

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K06225

研究課題名(和文) 中心体を起点とした細胞膜形成の分子メカニズム

研究課題名(英文) Molecular dissection of cell membrane formation from the centrosome

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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：中心体は、微小管の形成中心としてだけでなく、細胞膜の形成起点としてもはたらいているが、その分子メカニズムは不明な点が多い。分裂酵母の胞子細胞膜の形成は、中心体(酵母ではSPB)から始まるため、中心体からの細胞膜形成のモデルになると考えた。本研究の目的は、ゲノムワイドな逆遺伝学と生化学的手法を組み合わせ、この膜形成開始の分子メカニズムを解明することである。本研究では、カルモジュリンがCa<sup>2+</sup>依存的にSpo15と結合し、SPBに局在することによって、胞子細胞膜の起点としてはたらくことを明らかにした。さらにカルモジュリン/Spo15が結合するSPBタンパク質を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、分裂酵母中心体からの胞子細胞膜形成の分子メカニズムが一部明らかになった。具体的には、膜形成時にSPBに新たに形成されるMOPという構造がSpo15という巨大なコイルドコイルタンパク質によって行われていることを明らかにした。とくに、Spo15が真核生物で高く保存されているCa<sup>2+</sup>結合タンパク質カルモジュリンと結合し、Ca<sup>2+</sup>/カルモジュリン依存的にSPBに局在するという結果は、単に分裂酵母の胞子細胞膜形成開始のメカニズムだけでなく、中心体からの膜形成にCa<sup>2+</sup>シグナルが関わるという重要な知見が得られ、膜形成開始のメカニズムの研究に重要な知見を与えると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The centrosome functions not only as a microtubule formation center but also as a starting site for plasma membrane formation, but its molecular mechanism is still unclear. Since the formation of spore cell membranes in fission yeast begins from the centrosome (SPB in yeast), it was considered to be a model for cell membrane formation from the centrosome. The purpose of this study is to elucidate the molecular mechanism of the initiation of this membrane formation by combining genome-wide reverse genetics and biochemical methods. In this study, we revealed that calmodulin binds to Spo15 in a Ca<sup>2+</sup> + -dependent manner and localizes to SPB, thereby acting as a starting point for the spore cell membrane. Furthermore, we revealed the SPB protein to which calmodulin / Spo15 binds.

研究分野：酵母の分子遺伝学・分子細胞生物学

キーワード：中心体 膜 胞子 酵母

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

中心体は、微小管の形成中心として染色体の分配等で機能することはよく知られている。しかし、細胞膜形成の起点としての別の機能も有する。例えば、動物細胞の一次繊毛形成では中心体の付属突起物と呼ばれる構造に、膜小胞が集まり、そこを起点として繊毛膜が新しく形成される。

一方、申請者の研究対象である分裂酵母の胞子形成においても同様の細胞膜新生がみられる。胞子形成時になると、動物細胞の中心体に相当する SPB (spindle pole body) の細胞質側に MOP (meiotic outer plaque) という付加構造が形成され、そこに膜小胞が集まり、融合することにより胞子細胞膜が形成される。大変興味深いことに、この過程に関わる遺伝子の一部は一次繊毛の形成に関わる遺伝子と共通のものが使われていることを申請者のグループは明らかにした。すなわち、現象的にも分子レベルにおいても、中心体の細胞膜形成起点としてののはたらきは、進化を超えて普遍的に保存されている可能性が考えられ、そのメカニズム解明には大変興味を持たれる。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、分裂酵母の胞子細胞膜形成の中で特に、中心体 (SPB) における膜形成開始に焦点を当て、形成に必要な遺伝子の同定と解析により、その分子メカニズムを解明することである。「微小管の形成中心」としての中心体のはたらきについては世界的に盛んに研究されてきた。一方で、「細胞膜の形成起点」としての役割については研究例も少なく、その分子メカニズムは不明な点が多い。本研究は、もっとも単純な真核モデル生物である酵母の胞子形成を対象として、中心体における膜形成開始のメカニズム解明を目指す。

