

令和 2 年 6 月 9 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07712

研究課題名(和文) 出芽酵母前孢子膜伸長の分子機構解明 - タンパク質脱リン酸化とリン脂質代謝制御 -

研究課題名(英文) Molecular mechanism of prospore membrane extension in budding yeast: protein dephosphorylation and regulation of phospholipid metabolism

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(農学部)・准教授

研究者番号：60251576

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)：出芽酵母の孢子形成は、ダイナミックな細胞内再編成の過程である。本研究では、この過程で出現する前孢子膜の形成機構を解析することにより、細胞内新規膜構造形成機構の解明を目指した。この過程において働く、1型脱リン酸化酵素については、そのターゲットに迫った。また、この過程に必須なVps13を含む複合体については、他のコンタクトサイトタンパク質と協調することにより、小胞体と前孢子膜のコンタクトサイトを形成して、リン脂質のレベルの制御と前孢子膜の伸長において働くことを明らかにした。Vps13は様々なコンタクトサイトに局在を変えるタンパク質として注目されており、その膜形成における働きの理解に貢献した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞内新規膜形成は、細胞内で普遍的に見られる現象で、オートファジー、繊毛形成、植物の細胞板形成などがあげられる。出芽酵母の前孢子膜形成は、オートファジーとは全く異なるセットのタンパク質によって起きる細胞内新規膜形成の過程であり、1つのモデルとなると考えられる。本研究は、真核生物に広く保存された1型脱リン酸化酵素およびVps13、そしてPI4Pの前孢子膜形成における働き的一端を明らかにするものであり、普遍的な膜形成機構の理解に繋がる。また、ヒトVps13ホモログは神経変性疾患の原因遺伝子であり、疾患の分子基盤の理解に繋がる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Sporulation of budding yeast is a dynamic process of intracellular reorganization. In this study, to know the mechanism of de novo membrane formation in the cell, we analyzed the formation of the prospore membrane which appears during spore formation. As to the protein phosphatase type I complex which functions in this process, we tried to identify target protein and obtained some candidates. As to Vps13 containing complex, we showed that it forms the ER-prospore membrane contact sites with other contact site proteins, and functions in regulation of the levels of phospholipids and prospore membrane extension. This study contributed to our understanding of function of Vps13 in membrane formation.

研究分野：応用微生物学

キーワード：生体膜 リン脂質 出芽酵母 孢子形成 細胞分化 脱リン酸化酵素 脂質輸送

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

出芽酵母の胞子形成は、酵母が栄養源の枯渇という環境変化を察知して、細胞内をダイナミックに変化させ、ストレス耐性の胞子を作り出す、環境応答・細胞応答・細胞分化の過程である。胞子形成初期には、オートファジーが誘導されて隔離膜が形成され、その液胞への融合により細胞構成成分の再利用のための分解が起きる。これに対して、胞子形成中期には、前胞子膜と呼ばれる膜構造が形成され、減数分裂によって生じる娘核、その他オルガネラ、そして細胞質を包み込んで胞子の前駆体となる。前胞子膜は隔離膜と同様に細胞内で形成される新規二重膜構造であるが、全く異なる因子の働きにより形成されており、重要な役割を持つにもかかわらずその形成の分子機構には未だ不明な点が多い。

前胞子膜形成は、生体膜が適切な形、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されてきており(Mathieson EM, Neiman AM et al. Mol. Biol. Cell 2011, Maier P, Knop M et al. EMBO J. 2008)、我々は、その分子機構の解明の研究を行っている(Tachikawa H et al. J. Cell Biol. 2001, Pablo-Hernando EM, Tachikawa H et al. BMC Cell Biology 2008, Ishihara M, Tachikawa H et al. Eukaryotic Cell 2009)。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、前胞子膜が出現後、初期の伸長により小さな球状になり、続いて細長く伸長したのち先端の閉鎖に伴って大きな球状に変形することを明らかにした。さらに、この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)。我々は、これまでの研究で、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(PP1)複合体が、前胞子膜の伸長に必要なことを明らかにしている。また、同様に前胞子膜伸長に必要な遺伝子として、*SPO71*, *SPO73*, *VPS13* が、我々と共同研究者により報告されている。いずれの破壊株においても、前胞子膜は小さな球状の段階で伸長が止まり、胞子形成不全となる(Okumura Y, Tachikawa H et al. mSphere 2016, Park JS, Tachikawa H et al. Eukaryotic Cell 2013, Parodi EM, Huang LS et al. Eukaryotic Cell 2012, Park JS, Neiman AM et al. J. Cell Sci. 2011)。現在、これら因子の関与する前胞子膜伸長の分子機構解明に取り組んでいる。

PP1複合体(Gip1-Glc7)に関しては、前胞子膜の形成の過程で、紡錘極体(SPB)~前胞子膜~セブチン(前胞子膜に沿ったバー状の細胞骨格)~前胞子膜~核と、ダイナミックに局在を変えること、それぞれに局在化するために必要なドメインがGip1(targeting subunit)にあること、

