

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18525

研究課題名(和文) 分裂酵母における胞子への選択的ミトコンドリア継承機構の解明

研究課題名(英文) Selective inheritance of mitochondria from mother cells into spores in fission yeast

研究代表者

高稲 正勝 (Takaine, Masakatsu)

群馬大学・未来先端研究機構・助教

研究者番号：20573215

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：分裂酵母の胞子形成関連因子Npg1の細胞内局在および機能を制御する上流因子を探索したところ、Npg1は減数第一分裂期以降にオーロラキナーゼArk1によりその局在や機能が制御されていることが示唆された。またATPバイオセンサーを導入して、減数分裂期から胞子形成時にかけての細胞内ATP濃度を計測すると、母細胞のATP濃度が徐々に減少する一方で、胞子内ATP濃度が増大する様子が観察された。この結果は胞子形成における、厳密に制御されたエネルギー代謝の継承機構の存在を実証するものであり、現在その分子機構についてさらなる解析を行っている。

研究成果の概要(英文)：We have shown that a meiosis-specific protein Npg1 is involved in efficient sporulation and spore viability in fission yeast. To further elucidate its molecular mechanism, in this study, we first explored upstream factor that regulates intracellular localization and function of Npg1. Our results suggested that aurora-B kinase Ark1 may regulate localization and function of Npg1 after meiosis I and during sporulation.

We also examined intracellular energy status during meiosis and sporulation by visualizing intracellular ATP levels using an ATP biosensor QUEEN. As meiosis and sporulation progressed, ATP levels in mother cells (zygotes or asci) gradually decreased, while ATP levels in prespores and spores increased. These results suggest a well-controlled inheritance of energy metabolism during spore assembly, which we hypothesized in the application of this study. Now we are trying to elucidate mechanisms that regulate cellular energy status during sporulation at a molecular level.

研究分野：細胞生物学

キーワード：ミトコンドリア 分裂酵母 配偶子形成 エネルギー代謝 ATP オーロラキナーゼ バイオセンサー

1. 研究開始当初の背景

胞子形成は酵母の配偶子形成に相当する過程であり、二倍体細胞内で二回の減数分裂を経て、4つの一倍体核が形成された後、4つの胞子が新生する。胞子の細胞膜(胞子膜)は核の極近傍から、核を包み込むように形成されるが、興味深いことに、完成した胞子内には一揃いのオルガネラが確実に含まれている。中でもミトコンドリア(以下Mtと省略)は新規に生成されないため、母細胞から小さな胞子へ積極的にMtを分配する機構があることが示唆される。しかし分裂酵母の減数分裂期および胞子形成過程におけるMtの経時観察はされておらず、その動態は不明である。出芽酵母ではMtは核膜に付随することで胞子内に取り込まれると推測されている (Gorich and Shaw, 2004; Suda et al., 2007) が、分裂酵母ではそのような様子は見られず(高稲、未発表データ)、別の機構が働いていると考えられた。

近年ではMt活性と疾患との関係が医学的、社会的に注目されている。細胞のエネルギーであるアデノシン3リン酸 (ATP) 産生を担うMtは同時に大量の活性酸素も産生するため、絶えず酸化ストレスに曝されている。細胞内では活性酸素によって損傷したMtDNAやタンパク質を修復・分解したり、あるいは著しく損傷したMtそのものをオートファジーにより分解する(マイトファジー)ことにより、Mtの品質が維持されている。Mtの品質管理が異常になり不活性Mtが増加すると、細胞が機能不全に陥り、ひいてはパーキンソン病やアルツハイマー病を含む神経疾患や、II型糖尿病や脂肪肝等の代謝疾患を引き起こすことが指摘されている。またMt活性と老化との関係も注目されている。出芽酵母を用いた研究から、損傷Mtは老化の産物であると同時に老化促進因子であり、出芽により形成される娘細胞により健康なMt(還元的Mt)を選択的に分配することで、娘細胞の寿命を延伸させていること

が示唆されている (McFaline-Figueroa et al., 2011)。

これまでに申請者は分裂酵母の減数分裂期特異的遺伝子npg1が効率的な胞子膜形成に必須であること、およびnpg1遺伝子破壊株 (npg1Δ)由来の胞子の生存率が有意に低下することを示した (Takaine et al., 2014)。さらに申請者は、野生株では確実に胞子へMtが分配されるのに対し、npg1Δではその効率が半減することを発見した (高稲、未発表データ)。npg1自体はMtには局在しないため、npg1Δにおける胞子膜形成の異常が間接的にMt分配の異常を引き起こしたと考えられる。Mtを含まない細胞が生育することは不可能であるため、npg1Δ胞子の生存率低下の一因は、Mt分配効率の低下であることが示唆される。あるいはnpg1Δでは品質劣化したMtが分配され、エネルギー代謝が機能不全に陥り、胞子が生存できない可能性も考えられた。

