

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05782

研究課題名(和文) 出芽酵母前孢子膜形態形成の分子機構解明とその応用

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of prospore membrane morphogenesis in budding yeast and its applications

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、細胞内新規膜構造形成過程である前孢子膜形成の分子機構の解明を目指し、PP1複合体とSSV複合体の働きを調べた。PP1複合体については、脱リン酸化のターゲットの候補を明らかにしている。SSV複合体については、前孢子膜と小胞体間のコンタクトサイトを形成して、tetherタンパク質やOshタンパク質と共に働く可能性を示した。また、Spo71がVps13のリクルートに加えて前孢子膜上のPI4Pの制御あるいはVps13のPI4Pレベルの高い膜上での機能性に関与することを示した。これらの研究を通して、PP1複合体とSSV複合体が互いに独立に関与する前孢子膜伸長の分子機構の理解に貢献した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、微生物の環境応答・細胞分化の過程への理解が深まったのにとどまらず、生物に普遍的な新規膜形成制御の分子機構に迫ることができた。細胞内新規膜構造の形成は、高等動物の精子の頭部の形成や、繊毛の形成の初期の過程、そして植物の細胞板の形成など広く真核生物で見られる生命現象であり、その理解にも今後つながると考える。さらに、この過程で働く因子の一つであるVps13のヒトホモログはさまざまな神経変性疾患の原因として知られており、本研究は疾患の分子機構の解明へとつながるものでもある。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the functions of the PP1 complex and the SSV complex to elucidate the molecular mechanism of the formation of the prospore membrane, a novel intracellular membrane structure formation process. As for the PP1 complex, we have identified a candidate target for dephosphorylation. As for the SSV complex, we have shown that it may form a contact site between the prospore membrane and the endoplasmic reticulum and work with tether and Osh proteins. We also showed that Spo71 is involved in the regulation of PI4P on the prospore membrane or in the functionality of Vps13 on membranes with high PI4P levels, in addition to Vps13 recruitment. Through these studies, we have contributed to our understanding of the molecular mechanisms of prospore membrane expansion in which the PP1 and SSV complexes are involved independently of each other.

研究分野：応用微生物学

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

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・細胞分化の過程である。この過程では、前胞子膜と呼ばれる膜構造が細胞質中に出現し、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。前胞子膜はオートファジーで観察される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、隔離膜とは様々な面で異なっている。これらの膜は形成に必要なとされる因子も異なっており、特に前胞子膜形成の分子機構には未だ不明な点が多い。オートファジーと異なる機構による新規膜構造形成は、精子の形成過程や動物細胞の繊毛の形成過程、植物の細胞板形成過程にもみられる。前胞子膜形成はこれらの過程を理解するためのモデルになりうる。

研究代表者らはこれまで、前胞子膜形成の分子機構の解明に貢献してきた。前胞子膜形成過程の詳細な解析をライブイメージングにより行い、前胞子膜の形成が以下の4段階よりなることを示した(1)。輸送小胞が融合して前胞子膜が出現する 第一伸長により小さな球状になる 第二伸長によりカシュナツツ状の形態をとる 先端の閉鎖に伴って大きな球状に変形する。中でも、第二伸長は、核、オルガネラ、細胞質を包み込む重要な段階であり、適切な膜の形態形成を必要とする。研究代表者らはこの第二伸長に、1型プロテインホスファターゼ (PP1)複合体 と脂質輸送タンパク質 Vps13 を含む SSV 複合体が、互いに独立に寄与することを示した。さらに、PP1 複合体は前胞子膜に沿ってバー状の構造をとるセプチン細胞骨格と、SSV 複合体はホスファチジルイノシトール4-リン酸 (PI4P) とそれぞれ機能的に関係することを示した(2)。研究代表者らは、これら複合体の役割を中心に前胞子膜形態形成の分子機構解明に取り組んでいる。

