

博士論文（要約）

出芽酵母における前胞子膜伸長の分子機構に関する研究

奥村 祐哉

目次

論文内容の要旨.....	3
序論	7
実験手法	19
第一章 <i>spo71</i> 、 <i>spo73</i> 破壊株の表現型の解析	28
背景	29
結果	29
考察	33
第二章 <i>Spo73</i> の細胞内局在と相互作用の解析	41
背景	42
結果	42
考察	46
第三章 <i>Gip1</i> の <i>Glc7</i> 結合配列と機能についての解析	51
背景	52
結果	52
考察	55
総合討論	58
参考文献	60

論文内容の要旨

応用生命化学専攻
平成 25 年度博士課程 進学
氏 名 奥村 祐哉
指導教員名 東原 和成

論文題目

出芽酵母における前孢子膜伸長の分子機構に関する研究

背景および目的

生物は多様な膜構造から成り立っている。細胞やオルガネラは、膜で仕切られることで、独自の環境を持ち、それぞれの役割を果たすが、その機能には、形態も重要であることも知られている。しかしながら、細胞やオルガネラそのものの大きさや形がどのように決定されるかについては未だ不明な点が多い。

出芽酵母の二倍体細胞は、窒素源の枯渇と非発酵性炭素源の存在という条件下において、第一、第二減数分裂を行い、細胞内に一倍体胞子を 4 個形成する。この過程で、第二減数分裂初期に紡錘極体 (SPB) 近傍で輸送小胞が融合し、前孢子膜と呼ばれる新規二重膜構造が形成される。この前孢子膜は、笠状の膜構造として出現し、核やオルガネラを包み込むように、小さな球状、そして、カシューナッツ状 (楕円型) に伸長したのち、閉鎖して大きな球状へと変形し、胞子の細胞膜の基となる。前孢子膜形成は新規の膜構造が一定の形と大きさに形作られることから、生体膜形態形成のモデルの 1 つと考えることができる。

当研究室において、胞子形成不全を示す遺伝子の破壊株コレクションの中から、前孢子膜伸長に異常をきたす変異株のスクリーニングが行われ、以前から報告にある *gip1* 破壊株、*vps13* 破壊株に加え、*spo73* 破壊株、*spo71* 破壊株が取得された。これらの破壊株においては、前孢子膜は形成されるものの、小さな球状で留まり、それ以降の伸長が起きず、胞子が形成されない。

本研究では、*SPO73*、及び *GIP1* に着目し、その機能を解析し、前孢子膜伸長に関する分子機構を明らかにすることで、生体膜形成に関する新たな知見を得ることを目的とした。

第一章 *spo73* 破壊株の表現型の解析

spo71 破壊株及び *vps13* 破壊株は、前孢子膜が小さな球状のまま留まる表現型を示すことが報告されている。*Spo73* がこれらの遺伝子と同様に前孢子膜伸長に関わるかを知るため、これらの遺伝子破壊株の表現型と比較しながら、*spo73* 破壊株の表現型をより詳細に解

析した。これまでの報告を参照し、前孢子膜の核の取り込み効率、前孢子膜の内腔への小胞の蓄積有無、前孢子膜伸長末端の構造体である **leading-edge complex (LEC)** の分解度合、について解析を行った。その結果、野生株と比較して、*spo73*破壊株では、核の取り込みに失敗した前孢子膜が多く、さらに二重膜の内腔に小胞が多数蓄積した前孢子膜が多く観察され、LEC が分解されない細胞も多く観察された。これらの *spo73*破壊株におけるこれらの表現型は *spo71* 破壊株、及び *vps13*破壊株の表現型に似ていた。

また、*SPO71* は、前孢子膜を湾曲させる遺伝子である *SPO1* と遺伝学的に関連のあることが報告されており、*SPO73* も同様に遺伝学的な関係があるかを解析した。*spo1 spo73* 二重破壊株を作製し、その前孢子膜並びに孢子形成を観察した結果、一部の細胞で大きく伸長した前孢子膜が観察され、孢子形成する細胞も観察された。このことから、*SPO73* は *SPO71* と同様に、*SPO1* と遺伝学的に関係があることが示された。

本章において *Spo73* は *Spo71*、*Vps13* と同経路で前孢子膜伸長に関わる可能性が高いことが示唆された。

第二章 *Spo73* の細胞内局在と相互作用についての解析

Spo73 は、筋肉の修復に関わるジスフェリンやミオフェリンに特徴的な機能未知のドメインである **Dysferlin** ドメインのみからなるタンパク質である。この機能を知るため、局在化機構や、*Vps13* や *Spo71* との相互作用について解析を行った。*Spo73* の N 末端に GFP を付加し、その局在を観察した結果、前孢子膜に局在し、また、その局在は *Spo71* 及び *Vps13* に非依存的であった。*Spo73* の前孢子膜への局在化のメカニズムを知るため、まず構造解析の報告があるミオフェリンの **Dysferlin** ドメイン (2k2o A chain) を基に、MODELLER を用いて *Spo73* のモデリングを行った。そして、表面に出てループを構成すると予測される正電荷を持つアミノ酸残基 R119、K121、K123 に着目し、これらをアラニン置換した *Spo73*-AAA を作製した。*Spo73*-AAA を *spo73* 破壊株に過剰発現させ、局在並びに孢子形成を観察したところ、孢子は形成されるが前孢子膜への局在が失われた。このことから、*Spo73* は正電荷を持つアミノ酸により前孢子膜に局在することが示唆された。そこで *Spo73* を大腸菌で発現させ、精製し、**Lipid overlay assay** を行い脂質との結合検討した結果、*Spo73* は負電荷を持った複数のリン脂質と結合した。また、前孢子膜に局在できない *Spo73*-AAA は、前孢子膜に局在することが知られる *Spo71* の過剰発現により、前孢子膜への局在が回復した。このことから、*Spo71* と *Spo73* が結合することが示唆された。酵母ツーハイブリッド法により結合を確認したところ、*Spo73* と *Spo71* 全長との結合は観察されなかったものの、*Spo73* と *Spo71* の 2 番目の PH ドメイン (*SPO71*-M-PH) および *Spo73* 同士が結合することが示唆された。これらの結合は免疫沈降によっても確かめられた。

以上により、*Spo73* は前孢子膜上の負電荷をもつリン脂質、*Spo73* 自身、及び *Spo71* の PH ドメイン、と結合し前孢子膜伸長に関わることが示唆された。

第三章 Gip1 の Glc7 結合配列と機能についての解析

Gip1 は、出芽酵母で唯一の protein phosphatase type1 のカタリティックサブユニットである Glc7 の結合タンパク質として見出されたタンパク質で、胞子形成特異的なターゲティングサブユニットであることが知られている。Glc7 はターゲティングサブユニット側の K (R) VXF モチーフと呼ばれる配列と結合することが報告されており、Gip1 にはこのモチーフに類似する配列が 3 つ存在する。前任者により、この配列のうち VRF (492-494) の領域で Gip1 が Glc7 と結合することが示唆され、胞子形成において重要な機能を持つことが示唆されている。しかしながら前任者により取得されたデータが不十分であったため、本研究で、VRF (492-494) の領域のみが重要であることの確認を行った。Glc7 結合モチーフのバリン、フェニルアラニンをアラニンに置換した変異型 Gip1 のうち、確かに VRF (492-494) をアラニン置換した Gip1-G7M3 においてのみ Glc7 との結合が観察されないことを酵母ツーハイブリッド法により確認した。続いて、これらの変異型 Gip1 が機能するかを、*gip1* 破壊株に発現させ、胞子形成不全を回復するかで確認した。その結果、いずれの変異型 Gip1 も同程度発現していたが、Gip1-G7M3 を発現させた細胞でのみ、前胞子膜が小さな球状のまま留まり、胞子形成が全く起こらなかった。このことから、Gip1 は VRF (492-494) の領域で Glc7 と結合し、前胞子膜伸長に寄与することが確かめられた。

