

令和元年6月20日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07669

研究課題名(和文) 分裂酵母のミニゴルジ体の集合化機構の解明と物質生産への応用

研究課題名(英文) Analysis of the assembly mechanism of mini Golgi apparatus of fission yeast and its application to substance production

研究代表者

田中 直孝 (Tanaka, Naotaka)

香川大学・農学部・准教授

研究者番号：60324109

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ゴルジ体画分の解析より、coiled-coilタンパク質Gmp1, 3, 4を取得した。局在解析の結果、細胞内の数か所に凝集体を形成し、ゴルジ体への逆行輸送を担っているレトロマー構成タンパク質の一つ、Vps35とGmp1過剰発現時の凝集体の局在が一致した。さらに、Gmp1の過剰発現によりエンドソーム画分の肥大化が観察された。yeast two-hybrid法により、Gmp1とGmp3, Gmp3とGmp4が相互作用し、複合体を形成していることが推察された。凝集体の拡散条件を検討した結果、微小管合成阻害剤の添加や、窒素飢餓条件にて、細胞質中に拡散することが観察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Gmpファミリーの過剰発現によりエンドソームの肥大化が誘導されることが証明されたことで、エンドソームを介した選別輸送の機能促進や、ストレス応答の解明にもつながると予想している。さらに、エンドソームの大きさが変化することによるゴルジ体からの物質生産の効率化が考えられ、細胞種を超えた物質生産への適用に繋がることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：Coiled-coil proteins Gmp1, 3 and 4 were isolated from analysis of the Golgi fraction. As a result of localization analysis, aggregates were observed in several places in the cell. This aggregate was localized to Vps35, one of the retromer-constituting proteins responsible for retrograde transport to the Golgi apparatus. Furthermore, enlargement of the endosomal fraction was observed due to overexpression of Gmp1. According to the yeast two-hybrid method, it was inferred that Gmp1 and Gmp3, and Gmp3 and Gmp4 interact to form a complex. As a result of examining the diffusion conditions of the aggregates, it was observed that they were diffused into the cytoplasm under the addition of a microtubule synthesis inhibitor or under nitrogen starvation conditions.

研究分野：応用微生物学

キーワード：分裂酵母 ゴルジ体 選別輸送

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

分裂酵母のゴルジ体膜画分から同定した Gmp タンパク質は、通常はゴルジ体膜に局在するが、過剰発現により、細胞内に1から2個の凝集塊となり、通常は10から20個程度存在するミニゴルジ体が集積し、凝集塊を形成したように観察された。動物細胞の実験系では、分泌経路の解析を行う際、ゴルジ体を肥大化させたり、特定の分泌タンパク質を蓄積させたりすることで、人為的な分泌経路の実験系を構築し、分泌経路を詳細に解析する手法が行われている。分裂酵母においては、分泌経路の解析を容易にするゴルジ体機能の調整やこれを用いた実験系の構築は殆ど無い状況であった。また、分泌経路のオルガネラを凝集させて、タンパク質の物質生産への利用を試みることもされていなかった。

2. 研究の目的

Gmp タンパク質の過剰発現により形成される凝集塊の性質を明らかにし、物質生産への応用につながるか検証することを目的とする。

3. 研究の方法

【使用菌株及びベクター】

本研究では分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* の野生株である TP4-5A、ARC039、ARC001 を使用し、ARC039、ARC001 菌株は旭硝子中央研究所より供与して頂いた。本研究では野生株を元に作製した遺伝子破壊株、またはナショナルバイオリソースプロジェクト (NBRP) より供与して頂いた遺伝子破壊株を使用した。サブクローニングに用いる形質転換の宿主として *Escherichia coli* XL1-Blue 株を使用した。使用したベクターは、*S. pombe* のベクターとして pAL, pAU, pTN197, pJK210, pJK148 を用いた。

