

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24570219

研究課題名(和文) シンタキシンの減数分裂特異的なとりこみを制御するアレスチン様タンパク質の解析

研究課題名(英文) Characterization of an arresting-like protein involved in the internalization of syntaxin during meiosis

研究代表者

中村 太郎 (Nakamura, Taro)

大阪市立大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号：30291082

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：減数分裂時のエンドサイトーシスを観察するライブイメージング系を構築した。その結果、Mug170は孢子形成時に細胞膜の特定の領域に局在し、Psy1の局在変化と同時に観察することができた。Psy1のとりこみに重要なリジン残基を決定した。分裂酵母に存在する7つのHECTタイプユビキチンリガーゼ欠損株を作製し、Psy1のとりこみを観察したところ、いずれの株でもとりこみの欠損は見られなかった。また、減数分裂時に発現量の上がるmug遺伝子破壊株約200にGFP-Psy1を導入して、20の関連遺伝子を取得した。これらの中には、ユビキチンリガーゼ、サイクリン、微小管の構築に関わる遺伝子などが含まれていた。

研究成果の概要(英文)：We conducted live imaging of endocytosis during meiosis by fluorescence microscopy and demonstrated that Mug170 localizes to the specific region on the plasma membrane of zygote. We also observed dynamic behavior of Psy1 during meiosis and determined the lysine residue required for its internalization. No HECT-type ubiquitin ligase mutants showed defects in internalization of Psy1. Moreover, we identified 20 genes involved in Psy1 internalization, which encode ubiquitin ligase, cyclin, and microtubule-related proteins.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：膜輸送 シンタキシシン アレスチン 酵母 孢子形成

1. 研究開始当初の背景

エンドサイトーシスは、細胞が細胞外のものを取りこむ真核生物に普遍的な生命現象であり、細胞膜上のタンパク質のターンオーバーや、物質のとりこみと放出を制御している。

申請者は分裂酵母の胞子形成過程を解析している過程で、減数分裂に作動するエンドサイトーシスの存在を発見した。細胞膜に局在するシンタキシン 1 オルソログ Psy1 は、細胞膜から消失し、代わって胞子細胞膜へと局在をダイナミックに変化させる。シンタキシン 1 は、細胞膜上で膜小胞との特異的融合に直接関わるタンパク質で、膜小胞のターゲット膜を規定しているがその局在が細胞膜から前胞子膜へと変化するのである。これにより、分泌小胞の輸送方向の変化を大規模に起こすことが可能となる。

2. 研究の目的

それではこの減数分裂特異的な Psy1 のとりこみを引き起こす因子は何であろうか？申請者らはその候補としてアレスチン様タンパク質をコードする *mug170⁺* を取得した。アレスチンは真核生物に普遍的に存在し、酵母においては細胞膜タンパク質のエンドサイトーシスに関わっている。一般的に細胞膜タンパク質のエンドサイトーシスはユビキチン化が引き金になるが、アレスチンは細胞膜タンパク質とユビキチンリガーゼのアダプターとしてはたらくことにより、とりこまれるタンパク質に特異性を与えている。

mug170⁺ が減数分裂特異的に発現すること *mug170* 破壊株で Psy1 のとりこみが阻害されること 栄養増殖時に *Mug170* を強制発現させると Psy1 が細胞膜からとりこまれることから、*Mug170* が Psy1 のとりこみに直接関わる可能性が高いと考えられる。本研究は、Psy1 の減数分裂特異的なエンドサイトーシスの分子メカニズムをアレスチン様タンパク質 *Mug170* の解析を通して明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) Psy1、*Mug170* の減数分裂時のとりこみを蛍光顕微鏡下で観察できる系を構築する。

(2) Psy1 のとりこみに関わる新たな遺伝子を取得する。

(3) Psy1 のとりこみのメカニズムを解明する。

4. 研究成果

(1) Psy1、*Mug170* や核タンパク質、各オルガネラ局在マーカータンパク質などを CFP、GFP、mCherry など異なる蛍光タンパク質で標識し、さらにエンドサイトーシスを

追跡できる蛍光試薬 FM4-64 なども含めたライブイメージング系を構築した。これにより *Mug170* は胞子形成時に細胞膜の特定の領域 (Psy1 が局在できるところ) に局在し、Psy1 のダイナミックな局在変化をみる事ができた。*Mug170* が Psy1 のとりこみに関与することをサポートする結果が得られた。

