

分裂酵母の休眠からの復帰過程における
シグナル伝達と細胞質流動性の研究

Studies on the signal transduction and the
cytoplasmic fluidity during dormancy breaking in
fission yeast

総合研究大学院大学

生命科学研究所 基礎生物学専攻

酒井 啓一郎

目次

略語一覧	4
要旨	5
第一章 背景	7
1.1 本論文の構成	9
第二章 分裂酵母の発芽過程における細胞質流動性の制御機構の解明	11
2.1 序	11
2.1.1 細胞内環境と細胞内機能	11
2.1.2 栄養源枯渇時の細胞内部の流動性	13
2.1.3 細胞質流動性の評価方法	13
2.1.4 cAMP-PKA 経路による発芽開始の制御	17
2.1.5 トレハロースによる細胞質流動性の制御	19
2.1.6 本研究の目的	21
2.2 材料と方法	22
2.2.1 プラスミド	22
2.2.2 分裂酵母株と培地	22
2.2.3 分裂酵母の形質転換	24
2.2.4 分裂酵母のゲノム抽出	24
2.2.5 分裂酵母の増殖速度の測定	25
2.2.6 分裂酵母の孢子精製	25
2.2.7 分裂酵母の蛍光イメージング	25
2.2.8 細胞内トレハロースの定量	26
2.2.9 FCS	27
2.2.10 FRAP	28
2.2.11 画像とデータの解析	28
2.3 結果	34
2.3.1 分裂酵母孢子の精製法の検討	34
2.3.2 染色体上の特定の位置へ DNA 配列を挿入するためのプラスミドの開発	36
2.3.3 分裂酵母孢子では 40 nm-GEM の拡散が低下する	39
2.3.4 発芽開始直後に 40 nm-GEM の拡散が上昇する	42
2.3.5 cAMP-PKA 経路が発芽開始直後の 40 nm-GEM の拡散上昇に必要である	44
2.3.6 トレハラゼ Ntp1 が発芽開始直後の 40 nm-GEM の拡散上昇に必要である	46
2.3.7 cAMP-PKA 経路の不活性化に起因した発芽の異常は ntp1 過剰発現により部分的に回復する	49
2.3.8 発芽誘導後の細胞質の急速な流動化には新たなタンパク質の合成と ATP 産生は必要ない	53
2.3.9 孢子内で数百 nm スケールで mNeonGreen の拡散は制限されない	56
2.3.10 発芽中のストレス顆粒の消失は 40 nm-GEM の拡散上昇と同時期に起きる	60
2.4 考察	62
2.4.1 分裂酵母孢子の細胞質流動性の解析手法の確立	62
2.4.2 分裂酵母孢子の細胞質流動性	63
2.4.3 細胞質の流動性が低下する意義	64

2.4.4 cAMP-PKA 経路による Ntp1 の活性制御	65
第三章 近赤外蛍光タンパク質 iRFP を利用した分裂酵母の cAMP-PKA 経路の可視化・操作法の確立	68
3.1 序	68
3.1.1 分裂酵母の cAMP-PKA 経路の可視化と操作	68
3.1.2 近赤外蛍光タンパク質 iRFP	70
3.1.3 iRFP の発色団の形成	72
3.1.4 本研究の目的	73
3.2 材料と方法	75
3.2.1 プラスミド	75
3.2.2 分裂酵母株と培地	75
3.2.3 出芽酵母株と培地	76
3.2.4 分裂酵母の形質転換	76
3.2.5 分裂酵母のゲノム抽出	76
3.2.6 出芽酵母の形質転換	76
3.2.7 タンパク質の精製	77
3.2.8 in vitro での iRFP の蛍光特性の評価	78
3.2.9 ウェスタンブロット解析	78
3.2.10 Zinc blot 解析	79
3.2.11 分裂酵母の細胞内での蛍光スペクトルの測定	79
3.2.12 分裂酵母と出芽酵母の蛍光イメージング	80
3.2.13 画像とデータの解析	81
3.2.14 FCS 解析	81
3.2.15 HO 様タンパク質配列の解析	82
3.3 結果	91
3.3.1 分裂酵母の PKA 活性を可視化するバイオセンサーの開発	91
3.3.2 iRFP は分裂酵母の細胞内で蛍光を発しない	95
3.3.3 分裂酵母の細胞内で PCB が iRFP を高輝度化する	97
3.3.4 PCB は BV と比較して iRFP の効率的な発色団として機能する	100
3.3.5 PCB 合成システム (SynPCB2.1) を用いた iRFP の観察	104
3.3.6 内在性遺伝子へ iRFP をタグ付けするためのプラスミドの開発	110
3.3.7 PCB は他の近赤外蛍光タンパク質も高輝度化する	113
3.3.8 PCB は出芽酵母の細胞内でも iRFP を高輝度化する	115
3.3.9 分裂酵母における PKA 活性の可視化と操作	118
3.3.10 分裂酵母胞子において spPKA-KTR は機能的でない	118
3.4 考察	121
3.4.1 分裂酵母における cAMP-PKA 経路の可視化と操作	121
3.4.2 PCB による iRFP の高輝度化	122
3.4.3 細胞外への PCB の漏出	124
第四章 まとめと展望	126
参考文献	128
謝辞	140

略語一覽

bPAC	Bacterial photoactivated adenylate cyclase
BV	Biliverdin
CDF	Cumulative distribution function
CHX	Cycloheximide
FCS	Fluorescence correlation spectroscopy
FRAP	Fluorescence recovery after photobleaching
FRET	Förster resonance energy transfer
GEM	Genetically encoded multimeric nanoparticles
HO	Heme oxygenase
KTR	Kinase translocation reporter
MTS	Mitochondrial targeting sequences
PCB	Phycocyanobilin
PKA	Protein kinase A
ROI	Region of interest
2-DG	2-Deoxy-D-glucose

要旨

Cellular dormancy is a physiological state, in which cells are non-proliferative under stress conditions. To study cellular dormancy, fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*, is one of the valuable model organisms, because nitrogen depletion allows cells to enter a dormant state and form spores. Spore formation renders the cells resistant to several stresses. Glucose refeeding induces dormancy break of spores, resuming cell growth and proliferation. This process is called germination. In budding yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, it has been reported that stress tolerance under starvation or stress conditions requires a decrease in cytoplasmic fluidity. However, it remains unclear whether cytoplasmic fluidity reduces in fission yeast spores, and how the reduced cytoplasmic fluidity has an impact on stress tolerance and germination. In this study, I aimed to elucidate the relationship between cytoplasmic fluidity and germination in fission yeast spores by live cell imaging.

First, I quantified the cytoplasmic fluidity in fission yeast spores during germination by using a genetically encoded multimeric nanoparticle (GEM) with a diameter of 40 nm. The GEMs are homomultimeric scaffolds that self-assemble into stable particles. By tracking single fluorescent particles, I measured the effective diffusion coefficients of GEMs in vegetative cells and spores. I found that the diffusion coefficient in spores becomes approximately 30-fold smaller than that in vegetative cells. Further, such a solid-like cytoplasm of the spores was rapidly fluidized within an hour by glucose-induced germination. These results demonstrated that the spore cytoplasm is in a solid-like state, and cytoplasmic fluidity rapidly increases in spores during germination. To investigate the mechanisms underlying the increase in the fluidity of spores, I focused on the glucose-stimulated cAMP-PKA pathway, because glucose induces spore germination. The depletion of genes associated with the cAMP-PKA pathway prevented cytoplasm fluidization and spore germination induced by glucose stimulation. This result strongly suggests that germination requires cytoplasmic fluidization. Trehalose, a disaccharide, is known to reduce the fluidity in vegetative budding yeast cells, and accumulate during sporulation in fission yeast. Therefore, I examined possible links between the cAMP-PKA pathway and trehalose synthesis/degradation. The GEMs imaging data demonstrated that the glucose-induced germination causes rapid trehalose degradation at the same time as increased cytoplasmic fluidity. Disruption of the trehalose-degrading gene, *ntp1*, inhibited cytoplasmic fluidization and spore germination, indicating that cytoplasmic fluidization needs trehalose degradation for germination. Furthermore, *pka1*-deficient mutant spores did not show

any trehalose degradation. These data revealed that glucose-stimulated germination requires the activation of the cAMP-PKA pathway, followed by cytoplasmic fluidization via Ntp1-mediated trehalose degradation.

Next, to clarify the activation dynamics of the cAMP-PKA pathway during germination, I established live-cell imaging systems to visualize and manipulate the PKA activity. Because of the lack of tools to visualize the PKA activity in yeasts, I developed a PKA biosensor, called spPKA-KTR, which is based on the principle of kinase translocation reporter (KTR). spPKA-KTR shuttles between the nucleus and cytoplasm depending on its phosphorylation by PKA, and thus the subcellular localization of spPKA-KTR reflects PKA activity. As expected, glucose stimulation in vegetative cells induced translocation of spPKA-KTR from the nucleus to the cytoplasm, indicating PKA activation. To quantify the subcellular localization of spPKA-KTR, I tested a near-infrared fluorescent protein iRFP fused with nuclear localization signals (NLS-iRFP-NLS) as a nuclear marker. Unexpectedly, NLS-iRFP-NLS did not fluoresce at all in fission yeast. To overcome this issue, I tried to develop a method for iRFP imaging in fission yeast. In a series of experiments, I found that phycocyanobilin (PCB) functions as a chromophore for iRFP and enhances its fluorescence more than biliverdin (BV), which is a conventional chromophore for iRFP. The addition of purified PCB to cells expressing NLS-iRFP-NLS outperformed the addition of BV regarding iRFP fluorescence intensity. Further, I applied a PCB biosynthesis system, SynPCB, to iRFP imaging in fission yeast, allowing NLS-iRFP-NLS fluorescence imaging without adding purified PCB. To manipulate cAMP level and PKA activity, I introduced a photoactivated adenylate cyclase bPAC into fission yeast. Combining spPKA-KTR with bPAC enabled to visualization and manipulation of intracellular PKA activity in vegetative fission yeast cells. However, unfortunately, spPKA-KTR could not function in spores due to its aggregation.

In summary, I found that cytoplasmic fluidization plays an essential role in germinating fission yeast spores through trehalose degradation via the cAMP-PKA pathway. Because macromolecules such as RNA polymerase and ribosomes are comparable in size to GEMs, their diffusion could be suppressed in spores. Therefore, it is suggested that spores maintain dormancy by decreasing transcription and/or translation, and cytoplasmic fluidization triggers dormancy breaking and germination initiation through resuming RNA and/or protein synthesis. PKA imaging system with spPKA-KTR and bPAC would provide an experimental basis for investigating PKA activity dynamics in fission yeast.

第一章 背景

細菌、酵母、哺乳類細胞を始めとする様々な細胞は、一時的に増殖を停止した休眠状態となることが知られている。休眠した細胞は外環境からの化学的・物理的なストレスに対する耐性を持ち、環境条件が良好になるまで、増殖に適さない環境を耐え忍ぶ。環境条件が良好になると休眠から復帰して細胞増殖を再開する。こうした休眠と復帰過程の例として、例えば、細菌や酵母は孢子と呼ばれる休眠細胞を形成するが、細胞外に栄養源があることを感知すると休眠から復帰し増殖を再開する [1,2]。別の例として、休眠したがん細胞は、増殖中のがん細胞を標的とした薬剤から逃れて宿主の体内に潜伏し、ある時に突発的に増殖してがん治療を困難にする一因になる [3]。このように、細胞は休眠と復帰過程を適切に制御することでストレス環境を耐え忍ぶと考えられ、その制御機構の理解は将来的にはがん治療などへの応用へも繋がることが期待される。

単細胞性の真核生物である分裂酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) は、栄養源を枯渇させるだけで容易に休眠を誘導できることから、有用な休眠のモデル生物の一つである。分裂酵母は豊富な栄養源の存在下では主に1倍体で生育し、活発に分裂・増殖する。環境中の窒素源が枯渇すると、増殖を停止して、異種の接合型 (h+もしくは h-) の細胞同士で融合する (接合)。接合した細胞は2倍体となり、その後、減数分裂を経て、1倍体の孢子を形成する (図 1) [4]。孢子は増殖を一時的に停止した休眠細胞であり、熱ショック、有機溶媒 (エタノール、アセトンなど)、細胞壁の消化酵素などの様々なストレスに対して耐性を持つ [5-8]。加えて、孢子は栄養源が存在しない環境で数ヶ月に渡り生き延びることができる [9]。孢子の復帰過程は、グルコースなどの炭素源の刺激で誘導される [5]。この過程は発芽と呼ばれる (図 1) [10,11]。このように、分裂酵母はストレス耐性の獲得過程 (孢子形成) と孢子からの復帰過程 (発芽) を厳密に制御することで、栄養源が変動する自然環境においても生存することができると考えられる。

分裂酵母の孢子形成と発芽過程について、これまで様々な研究が報告されてきた。孢子形成については、1960年代に孢子の形成不全を示す変異体が単離され [12]、その後、1980年代にはどの遺伝子に変異が導入されているかが次々に同定さ

れた [13,14]。2000 年初頭には分裂酵母の染色体ゲノムの塩基配列が決定されたことでゲノムワイドな解析が可能となり [15]、マイクロアレイ解析によって孢子形成過程における遺伝子の発現変動が網羅的に調べられた [16]。その後も顕微鏡観察や分子生物学的手法を用いて、孢子形成に関与する遺伝子・タンパク質の機能が詳細に明らかにされてきた [6,17]。このように孢子形成に関わる分子基盤は比較的研究が進んでいるが、発芽過程は対照的に研究が進んでいない。その一つの原因として発芽過程を解析する技術的な難しさが挙げられる。発芽過程に必要な遺伝子を順遺伝学的にスクリーニングしようとしても、孢子の形成や維持に必要な遺伝子と入り混じって変異体が単離されてしまい、発芽にのみ必要な遺伝子を同定することは難しい。また、分裂酵母の発芽開始を同調させる手法が確立していないため [1]、細胞集団を用いたオミックス解析や生化学的解析は現状では困難である。こうした背景から、これまで主に 1 細胞レベルでの解析や顕微鏡観察を用いて発芽過程は研究されてきた。限られた研究例として、1 細胞 RNA-seq による発芽後の遺伝子の発現変動 [1,11] や顕微鏡観察による発芽中の孢子の形態変化 [18,19] などの解析結果が報告されている。しかし、従来の研究では栄養源を感知してから細胞内でどのような分子機構が働くことで発芽開始が決定されるのか、その詳細は明らかになっていない。すなわち、上述した発芽過程中的遺伝子の発現変動や形態変化が起きるまでの発芽初期に起きる分子機構が明らかになっていない。唯一の研究例として、発芽を誘導するグルコースの感知経路 (cAMP-PKA 経路) が同定されているが [10]、本経路の下流でどのような細胞機能が活性化されるのか、そして、本経路がどのような活性動態を示すことで発芽が始まるのかはわかっていない。発芽開始は、孢子というストレス耐性を持った細胞状態から脱することを意味し、誤った時期に発芽が始まってしまうと細胞自身が危険に晒される恐れがある。したがって、発芽の開始時期は厳密に制御されていると考えられる。

近年、増殖期の出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) が栄養源枯渇などのストレスに晒されると、細胞質の流動性が低下することが報告されている [20,21]。詳しくは 2.1.2 に記載するが、流動性の低下は酵母細胞のストレス耐性に関与することも知られている [20]。分裂酵母の孢子は炭素源・窒素源などの栄養源が枯渇した環境で生存できるため、孢子の細胞内も増殖期細胞と比較して流動性が低下していると予想される。仮に、孢子内の流動性が低下しているのならば、孢子から復帰する過程で

は、いわば「固体様状態」の細胞質で cAMP-PKA 経路を始めとするシグナル伝達経路が活性化する必要がある。こうした細胞質状態では、シグナル分子の動きが制限されることで分子同士の相互作用も抑制され、シグナル伝達が円滑に進行しないことが考えられる。しかし、分裂酵母の胞子で細胞質の流動性が低下しているのか、そして、流動性が低下した細胞質でシグナル伝達経路がどのように活性化するのかは明らかになっていない。

1.1 本論文の構成

本研究では、まず、分裂酵母の発芽過程における細胞質の流動性の制御機構を解析し(第二章)、さらに、流動性の制御に関わることが明らかになった cAMP-PKA 経路の活性動態の可視化・操作の実験系を構築した(第三章)。

第二章では、発芽開始に伴う細胞質の流動性の制御機構について記述する。近年、栄養源枯渇などのストレス環境に置かれた酵母細胞では、細胞質が流動性を失い、様々な分子の拡散が制限されることが報告されている。そこで、分裂酵母の胞子においても細胞質の流動性が低下しているのか、そして、流動性がどのように制御されるのかを明らかにすることを目指した。その結果、胞子では流動性が増殖期と比べて低下しており、発芽誘導後に cAMP-PKA 経路の制御下でトレハロース分解経路が活性化することが細胞質の流動化に必要であることを明らかにした。

第三章では、発芽誘導後の細胞質流動化に必要となる cAMP-PKA 経路の可視化・操作の実験系の構築と、それに付随して得られた近赤外蛍光タンパク質 iRFP の高輝度化について記述する。まず、分裂酵母の PKA 活性を可視化するためのバイオセンサー spPKA-KTR を開発した。spPKA-KTR の局在マーカー(核マーカー)を同時に観察する必要があったため、核局在化シグナル(NLS)を付加した近赤外蛍光タンパク質 iRFP の利用を試みた。その結果、iRFP は哺乳類細胞や出芽酵母で利用されているが、分裂酵母の細胞内では蛍光を発しないことを発見した。iRFP を分裂酵母で利用する手法の開発を進めたところ、従来よりも iRFP を高輝度に観察する手法を開発することに成功した。また、光照射によって cAMP 量や PKA 活性を操作できる光遺伝学 bPAC と spPKA-KTR を組み合わせ、増殖期の分裂酵母において PKA 活性を可視化・操作することに成功した。

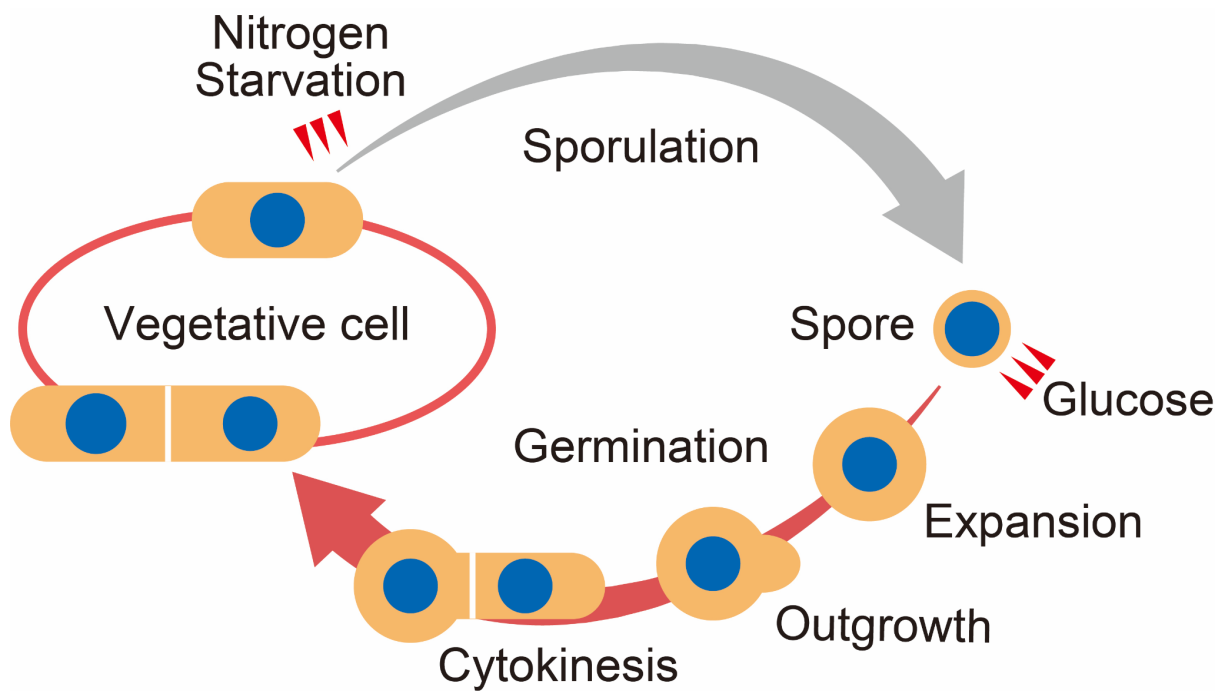


図1 分裂酵母の生活環

分裂酵母は栄養源が豊富な環境では活発に分裂・増殖するが、窒素源が枯渇すると休眠状態である胞子を作る。胞子はグルコースを感知すると、細胞サイズの膨張、突起状構造 (Germ tube) の形成といった一連の形態変化を経た後に、分裂して再び増殖を始める。この胞子から増殖期への復帰過程は発芽と呼ばれる。

第二章 分裂酵母の発芽過程における細胞質流動性の制御機構の解明

2.1 序

2.1.1 細胞内環境と細胞内機能

細胞の内部は多種多様な生体物質が混み合った環境である。図 2 には代表的な生体物質の大きさを示しており、様々なタンパク質 (GFP は直径 5 nm 程度)、タンパク質や RNA の複合体 (RNA ポリメラーゼ 直径 20 nm 程度、リボソーム 直径 40 nm 程度)、そして細胞小器官 (P-body 直径 100 nm 程度、酵母の核 直径 2 μm) などが、直径数 μm (酵母) から数十 μm (哺乳類細胞) 程度の細胞という区画に高密度で存在している。こうした細胞内環境において、生体物質は以下に示す主に 2 つの移動様式によって細胞内を動き回り、目的の分子と出会うことで生化学反応・プロセスを進行させる。一つは、分子モーターが細胞骨格上を動くことによる、積荷タンパク質や細胞小器官の方向性を持った輸送 (能動的輸送) である [22]。もう一つは、タンパク質、mRNA などを始めとする生体物質が周囲の他の分子と互いに衝突することで引き起こされるランダムな動き (拡散運動) である [23]。特に、後者の分子の拡散運動は、細胞周期や外環境からのストレスに応じた細胞内密度の変化の影響を受ける。細胞内密度が変化する例として、例えば、哺乳類細胞では分裂期に細胞体積が 10~30% 増加し、その結果、細胞内密度が低下することが知られている [24,25]。酵母では、高浸透圧ストレスに応答して細胞体積が減少し高密度化することが知られる [26,27]。このような細胞内密度の変化は、細胞質で進行する生化学反応へも影響することがわかっている [28-30]。したがって、細胞内環境の変化に応じた生体物質の拡散運動を評価し、それに基づき生化学反応・プロセスを理解することが重要であると考えられる。なお以降では、細胞内における生体物質の拡散のしやすさを「(細胞質) 流動性 (cytoplasmic fluidity)」と呼び、例えば、分子が拡散しやすい環境は「(細胞質) 流動性が高い」と表現する。

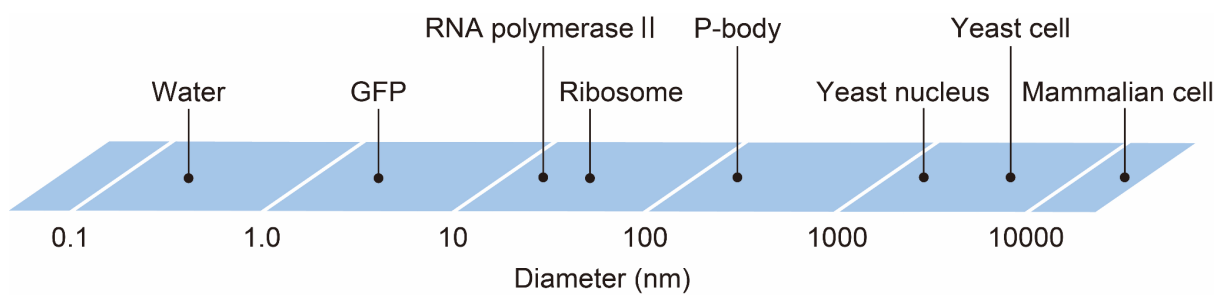


図2 細胞に関連した生体物質の大きさ

酵母細胞 (直径 5~10 μm) や哺乳類細胞 (直径 40 μm) 内には、水分子 (直径 0.38 nm) のような小さい分子を始めとし、タンパク質 (GFP 直径 5 nm)、タンパク質・RNA 複合体 (直径 20~40 nm)、細胞小器官 (直径 数百 nm~数 μm) などが存在する。

2.1.2 栄養源枯渇時の細胞内部の流動性

近年、栄養源枯渇時に細胞内の様々な生体物質の拡散が制限されること、つまり、細胞内の流動性が失われることがわかってきた。例えば、出芽酵母では、主要な炭素源となるグルコース枯渇時や ATP 枯渇時に、細胞内 pH の低下や細胞内からの脱水に起因して、100 nm サイズの粒子や染色体、mRNP (mRNA とタンパク質の複合体) の拡散が遅くなる [20,21]。また、分裂酵母では、定常期 (Stationary phase) にミトコンドリアや脂肪滴などの細胞小器官の動きが制限される [20,31]。大腸菌 (*Escherichia coli*) では、細胞内 ATP の枯渇時に、プラスミド DNA、フィラメントタンパク質、100 nm サイズの粒子の拡散が遅くなる [32]。こうした細胞内部の流動性の低下は、栄養源枯渇時の酵母細胞の生存率に関与することも知られている [20]。本研究で対象とする分裂酵母の胞子は、炭素源や窒素源などの栄養源が枯渇した環境においても生存できる。よって、過去の知見に基づくと、分裂酵母の胞子でも細胞質の流動性が低下していると予想される。実際に、出芽酵母の胞子では、細胞質の流動性が失われていることが最近報告されている [33]。しかし、従来の研究はいずれも、数百 nm 程度の粒子や DNA、細胞小器官などの細胞内部では比較的大きなサイズの生体物質の拡散のみを測定することで流動性を評価している。つまり、タンパク質や mRNA と同等のサイズの分子の動きは明らかになっていない。加えて、細胞内部の流動性がどのような環境条件で低下するかは研究されているが、栄養源が再供給された時に細胞質の流動性を元に戻すための分子機構は明らかになっていない。分裂酵母の胞子内部の流動性が低下するならば、発芽開始後にいずれかの時期に流動性が増殖期細胞と同程度まで上昇すると考えられる。よって、分裂酵母の発芽過程を対象とすることで、流動性の制御機構の理解へ繋がると考えられる。

2.1.3 細胞質流動性の評価方法

流動性や硬さといった、細胞質のレオロジー的性質を測定する手法としてマイクロレオロジーが知られている。ここでレオロジーとは、物質の流動や変形を扱う学問の一分野である。マイクロレオロジーは大きく 2 つに大別され、それぞれ active microrheology と passive microrheology と呼ばれる。前者の active microrheology は、磁力や光ピンセット、原子間力顕微鏡 (AFM) などを用いて外部から細胞に対し機械的

な力を加え、その応答を計測する手法である [34]。後者の *passive microrheology* は、細胞内に粒子やビーズを導入してそれらの動きを追跡し、細胞内の流動性を推定する手法である (図 3A) [35]。 *passive microrheology* の例として、例えば、蛍光標識したデキストランやフィコールといったポリマーを哺乳類細胞へ微量注入し (マイクロインジェクション)、それら粒子の動きを定量した研究例がある [36,37]。これらポリマーは生体外物質であり、細胞内の構造や因子と特異的な相互作用を起こさないと考えられ、純粋な拡散を測定できると期待される。本研究で使用する分裂酵母の場合は、硬い細胞壁で表面が覆われており、哺乳類細胞のようにマイクロインジェクションを用いて粒子を細胞質へ注入するということは困難である。実際に過去に分裂酵母へマイクロインジェクションする試みが報告されたが、酵母細胞を捕捉するための専用のチャンバーが必要であると共に、インジェクションが成功しても 7 割以上が死んでしまい実用的でなかった [38]。こうした背景から、酵母細胞では蛍光標識した粒子を細胞内で自己集合的に作り出す手法が有効である。具体的には、自己集合することが知られているタンパク質に蛍光タンパク質を融合し、この融合タンパク質をコードする DNA 配列を細胞内で発現させる。その結果、細胞自身が粒子を生合成し、それらの動きを追うことで流動性を評価することができる。これまでに、20 nm、40 nm、100 nm 程度の粒子を細胞内で作り出す手法が報告されており、細菌、酵母、哺乳類細胞など様々な生物種で利用されている [32,39]。

また、共焦点蛍光顕微鏡を利用することで光学分解能以下のサイズの粒子の流動性を推定する方法があり、蛍光相関分光法 (FCS) と光褪色後蛍光回復法 (FRAP) が知られている。溶液や細胞内では分子がランダムに拡散運動する (ブラウン運動)。FCS では、共焦点体積 (1 fL 程度) という極微小領域においてランダムに運動している蛍光分子の蛍光輝度の変動を検出する。その蛍光輝度の変動から自己相関関数を計算することで、蛍光分子の拡散係数を求めることができる (図 3B)。FRAP では、細胞内の一部の領域に強い光を照射して光褪色 (フォトブリーチ) させる。その後、光褪色した領域に蛍光分子が流入してくることで起きる蛍光輝度の回復を観察し、拡散係数を求める (図 3C)。このような手法の違いにより、FCS では数百 nm スケールでの拡散、FRAP では数十 μm スケールでの拡散を定量することができる。

このような passive microrheology、FCS、FRAP を組み合わせることで、分裂酵母の胞子内部において数 nm～数十 nm 程度の分子がどのように動いているのかを定量することができる考えた。

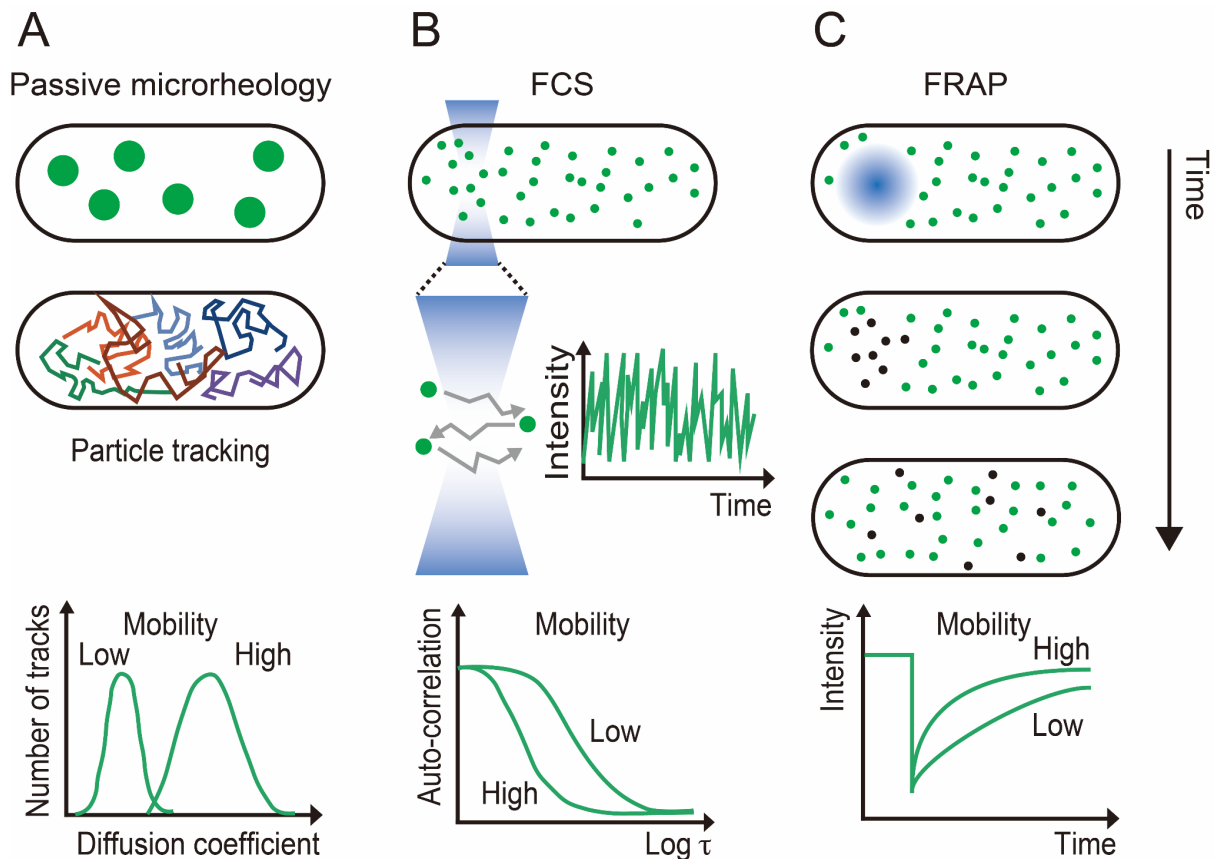


図3 細胞質流動性の評価方法

(A) passive microrheology の模式図。細胞内に蛍光性の粒子を導入し、それらの動きを顕微鏡で観察した後、一つ一つの粒子を追跡することで、粒子の拡散係数を求めることができる。更には、集団間における粒子の平均的な挙動を比較することで細胞質の流動性を評価することができる。(B) FCS の模式図。共焦点領域内における蛍光分子の輝度の変動を定量する。その後、自己相関関数を計算することで細胞質における蛍光分子の拡散係数を求めることができる。蛍光分子の拡散が遅い場合は自己相関関数の減衰が緩やかであり、逆に、拡散が速い場合は減衰が速やかである。(C) FRAP の模式図。細胞の一部の領域をフォトブリーチし、その領域の蛍光輝度の回復を観察することで、蛍光分子の拡散係数を測定できる。拡散が遅い場合は蛍光輝度の回復が緩やかであり、逆に拡散が速い場合は回復が速やかである。

2.1.4 cAMP-PKA 経路による発芽開始の制御

分裂酵母の発芽開始には、グルコース感知機構として知られる cAMP-PKA 経路が必要である [10]。本経路は、グルコース受容体 GPCR (Git3)、ヘテロ三量体 G タンパク質 (α subunit Gpa2、 β subunit Git5、 γ subunit Git11)、cAMP 合成酵素 (adenylate cyclase Cyr1)、PKA 複合体 (catalytic subunit Pka1、regulatory subunit Cgs1)、そして cAMP 分解酵素 (phosphodiesterase Cgs2) から構成される [40–46] (図 4)。グルコース存在下では Git3 受容体が活性化し、細胞内で cAMP が合成され、その結果、Pka1 が活性化し下流のターゲットとなるタンパク質がリン酸化される。Pka1 の抑制機構として、phosphodiesterase Cgs2 による cAMP の分解が知られている。cAMP-PKA 経路の胞子形成や発芽に対する寄与は、主に遺伝学的な手法で調べられてきた [10]。Pka1 に対し抑制的に働く *cgs1* や *cgs2* の遺伝子破壊株では、Pka1 の活性が常に高くなっており、それらの細胞は窒素飢餓時でも細胞同士の融合が起きず、結果として胞子が形成されない [47–49]。*gpa2*、*cyr1*、*pka1* の遺伝子破壊株から作製した胞子では、Pka1 の活性が上がらなくなり、発芽開始が大きく遅れる [10]。このように、cAMP-PKA 経路は胞子形成の過程では活性が抑制され、発芽開始では対照的に活性が上昇することが必要であると考えられる。

胞子形成における cAMP-PKA 経路の下流因子は同定されているが、発芽過程ではいまだ見つかっていない。[48,50]。増殖期では転写因子 Rst2 が Pka1 からリン酸化され転写活性が抑制されるが、窒素源枯渇に応答して Pka1 活性が抑制されると Rst2 が活性化し、接合・減数分裂に必要な遺伝子の転写が始まる。しかし、発芽過程では cAMP-PKA 経路が必要であることは示されているものの、下流でどのような因子が活性化され、発芽が始まるのかは明らかになっていない。

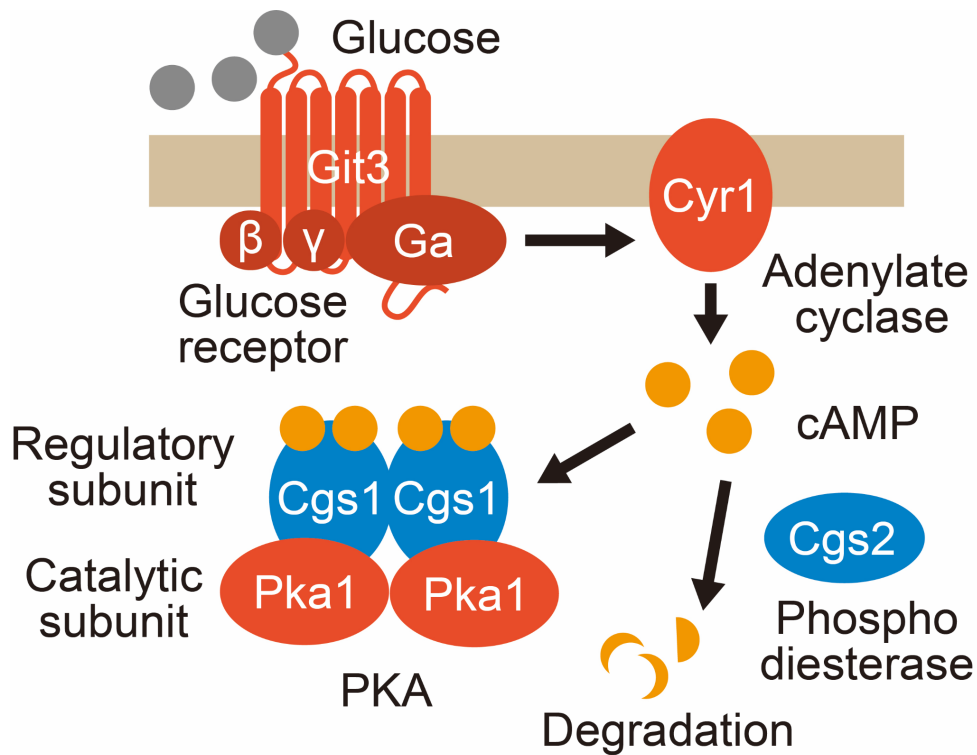


図4 分裂酵母の cAMP-PKA 経路

グルコース受容体 (Git3) がグルコースを感知して活性化すると、ヘテロ三量体 G タンパク質の β subunit (Git5) と γ subunit (Git11) を介して α subunit (Gpa2) が活性化する。活性化型 Gpa2 が adenylate cyclase (Cyr1) を活性化すると cAMP が細胞内で産出される。cAMP が PKA regulatory subunit (Cgs1) に結合すると catalytic subunit (Pka1) が活性化し、下流のターゲットタンパク質をリン酸化する。cAMP が phosphodiesterase (Cgs2) によって分解されることで Pka1 の活性が抑制される。

2.1.5 トレハロースによる細胞質流動性の制御

トレハロースはグルコース 2 分子が 1,1-グリコシド結合した二糖である。分裂酵母ではトレハロース-6-リン酸合成酵素 Tps1 を介して細胞内でトレハロースが合成され、逆に、トレハラーゼ Ntp1 によって分解される (図 5) [51–53]。トレハロースは増殖期の酵母細胞からはほとんど検出されず [51,54]、ストレス環境において合成が促進されることが知られている。実際に、分裂酵母の孢子ではトレハロースが蓄積し [52,55,56]、また、トレハロースを蓄積できない変異体 (*tps1Δ*) では孢子状態を維持できず、結果として生存率が低下する [51]。トレハロースは、孢子だけでなく、グルコース枯渇 [57]、窒素源枯渇 [58]、熱ショック [59]、定常期 [51] など様々なストレス環境で分裂酵母の細胞内に蓄積する。このことから、トレハロースは様々なストレス耐性に寄与することが推測される。加えて、分裂酵母だけでなく、大腸菌 [60]、出芽酵母 [61]、更には、ネムリユスリカ (*Polypedilum vanderplanki*) [62] やクマムシ (*Hypsibius exemplaris*) [63] などの多細胞生物でも、トレハロースが熱ショックや乾燥といったストレス環境で細胞内に蓄積し、生存率やストレス耐性に関与する。自然界から単離された酵母の高ストレス耐性はトレハロースの蓄積によるものだという報告もある [64]。このように、トレハロースは生物のストレス耐性獲得と密接に関わっているが、その細胞内での機能は推論の域を出ない。近年、増殖期の出芽酵母に熱ショックを与えるとトレハロースの蓄積によって細胞内の粘度が上昇し、細胞質の流動性が低下することが報告されている [65]。また、出芽酵母や分裂酵母のグルコース枯渇、窒素源枯渇、定常期、熱ショック時に細胞質の流動性が低下することを粒子や蛍光タンパク質を用いて測定されている [20,21,31,39,65]。これらを踏まえると、孢子ではトレハロースを蓄積することで細胞質の流動性を抑え、それが孢子の生存率へ影響を与えるという仮説が考えられた。また、*ntp1* 破壊株ではトレハロースを分解できず発芽開始が遅延することから、増殖期へ復帰する前にトレハロースを細胞内から除去することが必要であると考えられる [52]。

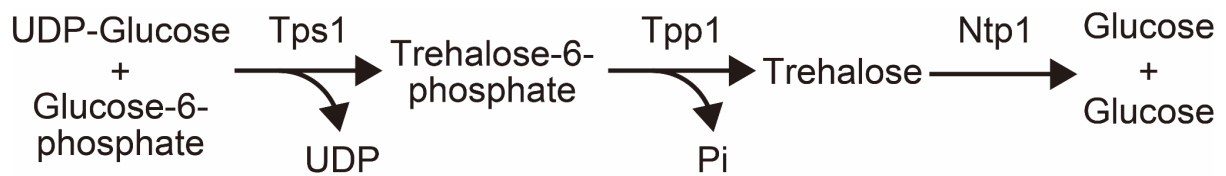


図5 分裂酵母のトレハロース代謝経路

トレハロース合成は、ウリジン二リン酸グルコース (UDP-Glucose) とグルコース-6-リン酸 (Glucose-6-phosphate) からトレハロース-6-リン酸 (Trehalose-6-phosphate) を作り出す反応から始まる。その後、トレハロース-6-リン酸が脱リン酸化されることでトレハロース (Trehalose) が合成される。トレハロース-6-リン酸の合成には Tps1 (alpha,alpha-trehalose-phosphate synthase) が必須であり、*tps1* 欠損株ではトレハロースを合成できなくなる。トレハロース-6-リン酸は Tpp1 (trehalose-6-phosphate phosphatase) によって脱リン酸化される [66]。また、トレハロースの分解は Ntp1 (alpha,alpha-trehalase) が担っており、トレハロースをグルコース 2 分子へと分解する。

2.1.6 本研究の目的

本研究では、分裂酵母の孢子と発芽過程で細胞質の流動性がどのように制御されているのかについて解析した。過去の増殖期の酵母細胞を用いた研究から、環境中の栄養源が枯渇すると細胞質の流動性が低下することが知られており、分裂酵母の孢子でも流動性が低下していることが予想された。しかし、実際に孢子内部の流動性が低下しているのか、また、流動性がどのように制御されているのかは明らかでない。また過去の研究でも、栄養源の枯渇に応じて一過的に流動性を失った細胞質が再び流動化する分子機構は明らかになっていない。そこで、孢子と発芽過程における細胞質の流動性をナノ粒子と蛍光タンパク質を用いて評価した。流動性の評価方法を確立するにあたり、分裂酵母の染色体上に DNA 配列を簡便に挿入するための新規プラスミドベクター (pSKI) を開発した。また、cAMP-PKA 経路とトレハロース代謝経路に着目し、これらの経路が細胞質流動性と発芽開始を制御するのかを調べた。