Gip1のPP1結合モチーフによってGip1とGlc7(catalytic subunit)が結合し、その結合が機能に必要なこと、Gip1自体がGlc7によって脱リン酸化されるターゲットの一つであり、その脱リン酸化がGip1とGlc7の局在変化に必要なことを明らかにしている。

Spo73, *Spo71*, *Vps13*に関しては、*Spo73-Spo71-Vps13*が、膜結合型タンパク質複合体(本研究でSSV複合体と命名)を形成して、ともに機能すること、*spo73*破壊株の胞子形成欠損をPI(Phosphatidylinositol)4-kinase複合体のタンパク質をコードする*STT4*の部分配列(活性中心を含まない)および*EFR3*の過剰発現が回復させること、PI4P 4-phosphataseの触媒ドメインの前胞子膜上への強制発現や、デグロンを用いたPI4-kinaseの分解により、前胞子膜のPI4Pのレベルを下げることにより、*spo73*破壊株の前胞子膜伸長と胞子形成が回復することを明らかにしている。リン脂質、特にPIは、膜の構成成分の中でも、リン酸化状態によりタンパク質との結合の特異性を変えることで、シグナル分子やオルガネラに特徴的な性質を付与する分子として働く重要な分子であり、生体膜形成においても重要な役割を担うと考えられる。現在までに、PP1複合体とSSV複合体の関係については、遺伝学的解析から、2つが独立に働くことを示唆するデータを得ている。

2. 研究の目的

我々は、『PP1複合体は、膜供給に必須なターゲットタンパク質を脱リン酸化することにより、また、SSV複合体は、前胞子膜上でリン脂質の代謝系を制御して膜を供給することにより、それぞれ独立に前胞子膜伸長において必須な役割を果たす』という仮説を立てている。本研究では、この仮説を検証し、前胞子膜形成の分子機構解明に寄与することを目的とする。また、これにより生体内新規膜構造形成の普遍的分子機構に迫ることを目指した。

3. 研究の方法

(1) PP1複合体に依存した前胞子膜伸長の分子機構の解明

PP1複合体(Gip1-Glc7)について、Gip1の役割がGlc7の前胞子膜ヘリクルート以外にもあるかを調べた。また、膜供給に必須なPP1複合体のターゲットタンパク質を明らかにするための実験を行った。

Glc7と前胞子膜ヘマーカーとの融合タンパク質を*gip1Δ*株で発現し、胞子形成の回復が見られるかを調べた。また、そこにGip1のC末断片を発現した場合の影響を調べた。

Gip1のターゲット候補として、細胞内で近傍で働くことが予想されるタンパク質を選び、それらについて、野生株と*gip1Δ*株で胞子形成時のリン酸化状態に変化がないかを、Western Blot法を用いて調べた。

Gip1のターゲットを網羅的に調べるため、野生株と*gip1Δ*株について胞子形成を誘導したのち、リン酸化ペプチドを精製し、LC-MS-MSを用いて同定した。

SILAC法を用いて、と同様な実験を行った。

(2) SSV 複合体による PI4P の制御機構の解明

SSV 複合体の機能、すなわちリン脂質の代謝系を調節して前胞子膜上の PI4P のレベルを下げる分子機構について解明するための研究を行った。また、SSV 複合体の Vps13 に関して、オルガネラ間のメンブレンコンタクトサイト(MCS)を形成し脂質のやり取りに関与することが報告された (Lang AB et al. J. Cell Biol. 2015)。前胞子膜と他のオルガネラ間での MCS に関する報告はいまだないが、SSV 複合体が胞子形成時に、前胞子膜と他のオルガネラ (PI4P 4-phosphatase の多い小胞体等) との MCS を形成して、脂質の輸送や変換を介して、前胞子膜上の PI4P を減少させているという可能性も十分に考えられたので検討した。

前胞子膜上の PI4P レベルの低下を証明するため、既存のマーカーを組み合わせて新しいマーカーを作製し、その胞子形成時における挙動を観察した。

SSV 複合体がコンタクトサイトを形成する可能性を考え、ER-PM コンタクトサイトに局在する tether タンパク質について、GFP 融合タンパク質として発現させ、胞子形成時の細胞内局在を観察した。

tether タンパク質の局在を、超解像顕微鏡を用いてより詳細に観察した。

Vps13 の断片を栄養増殖時に発現させ、その細胞内局在を観察した。

ER-前胞子膜コンタクトサイトの形成の可能性を、Split-GFP 法によって検討した。

4. 研究成果

(1) PP1 複合体に依存した前胞子膜伸長の分子機構の解明

Glc7 と前胞子膜へマーカーとの融合タンパク質は *gip1Δ* 株の胞子形成能を回復することができなかった。ここに、Gip1 の Glc7 結合領域を含む Gip1 の C 末断片を同時に発現すると、胞子形成が有意に回復した。この結果は Gip1 が、Glc7 の局在化のみでなく、おそらく Glc7 の基質に対する活性に寄与することを示している。

