

細胞形態形成

細胞極性と細胞周期

平田 大・登田 隆

Cdc2 (CDK) を中心にして展開してきた細胞周期研究は、単に G1 期→S 期→G2 期→M 期の移行制御機構の解明にとどまらず、当初の予想をはるかにこえた展開をみせ始めている。本稿では生物学の基本的問題のひとつである細胞極性と細胞周期について、筆者らの研究を紹介したい。細胞はいかにして自らの形を知り、その特異な形態をつくっていくのか。細胞極性は細胞周期のなかでダイナミックに変化する。また分化・発生過程においてもそれぞれの組織、細胞種を特徴づける最も細胞生物学的な基準が細胞形態であり、この場合は、細胞外の分化因子に呼応したシグナル経路が機能する。筆者らはこのような細胞極性、形態制御に興味をもち、分裂酵母を材料として、条件致死の細胞極性、形態異常変異体の系統的な分離から研究をスタートした。分裂酵母において明らかになりつつある、細胞極性を制御する遺伝子の分子機能を紹介し、問題点を整理したい。

Key words 【細胞形態】【成長極性】【分裂酵母】

はじめに 生物個体の諸組織および各器官を形成する細胞は、その細胞種由来により、それぞれ特異な形態をしている。筋肉細胞、神経細胞、繊維芽細胞など数多くの細胞が特徴ある形を維持している。それらは最初は受精卵という単一細胞から始まり、発生段階初期では、親と同じものの複製を目的とする活発な細胞分裂をくり返し、その後、ある決まった時期に、今度は親とは異なる娘細胞をつくり出す分化過程を経て形づくられたものである。それでは、いったい細胞はいかにして自らの形を知り、その特異な形をつくっていくのだろうか。形態形成の分子機構の解明は、長らく発生生物学における最も基本的な問題のひとつであった。

細胞形態を決定する最も重要な因子のひとつが、細胞

極性（または成長極性）である。神経細胞を特徴づけるニューロンの長い神経軸索は、細胞突端が非対称的に (asymmetrically) 成長した結果、形成されたものである。そのような細胞極性は、どのような分子機構のもとに整合的に分化過程で制御されているのか。細胞極性は、分化過程のみならず、活発に細胞分裂を行っている増殖期の細胞においても、細胞周期依存的に制御されている。すなわち、核分裂期 (M 期) の細胞では、細胞極性は失われ、間期に存在した細胞質微小管やアクチンファイバーは消失し、代わって紡錘体微小管 (スピンドル) が形成される。M 期が終了し間期になると、細胞骨格 (微小管、アクチン、中間系フィラメント) が再構築され、再び細胞は特異な

Dai Hirata, 広島大学工学部発酵工学講座生物物理化学研究室 (〒739 東広島市鏡山 1-4-1) [Department of Fermentation Technology, Faculty of Engineering, Hiroshima University, Kagamiyama, Higashi-Hiroshima 739, Japan]

Takashi Toda, Laboratory of Cell Regulation, The Imperial Cancer Research Fund, P. O. Box No 123, 44 Lincoln's Inn Fields, London WC2A 3PX, UK

Control of Cell Morphogenesis in the Cell Cycle

形態を示す。このように、細胞極性の制御は、正常な分化・増殖過程において必須であると考えられる。すなわち、細胞骨格系の維持・調節とDNA複製、染色体分裂サイクルを共役させる分子機構が存在することを示唆している^{1,2)}。

細胞形態制御は、分化・増殖過程において、細胞内外のさまざまなシグナル伝達を介する複雑な機構であるが、それら多様なシグナルの最終到達点は、1細胞そのものであり、それゆえ多細胞生物の形態形成を理解するうえで、単一細胞である酵母における形態形成制御機構の解明は必須であると考えられる。筆者らは、モデル系として分裂酵母を選び、細胞形態制御の分子機構について研究を進めている。以下、分裂酵母を中心に、細胞形態と細胞周期について紹介する。

I. 分裂酵母の成長極性と細胞周期

分裂酵母は直径が $\sim 3 \mu\text{m}$ 、細胞長が $8\sim 14 \mu\text{m}$ の円筒状の形態をしている。細胞周期過程で直径は一定、細胞端でのみ極性成長し、しかもその極性は細胞周期に依存して変化する(図1)。成長端の細胞壁は蛍光染料であるcalcofluorによって明るく染まり³⁾、この部分には、アクチンドットや細胞質小胞などが局在している^{4,5)}。また、細胞質微小管は両細胞端にほぼ到達するように細胞質内に伸びている⁶⁾。細胞端での極性成長のためのアクチン系や微小管系の役割はまだ明らかになってはいない。ただし、微小管変異体が、制限温度下でも細胞伸長を継続できること⁷⁾、アクチンの重合阻害剤であるサイトカラシンDを加えると極性成長が阻害されることから⁸⁾、細胞伸長にはアクチンが重要な役割を担うことが示唆されている。