【培地組成】

S. pombe の栄養培地として YES medium、合成最小培地として MM、窒素飢餓培地として MM (-N)、低グルコース培地として MM (0.05% Glc)、低リン酸培地として EMMP を用いた。*E. coli* の培養には LB (1.0% peptone, 1.0% NaCl, 0.5% Yeast extract, pH 6.8-7.2)、SOC (2.0% peptone, 0.05% NaCl, 0.5% Yeast extract, 0.49% MgSO₄, 0.36% Glucose, pH 7)、MMI (1.25% peptone, 0.85% NaCl, 2.5% Yeast extract, 1.0% 2 M Tris-HCl (pH 7.2)、0.4% Glycerol, pH 7.2) を用いた。

【培養条件】

S. pombe は 30 °C、*E. coli* は 37 °C で培養した。*S. pombe* を試験管で培養する際は 190 rpm で振盪させながら培養した。*S. pombe* をフラスコで培養する際は 300 mL のフラスコに 100 mL の培地に入れ、振盪培養した。

【タンパク質抽出】

S. pombe を YES medium または MM medium 5 mL で前培養した。その後、前培養した培養液の一部を YES medium または MM medium 50 mL に植菌し OD₆₀₀ が 1.0 前後になるまで本培養を行った。50 mL ディスポザブルチューブを用いて 3000 rpm で 5 分間遠心して全量を集菌し、一度 1 mL の滅菌水で洗菌した後、最終濃度が 10 mM PMSF *1 となるように添加した超音波破碎済みの Lysis Buffer *2 200 µL に懸濁した。この懸濁液を新しいエッペンチューブに移して、液面の 5 割程度の位置までガラスビーズを添加した後、4 °C に設定した冷蔵庫に設置した MS 機器社製ボルテックスミキサーを用いて 10 分間振盪し、菌体を破碎した。その後、氷上で 1 時間静置し、4 °C、3000 rpm、5 分間遠心後、上清をタンパク質サンプルとし新しいエッペンチューブに回収した。抽出したサンプルは、常法に従い、SDS-PAGE を行った。

【間接蛍光抗体染色法(免疫染色法)】

S. pombe を 10 mL の YES または MM で培養を行い OD₆₀₀ = 0.5~1.0 の菌体を使用した。培養液に最終濃度が 3% になるようにパラホルムアルデヒドを添加し、菌体をインキュベートし細胞を固定した (30 °C, 190 rpm, 1 hr)。2000 rpm, 5 min で遠心し集菌後、上清を除去し 1 mL の PEM Buffer で 3 回洗菌 (3000 rpm, 2 min) した。

500 µL の 0.5 mg/mL の Zymolyase 20-T in PEMS Buffer に細胞を懸濁して、インキュベートし細胞壁を分解した (37 °C, 200 rpm, 15 min)。6000 rpm, 1 min 遠心し集菌後、上清を除去し、200 µL の 1% TritonX-100 in PEMS Buffer に細胞を懸濁し、室温で 3 min 静置して透過処理した。6000 rpm, 3 min で遠心して上清除去し、その後 1 mL の PEMS Buffer で 3 回洗菌後、1 mL の PEMBAL Buffer に懸濁して室温で 30 min 静置し Blocking した。6000 rpm, 3 min で遠心し集菌後、上清を除去し、1% 一次抗体 in PEMBAL Buffer 50 µL で懸濁し、4°C 冷蔵庫内で 2 hr ~ over night 静かに攪拌し抗体反応させた。反応後の菌体を 4 °C, 6000 rpm, 1 min で遠心し集菌後、PEMBAL Buffer 100 µL で 3 回洗菌した。0.2% 蛍光二次抗体 in D.W. 50 µL 添加し、遮光して 4°C 冷蔵庫内で 2 hr-6 hr 静かに攪拌して抗体反応させた。反応後の菌体を 4 °C, 6000 rpm, 1 min で遠心し集菌後、PEMBAL Buffer 100 µL で 3 回洗菌後、蛍光顕微鏡で観察を行った。

