

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年6月5日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22580076

研究課題名（和文） 出芽酵母前孢子膜形成の分子機構解明とその応用

研究課題名（英文） Elucidation of the molecular mechanism underlying the prospore membrane formation in *Saccharomyces cerevisiae* and its application

研究代表者

館川 宏之 (TACHIKAWA HIROYUKI)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・准教授

研究者番号：60251576

研究成果の概要（和文）：出芽酵母の前孢子膜形成は生体膜形成のモデルとして研究されている。本研究では、前孢子膜伸長において働く1型プロテインホスファターゼのターゲティングサブユニットであるGip1のドメイン構造を明らかにし、局在化に必要なドメインと機能に必要なドメインが異なることを示した。また、前孢子膜形成に必須な膜タンパク質(Spo71, Spo73, Vps13)について解析を行い、Spo73の局在化に必要な配列を明らかにし、Spo71とSpo73が相互作用して働くことを示した。また、Spo73は、筋ジストロフィーと関係する機能未知のジスフェリンドメインのみからなっており、疾患の分子機構の解明に役立つ知見を得ることができた。

研究成果の概要（英文）：Prospore membrane formation of budding yeast is studied as a model system for membrane biogenesis. In this study, we performed domain analysis on protein phosphatase type I targeting subunit, Gip1, and showed that distinct domains are required for its localization and function. We also showed that Spo71 and Spo73, peripheral membrane proteins required for prospore membrane formation, interact together on prospore membrane. Spo73 is a dysferlin domain-only protein. Our analysis on Spo73 provides some clues to elucidate the mechanism of a type of muscular dystrophy caused by mutations in dysferlin domain of dysferlin.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：微生物学 生体膜

1. 研究開始当初の背景

(1) 出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) の前孢子膜形成は、細胞内に全く新たな膜構造が形成される細胞分化の過程であり、生体

膜形成のモデルと捉えることができる。研究代表者は以前の研究で前孢子膜形成過程の詳細な解析をタイムラプス蛍光顕微鏡観察により行い、この過程が段階的に進行するこ

とを明らかにしている (Diamond A Tachikawa H et al. Mol. Biol. Cell 2009)。また、この過程の中でも研究の進んでいない第2伸長の解析を行っている。

(2) 以前の研究で、高等動物まで保存された1型プロテインホスファターゼ複合体 (Gip1-Glc7) が、前胞子膜に沿って存在するセプチン細胞骨格に局在し、セプチン構造の形成に必要であることを明らかにし、前胞子膜の伸長において機能する可能性を示唆した (Tachikawa H et al. J Cell Biol. 2001)。これに関する詳細な解析の結果、Gip1-Glc7 が第2伸長に必要であることを明らかにした。また、Ysw1 が Gip1-Glc7 に対して補助因子として働くことを報告している (Ishihara S, Tachikawa H et al. Eukaryotic Cell 2009)。さらに、酵母の破壊株コレクションを用いた蛍光顕微鏡下でのビジュアルスクリーニングにより、新たに第2伸長に必要な因子を3つ (Spo71, Spo73, Vps13) 見出し、解析を行っている。

(3) 本研究の対象遺伝子の一つである *VPS13* のヒトホモログはコーエン症候群や有棘赤血球を伴う舞踏病 (神経変性疾患、難病) の原因遺伝子として研究がなされている。また、Spo73 は、筋ジストロフィーの原因遺伝子の一つがコードするジスフェリンにある機能未知のジスフェリンドメインのみからなる。これらの遺伝子を解析することにより疾患の分子機構の解明が期待される。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、前胞子膜第2伸長に関与する因子の機能や関係を明らかにすることを通して、その分子機構を解明することを目的とする。具体的には、この過程に必須な1型プロテインホスファターゼ複合体 (Gip1-Glc7)、および、膜タンパク質である Spo71, Spo73, Vps13 の構造、機能、関係についての知見を得ることを通して、前胞子膜伸長の詳細なメカニズムを明らかにする。この過程に関与する因子の多くは高等動物まで保存されており、種を超えて共通する生体膜形態形成の新たな機構の提案を目指す。

(2) 疾患の原因遺伝子のホモログである Vps13 や Spo73 についてドメインや機能の解析を行い、疾患の分子機構の解明に寄与する。

3. 研究の方法

(1) 研究代表者は以前の研究で、1型プロテインホスファターゼ複合体 (Gip1-Glc7) とその補助因子 (Ysw1) が前胞子膜上のセプチン細胞骨格に局在し、前胞子膜第2伸長に関与することを明らかにした。Gip1-Glc7 は、