細胞周期過程で極性成長が変化する重要な点を以下に示す^{4,9)}。最初のポイントが分裂直後の増殖開始点である(図1①)。アクチンドットは分裂直後には新生2細胞の新しくできた細胞端(new end)に局在するが(⑤)、細胞質分裂が完了すると、速やかにそれ以前に存在した細胞端(old end)に移動し、成長を始める。単極成長期を経て細胞周期0.34の時期に、アクチンの再分布が起こり、アクチンが両極に局在し両極成長期を迎える。この現象をNETO(new end take off)とよぶ^{3,10)}(②)。その後、細胞周期0.75でCdc2/Cdc13の活性化が起こる。細胞はG2からM期への移行に伴

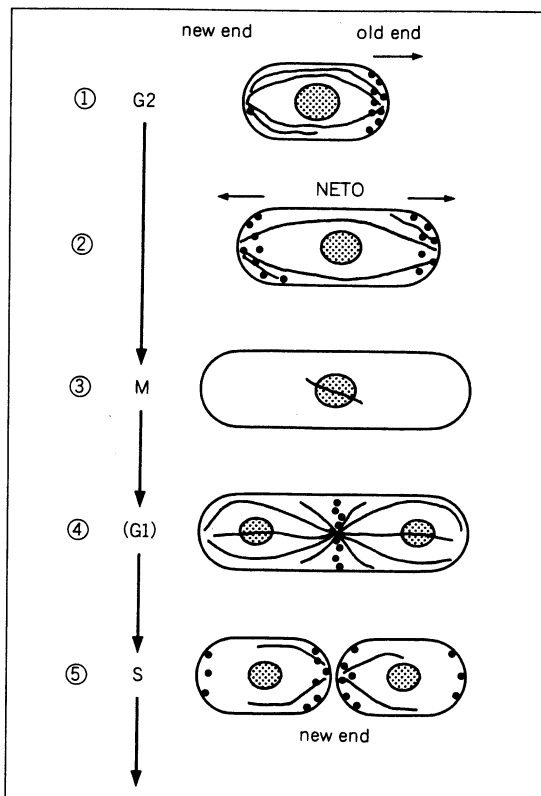


図1 分裂酵母の細胞周期と成長極性^{4,9)}

細胞内の小さな黒丸はアクチン局在を、大きな丸は核を、実線は微小管構造を示す。NETOはnew end take offを示す。詳細は本文参照。

い、両成長端に局在したアクチンは消失し、細胞伸長も停止し、細胞質分裂まで細胞長は一定である。M期では、細胞質微小管に代わって核内スピンドルが形成される(③)。核分裂後、細胞質分裂に先立ち、アクチンは将来の隔壁が形成される細胞中央部に局在する(④)。MPF(M-phase promoting factor)の活性化がシグナルとなる細胞成長停止機構、不活性化がシグナルとなるアクチン再局在化機構が存在することが示唆される。

以上述べたように、分裂酵母は単細胞真核生物でありながら特異な形態を保持し、しかも成長極性が細胞周期依存的に変化するという、細胞形態を研究するための優れた実験系といえる。

II. 形態異常変異体

細胞周期過程における極性成長の変化から、筆者らは、極性成長の調節に、① 成長端を決定するための位置情報と、② 成長極性をすばやく変化させるための動的情報の2つの要因が重要であると考えた。そこで、この2つの過程を制御する遺伝子を取得するため、極性成長に欠損のある変異体の系統的な分離を行なった。成長極性を制御するための情報発生は、細胞周期依存的であり、この情報は、形態形成のみならず増殖過程においても重要な役割を担うことが予想される。そこで、生育が高温または低温感受性かつ成長極性に異常を示す変異体の分離を試みた。変異体の分離には、蛍光染料である calcofluor を用いた。この染料で細胞を染色すると、隔壁が最も強く染まり、また新しく合成された細胞壁も染まる。この染料により、細胞形態ばかりでなく成長極性も容易に知ることができる。変異剤処理した20万株より約3000の高温感受性株、約2000の低温感受性株を選択後、それらの株を calcofluor で染色し、細胞形態異常を示す変異体を視覚的に選択した。その結果、それらは以下の4つのグループに分類された。すなわち、① 極性が失われている球形変異体 (*mok*; morphological and kinase inhibitor sensitive)、② 成長極性が一定で変化できないと考えられる単極成長変異体 (*mon*; monopolar growth)、③ 位置情報に欠損があると考えられる極性方向異常変異体 (*alp*; altered polarity)、④ 極性の動的情報に欠損があるため、細胞壁構成成分の分布に異常を示す変異体 (*fic*; fixed calcofluor material) である (図2)。

以下、この分類に従い、現在までに取得された形態異常変異体を整理し (表1)、変異体の解析、遺伝子クローニングによって明らかになっている分子経路ならびに筆者らが分離した変異体をあわせて概説する。

1. 球形変異体 (極性の維持、確立に必要な遺伝子)

A. プロテインキナーゼ C (PKC) ネットワーク

a. nPKC型プロテインキナーゼ (*pck1*, *pck2*)