また、発現解析の Western Blotting において、Gip1-G7M3 のバンドが Gip1 の野生型のものに比べ、若干上方に観察されることを見出した。そこで、アルカリフォスファターゼ処理を行い、このバンドシフトがリン酸化によるものであるか検討した結果、野生型 Gip1 と Gip1-G7M3 のバンドが同じ位置に検出された。このことから、Gip1-G7M3 は野生型 Gip1 と比較してより多くの箇所でリン酸化されていることが明らかとなり、Gip1 は Glc7 と結合することで脱リン酸化されることが示唆された。Gip1 の Glc7 との結合と Gip1 のリン酸化状態の変化が Gip1 の局在に影響を与えるか知るため、Gip1-G7M3 の局在を観察した。野生型の Gip1 の局在は SPB 近傍、前胞子膜 (小さな球状)、セプチン、前胞子膜 (大きな球状)、核、へと変化する。Gip1-G7M3 の局在は、*gip1* 破壊株においては小さな球状の前胞子膜上にも観察されるが、SPB に局在することが観察された。野生株においては野生型 Gip1 と同様に大きな球状の前胞子膜への局在までは観察されたものの、最後の核への移行が観察されず、前胞子膜上に留まった。このことより、Gip1 は Glc7 との結合、または Glc7 による脱リン酸化、によりその局在を変化させることが示唆された。

Gip1 は Glc7 を前胞子膜上にリクルートすることで前胞子膜の伸長に寄与すると考えられる。そこで前胞子膜移行配列を付加した Glc7 (G20-Glc7) を作製し、*gip1* 破壊株に発現させることで前胞子膜形成不全を回復するか検討した。その結果、*gip1* 破壊株の胞子形成不全は回復することはなかった。そこで、Glc7 結合領域を含み、前胞子膜への局在化に必要な領域を持たない 476-640 a.a. の領域のみからなる Gip1-C1 を共に過剰発現させた。その結果、Gip1-C1 のみを単独で過剰発現させると胞子形成率 0.5%であったが、G20-Glc7 を共に過剰発現させると胞子形成率が 16%と大きく回復した。このことから、Glc7 が胞子形

成時において機能するには、局在だけでなくターゲティングサブユニットと結合し、基質を認識することが必要であることが示された。続いて、Gip1-Glc7 ホスファターゼのターゲットの探索を行った。本研究では前孢子膜上で膜融合に関与する分子を候補とし、SNARE タンパク質である Sso1、Spo20、Snc1、およびホスホリパーゼ D である Spo14、Exocyst complex に結合する Sec4 に着目した。これらのタンパク質について、野生株と *gip1* 破壊株において発現させ、電気泳動を行い、リン酸化修飾によるバンドシフトが検出されるか検討した。その結果 Spo14 は、*gip1* 破壊株において、高分子量側にバンドが検出された。このことから Spo14 は Gip1-Glc7 ホスファターゼのターゲットの一つである可能性がある。

Spo73 / Spo71 / Vps13 と Gip1 の関係について、検討を行った。*spo71*、*spo73* 破壊株において Gip1 を過剰に発現させると一部の前孢子膜が伸長した。また、*vps13 gip1* 二重破壊株では、*gip1* 単独破壊株、*vps13* 単独破壊株に比べ小さな前孢子膜が観察された。このことから、Spo73 / Spo71 / Vps13 と Gip1 は別経路として前孢子膜伸長に寄与すると推測している。

総括

本研究では、Spo73 と Gip1 に着目し研究を行った。Spo73 は Spo71 と結合し、Vps13 と共に複合体を形成して、前孢子膜伸長に関与することが示唆された。Gip1 は VRF (492-494) の領域で Glc7 と結合し、前孢子膜伸長に関連すること、Gip1 自身も脱リン酸化されることが示唆された。また、Spo73 / Spo71 / Vps13 と Gip1 は別経路で前孢子膜伸長に寄与すると推測された。現在の課題としては、Gip1-Glc7 のターゲットや、Spo73 / Spo71 / Vps13 の下流で働く因子を特定することであり、今後、それらの因子を解析することで前孢子膜伸長の分子機構が明らかになり、さらに、生体膜の形態形成について、知見が深められることが期待される。

発表論文

Okumura Y., Nakamura T.S., Tanaka T., Inoue I., Suda Y., Takahashi T., Nakanishi H., Nakamura S., Gao X.D., Tachikawa H. (2015) **The Dysferlin domain-only protein, Spo73, is required for prospore membrane extension in *Saccharomyces cerevisiae*.** *mSphere* 1(1):00038-15.

Park J.S., Okumura Y., Tachikawa H., Neiman A.M. (2013) ***SPO71* encodes a developmental stage-specific partner for Vps13 in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Eukaryotic Cell* 12(11):1530-7.

序論

胞子形成と生体膜の研究意義

生物は様々な膜構造から成り立っている。膜で仕切られた各区内で細胞やオルガネラといった各器官は、独自の環境を持ち、エネルギーの生産、物質の輸送や貯蔵などの役割を持つ。様々な仕切られた空間を生み出す生体膜の形成は生物にとって欠くことのできないものである。膜で仕切られたオルガネラや細胞がどのような役割を持つかについては多くの知見が得られてきた。しかし、細胞やオルガネラそのものの大きさや形がどのように決定されるかについては研究が行われているが知見はまだ少ない。しかしながら、生体膜の形が正しく形作られないと、細胞が機能しないことも報告されており、(レティキュロン、Golgi の話など) 生体膜には空間を仕切るだけではなく、その形が重要であることも知られつつある。

前胞子膜形成は細胞内に新規の膜構造が、様々な過程を経て、一定の大きさと形に形成される過程であることから、細胞内の生体膜形成のモデルの一つとして考えることができる。また、前胞子膜形成過程は、生殖細胞の分化の過程の精子の分化の過程とも酷似している。精子の細胞膜も、前胞子膜と同様、必要な核やミトコンドリアのみ取り込み、不必要な細胞質画分を放棄するよう細胞膜の形を変化させる。そのため、前胞子膜形成過程は、膜構造の形態形成という側面と、分化の過程における膜構造という側面を持ち、本研究は前胞子膜形成の分子機構を解明することにより、これらの 2 つの側面の理解に貢献することを目的とした。

出芽酵母の生活環と胞子形成

出芽酵母はその発酵性を生かして、古くからワインや日本酒などの酒類、および、パンの生産に利用されている。出芽酵母は、単細胞の真核生物で、産業と結びついてきたことから、モデル生物として、盛んに研究が行われている。研究で用いられている出芽酵母は、基本的に *MAT* 遺伝子が欠損され、 α 細胞なら α 細胞、 α 細胞ならば α 細胞として固定されており、通常、一倍体として増殖を行う。一倍体の細胞はもう片方の接合型の細胞が近くに存在するとき、接合を行い、二倍体となる。栄養源が芳醇のときは、 α 細胞、 α 細胞、二倍体細胞のすべての細胞で、出芽の様式で体細胞分裂を行い、増殖する。

一方、栄養源の枯渇すなわち、非発酵性炭素源の存在と窒素減の枯渇で出芽酵母の二倍体は減数分裂を行い、1 つの細胞内に 4 つの一倍体胞子を形成する。そして休眠状態となる。(Neiman 2005)そして再び栄養が豊富な条件になると、胞子壁を破り (germination と呼ばれる)、出芽を行い、増殖を再び開始する。

出芽酵母が胞子形成を行う意義について、減数分裂を行うことで遺伝子の多様性を生み出すことが一点目にあげられる。他の利点としては、胞子形成を行うことで、出芽酵母は休眠状態に入り、栄養源が枯渇した飢餓条件に対して耐性を獲得する点である。合成された胞子壁により、より高濃度のエタノールやエーテルといった有機溶媒に対して耐性を持ち、さらにショウジョウバエに捕食されても、より生存確率が高くなることが報告されている(A.

