

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26870854

研究課題名(和文)小胞融合による新規膜構造形成の分子基盤の解明

研究課題名(英文)Molecular mechanism for de novo membrane formation

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) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、胞子形成時における前胞子膜形成機構を新規膜合成のモデルとし、小胞融合によりどのように膜構造が形成されるか、その分子メカニズムを明らかにする目的で行った。栄養増殖時にポストゴルジ小胞の細胞膜への融合に機能するRab GTPase Sec4のグアニンヌクレオチド交換因子Sec2の胞子形成時発現抑制株を作製し、胞子形成、前胞子膜形成、エフェクター分子や積み荷タンパク質の局在を解析した。その結果、Sec2発現抑制によるSec4活性化不全は、前胞子膜や胞子壁形成に機能する分子の輸送、局在に影響を及ぼし、胞子形成不全を示すことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Prospore membrane formation in budding yeast is developmental process and is regarded as a model for de novo membrane formation. Rab GTPase, Sec4 and its GTP exchange factor, Sec2 function in the fusion of post-Golgi vesicles to plasma membrane. The conditional mutant, in which Sec2 expression is specifically repressed during sporulation, was generated and analyzed for prospore membrane formation. Electron and light microscopic observation suggest that prospore membrane formation in the mutant was not uniform and included irregular spore wall materials. Further analysis revealed that some but not all effector proteins and cargo proteins were not delivered effectively to prospore membrane in the mutant. Although more extensive analysis will be required, but our analysis could provide some clues regarding de novo membrane formation in the cells.

研究分野：細胞生物学

キーワード：生体膜 Rab GTPase 胞子形成

1. 研究開始当初の背景

真核生物は様々なタンパク質と脂質膜の複合体により形作られる膜構造に囲まれた細胞内小器官から構成されている。これら細胞内小器官は、膜輸送と呼ばれる細胞内輸送経路により積み荷であるタンパク質や膜成分である脂質をやり取りしている。膜輸送は、ドナーとなる細胞内小器官からの輸送（出芽）とターゲットとなる細胞内小器官への輸送（融合）からなるが、これらは定常状態では均一であるべきで、片方の破綻は細胞内小器官の肥大や欠失を引き起こしてしまう。よって、膜輸送を滞りなく進行するために細胞内では膜輸送を司る様々な分子機構が協調して機能するように制御されていると考えられる。

細胞内膜輸送においてターゲット膜への小胞の融合は、いくつかの段階により制御されている。細胞膜への輸送小胞の融合を例に挙げると、まずドナーとなる細胞内小器官から輸送された小胞上において小胞の融合を制御する分子スイッチ Rab GTPase が活性化される。続いて Rab GTPase のエフェクターである繫留複合体が輸送小胞、ターゲット膜にリクルートされ、小胞が細胞膜への繫留される。最後に小胞と細胞膜に存在する SNARE 分子の会合により小胞膜と細胞膜とが融合する。このように大きく分けて3段階の機構により成し遂げられる。

近年のノーベル賞受賞により細胞内小胞輸送経路の研究が日の目を見たが、細胞内において膜輸送を司る分子機構すべてが明らかになったわけではない。前述のように、膜構造からなる細胞内小器官の形成と維持には膜輸送の分子メカニズムの解明が求められており、さらにこれらの破綻を起因とする疾患も明らかになっており、分子メカニズムそのもののみならず膜輸送の制御機構に関しても近年では盛んに研究が行われている。その一方で、膜構造の新規合成においては、小胞同士の融合により成し遂げられると考えられているものの、その分子機構に関してはいまだ不明な点が多い。その理由としては、ドナーである小胞が融合すべきターゲット膜が、膜構造形成の初期段階においては存在せず、細胞生物学的な検討が比較的困難であるとともに、モデルとなる細胞内現象が限られていることが挙げられる。

栄養源の飢餓に応答した出芽酵母の減数分裂とそれに伴う胞子形成過程では、細胞内小胞輸送経路の大幅な変換により前胞子膜と呼ばれるまったく新しい膜構造が細胞内に形成される。この前胞子膜形成過程では、その前胞子膜形成の初期段階に小胞が融合すべきターゲット膜が存在せず、高等生物の中心体に相当し、核膜に埋め込まれた紡錘極体とよばれる構造の細胞質側において新

規に膜構造の形成が開始することから、前述の様に新規膜構造形成機構のモデルと捉えることができる。これまでに申請者を含む数グループが出芽酵母の胞子形成過程の研究を行っており、紡錘極体の細胞質側が減数分裂時に新たな構造体を配置し、新規膜構造形成の足場となることが明らかになってきたが、小胞がなぜその足場においてのみ融合を開始するかなど幾つかの疑問に対しては明確な答えが出ていない。