PKCファミリーに高度に保存されたアミノ酸配列をもとにPCRによって2つのnPKC型プロテインキナーゼC相同遺伝子 (*pck1*⁺, *pck2*⁺) が分離された¹¹⁾。また、*pck2* 変異体は、プロテインキナーゼC阻害剤であ

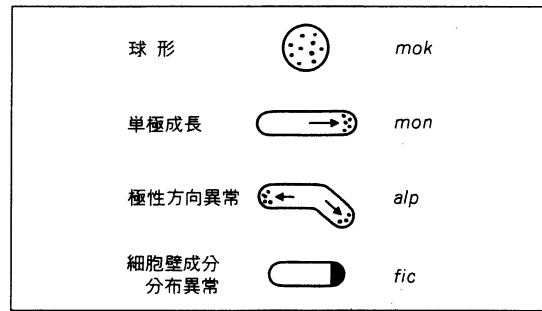


図2 形態異常変異体

小さな黒丸はアクチン局在を示す。矢印は成長方向を示す。黒い部分は calcofluor 異常染色部分を示す。詳細は本文参照。

るスタウロスポリンに超感受性を示す11遺伝子座の変異体の1つ *sts6* 変異体としても取得された¹³⁾。 *pck1*⁺, *pck2*⁺ は重複しつつ細胞増殖に必須な機能をもつ。 *pck2* 単独変異体は、細胞形態が異常であり、球形、洋梨様型、折れ曲がった形態を示す。 *pck2* 変異体がスタウロスポリンや β -グルカナーゼ (ザイモリアーゼ) に超感受性を示すこと、またプロトプラストからの再生の際、アクチンの再局在化が起きないために再生不能であるが、DNA複製、核分裂、細胞成長過程が進行し、巨大な多核のプロトプラストができることから³³⁾、 *Pck2* は、細胞壁合成と成長極性の確立に必須な役割をもち、しかもこの経路は染色体サイクルとは別経路であることが示唆された。

b. IIA型様プロテインホスファターゼ (*ppe1*)

IIA型プロテインホスファターゼに保存されているアミノ酸配列をもとに合成されたオリゴヌクレオチドをプローブとして、ハイブリダイゼーションによって取得された¹²⁾。 *ppe1* 変異体は球形あるいは洋梨様型形態を示し、低温感受性、接合不能、スタウロスポリン超感受性を示す。 *ppe1 pck1* 二重変異体は致死であり、 *pck1*⁺ の過剰発現により *ppe1* 変異体が抑圧されることから、両遺伝子は重複しつつ細胞増殖に必須な機能をもつことが示唆された。

c. *sts5*

sts5 変異は、スタウロスポリン超感受性変異として取得された¹³⁾。 *sts5* 変異体は、ほとんど極性を失った球形を示す。 *sts5*⁺ は分裂酵母 *Dis3*、出芽酵母 *Ssd1* と部分的に相同性を示す領域をもつ新規蛋白質をコードしている。 *pck2* 変異体とは異なり、 β -グルカナーゼに

表 I 細胞形態制御に関与する遺伝子

遺伝子 (座)	遺伝子産物	変異体の表現型	文献
<i>pck1</i>	nPKC 型プロテインキナーゼ		11
<i>pck2/sts6/mok3</i>		球形, 洋梨様, 折れ曲がり, ST ^s	
<i>ppe1</i>	IIA 型様プロテインホスファターゼ	球形, 低温感受性, ST ^s	12
<i>sts5/orb4/mok2</i>	出芽酵母 Ssd1, 分裂酵母 Dis3 相同領域保持	球形, ST ^s	13
<i>mok1~10</i>		球形, 洋梨様, 温度感受性, ST ^s	
<i>ras1/ste5</i>	GTPase	球形, 接合不能	14~17
<i>cdc42</i>	GTPase	球形, 接合不能, 増殖必須	18
<i>scd1/ral1</i>	Cdc42 の GDP/GTP 交換因子	球形, 接合不能	19,20
<i>scd2/ral3</i>	出芽酵母 Bem1 相同	球形, 接合不能	19,20
<i>ral1~4</i>		球形, 接合不能	20
<i>cwg2</i>	ゲラニルゲラニル基転移酵素 I 型 β サブユニット	球形, 細胞壁成分異常	21
<i>shk1/pak1</i>	プロテインキナーゼ出芽酵母 Ste20 相同	球形, 増殖必須	22,23
<i>orb1~12</i>		球形	24,25
<i>orb5/ckal</i>	カゼインキナーゼ II α サブユニット	球形	24,26
<i>ckb1</i>	カゼインキナーゼ II β サブユニット	洋梨様, 低温感受性	26
<i>kin1</i>	プロテインキナーゼ	球形	27
<i>ste10</i>		球形, 接合不能	28
<i>ssp1</i>	プロテインキナーゼ	単極成長, 高温感受性	29
<i>mon1~15</i>		単極成長, 高温感受性	
<i>nda3</i>	β -チューブリン	極性方向異常, 低温感受性	7,30
<i>alp1~13</i>		極性方向異常, 高温感受性	
<i>tea1, 2</i>		極性方向異常	24,25
<i>ban1~5</i>		極性方向異常	24,25
<i>fic1~6</i>		細胞壁成分分布異常, 高温感受性	
<i>ppb1</i>	II B 型プロテインホスファターゼ	多重隔壁, 枝分かれ	31
<i>cab1</i>	アデニル酸シクラーゼ結合蛋白質	形態異常	32
<i>pmk1</i>	MAP キナーゼ相同	形態異常	