E. Coluccio et al. 2008)。栄養条件が豊富な状況になるまで、厳しい条件に耐え、生存に有利になる様、胞子形成という機構を獲得したことが考えられる。

胞子形成の過程と生理的意義

栄養源の枯渇すなわち、非発酵性炭素源の存在と窒素減の枯渇で出芽酵母の二倍体は減数分裂を行い、1つの細胞内に4つの一倍体胞子を形成する。

この胞子形成の過程で、第二減数分裂初期に紡錘極体(Spindle Pole Body)に輸送小胞が集められ、前胞子膜という新しい二重膜構造が形成される。前胞子膜は核膜を覆うように伸長し、核膜や他の必要なオルガネラを取り込んだのちに閉鎖する。前胞子膜が閉鎖した後、前胞子膜の二重膜、内膜と外膜の間の内腔に胞子壁が形成される。胞子壁は内側から、マンナン層、 β -グルカン層、キトサン層、ジチロシン層の順に合成される。前胞子膜外膜は β -グルカン層の合成が完了すると消失する。出芽酵母は、この胞子壁の合成が完了することで胞子となる。

前胞子膜の形成過程

前胞子膜は独特の形態変化をとり、①出現、②伸長して小さな球状となり、③細長くカシューナッツ状に伸長し、④閉鎖し、大きな球状となる。

①前胞子膜の出現

胞子形成では核膜が存在したまま減数分裂が起きる。第二減数分裂時、核膜に埋まった構造を持つ SPB の構造変換が起こる。SPB は内側を inner plaque 外側を outer plaque と呼ばれ、栄養増殖時では微小管形成の役割を担っている(Knop and Strasser 2000)。第二減数分裂時に outer plaque の構成要素である Tub4、Spc42 が Mpc54、Spo21、Spo74、Ady4 に置換され、meiosis outer II plaque (MOP) を形成する(Knop and Strasser 2000)(Bajgier et al. 2001)(Nickas, Schwartz, and Neiman 2003)。MOP 構成因子 Mpc54 や Spo21 を破壊すると前胞子膜となる小胞の蓄積が起こらないことが報告されている(Knop and Strasser 2000)(Bajgier et al. 2001)。また、のちに後述する *spo14* 破壊株や小胞融合に関わる SNARE タンパク質の破壊株においては、MOP 近傍に小胞が蓄積することから、前胞子膜は MOP に小胞が融合することから形成されると考えられている(Nakanishi et al. 2006)。また、*ady3* の破壊株において、前胞子が核から離れるところに形成されることから（マーカーは Don1-G）(Mathieson, Schwartz, and Neiman 2010)

MOP の役割は、小胞融合による前胞子膜形成と前胞子膜の核をとらえることの両方にあると考えられている。

②小さな球状

Late sec gene

前孢子膜形成にはゴルジ体以降の膜輸送系由来の輸送小胞が必要であることが報告されている(Neiman 1998)。

SNARE(soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein receptor)

前孢子膜の融合には SNARE 複合体が必要であることが報告されている(Neiman, Katz, and Brennwald 2000)。

出芽酵母の細胞膜と輸送小胞の融合に関わる SNARE は、v-SNARE である Snc1 及び Snc2、シンタキシンファミリーに属する t-SNARE である Sso1 及び Sso2、SNAP-25 ファミリーに属する Sec9 によって構成される。Snc1/2、Sso1/2 が栄養増殖時、孢子形成時の両方に起きて機能することが知られている。しかし、Sec9 は栄養増殖時には必須であるが、孢子形成時には必須ではない。孢子形成時には Sec9 のホモログである Spo20 が特異的に発現し、前孢子膜の融合に必要 t-SNARE として機能する。

Spo20 は 51-91 の領域で PA と結合し(Nakanishi, de los Santos, and Neiman 2004)、PA と結合することで小胞融合を増強する(Liu et al. 2007)。

SNARE タンパク質を破壊した株では輸送小胞が SPB 近傍に蓄積することが観察され、前孢子膜形成の小胞融合に必要であることが示唆されている(Neiman, Katz, and Brennwald 2000)(Nakanishi et al. 2006)。

Exocyst

細胞膜に小胞を集合させるエクソシスト複合体も、MOP が形成されると、SPB に局在する Sec4、Sec8、Sec3(Mathieson et al. 2010)。また、Sec15 も前孢子膜に局在が観察される(Lam et al. 2014)。また、活性化型が小胞とエクソシスト complex を結合する役割を持つ Rab GTPase である Sec4 も前孢子膜に局在することが報告されている(Mathieson et al. 2010)。

Many proteins that function upstream of SNAREs for plasma membrane fusion in vegetative growth also play that role in sporulating cells. For example, the SM family protein, Sec1, the exocyst tethering complex, and the Rab GTPase Sec4 are all required for fusion at the prospore membrane (Neiman 1998). Thus, the alteration of the SNARE machinery by introduction of Spo20 seems to be the major basis for diverting secretory vesicles to fuse at the prospore membrane instead of the plasma membrane. Mso1, a Sec1 binding protein, plays a minor role in vegetative

secretion but is strongly defective in prospore membrane assembly (Knop et al. 2005) and, Spo14, a constitutively expressed phospholipase D, is dispensable for secretory pathway function during vegetative growth but is absolutely required for prospore membrane assembly (Rose et al. 1995; Rudge et al. 1998; Nakanishi et al. 2006).

Spo14

ホスホリパーゼ D である Spo14 は栄養増殖時での膜輸送に関与しないものの、前孢子膜の集積に必要でその活性中心が必要である (S. A. Rudge, Morris, and Engebrecht 1998)。

phospholipase D (PLD), encoded by the

SPO14 はゴルジ体における phosphatidylinositol/phosphatidylcholine といった脂質の輸送が spo14 変異株においてのみ機能することが知られている。

孢子形成時に N 末端側の領域でリン酸化されることが判明しており、Spo14 の前孢子膜局在に必要であることが報告されている。このリン酸化ドメインはホスホリパーゼ D 活性には影響を与えない。(S. A. Rudge, Morris, and Engebrecht 1998)

(Sec14-independent secretion).

we isolated a mutant allele, *spo14-S251P*, the product of which is improperly phosphorylated

and fails to relocalize and rescue the sporulation phenotype of homozygous *spo14* diploids, but supports Sec14-independent secretion. Furthermore, we show that the N-terminal domain of Spo14 is both phosphorylated and sufficient for prospore membrane localization during sporulation. These data indicate that Spo14 phosphorylation and relocalization are essential for the process of sporulation, but dispensable for Sec14-independent secretion. Finally, we demonstrate that Spo14 phosphorylation and relocalization are initiated by nitrogen and glucose limitation and occur independently of the process of meiosis. (S. A. Rudge, Zhou, and Engebrecht 2002)

Spo14 は PI(4,5)P₂ によって活性化され、ホスファチジルコリン(PC)を加水分化し、ホスファチジン酸(PA)とコリンを生成する (S. a Rudge et al. 2004)。

Spo20 は Spo14 によって生成された PA によって前孢子膜に局在することが知られている (Nakanishi et al. 2006)。一方、Sso1 は PA と結合し、破壊株は前孢子膜を形成できないが、mss4 を過剰発現させると前孢子膜形成不全を回復する、おそらく PI45P₂ 多くなって Spo14 が活性化されて、Sso2 だけで何とかなる？、(Mendonsa and Engebrecht 2009)。

Deletion of KES1, a gene that behaves as a negative regulator of *SPO14*, also promotes the function of *SPO20* in vegetative cells.

