

令和元年6月17日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K07057

研究課題名(和文) 分裂酵母ADAMメタロプロテアーゼによる胞子表層構造の構築の分子メカニズム

研究課題名(英文) Molecular dissection of the spore surface structure by the fission yeast ADAM

研究代表者

中村 太郎 (Nakamura, Taro)

大阪市立大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号：30291082

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：ADAMは真核生物で保存されたマトリックス型プロテアーゼで、高等生物ではさまざまな高次生命現象に関わっている。分裂酵母*S. pombe*はMde10というADAMを持つ最も下等な生物であり、Mde10は胞子の表層構築(凸凹構造の形成)に関わっている。本研究ではMde10のさまざまな欠失変異株の構築と解析から、プロテアーゼやディスインテグリンといった高等生物に保存されるドメインではなく、膜貫通ドメインが機能に重要であることを明らかにした。また、胞子のデコボコ構造の構築に関係する因子の取得を試みたところ、ファシクリンドメインをもつタンパク質や、アミラーゼドメインを持つタンパク質が取得された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

申請者らはMde10の機能には、他のADAMで保存されているプロテアーゼやディスインテグリンドメインではなく、膜貫通ドメインが重要であることを明らかにした。高等生物においてADAMファミリータンパク質は免疫や受精などの高次生命現象で極めて重要な機能を果たすマトリックス型プロテアーゼである。本研究から得られた結果は、これまで知られているADAMの機能発現とは全く異なるものであり、ADAMの新しい機能に重要な知見を与えると考えられる。

研究成果の概要(英文)：ADAMs is a matrix-type protease and is involved in various life phenomena in higher organisms. The fission yeast *S. pombe* is the simplest organism which possesses ADAM (Mde10). Mde10 is responsible for construction of the characteristic structure of the spore surface (spike structure). In this study, we constructed various deletion mutants of Mde10 and addressed the interesting feature. i) Neither protease domain nor disintegrin domain was required for the function of Mde10. ii) The transmembrane domain was important for the formation of the spike structure. Furthermore, we identified two novel spike proteins (a fasciclin-domain protein and an alpha-amylase domain protein) involved in the spike formation.

研究分野：分子遺伝学

キーワード：ADAM yeast cell wall spore

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ADAM (A Disintegrin And Metalloprotease) は細胞の表層ではたらき、細胞の接着・受精・シグナル伝達などさまざまな高次生命現象に関わるプロテアーゼである。また、ADAM は細胞のがん化、リウマチ、アルツハイマー病などにも関与していることがわかっており、その機能解明は極めて重要である。ADAM は特徴的なドメインを有している (図)。シグナル配列、メタロプロテアーゼ、ディスインテグリン、システインリッチ、膜貫通ドメインであり、基本的に保存されている。分裂酵母は ADAM を持つ最も単純な生物であり、胞子の表層構築に関わっている。

2. 研究の目的

本研究は分裂酵母 ADAM の Mde10 がどのように胞子表層構築を制御するか、その分子メカニズムを明らかにすることを目的とする。そのため、

- (1) *mde10* の様々な変異遺伝子を作製し、その構造と機能の関連を調べる。
- (2) Mde10 のターゲットを明らかにする。
- (3) Mde10 による胞子表層構造構築の分子モデルを提唱する。

3. 研究の方法

(1) Mde10 ドメイン欠失株の作製と解析

上でも述べたように、Mde10 のメタロプロテアーゼドメイン、ディスインテグリン、システインリッチドメインは胞子の Isp3 層の構築には必要あるが、凸凹構造の構築には重要でない可能性が示唆されている。Mde10 のさまざまなドメイン欠失変異株を作製していき、それらの変異株胞子の凸凹構造がどのように変化していくかを調べる。

(2) Mde10 のターゲット因子の取得と解析：

*mde10* 破壊株の胞子は表面の凸凹構造がなくなるので、逆に表面の凸凹構造ができない変異株をスクリーニング、その原因遺伝子を同定することにより、Mde10 のターゲットを含めた周辺ではたらく因子の取得を試みる。

