシン二塩酸塩と $^{13}\text{C}_6^{15}\text{N}_4$ -アルギニン一塩酸塩 (ケンブリッジアイソトープラボラトリーズ) を用いた。形質転換後の栄養要求性による選択には、一部のアミノ酸または核酸を除いた SC 培地を用いた。

生育温度

酵母は特に表記のない限り、30°Cで培養した。温度感受性株は、許容温度 (23°C) で培養し、制限温度 (37°C) で処理した。*sla2* Δ 株は 23°Cで培養した。FRAP では、温度感受性株と *sla2* Δ 株以外は 25°Cで培養した細胞を用いた。

形質転換

出芽酵母の形質転換は、酢酸リチウム法 (Gietz and Schiestl, 2007) で行った。まず、YEPD 培地で 1 夜培養した酵母を回収し、滅菌水で洗浄した。0.1 M 酢酸リチウム、33% ポリエチレングリコール (分子量 3,350; シグマアルドリッチ)、0.28 mg/mL サケ精巢由来デオキシリボ核酸 (deoxyribonucleic acid: DNA) (シグマアルドリッチ; 100°Cで加熱後氷上冷却したもの)、形質転換する DNA を混ぜた溶液に酵母を懸濁し、42°Cで 30 分処理した。栄養要求性または薬剤耐性の選択培地で数日培養し、形質転換体を得た。*kanMX* を選択マーカーに用いた場合は、形質転換後に YEPD 培地で一夜培養した後、200 mg/L G418 (ナカライテスク) を含む YEPD 培地で選択した。

遺伝子の欠失・挿入・変異

遺伝子の欠失株は、開始コドンと終止コドンの前後 40 bp の相同配列を持つプライマーを用いて、pBlueScript (pBS) ベクターの栄養要求性マーカーあるいは薬剤耐性マーカーをポリメラーゼ連鎖反応 (polymerase chain reaction: PCR) で増幅した。PCR 産物を形質転換し、相同

組み換えによって欠失が起きた株をアミノ酸・核酸欠失培地あるいは 200 mg/L G418 を含む YEPD 培地で選択した。遺伝子の 5'側とマーカー遺伝子に結合するプライマーで PCR を行い、目的の遺伝子が欠失していることを確認した。

cdc12-6 変異体の構築は、それぞれ 40 bp の相同領域を持った、+1167 のアデニンを欠失した *CDC12* (Li et al., 2012) と 500 bp の 3'非翻訳領域 (untranslated region: UTR) の PCR 産物、*CgURA3* の PCR 産物を形質転換し、SCD-Ura 培地で選択した。*cdc28-1N* の P250L (DNA の C749T) の変異 (Lörincz and Reed, 1986) も同様に、500 bp の 3' UTR と変異を含んだ *CDC28* の PCR 産物と、*CgURA3* の PCR 産物を形質転換し、SCD-Ura 固体培地で選択した。*CgURA3* カセットは、野生型株の *CDC28* の 3'UTR を形質転換し、YEPD 培地で一夜培養後に 5-FOA 固体培地で選択することで除去した。*flo8-1* の終始変異 (A608G) (Liu et al., 1996)は、50:50 法 (Horecka and Davis, 2014) を用いて変異を除いた。それぞれの変異は、シーケンスを読むことで確認した。

SSO2 の 5'側への *sfGFP* と *NPF-sfGFP* の挿入は、まず *CgURA3-P_{TEF1}-sfGFP* を *SSO2* の開始コドンの手前に挿入し、その後 *SSO2* の開始コドンの上流 40 bp を 5'末端に持った *sfGFP* または *kex2²³¹⁴⁻²³⁴⁶-sfGFP* の PCR 産物を形質転換し、YEPD 培地で一夜培養後に 5-FOA 固体培地で選択した。

SSO2 の 5'側への *NPF* の挿入は、まず *XbaI*で切断した *pRS306-P_{SSO2}-kex2²³¹⁴⁻²³⁴⁶-SSO2* を形質転換し、SCD-Ura 固体培地で選択した。YEPD 固体培地で培養後、5-FOA 培地で *pRS306* ベ

クターの脱落した株を選択し、その後 PCR で *NPF* の挿入を確認した。

2 倍体株を構築する際には、*pRS316-P_{GALI}-HO* (PMT39) を形質転換し、ウラシルを除いた mSCGR 培地にて 4 - 8 時間培養することで接合型を変換した。別のマーカーを含むベクターを持った株と混ぜ、選択培地上で接合させ、選択した。

OSH2-GFP, *OSH3-GFP*, *OSH6-GFP* および *MYO1-GFP* 株は Yeast GFP Collection (Huh et al., 2003) (サーモフィッシュャーサイエンティフィック) の株を用いた。

プラスミドの構築

GALI プロモーター (-454 ~ -1)、*TEF1* プロモーター (-420 ~ -1)、*SSO1* プロモーター (-500 ~ -1)、*SSO1* オープンリーディングフレーム (open reading frame: ORF)、*SSO2* ORF、*SAC1* ORF、シグナルペプチドの *kar2*¹⁻¹³⁵ と *num1*²⁵⁶³⁻²⁶⁹² (PH ドメイン) は、YMT682 のゲノム DNA を鋳型として PCR によって増幅した。鋳型 DNA の抽出では、まず YEPD 固体培地で培養した YMT682 を STES 緩衝液 (200 mM Tris-Cl (pH 7.5), 500 mM NaCl, 10 mM EDTA, 0.1% ドデシル硫酸ナトリウム) に懸濁し、ガラスビーズを加えてボルテックスミキサーで破碎した。水飽和フェノールとクロロホルムを 1:1 で混ぜたものを、破碎液に等量加え、懸濁した。14,000 rpm で 10 min 遠心分離を行い、上層を PCR に用いた。*ist2*²⁷⁸⁵⁻²⁸³⁸ は、酵母 ORF ライブラリー (オープンバイオシステムス) を鋳型としてクローニングした。*sfGFP* と *mCherry* は、pMaM17 (Khmelninskii et al., 2012) を鋳型にした。

小胞体保留 HDEL シグナル (CACGACGAATTGTAG) は、*sfGFP* または *mCherry* の終止コ

ドンの前に PCR で付加した。NPFXD シグナルの *kex2*²³¹⁴⁻²³⁴⁵ (GTACTAACAAACGAAAATCCATTTAGTGACCCT) は *sfGFP* の 5'末端に PCR で付加した。

PMT6433 と PMT6911 は、*TEF1* プロモーターを pRS315 の XhoI/BamHI サイトに、*kar2*¹⁻¹³⁵ と *sfGFP-HDEL* または *mCherry-HDEL* を BamHI/SacI 領域に挿入した。PMT6528, PMT7000, PMT7833 の構築には、*GALI* プロモーター、*SAC1* の ORF、終止コドンを含まない *sfGFP* を pRS315 の XhoI/SacI 領域に挿入した。その後、*ist2*²⁷⁸⁵⁻²⁸³⁸ または *num1*²⁵⁶³⁻²⁶⁹² を 2 つつなげ、その 3'末端に TGA 終止コドンを加えたものを SacI 領域に挿入した。その他のベクターは、プロモーターと ORF を pRS306 または pRS315 の XhoI/SacI 領域に導入した。

プロテオーム解析のサンプル

まず、YMT1495 株を 25 mL の mSCD 培地で一晩培養した。600 nm の濁度が 0.7-0.8 に達したところで、 $3,220 \times g$ で 1 分間遠心した。1 mL の mSCD 培地で 2 回洗浄した後、25 mL の mSCD 培地に再懸濁した。その後、10 mM アルファ因子 (ザイモリサーチ) を 25 μ L 加え、30°C で 6 時間培養した。 $3,220 \times g$ で 1 分間遠心し、上清を除いた後、1 mL のリン酸緩衝食塩水で 3 回洗浄した。50 μ L の培地に再懸濁し、200 μ L のリン酸緩衝食塩水に溶解した 1 バイアルの 1/5 量の Cy5 post-labeling reactive dye pack (GE ヘルスケア) を加えた。5 分間 30°C で静置し、その後 $5,000 \times g$ で 30 秒遠心した。上清を除き、1 mL のリシン塩酸塩とアルギニンの代わりに ¹³C₆¹⁵N₂-リシン二塩酸塩と ¹³C₆¹⁵N₄-アルギニン一塩酸塩を含む mSCD 培地 (1 回目)、またはリシン塩酸塩の代わりに ¹³C₆¹⁵N₂-リシン二塩酸塩を含む mSCD 培地 (2 回目) で洗浄

した。25 mL の洗浄に用いた培地と同じ組成の培地に再懸濁し、30°Cで 90 分間培養した。

3,220×g で 1 分間遠心し、上清を一部除いた。酵母を残った培地に再懸濁し、Ultrafree -MC, HV, 0.45 µm フィルターユニット (メルクミリポア) に約 1/4 量ずつ 4 つに分けて移した。フィルターユニットをアダプター (15 mL チューブにキムワイプを詰めたもの) に設置し、スイングローターで 1,000 ×g で 1 分間遠心した。-30°Cで冷却した 20 mL のメタノールにフィルターユニットを入れ、-30°Cで 1 時間、4°Cで 30 分間、30°Cで 15 分間置いた。4°Cおよび 30°Cでは、振盪しながら固定を行った。固定した細胞をリン酸緩衝食塩水で洗浄し、400 µL のリン酸緩衝食塩水に再懸濁した。超音波破碎機 (ブランソン Sonifier 250D およびスペシャルマイクロチップ) を用いて、20%の強度で 5 秒ずつ計 30~45 秒間、氷水で冷却しながら超音波処理し、母細胞と娘細胞を分断した。その後、Cy5 陽性の母細胞と Cy5 陰性の娘細胞を、FACS Aria II SORP (BD) でそれぞれ分取した。Cy5 は 640 nm のレーザーで励起し、660/20 nm の吸収フィルターを透過した光を検出した。

ペプチド消化

1~2 × 10⁷ 個の分取した細胞を 200 µL の破碎緩衝液に懸濁した (6 M グアニジン塩酸塩, 50 mM Tris-Cl, 0.1% トリトン X-100, 200mM ジチオスレイトール, pH 8.5)、等量のガラスビーズを加えて、10 分間ボルテックスし、100°Cで 15 分間加熱した。タンパク質の消化は膜上消化 (Filter-Aided Sample Preparation: FASP 法) で行った (Wiśniewski et al., 2009)。まず、14,000 rpm で 5 分間遠心した上清を 30 kDa の限外濾過膜 (アプロサイエンス) に移した。限外濾過

膜を溶液がすべて膜を通過するまで 14,000×g で遠心した。200 μL の洗浄緩衝液 (6 M グアニジン塩酸塩, 50 mM Tris-Cl, pH 8.5) を加え、14,000×g で溶液がすべて通過するまで遠心した。100 μL のヨードアセトアミド溶液 (50 mM ヨードアセトアミド、6 M グアニジン塩酸塩、50 mM Tris-Cl, pH 8.5) を加え、30 分間室温で暗所に静置することでシステイン残基をアルキル化した。14,000×g で遠心して溶液を除いた後、100 μL の 50 mM 重炭酸アンモニウムで 3 回洗浄した。次に、50 μL の消化酵素溶液 (20 ng/μL トリプシン リシルエンドペプチダーゼ混合消化酵素 (プロメガ; 1 回目) またはリシルエンドペプチダーゼ (和光純薬; 2 回目)、0.1% ラピジェスト SF (ウォーターズ)、50 mM 炭酸水素アンモニウム) を加え、37°C で 1 夜暗所に静置した。14,000×g で遠心し、消化ペプチドを回収した。また、ペプチドの回収率を上げるため、40 μL の 500 mM 塩化ナトリウムを加えて、再度遠心してペプチドを回収した。

ステージチップの作製

ペプチドの脱塩と分画のために、ステージチップ (Rappsilber et al., 2003) を作製した。18 gauge の注射針 (テルモ) の先端を切断し、やすりで平滑にしたもので、C18 Empore Disk (3M) と SCX Empore Disk (3M) をくりぬいた。イエローチップにくりぬいた C18 のディスクを 2 層、または SCX のディスクを 6 層重ねたものをそれぞれ脱塩、分画処理に用いた。

脱塩処理

次に、280 nm の吸光度からペプチド濃度を求め、10 μg の消化ペプチドを、C18 ステージチ

チップを用いて脱塩処理した (Rappsilber et al., 2003)。まず、ペプチド溶液に終濃度が 0.1% になるようにトリフルオロ酢酸を加え、14,000×g で 5 分間遠心して上清を得た。次に、C18 ステージチップを活性化するために、30 μL のメタノールを添加し、3,000×g ですべての溶液がディスクを通過するまで遠心した。次に、30 μL の 0.1% トリフルオロ酢酸を加え、3,000×g で遠心することで洗浄した。酸性化したペプチド溶液をチップに加え、1,000×g で遠心した。30 μL の 0.1% トリフルオロ酢酸を加え、3,000×g で遠心して塩を除去した。ペプチドは 30 μL の 70% アセトニトリル/0.1% トリフルオロ酢酸を加え、3,000×g で遠心して溶出した。溶出は 2 回繰り返して、混合した。最後にアセトニトリルの濃度を下げるために、溶出液に 220 μL の 0.1% トリフルオロ酢酸を加えた。

陽イオン交換によるペプチド分画

次に、脱塩したペプチドを SCX ステージチップ (18 gauge, 6 層) で分画した。SCX ステージチップに 60 μL のアセトニトリルを加え、3,000×g ですべての溶液がディスクを通過するまで遠心した。次に、30 μL の 0.1% トリフルオロ酢酸を加え、3,000×g で遠心することで、洗浄した。脱塩したペプチド溶液をチップに加え、1,000×g で遠心した。30 μL の 0.1% トリフルオロ酢酸を加え、3,000×g で遠心して洗浄した。溶出は、30 μL の 0.1% トリフルオロ酢酸と 15%アセトニトリルを含んだ異なる濃度の酢酸アンモニウム (31, 63, 125, 250 と 500 mM) で 3,000×g で遠心して行った。最後の画分は、30 μL の 5%アンモニア/80% アセトニトリルで溶出した。それぞれの溶出は、2 回ずつ繰り返した。溶出したペプチドは、遠心乾燥機で乾燥

し、10 μ L の 2% アセトニトリルを含んだ 0.1% トリフルオロ酢酸に溶解した。

質量分析

分画したペプチドは、液体クロマトグラフィー Easy-nLC 1000 (サーモフィッシャーサイエンティフィック) に接続した四重極・オービトラップ ハイブリッド質量分析計 Q Exactive (サーモフィッシャーサイエンティフィック) で、NanoSpray イオン源を用いて陽イオン検出モードで検出した。ペプチドは、カラムオーブンで 45°C に温めた NANO-HPLC C18 キャピラリーカラム (内径 0.075 mm, 長さ 150 mm, 充填剤の粒径 3 μ m, 日京テクノス) で分離した。移動相 A には 0.1% ギ酸を、移動相 B には 0.1% ギ酸を含むアセトニトリルを用いた。初めの 100 分には移動相 B が 0 から 30% の勾配で、100-120 分では移動相 B が 30 から 65% の勾配で、流速 300 nL/min で分離を行った。Q Exactive でのデータ取得は、MS1 の強度が上位 10 個以内のプリカーサーイオンに対してデータ依存的なスキャンを行った。また、スプレー電圧は 2.3 kV、キャピラリー温度は 275°C、m/z 比の範囲は 350-1800、開裂エネルギーは 28% に設定した。生データの取得には、Xcalibur (サーモフィッシャーサイエンティフィック) を用いた。

タンパク質の同定

取得した MS と MS/MS のデータは、Proteome Discoverer (サーモフィッシャーサイエンティフィック) と MASCOT search engine (マトリックスサイエンス) を用いて、Saccharomyces Genome Database (https://downloads.yeastgenome.org/sequence/S288C_reference/orf_protein/ 2015

年 1 月 14 日ダウンロード) の タンパク質の配列に対して検索を行った。この際、消化酵素はトリプシン (1 回目) または Lys-C (2 回目)、固定された修飾にはシステイン残基のカルバミドメチル化、動的な修飾にはメチオニン残基の酸化、プリカーサーイオンの許容度は ± 6 ppm、開裂イオンの許容度は ± 20 mDa、ペプチダーゼによる未切断部位は 1 か所以内に設定した。また、SILAC の R+10 と K+8 (1 回目) または K+8 (2 回目) の設定で定量を行った。擬陽性率は 5%未満に設定した。

プロテオーム解析のデータ解析

得られたデータは、Excel 2016 (マイクロソフト) で処理した。まず、 ^{12}C と ^{14}N 標識の軽いリシンまたはアルギニンを含むタンパク質の比率を、既存タンパク質比率とし、母細胞と娘細胞の既存タンパク質比率の差を不均等度合と定義した。次に、同定した 2039 個のタンパク質の上位 3, 5, 10%の不均等度合に閾値を設定した。2 回の実験で共にこれらの閾値の負の値以下の不均等度合を示すタンパク質を調べると、上位 3%と 5%の閾値ではそのようなタンパク質は存在しなかった。従って、上位 3%と 5%の閾値では、質量分析の誤差などによる擬陽性の発生が非常に低いことが示唆された。そこで、本研究では 2 回の実験で共に上位 5%の不均等度合を示したタンパク質を、不均等に分配されたと考えた。また、不均等度合の絶対値がその上位 5%の閾値以下であるタンパク質を、均等に分配されたと考えた。

遺伝子オントロジー解析は、Saccharomyces Genome Database の Gene Ontology Term Finder (<https://www.yeastgenome.org/cgi-bin/GO/goTermFinder.pl>) で、Component に設定して行った。局

在に関わる遺伝子オントロジーの情報は、fungal type cell wall (manually curated), cortical endoplasmic reticulum (manually curated), cell periphery (high throughput), plasma membrane (manually curated), cell cortex (manually curated) と endoplasmic reticulum (manually curated) のいずれも Saccharomyces Genome Database からダウンロードした。

遺伝子オントロジーに cell periphery, cell cortex, plasma membrane のいずれかを含み、fungal type cell wall と cortical endoplasmic reticulum を含まないタンパク質を細胞壁と細胞膜結合小胞体以外に局在する細胞表面タンパク質であると考えた。これらのタンパク質については、過去の GFP 融合タンパク質の局在の報告で、細胞表面への局在が確認されていることを確かめた (Huh et al., 2003; Weill et al., 2018)。これらの報告で、細胞膜タンパク質がエンドサイトーシスによって局在する可能性がある液胞内部を除いたオルガネラ (小胞体、液胞膜、核、ミトコンドリア) に局在することが報告されているタンパク質は、細胞表面のタンパク質から除いた。また、タンパク質が膜貫通ドメインを含むかどうかは、TMHMM (Krogh et al., 2001) を用いて予測した。

蛍光顕微鏡

蛍光顕微鏡観察には、2 mg/mL コンカナバリン A (ナカライテスク) で 30 分間コーティングし、滅菌水で洗浄したカバーガラスを使用した。

顕微鏡観察には、TCS SP8 (ライカマイクロシステムズ) とパーソナルデルタビジョン (GEヘルスケア) を用いた。TCS SP8 での観察には、HC PL APO 63x/1.40 Oil CS2 対物レンズを用

いた。GFP は 488 nm の光励起半導体レーザーで励起し、プリズムで分光した 495-550 nm の蛍光を HyD 検出器で検出した。明視野の画像は、488 nm の光励起半導体レーザーの透過光を光電子増倍管で検出した。データの取得は、Las X (ライカマイクロシステムズ) を用いて行った。

パーソナルデルタビジョン (GE ヘルスケア) での観察には、対物レンズは UPlanApo 20X/0.70 (オリンパス) と PLAPON 60XO NA 1.42 対物レンズ (オリンパス) を使い、pco.edge 5.5 sCMOS (PCO) で撮影した。GFP の検出には 475/28 nm の励起フィルターと、525/48 nm の吸収フィルターを、mCherry の検出には 575/25 nm の励起フィルターと 625/45 nm の吸収フィルターを、Cy5 の検出には 632/22 nm の励起フィルターと 679/34 nm の吸収フィルターを用いた。Z スタック画像は 0.15 μm ごとに撮影した。得られた画像は、Soft WoRx version 6.1.3 (GE ヘルスケア) を用いてデコンボリューションおよび明るさ・コントラストの調整を行った。

既存・新生タンパク質の蛍光顕微鏡観察

新生タンパク質を可視化する際には、mSCR 培地中で一夜培養し、600 nm での濁度が 0.5-0.8 の時点で培地の 1/10 量の 20% ガラクトースを添加した。20 分または 30 分培養後、蛍光顕微鏡にて観察した。

既存タンパク質の観察には、まず酵母を mSCGR 培地中で 1 夜培養し、600 nm での濁度が 0.5-0.8 の時点で、濁度が 0.2 になるように希釈した。1/25 量の 50% グルコースを添加し、4 時間培養後に蛍光顕微鏡で観察した。

野生型株と *cdc12-6* 株の比較の際には、mSCGR 培地中で 23°C にて 1 夜培養し、600 nm の濁度が 0.5-0.8 の時点で、濁度が 0.2 になるように希釈した。1/25 量の 50% グルコースを添加し、23°C で 6 時間培養した。37°C で 30 分間処理した後に、蛍光顕微鏡で観察した。

アクチンの重合阻害では、200 μ M のラトランクリン A と 1% ジメチルスルホキシドを加え、30 分間処理した。

イノシトール飢餓

Itr1 の分配への myo-イノシトールの影響を調べる際には、イノシトール不含培地 (表 4) を用いた。2% ガラクトースと 2% ラフィノースを含むイノシトール不含培地で一夜培養し、600 nm の濁度が 0.5-0.8 の時点で、濁度が 0.2 になるように希釈した。1/25 量の 50% グルコースと、イノシトールを添加する場合には 10 g/L の myo-イノシトールを 1/1000 量加え、4 時間培養した。

FRAP

野生型株と *cdc12-6* 株の比較のみ、細胞を 23°C で培養し、37°C で 30 分間処理をして実験を行った。データの取得は 25°C で、熱処理後 30 分以内に行った。その他の実験では、培養と測定をいずれも 25°C で行った。

GFP-HDEL の bFRAP では、解像度: 64 $\times$ 64 ピクセル、画像取得速度: 1800 Hz、拡大率: 16 倍、ピンホールの大きさ: 1 AU に設定した。まず、くびれから芽の先端までの距離が約 1.5 μ m

の芽の GFP を、強度 100% の 488 nm のレーザーで光退色した。光退色は直径 1.5 μm の円の内部を、ズームイン設定で行った。光退色後は、0.04 秒ごとに 300 回画像を取得した。光退色した芽に加えて、細胞全体、母細胞全体とバックグラウンドの平均蛍光強度を LasX を用いて定量した。芽と母細胞の相対蛍光強度は、Excel 2016 (マイクロソフト) で芽と母細胞それぞれの蛍光強度からバックグラウンドの蛍光強度を引いた後に比を計算することで求めた。

相対蛍光強度は実験開始から 8 秒間のデータを示した。蛍光回復率の半増期は、芽、細胞全体、バックグラウンドの蛍光強度を用いて、easyFRAP (Rapsomaniki et al., 2012) でフルスケール補正した後に、二重指数曲線にフィッティングすることで求めた。

その他のタンパク質の芽の蛍光の bFRAP では、解像度: 256 $\times$ 256 ピクセル、画像取得速度: 400 Hz、拡大率: 16 倍、ピンホールの大きさ: 1 AU に設定した。まず、くびれから芽の先端までの距離が約 1.5 μm の芽の GFP を、強度 40% の 488 nm のレーザーで光退色した。光退色は直径 1.5 μm の円の内部を、ズームイン設定で行った。光退色後は、2 秒ごとに 80 回画像を取得した。蛍光強度は Las X で定量した。芽と母細胞の相対蛍光強度は、Excel 2016 で芽と母細胞それぞれの蛍光強度からバックグラウンドの蛍光強度を引いた後に比を計算することで求めた。

GFP-Sso1, GFP-Sso2, GFP-Num1 の拡散の測定には、解像度: 256 $\times$ 256 ピクセル、画像取得速度: 400 Hz、拡大率: 16 倍、ピンホールの大きさ: 1 AU に設定した。まず、0.7 μm $\times$ 0.5 μm の長方形 (GFP-Sso1 と GFP-Sso2) か、0.6 μm $\times$ 0.6 μm の正方形 (GFP-Num1) の内部を強度

30%の 488 nm のレーザーで光退色した。光退色後は、2 秒ごとに 80 回画像を取得した。蛍光強度は Las X で定量した。GFP-Sso1 と GFP-Sso2 の蛍光強度は、easyFRAP を用いて、full scale normalization の設定で補正した。半増期は、二重指数曲線にフィッティングすることで求めた。GFP-Num1 は、Excel 2016 で GFP-Num1 の蛍光強度からバックグラウンドのシグナル強度を除き、退色前 10 回の測定の平均値で割ることで補正した。

細胞膜結合小胞体を持つ細胞の計測

mCherry-HDEL の光退色を避けるために、まずパーソナルデルタビジョンを用いて GFP-Ist2 の局在を鉛直軸方向に 0.15 μm ずつ動かして観察した。GFP-Ist2 がくびれで連続している細胞があった場合は、くびれで mCherry-HDEL が共局在しているかを確認した。1 つ以上の焦点で、GFP-Ist2 と共局在する mCherry-HDEL が母細胞と芽の間に連続している細胞の割合を計測した。

ミトコンドリアの分配

パーソナルデルタビジョンを用いて Yme2-GFP の局在を鉛直軸方向に 0.15 μm ずつ動かして観察した。すべての焦点で、Yme2-GFP の蛍光がない母細胞の割合を計測した。

グリセロール培地での生育・細胞壁ストレス耐性

YEPD 培地で濁度が 0.5~0.8 になったところで、濁度が 0.5 になるように希釈し、さらに 10 倍希釈系列を作成した。グリセロール培地での生育を調べる際には、それぞれの希釈系列を

5 μ L ずつ YEPD または YEPGly 固体培地に滴下し、それぞれ 30°C で 2 日間または 4 日間培養した。細胞壁ストレス耐性を調べる際には、それぞれの希釈系列を 5 μ L ずつ 80 μ g/mL のコンゴーレッドまたは 30 μ g/mL のカルコフロールホワイトを含む YEPD 固体培地に滴下し、30°C で 3 日間培養した。

偽菌糸形成

偽菌糸形成は、*FLO8/FLO8* の 2 倍体株を低窒素源培地にストリークし、30°C で 20 時間培養しすることで誘導した。

細胞伸長

それぞれの *cdc28-1N* 変異体株を YEPD 液体培地中で、23°C で 1 夜培養した。600 nm の濁度が 0.5-0.8 に到達した時点で、濁度が 0.3 になるように希釈し、37°C で 180 分振盪培養した。培地と等量の 8% パラホルムアルデヒド/リン酸緩衝食塩水を加え、37°C で 30 分振盪して固定した。リン酸緩衝食塩水で洗浄後、パーソナルデルタビジョンで 60 倍対物レンズを用いて観察した。芽の長さは、ImageJ (NIH) を用いて計測した。