上述の「Mtの品質と数量管理は細胞の健康維持に重要である」という知見を踏まえると、分裂酵母には胞子膜形成と共役した、(1)健全なMtを選択して、(2)それぞれの胞子に確実に分配する、いずれかあるいは両方の機構があることが予想された。(1)の機構としては、マイトファジーを含む、既知のMt品質管理システムが胞子形成時にも働いている可能性がある。またnpg1は(2)のMt分配機構、あるいは新奇のMt選択機構に関与している可能性がある。

2. 研究の目的

ミトコンドリア (Mt)は細胞の生存に必要なエネルギー生産を担うオルガネラであり、新規に生成されないため、細胞系列の維持には娘細胞がMtを適切に継承する必要がある。またMtの機能低下は代謝・神経疾患や老化の原因となる。分裂酵母の胞子形成時には、母細胞から新生胞子へ確実にMtが分配されるが、その分子機構は不明である。申請者は胞

子形成関連因子 *npg1* 遺伝子破壊株では孢子への Mt 分配が異常になり、また孢子の生存率が低下することを発見した。これは孢子形成と共役した Mt 継承機構の存在を示唆する。そこで本研究では孢子形成をモデル系として、Mt が孢子へ分配される動態や Mt 活性を高精度で計測することで、細胞新生における Mt の継承機構および品質管理機構の解明を目指した。

3. 研究の方法

孢子形成におけるミトコンドリア (Mt) の分配および品質管理の分子機構を究明するため、以下の二つのプロジェクトに大別して本研究を進めた：

(1) 孢子形成関連因子 *Npg1* の細胞内局在および機能解析

Npg1 の核内局在を既知の核内構造体と比較した。また *npg1* 遺伝子破壊株と既知の孢子形成変異株との遺伝学的関係を解析して *Npg1* の上流のシグナル伝達因子を探索した。

(2) 孢子形成時における分裂酵母細胞内エネルギー状態の可視化

当初は Mt の酸化還元状態を可視化するプローブを使用して孢子の健康状態を観察しようとしていた。しかし研究開始時点で、酵母で利用できる見込みの高い、高性能 ATP バイオセンサー (後述の QUEEN) が開発されていたため、エネルギー状態をより直接的に反映する細胞内 ATP 濃度を可視化する方針に変更し、QUEEN を分裂酵母に導入することで、孢子形成時における細胞内エネルギー状態の変動を解析した。

4. 研究成果

(1) 孢子形成因子 *Npg1* の細胞内局在の解析

Npg1 は減数分裂期 I と II の間に核内に 2-3 個のドットとして局在するため、染色体 (分裂酵母では 3 本) やその他の核内構造との相互作用が示唆された。そこで既知のマーカータンパ

ク質を利用して、セントロメア (マーカー : *Mis6*)、テロメア (マーカー : *Taz1*)、核小体と *Npg1* の局在を同時に観察して比較したが、*Npg1* のドットはいずれの構造とも局在が一致しなかった (図 1、核小体のデータは示していない)。一方、オーロラキナーゼ B *Ark1* も核内でドット状に局在することが知られていたため、*Npg1* と *Ark1* を同時に観察した所、両者の局在は非常に良く一致した (図 1)。