ST^s: スタウロスポリン超感受性。

対する感受性は野生株とほとんど変わらず, 細胞壁の強度に欠陥は認められなかった。しかしながら, 細胞周期間期の極性成長期では, 本来成長端に局在しているアクチンが無秩序に分散しており, 細胞質分裂に先立つ隔壁形成期にのみ細胞の中央部分に局在した。さらに, *cdc* 変異体との二重変異体における解析結果からも, *sts5*⁺ は細胞周期間期における成長極性の確立に必須な役割をもつことが示唆された。

sts5 変異は, *ppe1* 変異とその表現型が類似しているばかりでなく, *pck1*⁺ あるいはチロシンホスファターゼ遺伝子 *ppy1*⁺ の過剰発現によって抑圧され, さらに *sts5* *ppe1* 二重変異体は致死であった。以上から *sts5*⁺, *ppe1*⁺ 両遺伝子は細胞増殖に必須な機構に対し類似した機能を担っていることが示唆される。

II B 型プロテインホスファターゼ (カルシニューリン) をコードする遺伝子 *ppb1*⁺ が取得・解析されてい

るが, *ppb1* 変異体は細胞質分裂に著しい遅延を起こし, 多重隔壁形成や枝分かれした糸状形態などの異常を示す³¹⁾。興味深いことに, *sts5 ppb1* 二重変異体は致死であり, この結果は両遺伝子の表現型からはまったく予想されない機能的関連性を示唆している。

d. *mok*

pck1⁺, *pck2*⁺ は, 細胞壁合成と成長極性の確立といった細胞増殖に必須な少なくとも 2 つの機構に重要な役割を担っていることが示唆された。PKC と機能的関連性を示す分子種の一端が明らかになってきた。PKC ネットワークには, まだ明らかにされていない多種多様な分子が包含されるはずである。そこで筆者らは, これらの分子を同定する目的で, *pck2*, *ppe1*, *sts5* 変異体と類似した表現型を示す変異体を分離することにした。まず, 生育が温度感受性である株を選択後, 細胞形態が球形または洋梨様型といった異常を示し, かつスタ

ウロスポリン特異的に超感受性となる変異体を、スタウロスポリンの構造的類似体で阻害作用の異なる K252a に正常であることを指標にして選択した。それらに、*mok* と命名した。*mok* 変異体は 10 遺伝子座、予想どおり、*mok2* は *sts5*、*mok3* は *pck2* と同一遺伝子座の変異であった。*mok* 変異体のなかには、*pck2* 変異体同様、 β -グルカナーゼに感受性を示し、細胞壁の強度が低下したのや、温度感受性の生育が浸透圧保護剤(ソルビトール)によって抑圧されるものなどが存在した。*mok* 変異体の解析により、PKC ネットワークの新たな分子の同定が期待される。

B. GTPase 経路

Ras1 から Cdc42 に至る GTPase 経路が、接合過程における接合因子情報伝達と形態形成に重要な役割を担うことが明らかにされてきた(図 3)。

発癌遺伝子 *ras* ホモログ *ras1*⁺ は、その破壊株が接合不能、胞子形成不能、フェロモンレセプター遺伝子 *mam2*⁺ の発現誘導不能、また細胞形態が球形といった異常を示す¹⁴⁻¹⁷。*ras1*⁺ は接合過程における遺伝子発現誘導と栄養増殖および接合過程いずれにおいても、極性成長の確立に必要な。Ras1 のエフェクターとしては、接合に必要な遺伝子群の発現誘導に必須な MAP キナーゼカスケードの最上流キナーゼ Byr2³⁴(出芽酵母 Ste11, 哺乳類 MEKK のホモログ)や形態形成制御系の Scd1, Scd2 などが明らかにされている¹⁹。

scd 変異体は、*ras1* 変異体と類似した球形かつ接合不能となる変異として取得され、*scd1*⁺ は出芽酵母

Cdc42 GTPase の GDP/GTP 交換因子 Cdc24 のホモログを、*scd2*⁺ は 2 つの SH3 ドメインをもつ出芽酵母 Bem1 のホモログをそれぞれコードしていた。*scd1*, *scd2* 変異は、以前に分離された *ral1*, *ral3* 変異²⁰ とそれぞれ同一の遺伝子座の変異であった。Ras1 と Scd1 は Scd2 依存的に、さらに Scd1 と Cdc42 もまた Scd2 依存的に結合することが two hybrid 法により明らかにされた。Ras1 と Cdc42 は物理的にも機能的にも連結しているようだ。