Western Blot 法を用いたリン酸化状態の明らかな変化は検出できなかった。いくつかの候補タンパク質については、わずかな移動度の差は確認できた。

MS を用いたリン酸化ペプチドの解析では、野生株と *gip1Δ* 株で大きな変化のあるリン酸化ペプチドは見出されなかったが、Gip1 自体や、相互作用タンパク質の Ysw1、そして前胞子膜の先端に局在する LEC のコンポーネントのリン酸化が確認された。Ysw1 についてはさらなる解析を行い、Gip1 の安定性に必要であることを明らかにした。

SILAC 法を用いた解析では、リン酸化ペプチドについて、やはりわずかな変化しか観察されず、さらなる系の改善が必要ながわかった。

(2) SSV 複合体による PI4P の制御機構の解明

spo73Δ の欠損の表現型が前胞子膜上の PI4P のレベルを下げることによって回復することを確認するため、PI4P マーカーを用いて PI4P 量の変化を観察した。既存の PI4P マーカーはマーカー依存的にゴルジ体局在、前胞子膜局在を示したため、これらを融合することによって新しい PI4P マーカーを作製した。このマーカーは、ゴルジ体と前胞子膜の両方の局在化でき、これを用いることによって初めて前胞子膜上の PI4P 量の変化を証明することに成功した。

ER-PM コンタクトサイトに局在する tether タンパク質が胞子形成時には前胞子膜上に局在することを明らかにした。また、その局在化に SSV 複合体が必要であることを示した。

超解像顕微鏡を用いた解析により、tether タンパク質の前胞子膜への局在を確認した。

SSV 複合体のコンポーネントである Vps13 の N 末端が小胞体に affinity があることを示した。Vps13 は前胞子膜上に局在することより、Vps13 が小胞体と前胞子膜をつなぎ、小胞体-前胞子膜コンタクトサイトの形成に寄与することを強く示唆した。

Split-GFP 法を用いることにより、小胞体と前胞子膜が近接していることを示した。小胞体-前胞子膜コンタクトサイトを可視化できたと考える。

(3) 生体内新規膜構造形成の分子機構

本研究により、PP1 複合体の targeting subunit には複合体の局在を制御するだけでなく活性も制御することが明らかになった。また、脱リン酸化のターゲットの候補をあげることができた。さらなる解析により、膜供給に必須なターゲットを明らかにできると考える。PP1 は真核細胞に広く保存されており、PP1 の膜形成への関与という普遍的な機構に迫ることができると考える。

また、本研究では、SSV 複合体が ER-PM コンタクトサイトに局在する tether タンパク質と協調して ER-前胞子膜コンタクトサイトを形成することを明らかにした。最近の報告と合わせて考えると、脂質輸送タンパク質である Vps13 が、Spo71-Spo73 アダプターによってリクルートされて SSV 複合体を形成し、tether タンパク質と協調して ER-前胞子膜コンタクトサイトを形成して PI4P のレベルの調節するとともに、膜脂質を小胞体から前胞子膜へ直接供給することが強く示唆されたといえる。Vps13 は、真核生物に広く保存されており、新規膜形成における Vps13 および PI4P の働きについて新しい知見を得ることができた。今後、生体内新規膜構造形成の分子機構の一層の解明に繋がることを期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nakamura Tsuyoshi S., Numajiri Yumi, Okumura Yuuya, Hidaka Junji, Tanaka Takayuki, Inoue Ichiro, Suda Yasuyuki, Takahashi Tetsuo, Nakanishi Hideki, Gao Xiao-Dong, Neiman Aaron M., Tachikawa Hiroyuki	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 Molecular Biology of the 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

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 2018年
3. 雑誌名 FEMS Yeast Research	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 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 館川宏之
2. 発表標題 酵母の前孢子膜形成におけるリン脂質とオルガネラ接触部位の役割
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 館川宏之
2. 発表標題 出芽酵母前孢子膜形成の研究 - 新しい膜構造を構築する分子メカニズムの理解を目指して -
3. 学会等名 酵母細胞研究会
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 FEBS special meeting -the 2018 Golgi meeting-
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 出芽酵母の前孢子膜伸長における PI4P およびオルガネラ接触部位の役割の解析
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Wang Qin Yang Yan Liu Guoyu 舘川宏之 高暎冬 中西秀樹
2. 発表標題 出芽酵母の孢子が貪食細胞および非貪食細胞において取り込まれる過程の解析
3. 学会等名 酵母細胞研究会
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 日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hideki Nakanishi, Qin Wang, Yang Yan, Xiao-Dong Gao, Hiroyuki Tachikawa
2. 発表標題 Studies on phagocytic uptake of yeast spores
3. 学会等名 日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Nakamura Tsuyoshi S., Okumura Yuuya, Tachikawa Hiroyuki
2. 発表標題 Analysis of the role of PI4P in prospore membrane extension during sporulation of budding yeast
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 中村毅、館川宏之
2. 発表標題 出芽酵母前孢子膜伸長におけるPI4Pの役割
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中村毅、奥村祐哉、井上一朗、須田恭之、館川宏之
2. 発表標題 出芽酵母の前孢子膜伸長に必要な PP1 ターゲティングサブユニット Gip1 の解析
3. 学会等名 日本細胞生物学会
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
--	---------------------------	-----------------------	----