4. 研究の成果

Gmp 過剰発現による凝集体の局在及び特徴

(1) Gmp 過剰発現による凝集体は微小管阻害剤及び栄養飢餓により解離する。

微小管合成阻害剤である TBZ (Thiabendazole) 添加時及び栄養飢餓時に凝集体の拡散が観察された。TBZ はβ-チューブリンの拮抗阻害剤である。EGFP (A206K) を付加した Gmp1 の過剰発現株を用いて再現性を確認した。まず TBZ 添加時の確認では、生育培地 (MMa11) で対数生育期 (OD600=0.5-1.0) まで生育させ、その菌液に最終濃度 100 μg/mL となるように TBZ を添加し、30 °C, 190 rpm で 7 時間培養し、添加前と添加後の細胞内の凝集体を蛍光顕微鏡により観察した。凝集体が存在する細胞数と蛍光している全細胞数をそれぞれカウントし、凝集率 (%) を算出した。その結果、TBZ 添加前には 81.7% の凝集率であったものが、TBZ 添加 7 時間後では 31.4% の凝集率に減少した (Fig. 1-C)。

TBZ 添加前と TBZ 添加後 7 時間後の値で有意差検定を行なったところ有意差が見られた。TBZ 処理前と TBZ 添加後 7 時間後の各サンプルの蛍光写真を示した (Fig. 1A2)。また、この条件で凝集体が拡散している菌体からタンパク質抽出しウェスタンブロッティングした結果 (Fig. 1B2)、解離したタンパク質は分解されていないことが示された。これらの結果より、Gmp 過剰発現による凝集体は微小管依存的に凝集していることが推察された。次に栄養飢餓について、主な栄養源である窒素とグルコースについて行った。Gmp1-EGFP (A206K) 過剰発現株を生育培地 (MMa11) で対数生育期 (OD600=0.5-1.0) まで生育させ、滅菌水で洗菌し窒素飢餓培地 (MM (-N)) および低グルコース培地 (MM (0.05% Glc)) にそれぞれ菌体を移行し、さらに 3 時間培養した。栄養飢餓培地移行前と移行 3 時間後の菌体をそれぞれ蛍光観察し、凝集率を TBZ と同様の方法で算出した。その結果、MM (-N) および MM (0.05% Glc) 移行 3 時間後はそれぞれ 6.95% および 16.4% まで減少した (Fig. 1C3, 4)。さらに、栄養飢餓培地移行前と移行 3 時間後の値で有意差検定を行なったところ、双方とも有意差が見られた。Gmp1 過剰発現株の栄養飢餓培地移行 3 時間後の細胞の蛍光写真を示した (Fig. 1A 3, 4)。また、これらの条件で凝集体が拡散している菌体からタンパク質抽出しウェスタンブロッティングした結果 (Fig. 1B3, 4)、解離したタンパク質凝集体の一部が分解されていることを示した。これらの結果より、Gmp 過剰発現による凝集体は培地上的栄養源の低下により細胞質中に拡散し、一部分解されることが示された。

窒素飢餓により拡散した状態の Gmp タンパク質を生化学的な解析に繋げるために、ウェスタンブロッティングによる分子量解析をした。以前の解析で、SDS-PAGE による解析を行ったところ Gmp-EGFP のバンドのほかに分解された GFP のバンドが見られた。今回、BN-PAGE を用いて複合体構造を保った状態の分子量解析を行った。BN-PAGE は、通常の変性状態のタンパク質を分離する SDS-PAGE に対して、タンパク質の高次構造や複合体構造を保持したまま分子の大きさに従って分離することができる。複合体を示すスミアなバンドと、窒素飢餓により解離した単一 Gmp のバンドが検出されるという予測に反し、複合体状態のスミアなバンドのみが検出された (Fig. 2)。