### 3. 研究の方法

胞子形成時にはまず、SPB の細胞質側に付加構造 MOP (meiotic outer plaque) が形成される。MOP に膜小胞が集まり、融合して胞子細胞膜形成が始まる。MOP の構成因子としては、Spo2, Spo13 が知られているが、これらが SPB に局在するためには、MOP と SPB を結びつける巨大なタンパク質 Spo15 が必要である。本研究では、とくに Spo15 に注目し、MOP はどのようにして形成されるのか？ MOP と胞子細胞膜を直接結びつけるタンパク質 X は何であるかについて、分子遺伝学、分子細胞生物学および生化学的手法を組み合わせ明らかにする。

### 4. 研究成果

胞子形成に必須な遺伝子として取得された遺伝子として、Dms1 に注目した。Dms1 は膜貫通ドメインを持つ機能未知のタンパク質であった。dms1 破壊株で胞子細胞膜は全く形成されなかったことから、Dms1 は胞子細胞膜形成開始に必須であることがわかった。Dms1 に GFP を付加し、その局在を観察した結果、栄養増殖時から SPB に観察された。また、核膜にも弱いながらシグナルが見られた。Spo15 および MOP 構成タンパク質 Spo2, Spo13 は dms1 の遺伝子破壊株ではいずれも SPB に観察出来なかった。逆に spo15, spo2, spo13 の遺伝子破壊株では Dms1 は SPB に局在できた。Dms1 の C 末端にある膜貫通ドメインを削った変異タンパク質は SPB に局在できなかった。逆に膜貫通ドメインだけでも SPB に局在することができた。以上のことから、Dms1 は膜貫通ドメインを介して核膜に局在し、N 末端側で MOP 構成因子と相互作用し、これらを SPB にとどめている可能性が示唆された。しかしながら、Dms1 と Spo15 や既存の MOP 構成因子との直接的な結合は見られなかったため、Dms1 は未知のタンパク質を介して MOP を SPB に局在させていると考えられる。

カルモジュリンは真核生物の間で高く保存され、Ca<sup>2+</sup>シグナル伝達タンパク質として、さまざまな生命現象に関わっている。カルモジュリンの変異株では胞子形成に欠損があることが知られていた。酵母ツーハイブリッド法およびプルダウン法により、カルモジュリンが、Ca<sup>2+</sup>依存的に Spo15 と直接結合することを明らかにした。Spo15 は約 2000 アミノ酸からなる非常に巨大な SPB の構造タンパク質である。様々な Spo15 部分欠失変異タンパク質を構築し、その機能について調べた。その結果、SPB への局在には C 末端側約 500 アミノ酸の領域が必要であることが明らかになった。特に 1500-1600 アミノ酸の領域は安定して SPB に局在するために必要であった。次に、カルモジュリンとの結合領域を調べたところ、こちらについても C 末端側約 500 アミノ酸が必要であった。また、Spo15 は Spo2 と結合することが知られているが、Spo2 との結合には、逆に N 末端側 130 番目から 60 アミノ酸が必要であることがわかった。Spo2 はさらに別の SPB タンパク質を介して胞子細胞膜形成の場所となると考えられている。興味深いことに Spo15 の中央部分約 1200 アミノ酸を欠失させても胞子細胞膜形成はある程度おこった。以上の結果から、Spo15 は C 末端側で Ca<sup>2+</sup>依存的にカルモジュリンを介して SPB に結合・局在し、N 末端側で MOP 構成タンパク質の足場となり、その中央部分は SPB 本体と膜形成が行われてい

る場所の空間的な距離を作るのにはたらいっている可能性が示唆された。

カルモジュリンが MOP の形成に関わることが明らかになったため、胞子形成時に細胞内の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度がどのように変化するかを蛍光タンパク質 GCaMP を用いて観察した。分裂酵母ではすでに栄養増殖で使用可能であることが示されていたので、これを胞子形成時に適用した。その結果、胞子細胞膜形成開始時には細胞内で GCaMP の蛍光強度が高くなることが明らかとなった。これが、膜形成と直接関わるかどうかについては、今後の課題である。