(2) アレスチンは通常、ユビキチンリガーゼと結合して、ターゲットタンパク質のユビキチン化に関わる。そこで、ユビキチンリガーゼのうち、細胞膜に局在する HECT ドメインをもつユビキチンリガーゼが、*Mug170* を認識する可能性があると考えた。分裂酵母には HECT タイプのユビキチンリガーゼが 7 つ存在する。これら、すべての遺伝子破壊株を作製し、Psy1 のとりこみを観察した。しかしながら、いずれの株でもとりこみの欠損は見られなかった。したがって、Psy1 のとりこみには複数のユビキチンリガーゼが関わっている可能性が考えられた。Psy1 のとりこみは減数分裂時に起こるので、とりこみに関連する遺伝子も同じような発現パターンを示すのではないかと考えた。分裂酵母では、減数分裂・胞子形成時に発現が上昇する *mug* 遺伝子に注目した。約 200 の *mug* 遺伝子破壊株に GFP-Psy1 を導入して、減数分裂・胞子形成時のとりこみを観察した。その結果、Psy1 のとりこみに異常のある株を 20 取得した。これらの中には、ユビキチンリガーゼ (HECT タイプではない) サイクリン、微小管の構築に関わる遺伝子など興味深いものが含まれていた。

(3) ユビキチンは標的タンパク質のリジン残基に付加される。Psy1 に存在する 12 カ所のリジン残基をアルギニンに置換したさまざまな変異株を作製し、減数分裂・胞子形成時のとりこみについて調べた。全てのリジン残基について調べた結果、とりこみに重要なリジン残基を決定した。

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. Seike T, Nakamura T, *Shimoda C 2015 Molecular coevolution of a sex pheromone and its receptor triggers reproductive isolation in *Schizosaccharomyces pombe*. Proc Natl Acad Sci U S A. 112: 4405-4410. (査読有り)
2. Takaine M, Imada K, Numata O, Nakamura T, *Nakano K. 2014 The meiosis-specific nuclear passenger protein is required for proper assembly of forespore membrane in fission yeast. **J Cell Sci.** 127: 4429-4442. (査読有り)

3. Fukunishi K, Miyakubi K, Hatanaka M, Otsuru N, Hirata A, Shimoda C, *Nakamura T. 2014. The fission yeast spore is coated by a proteinaceous surface layer comprising mainly Isp3. **Mol Biol Cell**. 25, 1545-1548. (査読有り)
 4. *Seike T, Nakamura T, Shimoda. 2013. Distal and proximal actions of peptide pheromone M-factor control different conjugation steps in fission yeast. **PLoS ONE**. 16, e69491 (査読有り)
 5. Yamaoka T, Imada K, Fukunishi K, Yamasaki Y, Shimoda C, *Nakamura T. 2013. The fission yeast synaptobrevin ortholog Syb1 plays an important role in forespore membrane formation and spore maturation. **Eukaryotic Cell**. 12, 1162-1170 (selected for cover illustration) (査読有り)
- [学会発表](計 20 件)
1. 新美柊子, 中村太郎 (大阪市大・院理・生物地球) 分裂酵母における胞子細胞膜の形成開始時にはたらく新規遺伝子の取得・解析 第 67 回日本細胞生物学会大会 2015 年 6 月 30 日~7 月 2 日 タワーホール舟橋(東京都・江戸川区)
 2. Kana Fukunishi, Kana Miyakubi, Aiko Hirata, Chikashi Shimoda, Taro Nakamura Structure of the spore surface THE EIGHTH INTERNATIONAL FISSION YEAST MEETING (招待講演)(国際学会) 2015 年 6 月 21 日~25 日 Ikuta Shrine, Kobe, Hyogo, Japan
 3. 今田一姫, 中村太郎 (大阪市大・院理・生物地球) 2 つの Rab, Ypt3 と Ypt2 は SPB 上で前胞子膜形成の開始を調整する 第 49 回酵母遺伝学フォーラム研究会 2015 年 8 月 31 日~9 月 2 日 広島大学(広島県・東広島市)
 4. 今田一姫, 中村太郎 (大阪市大・院理・生物地球) 分泌経路の Rab はスピンドル極体上で胞子細胞膜の形成開始を調整する 第 68 回細胞生物学会大会 2016 年 6 月 15 日~17 日 京都マルサ(京都府・京都市)
 5. 酒井崇史, 中村太郎 (大阪市大・院理・生物地球) 分裂酵母胞子壁の最外タンパク質層(Isp3 層)構築に関わる遺伝子の取得と解析 2016 年 3 月 27 日~30 日 札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)
 6. 松崎彩子, 東谷未来, 中村太郎 (大阪市大・院理・生物地球) 分裂酵母における胞子特異的なタンパク質の網羅的解析 日本農芸化学会 2016 年度大会 2016 年 3 月 27 日~30 日 札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)
 7. 福西加奈, 中村太郎 (大阪市大・院理・生物地球) 胞子壁形成における分裂酵母 ADAM ファミリータンパク質 Mde10 の機能解析 日本分子生物学会 2014 年 11 月 25 日~27 日 パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)
 8. 石橋尚美, 中村太郎 (大阪市大・院理・生物地球) 分裂酵母カルモジュリンによる胞子細胞膜形成開始の制御 イーストワークショップ 2014 年 11 月 14 日~15 日 ビューポ-ト呉(広島県・呉市)
 9. 新美柊子, 中村太郎 (大阪市大・院理・生物地球) 分裂酵母の胞子細胞膜形成開始に関わる新たな遺伝子の取得と解析 イーストワークショップ 2014 年 11 月 14 日~15 日 ビューポ-ト呉(広島県・呉市)
 10. 福西加奈, 大鶴なつみ, 宮首佳奈, 畠中内子, 平田愛子, 下田親, 中村太郎 (大阪市大・院理・生物地球) 分裂酵母胞子表層構造の構築 イーストワークショップ 2014 年 11 月 14 日~15 日 ビューポ-ト呉(広島県・呉市)
 11. 福西加奈, 中村太郎 (大阪市大・院理・生物地球) 胞子表層構造の構築における ADAM プロテアーゼ Mde10 の機能解析 酵母遺伝学フォーラム 2014 年 9 月 1 日 東京大学(東京都・文京区)
 12. 中村太郎 (大阪市大・院理・生物地球) 分裂酵母の胞子表層構造の構築メカニズム 真核微生物交流会(招待講演) 2014 年 6 月 13 日 酒類総合研究所(広島県・東広島市)
 13. 石橋尚美, 板谷有希子, 中村太郎 (大阪市大・院理・生物地球) 分裂酵母の前胞子膜形成におけるカルモジュリンの機能 第 65 回日本細胞生物学会大会 2013 年 6 月 19 日~21 日 ウィンクあいち(愛知県・名古屋市)
 14. 福西加奈, 中村太郎 (大阪市大・院理・生物地球) 分裂酵母 ADAM メタロプロテアーゼ Mde10 による胞子表層構造の構築 第 65 回日本細胞生物学会大会 2013 年 6 月 19 日~21 日 ウィンクあいち(愛知県・名古屋市)