(2) Gmp 過剰発現による凝集体は拡散後、生育培地に戻すと再び凝集体を形成する。

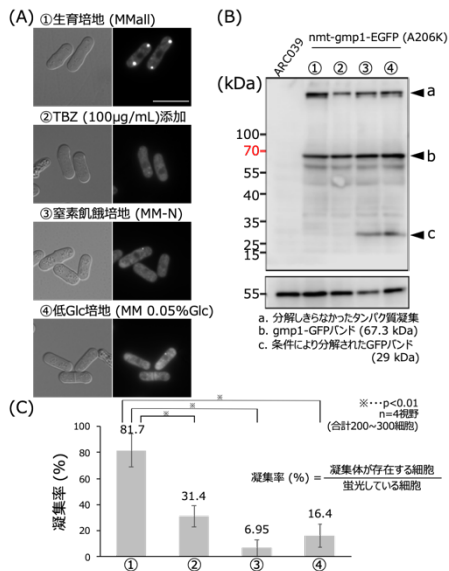


Fig. 1 Gmp1過剰発現時凝集体の解離条件
(A) Gmp1-EGFP (A206K) 過剰発現株を①生育培地で対数増殖期まで生育後、②TBZ (100μg/mL) 添加7時間後、③窒素飢餓培地 (MM (-N)) へ移行し3時間後、④低グルコース培地 (MM (0.05%Glc)) へ移行し3時間後蛍光観察して凝集体の形態を確認した。(スケールバー: 10 μm)
(B) (A)のタンパク質を抽出し、ウェスタンブロッティングで分子量の変化を確認した。(1次抗体: Tubulin: Rabbit Anti β-tubulin (S.pombe) 1/2000, GFP: Rabbit anti-GFP 抗体 1/5000, 2次抗体: Donkey Anti-Rabbit IgG HRP 1/10000, 検出試薬: Immunostar zeta 1倍)
(C) (A)の写真から凝集率を算出した。凝集率の値で関連のある2群の母平均の差の検定を行ったところ、凝集率の有意な低下が確認できた。

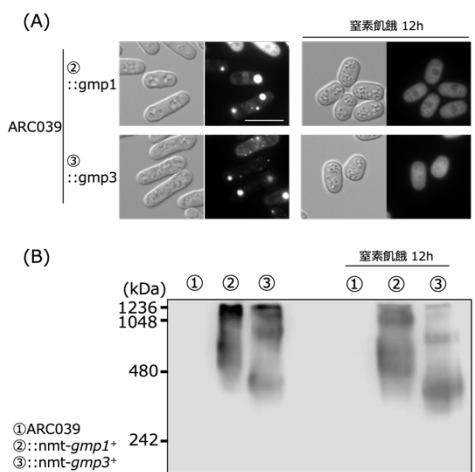


Fig. 2 窒素飢餓時のGmp過剰発現時の凝集体の分子量解析
(A) タンパク抽出を行う際の凝集体の形態
(B) 窒素飢餓時(A)におけるBlue Native PAGE
Mma11 50 mLで対数生育期まで生育後、窒素飢餓培地 50 mLに移行して12時間後の菌体からタンパク質抽出し、0.2% CBB G-250を添加して、4%から13%のグリセロールで100 V→150 Vで泳動した。(1次抗体: Tubulin: Rabbit Anti β-tubulin (S.pombe) 1/2000, GFP: Rabbit anti-GFP 抗体 1/5000, 2次抗体: Donkey Anti-Rabbit IgG HRP 1/10000, 検出試薬: Immunostar zeta 1倍)

