

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 8 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究 C

研究期間：2009～2011

課題番号：21570202

研究課題名（和文）減数分裂時に起動するエンドサイトーシスの分子メカニズム

研究課題名（英文）Molecular dissection of meiotic endocytosis

研究代表者

中村 太郎 (TARO NAKAMURA)

大阪市立大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号：30291082

研究成果の概要（和文）：細胞膜に局在するシンタキシン 1 オルソログ Psy1 は、減数分裂時に細胞膜からとりこまれ、前胞子膜へと局在をダイナミックに変化する。本研究は、その分子メカニズムを明らかにすることを目的とする。Psy1 の取り込みの認識には減数分裂特異的に発現するアレスチン様タンパク質 Mug170、取り込みにはアクチン骨格系が関わることを明らかにした。また、Psy1 の取り込みの際に Psy1 がユビキチン化される可能性を示すいくつかのデータを得た。

研究成果の概要（英文）：The plasma membrane syntaxin 1 ortholog Psy1 is internalized and changes its localization to the forespore membrane during meiosis. The aim of this study is to address the molecular mechanism of this meiotic endocytosis of Psy1. An arrestin-like protein Mug170 which is upregulated during meiosis was involved in this process. Like mitotic endocytosis, meiotic endocytosis required actin-cytoskeleton. Furthermore, we obtained data that ubiquitination of Psy1 triggers internalization during meiosis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：基礎生物学

科研費の分科・細目：細胞生物学

キーワード：GFP、エンドサイトーシス、分裂酵母、減数分裂、膜輸送

## 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込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、物質の取り込みを制御している。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、減数分裂特異的に作動するエンドサイトーシスの存在を発見した。興

味深いことに、胞子形成時、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、代わって前胞子膜へと局在をダイナミックに変化させる。膜小胞のターゲット膜を規定しているシンタキシン 1 が局在を細胞膜から、前胞子膜へと変化する。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。申請者らは *Psy1* の局在変化にはエンドサイトーシスが必要であることを明らかにした。

## 2. 研究の目的

このエンドサイトーシスについては栄養増殖時の通常のエンドサイトーシスと比べていくつかの違いが見られる。したがって、減数分裂時のエンドサイトーシスは、胞子という新しい細胞が新生するときにおこる新しい細胞内の秩序を構築するのに必須なシステムであると考えられる。ここではこの新しいエンドサイトーシスを *meiotic endocytosis* と呼び、その分子メカニズムの解明を目指す。

## 3. 研究の方法

(1) *meiotic endocytosis* の可視化: *Psy1* や核タンパク質、各オルガネラ局在マーカータンパク質をさまざまな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なども含めたライブイメージング系を構築する。

(2) *meiotic endocytosis* の制御因子の取得: ①GFP-*Psy1* をもたせた細胞に変異を導入し、胞子形成に欠損を示す変異株を多数取得した。また、この中で GFP-*Psy1* が減数分裂時に細胞膜に残っているものの取得を目指す。これらの変異株を分類し、原因遺伝子を網羅的に取得・解析する。②胞子形成時に転写誘導される因子のうち、エンドサイトーシスに関わると予想されるものについて、解析を行う。③*Psy1* のユビキチン化の解析: エンドサイトーシスの制御には標的タンパク質のユビキチン化があげられる。*Psy1* についても調べる。

## 4. 研究成果

(1) *meiotic endocytosis* の可視化: *meiotic endocytosis* を蛍光顕微鏡下で追跡、観察する系を構築した。*Psy1* や核タンパク質、各オルガネラ局在マーカータンパク質を CFP, GFP, mCherry など異なる蛍光タンパク質で標識し、蛍光試薬 FM4-64 で標識したエンドサイトーシスとともに観察可能とした。

(2) *meiotic endocytosis* の制御因子の取得: ①GFP-*Psy1* を発現させた株を変異剤処理し、約50,000株のスクリーニングで、約5,600株のヨウ素蒸気で褐色に染まらない変異株を取得した。これらの株を1つ1つ蛍光顕微鏡下で観察し、減数分裂時に*Psy1* が前胞子膜に移行しないもの、すなわち、*meiotic endocytosis* が欠損している可能性の高い株を38株程度取得した。これらは16の相補性