2.2 材料と方法

2.2.1 プラスミド

本研究で使用したプラスミドを表 1 にまとめた。40 nm-GEM_sp_opt は、FASMAC に外注して分裂酵母用にコドン最適化した 40 nm-GEM の配列を保持している。40 nm-GEM のアミノ酸配列は pCDNA3.1-pCMV-PfV-GS-Sapphire (Addgene plasmid #116933) を参考にした。pMNAT2LA21-40nm-GEM_sp_opt は、pMNAT2LA21(ver.2) と 40 nm-GEM_sp_opt をそれぞれ XhoI-NotI で制限酵素処理し、Ligation high Ver.2 (TOYOBO) を用いてライゲーションすることで作製した。pHBCO2-HA-spmNeonGreen は、孢子特異的に発現誘導されるプロモーターの下流に mNeonGreen を連結したプラスミドである。まず、過去に報告されたマイクロアレイデータを再解析し [16]、孢子形成時に発現が強力に誘導される上位 4 つの遺伝子を見出した。これら遺伝子のプロモーター配列を含むと想定される、ORF 上流の 1000 bp 程度の配列を PCR で増幅し、それぞれ Pos1~4 と命名した。得られた DNA 断片を HindIII-BamHI で制限酵素処理した pHBCA1-HA-spmNeonGreen-new と NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix (New England Biolabs) を用いて連結することで作製した。pHBCO2-ntp1 は、BamHI-NotI で制限酵素処理した pHBCO2-HA-spmNeonGreen と、分裂酵母ゲノムから PCR で増幅した *ntp1* 配列を NEBuilder を用いて連結することで作製した。pSKI ベクターは、*Amp*、*colEI ori* (pUC119 由来)、薬剤選択マーカーカセット (pFA6a-3FLAG-bsd、pFA6a-kan、pAV0587 (pHis5Stul-bleMX)、pMNATZA1、pHBCN1 由来)、*P_{adh1}*、*T_{adh1}* (pNATZA1 由来)、*P_{nmt1}*、*T_{nmt1}* (pREP1 由来)、MCS (合成したオリゴ DNA、Fasmac) を含む。

2.2.2 分裂酵母株と培地

本研究で使用した分裂酵母株を表 2 にまとめた。分裂酵母は通常、32°C で栄養培地である YEA 培地を用いて培養した。形質転換時の培養には SD 培地を適宜用いた。分裂酵母の孢子形成は、SPA 培地に塗布することで誘導した。分裂酵母の発芽は、精製した孢子を YEA-Glucose 培地に懸濁し、終濃度 2% となるようにグルコースを添加することで誘導した。なお、各培地の組成 (1 L 当たり) については以下に

まとめた。寒天培地を作製する場合は、以下の組成に加えて寒天を 20 g 添加した (SPA 培地の場合は 30 g)。また、薬剤耐性遺伝子を導入した細胞を選択する場合には使用した各種薬剤についても以下にまとめた。

• YEA 培地

Yeast extract	5 g
Glucose	30 g
Adenine	225 mg

* YEA-Glucose 培地を作製する場合は Glucose を除いた。

* YEA+Glycerol 培地は Glucose の代わりに Glycerol を 2% (w/v) 添加した。

• SD 培地

Yeast nitrogen base without amino acids	6.7 g
Glucose	5 g

• SPA 培地

Glucose	10 g
KH ₂ PO ₄	1 g
1,000× Vitamine stock (*1)	1 ml

(*1) 1,000× Vitamine stock (100 ml 当たり)

パントテン酸	100 mg
ニコチン酸	1000 mg
イノシトール	1000 mg
ビオチン	1 mg

• 薬剤耐性遺伝子

薬剤終濃度

<i>kan^r</i>	0.1 mg/ml G418 (Geneticin)
<i>hyg^r</i>	0.2 mg/ml Hygromycin-B (Wako)
<i>nat^r</i>	0.1 mg/ml ClonNat (重松貿易)
<i>bsd^r</i>	0.05 mg/ml Blastcidine (フナコシ)

2.2.3 分裂酵母の形質転換

細胞を 1.0×10^7 cells/ml 程度まで培養して遠心集菌し、滅菌水で洗浄した後に、酢酸-リチウム-TE 30% Glycerol 溶液 50 μ l (100 mM Lithium-acetate, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA (pH 8.0), 30% Glycerol) に懸濁した。懸濁液にサケ精子 DNA 5 μ l (Sonicated Salmon Sperm DNA, BioDynamics Laboratory Inc.)、DNA 断片もしくはプラスミド 5 μ l、および酢酸-リチウム-TE 50% PEG 溶液 145 μ l (100 mM Lithium-acetate, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA (pH 8.0), 50% PEG4000) を添加してよく懸濁した。42°Cで10分間熱ショックを与えて、遠心集菌し、滅菌水 50 μ l で懸濁した。懸濁液を YEA 寒天培地に塗布し、32°Cで半日ほど静置培養した。その後、選択培地へレプリカし、生えてきたコロニーに目的の遺伝子が導入されているかを確認した後、-80°Cへ保管した。細胞株は Fission yeast stock solution (0.5% Yeast extract, 3% Glucose, 20% Glycerol, Ampicillin 100 μ g/ml) に懸濁して保存した。

分裂酵母の染色体上にプラスミドを組み込む場合は、使用するプラスミドを *Apal* で制限酵素処理し、線状化されたプラスミドをエタノール沈殿で回収して、形質転換に用いた。相同組み換えによって目的の染色体上の位置 (*z*, *c*, 1L, 2L, 3R locus) へ正しく組み込まれたかはコロニーPCRで確認した。また、内在性遺伝子のC末端領域に蛍光タンパク質などのタグを融合するために、内在性遺伝子との相同配列 (500 bp 程度)、タグ遺伝子、*adh* ターミネーターおよび薬剤耐性遺伝子発現用カセット (*kan^r*, *hyg^r*, *nat^r*, *bsd^r*, *ble^r*) を PCR で増幅し形質転換した。同様に、遺伝子破壊には、対象の遺伝子上流および下流の 500 bp 程度の相同配列と薬剤耐性遺伝子発現用カセットを PCR で増幅し形質転換した。タグ融合および遺伝子破壊どちらについても、該当部位の外側から増幅できるようなプライマーを設計して、コロニーPCRによって正しい組み換えが起きているのかを確認した。

2.2.4 分裂酵母のゲノム抽出

寒天培地に生えたコロニーを少量掻き取り、Breaking buffer 0.2 ml (500 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM EDTA, 1% SDS) に懸濁した。ガラスビーズ 50 μ l およびフェノール/クロロホルム 0.2 ml を添加し、2分間激しく攪拌した。9,560 g、室

温、5分間遠心し、上清を回収した。その後、エタノール沈殿によってDNAを回収し、風乾後、TE 50 μ l に溶解して4°Cで保管した。

2.2.5 分裂酵母の増殖速度の測定

分裂酵母を YEA 培地中で 32°C で OD₆₆₀ = 1.0 になるまで前培養した後、YEA 培地で 20 倍希釈した。Compact Rocking Incubator Biophotorecorder TVS062CA (Advantec) を使い、32°C、70 rpm の条件で振とう培養し、OD₆₆₀ を 30 分毎に測定した。増殖曲線はロジスティック関数 $x = K / (1 + (K/x_0 - 1)e^{-rt})$ を使いフィッティングした (x : 細胞数, K : 環境収容力, x_0 : 初期細胞数, r : 内的自然増加率, t : 時間)。倍加時間 ($\ln 2 / r$) は Python3 (<https://www.python.org/>) と Scipy (<https://scipy.org/>) を使って計算した。

2.2.6 分裂酵母の孢子精製

細胞を YEA 培地中で 1.0×10^7 cells/ml 程度まで培養し、遠心集菌し、滅菌水で 1~2 回洗浄した。滅菌水で懸濁して、SPA 寒天培地に塗布し、26°C で 3 日間静置培養した。SPA 寒天培地上の細胞を回収して滅菌水に懸濁し、終濃度 2% となるようにグルスラーゼ (PerkinElmer) を加え、室温で 3 時間程度、回転培養した。細胞を遠心回収して、0.5% Triton-X100 で 3 回洗浄後、懸濁した。その後、100% Percoll 溶液 1 ml に細胞懸濁液を重層し、9,560 g、4°C、5 分間遠心した。一番下層の孢子層を回収し、再度、同様の遠心操作を行った。0.5% Triton-X100 で 3 回洗浄後、懸濁して 4°C で保存した。

2.2.7 分裂酵母の蛍光イメージング

分裂酵母の観察には、sCMOS カメラ (ORCA-Fusion BT; Hamamatsu Photonics)、対物レンズ (UPLXAPO 100 \times , NA = 1.45, WD = 0.13 mm; or UPLXAPO 60 \times PH, NA = 1.42, WD = 0.15 mm; Olympus)、共焦点スキャナユニット (CSU-W1; Yokogawa Electric Corporation) を備えた、IX83 倒立顕微鏡 (Olympus) を使用した。40 nm-GEM もしくは mNeonGreen を発現する細胞の観察では、励起レーザ (488 nm, Coherent)、励起フィルター (525/50, Yokogawa Electric Corporation)、ダイクロイックミラー (DM405/488/561/640, Yokogawa Electric Corporation) を使用した。また、40 nm-GEM

を発現させた細胞の観察では、Metamorph の Stream Acquisition (Stream to RAM) を使用した。100 msec のインターバルで 10 sec 観察し、合計 101 枚の画像を一度の測定で取得した。

分裂酵母の増殖期および胞子を蛍光顕微鏡で観察する場合は、遠心して集めた細胞をスライドガラス (MAS コートスライド, 76 × 26 mm, Matsunami Glass Ind., Ltd.) に載せ、カバーガラス (18 × 18 mm No.1, Matsunami Glass Ind., Ltd.) を上から被せてから観察した。阻害剤を使う場合は、2-Deoxy-D-glucose (2-DG, Wako) は終濃度 1% となるように、Cycloheximide (CHX, Nacalai Tesque, #06741-91) は 100 µg/ml となるように、Torin1 (Selleckchem, #S2827) は終濃度 25 µM となるように添加した。

2.2.8 細胞内トレハロースの定量

細胞内トレハロースの定量には Trehalose assay kit (K-TREH, Megazyme) を使用し、メーカーの説明書と過去の研究 [65] を参考にして実施した。

増殖期と胞子とでトレハロース量を比較する場合は、細胞を対数増殖期まで YEA 培地で培養することで増殖期の細胞として使用し、胞子は精製してから使用した。それぞれ細胞数をセルアナライザー Moxi GO II (ORFLO) を用いて計測し、増殖期は 1.0×10^8 、胞子は 1.0×10^7 の細胞を使用した。この時、細胞の体積も同装置で計測した (増殖期 : 30~40 fL 程度、胞子 : 10~12 fL 程度)。細胞を YEA-Glucose 培地 1 ml で洗浄し、その後、95°C で熱した蒸留水 100 µl を添加して激しく攪拌した。95°C のインキュベーターで 15 分間静置してから、遠心して上清 100 µl 程度を別の 1.5 ml チューブへ回収した。残ったペレットへ 95°C で熱した蒸留水 100 µl を添加して 5 分間、室温で攪拌した。遠心してから上清 100 µl 程度を 1.5 ml チューブへ回収し、合わせて 200 µl 程度の細胞抽出液を得た。この抽出液を Trehalose assay kit で使用した。基本的に抽出した日に測定まで行い、使用するまでは 4°C で保管した。96 ウェルマイクロプレート (Thermo Fisher Scientific, #167008) を使用し、サンプルはそれぞれ 20 µl、3 連 (Technical triplicate) で、吸光マイクロプレートリーダー Thermo Scientific Multiskan FC (Thermo Fisher Scientific) を用いて 340 nm の吸光を測定した。細胞内トレハロースを絶対定量する場合は、トレハロース溶液 (1.25, 2.5, 5.0, 10, 20 µg) も合わせて測定して検量線を作製した。また、細胞数 (胞子の方が 10 倍多い) と細胞体積についても補正してトレハロース濃度を算出した。

発芽過程における細胞内トレハロースを測定する場合は、精製した胞子の細胞数をセルアナライザーMoxi GO II (ORFLO) を用いて計測し、胞子を蒸留水で2回洗浄してから YEA-Glucose 培地に懸濁し、 1.0×10^7 ずつ 1.5 ml チューブに分けた。グルコースを2%となるように添加することで発芽を誘導し、32°Cのインキュベーターで静置した。各タイムポイントでチューブを遠心して細胞を回収し、上で記載した通りの方法で細胞抽出液の回収およびトレハロースの定量を行った。

2.2.9 FCS

Leica SP8 Falcon 共焦点顕微鏡を用いて FCS 測定を行った。対物レンズは HC PL APO 63×/1.20 W motCORR CS2 (Leica) を使用した。以前と同様に [67,68]、データの解析は Leica のソフトウェアを使用した。mNeonGreen を発現する細胞の観察では、488 nm の波長で励起し、Leica 高感度検出器 HyD を使って 500~600 nm の範囲の蛍光を検出した。Structural parameter と Effective confocal volume の較正には、蒸留水で希釈した 500 nM Rhodamine 6G (TCI, R0039) を用いた。室温における蒸留水中での Rhodamine 6G の拡散係数は $414 \mu\text{m}^2/\text{s}$ であることが報告されており [69]、これを参考にした。本研究では、Structure parameter は 1.88、Effective confocal volume は 0.88 fL と見積もられた。

蛍光輝度の変動は 30 秒間測定し、Leica FCS 解析ソフトウェアの photobleach correction algorithm を使って補正した。その後、同ソフトウェアを使って自己相関関数を計算、および、以下に示した 1 成分 Normal diffusion のトリプレットモデルを使いフィッティングし、拡散係数を算出した。

$$G(\tau) = 1 + \frac{\left(1 - T + T \exp\left(\frac{-\tau}{\tau_{triplet}}\right)\right)}{N(1 - T)} \times \left(\frac{1}{1 + \frac{\tau}{\tau_D}}\right) \left(\frac{1}{1 + \left(\frac{1}{s}\right)^2 \left(\frac{\tau}{\tau_D}\right)}\right)^{\frac{1}{2}}$$

N : 観察領域内に存在する蛍光分子の平均分子数、 T : トリプレット状態にある蛍光分子の割合、 $\tau_{triplet}$: トリプレット状態にある蛍光分子の寿命、 τ_D : 相関時間、 s : structure parameter

2.2.10 FRAP

FRAP では共焦点レーザー走査型顕微鏡 FV3000 (Olympus) を用いた。対物レンズは UPLXAPO60XO ($\times 60$, NA = 1.42, WD = 0.15 mm; Olympus) を使用した。

mNeonGreen を発現する細胞の観察では、488 nm の波長で励起し、500~540 nm の範囲の蛍光を検出した。光刺激で細胞の半分程度をブリーチした。胞子ではレーザー強度 40%、刺激時間 12 msec、増殖期細胞ではレーザー強度 100%、刺激時間 19 msec で光刺激した。スキャンスピードは 50~100 msec で、20 フレーム撮影後に光刺激して、合計 150 フレーム撮影した。

FRAP の解析は同研究室の近藤 洋平助教と協力して行った。光刺激前の蛍光画像 20 フレームを時間平均したものに大津の方法を適用して二値化することで、細胞領域を検出した。この領域について輝度パターン $c(x, y, t)$ の時間発展を次の拡散方程式モデルでシミュレーションした。

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D\Delta c - kc,$$

ここで D は拡散係数である。減衰項 kc は観察中の光褪色を考慮するためのものであり、輝度減衰率 k は細胞全体の輝度和の光刺激後の時系列から最小二乗法によって推定した。モデルの数値積分には FTCS 差分法 ($\Delta t = 0.005$ 、ここではフレーム間隔を単位時間としている) を用いた。シミュレーション結果から光刺激領域における FRAP 時系列 F_{sim} を抽出し、観測された FRAP 時系列 F_{exp} との二乗誤差

$$\sum_t (F_{exp}(t) - F_{sim}(t))^2$$

を最小化する D をグリッドサーチによって決定し、拡散係数の推定値とした。ここでシミュレーション FRAP 時系列は光刺激領域における輝度平均の時系列 $I(t)$ を

$$F_{sim}(t) = \frac{F_{exp}(\infty) - F_{exp}(0)}{I(\infty) - I(0)} (I(t) - I(0)) + F_{exp}(0)$$

によって観測 FRAP 時系列に合わせてスケール変換したものである。

2.2.11 画像とデータの解析

画像解析は Fiji (Image J; <https://fiji.sc/>) を使って行った。蛍光画像のバックグラウンドは Rolling ball 法を用いて除いた。40 nm-GEM のトラッキングでは、Fiji プラグインの Mosaic suite を使用し、パラメーターは基本的に Radius : 3、Cutoff : 0、

Per/Abs : 0.2~0.5、Link Range : 1、Displacement : 6、Dynamics : Brownian、とした。データの可視化・グラフ作製には Python を用いた。

表 1 本研究で使用したプラスミド

Plasmid name	Description	Source	Benchling Link
40nm-GEM_sp_opt	40 nm-GEM optimized for fission yeast codon usage	this study	https://benchling.com/s/seq-H7eSS3SCpeZZJwuEK6n5
pMNAT2LA21(ver.2)		Lab stock	https://benchling.com/hironorisugiyama/f/lib_On3abtER-pombe-gene/seq_AOJoR6q2-pmnat2la21ver-2/edit
pMNAT2LA21-40nm-GEM_sp_opt	2L::Padh21-40nm-GEM<<nat	this study	
pMNATZA1-GFP-uNS		this study	https://benchling.com/s/seq-B1IjgWLExt3H0W0Y9PIS
pMNAT2LT1-20nm-GEM-yeGFP		this study	
pSKI-KAN-1L-A1-M	pSKI	this study	https://benchling.com/s/seq-G3P9JqxX51ObX5Sz96MA
pSKI-NAT-1L-A1-M	pSKI	this study	https://benchling.com/s/seq-8eBCjMRKikhCkklujGhW
pSKI-BSD-1L-A1-M	pSKI	this study	https://benchling.com/s/seq-HhBJcOmn70PBjUtaRdFR
pSKI-BLE-1L-A1-M	pSKI	this study	https://benchling.com/s/seq-bhdt76l7rpG8s7St32bv
pSKI-KAN-2L-A1-M	pSKI	this study	https://benchling.com/s/seq-TreXp3COB6wHS3IOhASP
pSKI-NAT-2L-A1-M	pSKI	this study	https://benchling.com/s/seq-HLDrXgZxwWWQzFpCQmxk
pSKI-BSD-2L-A1-M	pSKI	this study	https://benchling.com/s/seq-eDFPR3eDDbwOpHn3wELO
pSKI-BLE-2L-A1-M	pSKI	this study	https://benchling.com/s/seq-tU4cqJD4RsS3y9AFcgvD
pSKI-KAN-3R-A1-M	pSKI	this study	https://benchling.com/s/seq-QLwzrxGXyx0TpSjNMzAH
pSKI-NAT-3R-A1-M	pSKI	this study	https://benchling.com/s/seq-Hvoe4y6Rfz9HRKKXmM8Q
pSKI-HYG-3R-A1-M	pSKI	this study	https://benchling.com/s/seq-EkO6jh5uMmuXF5brQFBq
pSKI-BSD-3R-A1-M	pSKI	this study	https://benchling.com/s/seq-NUrSW450XbywsQzxnYX9
pSKI-BLE-3R-A1-M	pSKI	this study	https://benchling.com/s/seq-G4LydqOGtHxT2v7SHikY

pSKI-KAN-1L-N1	pSKI	this study	https://benchling.com/s/seq-lajqCWRwNsuhe2ckb9nk
pSKI-NAT-1L-N1	pSKI	this study	https://benchling.com/s/seq-X1w13cdTQVw4wgGpBfZR
pSKI-BSD-1L-N1	pSKI	this study	https://benchling.com/s/seq-QQZR1vatv7zHfuA7bMnI
pSKI-BLE-1L-N1	pSKI	this study	https://benchling.com/s/seq-MfQgtyoBCoIVSDIujzjg
pSKI-KAN-2L-N1	pSKI	this study	https://benchling.com/s/seq-CFloX6NrLvuJrnI5JaPD
pSKI-NAT-2L-N1	pSKI	this study	https://benchling.com/s/seq-YbDO5EX4oqDfJGuRrf0
pSKI-HYG-2L-N1	pSKI	this study	https://benchling.com/s/seq-8e48M8moxUXOqsybHbYO
pSKI-BSD-2L-N1	pSKI	this study	https://benchling.com/s/seq-a5dfK1ki5ow43Px6o0tl
pSKI-BLE-2L-N1	pSKI	this study	https://benchling.com/s/seq-KocnJoOdrJwaDPHHGeke
pSKI-KAN-3R-N1	pSKI	this study	https://benchling.com/s/seq-BZmnME31WCynpEwW7GfH
pSKI-NAT-3R-N1	pSKI	this study	https://benchling.com/s/seq-kVuyYx3nHglfwjYI0MYP
pSKI-BSD-3R-N1	pSKI	this study	https://benchling.com/s/seq-7M97ws9s2eY5ZfqXIQBq
pSKI-HYG-3R-N1	pSKI	this study	https://benchling.com/s/seq-1eL7D3ki8KLvb3Uh3etM
pSKI-BLE-3R-N1	pSKI	this study	https://benchling.com/s/seq-kMwFYBeWLuaYDoegFvdl
pMNATZA1		this study	https://benchling.com/s/seq-F7zeXNTMu66Gs0zKvIpx
pMNATZA1-spmNeonGreen		this study	https://benchling.com/s/seq-eNXfcf6oImjRKuJpX9k5
pSKI-NAT-1L-A1-M-spmNeonGreen (S.p codon optimized)		this study	https://benchling.com/s/seq-5RTHLQjGhwtHW5hpF9XC
pSKI-NAT-2L-A1-M-spmNeonGreen (S.p codon optimized)		this study	https://benchling.com/s/seq-5KTJy6ykRRzXgNaRUUeV
pSKI-NAT-3R-A1-M-spmNeonGreen (S.p codon optimized)		this study	https://benchling.com/s/seq-8eBCjMRKikhCkkluJGhW
pHBCO2-HA-spmNeonGreen		this study	https://benchling.com/s/seq-7gisa0JjhVq0WrDyNKFO?m=slm-rsrsB6YOySqwzfHa05I4
pHBCO2-ntp1	c::Posi2-ntp1<<hyg	this study	https://benchling.com/s/seq-jvtAd53Mw9VgFl4YFw1X?m=slm-oXvW89tp4XNoEnRFF3wo

pMNATZA1-spmNeonGreen	z::Padh1-spmNeonGreen<<nat	Lab stock	https://benchling.com/s/seq-eNXfcf6oImjRKuJpX9k5
-----------------------	----------------------------	-----------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------

表 2 本研究で使用した分裂酵母株

Strain name	Genotype	Fig.	Source
L968	h90	Fig. 11B, 11C, Fig. 12C, 12E, 12F, 12H, Fig. 13A, 13B	NBRP
L972	h-	Fig. 7C, 7D	NBRP
SK445	h90 2L::Padh21-40nm-GEM<<nat	Fig. 6B, Fig. 8B, 8C, 8D, 8E, Fig. 9, Fig. 10A, 10B, 10C, Fig. 11D, Fig. 12B, 12D, 12E, 12G, Fig. 13D, 13E, 13F, Fig. 15A, 15B, Fig. 16A, 16B, Fig. 17A, 17B, Fig. 19A, 19B	this study, L968
SK064	h- 1L::Padh1<<nat	Fig. 7C, 7D	this study, L972
SK098	h- 2L::Padh1<<nat	Fig. 7C, 7D	this study, L972
SK100	h- 3R::Padh1<<nat	Fig. 7C, 7D	this study, L972
SK062	h- z::Padh1<<nat	Fig. 7D	this study, L972
SK063	h- z::Padh1-spmNeonGreen<<nat	Fig. 7E	this study, L972
SK027	h- 1L::Padh1-spmNeonGreen<<nat	Fig. 7E	this study, L972
SK099	h- 2L::Padh1-spmNeonGreen<<nat	Fig. 7E	this study, L972
SK101	h- 3R::Padh1-spmNeonGreen<<nat	Fig. 7E	this study, L972
SK425	h90 z::Padh1-GFP-uNS<<nat	Fig. 9	this study, L968
SK447	h90 2L::Ptdh1-20nm-GEM-yeGFP<<nat	Fig. 9	this study, L968
YG008	h90 ade6-M210 leu1-32		Lab stock
SK009	h90 ade6-M210 leu1-32 pka1::hyg	Fig. 11B, 11C	this study, YG008
SK012	h90 ade6-M210 leu1-32 cyr1::nat	Fig. 11B, 11C	this study, YG008
SK028	h90 cyr1::kan		this study, L968
SK520	h90 git3::kan		this study, L968

SK533	h90 pka1::kan	Fig. 13A, 13B	this study, L968
SK570	h90 cyr1::kan 2L::Padh21-40nm-GEM<<nat	Fig. 11D	this study, SK028
SK571	h90 git3::kan 2L::Padh21-40nm-GEM<<nat	Fig. 11D	this study, SK520
SK577	h90 pka1::kan 2L::Padh21-40nm-GEM<<nat	Fig. 11D	this study, SK533
SK528	h90 ntp1::kan	Fig. 12F, 12H	this study, L968
SK575	h90 ntp1::kan 2L::Padh21-40nm-GEM<<nat	Fig. 12B, 12D, 12G	this study, SK528
SK590	h90 gpa2::kan		this study, L968
SK612	h90 gpa2::kan 2L::Padh21-40nm-GEM<<nat	Fig.13D, 13E, 13F	this study, SK590
SK668	h90 gpa2::kan 2L::Padh21-40nm-GEM<<nat c::Posi2-ntp1<<hyg	Fig.13D, 13E, 13F	this study, SK612
SK037	h90 z::Padh1-spmNeonGreen<<nat	Fig. 14A, 14B, 14C, 14D, Fig. 18A, 18B, 18C, 18D, 18E	this study, L968
YG430	h90 c::Posi1-HA-spmNeonGreen<<hyg	Fig. 14A, 14B, 14C, 14D	this study, L968
YG431	h90 c::Posi2-HA-spmNeonGreen<<hyg	Fig. 14A, 14B, 14C, 14D	this study, L968
YG432	h90 c::Posi3-HA-spmNeonGreen<<hyg	Fig. 14A, 14B, 14C, 14D	this study, L968
YG433	h90 c::Posi4-HA-spmNeonGreen<<hyg	Fig. 14A, 14B, 14C, 14D	this study, L968
SK597	h90 pabp-spmNeonGreen<<kan	Fig. 19A, 19B	this study, L968

* 株名が「SK」から始まるものは著者が、「YG」から始まるものは同研究室の後藤祐平助教が作製した。

表 3 本研究で使用したプライマー

Primer name	Primer sequence (5' → 3')
TtefF	ATGCGAAGTTAAGTGC GCAG
1Llocus-check-R	TCGGATAGTAGTTGCCAACAGC
2Llocus-check-R	CGTATTTTCGCTGTACATAGCATAATTC
3Rlocus-check-R	TGCAGCTGTAGTAAATTTCGAAGTC
HO1-seq-F	AGGCTGAGAAAGTGCATGATCGTCTTTTC
HO1-seq-R	GAACGCAGTCTTGGCCTCTTCTATCAC

2.3 結果

2.3.1 分裂酵母胞子の精製法の検討

過去の報告を参考にして [70]、簡便で高純度に分裂酵母の胞子を精製する手法を検討した。本研究で使用した胞子の精製方法を図 6A に示している。まず、対数増殖期まで培養した酵母細胞を回収し、胞子形成を誘導するため SPA 寒天培地に塗布した。SPA 寒天培地上で 26°C で 3 日間静置培養した後、位相差顕微鏡で細胞を観察した。位相差顕微鏡下では胞子は白色に見える (図 6B, SPA plate, 赤矢印)、増殖期細胞は黒色に見える (図 6B, SPA plate, 緑矢印) ことが以前に報告されているため [10]、顕微鏡観察によって胞子と増殖期細胞を判別した。接合子は 4 つの胞子が膜状の構造に包まれた細胞形態を示す (図 6B, SPA plate, 青矢印)。次に、SPA 寒天培地上から細胞を回収し、2% グルスラーゼ溶液に懸濁して 3 時間反応させた。この操作により胞子形成しなかった増殖期細胞を死滅させた (図 6B, Glusulase treatment)。その後、胞子を 0.5% Triton-X100 で懸濁し、100% Percoll 溶液に重層して遠心することで胞子と死滅した増殖期細胞を分離した。遠心後、沈殿した層を回収すると、概ね 100% の純度で胞子を回収することができた (図 6B, After purification)。過去に報告されている胞子の精製方法では、密度勾配遠心によって胞子と増殖期細胞を分離している [10,70,71]。本手法では、100% Percoll の単一層に細胞溶液を重層するだけで胞子のみを下層に沈殿させることができる。加えて、従来の方法では超遠心 (25,000 g, 30 分間、など) を用いているが [10,70,71]、本手法では通常の遠心機 (9,560 g, 5 分間) を用いて精製することができる。このように、過去の手法よりも簡便かつ高純度に胞子を精製することに成功した。以降、胞子を用いた実験では本手法を用いて胞子を精製している。

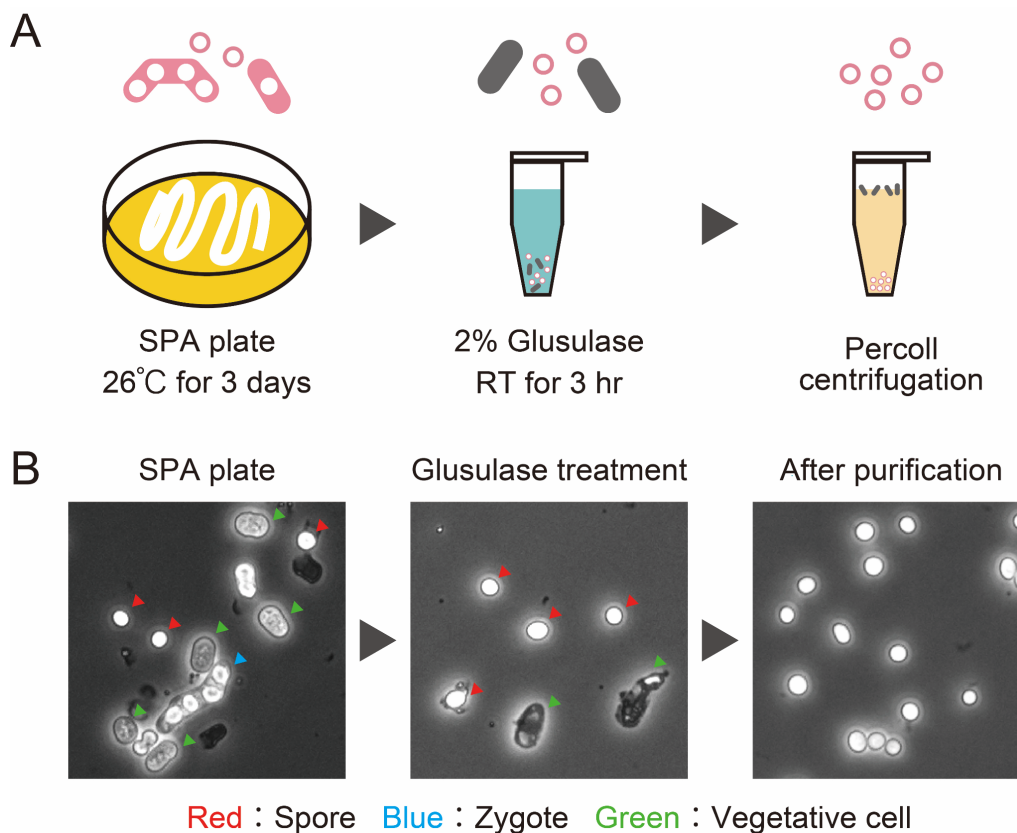


図6 分裂酵母胞子の精製法の検討

(A) 分裂酵母の胞子の精製法の模式図。SPA 寒天培地上に増殖期細胞を塗布し、26°Cで3日間静置培養した。その後、細胞を2%グルスラーゼ溶液に懸濁し、室温で3時間反応させて、胞子形成しなかった増殖期細胞を死滅させた。胞子と死滅した増殖期細胞を分離する目的で、100% Percoll の上に細胞溶液を重層して遠心した。胞子は下層に沈殿し、死滅した増殖期細胞は沈殿せずに上層に残った。(B) 胞子精製の過程での位相差顕微鏡による細胞の観察。SPA 寒天培地上で3日間静置培養した後 (SPA plate)、グルスラーゼ処理後 (Glusulase treatment)、Percoll 遠心後 (After purification) の細胞を示している。胞子は赤矢印、接合子は青矢印、増殖期細胞は緑矢印で示されている。なお、Percoll 遠心後は胞子のみが観察されているため、赤矢印は表記していない。

2.3.2 染色体上の特定の位置へ DNA 配列を挿入するためのプラスミドの開発

続いて、酵母細胞内の細胞質流動性を評価するに向け、ナノ粒子をコードする DNA 配列を染色体上に安定的に挿入する手法を開発した。詳細は 2.3.3 で述べるが、ナノ粒子を細胞内で自己集合的に生合成するには、1.8 kb 程度の DNA 配列を細胞に導入、発現する必要があった。これまでも分裂酵母の染色体上へ DNA 配列を挿入するためのプラスミドベクターは開発されているが [72–78]、偶発的にプラスミドを脱落してしまう (不安定性)、複数のプラスミドが挿入される場合がある (多コピー性)、栄養要求性株を使用しなければならない (栄養要求性) などの問題があった。本研究で開発した新規プラスミドベクターは、1) 安定的に 1 コピーのみを挿入でき、2) 細胞株の栄養要求性によらず使用でき、3) 細胞株間の交雑を容易に行えるよう離れた染色体上の複数の位置にも挿入できる、という点で他にない利点を備えている。まず、分裂酵母が持つ 3 本の染色体で遺伝子が存在しない領域を見つけ、それぞれ、1L locus (1 番染色体 1,508,522 ~ 1,508,641, *mug165* の近傍)、2L locus (2 番染色体 447,732 ~ 447,827, *pho4* の近傍)、3R locus (3 番染色体 1,822,244 ~ 1,822,343, *nup60* の近傍) と命名した (図 7A)。次に、これら locus に目的の DNA 配列を挿入するためのプラスミドベクターを作製した。本プラスミドベクターは、大腸菌内でのプラスミド複製維持に必要な遺伝子 (*Amp*, *ori*)、構成的発現プロモーター (*P_{adh1}*) もしくは誘導的発現プロモーター (*P_{nm1}*)、マルチクローニングサイト (MCS)、転写ターミネーター (*T_{ADH}*)、分裂酵母の薬剤耐性マーカー遺伝子、および制限酵素の切断配列を含むホモロジーアームから構成される (図 7B)。染色体上へ挿入する場合は、制限酵素処理してプラスミドを線状化して用いる。染色体上の目的の位置に挿入されたかは、表 3 にまとめたプライマーを用いて PCR することで確認できる (図 7C)。プラスミドを染色体上へ挿入しても細胞増殖に影響が見られないことを確認した (図 7D)。また、1L、2L、3R locus からのタンパク質発現量は、以前に報告されていた染色体上の挿入位置 Z locus (2 番染色体, *zfs1* の近傍) [79] と比較して、同程度もしくはやや高い値を示した (図 7E)。これらのプラスミドシリーズを pSKI (plasmid for **S**t_ab_le **K**nock-**I**n, 表 1) と命名し、以降の実験で使用した。

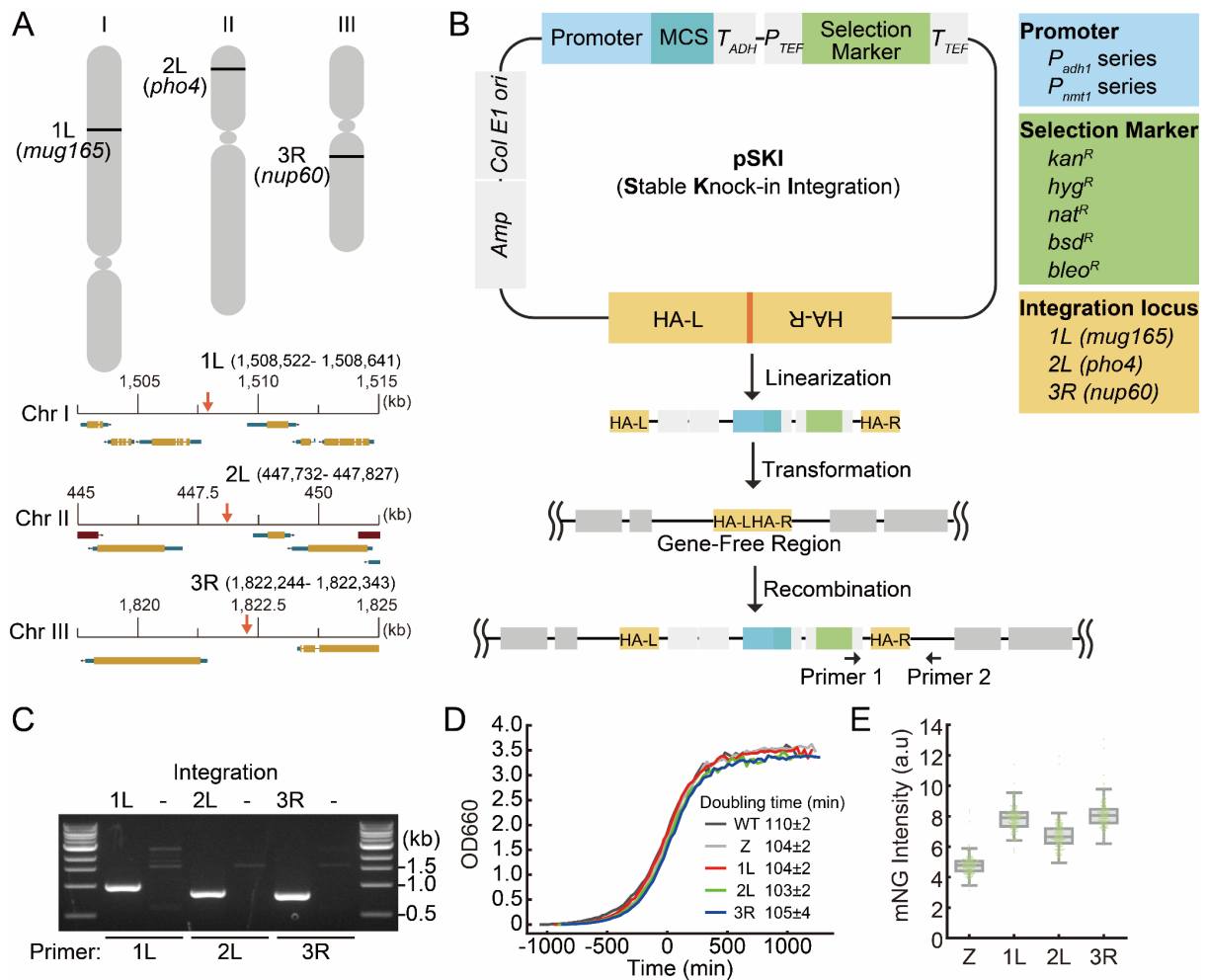


図7 分裂酵母の染色体上へDNA配列を組み込むための新規プラスミド (pSKI) (A) 各染色体上のDNA配列の組み込み位置 (Integration locus)。上図で Integration locus を黒線で示しており、その近傍の遺伝子の名前も表記した。下図で Integration locus を赤矢印で示しており、その周辺の遺伝子情報も示した。(B) プラスミドマップと染色体上へ組み込む実験手順。プラスミド上にはホモロジーアーム (HA-Lと HA-R) に挟まれた制限酵素サイトがある。制限酵素で線状化したプラスミドで分裂酵母を形質転換すると、特定の Integration locus でプラスミドが相同組み換えすることで染色体上に組み込まれる。プラスミドは表1に一覧で示した。(C) PCRによる染色体への組み込みの確認。プライマーはBに示すように、 T_{TEF} 領域に結合する Primer1 と HA-Rの外側に結合する Primer2を合わせて用いる。Primer1は全ての locus (1L、2L、3R) で共通であり、Primer2はそれぞれの locus 特異的である。使用するプライマーは表3に一覧で示した。(D) 各 locus (1L、2L、3R) に空ベクターを組

み込んだ細胞株の代表的な増殖曲線を示した。各細胞株の倍加時間を平均値と標準偏差で示した ($n = 3$)。倍加時間の計算方法は材料と方法に示した。最大 OD_{660} 値の半分の時点をゼロ時間目として示している。(E) 各 **Integration locus** からのタンパク質発現量の比較。1L、2L、3R、Z (コントロール) locus から緑色蛍光タンパク質 **mNeonGreen (mNG)** を発現させ、蛍光輝度値を定量した。グラフのそれぞれの点は 1 細胞毎の **mNG** 蛍光輝度値を示している。また、箱ひげ図では、中央の線が中央値を、“箱”が四分位範囲を、“ひげ”が最小値と最大値を示している。四分位範囲の 1.5 倍よりも外れた値は外れ値とした。それぞれ 150 細胞以上を定量した。

2.3.3 分裂酵母胞子では 40 nm-GEM の拡散が低下する

分裂酵母胞子の細胞質流動性を評価するため、本研究では *genetically encoded multimeric nanoparticles (GEM)* を使用した [39]。GEM は、N 末側の *scaffold domain* と C 末側の蛍光タンパク質 *T-Sapphire* からなり、細胞内では *scaffold domain* を介して 120 個程度の GEM モノマーが自己集合し、直径 40 nm 程度の一定サイズの粒子が形成される (図 8A)。本ツールは 40 nm-GEM と呼ばれ、細胞質における GEM 粒子の拡散係数を算出することで、細胞内の分子混雑や粘度を推定することができる [27,39,80]。まず、GEM モノマーをコードする DNA 配列を様々な発現強度のプロモーターの下流から発現させ、酵母胞子内で粒子を形成するかを観察した。発現強度が高いプロモーター (P_{adh1} , P_{adh11}) から発現させると、細胞内のバックグラウンドが高く、また、GEM が凝集してしまうことがわかった。逆に、発現強度が低いプロモーター (P_{adh41} , P_{adh81}) では、形成された粒子の数が少なく、細胞全体の輝度が低く観察が困難であった。最終的に、中程度の発現強度のプロモーター (P_{adh21}) が適当な発現量であることがわかった。過去にも 40 nm-GEM は増殖期の分裂酵母細胞で使用されており [27]、本研究でも増殖期細胞と胞子の細胞内で一定サイズの粒子が形成されることを確認した (図 8B, 40 nm-GEM)。また、40 nm-GEM 以外にも 20 nm (20 nm-GEM) [39] と 100 nm (GFP- μ NS) [32] 程度の粒子を胞子で形成させることを試みた。前者は粒子にならず細胞質に散らばり、また後者は巨大な凝集体を形成してしまうため発芽過程の解析には使用できなかった (図 9)。次に、40 nm-GEM を用いて増殖期細胞と胞子とで細胞質の流動性を比較した。その結果、増殖期細胞では数 μ m 程度の GEM 粒子の軌跡が観察され、GEM が細胞内で動いていることがわかった (図 8B, Tracking)。胞子では各々の GEM 粒子が一部の狭い区画からほとんど動かず、短い軌跡しか観察されなかった (図 8B, Tracking)。さらに、得られた軌跡から増殖期と胞子における GEM の拡散係数を推定した。40 nm-GEM の拡散係数の中央値は、増殖期細胞で $0.63 \mu\text{m}^2/\text{s}$ 、胞子で $0.023 \mu\text{m}^2/\text{s}$ であり、胞子では 40 nm-GEM の拡散係数は 30 倍程度低下していた (図 8C,D,E)。したがって、増殖期から胞子へと変わる胞子形成の過程で細胞質の流動性が低下していることが明らかになった。

