

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450094

研究課題名(和文) 出芽酵母の前孢子膜形成におけるリン脂質代謝制御機構とその役割の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the role of phospholipid metabolism in the prospore membrane formation of budding yeast

研究代表者

舘川 宏之 (TACHIKAWA, HIROYUKI)

東京大学・農学生命科学研究科・准教授

研究者番号：60251576

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：出芽酵母の前孢子膜形成をモデルに、生体膜の形態形成の分子機構に関する研究を行った。前孢子膜の適切な伸長に必要な遺伝子の遺伝学的解析から、膜のリン脂質の一つであるPI4Pの合成酵素の複合体がこの過程に関与することが示された。また、PI4Pとその合成酵素、そしてPS、PAが前孢子膜に局在することが示され、さらに、PI4P合成酵素複合体の形成阻害、PI4P合成酵素の活性を持つサブユニットの分解、そして前孢子膜上のPI4Pの減少が、前孢子膜伸長に重要であることが示唆された。これらのことは、前孢子膜の伸長においてPI4Pの調節が重要であることを示し、生体膜形態形成の分子機構の一端が明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Prospore membrane formation of *Saccharomyces cerevisiae* is a de novo membrane formation in side the cell to the proper size and proper shape and is a good model for membrane morphogenesis. We and other groups have been analyzing the genes involved in this process. Our genetic screen revealed that Phosphatidylinositol (PI) 4-kinase complex is involved in the prospore membrane formation. We also showed that PI4P and PI4-kinase complex together with Phosphatidic Acid and Phosphatidylserine are on the prospore membrane. Further, our analyses suggest that decrease of PI4P on the prospore membrane is related to extension of the prospore membrane, and that regulation of PI4P levels on the prospore membrane is important for its extension. Our result will contribute to the understanding of the role of PI4P in membrane formation in the cell.

研究分野：応用微生物学

キーワード：生体膜 リン脂質 微生物学

1. 研究開始当初の背景

(1) リン脂質は生体膜の主要な成分であり、小胞輸送、細胞骨格制御、シグナル伝達など、細胞内でおこる様々な過程に参与している。そのため、リン脂質の分布や量は厳密に制御される必要がある。生物が生命の維持のために必要な膜構造をつくり出す生体膜形成においてもリン脂質の代謝制御は重要であるが、その理解はまだ不十分である。

(2) 出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) の前胞子膜形成は、細胞内に全く新しい膜構造が形成され、それが適切な形、大きさへと形づくられる過程であり、生体膜の形成のモデルとして研究がなされている。申請者は、その分子機構の解明の研究を行ってきており (Tachikawa H et al. *J Cell Biol.* 2001, Pablo-Hernando EM, Tachikawa H et al. *BMC Cell Biology* 2008) 以前の研究で前胞子膜前胞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、前胞子膜形成が、段階的に進行することを明らかにした。さらに、前胞子膜の閉鎖と変形にタンパク質分解系が関与することを示し分子機構の一端を明らかにしている (Diamond A, Tachikawa H et al. *Mol. Biol. Cell* 2009)。

(3) われわれは、前胞子膜の伸長の解析を行い、遺伝子破壊株コレクションからの前胞子膜マーカーを用いたヴィジュアルスクリーニングより取得した前胞子膜伸長に必要な遺伝子 *SPO71*, *SPO73* のコードするタンパク質の解析を行い、Spo71 と Spo73 独立に前胞子膜上に局在化し、膜上で互いに相互作用することにより、前胞子膜伸長に働くことを明らかにした。また、*spo73* 遺伝子破壊株の胞子形成欠損を Phosphatidylinositol (PI)4-kinase 複合体のタンパク質をコードする *STT4* (一部) と *EFR3* の過剰発現が回復することも明らかにしている。タンデムな Pleckstrin Homology (PH) ドメインを持つタンパク質がリン脂質を感知してリン脂質代謝を調節する役割を持つことが報告されている (Ling Y, Emr S et al. *EMBO J* 2012)。われわれが解析を行ってきた Spo71 もタンデムな PH ドメインを持っており、同様な機能を持つ可能性が考えられる。さらに、同じく前胞子膜伸長に必要なタンパク質であり、細胞骨格の制御に参与すると考えられている Gip1 についても解析を行い、アミノ末端ドメインが膜 (おそらくリン脂質) との結合とセブチン構造への局在に必要であることを示している。以上より、前胞子膜形成過程においてリン脂質の代謝制御が重要な役割を持つことは明らかである。