そのターゲットを脱リン酸化することによって、セプチン細胞骨格や膜輸送を制御し、前胞子膜第2伸長において働くと考えられる。本研究では、リン酸化・脱リン酸化による前胞子膜第2伸長の分子機構の解明を目指して、以下の方法で研究を行った。

① *gip1* 温度感受性胞子形成変異株のマルチコピー-サブレッサー遺伝子のスクリーニングを行う。現在までに、キナーゼと膜輸送において働くタンパク質をコードする遺伝子をそれぞれ取得し、さらなるスクリーニングを行っている。このスクリーニングで得られる遺伝子の破壊株の表現型や遺伝子産物の細胞内局在を、蛍光顕微鏡により観察する。また、Gip1-Glc7 との直接的な相互作用について、Two-hybrid 法やタグを用いた pull-down 法により検討し、関係を明らかにする。

② 脱リン酸化ターゲット候補である Ysw1 やセプチンについてのリン酸化状態の変化が検出できるかを検討する。

③ ターゲティングサブユニットである Gip1 の局在化や機能に必要なドメインを明らかにする。

(2) 以前の研究で、研究代表者は、酵母の破壊株コレクションを用いた蛍光顕微鏡下でのビジュアルスクリーニングにより、第2伸長が異常な株として、*spo71* 破壊株、*spo73* 破壊株、*vps13* 破壊株を取得している。Spo71 と Spo73 はいずれも胞子形成時に特異的に誘導される機能未知タンパク質であり、Spo71 は脂質結合に関与するとされる PH ドメインを2つ、Spo73 はやはり脂質結合の可能性が考えられている機能未知のジスフェリンドメインを持つ。また、両タンパク質が前胞子膜に局在化することから、Spo71 と Spo73 が特異的な脂質に結合して前胞子膜上に局在し、第2伸長のための脂質シグナリングにおいて働く可能性が考えられる。本研究では前胞子膜に局在化する Spo71, Spo73, Vps13 の第2伸長における役割を明らかにするため以下の実験を行う。

① それぞれの破壊株の表現型を、胞子形成時特異的な構造 (前胞子膜、セプチン、前胞子膜の先端) のマーカーを用いた蛍光顕微鏡観察により詳細に解析する。必要に応じて、タイムラプス観察も行うことにより、役割を推測する。また、それらの破壊株において、他の二つの産物の局在が正常か否かを調べる。

② Spo71, Spo73 について前胞子膜への局在化に必要な領域を調べる。

③ これらの遺伝子について互いの欠損を相補するか等、遺伝学的相互作用の有無を検討する。もし有るならば、物理的相互作用を検討する。

④ 遺伝学や Two-hybrid 法を用いたスクリーニングによる、関連因子の探索を行い、解析する。

(3) 本研究で得られる結果や他のグループの報告を元に前胞子膜第2伸長の分子機構のモデルを構築する。また、種を超えて保存されているタンパク質やドメインに着目して、生体膜形成のモデルを構築する。Spo73は、筋ジストロフィーと関係する機能未知のジスフェリンドメインのみからなっており、疾患の分子機構の解明の足がかりを得る。

4. 研究成果

(1) 1型プロテインホスファターゼ複合体のターゲティングサブユニットコードする *GIP1* 遺伝子の温度感受性胞子形成変異株のマルチコピーサプレッサーの更なる取得を行ったが、あらたな遺伝子を得ることができなかった。そこで、これまでに取得して未解析だった2つの遺伝子について破壊株の表現型およびコードするタンパク質の胞子形成時の細胞内局在解析、結合の解析を行った、その結果、明らかな表現型や特異的な細胞内局在、相互作用は観察されず、PP1との機能的関係の解明は今後の課題である。

(2) 1型プロテインホスファターゼ複合体のターゲットを明らかにするため、第一候補である Ysw1 のリン酸化について検討を行ったが、明らかなリン酸化は検出できなかった。PP1 のターゲットについては他の候補のリン酸化状態の解析やスクリーニングを含め、さらなる検討が必要である。