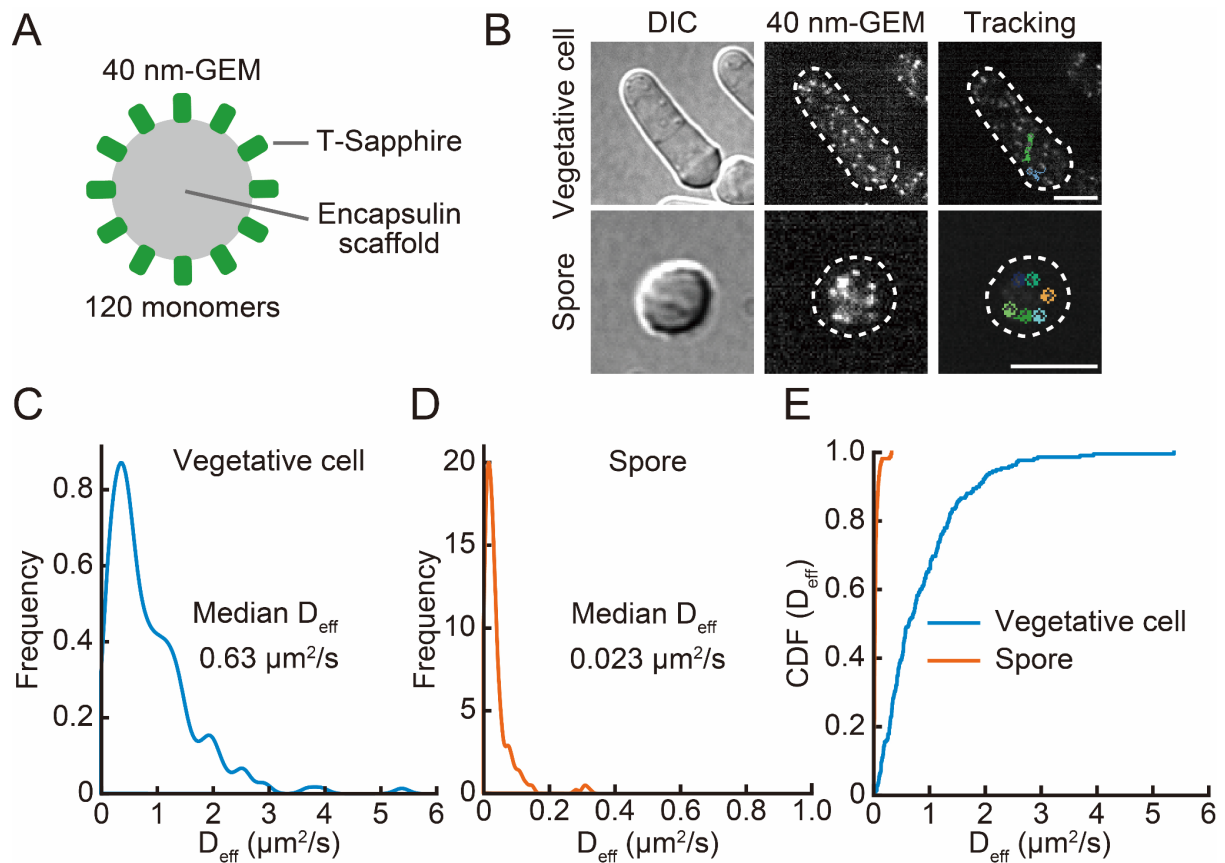


図 8 分裂酵母胞子では 40 nm-GEM の拡散が低下する

(A) 40 nm-GEM の模式図。(B) 40 nm-GEM を発現させた分裂酵母。DIC 画像、40 nm-GEM の蛍光画像、20 フレーム以上トラッキングできた代表的な 40 nm-GEM の画像を示している。スケールバー：5 μm 。(C, D) 増殖期細胞 (C) と胞子 (D) における 40 nm-GEM の拡散係数の分布。カーネル密度推定によって平滑化し、分布内の面積が 1 となるように正規化している。増殖期細胞：n = 218、胞子：n = 221。(E) 40 nm-GEM の拡散係数の累積分布関数 (Cumulative distribution function, CDF)。(p < 0.001、Kolmogorov-Smirnov test)

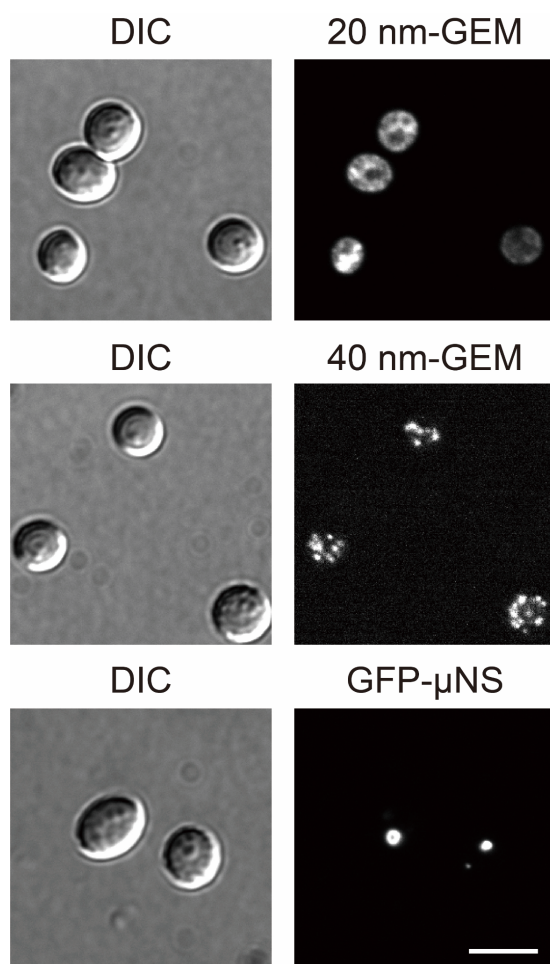


図9 20 nm 粒子 (20 nm-GEM)と 100 nm 粒子 (GFP- μ NS) の検討
 20 nm-GEM、40 nm-GEM、GFP- μ NS を発現する分裂酵母胞子の観察。スケールバ
 ー : 5 μ m。

2.3.4 発芽開始直後に 40 nm-GEM の拡散が上昇する

分裂酵母孢子では増殖期細胞よりも細胞質の流動性が低下していたことより (図 8C,D)、発芽が開始してから増殖期へと復帰するどこかの段階で細胞質が流動化すると予想された。この考えを検証するため、発芽開始から 1~2 時間おきに孢子内の 40 nm-GEM の動きを顕微鏡下で観察し、各タイムポイントでの GEM 粒子の拡散係数を算出した。孢子の発芽は 2% グルコースの添加で誘導し、発芽開始から 4 時間後に細胞サイズの膨張、6 時間後に germ tube (突起状構造) の形成、8 時間後に septum (隔壁) が観察され (図 10A)、その後、10~12 時間で最初の分裂を完了する [1,11]。40 nm-GEM の拡散係数は、グルコース添加後から 1 時間以内に 15 倍程度上昇し、その後、さらに 2 倍程度の範囲内で緩やかに上昇し、6 時間目に増殖期細胞と同程度の値を示した (増殖期細胞 $0.63 \mu\text{m}^2/\text{s}$; 発芽 6 時間目 $0.52 \mu\text{m}^2/\text{s}$) (図 10B,C)。発芽過程は平均すると 10~12 時間程度で完了することを踏まえると、細胞質流動性は発芽初期に急速に上昇していると言える。また、これまで発芽開始の指標として細胞内の屈折率の変化に起因する、位相差顕微鏡下での孢子の黒色化が利用されてきた [5,10]。この黒色化は発芽後の 2 時間目から観察されるため、すなわち、40 nm-GEM の拡散係数の上昇はこれまで知られている発芽開始の指標の中で最初期の現象である。

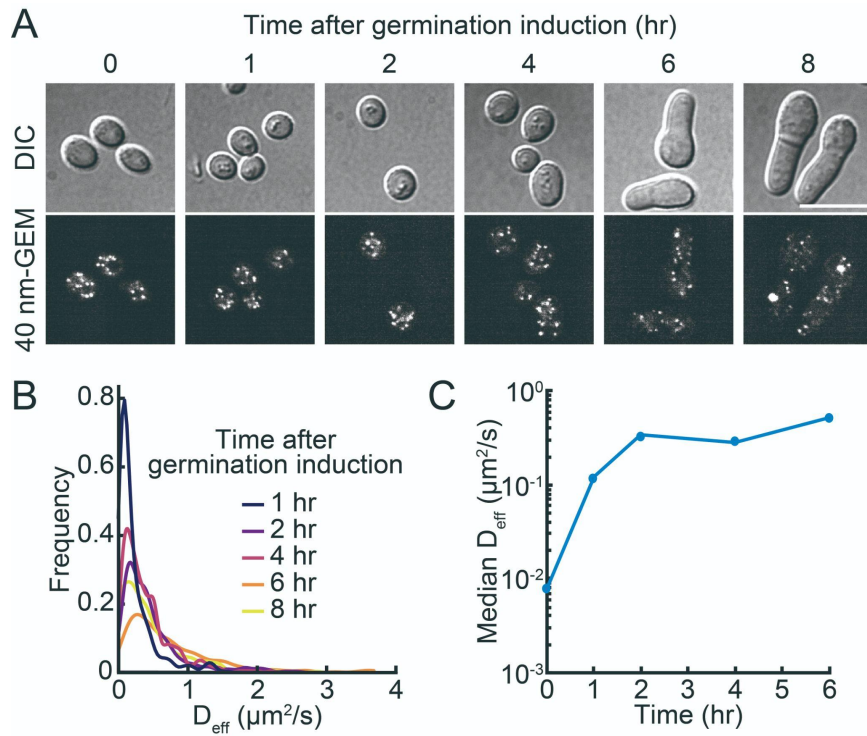


図 10 発芽開始直後に 40 nm-GEM の拡散が上昇する

(A) 発芽過程における分裂酵母の形態変化と 40 nm-GEM の蛍光画像。スケールバー：10 μm 。(B) 発芽誘導後の 40 nm-GEM の拡散係数の分布。カーネル密度推定によって平滑化し、分布内の面積が 1 となるように正規化している。1 hr : $n = 385$ 、2 hr : $n = 306$ 、4 hr : $n = 353$ 、6 hr : $n = 263$ 、8 hr : $n = 303$ 。(C) 発芽誘導後の 40 nm-GEM の拡散係数の中央値。

2.3.5 cAMP-PKA 経路が発芽開始直後の 40 nm-GEM の拡散上昇に必要である

発芽後の細胞質の流動化を引き起こす分子機構を明らかにするため、分裂酵母のグルコース感知機構として知られる cAMP-PKA 経路に着目した (図 11A)。本経路の構成因子である *pkal* (PKA catalytic subunit) や *cyr1* (adenylate cyclase) を欠失すると、グルコースの存在を感知できず、発芽開始が著しく遅延する (図 11B,C) [10]。そのため、本経路を欠失した胞子では、グルコースを添加しても発芽開始のシグナルが細胞内に伝播されず、細胞質の流動化が起きない、もしくは遅延することが考えられた。この考えを検証するため、*git3* (G-protein coupled receptor)、*cyr1*、*pkal* の遺伝子破壊株を作製し、発芽誘導後の 40 nm-GEM の拡散係数を算出した。その結果、いずれの変異体においてもグルコース添加から 6 時間目まで、40 nm-GEM の拡散係数が胞子時と比較して変化しなかった (図 11D)。したがって、発芽時の細胞質の流動化は cAMP-PKA 経路を介して誘導されることが明らかになった。また本結果は、グルコースが栄養源として細胞内に取り込まれ ATP 産生などの代謝活動に利用されることよりも、シグナル分子として細胞膜上の受容体に認識され細胞内へ情報を伝えることが細胞質の流動化に必要であることを示唆している。

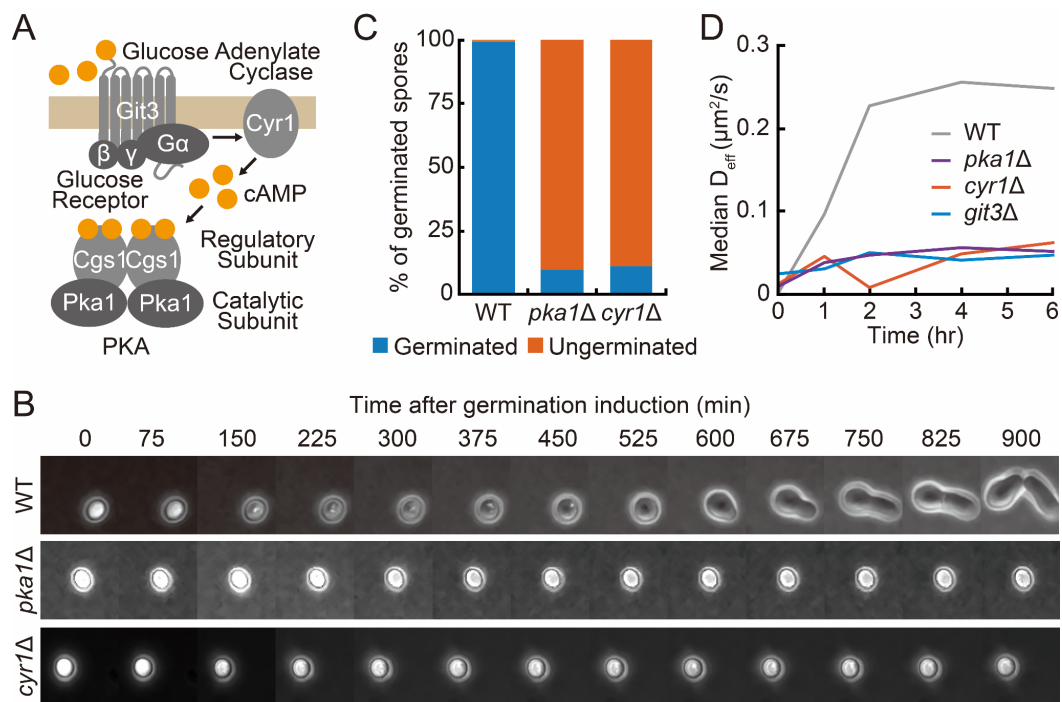


図 11 cAMP-PKA 経路が発芽開始直後の 40 nm-GEM の拡散上昇に必要である
 (A) 分裂酵母の cAMP-PKA 経路の模式図。(B) 位相差顕微鏡による発芽過程のタイム
 ラプス観察。 *pka1* : PKA 触媒サブユニット (cAMP-dependent protein kinase catalytic
 subunit)、 *cyr1* : cAMP 合成酵素 (adenylate cyclase)。(C) 発芽誘導から 15 時間目にお
 ける孢子の発芽率。 WT : n = 147 cells、 *pka1Δ* : n = 356 cells、 *cyr1Δ* : n = 163 cells。
 (D) 発芽誘導後の 40 nm-GEM の拡散係数の中央値。 *git3* : (G-protein coupled
 receptor)。

2.3.6 トレハラーゼ Ntp1 が発芽開始直後の 40 nm-GEM の拡散上昇に必要である

次に、細胞質の流動化を引き起こす分子機構として、トレハロース分解酵素であるトレハラーゼ Ntp1 に着目した (図 12A)。*ntp1* 破壊株は発芽遅延を示すことから、トレハロースの分解が発芽開始に必要であると考えられる (図 12B) [52]。先行研究で胞子内にトレハロースが蓄積することが報告されており [52,55,56]、本研究でも増殖期と比較して胞子でトレハロースが 1000 倍程度増加していることが確認された (図 12C)。また近年、増殖期の出芽酵母細胞内にトレハロースが蓄積して細胞質流動性が低下することが知られている [65]。これらを踏まえ、胞子内に蓄積したトレハロースが発芽誘導後に分解されることで、細胞質が流動化し、発芽が開始するという仮説を立てた。本仮説を検証するため、*ntp1* 破壊株を用いて発芽誘導後の 40 nm-GEM の拡散係数を定量した。その結果、発芽誘導から 8 時間目まで *ntp1* 破壊株の拡散係数は野生株よりも低いままであった (図 12D)。加えて、野生株では、GEM の拡散係数が上昇するのと同じ時期にトレハロースが分解されるが (図 12E)、*ntp1* 破壊株ではトレハロース量は 8 時間目まで減少していなかった (図 12F)。よって、Ntp1 は発芽開始時の主要なトレハロース分解経路であり、トレハロース分解が細胞質の流動化と発芽開始に必要であることが示唆された。

ntp1 破壊株の 40 nm-GEM の拡散係数は、細胞集団レベルで見ると発芽誘導後に徐々に上昇しているようであった (図 12D)。そこで、1 細胞毎の 40 nm-GEM の拡散係数を定量したところ、発芽誘導から 6 時間目で、*ntp1* 破壊株の 1/3 程度が野生株の拡散係数の中央値と同程度の値を示していた (図 12G)。また、*ntp1* 破壊株であっても発芽誘導から 24 時間目にはトレハロースが野生株と同程度まで分解されていた (図 12H)。つまり、Ntp1 非依存的なトレハロース分解経路の存在とその経路を介した細胞質の流動化が起きることが示唆された。分裂酵母において *ntp1* 以外のトレハラーゼ遺伝子は同定されていないが [53]、*ntp1* 破壊株の細胞抽出液もトレハラーゼ活性を示すことが報告されている [52,81]。未知のトレハラーゼ遺伝子もしくはトレハラーゼ非依存的なトレハロース分解が起きていることが推測される。しかし、Ntp1 非依存的分解経路はトレハロースが分解されるまでに時間がかかると共に、トレハロース分解効率は細胞毎にばらつきが見られる (図 12G)。よって、胞子が発芽を速やかに開始するためには Ntp1 が必要であると考えられる。

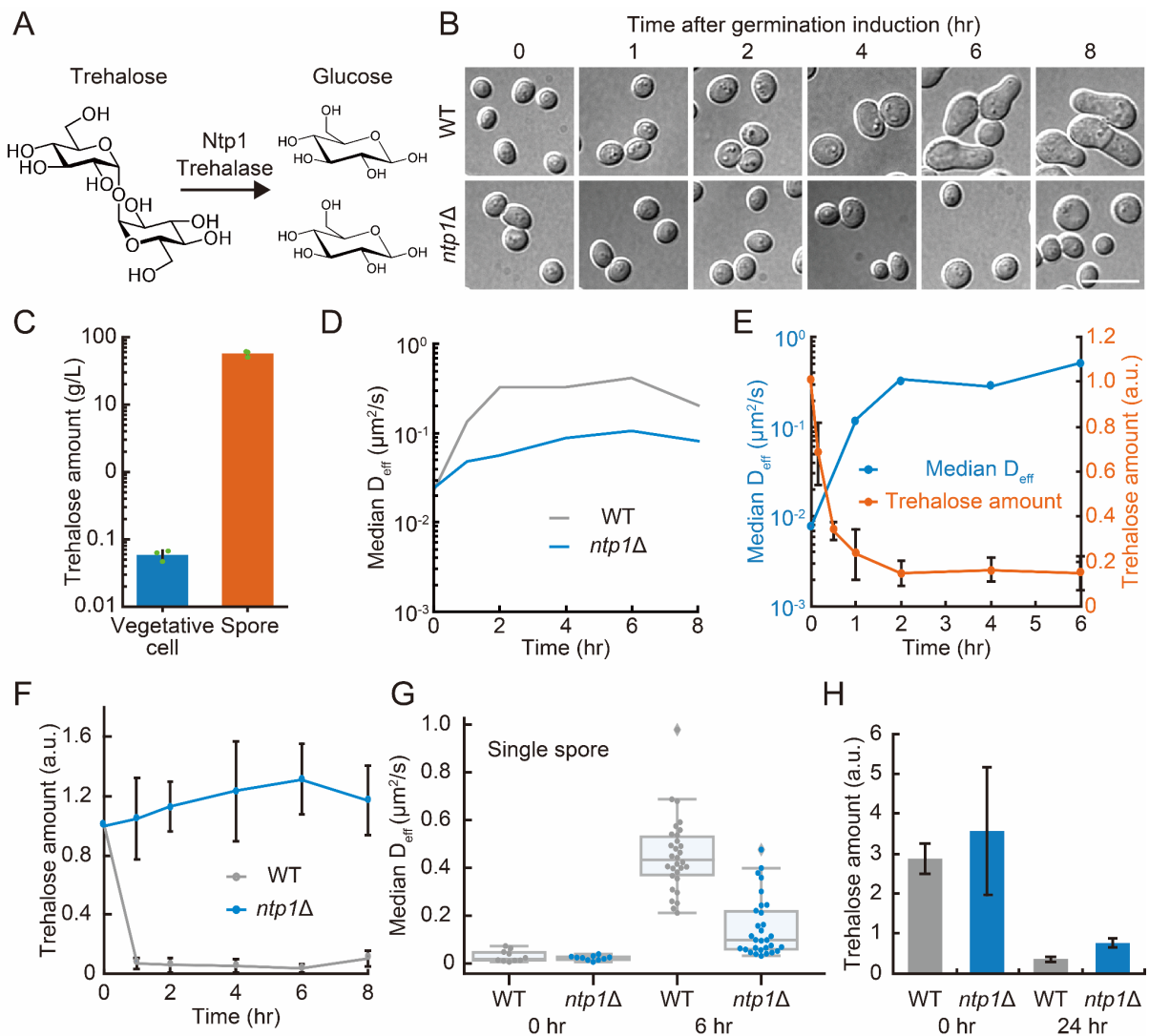


図 12 トレハラーゼ Ntp1 が発芽開始直後の 40 nm-GEM の拡散上昇に必要である
 (A) トレハラーゼ Ntp1 によるトレハロース分解。トレハロースはグルコース 2 分子へと分解される。(B) *ntp1Δ* 株の発芽過程における形態変化。スケールバー：10 μm 。(C) 増殖期細胞と孢子における細胞内トレハロースの定量。3 回の独立した実験の平均値と標準偏差を示している。3 回の実験のそれぞれの測定値は緑の点で示している。(D) *ntp1Δ* 株の発芽過程における 40 nm-GEM の拡散係数の中央値。(E) 野生株の発芽過程における 40 nm-GEM の拡散係数 (中央値) と細胞内トレハロース量。トレハロース量は 3 回の独立した実験の平均値と標準偏差を示している。(F) *ntp1Δ* 株の発芽過程における細胞内トレハロース量。3 回の独立した実験の平均値と標準偏差を示している。(G) 1 細胞毎の 40 nm-GEM の拡散係数の中央値。それぞれの点

が1細胞における拡散係数に相当する。また、箱ひげ図では、中央の線が中央値を、“箱”が四分位範囲を、“ひげ”が最小値と最大値を示している。四分位範囲の1.5倍よりも外れた値は外れ値とした。0 hr : n = 10 cells、6 hr : n = 30 cells。(H) 発芽誘導から24時間後の *ntp1*Δ株における細胞内トレハロースの定量。3回の独立した実験の平均値と標準偏差を示している。

2.3.7 cAMP-PKA 経路の不活性化に起因した発芽の異常は *ntp1* 過剰発現により部分的に回復する

cAMP-PKA 経路と *Ntp1* の関係性について検討した。cAMP-PKA 経路は、細胞膜上の受容体 *Git3* がグルコースを感知すると、そのシグナルを cAMP などを介して細胞内へ伝播する。本経路は発芽誘導直後に活性化する経路であると想定され、*Ntp1* はその下流で活性化することが考えられた。そこで、cAMP-PKA 経路が不活性化された状態で、発芽誘導後にトレハロースが分解されるかを検証した。PKA の catalytic subunit である *pkal* の破壊株では、トレハロースの分解が発芽誘導後の 8 時間目まで見られなかった (図 13A)。発芽誘導から 24 時間目でもトレハロース量を測定したが、*pkal* 破壊株では 0 時間目と比較して変化していなかった (図 13B)。つまり、cAMP-PKA 経路の下流でトレハロース分解が誘導されることが明らかになった。トレハロース分解経路として、*Ntp1* 依存的経路と非依存的経路の存在が示唆されており (図 12F,H)、これら両経路が cAMP-PKA 経路の下流であると考えられる。

次に、cAMP-PKA 経路の主要な下流因子が *Ntp1* であるかについて検証した (図 13C)。ヘテロ三量体 G タンパク質の α subunit *Gpa2* は cAMP-PKA 経路の活性化に必要であり、*gpa2* を欠失すると発芽が著しく遅延する (図 13D) [10]。*gpa2* 破壊株で *ntp1* を過剰発現させることで発芽が正常に進むのであれば、cAMP-PKA 経路の下流では *Ntp1* が活性化すれば発芽を進行するには十分であると言える (図 13C)。そこで、*gpa2* 破壊株で *ntp1* を孢子特異的発現プロモーターの制御下で発現させた。本プロモーターについては、同研究室の後藤 祐平助教と協力し、過去のマイクロアレイデータ [16] を再解析することで同定した。孢子形成後に発現が強力に誘導される遺伝子のうち、上位 4 つの遺伝子について、ORF 上流の 1000 bp 程度の塩基配列をプロモーター領域とし、それぞれ *Posi* (**P**romoters for **o**nly **s**pore **i**nduction) 1~4 と命名した。これらプロモーター下流に緑色蛍光タンパク質 *mNeonGreen* を連結して蛍光輝度を増殖期と孢子で比較したところ、いずれも孢子での発現量が 5~20 倍程度上昇していた (図 14A,B,C,D)。その中でも増殖期と孢子とでの発現量比に最も違いがあった *Posi2* を本研究で使用した (図 14D)。*Posi2* の下流で *ntp1* を発現した孢子では、わずかではあるが発芽速度の回復が見られた (図 13D)。40 nm-GEM を観察したところ、*ntp1* 過剰発現株は発芽開始後 6~8 時間目に *gpa2* 破壊株よりもやや高い拡散係

数を示した (図 13E)。1 細胞毎の拡散係数を見ると、*ntp1* 過剰発現株では 1/3 程度の胞子が *gpa2* 破壊株よりも高い値を示した (図 13F)。このように、*ntp1* 過剰発現によって部分的ではあるが *gpa2* 破壊株の発芽異常が回復したため、*ntp1* が cAMP-PKA 経路の主要な下流因子の一つであることが示唆された。

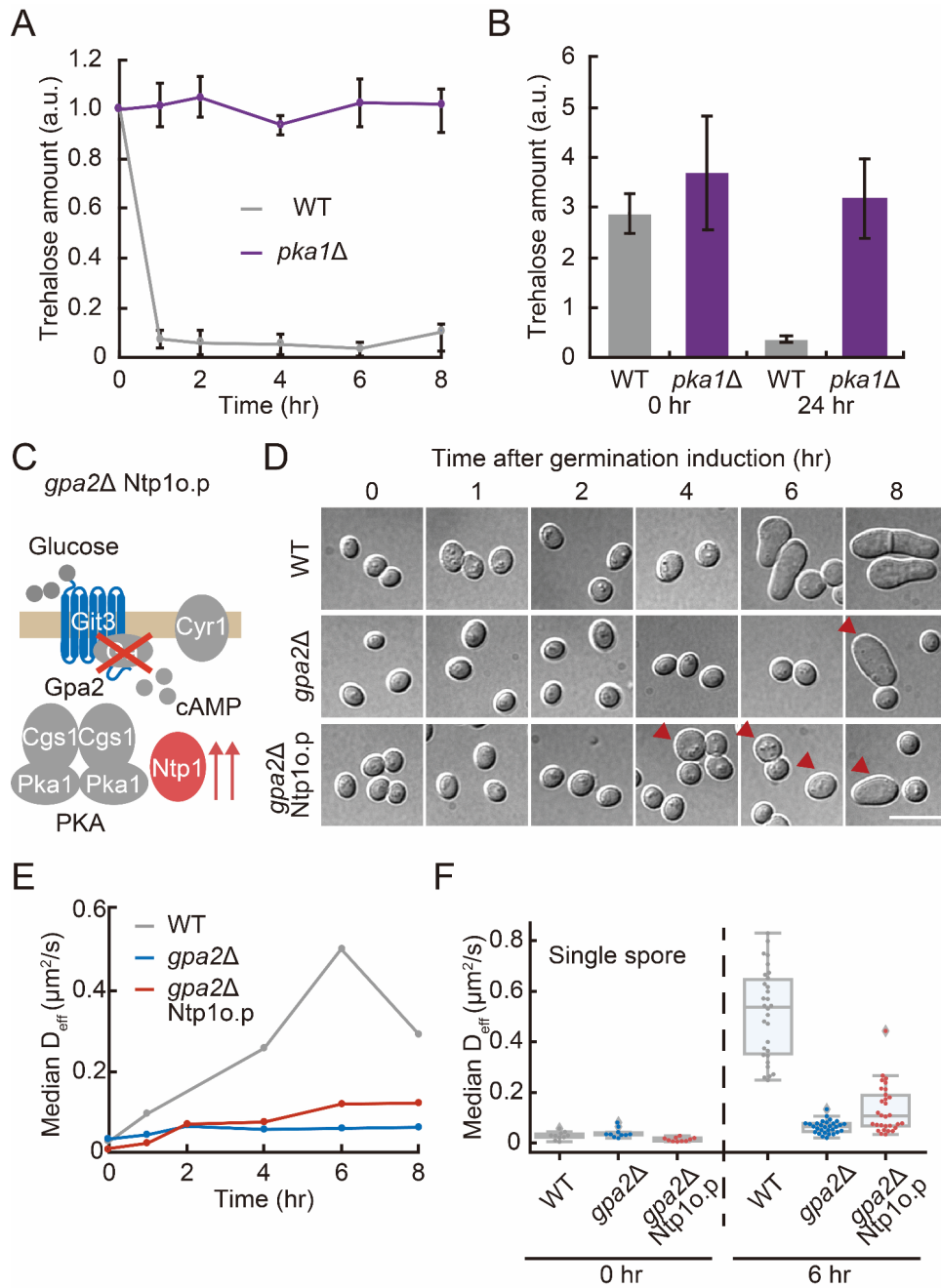


図 13 cAMP-PKA 経路の不活性化に起因した発芽の異常は *ntp1* 過剰発現により部分的に回復する

(A) *pka1Δ* 株の発芽過程における細胞内トレハロース量。3 回の独立した実験の平均値と標準偏差を示している。(B) 発芽誘導から 24 時間後の *pka1Δ* 株における細胞内トレハロースの定量。3 回の独立した実験の平均値と標準偏差を示している。(C) *gpa2Δ* 株に *ntp1* を過剰発現した細胞の模式図。(D) *gpa2Δ* 株と *gpa2Δ ntp1* 過剰発現株の発芽過程における形態変化。スケールバー：10 μm 。*gpa2Δ* 株と *gpa2Δ ntp1* 過剰発

現株については、発芽した胞子を赤矢印で示した。(E) *gpa2Δ ntp1* 過剰発現株の発芽過程における 40 nm-GEM の拡散係数の中央値。(F) 1 細胞毎の 40 nm-GEM の拡散係数の中央値。それぞれの点が 1 細胞における拡散係数に相当する。また、箱ひげ図では、中央の線が中央値を、“箱”が四分位範囲を、“ひげ”が最小値と最大値を示している。四分位範囲の 1.5 倍よりも外れた値は外れ値とした。0 hr : n = 10 cells、6 hr : n = 30 cells。

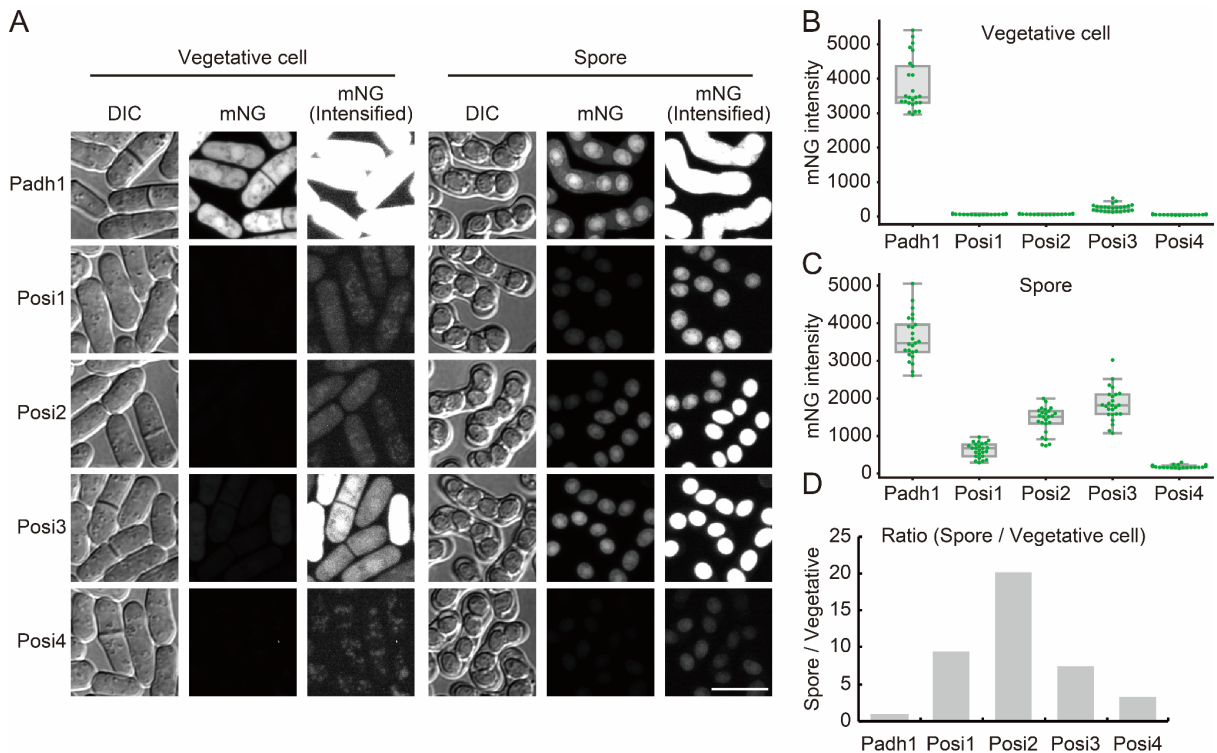


図 14 胞子特異的発現プロモーター (Posi シリーズ) からの mNeonGreen の発現 (A) Posi1~4 の下流から mNeonGreen (mNG) を発現させた増殖期細胞と胞子 (SPA に塗布してから 1 日後) の代表的な画像。DIC と mNG の蛍光画像を示している。スケールバー : 10 μ m。 (B,C) 増殖期 (B) と胞子 (C) の細胞内における mNG の蛍光輝度の定量。コントロールとして構成的発現プロモーター (*Padh1*) の下流から mNG を発現する細胞も定量した。n = 25 cells。 (D) 胞子と増殖期細胞における mNG の発現量比。各株について胞子の平均値を増殖期細胞の平均値で除算した。

2.3.8 発芽誘導後の細胞質の急速な流動化には新たなタンパク質の合成と ATP 産生は必要ない

細胞質流動化と発芽開始に必要な分子機構をさらに調べることを目的に、各種阻害剤を使った実験を行った。まず、タンパク質合成阻害剤である cycloheximide (CHX) 添加時の胞子の形態変化と 40 nm-GEM を観察した。CHX の存在下では、発芽誘導から 20 時間後でさえ、胞子の形態変化は起きなかった (図 15A)。よって、新たなタンパク質の合成は胞子サイズが大きくなる過程に必要であることが明らかになった。しかし、CHX の存在下でも非存在下と同様に、発芽誘導から 1 時間以内に細胞質は流動化した (図 15B)。つまり、発芽時の細胞質の流動化には、新たなタンパク質の合成は必要ないことが示された。同様の結果は、リボソーム生合成・タンパク質合成に関わるキナーゼである TORC1 の機能を、Torin1 添加によって阻害した際にも見られた (図 16A,B)。次に、分裂酵母の主要な ATP 産生経路である解糖系 [82] を 2-Deoxy-D-glucose (2-DG) 添加によって阻害した。2-DG 添加時は、CHX 添加時と同様に胞子の形態変化は見られず (図 17A)、胞子の成長過程で解糖系を介した ATP 産生が必要であることがわかった。40 nm-GEM の動きを観察したところ、発芽誘導後 1 時間目までは 2-DG の有無によらず GEM 粒子の拡散係数の上昇が見られた (図 17B)。しかし、2-DG 存在下では、1 時間目以降の GEM 粒子の拡散係数の上昇は見られなかった (図 17B)。本結果は、発芽誘導後の細胞質の流動化は 2 段階で起きることを示唆している。1 段階目は、cAMP-PKA 経路が活性化し、それに続く Ntp1 を介したトレハロースの分解による 1 時間以内の急速な細胞質の流動化である (図 11D, 図 12D,E)。2 段階目は、解糖系を介した ATP 産生によって起きる緩やかな流動化である。また、2-DG の存在下でも 1 段階目の流動化は見られるため、トレハロース分解の結果できたグルコースが ATP 産生に利用されて細胞質が流動化する訳ではないことを示唆している。

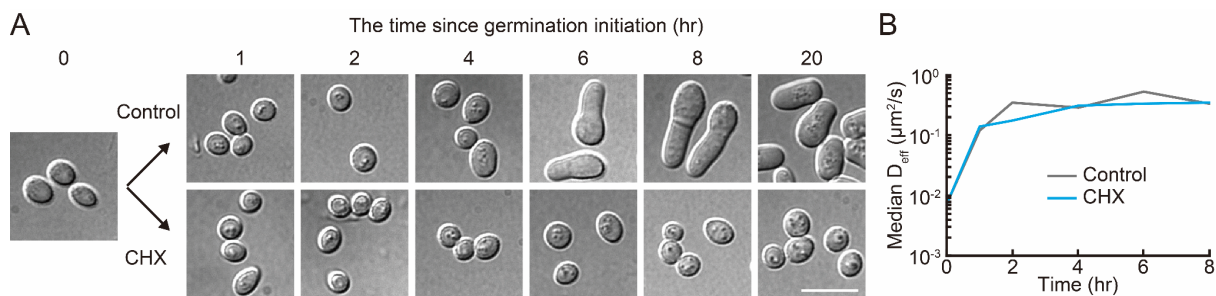


図 15 CHX 添加時の発芽過程における 40 nm-GEM の拡散

(A) CHX 添加時の発芽過程における形態変化。精製した孢子を YEA-Glucose 培地に懸濁して 2 つに分け、片方に CHX を添加し (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)、グルコースを 2% となるように添加して発芽を誘導した。スケールバー : 10 μm 。(B) CHX 添加時の発芽過程における 40 nm-GEM の拡散係数の中央値。

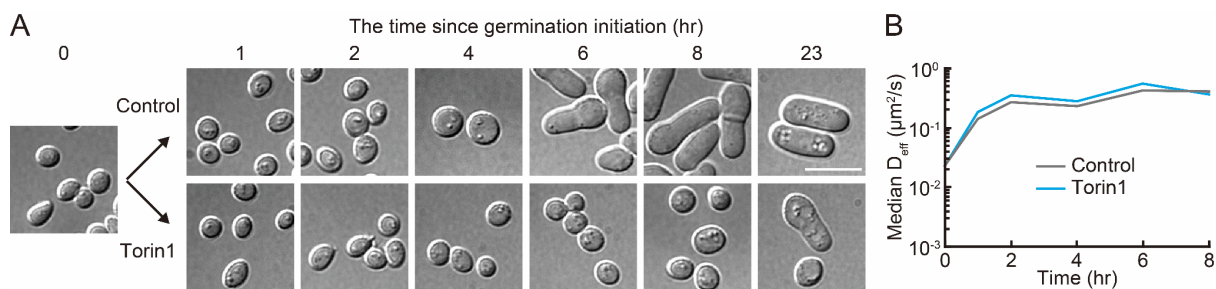


図 16 Torin1 添加時の発芽過程における 40 nm-GEM の拡散

(A) Torin1 添加時の発芽過程における形態変化。精製した孢子を YEA-Glucose 培地に懸濁して 2 つに分け、片方に Torin1 を添加し (終濃度 25 μM)、グルコースを 2% となるように添加して発芽を誘導した。スケールバー : 10 μm 。(B) Torin1 添加時の発芽過程における 40 nm-GEM の拡散係数の中央値。

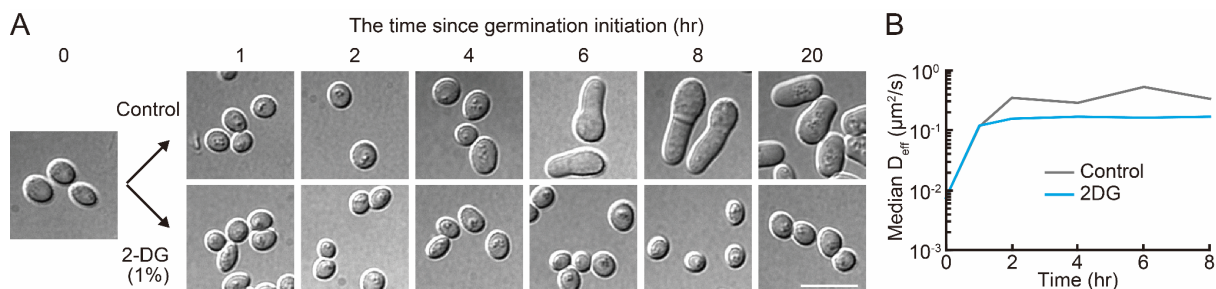


図 17 2-DG 添加時の発芽過程における 40 nm-GEM の拡散

(A) 2-DG 添加時の発芽過程における形態変化。精製した胞子を YEA-Glucose 培地に懸濁して 2 つに分け、片方に 2-DG を添加し (終濃度 1%)、グルコースを 2% となるように添加して発芽を誘導した。スケールバー : 10 μm 。(B) 2-DG 添加時の発芽過程における 40 nm-GEM の拡散係数の中央値。