グループに分類された。このうち5つの遺伝子を決定した。そのうち4つはアクチン細胞骨格系、1つはユビキチン修飾系の遺伝子であった。②そこで胞子形成時に発現量が大幅に増加するユビキチン関連因子であるアレクチン様タンパク質 *Mug170* に注目し解析を行った。*mug170* 破壊株では *Psy1* の取り込みが部分的に阻害された。また、*Mug170* を強制発現させると通常細胞膜にみられる *Psy1* が細胞内に取り込まれ、ドット状に局在した。*Mug170* は胞子形成特異的に発現することが知られている。以上のことから、*Mug170* が胞子形成時に *Psy1* の細胞内の取り込みに関わる可能性が示唆された。

(3) *Psy1* のユビキチン化の解析: *Psy1* にはユビキチン化の標的となるリジン残基が12個存在するが、それをアルギニンに置換したさまざまな変異株を作製した。まず12個すべてをアルギニンに変えた変異株はエンドサイトーシスが阻害された。次に、どのリジンがエンドサイトーシスに必要なかを調べたところ、N末付近に存在する3つの近接するリジンが重要であることがわかった。このことから、*Psy1* のエンドサイトーシスにもユビキチン化が必要であることが示唆された。HECT型といわれるユビキチンリガーゼはエンドサイトーシスに必要なことが知られている。分裂酵母に存在するHECT型ユビキチンリガーゼ遺伝子のすべてについて破壊株を作製したが、どの破壊株でも *Psy1* の取り込みは阻害されなかった。このことから *Psy1* のユビキチン化には複数のユビキチンリガーゼに関わる可能性が示唆された。

## 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12件)

- ① Seike T, Yamagishi Y, Iio H, \*Nakamura T., Shimoda C. (2012). Remarkably simple sequence requirement of the M-factor pheromone of *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics*. 191 815-822. 査読あり
- ② Kashiwazaki J, Yamasaki Y, Itadani A, Teraguchi E, Maeda Y, Shimoda C, \*Nakamura T. (2011). Endocytosis is essential for dynamic translocation of a syntaxin 1 ortholog during fission yeast meiosis. *Mol Biol Cell*. 2219 3658-3670 査読あり
- ③ Nakamura-Kubo M, Hirata A, Shimoda