細胞伸長時の GFP の局在の解析では、mSCD-Leu 液体培地で 23°C で 1 夜培養した。濁度が 0.5-0.8 に到達した時点で濁度が 0.3 になるように希釈し、37°C で 150 分振盪培養した。パーソナルデルタビジョンで 60 倍対物レンズを用いて観察した。

統計解析

検定には、ウェルチの両側 t 検定を用いた。3 群以上の多重比較には、ボンフェローニの補正を用いた。統計解析には Excel 2016 を用いた。 $p < 0.05$ を統計的に有意であるとした。

3 章 出芽酵母の既存・新生タンパク質分配のプロテオーム解析

背景

前述の通り (1 章)、過去の既存・新生タンパク質分配のプロテオーム解析 (Okada et al., 2017; Thayer et al., 2014) は、分裂後のタンパク質合成や分解の影響を受けている可能性があった。また、いずれの研究も、不均等分配されるタンパク質の同定に注力しており、どのような特徴を持ったタンパク質が不均等に分配されるかは明らかになっていない。そこで、出芽酵母の 1 回の細胞分裂における既存・新生タンパク質分配を網羅的に測定する手法を開発し、解析することで、均等・不均等分配されるタンパク質に共通したドメインの同定を目指した。

結果

母・娘細胞への既存・新生タンパク質分配のプロテオーム解析

不均等に分配されるタンパク質に共通した特徴を調べるため、1 回の細胞分裂後の既存タンパク質と新生タンパク質の比率を母細胞と娘細胞それぞれで解析する手法を確立した (図 3-1)。まず、細胞周期を同調するために、接合フェロモンのアルファ因子処理によって、G1 期で停止させた。従来、合成培地では細胞周期の同調は困難であると考えられていたが (Juanes, 2017)、アミノ酸、核酸、イノシトールを豊富に含む培地中で長時間、接合フェロモンで処理することで同調が可能であることを発見した (図 3-2 A と B)。細胞質分裂時に起こるアクトミオシンリング (Myo1-GFP) の収縮を観察すると、多くの細胞で G1 期停止解除後 65-80 分に収縮が起こり、同調率が高いことが示唆された (図 3-2 A と B)。細胞質分裂と一次隔壁の分解によって、母細胞と娘細胞の分断を完了させるために、G1 期停止解除後 90 分の細

胞を用いることにした。

接合フェロモンでの細胞周期停止後、細胞外部のタンパク質を蛍光色素の Cy5 で標識した。細胞外部のタンパク質の多くは母細胞に留まるため、Cy5 標識された母細胞と標識されていない娘細胞を区別することができるようになる (Chin et al., 2008)。Cy5 標識後に、G1 期停止を解除し、安定同位体の ^{13}C および ^{15}N で標識されたリシンまたは、リシンおよびアルギニンを含む培地で培養し、新生タンパク質を安定同位体で標識した (pulsed Stable Isotope Labeling by Cell culture: pSILAC 法) (Ong et al., 2002; Schwanhäusser et al., 2009)。1 細胞周期後に、タンパク質の合成と分解を停止させるためにメタノール固定を行い、フローサイトメーターによって Cy5 標識された母細胞と標識されていない娘細胞をそれぞれ分取した (図 3-2 C と D)。この際、母細胞に接着したままの娘細胞があり、母細胞濃縮画分に約 30%の娘細胞の混入があった (図 3-2 C と D)。得られた母細胞濃縮画分および娘細胞濃縮画分からタンパク質を抽出し、リシルエンドペプチダーゼまたはトリプシンによって消化した。消化ペプチドを液体クロマトグラフィータンデム質量分析計 (LC-MS/MS) で分析し、それぞれの画分での ^{12}C および ^{14}N で標識されたリシン残基またはアルギニン残基を含む既存タンパク質の割合を測定した (図 3-3 A)。2 回の実験で 2039 個のタンパク質が共通して同定された。これらのタンパク質に対して、母細胞と娘細胞の間での既存タンパク質比率の差を計算し、不均等度合と定義した (図 3-3 B)。不均等度合が大きいほど母細胞に既存タンパク質が蓄積しているか、娘細胞に新生タンパク質が蓄積していることを示し、不均等度合が 0 に近いほど既存・新生タ

ンパク質が均等に分配されていることを示す。

不均等分配されるタンパク質の同定

2 回実験を行い、不均等度合が上位 5% に共通して同定されたタンパク質が 56 個あった (図 3-3 C)。この中には、以前に蛍光顕微鏡 (Eldakak et al., 2010; Khmelinskii et al., 2012; Takizawa et al., 2000; Thayer et al., 2014) やプロテオーム解析 (Okada et al., 2017) で不均等分配されることが示唆されたタンパク質が 20 個含まれていた。5 個のタンパク質は、過去に不均等分配が報告されているにも関わらず、本実験では不均等度合が設定した閾値より低かった。この内、蛍光顕微鏡で不均等分配が過去に確認されているのは、Hsp26 だけである (Thayer et al., 2014)。Hsp26 は、熱などのストレスに応じて凝集体を形成し (Specht et al., 2011)、既存 Hsp26 を含む凝集体が母細胞に留まることが知られている (Thayer et al., 2014)。従って、既存 Hsp26 の不均等分配は生育環境依存的であると推察される。次に、他の 4 つのタンパク質が実際に不均等に分配されるかを調べるために、誘導性の *GAL1* プロモーターから緑色蛍光タンパク質 (Green Fluorescent Protein: GFP) を融合したタンパク質を発現することで、既存タンパク質の分配を調べた。GFP-Asp1 は、グルコースを加えて転写を 4 時間停止した後も線状の巨大な構造体が母細胞に留まっており、既存タンパク質が不均等に分配されることが確認された (図 3-4 A)。GFP-Asp1 を自身のプロモーターから発現した際には、巨大な構造体の他に細胞質全体にも分布することが報告されており (Weill et al., 2018)、Asp1 は一部のみが不均等に分配されると推察される。実際、Asp1 の不均等度合 (0.087 と 0.102) は上位 5% と 7% の間であり、

一部が不均等に分配されたことが示唆された。次に、細胞膜イノシトール輸送体の Itr1 は、本研究に使用したようなイノシトールを豊富に含む培地中ではエンドサイトーシスされ、液胞で分解されることが報告されている (Lai et al., 1995)。実際、イノシトールを含まない培地中では既存 GFP-Itr1 は母細胞の細胞膜に留まっていたのに対し、高イノシトール濃度の培地では液胞様の局在を示した (図 3-4 B)。プロテオーム解析でも、既存タンパク質の比率が母細胞と娘細胞共に低かったことから (図 3-3 A)、ターンオーバーが速いために既存 Itr1 の比率が低くなり、不均等度合が低くなったことが示唆された。また、既存の Pet10-GFP と GFP-Rtn2 はいずれも母細胞と芽の両方に分布していた (図 3-4 C と D)。従って、Pet10 と Rtn2 の不均等分配は生育環境依存的であるか、過去のプロテオーム解析 (Okada et al., 2017) の擬陽性であることが示唆された。以上より、以前の研究と今回のプロテオーム解析の不一致は、生育環境の違いか、設定した閾値の違い、または過去の研究の擬陽性によると考えられる。従って、本章で開発した手法は、過去に報告された不均等分配される既存・新生タンパク質を同定できることが確かめられ、さらに均等・不均等に分配される既存・新生タンパク質の候補を大幅に拡張することができた。

遺伝子オントロジー解析

次に、不均等度合が高い 56 個のタンパク質の遺伝子オントロジー (Cellular Component) 解析を行ったところ、細胞表面 (cell periphery) のタンパク質が不均等に分配されやすい傾向にあることが分かった (図 3-5 A)。局在の不均等分配への影響をより深く調べるために、細胞

表面タンパク質を細胞壁、細胞膜結合小胞体、それ以外の 3 つに分割して更なる解析を行った。

細胞壁タンパク質

細胞壁タンパク質は 26 個同定され、その内 20 個は 2 回の実験で共に不均等度合が上位 5% 以内であった (図 3-5 B)。不均等度合が小さかった 6 個のタンパク質 (Mcd4, Ssa1, Ssa2, Tdh1, Tdh2, Tdh3) は、大部分が細胞質または小胞体に局在しており (Huh et al., 2003; Weill et al., 2018)、今回同定された主に細胞壁に局在しているタンパク質はすべて不均等度合が上位 5% に同定された。細胞壁タンパク質の不均等度合が高い理由としては、以下の 3 つの可能性が考えられる。出芽酵母では、糖鎖修飾タンパク質は細胞壁との共有結合によって動かなくなり (Valdez-Taubas and Pelham, 2003)、母細胞と芽の間を移動しないと考えられる。また、細胞膜を貫通して細胞外領域を持つタンパク質は、出芽酵母では細胞膜の脂質の流動性が小さいために (Eldakak et al., 2010) 動きが制限されていると予想される。また、分泌小胞はミオシンによって運搬されることで、芽で活発に分泌が行われるため (Park and Bi, 2007)、細胞壁に運ばれる新生タンパク質が芽に分配されると予想される。このように細胞壁タンパク質の流動性が低いために既存・新生タンパク質の母細胞と芽の間での交換が制限され、新生タンパク質が芽に輸送されることで高い不均等度合を示したと考えられる。

細胞膜タンパク質

次に、細胞壁及び細胞膜結合小胞体のいずれにも局在しない細胞表面タンパク質の解析を行った (図 3-5 D)。これらのタンパク質は、細胞膜に結合あるいは挿入されていると予想される。膜貫通ドメインの有無を調べたところ、不均等に分配される細胞膜タンパク質の多くが膜貫通ドメインを持っていた。細胞膜貫通タンパク質の不均等分配は、拡散速度が遅いため様々な既存細胞膜輸送体が母細胞に蓄積し、また新生輸送体が分泌小胞の輸送によって芽や娘細胞に偏って分布するという過去の報告に一致する (Eldakak et al., 2010; Henderson et al., 2014; Khmelinskii et al., 2012; Singh et al., 2017; Yang et al., 2015)。

セプチンは母細胞と芽の間のくびれで、細胞膜結合タンパク質の拡散を制限していると考えられている (Barral et al., 2000; Takizawa et al., 2000) (1 章)。しかし、膜貫通ドメインを持たない、つまり細胞膜の膜脂質かタンパク質に結合していると予想されるタンパク質の多くが不均等に分配され (図 3-5 D)、セプチンは細胞膜結合タンパク質の拡散を強くは制限していないことが示唆された。

また、膜貫通ドメインを持たないにも関わらず不均等度合が高い Num1 と、膜貫通ドメインを持つにも関わらず不均等度合が低かった 6 個のタンパク質 (Dnf2, Fks1, Gsc2, Itr1, Snc2, Sso1) が同定されたことから (図 3-6 e と g)、上記以外にも細胞膜タンパク質の分配を制御する機構があると予想された (5, 6 章)。

細胞膜結合小胞体

細胞膜結合小胞体に局在するタンパク質は、4 つのタンパク質 (Ist2, Tcb1, Tcb2, Tcb3) が高

い不均等度合を示した (図 3-5 C)。これらのタンパク質は、いずれも細胞膜に結合するドメインと小胞体膜を貫通するドメインを持ち、小胞体-細胞膜接触部位に局在することが報告されている (Manford et al., 2012)。特に Ist2 は、セプチン依存的に不均等に分配されることが報告されており、細胞膜または小胞体膜の拡散障壁によって、母細胞と芽の間の流出入が制限されることが示唆されている (Chao et al., 2014; Luedeke et al., 2005; Takizawa et al., 2000)。しかし、細胞膜結合ドメインか小胞体膜貫通ドメインの一方だけを持つタンパク質のほぼすべてが均等に分配されていた (図 3-5 D と E; 図 3-6 d と h)。従って、細胞膜と小胞体膜の一方の拡散障壁では小胞体-細胞膜接触部位タンパク質の不均等分配は説明できず、細胞膜結合ドメインと小胞体膜貫通ドメインの両方のドメインを持つことが不均等分配されるのに必要であることが示唆された (4 章)。

考察

既存・新生タンパク質分配の網羅的解析法の開発

本章では、まず出芽酵母の 1 回の細胞分裂での既存・新生タンパク質分配を網羅的に解析する手法を確立した (図 3-1)。分裂完了後にメタノール固定を行うことで、分画中の母・娘細胞のいずれかに特異的なタンパク質合成・分解を避けることができるになり、より高精度なタンパク質分配の大規模解析が可能になったと考えられる。実際、以前に不均等分配されることが報告されているタンパク質を多く同定できており (図 3-3 C)、さらに均等・不均等分配されるタンパク質候補を大幅に拡張することができた。

本章で開発した手法では、細胞周期を同調する際に、接合フェロモンを用いた。接合フェロモン処理をすると、母細胞が肥大化するため (図 3-2 A と D)、拡散が遅いタンパク質は通常の生育時より母細胞に蓄積しやすくなっている可能性がある。細胞外部のタンパク質を同定する必要がない場合は、プロナーゼを用いて接合フェロモンを分解することによって同調率を向上できるため (Juanes, 2017)、接合フェロモンの処理時間を短縮し、細胞の肥大化を抑えられる可能性がある。また、フローサイトメーターの分画の際に、Cy5 陽性画分への娘細胞の混入が見られた (図 3-2 C と D)。これは、特に娘細胞に偏って局在するタンパク質の不均等度合に大きな影響を与えている可能性がある。細胞壁タンパク質を同定する必要がない場合には、細胞壁分解酵素を用いて、細胞質分裂後に母細胞と娘細胞をつなげている一次隔壁を除去すれば、より純度の高い母細胞を回収できると予想される。さらに将来、高速液体クロマトグラフィーや質量分析器の分解能が向上することで、より多くの均等・不均等分配されるタンパク質を同定できるようになることが期待される。

タンパク質分配プロテオーム解析法の応用

既存・新生タンパク質の比率は、分解、合成、輸送、翻訳後修飾、膜の脂質組成など様々な要因に影響を受ける (Singh et al., 2017; Valdez-Taubas and Pelham, 2003; Xu et al., 2017)。従って、既存・新生タンパク質の分布は生育環境に左右されることが予想される。また、ストレスや細胞老化によって形成されるタンパク質凝集体も母細胞に留まることが知られている (Schneider et al., 2018; Thayer et al., 2014)。タンパク質の凝集は既存タンパク質を隔離すること

があり、既存タンパク質の分配に大きく影響する (Thayer et al., 2014)。本章で開発した手法で、生育環境の既存・新生タンパク質分配への影響を網羅的に解析することで、その機構や意義についての知見を得ることが期待される。

また、既存/新生タンパク質の量だけではなく、開発した手法を応用すれば、母・娘細胞間でのタンパク質修飾の違いを調べることも可能である。出芽酵母では、一部のタンパク質のリン酸化やアセチル化などの修飾が、母細胞と芽のいずれか一方だけに見られることがある (Kumar et al., 2018; Lengefeld et al., 2017)。これらのタンパク質修飾は、核の分配や分裂後の細胞周期を制御することが知られている (Kumar et al., 2018; Lengefeld et al., 2017)。細胞固定によって、1 細胞周期後の母・娘細胞の分画が可能になり、分裂後のタンパク質修飾の影響を小さくすることができる。それによって、一方の細胞に特異的なタンパク質修飾の大規模かつ高精度な同定が可能になることが予想される。

既存・新生タンパク質分配のドメイン解析

本章で同定された不均等度合の高いタンパク質には、特に細胞表面のタンパク質が多く含まれていた (図 3-5 A)。そこで、細胞表面を細胞壁、細胞膜結合小胞体、細胞膜の 3 つに局在に分類し、さらに局在に関わる膜貫通ドメインの有無を調べることで、細胞壁タンパク質と細胞膜貫通タンパク質、細胞膜結合ドメインと小胞体膜貫通ドメインの両方を持つタンパク質が不均等に分配されやすいことを発見した (図 3-6)。細胞膜結合ドメインか小胞体膜貫通ドメインの一方のみを持つタンパク質は均等に分配されることから (図 3-6 d と h)、これら両

方のドメインを持つことが不均等分配に重要であることが示唆された。また、細胞膜タンパク質の中には、例外的な分配を示すものが存在することを発見した (図 3-6 e と g)。以降の章では、特に不均等分配の機構が明らかになっていない細胞膜結合ドメインと小胞体膜貫通ドメインの両方を持つタンパク質と、細胞膜タンパク質で例外的な挙動を示したタンパク質に注目して研究を行った (4~6 章)。

4 章 小胞体-細胞膜接触部位タンパク質の不均等分配機構

背景

小胞体膜貫通ドメインと細胞膜結合ドメインの両方を持つ小胞体-細胞膜接触部位タンパク質の Ist2 は、セプチン依存的に不均等に分配されることが報告されている (Chao et al., 2014; Takizawa et al., 2000)。セプチンは細胞骨格の 1 つで、複数種のサブユニットが重合することで線維状になり、さらに網目状や輪状の高次構造を形成する (Garcia et al., 2011; Glomb and Gronemeyer, 2016; Oh and Bi, 2011)。セプチンはホスホイノシチドに結合する塩基性アミノ酸に富んだドメインを持ち、出芽酵母の母細胞と芽の間のくびれの細胞膜などの湾曲した生体膜に結合する (Bridges et al., 2016; Oh and Bi, 2011)。

セプチン変異体では、芽に特異的に局在する細胞膜タンパク質が母細胞にも観察されるようになり、小胞体膜タンパク質の母細胞と芽の間での流出入が増加することから、セプチンがくびれにおいて細胞膜や小胞体膜タンパク質の拡散を妨げる拡散障壁を形成していると考えられている (Barral et al., 2000; Chao et al., 2014; Clay et al., 2014; Luedeke et al., 2005; Takizawa et al., 2000)。しかし、実際にセプチンがどのように細胞膜タンパク質や小胞体膜タンパク質の局在や動きを制御しているのかは明らかになっていない (1 章)。

小胞体-細胞膜接触部位に局在する Ist2 の不均等分配機構については、2 つの対立する結果が報告されている。Luedeke らは、小胞体膜拡散障壁の形成に必要とされるセプチン以外の因子の 1 つ *BUD6* の欠失株では、Ist2 の不均等分配に変化がなかったことから、小胞体膜ではなく細胞膜の拡散障壁が重要であるとした (Luedeke et al., 2005)。それに対して、Chao らは、

小胞体区画化に関わる非セプチンの *SCS2* または *EPO1* の変異体において、Ist2 の娘細胞での発現量が増加したことから、小胞体膜拡散障壁が重要であると結論付けた (Chao et al., 2014)。

しかし、*bud6* 変異体と *scs2* 変異体および *epo1* 変異体における矛盾は説明されていない。

これらの結果に対して、第 3 章のプロテオーム解析では細胞膜結合タンパク質、および小胞体膜貫通タンパク質の多くが均等に分配されることが示唆されており、一方の拡散障壁では Ist2 などの小胞体-細胞膜接触部位タンパク質の不均等分配を説明できないことが示唆された。拡散障壁の分子機構も不明であるため、小胞体-細胞膜接触部位タンパク質が何故不均等に分配されるか、さらなる解析が必要であった。

結果

セプチンによるくびれでの小胞体-細胞膜接触タンパク質の流出入制限

まず、既存の Ist2 がセプチン依存的に母細胞に蓄積しているかを確かめるために、誘導性の *GAL1* プロモーターから GFP-Ist2 を発現し、グルコースの添加によって転写を停止した後の局在を調べた。既存の GFP-Ist2 の多くは母細胞に局在したが、セプチンのサブユニットの 1 つである *CDC12* の温度感受性変異体 *cdc12-6* 株では制限温度で芽への流入が見られた (図 4-1 A)。この結果を確認するために、光退色後蛍光回復法 (Fluorescence Recovery After Photobleaching; FRAP 法) で芽の蛍光を光退色した後の回復を観察した (図 4-1 B と C)。野生型株は光退色前から芽の蛍光が弱かったため、蛍光の回復率は実際のタンパク質流入の指標にはならない。そこで、光退色後の非対称なタンパク質の分布がどの程度維持されるかを見

積るために、芽の蛍光強度を母細胞の蛍光強度で割った相対蛍光強度を計算した (以降、bud FRAP: bFRAP と呼ぶ)。光退色後の相対蛍光強度の上昇は、*cdc12-6* 株が野生型株に比べて速く、セプチンが既存 GFP-Ist2 の母細胞から芽への流入を制限していることが示された。同様の結果が、くびれのセプチン重合体の構造の一部が壊れるセプチンサブユニット *SHS1* 欠失株 (Garcia et al., 2011) でも観察された (図 4-1 D)。また、不均等分配される他の小胞体-細胞膜接触部位タンパク質の Tcb1-GFP, Tcb2-GFP, Tcb3-GFP についても bFRAP 法で芽への流入を調べたところ、Ist2 と同様に *cdc12-6* 株で相対蛍光強度の上昇が速くなったことから (図 4-1 E-G)、これらのタンパク質もセプチンによって母細胞と芽の間での流出入が制限されていることが明らかになった。

小胞体膜と細胞膜に結合するが、膜貫通ドメインを持たない Osh2, Osh3, Osh6, Osh7 は、プロテオーム解析で均等に分配されることが示唆された (図 3-6 c)。これらの GFP 融合タンパク質は、細胞膜結合小胞体に加えて、細胞質にも局在する (Schulz et al., 2009) (図 4-1 H)。従って、これらのタンパク質は小胞体膜および細胞膜から解離し、細胞質を通過して芽と母細胞の間を移動すると推察される。

また、主に細胞膜結合小胞体に局在するが、細胞膜に結合するドメインが発見されていないタンパク質 (Dpl1, Lcb4, Rtn1, Rtn2, Sey1, Sfh5) は、いずれも均等に分配された (図 3-5 C)。これらのタンパク質は、核膜や細胞質小胞体などにも存在し (Huh et al., 2003; Weill et al., 2018)、細胞膜結合小胞体のみに局在するタンパク質ではない。従って、細胞膜結合小胞体以外にも

移動できる場合には、均等分配されると予想された。

以上より、細胞膜結合ドメインと小胞体膜貫通ドメインの両方を持ち、細胞膜結合小胞体に安定的に局在するタンパク質は、セプチン依存的に不均等に分配されることが示唆された。

非セプチンの小胞体区画化制御因子の影響

次に、既存の GFP-Ist2 の局在を非セプチンの小胞体区画化遺伝子の変異体で観察した。上述の通り、小胞体区画化に関わる *bud6* 変異体と *epo1* 変異体および *scs2* 変異体で Ist2 の分布について矛盾した結果が報告されている (Chao et al., 2014; Luedeke et al., 2005)。そこで既存 GFP-Ist2 の局在を調べたところ、*bud6Δ* 株, *scs2Δ* 株, *epo1Δ* 株のいずれでも母細胞に蓄積していた (図 4-2 A)。また、bFRAP 法で芽の蛍光を光退色した後の蛍光回復も、これらの変異体と野生型株の間で違いが見られなかった (図 4-2 B)。従って、これらの遺伝子は、Ist2 の不均等分配に全く、あるいはセプチンに比べて非常に小さな影響しか与えない。過去に Scs2 と Epo1 が芽での Ist2 の発現量に関わるとした報告では、既存タンパクに注目せずに全体のタンパク質の量を調べていたため (Chao et al., 2014)、詳細な機構は不明であるが、Scs2 や Epo1 は新生 Ist2 の芽での発現量に影響すると予想される。さらに、スフィンゴ脂質の合成に関わり、小胞体区画化に必須であるとされる *SUR2* の欠失株 (Clay et al., 2014) でも既存 GFP-Ist2 が母細胞に蓄積していた (図 4-2 A)。また、bFRAP 法で調べた場合も芽への流入が野生型株と変わらなかった (図 4-2 B)。以上より、セプチンは、これらの小胞体区画化因子とは異なる機構で Ist2 の分配を制御していることが明らかになった。

細胞膜結合ドメインと小胞体膜貫通ドメイン

プロテオーム解析によって、多くの細胞膜結合タンパク質が均等に分配されることが示唆された (図 3-6 d)。そこで、細胞膜拡散障壁の Ist2 不均等分配への影響を調べるために、Ist2 の細胞膜結合ドメインの分配を調べた。Ist2 は、C 末端に存在する塩基性アミノ酸に富んだドメインが細胞膜のホスホイノシチドに結合することが知られている (Fischer et al., 2009; Maass et al., 2009; Manford et al., 2012) (図 4-3 A)。細胞膜結合ドメイン 1 つでは細胞膜への結合が弱い、2 つつなげたもの (PMBD×2) は細胞膜に安定的に結合することが知られている (Manford et al., 2012)。そこで、*GAL1* プロモーターを用いて既存 GFP-PMBD×2 の分布を調べると、母細胞と芽の両方の細胞表面に存在した (図 4-3 B)。同様に、Ist2 から細胞膜結合ドメインを除いた GFP-Ist2ΔPMBD は、母細胞と芽の両方に存在した (図 4-3 B)。また、芽の蛍光を光退色した後の蛍光回復を観察した場合も、GFP-PMBD×2 と GFP-Ist2ΔPMBD のいずれも全長の GFP-Ist2 に比べて相対蛍光強度の上昇が速かった (図 4-3 C と D)。以上より、細胞膜結合ドメインは Ist2 の不均等分配に必須であるが、細胞膜結合ドメインだけでは不均等分配されないことが明らかになった。

次に、小胞体膜貫通ドメインの不均等分配への関与を調べるために、プロテオーム解析で均等分配されることが確認された小胞体膜貫通タンパク質の Sac1 (不均等度合: 0.014 と 0.015) に Ist2 の細胞膜結合ドメインを融合した際の挙動を調べた。Sac1 は細胞膜結合ドメインを持たず、このことは Sac1-GFP が核膜を含む小胞体全体に局在することからも確かめられた (図

4-3 E)。それに対して、Ist2 の細胞膜結合ドメインを 2 つ融合した Sac1-GFP-PMBD×2 は、細胞表面のみに蛍光が観察されたことから、細胞膜結合小胞体に局在していることが示唆された (図 4-3 E)。GAL1 プロモーターから発現すると、既存 Sac1-GFP は母細胞と芽の両方に存在していたのに対し、既存 Sac1-GFP-PMBD×2 は母細胞のみに観察された (図 4-3 E)。それに対して、cdc12-6 株では制限温度で既存 Sac1-GFP-PMBD×2 の芽への流入が見られた (図 4-3 F)。また芽の蛍光を光退色した後の相対蛍光強度の上昇も cdc12-6 株で速くなり (図 4-3 G)、Sac1-GFP-PMBD×2 はセプチンによって母細胞から芽への流入が制限されていることが明らかになった。