2.3.9 胞子内で数百 nm スケールで mNeonGreen の拡散は制限されない

ここまでは 40 nm 程度の粒子 (40 nm-GEM) の拡散係数を定量し、細胞質の流動性を評価してきた。続いて、40 nm-GEM よりも小さいタンパク質として、緑色蛍光タンパク質 mNeonGreen (直径 5 nm 程度) の拡散係数を胞子で定量した。mNeonGreen の拡散係数の定量には、FCS と FRAP の 2 種類の手法を使用した。FCS は共焦点領域内の 400 nm 程度の範囲における蛍光分子の拡散係数を算出でき、FRAP は細胞内の一部の領域をフォトブリーチし、その後の蛍光の回復を観察するため μm スケールでの蛍光分子の拡散係数を算出できる。まず、FCS で mNeonGreen の拡散係数を定量した。増殖期細胞と胞子に mNeonGreen を発現させ、その蛍光輝度値の変動を顕微鏡で観察し、得られた輝度値データから自己相関関数を算出し、mNeonGreen の拡散係数を推定した (図 18A)。その結果、胞子では mNeonGreen の拡散係数が増殖期細胞と比較して 4 倍程度低下していた (図 18B)。しかし、40 nm-GEM の拡散係数は胞子で 30 倍程度低下していたことから (図 8C,D, 表 4 に結果をまとめた)、5 nm 程度の分子の拡散は 40 nm 程度の分子ほどは低下していないことが示唆された。次に、FRAP で mNeonGreen の拡散係数を定量した。酵母細胞の一部の領域をフォトブリーチしたところ、細胞サイズが小さいために、最終的に細胞全体の輝度が下がってしまうことがわかった (図 18C)。拡散速度を比較するための指標として、蛍光回復後に達する最大輝度値の半分になるまで要した時間 (T-half) が利用されるが [65]、細胞全体の輝度が下がってしまうと見かけ上、T-half の値が低く見積もられてしまうと考えられた。そこで、本研究ではフォトブリーチ後の蛍光回復をシミュレーションし、実際の実験データと比較することで、mNeonGreen の拡散係数を定量することにした (図 18D)。なお、シミュレーションの解析については、同研究室の近藤洋平助教と協力して行った。FRAP で mNeonGreen の拡散係数を定量した結果を図 18E に示した。胞子では増殖期細胞と比較して拡散係数が 40 倍程度低下していた (胞子 $\sim 0.5 \mu\text{m}^2/\text{s}$; 増殖期細胞 $\sim 20 \mu\text{m}^2/\text{s}$)。このように、FCS と FRAP で定量した mNeonGreen の拡散係数には乖離があることが判明した (表 4)。この乖離は、両手法で観察している拡散のスケールの違いに起因すると考えられる。つまり、mNeonGreen は数百 nm スケールでは比較的自由に拡散できるため、FCS では増殖期

との違いが数倍程度しか見られないが、数 μm スケールでは孢子特異的な細胞質の構造によって拡散が制限されていると推測される。

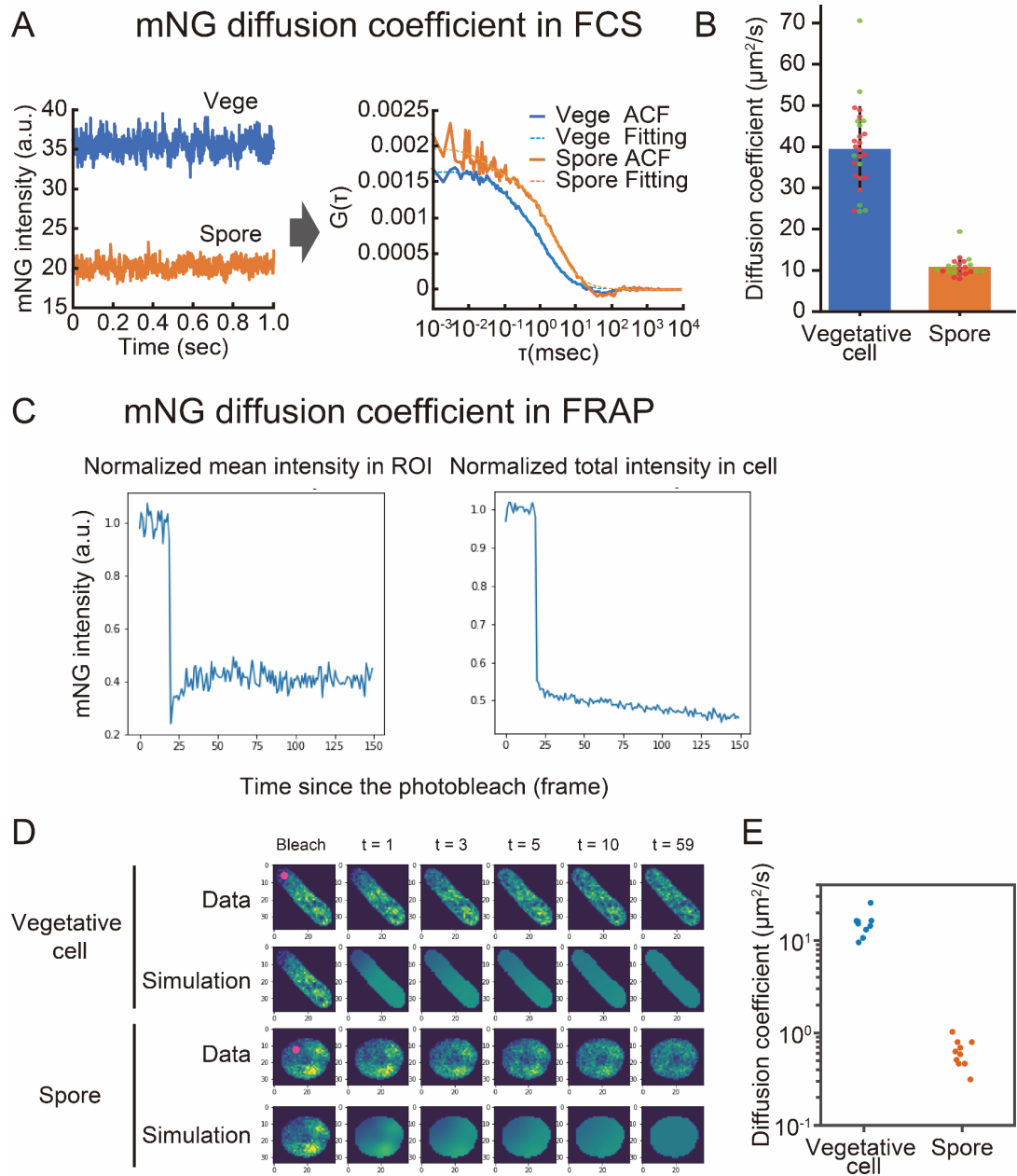


図 18 胞子内で数百 nm スケールでの mNeonGreen の拡散は制限されない

(A) mNeonGreen (mNG) を発現する増殖期細胞と胞子から得られた代表的な FCS のデータ。左のグラフは mNG の蛍光輝度値の変動の生データを示している。右は自己相関関数 (Auto-correlation function, ACF, 実線) とフィッティングした曲線(点線)を示している。(B) FCS による増殖期と胞子での mNeonGreen の拡散係数の定量。2 回の独立した実験の平均値と標準偏差を示している。各実験で 10 細胞程度の測定を行い、それぞれ別の色で示している。(C) 胞子の一部の領域 (ROI) をフォトブリーチし

た時の mNG の蛍光輝度。左は ROI 内での蛍光輝度の変化、右は細胞全体での蛍光輝度の変化を示している。(D) 分裂酵母の FRAP のシミュレーション解析。フォトブリーチ後の細胞内の蛍光輝度の分布 (Data) とそれをもとにした蛍光輝度の変化のシミュレーション (Simulation) を示している。フォトブリーチした領域をピンクで示している。(E) FRAP による増殖期と孢子での mNeonGreen の拡散係数の定量。それぞれ 10 細胞の拡散係数を定量した。

表 4 本研究で得られた細胞内における mNeonGreen と 40 nm-GEM の拡散係数
増殖期細胞と孢子における mNeonGreen (mNG) (5 nm) と 40 nm-GEM (40 nm) の拡散係数の中央値をまとめた。mNG については FCS と FRAP から得られたそれぞれの値を示した。また、増殖期細胞が孢子に対してどの程度 mNG と 40 nm-GEM の拡散係数が高いのかを Vegetative cell / Spore に示した。

	Vegetative cell	Spore	Vegetative cell / Spore
FCS (mNG, 5 nm)	39.2 $\mu\text{m}^2/\text{s}$	10.2 $\mu\text{m}^2/\text{s}$	3.8
FRAP (mNG, 5 nm)	23.8 $\mu\text{m}^2/\text{s}$	0.52 $\mu\text{m}^2/\text{s}$	49.6
Particle tracking (GEM, 40 nm)	0.63 $\mu\text{m}^2/\text{s}$	0.023 $\mu\text{m}^2/\text{s}$	27.3

2.3.10 発芽中のストレス顆粒の消失は 40 nm-GEM の拡散上昇と同時期に起きる

最後に、胞子内で細胞質の流動性が低下し、また発芽誘導後に流動化することでどのような細胞機能が影響を受けるのかを検討した。過去の研究で、細胞質の流動性が低下することで、液液相分離が亢進したり [39]、微小管の重合・脱重合が阻害されたり [27] することが報告されている。胞子で細胞質の流動性が低下することで、こうした細胞内の生化学反応やプロセスが影響を受けることが予想された。そこで本研究では、ストレス顆粒に着目した。ストレス顆粒は、細胞が熱ショックなどのストレスに晒された時に、細胞質中に一過的に形成される 100~200 nm 程度の凝集体である [83]。ストレス顆粒は液液相分離によって形成されるため、胞子では細胞質の流動性が低下することでストレス顆粒の形成が亢進し、発芽後に細胞質が流動化することでストレス顆粒が消失すると考えられた。主要なストレス顆粒の構成因子として知られる Pabp (poly(A) binding protein) に蛍光タンパク質 mNeonGreen を融合して蛍光顕微鏡で観察したところ、ほぼ全ての胞子でストレス顆粒が形成されていたが、発芽誘導から 1 時間以内に 9 割以上の胞子でストレス顆粒が消失していた (図 19A,B)。また、ストレス顆粒の消失は 40 nm-GEM の拡散係数の上昇と同時期であった (図 19B)。したがって、発芽中の細胞質の流動化に伴い、ストレス顆粒の分解が促進されることが示唆された。

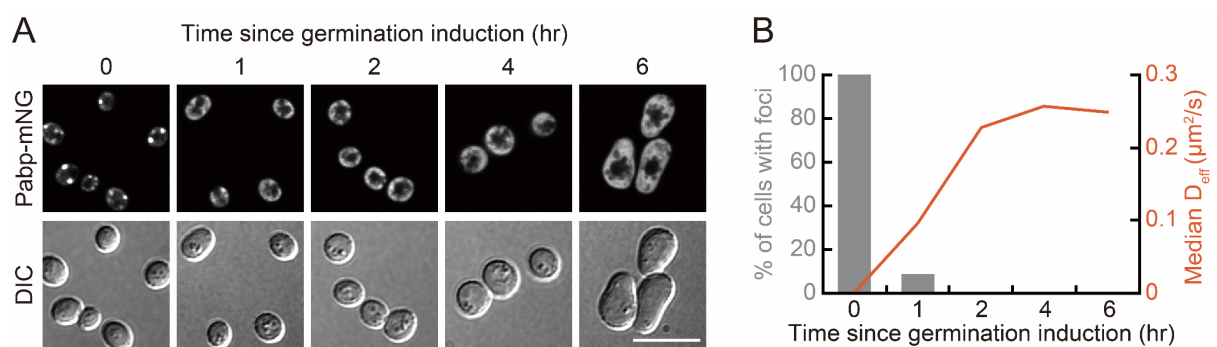


図 19 発芽中のストレス顆粒の消失は 40 nm-GEM の拡散上昇と同時期に起きる

(A) 発芽過程におけるストレス顆粒の代表的な画像。Pabp : ストレス顆粒の局在マーカー (major poly(A) binding protein)。スケールバー : 10 μm 。(B) 発芽中のストレス顆粒を持つ細胞の割合と 40 nm-GEM の拡散係数の定量。

2.4 考察

本研究では分裂酵母の孢子と発芽において細胞質流動性を評価し、また流動性の制御機構の解明を目指した。40 nm-GEM を用いて見積もった流動性は、増殖期細胞と比較して孢子で大きく低下していた。しかし、発芽誘導から 1 時間以内に孢子の細胞質は急速に流動化することが明らかになった。この急速な流動化には、cAMP-PKA 経路によるグルコース感知と Ntp1 によるトレハロース分解が必要であった (図 20)。発芽誘導から 1 時間目以降にも細胞質が緩やかに流動化した。この緩やかな流動化には解糖系を介した ATP 産生が必要であることが示唆された (図 20)。

2.4.1 分裂酵母孢子の細胞質流動性の解析手法の確立

分裂酵母の孢子で細胞質流動性を解析する手法が確立していなかったため、技術的な基盤を開発した。初めに、分裂酵母の孢子を高純度かつ簡便に精製する手法を開発した (図 6)。本研究では cAMP-PKA 経路やトレハロース代謝経路を始めとし、様々な遺伝子破壊株などの変異体から孢子を精製する必要があるがあった。従来の超遠心や密度勾配遠心を用いた精製手法と比べ、短時間で孢子を精製できるため、円滑に実験・解析を進めることが可能になった。発芽研究が進んでいない一つの理由として簡便な実験手法が開発されていないことも挙げられ、今回開発した精製法を使うことで発芽研究が進展することが期待される。次に、分裂酵母の染色体上の特定の位置に任意の DNA 配列を挿入するため、新規のプラスミドベクターを開発した (図 7)。分裂酵母へ外来の遺伝子を導入するには、プラスミドとして保持させる手法が一般的に利用される [78]。しかし、細胞毎に導入されるプラスミドのコピー数が違うため、遺伝子の発現量を細胞間で一様にするのは難しい。今回の実験で使用した 40 nm-GEM のように発現量によって細胞内での形成に違いが見られる場合、染色体上に遺伝子を挿入し、発現量を揃えることが望ましい。また、細胞間でタンパク質の蛍光輝度値を比較したい場合にも細胞毎の発現量のばらつきは問題になり得る。過去にも染色体上に DNA 配列を挿入するためのプラスミドベクターは報告されているが [72-78]、ものによっては多コピーで挿入されてしまう。また今回、3つの染色体上の locus (1L, 2L, 3R locus) に DNA 配列を挿入できることを示した。過去に報告されている Z locus [79] と合わせて、最大 4 種類の外来の DNA 配列を 1 つの細

胞株に導入することが可能となった。それぞれの locus は染色体上の離れた位置にあるため、細胞同士を掛け合わせて株を取得するのも比較的容易である。このように、pSKI プラスミドベクターを使うことで分裂酵母で外来の DNA 配列を導入する選択肢が広がり、実験を円滑に進める上で幅広く利用されることが期待される。

2.4.2 分裂酵母胞子の細胞質流動性

分裂酵母胞子は増殖期と比較して細胞質流動性が低下していることが明らかになった (図 8C,D)。同様の流動性の低下 (粘性の増加) は、菌類 (*Talaromyces macrosporus*) や出芽酵母の胞子でも報告されている [33,84]。これらの知見を踏まえると、一般的に休眠時の胞子では細胞質の流動性が失われていると考えられる。これまでの菌類や出芽酵母の研究では、1種類のみ粒子や蛍光色素を用いて流動性を評価している [33,84]。そして、拡散係数と粘性が反比例の関係にあるというストークス-アインシュタインの式より、胞子の細胞質の粘性が増加することで分子の拡散が一樣に遅くなると考えられていた [33,84]。本研究では大きさの異なる2種類の粒子 (40 nm)・蛍光タンパク質 (5 nm) を用いて流動性を評価した。その結果、分裂酵母胞子では 40 nm 程度の分子 (40 nm-GEM) の動きは制限されるが (図 8C,D)、5 nm 程度の分子 (mNeonGreen) の動きは数 μm の範囲では制限されるものの、数百 nm では比較的自由であった (図 18B,E)。このような距離に依存した 5 nm の分子の動きは、細胞質の粘性の増加だけでは説明できない。つまり、分裂酵母胞子では、細胞質の粘性が増加するだけでなく、増殖期細胞では存在しない特異的な構造体が細胞内に形成されていることが示唆された。本研究では、胞子の細胞質では2つの特徴を持った構造体が形成されているというモデルを提案する (図 21)。1つ目は、分子サイズのふるい分けをする、障害物となる構造体である。図 21 ではその一つの例としてメッシュ様の構造体を示しているが、他にも膜様の構造体などが想定される。こうした構造体により、40 nm の分子の動きは構造体に捕捉され動きが阻害されるが、5 nm 程度の小さい分子は構造体の網目を抜け、比較的自由に動くことができると考えられる。この構造体によって 40 nm-GEM と mNeonGreen の FCS の結果の違いを説明できると考える (表 4)。2つ目は、生体物質と非特異的に相互作用する構造体である。図 21 ではその一つの例として、メッシュ様構造が粘着性を持っていると想定している。粘着性のように相互作用する性質を持った構造体が胞子で形成される

ことで、5 nm 程度の小さい分子であっても移動する距離が長くなるにつれ、拡散係数が低く見積もられると考えられる。この構造体によって mNeonGreen の FCS と FRAP の結果の乖離を説明できると考える (表 4)。これまでも、増殖期の酵母や哺乳類細胞の細胞質がメッシュ様構造であることは示唆されていた [36,85]。しかし、粘着性のような生体物質と非特異的に相互作用する構造体との複合的な構造を形成するという報告例はなく、胞子は特殊な細胞質状態であることが推測される。

このような特殊な細胞質内の構造体を生み出す分子機構の候補として、トレハロースが考えられる。過去の研究で、増殖期の出芽酵母では、熱ショック時にトレハロースとグリコーゲンが協調的に働くことで細胞質の粘性が増加し、分子の拡散が遅くなることが報告されている [65]。分裂酵母胞子では増殖期細胞と比較してトレハロースが蓄積するが (図 12C)、グリコーゲン量は増殖期と比べて変化しないことが過去に報告されている [55]。加えて、トレハロース単体では 45% という高濃度溶液であっても GFP の拡散係数は半分程度しか低下しないが [65]、胞子内のトレハロース濃度は 5% であった (図 12C)。よって、トレハロース単体で細胞質の粘性の増加を引き起こすことは難しいと言える。現在、トレハロースと細胞内成分が相互作用することで胞子特異的な構造体を形成すると予想している。トレハロースはタンパク質の安定化に寄与するため [86]、タンパク質と相互作用することで構造体を形成すると考えている。このようなトレハロースを介した構造体が上述した胞子の特異的な構造体であると考えている (図 21)。

2.4.3 細胞質の流動性が低下する意義

胞子内にトレハロースが蓄積することで細胞質の流動性が低下することがわかった。流動性が低下することで細胞質では何が起きているのだろうか。一つの可能性として本研究ではストレス顆粒に着目した。ストレス顆粒の消失は細胞質の流動化とタイミングが一致することから (図 19B)、流動性低下時にストレス顆粒の形成が促進されていることが示唆された。また、出芽酵母の胞子では増殖期よりも転写・翻訳速度が低下することが知られている [87]。リボソームは 30 nm、RNA ポリメラーゼは 20 nm 程度のタンパク質・RNA 複合体であるため [88,89]、40 nm 粒子の拡散が制限される胞子の細胞質では、拡散律速となることで転写・翻訳が抑制されていることも考えられる。こうした代謝活動の抑制は、ATP などのエネルギー源の節約

に繋がり、結果として栄養源が枯渇した環境で胞子が生存するための一因になっている可能性がある。

2.4.4 cAMP-PKA 経路による Ntp1 の活性制御

グルコース感知機構である *pkal* 遺伝子の破壊株では発芽誘導後のトレハロース分解が見られなかった (図 13A,B)。つまり、トレハラーゼ Ntp1 は cAMP-PKA 経路の下流で活性制御されていると考えられる。先行研究で、分裂酵母、出芽酵母において Ntp1 およびその相同遺伝子 Nth1 の活性が cAMP 量や PKA 活性によって制御されることが報告されている [90–92]。出芽酵母では PKA からトレハラーゼ Nth1 への直接的なリン酸化を示唆する研究例もある [93]。分裂酵母の Ntp1 のアミノ酸配列中には PKA のリン酸化モチーフ (RRXS*/T*) [94] があり、これに該当する S71 を別のアミノ酸へ置換するとトレハラーゼ活性を失う [95]。そのため、Ntp1 は PKA によって直接的にリン酸化されて活性制御される可能性が考えられる。また本研究で、*gpa2* 破壊株で Ntp1 を過剰発現させただけでは発芽開始時の急速な細胞質の流動化が見られず、また正常に発芽が進行しないことが判明した (図 13D,E,F)。先行研究を踏まえると、*gpa2* を欠失して cAMP-PKA 経路が不活性化していると、Ntp1 は不活性化状態のままであると想定される。そのため、Ntp1 を過剰発現させただけでは細胞質が十分に流動化しなかったと考えられる。また、CHX を添加して新たなタンパク質の合成を阻害しても細胞質は流動化する (図 15B)。よって、Ntp1 は胞子形成の段階で既に細胞内に作られていると予想される。胞子で作られた Ntp1 は不活性型であるが、グルコースを感知してから PKA が活性化し、Ntp1 が PKA から翻訳後調節され活性化型となることで、トレハロースが分解され、その結果、細胞質の流動化へと繋がると考えている。

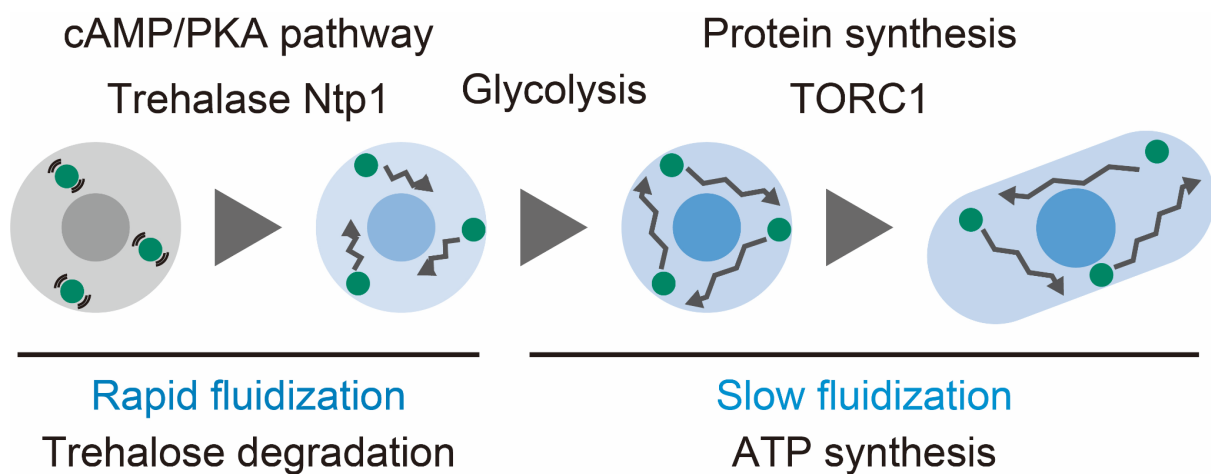


図 20 発芽過程における細胞質流動性の制御機構

発芽誘導前の孢子では、細胞内にトレハロースが蓄積することで流動性が低下している。グルコースを添加して発芽を誘導すると、トレハロースが急速に分解され、その結果、細胞質が流動化する (1 段階目の流動化)。トレハロースの分解には、グルコース感知機構 **cAMP-PKA** 経路とトレハララーゼ **Ntp1** が必要である。その後、解糖系を介して **ATP** が細胞内で産生されることで、様々な細胞内の生化学反応・プロセスが活性化し、緩やかに細胞質が流動化すると考えられる (2 段階目の流動化)。なお、細胞質の流動化にはタンパク質合成は必要ない。

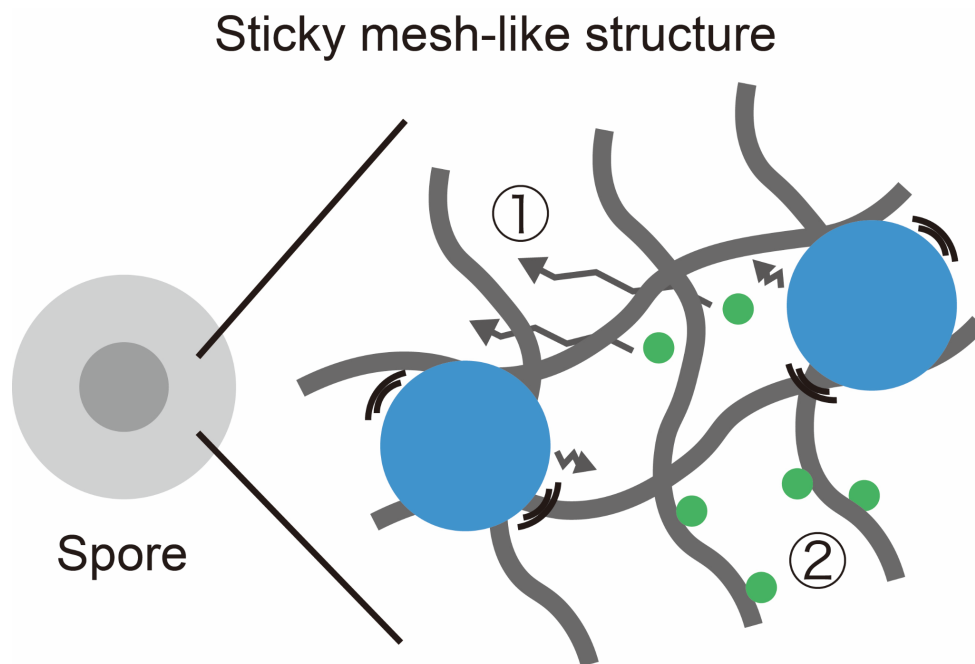


図 21 胞子内の粘着性のメッシュ様構造 (Sticky mesh-like structure)

分裂酵母の胞子は増殖期とは異なる細胞質の物性を示す。本研究の結果から主に 2 つの特徴的な構造が形成されていると考える。① 粒子の動きを制限し、障害物となるような「メッシュ様構造」：粒子のサイズが大きいと網目に捕われて自由に動くことができないが、網目の大きさよりも小さい粒子は比較的自由に拡散できる。② 粒子が非特異的に吸着するような「粘着性構造」：網目の大きさよりも小さい粒子であっても、長距離での拡散は制限され、拡散速度が増殖期よりも遅くなる。これは、胞子内では粒子が粘着性を持った構造に吸着しながら動くため、距離に依存して拡散速度への影響が見られるためと考えられる。

第三章 近赤外蛍光タンパク質 iRFP を利用した分裂酵母の cAMP-PKA 経路の可視化・操作法の確立

3.1 序

第二章では、分裂酵母の孢子と発芽過程における細胞質の流動性について記述した。発芽過程における流動性の制御には、グルコース感知機構として知られる cAMP-PKA 経路が必要であることが明らかになった。cAMP-PKA 経路の必要性について主に遺伝子破壊株を用いて解析したが、第三章では本経路の活性動態まで解析することを目的に行った、cAMP-PKA 経路の可視化・操作法の確立について記述する。また、それに付随して得られた近赤外蛍光タンパク質 iRFP の高輝度化についても記述する。

3.1.1 分裂酵母の cAMP-PKA 経路の可視化と操作

cAMP-PKA 経路は分裂酵母の主要な炭素源となるグルコースの感知機構として知られる (図 4)。本経路はこれまで主に遺伝学および生化学的手法を用いて解析されてきた [10]。しかし、これらの手法の性質上、1) 遺伝子の破壊に基づく定性的な情報しか得られず、また、2) 大多数の細胞からの平均的な振る舞いを測定するため、細胞間の cAMP 量や PKA 活性のばらつきを考慮できていない。分裂酵母の発芽開始は、たとえクローナルな細胞集団であっても数時間程度のばらつきが見られる [1,11]。そのため、細胞集団を用いて発芽過程における cAMP 量や PKA 活性を測定しようとしても正確に定量することは困難である。

cAMP・PKA などの小分子の濃度やキナーゼの活性変化を 1 細胞レベルで解析する上で、蛍光顕微鏡イメージングは強力な手法の一つである。これまで、哺乳類細胞や出芽酵母では、cAMP 濃度や PKA 活性の変化を可視化する目的でバイオセンサーが利用されてきた [96–98]。これらのバイオセンサーは、cAMP との結合ドメインや PKA のリン酸化モチーフを含むペプチドを蛍光タンパク質と連結することで作られる。刺激に応答したバイオセンサーの局在 [99] や蛍光輝度 [100–102]、Förster resonance energy transfer (FRET) 効率 [96–98] の変化を cAMP 濃度や PKA 活性の変化へと変換し定量することができる。こうしたバイオセンサーの一つとして、kinase

translocation reporter (KTR) が知られている [99]。KTR は対象とするキナーゼの活性変化に応じて細胞質と核との間で局在が変化する。その細胞質と核内の蛍光輝度の比率 (C/N 比) を算出することで、キナーゼの活性強度を 1 細胞レベルで推定できる。しかし、分裂酵母では KTR を含め、cAMP 量や PKA 活性を定量するためのバイオセンサーは開発されておらず、1 細胞レベルでの解析は報告されていない。cAMP-PKA 経路は発芽過程だけでなく、減数分裂・胞子形成 [47-49]、ストレス耐性 [103,104]、極性成長 [105]、など分裂酵母の様々な細胞内現象や機能に関わる。よって、cAMP-PKA 経路を可視化するバイオセンサーを開発できれば、分裂酵母の細胞内機能を解析する上で有用な手法の一つになると考えられる。

また、バイオセンサーで可視化された cAMP 量や PKA 活性の動態を細胞内で人為的に再構成できれば、その動態が発芽開始を誘導するのに十分であることまで明らかにできる。cAMP 量や PKA 活性の動態を操作する上で、光遺伝学が有用な手法の一つである。光遺伝学は、光照射に応答して構造変化する光受容タンパク質を用いて、細胞内機能を制御する技術である。これまでに、青色照射依存的に cAMP の産生を促す、bacterial photoactivated adenylate cyclase (bPAC) が開発され、哺乳類細胞や出芽酵母で利用されている [106,107]。bPAC は硫黄酸化細菌 (*Beggiatoa*) 由来の光活性化型の cAMP 合成酵素であり、青色光を吸収するために必要な BLUF (blue light receptor using FAD) ドメインと cAMP 合成活性を持つ adenylyl cyclase ドメインから構成される [107]。バイオセンサーと光遺伝学を用いた cAMP-PKA 経路の可視化・操作法が確立すれば、発芽開始のシグナル動態を詳細に調べることが可能となる。

KTR 型バイオセンサーの観察では、KTR の局在を追跡するために核局在マーカーが必要となり、バイオセンサー、光遺伝学と合わせて同時に 3 色の蛍光タンパク質や光刺激を用いることになる。光遺伝学 bPAC では青色光照射によって光刺激を行うため、同じ励起波長が必要となる GFP などの緑色蛍光タンパク質は同時に観察することが難しい。そこで、本研究では赤色蛍光タンパク質を用いて KTR 型バイオセンサーを開発した。これらに加え、本研究では以下 (3.1.2~3.1.3) に述べる近赤外蛍光タンパク質 iRFP を核局在マーカーとして使い、分裂酵母における cAMP-PKA 経路の可視化・操作法を構築することを目指した。

3.1.2 近赤外蛍光タンパク質 iRFP

蛍光タンパク質は細胞内での生体物質の局在、量、機能などを調べる目的で幅広く利用される。数ある蛍光タンパク質の中でも、最も長波長の蛍光を発するものとして、近赤外蛍光タンパク質が知られている (図 22)。近赤外蛍光タンパク質は他の蛍光タンパク質の蛍光波長との分離が比較的容易なため、多重蛍光イメージングをする上で有用である。また、一般的に BFP を代表とする青色蛍光タンパク質を観察するには、紫外線等の短波長の光を細胞へ照射する必要があるため、光照射が細胞に対して毒性となる場合がある。よって、緑色や赤色蛍光タンパク質と併用可能な近赤外蛍光タンパク質は、3色以上の蛍光タンパク質を同時に可視化する上で、優先的に選択される蛍光タンパク質である。

近赤外蛍光タンパク質は、植物、菌類、細菌が持つ光受容タンパク質であるフィトクロムや、シアノバクテリアの集光装置フィコビリソームの構成成分であるアロフィコシアニンなどを基にして開発されてきた [108,109]。中でも、光合成細菌由来の光受容タンパク質 RpBphP2 (別名 PhyB1) の一部のドメインを切り出し、それに変異を導入することで開発された iRFP (別名 iRFP713) がよく知られている [110]。iRFP はこれまでに哺乳類細胞や出芽酵母などで利用されているが [110–115]、分裂酵母での利用例は報告されていない。

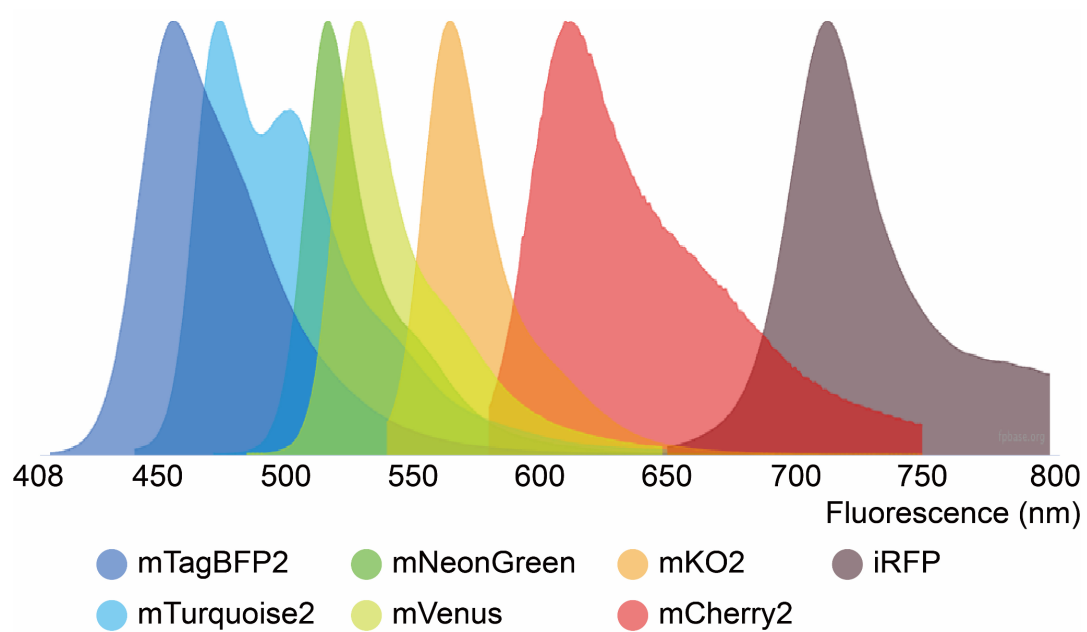


図 22 様々な蛍光タンパク質の蛍光スペクトル

これまで報告されている様々な蛍光タンパク質の蛍光スペクトルを併せて記載した。iRFPは最も長波長側の蛍光を発することがわかる。なお、本図はFPbase (<https://www.fpbase.org/>) を用いて作製した。

3.1.3 iRFP の発色団の形成

GFP を始めとする、クラゲやサンゴ由来の蛍光タンパク質は、ペプチド鎖の一部が自発的に発色団を形成して蛍光性となる。しかし、フィトクロムやアロフィコシアニンは発色団として開環テトラピロール構造を持つ化合物を必要とする (図 23)。具体的には、バクテリオフィトクロムはビリベルジン (BV)、アロフィコシアニンやシアノバクテリオクロムはフィコシアノビルリン (PCB)、植物フィトクロムはフィトクロモビルリン (PΦB) を発色団として利用し蛍光を発する。これら光受容タンパク質は非酵素的に発色団と共有結合する [116]。

これらの開環テトラピロール構造を持つ発色団は、中心金属として鉄を持つポルフィリン錯体であるヘムを前駆体として細胞内で作られる (図 23) [117,118]。ヘムオキシゲナーゼ (HO) が、電子供与体であるフェレドキシン (Fd) と酸化還元酵素であるフェレドキシン-NADP⁺ レダクターゼ (Fnr) と共に、ヘムの酸化開裂を触媒することで BV が合成される [119]。シアノバクテリアでは、Fd と Fnr と共に、PCB : Fd オキシドレダクターゼである PcyA の働きによって BV から PCB が合成される [120,121]。植物では、Fd と Fnr と共に、PΦB : Fd オキシドレダクターゼである HY2 の働きによって BV から PΦB が合成される [122–124]。これまでに、細菌、哺乳類細胞、カエル卵、出芽酵母、メタノール資化性酵母、分裂酵母などで、上記の遺伝子を発現させることで BV、PCB、PΦB を細胞内で合成できることが報告されている [120,121,125–132]。

バクテリオフィトクロム由来の iRFP の場合は、発色団として BV を必要とする [110]。つまり、細胞内で作られた発色団と結合していない iRFP (アポ iRFP) が BV と結合して (ホロ iRFP)、初めて蛍光性となる。このように iRFP が蛍光を発するかは BV との結合に依存するため、iRFP を使ったイメージングでは細胞内 BV 濃度が重要になる (図 24)。実際に、BV を培地中に添加することで iRFP や他の近赤外蛍光タンパク質の蛍光輝度が増加することが報告されている [133,134]。また、ヘムオキシゲナーゼ (HO1) を過剰発現させて BV の合成を促進する、あるいは、BV をビリルビンへ分解する酵素であるビリベルジンレダクターゼ A (BLVRA) の遺伝子を破壊することで、細胞内に BV が蓄積して iRFP 蛍光が増加することが報告されている [134,135]。逆に、BV の合成能が低い、もしくは全く合成できない生物種では iRFP

を使ったイメージングは不可能である。例えば、線虫 (*Caenorhabditis elegans*) は BV を合成できないため、iRFP だけを導入しても蛍光を観察できない [136,137]。加えて、BV は組織への浸透性が低いため、線虫のような多細胞生物では外から BV を添加するのではなく、BV 合成遺伝子を導入する方が効率的である。しかし、iRFP の発色団を細胞内で合成させる手法として、HO1 遺伝子を導入する手法しか報告されておらず、その改良や最適化はされていない。

3.1.4 本研究の目的

本研究では、分裂酵母の cAMP-PKA 経路の可視化・操作法の確立を目指し、またそれに付随して得られた iRFP の高輝度化について解析した。まず、分裂酵母では cAMP-PKA 経路の活性を可視化できるバイオセンサーが報告されていなかったため、PKA の KTR 型バイオセンサー spPKA-KTR を開発した。加えて、青色光照射によって細胞内 cAMP 量を操作可能な bPAC を分裂酵母で適用し、PKA 活性を操作できるかを検証した。spPKA-KTR の核局在マーカーとして iRFP の利用を試みたところ、分裂酵母では iRFP が蛍光を発しないことを発見した。そこで、iRFP を分裂酵母で利用するための手法を探索した。

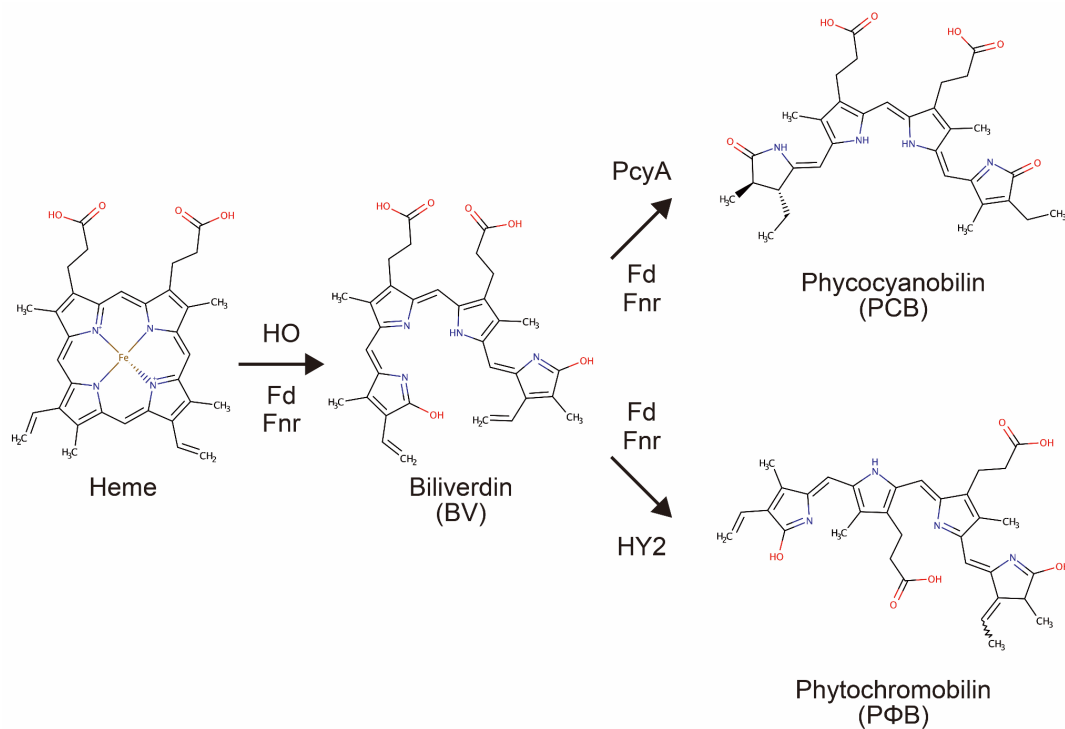


図 23 フィトクロムやアロフィコシアニンの発色団の生合成

バクテリオフィトクロムはビリベルジン (BV)、アロフィコシアニンやシアノバクテリオクロムはフィコシアノビルリン (PCB)、植物フィトクロムはフィトクロモビルリン (PΦB) を発色団として利用し蛍光を発する。これらの発色団はへムを前駆体として細胞内で作られる。HO : へムオキシゲナーゼ、Fd : フェレドキシン、Fnr : フェレドキシン-NADP⁺ レダクターゼ、PcyA : PCB : Fd オキシドレダクターゼ、HY2 : PΦB : Fd オキシドレダクターゼ

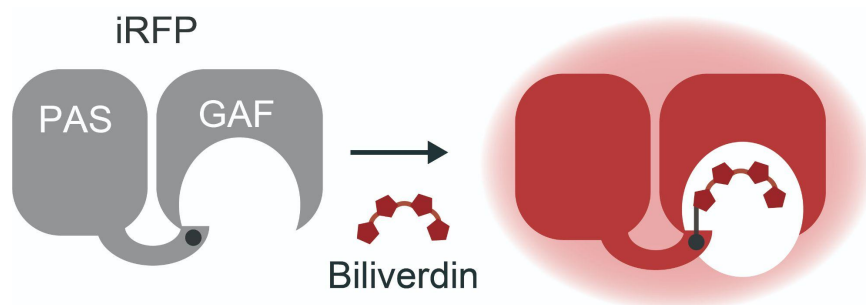


図 24 iRFP の BV を利用した発色団形成

iRFP の PAS ドメインの N 末端にシステイン残基があり、BV と共有結合する。結合した BV は GAF ドメインのポケットに入って安定化し、iRFP は蛍光を発する。

3.2 材料と方法

3.2.1 プラスミド

本研究で使用したプラスミドを表 5 にまとめた。*PcyA*、*HO1*、*Fd*、*Fnr* の cDNA は *T. elongatus* BP-1 株由来である [132]。これら遺伝子と SynPCB2.1 の塩基配列は所属研究室の先行研究でヒト用にコドンが最適化されている。ミトコンドリア局在化配列 (MTS; MSVLTPLLLRGLTGSARRLP) はヒトの cytochrome C oxidase subunit VIII 由来である。cDNA は Ligation highVer.2 (TOYOBO) か NEBuilder HiFi DNA Assembly (New England Biolabs) を使用してベクターへサブクローニングした。蛍光タンパク質 mNeonGreen と Turquoise2-GL の塩基配列は分裂酵母用にコドンを最適化した。pSKI-SynPCB2.1-Lifeact-iRFP の作製では、*Pact1* (開始コドンの上流 822 bp の領域) を分裂酵母のゲノムからクローニングし、Lifeact をオリゴ DNA をアニールして使用した。miRFP670 と miRFP703 の cDNA は、それぞれ pmiRFP670-N1 と pmiRFP703-N1 (Addgene plasmids #79987 and #79988, deposited by Vladislav Verkusha) から得て、サブクローニングして pMNATZA1-miRFP670 と pMNATZA1-miRFP703 を作製した。pMNATZA1-iRFP-mNeonGreen は、iRFP の cDNA を mNeonGreen の上流に挿入することで作製した。pCold-TEV-linker-iRFP と pCold-TEVlinker-iRFP-mNeonGreen は、iRFP と iRFP-mNeonGreen の cDNA を pCold-TEV へサブクローニングすることで作製した。