栄養飢餓条件で凝集体が拡散したあと、生育培地 (MMall) に戻すことによる影響を調べた。一般的に栄養飢餓環境では細胞周期が停止し、栄養回復に応じて細胞周期を再開させ、細胞増殖が開始される。前項と同じ要領で栄養飢餓 (N 及び Glc) に 3 時間曝した後、菌体を回収し再び生育培地 (MMall) に戻し 3, 6, 9 時間後の Gmp1-EGFP (A206K) の形態を観察した (Fig. 3A, 4A)。どちらの栄養飢餓状態からの回復においても、生育培地に移行後 3 時間では凝集率の回復は見られず、その後経時的に凝集率が回復した (Fig. 3B, 4B) ことから、凝集体が拡散した細胞で再び凝集体が形成されるのではなく、細胞分裂した細胞で新たに凝集体が形成されることが示唆された。また、栄養飢餓状態からの回復後の細胞増殖は、異常は見られなかった。

(3) Gmp 過剰発現による凝集体は BFA による影響を受けない。

Brefeldin A (BFA) は、分泌経路における小胞体からゴルジ体への輸送をブロックし、ゴルジ体の解体を引き起こしてゴルジ体のタンパク質成分を小胞体へと逆輸送させる薬剤である。ゴルジ体局在の UDP-ガラクトース輸送体である Gms1 は、BFA 処理により小胞体へ局在が変化する。Gmp1-EGFP, Gmp3-EGFP を過剰発現させた株を生育培地 (MMall) で対数生育期まで生育後、最終濃度 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるように BFA を添加し、30 $^{\circ}\text{C}$ で 45-60 分培養し蛍光観察した。BFA 添加前の局在と比べ変化していない (Fig. 5) ことから Gmp 過剰発現による凝集体は BFA による影響を受けないことが明らかとなり、ゴルジ体に局在しないことが示唆された。

(4) Gmp 過剰発現による凝集体はエンドサイトーシス経路上には局在しない。

Gmp-EGFP の染色体組み込み株を用いた局在観察で、Gmp 過剰発現による凝集体がエンドソーム上にてエンドソームからゴルジ体への逆行輸送を行うレトロマー複合体の構成因子 Vps35 と Gmp1 の局在が一致したことが示された。エンドソームは、エンドサイトーシス経路、タンパク質合成経路、オートファジー経路からの取り込みの輸送とリソソーム、ゴルジ体、細胞膜への輸送の中継地点として働く。以上のことからエンドサイトーシスに着目し、局在観察によって関連を調べた。エンドサイトーシスの指標として FM4-64 染色試薬を用いた。FM4-64 は酵母液胞膜を選択的に染色する赤色蛍光色素である。染色された細胞膜がエンドサイトーシスによって取り込まれ、約 30 分後液胞まで輸送され液胞膜を染色する。そこで、Gmp-EGFP 過剰発現株を生育培地 (MMall) で対数生育期まで培養後、OD600=1.0 分を取り集菌後、MMall 500 μL に懸濁し最終濃度 8 μM の FM4-64 を氷上で添加し、30 $^{\circ}\text{C}$ で 2 分-30 分間培養し、経時的な FM4-64 取り込み過程を観察した。どの地点においても Gmp-EGFP の蛍光と重なる点がなく、Gmp 過剰発現による凝集体は FM4-64 のエンドサイトーシスによる取り込みに影響を及ぼさないことが考えられた (図省略)。

(5) Gmp 過剰発現による凝集体は糖鎖修飾機構に影響を与えない。

Gmp 過剰発現状態において酸性ホスファターゼの糖鎖付加への影響がないことが示されていたため、インペルターゼの糖鎖修飾への影響を確認した。遺伝子破壊株と同様に過剰発現株においても WT と同程度の移動度であった (図省略)。この結果、Gmp 過剰発現による凝集体の存在は、分泌糖タンパク質の糖鎖修飾機構に影響を与えないことを裏付けた。