以上より、Ist2 の不均等分配には小胞体膜貫通ドメインと細胞膜結合ドメインの両者が必要であることが示唆された。

セプチンによる細胞膜結合小胞体の分断

なぜ小胞体膜貫通ドメインと細胞膜結合ドメインの両者が不均等分配に必要なのかを調べるために、まず野生型株とセプチン変異体での Ist2 の局在に注目した。野生型株では、GFP-Ist2 はくびれの部分に蛍光が見られず、母細胞と芽の間で不連続になっていた (図 4-1 B)。それに対して、cdc12-6 株では、制限温度で GFP-Ist2 がくびれを通じて連続に存在していた (図 4-1 B)。このセプチンに依存的な Ist2 の局在の不連続性が、不均等分配に重要であると推察された。

出芽酵母は、母細胞と芽でつながった唯一つの小胞体を持つ (Luedeke et al., 2005)。この小

胞体は、小胞体-細胞膜接触部位タンパク質によって細胞膜に結合する細胞膜結合小胞体、細胞膜に結合していない細胞質小胞体と核膜に区分される。過去の電子顕微鏡観察で、出芽酵母では細胞膜結合小胞体がくびれの部分に存在せず、S-G2 期には細胞質小胞体のみが母細胞と芽の間でつながっていることが報告されている (West et al., 2011)。Ist2 や Tcb1, Tcb2, Tcb3 は細胞膜結合小胞体に局在するため (Manford et al., 2012)、セプチンが細胞膜結合小胞体をくびれで分断して不連続にすることで、小胞体-細胞膜接触部位タンパク質の母細胞と芽の間での交換を妨げていると仮説を立てた (図 4-6)。

実際、小胞体内腔に局在する mCherry-HDEL は、セプチン (Cdc10-GFP) が局在するくびれの部分でほとんど蛍光が見られなかったが、*cdc12-6* 株では母細胞と芽の間で連続した蛍光が観察された (図 4-4 A)。GFP-Ist2, Tcb1-GFP, Tcb2-GFP, Tcb3-GFP は、mCherry-HDEL と同じ部位で不連続になっていたが、*cdc12-6* 株ではくびれにも観察され、細胞膜結合小胞体が Cdc12 依存的に分断されることが明らかになった (図 4-4 B-F)。また、くびれのセプチンの一部分が壊れる *shs1Δ* 株 (Garcia et al., 2011) でも、mCherry-HDEL および GFP-Ist2 がくびれで連続して観察された (図 4-4 G-I)。それに対して、GFP-Ist2 と共局在しない細胞質小胞体は、野生型株のくびれにも存在した (図 4-4 B)。

以上より、セプチンは細胞膜結合小胞体をくびれで不連続にすることが示され、この不連続性が小胞体-細胞膜接触部位に局在するタンパク質の不均等分配を引き起こしていることが示唆された。

セプチンによるくびれでの小胞体内腔タンパク質の流出入制限

セプチンは、小胞体の膜タンパク質の動きを制限し、内腔タンパク質の動きには影響しないと考えられてきた (Luedeke et al., 2005)。しかし、セプチンが細胞膜結合小胞体を分断するのであれば、芽と母細胞の間の小胞体タンパク質の流出入は細胞質小胞体と核膜に限られることになり、小胞体内腔タンパク質の流出入も制限されることが予想された。過去の研究では、光退色蛍光減衰法 (Fluorescence Loss In Photobleaching: FLIP 法) を用いて、小胞体タンパク質の芽と母細胞の間の動きが調べられた (Chao et al., 2014; Clay et al., 2014; Luedeke et al., 2005)。母細胞の小胞体の一部分を繰り返し光退色すると、GFP 融合小胞体膜タンパク質の蛍光は、母細胞全体ですぐに減少するのに比べて、芽での蛍光の減少は遅いことが報告されている (Luedeke et al., 2005)。セプチン変異体では母細胞と芽での退色がほぼ同時に起きたことから、セプチンが小胞体膜タンパク質の流出入をくびれで妨げていることが示唆された。それに対して、GFP 融合小胞体内腔タンパク質は、野生型株でも母細胞と芽でほぼ同時に退色したため、小胞体内腔タンパク質の動きは制限されず、膜に特異的な拡散障壁が形成されていると結論付けられた (Luedeke et al., 2005)。

しかし、その報告では膜タンパク質と内腔タンパク質では拡散速度に違いがあること (Levin et al., 2001) を考慮しておらず、またセプチン変異体で内腔タンパク質の母細胞と芽の間の流出入に変化があるかは確かめられていない。そこで、本当に小胞体内腔タンパク質の動きがセプチンによって制限されないのかを調べるために、FLIP 法に比べて時間分解能が高い bFRAP 法で、芽の小胞体内腔タンパク質 (GFP-HDEL) の蛍光を光退色した後の蛍光回復

を観察した。芽の蛍光の回復は野生型株に比べて *cdc12-6* 株の方が速く、半増期も有意に小さかった (図 4-5 A-C)。また、同様の結果が別のセプチン変異体の *shs1Δ* 株でも得られた (図 4-5 D と E)。以上より、セプチンは小胞体内腔タンパク質の流出入を制限していることが示された。この結果は、セプチンが小胞体膜に拡散障壁を形成するのではなく、細胞膜結合小胞体を分断することで小胞体タンパク質、特に小胞体-細胞膜接触部位タンパク質の流出入を制限しているというモデルを支持する (図 4-6)。

考察

小胞体-細胞膜接触部位タンパク質の不均衡分配機構

本章では、セプチンが細胞膜結合小胞体を母細胞と芽の間のくびれで分断することで、小胞体局在タンパク質、特に小胞体-細胞膜接触部位タンパク質の流出入を制限することを明らかにした。従来、Ist2 の不均等分配は、細胞膜あるいは小胞体膜の拡散障壁によるものだと考えられてきた (Chao et al., 2014; Luedeke et al., 2005; Takizawa et al., 2000)。しかし、プロテオーム解析によって多くの細胞膜結合タンパク質、小胞体膜貫通タンパク質は均等に分配されることが明らかになり、一方の拡散障壁では不均等分配が説明できないことが示唆された (図 3-6 d と h)。実際、Ist2 の不均等分配には細胞膜結合ドメインと小胞体膜貫通ドメインの両方が必要であった (図 4-3)。そこで、小胞体-細胞膜接触部位タンパク質が局在する細胞膜結合小胞体の形態を観察したところ、セプチン依存的にくびれで分断されており (図 4-4)、この分断が小胞体-細胞膜接触部位タンパク質の母細胞と芽の間の流出入を制限していることが示

唆された (図 4-6)。この際、セプチンは細胞膜のホスホイノシチドに結合するため (Zhang et al., 1999)、同様に細胞膜に結合している細胞膜結合小胞体と物理的に衝突し、それによって細胞膜結合小胞体をくびれで不連続にしていると推察される。また、*IST2*, *TCB2*, *TCB3* の mRNA はミオシンによって芽に運搬されるため (Shepard et al., 2003; Takizawa et al., 2000)、新生タンパク質が芽に、既存タンパク質が母細胞に分布する (図 4-6)。

細胞膜拡散障壁

芽やくびれに局所的に分布する細胞膜タンパク質が、セプチン変異体では母細胞にも観察されるようになることから、セプチンはくびれの細胞膜に拡散障壁を形成すると考えられている (Barral et al., 2000; Dobbelaere and Barral, 2004)。しかし、3 章のプロテオーム解析ではほぼすべての細胞膜結合タンパク質が均等に分配されることが示唆され (図 3-6 d)、また *Ist2* の細胞膜結合ドメインは母細胞から芽へ速く流入していた (図 4-3 C と D)。これらの矛盾が生じた理由には、以下の 3 つの可能性が考えられる。1 つ目に、細胞膜拡散障壁は選択性があり、一定以上の大きさのタンパク質か、あるいは特定の脂質に結合するタンパク質の拡散のみを制限する可能性がある。2 つ目に、セプチンの構造は細胞周期に応じて変化することが知られており (Oh and Bi, 2011)、一部の細胞周期のみで拡散障壁を形成している可能性がある。3 つ目に、セプチンは様々なタンパク質の足場として働くことが知られており (Glomb and Gronemeyer, 2016; Oh and Bi, 2011)、それによって細胞極性や局所的なエキソサイトーシスを制御している可能性がある。セプチンが形成する細胞膜拡散障壁は、細胞極性の維持や細胞

質分裂時に重要な役割を担うと考えられており (Barral et al., 2000; Dobbelaere and Barral, 2004)、セプチンが実際にどのような機構で細胞膜タンパク質の局在を制御しているか、さらなる研究が必要である。

小胞体膜拡散障壁

従来、セプチンは小胞体の膜タンパク質のみの流出入を制限し、小胞体内腔タンパク質の動きには影響しないと考えられてきた (Chao et al., 2014; Clay et al., 2014; Luedeke et al., 2005)。

しかし、セプチン変異体で小胞体内腔タンパク質の流出入が速くなっていることが明らかになり (図 4-5)、これによって小胞体膜での拡散障壁の存在を示す証拠が崩れ、セプチンが小胞体の形態を変化させることでタンパク質の流出入を制御していることが支持された (図 4-6)。

セプチンは、膜脂質に結合するドメインは 1 つしか持たず (Oh and Bi, 2011)、セプチンだけでどのように細胞膜と小胞体膜の両方に拡散障壁を形成するか不明であった。また、小胞体膜は内腔を包むようにして管状になっており、内腔を挟んだ細胞膜の逆側の小胞体膜にはセプチンは接していないはずである。これらの矛盾に対して、Bud1, Bud5, Bud6, Cdc24, Cdc42 といった小胞体の区画化に必要なタンパク質がセプチンと相互作用し、さらに環状になって小胞体膜を囲むことで、くびれの小胞体膜に拡散障壁を形成するというモデルが立てられている (Clay et al., 2014; Luedeke et al., 2005)。しかし、これらの因子がセプチンの下流で小胞体を区画化していることを示す直接的な証拠はない。局所的に拡散障壁を形成するのではなく、小胞体や小胞体ネットワークの形態を変えるか、あるいは小胞体全体やくびれにも存在する

小管小胞体 (tubular endoplasmic reticulum) の膜の流動性を下げること、小胞体タンパク質の母細胞と芽の間の流出入を減らしている可能性がある。本章で小胞体膜拡散障壁の存在を示す証拠が否定されたため、セプチン以外の小胞体区画化因子が膜タンパク質だけの流出入を制限しているのか、そしてどのような機構で小胞体を区画化しているのかについて、更なる検討が必要である。

小胞体-細胞膜接触部位の局在制御の機能

小胞体-細胞膜接触部位のタンパク質は、収縮環 (アクトミオシンリング) の形成や、エキソサイトーシスの場の決定、脂質の小胞体膜と細胞膜間での交換、カルシウム代謝を制御している (Ng et al., 2018; Saheki and De Camilli, 2017; Zhang et al., 2016)。従って、セプチンによる小胞体-細胞膜接触部位タンパク質の局在制御が、これらの機能の場を決定するのに重要な役割を果たすと推察される。

セプチンは植物を除いた真核生物に広く保存されており (Caudron and Barral, 2009)、出芽酵母以外の種においても小胞体-細胞膜接触部位タンパク質の局在を制御していると予想される。動物細胞では、セプチンは小胞体-細胞膜接触部位タンパク質 STIM1 と細胞膜カルシウムチャネルの Orai1 の共局在に必要であり、それによってストア作動性カルシウム流入を制御することが知られている (Sharma et al., 2013)。セプチンがどのようにこれらのタンパク質の共局在を制御するかは明らかになっていないが、拡散障壁が STIM1 の局在を制限することが一つの要因であると考えられている (Deb and Hasan, 2016)。今回発見した機構と同様に、セプ

チンは小胞体-細胞膜接触部位の位置を制限することで、STIM1 と Orai1 の共局在を制御していることが疑われる。

この他に、セプチンは神経細胞の樹状突起棘のくびれ、一次繊毛の移行帯、精子の輪状小体といった細胞内区画の境界部位に存在する (Saarikangas and Barral, 2011)。従って、セプチンはこれらの細胞内区画での小胞体-細胞膜接触部位タンパク質の量を制御している可能性がある。ジャンクトフィリンは小胞体-細胞膜接触部位タンパク質で、小胞体に局在するリアノジン受容体・カルシウムポンプと、細胞膜に局在する N-メチル-D-アスパラギン酸 (NMDA) 受容体・カルシウム依存的カリウムチャネルの距離を縮めることで、それぞれの受容体・チャネル間のカルシウムイオンの移動を制御し、記憶の形成を制御することが示唆されている (Moriguchi et al., 2006)。NMDA 受容体は樹状突起棘に観察されるため (Hu et al., 2010)、セプチンがジャンクトフィリンの樹状突起棘での量を制御することで、シナプス可塑性を制御していることが予想される。

以上のように、本章での発見は、出芽酵母のみならず様々な真核生物での小胞体-細胞膜接触部位の位置制御の機構と機能の研究に波及することが期待される。

5 章 細胞膜結合タンパク質 Num1 の不均等分配機構と機能

背景

3 章のプロテオーム解析で、膜貫通ドメインを持たない細胞膜タンパク質、つまり細胞膜の脂質やタンパク質への結合が予想されるタンパク質は、ほぼすべてが均等に分配されることが示唆された (図 3-6 d)。それに対して、細胞膜に結合する Num1 は膜貫通ドメインを持たないにも関わらず例外的に不均等に分配されることを発見した (図 3-6 e)。

Num1 はダイニンやミトコンドリア、小胞体などと結合し、足場として働くことが知られている (Cervený et al., 2007; Farkasovsky and Küntzel, 2001; Lackner et al., 2013)。Num1 は相互作用によってダイニンを活性化し、核の挙動を制御することが報告されており、母細胞および芽への局在が核の分配に影響すると考えられている (Kormanec et al., 1991; Lammers and Markus, 2015; Omer et al., 2018)。また、Num1 はミトコンドリアの Mdm36 と相互作用することで、ミトコンドリアを細胞膜に近づけることが報告されている (Cervený et al., 2007; Hammermeister et al., 2010; Lackner et al., 2013)。さらに *NUM1* と、ミトコンドリアの分裂に関わる *DNM1* の二重欠失株では、一部の細胞でミトコンドリアが芽に偏って分布することから、*dnm1* Δ 株において、Num1 はミトコンドリアと結合して母細胞に留めることが示唆されている (Cervený et al., 2007)。従って、Num1 の母細胞・芽への分布は核やミトコンドリアの分配を制御すると考えられる。

Num1 は、既存・新生タンパク質を区別しない場合には、芽に比べて母細胞に多く存在するが、セプチンのサブユニットの 1 つ *SHS1* の変異体では、Num1 の芽での発現量が増加する

(Chao et al., 2014)。Num1 は小胞体膜貫通タンパク質の Scs2 と相互作用するため、小胞体膜拡散障壁によって母細胞に留まることが示唆された (Chao et al., 2014)。しかし、SCS2 とパラログの SCS22 の二重欠失株では、Num1 は母細胞に偏って局在するため、小胞体の区画化では Num1 の非対称な局在を説明できないことが示唆された (Omer et al., 2018)。また、Num1 は不動な巨大構造体を細胞膜上に形成するため、セプチンとは無関係に母細胞に留まることが示唆されている (Kraft and Lackner, 2017; Omer et al., 2018)。しかし、セプチン変異体の芽での発現量増加との矛盾は説明されていない。

また、Num1 の芽の先端への局在は、アクチン重合に関わるフォルミン Bni1 の発現に依存することが報告されている (Farkasovsky and Küntzel, 2001)。アクチン重合を阻害した場合も、Num1 は芽に存在することから、アクチン重合ではなく Bni1 との相互作用によって Num1 が芽の先端に局在することが示唆されている。しかし、この研究では巨大構造体の形成後の Num1 の挙動を観察している可能性があり、Num1 の芽への分配が本当にアクチンに依存しないかは不明であった。

これらの研究では、既存・新生タンパク質を区別していないため、Num1 の分布が転写や翻訳に影響され、正確に分配を解析できていなかった可能性がある。そこで、本章では既存・新生タンパク質それぞれの挙動を観察することで、Num1 の母細胞と芽への分布について新たな知見を得ることを目指した。

結果

既存 Num1 の分配

まず、誘導性の *GALI* プロモーターを用いて既存の GFP-Num1 の分布を調べると、母細胞に偏って局在していた (図 5-1 A)。次に、セプチンの既存 GFP-Num1 の分配への影響を調べた。*cdc12-6* 株と *shs1Δ* 株のいずれでも、既存 GFP-Num1 は母細胞に蓄積していた (図 5-1 B と C)。芽の蛍光を光退色した後の相対蛍光強度の上昇も、野生型株と *cdc12-6* 株で有意な差が見られなかった (図 5-1 D)。また、細胞膜のホスファチジルイノシトール 4,5 ビスリン酸と結合する Num1 のプレクストリン相同 (Plekstrin homology: PH) ドメインを 2 つつなげたものは、既存タンパク質が母細胞と芽の両方に均等に存在したことから、細胞膜拡散障壁は既存 Num1 の分配に関与しないことが支持された (図 5-1 E)。以上より、既存 Num1 はセプチン非依存的に母細胞に留まることが明らかになった。以前の報告では、既存 Num1 と新生 Num1 が区別されていなかったため (Chao et al., 2014)、詳細な機構は不明であるが、セプチンは Num1 の転写や翻訳に影響を与えていると予想される。

次に、Num1 の既知の相互作用タンパク質を欠失した株で、既存 Num1 の局在を調べた。既存・新生タンパク質を区別しない場合 (Omer et al., 2018) と同様、小胞体の Scs2 とそのパラログの Scs22 をコードする遺伝子の欠失株では、既存 GFP-Num1 は母細胞に偏って分布していた (図 5-1 F)。また、ミトコンドリアの Mdm36、ダイニン重鎖の Dyn1 をコードする遺伝子の欠失でも、いずれも母細胞に偏って局在したままであった (図 5-1 G)。以上より、既存 Num1 の不均等分配は既知の相互作用に影響されないことが明らかになった。

GFP-Num1 は細胞膜上に巨大な斑点を形成する。FRAP でこの斑点 1 つの蛍光を光退色すると、蛍光回復はほとんど見られず (Kraft and Lackner, 2017; Omer et al., 2018) (図 5-1 H と I)、Num1 は細胞膜上の斑点と細胞質の間、および細胞膜上の斑点間での交換が非常に遅いことが示唆された。また、細胞膜上の斑点は FRAP での観察中に動かなかった。以上より、既存 Num1 はセプチンによる拡散障壁に依らず、不動な構造体を形成することで母細胞に留まることが示唆された。

新生 Num1 の分配

次に、*GALI* プロモーターからの転写を 30 分間だけ活性化すると、新生 GFP-Num1 は芽に巨大な輝点を形成していた (図 5-2 A)。小胞体の *Scs2/Scs22*、ミトコンドリアの *Mdm36*、ダイニン重鎖の *Dyn1* をコードする遺伝子の欠失株では、いずれも芽に偏って局在したままであったことから、新生 Num1 の不均等分配は既知の相互作用によるものではないことが示唆された (図 5-2 B)。

既存・新生タンパク質を区別しない場合に、アクチン重合を促進するフォルミン *Bni1* をコードする遺伝子の欠失株で、Num1 の芽先端への局在が見られなくなることが報告されている (Farkasovsky and Kuntzel, 2001)。このことから、Num1 は *Bni1* と相互作用することで芽の先端に局在していると考えられてきた。しかし、*Bni1* は芽に偏って分布するタンパク質であるにも関わらず (Buttery et al., 2007)、既存の Num1 は母細胞に留まるため、相互作用以外の機構で Num1 の芽への局在を制御している可能性があった。*Bni1* はアクチン重合に関わるこ

とから、アクチン重合を阻害するラトランクリン A で処理した際の GFP-Num1 の局在への影響を観察した。既存 GFP-Num1 の母細胞への偏った局在には影響が見られなかったのに対し、新生 GFP-Num1 は芽と母細胞両方に観察された (図 4-3 C と D)。Bni1 はラトランクリン A 処理した際も芽に局在することから (Buttery et al., 2007)、新生 Num1 の芽への偏った局在には、アクチンケーブルとミオシンによる輸送に関わることが示唆された。

出芽酵母では一部の mRNA がミオシンによって芽に輸送され、芽に特異的な遺伝子発現を引き起こすことが知られている (Shepard et al., 2003)。そこで、mRNA 輸送の影響を調べるために、mRNA とミオシンのアダプターの She2 (Takizawa and Vale, 2000) の新生 Num1 の局在への影響を調べた。*she2Δ* 株で、新生 GFP-Num1 は芽に偏って局在していたことから (図 4-3 E)、不均等分配は mRNA の芽への輸送が原因でないことが示唆された。従って、新生 Num1 か Num1 と相互作用する未知の分子が、ミオシンによって芽へと運搬されていると予想される。

Num1 によるミトコンドリアの分配制御

NUM1 と、ミトコンドリアの分裂に必要なダイナミン関連タンパク質をコードする *DNMI* の二重欠失株では、ミトコンドリアが芽に運搬されやすくなることが報告されている (Cervený et al., 2007)。Num1 はミトコンドリアと結合するため、Num1 が母細胞に留まることでミトコンドリアを母細胞に滞留させる役割があると考えられている。しかし、*NUM1* のみを欠失した株ではミトコンドリアは母細胞に留まるため (Cervený et al., 2007) (図 5-2 A と B)、

野生型株では Num1 はミトコンドリアの母細胞に滞留させるのに必要ないことが示唆されている。しかし、生育環境によっては野生型株でも Num1 がミトコンドリアの分配に関わっている可能性があるため、以前の研究 (Cervený et al., 2007) とは異なる生育環境で *num1* Δ株でのミトコンドリアの分布を調べる実験を行った。

ミトコンドリア外膜に移行する膜貫通ドメインをミオシンに融合したタンパク質を発現させ、ミトコンドリアを強制的に芽に運搬させると生育が顕著に阻害されることから (Klecker et al., 2013)、ミトコンドリアが一定量母細胞に留まることが生存に重要であることが示唆されている。*num1* Δ株は非発酵性のグリセロールを炭素源にした培地で生育が遅いことが報告されていることから (Steinmetz et al., 2002) (図 5-2 C)、これがミトコンドリアの不均等な分配によるものであるかを調べた。野生型株では母細胞と芽の両方にミトコンドリアが観察されたのに対して、*num1* Δ株ではミトコンドリアが芽に偏って分布し、一部の細胞では芽だけに分布していた (図 5-2 D と E)。従って、野生型株でも非発酵条件においては、Num1 がミトコンドリアの一部を母細胞に留めていることが明らかになった。

考察

従来の Num1 の分布の研究とは異なり、本章では既存・新生タンパク質に着目して研究を行った。それによって既存 Num1 が、セプチンによって形成される拡散障壁に依らず、安定で不動な巨大構造体を形成することで母細胞に留まることを明らかにした (図 5-1 と 5-4)。巨大構造体の形成には、コイルドコイルドメインとホスファチジルイノシトール 4,5-ビスリン

酸に結合する PH ドメインのみが必要であることが報告されている (Tang et al., 2012)。コイルドコイルドメインはホモ二量体を形成することが知られているが (Tang et al., 2012)、どのように巨大構造体を形成するかは不明である。このコイルドコイルドメインはミトコンドリアの Mdm36 やダイニンと結合することが報告されているが (Cervený et al., 2007; Farkasovsky and Küntzel, 2001)、これらのタンパク質をコードする遺伝子の欠失株でも巨大構造体は形成されており、既存タンパク質が母細胞に留まっていた (図 5-1 G)。従って、複数の因子が冗長的に巨大構造体の形成を促進しているか、これらのタンパク質以外の因子が巨大構造体の形成に関わっていると考えられる。また、PH ドメインも巨大構造体の形成に必要であるため (Tang et al., 2012)、脂質膜への結合による拡散の制限や、膜マイクロドメインへの集積が関わっている可能性がある。

また、新生 Num1 の芽への分配は、芽先端に局在する Bni1 との相互作用ではなく、アクチンとミオシンによる輸送に関わることが示唆された (図 5-2 と 5-4)。mRNA とミオシンのアダプターとして知られる She2 の欠失株でも新生 Num1 は芽先端に局在していたため (図 5-2 E)、新生 Num1 がミオシンによって輸送されているか、何らかの生体分子がミオシンによって輸送され、それに Num1 が結合するといった可能性が考えられる。

また、既存 Num1 の不均等分配が、非発酵条件でミトコンドリアを母細胞に滞留させるのに必要であることが示唆された (図 5-2 D と E, 5-4)。グルコースを含む発酵培地ではミトコンドリアは母細胞と芽に均等に分配されたことから (図 5-2 A と B)、非発酵条件などの一部

の条件でのみ Num1 がミトコンドリアの分配制御で重要な役割を果たすと考えられる。ミトコンドリアの分配は、Num1 以外にもミオシンによる芽への運搬や、ミトコンドリアの分裂・融合に影響されることが報告されている (Cervený et al., 2007; Chernyakov et al., 2013; Lackner et al., 2013)。また、ミトコンドリアは細胞膜、小胞体、液胞、脂肪滴、ペルオキシソームといった様々な生体膜・オルガネラに結合するため (Elbaz-Alon et al., 2014; Kakimoto et al., 2018; Kornmann et al., 2009; Lackner et al., 2013; Shai et al., 2018)、それらの結合がミトコンドリアの動きに影響している可能性がある。非発酵培地で遺伝子発現や代謝に変化が生じることで、これらのミトコンドリアの分配制御機構の一部に歪みが生じた際に、野生型株においても Num1 が必要になると推察される。

以上のように、既存・新生タンパク質に着目することで、Num1 の分配について新たな知見を得ることができた。また、野生型株でも非発酵条件下で、Num1 がミトコンドリアを母細胞に留めていることを発見した。さらに既存・新生タンパク質の分配を解析することによって、Num1 の分布を決定し、核やミトコンドリアの分配を制御する機構の理解が進むことが期待される。

6 章 細胞膜 t-SNARE タンパク質 Sso1 の均等分配機構と機能

背景

多くの既存細胞膜輸送体は、拡散が遅いために母細胞に留まることが知られている (Eldakak et al., 2010; Singh et al., 2017)。この報告に一致して、プロテオーム解析で 21 個の細胞膜貫通タンパク質は不均等度合が上位 5%以内であった (図 3-6 f)。それに対して、6 個の細胞膜貫通タンパク質 (Dnf2, Fks1, Gsc2, Itr1, Snc2, Sso1) は均等に分配されることが示唆され (図 3-6 g)、ターンオーバーが速いか、何らかの機構で既存タンパク質が芽に流入していると考えられた。