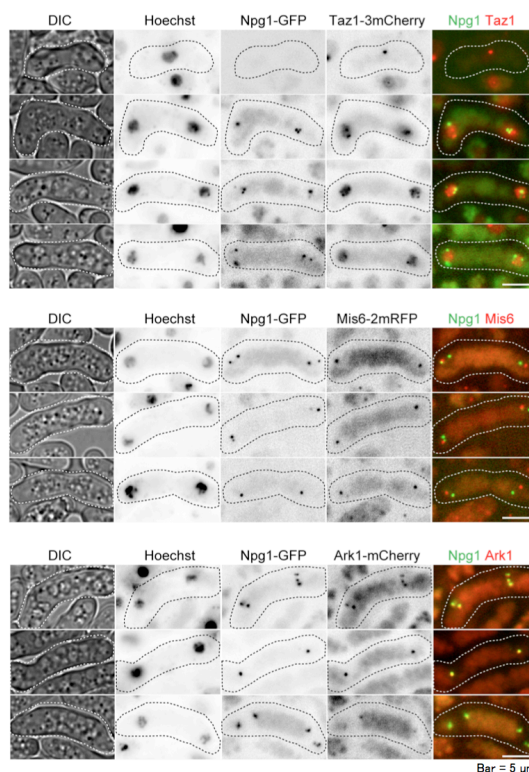


図 1: *Npg1* と既知の核内構造体マーカーとの局在比較

(2) 孢子形成因子 *Npg1* とオーロラキナーゼ B *Ark1* の遺伝学的相互作用

上記 (1) の結果から *Npg1* と *Ark1* の相互作用が示唆されたため、*Npg1* 遺伝子破壊株と薬剤感受性 *Ark1* 変異株 (*ark1-as*) を交配させて、二重変異株を作製し、孢子形成効率を観察した。二重変異株では野生株や単独変異株と比較して極端に孢子形成効率が低下しており、いわゆる正の遺伝学的相互作用が確認された。

また *Npg1*-GFP 株と薬剤感受性 *Ark1* 変異株を交配させて *npg1*-GFP *ark1-as* 株を作製し

たところ、この株では野生株や単独変異株と比較して孢子形成効率が低下していた。さらにNpg1局在を観察した結果、Ark1野生株では観察されないような異常なNpg1-GFPドットの局在が確認された。これらの結果はArk1活性がNpg1の正しい細胞内局在に重要であることを示唆する。

(3) 孢子形成期におけるオーロラキナーゼB Ark1タンパク質量の変動の解析

Ark1のプロモーター領域を解析したところ減数分裂特異的な転写因子mei4の結合モチーフであるFLEX配列が複数検出された(図2A)。これは減数分裂および孢子形成時期におけるArk1タンパク質量の上方制御を示唆する。そこで減数分裂期における遺伝子発現のマイクロアレイ解析(Mata et al., 2007)のデータを利用してArk1と類似した発現変動を示す遺伝子を探索した結果、Npg1, Pic1(動原体タンパク質), Bir1(サーバイビン), Psy1(シンタキシン)が同定された(図2B)。いずれの因子も減数第一分裂と減数第二分裂の間(図2の5h)で発現量が増大していた。これらの因子の内、Pic1とBir1はArk1やNpg1と同様に核内あるいは染色体上に局在するタンパク質である。従って、これらの結果はArk1がNpg1のみならず、Pic1やBir1とも共同して減数分裂や孢子形成に関与する可能性を示唆している。

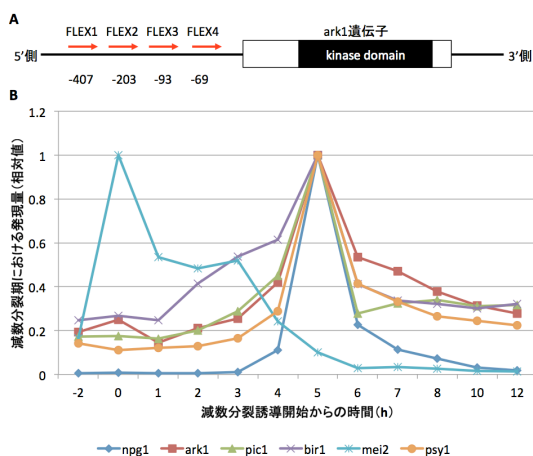


図2: 減数分裂期におけるark1の発現量の解析

さらにArk1タンパク質の量的変動を実際に計測するためのHAタグ融合型のArk1発現株を作製し、ウェスタンブロット法でバンドが検出されることを確認した。またこの株にpat1-114変異を導入することで、減数分裂期に高度に同調させた細胞集団中のArk1タンパク質量を計測することが可能になった。

(4) 分裂酵母細胞内ATP濃度の可視化

分裂酵母細胞内のエネルギー状態を一細胞レベルで解析するために、ATPバイオセンサーQUEEN(Yaginuma et al., 2014)を発現する株を作製した(広島大学 北村憲司博士との共同研究)。ATP産生の阻害剤を使用した実験から、QUEENのシグナルは細胞内ATP濃度変化を正しく反映できることが確認された(図3、ATP濃度を疑似カラーで表示)。