cdc42⁺ は出芽酵母の *cdc42*^{ts} 変異を抑圧する機能的ホモログとして取得され、また構造的にも高度に保存されていた¹⁹。遺伝子破壊は致死であり、細胞は球形かつ分裂不能の状態に生育停止していた。Cdc42 は栄養増殖、極性成長に重要な役割をもつ。

cwg2 変異体は、高温での生育に浸透圧保護剤が必要、かつ細胞壁の β -グルカン成分が減少している変異体として取得され、高温で球形になる²¹。*cwg2*⁺ はグラニルグラニル基転移酵素 I 型 β サブユニットをコードしており、出芽酵母 *CDC43/CAL1* のホモログである。Cwg2 は Cdc42 の修飾酵素である可能性が高い。

shk1⁺/*pak1*⁺ は出芽酵母 Ste20, 哺乳類 Pak プロテインキナーゼのホモログをコードする^{22,23}。遺伝子破壊は致死であり、細胞は球形の状態に生育停止していた。*shk1*⁺ 過剰発現は、*cdc42* 優性不活性型変異がひき起こす接合不能の表現型を部分的に抑圧できることから、Shk1 は Cdc42 の下流に位置し、MAP キナーゼカスケードに接合因子情報を伝達している可能性が示唆されている。

C. orb

orb 変異は、高温生育時に球形となる変異として取得され、現在までに 12 遺伝子座が同定されている^{24,25}。*orb4* が *sts5*、*orb7* が *cwg2*、*orb11* が *cwg1* とそれぞれ同一の遺伝子座の変異であることが明らかになっている。*orb5*⁺/*cka1*⁺ は、カゼインキナーゼ II α サブユニットをコードしていた^{24,26}。 β サブユニット変異でも、同様の表現型を示す²⁶。*orb* 変異体と *cdc* 変異体との二重変異体の解析結果より、4 つのグループに分類されている。すなわち、極性成長の維持に必要なもの(*orb1*⁺, 6⁺, 12⁺, *sts5*⁺/*orb4*⁺, *cwg2*⁺/*orb7*⁺)、増殖開始に必要なもの(*orb5*⁺)、NETO の調節に必要なもの(*orb2*⁺)、細胞質分裂後のアクチンの old end への再配置に必要なもの(*Orb3*⁺, 8⁺, 9⁺) などである。

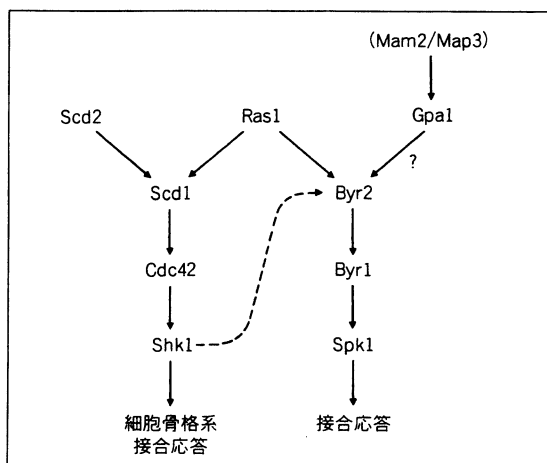


図 3 接合に必要な GTPase 経路^{19,22}

2. 単極成長変異体 (極性を動かすために必要な遺伝子)

A. *ssp1*

前述したように、*ppe1* あるいは *sts5* 変異体は、スタウロスポリン超感受性かつ球形という同様の表現型を示す。また、両遺伝子破壊は致死であることから、両遺伝子は重複しつつ、極性成長に必須な役割を担うことが示唆されている。そこで、これらの遺伝子が関与する成長極性制御系、特に機能的に関連性のある分子種を同定する目的で、これらの変異体のスタウロスポリン超感受性を抑圧する温度感受性変異体が分離された。それぞれの変異体から取得された抑圧変異は、同一の2つの遺伝子座の変異であることが明らかになり、この変異に *ssp* (suppressor of *sts5* and *ppe1*) と命名した²⁹⁾。

ssp1 変異体は制限温度4時間で、細胞長が約14 μm 、DNA含量は2C、アクチンが単極にのみ局在する単極成長様式を続ける終末表現型を示した(図4)。NETOが起きるためには、細胞がある一定の大きさ(critical cell size)以上で、しかもS期が完了していなければならない。*ssp1* 変異体では、以上の2つの条件を満たしているにもかかわらず単極成長様式を示した。このことは、*ssp1* 変異体が成長極性を単極から両極に移動できないNETO欠損変異体であることを示唆している。以前に取得されている *cdc* 変異体のなかにこのような変異体はなく、その意味でまったく新たな *cdc* 変異体である。