Rab GTPase は細胞内膜輸送経路において主として小胞のターゲット膜への融合を制御する分子スイッチとして機能している。Rab GTPase は不活性型の GDP 結合型として細胞質に存在し、グアニンヌクレオチド交換因子(GEF)により活性化すると GTP 結合型に変換し、膜構造へと局在し、繫留複合体をはじめとする様々なエフェクター分子を膜上へとリクルートする。のちに GTPase 活性化タンパク質の介助により不活性型に戻ると細胞質へとリサイクルされる。細胞内の膜輸送において、様々な Rab GTPase (とエフェクター分子)には特異性が存在し、小胞は融合すべき場所が決められている。

Rab GTPase のひとつである Sec4 は、ポストゴルジ小胞の細胞膜への融合において機能している。Sec2 はグアニンヌクレオチド交換因子であり、Sec4 の GDP 型から GTP 型への変換（活性化）を行い、エフェクター分子として Exocyst 複合体が機能することが報告されている。出芽酵母の胞子形成では、細胞内輸送経路が大幅に変えられ、ポストゴルジ小胞は細胞膜ではなく、紡錘極体へと輸送される。輸送された小胞は紡錘極体上でおそらく小胞同士の融合を起因として細胞内の新規膜構造である前胞子膜を形成する。この際に Sec2-Sec4 の寄与が示唆されていたが、詳細なる分子メカニズムに関しては研究開始当初には明らかになっていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、前胞子膜形成における小胞融合制御機構の解明を通じて新規膜構造形成の分子メカニズムを明らかにする目的で行った。具体的には下記2項目の解析を中心として行った。

1) Rab GTPase Sec4 のグアニンヌクレオチド交換因子である Sec2 の胞子形成時発現抑制株を利用し、出芽酵母胞子形成時における Sec4 の活性調節機構の寄与を明らかにする。

2) 小胞の積み荷タンパク質群や Sec4 のエフェクター分子である Exocyst 繫留複合体のプロープを作製し、また、それら分子の変異株を作製する。これらの解析から胞子形成時に

おける局在化機構、前胞子膜形成への寄与を、可視化を中心とした解析により明らかにする。

以上2項目の解析から、ポストゴルジ小胞が如何にして前胞子膜形成の場である紡錘極体へと輸送され繫留し融合を経て、新規膜形成を成し遂げるかを明らかにしようと試みた。

3. 研究の方法

Sec4 のグアニンヌクレオチド交換因子 Sec2 の胞子形成時特異的発現抑制株(以下省略し、発現抑制株)を作製し、その表現型を詳細に検討した。

出芽酵母2倍体野生株の Sec2 のプロモーター領域を、栄養増殖時にはその発現が見られるが、胞子形成時に発現が抑制される *CLB2* 遺伝子のプロモーター領域に置換し、Sec2 発現抑制株とした。

Sec2 発現抑制株の胞子形成率を野生株と比較し、胞子形成に影響があるか確認した。さらに認められた胞子形成不全を詳細に検討するために下記の解析を行った。

前胞子膜マーカーを Sec2 発現抑制株に導入し、蛍光顕微鏡による観察から前胞子膜形成のどの段階に影響があるか調べた。胞子壁の形成に影響がないか、野生株胞子の薬剤耐性を指標として検討した。さらに電子顕微鏡観察により細胞内微細構造を検証し、前胞子膜、胞子壁等への影響を観察した。

Sec4 のエフェクター分子である Exocyst 繫留複合体、積み荷タンパク質のプロープを作製し、野生株、Sec2 発現抑制株に導入し、その局在を中心として解析を行った。さらにそれらの欠損株を作製し、胞子形成や前胞子膜形成に何らかの影響が見られるか解析を行った。

4. 研究成果

野生株は、同調条件で約80%の胞子形成率を示したが、作製した Sec2 発現抑制株においては数%との結果を得た。Sec2 発現抑制株の胞子形成不全は、*SEC2* 遺伝子の導入により回復した。Sec2 の胞子形成誘導後のタンパク質発現量を野生株および Sec2 発現抑制株において確認したところ、Sec2 発現抑制株では胞子形成誘導後2時間程度から徐々に減少が見られ、前胞子膜形成を開始する誘導後約5時間ではその発現は、ほぼ見られなくなっていた。電子顕微鏡観察により、Sec2 発現抑制株においては、前胞子膜形成はある程度観察されること、胞子壁の形成に異常があることが認められた。野生株の胞子はその堅牢な胞子壁によりエタノールなどさまざまな外的ストレスに抵抗性を示すが、Sec2 発現抑制

株は感受性を示し、胞子壁形成に不全が認められることを確認した。

前胞子膜プロープを利用して蛍光顕微鏡下で前胞子膜形成能を観察したところ、野生株では細胞あたり4つ存在する紡錘極体から前胞子膜が均一に細胞中心部へと伸長する様子が観察されたが、Sec2 発現抑制株では、前胞子膜が全く形成されない、形成されても不均一に伸長する、方向性に異常が見られるなど様々な前胞子膜形成異常が見られた。一方で Sec2 発現抑制株では野生株と同様に紡錘極体の細胞質側に異常は見られなかった。これらの結果は、Sec2 発現抑制による Sec4 活性化不全によりポストゴルジ小胞の融合に影響があり、積み荷タンパク質の輸送にも影響が見られていることが示唆された。

次に、Sec4 の局在を野生株、Sec2 発現抑制株にて確認したところ、野生株では形成途中の前胞子膜近傍にてその局在が観察されたが、Sec2 発現抑制株では Sec4 は細胞質に広がって観察された。この結果は Sec2 発現抑制により Sec4 の活性化および膜局在の異常が発現抑制株ではおこなっていることを示唆している。ポストゴルジ小胞の積み荷である Sso1、Dtr1 の輸送を野生株、Sec2 発現抑制株にて確認したところ、野生株でそれらは前胞子膜上への局在が観察されたが、Sec2 発現抑制株ではそれらの蛍光強度は低く、効率的に輸送されていないことが示唆された。同様に繫留複合体の因子に関しても同様の結果が得られた。

以上の結果から、Sec2 発現抑制株では、Sec4 の活性化不全による下流の因子群のターゲティングや小胞の輸送不全が見られ、前胞子膜形成、およびその完了とともに誘導される胞子壁形成に影響が見られることが明らかになった。本研究により、Sec2-Sec4 モジュールの前胞子膜形成への寄与は明らかとなったが、下流の因子群の表現型解析、詳細なるライブイメージングに関してはさらなる努力が必要である。

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 3件)

- 1) Okumura, Y., Nakamura, T. S., Tanaka, T., Inoue, I., Suda, Y., Takahashi, T., Nakanishi, H., Nakamura, S., Gao, X.D., and Tachikawa, H. (2016). The Dysferlin Domain-Only Protein, Spo73, Is Required for Prospore Membrane Extension in *Saccharomyces cerevisiae*.

mSphere, 1(1), e00038-15. doi:
10.1128/mSphere.00038-15 (査読あり)

- 2) Fujimoto, M., Suda, Y., Vernhettes, S., Nakano, A. and Ueda, T. (2015) Phosphoinositides have distinct roles in intracellular trafficking of the cellulose synthase complex in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Cell Phys.**, 56: 287-298. doi:10.1093/pcp/pcu195 (査読あり)
- 3) Uemura, T., Suda, Y., Ueda, T. and Nakano, A. (2014) Dynamic behavior of the trans-Golgi network in root tissues of *Arabidopsis* revealed by super-resolution live imaging. **Plant Cell Phys.** 55, 694-703. doi: 10.1093/pcp/pcu010 (査読あり)

[学会発表](計 5件)

- 1) Suda Y, Irie K, Nakano A. Live Imaging of the Golgi apparatus in *Saccharomyces cerevisiae*. International Workshop for Fungal Cell Biology. Jiangnan Univ., Wuxi, China, 7-10th March. 2015
- 2) Suda Y, Nakano A, Irie K. Live Imaging of the Golgi apparatus in *Saccharomyces cerevisiae*. The 14th International Joint Mini-Symposium on Molecular and Cell Biology. 京都大学物質-細胞統合システム拠点 (iCeMS), Kyoto, Japan, 11-13th June. 2015
- 3) Lien Thi Kim Pham, Kei Muroi, Yasuyuki Suda, Kenji Irie : Analysis of Scd6 physiological activity through its interaction with Hmt1 酵母遺伝学フォーラム第48回研究報告会 広島大学東広島キャンパス、広島、日本、2015年9月1日~9月2日
- 4) Lien Thi Kim Pham, Kei Muroi, Yasuyuki Suda, Kenji Irie : Analysis of Scd6 physiological activity through its interaction with Hmt1 and Rps28a 第67回日本細胞生物学会大会 タワーホール船堀、東京、日本、2015年6月30日~7月2日
- 5) 須田恭之、中野明彦、入江賢児 : 出芽酵母 Sec2の胞子形成における役割、酵母遺伝学フォーラム第47回研究報告会 東京大学弥生キャンパス、東京、日本、2014年9月2日~3日

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織
(1)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