酵母の前胞子膜形成は、新しい生体膜が適切な形、大きさへと形づくられる過程であり、生体膜形成のモデルとして世界で広く研究されてきており (3-5)、国内からは研究代表者らがこの分野に貢献してきた。また、PP1 の研究は、主に海外で大変進んでいるが、PP1 と精子形成の関係が最近明らかにされてきており、本研究は、モデル生物を用いてこの分野に示唆を与える研究という面も持つ。Vps13 については、オルガネラ間のメンブレンコンタクトサイトに局在する脂質輸送タンパク質として酵母とヒトの両方で最近大変注目されている(6, 7)。ヒトでは4つのアイソフォームがそれぞれ神経系の疾患の原因遺伝子とされており(8)、我々の研究は、細胞分化における Vps13 の働きを理解するのにとどまらず、疾患の理解にもつながる研究である。

2. 研究の目的

研究代表者らは、『PP1 複合体は小胞輸送と細胞骨格の制御により、SSV 複合体は小胞体と前胞子膜のメンブレンコンタクトサイトを形成して脂質組成制御と膜脂質供給を行うことにより、それぞれ独立に前胞子膜第二伸長における膜の形態形成に寄与する』という仮説を立てている。この仮説を検証することにより前胞子膜形態形成の分子機構を解明し、細胞内新規膜構造形成の理解に寄与することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) PP1 複合体(Gip1-Glc7)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。以前は成功していなかったが、より詳細な条件検討により系を改善し、解析を行った。

(2) Osh タンパク質(Osh1-7)について、GFP を付加して胞子形成時に発現させ、その細胞内局在を観察した。

(3) 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。以前の研究では ER と前胞子膜の膜タンパク質を用いたが、今回は ER 膜タンパク質と前胞子膜に結合するマーカータンパク質を用いた。

(4) SSV 複合体中の Spo71 について、その役割について知るため、Vps13 と結合する PxP モチーフを含むドメインに前胞子膜マーカーを融合させ、*spo71* 破壊株で発現させることにより Spo71 の役割を担えるかを検討した。また、同時に、前胞子膜上の PI4P のレベルを下げる Sac1 と前胞子膜マーカーの融合タンパク質を発現させた場合についても胞子形成を観察した。

(5) SSV 複合体とともに働くと考えられる tether タンパク質(Ist2, Scs2, Scs22, Tcb1-3)の遺伝子について、多重破壊株を作製しその表現型を調べた。また、Ice2 の遺伝子の破壊も加えた7重破壊株も作製し、その胞子形成を観察した。

(6) SSV 複合体で中心的な役割を果たす Vps13 の C 末ドメインは前胞子膜と相互作用することが予想されている。その近傍で働く因子の探索を目指して、Vps13 の C 末ドメインに error prone PCR によって変異を導入して温度感受性胞子形成変異株を作製し、その表現形を解析した。

4. 研究成果

(1) PP1 複合体(Gip1-Glc7)のターゲットを網羅的に調べるための LC-MS-MS 解析の結果、新た

にいくつかの孢子形成関連遺伝子の取得に成功した。現在、個別に解析を始めており、今後メカニズムの解明につながる事が期待できる。

(2) 以前の研究で ER-細胞膜コンタクトサイトに局在する tether タンパク質が孢子形成時には前孢子膜上に局在することを明らかにしていたが、それと協調的に働く脂質輸送タンパク質である Osh タンパク質のうち少なくとも Osh2,3 は明らかに前孢子膜上に局在することを示した。

(3) ER 膜タンパク質と前孢子膜マーカーを用いた Split-GFP 実験により、前孢子膜に沿って蛍光が観察された。(2)の結果と合わせて、ER-前孢子膜コンタクトサイトの存在を強く示唆していると考えられる。

(4) Spo71 の PxP モチーフを含むドメインと前孢子膜マーカーの融合タンパク質は、Vps13 を前孢子膜にリクルートできるが(図1)、それだけでは *spo71* 破壊株の孢子形成を回復できないことが明らかになった(図2)。これにより、Spo71 には Vps13 を前孢子膜にリクルートする以外にも役割があることを示された。これに対して、この融合タンパク質に加えて、前孢子膜の PI4P レベルを低下させるタンパク質(Sac1-前孢子膜マーカー融合タンパク質)を同時に発現した場合には、*spo71* 破壊株の孢子形成不全が部分的に回復することを明らかにした(図2)。これにより、Spo71 は Vps13 を前孢子膜にリクルートするのに加えて、前孢子膜上の PI4P のレベルの制御、あるいは PI4P レベルの高い膜上における Vps13 の機能性に関与することが示された。