その中でも Sso1 は、パラログの Sso2 の不均等度合が高いことから、均等に分配されることによって Sso2 とは異なる細胞機能を制御していると予想された。Sso1 と Sso2 は、target-soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor (t-SNARE) タンパク質で、分泌小胞膜上の別の SNARE タンパク質と結合することで分泌小胞膜と細胞膜の融合を引き起こす (Burri and Lithgow, 2004)。従って、Sso1 や Sso2 の分配は芽あるいは母細胞でのエキソサイトーシスの効率に影響を与えている可能性がある。エキソサイトーシスは細胞壁の再構築因子、膜脂質、膜タンパク質を細胞壁や細胞膜に供給するため (Park and Bi, 2007)、既存 Sso1 の芽への分配が、細胞の極性生育や細胞壁・細胞膜ストレス耐性に関与していることが疑われた。そこで、Sso1 が均等に分配される機構の解明と、芽への局在が制御する細胞機能の発見を目指して研究を行った。

結果

リサイクルによる Sso1 の芽への移動

まず、誘導性の *GAL 1* プロモーターから発現することで、新生・既存 GFP-Sso1 と GFP-Sso2 の局在を調べた。出芽酵母では分泌小胞がミオシンによって芽に運ばれることに一致して (Park and Bi, 2007)、新生 GFP-Sso1 と GFP-Sso2 はいずれも芽に偏って局在しており、不均等度合の違いは新生タンパク質の分配によるものではないことが示唆された (図 6-1 A)。それに対して、既存 GFP-Sso2 は母細胞の細胞膜に偏って局在し、既存 GFP-Sso1 は芽と母細胞両方の細胞膜に等しく発現していた (図 6-1 B)。また、bFRAP で芽の蛍光を光退色した後の蛍光回復は GFP-Sso1 の方が GFP-Sso2 より早く、Sso1 は Sso2 に比べて芽への流入が速いことが確かめられた (図 6-1 C と D)。これらの結果より、既存 Sso1 の芽への流入が、Sso1 が低い不均等度合を示した原因であることが示唆された。

この既存 Sso1 の芽への流入の機構を解明するために、まず Sso1 と Sso2 の拡散速度を比較した。FRAP で細胞の一部分の蛍光を光退色した際の回復を調べると、GFP-Sso1 と GFP-Sso2 で蛍光回復に大きな違いはなく、半増期に有意差が見られなかった (図 6-2 A と B)。従って、Sso1 と Sso2 の拡散速度に違いがないことが示唆された。また芽の光退色後の蛍光回復を調べると、セプチン変異体の *cdc12-6* 株でも GFP-Sso2 の芽への流入は変化せず、GFP-Sso2 が母細胞に留まるのはセプチンによる細胞膜拡散障壁が原因でないことが明らかになった (図 6-2 C)。以上より、Sso1 と Sso2 の分配の違いは拡散速度の違いや細胞膜拡散障壁によるものではないことが示唆された。

出芽酵母では、エンドサイトーシス後にリサイクルされるタンパク質は芽に運搬されることが報告されている (Valdez-Taubas and Pelham, 2003)。そこで、Sso1 がリサイクルされているかを調べた。GFP-Sso1 に Kex2 のエンドサイトーシスシグナルの NPFXD シグナルを加えると (NPF-GFP-Sso1)、芽に偏って局在するようになる (Valdez-Taubas and Pelham, 2003) (図 6-3 A)。それに対して、NPF-GFP-Sso2 は母細胞と芽の両方に存在した (図 6-3 B)。従って、Sso1 に比べて Sso2 はリサイクルされにくいと考えられる。リサイクルされるタンパク質は、*rcy1Δ* 株で細胞内の小胞に蓄積することが報告されている (Wiederkehr et al., 2000; Xu et al., 2017)。GFP-Sso1 は *rcy1Δ* 株で小胞への局在が見られたのに対し、GFP-Sso2 は細胞膜のみに局在した (図 6-3 B)。さらに、クラスリンとアクチンのアダプターの Sla2 を欠失することでエンドサイトーシスが抑制された株で、bFRAP によって Sso1 の芽への流入を調べると、野生型株に比べて流入が少なかった (図 6-3 C と D)。以上より、Sso1 はエンドサイトーシスされ、リサイクルされることが明らかとなり、それによって既存タンパク質が母細胞から芽へと移動することが示唆された。

Sso1 のリサイクルによる細胞伸長促進

Sso1/2 はエキソサイトーシス時の膜融合を引き起こし、細胞生育時の細胞壁再構築因子や膜脂質を細胞膜・細胞壁に輸送するのに必須となる (Aalto et al., 1993; Burri and Lithgow, 2004)。また、Sso1/2 のホモログは、真菌や植物細胞、動物細胞において細胞伸長に必要であることが報告されている (Bernardo et al., 2014; Darios and Davletov, 2006; Ichikawa et al., 2014)。そこで、

Sso1 の分配の細胞伸長への影響を調べた。

2 倍体の出芽酵母は、窒素やアミノ酸の飢餓時に酵母型から偽菌糸型と呼ばれる形態になる (Gimeno et al., 1992)。偽菌糸型では細胞が伸長し、固体培地を侵襲して内部に入り込むことで、栄養が豊富な場所を探すことが知られている。そこで、2 倍体細胞をアミノ酸飢餓培地で生育すると、ホモ *SSO1* 欠失株の *sso1Δ/sso1Δ* 株は、野生型株や *sso2Δ/sso2Δ* 株に比べて細胞が短かった (図 6-4 A)。

偽菌糸は固体培地の内部に入り込み、細胞の長さを定量することが困難であるため、より下流のシグナル経路で細胞伸長を引き起こす系を用いて、細胞伸長の定量を試みた。出芽酵母の先端成長と等方性成長はサイクリン依存性キナーゼによって制御されており、偽菌糸の細胞伸長も G2 期停止によって引き起こされる (Kron et al., 1994)。そこで、サイクリン依存性キナーゼの変異体で、制限温度でサイクリン B との相互作用が失われて G2 期停止を引き起こす *cdc28-1N* 株 (Surana et al., 1991) を用いて細胞伸長を計測した。制限温度の 37°C で 180 分培養して細胞伸長を誘導すると、*sso1Δ* 株は野生型株と *sso2Δ* 株に比べて芽が有意に短かった (図 6-4 B と C)。また、細胞伸長時に GFP-Sso1 は芽先端の細胞膜に蓄積していたのに対して、GFP-Sso2 は母細胞に比べて芽先端の蛍光が弱かった (図 6-4 D)。

実際に、Sso1/2 のリサイクルが細胞伸長を促進するかを確かめるために、Kex2 のエンドサイトーシスシグナルを GFP-Sso2 に融合した NPF-GFP-Sso2 を発現した際の細胞伸長を観察した。まず、細胞伸長時の NPF-GFP-Sso2 の局在を調べると、GFP-Sso2 とは異なり芽先端にも

観察された (図 6-4 D)。次に、*cdc28-1N sso1Δ* 株の染色体 *SSO2* の 5'側に *GFP* または *NPF-GFP* を導入した株を構築した。これらの株の G2 期停止時の細胞伸長を調べると、*NPF-GFP-SSO2* 株が *GFP-SSO2* 株に比べて芽が有意に長かった (図 6-4 E と F)。以上より、Sso1/2 のエンドサイトーシスによる局在移動が細胞伸長を促進することが示唆された。これは、Sso1 がエンドサイトーシスされた後にリサイクルされて芽の先端に運ばれることで、芽先端での細胞壁再構築因子や膜成分を供給するエキソサイトーシスの効率が上昇するためであると考えられる (図 6-4 G)。

Sso1 のリサイクルによる細胞壁ストレス耐性の向上

出芽酵母の芽が成長する際には、細胞壁の再構築が必要である (Levin, 2011)。そこで、既存 Sso1 はリサイクルによって芽へと運ばれることから、Sso1 のエンドサイトーシスの細胞壁完全性維持への影響を調べた。以前に報告されているように (García et al., 2015)、*sso1Δ* 株は、キチンに結合して細胞壁の構造を変えるコンゴーレッドに感受性を示した (図 6-5)。それに対して、*sso2Δ* 株は野生型株と同程度の耐性が見られた。同様の結果が、コンゴーレッドと類似の機構で細胞壁ストレスを引き起こすカルコフロールホワイトに対しても見られた。エンドサイトーシスシグナルを *SSO2* に付加したところ、コンゴーレッドとカルコフロールホワイトの両方への耐性が向上した (図 6-5)。以上より、Sso1 はリサイクルによって芽に移動することで、細胞壁ストレス耐性を高めていることが示唆された。

考察

Sso1 の分配

窒素飢餓による偽菌糸形成時には、細胞が伸長し、固体培地の内部に侵襲することで栄養の多い場所を探す (Gimeno et al., 1992)。窒素飢餓時にはタンパク質合成が大きく減るため (Kelly and Bedwell, 2015)、Sso1 のリサイクルは Sso1 の合成を増やすより効率的に芽先端での発現量を増やすことができると推察される。

Saccharomyces cerevisiae を初めとして、真菌の中には動物や植物に対して病原性を持つものが多数存在する (Bernardo et al., 2014; McCusker et al., 1994; Riquelme et al., 2018)。偽菌糸や菌糸の形成は組織や細胞への侵襲を引き起こし、*Saccharomyces cerevisiae* を含む様々な種の真菌症の発症において重要な役割を果たすことが知られている (Bernardo et al., 2014; McCusker et al., 1994; Riquelme et al., 2018)。従って、Sso1 や Sso1 ホモログのリサイクルによる細胞伸長促進が、真菌の病原性に関係していることが予想される。また、Sso1 のホモログは動物細胞や植物細胞の伸長にも必要である (Darios and Davletov, 2006; Ichikawa et al., 2014)。特に植物の Sso1 のホモログ SYP123 は、リサイクルされることで細胞伸長部位に運搬されることが知られており (Ichikawa et al., 2014)、高等真核生物でも Sso1 ホモログのリサイクルが、細胞伸長を促進していると予想される。

また、Sso1 のエンドサイトーシスは、細胞壁ストレスへの耐性を向上させていることを明らかにした。コンゴーレッドとカルコフロールホワイトはいずれも細胞壁のキチンに結合することで、細胞壁の構造を変化させる (Kopecká and Gabriel, 1992; Roncero and Durán, 1985;

Vannini et al., 1983)。出芽酵母では、特に芽で成長のために細胞壁の再構築を活発に行っており (Levin, 2005; Park and Bi, 2007)、細胞壁が不安定な状態であることが予想される。Sso1 の芽への移動は、細胞壁再構築因子のエキソサイトーシスの効率を高め、より丈夫な細胞壁を構築する、あるいは生じた損傷を速やかに修復することで細胞壁ストレスへの耐性を高めていると考えられる。細胞壁はヒトの細胞には存在しないために抗真菌剤の重要な標的であり、カルコフロールホワイトも抗真菌剤としての応用が検討されている (Kingsbury et al., 2012)。Sso1 のエンドサイトーシスによる細胞壁ストレス耐性向上の発見は、新たな抗真菌剤の開発や抗真菌剤耐性獲得の機構解明につながる可能性がある。

また、既存 Sso2 が母細胞に留まることにも何らかの意義がある可能性がある。局所的な細胞膜・細胞壁損傷時には、細胞極性の形成やエキソサイトーシスに関わるタンパク質が損傷部位に集積することが知られている (Kono et al., 2012)。この母細胞の細胞膜・細胞壁損傷時に、Sso2 の母細胞への蓄積が、損傷部位でのエキソサイトーシスの効率を上昇させていることが予想される。

3 章のプロテオーム解析で、Sso1 以外にも 5 個の細胞膜貫通タンパク質 (Dnf2, Fks1, Gsc2, Itr1, Snc2) の不均等度合が低かった (図 3-6 g)。この内、Itr1 は既存タンパク質の分解によって、不均等度合が小さくなったと考えられる (3 章)。他の 4 つのタンパク質は、いずれも芽に偏って局在することが報告されていることから (Huh et al., 2003; Weill et al., 2018)、エンドサイトーシス後のリサイクルによって芽に輸送されている可能性がある。実際、Snc2 のパラ

ログの Snc1 はリサイクルのターゲットであることが知られている (Valdez-Taubas and Pelham, 2003)。また、これら 4 つのタンパク質は、それぞれ細胞極性の形成や、細胞壁の合成、エキソサイトーシスに関わることから (Burri and Lithgow, 2004; Das et al., 2012; Inoue et al., 1995)、芽への局在が Sso1 と同様に細胞極性生育や細胞壁ストレス耐性に関わると予想される。

7 章 結論

本研究では、既存・新生タンパク質の分配のプロテオーム解析を行うことで、細胞表面タンパク質の分配を制御する局在・ドメインを発見した。ドメインの解析によって、小胞体-細胞膜接触部位タンパク質の不均等分配に小胞体膜貫通ドメインと細胞膜結合ドメインの両方が必要であることを明らかにした。このことを元に、セプチンによる細胞膜結合小胞体の分断が小胞体-細胞膜接触部位タンパク質の母細胞と芽の間の流出入を制限していることを明らかにした。また、プロテオーム解析で、同じドメインを持つ大多数のタンパク質とは異なった分配を示すタンパク質を発見した。核やミトコンドリアの分配に関わる Num1 は、既存タンパク質が不動な巨大構造体を形成し、新生タンパク質がアクチン依存的に芽に集積することを明らかにした。さらに、Num1 が非発酵条件下でミトコンドリアを母細胞に留める役割があることを発見した。また、細胞膜 t-SNARE タンパク質の Sso1 は、パラログの Sso2 を含む多くの細胞膜貫通タンパク質が不均等に分配されたのに対して、均等に分配された。これは、既存 Sso1 がエンドサイトーシスされた後にリサイクルされることで芽に移動するためであり、芽での発現量を増やすことで偽菌糸形成時の細胞伸長を促進し、細胞壁ストレス耐性を向上させていることを明らかにした。

以上より、出芽酵母の細胞表面において既存・新生タンパク質の分配が多様な機構で制御され、多様な細胞機能を制御することを明らかにした。また、本論文での発見は、出芽酵母のみならず様々な真核生物の非対称分裂や細胞内区画化、細胞極性生育の研究に波及し、こ

れまで説明のつかなかった生命現象や疾患の理解につながることを期待される。

図表

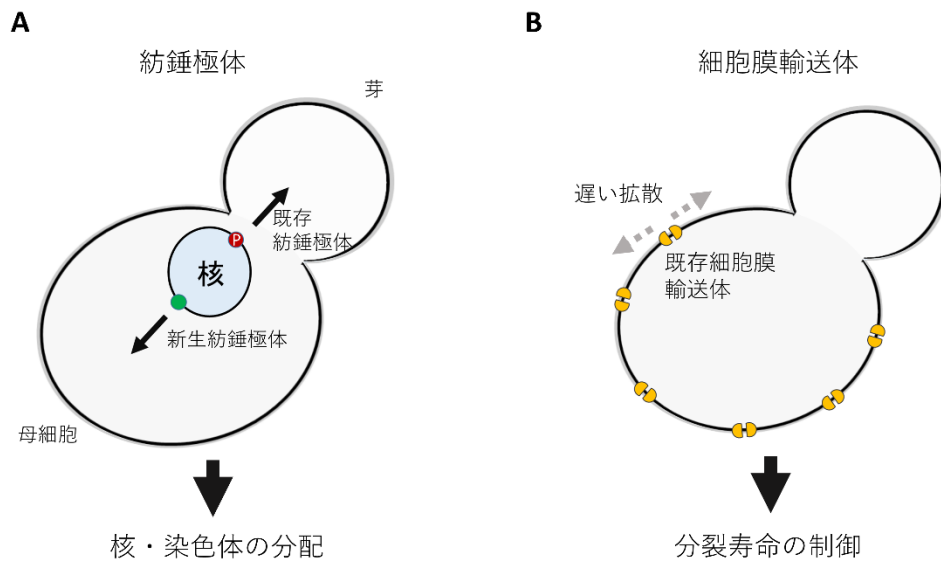


図 1-1. 既存・新生タンパク質分配の機構と機能

(A) 既存・新生紡錘極体と核の分配。既存の紡錘極体タンパク質 Nud1 が G1 期にリン酸化を受けることで、G2 期に合成される紡錘極体と区別される (Lengefeld et al., 2017)。これによって、核および染色体の母細胞と芽への運搬が制御される。

(B) 既存細胞膜輸送体の分配。細胞膜輸送体は拡散が遅いために母細胞に留まり、母細胞での発現量が増えることで、分裂寿命が増減するとされる (Eldakak et al., 2010; Singh et al., 2017)。

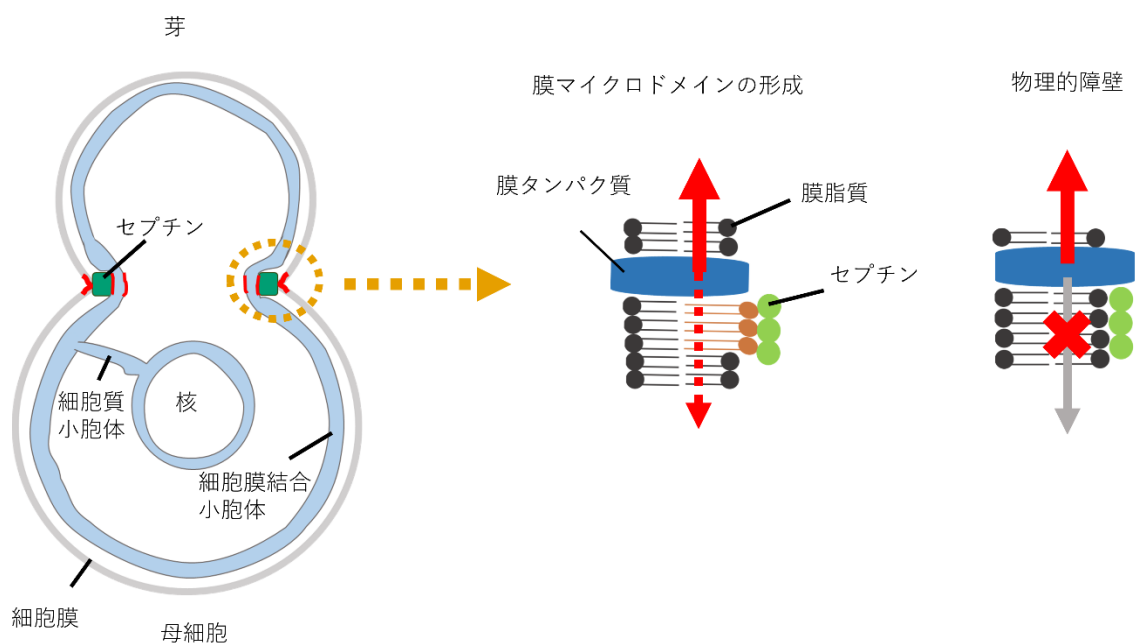


図 1-2. 拡散障壁仮説

母細胞と芽の間のくびれに局在するセプチンが、細胞膜と小胞体膜のタンパク質の拡散を局所的に制限する。セプチンや、セプチンと相互作用するタンパク質が膜脂質に結合することで、膜マイクロドメインを形成するか、物理的な障壁となることで膜タンパク質の拡散を制限するとされる (Faty et al., 2002)。

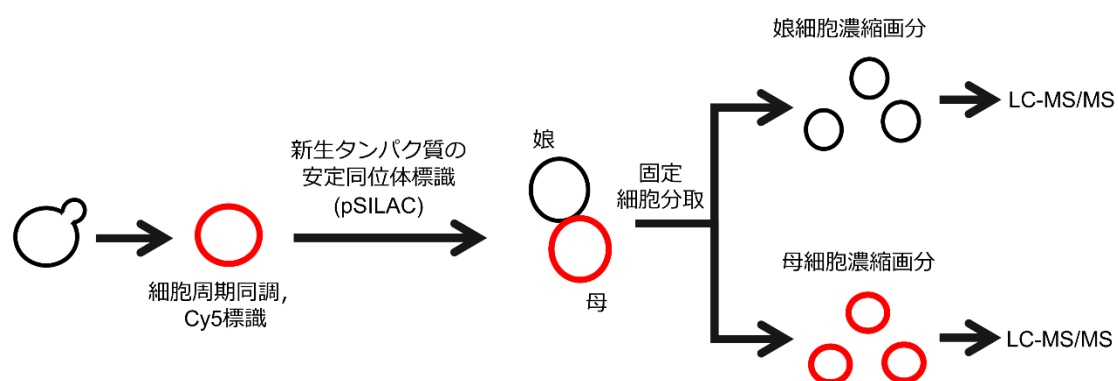


図 3-1. 既存・新生タンパク質分配のプロテオーム解析法

接合フェロモンで細胞周期を G1 期に停止させ、細胞外部のタンパク質を Cy5 で標識した。G1 期停止解除後、安定同位体標識アミノ酸を含む培地で培養し、新生タンパク質を標識した。一細胞周期培養した後に、タンパク質合成・分解を停止させるためにメタノール固定を行った。フローサイトメーターで Cy5 標識された母細胞と、標識されていない娘細胞を分取し、それぞれの新生・既存タンパク質の比率を質量分析器で定量した。

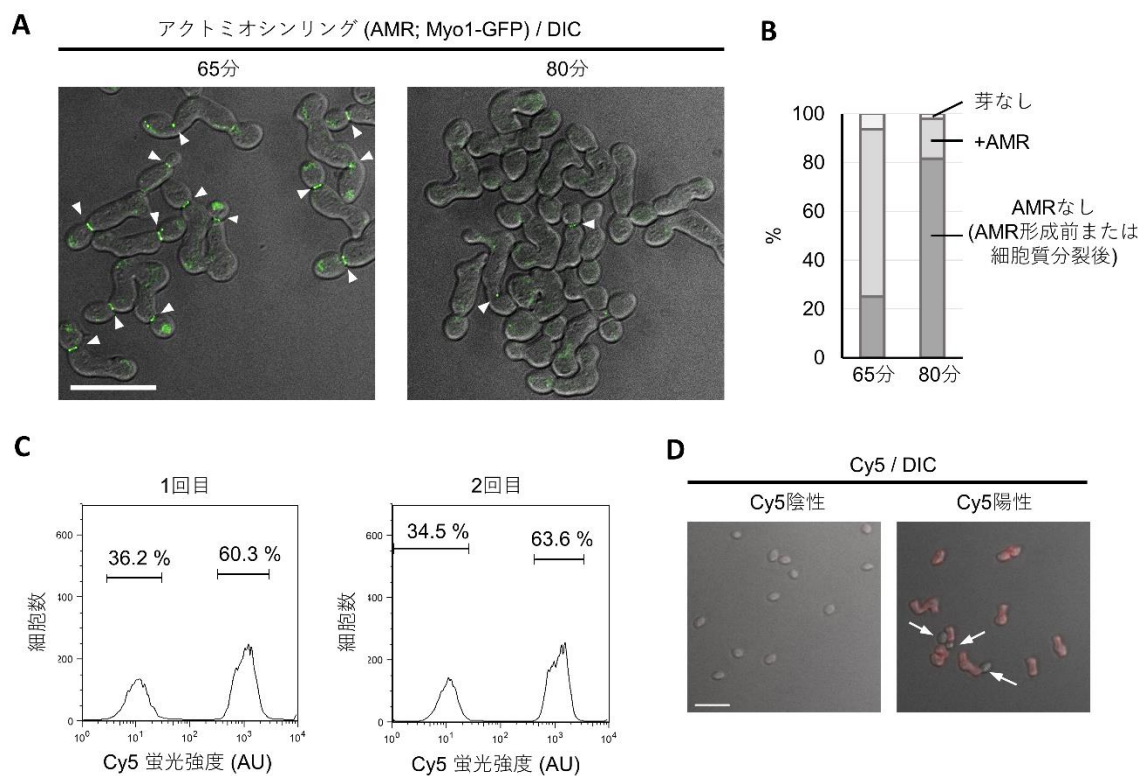


図 3-2. 細胞周期の同調と母・娘細胞の分画

(A と B) 細胞周期の同調。接合フェロモンで G1 期停止を引き起こした後、洗浄してから 65 分 ($n = 64$) と 80 分 ($n = 49$) で、細胞質分裂の指標であるアクトミオシンリング (actomyosin ring, AMR) の収縮の割合を調べた。矢じりは、くびれに局在する AMR を示す。スケールバーは 15 μm 。

(C) 母細胞と娘細胞の割合。フローサイトメーターで測定した Cy5 標識されている母細胞と、標識されていない娘細胞の割合。

(D) 分取後の酵母。Cy5 陽性画分には、接合突起を形成していない Cy5 陰性の娘細胞が母細胞から分断されなかったために、混入していた (矢印)。スケールバーは 15 μm 。

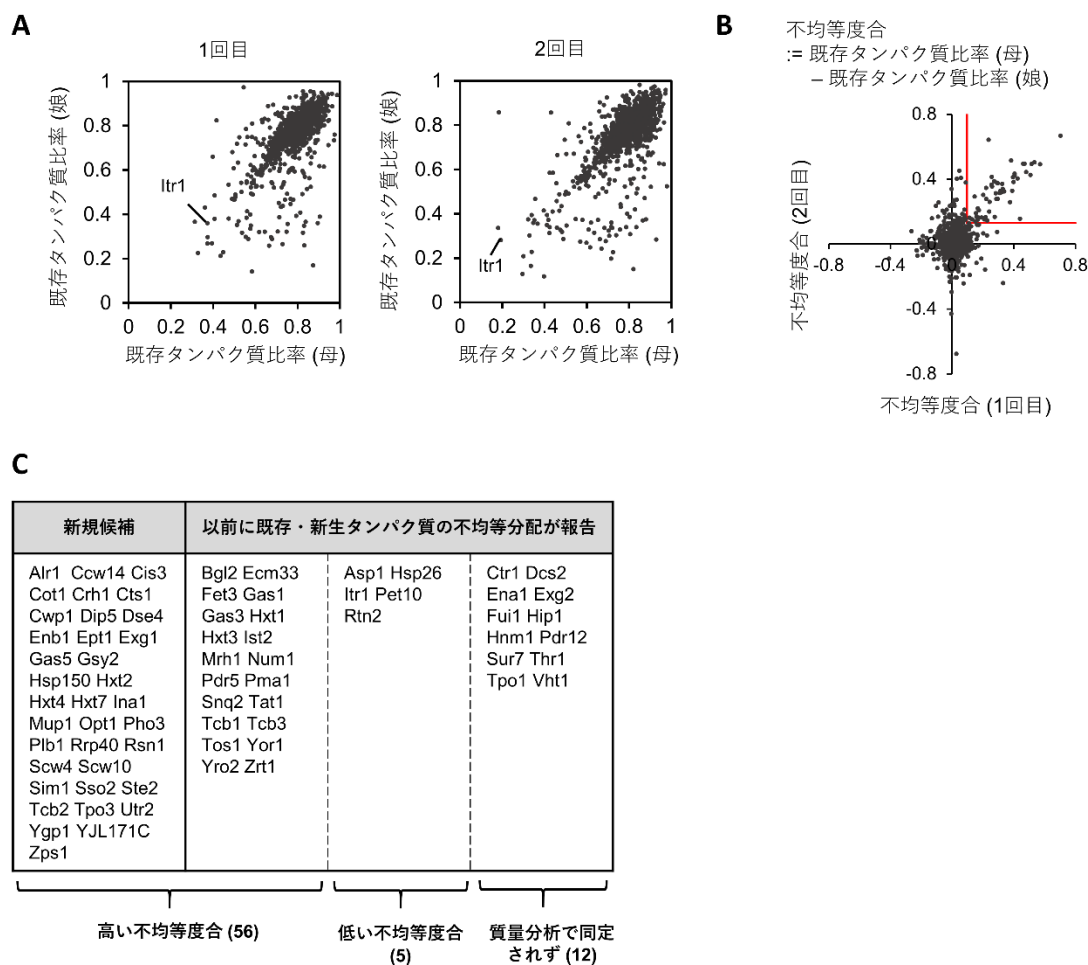


図 3-3. 既存・新生タンパク質分配のプロテオーム解析

(A) 母細胞濃縮画分、娘細胞濃縮画分それぞれでの既存タンパク質比率。既存タンパク質比率は、 ^{12}C と ^{14}N で標識されたリシン残基またはアルギニン残基を含むペプチドの割合を既存タンパク質比率と定義した。