③カシューナッツ状

セプチン

セプチンは真核生物に広く保存された GTP 結合タンパク質で、重合してフィラメントや高次構造を形成し、細胞分裂や紡錘極体の位置決定などに関与する。

栄養増殖時のセプチンは、出芽くびれの箇所にリング状にフィラメントとして存在し、体細胞分裂時の母細胞と娘細胞の核オルガネラの分配に必須な役割を果たしている。Cdc3、Cdc10、Cdc11、Cdc12、Shs1 の 5 種類が 8 量体になって存在する。孢子形成時では Cdc11、Cdc12、Shs1 が Spr3、Spr28 に置換され、Cdc3-Cdc10-Spr3-Spr28 が二量体となったヘテロオクタマーを形成し、前孢子膜に沿った 2 本のバー上構造をとる。

孢子形成時におけるセプチンの役割については、分裂酵母の *Schizosaccharomyces pombe* の孢子形成においてはセプチンが前孢子膜の曲がる方向を決定することが報告されている (Onishi et al. 2010)ものの、出芽酵母においては、セプチンを欠損した菌株において孢子形成率の高い SK1 バックグラウンドの菌株では、大きな影響は与えず、その存在意義が不明であった。しかしながら、孢子形成率が 30%ほどの酵母の標準菌である BY バックグラウンドの菌株と SK1 バックグラウンドを掛け合わせたハイブリッド株においては、セプチンを欠損した菌株の孢子形成率は大きく低下するため、孢子形成を効率的に行うために必要な構造体であることが示唆されている (Heasley and McMurray 2016)。

LEP (Leading edge protein coat)

LEP は前孢子膜の伸長している先端に形成されるリング状の構造で、前孢子膜の伸長や、細胞質の取り込みに必須である。現在、構成因子として Ssp1、Irc10、Ady3、Don1 という 4 つのタンパク質が知られている。中でも、Ssp1 は特に重要であり、*ssp1* 破壊株においては、孢子形成が全く起きず、Irc10、Ady3、Don1 の前孢子膜への局在は Ssp1 依存的である (Moreno-borchart et al. 2001) (Lam et al. 2014)。*don1* 破壊株については、孢子形成率は野生型と変わらないものの (Knop and Strasser 2000)、Irc10、Ady3 の単独破壊株については、孢子形成率が低下することが報告されている (Lam et al. 2014) (Nickas and Neiman 2002)。電子顕微鏡による観察の結果、*ssp1* 破壊株においては、前孢子膜は形成されるものの、野生株と比較して前孢子膜は核膜に非常に近接するように伸長するため、細胞質の取り込みに重要な役割を果たすことが示唆されている (Moreno-borchart et al. 2001)。

前孢子膜 SPOMeB pathway

SPO1、*SMA2* という遺伝子群の破壊株においては LEP のサイズがより大きくなり、前孢子膜が閉鎖せず、孢子形成できないことが報告されている(Maier et al. 2008)。これらの破壊株では、*spo71*、*vps13*破壊株とは逆に、前孢子膜が異常に伸長するため、Spo1、Sma2 は前孢子膜を曲げる方向に伸長させる役割を持つことが示唆されている。*spo1* 破壊株、*sma2*破壊株の表現型は GPI アンカー型タンパク質である Spo19 や Cwp1 の過剰発現により回復することが報告されているが、その分子機構は不明である。

SPO1 遺伝子は *SPO71* が弱い遺伝学的関係があることが報告されている(Parodi et al. 2012)。*spo1* 破壊株は孢子形成不全で、その前孢子膜は、減数分裂を完了した細胞の 66% が前孢子膜のシグナルは観察されるが、細胞質上にドット状にしか検出されず、1 細胞あたりに形成される前孢子膜の数が少なくなることが報告されている。また、同じ *spo1* 破壊株において、前孢子膜が孢子形成不全で、その前孢子膜は、減数分裂を完了した細胞の 66% が前孢子膜のシグナルは観察されるが、細胞質上にドット状にしか検出されず、1 細胞あたりに形成される前孢子膜の数が少なくなることが報告されている。また、同じ *spo1* 破壊株において、前孢子膜が形成されれば、前孢子膜の口が開いた表現型を示すことが報告されている。

spo71 spo1 二重破壊株では、前孢子膜の大きさ、孢子形成は変化がないものの、*spo1* 単独破壊株と比較して、1 細胞あたりにできる前孢子膜の数が増加することが報告されている。

Gip1

④大きな球状、閉鎖と変形

LEC

Ssp1 は 503, 504 のリジン残基で SUMO 化されて分解されることが孢子形成に必要(Maier et al. 2007)。

Ama1 により活性化される(Diamond et al. 2009)

Vps13

Spo73

Dysferlin domain について

Spo71

Vps13

母細胞の細胞質にレーザーを照射し、母細胞の蛍光を消失させた上で、前胞子膜で囲まれた領域にある蛍光が母細胞の細胞質に移行するかしないかで前胞子膜が閉鎖しているかどうかを確かめるアッセイ系 Fluorescence loss in photobleaching (FLIP) can がある (J Cell Sci. 2012 Jun 15;125(Pt 12):3004-11. doi: 10.1242)。vps13、spo71破壊株において、前胞子膜内の GFP が母細胞の細胞質に移行する細胞が多く観察されたことから、前胞子膜が閉鎖しない細胞が多くあることが報告されている。

Gip1-Glc7

Protein phosphatase type1 (以下 PP1 と呼称する)はセリン、スレオニンの脱リン酸酵素の一つである。Glc7 は PP1 の酵母において唯一のカタリティックサブユニット（触媒サブユニット）である。PP1 の特徴の 1 つとして、異なる様々なターゲッティングサブユニット（調節サブユニット）と結合することが挙げられる。この様々なターゲッティングサブユニットと結合することで、カタリティックサブユニットはその局在を基質との特異性を変えることができ、目的のタンパク質を脱リン酸化する。

PP1 は細胞内の様々な生命現象に関わることが知られている。Glc7-Gac1 はグリコーゲン貯蔵、Glc7-Reg1 はグルコース抑制、Glc7-Scd5 はエンドサイトーシスに関与している。

Gip1 は Glc7 の結合タンパク質として見いだされたタンパク質である。

Fig.1 出芽酵母における胞子形成過程

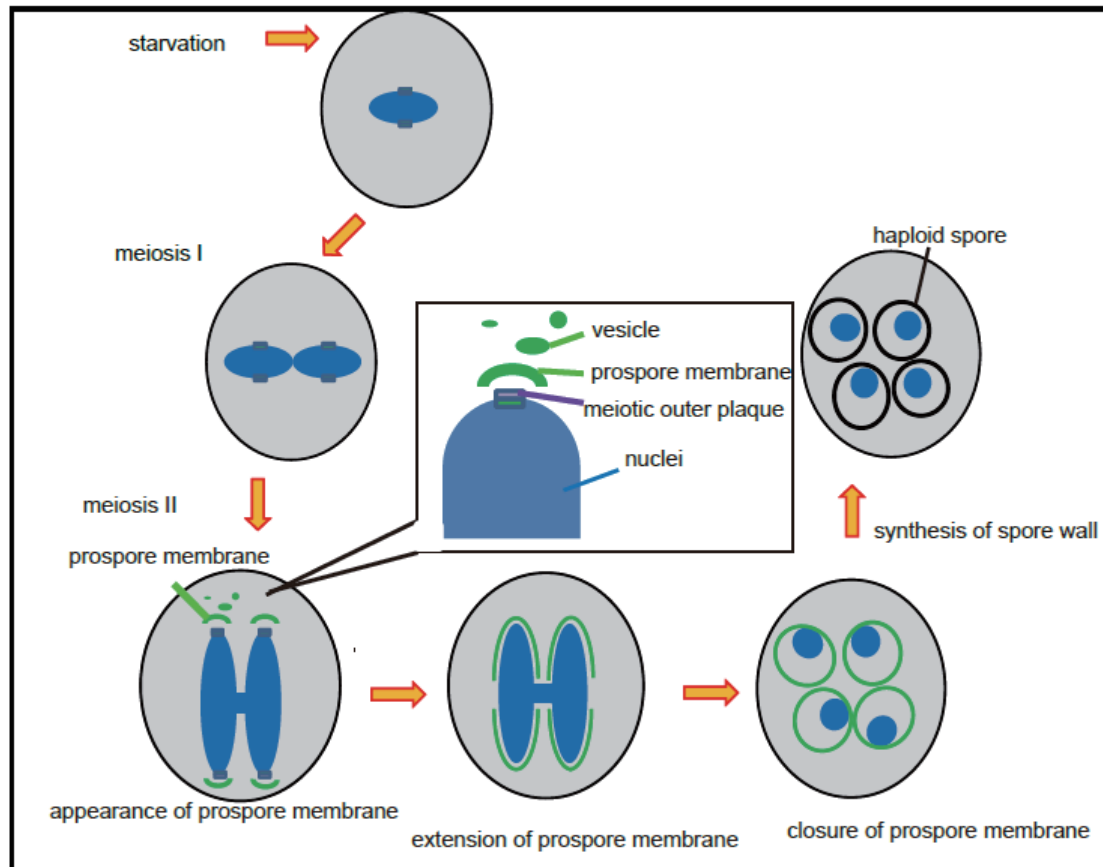
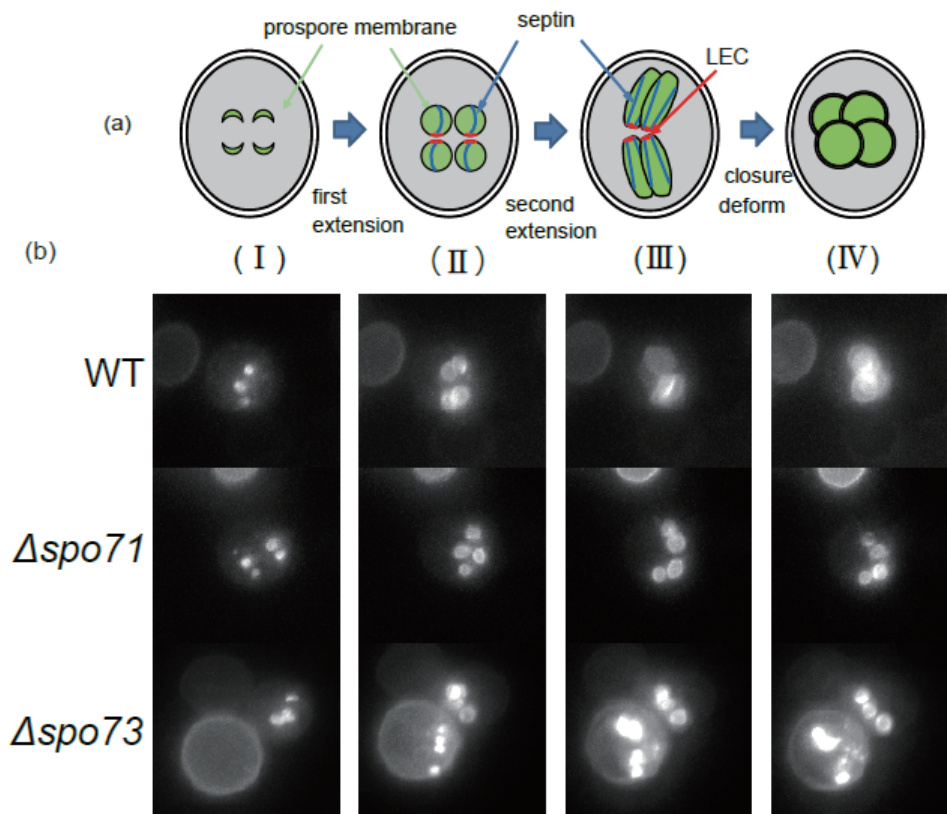