3.2.2 分裂酵母株と培地

本研究で使用した分裂酵母株を表 6 にまとめた。分裂酵母の培地、培養、孢子形成、発芽誘導方法については 2.2.2 と同様に行った。

発色団として BV と PCB を用いた。ビリベルジン塩酸塩は Sigma-Aldrich (30891-50MG) から購入し、DMSO に 25 mM となるように溶かして -30°C で保管した。PCB は Santa Cruz Biotechnology (sc-396921) から購入し、DMSO に 5 mM となるように溶かして -30°C で保管した。分裂酵母の培地に 625 μ M となるように BV や PCB を添加すると溶けきらずに沈殿が確認された。

3.2.3 出芽酵母株と培地

本研究で使用した出芽酵母株を表 7 にまとめた。出芽酵母は 32°C で栄養培地である YPDA 培地を用いて培養した。YPDA 培地の組成 (1 L 当たり) は以下に示した。寒天培地を作製する場合は、以下の組成に加えて寒天を 20 g 添加した。また、薬剤耐性遺伝子を導入した細胞を選択する場合、分裂酵母と同様の薬剤濃度を使用した (2.2.2 参照)。

・ YPDA 培地

Yeast Extract	10 g
Glucose	20 g
Pepton	20 g
Adenine	400 mg

3.2.4 分裂酵母の形質転換

2.2.3 と同様に行った。

3.2.5 分裂酵母のゲノム抽出

2.2.4 と同様に行った。

3.2.6 出芽酵母の形質転換

前日から YPDA 寒天培地に細胞株を塗布して 32°C で静置培養した。生えてきたコロニーを少量かき取り、YPDA 液体培地 5 ml に植菌して 32°C で 8 時間程度、振とう培養した。遠心して培養液を回収し、その後、滅菌水で細胞を洗浄した。細胞を酢酸-リチウム-TE 100 μ l (100 mM Lithium-acetate, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA (pH 8.0)) で懸濁し、30°C で 1 時間程度静置した。プラスミドもしくは DNA 断片 10 μ l とサケ精子 DNA 10 μ l を加え、さらに、酢酸-リチウム-TE 50% PEG 溶液 680 μ l (100 mM Lithium-acetate, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA (pH 8.0), 50% PEG4000) を加え、静かに混合した。30°C で 30 分間静置した後、42°C で 15 分間の熱ショックを与え、遠心して細胞を回収し、滅菌水で懸濁した。懸濁液を YPDA 寒天培地に塗布し、32°C で半日ほど静置培養した。その後、選択培地へレプリカし、生えてきたコロニーに目的の遺伝子が導入されているかを確認した後、-80°C へ保管した。

染色体上へ DNA 配列を組み込むためのベクター p304TEFp-NatMX およびこのベクターから作製したプラスミドで形質転換する場合は、再度組み換えが起きてプラスミドが脱落することを防ぐために、基本的に-80°Cで保存するまで ClonNat を添加した培地で培養した。

3.2.7 タンパク質の精製

His タグを付加した iRFP の精製では、pCold-TEV-linker-iRFP で大腸菌 BL21(DE3) pLysS (Promega、L1195) を形質転換し、0.1 mg/ml のアンピシリンを含む LB 寒天培地で 37°Cで一晩培養した。生えてきたコロニーの内の一つを、0.1 mg/ml のアンピシリンと 30 µg/ml のクロラムフェニコールを含む LB 液体培地 2.5 ml に植菌し 37°Cで一晩培養した。培養液をアンピシリンとクロラムフェニコールを含む LB 液体培地 250 ml に植菌し、OD₆₀₀が 0.6~1.0 に達するまで、37°Cで 2~4 時間、振とう培養した。培養液を 18°Cへ冷やし、0.25 mM isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG、Wako、094-05144) を添加し His タグを付加したタンパク質の発現を誘導した。18°Cで一晩振とう培養した後、細胞を遠心して回収し 20 mM イミダゾール (Nacalai Tesque、19004-22) を含む PBS (Takara、T900) に懸濁した。細胞をソニケーション (VP-300N、TAITEC) を使って破碎処理し、遠心 (215,000 g、15 分間、4°C) して上清を回収し、250 µl Ni-NTA Agarose (Qiagen、1018244) を添加して 4°Cで 2 時間反応させた。タンパク質が結合したビーズを 20 mM イミダゾールを含む PBS で洗浄し、その後、300 mM イミダゾールを含む PBS でタンパク質を溶出した。

溶出画分を分子量マーカー Precision Plus Protein™ All Blue Standards (Bio-Rad、#1610373) と共に SDS-PAGE し、ゲルを Coomassie Brilliant Blue (CBB) 染色 (BIOCRAFT、CBB250) することでタンパク質を確認した。タンパク質を含む画分を Slide-A-Lyzer Dialysis Cassette 3500 MWCO (Thermo Scientific、66110) を使って透析し、イミダゾールを除いた。さらにタンパク質を濃縮するために Amicon ultra 3 K 500 µl (Millipore、UFC500308) を使用した。タンパク質の濃度は、Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific、23227) を使って測定した。精製した His-iRFP を BV もしくは PCB と結合させるには、His-iRFP を過剰量の発色団と混ぜて (分子比 1:5)、NAP-5 columns (Cytiva、17085301) を使ったサイズ排除クロマトグラフィーで結合していない BV や PCB を除いた。

FCS 解析で使用する His-iRFP-mNeonGreen を精製する場合は、pCold-TEV-linker-iRFP-mNeonGreen で大腸菌 BL21(DE3) pLysS を形質転換し、上と同様の方法で前培養まで行った。培養液をアンピシリンとクロラムフェニコールを含む LB 液体培地 1 L に植菌し、OD₆₀₀ が 0.6 に達するまで、37°C で 2~4 時間、振とう培養した。培養液を急速に 15°C まで冷やして 30 分間静置した。1 mM となるように IPTG を添加してタンパク質の発現を誘導した。15°C で一晩培養し、上と同様の方法で集菌と細胞の破碎処理を行った。得られた上清に 500 µl Ni-NTA Agarose を混ぜ、4°C で一晩反応させた。タンパク質が結合したビーズを 20 mM イミダゾールを含む PBS で洗浄し、その後、50 mM イミダゾールを含む PBS でタンパク質を溶出した。タンパク質の抽出画分は目視で mNeonGreen の蛍光を確認した。タンパク質を Amicon ultra 3 K 500 µl で濃縮し、透析を行った。タンパク質の濃度は、アルブミンスタンダード (Thermo Fisher Scientific、#23209) をリファレンスとして CBB 染色で測定した。

3.2.8 *in vitro* での iRFP の蛍光特性の評価

BV (100 µM)、PCB (100 µM)、発色団と結合した His-iRFP (12 µM) の吸収スペクトルは、10 mm の石英ガラスキューベット (TOSOH, T-29M UV10) に入れ、P330 nanophotometer (IMPLEN) を使い、200~950 nm の波長範囲で測定した。絶対蛍光量子収率は、BV もしくは PCB と結合した His-iRFP (1 µM) を PBS に入れ、Quantaaurus-QY C11347-01 絶対 PL 量子収率測定装置 (Hamamatsu Photonics) を使って測定した。励起波長は 640 nm とした。BV もしくは PCB と結合した His-iRFP (12 µM) の励起・蛍光スペクトルは、分光蛍光光度計 F-4500 (Hitachi) を使って測定した。励起スペクトルの測定では、タンパク質溶液を 500~720 nm の波長範囲を励起し、730 nm の蛍光を検出した。蛍光スペクトルの測定では、タンパク質溶液を 640 nm の波長で励起し、660~800 nm の波長範囲の蛍光を検出した。

3.2.9 ウェスタンブロット解析

分裂酵母からのタンパク質抽出は以前に報告された手法を参考にした [138]。分裂酵母を 32°C で培養し、 $2.5\sim 5.0 \times 10^7$ 程度の細胞を遠心して回収した。必要であれば、培養液に終濃度 125 µM となるように BV もしくは PCB を添加し、室温で 1.5 時間反応させた後に細胞を回収した。細胞の溶解のため、氷冷した 20% トリクロロ酢

酸 (TCA) 1 ml で細胞を懸濁し、その後、1 M Tris-HCl (pH7.5) 1 ml で細胞を洗浄した。細胞を 2 × SDS sample buffer 200 μl (25 mM Tris-HCl (pH 6.8), 24% glycerol, 4% SDS, 0.008% Bromophenol Blue, 10% 2-mercaptoethanol) で懸濁し、95°Cで 10 分間加熱した。7.0 mm ジルコニアビーズ (bio medical science) を入れたチューブにサンプルを移し、Cell Destroyer PS2000 (bio medical science) を使って細胞を破碎処理した。その後、95°Cで 10 分間加熱し、遠心 (16,000 g、10 分間、4°C) して上清を回収した。これを 5~20% ポリアクリルアミドゲル (Nacalai Tesque、13063-74) にロードし、SDS-PAGE を行った。その後、ポリフッ化ビニリデン膜 (PVDF) (Merck Millipore、IPFL00010) に転写し、TBS ブロッキングバッファー (LI-COR、927-60001) に浸してブロッキング処理をした。PVDF メンブレンを T7 タグ (1:1000、rabbit、Cell Signaling、13246) と α -チューブリン (1:1000、mouse、Sigma-Aldrich、T5168) に対する一次抗体と反応させ、その後、IRDye800CW donkey anti-mouse secondary antibody (1:5000、LI-COR、926-32212) と IRDye680RD goat anti-rabbit secondary antibody (1:5000、LI-COR、926-68071) で反応させた。タンパク質は、近赤外蛍光スキャナー Odyssey DLx イメージングシステム (LI-COR) を使って検出した。

3.2.10 Zinc blot 解析

Zinc blot 解析は以前に報告された手法を参考にした [131]。His-iRFP-mNeonGreen (5.1 μM) を様々な濃度の BV もしくは PCB と混合し、室温で 30 分間静置した。その後、等量の 2×SDS sample buffer を加えて、95°Cで 5 分間加熱し、SDS-PAGE を行った。ゲルを Zinc solution (150 mM zinc acetate (Wako, 268-01882), 150 mM Tris-HCl (pH 6.8)) に浸して 3 時間室温で振とうした。BV もしくは PCB の蛍光は、近赤外蛍光スキャナー Odyssey DLx イメージングシステム (LI-COR) で検出した。励起波長は 680 nm とした。

3.2.11 分裂酵母の細胞内での蛍光スペクトルの測定

Leica SP8 Falcon 共焦点顕微鏡のラムダスキャン機能を使って蛍光スペクトルを測定した。励起波長は 633 nm とし、650 nm から 768 nm の波長範囲において 20 nm の検出幅を 3 nm ずつスライドさせて蛍光を検出した。得られた蛍光スペクトルは最大蛍光波長で正規化した。

3.2.12 分裂酵母と出芽酵母の蛍光イメージング

酵母の観察には、sCMOS カメラ (ORCA-Fusion BT; Hamamatsu Photonics)、対物レンズ (UPLXAPO 100×, NA = 1.45, WD = 0.13 mm; or UPLXAPO 60×, NA = 1.42, WD = 0.15 mm; Olympus)、共焦点スキャナユニット (CSU-W1; Yokogawa Electric Corporation) を備えた、IX83 倒立顕微鏡 (Olympus) を使用した。mNeonGreen、mScarlet-I、iRFP (miRFP670、miRFP703 も同様) の励起レーザとして、それぞれ、488 nm、561 nm、640 nm を使用した。励起ダイクロイックミラーとして DM405/488/561/640 (Yokogawa Electric Corporation) を使用した。励起フィルターとして、mNeonGreen、mScarlet-I、iRFP (miRFP670、miRFP703 も同様) のそれぞれで 525/50、617/73、685/40 を使用した (Yokogawa Electric Corporation)。

分裂酵母のライブセルイメージングでは、CellASIC® ONIX2 マイクロ流体システム (CAX2-S0000; Millipore) を使い、Y04T 酵母用 CellASIC ONIX トラッププレートに培養液を入れて観察した。9 psi の圧力でプレート内に酵母を入れ、培地は 1 psi で灌流した。温度の管理には CellASIC ONIX2 Manifold XT (CAX2-MXT20; Millipore) を使い、32°C で培養した。培地を切り替える時は、切替後の培地を 8 psi で 15 秒間流し、その後、1 psi で灌流した。また、bPAC 発現細胞に対し青色照射で刺激する際は、LED ライト (450 nm, LED-41VIS450; OptoCode) を使用した。

多重蛍光イメージングでは、Leica SP8 Falcon 共焦点顕微鏡を使用した。対物レンズは HCPL APO CS2 100×/1.40 OIL を使用した。mTagBFP2、Turquoise2-GL、mNeonGreen、mCherry、iRFP のそれぞれの励起レーザとして、405 nm、470 nm、488 nm、560 nm、633 nm を使用した。またそれぞれ、420~450 nm、480~500 nm、500~550 nm、580~650 nm、680~780 nm の波長範囲で検出した。0.5 μm の間隔で z 方向に 10 枚撮影した。得られた画像を Lightning 機能 (Leica) を使ってデコンボリューションした。

酵母を蛍光顕微鏡で観察する場合は、遠心して集めた細胞をスライドガラス (MAS コートスライド, 76 × 26 mm, Matsunami Glass Ind., Ltd.) に載せ、カバーガラス (18 × 18 mm No.1, Matsunami Glass Ind., Ltd.) を上から被せてから観察した。

3.2.13 画像とデータの解析

画像解析では Fiji (Image J; <https://fiji.sc/>) を使った。蛍光画像のバックグラウンドは Rolling ball 法を用いて除いた。いくつかの画像では、 $0.2\ \mu\text{m}$ の間隔で z 方向に 10 ~ 30 枚程度撮影した画像を Maximal intensity projection して示した。分裂酵母や一部の出芽酵母の蛍光輝度の定量では、マニュアルで適当な Regions of interest (ROI) を設定し、その平均輝度値を測定した。出芽酵母の蛍光輝度の定量では、Stardist [139,140] を用いて mNeonGreen のシグナルで細胞を認識し、iRFP の蛍光輝度を測定した。Hta2-iRFP の定量では、iRFP のシグナルを Stardist で認識した。また、spPKA-KTR の定量では CellTK を使用した [141]。CellTK を使った C/N 比の算出では、核内と核の周囲 (細胞質) の spPKA-KTR の蛍光輝度を定量し、その比率 (細胞質の蛍光輝度/核内の蛍光輝度) を求めた。データの可視化・グラフ作製には Python を用いた。

3.2.14 FCS 解析

Leica SP8 Falcon 共焦点顕微鏡を用いて FCS 測定を行った。対物レンズは HC PL APO 63×/1.20 W motCORR CS2 (Leica) を使用した。以前と同様に [67,68]、データの解析は Leica のソフトウェアを使用した。

iRFP-mNeonGreen を発現する分裂酵母の FCS では、488 nm (mNeonGreen) と 640 nm (iRFP) の波長で励起し、Leica 高感度検出器 HyD で 500~620 nm (mNeonGreen) と 680~768 nm (iRFP) の波長範囲の蛍光を検出した。Structural parameter と Effective confocal volume の較正には、蒸留水で希釈した 500 nM Rhodamine 6G (TCI, R0039) を用いた。室温における蒸留水中での Rhodamine 6G の拡散係数は $414\ \mu\text{m}^2/\text{s}$ であることが報告されており [69]、これを参考にした。Rhodamine 6G 溶液は、561 nm の波長で励起し 580~700 nm の蛍光を検出した。本研究では、Structure parameter は 3.70、Effective confocal volume は 0.616 fL と見積もられた。iRFP-PCB と比べて iRFP-BV は蛍光強度が低かったため、iRFP-BV を測定する際は励起レーザー強度を上げた。

His-iRFP-mNeonGreen (5.1 μM) 溶液の FCS では、35 mm ガラスベースディッシュ (IWAKI) にサンプルを入れ、蛍光ビーズを混ぜた (Invitrogen, I14785)。Structure parameter は 8.57、Effective confocal volume は 1.63 fL と見積もられた。

His-iRFP-mNeonGreen の測定では、まず、488 nm の波長で励起し、Leica 高感度検出器 HyD で 500~620 nm の波長範囲の蛍光を検出し、その後、160 μM となるように

BV もしくは PCB を添加して、640 nm の波長で励起し、680~795 nm の波長範囲の蛍光を検出した。mNeonGreen から iRFP への FRET が起こることを懸念し、このように先に mNeonGreen のみ測定した後、発色団を添加し iRFP を測定した。それぞれの発色団について、2 回の独立した実験を行い、各実験で 3 回ずつ測定した。iRFP-PCB と比べて iRFP-BV は蛍光強度が低かったため、iRFP-BV を測定する際は励起レーザー強度を上げた。

蛍光輝度の変動は 30 秒間測定し、Leica FCS 解析ソフトウェアの photobleach correction algorithm を使って補正した。その後、同ソフトウェアを使って自己相関関数 $G(\tau)$ を計算、および、以下に示した 1 成分 Normal diffusion のトリプレットモデルを使いフィッティングした。Confocal volume 内の蛍光分子の数 (N) は自己相関関数の y 軸切片 $G(\tau = 0)$ と逆数の関係にある ($N = 1/G(\tau = 0)$) ため、自己相関関数から confocal volume 内の分子数が推定できる。ホロ iRFP の割合は、蛍光性 iRFP の分子数を mNeonGreen の分子数 (全ての mNeonGreen が発色団を形成していると想定している) で徐算することで推定した。

$$G(\tau) = 1 + \frac{\left(1 - T + T \exp\left(\frac{-\tau}{\tau_{triplet}}\right)\right)}{N(1 - T)} \times \left(\frac{1}{1 + \frac{\tau}{\tau_D}}\right) \left(\frac{1}{1 + \left(\frac{1}{s}\right)^2 \left(\frac{\tau}{\tau_D}\right)}\right)^{\frac{1}{2}}$$

N : 観察領域内に存在する蛍光分子の平均分子数、 T : トリプレット状態にある蛍光分子の割合、 $\tau_{triplet}$: トリプレット状態にある蛍光分子の寿命、 τ_D : 相関時間、 s : structure parameter

3.2.15 HO 様タンパク質配列の解析

代表的な菌類において HO 様タンパク質配列を持つかを BLASTp を使って調べた。ヒトの HO1 (Uniprot P09601) と出芽酵母の HMX1 (Uniprot P32339) をクエリーとした ($e\text{-value} < 1 \times 10^{-5}$)。菌類の系統関係は近年の研究を参考にした [142,143]。近年のゲノムスケールでの系統に基づき [142]、代表的な種について進化的関係をマニュアルで書いた [143]。これは現在の菌類の系統樹の一般的な見解と一致する [144]。HO1 ホモログの配列が多様化していることが示唆されたため、BLASTp でヒットした *Laccaria bicolor* と *Saitoella complicata* の HO 様タンパク質配列を使ったが、新しくヒットした配列はなかった。HO 様タンパク質を *A. nidulans* は持っておらず、*C.*

albicans を持っているという結果は、以前の研究と一致する [145,146]。 *C. elegans* についても、ヒトの HO1 と出芽酵母の HMX1 をクエリーとして WormBase (<http://www.wormbase.org>; release WS280、date 20-Dec-2020、database version WS279) の BLASTp 機能を使って HO 様タンパク質配列を探したがヒットしなかった (e-value $<1 \times 10^{-2}$)。

表 5 本研究で使用したプラスミド

Plasmid name	Description	Source	Benchling Link
pFA6a-iRFP-kan	iRFP C-terminal tagging	this study	https://benchling.com/s/seq-bkYIYdFO0LISWLRgqKf2
pFA6a-iRFP-hyg	iRFP C-terminal tagging	this study	https://benchling.com/s/seq-emc65aNbjBFYkdt8Ooib
pFA6a-iRFP-nat	iRFP C-terminal tagging	this study	https://benchling.com/s/seq-hb5KLMGZXpgTFmQN9MH5
pFA6a-iRFP-bsd	iRFP C-terminal tagging	this study	https://benchling.com/s/seq-MB0yvsIASTKHVYJnvflU
pFA6a-mNeonGreen (S.p codon optimized)-kan	mNeonGreen C-terminal tagging	this study	https://benchling.com/s/seq-r5vPvd2m4SeMm6VxVhiN
pSKI-KAN-1L-A1-M-SynPCB2.1	SynPCB2.1	this study	https://benchling.com/s/seq-iAht1qGQ6taledZRBjhy
pSKI-NAT-1L-A1-M-SynPCB2.1	SynPCB2.1	this study	https://benchling.com/s/seq-6Ds1klA3foLeFGMjNRY4
pSKI-BSD-1L-A1-M-SynPCB2.1	SynPCB2.1	this study	https://benchling.com/s/seq-t5O2P2WzKmrmtTYCcEtUk
pSKI-BLE-1L-A1-M-SynPCB2.1	SynPCB2.1	this study	https://benchling.com/s/seq-TeeZbKcTCjCZxRoCQ9ua
pSKI-BSD-1L-A1-M-SynPCB2.1-Lifeact-iRFP	pSKI-SynPCB2.1-Lifeact-iRFP	this study	https://benchling.com/s/seq-kazB0PhzppnUokAcnZBp
pSKI-BSD-1L-A1-M-SynPCB2.1-Tadh1-Padh1-NLS-iRFP-NLS-Tadh1	pSKI-SynPCB2.1-NLS-iRFP-NLS	this study	https://benchling.com/s/seq-gGVpZDolap5t4mj7bGFK
pSKI-BSD-2L-A1-M-NLS-iRFP-NLS		this study	https://benchling.com/s/seq-obPOLIX96PllBreCKNXY

pSKI-NAT-1L-A1-M-MTS-HO1		this study	https://benchling.com/s/seq-A38a1P9LQU1mhRfdWPBb
pSKI-NAT-3R-A1-M-MTS-btFnr-bFd		this study	https://benchling.com/s/seq-6MjIWH76M7373w9WG02R
pMNATZA1-MTS-PcyA		this study	https://benchling.com/s/seq-sRCmN6qpFCs6Dp5yVqzO
pSKI-KAN-1L-A1-M-MTS-HO1		this study	https://benchling.com/s/seq-U8xwbETwRXjIzmqHhQ2O
pSKI-KAN-3R-A1-M-MTS-btFnr-bFd		this study	https://benchling.com/s/seq-SuqW1exP3iAJHvnDvxeD
pNATZA15-mCherry-atb2		this study	https://benchling.com/s/seq-0XMOLayGLNMT0Jx5xFa8
pHBCA11-NLS-mTagBFP2-NLS		this study	https://benchling.com/s/seq-vsO72fejJfzTcSFPqF5X
pMBLE-3R-A1-Turquoise2-GL-ras1delN200		this study	https://benchling.com/s/seq-KXyKpinMwc3D1kstue68
pCold-TEV-linker-iRFP		this study	https://benchling.com/s/seq-2HCLXjM6wnXr2mMIa5QH
pCAGGS-iRFP-P2A-EGFP		this study	https://benchling.com/s/seq-CwGIEm2qwVg6M8Cq2fVL
pMNATZA1-iRFP		this study	https://benchling.com/s/seq-ognHEdGiwTv53g9u6Izg
pMNATZA1-miRFP670		this study	https://benchling.com/s/seq-TMYFXIJAgrnfJMU2sspa
pMNATZA1-miRFP703		this study	https://benchling.com/s/seq-KF8bwpeSBJsn4I

			AVpCRh
pMNATZA1-iRFP-spmNeonGreen		this study	https://benchling.com/s/seq-LUTpnIp22MncJeIxnja8
pX459-HO1		this study	https://benchling.com/s/seq-m8fAQ0zPMX9jXuU5dgxk
p304TEFp-NatMX-NLS-iRFP-NLS		this study	https://benchling.com/s/seq-u447ykUkwbQLuY4TcRvo
p304TEFp-NatMX-iRFP713-spmNeonGreen		this study	https://benchling.com/s/seq-IPpKiqPuh3eWk2xEx4tK
pMNATZA1-iRFP-T7		this study	https://benchling.com/s/seq-wATKwV60V3uPR9M9MsZU
pCold-TEV-linker-iRFP-spmNeonGreen		this study	https://benchling.com/s/seq-0V5iMuBheANeZFN4cmST
pMNATZA1-spPKA-KTR		this study	https://benchling.com/s/seq-HEVuRywPSzKJefrQTHoL
pMNATZA1-spPKA-KTR-T140A3-T253A		this study	https://benchling.com/s/seq-sIk8riZ2Gud8dprQcioU?m=slm-7JL8BJgORdEeJ7RHt75m
pMBSD-1L-A1-SynPCB2.1		this study	https://benchling.com/s/seq-t5O2P2WzKmrmTYCcEtUk
pHBCA21-bPAC_sp_opt		this study	https://benchling.com/s/seq-c7hwKyXTcOxHfc7NncUy

表 6 本研究で使用した分裂酵母株

Strain name	Genotype	Fig.	Source
L972	h-	Fig. 30D, 30E	NBRP
L975	h+		NBRP
L968	h90		NBRP
YG038	h- hta1-mNeonGreen-kan		this study, L972
SK186	h- hta1-mNeonGreen<<kan z::Padh1-spPKA-KTR(mScarlet-I)<<nat	Fig. 25C, 25D, 25E, 25F	this study, YG038
SK029	h+ cyl1::kan		this study, L975
SK045	h+ cgs2::bsd		this study, L975
SK077	h+ cgs1::kan		this study, L975
SK023	h- pka1::kan		this study, L972
SK188	h+ cyl1::kan z::Padh1-spPKA-KTR(mScarlet-I)<<nat	Fig. 25C, 25D, 25E, 25F	this study, SK029
SK192	h+ cgs2::bsd z::Padh1-spPKA-KTR(mScarlet-I)<<nat	Fig. 25E	this study, SK045
SK193	h+ cgs1::kan z::Padh1-spPKA-KTR(mScarlet-I)<<nat	Fig. 25E	this study, SK077
SK194	h- pka1::kan z::Padh1-spPKA-KTR(mScarlet-I)<<nat	Fig. 25E, 25F	this study, SK023
SK261	h+ cgs1::kan z::Padh1-spPKA-KTR(T140A3+T253A)<<nat	Fig. 25F	this study, SK077
SK264	h- pka1::kan z::Padh1-spPKA-KTR(T140A3+T253A)<<nat	Fig. 25F	this study, SK023
SK270	h- hta1-mNeonGreen-kan z::Padh1-spPKA-KTR(T140A3+T253A)<<nat	Fig. 25F	this study, YG038
SK276	h- 2L::Padh1-NLS-iRFP-NLS<<bsd	Fig. 26A, 26B, 26C, Fig. 27B, 27C, 27D, Fig. 28B, 28C, 28G, Fig. 31F, 31H, Fig. 32B, 32C	this study, L972
SK277	h+ 2L::Padh1-NLS-iRFP-NLS<<bsd		this study, L975
SK284	h- 2L::Padh1-NLS-iRFP-NLS<<bsd 1L::Padh1-HO1<<nat	Fig. 27B, Fig. 28B, 28C, 28G, Fig.	this study, SK276

		31G, 31I	
SK285	h+ 2L::Padh1-NLS-iRFP-NLS<<bsd 3R::Padh1-btFnr-bFd<<nat	Fig. 27B	this study, SK277
SK287	h+ 2L::Padh1-NLS-iRFP-NLS<<bsd z::Padh1-PcyA<<nat	Fig. 27B	this study, SK277
SK294	h- 2L::Padh1-NLS-iRFP-NLS<<bsd 1L::Padh1-HO1<<nat 3R::Padh1-btFnr-bFd<<kan	Fig. 27B	this study, SK284
SK296	h+ 2L::Padh1-NLS-iRFP-NLS<<bsd z::Padh1-PcyA<<nat 1L::Padh1-HO1<<kan	Fig. 27B	this study, SK287
SK295	h+ 2L::Padh1-NLS-iRFP-NLS<<bsd z::Padh1-PcyA<<nat 3R::Padh1-btFnr-bFd<<kan	Fig. 27B	this study, SK287
SK305	h+ 2L::Padh1-NLS-iRFP-NLS<<bsd 1L::Padh1-HO1<<nat 3R::Padh1-btFnr-bFd<<kan z::Padh1-PcyA<<nat	Fig. 27B, Fig. 28G, Fig. 31G, 31I	this study, SK294 × SK295
SK282	h- 2L::Padh1-NLS-iRFP-NLS<<bsd 1L::Padh1-SynPCB2.1<<kan	Fig. 28G, Fig. 31G, 31I, Fig. 32B, 32C	this study, SK276
SK408	h- 1L::Padh1-MTS-HO1<<kan		this study, L972
YG658	h- 1L::Padh1-SynPCB2.1<<bsd		this study, L972
SK409	h- z::Padh1-iRFP-spmNeonGreen<<nat	Fig. 30A, 30B, 30C, Fig. 31C	this study, L972
SK410	h- 1L::Padh1-SynPCB2.1<<bsd z::Padh1-iRFP-spmNeonGreen<<nat	Fig. 30A, 30B, 30C, Fig. 31B, 31C	this study, YG658
SK417	h- 1L::Padh1-MTS-HO1<<kan z::Padh1-iRFP-spmNeonGreen<<nat	Fig. 30A, 30B, 30C, Fig. 31C	this study, SK408
SK428	h- z::Padh1-iRFP-T7<<nat	Fig. 30D, 30E	this study, L972
SK429	h- 1L::Padh1-MTS-HO1<<kan z::Padh1-iRFP-T7<<nat	Fig. 30D, 30E	this study, SK408
SK437	h- 1L::Padh1-SynPCB2.1<<bsd z::Padh1-iRFP-T7<<nat	Fig. 30D, 30E	this study, YG658
YG503	h- 1L::Padh1-SynPCB2.1<<kan	Fig. 32B, 32C	this study, L972
YG1074	h- 1L::Padh1-SynPCB2.1<<bsd cdc2-iRFP<<kan	Fig. 33B	this study, YG658
YG1096	h- 1L::Padh1-SynPCB2.1<<bsd rpb9-iRFP<<kan	Fig. 33B	this study, YG658
YG1095	h- 1L::Padh1-SynPCB2.1<<bsd rpa49-iRFP<<kan	Fig. 33B	this study, YG658
YG1085	h- 1L::Padh1-SynPCB2.1<<bsd swi6-iRFP<<kan	Fig. 33B	this study, YG658

YG1093	h- 1L::Padh1-SynPCB2.1<<bsd pds5-iRFP<<kan	Fig. 33B	this study, YG658
YG1083	h- 1L::Padh1-SynPCB2.1<<bsd cut11-iRFP<<kan	Fig. 33B	this study, YG658
YG1094	h- 1L::Padh1-SynPCB2.1<<bsd mal3-iRFP<<kan	Fig. 33B	this study, YG658
YG1084	h- 1L::Padh1-SynPCB2.1<<bsd sfi1-iRFP<<kan	Fig. 33B	this study, YG658
YG1086	h- 1L::Padh1-SynPCB2.1<<bsd cox4-iRFP<<kan	Fig. 33B	this study, YG658
YG1092	h- 1L::Padh1-SynPCB2.1<<bsd cnx1-iRFP<<kan	Fig. 33B	this study, YG658
SK323	h- 1L::Padh1-SynPCB2.1-Lifeact-iRFP<<bsd	Fig. 34A	this study, L972
YG1082	h- 1L::Padh1-SynPCB2.1-Tadh1-Padh1-NLS-iRFP-NLS-Tadh1<<bsd	Fig. 34B	this study, L972
SK356	h- 3R::Padh1-Turquoise2-GL-ras1delN200<<ble		this study, L972
YG1114	h- 3R::Padh1-Turquoise2-GL-ras1delN200<<ble mis12-spmNeonGreen<<kan 1L::Padh1-SynPCB2.1-Lifeact-iRFP<<bsd		this study, SK356
YG1124	h- 3R::Padh1-Turquoise2-GL-ras1delN200<<ble mis12-spmNeonGreen<<kan 1L::Padh1-SynPCB2.1-Lifeact-iRFP<<bsd z::Padh15-mCherry-atb2<<nat		this study, YG1114
YG1127	h- 3R::Padh1-Turquoise2-GL-ras1delN200<<ble mis12-spmNeonGreen<<kan 1L::Padh1-SynPCB2.1-Lifeact-iRFP<<bsd z::Padh15-mCherry-atb2<<nat c::Padh11-NLS-mTagBFP2-NLS<<hyg	Fig. 34C	this study, YG1124
SK402	h- z::Padh1-iRFP<<nat	Fig. 35	this study, L972
SK403	h- z::Padh1-miRFP670<<nat	Fig. 35	this study, L972
SK404	h- z::Padh1-miRFP703<<nat	Fig. 35	this study, L972
YG509	h- 1L::Padh1-SynPCB2.1<<bsd		this study, L972
SK210	h- 1L::Padh1-SynPCB2.1<<bsd c::Padh21-bPAC_sp_opt<<hyg		this study, YG509
SK211	h+ cyr1::kan z::Padh1-spPKA-KTR(mScarlet-I)<<nat 2L::Padh1-NLS-iRFP-NLS<<bsd		this study, SK188
SK230	h+ 1L::Padh1-SynPCB2.1<<bsd c::Padh21-bPAC_sp_opt<<hyg cyr1::kan z::Padh1-spPKA-KTR(mScarlet-I)<<nat 2L::Padh1-NLS-iRFP-NLS<<bsd	Fig. 37B, 37C	this study, SK210×SK211

SK248	h90 hta1-mNeonGreen<<kan		this study, L968
SK249	h90 hta1-mNeonGreen<<kan z::Padh1-spPKA-KTR(mScarlet-I)<<nat	Fig. 37D	this study, SK248
SK298	h90 hta1-mNeonGreen<<kan z::Padh1-spPKA-KTR(T140A3+T253A)<<nat	Fig. 37D	this study, SK248

* 株名が「SK」から始まるものは著者が、「YG」から始まるものは同研究室の後藤祐平助教が作製した。

表 7 本研究で使用した出芽酵母株

Strain name	Genotype	Fig.	Source
BY4741	MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0		Y. Kamada Lab
SK418	MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 TRP1::TEFp-NLS-iRFP-NLS<<nat (p304)	Fig. 36A, 36B	this study, BY4741
SK411	MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 hmx1::kan		this study, BY4741
SK436	MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 hmx1::kan TRP1::TEFp-NLS-iRFP-NLS<<nat (p304)	Fig. 36A, 36B	this study, SK411
SK482	MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 TRP1::TEFp-iRFP713-spmNeonGreen<<nat (p304)	Fig. 36C, 36D	this study, BY4741
SK483	MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 hmx1::kan TRP1::TEFp-iRFP713-spmNeonGreen<<nat (p304)	Fig. 36C, 36D	this study, SK411
SK484	MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 hta2-iRFP<<kan	Fig. 36E, 36F	this study, BY4741

3.3 結果

3.3.1 分裂酵母の PKA 活性を可視化するバイオセンサーの開発

分裂酵母の cAMP-PKA 経路の活性動態を測定するため、PKA 活性を可視化するバイオセンサーを開発した。分裂酵母では PKA 活性の低下に応じて細胞質から核内へ局在移行する転写因子 Rst2 が知られており [48,50]、Rst2 の局在変化を利用して、PKA の活性を測定することができるのではないかと考えた (図 25A)。その際、バイオセンサーの発現が転写制御へ影響を与えないようにするため、Rst2 の転写活性化ドメイン (Zinc finger C2H2 type domain, アミノ酸残基 98~128) を除き、残りの C 末側の部位 (アミノ酸残基 131~567) に赤色蛍光タンパク質 mScarlet-I を連結し、これを spPKA-KTR と命名した (図 25B)。まず、spPKA-KTR が PKA の活性化に応じて局在変化を示すかを調べた。分裂酵母ではグルコース刺激によって PKA が活性化することが知られている [40]。そこで、spPKA-KTR を発現する分裂酵母をグリセロールを炭素源とする培地で培養後に、グルコース含有培地に移すことでグルコース刺激を行った。その結果、spPKA-KTR はグルコース刺激後に核内から細胞質へと移行し、つまり、PKA の活性化に応じた局在変化が観察された (図 25C)。この局在変化は刺激から数分以内に起き、かつ可逆的であった (図 25D)。また PKA の活性化には cAMP が必要であり [147]、adenylate cyclase をコードする遺伝子 *cyr1* を欠失するとグルコース刺激時の局在の変化は見られなかった (図 25C,D)。同様に、PKA の catalytic subunit をコードする遺伝子 *pkal* を破壊すると、野生株と比較して C/N 比 (cytoplasmic/nuclear ratio, 細胞質と核内の spPKA-KTR の蛍光輝度の比率) が低下した (図 25E)。逆に、PKA の regulatory subunit (*cgs1*) と phosphodiesterase (*cgs2*) をコードする遺伝子 [41] を破壊すると C/N 比が上昇した (図 25E)。さらに、Rst2 中の PKA によるリン酸化残基 (T140 と T253) と T140 の前後の PKA によってリン酸化される可能性があるアミノ酸残基 (S139 と T141) (図 25B) [50] をアラニンへ置換した spPKA-KTR 変異体 (T140A3+T253A) を作製した。この変異体を発現する細胞では、グルコース存在下であっても C/N 比が低いままであった (図 25F)。よって、spPKA-KTR の局在の変化は PKA からの直接的なリン酸化によって起こることが示唆された。このように、spPKA-KTR は PKA の活性化に応じて局在を変化させるため、本バイオセ

ンサーを用いることで PKA の活性動態を 1 細胞レベルで高い時間解像度で定量することができると考えられた。

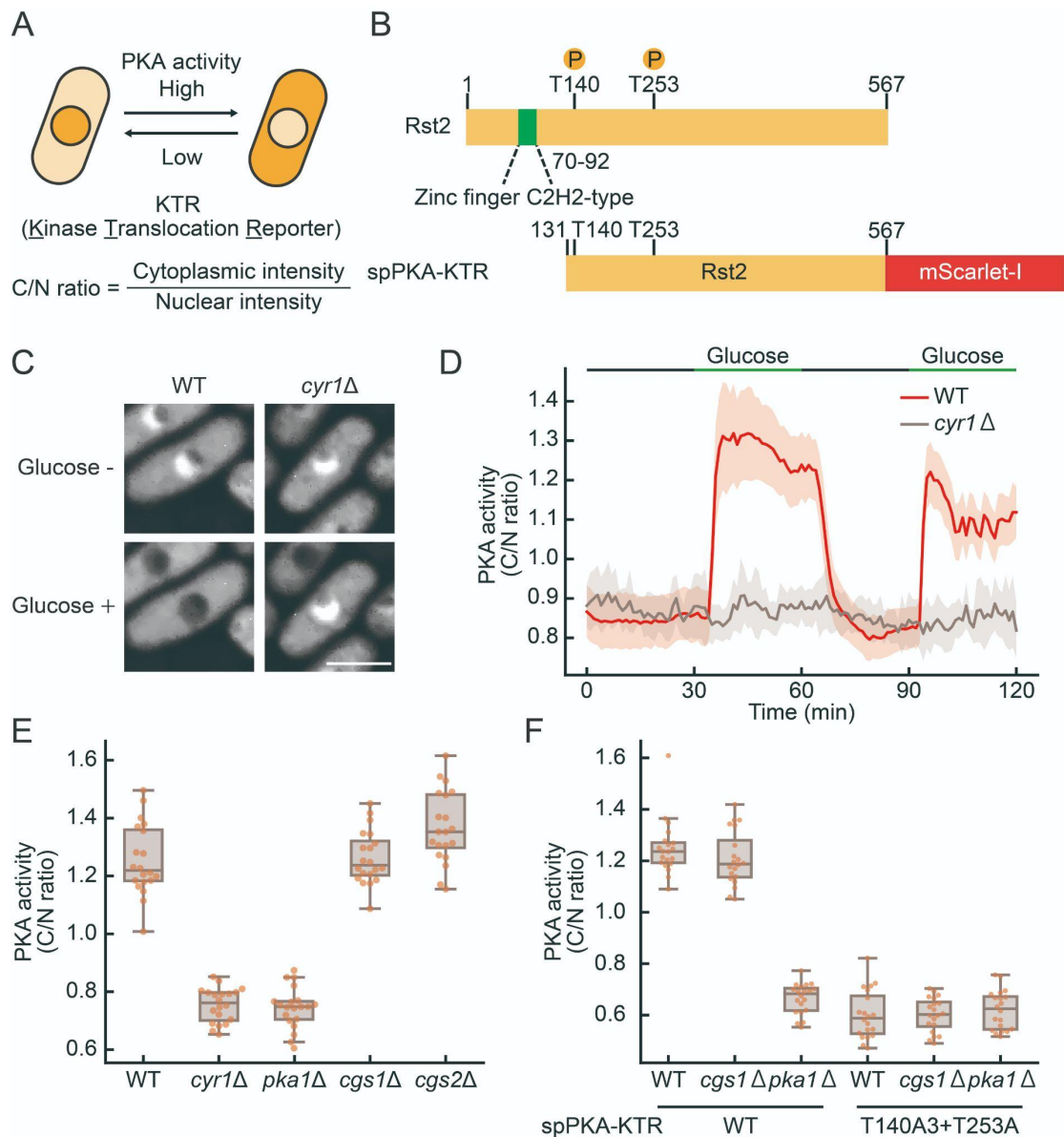


図 25 分裂酵母の PKA 活性を可視化するバイオセンサー spPKA-KTR の開発

(A) PKA の KTR 型バイオセンサーの模式図。PKA 活性依存的に核内と細胞質を局在変化するタンパク質をベースとしたバイオセンサーを開発した。バイオセンサーの細胞質/核内の蛍光輝度の比 (C/N ratio) を算出することで、PKA 活性を見積もることができる。(B) Rst2 とそれを用いた PKA センサー (spPKA-KTR) の構造。Rst2 は PKA 活性依存的に核内と細胞質を局在変化する転写因子であり、N 末側に転写活性化ドメイン (Zinc finger C2H2-type domain)、また PKA によってリン酸化される 2 箇所のアミノ酸残基 (T140, T253) を持つ。spPKA-KTR は Rst2 の Zinc finger C2H2-type domain を削った、C 末側の部位 (アミノ酸残基 131~567) に赤色蛍光タンパク質

mScarlet-I を連結している。(C) WT と *cyr1* Δ の分裂酵母の細胞内における spPKA-KTR の局在の観察。マイクロ流体システム ONIX を使い、細胞を YEA+Glycerol 培地 (Glucose -) で 16 時間程度培養した後に観察を開始した。YEA 培地 (2% Glucose) に変えてから 9 分後の画像を示した (Glucose +)。スケールバー : 5 μ m。(D) spPKA-KTR を使った細胞内 PKA 活性の定量。マイクロ流体システム ONIX で WT と *cyr1* Δ の分裂酵母株を YEA+Glycerol 培地で 16 時間程度培養した後に、YEA 培地 (2% Glucose、Glucose (緑線)) と YEA+Glycerol 培地 (黒線) を 30 分毎に切り替え、spPKA-KTR の局在を観察した。細胞質と核内における spPKA-KTR の蛍光輝度値を定量し、その蛍光輝度の比 (C/N 比) を算出することで PKA 活性を見積もった。グラフは平均値と標準偏差を示している。WT : n = 67、*cyr1* Δ : n = 10。(E) cAMP-PKA 経路に関わる遺伝子破壊株における PKA 活性の定量。spPKA-KTR を発現する野生株 (WT)、*cyr1* Δ 株、*pkal* Δ 株、*cgs1* Δ 株、*cgs2* Δ 株を YEA 培地で培養後、spPKA-KTR の局在を顕微鏡で観察し、C/N 比を算出した。グラフのそれぞれの点は 1 細胞毎の PKA 活性を示している。また、箱ひげ図では、中央の線が中央値を、”箱”が四分位範囲を、”ひげ”が最小値と最大値を示している。四分位範囲の 1.5 倍よりも外れた値は外れ値とした。それぞれ 20 細胞ずつ定量した。(F) spPKA-KTR 中の PKA リン酸化残基のアラニン変異体の検討。spPKA-KTR もしくは変異体 (T140A3+T253A) を発現する野生株 (WT)、*cgs1* Δ 株、*pkal* Δ 株を YEA 培地で培養後、それらの局在を顕微鏡で観察し、C/N 比を算出した。グラフのそれぞれの点は 1 細胞毎の C/N 比を示している。また、箱ひげ図では、中央の線が中央値を、”箱”が四分位範囲を、”ひげ”が最小値と最大値を示している。四分位範囲の 1.5 倍よりも外れた値は外れ値とした。それぞれ 20 細胞ずつ定量した。