分裂酵母の SPB 本体を構成するタンパク質はかなり同定されている。この中で、核膜付近に局在する Sad1、中央に局在する Pcp1、細胞質側に局在する Sid4, Cdc11 について、Spo15 と結合するかを酵母ツーハイブリッド法を用いて調べた。その結果、Cdc11 についてポジティブな結果が得られた。cdc11 遺伝子は生育に必須なタンパク質であるため、温度感受性変異株を用いた解析を行った。しかしながら、用いた cdc11 変異株では胞子形成には大きな影響が見られなかった。また、調べた cdc11 変異株では、Spo15-GFP タンパク質の SPB への局在も顕著な異常が見られなかった。これらの結果については、使用した cdc11 変異株の変異点の問題（cdc11 は多くのタンパク質の足場としてはたらくので、どのタイプの変異を選ぶのかは重要である）や Cdc11 以外に Spo15 の局在に関わるタンパク質が存在する可能性があると考えられる。

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 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Tahara Yuhei O., Miyata Makoto, Nakamura Taro	4. 巻 7
2. 論文標題 Quick-Freeze, Deep-Etch Electron Microscopy Reveals the Characteristic Architecture of the Fission Yeast Spore	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Fungi	6. 最初と最後の頁 7~7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jof7010007	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 Zhang Bowen, Teraguchi Erika, Imada Kazuki, Tahara Yuhei O., Nakamura Shuko, Miyata Makoto, Kagiwada Satoshi, Nakamura Taro	4. 巻 6
2. 論文標題 The Fission Yeast RNA-Binding Protein Meu5 Is Involved in Outer Forespore Membrane Breakdown during Spore Formation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Fungi	6. 最初と最後の頁 284 ~ 284
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jof6040284	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 Seike Taisuke, Maekawa Hiromi, Nakamura Taro, Shimoda Chikashi	4. 巻 132
2. 論文標題 The asymmetric chemical structures of two mating pheromones reflect their differential roles in mating of fission yeast	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Cell Science	6. 最初と最後の頁 jcs230722
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/jcs.230722	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 Touko Niimi and Taro Nakamura	4. 巻 13
2. 論文標題 The fission yeast SPB component Dms1 is required to initiate forespore membrane formation and maintain meiotic SPB components.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLoS ONE	6. 最初と最後の頁 e0197879
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0197879. eCollection 2018.	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 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 鈴木未菜、中村太郎
2. 発表標題 S. pombeの胞子形成におけるSec7ドメインスーパーファミリータンパク質Spo7の働き
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム第53回研究報告会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 葉山菜央、中村太郎
2. 発表標題 分裂酵母の2つのDDKキナーゼの役割分担
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム第53回研究報告会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 谷口拓海、松崎彩子、中村太郎
2. 発表標題 . pombeの新規胞子壁タンパク質の同定と機能解析
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム第53回研究報告会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 新美 柊子、石橋 尚美、中村 太郎
2. 発表標題 分裂酵母の巨大なSPBタンパク質Spo15の前胞子膜形成における機能
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム 第52回研究報告会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 葉山菜央、中村 太郎
2. 発表標題 分裂酵母を用いたDDKの役割分担および機能発現メカニズムの解明
3. 学会等名 第37回 YEAST WORKSHOP
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 新美 柊子、石橋 尚美、中村 太郎
2. 発表標題 分裂酵母の巨大な中心体タンパク質Spo15はどのようにして胞子細胞膜形成に関わるか
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会（大会自体はコロナウイルスのため中止）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 三浦 悠、中村 太郎（大阪市大・院理）
2. 発表標題 分裂酵母の胞子形成過程に関わる生育に必須な遺伝子の取得と解析
3. 学会等名 第36回YEAST WORKSHOP
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 新美 柊子、中村 太郎（大阪市大・院理）
2. 発表標題 分裂酵母の胞子はどのように形成されるか？
3. 学会等名 第36回YEAST WORKSHOP
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 三浦 悠、中村 太郎（大阪市大・院理）
2. 発表標題 分裂酵母の胞子形成過程に関わる生育に必須な遺伝子の同定および解析
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム 第51会研究報告会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 新美 柊子、中村 太郎（大阪市大・院理）
2. 発表標題 分裂酵母のSPBタンパク質Spo15の胞子形成における機能の解析
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム 第51会研究報告会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

大阪公立大学大学院理学研究科細胞機能学研究室 <a href="http://www.sci.osaka-cu.ac.jp/biol/cbiol/pombe/pombe_J.htm">http://www.sci.osaka-cu.ac.jp/biol/cbiol/pombe/pombe_J.htm</a>
---

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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------