

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07364

研究課題名(和文)細胞質分裂進行を制御する酵母リン脂質代謝酵素の機能解析

研究課題名(英文)Functional analysis of yeast phospholipase on cytokinesis.

研究代表者

玉置 尚徳(TAMAKI, Hisanori)

鹿児島大学・農水産獣医学域農学系・教授

研究者番号：20212045

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)：本研究では、分裂酵母におけるホスホリパーゼPah1の細胞質分裂における新たな機能の解明を目的として研究を行った。pah1遺伝子は必須遺伝子であるため様々な条件致死株の構築を行ったが、(1)Pah1に分解シグナルを付加したデグロンシステム、(2)urg1プロモーターを用いたウラシル除去による転写抑制システム、(3)テトラサイクリン応答性プロモーターを用いた転写抑制システムでは、完全な条件致死を引き起こせなかったために、Pah1の機能解明には至っていない。今後、Pah1の温度感受性変異株の取得を行うことで、Pah1の細胞質分裂における機能を明らかにできるものとする。

研究成果の概要(英文)：In this study, we tried to clarify the function of phospholipase Pah1 on cytokinesis in fission yeast. Since pah1 is essential gene, we constructed some pah1-conditional knock out strains. However, pah1 conditional knock out strain constructed such as (1)pah1 degon strain, (2)uracil regulatable pah1 strain, and (3)tetracycline regulated pah1 repressible strain did not work well, and thus functional analysis of Pah1 is not completed yet. To elucidate the function of pah1, pah1 temperature sensitive strain should be obtained.

研究分野：応用微生物学

キーワード：細胞質分裂 脂質分解酵素 分裂酵母

1. 研究開始当初の背景

研究代表者は、細胞膜を構成するリン脂質の修復に関与するリン脂質代謝酵素について研究を行っていた。分裂酵母に見出したホスホリパーゼ Pah1 について検討を行い、GFPとの融合タンパク質を用いて細胞内局在性を調べたところ、細胞分裂時に現れる隔壁近傍に顕著に集積することが示された。また、二倍体細胞を用いて2つある当該酵素遺伝子の1方を破壊したヘテロ破壊株を作成し、孢子形成後マイクロマニピュレーターを用いて1つの細胞に由来する4つの胞子を単離・培養したところ(四分子解析)4つの胞子のうち2つでのみコロニーの形成が認められ、遺伝子破壊株ではコロニーの生育が認められなかったことから、当該酵素遺伝子は必須遺伝子であると考えられた。さらに、顕微鏡観察により遺伝子破壊株では、孢子発芽後に複数の隔壁を有した状態で細胞質分裂が停止していたことから、本遺伝子産物は細胞質分裂において2つの細胞を切り離す段階で中心的役割を担っていることが考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、これまでに細胞膜の修復に関与することが報告されてきた脂質代謝酵素に関して、細胞質分裂との関連を調べることでこれまでに知られていないホスホリパーゼによる細胞質分裂の制御機構の解明を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

(1)ホスホリパーゼ遺伝子の破壊は細胞質分裂不全により細胞内に複数の隔壁を有する形で致死となる可能性が示された。そこで、生細胞が死に至る過程を詳細に観察する目的で、まず改良型デグロンシステムを用いて条件致死変異株の作成を行った。デグロンシステムとは、植物ホルモンであるオーキシンによって植物細胞において活性化されるタンパク質分解機構を酵母に適用した方法であり、標的とするタンパク質に分解標識(デグロン)を付加することでオーキシン依存的にユビキチン化され短時間に分解されるシステムである。改良型デグロンシステムでは、さらにチアミンの添加によって転写をシャットダウンできる *nmt81* プロモーターを用いている。ホスホリパーゼ遺伝子を標的とした改良型デグロンシステムの構築を行い、オーキシンとチアミン添加により細胞内のホスホリパーゼが速やかに分解されるかをホスホリパーゼに対するペプチド抗体を用いたウエスタンブロットにより確認した。

(2)次に、ウラシルにより転写制御できる *urg1* プロモーターを用いたホスホリパーゼ遺伝子の転写制御抑制株の構築を行った。*urg1* は、ウラシルの除去によって転写が抑制

されるプロモーターである。その抑制機構は、染色体上の *urg1* の位置に於いて顕著であることから、マーカーを *ura4* として *pah1* のコーディング領域を *urg1* プロモーターの下流に導入した株を構築した。

(3)テトラサイクリンによって転写抑制される TetOFF プロモーターを染色体上の *pah1* 遺伝子上流に導入した株を構築し、テトラサイクリンによる転写抑制の効果を調べた。