(B) 不均等度合のプロット。赤線は上位 5%を示す。

(C) 不均等に分配された既存・新生タンパク質。高い不均等度合は 2 回の実験で共に不均等度合が上位 5%の閾値より大きかったタンパク質を、低い不均等度合は 2 回の実験で共に不均等度合の絶対値が上位 5%の閾値より小さかったタンパク質を示す。括弧内の数字は、同定されたタンパク質の数を示す。

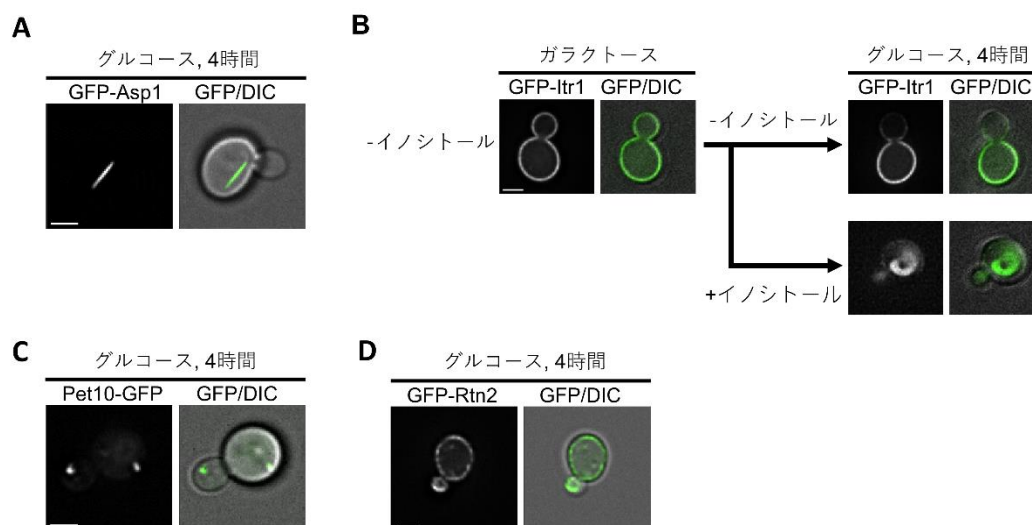


図 3-4. 過去に不均等分配が報告されたタンパク質の分配

(A) 既存 GFP-Asp1 の局在。グルコースを加えて、*GAL1* プロモーターからの *GFP-ASP1* の転写を抑制した。スケールバーは 2 μm を示す。

(B) イノシトールの既存 GFP-Itr1 の局在への影響。イノシトールを含まない培地と、10 mg/L のイノシトールを含む培地で培養した。グルコースを加えて、*GAL1* プロモーターからの *GFP-ITR1* の転写を抑制した。スケールバーは 2 μm を示す。

(C と D) 既存 Pet10-GFP (C) と GFP-Rtn2 (D) の局在。グルコースを加えて、*GAL1* プロモーターからの転写を抑制した。スケールバーは 2 μm を示す。

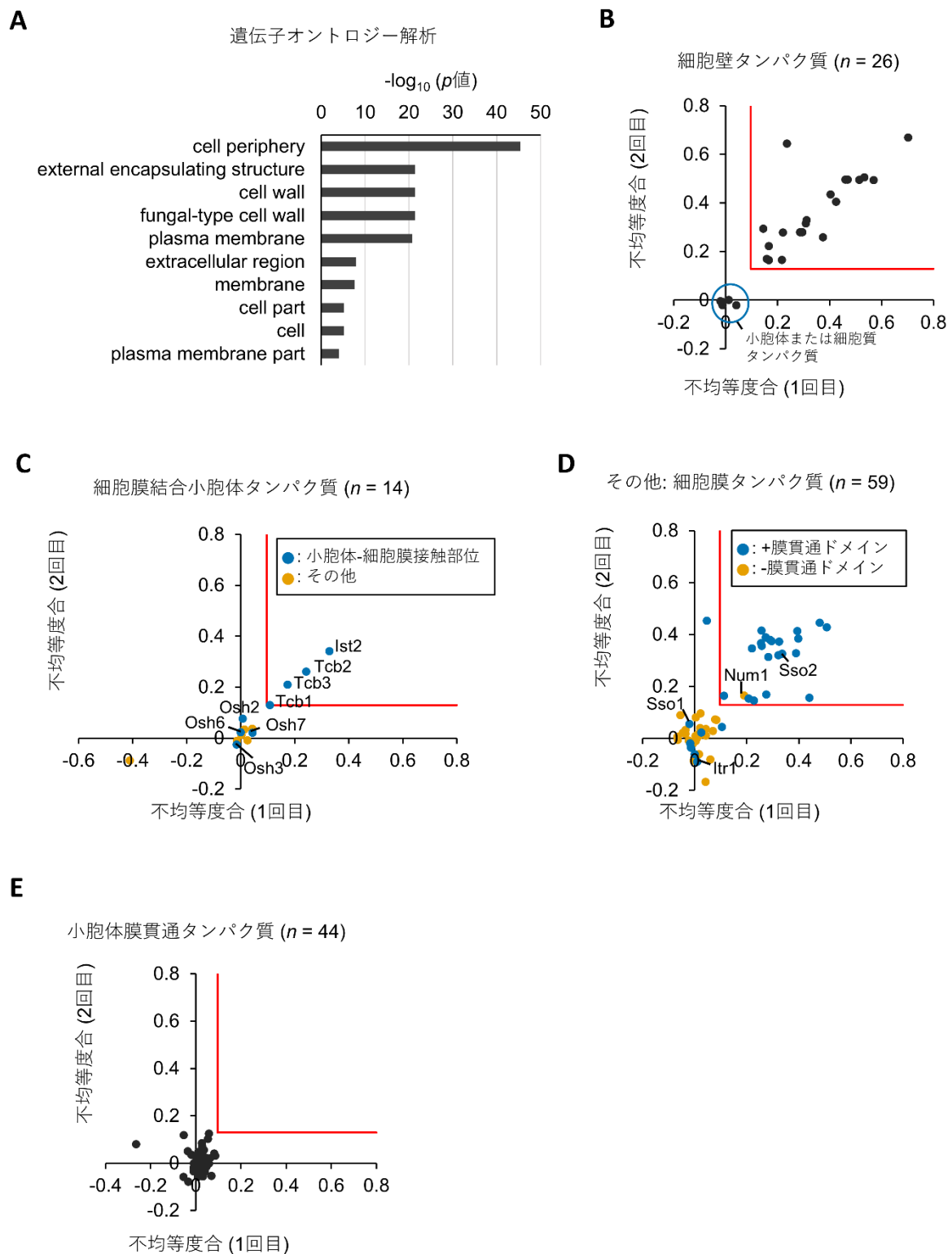


図 3-5. 細胞表面タンパク質の分配の解析

(A) 不均等度合が上位 5%であった 56 個のタンパク質の遺伝子オントロジー解析 (cellular components)。

(B) 細胞壁タンパク質 (遺伝子オントロジー: Fungal type cell wall) の不均等度合。青い円は、主に細胞質や小胞体に局在することが報告されているタンパク質を示す (Huh et al., 2003; Weill et al., 2018)。赤線は、図 3-3 B と同じ閾値を示す (C-E も同様)。

(C) 細胞膜結合小胞体タンパク質 (遺伝子オントロジー: cortical endoplasmic reticulum) の不均等度合。青点は、小胞体-細胞膜接触部位への局在が報告されているタンパク質を示す (Manford et al., 2012; Schulz et al., 2009)。

(D) その他の細胞表面タンパク質 (遺伝子オントロジーに plasma membrane, cell periphery, cell cortex のいずれかを含み、かつ fungal-type cell wall と cortical endoplasmic reticulum を含まないもの) の不均等度合。蛍光顕微鏡で細胞表面に局在することが確認されているタンパク質 (Huh et al., 2003; Weill et al., 2018) のみを示した。膜貫通ドメインの有無は、TMHMM (Krogh et al., 2001) で予測した。

(E) 小胞体膜貫通タンパク質 (遺伝子オントロジー: Endoplasmic reticulum) の不均等度合。膜貫通ドメインの有無は、TMHMM (Krogh et al., 2001) で予測した。

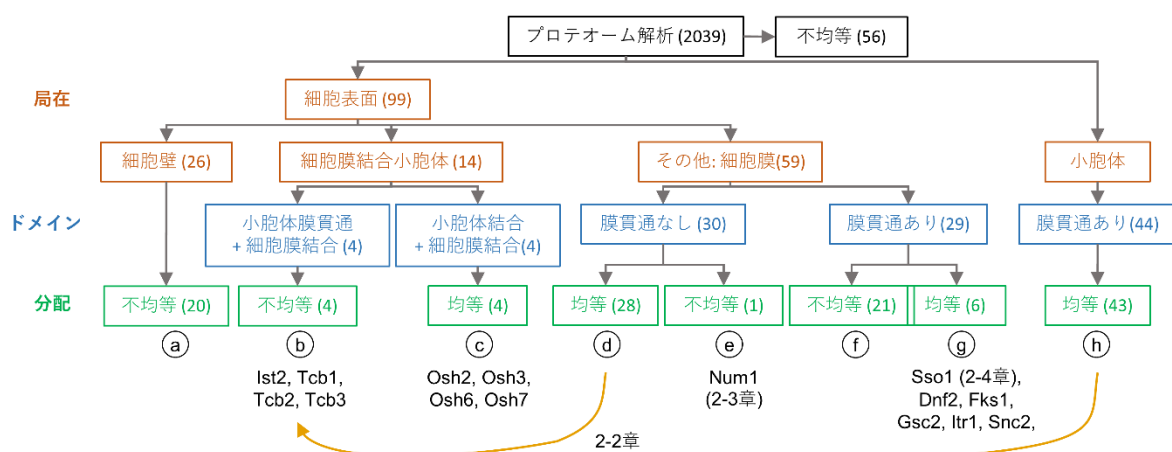


図 3-6. 細胞表面タンパク質の分配

細胞表面および小胞体膜貫通タンパク質の分配。不均等度合が 2 回の実験で共に上位 5 % であるタンパク質を不均等に分配されたと考え、不均等度合の絶対値が上位 5% の閾値以下であるタンパク質を均等に分配されたと考えた。括弧内の数字は同定されたタンパク質の数を示す。

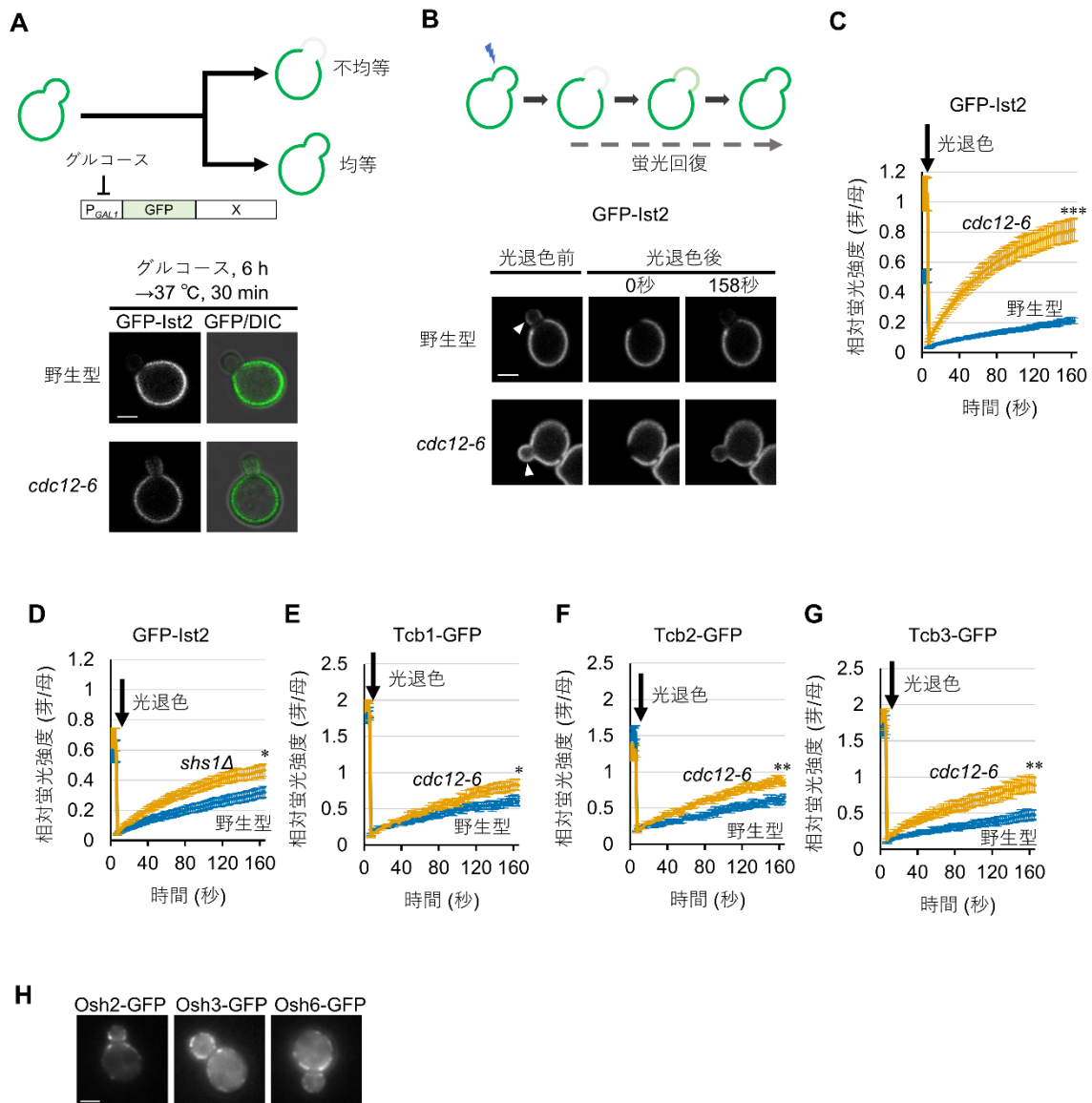


図 4-1. セプチンによる小胞体-細胞膜接触部位タンパク質のくびれでの流出入制限

(A) *cdc12-6* 株での既存 GFP-Ist2 の局在。グルコースを加えて *GAL1* プロモーターからの *GFP-IST2* の転写を 6 時間抑制し、制限温度 (37°C) で 30 分処理した。スケールバーは 2 μm を示す。

(B と C) *cdc12-6* 株での GFP-Ist2 の母細胞から芽への流入。bFRAP 法で、芽の蛍光を光退色し、母細胞からの流入を調べた。実験前に制限温度 (37°C) で 30 分処理した。矢じりは光退色した芽を示し、スケールバーは 2 μm を示す。エラーバーは標準誤差を示す。n = 15. ****p* < 0.001 (ウェルチの *t* 検定)。

(D) *shs1Δ* 株での GFP-Ist2 の母細胞から芽への流入。bFRAP 法で、芽の蛍光を光退色し、母細胞からの流入を調べた。エラーバーは標準誤差を示す。n = 15. **p* < 0.05 (ウェルチの *t* 検定)。

(E-G) *cdc12-6* 株での Tcb1-GFP (E), Tcb2-GFP (F), Tcb3-GFP (G) の母細胞から芽への流入。bFRAP

法で、芽の蛍光を光退色し、母細胞からの流入を調べた。実験前に制限温度 (37°C) で 30 分処理した。エラーバーは標準誤差を示す。 $n = 15$. $*p < 0.05$, $**p < 0.01$ (ウェルチの t 検定)。

(H) Osh2-GFP, Osh3-GFP, Osh6-GFP の局在。スケールバーは 2 μm を示す。

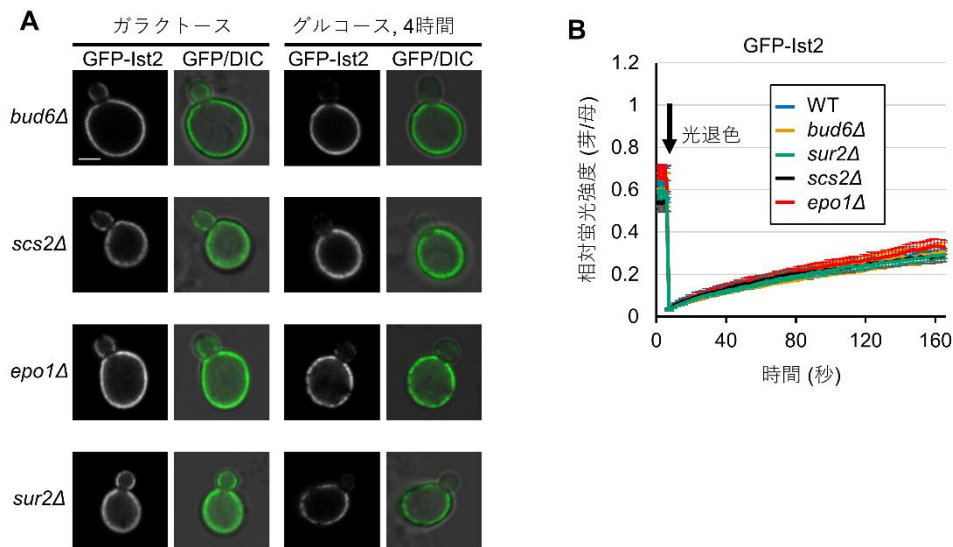


図 4-2. 非セプチンの小胞体区画化因子の Ist2 不均等分配への影響

(A) *bud6 Δ*, *sur2 Δ*, *scs2 Δ*, *epo1 Δ* 株での既存 GFP-Ist2 の局在。グルコースを加えて、*GALI* プロモーターからの *GFP-IST2* の転写を抑制した。スケールバーは 2 μ m を示す。

(B と C) *bud6 Δ*, *sur2 Δ*, *scs2 Δ*, *epo1 Δ* 株での GFP-Ist2 の母細胞から芽への流入。bFRAP 法で、芽の蛍光を光退色し、母細胞からの流入を調べた。エラーバーは標準誤差を示す。 $n=15$ 。光退色後 158 秒で、いずれの変異体株も野生型株に対して有意な差はなかった ($p > 0.05$; ウェルチの t 検定)。

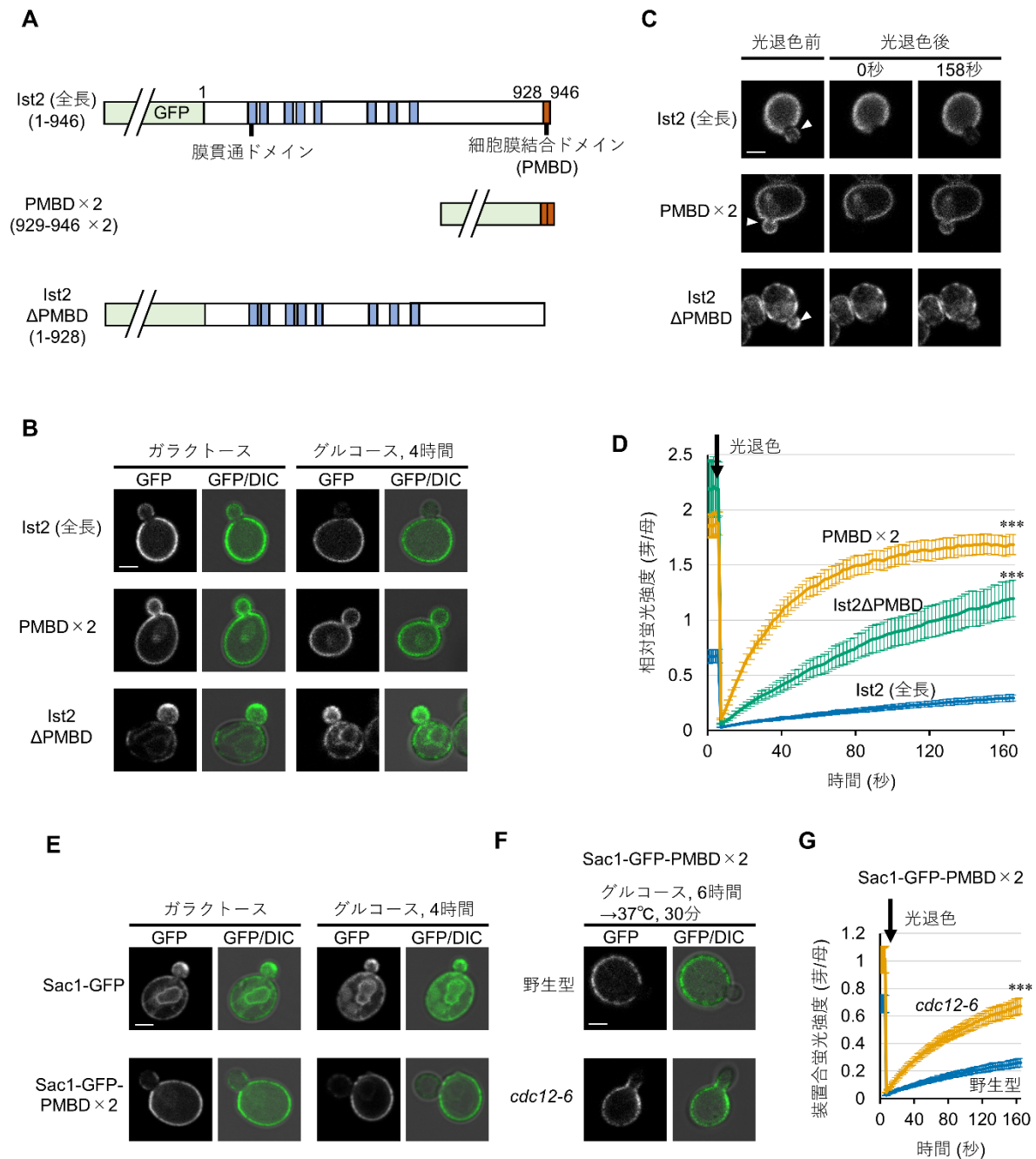


図 4-3. 細胞膜結合ドメインと小胞体膜貫通ドメインの Ist2 不均等分配への寄与

(A) 全長の GFP-Ist2, GFP-PMBD × 2 と GFP-Ist2 ΔPMBD のドメイン構造。

(B) 既存 GFP-PMBD × 2 と GFP-Ist2 ΔPMBD の局在。グルコースを加えて、*GAL1* プロモーターからの各遺伝子の転写を抑制した。スケールバーは 2 μm を示す。

(C と D) GFP-PMBD × 2 と GFP-Ist2 ΔPMBD の母細胞から芽への流入。bFRAP 法で、芽 (矢じり) の蛍光を光退色し、母細胞からの流入を調べた。スケールバーは 2 μm を示す。エラーバーは標準誤差を示す。n = 20. ***p < 0.001 (ボンフェローニ補正したウェルチの t 検定)。

(E) 既存 Sac1-GFP と Sac1-GFP-PMBD×2 の局在。グルコースを加えて、*GAL1* プロモーターからの各遺伝子の転写を抑制した。スケールバーは 2 μm を示す。

(F) *cdc12-6* 株での既存 Sac1-GFP-PMBD×2 の局在。グルコースを加えて *GAL1* プロモーターからの *SAC1-GFP-PMBD*×2 の転写を 6 時間抑制し、制限温度 (37°C) で 30 分処理した。スケールバーは 2 μm を示す。

(G) *cdc12-6* 株での Sac1-GFP-PMBD×2 の母細胞から芽への流入。bFRAP 法で、芽の蛍光を光退色し、母細胞からの流入を調べた。実験開始前に制限温度 (37°C) で 30 分処理した。エラーバーは標準誤差を示す。 $n = 15$. *** $p < 0.001$ (ボンフェローニしたウェルチの t 検定)。

