

令和 6 年 9 月 6 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06145

研究課題名(和文)出芽酵母胞子形成におけるオルガネラ分配

研究課題名(英文)Organelle segregation in yeast sporulation.

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) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、出芽酵母の胞子形成時における小胞体機能ドメインERESの形態変化と胞子への分配を司る分子機構と前胞子膜形成への寄与を明らかにすることを目的として行った。まず、野生株における小胞体、ERESの減数分裂・胞子形成時の挙動、分布について明らかにし、スクリーニングによりそれらに影響を示す変異株を取得した。ライブイメージングにより変異株の表現型を詳細に解析した。その結果、減数分裂時にERESの減少に伴う分泌経路の一時的な停止が認められた。この際、膜交通関連オルガネラは細胞内から消失し、前胞子膜形成後にPP1-Gip1をトリガーとして、その内側にて再形成されることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

真核生物には老化に伴う個体の寿命が存在するが、配偶子形成を経た世代交代により個体寿命・老化はリセットされる。この現象は胞子形成を経た出芽酵母においても認められている。現在までに、出芽酵母の減数分裂・胞子形成時のオルガネラ分配や前胞子膜は、個体寿命・老化のリセット、すなわち若返りメカニズムへの関与が示唆されている。しかしながらその詳細なメカニズムについては明らかになっていない。本研究により前胞子膜形成のメカニズムの一端が明らかとなった。今後は、取得した変異株における個体寿命リセットなど詳細な解析を通じ、個体寿命・老化との関連などが少しずつ明らかになっていくと期待される。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to elucidate the molecular mechanisms governing the morphological changes of the functional domain of the endoplasmic reticulum (ER), ERES and their distribution to spores during sporulation in budding yeast, and their contribution to the formation of the prospore membrane (PSM) formation. First, the morphology and distribution of the ER and ERES during meiosis and sporulation in wild-type were analyzed, and screening of the mutants showing defects in the distribution of the ERES was conducted. The phenotype was analysed in detail by live imaging. The results showed a transient arrest of the secretory pathway with a reduction of ERES during meiosis. The membrane traffic-associated organelle disappeared from the cell during meiosis, triggering PP1-Gip1 to re-form inside the PSMs upon the onset of their formation.

研究分野：細胞生物学

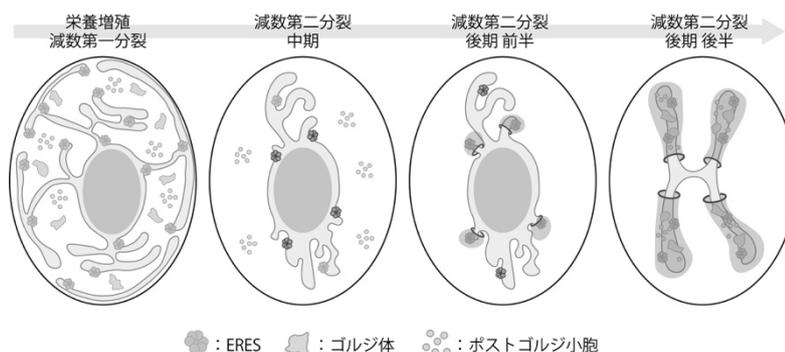
キーワード：生体膜 膜輸送 出芽酵母 胞子形成 減数分裂

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

高等生物の配偶子形成に相当する出芽酵母の胞子形成では、減数分裂を経た1倍体の核は前胞子膜と呼ばれる膜構造の内へと分配され、4つの胞子が細胞内に形成される。前胞子膜は細胞内に新たに形成される膜構造であり、その形成の初期段階はゴルジ体からの小胞を主な膜供給源とする。そのため前胞子膜を正確に形成するためには、減数分裂・胞子形成の過程を通じて細胞内膜交通の制御が必須であるといえる。これまでの研究では、ゴルジ体以降の細胞内膜交通経路に関わる分子の前胞子膜形成への寄与については精力的に行われてきたが、小胞体とゴルジ体の間などいわゆる初期分泌経路に関わる分子や関連オルガネラの動態についての研究は、自身の研究を含めわずかしかなかった(1, 2)。

細胞内膜交通の出発地点となる小胞体膜上ではER exit site (ERES) と呼ばれるCOPII小胞を形成する膜領域が形成され、この領域からCOPII小胞により積荷がゴルジ体へと輸送されてゆく。小胞体は、核膜と連続した膜構造として存在するため、減数分裂時に際した核膜形態の変化に応じて大きくその構造を変化させる(下図)。この小胞体の形態やERESの分布が減数分裂・胞子形成を通じてどのように変化するのか、細胞内に新たに形成される前胞子膜に膜脂質がどのように供給されるのか、さらに細胞内膜交通を形成するオルガネラは胞子内へどのように分配されるのか、そしてそれらを司る分子機構は存在するのか、など未知なる点が多くあった。



2. 研究の目的

本研究では、小胞体機能ドメインERESの形態変化と胞子への分配を司る分子機構に焦点を当て、その前胞子膜形成への寄与を明らかにすることを目的として行った。

3. 研究の方法

小胞体、ERESの減数分裂・胞子形成時の挙動、分布について核や前胞子膜と同時にイメージングすることにより詳細に定量的に記述し、ビジュアルスクリーニングにより小胞体形態やERESの動態制御、胞子前駆体への分配などに影響を示す変異株を取得した。取得した変異株について、小胞体、ERESにおける小胞輸送の分子機構に影響があるかなど定量的な画像解析を中心に行った。

4. 研究成果

小胞体の形態はReticulon family, Yop1/DP1 familyが中心となり制御されている。小胞体の形態制御が減数分裂・胞子形成を通じて制御されているのかに関して解析を試みた。小胞体のチューブ構造が失われる*rtn1 rtn2 yop1*変異株を作成し、胞子形成を誘導した細胞にて小胞体の形態とERESの挙動を観察し、野生株と比較した。野生株では減数分裂に際して、母細胞の細胞膜直下に存在するcortical ER領域が剥がれ、核膜へと収束する様子が観察されたが、変異株では異常なシート状構造の影響からこの様子が観察されなかった。出芽酵母の栄養増殖細胞においてERESは小胞体の曲率の高い領域に形成され、1細胞あたり30-50のドメインを形成する。このERESの数を栄養増殖時から減数分裂・胞子形成の完了まで記録したところ、減数分裂時にはERES数は減数分裂第二期のmetaphase IIを境に減少から増加へと転じた。このERES数変化は*rtn1 rtn2 yop1*変異株では異常な数値を示した。これらの結果から減数分裂時にはERES数が減少し、細胞内物質輸送がそのスタート時点の変化に伴い制御されている可能性があることや、ERES数の制御には小胞体の形態変化が必要であることがわかった。

野生株におけるERESの挙動について、細胞内の位置や形成される前胞子膜との関係についてより詳細にライブイメージングに解析したところ、ERESは前胞子膜形成のごく初期段階にその内側にて新たに形成されることがわかった。この結果は、前胞子膜内側の細胞質区画への膜交通関連オルガネラの分配を示唆している。そこで、前胞子膜内側におけるERES形成を指標として、既知の胞子形成・前胞子膜形成不全株についてビジュアルスクリーニングを行い、*gip1*変異株を取得した。

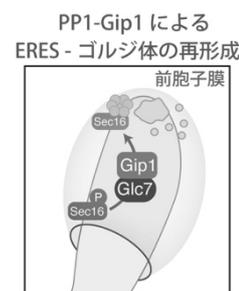
*Gip1*は1型ホスファターゼ(PP1)の胞子形成時特異的サブユニットであり、その欠損株は胞子形成時のセプチン構造形成不全を示すことが報告されていた(3)。そこでERES形成とセプチン構造との関連が疑われた。セプチンはCdc3/10/11/12, Shs1のサブユニットからなるヘテロ8量体を基本構造とし、フィラメントやリングなど多様な高次構造を形成する細胞骨格のひとつである。出芽酵母の胞子形成時には、このうちCdc11/12が胞子形成時に特異的に発現するSpr3/28に置き換わることが示されている(4, 5)。そこで*spr3/28*欠損とAuxin-Degron法によるCdc3/10の破壊を組み合わせた条件変異株を作製し、ERES形成や前胞子膜の形態など詳細に解析した。

その結果、条件変異株での ERES 形成は野生株と変化なく、PP1-Gip1 経路はセプチン構造形成の制御とは別経路にて ERES 形成に寄与していることがわかった。

野生株と *gip1* 欠損株について、ERES 形成やゴルジ体の挙動について各種マーカータンパク質を使用したライブイメージングにより解析を行ったところ、野生株では減数分裂の経過とともに ERES 数減少を起因としてゴルジ体も一過的に減少すること、それらは前胞子膜形成時にその内側で ERES の再形成を起点として再構成されることを見出した。一方、*gip1* 欠損株ではそれら再形成は全く起こらないことが明らかになった。

次に COPII 小胞形成を司る分子をコードする遺伝子群のうち非必須遺伝子の欠損株にても ERES 形成や前胞子膜形成、そして胞子形成率に影響があるか調べたところ、Sar1-GEF である Sec12 のホモログ Sed4 の欠損株では ERES 形成不全に起因した前胞子膜伸長不全を示すことがわかった。Sec16 は ER 膜と相互作用する巨大タンパク質であり、ERES 形成に中心的に機能する分子であり、近年の研究から Sed4 は Sec16 の ERES 局在に寄与することが報告されている (6)。そこで *gip1* 欠損株における Sec16 の胞子形成時の ERES 局在について調べたところ、減数第二分裂以降の細胞では Sec16 の ERES 局在が全く見られなかった。また同様に *gip1* 欠損株では Sed4 の ERES 局在にも影響があった。

以下に本研究にて得られた結果をまとめる。減数分裂・胞子形成時に ERES は何らかのシグナルにより徐々にその数を減らし、その結果、減数第二分裂時にゴルジ体は細胞内から減少もしくは消失し、一過的に分泌経路全体が停止する。その際、いくつかのゴルジ体の酵素は小胞体へと戻される。同時期に、細胞内にあらかじめ存在したゴルジ体はポストゴルジ小胞の供給源として消費され、これら小胞が融合し前胞子膜形成が開始される。この前胞子膜の内側に配置される PP1-Gip1 からのシグナルを起点として ERES は局所的に再形成する。ERES の再形成は、ゴルジ体をはじめとする膜交通関連オルガネラの再生を促し、分泌経路そのものを新たに前胞子に形成する。減数分裂・胞子形成におけるこれら一連の細胞内膜交通の再編成により前胞子膜形成とその内側への膜交通関連オルガネラの分配とが成立し、その制御に関するモデル (右図) を提唱し論文として発表した。



なお、ERES 数の制御には PP1-Gip1 が関わることからリン酸化・脱リン酸化による制御が示唆された。その因子の候補としては ERES 形成の最上流因子である Sec16 が挙げられるが、本研究ではそのリン酸化領域の同定には至らなかった。また、関与するリン酸化酵素の同定と解析が今後の課題として挙げられるだろう。

<引用文献>

1. Neiman AM. Prospore membrane formation defines a developmentally regulated branch of the secretory pathway in yeast. *J Cell Biol.* 1998 Jan 12;140(1):29-37.
2. Suda Y, Nakanishi H, Mathieson EM, Neiman AM. Alternative modes of organellar segregation during sporulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell.* 2007 Nov;6(11):2009-17.
3. Tachikawa H, Bloecher A, Tatchell K, Neiman AM. A Giplp-Glc7p phosphatase complex regulates septin organization and spore wall formation. *J Cell Biol.* 2001 Nov 26;155(5):797-808.
4. Fares H, Goetsch L, Pringle JR. Identification of a developmentally regulated septin and involvement of the septins in spore formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol.* 1996 Feb;132(3):399-411.
5. De Virgilio C, DeMarini DJ, Pringle JR. SPR28, a sixth member of the septin gene family in *Saccharomyces cerevisiae* that is expressed specifically in sporulating cells. *Microbiology.* 1996 Oct;142 (Pt 10):2897-905.
6. Yorimitsu T, Sato K. Sec16 and Sed4 interdependently function as interaction and localization partners at ER exit sites. *J Cell Sci* [Internet]. 2023 May 1;136(9). Available from: <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.261094>

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 9件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 10件）

1. 著者名 Suda Yasuyuki, Tachikawa Hiroyuki, Suda Tomomi, Kurokawa Kazuo, Nakano Akihiko, Irie Kenji	4. 巻 na
2. 論文標題 Remodeling of the secretory pathway is coordinated with <i>de novo</i> membrane formation in budding yeast gametogenesis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 na
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/2023.07.10.548399	査読の有無 無
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 Tojima Takuro, Suda Yasuyuki, Jin Natsuko, Kurokawa Kazuo, Nakano Akihiko	4. 巻 13
2. 論文標題 Spatiotemporal dissection of the Golgi apparatus and the ER-Golgi intermediate compartment in budding yeast	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e92900
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.92900	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 Taguchi Shodai, Suda Yasuyuki, Irie Kenji, Ozaki Haruka	4. 巻 28
2. 論文標題 Automation of yeast spot assays using an affordable liquid handling robot	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 SLAS Technology	6. 最初と最後の頁 55 ~ 62
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.slast.2022.12.001	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 Revilleza Jastin Edrian Cocuangco, Sato Megumi, Irie Kaoru, Suda Yasuyuki, Mizuno Tomoaki, Irie Kenji	4. 巻 17
2. 論文標題 Regulation of CLB6 expression by the cytoplasmic deadenylase Ccr4 through its coding and 3' UTR regions	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0268283
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0268283	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 Sato Megumi, Irie Kaoru, Suda Yasuyuki, Mizuno Tomoaki, Irie Kenji	4. 巻 18
2. 論文標題 The RNA-binding protein Puf5 and the HMGB protein Ixr1 contribute to cell cycle progression through the regulation of cell cycle-specific expression of CLB1 in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLOS Genetics	6. 最初と最後の頁 e1010340
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pgen.1010340	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 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 e1009727
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 -

1. 著者名 Higuchi Yudai, Fujii Shiori, Valderrama Arvin Lapiz, Irie Kaoru, Suda Yasuyuki, Mizuno Tomoaki, Irie Kenji	4. 巻 85
2. 論文標題 The eIF4E-binding protein Eap1 has similar but independent roles in cell growth and gene expression with the cytoplasmic deadenylase Ccr4	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 1452 ~ 1459
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/bbb/zbab056	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 Valderrama Arvin Lapiz, Fujii Shiori, Duy Duong Long, Irie Kaoru, Mizuno Tomoaki, Suda Yasuyuki, Irie Kenji	4. 巻 26
2. 論文標題 Pbp1 mediates the aberrant expression of genes involved in growth defect of ccr4 and pop2 mutants in yeast <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 381 ~ 398
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12846	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 Fujii Shiori, Duy Duong Long, Valderrama Arvin Lapiz, Takeuchi Risa, Matsuura Eri, Ito Ayaka, Irie Kaoru, Suda Yasuyuki, Mizuno Tomoaki, Irie Kenji	4. 巻 570
2. 論文標題 Pan2-Pan3 complex, together with Ccr4-Not complex, has a role in the cell growth on non-fermentable carbon sources	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 125 ~ 130
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.07.007	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 Tuong Vi Dang Thi, Fujii Shiori, Valderrama Arvin Lapiz, Ito Ayaka, Matsuura Eri, Nishihata Ayaka, Irie Kaoru, Suda Yasuyuki, Mizuno Tomoaki, Irie Kenji	4. 巻 16
2. 論文標題 Pbp1, the yeast ortholog of human Ataxin-2, functions in the cell growth on non-fermentable carbon sources	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0251456
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0251456	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9件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 神奈亜子、黒川量雄、戸島拓郎、須田恭之、中野明彦
2. 発表標題 膜交通のダイナミクスの真実に迫る 酵母RUSH法開発とライブセルイメージングへの応用
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム第56回研究報告会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 田口将大、入江賢児、須田恭之
2. 発表標題 胞子形成時におけるセブチン細胞骨格近傍への翻訳制御因子の局在
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム第56回研究報告会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 田口将大、須田恭之、入江賢児、尾崎遼
2. 発表標題 自動分注機OT-2を用いたスポットアッセイ自動化および定量化手法の開発
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム第55回研究報告会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 須田恭之、田口将大、舘川宏之、中野明彦、入江賢児
2. 発表標題 減数分裂・胞子形成におけるセプチンの形態とその役割
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム第55回研究報告会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐藤恵、入江かおる、須田恭之、水野智亮、入江賢児
2. 発表標題 RNA結合タンパク質Puf5とHMGBタンパク質Ixr1はCLB1遺伝子の細胞周期特異的な発現を制御する
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム第55回研究報告会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 須田恭之、舘川宏之、黒川量雄、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に伴う再構成
3. 学会等名 第74回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2022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、館川宏之
2. 発表標題 Vps13とSpo73-Spo71アダプター複合体の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54回研究報告会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 須田恭之、館川宏之、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・孢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第54回研究報告会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田口将大、須田恭之、入江賢児
2. 発表標題 孢子形成過程においてポリA鎖結合タンパク質Pab1はセプチンと共局在する
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム第54回研究報告会
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

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			
中国	江南大学			