(6) Gmp 過剰発現による凝集体は液胞輸送タンパク質 Cpy1 の選別輸送に影響を与えない。

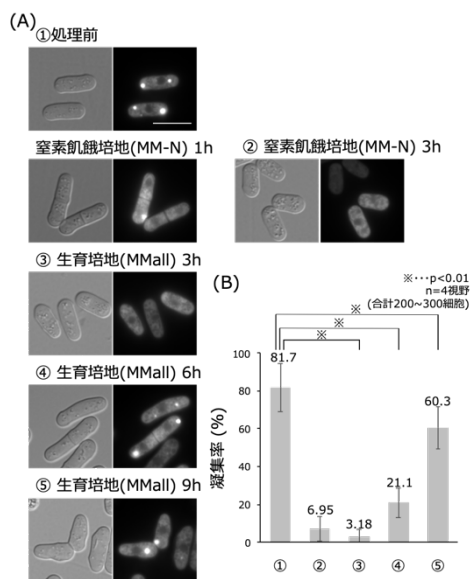


Fig. 3 窒素飢餓条件での経時的な凝集体解離の観察

(A) Gmp1-EGFP (A206K) 過剰発現株を①生育培地 (MMall) で対数増殖期まで生育後、窒素飢餓培地 (MM-N) へ移行し 1h 後、② 3h 後、その後再び生育培地へ戻し ③ 3h 後、④ 6h 後、⑤ 9h 後の凝集体を蛍光観察で観察した。(スケールバー: 10 μm)
 (B) (A) の写真から凝集率を算出した。凝集率の値で関連のある 2 群の平均値の差の検定を行ったところ、凝集率の有意な低下が確認できた。

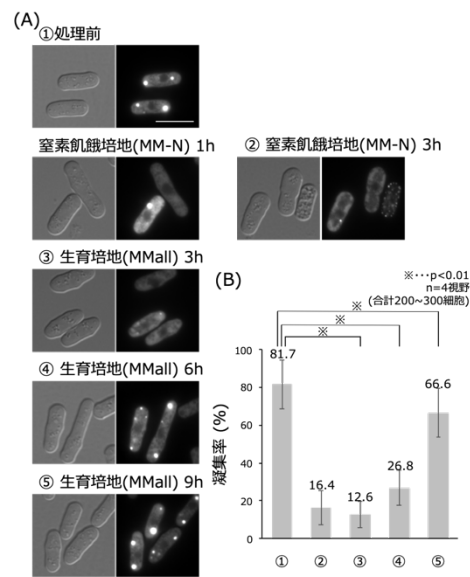


Fig. 4 低Glc条件での経時的な凝集体解離の観察

(A) Gmp1-EGFP (A206K) 過剰発現株を①生育培地 (MMall) で対数増殖期まで生育後、低Glc培地 (MM (0.05% Glc)) へ移行し 1h 後、② 3h 後、その後再び生育培地へ戻し ③ 3h 後、④ 6h 後、⑤ 9h 後の凝集体を蛍光観察で観察した。(スケールバー: 10 μm)
 (B) (A) の写真から凝集率を算出した。凝集率の値で関連のある 2 群の平均値の差の検定を行ったところ、凝集率の有意な低下が確認できた。

真核細胞の分泌経路の一部である糖鎖修飾機構への影響がないことが示唆されたので、その下流部分となる液胞へのタンパク質輸送への影響を調べるため、液胞へ選別輸送される CPY (Carboxypeptidase Y) を指標に解析を行った。CPY は最も研究されている液胞タンパク質の一つで、*S. pombe*, *S. cerevisiae* 共に生合成や輸送経路に関して詳細な解析が行なわれている。*S. pombe* の CPY である Cpy1 は、小胞体でプロ配列を有した前駆体 (110 kDa) として合成された後、液胞内で 2 度の切断を受けて成熟型ヘテロダイマー (32 kDa+19 kDa) へと変化する。また、phosphatidylinositol 3-kinase として機能する Vps34 や Cpy1 の輸送体として機能する Vps10 をはじめとする *vps* (vacuolar protein sorting) 遺伝子の遺伝子破壊株では、Cpy1 が液胞へと輸送されず、前駆体のまま細胞外へと漏出することが報告されている。そこで、Gmp1, Gmp3 の各過剰発現株のコロニーブロットアッセイを行ない Cpy1 の細胞外への漏出の確認を行なった。その結果、Gmp1, Gmp3 各過剰発現株どちらも Cpy1 の細胞外への漏出は見られなかった(図省略)。以上の結果より、Gmp 過剰発現による凝集体は液胞へのタンパク質輸送に影響を与えないことが考えられた。