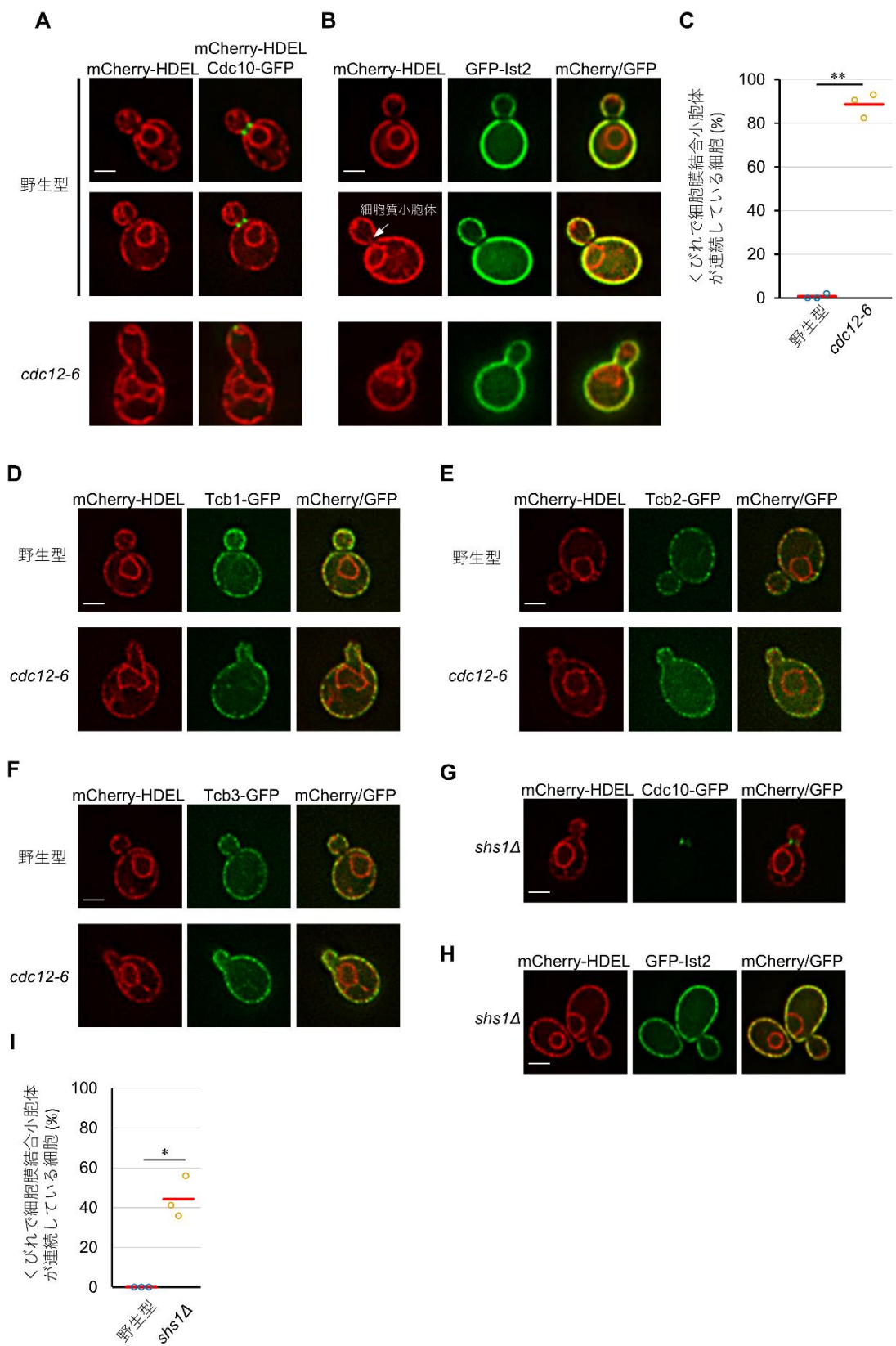


図 4-4. セプチンによる細胞膜結合小胞体の分断

(A) *cdc12-6* 株での小胞体内腔 (mCherry-HDEL) とセプチン (Cdc10-GFP) の局在。観察前に、制限

温度 (37°C) で 30 分処理した。スケールバーは 2 μ m を示す。

(B) *cdc12-6* 株での GFP-Ist2 と小胞体内腔 (mCherry-HDEL) の局在。観察前に、制限温度 (37°C) で 30 分処理した。スケールバーは 2 μ m を示す。

(C) 母細胞と芽で連続した細胞膜結合小胞体 (GFP-Ist2 と mCherry-HDEL が共局在した小胞体) を持つ細胞の割合。観察前に、制限温度 (37°C) で 30 分処理した。赤線は平均値を示す。50 個以上の細胞を 3 回ずつ観察した。** $p < 0.01$ (ウェルチの t 検定)。

(D-F) *cdc12-6* 株での小胞体内腔 (mCherry-HDEL) と Tcb1-GFP (D), Tcb2-GFP (E), Tcb3-GFP (F) の局在。観察前に、制限温度 (37°C) で 30 分処理した。スケールバーは 2 μ m を示す。

(G) *shs1* Δ 株での小胞体内腔 (mCherry-HDEL) とセプチン (Cdc10-GFP) の局在。スケールバーは 2 μ m を示す。

(H) *shs1* Δ 株での GFP-Ist2 と小胞体内腔 (mCherry-HDEL) の局在。スケールバーは 2 μ m を示す。

(I) 母細胞と芽で連続した細胞膜結合小胞体 (GFP-Ist2 と mCherry-HDEL が共局在した小胞体) を持つ細胞の割合。赤線は平均値を示す。50 個以上の細胞を 3 回ずつ観察した。 $*p < 0.05$ (ウェルチの t 検定)。

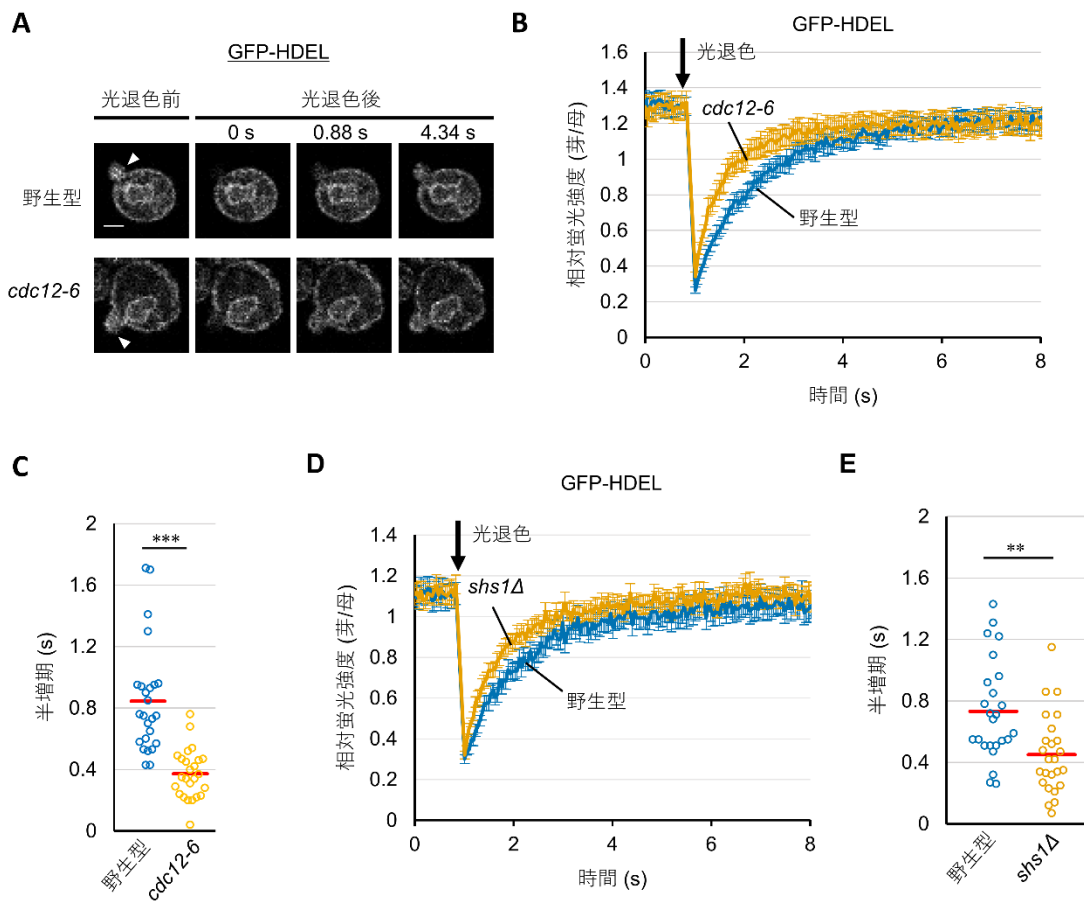


図 4-5. セプチンによるくびれでの小胞体内腔タンパク質の流入制限

(A と B) *cdc12-6* 株での GFP-HDEL の母細胞から芽への流入。bFRAP 法で、芽 (矢じり) の蛍光を光退色し、母細胞からの流入を調べた。実験前に、制限温度 (37°C) で 30 分処理した。スケールバーは 2 μm を示す。 $n = 25$ 。エラーバーは標準誤差を示す。

(C) B の蛍光回復率の半増期。赤線は平均値を示す。*** $p < 0.001$ (ウェルチの t 検定)。

(D) *shs1Δ* 株での GFP-HDEL の母細胞から芽への流入。bFRAP 法で、芽 (矢じり) の蛍光を光退色し、母細胞からの流入を調べた。 $n = 25$ 。エラーバーは標準誤差を示す。

(E) D の蛍光回復率の半増期。赤線は平均値を示す。** $p < 0.01$ (ウェルチの t 検定)。

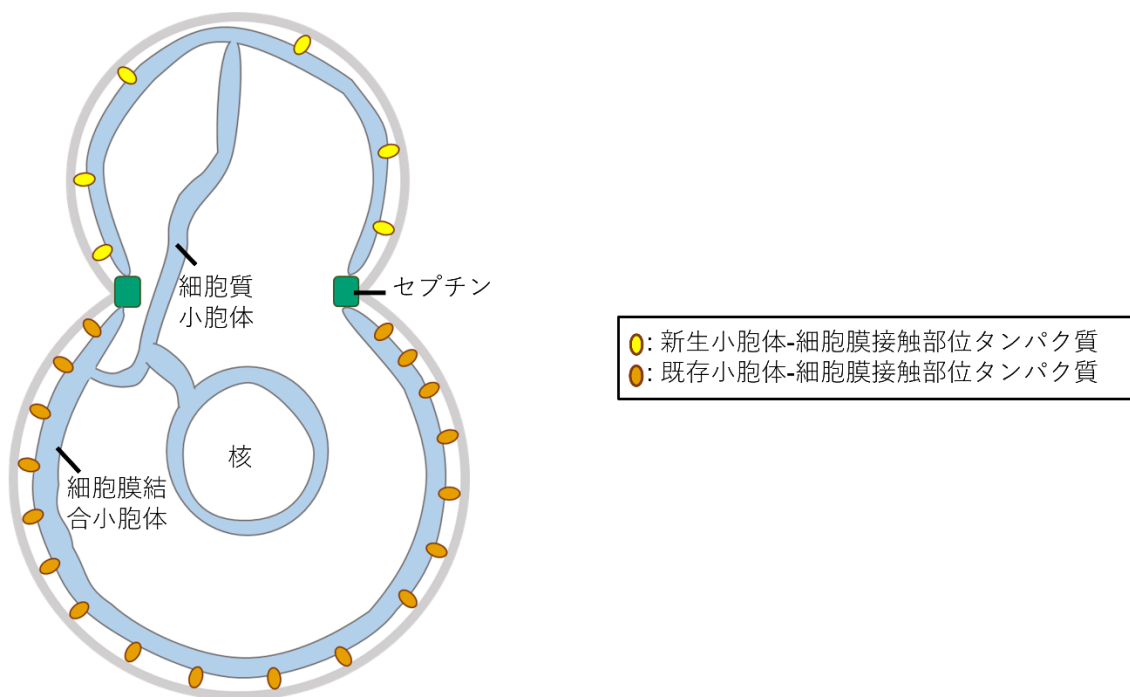


図 4-6. 小胞体-細胞膜接触部位タンパク質の不均衡分配モデル

セプチンが、くびれで細胞膜結合小胞体を分断することで、小胞体-細胞膜接触部位タンパク質の芽と母細胞の間での流出入を制限する。また、*IST2*, *TCB2*, *TCB3* の mRNA は、ミオシンによって芽に輸送され、新生タンパク質が芽に偏って局在する (Shepard et al., 2003; Takizawa et al., 2000)。

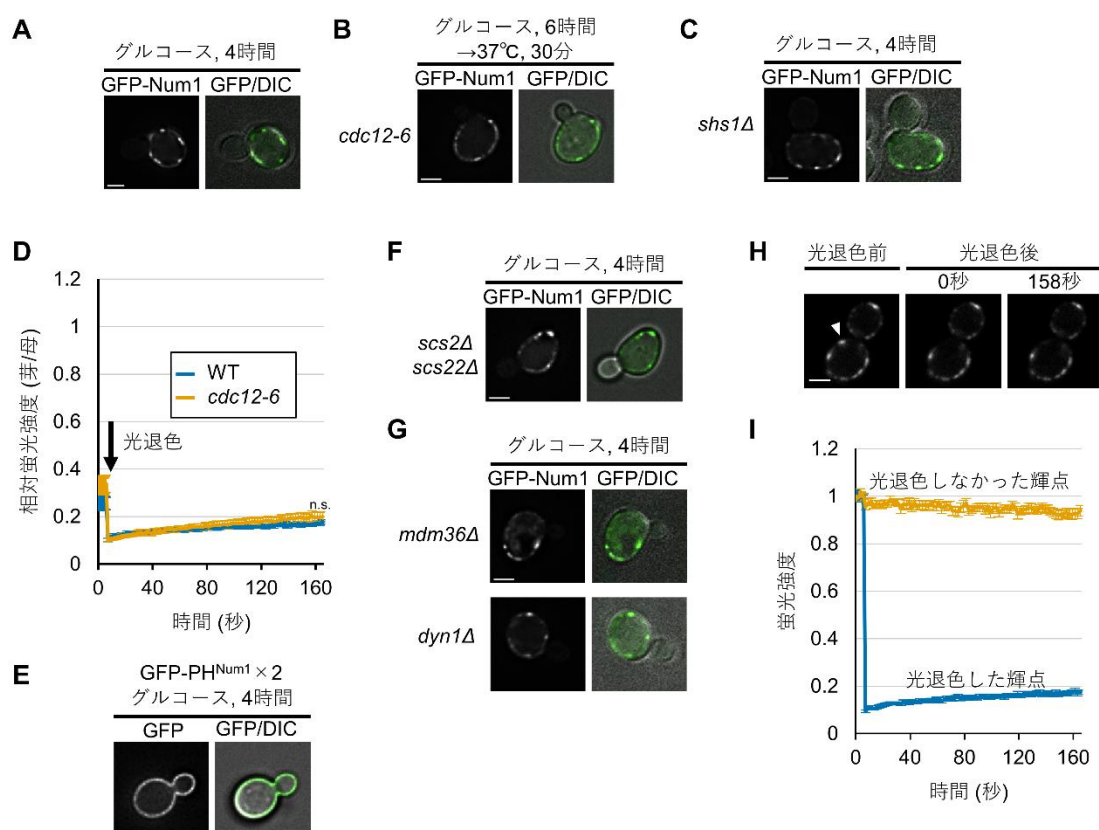


図 5-1. 既存 GFP-Num1 の分配

(A) 既存 GFP-Num1 の局在。グルコースを加えて、*GAL1* プロモーターからの各遺伝子の転写を抑制した。スケールバーは 2 μm を示す。

(B) *cdc12-6* 株での既存 GFP-Num1 の局在。グルコースを加えて、*GAL1* プロモーターからの各遺伝子の転写を抑制した。観察前に、制限温度 (37°C) で 30 分処理した。スケールバーは 2 μm を示す。

(C) *shs1Δ* 株での既存 GFP-Num1 の局在。グルコースを加えて、*GAL1* プロモーターからの各遺伝子の転写を抑制した。スケールバーは 2 μm を示す。

(D) *cdc12-6* 株での GFP-Num1 の母細胞から芽への流入。bFRAP 法で、芽の蛍光を光退色し、母細胞からの流入を調べた。実験前に制限温度 (37°C) で 30 分処理した。n = 15. エラーバーは標準誤差を示す。n.s.は有意差がないことを示す ($p > 0.05$; ウェルチの t 検定)。

(E) 既存 GFP-PH^{Num1}×2 の局在。グルコースを加えて、*GAL1* プロモーターからの各遺伝子の転写を抑制した。スケールバーは 2 μm を示す。

(F) *scs2Δ scs22Δ* 株での既存 GFP-Num1 の局在。グルコースを加えて、*GAL1* プロモーターからの各遺伝子の転写を抑制した。スケールバーは 2 μm を示す。

(G) *mdm36Δ* 株および *dyn1Δ* 株での既存 GFP-Num1 の局在。グルコースを加えて、*GAL1* プロモーターからの各遺伝子の転写を抑制した。スケールバーは 2 μm を示す。

(H と I) GFP-Num1 の輝点の FRAP。矢じりの輝点の蛍光を光退色し、蛍光回復を測定した。 $n = 10$.
スケールバーは $2\ \mu\text{m}$ を、エラーバーは標準誤差を示す。

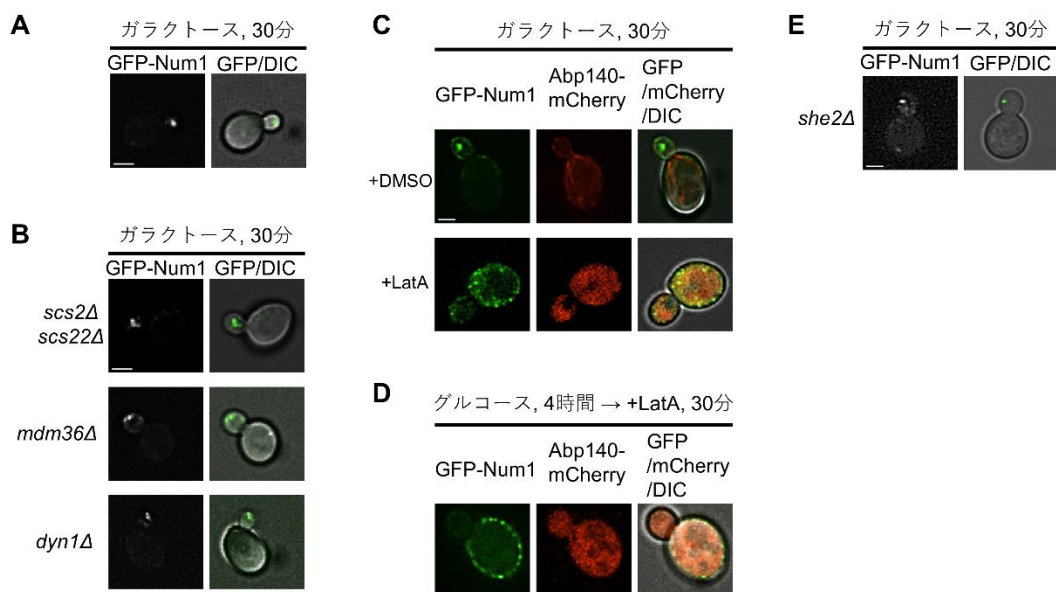


図 5-2. 新生 GFP-Num1 の分配

(A) 新生 GFP-Num1 の局在。ガラクトースを加えて、*GAL1* プロモーターからの発現を活性化した。スケールバーは 2 μm を示す。

(B) *scs2* Δ *scs22* Δ 株、*mdm36* Δ 株および *dyn1* Δ 株での新生 GFP-Num1 の局在。ガラクトースを加えて、*GAL1* プロモーターからの発現を活性化した。スケールバーは 2 μm を示す。

(C) ラトランクリン A (LatA) 処理時の新生 GFP-Num1 の局在。ガラクトースと LatA または DMSO を同時に加えて 30 分処理した。スケールバーは 2 μm を示す。

(D) LatA 処理時の既存 GFP-Num1 の局在。グルコースを加えて 4 時間培養し、LatA を加えて 30 分処理した。スケールバーは 2 μm を示す。

(E) *she2* Δ 株での新生 GFP-Num1 の局在。ガラクトースを加えて、*GAL1* プロモーターからの発現を活性化した。スケールバーは 2 μm を示す。

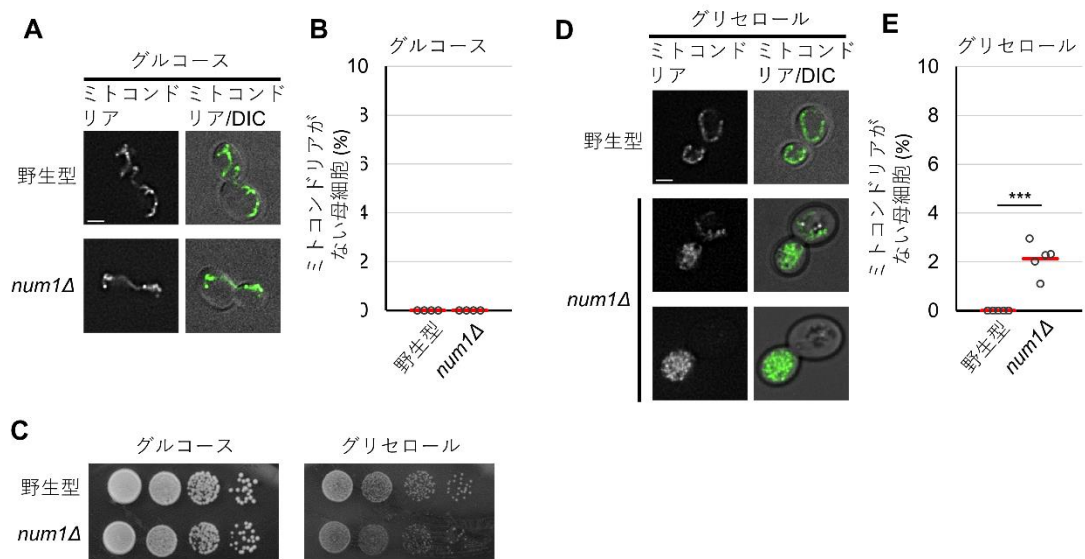


図 5-3. Num1 のミトコンドリアの分配への影響

(A) グルコース培地でのミトコンドリア (Yme2-GFP) の分布。スケールバーは 2 μm を示す。

(B) グルコース培地で培養した際の、ミトコンドリアを持たない母細胞の割合。各実験で 205 個以上の細胞を観察し、4 回実験を行った。赤線は平均値を示す。

(C) num1 Δ 株のグルコース培地 (2 日間)、またはグリセロール培地 (4 日間) での生育。

(D) グリセロール培地でのミトコンドリア (Yme2-GFP) の分布。スケールバーは 2 μm を示す。

(E) グリセロール培地で培養した際の、ミトコンドリアを持たない母細胞の割合。各実験で 213 個以上の細胞を観察し、5 回実験を行った。赤線は平均値を示す。*** $p < 0.001$ (ウェルチの t 検定)。

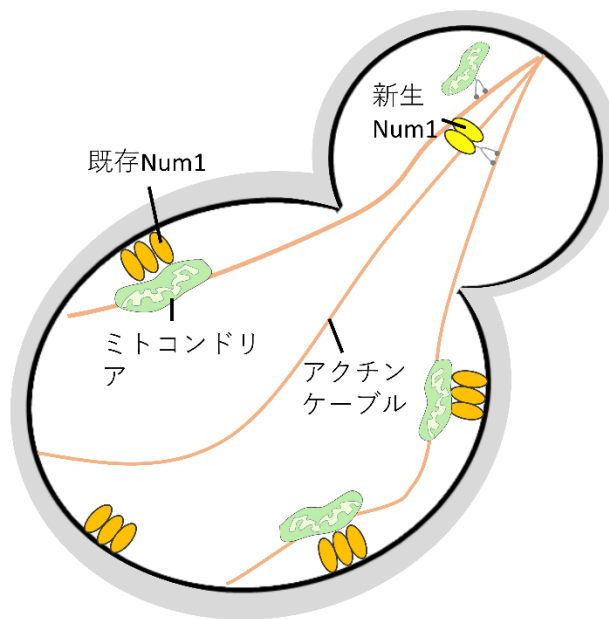


図 5-4. 既存・新生 Num1 とミトコンドリアの分配モデル

既存 Num1 は不動な構造体を形成することで、非発酵培地でミトコンドリアを母細胞に留める。分裂したミトコンドリアは、アクチンケーブルとミオシンによって芽に運搬される (Chernyakov et al., 2013)。また、新生 Num1 はアクチン依存的に芽へ運搬される。

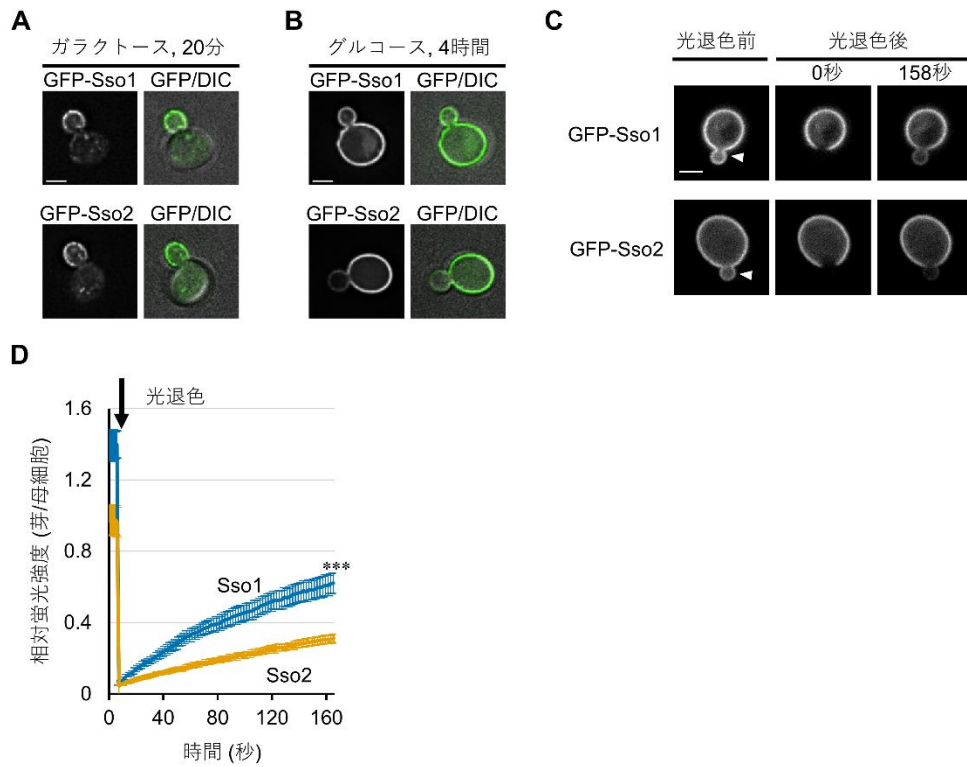


図 6-1. 既存・新生 Sso1/2 の分配

(A) 新生 GFP-Sso1/2 の局在。ガラクトースを加えて、*GAL1* プロモーターからの発現を 20 分間活性化した。スケールバーは 2 μm を示す。

(B) 既存 GFP-Sso1/2 の局在。グルコースを加えて、*GAL1* プロモーターからの発現を 4 時間抑制した。スケールバーは 2 μm を示す。

(C と D) GFP-Sso1/2 の芽への流入。bFRAP 法で、芽 (矢じり) の蛍光を光退色し、母細胞からの流入を調べた。スケールバーは 2 μm を、エラーバーは標準誤差を示す。 $n = 10$. *** $p < 0.001$ (ウェルチの t 検定)。