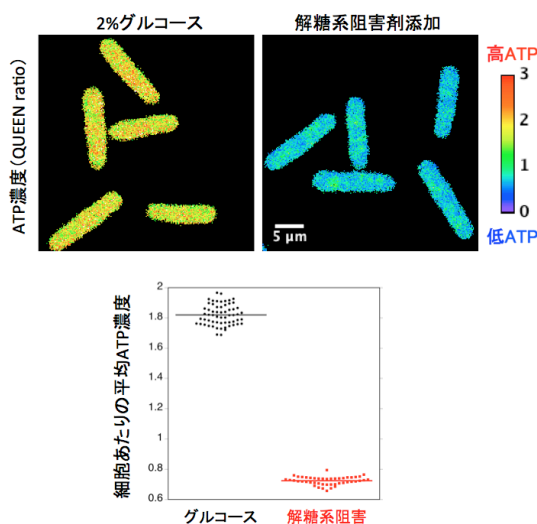


図3: 分裂酵母細胞内ATP濃度の可視化

次に、QUEENを発現する分裂酵母を使用して、減数分裂期および孢子形成期における分裂酵母細胞内ATP濃度の変化を観察した。減数分裂が誘導される窒素源飢餓状態にすると細胞内ATP濃度は通常の生育状態と比較して低下し、減数分裂が進行するにつれてさらなる低下が観察された(図4)。また孢子形成過程においては母細胞内のATP濃度が低下する一方で、予定孢子および孢子内のATP濃度は徐々に増大

した。

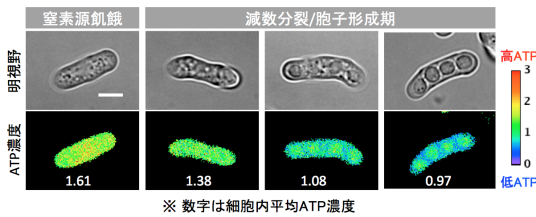


図4: 減数分裂/胞子形成期における分裂酵母細胞内ATP濃度の変化

(5) まとめと今後の展望

以上の結果から Npg1 は減数第一分裂以降にオーロラキナーゼ Ark1 により、その局在や機能が制御されている可能性が示唆された。今後は免疫沈降法等により Npg1 と Ark1 の相互作用を検証する必要がある。また Npg1 と同様のタイミングで発現が増大する Pic1 や Bir1 についても、同様に Npg1 との相互作用を確認する必要がある。物理的に相互作用しない場合でも、Npg1 にはオーロラキナーゼによるリン酸化コンセンサス配列が 13 箇所存在するため、Ark1 によるリン酸化で Npg1 の局在や機能が制御されている可能性も十分に考えられる。全てのリン酸化配列を改変した脱リン酸化型 Npg1 (セリン/スレオニン残基をアラニンに置換) および疑似リン酸化型 Npg1 (アスパラギン酸に置換) コンストラクトを作製し、局在や胞子形成能を観察し、リン酸化の影響を検証する。また薬剤感受性 ark1 変異株を使用して、ark1 キナーゼ活性を胞子形成時特異的に阻害した場合の表現型を観察する。減数第一分裂以降の Ark1 の機能や局在はこれまで全く顧みられていなかったもので、Ark1 による Npg1 の制御機構が示されれば、細胞新生におけるオーロラキナーゼの新たな役割が明らかになると期待される。

当初は胞子形成における Mt 活性を可視化して観察する予定であったが、細胞や胞子の ATP 濃度を可視化する方針に変更した。結果として、直接的に細胞内エネルギー状態を解析できる、より優れた実験系が構築されたと

言える。母細胞の ATP 濃度が低下しつつ、胞子内の ATP 濃度が増大する様子を捉えた観察結果は、申請者が予想していた制御された胞子への Mt 継承システムの存在を実証するものである。細胞は Mt 以外にも解糖系でもかなりの ATP 産生を賄っていることを考え合わせると、「母細胞から胞子へエネルギー代謝活性が、厳密な制御を受けて継承される」という、より包括的な現象が明らかになったと考えられる。今後は npg1 遺伝子破壊株を始めとした胞子形成異常を示す変異株で同様に ATP 濃度を観測して、異常な胞子における細胞内エネルギー状態を解析することで、胞子形成と胞子へのエネルギー代謝活性の継承が共役しているかどうかを検証する。また、Npg1 の下流制御因子を探索して機能解析することで、Mt を含む母細胞のエネルギー代謝活性がどのように胞子に受け渡されるか、その分子機構の解明に迫りたい。

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 5 件)

① 大橋一登、Romanas Chaleckis、高稲正勝、Craig E. Wheelock、吉田知史

Kynurenine aminotransferase activity of Aro8/Aro9 engage tryptophan degradation by producing kynurenic acid in *Saccharomyces cerevisiae*.