3.3.2 iRFP は分裂酵母の細胞内で蛍光を発しない

前述の通り開発した spPKA-KTR に加え、光遺伝学 bacterial photoactivated adenylate cyclase (bPAC) を用いることで [107]、PKA 活性を 1 細胞レベルで可視化・操作できると考えた。PKA の操作までできれば、観察された PKA の活性動態が発芽を誘導するために十分であるかまで検証することができる。bPAC は青色光照射によって活性化する adenylate cyclase であり、cAMP の合成を誘導することで PKA を活性化することができると考えた。しかし、spPKA-KTR (赤色光)、bPAC (青色光) に加えて、spPKA-KTR の局在を判別するための核局在マーカーも同時に別の蛍光波長で観察する必要があった。そこで、近赤外蛍光タンパク質 iRFP に NLS を 2 つ付加し (NLS-iRFP-NLS) [148]、核の局在を観察することを試みた。予期しないことに、分裂酵母の細胞内では iRFP が蛍光を発しないことを発見した (図 26A)。これまでに iRFP は哺乳類細胞や出芽酵母で幅広く利用されているものの [110–115]、分裂酵母での報告例はなかった。そこで以降 (~3.3.8 まで) では、分裂酵母における PKA 活性の可視化と操作の確立に向けて、初めに iRFP の可視化法の検討を行った結果について記述する。また、その過程で発見した iRFP の高輝度化現象、および他生物への応用についても記述する。

iRFP が蛍光を発するには、発色団としてビリベルジン (BV) を必要とする (図 24)。分裂酵母では BV を合成できないために iRFP が蛍光を発しないと考えられた。そこで BV を培地中に添加したところ、BV が細胞内に取り込まれ、核と思われる場所で iRFP の蛍光が観察された (図 26A)。この iRFP 蛍光は添加する BV の濃度依存的 (125 μ M まで) に増加した (図 26B)。また、500 μ M という高濃度の BV 存在下で、iRFP 蛍光が 24 時間程度かけて徐々に増加した (図 26C)。また、細胞内において BV はヘムを前駆体としてヘムオキシゲナーゼ (HO) によって合成される。同研究室の近藤 洋平助教と協力し、分裂酵母を含む代表的な菌類のゲノムから HO 様タンパク質をコードする遺伝子を探したところ、予想通り、分裂酵母では該当する遺伝子は見つからなかった (図 26D)。また分裂酵母以外の菌類でも散発的に HO を失っていた (図 26D)。以上より、分裂酵母は HO を欠失していることで、BV を細胞内で合成できず、iRFP は蛍光を発しないと結論づけた。

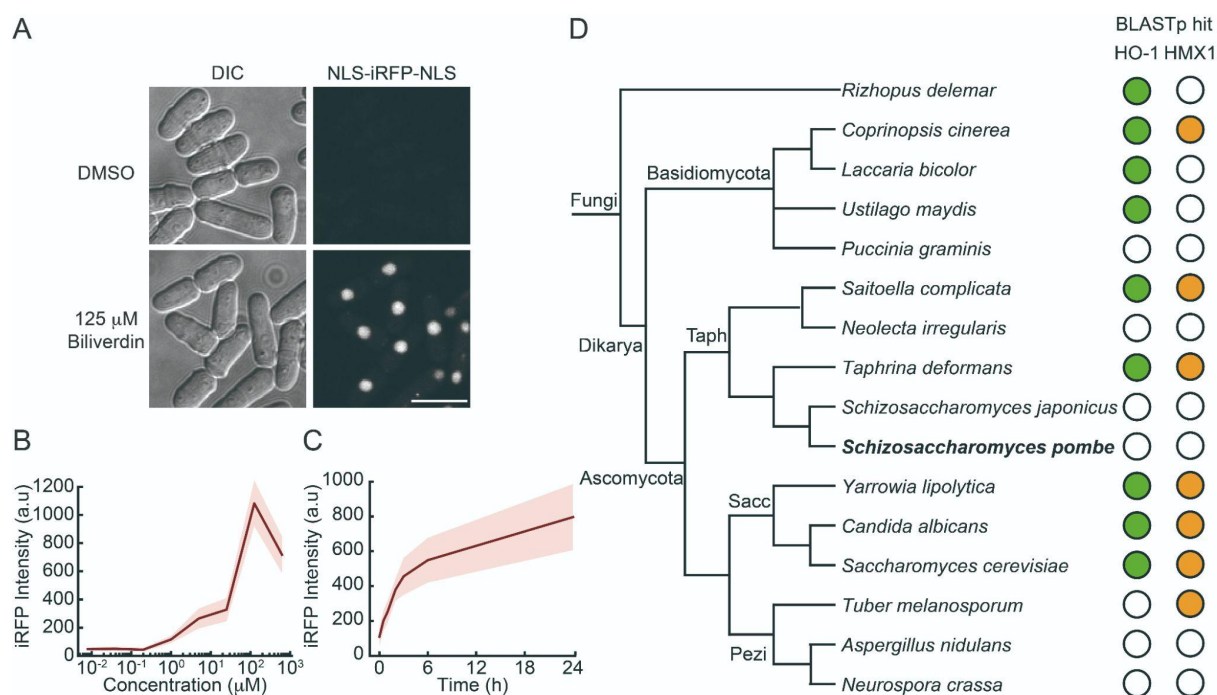


図 26 分裂酵母の細胞内では iRFP は蛍光を発しない

(A) NLS-iRFP-NLS を発現する分裂酵母の代表的な画像。BV 添加と非添加 (DMSO) で比較した。スケールバー：10 μm。(B) BV の添加濃度に対する iRFP 蛍光輝度値の用量-反応 (Dose-response)。NLS-iRFP-NLS を発現する分裂酵母を YEA 培地で培養後、BV (8 nM、40 nM、200 nM、1 μM、5 μM、25 μM、125 μM、625 μM) を添加し 3 時間室温で静置し観察した。グラフは平均値と標準偏差を示している。それぞれ 50 細胞ずつ定量した。625 μM の BV 添加時に iRFP 蛍光が低下しているのは、過剰な DMSO による毒性や細胞死が原因だと考えられる。(C) BV 添加時の iRFP 蛍光輝度値の経時変化。NLS-iRFP-NLS を発現する分裂酵母を BV を 500 μM 添加した YEA 培地で 32°C で振とう培養し、各タイムポイント (0.5 h、1 h、2 h、3 h、6 h、24 h) で細胞を回収して観察した。グラフは平均値と標準偏差を示している。それぞれ 50 細胞ずつ定量した。(D) 代表的な菌類における HO 様タンパク質配列の探索。Taph : Taphrinomycotina、Sacc : Saccharomycotina、Pezi : Pezizomycotina。ヒト HO タンパク質 (HO1) をクエリーとして BLASTp (e-value<1×10⁻⁵) でヒットしたものを緑の丸で示した。また、同様に出芽酵母 HO タンパク質 (HMX1) をクエリーとしてヒットしたものをオレンジの丸で示した。

3.3.3 分裂酵母の細胞内で PCB が iRFP を高輝度化する

BV を培地中に添加すれば分裂酵母内で iRFP が蛍光を発するものの、高濃度で BV を添加すると (図 26B,C)、中には死んでしまった細胞も見られ、BV に毒性があることがわかった。そこで、iRFP を観察する別のアプローチとして、BV 合成に必要な遺伝子を染色体上に組み込み、細胞内で BV 合成を誘導することを考えた。BV の合成では、ヘムのテトラピロール構造を線状化する反応を触媒する HO が不可欠な酵素である (図 27A)。そこで、pSKI プラスミドベクター (図 7) を用いて分裂酵母の細胞内で HO と NLS-iRFP-NLS を安定的に発現させて iRFP 蛍光輝度を定量した。BV の前駆体であるヘムがミトコンドリアに豊富に存在するため、好熱性シアノバクテリア (*Thermosynechococcus elongatus* BP-1 株) 由来の HO1 をミトコンドリアで発現させた。HO1 発現株では培地中への BV 添加と比較して高い蛍光輝度が観察された (図 27B, 2 列目と 3 列目の比較)。また、HO1 がヘムを BV へ変換するには還元型 Fd が必要であることが知られている [149]。そこで、好熱性シアノバクテリア (*T. elongatus*) 由来の Fd (別名 PetF1) と Fd を還元する Fnr (別名 PetH) の一部を連結したキメラタンパク質 tFnr-Fd を HO1 と共発現させた [132]。tFnr-Fd を共発現させることで HO1 のみを発現させた時よりも高い蛍光輝度が観察されると予想したが、iRFP 蛍光輝度は変化しなかった (図 27B, 3 列目と 6 列目の比較)。よって、分裂酵母では内在性の Fd で十分に HO1 による BV 合成が進行することが示唆された。

iRFP から派生した近赤外蛍光タンパク質では、フィコシアノビルリン (PCB) の存在下で BV 存在下より蛍光輝度が高いことが *in vitro* の解析で報告されていた [150]。そこで、分裂酵母の細胞内で PCB によって iRFP が明るくなるのかを検討した。BV を PCB へ変換する酵素である好熱性シアノバクテリア (*T. elongatus*) 由来の PcyA を HO1 および tFnr-Fd と共にミトコンドリアで発現させると、HO1 のみを発現する細胞と比べて iRFP の蛍光輝度が高かった (図 27B, 3 列目と 9 列目の比較)。さらに、PCB を培地中に添加すると、BV 添加と比較して高い iRFP の蛍光輝度が観察された (図 27C,D)。BV 結合型の iRFP (iRFP-BV) と PCB 結合型の iRFP (iRFP-PCB) では蛍光輝度に大きな差があるものの、用量-反応 (Dose-response) (図 26B, 図 27C) と発色団の細胞内への取り込み (図 26C, 図 27D) は同様の傾向を示した。このように、分裂酵母では PCB によって iRFP が高輝度化することが明らかになった。

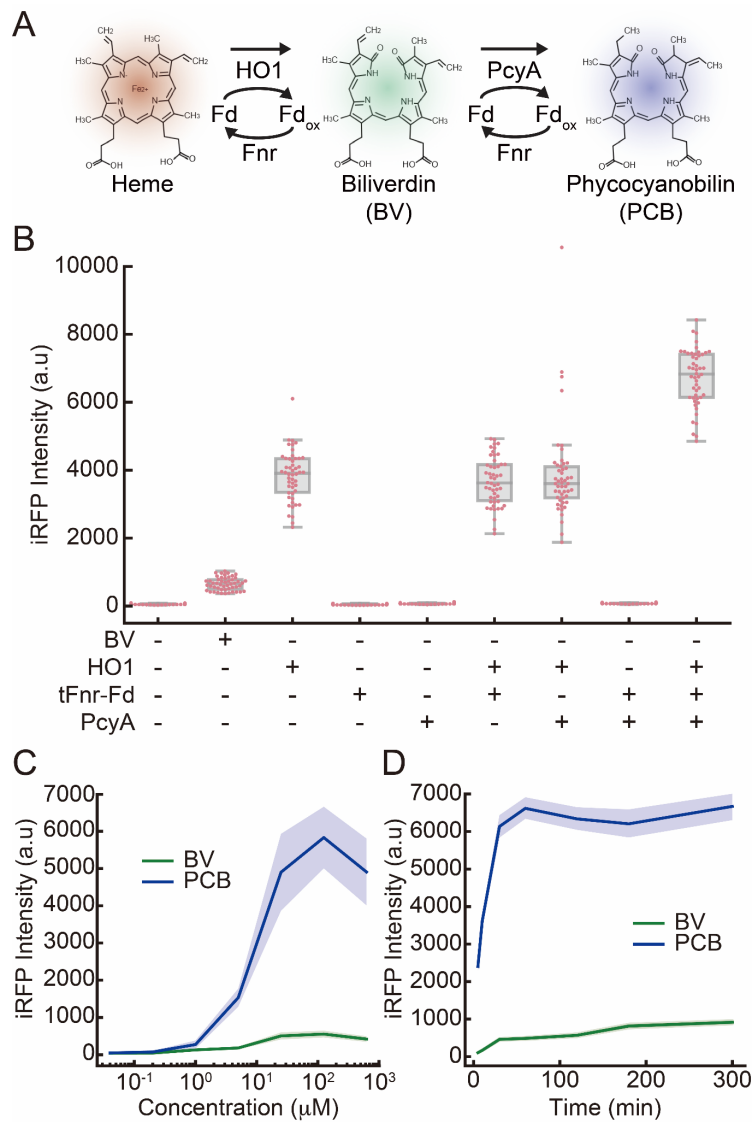


図 27 分裂酵母内において PCB は BV よりも iRFP を明るくする

(A) PCB 生合成経路の模式図。HO1 : ヘムオキシゲナーゼ、PcyA : PCB:フェレドキシン オキシドレダクターゼ、Fd : フェレドキシン、Fd_{ox} : 酸化型フェレドキシン、Fnr : フェレドキシン-NADP⁺ レダクターゼ (B) NLS-iRFP-NLS を発現する分裂酵母における iRFP 蛍光輝度値の定量。同一の細胞内で PCB 合成系遺伝子 (HO1、tFnr-Fd、PcyA) も発現させた。BV 添加条件では、125 μM の BV を添加してから室温で 1 時間静置後に観察した。それぞれの点は 1 細胞毎の iRFP 蛍光輝度値を示している。また、箱ひげ図では、中央の線が中央値を、“箱”が四分位範囲を、“ひげ”が最小値と最大値を示している。四分位範囲の 1.5 倍よりも外れた値は外れ値とした。それぞれ 50 細胞ずつ定量した。(C) BV もしくは PCB の添加濃度に対する iRFP 蛍光輝度値の用量-反応 (Dose-response)。NLS-iRFP-NLS を発現する分裂酵母を YEA 培地で培養

後、BVもしくはPCB (8 nM、40 nM、200 nM、1 μ M、5 μ M、25 μ M、125 μ M、625 μ M) を添加し3時間室温で静置し観察した。グラフは平均値と標準偏差を示している。それぞれ50細胞ずつ定量した。625 μ MのBVもしくはPCB添加時にiRFP蛍光が低下しているのは、過剰なDMSOによる毒性や細胞死が原因だと考えられる。

(D) BVもしくはPCB添加時のiRFP蛍光輝度値の経時変化。NLS-iRFP-NLSを発現する分裂酵母をYEA培地で培養後、BVもしくはPCBを125 μ M添加して観察を始めた。グラフは平均値と標準偏差を示している。それぞれ50細胞ずつ定量した。

3.3.4 PCBはBVと比較してiRFPの効率的な発色団として機能する

前述した結果は、PCBはBVよりもiRFPの発色団として適する可能性を示している。それでは、なぜPCBがBVよりもiRFPを明るくするのか、その理由を検討した。まず、発色団と結合したiRFP(ホロ iRFP)の形成効率がBVとPCBとで違うことで、iRFP蛍光輝度に差が生まれるのかについて調べた。そこで、HO1を発現する細胞にPCBを添加する実験を行った。HO1発現細胞ではBVが細胞内で合成されているため、PCBの添加前に既にiRFPはBVとの複合体を形成していると考えられる(図28A)。仮に、HO1発現細胞で全てのiRFPがBVと結合しているのであれば、PCBを培地中に添加しても、細胞内でPCBがiRFPとの複合体を作れず、HO1を発現しない細胞と比較してPCB添加時のiRFP蛍光輝度の上昇が緩和されることが予想された。予想した通り、HO1を発現しない細胞ではPCBの濃度依存的にiRFPの蛍光輝度の上昇が見られるものの、HO1発現細胞ではPCBを添加してもほとんどiRFPの蛍光輝度の上昇は見られなかった(図28B,C)。よって、HO1発現細胞ではほとんど全てのiRFPがBVと複合体を形成していることが明らかとなり、つまり、発色団のiRFPへの結合効率の違いがiRFP蛍光輝度の差を生み出している訳ではないと考えられた。

iRFP-PCBがiRFP-BVよりも明るくなる理由をさらに調べるため、*in vitro*での解析を行った。発色団と結合していないiRFP(アポ iRFP)を大腸菌から発現・精製し[110](図29A)、PCBもしくはBVと混合してホロ iRFP(iRFP-PCBもしくはiRFP-BV)を得た(図29B)。まず、iRFP-PCBとiRFP-BVの吸収スペクトル、励起スペクトル、蛍光スペクトルを測定した。本研究で使用したiRFPの励起波長(640 nm)や顕微鏡の蛍光フィルター条件(665~705 nm)において、iRFP-PCBの方が励起されやすい、検出されやすいなどがあれば、PCBによるiRFPの高輝度化の一つの要因となり得る。PCBがiRFPに結合するとiRFPおよびPCB溶液と比べて吸収スペクトルが変化し(図28D)、iRFP-PCBが形成されていることを確認した。iRFP-PCBの最大吸収波長はiRFP-BVと比較して10 nm程度短波長側へシフトした(図28E)。同様に、蛍光スペクトルと励起スペクトルについてもiRFP-PCBではiRFP-BVと比較して10 nm程度短波長側へシフトした(図29C)。iRFP-PCBの励起・吸収スペクトルが短波長側へシフトすることでiRFP-BVよりも640 nmの励起波長で効率的に励起され、

また、蛍光スペクトルが短波長側へシフトすることで今回の蛍光フィルター条件 (665~705 nm) では検出されやすくなる。よって、iRFP-PCB と iRFP-BV の吸収スペクトル、励起スペクトル、蛍光スペクトルの違いが iRFP 高輝度化の一つの要因であると考えられた。次に、蛍光タンパク質の明るさに関わる 2 つのパラメーターである蛍光量子収率 (Φ) とモル吸光係数 (ϵ) を測定した。蛍光量子収率は、蛍光タンパク質に吸収された光子の数に対し、どのくらいの効率で蛍光によって光子が放出されるのかを示す値であり、最大効率は 1 となる。モル吸光係数は、蛍光タンパク質が特定波長において吸収する光量であり、光路 1 cm あたりの 1 M タンパク質溶液で規格化される値である ($\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$)。蛍光量子収率 (Φ) は iRFP-PCB で iRFP-BV と比較して 2 倍程度高かったが (0.094 vs 0.054)、モル吸光係数 (ϵ) は両者で大きく変化しなかった (図 28F)。今回測定した iRFP-PCB と iRFP-BV の蛍光量子収率、モル吸光係数の値は過去の報告と概ね一致していた [150]。したがって、iRFP-PCB の蛍光量子収率の上昇も iRFP 高輝度化の一つの要因であると考えられた。

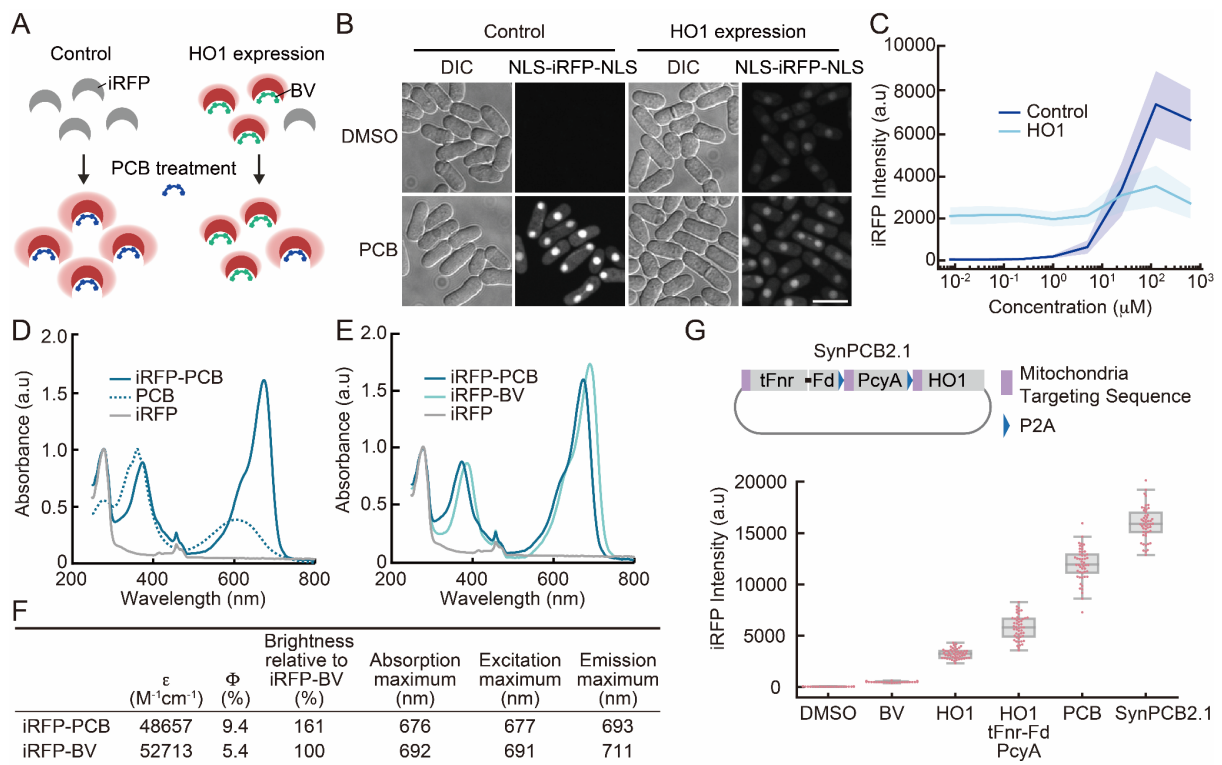


図 28 PCB は BV よりも明るい発色団として機能する

(A) B と C の実験手順の模式図。コントロール (野生株) では PCB を添加すると細胞内で iRFP が蛍光を発する。HO1 発現株では細胞内で BV が合成され、PCB を添加する前から iRFP が BV と複合体を形成する。そのため、PCB を添加しても iRFP と結合できず、結果として蛍光輝度の増加がコントロールほど見られないと考えられる。(B) NLS-iRFP-NLS を発現する分裂酵母の代表的な画像。125 μ M PCB 添加と非添加 (DMSO) で比較した。スケールバー: 10 μ m。(C) PCB の添加濃度に対する iRFP 蛍光輝度値の用量-反応 (Dose-response)。NLS-iRFP-NLS を発現する分裂酵母を YEA 培地で培養後、PCB (8 nM、40 nM、200 nM、1 μ M、5 μ M、25 μ M、125 μ M、625 μ M) を添加し 1 時間室温で静置し観察した。グラフは平均値と標準偏差を示している。それぞれ 50 細胞ずつ定量した。(D) iRFP-PCB、PCB 溶液、iRFP の正規化した吸収スペクトル。まず、iRFP-PCB と iRFP のスペクトルを 280 nm (タンパク質の吸収) で正規化した。その後、PCB 溶液のスペクトルを 375 nm で正規化した。(E) iRFP-PCB、iRFP-BV、iRFP の正規化した吸収スペクトル。全てのスペクトルは 280 nm (タンパク質の吸収) で正規化した。また、D と E では、分光計の問題により全てのスペクトルにおいて 450 nm 付近にピークが見える。D と E はそれぞれ 2 回実験を

行った。(F) *in vitro* における iRFP-PCB と iRFP-BV の蛍光特性。ε：モル吸光係数、Φ：蛍光量子収率。(G) (上) SynPCB2.1 プラスミドの模式図。N 末端にミトコンドリア局在化配列 (MTS) が付加された tFnr-Fd、PcyA、HO1 を発現し、それぞれ自己切断配列である P2A で区切られている。(下) 各細胞株と条件における iRFP 蛍光輝度の定量。BV と PCB はそれぞれ 125 μM BV もしくは PCB を添加して 1 時間室温で静置してから観察した。それぞれの点は 1 細胞毎の iRFP 蛍光輝度値を示している。また、箱ひげ図では、中央の線が中央値を、“箱”が四分位範囲を、“ひげ”が最小値と最大値を示している。四分位範囲の 1.5 倍よりも外れた値は外れ値とした。それぞれ 50 細胞ずつ定量した。

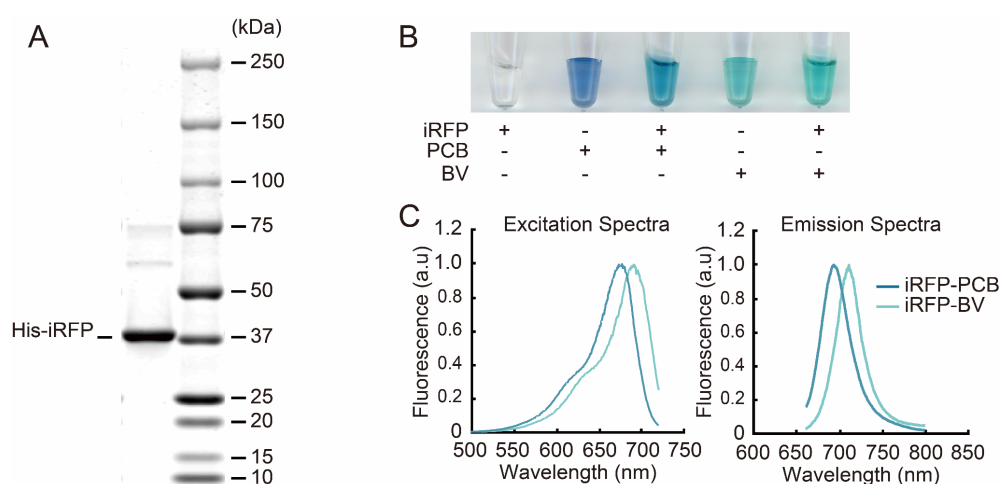


図 29 *in vitro* で PCB は iRFP に結合する

(A) 精製したリコンビナント His-iRFP (39 kDa) の CBB 染色画像。(B) 左から順に、精製した His-iRFP、PCB 溶液、iRFP-PCB、BV 溶液、iRFP-BV の画像。iRFP-PCB と iRFP-BV については、結合しなかった PCB および BV をサイズ排除クロマトグラフィーで除いた。(C) iRFP-PCB と iRFP-BV の励起スペクトル (左) と蛍光スペクトル (右)。蛍光輝度は最大値が 1 となるように正規化している。

3.3.5 PCB 合成システム (SynPCB2.1) を用いた iRFP の観察

分裂酵母において PCB を発色団として iRFP を簡便に観察するため、PCB 合成システムである SynPCB2.1 を細胞へ導入した。SynPCB2.1 は、ミトコンドリア局在化配列 (mitochondrial targeting sequences, MTS) が N 末に付加された、*tFnr-Fd*、*PcyA*、*HO1* の遺伝子から成り、これら遺伝子がタンデムに連結されており、また、ポリシストロニックに発現されるよう自己切断のための P2A ペプチド配列で区切られている [132] (図 28G)。NLS-iRFP-NLS を発現する細胞へ SynPCB2.1 を pSKI プラスミドを用いてノックインし、iRFP 蛍光輝度を観察した。その結果、SynPCB2.1 発現細胞では、PCB の培地中への添加もしくは PCB 合成系の遺伝子を別々に発現させた時と比較して、高い iRFP の蛍光輝度を示した (図 28G, 4 列目と 5 列目と 6 列目の比較)。また、いずれの株および条件においても iRFP の発現量に違いは見られなかった (図 30)。この結果は、分裂酵母において iRFP の発色団との結合はタンパク質の安定性にはほとんど影響を与えないことを示している。

分裂酵母内でどの程度の iRFP が PCB もしくは BV と複合体を形成しているかを調べるため、蛍光相関分光法 (FCS) によって蛍光性の iRFP の分子数を定量した。FCS では、共焦点顕微鏡の観察領域 (~1 fL) における蛍光分子の揺らぎを測定することで、観察領域中の蛍光分子の数や拡散係数を推定できる [151–153]。そこで、mNeonGreen を連結した iRFP (iRFP-mNeonGreen) を発現させた分裂酵母に対し、発色団 (PCB もしくは BV) の添加、もしくは発色団の合成系 (SynPCB2.1 もしくは HO1) を導入し、蛍光性の iRFP と mNeonGreen の分子数を FCS で定量した (図 31A)。発色団と結合し蛍光性となった iRFP の数が多いほど、mNeonGreen に対する iRFP の割合が高くなり、その値は 1.0 に近づくと考えられる。SynPCB2.1 発現細胞と PCB 添加条件では、mNeonGreen に対する蛍光性 iRFP の分子数の比率が 0.8~1.0 程度であったため (図 31B,C)、80~100% の iRFP が PCB と複合体を形成していることが明らかになった。同様に、HO1 発現細胞でも SynPCB2.1 発現細胞と同程度の割合の iRFP が BV と複合体を形成し蛍光性になっていることがわかった (図 31C)。また、BV 添加時には mNeonGreen に対する蛍光性 iRFP の比率が低かった (図 31C)。この結果は、培地中に存在する BV の分裂酵母の細胞内への取り込みが遅いことを示しており、HO1 発現株と BV 添加時の iRFP 蛍光輝度値の違いを生む一つの理由で

あると考えられる (図 28G, 2 列目と 3 列目の比較)。また、精製した iRFP-mNeonGreen を使い、*in vitro* における iRFP-PCB と iRFP-BV の複合体の形成効率を Zinc blot 解析と FCS で測定した。細胞内と同様に、*in vitro* でも iRFP は BV と PCB のどちらに対しても同程度に結合していた (図 31D,E)。

次に、分裂酵母の細胞内においても iRFP-PCB の蛍光スペクトルが iRFP-BV と比較して変化しているのか調べた。*in vitro* での結果と同様に (図 29C)、PCB 添加時の細胞内における iRFP-PCB の蛍光スペクトルは、BV 添加時の iRFP-BV よりも短波長側へシフトしていた (図 31F)。同様に、SynPCB2.1 発現細胞は、HO1 発現細胞と比較して蛍光スペクトルが短波長側へシフトしていた (図 31G,J)。興味深いことに、HO1、tFnr-Fd、PcyA を別々に発現する細胞では中間の蛍光スペクトルを示した (図 31G)。この細胞株では iRFP-BV と iRFP-PCB の両方が形成されていることが示唆された。PCB 合成系遺伝子を別々に発現する細胞では、iRFP-BV が細胞内に存在することが原因で、SynPCB2.1 発現細胞と比較して iRFP 蛍光輝度が低下していると考えられる (図 28G, 4 列目と 6 列目の比較)。また、蛍光スペクトルの実測値より (図 31H,I)、PCB 添加もしくは SynPCB2.1 発現細胞において iRFP の蛍光スペクトルのピークがそれぞれ BV 添加や HO1 発現細胞よりも高い値を示した。よって、PCB によって iRFP の蛍光が増加することが蛍光スペクトルの解析からも得られた。

分裂酵母を用いて iRFP を観察する過程で、SynPCB2.1 発現細胞から PCB が細胞外に漏れ出し、周りの細胞がその PCB を取り込むことを見出した。SynPCB2.1 のみを発現する細胞と NLS-iRFP-NLS のみを発現する細胞の 2 種類を共培養すると (図 32A)、PCB 添加と同程度の iRFP の蛍光が観察された (図 32B,C)。NLS-iRFP-NLS 発現細胞を単独で培養しても iRFP の蛍光は観察されなかった (図 32B,C)。よって、分裂酵母から PCB が細胞外へ漏れ出し、それを周囲の細胞が取り込み発色団として利用できることが明らかになった。

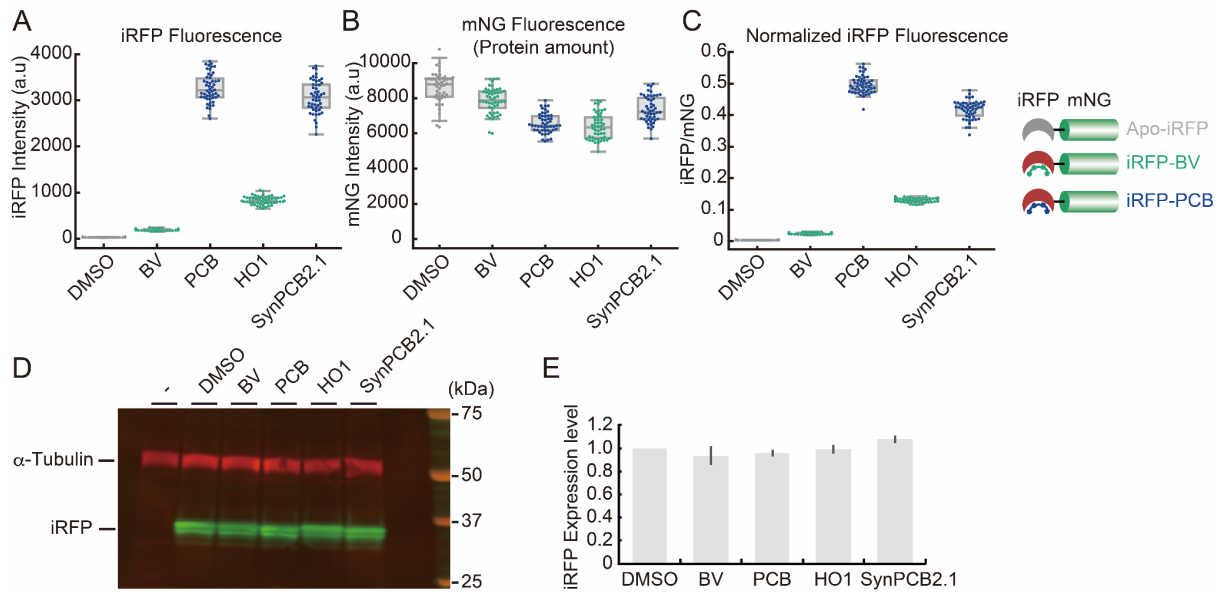


図 30 分裂酵母における iRFP 発現量の定量

(A-C) iRFP-mNeonGreen を発現する分裂酵母で、iRFP 蛍光輝度 (A) と mNeonGreen (mNG) 蛍光輝度 (B) を定量し、また iRFP 蛍光輝度を mNG 蛍光輝度を用いて正規化した (C)。DMSO、BV、PCB はそれぞれ DMSO、125 μ M BV、125 μ M PCB を添加して 2 時間室温で静置した細胞であり、HO1、SynPCB2.1 はそれぞれの遺伝子 (群) を発現する細胞である。グラフのそれぞれの点は 1 細胞毎の蛍光輝度値 (灰色 : Apo-iRFP、緑色 : iRFP-BV、青色 : iRFP-PCB) を示している。また、箱ひげ図では、中央の線が中央値を、“箱”が四分位範囲を、“ひげ”が最小値と最大値を示している。四分位範囲の 1.5 倍よりも外れた値は外れ値とした。それぞれ 50 細胞ずつ定量した。(D) iRFP 発現量 (緑) のウェスタンブロット解析の代表的な画像データ。内部コントロールとして α -チューブリン (赤) も定量した。DMSO、BV、PCB はそれぞれ DMSO、125 μ M BV、125 μ M PCB を添加して 1.5 時間室温で静置した細胞であり、HO1、SynPCB2.1 はそれぞれの遺伝子 (群) を発現する細胞である。また、iRFP を発現しない野生株 (-) をネガティブコントロールとして用いた。(E) ウェスタンブロット解析による iRFP 発現量の定量データ。iRFP 由来のシグナルを α -チューブリン由来のシグナルで正規化し、DMSO に対する相対値として示している。また独立した 3 回の実験の平均値と標準偏差を示している。

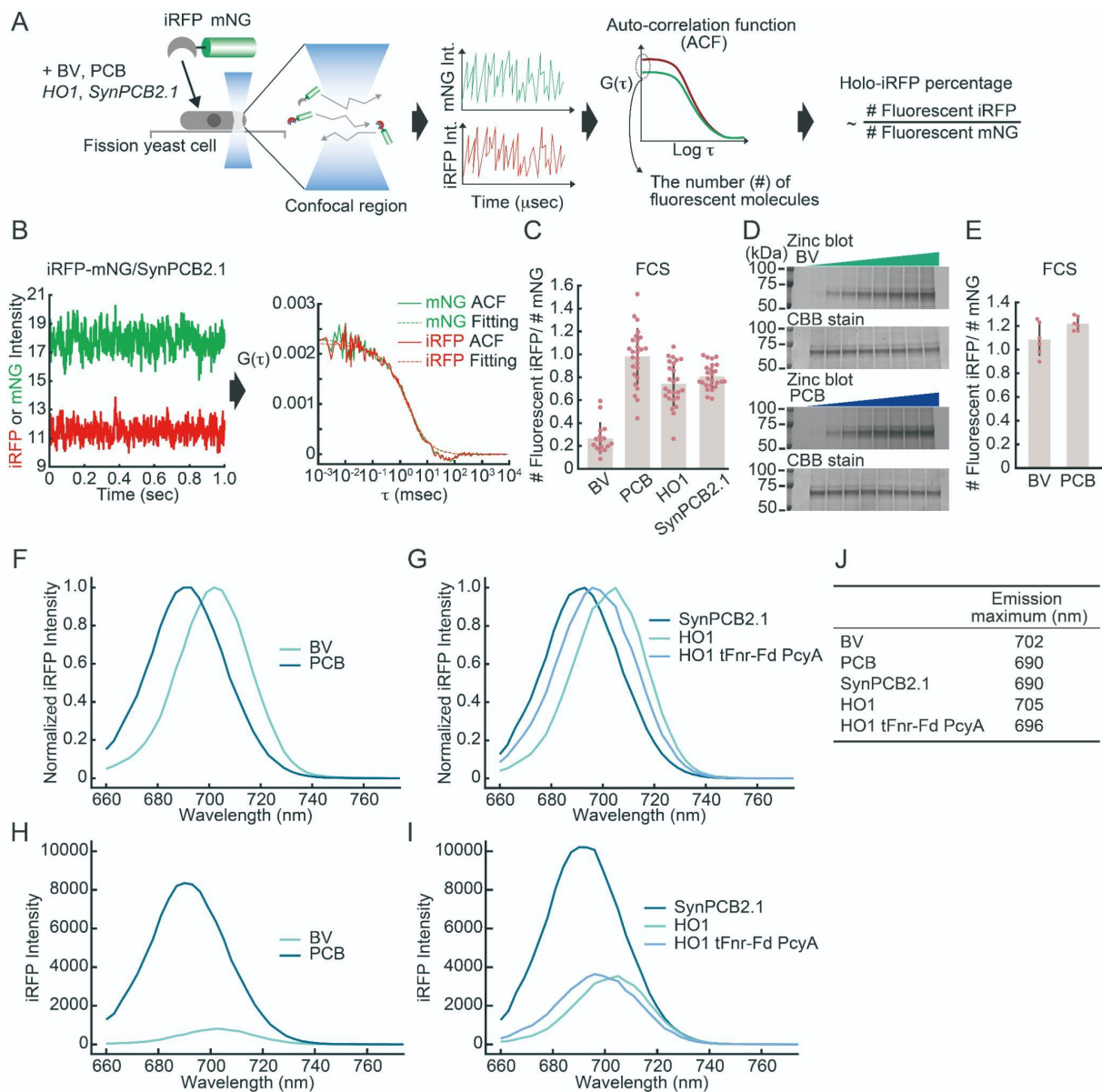


図 31 分裂酵母における PCB 結合型と BV 結合型の iRFP の特徴付け

(A) 蛍光相関分光法 (FCS) の実験手順の模式図。iRFP-mNeonGreen を発現する分裂酵母に対し、125 μ M BV か 125 μ M PCB を添加して 3 時間室温で静置する、もしくは HO1 か SynPCB2.1 を共発現させて、FCS を行った。共焦点顕微鏡で観察し、観察領域内 (Confocal volume) における iRFP と mNeonGreen (mNG) の蛍光輝度の変動を測定し、その時系列データから自己相関関数 (ACF) を計算した。自己相関関数の y 軸切片 ($G(\tau = 0)$) は観察領域内の蛍光分子数と逆相関する。よって、蛍光性 iRFP と mNG の分子数を比べることで、ホロ iRFP の割合を推定することができる。(B) SynPCB2.1 を発現する細胞から得られた代表的な FCS データ。左のグラフは iRFP

(赤) と mNG (緑) の蛍光輝度の変動の生データを、右のグラフは自己相関関数 (実線) とフィッティングカーブ (点線) を示している。(C) 分裂酵母内の蛍光性ホロ iRFP の割合。蛍光性 iRFP の分子数を mNG の分子数で除算した。各細胞の値をピンクの点で示しており、平均値と標準偏差も示した。BV : n = 15、PCB : n = 26、HO1 : n = 25、SynPCB2.1 : n = 25。(D) 精製した His-iRFP-mNeonGreen の Zinc blot 解析。タンパク質溶液 (5.1 μ M) に BV もしくは PCB (0、5、10、20、40、80、160、320 μ M) を添加し、30 分間室温で静置した。SDS-PAGE をした後、Zinc solution でゲルを染めた (Zinc blot)。内部コントロールとして、CBB 染色で His-iRFP-mNeonGreen を可視化した (CBB)。(E) BV もしくは PCB を添加した精製 His-iRFP-mNeonGreen 溶液 (5.1 μ M) の FCS 解析。mNG から iRFP への FRET が起きることを懸念し、発色団を添加する前に mNG の蛍光変動のみを初めに測定し、その後、終濃度 160 μ M となるように BV や PCB を添加し (Zinc blot より推定した飽和濃度)、iRFP の蛍光変動を測定した。それぞれの発色団について独立した 2 回の実験を行い、1 回の実験で 3 回測定し、計 6 回の測定を実施した。蛍光性ホロ iRFP の割合は、蛍光性 iRFP の分子数を mNG の分子数で除算することで求めた。mNG の分子数は 6 回の測定の平均値を使用した。各測定値をピンクの点で示しており、平均値と標準偏差も示した。(F) 分裂酵母の細胞内における iRFP-BV と iRFP-PCB の正規化した蛍光スペクトル。NLS-iRFP-NLS を発現する細胞に BV か PCB を 125 μ M となるように添加した。640 nm のレーザーで励起し、20 nm の検出幅で 3 nm の間隔で蛍光を検出した。各条件で 10 細胞以上を測定した。正規化のためにスペクトルの最大値でそれぞれの蛍光輝度を徐算した。(G) SynPCB2.1、HO1、PCB 合成系の遺伝子群 (HO1、tFnr-Fd、PcyA) を発現する分裂酵母における iRFP の正規化した蛍光スペクトル。(H, I) H は F の正規化する前のスペクトル、I は G の正規化する前のスペクトル。(J) 各細胞株と条件における蛍光スペクトルの最大値をまとめた。