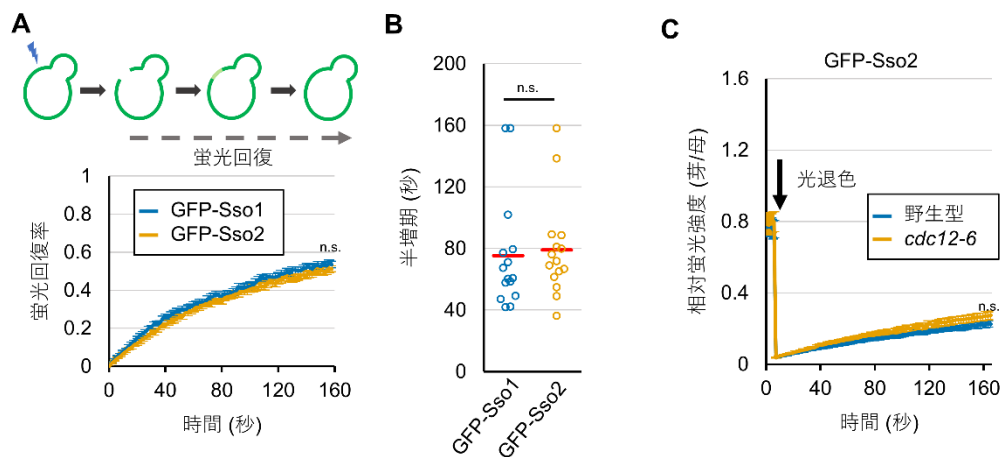


図 6-2. GFP-Sso1/2 の拡散速度

(A) FRAP による GFP-Sso1/2 の拡散の測定。エラーバーは標準誤差を示す。 $n = 15$ 。

(B) A での FRAP の半増期。赤線は平均値を示す。n.s.は有意差がないことを示す ($p > 0.05$; ウェルチの t 検定)。

(C) *cdc12-6* 株での GFP-Sso2 の芽への流入。bFRAP 法で、芽の蛍光を光退色した後の芽と母細胞の相対蛍光強度をプロットした。エラーバーは標準誤差を示す。 $n = 15$ 。n.s.は有意差がないことを示す ($p > 0.05$; ウェルチの t 検定)。

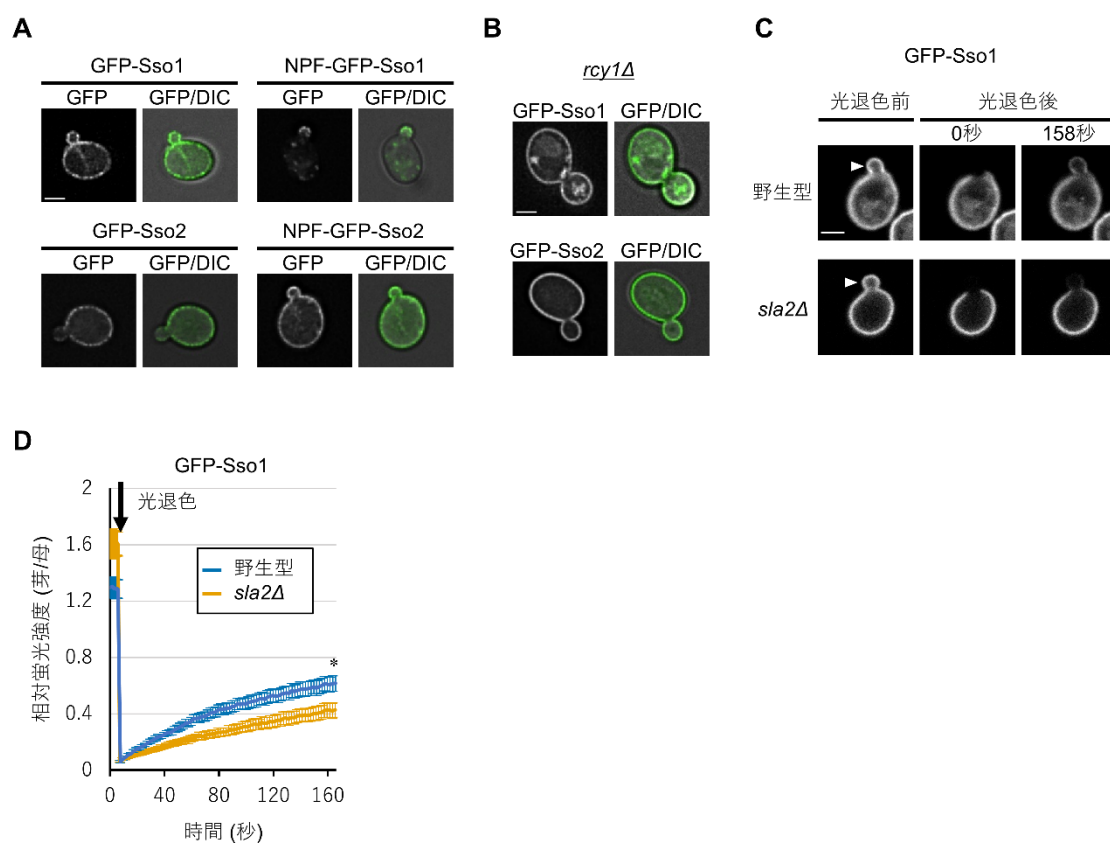


図 6-3. Sso1 のリサイクルによる芽への移動

(A) NPFEXD を付加した GFP-Sso1/2 の局在。スケールバーは 2 μm を示す。

(B) *rcy1Δ* 株での GFP-Sso1/2 の局在。スケールバーは 2 μm を示す。

(C と D) *sla2Δ* 株での GFP-Sso1 の芽への流入。bFRAP 法で、芽 (矢じり) の蛍光を光退色し、母細胞からの流入を調べた。スケールバーは 2 μm を、エラーバーは標準誤差を示す。 $n = 10$. $*p < 0.05$ (ウェルチの t 検定)。

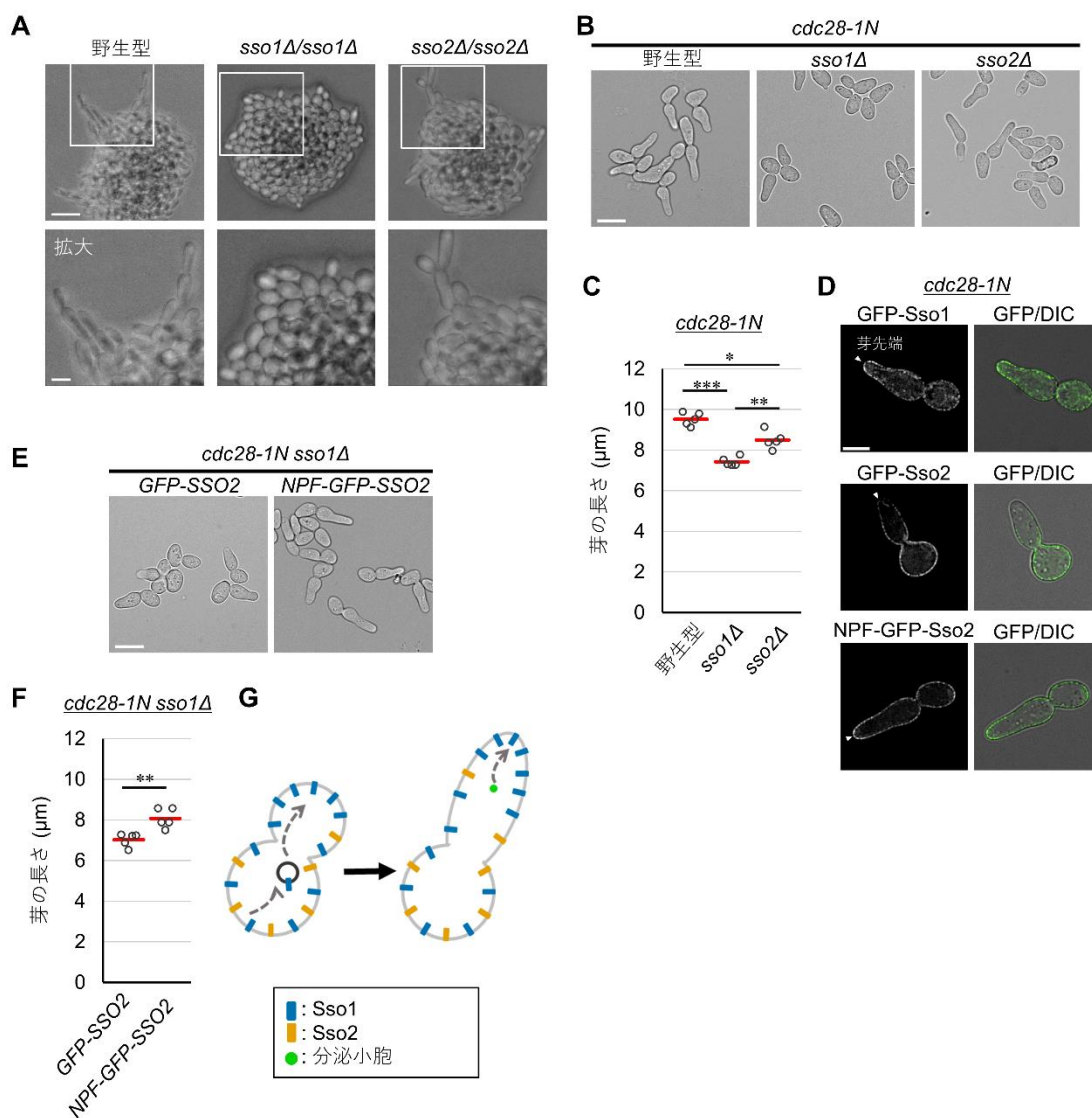


図 6-4. Sso1 のリサイクルの細胞伸長への影響

(A) *SSO1/2* 欠失株での偽菌糸形成。低窒素源培地で 20 時間培養した。スケールバーは 15 μm (上) と 5 μm (下) を示す。

(B) *SSO1/2* 欠失株での芽の伸長。*cdc28-1N* 変異を持つ酵母を制限温度 (37°C) で 180 分処理した。スケールバーは 10 μm を示す。

(C) B の芽の伸長の定量。71 個以上の細胞の芽の長さを 5 回ずつ計測した。赤線は平均値を示す。

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (ボンフェローニ補正したウェルチの t 検定)。

(D) 伸長中の芽での GFP-Sso1, GFP-Sso2, NPF-GFP-Sso2 の局在。37°C で 150 分処理した。スケールバーは 5 μm を示す。

(E) GFP-Sso2 へエンドサイトーシスシグナル付加の細胞伸長への影響。*cdc28-1N sso1Δ* 株の染色体の *SSO2* に *GFP* または *NPF-GFP* を挿入し、37°C で 180 分処理した。スケールバーは 10 μm を示す。

示す。

(F) E の芽の伸長の定量。52 個以上の細胞の芽の長さを 5 回ずつ計測した。赤線は平均値を示す。

**** $p < 0.01$ (ウェルチの t 検定)。**

(G) Sso1 のリサイクルによる細胞伸長促進モデル。母細胞の Sso1 がエンドサイトーシスされてリサイクルされることで、芽に輸送される。芽での Sso1 の発現量が増えることで、分泌小胞と細胞膜の膜の融合効率が上昇する。これによって、成長部位への細胞壁再構築因子や膜脂質の分泌が増え、細胞伸長が促進される。

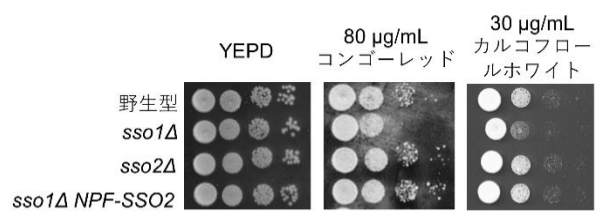


図 6-5. Sso1 のリサイクルの細胞壁ストレス耐性への影響

10 倍希釈系列をスポッティングし、30°Cで 3 日間培養した。

表 1 使用した出芽酵母株

株名	遺伝子型	出典
YMT682	<i>MATa ura3Δ0 leu2Δ0 lys2Δ0 his3Δ1</i>	ラボストック
YMT1495	<i>MATa ura3Δ0 leu2Δ0 lys2Δ0 his3Δ1 arg4Δ::CgHIS3</i>	本研究
YMT2296	<i>MATa ura3Δ0 leu2Δ0 lys2Δ0 his3Δ1 HIS3MX; P_{GALI}-sfGFP-NUM1</i>	本研究
YMT2405	<i>MATa ura3Δ0 leu2Δ0 lys2Δ0 his3Δ1 HIS3MX; P_{GALI}-sfGFP-IST2</i>	本研究
YMT2414	<i>MATa ura3Δ0 leu2Δ0 lys2Δ0 his3Δ1 HIS3MX; P_{GALI}-sfGFP-SSO1</i>	本研究
YMT2415	<i>MATa ura3Δ0 leu2Δ0 lys2Δ0 his3Δ1 HIS3MX; P_{GALI}-sfGFP-SSO2</i>	本研究
YMT2452	<i>MAT a ura3Δ0 leu2Δ0 lys2Δ0 his3Δ1 TCB1-sfGFP-ADH1t; kanMX</i>	本研究
YMT2453	<i>MAT a ura3Δ0 leu2Δ0 lys2Δ0 his3Δ1 TCB2-sfGFP-ADH1t; kanMX</i>	本研究
YMT2454	<i>MAT a ura3Δ0 leu2Δ0 lys2Δ0 his3Δ1 TCB3-sfGFP-ADH1t; kanMX</i>	本研究
YMT2458	<i>MATa ura3Δ0 leu2Δ0 lys2Δ0 his3Δ1 HIS3MX; P_{GALI}-sfGFP-ITR1</i>	本研究
YMT2459	<i>MATa ura3Δ0 leu2Δ0 lys2Δ0 his3Δ1 HIS3MX; P_{GALI}-sfGFP-IST2 bud6Δ::kanMX</i>	本研究
YMT2460	<i>MATa ura3Δ0 leu2Δ0 lys2Δ0 his3Δ1 HIS3MX; P_{GALI}-sfGFP-IST2 sur2Δ::kanMX</i>	本研究
YMT2461	<i>MATa ura3Δ0 leu2Δ0 lys2Δ0 his3Δ1 HIS3MX; P_{GALI}-sfGFP-IST2 shs1Δ::kanMX</i>	本研究
YMT2462	<i>MATa ura3Δ0 leu2Δ0 lys2Δ0 his3Δ1 HIS3MX; P_{GALI}-sfGFP-ist2¹⁻²⁷⁸⁴-ADH1t; kanMX</i>	本研究
YMT2467	<i>MAT a ura3Δ0 leu2Δ0 lys2Δ0 his3Δ1 shs1Δ::kanMX</i>	本研究
YMT2494	<i>MATa ura3Δ0 leu2Δ0 lys2Δ0 his3Δ1 sso1Δ::kanMX</i>	本研究
YMT2495	<i>MATa ura3Δ0 leu2Δ0 lys2Δ0 his3Δ1 sso2Δ::kanMX</i>	本研究
YMT2497	<i>MATa ura3Δ0 leu2Δ0 lys2Δ0 his3Δ1 num1Δ::kanMX</i>	本研究
YMT2499	<i>MATa ura3Δ0 leu2Δ0 lys2Δ0 his3Δ1 HIS3MX; P_{GALI}-sfGFP-NUM1 mdm36Δ::kanMX</i>	本研究
YMT2500	<i>MATa ura3Δ0 leu2Δ0 lys2Δ0 his3Δ1 HIS3MX; P_{GALI}-sfGFP-NUM1 shs1Δ::kanMX</i>	本研究
YMT2511	<i>MATa ura3Δ0 leu2Δ0 lys2Δ0 his3Δ1 HIS3MX; P_{GALI}-sfGFP-SSO1 rcyl1Δ::kanMX</i>	本研究
YMT2534	<i>MATa ura3Δ0 leu2Δ0 lys2Δ0 his3Δ1 HIS3MX; P_{GALI}-sfGFP-NUM1 dyn1Δ::kanMX</i>	本研究
YMT2668	<i>MATa ura3Δ0 leu2Δ0 lys2Δ0 his3Δ1 YME2-sfGFP-ADH1t; kanMX</i>	本研究
YMT2669	<i>MATa ura3Δ0 leu2Δ0 lys2Δ0 his3Δ1 YME2-sfGFP-ADH1t; kanMX num1Δ::CgHIS3</i>	本研究
YMT2692	<i>MATa ura3Δ0 leu2Δ0 lys2Δ0 his3Δ1 HIS3MX; P_{GALI}-sfGFP-SSO2 rcyl1Δ::kanMX</i>	本研究
YMT2696	<i>MATa/α ura3Δ0/ura3Δ0 leu2Δ0/leu2Δ0 lys2Δ0/lys2Δ0 his3Δ1/his3Δ1 FLO8/FLO8</i>	本研究
YMT2697	<i>MATa/α ura3Δ0/ura3Δ0 leu2Δ0/leu2Δ0 lys2Δ0/lys2Δ0 his3Δ1/his3Δ1 FLO8/FLO8 sso1Δ::kanMX/sso1Δ::kanMX</i>	本研究
YMT2698	<i>MATa/α ura3Δ0/ura3Δ0 leu2Δ0/leu2Δ0 lys2Δ0/lys2Δ0 his3Δ1/his3Δ1 FLO8/FLO8 sso2Δ::kanMX/sso2Δ::kanMX</i>	本研究

YMT2742	<i>MATa ura3Δ0 leu2Δ0 lys2Δ0 his3Δ1 CDC10-sfGFP-ADH1t; kanMX</i>	本研究
YMT2743	<i>MATa ura3Δ0 leu2Δ0 lys2Δ0 his3Δ1 CDC10-sfGFP-ADH1t; kanMX shs1Δ::CgHIS3</i>	本研究
YMT2758	<i>MATa ura3Δ0 leu2Δ0 lys2Δ0 his3Δ1 HIS3MX; P_{GALI}-sfGFP-IST2 cdc12-6; CgURA3</i>	本研究
YMT2759	<i>MATa ura3Δ0 leu2Δ0 lys2Δ0 his3Δ1 CDC10-sfGFP-ADH1t; kanMX cdc12-6; CgURA3</i>	本研究
YMT2786	<i>MATa ura3Δ0 leu2Δ0 lys2Δ0 his3Δ1 TCB1-sfGFP-ADH1t; kanMX cdc12-6; CgURA3</i>	本研究
YMT2787	<i>MATa ura3Δ0 leu2Δ0 lys2Δ0 his3Δ1 TCB2-sfGFP-ADH1t::kanMX cdc12-6; CgURA3</i>	本研究
YMT2788	<i>MATa ura3Δ0 leu2Δ0 lys2Δ0 his3Δ1 TCB3-sfGFP-ADH1t::kanMX cdc12-6; CgURA3</i>	本研究
YMT2790	<i>MATa ura3Δ0 leu2Δ0 lys2Δ0 his3Δ1 cdc12-6; CgURA3</i>	本研究
YMT2792	<i>MATa ura3Δ0 leu2Δ0 lys2Δ0 his3Δ1 HIS3MX; P_{GALI}-sfGFP-SSO2 cdc12-6; CgURA3</i>	本研究
YMT2793	<i>MATa ura3Δ0 leu2Δ0 lys2Δ0 his3Δ1 HIS3MX; P_{GALI}-sfGFP-NUM1 cdc12-6; CgURA3</i>	本研究
YMT2865	<i>MATa ura3Δ0 leu2Δ0 lys2Δ0 his3Δ1 HIS3MX; P_{GALI}-sfGFP-IST2 epolΔ::kanMX</i>	本研究
YMT2866	<i>MATa ura3Δ0 leu2Δ0 lys2Δ0 his3Δ1 HIS3MX; P_{GALI}-sfGFP-IST2 scs2Δ::kanMX</i>	本研究
YMT3380	<i>MATa ura3Δ0 leu2Δ0 lys2Δ0 his3Δ1 sla2 Δ::CgHIS3</i>	本研究
YMT3382	<i>MATa ura3Δ0 leu2Δ0 lys2Δ0 his3Δ1 cdc28-1N</i>	本研究
YMT3383	<i>MATa ura3Δ0 leu2Δ0 lys2Δ0 his3Δ1 cdc28-1N sso1Δ::kanMX</i>	本研究
YMT3384	<i>MATa ura3Δ0 leu2Δ0 lys2Δ0 his3Δ1 cdc28-1N sso2Δ::kanMX</i>	本研究
YMT3386	<i>MATa ura3Δ0 leu2Δ0 lys2Δ0 his3Δ1 cdc28-1N sso1Δ::kanMX sfGFP-SSO2</i>	本研究
YMT3430	<i>MATa ura3Δ0 leu2Δ0 lys2Δ0 his3Δ1 cdc28-1N sso1Δ::kanMX kex2²³¹⁴⁻²³⁴⁶-sfGFP-SSO2</i>	本研究
YMT3391	<i>MATa/α ura3Δ0/ura3Δ0 leu2Δ0/leu2Δ0 lys2Δ0/lys2Δ0 his3Δ1/his3Δ1 NUM1/HIS3MX; P_{GALI}-sfGFP-NUM1 ABP140/ABP140-mCherry; kanMX</i>	本研究
YMT3410	<i>MATa ura3Δ0 leu2Δ0 lys2Δ0 his3Δ1 HIS3MX; P_{GALI}-sfGFP-NUM1 scs2Δ::kanMX scs22Δ::CgURA3</i>	本研究
YMT3414	<i>MATa ura3Δ0 leu2Δ0 lys2Δ0 his3Δ1 P_{GALI}-sfGFP-NUM1 she2Δ::CgURA3</i>	本研究
YMT3430	<i>MATa ura3Δ0 leu2Δ0 lys2Δ0 his3Δ1 sso1Δ::kanMX kex2²³¹⁴⁻²³⁴⁶-SSO2</i>	本研究
なし	<i>MATa ura3Δ0 leu2Δ0 met15Δ0 his3Δ1 OSH2-GFP; HIS3MX6</i>	Huh et al., 2003
なし	<i>MATa ura3Δ0 leu2Δ0 met15Δ0 his3Δ1 OSH3-GFP; HIS3MX6</i>	Huh et al., 2003
なし	<i>MATa ura3Δ0 leu2Δ0 met15Δ0 his3Δ1 OSH6-GFP; HIS3MX6</i>	Huh et al., 2003
なし	<i>MATa ura3Δ0 leu2Δ0 met15Δ0 his3Δ1 MYO1-GFP; HIS3MX6</i>	Huh et al., 2003

表 2 本研究で用いたプラスミド

プラスミド名	構成	出典
PMT39	<i>pRS316-P_{GAL}-HO</i>	ラボストック
PMT208	<i>pBS-kanMX4</i>	ラボストック
PMT209	<i>pBS-CgHIS3</i>	ラボストック
PMT212	<i>pBS-CgURA3</i>	ラボストック
PMT5554	<i>pFA6a-mCherry-ADH1t-kanMX</i>	本研究
PMT6151	<i>pFA6a-sfGFP-ADH1t-kanMX</i>	本研究
PMT6307	<i>pFA6a-HIS3MX6-PGAL1-sfGFP</i>	本研究
PMT6433	<i>pRS315-P_{TEF1}-kar2¹⁻¹³⁵-mCherry-HDEL</i>	本研究
PMT6435	<i>pFA6a-CgURA3-P_{GAL1}-sfGFP</i>	本研究
PMT6528	<i>pRS315-P_{GAL1}-sfGFP- ist2²⁷⁸⁵⁻²⁸³⁸ × 2</i>	本研究
PMT6907	<i>pRS315-P_{SSO1}-sfGFP-SSO1</i>	本研究
PMT6908	<i>pRS315-P_{SSO1}-kex2²³¹⁴⁻²³⁴⁶-sfGFP-SSO1</i>	本研究
PMT6909	<i>pRS315-P_{SSO1}-sfGFP-SSO2</i>	本研究
PMT6910	<i>pRS315-P_{SSO1}-kex2²³¹⁴⁻²³⁴⁶-sfGFP-SSO2</i>	本研究
PMT6911	<i>pRS315-P_{TEF1}-kar2¹⁻¹³⁵-sfGFP-HDEL</i>	本研究
PMT6999	<i>pRS315-P_{GAL1}-SAC1-sfGFP</i>	本研究
PMT7000	<i>pRS315-P_{GAL1}-SAC1-sfGFP-ist2²⁷⁸⁵⁻²⁸³⁸ × 2</i>	本研究
PMT7833	<i>pRS315-P_{GAL1}-sfGFP-num1²⁵⁶³⁻²⁶⁹² × 2</i>	本研究
PMT7912	<i>pRS315-P_{GAL1}-sfGFP-SSO1</i>	本研究
PMT8201	<i>pRS306-P_{SSO2}-kex2²³¹⁴⁻²³⁴⁶-SSO2</i>	本研究

表 3 mSC 培地の組成

組成	濃度
アミノ酸不含酵母窒素源 (BD)	6.7 g/L
アデニン硫酸塩	40 mg/L
L-アルギニン	200 mg/L
L-アスパラギン酸	320 mg/L
L-ヒスチジン	80 mg/L
L-イソロイシン	200 mg/L
L-ロイシン	400 mg/L
L-リシン一塩酸塩	200 mg/L
L-フェニルアラニン	200 mg/L

L-トレオニン	400 mg/L
L-チロシン	200 mg/L
ウラシル	80 mg/L
L-バリン	640 mg/L
myo-イノシトール	8 mg/L (終濃度は 10 mg/L)

表 4 イノシトール不含培地の組成

組成	濃度
リン酸二水素カリウム	1 g/L
硫酸マグネシウム	500 mg/L
塩化ナトリウム	100 mg/L
塩化カルシウム二水和物	100 mg/L
D-ビオチン	2 µg/L
D-パントテン酸カルシウム	400 µg/L
葉酸	2 µg/L
ナイアシン	400 µg/L
p-アミノ安息香酸	200 µg/L
ピリドキシン塩酸塩	400 µg/L
リボフラビン	200 µg/L
チアミン塩酸塩	400 µg/L
ホウ酸	500 µg/L
硫酸銅 (II)	40 µg/L
ヨウ化カリウム	100 µg/L
塩化鉄 (III) 六水和物	200 µg/L
塩化マンガン (II) 四水和物	400 µg/L
モリブデン (VI) 酸二ナトリウム二水和物	200 µg/L
硫酸亜鉛七水和物	400 µg/L
硫酸アンモニウム	5 g/L
アデニン硫酸塩	40 mg/L
L-アルギニン	200 mg/L
L-アスパラギン酸	320 mg/L
L-ヒスチジン	80 mg/L
L-イソロイシン	200 mg/L
L-ロイシン	400 mg/L

L-リシン一塩酸塩	200 mg/L
L-フェニルアラニン	200 mg/L
L-トレオニン	400 mg/L
L-チロシン	200 mg/L
ウラシル	80 mg/L
L-バリン	640 mg/L

表 5 SC 培地の組成

組成	濃度
アミノ酸不含酵母窒素源 (BD)	6.7 g/L
Complete Supplement Mixture (サンライズサイエンス)	790 mg/L

表 6 低アミノ酸濃度培地の組成

組成	濃度
アミノ酸および硫酸アンモニウム不含酵母窒素源 (BD)	6.7 g/L
L-ヒスチジン	2.5 mg/L
L-ロイシン	12.5 mg/L
L-リシン一塩酸塩	6.3 mg/L
ウラシル	20 mg/L

表 7 YEP 培地の組成

組成	濃度
酵母抽出物 (ナカライテスク)	10 g/L
バクトペプトン (BD)	20 g/L

表 8 5-FOA 培地の組成

組成	濃度
アミノ酸不含酵母窒素源 (BD)	6.7 g/L
Complete Supplement Mixture (サンライズサイエンス)	790 mg/L
5-フルオロオロチン酸一水和物. (フルオロケム)	1 g/L

参考文献

- Aalto, M.K., Ronne, H., and Keränen, S. (1993). Yeast syntaxins Sso1p and Sso2p belong to a family of related membrane proteins that function in vesicular transport. *EMBO J.* *12*, 4095–4104.
- Barral, Y., Mermall, V., Mooseker, M.S., and Snyder, M. (2000). Compartmentalization of the cell cortex by septins is required for maintenance of cell polarity in yeast. *Mol. Cell* *5*, 841–851.
- Bendall, S.C., Hughes, C., Stewart, M.H., Doble, B., Bhatia, M., and Lajoie, G.A. (2008). Prevention of Amino Acid Conversion in SILAC Experiments with Embryonic Stem Cells. *Mol. Cell. Proteomics* *7*, 1587–1597.
- Bernardo, S.M., Rane, H.S., Chavez-Dozal, A., and Lee, S.A. (2014). Secretion and filamentation are mediated by the *Candida albicans* t-SNAREs Sso2p and Sec9p. *FEMS Yeast Res.* *14*, 762–775.
- Bridges, A.A., Jentzsch, M.S., Oakes, P.W., Occhipinti, P., and Gladfelter, A.S. (2016). Micron-scale plasma membrane curvature is recognized by the septin cytoskeleton. *J. Cell Biol.* *213*, 23–32.
- Burri, L., and Lithgow, T. (2004). A complete set of SNAREs in yeast. *Traffic* *5*, 45–52.
- Buttery, S.M., Yoshida, S., and Pellman, D. (2007). Yeast formins Bni1 and Bnr1 utilize different modes of cortical interaction during the assembly of actin cables. *Mol. Biol. Cell* *18*, 1826–1838.
- Campanale, J.P., Sun, T.Y., and Montell, D.J. (2017). Development and dynamics of cell polarity at a glance. *J. Cell Sci.* *130*, 1201–1207.
- Caudron, F., and Barral, Y. (2009). Septins and the Lateral Compartmentalization of Eukaryotic Membranes. *Dev. Cell* *16*, 493–506.
- Cervený, K.L., Studer, S.L., Jensen, R.E., and Sesaki, H. (2007). Yeast Mitochondrial Division and Distribution Require the Cortical Num1 Protein. *Dev. Cell* *12*, 363–375.
- Chao, J.T., Wong, A.K.O., Tavassoli, S., Young, B.P., Chruscicki, A., Fang, N.N., Howe, L.J., Mayor, M.J., et al. (2015). A septin-based cortical cytoskeleton is required for polarized growth in yeast. *Cell* *161*, 105–117.

