

令和 5 年 5 月 10 日現在

機関番号：38005

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15795

研究課題名（和文）プロトン流入を利用した細胞膜損傷応答

研究課題名（英文）Plasma membrane damage response mediated by proton influx

研究代表者

杉山 伸樹 (Sugiyama, Shinju)

沖縄科学技術大学院大学・膜生物学ユニット・ポストドクトラルスカラー

研究者番号：70868687

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）：従来注目されていたカルシウム流入に依存しない新規な細胞膜/細胞壁損傷応答の探索とその機構の解明を行った。出芽酵母は弱酸性培地で細胞膜/細胞壁損傷を引き起こす界面活性剤への耐性が向上した。この際、細胞膜/細胞壁損傷時のプロトン流入に応答して一部のタンパク質が凝縮し、活性が変化することで損傷に応答している可能性が示唆された。また、その他に損傷部位で小胞体の形態変化が起こることを発見した。この形態変化はエキソサイトーシスによる細胞膜リモデリングによって、小胞体-細胞膜間の接着が弱まることで起きていた。これによって、小胞体と修復因子間の細胞膜上での競合を解消していると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞膜や細胞壁は細胞の内と外を物理的に分けるが、様々な刺激によって損傷すると、細胞内の物質の流出や細胞外の物質の流入が起こる。細胞膜/細胞壁の損傷は最終的に細胞死を引き起こすため、細胞にはこのような損傷を修復する様々な機構が備わっている。本研究では、細胞内外のpHの違いを利用した損傷応答と、細胞内小器官の位置制御による損傷応答という新たな細胞膜/細胞壁損傷応答を発見した。これらの結果は、細胞膜/細胞壁損傷による酵母の細胞死を減らして物質生産を向上させる手法の開発や、細胞膜損傷に関わるヒトの疾患の治療法の開発に繋がることが期待される。

研究成果の概要（英文）：I aimed to reveal novel responses against plasma membrane/cell wall (PM/CW) damage independent of calcium influx. I found that budding yeast showed enhanced tolerance to surfactants that induce PM/CW damage in a weakly acidic medium. It was suggested that some proteins condensed in response to proton influx induced by PM/CW damage, which may alter their activities. In addition, I found that the ER was reorganized at the damaged sites. This morphological change of the ER was caused by the weakening of the ER-PM tethering through PM remodeling by exocytosis. This is thought to resolve the competition on the plasma membrane between the ER and PM/CW repair factors.

研究分野：細胞生物学

キーワード：出芽酵母 細胞膜細胞壁損傷応答 オルガネラ プロトン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞膜/細胞壁は常に細胞内外からのストレスにさらされており、損傷することがある。細胞膜/細胞壁が損傷すると細胞内の分子が流出し、その状態が続くとやがて細胞死に至る。このような細胞死を防ぐために細胞には細胞膜/細胞壁の損傷を感知し速やかに修復する機構が備わっており、その機構が破綻した場合には筋ジストロフィー症などの疾患につながる事が知られている。

これまでに、細胞膜が損傷すると細胞外から流入した Ca^{2+} や活性酸素種によって細胞膜を修復するタンパク質や小胞などが損傷部位に集められることが明らかになっているが、従来の研究はこれらの経路の修復機構の解明に集中しており、 Ca^{2+} や活性酸素種の流入に依存しない細胞膜損傷応答に不明な点が多いのが課題であった。

2. 研究の目的

本研究では Ca^{2+} や活性酸素種の流入によらない新規な細胞膜損傷応答の発見とその機構の解明を目指す。

3. 研究の方法

真核生物の中でも遺伝学的解析が非常に容易である出芽酵母を用いて研究を行った。出芽酵母に界面活性剤およびレーザーによって細胞膜/細胞壁を損傷した際のタンパク質の挙動と、出芽や接合突起形成時といった細胞膜/細胞壁損傷修復以外の極性形成時のタンパク質の挙動を蛍光顕微鏡で観察した。また、酵母の遺伝子欠失、プラスミドからの遺伝子過剰発現、オーキシン誘導デグロンによる必須遺伝子の発現量抑制を用いて、発見した現象の機構の解明を行った。

4. 研究成果

プロトン流入による細胞膜/細胞壁損傷応答

プロトン流入を利用した細胞膜/細胞壁損傷応答が存在するかを調べるため、複数の pH の培地で界面活性剤による細胞膜/細胞壁損傷への感受性を調べた。酸性の培地では、中性の培地に比べて界面活性剤耐性が高く、プロトン流入依存的な損傷応答の存在が示唆された(図1)。

次に、細胞膜/細胞壁損傷によって液液相分離やゲル化、凝集するタンパク質の探索を行った。まず、出芽酵母において液液相分離や凝集することが報告されているタンパク質を中心に、界面活性剤またはレーザーによって細胞膜/細胞壁損傷を引き起こした際の挙動を蛍光顕微鏡で観察した。その結果、細胞膜/細胞壁損傷依存的に斑点状の集合体を形成するタンパク質を複数発見した(図2)。その中の一部は培地の pH が弱酸性の場合に凝縮体が形成されやすかったことから、細胞膜損傷時のプロトン流入により液液相分離や凝集している可能性が高いと考えられた。また、発見したタンパク質の一つは、リン脂質代謝に関わることが知られていることから、凝縮体の形成によってこのタンパク質の活性を変化させることで、細胞膜損傷時の膜脂質代謝を制御している可能性が示唆された。