(4) 研究対象の一つである Spo73 は、ジスフェリン (DysF) ドメインのみからなるタンパク質である。DysF ドメインは筋ジストロフィーの原因遺伝子の一つである DysF に存在する機能未知ドメインであり、ドメイン内の変異が筋ジストロフィーを誘発することが知られている。DysF は筋肉の細胞膜の修復

において働くことが知られているが、その機構には不明な点はまだ多い (Lek A et al. *Traffic* 2012)。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、リン脂質、リン脂質代謝系酵素、前胞子膜形成に必要なリン脂質結合タンパク質の細胞内局在や関係そして役割を明らかにすることを通して前胞子膜形成の分子機構を解明する。具体的には、前胞子膜形成時におけるリン脂質およびその合成酵素、および Spo73, Spo71, Gip1 の役割を明らかにすることを目的とする。

(2) この過程に参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。また、DysF ドメインの解析を通して、関連する疾患の分子基盤にせまる。

3. 研究の方法

(1) 現在までに、各種リン脂質に特異的に結合するドメインと GFP の融合タンパク質を利用して、前胞子膜上に、PA が多く存在すること、PI(4,5)P₂ が局在すること、PI4P も少ないが局在することなどが報告されている (Nakanishi H et al. *Mol. Biol. Cell* 2004)。しかし申請者は、PA は前胞子膜に多いが、PI(4,5)P₂ は伸長が進んだ前胞子膜のみで観察されること、PI4P が前胞子膜に多いことを示す予備的な結果を得ていた。そこで、以下の実験を行った。

リン脂質の細胞内局在の観察を行った。各種リン脂質検出用マーカータンパク質 (PI4P: GFP-Osh2, PI(4,5)P₂: GFP-PLCδ, PA: GFP-Spo20fragment, 必要に応じて PI3P: EEA1-GFP, PS: lactC2-GFP) について前胞子膜形成時の細胞内局在を詳細に再検討した。前胞子膜のマーカーとしては前胞子膜の膜タンパク質と RFP の融合タンパク質 (Dtr1-RFP) を用いた。

前胞子膜伸長の変異株におけるリン脂質の細胞内局在の観察を行った。前胞子膜伸長に参与する Spo71 や Spo73 の欠損株における各種マーカーの前胞子膜形成における局在を観察した。

リン脂質代謝系酵素の細胞内局在の観察を PI 系に絞って行った。GFP タグを付加したリン脂質代謝系酵素の前胞子膜形成時の細胞内局在を観察した。観察対象としては、細胞膜の PI4-kinase をコードする Stt4 およびともに複合体を形成する Efr3, Ypp1、ゴルジ体に局在する PI4-kinase である Pik1、PI4P-5kinase をコードする Mss4、そして PI phosphatase をコードする Sac1, Inp51, 52, 53 等について解析を行う。

(2) *spo73* 遺伝子破壊株の胞子形成欠損を PI4-kinase 複合体のタンパク質をコードする *STT4* (一部) と *EFR3* の過剰発現が回復するメカニズムに迫るため、以下の実験を行った。

全長、各種欠失変異および活性中心に変異を導入した Stt4 について、過剰発現が *spo73* 遺伝子破壊株の胞子形成を回復するかを調べた。Efr3 についても欠失変異を導入して同様に解析した。

Auxin-inducible Degron のシステムを用いて、PI4-kinase を胞子形成時特異的に分解する系を構築して、*spo73* 遺伝子破壊株の胞子形成を回復するかを調べた。また、この時の前胞子膜の伸長についても、前胞子膜マーカーを用いて解析を行った。

前胞子膜上のリン脂質の組成を操作するため、PI4-kinase および PI4-phosphatase の活性を持つドメインをそれぞれ前胞子膜マーカーとの融合タンパク質として発現するプラスミド構築した。これらを、前胞子膜伸長に欠陥のある *spo73* 株に導入することにより、前胞子膜上に局在化させて、これら株における胞子形成の回復を観察した。