- C, \*Nakamura T. (2011). The fission yeast pleckstrin homology domain protein Spo7 is essential for initiation of forespore membrane assembly and spore morphogenesis. *Mol Biol Cell.* 22: 3442-3455. 査読あり
- ④ Itadani A, Nakamura T., Hirata A, \*Shimoda C. (2010) Fission yeast calmodulin, Cam1, plays a crucial role in sporulation by recruiting and stabilizing the spindle pole body components responsible for assembly of the forespore membrane. *Eukaryot. Cell.* 9: 1925-1935. 査読あり
- ⑤ Nakase M, Tani M, Morita T, Kitamoto HK, Kashiwazaki J, Nakamura T., Hosomi A, Tanaka N, \*Takegawa K. (2010). Mannosylinositol phosphorylceramide is a major sphingolipid component and is required for proper localization of plasma-membrane proteins in *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Cell Sci.* 123:1578-1587. 査読あり
- ⑥ \*Onishi M, Koga T, Hirata A, Nakamura T., Asakawa H, Shimoda C, Bähler J, Wu JQ, Takegawa K, Tachikawa H, \*Pringle JR, Fukui Y. (2010). Role of septins in the orientation of forespore membrane extension during sporulation in fission yeast. *Mol. Cell Biol.* 8 :2057-2074. 査読あり
- ⑦ \*Yamazaki Y, Akashi R, Banno Y, Endo T, Ezura H, Fukami-Kobayashi K, Inaba K, Isa T, Kamei K, Kasai F, Kobayashi M, Kurata N, Kusaba M, Matuzawa T, Mitani S, Nakamura Y, Nakatsuji N, Naruse K, Niki H, Nitasaka E, Obata Y, Okamoto H, Okuma M, Sato K, Serikawa T, Shiroishi T, Sugawara H, Urushibara H, Yamamoto M, Yaoita Y, Yoshiki A, Kohara Y.. (2010). NBRP databases: databases of biological resources in Japan. *Nucleic Acids Res.* D26-30 査読あり
- ⑧ Mukaiyama H, Kajiwara S, Hosomi A, Giga-Hama Y, Tanaka N, Nakamura T., \*Takegawa K. (2009) Autophagy-deficient *Schizosaccharomyces pombe* mutants undergo partial sporulation during nitrogen starvation. *Microbiology* 155: 3816-3826 査読あり
- ⑨ Nakase Y, Hirata A, Shimoda C, \*Nakamura T. (2009) Ectopic overproduction of a meiosis-specific transcription factor induces assembly of prospore-like membranous compartments in vegetative cells of fission yeast. *Genetics* 183:1195-1199 査読あり
- ⑩ Kashiwazaki J, Iwaki T, Takegawa K, Shimoda C, \*Nakamura T. (2009) Two fission yeast rab7 homologs, ypt7 and ypt71, play antagonistic roles in the regulation of vacuolar morphology. *Traffic* 10: 912-924 査読あり
- [学会発表] (計9件)
- ① 日本農芸化学会 2013 年度大会 (東北大学川内北キャンパス)  
2013 年 3 月 24 日～27 日  
○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ntaxin1 の孢子形成特異的なエンドサイトーシスの分子メカニズム
- ② 第 35 回日本分子生物学会年会 (福岡国際会議場・マリンメッセ福岡)  
2012 年 12 月 11 日～14 日  
○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ntaxin1 の孢子形成時エンドサイトーシスの分子機構
- ③ 第 44 回 酵母遺伝学フォーラム (九州大学医学部百年講堂)  
2011 年 9 月 5 日～7 日  
○山崎百合子、寺口絵理香、中村太郎(大阪市大・院理・生物地球)  
メンブレントラフィックと孢子形成 分裂酵母の孢子形成欠損株の解析から
- ④ 第 63 回 日本細胞生物学学会 (北海道大学 クラーク会館)  
2011 年 6 月 27 日～29 日  
「Endocytosis of fission yeast syntaxin 1 orthologue during meiosis」  
○山崎百合子、寺口絵理香、中村太郎(大阪市大・院理・生物地球)
- ⑤ 日本農芸化学会大会 (京都女子大学：震災のため成立するも中止)  
2011 年 3 月 25 日～27 日  
「孢子形成特異的な分裂酵母シntaxin 1 オルソログのエンドサイトーシスの解析」  
○山崎百合子、寺口絵理香、中村太郎 (大阪市大・院理・生物地球)

- ⑥ 第33回日本分子生物学会年会  
第83回日本生化学会大会 合同大会  
(神戸ポートアイランド)  
2010年12月7~10日  
「孢子形成時における分裂酵母シンタキシン1オルソログの局在変化の分子メカニズム」  
○山崎百合子、寺口絵理香、下田 親、  
中村太郎 (大阪市大・院理・生物地球)
- ⑦ 第62回日本細胞生物学会  
(大阪国際会議場)  
2010年5月19~21日  
減数分裂における分裂酵母シンタキシンの局在変化の分子メカニズム  
○寺口絵理香、柏崎 隼、下田 親、  
中村太郎 (大阪市大・院理・生物地球)
- ⑧ International fission yeast meeting 2009  
2009年10月26日~31日 東京  
Endocytosis during meiosis. Jun Kashiwazaki\*, Erika Teraguchi, Akiko Itadani, Chikashi Shimoda, and ○ Taro Nakamura  
(Department of Biology, Graduate School of Science, Osaka City University )
- ⑨ International fission yeast meeting 2009  
2009年10月26日~31日 東京  
Isolation and characterization of fission yeast mutants defective in relocalization of syntaxin 1 homolog during meiosis  
○ Erika Teraguchi, Jun Kashiwazaki, Chikashi Shimoda and Taro Nakamura  
( Department of Biology, Graduate School of Science, Osaka City University )

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中村 太郎 (TARO NAKAMURA)  
大阪市立大学・大学院理学研究科・教授  
研究者番号：30291028

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし