

令和 2 年 6 月 17 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07377

研究課題名(和文)細胞内新規膜構造形成の分子メカニズム

研究課題名(英文)Molecular mechanisms for de novo membrane formation.

研究代表者

須田 恭之(Suda, Yasuyuki)

筑波大学・医学医療系・助教

研究者番号：10553844

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):本研究では、Rab GTPaseの下流で機能するExocyst繫留複合体に焦点を当て、ポストゴルジ小胞がどのように繫留から融合を経て前胞子膜を形成するか解析を行った。オーキシンデグロン法を改変し、胞子形成時特異的にExocyst複合体中の因子を分解する条件変異株を作出し、胞子形成能を指標として検討した。その結果、どのExocyst複合体中の因子も胞子形成率の低下を引き起こし、前胞子膜形成に機能することが見出された。しかしながらこれら因子の分解による胞子形成率の低下には有意な差は見られず、Exocyst複合体とともに協調して前胞子膜形成に機能する因子の存在が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で明らかにする膜構造形成の分子機構は、出芽酵母の前胞子膜のみならず様々なオルガネラにおいて、さらには種を超えて存在する。よって本研究により得られる知見を足がかりとして細胞内膜交通の基本的な分子基盤が明らかになることが期待される。本研究ではExocyst複合体の前胞子膜形成への寄与を明らかにした。他生物におけるポストゴルジ小胞同士の融合による新規膜構造形成としては精子頭部の先体や植物細胞の細胞分裂時の細胞盤形成が挙げられ、Exocyst複合体はこれら膜構造形成にも同様に機能することが考えられる。

研究成果の概要(英文): In this study, one of the effector complex of Rab GTPase sec4, Exocyst complex, was focused to analyze for the initiation of prospore membrane formation during sporulation in *Saccharomyces cerevisiae*. We have constructed auxin-inducible degron mutants for each subunit of Exocyst complex and analyzed for prospore membrane formation. Although each of them did not show complete sporulation defective phenotypes, each mutants showed reduced sporulation efficiency, suggesting the Exocyst complex functions in prospore membrane formation.

研究分野：細胞生物学

キーワード：生体膜 膜輸送 出芽酵母 胞子形成

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

真核生物は様々なタンパク質と脂質膜の複合体により形作られる膜構造に囲まれた細胞内小器官から構成されている。この膜構造の形成と維持には膜構造にて機能するタンパク質と生体膜を形作る膜脂質の供給が必須であるが、主だった機構としては細胞内膜交通が寄与していると考えられている。膜交通はドナー小胞の出芽と輸送、そしてターゲット膜への融合により成り立っており、その分子機構はいくつかの段階により制御されている。細胞膜への小胞の融合を例にすると、1) 小胞の融合を制御する分子スイッチ Rab GTPase の活性化、2) Rab GTPase のエフェクターである繫留複合体のリクルートによる小胞の細胞膜への繫留、3) 小胞と細胞膜に存在する SNARE 分子の会合といった3段階の分子機構により成し遂げられる。これらの分子機構はさまざまな細胞内膜輸送において研究が行われてきたが、新規膜構造形成では不明な点が多い。その理由として、ドナーである小胞のターゲット膜が存在せず、細胞生物学的な検討が比較的困難であるとともに、モデルとなる細胞内現象が限られていることが挙げられる。本研究では、この細胞内新規膜構造形成のひとつとして出芽酵母の減数分裂における細胞内新規膜構造形成に着目し研究を行なった。

栄養源の飢餓に応答した出芽酵母の減数分裂とそれに伴う胞子形成過程では、細胞内小胞輸送経路の大幅な変換により前胞子膜と呼ばれるまったく新しい膜構造が細胞内に形成される。この前胞子膜形成過程では、その前胞子膜形成の初期段階に小胞が融合するべきターゲット膜が存在せず、高等生物の中心体に相当し、核膜に埋め込まれた紡錘極体とよばれる構造の細胞質側において新規に膜構造の形成が開始することから、前述の様に新規膜構造形成機構のモデルと捉えることができる。これまでに申請者を含む数グループが出芽酵母の胞子形成過程の研究を行っており、紡錘極体の細胞質側が減数分裂時に新たな構造体を配置し、新規膜構造形成の足場となることが明らかになってきたが、小胞がなぜその足場においてのみ融合を開始するかなど幾つかの疑問に対しては明確な答えが出ていない。

Rab GTPase は細胞内膜輸送経路において主として小胞のターゲット膜への融合を制御する分子スイッチとして機能している。Rab GTPase は不活性型の GDP 結合型として細胞質に存在し、グアニンヌクレオチド交換因子(GEF)により活性化すると GTP 結合型に変換し、膜構造へと局在し、繫留複合体をはじめとする様々なエフェクター分子を膜上へとリクルートする。のちに GTPase 活性化タンパク質の介助により不活性型に戻ると細胞質へとリサイクルされる。細胞内の膜輸送において、様々な Rab GTPase (とエフェクター分子)には特異性が存在し、小胞は融合すべき場所が決められている。

Rab GTPase のひとつである Sec4 は、ポストゴルジ小胞の細胞膜への融合において機能している。Sec2 はグアニンヌクレオチド交換因子であり、Sec4 の GDP 型から GTP 型への変換(活性化)を行い、エフェクター分子として Exocyst 複合体が機能することが報告されている。出芽酵母の胞子形成では、細胞内輸送経路が大幅に変えられ、ポストゴルジ小胞は細胞膜ではなく、紡錘極体へと輸送される。輸送された小胞は紡錘極体上でおそらく小胞同士の融合を起因として細胞内の新規膜構造である前胞子膜を形成する。この際に Sec2-Sec4 の寄与について明らかにしてきたが、そのエフェクター分子 Exocyst 複合体に関しては研究開始当初には明らかになっていなかった。

### 2. 研究の目的

本研究では、Rab GTPase の下流で機能する繫留複合体に焦点を当て、ポストゴルジ小胞がどのように繫留から融合を経て前胞子膜を形成するか解析を行った。

### 3. 研究の方法

Rab GTPase Sec4 のエフェクターとして機能する Exocyst 複合体を形成する因子それぞれについて胞子形成時特異的デグロン株(以下省略し、デグロン株)を作製し、その表現型を詳細に検討した。

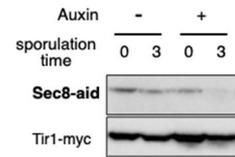
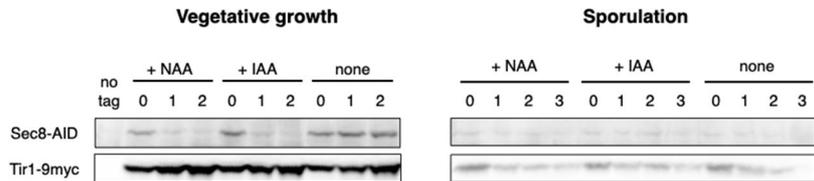
### 4. 研究成果

出芽酵母の減数分裂、胞子形成時特異的にターゲット遺伝子の機能を欠損させる手法として、これまでにターゲット遺伝子のプロモーター領域を栄養増殖時のみに発現し減数分裂、胞子形成時に抑制される *CLB2* 遺伝子のプロモーター領域に置換する方法を利用していた。しかしながら、この手法を用いて検討した Rab GTPase Sec4 の GTP 交換因子 Sec2 の発現抑制では胞子形成不全の表現型が弱いとの結果を得ていた。この理由として、半減期が比較的長いタンパク質についてはプロモーター置換による発現抑制のみでは標的タンパク質の機能欠損が不完全であることが予想された。そこで本研究では、繫留複合体サブユニットの胞子形成時特異的デグロン株を作製し検討することとした。オーキシングレグロン法(Nishimura K. et al., 2009)を改変し、植物由来の Tir1 を胞子形成時特異的に発現させることで標的タンパク質を分解誘導する系を作製し用いた。この解析の結果、Exocyst 複合体の分解効率が予想よりも低く、系の改善が必要となった。(下図)

当初、植物由来の Tir1 は ADH1pr により高発現させていたが、減数分裂時には ADH1pr による誘導はさほど高くないことが明らか

となった。この点を改善するために TEF1pr による誘導と、上流 ORF の安定性を高めることが報告されている DIT1t を採用し Tir1 発現コンストラクトを作製した。この結果、減数分裂時の Tir1 高発現を可能として、さらには当初計画通り Exocyst 複合体の胞子形成時特異的分解を行うことが可能となった。(右図)

上記の成果により、Exocyst 複合体中の因子それぞれのデグロン株を作出し、オーキシン添加による分解を試みた。その結果、どの Exocyst 複合体中の因子も胞子形成率の低下を引き起こした。このうち、Sec8 などは小胞上に、Sec3, Exo70 はターゲット膜上にリクルートされると考えられていた。しかしながらこれら因子の分解による胞子形成率の低下には有意な差は見られなかった。以前の研究から、Exocyst 複合体中の Sec3, Exo70 は胞子形成時に紡錘極体上にリクルートされ、複合体形成に寄与していると考えていたが、これらの結果より、小胞上にリクルートされる因子も同様に複合体形成、そしてポストゴルジ小胞の繫留による前胞子膜形成に重要な役割を持つことがわかった。一方で、Exocyst 複合体の分解は胞子形成率の低下は誘導するものの、胞子形成不全の表現型は見られなかった。この結果は前胞子膜形成における小胞の繫留、融合には Exocyst 複合体のほか何らかの因子が機能している可能性を示唆している。栄養増殖時に Sro7/77 は Exocyst 複合体と協調して小胞のターゲティング、繫留に寄与することが報告されている。そこで *sro7Δ sro77Δ* 二重破壊株を作製し検討したが、胞子形成には目立った表現型は見られなかった。よって Exocyst 複合体と Sro7/77 は協調して前胞子膜形成へと寄与していることが示唆された。今後は、これらの両複合体の前胞子膜形成に寄与についてさらなる検討が必要と考えられる。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Viet Nguyen Thi Minh, Duy Duong Long, Saito Kazuhiro, Irie Kaoru, Suda Yasuyuki, Mizuno Tomoaki, Irie Kenji	4. 巻 23
2. 論文標題 Regulation of LRG1 expression by RNA binding protein Puf5 in the budding yeast cell wall integrity pathway	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 988 ~ 997
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12646	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Suda Yasuyuki, Tachikawa Hiroyuki, Inoue Ichiro, Kurita Tomokazu, Saito Chieko, Kurokawa Kazuo, Nakano Akihiko, Irie Kenji	4. 巻 18
2. 論文標題 Activation of Rab GTPase Sec4 by its GEF Sec2 is required for prospore membrane formation during sporulation in yeast <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 FEMS Yeast Res.	6. 最初と最後の頁 fox095
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/femsyr/fox095	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Suda Yasuyuki, Kurokawa Kazuo, Nakano Akihiko	4. 巻 5
2. 論文標題 Regulation of ER-Golgi Transport Dynamics by GTPases in Budding Yeast	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Front. Cell Dev. Biol.	6. 最初と最後の頁 122
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcell.2017.00122	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tsuyoshi S Nakamura, Yumi Numajiri, Yuuya Okumura, Junji Hidaka, Takayuki Tanaka, Ichiro Inoue, Yasuyuki Suda, Tetsuo Takahashi, Hideki Nakanishi, Xiao-Dong Gao, Aaron M Neiman, and Hiroyuki Tachikawa	4. 巻 28
2. 論文標題 Dynamic localization of a yeast development-specific PP1 complex during prospore membrane formation is dependent on multiple localization signals and complex formation.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Mol. Biol. Cell	6. 最初と最後の頁 3881-3895
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1091/mbc.E17-08-0521	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

[学会発表] 計13件(うち招待講演 2件/うち国際学会 6件)

1. 発表者名 Yasuyuki Suda
2. 発表標題 Live imaging of the Golgi apparatus in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
3. 学会等名 Mini-symposium on membrane trafficking and remodeling (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中村 毅, 棟重賢治, 須田恭之, 舘川宏之
2. 発表標題 出芽酵母前胞子膜伸長における PI4P およびオルガネラ接触部位の 役割の解析
3. 学会等名 酵母遺伝フォーラム第51回研究報告会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yasuyuki Suda, Hiroyuki Tachikawa, Kenji Irie, Akihiko Nakano
2. 発表標題 Post-Golgi vesicle tethering and fusion for de novo membrane formation during sporulation in budding yeast
3. 学会等名 The 2018 FEBS Golgi meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Long-Duy Duong, Yasuyuki Suda, Kenji Irie
2. 発表標題 Cytoplasmic Deadenylation Ccr4 is Required for Translational Repression of Puf5 mRNA targets in the Stationary Phase in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
3. 学会等名 2018 joint annual meeting of JSCB & JSDB
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tsuyoshi S. Nakamura, Kenji Muneshige, Yasuyuki Suda, Hiroyuki Tachikawa
2. 発表標題 Analysis of the role of PI4P and organelle contact site in prospore membrane extension during sporulation of budding yeast
3. 学会等名 2018 joint annual meeting of JSCB & JSDB
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kenji Irie, Duong Long Duy, Yasuyuki Suda
2. 発表標題 Cytoplasmic deadenylases Ccr4 regulates not only LRG1 mRNA level through poly(A) shortening but also the translation of LRG1 mRNA in the stationary phase.
3. 学会等名 Cutting edge development in RNA biology for the control of gene expression (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Duong Long Duy, Yasuyuki Suda, Kenji Irie
2. 発表標題 Cytoplasmic deadenylases Ccr4 is required for translational repression of Puf5 mRNA targets in the stationary phase.
3. 学会等名 Cutting edge development in RNA biology for the control of gene expression (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Duong Long Duy, 須田恭之, 入江賢児
2. 発表標題 ポリA分解酵素Ccr4はLRG1 mRNAのポリ(A)鎖長と翻訳を制御する。
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム第50回研究報告会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Arvin Lapiz Valderrama, Duong Long Duy, Yasuyuki Suda, Kenji Irie
2. 発表標題 Cytoplasmic deadenylases Ccr4 and Pop2 are required for translational repression of LRG1 mRNA in the stationary phase.
3. 学会等名 28th International Conference on Yeast Genetics and Molecular Biology (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yasuyuki Suda
2. 発表標題 Membrane traffic in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
3. 学会等名 Special seminar in College of Life Science, National Taiwan University (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Duong Long Duy, Yasuyuki Suda, Kenji Irie
2. 発表標題 Cytoplasmic deadenylases Ccr4 is required for translational repression of LRG1 mRNA in the stationary phase.
3. 学会等名 第19回日本RNA学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 須田恭之, 舘川宏之, 中野明彦, 入江賢児
2. 発表標題 出芽酵母Sec2の胞子形成における役割
3. 学会等名 第69回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中村毅, 奥村裕哉, 井上一朗, 須田恭之, 舘川宏之
2. 発表標題 出芽酵母の前胞子膜伸張に必須なPP1ターゲティングサブユニットGip1の解析
3. 学会等名 第69回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2017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
--	---------------------------	-----------------------	----