(5) SSV 複合体とともに働くと考えられる tether タンパク質(Ist2, Scs2, Scs22, Tcb1-3)の遺伝子の 6 重破壊株は野生株と変わらない効率で孢子形成をしたが、形成される前孢子膜の形態、そして孢子の形態が異常になることを明らかにした。このことは、tether タンパク質が前孢子膜の形態形成に関係することを示している。さらに *ICE2* を加えて 7 重破壊株を作製したが、不安定な表現型を示したので、これについては再度検討の必要がある。

(6) Vps13 の C 末領域に変異を入れることにより作製された *vps13* 温度感受性孢子形成変異株は、やはり前孢子膜の伸長が温度感受性になっていることが示され、今後の関連因子の解析と探索の足掛かりを得た。

(7) 本研究により、PP1 複合体については、脱リン酸化のターゲットの候補を明らかにすることに成功し、さらなる解析を進めている。SSV 複合体については、前孢子膜と小胞体間のコンタクトサイトを形成して、tether タンパク質や Osh タンパク質のそこへの局在化に必要であることや、コンポーネントの 1 つである Spo71 が Vps13 のリクルートに加えて前孢子膜上の PI4P の制御、あるいは PI4P レベルの高い膜上における Vps13 の機能性に関与することを示した。これらの研究を通して、PP1 複合体と SSV 複合体が互いに独立に関与する前孢子膜伸長の分子機構の理解に貢献した。本研究は、真核生物における新生膜やオルガネラの形成の理解につながるとともに、関連するヒト疾患の理解にもつながるといふ意義もあると考える。

<引用文献>

- (1) Diamond A, Park JS, Inoue I, Tachikawa H, Neiman AM. (2009) The anaphase promoting complex targeting subunit Ama1 links meiotic exit to cytokinesis during sporulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* 20: 134-145
- (2) Nakamura TS, Numajiri Y, Okumura Y, Hidaka J, Tanaka T, Inoue I, Suda Y, Takahashi T, Nakanishi H, Gao, XD, Neiman AM, Tachikawa H (2017) Dynamic localization of a yeast development-specific PP1 complex during prospore membrane formation is dependent on multiple localization signals and complex formation *Mol. Biol. Cell* 28: 3881-3895
- (3) Hsu TH, Chen RH, Cheng YH, Wang CW (2017) Lipid droplets are central organelles for meiosis II progression during yeast sporulation *Mol. Biol. Cell* 28: 440-451
- (4) Mathieson EM, Suda Y, Nickas M, Snydsman B, Davis TN, Muller EG, Neiman AM (2011) Vesicle docking to the spindle pole body is necessary to recruit the exocyst during membrane formation in *Saccharomyces cerevisiae* *Mol. Biol. Cell* 21: 3693-3707
- (5) Maier P, Rathfelder N, Maeder CI, Colombelli J, Stelzer EH, Knop M (2008) The SpoMBe pathway drives membrane bending necessary for cytokinesis and spore formation in yeast meiosis *EMBO J.* 27: 2363-2374

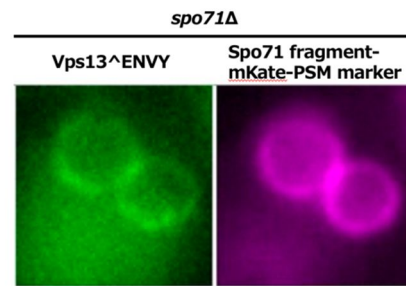


図1 Spo71のPxPモチーフを含むドメインと前孢子膜マーカーの融合タンパク質は、Vps13を前孢子膜にリクルートできる

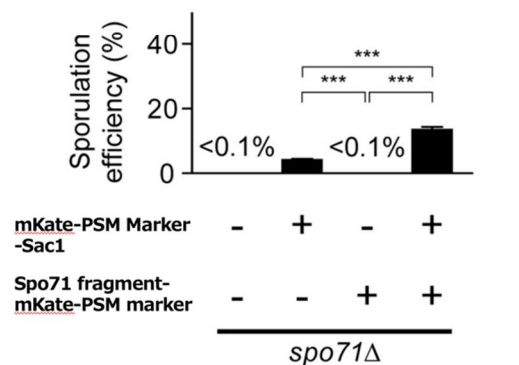


図2 Spo71のPxPモチーフを含むドメインと前孢子膜マーカーの融合タンパク質とSac1-前孢子膜マーカー融合タンパク質を同時に発現すると*spo71*破壊株の孢子形成が部分的に回復する