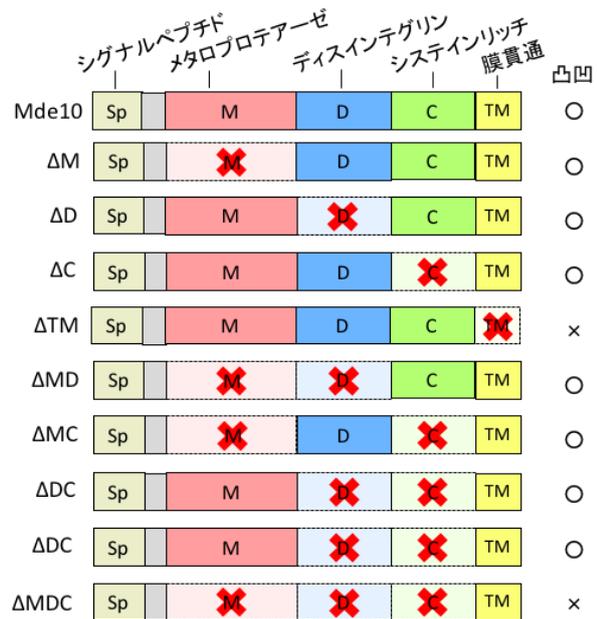
4. 研究成果

(1) Mde10 ドメイン欠失株の作製と解析

図に示すように Mde10 の様々なドメインを欠失させた変異株を取得した。次にこれら変異株の胞子の表層構造を電子顕微鏡で観察した。

Mde10 の構造と機能の関連を調べるため、様々な変異遺伝子を試みた。Mde10 はシグナル配列、メタロプロテアーゼドメイン、システインリッチドメイン、ディスインテグリンドメイン、膜貫通ドメインの一重、二重、三重欠失変異株を全て完成させ、それらの形質について観察した。

大変興味深いことに、膜貫通ドメインを除くどのドメインを欠失させても凸凹構造は見られた。また、これらのドメインの二重ドメイン欠失株も凸凹形成に大きな欠損はみられなかった。一方、膜貫通ドメインを欠失させると凸凹構造は全く形成されなかった。これらの結果から、Mde10 の膜貫通ドメインは単に胞子膜への局在だけでなく、膜において他の膜タンパク質との相互作用に関わる可能性が示唆された。



(2) Mde10 のターゲット因子の取得と解析：

表面の凸凹構造に欠損がみられる変異株のスクリーニングをおこなった。胞子形成時に発現の上がる *mug*, *meu* 遺伝子の破壊株およそ 200 株の胞子について、表面構造に異常があるかを調べた。まず、位相差顕微鏡で胞子の形態が野生型胞子と異なるものを約 40 株取得した。このうち 10 株について電子顕微鏡を用いて表面構造を調べた。その結果、*mug57Δ* と *meu30Δ* の 2 株の胞子では凸凹はみられたものの数が多くより小さかった。Mug57 はファシクリンドメインをもつタンパク質である。ファシクリンは細胞表層で働き、植物細胞では細胞壁の構築に関わっていることが知られている。一方、Meu30 は  $\alpha$  アミラーゼドメイン、シグナルペプチド、膜貫通ドメインを持つタンパク質である。GFP 融合タンパク質を発現させ、蛍光顕微鏡下で観察したところ、いずれのタンパク質も胞子壁にドット状に局在が観察された。また、分裂酵母の胞子壁は  $\alpha$  グルカンをもっていることから、まず、Mde10 により小さな凸凹が形成され、その後

Mug57 と Meu30 が協調してはたらき、凸凹構造を構築している可能性が示唆された。

また、(1) の結果と合わせて考えると、Mde10 は膜貫通ドメインを介してこれらのタンパク質と相互作用をしている可能性も示唆された。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① Niimi T, [Nakamura T.](#) (2018) The fission yeast SPB component Dms1 is required to initiate forespore membrane formation and maintain meiotic SPB components. *PLoS One* 13(5): e0197879  
DOI: 10.1371/journal.pone.0197879. 査読有
- ② Imada K, [Nakamura T.](#) (2017) Meiosis-specific localization of the exocytic Rab Ypt2 in fission yeast. *Small GTPases* Sep 6:1-9  
DOI: 10.1080/21541248.2017.1356425. 査読有
- ③ Imada K, [Nakamura T.](#) (2016) The exocytic Rabs Ypt3 and Ypt2 regulate the early step of biogenesis of the spore plasma membrane in fission yeast. *Mol. Biol. Cell* 27(21):3317-3328  
DOI: 10.1091/mbc.E16-03-0162 査読有