(3) *Spo73* と同様に、前胞子膜伸長に必要な遺伝子 *GIP1* について *SPO73* と遺伝学的関係を調べた。それぞれの遺伝子の欠損がもう一方の過剰発現によって相補されるか否かを調べた。また、2重破壊株を作製しその前胞子膜の大きさを単独変異株と比較して解析した。

(4) 本研究で得られる結果や他のグループの報告をもとに、リン脂質代謝制御機構を取り込んだ、前胞子膜形成分子機構のモデルを構築した。また、ジスフェリンドメインの役割について考察した。

4. 研究成果

(1) 各種リン脂質のマーカーを用いた観察の結果、以前に報告のある PA、PI4P に加えて、PS も前胞子膜形成の初期から前胞子膜に局在することが明らかになった。PI(4,5)P₂ については、前胞子膜形成の初期には前胞子膜上に観察されず、伸長後の大きな前胞子膜にのみ観察されることが示された。PI3P については、エンドソーム様の局在パターンを示し、胞子形成時に特異的な局在は示さなかった。また、現在用いているマーカーでは、*Spo71* および *Spo73* の欠損による前胞子膜中の PA、PI4P、PS の明らかな変化は、観察されなかった。

(2) リン脂質代謝系酵素について、前胞子膜形成時における細胞内局在の変化を、GFP 融合タンパク質を用いて解析した。PI4-kinase 複合体を形成するタンパク質のうち Stt4 と Efr3、PI4P 5-kinase である Mss4 が前胞子膜上に局在することを明らかにした。PI4-phosphatase である Sac1 に関しては、前胞子膜形成時も小胞体に、Inp52 はドット状の局在を示した。Inp51 と Inp53 についてははっきりした局在パターンを得ることはできなかった。また、*spo73* 破壊株において PI4-kinase や PI4P 5-kinase の局在は変化しないことが示された。

(3) Stt4 および Efr3 が *Spo73* の欠損を回復

するのに必要なドメインの解析を行い、Stt4 についてはキナーゼドメインを含まない変異体やキナーゼ活性中心に変異を持つ変異体が回復能を持ち、キナーゼドメインを含む全長は、回復能を持たないことが明らかになった。また、Stt4 と Efr3 の両方について、Ypp1 との結合領域が必要であり、複合体の形成を阻害することにより *Spo73* の欠損を回復していることが示された。

(4) Stt4 および Efr3 による *Spo73* の欠損の胞子形成不全の回復が、PI4-kinase 複合体の形成を阻害し機能を低下させることによるのかを調べた。AID システムを用いた PI4-kinase の分解より、*Spo73* 欠損株の胞子形成が部分的に回復した。また、このとき前胞子膜の伸長が部分的に回復していることが示された。これらのことから、*Spo73* の欠損の回復には、前胞子膜上の PI4P の合成を阻害することが重要なのではないかと考えられた。

(5) *Spo73* 欠損株において、PI4P 4-phosphatase である Sac1 の活性を持つドメインを前胞子膜マーカーと融合タンパク質として発現させた結果、胞子形成の部分的な回復が見られた。これに対して、Stt4 の kinase 活性を持つドメインを前胞子膜上に局在化させても何も変化も観察されなかった。このことは、*Spo73* 欠損株の胞子形成の回復は、前胞子膜上の PI4P の減少によることを強く示唆している。

(6) 前胞子膜の伸長に必要な因子である *Spo73* と *Gip1* の遺伝学的関係を調べた結果、いずれの過剰発現ももう一方の変異を回復することができず、二重破壊株の前胞子膜は単独破壊に比べてさらに小さくなった。これらの結果から、*SPO73* と *GIP1* の間には遺伝学的相互作用がなく、*Spo73* と *Gip1* は別々の経路により前胞子膜の伸長に関与していることが示された。