- (6) John Peter AT Herrmann B, Antunes D, Rapaport D, Dimmer KS, Kornmann B (2017) Vps13-Mcp1 interact at vacuole-mitochondria interfaces and bypass ER-mitochondria contact sites *J. Cell Biol.* 216: 3219-3229
- (7) Bean BDM Dziurdzik SK, Kolehmainen KL, Fowler CMS, Kwong WK, Grad LI, Davey M, Schluter C, Conibear E. (2018) Competitive organelle-specific adaptors recruit Vps13 to membrane contact sites *J. Cell Biol.* 219: 3593-3607
- (8) Kumar N, Leonzino M, Hancock-Cerutti W, Horenkamp FA, Li P, Lees JA, Wheeler H, Reinisch KM, De Camilli P (2018) VPS13A and VPS13C are lipid transport proteins differentially localized at ER contact sites *J. Cell Biol.* 217:3625-3639

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 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Nakamura Tsuyoshi S., Suda Yasuyuki, Muneshige Kenji, Fujieda Yuji, Okumura Yuuya, Inoue Ichiro, Tanaka Takayuki, Takahashi Tetsuo, Nakanishi Hideki, Gao Xiao-Dong, Okada Yasushi, Neiman Aaron M., Tachikawa Hiroyuki	4. 巻 17
2. 論文標題 Suppression of Vps13 adaptor protein mutants reveals a central role for PI4P in regulating prospore membrane extension	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS Genetics	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pgen.1009727	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 Liu Guoyu, Yang Yan, Tachikawa Hiroyuki, Gao Xiao-Dong, Nakanishi Hideki	4. 巻 71
2. 論文標題 Application of yeast spores as β -glucan particles	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Particuology	6. 最初と最後の頁 34 ~ 40
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.partic.2022.01.013	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8件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Yang Yan Liu Guoyu 舘川宏之 高暁冬 中西秀樹
2. 発表標題 ノンプロフェッショナル貪食細胞においてヌクレオチド依存的に誘導されるファゴサイトーシスの解析
3. 学会等名 日本細胞生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yang Yan Song Chaoqun 舘川宏之 高暁冬 中西秀樹
2. 発表標題 出芽酵母の胞子壁に付着するRNAの解析
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム
4. 発表年 2021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 膜交通関連オルガネラの減数分裂・胞子形成における再構成
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤枝祐二 中村 毅 棟重賢治 井上一朗 中西秀樹 須田恭之 舘川宏之
2. 発表標題 Vps13 と Spo73-Spo71 アダプター複合体の前胞子膜形成における役割
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤枝祐二 棟重賢治 中村 毅 須田恭之 舘川宏之
2. 発表標題 出芽酵母の胞子形成における Vps13アダプタータンパク質 Spo71 の解析
3. 学会等名 第72回 日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 膜交通関連オルガネラの減数分裂に伴う再構成
2. 発表標題 須田恭之 舘川宏之 黒川量雄 中野明彦 入江賢児
3. 学会等名 第72回 日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中西秀樹 Yang Yan Liu Guoyu 舘川宏之 高暁冬
2. 発表標題 非貪食細胞におけるヌクレオチドで誘導されるファゴサイトーシス様取り込み機構の解析
3. 学会等名 第72回 日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤枝祐二 棟重賢治 中村毅 中西秀樹 須田恭之 舘川宏之
2. 発表標題 脂質輸送タンパク質Vps13の出芽酵母前孢子膜形成における役割
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム 第53回報告会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

生物化学研究室 http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/biological-chemistry/seika_ronbun/seika_koubo/index.html#link_inav
--

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			
米国	ストーニーブルック大学			
中国	江南大学			