Scientific Reports (査読有り) 7, 2017, 12180.

DOI: 10.1038/s41598-017-12392-6

② 森田陸離、高稲正勝、沼田治、中野賢太郎
Molecular dissection of the actin-binding ability of the fission yeast α -actinin, Ain1, in vitro and in vivo.

Journal of Biochemistry (査読有り) 62, 2017, 93-102.

DOI: 10.1093/jb/mvx008

③ 櫛田康晴、高稲正勝、中野賢太郎、菅井俊朗、Krishna Kumar Vasudevan, Mayukh Guha, Yu-Yang Jiang, Jacek Gaetig, 沼田治

Kinesin-14 is Important for Chromosome Segregation During Mitosis and Meiosis in

the Ciliate *Tetrahymena thermophila*
The Journal of Eukaryotic Microbiology (査
読有り) 64, 293-307.

DOI: 10.1111/jeu.12366

④ 安田剛、高稲正勝、沼田治、中野賢太郎
Anillin-related protein Mid1 regulates
timely formation of the contractile ring
in the fission yeast *Schizosaccharomyces*
japonicus.

Genes to Cells (査読有り) 21, 2016,
594-607.

DOI: 10.1111/gtc.12368

⑤ 高稲正勝、沼田治、中野賢太郎
An actin-myosin-II interaction is
involved in maintaining the contractile
ring in fission yeast.

Journal of Cell Science (査読有り) 128,
2015, 2903-2918.

DOI: 10.1242/jcs.171264

[学会発表] (計 7 件)

① 高稲正勝
出芽酵母の細胞内 ATP 濃度変動を制御する
仕組み
日本生体エネルギー研究会第 43 回討論会
2017 年 12 月 19 日
京都産業大学 むすびわざ館 (京都府京都市)

② 高稲正勝、今村博臣、吉田知史
個々の酵母細胞内での ATP 動態を可視化する。
ConBio2017 (2017 年度生命科学系学会合同年
次大会)
2017 年 12 月 9 日
神戸ポートアイランド (兵庫県神戸市)

③ 高稲正勝、今村博臣、吉田知史
出芽酵母の細胞内 ATP 濃度変動を制御する仕
組み
ConBio2017 (2017 年度生命科学系学会合同年
次大会)
2017 年 12 月 6 日
神戸ポートアイランド (兵庫県神戸市)

④ 高稲正勝、今村博臣、吉田知史
出芽酵母の細胞内 ATP 濃度変動を制御する仕
組み
酵母遺伝学フォーラム第 50 回研究報告会
2017 年 9 月 12 日
東京大学弥生講堂 (東京都文京区)

⑤ 高稲正勝、今村博臣、吉田知史
細胞質 ATP 濃度の可視化により見えてきた、

酸化ストレス下における酵母の生存戦略
第 39 回日本分子生物学会年会

2016 年 11 月 30 日

パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

⑥ 高稲正勝
出芽酵母の細胞内 ATP 濃度の可視化とスト
レス応答

第 191 回酵母細胞研究会例会

2016 年 11 月 11 日

キリンビール (株) 横浜工場 (神奈川県横浜
市)

⑦ 高稲正勝、今田一姫、沼田治、中村太郎、
中野賢太郎

減数分裂期特異的な核パッセンジャータン
パク質 Npg1 は分裂酵母の適切な前胞子膜形
成に必須である

BMB2015 (第 38 回日本分子生物学会年会、第
88 回日本生化学会大会 合同大会)

2015 年 12 月 1 日

神戸ポートアイランド (兵庫県神戸市)

[その他]

ホームページ等

群馬大学生体調節研究所細胞シグナル分野
<http://www.imcr.gunma-u.ac.jp/>

群馬大学未来先端研究機構

<http://www.giar.gunma-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高稲 正勝 (TAKAINE, Masakatsu)

群馬大学・未来先端研究機構・助教

研究者番号: 20573215

(2) 研究分担者

該当無し

(3) 連携研究者

該当無し

(4) 研究協力者

該当無し