[学会発表] (計 15 件)

- ① ○増田大輝、田原悠平、宮田真人、[中村太郎](#) (大阪市大・院理、大阪市大複合先端研究機構) 分裂酵母の胞子表面を覆うデコボコ構造の形成に関与する遺伝子の取得と解析 日本農芸化学会 2019 年度東京大会 (2019)
- ② ○吉川佳里奈、酒井崇史、[中村太郎](#) (大阪市大・院理) 分裂酵母胞子表層タンパク質 Isp3 を用いた未知の分泌メカニズムの解析 日本農芸化学会 2019 年度東京大会 (2019)
- ③ ○張 博文、[中村太郎](#) (大阪市大・院理) 胞子成熟における前胞子膜外膜の分解に関わる遺伝子の解析 酵母遺伝学フォーラム 第 51 回研究報告会 (2018)
- ④ ○張 博文、増田風子、[中村太郎](#) (大阪市大・院理) 分裂酵母における胞子成熟に関わる遺伝子の取得と解析 日本農芸化学会 2018 年度名古屋大会 (2018)
- ⑤ ○酒井崇史、田原悠平、宮田真人、[中村太郎](#) (大阪市大・院理、大阪市大複合先端研究機構) 分裂酵母胞子の最外タンパク質層構築に関連する因子の同定と解析 日本農芸化学会 2018 年度名古屋大会 (2018)
- ⑥ ○今田一姫、[中村太郎](#) (大阪市大・院理) 減数分裂時における Rab ファミリー-small GTPase Ypt2 の SPB 局在機構の解析 酵母遺伝学フォーラム 第 50 回研究報告会 (2017)
- ⑦ ○張 博文、今田一姫、寺口絵里香、田原悠平、宮田真人、[中村太郎](#) (大阪市大・院理、大阪市大複合先端研究機構) 分裂酵母 *S. pombe* における前胞子膜の外膜溶解に関わる遺伝子の同定と解析 日本農芸化学会 2017 年度大会 (2017)
- ⑧ ○今田一姫、[中村太郎](#) (大阪市大・院理) 分裂酵母の胞子形成において、分泌経路の Rab はスピンドル極体に局在し、胞子細胞膜の形成開始を調節する 第 39 回 日本分子生物学会年会 (2017)
- ⑨ ○[Taro Nakamura](#), Touko Niimi, Kazuki Imada (大阪市大・院理) Initiation of spore plasma membrane formation in *S. pombe*. *International Congress of Yeast* 14 (2016)
- ⑩ ○Ayako Matsuzaki, [Taro Nakamura](#) (大阪市大・院理) Comprehensive analysis of fission yeast spore proteins. *International Congress of Yeast* 14 (2016)
- ⑪ ○Takafumi Sakai, [Taro Nakamura](#) (大阪市大・院理) Identification and analysis of genes involved in the outermost layer construction of the spore wall in *S. pombe*. *International Congress of Yeast* 14 (2016)
- ⑫ ○酒井崇史、[中村太郎](#) (大阪市大・院理) 分裂酵母胞子壁最外層(Isp3 層)の構築に関わる遺伝子の取得と解析 酵母遺伝学フォーラム 第 49 回研究報告会 (2016)

⑬ ○張 博文、今田一姫、寺口絵里香、田原悠平、宮田真人、中村太郎（大阪市大・院理、大阪市大複合先端研究機構）分裂酵母の胞子壁形成に関わる遺伝子の取得と解析酵母遺伝学フォーラム 第49回研究報告会（2016）

⑭ ○松崎彩子、東谷未来、中村太郎（大阪市大・院理）分裂酵母における胞子特異的なタンパク質の網羅的解析 日本農芸化学会 2016年大会（2016）

⑮ ○酒井崇史、中村太郎（大阪市大・院理）分裂酵母胞子壁の最外タンパク質層（Isp3層）構築に関わる遺伝子の取得と解析 日本農芸化学会 2016年大会（2016）

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

○取得状況（計0件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.sci.osaka-cu.ac.jp/biol/cbiol/pombe/pombe\\_J.htm](http://www.sci.osaka-cu.ac.jp/biol/cbiol/pombe/pombe_J.htm)

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。