ssp1⁺ は、新規なタイプのプロテインキナーゼをコードしており、間接蛍光法により細胞質に存在することが明らかになった。遺伝子破壊は変異体と同様、温度感受性かつNETO欠損の表現型を示した。さらに、*ssp1*⁺ を過剰発現させると細胞形態が洋梨様型あるいは球形となり、そのときアクチンは分散し非局在化していた(図4)。以上の結果から、Ssp1は、NETOの時期に成長極性を動かす機構に重要な役割を担っていること、また *ssp1* 変異体は許容温度においても接合効率が著しく低下することから、Ssp1がNETOのみならず接合過程における形態変化機構にも重要な役割をもつことが示唆された。

ssp1 変異体は、プロテインホスファターゼ *ppe1* 変異の抑圧変異として取得された。このことは、両者が成長極性の調節機構に対しリン酸化・脱リン酸化反応を

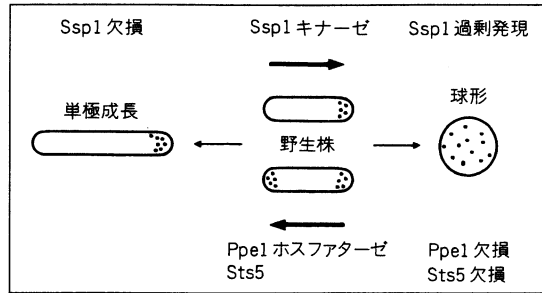


図4 Ssp1-Ppe1調節系による成長極性制御モデル²⁹⁾
小さな黒丸はアクチン局在を示す。詳細は本文参照。

介し、拮抗的に機能していることを示唆している(図4)。両者に共通の基質が存在するのかもしれない。

B. *mon*

ssp1 変異体はNETO変異体であった。NETOは細胞周期全体の0.34に、成長極性が単極から両極にダイナミックに移行する時期である。NETOが遂行されるためには、少なくとも2つの情報(細胞の大きさとS期の完了)が必要である。そこで、筆者らは、NETOに焦点をあて、この機構を制御する、すなわち成長極性を動かすために必要な分子種の同定を目的として、生育が高温感受性、DNA含量が2C、単極成長様式を示す変異体の分離を試みた。それらに、*mon* と命名した。*mon* 変異体は15遺伝子座に分類された。*mon* 変異体および遺伝子の解析によりNETO、さらに極性を動かす機構が明らかになることを期待している。

3. 極性方向異常変異体 (極性の位置決定に関する遺伝子)

A. β -チューブリン (*nda3*)

nda3-311 変異体は、生育が低温感受性かつ核分裂不能を示す *nda* 変異のひとつである⁷⁾。*nda3* 変異体は微小管重合阻害剤に対して超感受性あるいは耐性を示し、制限温度下で枝分かれした細胞が生じる。*nda3*⁺ は β -チューブリンをコードしていた³⁰⁾。野生株を微小管重合阻害剤で処理すると、*nda3* 変異体同様、枝分かれなどの形態異常をひき起こす³⁵⁾。以上の結果は、微小管が極性の位置決定機構に重要な役割をもつことを示唆する。

B. *alp*

筆者らは、極性の位置決定機構に関する遺伝子を取得する目的で、生育が温度感受性かつ成長極性が異

常になる極性方向変異体を分離した。それらに、*alp* と命名した。*alp* 変異体は 13 遺伝子座に分類された。制限温度下で折れ曲がり、あるいは湾曲する形態異常を示す。細胞質分裂のための隔壁が細胞中央部からずれた非対称的隔壁形成などが観察された。

alp1, *alp2* 変異体は、枝分かれした細胞の出現頻度が高い変異体である。これらの変異体は制限温度下で核が細胞中央部から転置したのち、折れ曲がりなどの形態異常をひき起こした。さらに、抗チューブリン抗体を用いた間接蛍光染色法により、核の転置に先立ち、細胞質微小管の構造破壊が起こることが明らかになった。以上から、両遺伝子は、微小管の構造維持、機能発現に関与し、核を含む細胞内成分の対称的な分配機構に重要な役割を担うことが示唆された。いい換えれば、細胞成長の方向維持には、アクチン系よりもむしろ微小管系が重要な機能を担っていることがわかった。

C. *tea*, *ban*

tea 変異体は高温生育時に T 字型に枝分かれする変異体として、*ban* 変異体は高温生育時に湾曲する変異体として取得された^{24,25)}。それぞれの変異について、2 遺伝子座、5 遺伝子座が同定されている。*cdc* 変異体との二重変異体の解析結果より、3 つのグループに分類されている。すなわち、成長方向の維持に必要なもの (*ban1*⁺~5⁺)、NETO の調節に必要なもの (*tea1*⁺, *ban2*⁺)、細胞質分裂後の成長点の決定に必要なもの (*tea1*⁺, 2⁺) などである。