T., Foster, L.J., and Loewen, C.J.R. (2014). Polarization of the Endoplasmic Reticulum by ER-Septin Tethering. *Cell* 158, 620–632.

Chernyakov, I., Santiago-Tirado, F., and Bretscher, A. (2013). Active Segregation of Yeast Mitochondria by Myo2 Is Essential and Mediated by Mmr1 and Ypt11. *Curr. Biol.* 23, 1818–1824.

Chin, C.-S., Chubukov, V., Jolly, E.R., DeRisi, J., and Li, H. (2008). Dynamics and Design Principles of a Basic Regulatory Architecture Controlling Metabolic Pathways. *PLoS Biol.* 6, e146.

Clay, L., Caudron, F., Denoth-Lippuner, A., Boettcher, B., Buvelot Frei, S., Snapp, E.L., and Barral, Y. (2014). A sphingolipid-dependent diffusion barrier confines ER stress to the yeast mother cell. *Elife* 3, e01883.

Darios, F., and Davletov, B. (2006). Omega-3 and omega-6 fatty acids stimulate cell membrane expansion by acting on syntaxin 3. *Nature* 440, 813–817.

Das, A., Slaughter, B.D., Unruh, J.R., Bradford, W.D., Alexander, R., Rubinstein, B., and Li, R. (2012). Flippase-mediated phospholipid asymmetry promotes fast Cdc42 recycling in dynamic maintenance of cell polarity. *Nat. Cell Biol.* 14, 304–310.

Deb, B.K., and Hasan, G. (2016). Regulation of Store-Operated Ca²⁺ Entry by Septins. *Front. Cell Dev. Biol.* 4, 142.

Dobbelaere, J., and Barral, Y. (2004). Spatial Coordination of Cytokinetic Events by Compartmentalization of the Cell Cortex. *Science* (80-.). 305, 393–396.

Elbaz-Alon, Y., Rosenfeld-Gur, E., Shinder, V., Futerman, A.H., Geiger, T., and Schuldiner, M. (2014). A Dynamic Interface between Vacuoles and Mitochondria in Yeast. *Dev. Cell* 30, 95–102.

Eldakak, A., Rancati, G., Rubinstein, B., Paul, P., Conaway, V., and Li, R. (2010). Asymmetrically inherited multidrug resistance transporters are recessive determinants in cellular replicative ageing.

Nat. Cell Biol. 12, 799–805.

Farkasovsky, M., and Küntzel, H. (2001). Cortical Num1p interacts with the dynein intermediate chain Pac11p and cytoplasmic microtubules in budding yeast. *J. Cell Biol.* 152, 251–262.

Faty, M., Fink, M., and Barral, Y. (2002). Septins: a ring to part mother and daughter. *Curr. Genet.* 41, 123–131.

Fischer, M.A., Temmerman, K., Ercan, E., Nickel, W., and Seedorf, M. (2009). Binding of Plasma Membrane Lipids Recruits the Yeast Integral Membrane Protein Ist2 to the Cortical ER. *Traffic* 10, 1084–1097.

Garcia, G., Bertin, A., Li, Z., Song, Y., McMurray, M.A., Thorner, J., and Nogales, E. (2011). Subunit-dependent modulation of septin assembly: budding yeast septin Shs1 promotes ring and gauze formation. *J. Cell Biol.* 195, 993–1004.

García, R., Botet, J., Rodríguez-Peña, J.M., Bermejo, C., Ribas, J.C., Revuelta, J.L., Nombela, C., and Arroyo, J. (2015). Genomic profiling of fungal cell wall-interfering compounds: identification of a common gene signature. *BMC Genomics* 16, 683.

Gietz, R.D., and Schiestl, R.H. (2007). High-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. *Nat. Protoc.* 2, 31–34.

Gimeno, C.J., Ljungdahl, P.O., Styles, C.A., and Fink, G.R. (1992). Unipolar cell divisions in the yeast *S. cerevisiae* lead to filamentous growth: regulation by starvation and RAS. *Cell* 68, 1077–1090.

Glomb, O., and Gronemeyer, T. (2016). Septin Organization and Functions in Budding Yeast. *Front. Cell Dev. Biol.* 4, 123.

Gonçalves, J., and Pelletier, L. (2017). The Ciliary Transition Zone: Finding the Pieces and Assembling the Gate. *Mol. Cells* 40, 243.

Hammermeister, M., Schodel, K., and Westermann, B. (2010). Mdm36 Is a Mitochondrial Fission-promoting Protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* 21, 2443–2452.

Henderson, K.A., Hughes, A.L., and Gottschling, D.E. (2014). Mother-daughter asymmetry of pH underlies aging and rejuvenation in yeast. *Elife* 3, e03504.

Higuchi-Sanabria, R., Pernice, W.M.A., Vevea, J.D., Alessi Wolken, D.M., Boldogh, I.R., and Pon, L.A. (2014). Role of asymmetric cell division in lifespan control in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* 14, 1133–1146.

Horecka, J., and Davis, R.W. (2014). The 50:50 method for PCR-based seamless genome editing in yeast. *Yeast* 31, 103–112.

Hu, J.-L., Liu, G., Li, Y.-C., Gao, W.-J., and Huang, Y.-Q. (2010). Dopamine D1 receptor-mediated NMDA receptor insertion depends on Fyn but not Src kinase pathway in prefrontal cortical neurons. *Mol. Brain* 3, 20.

Huh, W.-K., Falvo, J. V., Gerke, L.C., Carroll, A.S., Howson, R.W., Weissman, J.S., and O'Shea, E.K. (2003). Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature* 425, 686–691.

Ichikawa, M., Hirano, T., Enami, K., Fuselier, T., Kato, N., Kwon, C., Voigt, B., Schulze-Lefert, P., Baluška, F., and Sato, M.H. (2014). Syntaxin of Plant Proteins SYP123 and SYP132 Mediate Root Hair Tip Growth in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 55, 790–800.

Inoue, S.B., Takewaki, N., Takasuka, T., Mio, T., Adachi, M., Fujii, Y., Miyamoto, C., Arisawa, M., Furuichi, Y., and Watanabe, T. (1995). Characterization and gene cloning of 1,3-beta-D-glucan synthase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* 231, 845–854.

Juanes, M.A. (2017). Methods of Synchronization of Yeast Cells for the Analysis of Cell Cycle Progression. In *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.), pp. 19–34.

- Kakimoto, Y., Tashiro, S., Kojima, R., Morozumi, Y., Endo, T., and Tamura, Y. (2018). Visualizing multiple inter-organelle contact sites using the organelle-targeted split-GFP system. *Sci. Rep.* 8, 6175.
- Kelly, S.P., and Bedwell, D.M. (2015). Both the autophagy and proteasomal pathways facilitate the Ubp3p-dependent depletion of a subset of translation and RNA turnover factors during nitrogen starvation in *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA* 21, 898–910.
- Khmelniskii, A., Keller, P.J., Bartosik, A., Meurer, M., Barry, J.D., Mardin, B.R., Kaufmann, A., Trautmann, S., Wachsmuth, M., Pereira, G., et al. (2012). Tandem fluorescent protein timers for in vivo analysis of protein dynamics. *Nat. Biotechnol.* 30, 708–714.
- Kingsbury, J.M., Heitman, J., and Pinnell, S.R. (2012). Calcofluor White Combination Antifungal Treatments for *Trichophyton rubrum* and *Candida albicans*. *PLoS One* 7, e39405.
- Klecker, T., Scholz, D., Fortsch, J., and Westermann, B. (2013). The yeast cell cortical protein Num1 integrates mitochondrial dynamics into cellular architecture. *J. Cell Sci.* 126, 2924–2930.
- Knoblauch, B., and Rachubinski, R.A. (2015). Sharing the cell's bounty - organelle inheritance in yeast. *J. Cell Sci.* 128, 621–630.
- Kono, K., Saeki, Y., Yoshida, S., Tanaka, K., and Pellman, D. (2012). Proteasomal Degradation Resolves Competition between Cell Polarization and Cellular Wound Healing. *Cell* 150, 151–164.
- Kopecká, M., and Gabriel, M. (1992). The influence of congo red on the cell wall and (1----3)-beta-D-glucan microfibril biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Microbiol.* 158, 115–126.
- Kormanec, J., Schaaff-Gerstenschläger, I., Zimmermann, F.K., Perecko, D., and Küntzel, H. (1991). Nuclear migration in *Saccharomyces cerevisiae* is controlled by the highly repetitive 313 kDa NUM1 protein. *Mol. Gen. Genet.* 230, 277–287.
- Kornmann, B., Currie, E., Collins, S.R., Schuldiner, M., Nunnari, J., Weissman, J.S., and Walter, P.

(2009). An ER-Mitochondria Tethering Complex Revealed by a Synthetic Biology Screen. *Science* (80-.). 325, 477–481.

Kraft, L.M., and Lackner, L.L. (2017). Mitochondria-driven assembly of a cortical anchor for mitochondria and dynein. *J. Cell Biol.* 216, 3061–3071.

Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G., and Sonnhammer, E.L.. (2001). Predicting transmembrane protein topology with a hidden markov model: application to complete genomes¹¹Edited by F. Cohen. *J. Mol. Biol.* 305, 567–580.

Kron, S.J., Styles, C.A., and Fink, G.R. (1994). Symmetric cell division in pseudohyphae of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* 5, 1003–1022.

Kumar, A., Sharma, P., Gomar-Alba, M., Shcheprova, Z., Daulny, A., Sanmartín, T., Matucci, I., Funaya, C., Beato, M., and Mendoza, M. (2018). Daughter-cell-specific modulation of nuclear pore complexes controls cell cycle entry during asymmetric division. *Nat. Cell Biol.* 20, 432–442.

Lackner, L.L., Ping, H., Graef, M., Murley, A., and Nunnari, J. (2013). Endoplasmic reticulum-associated mitochondria-cortex tether functions in the distribution and inheritance of mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, E458–E467.

Lai, K., Bolognese, C.P., Swift, S., and McGraw, P. (1995). Regulation of inositol transport in *Saccharomyces cerevisiae* involves inositol-induced changes in permease stability and endocytic degradation in the vacuole. *J. Biol. Chem.* 270, 2525–2534.

Lammers, L.G., and Markus, S.M. (2015). The dynein cortical anchor Num1 activates dynein motility by relieving Pac1/LIS1-mediated inhibition. *J. Cell Biol.* 211, 309–322.

Lengefeld, J., Hotz, M., Rollins, M., Baetz, K., and Barral, Y. (2017). Budding yeast Wee1 distinguishes spindle pole bodies to guide their pattern of age-dependent segregation. *Nat. Cell Biol.*

19, 941–951.

Levin, D.E. (2005). Cell wall integrity signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 69, 262–291.

Levin, D.E. (2011). Regulation of Cell Wall Biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae* : The Cell Wall Integrity Signaling Pathway. *Genetics* 189, 1145–1175.

Levin, M.H., Haggie, P.M., Vetrivel, L., and Verkman, A.S. (2001). Diffusion in the endoplasmic reticulum of an aquaporin-2 mutant causing human nephrogenic diabetes insipidus. *J. Biol. Chem.* 276, 21331–21336.

Li, L., Zhang, C., and Konopka, J.B. (2012). A *Candida albicans* temperature-sensitive *cdc12-6* mutant identifies roles for septins in selection of sites of germ tube formation and hyphal morphogenesis. *Eukaryot. Cell* 11, 1210–1218.

Liu, H., Styles, C.A., and Fink, G.R. (1996). *Saccharomyces cerevisiae* S288C has a mutation in FLO8, a gene required for filamentous growth. *Genetics* 144, 967–978.

Lörincz, A.T., and Reed, S.I. (1986). Sequence analysis of temperature-sensitive mutations in the *Saccharomyces cerevisiae* gene CDC28. *Mol. Cell. Biol.* 6, 4099–4103.

Luedeke, C., Frei, S.B., Sbalzarini, I., Schwarz, H., Spang, A., and Barral, Y. (2005). Septin-dependent compartmentalization of the endoplasmic reticulum during yeast polarized growth. *J. Cell Biol.* 169, 897–908.

Maass, K., Fischer, M.A., Seiler, M., Temmerman, K., Nickel, W., and Seedorf, M. (2009). A signal comprising a basic cluster and an amphipathic α -helix interacts with lipids and is required for the transport of Ist2 to the yeast cortical ER. *J. Cell Sci.* 122, 625–635.

Manford, A.G., Stefan, C.J., Yuan, H.L., MacGurn, J.A., and Emr, S.D. (2012). ER-to-Plasma

Membrane Tethering Proteins Regulate Cell Signaling and ER Morphology. *Dev. Cell* 23, 1129–1140.

Martin, S.G., and Arkowitz, R.A. (2014). Cell polarization in budding and fission yeasts. *FEMS Microbiol. Rev.* 38, 228–253.

McCusker, J.H., Clemons, K. V, Stevens, D.A., and Davis, R.W. (1994). *Saccharomyces cerevisiae* virulence phenotype as determined with CD-1 mice is associated with the ability to grow at 42 degrees C and form pseudohyphae. *Infect. Immun.* 62, 5447–5455.

Moriguchi, S., Nishi, M., Komazaki, S., Sakagami, H., Miyazaki, T., Masumiya, H., Saito, S. -y., Watanabe, M., Kondo, H., Yawo, H., et al. (2006). Functional uncoupling between Ca²⁺ release and afterhyperpolarization in mutant hippocampal neurons lacking junctophilins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 10811–10816.

Neumuller, R.A., and Knoblich, J.A. (2009). Dividing cellular asymmetry: asymmetric cell division and its implications for stem cells and cancer. *Genes Dev.* 23, 2675–2699.

Ng, A.Y.E., Ng, A.Q.E., and Zhang, D. (2018). ER-PM Contacts Restrict Exocytic Sites for Polarized Morphogenesis. *Curr. Biol.* 28, 146–153.e6.

Oh, Y., and Bi, E. (2011). Septin structure and function in yeast and beyond. *Trends Cell Biol.* 21, 141–148.

Okada, M., Kusunoki, S., Ishibashi, Y., and Kito, K. (2017). Proteomics analysis for asymmetric inheritance of preexisting proteins between mother and daughter cells in budding yeast. *Genes to Cells* 22, 591–601.

Omer, S., Greenberg, S.R., and Lee, W.-L. (2018). Cortical dynein pulling mechanism is regulated by differentially targeted attachment molecule Num1. *Elife* 7.

Park, H.-O., and Bi, E. (2007). Central Roles of Small GTPases in the Development of Cell Polarity in

Yeast and Beyond. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 71, 48–96.

Rappsilber, J., Ishihama, Y., and Mann, M. (2003). Stop and go extraction tips for matrix-assisted laser desorption/ionization, nanoelectrospray, and LC/MS sample pretreatment in proteomics. *Anal. Chem.* 75, 663–670.

Rapsomaniki, M.A., Kotsantis, P., Symeonidou, I.-E., Giakoumakis, N.-N., Taraviras, S., and Lygerou, Z. (2012). easyFRAP: an interactive, easy-to-use tool for qualitative and quantitative analysis of FRAP data. *Bioinformatics* 28, 1800–1801.

Riquelme, M., Aguirre, J., Bartnicki-García, S., Braus, G.H., Feldbrügge, M., Fleig, U., Hansberg, W., Herrera-Estrella, A., Kämper, J., Kück, U., et al. (2018). Fungal Morphogenesis, from the Polarized Growth of Hyphae to Complex Reproduction and Infection Structures. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 82, e00068-17.

Roncero, C., and Durán, A. (1985). Effect of Calcofluor white and Congo red on fungal cell wall morphogenesis: in vivo activation of chitin polymerization. *J. Bacteriol.* 163, 1180–1185.

Saarikangas, J., and Barral, Y. (2011). The emerging functions of septins in metazoans. *EMBO Rep.* 12, 1118–1126.

Saheki, Y., and De Camilli, P. (2017). Endoplasmic Reticulum–Plasma Membrane Contact Sites. *Annu. Rev. Biochem.* 86, 659–684.

Sarto-Jackson, I., and Tomaska, L. (2016). How to bake a brain: yeast as a model neuron. *Curr. Genet.* 62, 347–370.

Schneider, K.L., Nyström, T., and Widlund, P.O. (2018). Studying Spatial Protein Quality Control, Proteopathies, and Aging Using Different Model Misfolding Proteins in *S. cerevisiae*. *Front. Mol. Neurosci.* 11, 249.

Schulz, T.A., Choi, M.-G., Raychaudhuri, S., Mears, J.A., Ghirlando, R., Hinshaw, J.E., and Prinz, W.A. (2009). Lipid-regulated sterol transfer between closely apposed membranes by oxysterol-binding protein homologues. *J. Cell Biol.* *187*, 889–903.

Shai, N., Yifrach, E., van Roermund, C.W.T., Cohen, N., Bibi, C., IJlst, L., Cavellini, L., Meurisse, J., Schuster, R., Zada, L., et al. (2018). Systematic mapping of contact sites reveals tethers and a function for the peroxisome-mitochondria contact. *Nat. Commun.* *9*, 1761.

Sharma, S., Quintana, A., Findlay, G.M., Mettlen, M., Baust, B., Jain, M., Nilsson, R., Rao, A., and Hogan, P.G. (2013). An siRNA screen for NFAT activation identifies septins as coordinators of store-operated Ca²⁺ entry. *Nature* *499*, 238–242.

Shepard, K.A., Gerber, A.P., Jambhekar, A., Takizawa, P.A., Brown, P.O., Herschlag, D., DeRisi, J.L., and Vale, R.D. (2003). Widespread cytoplasmic mRNA transport in yeast: Identification of 22 bud-localized transcripts using DNA microarray analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *100*, 11429–11434.

Singh, P., Ramachandran, S.K., Zhu, J., Kim, B.C., Biswas, D., Ha, T., Iglesias, P.A., and Li, R. (2017). Sphingolipids facilitate age asymmetry of membrane proteins in dividing yeast cells. *Mol. Biol. Cell* *28*, 2712–2722.

Specht, S., Miller, S.B.M., Mogk, A., and Bukau, B. (2011). Hsp42 is required for sequestration of protein aggregates into deposition sites in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* *195*, 617–629.

Steinmetz, L.M., Scharfe, C., Deutschbauer, A.M., Mokranjac, D., Herman, Z.S., Jones, T., Chu, A.M., Giaever, G., Prokisch, H., Oefner, P.J., et al. (2002). Systematic screen for human disease genes in yeast. *Nat. Genet.* *31*, 400–404.

Surana, U., Robitsch, H., Price, C., Schuster, T., Fitch, I., Futcher, A.B., and Nasmyth, K. (1991). The role of CDC28 and cyclins during mitosis in the budding yeast *S. cerevisiae*. *Cell* *65*, 145–161.

Takizawa, P.A., and Vale, R.D. (2000). The myosin motor, Myo4p, binds Ash1 mRNA via the adapter protein, She3p. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *97*, 5273–5278.

Takizawa, P.A., DeRisi, J.L., Wilhelm, J.E., and Vale, R.D. (2000). Plasma membrane compartmentalization in yeast by messenger RNA transport and a septin diffusion barrier. *Science* *290*, 341–344.

Tang, X., Germain, B. St., and Lee, W.-L. (2012). A novel patch assembly domain in Num1 mediates dynein anchoring at the cortex during spindle positioning. *J. Cell Biol.* *196*, 743–756.

Thayer, N.H., Leverich, C.K., Fitzgibbon, M.P., Nelson, Z.W., Henderson, K.A., Gafken, P.R., Hsu, J.J., and Gottschling, D.E. (2014). Identification of long-lived proteins retained in cells undergoing repeated asymmetric divisions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *111*, 14019–14026.

Valdez-Taubas, J., and Pelham, H.R.B. (2003). Slow diffusion of proteins in the yeast plasma membrane allows polarity to be maintained by endocytic cycling. *Curr. Biol.* *13*, 1636–1640.

Vannini, G.L., Poli, F., Donini, A., and Pancaldi, S. (1983). Effects of Congo red on wall synthesis and morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Plant Sci. Lett.* *31*, 9–17.

Weill, U., Yofe, I., Sass, E., Stynen, B., Davidi, D., Natarajan, J., Ben-Menachem, R., Avihou, Z., Goldman, O., Harpaz, N., et al. (2018). Genome-wide SWAp-Tag yeast libraries for proteome exploration. *Nat. Methods* *15*, 617–622.

West, M., Zurek, N., Hoenger, A., and Voeltz, G.K. (2011). A 3D analysis of yeast ER structure reveals how ER domains are organized by membrane curvature. *J. Cell Biol.* *193*, 333–346.

Wiederkehr, A., Avaro, S., Prescianotto-Baschong, C., Hagenauer-Tsapis, R., and Riezman, H. (2000). The F-box protein Rcy1p is involved in endocytic membrane traffic and recycling out of an early endosome in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* *149*, 397–410.

Wiśniewski, J.R., Zougman, A., Nagaraj, N., and Mann, M. (2009). Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nat. Methods* 6, 359–362.

Xu, P., Hankins, H.M., MacDonald, C., Erlinger, S.J., Frazier, M.N., Diab, N.S., Piper, R.C., Jackson, L.P., MacGurn, J.A., and Graham, T.R. (2017). COPI mediates recycling of an exocytic SNARE by recognition of a ubiquitin sorting signal. *Elife* 6.

Yang, J., McCormick, M.A., Zheng, J., Xie, Z., Tsuchiya, M., Tsuchiyama, S., El-Samad, H., Ouyang, Q., Kaeberlein, M., Kennedy, B.K., et al. (2015). Systematic analysis of asymmetric partitioning of yeast proteome between mother and daughter cells reveals “aging factors” and mechanism of lifespan asymmetry. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112, 11977–11982.

Zhang, D., Bidone, T.C., Correspondence, D.V., and Vavylonis, D. (2016). ER-PM Contacts Define Actomyosin Kinetics for Proper Contractile Ring Assembly. *Curr. Biol.* 26, 647–653.

Zhang, J., Kong, C., Xie, H., McPherson, P.S., Grinstein, S., and Trimble, W.S. (1999). Phosphatidylinositol polyphosphate binding to the mammalian septin H5 is modulated by GTP. *Curr. Biol.* 9, 1458–1467.

謝辞

本研究は、筆者が東京工業大学 生命理工学院 生命理工学系 生命理工学コース在学中に、理化学研究所 脳神経科学研究センター タンパク質構造疾患研究チーム チームリーダーの田中元雅先生のご指導の下に行ったものです。本研究を進めるにあたり終始ご指導いただいた田中元雅先生に深謝いたします。

研究室内では高橋尚美さんに培地や試薬の調製などでご助力いただき、他の室員の皆様にも研究を進めるに当たり様々なご助言をいただきました。また、本研究での DNA 配列の解析、フローサイトメーターによる細胞分取、質量分析器による測定は、理化学研究所 脳神経科学研究センター 研究基盤開発部門 生体物質分析ユニットの DNA 配列解析サービス、自動細胞分取分析サービス、質量分析サービスの方々に行っていただきました。これらの方々に深く感謝いたします。

また、理化学研究所で研究を進めるに当たり、指導教官の伊藤武彦先生には、学位審査や大学内での手続きなど様々な面で、ご尽力いただきました。伊藤研究室の坂東由衣さんには、事務手続きや試薬の購入などで、ご助力いただきました。お二方に、心より感謝いたします。