(3) 1型プロテインホスファターゼ複合体のターゲティングサブユニットである Gip1 の解析を行った。Gip1 はカタリティックサブユニットである Glc7 と複合体を形成して前胞子膜に沿ったバー状のセプチン細胞骨格に局在し、前胞子膜の伸長に必須であることをわれわれは示してきている。本研究では、Gip1 の欠失変異体のシリーズを作成し、その機能および局在に必要な領域を決定した。その結果、前胞子膜への局在化に必要な領域とさらにその膜上でセプチン構造への局在化するのに必要な領域、そして Gip1 の胞子形成における機能に必要な領域が別々に存在することが明らかになった。また、変異の導入や Two-hybrid 解析により、機能に必要な領域は Glc7 との結合領域を含み、結合タンパク質である Ysw1 との結合に必要な領域とも重なることが明らかになった。これらの結果は、リン酸化・脱リン酸化による前胞子膜伸長制御の分子機構の一端を明らかにするものであるとともに、高等動物まで保存された1型プロテインホスファターゼ複合体

のターゲティングサブユニットの働き方に新たな知見をもたらすものである。

(4) *spo71* 破壊株、*spo73* 破壊株について、表現型を、各種マーカーを用いて詳細に観察した。また、タイムラプス蛍光顕微鏡観察も行い、前胞子膜の第2伸長が起こらないことを確認するとともに、核を前胞子膜で包み込むステップも一定の頻度でうまくいかなくなることを明らかにした。

SPO71, *SPO73*, *VPS13* の遺伝学的関係について検討を行い、それぞれの欠損の表現型がその他の2遺伝子の過剰発現によって抑圧されないことを明らかにした。また、それぞれの遺伝子の破壊が、他の2つがコードするタンパク質の細胞内局在を変化させないことを示した。

(5) Spo71 の各種欠失変異体を作製し、その胞子形成時における細胞内局在と機能を解析した。その結果、いずれの欠失変異体も局在と機能を失うことが明らかになり、大部分の領域が必須であることが示された。

Spo73 の局在化に必要な配列を高等動物ホモログの立体構造から予測した。予想されたプラスチャージのアミノ酸のクラスターに変異を導入したところ、部分的に機能を保ったまま、局在が失われることが明らかになった。この変異型 Spo73 を発現する酵母において Spo71 を過剰発現させたところ、変異型 Spo73 の局在が回復することを明らかにした。このことは、Spo71 と Spo73 の相互作用を示唆する。

(6) Two-hybrid 解析により、Spo73 と Spo71 の各ドメインの相互作用を解析し、互いに結合することを明らかにした。これらの結果は、peripheral な膜タンパク質である Spo71 と Spo73 が相互作用しながら、膜の伸長において働く可能性を示しており、いまだ不明な点の多い前胞子膜の伸長の分子機構の解明の足がかりが得られた。また、この結果は、ジスフェリンが PH ドメインを持つタンパク質と結合する可能性を示すものであり、ジスフェリンドメインの機能を理解する上で重要な足がかりと考えられる。

(7) *spo71* の温度感受性胞子形成変異株を作成し、変異の位置を決定し、Spo71 にある保存領域の重要性を示した。マルチコピーサプレッサーのスクリーニングを行ったが、候補の取得に至らなかった。

(8) 本研究では、前胞子膜形成の分子機構、中でも研究の進んでいない第2伸長の分子機構の研究を行った。第2伸長における1

型プロテインホスファターゼ複合体の解析、および、前孢子膜に局在するタンパク質の機能と関係の解析を行い、その分子機構に迫ることができた。得られる成果は、微生物分化の分子機構の理解にとどまらず、生物に共通する能動的膜形成制御機構の解明につながるという意味で大変意義深い。また、配偶子形成や細胞分化のモデルの研究とも捉えられること、さらにヒトの疾患の分子機構の解明へとつながることが期待できる。

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)

[学会発表] (計3件)

1. 奥村祐哉 舘川宏之 他 出芽酵母前孢子膜伸長に關与する Spo71, Spo73 の解析 酵母遺伝学フォーラム 2012. 9.5 京都

2. Tanaka T, Tachikawa H, et al. *SPO71* and *SPO73* are required for proper prospore membrane extension. Yeast Cell Biology Meeting 2011.8.18 Cold Spring harbor NY USA

3. 舘川宏之 出芽酵母前孢子膜形成の分子機構 酵母細胞研究会 2011.7.8 東京

[その他]

ホームページ等

<http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/biological-chemistry/ti/pa2.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

舘川 宏之 (TACHIKAWA HIROYUKI)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・准教授

研究者番号：60251576