4. 細胞壁成分分布異常変異体 (細胞極性と細胞壁合成の共役に関与する遺伝子) — *fic*

細胞壁合成は、細胞周期により厳密に調節されており、成長期、細胞質分裂期において構成成分がアクチン系と共局在 (colocalization) することが知られている^{4,8)}。しかも、アクチン繊維は細胞成長端で細胞壁部分と物理的に結合し、継なぎ止められていることが示されている³⁶⁾。そこで、細胞極性と細胞壁合成の共役に関与する遺伝子を取得する目的で、生育が高温感受性で calcofluor によって染色される細胞壁成分が不均一に分布する変異体を分離した。それらに、*fic* と命名した。*fic* 変異体は 6 遺伝子座に分類された。制限温度下で、細胞壁成分が均一に分布せず、calcofluor によって単極のみや隔壁が非常に強く染まるといった異常を示した。*fic* 変異体および遺伝子の解析により、細胞極性

と細胞壁合成の共役機構が明らかになることを期待している。

III. 細胞極性研究の今後の課題

分裂酵母の形態形成について、現在までに明らかになっている知見を記述してきた。形態形成機構の研究は始まったばかりであり、まだ解決されなければならない数多くの問題を残している。それらを列挙してみよう。

まず、細胞の大きさについての関知機構である。はたして細胞は、何を指標にして自身の細胞の大きさを知るのだろうか。細胞長、体積あるいは細胞の重量などいくつかの指標が考えられる。前述したように、NETO の必要条件のひとつが、ある一定以上の細胞の大きさをもつことである。細胞周期のこの点においては、細胞の大きさを関知する機構が存在することを示唆している。

次は、極性の制御機構である。分裂酵母は両細胞端でのみ生育し、それ以外の位置では生育することができない。先端成長様式も、単極、両極 2 つの異なる様式を示し、さらにその細胞端は活性化されたり、不活性化されながら細胞周期依存的に制御されている。極性の確立や極性の移動にはどのような分子種が関与しているのか。また、それらが Cdc2 によって直接的あるいは間接的にどのように調節され、細胞周期と連動しているのか。

最後に、位置情報に関する問題があげられる。核や、隔壁は細胞の中央部に位置する。このことは、細胞が自身の中央を認識する機構を保持していることを示唆する。それらは、対称的分配機構の基礎となるものである。いったい細胞は何を指標にして自身の中央を知るのだろうか³⁷⁾。分裂酵母に成長点は 2 つある。細胞はなぜ、細胞端を成長点に選ぶのか、具体的にはどのような分子種が成長点決定に関与するのか。

以上あげた点は、形態形成機構を理解するために解決されなければならない問題の一部分にすぎない。

おわりに 1980 年代後半に開花した細胞周期の分子生物学は、この 10 年間で第 1 期(もちろんそれまでの各方面での研究成果に寄り添ったことだが) と位置づ

けることができる。この期間は、中心エンジンとしての MPF (maturation promoting factor) = Cdc2/サイクリン分子の同定から始まり、Cdc2 キナーゼの活性制御機構、結晶構造の決定も含めて Cdc2 (Cdk)/サイクリン分子の“周辺”が明らかにされた。すなわち、細胞周期進行、停止機構のフレームワークがほぼ解明されたといっていいただろう。具体的には、G2 → M 期移行の分子機構が明らかになり、CDK インヒビターが登場し、現在は G1 → S 期、特に S 期の開始機構および各事象の秩序正しい進行の分子制御 (チェックポイント) が残された課題である。これをもって細胞周期研究は終焉するのだろうか。この 10 年間の研究経過を概観するとき、細胞周期が生物学事象の中心のひとつであり、その研究が当初予想された以上に深い広がりを見せていると感ずるのは筆者らだけの思い入れであろうか。これからの 10 年間の細胞周期研究の新展開は、他分野——少なくともこれまで別に分類されてきた——との融合、あるいは邂逅ではなかろうか。ちょうどそれは、サイクリン D の発癌遺伝子としての発見、癌抑制遺伝子 *Rb*, p53 の細胞周期調節因子としての登場により、細胞周期研究と癌研究が完全にオーバーラップしたように。21 世紀に向けての細胞周期研究は、分化・発生機構の分子レベルでの解明、ひいては高次神経系というフロンティアにおいてその重要性が認識されるのではないか。これらの分野と細胞周期研究との接点が新しい発見・知見への突破口になると筆者らは確信している。その意味からも本稿で取り上げた細胞極性制御は、分化・発生・高次神経系を研究するうえでの基本的現象である。分裂酵母を用いた遺伝学的研究が、ちょうど酵母細胞周期変異体 (*cdc* 変異体) が細胞周期分野を開拓したように、高等生物のモデル系として威力を発揮するものと期待したい。