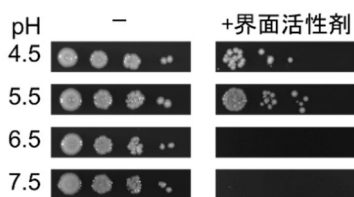


図1 酸性から中性での界面活性剤耐性

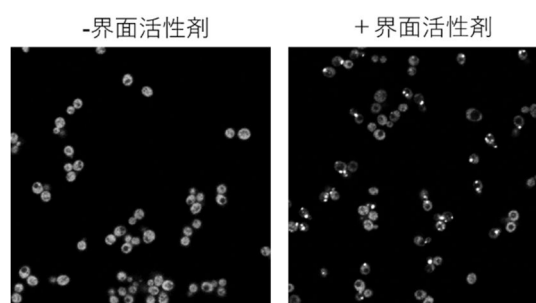


図2 界面活性剤処理時の
GFP 融合タンパク質の凝縮

細胞膜/細胞壁損傷時の小胞体の形態変化

また、蛍光タンパク質融合タンパク質を観察する中で、細胞膜/細胞壁損傷部位から小胞体-細胞膜を接着するタンパク質が排除され、小胞体が細胞膜から剥離することを発見した(図3)。この剥離は損傷した細胞膜/細胞壁リモデリングのために損傷部位でエキソサイトーシスが活発になる際に起きていた。また、このような形態変化は、高濃度カルシウム処理によって細胞内カルシウム濃度を上昇させた際には見られないことから、カルシウム流入に依存しない現象であると考えられた。

細胞膜/細胞壁損傷時には、損傷部位に極性が切り替わることから、他の極性形成部位での小胞体の挙動を観察したところ、出芽部位や接合突起先端でも同様の形態変化が起きており、極性形成部位に共通した現象であった。

そこで、特に観察が容易な出芽部位での小胞体の形態変化に注目して、細胞膜からの小胞体剥離の機構の解明を行った。その結果、エキソサイトーシス阻害によって小胞体-細胞膜間の排除が弱まることを発見した。また、この排除には接着因子の細胞膜への結合ドメインだけで充分であり、細胞膜の脂質組成変化によらなかった。以上の結果は、極性形成部位の小胞体-細胞膜の接着因子が、エキソサイトーシスによる脂質組成変化以外の細胞膜リモデリングによって局所的に排除されることで、小胞体が細胞膜から剥離することを示唆する。

また、この小胞体の細胞膜からの剥離は、出芽部位細胞膜でのセプチンの高次構造形成に必要であることが示唆された。細胞膜から小胞体が剥離することで細胞膜の混みあいが解消され、細胞骨格などの巨大構造物が細胞膜に結合できるようになるのだと考えられる(図4)。細胞膜/細胞壁損傷時にもアクチンや分泌小胞が損傷部位の細胞膜に結合する必要があることから、損傷部位でも小胞体の剥離が他の構造物の細胞膜への効率的な結合に重要である可能性が高い。

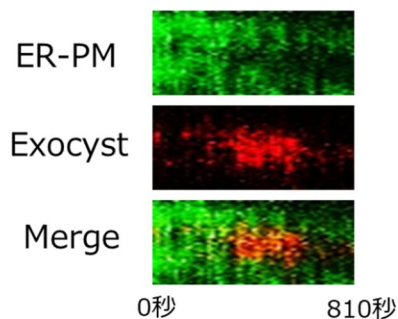


図3 損傷部位からの小胞体-細胞膜 (ER-PM) 接着因子の排除 (カイモグラフ)

損傷部位に exocyst 複合体が集積してエキソサイトーシスが活発になる際に、接着因子が排除される。

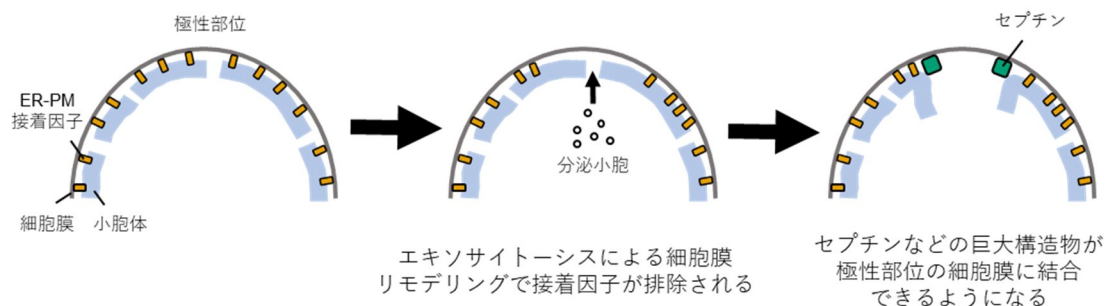


図4 極性部位の細胞膜からの小胞体剥離のモデル

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 ○杉山伸樹 河野恵子
2. 発表標題 出芽酵母の細胞極性形成部位における小胞体-細胞膜接着因子の排除
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム 第54回研究報告会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 ○杉山伸樹
2. 発表標題 極性形成時の小胞体-細胞膜接触部位の位置制御
3. 学会等名 酵母研究若手の会 第7回研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 ○杉山伸樹
2. 発表標題 細胞膜上の巨大構造物の探索
3. 学会等名 酵母研究若手の会 第8回研究会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------