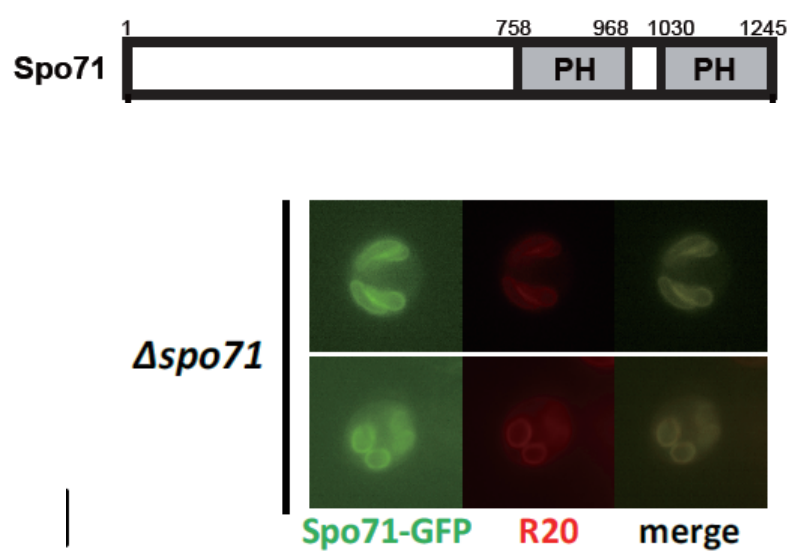
Fig.0-1 出芽酵母における胞子形成



$\Delta spo71$ 、 $\Delta spo73$ 株では前胞子膜の第二伸長がおきない。

Fig.0-2 前胞子膜の伸長の過程

Fig.0-3 Spo71 は前孢子膜に局在する。



実験手法

酵母の培養

孢子形成誘導

第一章

前孢子膜の大きさの定量

前孢子膜と核の観察

核マーカーとしてプラスミド 316-HTB2-mChery を用い、前孢子膜マーカーとして 424-*GFP-SPO20*⁵¹⁻⁹¹(G20)を用いて、野生株、*spo73*破壊株に導入した。Trp、Ura を欠損した SD 培地で 2 日間、プレート上でインキュベートしたのち、孢子形成培地に塗布し、8 時間後の細胞を観察した。

前孢子膜の大きさは、減数分裂が完了し、核が 4 つにわかれたもののみをカウントした。取得した前孢子膜の画像を imageJ で開き、前孢子膜の蛍光シグナルの中央を線でなぞり(本当はシグナルの大外より少し内側)、その長さを計算した。

前孢子膜の内側に分離した核が完全に含まれたものを、核を包み込んだ前孢子膜に分類した。

透過型電子顕微鏡

プレート上で孢子形成を 8 時間誘導した細胞を、パラホルムアルデヒドで前固定し、過マンガン酸カリウムで固定した。、、、、、、

Sporulating cells were collected, fixed with 2% paraformaldehyde–2% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4) at 4°C overnight, and washed three times with 0.1 M phosphate buffer. Cells were then treated with 4% KMnO₄ at room temperature for an hour, washed with distilled water, and embedded in 1.5% low-melting-point agarose. Samples were dehydrated with acetone and infiltrated with increasing concentrations of Spurr's resin in propylene oxide and finally with 100% Spurr's resin. After polymerization with dimethylaminoethanol, ultrathin sections were cut on a Leica Ultracut UCT microtome and stained with uranyl acetate and lead citrate. The sections were then viewed with a JEOL 2000EX electron microscope.

。ジメチルアミノエタノールで重合した後、超薄切片を Leica Ultracut UCT ミクロトームで切断し、酢酸ウラニルおよびクエン酸鉛で染色した。その後、切片を JEOL2000EX 電子顕微鏡で観察した

定された組織は脱水液(エタノールまたはアセトン)の濃度を徐々に上げ完全に脱水する。脱水した組織は樹脂に包埋するが、包埋剤に充分つけ組織の隅々まで浸透させる。用いる樹脂はエポキシ系、アクリル系等いろいろあるがエポキシ系樹脂が組織の保存と薄切時の切れ味の良さからも優れている。包

http://eprints.lib.hokudai.ac.jp/dspace/bitstream/2115/35288/1/2_p16-24.pdf

LEC の分解についての観察

LEC マーカーとしてプラスミド 306-Don1-GFP を用いて、野生株、*spo73* 破壊株、*spo71* 破壊株の酵母ゲノムに Don1-GFP を組み込んだ菌株を作製した(YO88,89,90)。その後、これらの菌株を前孢子膜マーカーの 424-*mRFP-SPO20*⁵¹⁻⁹¹(R20)を用いて、*spo73* 破壊株に導入した。Trp、Ura を欠損した SD 培地で 2 日間、プレート上でインキュベートしたのち、孢子形成培地に塗布し、9-11 時間後の細胞を観察した。4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) staining were observed

前孢子膜と PI4P との関係

PI4P マーカーとして pRS426-P_{PRC1}-GFP-PH_{OSH2}、前孢子膜マーカーとして pRS424-DTR1-RFPを用いた。野生株、*spo73* 破壊株、*spo71* 破壊株の酵母を形質転換して、Trp、Ura を欠損した SD 培地で 2 日間、プレート上でインキュベートしたのち、孢子形成培地に塗布し、7.5-9 時間後、または 11 時間後の細胞を観察した。前孢子膜マーカーの Dtr1-RFP のシグナルが観察される前孢子膜の中で、GFP-PH_{OSH2}が観察される割合をカウントした。

Spore Membrane bending pathway との関係

孢子形成率

野生株、*spo73* 破壊株、*spo1* 破壊株、*sma2* 破壊株、*spo1 spo73* 二重破壊株 *sma2 spo73* 二重破壊株を YPD 培地で 2 日間培養後、孢子形成培地に塗布し、1 日後の孢子形成を観察し、その孢子形成率をカウントした。

前孢子膜と核の観察

核マーカーとしてプラスミド 316-HTB2-mChery を用い、前孢子膜マーカーとして 424-GFP-SPO20⁵¹⁻⁹¹(G20)を用いて、野生株、*spo73* 破壊株、*spo1* 破壊株、*spo1 spo73* 二重破壊株に導入した。Trp、Ura を欠損した SD 培地で 2 日間、プレート上でインキュベートしたのち、孢子形成培地に塗布し、8 時間後の細胞を観察した。

前孢子膜の大きさ

減数分裂が完了し、核が 4 つにわかれたもののみをカウントした。取得した前孢子膜の画像を imageJ で開き、前孢子膜の蛍光シグナルの中央を線でなぞり(本当はシグナルの大小外

より少し内側)、その長さを計算した。

前胞子膜の分解

*spo1*破壊株、*spo1 spo73*二重破壊株において、前胞子膜が分解されるかどうかに関しては、核が4つにわかれた細胞で、なおかつ前胞子膜マーカーの GFP のシグナルが検出される細胞のみを、クラス分けした。

核の取り込まれ具合

前胞子膜の核の取り込まれ具合に関しては、前胞子膜が分解されずに残る細胞に対してのみカウントし、前胞子膜の内側に分離した核が完全に含まれたものを、核を包み込んだ前胞子膜に分類した。

Spore Membrane bending pathway との関係

胞子形成率

野生株、*spo73*破壊株、*spo1*破壊株、*sma2*破壊株、*spo1 spo73*二重破壊株 *sma2 spo73*二重破壊株を YPD 培地で2日間培養後、胞子形成培地に塗布し、1日後の胞子形成を観察し、その胞子形成率をカウントした。

前胞子膜と核の観察

核マーカーとしてプラスミド 316-HTB2-mChery を用い、前胞子膜マーカーとして 424-*GFP-SPO20⁵¹⁻⁹¹*(G20)を用いて、野生株、*spo73*破壊株、*spo1*破壊株、*spo1 spo73*二重破壊株に導入した。Trp、Ura を欠損した SD 培地で2日間、プレート上でインキュベートしたのち、胞子形成培地に塗布し、8時間後の細胞を観察した。

前胞子膜の大きさ

減数分裂が完了し、核が4つにわかれたもののみをカウントした。取得した前胞子膜の画像を imageJ で開き、前胞子膜の蛍光シグナルの中央を線でなぞり(本当はシグナルの太外より少し内側)、その長さを計算した。

前胞子膜の分解

*spo1*破壊株、*spo1 spo73*二重破壊株において、前胞子膜が分解されるかどうかに関しては、核が4つにわかれた細胞で、なおかつ前胞子膜マーカーの GFP のシグナルが検出される細胞のみを、クラス分けした。

核の取り込まれ具合

前胞子膜の核の取り込まれ具合に関しては、前胞子膜が分解されずに残る細胞に対してのみカウントし、前胞子膜の内側に分離した核が完全に含まれたものを、核を包み込んだ前胞子膜に分類した。

2 章

実験手法

Spo73 の機能の確認

pRS-314-SPO73pro-FLAG-HA-SPO73ter

に Spo73 の断片をクローニングしたプラスミドを用いて、*spo73* 破壊株を形質転換し、孢子形成を誘導して 2 日後の孢子を観察した。

Spo73 のモデリング

結晶構造解析の報告があるミオフィリンの Dysferlin ドメイン(2k2o A chain)を基に、MODELLER という計算ソフトを用いて Spo73 のモデリングを行った。

Spo73 の局在

424-SPO73-GFP を発現させ、前孢子膜マーカー 424-*GFP-SPO20*⁵¹⁻⁹¹(G20)と共に *spo73* 破壊株を形質転換し、孢子形成を誘導後 8 時間の細胞を観察した。

コンストラクト

424-SPO20pro-GFP-SPO73

424- SPO20pro-GFP-SPO73-AAA くらっと PCR

大腸菌による Spo73 の発現

Nus-tag および His-tag を所有するベクター pET50 及び、pET50 に SPO73 の ORF を Sma1、Xho1 サイトでクローニングした pET50-SPO73、pET50-AAA を大腸菌 rosetta (0BL21 菌由来)に導入し、1 晩 30℃で前培養後、50 mL の LB 培地で本培養し、OD₆₀₀=0.5~0.7 になった時点で終濃度が 0.1mM になる様、IPTG を添加後、4 時間 30℃で培養し、タンパク質を発現させた。

得られた菌を 4℃、6000 rpm で 5 分間の遠心を行い、菌体を回収した。その後 150 mM NaCl、50 mM Tris-HCl PH7.5 のバッファーで洗浄し、4℃、6000 rpm で 5 分間の遠心を行い、

回収し-80℃にストックした。

Spo73 タンパク質の精製

-80℃にストックした菌体を解凍し、150 mM NaCl、50 mM Tris-HCl PH7.5、のバッファーを 1 mL 加え、懸濁した。(機械)を用いて超音波によって大腸菌を破碎して、4℃、15,000 rpm で 5 分間遠心し、上清を取得した。

得られた上清にニッケルビーズ () を μ l 加え、1 時間インキュベートしビーズに His-tag が付加されたタンパク質を吸着させた。

その後、150 mM NaCl、50 mM Tris-HCl pH7.5 で 3 度洗浄したのち、10 mM イミダゾール、150 mM NaCl、50 mM Tris-HCl PH7.5 を 400 μ l 加え、タンパク質を溶出させた。

(タンパク質量の測定

BCA キット)

Lipid overlay assay

各種 Lipid が 100 pmol 付着されたニトロセルロースメンブレン(PIP Strip p-6001)を 0.2% lipid free BSA (sigma)、10mM Tris HCl pH 7.5 、150mM NaCl TBST 、0.1% ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノラウレート(tween-20) のバッファーで 1 時間ブロッキングした。その後、2 μ g/mL のタンパク質、10mM Tris HCl pH 7.5 、150mM NaCl TBST 、0.1% ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノラウレート(tween-20)のバッファーで、2 時間室温でインキュベートし、脂質とタンパク質を結合させた。その後、His 抗体0 で標識し、LAS-4000 でシグナルを検出した。

手法

本章で用いた菌株(表にまとめる)

AH109

del 73

del 71

del 71 del73

del spo1

del sma2

del spo1del 73

del sma2 del 73

AN120 GFP-Vps13

del71 GFP-Vps13

del73

本章で用いたプラスミド(表にまとめる)

424-R20

316-Htb2-mcherry

424-GFP-SPO73

424-GFP-SPO73-AAA

314- GFP-SPO73-AAA

426-SPO71

426-Vps13

pGAD-T7

pGAD-SPO73

pGBK-T7

pGBK-SPO71-Nter

pGBK-SPO71-middle

pGBK-SPO71-MPH

pGBK-SPO71-C-PH

pGBK-SPO73

426-SPO73pro-FLAG-HA-SPO73

424-TEF1pro-7HisMyc-SPO71-M-PH (由来 pYM46)

424-TEF1pro-7HisMyc-SPO73

SPO73 の局在の依存性

spo71 破壊株、*vps13* 破壊株に 424-GFP-SPO73 並びに前胞子膜マーカー426-R20 を導入し、胞子形成を誘導後 8 時間後の前胞子膜を形成過程にある細胞を観察した。

***spo73*破壊株における、Spo71、Vps13 の局在**

Spo71 の局在に関しては野生株と *spo73* 破壊株に 424-SPO71-GFP 並びに前胞子膜マーカー426-R20 を導入し、胞子形成を誘導後 8 時間の前胞子膜の形成過程にある細胞を観察した。