文 献

- 1) Harold, F. M. : *Microbiol. Rev.*, **54**, 381-431 (1990)
- 2) Drubin, D. G., Nelson, W. J. : *Cell*, **84**, 335-344 (1996)
- 3) Streiblova, E., Wolf, A. : *Zeitschrift fur Allg. Mikrobiologie*, **12**, 673-684 (1972)
- 4) Marks, J., Hyams, J. S. : *Eur. J. Cell Biol.*, **39**, 27-32 (1985)
- 5) Kanbe, T., Kobayashi, I., Tanaka, K. : *J. Cell Sci.*, **94**, 647-656 (1989)
- 6) Hagan, I. M., Hyams, J. S. : *J. Cell Sci.*, **89**, 343-357 (1988)
- 7) Toda T., Umesono, K., Hirata, A., Yanagida, M. : *J. Mol. Biol.*, **168**, 251-270 (1983)
- 8) Kobori, H., Yamada, N., Taki, A., Osumi, M. : *J. Cell Sci.*, **94**, 635-646 (1989)
- 9) Marks, J., Hagan, I. M., Hyams, J. S. : *J. Cell Sci.*, **5** (Suppl.), 229-241 (1986)
- 10) Mitchison, J. M., Nurse, P. : *J. Cell Sci.*, **75**, 357-376 (1985)
- 11) Toda, T., Shimanuki, M., Yanagida, M. : *EMBO J.*, **12**, 1987-1995 (1993)
- 12) Shimanuki, M., Kinoshita, N., Ohkura, H., Yoshida, T., Toda, T., Yanagida, M. : *Mol. Biol. Cell*, **4**, 303-313 (1993)
- 13) Toda, T., Shimanuki, M., Yanagida, M. : *Genes Dev.*, **5**, 60-73 (1991)
- 14) Fukui, Y., Kaziro, Y. : *EMBO J.*, **4**, 687-691 (1985)
- 15) Fukui, Y., Kozasa, T., Kaziro, Y., Takeda, T., Yamamoto, M. : *Cell*, **44**, 329-336 (1986)
- 16) Nadin-Davis, S. A., Nasim, A., Beach, D. : *EMBO J.*, **5**, 2963-2971 (1986)
- 17) Xu, H. P., White, M., Marcus, S., Wigler, M. : *Mol. Cell Biol.*, **14**, 50-58 (1994)
- 18) Miller, P. J., Johnson, D. I. : *Mol. Cell Biol.*, **14**, 1075-1083 (1994)
- 19) Chang, E. C., Barr, M., Wang, Y., Jung, V., Xu, H. P., Wigler, M. : *Cell*, **79**, 131-141 (1994)
- 20) Fukui, Y., Yamamoto, M. : *Mol. Gen. Genet.*, **215**, 26-31 (1988)
- 21) Diaz, M., Sanchez, Y., Bennett, T., Sun, C. R., Godoy, C., Tamanoi, F., Duran, A., Perez, P. : *EMBO J.*, **12**, 5245-5254 (1993)
- 22) Marcus, S., Polverino, A., Chang, E., Robbins, D., Cobb, H. M., Wigler, M. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 6180-6184 (1995)
- 23) Otilie, S., Miller, P. J., Johnson, D. I., Creasy, C. L., Sells, M. A., Bagrodia, S., Forsburg, S. L., Chernoff, J. : *EMBO J.*, **14**, 5908-5919 (1995)
- 24) Snell, V., Nurse, P. : *EMBO J.*, **13**, 2066-2074 (1994)
- 25) Verde, F., Mata, J., Nurse, P. : *J. Cell Biol.*, **131**, 1529-1538 (1995)
- 26) Roussou, L., Draetta, G. : *Mol. Cell Biol.*, **14**, 576-586 (1994)
- 27) Levin, D. E., Bishop, J. M. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 8272-8276 (1990)
- 28) Leupold, U., Sipiczki, M. : *Curr. Genet.*, **20**, 67-73 (1991)

- 29) Matsusaka, T., Hirata, D., Yanagida, M., Toda, T. : *EMBO J.*, **14**, 3325-3338 (1995)
- 30) Hiraoka, Y., Toda, T., Yanagida, M. : *Cell*, **39**, 349-358 (1984)
- 31) Yoshida, T., Toda, T., Yanagida, M. : *J. Cell Sci.*, **107**, 1725-1735 (1994)
- 32) Kawamukai, M., Gerst, J., Field, J., Riggs, M., Rodgers, L., Wigler, M., Young, D. : *Mol. Biol. Cell*, **3**, 167-180 (1992)
- 33) Kobori, H., Toda, T., Yaguchi, H., Toya, M., Yanagida, M., Osumi, M. : *J. Cell Sci.*, **107**, 1131-1136 (1994)
- 34) Wang, Y., Xu, H. P., Riggs, M., Rodgerws, L., Wigler, M. : *Mol. Cell. Biol.*, **11**, 3554-3563 (1991)
- 35) Umesono, K., Toda, T., Hayashi, S., Yanagida, M. : *J. Mol. Biol.*, **168**, 271-284 (1983)
- 36) Muholland, J., Preuss, D., Moon, A., Wong, A., Drubin, D., Botstein, D. J. : *J. Cell Biol.*, **125**, 381-391 (1994)
- 37) Chang, F., Nurse, P. : *Cell*, **84**, 191-194 (1996)