(4)*Pah1* の温度感受性変異株取得を行った。*pah1* 遺伝子を正確性の低い DNA ポリメラーゼを用いて PCR 増幅を行い、カナマイシン耐性遺伝子 *kanMX6* をマーカーとして染色体上の *pah1* 遺伝子と置き換えた株を取得し、その中で 25 度では生育できるが 36 度では生育できない株を選択することで温度感受性変異株の取得を目指した。

4. 研究成果

(1)二倍体分裂酵母を用いて、一方のホスホリパーゼ遺伝子にデグロン+HA を付加した株を構築し、孢子形成を行いマイクロマニピュレーターを用いて、各胞子を単離し生成したコロニーを PCR にて調べたところ、デグロンが付加された株が取得された。しかしながら、抗体を用いてウエスタンブロットを行ったところデグロン付加株は野生株と同様に Pah1 タンパク質と同じサイズである 50kDa にのみバンドが検出された。また、HA 抗体を用いてウエスタンブロットを行ったところバンドは検出されなかった。この結果より、デグロンタンパク質がつかわれていない、もしくは正常に発現していない可能性が示唆されホスホリパーゼの C 末端側にデグロンや HA 等のタグが付くことにより正常な機能が阻害されることが考えられた。

(2)一倍体分裂酵母の *urg1* プロモーターの下流にホスホリパーゼ遺伝子を導入後、もともとのホスホリパーゼ遺伝子破壊株を構築した。株の構築はゲノムサザンにより確認した。しかしながらウラシルを除いた状態においてもホスホリパーゼ抗体を用いたウエスタンブロットにより野生株と同様にホスホリパーゼのバンドが検出された。そ

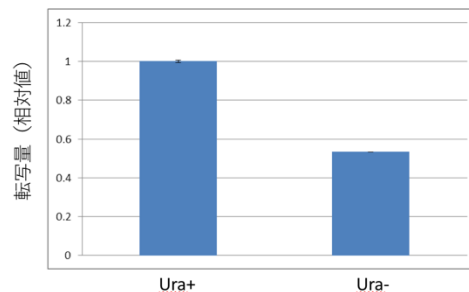


図1 *urg1*プロモーターによるホスホリパーゼ遺伝子の制御

ここで、ウラシルの有無による遺伝子の転写レベルをリアルタイム PCR を用いて解析したところ、*urg1* プロモーター制御株においてはウラシル除去条件において転写量がおよそ半分に減少していることが示された。(図 1) しかしながら、ウエスタンブロットの結果及び表現型の変化が見られなかったことから、この程度の転写抑制では遺伝子ノックアウトにおける表現型の観察は行えないことが示された。

(3)一倍体分裂酵母において *pah1* プロモーターを TetOFF プロモーターに置き換えた株を構築し、PCR にて確認した。TetOFF システム導入株の表現型をスポットアッセイにより観察した。5ng/ml のドキシサイクリン(Dox)を含む YE 固体培地と含まない YE 固体培地に TetOFF-*pah1* 株を適宜希釈したものを 5 μ l ずつスポットし、30 度にて培養した。その結果、Dox 添加の有無によって生育の差は確認できなかった。

pah1 遺伝子を TetOFF システムによって抑制した条件においても、生育に優位な差が見られなかったため、*pah1* 遺伝子の転写がどの程度抑制されているかをリアルタイム PCR によって確認した。Dox の有無における転写量を比較したところ、TetOFF-*pah1* 株では Dox の添加によって *pah1* の転写は、約 1/100 に減少していた。しかしながら Dox 添加時の転写量が野生株と比べて 20 倍も

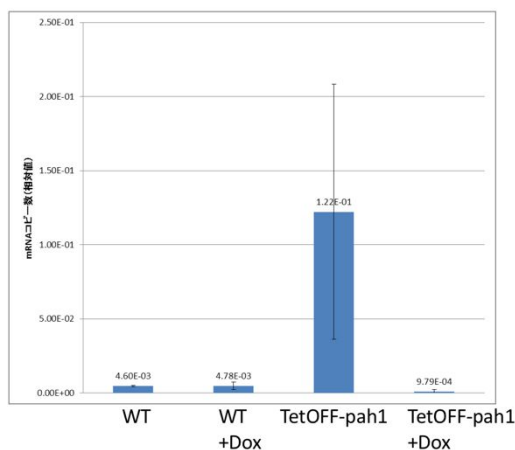


図2 TetOFFによる*pah1*の転写制御

高いため TetOFF の状態でも *pah1* の転写は野生株の約 20%に抑制されていることが分かった。(図 2) 野生株における *pah1* の転写量が低いことを踏まえると *pah1* 遺伝子は、比較的少ない転写量で発現することができ、この実験系における転写抑制レベルでは、生育に影響を与えていないことが示唆された。