Vps13 の局在に関してはゲノム上の Vps13 に GFP がタグ付けされた菌株を用いた。*SPO73* 遺伝子を破壊した菌株を作製後、前胞子膜マーカー426-R20 を導入し、胞子形成を誘導後 8 時間の前胞子膜の形成過程にある細胞を観察した。

Spo73-AAA の局在観察について

前胞子膜に局在できない変異型 Spo73 である Spo73-AAA を、過剰発現ベクターで発現させた野生株および *spo73*破壊株を、*Ura3*マーカーをもったマルチコピーベクターpRS426、pRS426-SPO71、pRS426-VPS13 で形質転換し、過剰発現させ、胞子形成を誘導後 8 時間における Spo73-AAA の局在の観察を行った。

Spo73-AAA の胞子形成率

*spo73*破壊株を 314-GFP-SPO73-AAA と、pRS426、426-SPO71、426-VPS13 それぞれを用いて形質転換を行った。得られたコロニーを、選択培地で 2 日間インキュベートした後、胞子形成培地に塗布し、1 日後、胞子形成率をカウントした。

Spo71,Spo73 の相互作用について

ツーハイブリッド法による結合の実験

酵母ツーハイブリッド法に用いる菌株である AH109 をプラスミド pGAD シリーズ、pGBK シリーズを用いて形質転換を行った。形質転換後、シングルコロニーを拾い、レポーター培地に植菌を行い、30℃で 2 日インキュベートしたプレートを撮影し、その生育度合いを観察した。

免疫沈降による相互作用の検討

Spo71-MPH と Spo73 の結合

spo71 spo73 二重破壊株において、Spo73 の N 末端に FLAG-HA タグを付加した FLAG-HA-SPO73、および PH ドメインの N 末端に 7His-Myc をタグ付けした 7His-Myc-Spo71-M-PH を過剰発現ベクターを用いて発現させた。

Spo73 同士の結合

spo73 破壊株において、Spo73 の N 末端に FLAG-HA タグを付加した FLAG-HA-SPO73、および、Spo73 の N 末端に FLAG-HA タグを付加した 7His-Myc-Spo73 を過剰発現ベクターを用いて発現させた。

液体培地で孢子形成誘導後、1mM PMSF を加え 4000rpm 1min で遠心後、25mM Tris-HCl pH7.5、150mM NaCl、1mM PMSF で洗浄し、直ちに、回収し-80℃にストックした。

免疫沈降

サンプルに対し、速やかに融解後、25mM Tris-HCl pH7.5、150mM NaCl のバッファー400 µl で懸濁し、ガラスビーズ(Sigma)を加え、multi beads shocker を用いて酵母の細胞壁を破碎した。破碎には 2000rpm、30 秒間のボルテックスによる破碎を、インターバルを 30 秒として 8 回行った。

その後、終濃度が 0.1%になるように NP-40 (Nonidet) を加え、20 分間氷上に静置した。その後、15000rpm、5min の遠心を行い、上清の可溶画分を取得した。可溶画分に対して、FLAG 抗体がビーズに結合された FLAG beads (sigma)を加え、4℃にて転倒混合を一晩行い、FLAG 配列を有するタンパク質とビーズと結合を促した。FLAG beads はサンプルに加える前、あらかじめ 25mM Tris-HCl pH7.5、150mM NaCl、0.1% NP-40 で洗浄した。4℃にて転倒混合を一晩行ったのち、25mM Tris-HCl pH7.5、150mM NaCl、0.1% NP-40 を用いて 3 回洗浄して、FLAG 抗体と結合しないタンパク質を取り除いた。その後、

SDS-PAGE による電気泳動、Western blotting を行い、membrane に転写し、1 次抗体、には 2 次抗体には を使用した。

Spo71-PH ドメインと Spo73 の結合部位の同定

酵母ツーハイブリッド法に用いる菌株である AH109 をプラスミド pGBK-M-PH 及び Spo73 を断片化し pGAD にクローニングした pGAD シリーズを用いて形質転換を行った。形質転換後、シングルコロニーを拾い、レポーター培地に植菌を行い、30℃で 2 日インキュベートしたプレートを撮影し、その生育度合いを観察した。

第三章

手法方法

菌株

AH109

AN120

gip1

WT gal-ER

gip1 galER

プラスミド

Glc7 結合モチーフ interaction

GBK-Glc7 とともに GAD-Gip1

Glc7 結合モチーフと胞子形成

Gip1 自身のリン酸化の解析

G7M3 の局在解析

Gip1-Glc7 フォスファターゼのターゲットの探索

第一章 *spo71*、*spo73* 破壊株の表現型の解析

第一章 *spo71*、*spo73*破壊株の表現型の解析

背景

前孢子膜形成に関する知見を得るため、前任者により孢子形成に異常を示すと報告のある非必須遺伝子の破壊株 (Briza et al. 2002)(Enyenihi and Saunders 2003)(Marston et al. 2004) 293 株における前孢子膜の観察が行われ、この中から前孢子膜の伸長がおかしくなる変異型のスクリーニングが行われた。

その結果、これまでの報告にある *vps13*破壊株(Nakanishi, Suda, and Neiman 2007)、に似て前孢子膜が十分に伸長をしない表現型を示すものとして、既に報告されている *gip1*破壊株に加え(Tachikawa et al. 2001)、*spo71*破壊株及び、*spo73*破壊株が取得された。タイムラプス蛍光顕微鏡観察から、*spo71*、*spo73*破壊株の前孢子膜は伸長が途中で終了してしまい、前孢子膜が小さな球状のまま留まり、正しく伸長しないことが判明している(Fig.0-)。*spo73*破壊株は、減数分裂は正常に進ものの、孢子壁が合成されない破壊株として報告されている(Rabitsch et al. 2001)(A. Coluccio et al. 2004)。

SPO71 に関しては本研究過程に前孢子膜伸長に関わることが報告されてしまったため、本章では *SPO73* に着目した。*Gip1* はセプチンに局在する一方、*Spo73* は完成された孢子においては孢子膜上に局在し(A. Coluccio et al. 2004)、*Vps13*、*Spo71*、は前孢子膜に局在する。*Vps13* 並びに、*Spo71* は結合することが報告されており、前孢子膜伸長に協調して働くことが推察されている(Park et al. 2013)。*Spo73* が、前孢子膜伸長において *Vps13*、*Spo71* と同様に関わるかを知るため、本章では、これらの遺伝子破壊株の表現型と比較しながら、*spo73*破壊株の表現型をより詳細に解析した。

また、*SPO71* は前孢子膜を湾曲させる経路(*SpoMBe pathway*)に働く *SPO1* 遺伝子(Maier et al. 2008)と弱い遺伝学的関係があることが報告されている(Parodi et al. 2012)。本章では二重破壊株を作製し、その表現型を観察することで、*SPO73* も *SPO71* 同様、この前孢子膜を湾曲させる遺伝子と遺伝学的に関連があるかを検討し、*Spo73* も *Spo71*、*Vps13* と同じ経路で働くかの検討を行った。

結果

1 表現型の解析

前任者のタイムラプス蛍光顕微鏡観察により、*spo73*破壊株においては、前孢子膜が小さな球状のまま留まり、その後の過程が起こらないことが示された。ほかに前孢子膜が小さな球状のまま留まる変異株として、*spo71*破壊株(Parodi et al. 2012)、および *vps13*破壊株(Nakanishi, Suda, and Neiman 2007)が報告されている。*Spo71* 及び *Vps13* は結合し、前孢子膜の伸長に協調して働くことが示唆されている(Park et al. 2013)。*Spo73* もこれらの因子と共に前孢子膜伸長において働くかを検討するため、*spo73*破壊株のより詳細な解析を行い、これらの破壊株の表現型との比較を行った。*spo71*破壊株及び *vps13*破壊株におい

て報告されている表現型としては、前胞子膜の内腔に輸送小胞が蓄積すること、LEC が閉鎖しないこと、PI4P の量が減少すること、報告されているため、これらの表現型について解析を行った(結果 1-3、1-4、 1-5)。