(7) 以前の研究で、PI4P のレベルが下がることにより前胞子膜の伸長が阻害されるという報告がなされていた (Park JS et al. J. Cell Sci. 2012)。本研究では、複数の方法により、PI4P の減少により、前胞子膜の伸長が促進されることが示された。異なる結果が得られた理由はまだはっきりしておらず、今後さらなる検討が必要である。本研究の成果により、PI4P の代謝制御とその役割に関する、新しい知見が得られ、今後の研究により PI4P の関与する生体膜形態形成の分子機構の解明につながることを期待される。また、ジスフェリンドメインのみからなる *Spo73* は、前胞子膜形成の系においては、*Spo71*、*Vps13* と複合体を形成して PI4P のレベルを下げる過程で働くと考えられる。高等動物のジスフェリンドメインも、膜脂質と他のタンパク質の両方と結合する調節因子としての役割をしていることが推測される。

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)

〔雑誌論文〕(計2件)

Park JS, Okumura Y, Tachikawa H, Neiman AM. *SPO71* encodes a developmental stage-specific partner for Vps13 in *Saccharomyces cerevisiae*. Eukaryotic Cell 査読有 12(11) 2013, 1530-1537
DOI: 10.1128/EC.00239-13.

Okumura Y, Nakamura TS, Tanaka T, Inoue I, Suda Y, Takahashi T, Nakanishi H, Nakamura S, Gao XD, Tachikawa H. The Dysferlin domain-only protein, Spo73, is required for prospore membrane extension in *Saccharomyces cerevisiae* mSphere 査読有 1(1) 2016, 00038-15
DOI: 10.1128/mSphere.00038-15

〔学会発表〕(計10件)

中村毅 奥村祐哉 舘川宏之 前孢子膜形成に必要な Spo73 は PI4P と関係する 酵母遺伝学フォーラム 2013 年 9 月 8 日～10 日 東北学院大学(宮城県・仙台市)

沼尻祐未 井上一朗 舘川宏之 出芽酵母孢子形成に必要な PP1 ターゲティングサブユニットの解析 日本農芸化学会 2014 年 3 月 28 日～30 日 明治大学(神奈川県・川崎市)

奥村祐哉 中村毅 須田恭之 舘川宏之 ディスフェリンタンパク質である Spo73 の機能解析 日本農芸化学会 2014 年 3 月 28 日～30 日 明治大学(神奈川県・川崎市)

中村毅 奥村祐哉 舘川宏之 出芽酵母の前孢子膜形成における Spo73 の役割および PI4P との関係の解析 日本細胞生物学会 2014 年 6 月 11 日～13 日 奈良県新公会堂(奈良県・奈良市)

中西秀樹 Libing Shi 舘川宏之 高暁冬 出芽酵母の孢子を利用したカプセル化酵素の作成 酵母遺伝学フォーラム 2014 年 9 月 1 日～3 日 東京大学(東京都・文京区)

中村毅 奥村祐哉 舘川宏之 出芽酵母前孢子膜形成における PI4P および PI 4-kinase Stt4 の役割 日本農芸化学会 2015 年 3 月 26 日～29 日 岡山大学(岡山県・岡山市)

中村毅 奥村祐哉 舘川宏之 出芽酵母孢子形成時の前孢子膜伸長における PI4P の役割の解析 日本細胞生物学会 2015 年 6 月 30 日～7 月 2 日 タワーホール船堀(東京都・江戸川区)

中村毅 奥村祐哉 舘川宏之 出芽酵母前孢子膜形成における PI4P の役割の解析 酵母遺伝学フォーラム 2015 年 8 月 31 日～9 月 2 日 広島大学(広島県・東広島市)

Tachikawa H, Numajiri Y, Okumura Y, Nakamura TS, Hidaka J, Inoue I, Neiman AM. Analyses of Gip1, a protein

phosphatase type1 targeting subunit required for prospore membrane extension. Cold Spring Harbor Meeting "Cell Biology of Yeasts" 2015 年 11 月 3 日～7 日 Cold Spring Harbor Laboratories (NewYork, USA)

Nakamura TS, Okumura Y, Tachikawa H. Analysis of the role of PI4P in prospore membrane extension during sporulation of budding yeast. Cold Spring Harbor Meeting "Cell Biology of Yeasts" 2015 年 11 月 3 日～7 日 Cold Spring Harbor Laboratories (NewYork, USA)

〔その他〕

ホームページ等

<http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/biological-chemistry/kenkyunaiyou/index.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