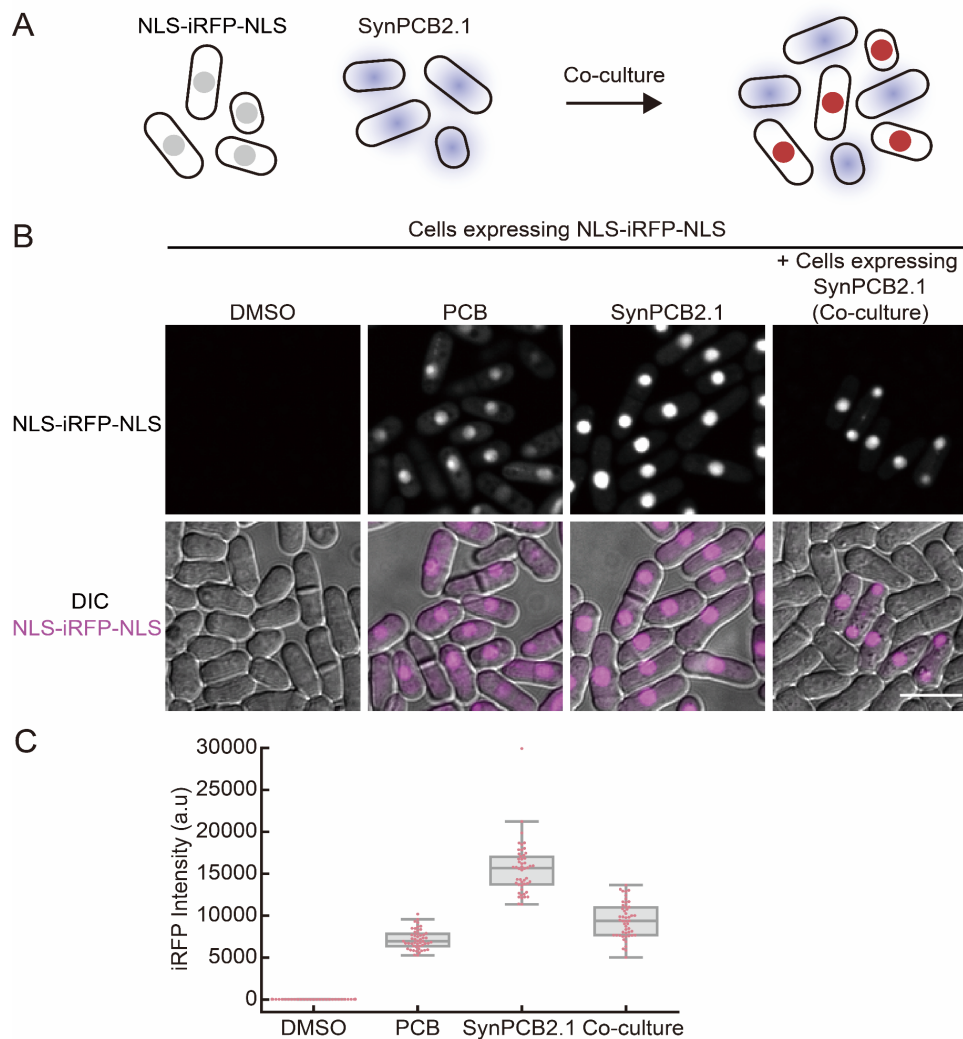


図 32 SynPCB2.1 を発現する分裂酵母から PCB が漏れ出す

(A) NLS-iRFP-NLS 発現細胞と SynPCB2.1 発現細胞の共培養実験の模式図。どちらの細胞株も単独では iRFP 蛍光を示さないが、SynPCB2.1 発現細胞が合成した PCB が培地中に漏れ出し、NLS-iRFP-NLS 発現細胞がそれを取り込むことで iRFP 蛍光が観察されると考えられた。(B) 各種条件下における NLS-iRFP-NLS 発現細胞の代表的な画像。NLS-iRFP-NLS 発現細胞に対し DMSO、125 μ M PCB の添加、SynPCB2.1 の共発現、もしくは SynPCB2.1 発現細胞と共培養 (overnight) して、iRFP 蛍光を観察した。スケールバー：10 μ m。(C) NLS-iRFP-NLS 蛍光輝度値の定量。それぞれの点は 1 細胞毎の iRFP 蛍光輝度値を示している。また、箱ひげ図では、中央の線が中央値を、“箱”が四分位範囲を、“ひげ”が最小値と最大値を示している。四分位範囲の 1.5 倍よりも外れた値は外れ値とした。それぞれ 50 細胞ずつ定量した。

3.3.6 内在性遺伝子へ iRFP をタグ付けするためのプラスミドの開発

分裂酵母での iRFP を用いた観察をさらに簡便にするため、既存の手法を基に [154]、内在性タンパク質の C 末に iRFP をタグ付けするためのプラスミドを開発した。本プラスミドは、iRFP カセットに加え、4 つの薬剤耐性マーカーカセットの内いずれか一つを持っている (図 33A)。これらプラスミドを用いて、分裂酵母の様々な内在性タンパク質を iRFP で可視化できるか検証した。SynPCB2.1 を発現する細胞を用いて、*cdc2* (CDK, 核)、*rpb9* (RNA ポリメラーゼII, 染色体)、*rpa49* (RNA ポリメラーゼI, 核小体)、*swi6* (ヘテロクロマチン)、*pds5* (コヒーシン)、*cut11* (核膜)、*mal3* (微小管プラス端)、*sfl1* (スピンドル極体, SPB)、*cox4* (ミトコンドリア)、*cnx1* (別名 *cal1*, 小胞体 ER)、などの内在性タンパク質を観察できることを示した (図 33B)。タグ付けした内在性タンパク質の発現量によって signal-to-noise 比 (S/N 比) に違いはあるものの、今回観察した全てのタンパク質で予想通りの細胞内の局在を示した。

続いて、SynPCB2.1 と iRFP 融合タンパク質を一つのプラスミドから発現することができる一体型プラスミド (all-in-one plasmid) を開発した。一体型にすることで、これら 2 つの異なる遺伝子を別々のプラスミドを用いて発現して、限りのある薬剤耐性マーカーや染色体上の挿入位置の内、2 つを占有してしまうことを避けることができる。そこで、Lifeact-iRFP (F-actin マーカー) もしくは NLS-iRFP-NLS (核マーカー) をコードする DNA を SynPCB2.1 遺伝子カセットと共に pSKI プラスミドに導入した (図 34A,B)。これらプラスミドを導入した分裂酵母では、アクチンパッチ、アクチンケーブル、アクチンリングといった F-アクチンの局在 (図 34A)、もしくは、核の局在 (図 34B) を観察することができた。また、今回開発した一体型プラスミドと他の蛍光タンパク質を組み合わせることで、核 (NLS-mTagBFP2-NLS)、細胞膜 (Turquoise2-GL-ras1 Δ N200)、動原体 (内在性 Mis12-mNeonGreen)、微小管 (mCherry-Atb2)、そして F-アクチン (Lifeact-iRFP) といったように、5 つの異なるタンパク質や細胞小器官を同時に可視化することが可能になった (図 34C)。

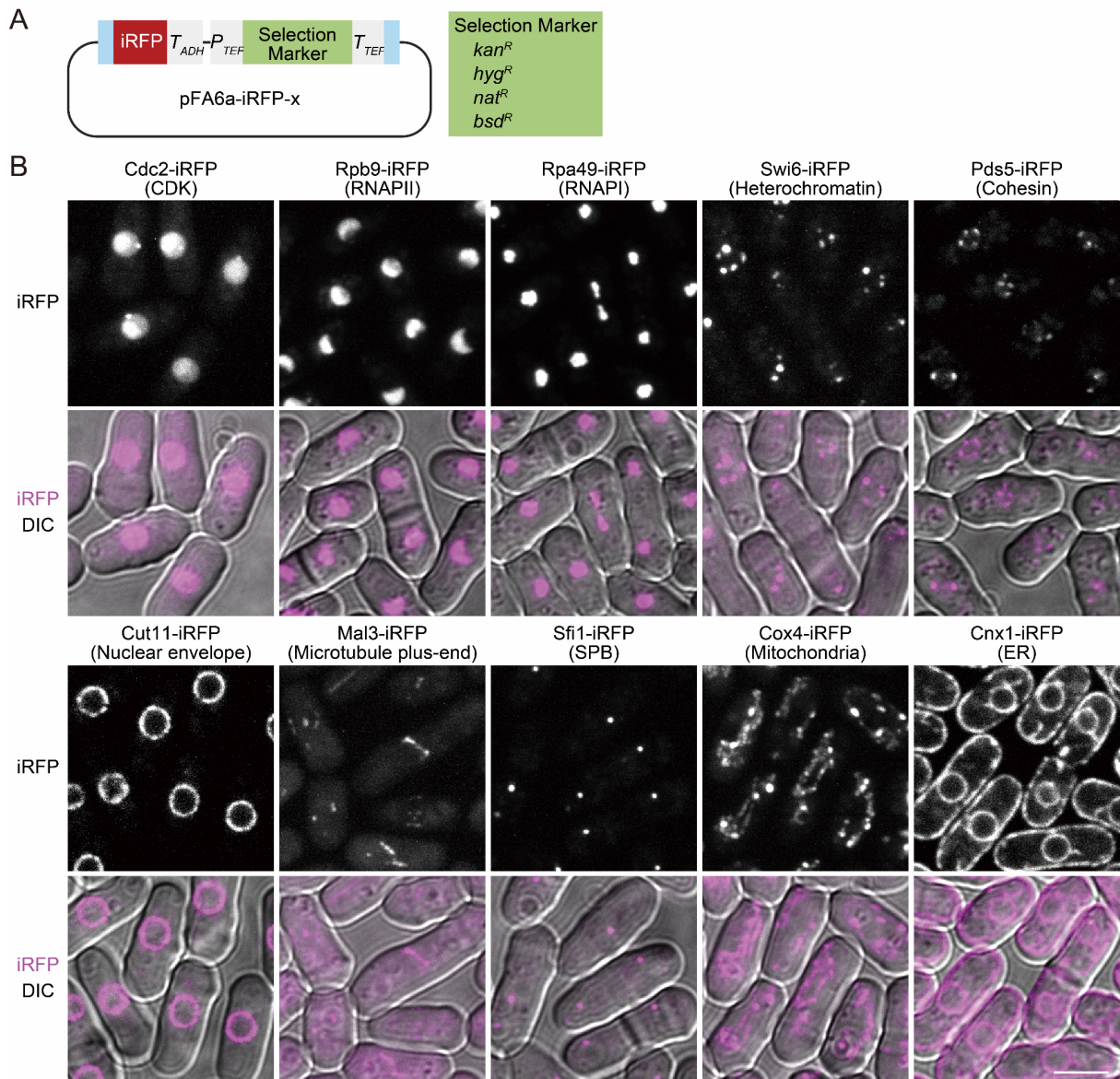


図 33 iRFP を使った分裂酵母の内在性タンパク質の可視化

(A) 内在性タンパク質の C 末端に iRFP をタグ付けするためのプラスミドの模式図。水色の部分は過去に報告されている共通配列である [154]。P : プロモーター、T : ターミネーター。プラスミドは表 5 に一覧で示した。(B) pFA6a-iRFP を使って内在性タンパク質に iRFP をタグ付けし、その局在を観察した画像。iRFP 蛍光画像 (上) と DIC と iRFP 蛍光のマージ画像 (下) を示している。Cut11-iRFP、Cnx-iRFP 以外は、iRFP 蛍光画像の Maximal intensity projection を示している。2 回の実験の内、代表的な画像を示している。RNAP : RNA ポリメラーゼ。スケールバー : 5 μ m。

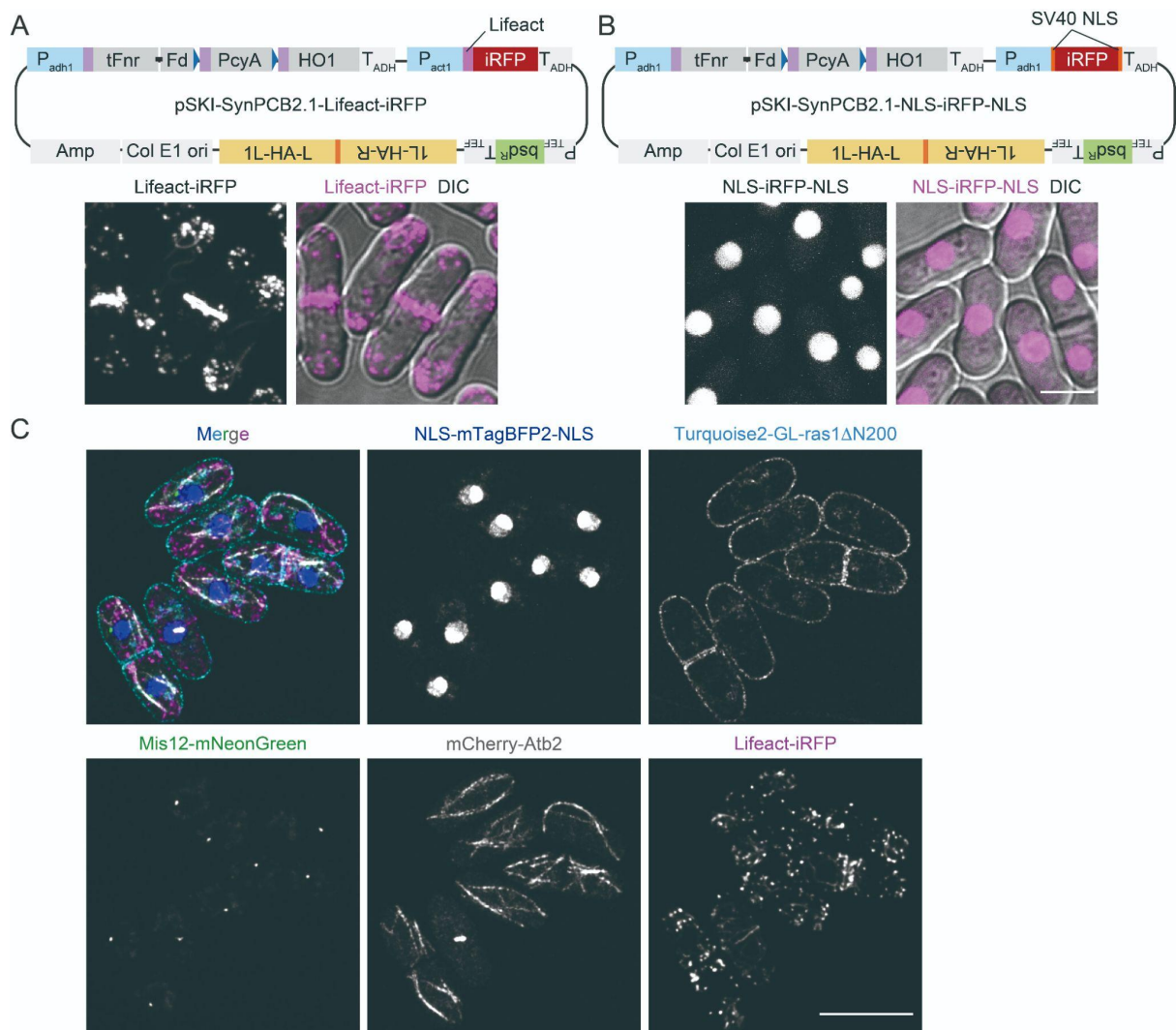


図 34 一体型プラスミド (all-in-one plasmid) を使った iRFP イメージング

(A) (上) SynPCB2.1 と Lifeact-iRFP を発現するためのプラスミド (pSKI-SynPCB2.1-Lifeact-iRFP) の模式図。(下) Lifeact-iRFP を発現する分裂酵母の代表的な画像。蛍光画像の Maximal intensity projection を示している。(B) (上) SynPCB2.1 と NLS-iRFP-NLS を発現するためのプラスミド (pSKI-SynPCB2.1-NLS-iRFP-NLS) の模式図。(下) NLS-iRFP-NLS を発現する分裂酵母の代表的な画像。蛍光画像の Maximal intensity projection を示している。スケールバー : 5 μ m。(C) NLS-mTagBFP2-NLS (核)、Turquoise2-GL-ras1 Δ N200 (細胞膜)、Mis12-mNeonGreen (キネトコア)、mCherry-Atb2 (チューブリン)、Lifeact-iRFP (F-アクチン) を発現する分裂酵母の多重蛍光イメージング。Turquoise2-GL-ras1 Δ N200 以外は、蛍光画像の Maximal intensity projection を示している。スケールバー : 10 μ m。(A)~(C) 全てで 4 回の実験の内、代表的な画像を示している。

3.3.7 PCB は他の近赤外蛍光タンパク質も高輝度化する

PCB が iRFP 以外の近赤外蛍光タンパク質も高輝度化するかを調べるため、iRFP とは異なり、バクテリオフィトクロム RpBphP1 由来の miRFP670 および miRFP703 を用い [155]、これらの BV もしくは PCB 結合型の蛍光輝度を比較した。分裂酵母に miRFP670、miRFP703、もしくは iRFP (別名 iRFP713) を発現させ、BV もしくは PCB 添加時と SynPCB2.1 発現時におけるそれぞれの蛍光輝度を比較した。その結果、iRFP と同様に、PCB 添加もしくは SynPCB2.1 発現時に miRFP670 と miRFP703 の蛍光輝度が BV 添加時と比較して上昇した (図 35)。よって、分裂酵母内で SynPCB2.1 を使って PCB を合成することで、iRFP だけでなく、miRFP670 と miRFP703 も明るく観察できることが明らかになった。

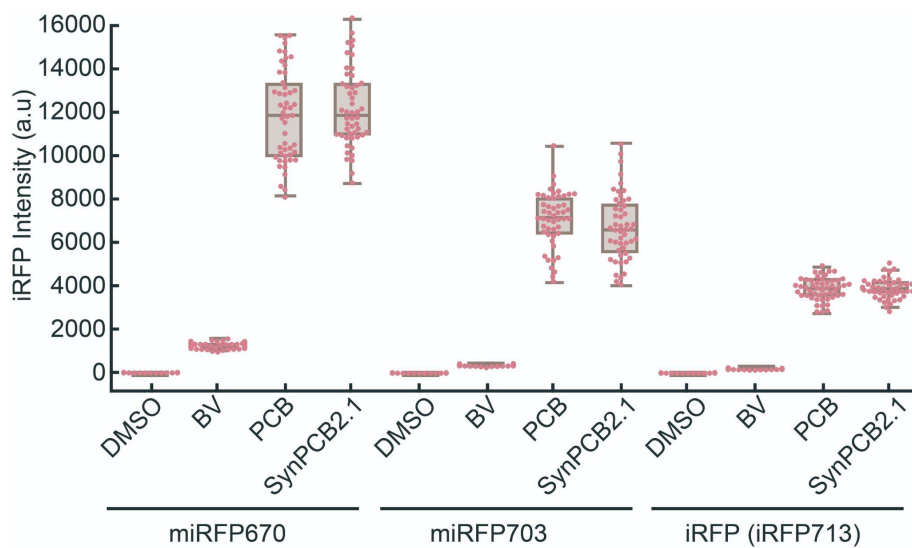


図 35 PCB は miRFP670 と miRFP703 を BV よりも効率的に明るくする
 分裂酵母における miRFP の蛍光輝度の定量。miRFP670、miRFP703、iRFP (= iRFP713) を発現する細胞に対して DMSO、125 μ M BV、125 μ M PCB を添加して 3 時間室温で静置、もしくは SynPCB2.1 を共発現した。それぞれのピンクの点は 1 細胞毎の miRFP670、miRFP703、iRFP の蛍光輝度値を示している。また、箱ひげ図では、中央の線が中央値を、“箱”が四分位範囲を、“ひげ”が最小値と最大値を示している。四分位範囲の 1.5 倍よりも外れた値は外れ値とした。それぞれ 50 細胞ずつ定量した。

3.3.8 PCB は出芽酵母の細胞内でも iRFP を高輝度化する

他の生物でも PCB によって iRFP が高輝度化するかを調べるため、出芽酵母において iRFP 蛍光を観察した。出芽酵母では既に iRFP を用いた観察は報告されている [111–114]。これは出芽酵母がヘムオキシゲナーゼ遺伝子 *HMX1* を保持し細胞内で BV を合成できるためであると考えられる (図 26D)。まず、NLS-iRFP-NLS を発現する出芽酵母を用いて、内在性の *HMX1* 依存的に iRFP 蛍光が観察されるかを確認した。*HMX1* を欠失した細胞株 (*hmx1Δ*) では iRFP 蛍光がバックグラウンド程度まで減少したが、BV を培地中に添加することで元のレベルまで戻った (図 36A,B)。野生株の培地中に BV を添加したところ、非添加時と比べてさらに iRFP 蛍光が上昇した (図 36A,B)。よって、今回発現させている NLS-iRFP-NLS に対しては、内在性 Hmx1 による BV の合成量だけでは、iRFP 蛍光輝度が最大になるのに十分でないことが明らかになった。次に、PCB もしくは BV を培地中に添加して iRFP 蛍光輝度を比較した。分裂酵母と同様に、PCB 添加では、BV 添加と比較して添加濃度 (図 36C) あるいは時間 (図 36D) 依存的により高い iRFP の蛍光輝度が観察された。さらに、iRFP をタグ付けした内在性の Hta2 (ヒストン H2A) は、PCB を培地中に添加することで BV 添加時と比べて 10 倍程度高い蛍光輝度が観察された (図 36E,F)。よって、出芽酵母においても PCB を使うことで iRFP をより明るく観察できることが示された。

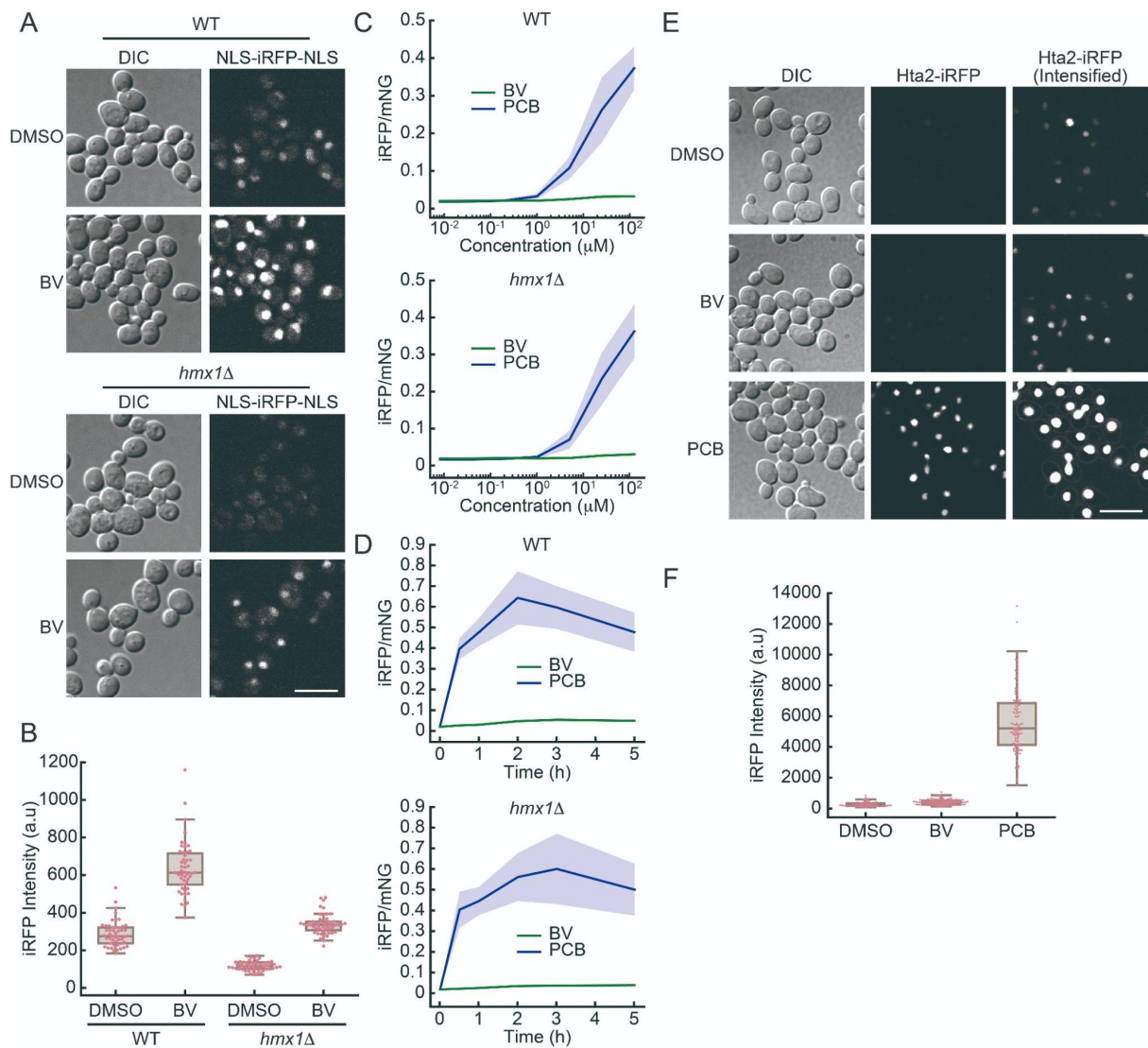


図 36 出芽酵母において PCB は BV よりも効率的に iRFP を明るくする

(A) NLS-iRFP-NLS を発現する出芽酵母の代表的な画像。野生株 (WT) と *hmx1* 破壊株 (*hmx1Δ*) について、125 μM BV 添加 (BV) もしくは非添加 (DMSO) で観察した。スケールバー : 10 μm 。(B) A のデータの iRFP 蛍光輝度の定量。それぞれのピンクの点は 1 細胞毎の iRFP の蛍光輝度値を示している。箱ひげ図では、中央の線が中央値を、“箱”が四分位範囲を、“ひげ”が最小値と最大値を示している。四分位範囲の 1.5 倍よりも外れた値は外れ値とした。それぞれ 50 細胞ずつ定量した。(C) BV もしくは PCB の添加濃度に対する iRFP 蛍光輝度値の用量-反応 (Dose-response)。WT もしくは *hmx1Δ* を使用した。iRFP-mNeonGreen を発現する出芽酵母を YPDA 培地で培養後、BV もしくは PCB (8 nM、40 nM、200 nM、1 μM 、5 μM 、25 μM 、125 μM 、625 μM) を添加し 1 時間室温で静置し観察した。iRFP 蛍光輝度は mNeonGreen (mNG) の

蛍光輝度で正規化している。グラフは平均値と標準偏差を示している。それぞれ 280 細胞以上を定量した。(D) BV もしくは PCB 添加時の iRFP 蛍光輝度値の経時変化。WT もしくは *hmx1Δ* を使用した。iRFP-mNeonGreen を発現する出芽酵母を YPDA 培地で培養後、BV もしくは PCB を 125 μ M 添加して観察を始めた。iRFP 蛍光輝度は mNG の蛍光輝度で正規化している。グラフは平均値と標準偏差を示している。それぞれ 240 細胞以上を定量した。(E) iRFP をタグ付けした内在性 Hta2 を発現する出芽酵母の代表的な画像。125 μ M BV 添加 (BV)、125 μ M PCB 添加 (PCB) もしくは非添加 (DMSO) で観察した。PCB 添加と比較して BV 添加と非添加の iRFP 蛍光が弱かったため、蛍光輝度を強めた画像 (intensified) も示した。スケールバー：10 μ m。(F) E のデータの iRFP 蛍光輝度の定量。それぞれのピンクの点は 1 細胞毎の iRFP の蛍光輝度値を示している。箱ひげ図では、中央の線が中央値を、“箱”が四分位範囲を、“ひげ”が最小値と最大値を示している。四分位範囲の 1.5 倍よりも外れた値は外れ値とした。それぞれ 60 細胞以上を定量した。

3.3.9 分裂酵母における PKA 活性の可視化と操作

前述の通り、分裂酵母で iRFP を利用する実験手法を確立したため、当初の目的であった PKA 活性の可視化と操作を同時に行えるかを検証した。spPKA-KTR (mScarlet-I)、bPAC (450 nm 波長で活性化)に加えて、核マーカーとして NLS-iRFP-NLS と SynPCB2.1 を発現する細胞を構築した。本株に青色光照射 (450 nm) をすると cAMP が細胞内で合成され、PKA が活性化し、その活性化を spPKA-KTR で測定できると考えた (図 37A)。30 分毎に 450 nm 光照射刺激をすると、光照射後に PKA 活性が数分以内に上昇し、光照射を止めると数分以内に基底レベルまで低下した (図 37B)。また、光照射の強度を変えて 10 分毎に 450 nm 光照射をすると、光照射の強度依存的に PKA が活性化した (図 37C)。照射強度が弱いほど、PKA 活性が最大値に達するまでに時間を必要とすることも観察された (図 37C)。このように、bPAC と spPKA-KTR を用いた、分裂酵母における PKA 活性の可視化・操作の実験系を構築することができた。

3.3.10 分裂酵母孢子において spPKA-KTR は機能的でない

分裂酵母の孢子および発芽過程で PKA 活性の可視化ができるかを検証した。spPKA-KTR (mScarlet-I) と核マーカーとして mNeonGreen をタグ付けした内在性の Hta1 (ヒストン H2A) を発現する細胞株を構築した。孢子の中で、spPKA-KTR は細胞質に局在しドット状に分布しており、凝集体を形成していることがわかった (図 37D, spPKA-KTR の 0 時間目)。グルコースを添加し発芽を誘導すると、1 時間後に核内へも spPKA-KTR が局在し、また 4 時間目以降に凝集体が徐々に消失していくことがわかった (図 37D)。よって、これら凝集体は孢子特異的に形成されることが示唆された。凝集体形成は spPKA-KTR の局在変化へ影響を及ぼす可能性があり、本バイオセンサーを孢子および発芽過程で使用するのは適当でないと考えられる。しかし、spPKA-KTR 変異体 (T140A3+T253A) は発芽誘導の 30 分後から核内へ集積し始め、2 時間後には大部分の孢子で核内に局在変化することが観察された (図 37D)。よって、発芽過程で観察された spPKA-KTR の局在変化は、PKA 活性の変化を反映している可能性がある。

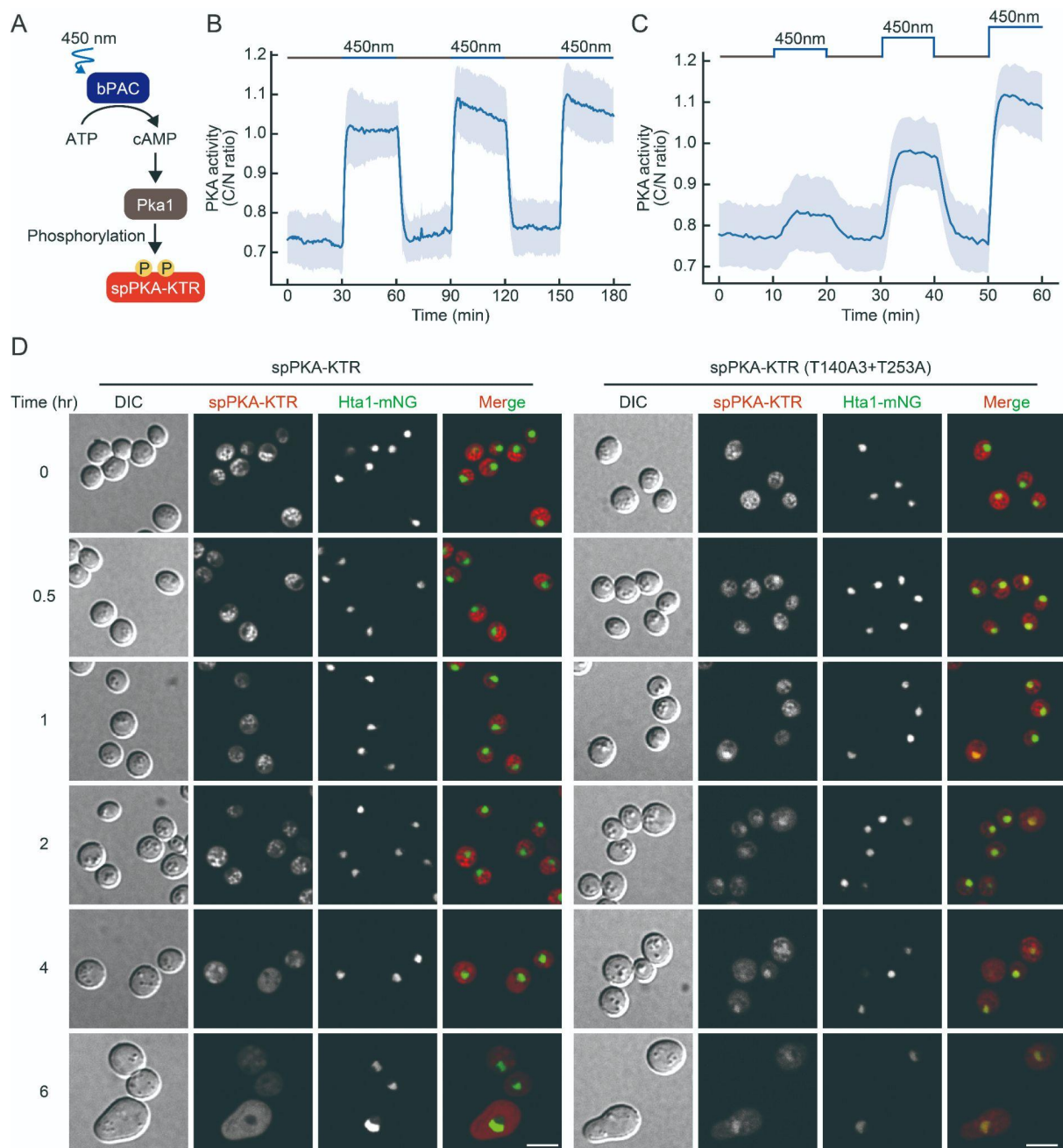


図 37 分裂酵母における PKA 活性の可視化と操作

(A) spPKA-KTR と bPAC を用いた PKA 活性の可視化・操作の模式図。(B) bPAC による PKA 活性の操作。マイクロ流体システム ONIX で bPAC を発現する細胞を培養し、青色光 (450 nm) を 30 分毎に照射し、PKA の活性変化を spPKA-KTR で測定した。細胞質と核内における spPKA-KTR の蛍光輝度を定量し、その蛍光輝度の比 (C/N 比) を算出することで PKA 活性を見積もった。グラフは平均値と標準偏差を示している。(C) 青色照射光の強度を変化させた時の PKA 活性。青色光 (450 nm) を 10 分毎に照射し、その強度を 3 段階で変化させた。また PKA の活性変化を spPKA-

KTR で測定した。グラフは平均値と標準偏差を示している。(D) 孢子と発芽過程における spPKA-KTR を用いた PKA 活性の可視化。spPKA-KTR もしくはそのアラニン変異体 (T140A3+T253A)、および核マーカー (Hta1-mNG) を発現する株から孢子を製作した (0 時間目)。YEA (2% Glucose) 培地に孢子を懸濁して発芽を誘導し、各タイムポイントで孢子を回収して顕微鏡で spPKA-KTR と核マーカーの局在を観察した。スケールバー : 5 μm 。

3.4 考察

本研究では、分裂酵母の発芽開始に必要となる cAMP-PKA 経路に着目し、PKA 活性の可視化・操作法の確立と、その過程で発見した PCB による iRFP の高輝度化について解析した。まず、分裂酵母の PKA 活性を可視化するためのバイオセンサー spPKA-KTR を開発し、グルコース刺激時に PKA が活性化することを観察した。spPKA-KTR に加え、光遺伝学 bPAC と核局在マーカーを同時にイメージングするためには、合計 3 色の蛍光タンパク質と光刺激を使用することになる。この目的のために iRFP の利用を試みたところ、分裂酵母の細胞内では iRFP が全く蛍光を発しないことを発見した。そこで分裂酵母で iRFP の利用法を検討したところ、PCB によって iRFP が高輝度化することを見出した。最終的に分裂酵母で spPKA-KTR と bPAC を使うことで PKA 活性を可視化・操作することを達成した。しかし、spPKA-KTR は孢子の中で凝集してしまい、発芽におけるシグナル伝達を研究するには実用的でないことがわかった。よって、発芽過程のシグナル伝達を解析するためには別のアプローチが必要であると考えられた。

3.4.1 分裂酵母における cAMP-PKA 経路の可視化と操作

分裂酵母の PKA 活性を可視化するためのバイオセンサー spPKA-KTR を開発した。これまでも細胞内 cAMP 量や PKA 活性を測定するバイオセンサーは報告されている。しかし、既存の FRET 型の cAMP センサー (CFP-Epac-YFP) [156] は、分裂酵母の cAMP の基底レベルが低いために機能せず、また、既存の FRET 型の PKA センサー (AKAR3EV) [97] は他のキナーゼからの非特異的なリン酸化を受け、PKA 活性を検出できなかった。そのため、spPKA-KTR は分裂酵母の PKA 活性を測定する上で有用な手法になると考えられる。しかし、spPKA-KTR は分裂酵母の孢子では凝集体を形成してしまい、発芽を解析するには実用的でないことがわかった (図 37D)。第二章で記述した通り、分裂酵母の孢子では細胞質の物性が増殖期と比較して変化しており、KTR のような局在を変化させるバイオセンサーは解析に適していない可能性がある。よって、孢子や発芽過程で cAMP-PKA 経路の動態を可視化するためには別のアプローチを用いる必要がある。別のアプローチの有望な候補の一つとして、局在変化を必要としない、cAMP との結合に伴う蛍光輝度の上昇を捉える

バイオセンサー (GreenFalcon, G-Flamp1) が開発されており [100,157]、将来的に発芽過程でのシグナル動態の解析に応用できることが期待される。

また、光遺伝学 bPAC を使うことで分裂酵母内の cAMP 量の操作を通じて PKA 活性を人為的に操作できることがわかった (図 37B,C)。従来、cAMP-PKA 経路へ摂動を与える目的で、cAMP を培地中に添加して PKA を活性化させる、もしくは ATP アナログ感受性の Pka1 変異体 (analogue-sensitive Pka1 mutant) を発現する細胞に ATP アナログである 3MB-PP1 を添加して PKA 活性を阻害する、などの薬剤を用いた手法が使われてきた [105]。bPAC を使うと、高い時間分解能で可逆的に PKA 活性を操作でき、従来の薬剤を使った手法と比較して利点がある。今後、spPKA-KTR と bPAC を用いることで分裂酵母の細胞内機能をより詳細に解明できることが期待される。

3.4.2 PCB による iRFP の高輝度化

なぜ PCB によって iRFP が明るくなるのか、その理由を考察した。SynPCB2.1 発現株と HO1 発現株の iRFP の発現量は同程度であることから (図 30)、PCB が結合し iRFP の安定性が増すことが原因ではないと考えられる。また、細胞内で iRFP は PCB および BV のどちらに対しても 80~100% の効率で結合し蛍光を発することから (図 31C,E)、発色団の形成効率の違いが原因でないと考えられる。本研究では、iRFP-PCB と iRFP-BV の蛍光特性の違いが、iRFP の高輝度化の原因であることを示唆する結果が得られた。まず、iRFP-PCB では iRFP-BV と比較して励起スペクトルが 10 nm 程度短波長側へシフトする (図 29C)。一般的に使用される赤色レーザーである 640 nm の励起波長では、iRFP-PCB の方が 1.3 倍、効率的に励起される (図 38①)。次に、蛍光スペクトルも iRFP-PCB で 10 nm 程度短波長側へシフトし (図 29C)、本研究で使用した顕微鏡の蛍光フィルター条件 (665~705 nm) では iRFP-PCB の方が 2 倍、効率的に検出される (図 38②)。最後に、iRFP-PCB の方が蛍光量子収率が 2 倍程度高く (図 28F)、またモル吸光係数も考慮すると、iRFP-PCB の方が 1.61 倍明るい (図 38③)。概算ではあるが、これらより、iRFP-PCB の方が iRFP-BV よりも観察される蛍光輝度が 4.2 倍 ($1.3 \times 2 \times 1.61 = 4.2$) 高くなると見積もられる。SynPCB2.1 発現株と HO1 発現株を比較すると iRFP 蛍光輝度が前者 (iRFP-PCB) で 4 倍程度高かったため (図 28G)、この見積もりとおおよそ一致した。PCB を用いるこ

とで iRFP は高輝度化するが、いくつかデメリットがある。まず、iRFP-PCB は iRFP-BV と比べて蛍光スペクトルが 10 nm 程度短波長側へシフトするため (図 29C)、赤色蛍光タンパク質の蛍光波長へ近づいてしまい、蛍光波長が分離しづらくなることが挙げられる。加えて、SynPCB2.1 を細胞へ導入する必要があり手間がかかること、そして生物種によっては毒性がある可能性は否定できない。したがって、こうしたデメリットも考慮した上で、PCB と iRFP を使い、近赤外イメージングをすることが望ましい。

PCB は iRFP だけでなく他の蛍光タンパク質や光遺伝学、バイオセンサーへも応用できる可能性がある。実際に、iRFP とは異なるバクテリオフィトクロムを由来とする miRFP670 と miRFP703 についても、BV 添加と比較して PCB 添加によって蛍光輝度が高くなることがわかった (図 35)。他にもシアノバクテリオクロム由来の近赤外蛍光タンパク質 iRFP670nano は、元々、シアノバクテリオクロム自体が PCB と結合するため、PCB を発色団として利用できる可能性がある [158]。また、バクテリオフィトクロムを基にした光遺伝学やバイオセンサーは BV を使って機能するが [159–162]、PCB も使うことができる可能性がある。BV の代わりに PCB を使うことでこれらの蛍光タンパク質の高輝度化や光遺伝学・バイオセンサーの機能向上が見込める。また、こうした蛍光タンパク質、光遺伝学、バイオセンサーに対し、BV と PCB のどちらがより適した発色団として機能するかを調べるには、BV と PCB のどちらの合成能も持っていない分裂酵母は適した実験系になると考えられる。哺乳類細胞や出芽酵母は BV を細胞内で合成するため、HO の遺伝子破壊株を用いるなどしないと BV の影響を完全には排除できない。

また、分裂酵母以外の BV を合成できない生物種でも、SynPCB2.1 を使うことで iRFP を明るく観察できる可能性がある。例えば、モデル生物として知られる線虫は、BV を合成できないため、iRFP を導入しただけでは蛍光を観察できない。線虫で SynPCB は機能的であることは確認されているため [163]、PCB を合成することで iRFP を簡便に観察できることが期待される。また他にも、代表的な菌類のゲノムから HO を探すと、HO を失っている菌類が散見されるため (図 26D)、こうした BV を合成できない生物種での iRFP イメージングに応用できる可能性がある。加えて、HO を持つ出芽酵母でもヒストンなどの発現量が高いタンパク質を iRFP で観察するには、PCB を培地中に添加しないと十分に明るくならないことも判明した (図

36E,F)。したがって、BVを合成できる生物でも観察対象となるタンパク質によってはPCBを使うことでより明るく観察できることが期待される。

3.4.3 細胞外へのPCBの漏出

SynPCB2.1を発現する細胞と共培養することで、iRFPのみを発現している細胞でもiRFP蛍光が観察されることが明らかになった(図32)。これはPCBが分裂酵母の細胞外に漏れ出すことを示している。このようなPCBを始めとする発色団の細胞外への漏出は、実験環境だけでなく、実際の自然環境中でも起こりうる。興味深いことに、*Aspergillus nidulans*と*Neurospora crassa*はHOホモログを持っていないが(図26D)、発色団を必要とするフィトクロムを保持している[145,164]。よって、これらの菌類は他の生物種から漏れ出したBVやPCBなどの発色団を利用していることが予想される。複数の菌類でHOが散発的に失われているのは(図26D)、他の生物から漏れ出した発色団を利用できる環境に生息していることが一つの可能性として考えられる。