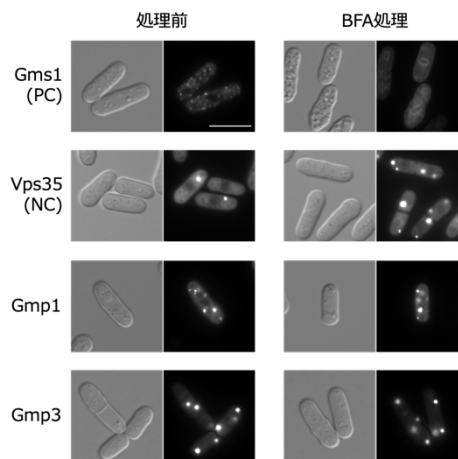


Fig. 5 Gmp過剰発現株におけるBFA処理
Gmp1-EGFP, Gmp3-EGFP各過剰発現株にBFA (最終濃度 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を添加し、30 °C、45分間培養させた。BFA添加前と添加後でGmp過剰発現による凝集体の形態変化は見られなかった。ポジティブコントロールであるゴルジ体局在タンパク質 Gms1の蛍光形態はゴルジ体のドット状からER局在への変化が見られた。(スケールバー: 10 μm)

本研究ではゴルジ体画分の TOF-MS 解析より、配列内に coiled-coil 領域を持つ機能未知のタンパク質 Gmp1 から 4 を取得した。互いに相溶性が高いことから Gmp1, Gmp3, Gmp4 に着目した。Gmp ファミリーに GFP を付加し過剰発現させたところ、細胞内の数か所に集約したドットが観察され、凝集体を形成していた。その局在を明らかにするため、分泌経路内のオルガネラマーカータンパク質と共発現させたところ、後期分泌経路のオルガネラであるエンドソームにおいて、ゴルジ体への逆行輸送を担っているレトロマーの構成タンパク質の一つ、Vps35 と Gmp1 過剰発現時の凝集体の局在が一致した。さらに、Gmp1 の過剰発現によりエンドソーム画分の肥大化が観察された。また、yeast two-hybrid 法により、Gmp1, Gmp3, Gmp4 がそれぞれ相互作用しており、Gmp1 と Gmp3, Gmp3 と Gmp4 が相互作用していることが示され、Gmp ファミリーが複合体を形成していることが推察された。Gmp 過剰発現時の凝集機構を明らかにするため拡散条件を検討した結果、微小管合成阻害剤 TBZ の添加や、窒素飢餓条件にて、凝集体が細胞質中に拡散することが観察された。

Gmp ファミリーの過剰発現によりエンドソームの肥大化が誘導されることが証明されることで、エンドソームを介した選別輸送の機能促進や、ストレス応答の解明にもつながると予想している。さらに、エンドソームの大きさが変化することによる物質生産の効率化が考えられ、細胞種を超えた物質生産への適用に繋がることを期待できる。

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 2 件)

寺島知里, 大山拓朗, 田淵光昭, 田中直孝
細胞内で凝集塊を形成する Gmp タンパク質の挙動と分子機構の解析
日本農芸化学会 2018 年度大会

寺島知里, 大山拓朗, 兒子隆英, 田淵光昭, 田中直孝
分裂酵母の分泌経路において機能する Gmp 複合体の機能解析
第 58 回日本生化学会中国・四国支部例会

※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。