(4)*Pah1* 温度感受性変異株の取得。
これまでの結果より、*Pah1* にはデグロンなどの配列の付加は、機能に影響するため用いられないこと、また、プロモーターの転

写抑制によっては、効果がみられなかったことから、*pah1* 遺伝子に PCR 法によりランダムな変異を導入し、ある一定の温度以上で機能できなくなる *Pah1* の温度感受性変異株の取得を行った。*pah1* 遺伝子を正確性の低い DNA ポリメラーゼを用いた PCR にて増幅し、カナマイシン耐性遺伝子である、*kanMX6* をマーカーとして分裂酵母の *pah1* の位置に導入した。スクリーニングは、G418 を含む寒天培地に於いて 25 度で行い、形質転換体のコロニーが生育後、別の寒天培地にレプリカし、36 度でインキュベートを行い、36 度でのみ生育できなくなる株の取得を目指した。報告書を提出する段階において約 2000 株について検討しているが、*Pah1* 温度感受性株は取得できていない。

考察

本研究においては、ホスホリパーゼ *Pah1* の分裂酵母における機能を解明することで、*Pah1* の細胞質分裂における新たな機能の解明を行う目的で研究を行った。*pah1* 遺伝子は、破壊すると致死となることから、様々な方法により条件致死株の構築を行ったが、(1)~(3)の方法で得られた条件致死株では、完全な条件致死を引き起こすことができなかったために、*Pah1* の機能解明には至っていない。今後、(4)の方法により温度感受性変異株の取得を行うことで、*Pah1* の細胞質分裂における機能を明らかにできるものとする。

< 引用文献 >

- Nishimura K., et al., *Nature Methods*, **6**, 917 (2009)
- Kanke M., et al., *BMC Cell Biology*, **12**, 8 (2011)
- Watson AT, et al., *Gene*, **484**, 75 (2011)
- Zilio N. et al., *Yeast*, **29**, 425 (2012)

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

Nanoscale domain formation of phosphatidylinositol 4-phosphate in the plasma and vacuolar membranes of living yeast cells. Kanna Tomioku, Mikiko Shigekuni, Hiroki Hayashi, Akane Yoshida, Taiki Futagami, Hisanori Tamaki, Kenji Tanabe, Akikazu Fujita. (2018) *Eur. J. Cell Biol.* doi: 10.1016/j.ejcb.2018.03.007. 査読有り

[学会発表] (計 6 件)

福永嵩大、吉崎由美子、奥津果優、高峯和則、二神泰基、玉置尚徳 . 分裂酵母のリン脂質分解酵素 *Pah1* の細胞内基質探索と機能解明 11/24-25/2017 The 35th Yeast Workshop

橋本加奈、奥津果優、吉崎由美子、高峯和則、二神泰基、玉置尚徳、分裂酵母新脂質分解酵素 Pah1 の機能解析。11/3-4/2016, The 34th Yeast Workshop

山下夏希、吉崎由美子、奥津果優、高峯和則、二神泰基、玉置尚徳、リゾリン脂質アシル転移酵素 Lpt1 のトポロジー解析、11/13-14/2015, The 33th Yeast Workshop

山下夏希、吉崎由美子、奥津果優、高峯和則、二神泰基、玉置尚徳、リゾリン脂質アシル転移酵素 Lpt1 の ER 膜における配向性、10/26-28/2015, 第 67 回日本生物工学会大会

山下夏希、吉崎由美子、奥津果優、高峯和則、二神泰基、玉置尚徳、リゾリン脂質アシル転移酵素 Lpt1 のトポロジー解析、8/31-9/2/2015、第 48 回酵母遺伝学フォーラム

玉置尚徳、酵母細胞膜リン脂質リモデリングの解析、5/29/2015、日本農芸化学会西日本支部例会

〔その他〕

ホームページ等

<http://shochu.agri.kagoshima-u.ac.jp/honkaku/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

玉置 尚徳 (TAMAKI Hisanori)

鹿児島大学・農水産獣医学域農学系・教授

研究者番号：20212045

(2) 研究分担者

二神 泰基 (FUTAGAMI Taiki)

鹿児島大学・農水産獣医学域農学系・准教授

授

研究者番号：60512027