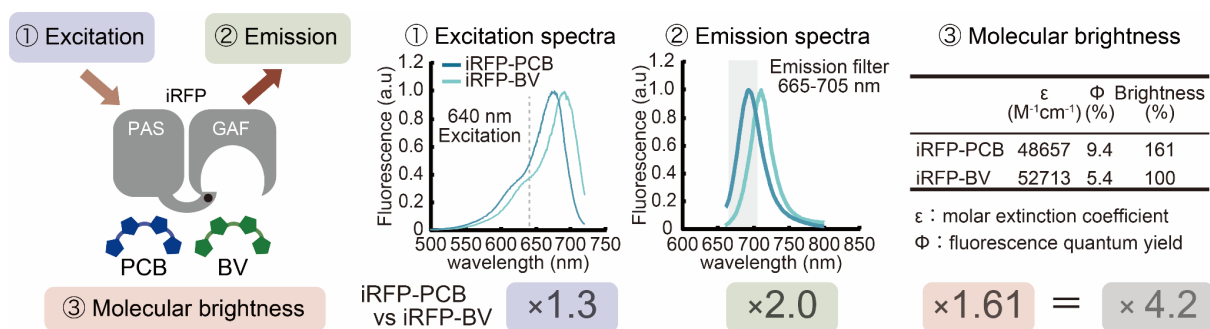


図 38 PCB が iRFP を高輝度化する要因

励起スペクトル、蛍光スペクトル、蛍光タンパク質の輝度に関わるパラメーター (蛍光量子収率とモル吸光係数) について iRFP-PCB と iRFP-BV で比較した。励起スペクトルでは励起波長 640 nm での両者の蛍光輝度を比較し (iRFP-PCB の方が 1.3 倍効率的に励起される)、蛍光スペクトルでは顕微鏡の蛍光フィルター (665~705 nm) における蛍光輝度を比較し (iRFP-PCB の方が 2 倍効率的に検出される)、蛍光量子収率とモル吸光係数から両者の分子レベルでの明るさを計算した (iRFP-PCB の方が 1.61 倍明るい)。これらを全て考慮すると、iRFP-PCB の方が iRFP-BV と比較して、4.2 倍程度明るいと考えられる。

第四章 まとめと展望

本研究では、分裂酵母の発芽過程における細胞質流動性とシグナル伝達について解析した。第二章では、胞子の細胞質流動性に着目し、40 nm の粒子の拡散を胞子と増殖期とで比較した。その結果、胞子では増殖期と比べて粒子の拡散が低下しているが、発芽開始から1時間以内に粒子が活発に動き出すことがわかった。こうした細胞質の流動性は、トレハロースによって制御されており、発芽開始時にトレハラーゼ Ntp1 依存的にトレハロースが分解されることが流動性の上昇に必要であることを明らかにした。また、Ntp1 はグルコース感知機構である cAMP-PKA 経路の制御下であることも明らかにした。第三章では、細胞質流動性と発芽開始の制御に必要な cAMP-PKA 経路の活性動態を明らかにすることを目指し、PKA センサー spPKA-KTR を開発した。残念ながら、spPKA-KTR は胞子では凝集体を形成してしまい、発芽を解析するには実用的でないことがわかった。PKA 活性の可視化と操作の実験系を構築する過程で、iRFP が分裂酵母の細胞内では蛍光を発しないことを発見し、また PCB が iRFP を高輝度化することを見出した。spPKA-KTR、bPAC、iRFP を使うことで増殖期の分裂酵母で PKA 活性を可視化・操作する実験系を確立した。

胞子内で細胞質の流動性が低下しているならば、このような細胞内環境中で PKA などのシグナル分子はどうやって活性化し、他のタンパク質と相互作用するのだろうか。cAMP-PKA 経路のグルコース受容体 (Git3)、ヘテロ三量体 G タンパク質 (Gpa2、Git5、Git11)、adenylate cyclase (Cyr1) は細胞膜上に局在し活性化するため、グルコースの感知から cAMP の産生までは、細胞質物性の変化の影響は比較的少ないと考えられる。しかし、胞子の細胞質では蛍光タンパク質 mNeonGreen (27 kDa) の拡散が数 μm の距離では増殖期と比べて数十倍低下していた。PKA は Pka1 (58 kDa) と Cgs1 (46 kDa) が2つずつ結合した4量体を形成し、つまり mNeonGreen よりも大きな複合体であると想定され、局在変化やリン酸化の標的タンパク質との相互作用に影響が出ることが予想される。PKA の活性動態を胞子と増殖期で比較することで、流動性が低下した細胞質において、PKA がどのようにして活性化するのかを明らかにできると考えられる。そのためには、胞子で利用可能な PKA センサーを開発・改良することが今後の課題であると考えられる。また、これまでのシグナル伝達経路の研究では流動的な細胞質を想定して研究・議論されている。胞子を含め、流動

性が低下した細胞質においてシグナル伝達経路がどのように機能するかを調べた研究例はほとんどない。したがって、胞子において cAMP-PKA 経路の活性動態を解析することは、シグナル伝達経路の研究という大きな枠組みにおいても有益な知見が得られることが期待される。

参考文献

1. Tsuyuzaki H, Hosokawa M, Arikawa K, Yoda T, Okada N, Takeyama H, et al. Time-lapse single-cell transcriptomics reveals modulation of histone H3 for dormancy breaking in fission yeast. *Nat Commun.* 2020;11: 1265.
2. Pandey R, Ter Beek A, Vischer NOE, Smelt JPPM, Brul S, Manders EMM. Live cell imaging of germination and outgrowth of individual bacillus subtilis spores; the effect of heat stress quantitatively analyzed with SporeTracker. *PLoS One.* 2013;8: e58972.
3. Endo H, Inoue M. Dormancy in cancer. *Cancer Sci.* 2019;110: 474–480.
4. Sieber B, Coronas-Serna JM, Martin SG. A focus on yeast mating: From pheromone signaling to cell-cell fusion. *Semin Cell Dev Biol.* 2022.
doi:10.1016/j.semcdb.2022.02.003
5. Shimoda C. Differential effect of glucose and fructose on spore germination in the fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. *Can J Microbiol.* 1980;26: 741–745.
6. Fukunishi K, Miyakubi K, Hatanaka M, Otsuru N, Hirata A, Shimoda C, et al. The fission yeast spore is coated by a proteinaceous surface layer comprising mainly Isp3. *Mol Biol Cell.* 2014;25: 1549–1559.
7. García I, Tajadura V, Martín V, Toda T, Sánchez Y. Synthesis of alpha-glucans in fission yeast spores is carried out by three alpha-glucan synthase paralogues, Mok12p, Mok13p and Mok14p. *Mol Microbiol.* 2006;59: 836–853.
8. Egel R. Selective spore survival during replica-plating of fission yeast. *Arch Microbiol.* 1977;112: 109–110.
9. Ohtsuka H, Imada K, Shimasaki T, Aiba H. Sporulation: A response to starvation in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Microbiologyopen.* 2022;11: e1303.
10. Hatanaka M, Shimoda C. The cyclic AMP/PKA signal pathway is required for initiation of spore germination in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast.* 2001;18: 207–217.
11. Tsuyuzaki H, Ujiie R, Sato M. Wake-up alarm: virtual time-lapse gene expression landscape illuminates mechanisms underlying dormancy breaking of germinating spores. *Curr Genet.* 2021. doi:10.1007/s00294-021-01177-0
12. Bresch C, Müller G, Egel R. Genes involved in meiosis and sporulation of a yeast. *Mol Gen Genet.* 1968;102: 301–306.
13. Shimoda C, Uehira M. Cloning of the *Schizosaccharomyces pombe* mei3 gene essential for the initiation of meiosis. *Mol Gen Genet.* 1985;201: 353–356.
14. Shimoda C, Uehira M, Kishida M, Fujioka H, Iino Y, Watanabe Y, et al. Cloning and analysis of transcription of the mei2 gene responsible for initiation of meiosis in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J Bacteriol.* 1987;169: 93–96.

15. Wood V, Gwilliam R, Rajandream M-A, Lyne M, Lyne R, Stewart A, et al. The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature*. 2002;415: 871–880.
16. Mata J, Lyne R, Burns G, Bähler J. The transcriptional program of meiosis and sporulation in fission yeast. *Nat Genet*. 2002;32: 143–147.
17. Nakamura T, Asakawa H, Nakase Y, Kashiwazaki J, Hiraoka Y, Shimoda C. Live observation of forespore membrane formation in fission yeast. *Mol Biol Cell*. 2008;19: 3544–3553.
18. Bonazzi D, Julien J-D, Romao M, Seddiki R, Piel M, Boudaoud A, et al. Symmetry breaking in spore germination relies on an interplay between polar cap stability and spore wall mechanics. *Dev Cell*. 2014;28: 534–546.
19. Wei W, Zheng B, Zheng S, Wu D, Chu Y, Zhang S, et al. The Cdc42 GAP Rga6 promotes monopolar outgrowth of spores. *J Cell Biol*. 2023;222. doi:10.1083/jcb.202202064
20. Munder MC, Midtvedt D, Franzmann T, Nüske E, Otto O, Herbig M, et al. A pH-driven transition of the cytoplasm from a fluid- to a solid-like state promotes entry into dormancy. *Elife*. 2016;5. doi:10.7554/eLife.09347
21. Joyner RP, Tang JH, Helenius J, Dultz E, Brune C, Holt LJ, et al. A glucose-starvation response regulates the diffusion of macromolecules. *Elife*. 2016;5. doi:10.7554/eLife.09376
22. Vale RD. The molecular motor toolbox for intracellular transport. *Cell*. 2003;112: 467–480.
23. Brangwynne CP, Koenderink GH, MacKintosh FC, Weitz DA. Cytoplasmic diffusion: molecular motors mix it up. *J Cell Biol*. 2008;183: 583–587.
24. Son S, Kang JH, Oh S, Kirschner MW, Mitchison TJ, Manalis S. Resonant microchannel volume and mass measurements show that suspended cells swell during mitosis. *J Cell Biol*. 2015;211: 757–763.
25. Zlotek-Zlotkiewicz E, Monnier S, Cappello G, Le Berre M, Piel M. Optical volume and mass measurements show that mammalian cells swell during mitosis. *J Cell Biol*. 2015;211: 765–774.
26. Miermont A, Waharte F, Hu S, McClean MN, Bottani S, Léon S, et al. Severe osmotic compression triggers a slowdown of intracellular signaling, which can be explained by molecular crowding. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110: 5725–5730.
27. Molines AT, Lemièrre J, Gazzola M, Steinmark IE, Edrington CH, Hsu C-T, et al. Physical properties of the cytoplasm modulate the rates of microtubule polymerization and depolymerization. *Dev Cell*. 2022;57: 466–479.e6.
28. Minton AP. The Influence of Macromolecular Crowding and Macromolecular Confinement on Biochemical Reactions in Physiological Media *. *J Biol Chem*. 2001;276: 10577–10580.

29. Rivas G, Minton AP. Macromolecular Crowding In Vitro, In Vivo, and In Between. *Trends Biochem Sci.* 2016;41: 970–981.
30. Mourão MA, Hakim JB, Schnell S. Connecting the dots: the effects of macromolecular crowding on cell physiology. *Biophys J.* 2014;107: 2761–2766.
31. Heimlicher MB, Bächler M, Liu M, Ibeneche-Nnewihe C, Florin E-L, Hoenger A, et al. Reversible solidification of fission yeast cytoplasm after prolonged nutrient starvation. *J Cell Sci.* 2019;132. doi:10.1242/jcs.231688
32. Parry BR, Surovtsev IV, Cabeen MT, O’Hern CS, Dufresne ER, Jacobs-Wagner C. The bacterial cytoplasm has glass-like properties and is fluidized by metabolic activity. *Cell.* 2014;156: 183–194.
33. Plante S, Moon K-M, Lemieux P, Foster LJ, Landry CR. Exit of spore dormancy transforms the yeast cytoplasm and the solubility of its proteome. *bioRxiv.* 2022. p. 2022.07.29.502016. doi:10.1101/2022.07.29.502016
34. Ahmed WW, Fodor É, Betz T. Active cell mechanics: Measurement and theory. *Biochim Biophys Acta.* 2015;1853: 3083–3094.
35. Wirtz D. Particle-tracking microrheology of living cells: principles and applications. *Annu Rev Biophys.* 2009;38: 301–326.
36. Luby-Phelps K, Taylor DL, Lanni F. Probing the structure of cytoplasm. *J Cell Biol.* 1986;102: 2015–2022.
37. Luby-Phelps K, Castle PE, Taylor DL, Lanni F. Hindered diffusion of inert tracer particles in the cytoplasm of mouse 3T3 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987;84: 4910–4913.
38. Riveline D, Nurse P. “Injecting” yeast. *Nat Methods.* 2009;6: 513–514.
39. Delarue M, Brittingham GP, Pfeffer S, Surovtsev IV, Pinglay S, Kennedy KJ, et al. mTORC1 Controls Phase Separation and the Biophysical Properties of the Cytoplasm by Tuning Crowding. *Cell.* 2018;174: 338–349.e20.
40. Maeda T, Watanabe Y, Kunitomo H, Yamamoto M. Cloning of the *pka1* gene encoding the catalytic subunit of the cAMP-dependent protein kinase in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biol Chem.* 1994;269: 9632–9637.
41. DeVoti J, Seydoux G, Beach D, McLeod M. Interaction between *ran1+* protein kinase and cAMP dependent protein kinase as negative regulators of fission yeast meiosis. *EMBO J.* 1991;10: 3759–3768.
42. Maeda T, Mochizuki N, Yamamoto M. Adenylyl cyclase is dispensable for vegetative cell growth in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87: 7814–7818.
43. Isshiki T, Mochizuki N, Maeda T, Yamamoto M. Characterization of a fission yeast gene, *gpa2*, that encodes a G alpha subunit involved in the monitoring of nutrition. *Genes Dev.* 1992;6: 2455–2462.

44. Welton RM, Hoffman CS. Glucose Monitoring in Fission Yeast via the *gpa2* G α , the *git5* G β and the *git3* Putative Glucose Receptor. *Genetics*. 2000;156: 513–521.
45. Landry S, Hoffman CS. The *git5* G β and *git11* G γ form an atypical Gbetagamma dimer acting in the fission yeast glucose/cAMP pathway. *Genetics*. 2001;157: 1159–1168.
46. Kim DU, Park SK, Chung KS, Choi MU, Yoo HS. The G protein beta subunit Gpb1 of *Schizosaccharomyces pombe* is a negative regulator of sexual development. *Mol Gen Genet*. 1996;252: 20–32.
47. Mochizuki N, Yamamoto M. Reduction in the intracellular cAMP level triggers initiation of sexual development in fission yeast. *Mol Gen Genet*. 1992;233: 17–24.
48. Kunitomo H, Higuchi T, Iino Y, Yamamoto M. A zinc-finger protein, Rst2p, regulates transcription of the fission yeast *ste11(+)* gene, which encodes a pivotal transcription factor for sexual development. *Mol Biol Cell*. 2000;11: 3205–3217.
49. Jeong HT, Ozoe F, Tanaka K, Nakagawa T, Matsuda H, Kawamukai M. A novel gene, *msa1*, inhibits sexual differentiation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics*. 2004;167: 77–91.
50. Higuchi T, Watanabe Y, Yamamoto M. Protein kinase A regulates sexual development and gluconeogenesis through phosphorylation of the Zn finger transcriptional activator Rst2p in fission yeast. *Mol Cell Biol*. 2002;22: 1–11.
51. Blázquez MA, Stucka R, Feldmann H, Gancedo C. Trehalose-6-P synthase is dispensable for growth on glucose but not for spore germination in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Bacteriol*. 1994;176: 3895–3902.
52. Beltran FF, Castillo R, Vicente-Soler J, Cansado J, Gacto M. Role for trehalase during germination of spores in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *FEMS Microbiol Lett*. 2000;193: 117–121.
53. Soto T, Fernández J, Dominguez A, Vicente-Soler J, Cansado J, Gacto M. Analysis of the *ntp1+* gene, encoding neutral trehalase in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* The nucleotide sequence of this gene has been submitted to the EMBL/GenBank sequence database and is available under accession number AJ224339.1. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*. 1998;1443: 225–229.
54. Soto Teresa, Fernández Juana, Vicente-Soler Jero, Cansado Jose, Gacto Mariano. Accumulation of Trehalose by Overexpression of *tps1*, Coding for Trehalose-6-Phosphate Synthase, Causes Increased Resistance to Multiple Stresses in the Fission Yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Appl Environ Microbiol*. 1999;65: 2020–2024.
55. Inoue H, Shimoda C. Changes in trehalose content and trehalase activity during spore germination in fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. *Arch Microbiol*. 1981;129: 19–22.
56. Inoue H, Shimoda C. Induction of trehalase activity on a nitrogen-free medium: a sporulation-specific event in the fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Gen Genet*. 1981;183: 32–36.

57. Pluskal T, Hayashi T, Saitoh S, Fujisawa A, Yanagida M. Specific biomarkers for stochastic division patterns and starvation-induced quiescence under limited glucose levels in fission yeast. *FEBS J.* 2011;278: 1299–1315.
58. Sajiki K, Pluskal T, Shimanuki M, Yanagida M. Metabolomic analysis of fission yeast at the onset of nitrogen starvation. *Metabolites.* 2013;3: 1118–1129.
59. Pluskal T, Nakamura T, Villar-Briones A, Yanagida M. Metabolic profiling of the fission yeast *S. pombe*: quantification of compounds under different temperatures and genetic perturbation. *Mol Biosyst.* 2010;6: 182–198.
60. Hengge-Aronis R, Klein W, Lange R, Rimmele M, Boos W. Trehalose synthesis genes are controlled by the putative sigma factor encoded by *rpoS* and are involved in stationary-phase thermotolerance in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 1991;173: 7918–7924.
61. Tapia H, Koshland DE. Trehalose is a versatile and long-lived chaperone for desiccation tolerance. *Curr Biol.* 2014;24: 2758–2766.
62. Sakurai M, Furuki T, Akao K-I, Tanaka D, Nakahara Y, Kikawada T, et al. Vitrification is essential for anhydrobiosis in an African chironomid, *Polypedilum vanderplanki*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105: 5093–5098.
63. Nguyen K, Kc S, Gonzalez T, Tapia H, Boothby TC. Trehalose and tardigrade CAHS proteins work synergistically to promote desiccation tolerance. *Commun Biol.* 2022;5: 1046.
64. Nakazawa N, Obata Y, Ito K, Oto M, Ito T, Takahashi K. Mechanism of high trehalose accumulation in a spore clone isolated from Shirakami kodama yeast. *J Gen Appl Microbiol.* 2014;60: 147–155.
65. Persson LB, Ambati VS, Brandman O. Cellular Control of Viscosity Counters Changes in Temperature and Energy Availability. *Cell.* 2020;183: 1572–1585.e16.
66. Franco Alejandro, Soto Teresa, Vicente-Soler Jero, Guillen Pedro Valero, Cansado Jose, Gacto Mariano. Characterization of *tpp1+* as Encoding a Main Trehalose-6P Phosphatase in the Fission Yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J Bacteriol.* 2000;182: 5880–5884.
67. Sadaie W, Harada Y, Matsuda M, Aoki K. Quantitative in vivo fluorescence cross-correlation analyses highlight the importance of competitive effects in the regulation of protein-protein interactions. *Mol Cell Biol.* 2014;34: 3272–3290.
68. Komatsubara AT, Goto Y, Kondo Y, Matsuda M, Aoki K. Single-cell quantification of the concentrations and dissociation constants of endogenous proteins. *J Biol Chem.* 2019;294: 6062–6072.
69. Müller CB, Loman A, Pacheco V, Koberling F, Willbold D, Richtering W, et al. Precise measurement of diffusion by multi-color dual-focus fluorescence correlation spectroscopy. *EPL.* 2008;83: 46001.
70. Kloimwieder A, Winston F. A Screen for Germination Mutants in *Saccharomyces cerevisiae*. *G3.* 2011;1: 143–149.

71. Plante S, Labbé S. Spore Germination Requires Ferrichrome Biosynthesis and the Siderophore Transporter Str1 in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics*. 2019;211: 893–911.
72. Fennessy D, Grallert A, Krapp A, Cokoja A, Bridge AJ, Petersen J, et al. Extending the *Schizosaccharomyces pombe* molecular genetic toolbox. *PLoS One*. 2014;9: e97683.
73. Vještica A, Marek M, Nkosi PJ, Merlini L, Liu G, Bérard M, et al. A toolbox of stable integration vectors in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J Cell Sci*. 2020;133. doi:10.1242/jcs.240754
74. Kakui Y, Sunaga T, Arai K, Dodgson J, Ji L, Csikász-Nagy A, et al. Module-based construction of plasmids for chromosomal integration of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Open Biol*. 2015;5: 150054.
75. Keeney JB, Boeke JD. Efficient targeted integration at *leu1-32* and *ura4-294* in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics*. 1994;136: 849–856.
76. Matsuyama A, Shirai A, Yashiroda Y, Kamata A, Horinouchi S, Yoshida M. pDUAL, a multipurpose, multicopy vector capable of chromosomal integration in fission yeast. *Yeast*. 2004;21: 1289–1305.
77. Siam R, Dolan WP, Forsburg SL. Choosing and using *Schizosaccharomyces pombe* plasmids. *Methods*. 2004;33: 189–198.
78. Maundrell K. Thiamine-repressible expression vectors pREP and pRIP for fission yeast. *Gene*. 1993;123: 127–130.
79. Sakuno T, Tada K, Watanabe Y. Kinetochore geometry defined by cohesion within the centromere. *Nature*. 2009;458: 852–858.
80. Alric B, Formosa-Dague C, Dague E, Holt LJ, Delarue M. Macromolecular crowding limits growth under pressure. *Nat Phys*. 2022;18: 411–416.
81. Vicente-Soler J, Soto T, Madrid M, Núñez A, Cansado J, Gacto M. Solubilization and characterization of a cell wall-bound trehalase from ascospores of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Microbiol Res*. 2009;164: 304–311.
82. Takaine M, Ueno M, Kitamura K, Imamura H, Yoshida S. Reliable imaging of ATP in living budding and fission yeast. *J Cell Sci*. 2019;132. doi:10.1242/jcs.230649
83. Grousl T, Vojtova J, Hasek J, Vomastek T. Yeast stress granules at a glance. *Yeast*. 2022;39: 247–261.
84. Dijksterhuis J, Nijssse J, Hoekstra FA, Golovina EA. High viscosity and anisotropy characterize the cytoplasm of fungal dormant stress-resistant spores. *Eukaryot Cell*. 2007;6: 157–170.
85. Tolić-Nørrelykke IM, Munteanu E-L, Thon G, Oddershede L, Berg-Sørensen K. Anomalous diffusion in living yeast cells. *Phys Rev Lett*. 2004;93: 078102.
86. Jain NK, Roy I. Effect of trehalose on protein structure. *Protein Sci*. 2009;18: 24–36.

87. Maire T, Allertz T, Betjes MA, Youk H. Dormancy-to-death transition in yeast spores occurs due to gradual loss of gene-expressing ability. *Mol Syst Biol.* 2020;16: e9245.
88. Verschoor A, Warner JR, Srivastava S, Grassucci RA, Frank J. Three-dimensional structure of the yeast ribosome. *Nucleic Acids Res.* 1998;26: 655–661.
89. Darst SA, Kubalek EW, Kornberg RD. Three-dimensional structure of *Escherichia coli* RNA polymerase holoenzyme determined by electron crystallography. *Nature.* 1989;340: 730–732.
90. Carrillo D, Vicente-Soler J, Gacto M. Cyclic AMP signalling pathway and trehalase activation in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Microbiology.* 1994;140 (Pt 6): 1467–1472.
91. Soto T, Fernandez J, Cansado J, Vicente-Soler J, Gacto M. Glucose-induced, cyclic-AMP-independent signalling pathway for activation of neutral trehalase in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Microbiology.* 1995;141: 2665–2671.
92. Ortiz CH, Maia JC, Tenan MN, Braz-Padrão GR, Mattoon JR, Panek AD. Regulation of yeast trehalase by a monocyclic, cyclic AMP-dependent phosphorylation-dephosphorylation cascade system. *J Bacteriol.* 1983;153: 644–651.
93. Dengler L, Örd M, Schwab LM, Loog M, Ewald JC. Regulation of trehalase activity by multi-site phosphorylation and 14-3-3 interaction. *Sci Rep.* 2021;11: 962.
94. Smith FD, Samelson BK, Scott JD. Discovery of cellular substrates for protein kinase A using a peptide array screening protocol. *Biochem J.* 2011;438: 103–110.
95. Franco A, Soto T, Madrid M, Vicente-Soler J, Gacto M, Cansado J. Functional characterization of *Schizosaccharomyces pombe* neutral trehalase altered in phosphorylatable serine residues. *Arch Microbiol.* 2005;183: 394–400.
96. Nikolaev VO, Bünemann M, Hein L, Hannawacker A, Lohse MJ. Novel single chain cAMP sensors for receptor-induced signal propagation. *J Biol Chem.* 2004;279: 37215–37218.
97. Komatsu N, Aoki K, Yamada M, Yukinaga H, Fujita Y, Kamioka Y, et al. Development of an optimized backbone of FRET biosensors for kinases and GTPases. *Mol Biol Cell.* 2011;22: 4647–4656.
98. Botman D, O’Toole TG, Goedhart J, Bruggeman FJ, van Heerden JH, Teusink B. A yeast FRET biosensor enlightens cAMP signaling. *Mol Biol Cell.* 2021;32: 1229–1240.
99. Regot S, Hughey JJ, Bajar BT, Carrasco S, Covert MW. High-sensitivity measurements of multiple kinase activities in live single cells. *Cell.* 2014;157: 1724–1734.
100. Hiasa S, Fujimori T, Aiki S, Ueda H, Tsuboi T, Kitaguchi T. Development of green fluorescent protein-based cAMP indicators with expanded dynamic range and various working ranges. *Jxiv.* 2022. Available: <https://jxiv.jst.go.jp/index.php/jxiv/preprint/view/108/>
101. Harada K, Ito M, Wang X, Tanaka M, Wongso D, Konno A, et al. Red fluorescent

- protein-based cAMP indicator applicable to optogenetics and in vivo imaging. *Sci Rep.* 2017;7: 7351.
102. Odaka H, Arai S, Inoue T, Kitaguchi T. Genetically-encoded yellow fluorescent cAMP indicator with an expanded dynamic range for dual-color imaging. *PLoS One.* 2014;9: e100252.
 103. Roux AE, Quissac A, Chartrand P, Ferbeyre G, Rokeach LA. Regulation of chronological aging in *Schizosaccharomyces pombe* by the protein kinases Pka1 and Sck2. *Aging Cell.* 2006;5: 345–357.
 104. Matsuo Y, Kawamukai M. cAMP-dependent protein kinase involves calcium tolerance through the regulation of Prz1 in *Schizosaccharomyces pombe*. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2017;81: 231–241.
 105. Kelkar M, Martin SG. PKA antagonizes CLASP-dependent microtubule stabilization to re-localize Pom1 and buffer cell size upon glucose limitation. *Nat Commun.* 2015;6: 8445.
 106. Stewart-Ornstein J, Chen S, Bhatnagar R, Weissman JS, El-Samad H. Model-guided optogenetic study of PKA signaling in budding yeast. *Mol Biol Cell.* 2017;28: 221–227.
 107. Stierl M, Stumpf P, Udvari D, Gueta R, Hagedorn R, Losi A, et al. Light modulation of cellular cAMP by a small bacterial photoactivated adenylyl cyclase, bPAC, of the soil bacterium *Beggiatoa*. *J Biol Chem.* 2011;286: 1181–1188.
 108. Chernov KG, Redchuk TA, Omelina ES, Verkhusha VV. Near-Infrared Fluorescent Proteins, Biosensors, and Optogenetic Tools Engineered from Phytochromes. *Chem Rev.* 2017;117: 6423–6446.
 109. Rodriguez EA, Tran GN, Gross LA, Crisp JL, Shu X, Lin JY, et al. A far-red fluorescent protein evolved from a cyanobacterial phycobiliprotein. *Nat Methods.* 2016;13: 763–769.
 110. Filonov GS, Piatkevich KD, Ting L-M, Zhang J, Kim K, Verkhusha VV. Bright and stable near-infrared fluorescent protein for in vivo imaging. *Nat Biotechnol.* 2011;29: 757–761.
 111. Geller SH, Antwi EB, Di Ventura B, McClean MN. Optogenetic Repressors of Gene Expression in Yeasts Using Light-Controlled Nuclear Localization. *Cell Mol Bioeng.* 2019;12: 511–528.
 112. Li Y, Jin M, O’Laughlin R, Bittihn P, Tsimring LS, Pillus L, et al. Multigenerational silencing dynamics control cell aging. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017;114: 11253–11258.
 113. Tojima T, Suda Y, Ishii M, Kurokawa K, Nakano A. Spatiotemporal dissection of the trans-Golgi network in budding yeast. *J Cell Sci.* 2019;132. doi:10.1242/jcs.231159
 114. Wosika V, Durandau E, Varidel C, Aymoz D, Schmitt M, Pelet S. New families of single integration vectors and gene tagging plasmids for genetic manipulations in budding yeast. *Mol Genet Genomics.* 2016;291: 2231–2240.

115. Maryu G, Matsuda M, Aoki K. Multiplexed Fluorescence Imaging of ERK and Akt Activities and Cell-cycle Progression. *Cell Struct Funct.* 2016;41: 81–92.
116. Fushimi K, Narikawa R. Phytochromes and Cyanobacteriochromes: Photoreceptor Molecules Incorporating a Linear Tetrapyrrole Chromophore. In: Yawo H, Kandori H, Koizumi A, Kageyama R, editors. *Optogenetics: Light-Sensing Proteins and Their Applications in Neuroscience and Beyond.* Singapore: Springer Singapore; 2021. pp. 167–187.
117. Terry MJ, Lagarias JC. Holophytochrome assembly. Coupled assay for phytychromobilin synthase in organello. *J Biol Chem.* 1991;266: 22215–22221.
118. Beale SI. Biosynthesis of phycobilins. *Chem Rev.* 1993;93: 785–802.
119. Cornejo J, Willows RD, Beale SI. Phytobilin biosynthesis: cloning and expression of a gene encoding soluble ferredoxin-dependent heme oxygenase from *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant J.* 1998;15: 99–107.
120. Mukougawa K, Kanamoto H, Kobayashi T, Yokota A, Kohchi T. Metabolic engineering to produce phytochromes with phytychromobilin, phycocyanobilin, or phycoerythrobilin chromophore in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* 2006;580: 1333–1338.
121. Müller K, Engesser R, Timmer J, Nagy F, Zurbriggen MD, Weber W. Synthesis of phycocyanobilin in mammalian cells. *Chem Commun .* 2013;49: 8970–8972.
122. Frankenberg N, Mukougawa K, Kohchi T, Lagarias JC. Functional genomic analysis of the HY2 family of ferredoxin-dependent bilin reductases from oxygenic photosynthetic organisms. *Plant Cell.* 2001;13: 965–978.
123. Kohchi T, Mukougawa K, Frankenberg N, Masuda M, Yokota A, Lagarias JC. The *Arabidopsis* HY2 gene encodes phytychromobilin synthase, a ferredoxin-dependent biliverdin reductase. *Plant Cell.* 2001;13: 425–436.
124. Muramoto T, Kohchi T, Yokota A, Hwang I, Goodman HM. The *Arabidopsis* photomorphogenic mutant *hyl* is deficient in phytychrome chromophore biosynthesis as a result of a mutation in a plastid heme oxygenase. *Plant Cell.* 1999;11: 335–348.
125. Gambetta GA, Lagarias JC. Genetic engineering of phytychrome biosynthesis in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98: 10566–10571.
126. Hochrein L, Machens F, Messerschmidt K, Mueller-Roeber B. PhiReX: a programmable and red light-regulated protein expression switch for yeast. *Nucleic Acids Res.* 2017;45: 9193–9205.
127. Kyriakakis P, Catanho M, Hoffner N, Thavarajah W, Hu VJ, Chao S-S, et al. Biosynthesis of Orthogonal Molecules Using Ferredoxin and Ferredoxin-NADP⁺ Reductase Systems Enables Genetically Encoded PhyB Optogenetics. *ACS Synth Biol.* 2018;7: 706–717.
128. Landgraf FT, Forreiter C, Hurtado Picó A, Lamparter T, Hughes J. Recombinant holophytochrome in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* 2001;508: 459–462.

129. Shin A-Y, Han Y-J, Song P-S, Kim J-I. Expression of recombinant full-length plant phytochromes assembled with phytochromobilin in *Pichia pastoris*. *FEBS Lett.* 2014;588: 2964–2970.
130. Tooley AJ, Cai YA, Glazer AN. Biosynthesis of a fluorescent cyanobacterial C-phycoyanin holo- α subunit in a heterologous host. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2001;98: 10560–10565.
131. Uda Y, Goto Y, Oda S, Kohchi T, Matsuda M, Aoki K. Efficient synthesis of phycocyanobilin in mammalian cells for optogenetic control of cell signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017;114: 11962–11967.
132. Uda Y, Miura H, Goto Y, Yamamoto K, Mii Y, Kondo Y, et al. Improvement of Phycocyanobilin Synthesis for Genetically Encoded Phytochrome-Based Optogenetics. *ACS Chem Biol.* 2020;15: 2896–2906.
133. Piatkevich KD, Suk H-J, Kodandaramaiah SB, Yoshida F, DeGennaro EM, Drobizhev M, et al. Near-Infrared Fluorescent Proteins Engineered from Bacterial Phytochromes in Neuroimaging. *Biophys J.* 2017;113: 2299–2309.
134. Shemetov AA, Oliinyk OS, Verkhusha VV. How to Increase Brightness of Near-Infrared Fluorescent Proteins in Mammalian Cells. *Cell Chem Biol.* 2017;24: 758–766.e3.
135. Kobachi K, Kuno S, Sato S, Sumiyama K, Matsuda M, Terai K. Biliverdin Reductase-A Deficiency Brighten and Sensitize Biliverdin-binding Chromoproteins. *Cell Struct Funct.* 2020;45: 131–141.
136. Rao AU, Carta LK, Lesuisse E, Hamza I. Lack of heme synthesis in a free-living eukaryote. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102: 4270–4275.
137. Ding W-L, Miao D, Hou Y-N, Jiang S-P, Zhao B-Q, Zhou M, et al. Small monomeric and highly stable near-infrared fluorescent markers derived from the thermophilic phycobiliprotein, ApcF2. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 2017;1864: 1877–1886.
138. Koch A, Rode HB, Richters A, Rauh D, Hauf S. A chemical genetic approach for covalent inhibition of analogue-sensitive aurora kinase. *ACS Chem Biol.* 2012;7: 723–731.
139. Schmidt U, Weigert M, Broaddus C, Myers G. Cell Detection with Star-Convex Polygons. *Medical Image Computing and Computer Assisted Intervention – MICCAI 2018.* Springer International Publishing; 2018. pp. 265–273.
140. Weigert M, Schmidt U, Haase R, Sugawara K, Myers G. Star-convex polyhedra for 3D object detection and segmentation in microscopy. *2020 IEEE Winter Conference on Applications of Computer Vision (WACV).* IEEE; 2020. doi:10.1109/wacv45572.2020.9093435
141. Kudo T, Jeknić S, Macklin DN, Akhter S, Hughey JJ, Regot S, et al. Live-cell measurements of kinase activity in single cells using translocation reporters. *Nat Protoc.* 2018;13: 155–169.

142. Li Y, Steenwyk JL, Chang Y, Wang Y, James TY, Stajich JE, et al. A genome-scale phylogeny of the kingdom Fungi. *Curr Biol.* 2021;31: 1653–1665.e5.
143. Nguyen TA, Cissé OH, Yun Wong J, Zheng P, Hewitt D, Nowrousian M, et al. Innovation and constraint leading to complex multicellularity in the Ascomycota. *Nat Commun.* 2017;8: 14444.
144. James TY, Stajich JE, Hittinger CT, Rokas A. Toward a Fully Resolved Fungal Tree of Life. *Annu Rev Microbiol.* 2020;74: 291–313.
145. Blumenstein A, Vienken K, Tasler R, Purschwitz J, Veith D, Frankenberg-Dinkel N, et al. The *Aspergillus nidulans* phytochrome FphA represses sexual development in red light. *Curr Biol.* 2005;15: 1833–1838.
146. Pendrak ML, Chao MP, Yan SS, Roberts DD. Heme Oxygenase in *Candida albicans* Is Regulated by Hemoglobin and Is Necessary for Metabolism of Exogenous Heme and Hemoglobin to α -Biliverdin*. *J Biol Chem.* 2004;279: 3426–3433.
147. Matsuo Y, McInnis B, Marcus S. Regulation of the subcellular localization of cyclic AMP-dependent protein kinase in response to physiological stresses and sexual differentiation in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Eukaryot Cell.* 2008;7: 1450–1459.
148. Miura H, Kondo Y, Matsuda M, Aoki K. Cell-to-Cell Heterogeneity in p38-Mediated Cross-Inhibition of JNK Causes Stochastic Cell Death. *Cell Rep.* 2018;24: 2658–2668.
149. Rhie G, Beale SI. Biosynthesis of phycobilins. Ferredoxin-supported nadph-independent heme oxygenase and phycobilin-forming activities from *Cyanidium caldarium*. *J Biol Chem.* 1992;267: 16088–16093.
150. Stepanenko OV, Stepanenko OV, Shpironok OG, Fonin AV, Kuznetsova IM, Turoverov KK. Near-Infrared Markers based on Bacterial Phytochromes with Phycocyanobilin as a Chromophore. *Int J Mol Sci.* 2019;20. doi:10.3390/ijms20236067
151. Kinjo M, Sakata H, Mikuni S. Basic fluorescence correlation spectroscopy setup and measurement. *Cold Spring Harb Protoc.* 2011;2011: 1262–1266.
152. Sudhakaran T, Liu P, Foo YH, Bu W, Lim KB, Wohland T, et al. Determination of in Vivo Dissociation Constant, KD, of Cdc42-Effector Complexes in Live Mammalian Cells Using Single Wavelength Fluorescence Cross-correlation Spectroscopy*. *J Biol Chem.* 2009;284: 13602–13609.
153. Shi X, Foo YH, Sudhakaran T, Chong S-W, Korzh V, Ahmed S, et al. Determination of dissociation constants in living zebrafish embryos with single wavelength fluorescence cross-correlation spectroscopy. *Biophys J.* 2009;97: 678–686.
154. Longtine MS, McKenzie A 3rd, Demarini DJ, Shah NG, Wach A, Brachat A, et al. Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* 1998;14: 953–961.
155. Shcherbakova DM, Baloban M, Emelyanov AV, Brenowitz M, Guo P, Verkhusha VV. Bright monomeric near-infrared fluorescent proteins as tags and biosensors for

- multiscale imaging. *Nat Commun.* 2016;7: 12405.
156. Ponsioen B, Zhao J, Riedl J, Zwartkruis F, van der Krogt G, Zacco M, et al. Detecting cAMP-induced Epac activation by fluorescence resonance energy transfer: Epac as a novel cAMP indicator. *EMBO Rep.* 2004;5: 1176–1180.
 157. Wang L, Wu C, Peng W, Zhou Z, Zeng J, Li X, et al. A high-performance genetically encoded fluorescent indicator for in vivo cAMP imaging. *Nat Commun.* 2022;13: 5363.
 158. Oliinyk OS, Shemetov AA, Pletnev S, Shcherbakova DM, Verkhusha VV. Smallest near-infrared fluorescent protein evolved from cyanobacteriochrome as versatile tag for spectral multiplexing. *Nat Commun.* 2019;10: 279.
 159. Redchuk TA, Omelina ES, Chernov KG, Verkhusha VV. Near-infrared optogenetic pair for protein regulation and spectral multiplexing. *Nat Chem Biol.* 2017;13: 633–639.
 160. Qian Y, Cosio DMO, Piatkevich KD, Aufmkolk S, Su W-C, Celiker OT, et al. Improved genetically encoded near-infrared fluorescent calcium ion indicators for in vivo imaging. *PLoS Biol.* 2020;18: e3000965.
 161. Monakhov MV, Matlashov ME, Colavita M, Song C, Shcherbakova DM, Antic SD, et al. Screening and Cellular Characterization of Genetically Encoded Voltage Indicators Based on Near-Infrared Fluorescent Proteins. *ACS Chem Neurosci.* 2020;11: 3523–3531.
 162. Kaberniuk AA, Shemetov AA, Verkhusha VV. A bacterial phytochrome-based optogenetic system controllable with near-infrared light. *Nat Methods.* 2016;13: 591–597.
 163. Oda S, Sato-Ebine E, Nakamura A, Kimura KD, Aoki K. Optogenetic control of cell signaling with red/far-red light-responsive optogenetic tools in *Caenorhabditis elegans*. *bioRxiv.* 2022. p. 2022.08.12.503710. doi:10.1101/2022.08.12.503710
 164. Froehlich AC, Noh B, Vierstra RD, Loros J, Dunlap JC. Genetic and molecular analysis of phytochromes from the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Eukaryot Cell.* 2005;4: 2140–2152.

謝辞

本研究を遂行するにあたり、私を博士課程から受け入れ、丁寧にご指導して下さいました、基礎生物学研究所 青木 一洋 教授に心より感謝申し上げます。

分裂酵母の実験について一からご指導して下さいました、基礎生物学研究所 後藤 祐平 助教に心より感謝申し上げます。実験データの解析や胞子の細胞質物性について議論を深めて下さいました、基礎生物学研究所 近藤 洋平 助教に心より感謝申し上げます。また、日頃から研究の議論、実験のサポート、心の支えになって下さいました、基礎生物学研究所 定量生物学研究部門の皆様に深く感謝申し上げます。

生命科学プロGRESSにおいて、本研究を進める上での貴重な意見・議論をさせて下さいました、基礎生物学研究所 中山 潤一 教授、同研究所 鎌田 芳彰 助教、同研究所 山下 朗 准教授 (現 名古屋大学 低温プラズマ科学研究センター 特任准教授)、同研究所 三井 優輔 助教、同研究所 大坪 瑤子 特任助教に深く感謝申し上げます。鎌田 芳彰 助教からは、出芽酵母の細胞株とプラスミドをお譲りして頂きました。併せて感謝申し上げます。

タンパク質発現用プラスミドをお譲りして下さいました、生命創成探求センター 加藤 晃一 教授に感謝申し上げます。分裂酵母の細胞株を分譲して下さいました、ナショナルバイオリソースプロジェクト (NBRP) に感謝申し上げます。

iRFP の蛍光量子収率の測定でご指導して下さいました、東京大学大学院 医学系研究科 神谷 真子 准教授 (現 東京工業大学 生命理工学院 教授)、同大学院 薬学系研究科 藤岡 礼任 氏に感謝申し上げます。

また、おかしん先端科学奨学金、および、日本学術振興会 特別研究員制度のご支援を賜りましたことを心より御礼申し上げます。

最後に、大学入学から博士課程までの 9 年間に渡って、日頃から支えてくださった両親に心より感謝申し上げます。