15. 石橋尚美、中村太郎 (大阪市大・院理・生物地球) 分裂酵母の胞子形成における SPB 構造変換の分子メカニズム 第 46 回酵母遺伝学フォーラム 2013 年 9 月 8 日 ~ 10 日 東北学院大学土樋キャンパス (宮城県・仙台市)
16. 今田一姫、中村太郎 (大阪市大・院理・生物地球) 分裂酵母の胞子形成は SPB 上での Rab-CEF カスケードにより開始される 第 46 回酵母遺伝学フォーラム 2013 年 9 月 8 日 ~ 18 日 東北学院大学土樋キャンパス (宮城県・仙台市)
17. 福西加奈、大鶴なつみ、宮首佳奈、畠中内子、下田 親、中村太郎 (大阪市大・院理・生物地球・東大院新領域) 花粉アレルゲン様配列を持つ分裂酵母胞子表面タンパク質 Isp3 の解析 第 46 回酵母遺伝学フォーラム 2013 年 9 月 8 日 ~ 10 日 東北学院大学土樋キャンパス (宮城県・仙台市)
18. 福西加奈、宮首佳奈、畠中内子、大鶴なつみ、平田愛子、下田親、中村太郎 (大阪市大院理・東大院新領域) 花粉アレルゲンと相同姓をもつ分裂酵母胞子壁タンパク質 Isp3 の解析 日本農芸化学会 2014 年度東京大会 2014 年 3 月 27 日 ~ 30 日 明治大学生田キャンパス (神奈川県・川崎市)
19. 山崎百合子、寺口絵理香、中村太郎 (大阪市大・院理・生物地球) 分裂酵母シタキシン 1 の胞子形成特異的なエンドサイトーシスの分子メカニズム 日本農芸化学会 2013 年度大会 2013 年 3 月 24 日 ~ 27 日 東北大学 川内北キャンパス (宮城県・仙台市)
20. 山崎百合子、寺口絵理香、中村太郎 (大阪市大・院理・生物地球) 分裂酵母シタキシン 1 の胞子形成時エンドサイトーシスの分子機構 第 35 回日本分子生物学会年会 2012 年 12 月 11 日 ~ 12 月 13 日 福岡国際会議場 (福岡県・福岡市)

〔その他〕

ホームページ等

http://www.sci.osaka-cu.ac.jp/biol/cbiol/pombe/pombe_J.htm

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 太郎 (Nakamura Taro)

大阪市立大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号：30291082