1-1 前胞子膜の大きさの定量

前任者のタイムラプス蛍光顕微鏡観察により *spo73* 破壊株において、前胞子膜が小さな球状のまま留まり、その後の過程が起こらないことが示されているが、この実験は定性的であった。そこで、野生株と比較して大きさに違いがあるか定量的に示すため、前胞子膜の大きさを計測した。前胞子膜マーカーである G20 と核マーカーである Htb2-mCherry を発現させた野生株及び *spo73* 破壊株について胞子形成誘導後 7-9 時間の細胞を観察し、第二減数分裂が完了した細胞について前胞子膜の大きさを計測した。(Fig.1-1-1)。その結果、確かに、野生株と比較して *spo73* 破壊株の前胞子膜は小さくなっていた。

1-2 前胞子膜の核の取り込み

前胞子膜の大きさを計測中、*spo73* 破壊株において、核を取り込まない前胞子膜が観察された。そこで、*spo73* 破壊株において前胞子膜の核の取り込み具合に影響があるかを調べるため、観察されたすべての前胞子膜について、核を包んでいるか否かを区別し、定量した(Fig.1-2-1)。その結果、野生株ではほぼすべての前胞子膜が核を取り込むのに対し、*spo73* 破壊株では 42%の前胞子膜が核の取り込みに失敗していた。一方、*spo71* 破壊株では核の取り込みに異常はないことが報告されている(Parodi et al. 2012)。そこで、*spo71* 破壊株についても、核の包み込みについて観察を行なった。この結果本研究においては、*spo71* 破壊株において、*spo73* 破壊株と同程度の前胞子膜が核を包み込むことに失敗しており、これは以前報告されていた知見と異なっていた。続いて、前胞子膜が核の取り込みに対して影響があることを確かめるために、タイムラプス蛍光顕微鏡観察を行った。結果、野生株では前胞子膜による核の取り込みが観察されたのに対して、*spo73* 破壊株では前胞子膜の先端で核がとどまってしまう、核が取り込まれない様子が観察された(Fig.1-1-2-2)。本研究において、*spo73* 破壊株において前胞子膜の核への取り込みに異常が観察され、その様子は *spo71* 破壊株に似ていた。

1-3 透過型電子顕微鏡による観察

前胞子膜が小さな球状で留まる *spo71* 破壊株及び *vps13* 破壊株において報告されている前胞子膜の表現型としては、前胞子膜の二重膜の間に intraluminal vesicles と呼ばれる小胞がたくさん蓄積された MVB (multi vesicular body) 様の構造が観察されることが報告されている(Park et al. 2013)。そこで、*spo73* 破壊株の前胞子膜においても同様な構造が観察されるかを、電子顕微鏡による観察を行い、検討した。野生株、*spo73* 破壊株、*spo71* 破壊株、*vps13* 破壊株について、胞子形成を誘導し、固定したサンプルの前胞子膜を観察した(Fig.1-1-3)。その結果、野生型株においては前胞子膜の二重膜の間の距離は一定であったの

に対して、*spo71*破壊株、*vps13*破壊株では以前の報告にあった通り、前胞子膜内に小胞がたくさん蓄積された前胞子膜が観察された。*spo73*破壊株では、カウントした結果、4割ほどの前胞子膜において、前胞子膜内に小胞がたくさん蓄積された MVB (multi vesicular body) 様の構造が観察された。この結果は、既に報告されている、*spo73*破壊株と似た表現型を示す *vps13*、*spo71*破壊株における観察結果と似ていた。

1-4 LEP の分解についての観察

前胞子膜については、*spo73*破壊株は *vps13*、*spo71*破壊株に似た表現型を示すことが明らかとなったため、続いて LEP について解析を行った。*vps13*、*spo71*破壊株においては、LEP は形成されるもの、分解されず前胞子膜が閉鎖しないことが報告されている(Park et al. 2013)。この報告において、*vps13*、*spo71*破壊株においては 3 割ほどの細胞において LEP が分解されずに残ること、その結果、前胞子膜の閉鎖が *vps13*破壊株では 9 割、*spo71*破壊株では 7 割ほどの細胞で起こらないことが、FLIP アッセイによって示されている。そこで、*spo73*破壊株においても、LEP に影響があるのか、観察を行った。LEP のマーカーの Don1-GFP、前胞子膜マーカーの R20 を発現させた、野生株、*spo73*破壊株、*spo71*破壊株について、前胞子膜が十分伸長する胞子形成誘導後 9-11 時間の細胞を固定し DAPI 染色を行うことで、前胞子膜、LEP、及び核を観察した。減数分裂が完了し 4 つの核が観察される細胞のみにおいて、LEP の分解についてカウントした(Fig.1-1-4)。その結果、野生株においては、LEC は形成されるが、前胞子膜の伸長が完了し、大きな球状となる 9-11 時間の細胞では、ほとんどの前胞子膜において、LEP は分解され、Don1-GFP のシグナルは細胞質へと拡散した。対して、*spo73*破壊株では分解されずに残る細胞が多く観察され、その割合は 30%であった。同様に、*spo71*破壊株では 4 割ほどの細胞において LEC が分解されずに残っており、LEC に影響がある以前の知見と一致していた。このことから *spo73*破壊株において前胞子膜の閉鎖にも部分的に欠失があると考えられる。

1-5 前胞子膜と PI4P との関係

*vps13*破壊株、*spo71*破壊株において前胞子膜上の PI4P が減少していることが報告されている(Park and Neiman 2012)(Park et al. 2013)。これは、胞子壁を合成する Dtr1 という、前胞子膜に局在するタンパク質に RFP を融合させた前胞子膜マーカーにとともに、Osh2 タンパク質の PH 結合ドメインを蛍光タンパク質に融合させた PI4P マーカーを同時に発現させた細胞において、前胞子膜を観察し、PI4P マーカーのシグナルが検出された前胞子膜の割合を算出することで前胞子膜上の PI4P の量を議論している。野生株においてはほとんどの前胞子膜で PI4P マーカーの蛍光も観察されるのに対して、*spo71*破壊株及び *vps13*破壊株の前胞子膜においては、PI4P マーカーの蛍光が観察される割合が減少することから、*vps13*破壊株、*spo71*破壊株において前胞子膜上の PI4P が減少していると報告されている。そこで同様に、*spo73*破壊株においても前胞子膜マーカーと PI4P マーカーを発

現させ、孢子形成誘導後 8-9 時間の細胞で PI4P が減少していないか検討した(Fig.1-1-5-1)。その結果、PI4P マーカーの蛍光が観察される前孢子膜の割合は、野生株と比べそんな色なく、優位差がなかった。そこで、野生株と比較して優位に差があると報告のある *spo71* 破壊株においても PI4P が減少していないか確認実験を行ったところ、PI4P マーカーの傾向が減少することはなく、報告された知見と異なっていた。

Park らの、報告では室温で 16 時間孢子形成を誘導した菌株を観察していた。そこで、本研究で得られた結果が、観察条件が異なっていたことが原因で過去の知見と異なっているか知るために、より時間を遅らせた 12 時間で PI4P の観察を行った。その結果、野生株と比較して *spo73*、*spo71* 破壊株において、PI4P が検出される前孢子膜は確かに減少していた観察された。このことから、より遅いタイミングで PI4P の減少は観察されるものの、前孢子膜ができるまさにその時である 30℃、8 時間においては、前孢子膜上の PI4P の量はこの実験系においては、野生株と *spo73* 破壊株で差が検出されないことが判明した。

2. Spore Membrane bending pathway との関係

SPO71 は前孢子膜を湾曲させる経路(SpoMBe pathway)に働く *SPO1* 遺伝子(Maier et al. 2008)と弱い遺伝学的関係があることが報告されている(Parodi et al. 2012)。

spo1 破壊株は孢子形成不全で、その前孢子膜は、減数分裂を完了した細胞の 66%が前孢子膜のシグナルは観察されるが、細胞質上にドット状にしか検出されず、1 細胞あたりに形成される前孢子膜の数が少なくなることが報告されている。また、同じ *spo1* 破壊株において、前孢子膜が形成されれば、前孢子膜の口が開いた表現型を示し、*spo73* 破壊株とは逆に前孢子膜が過剰に伸長する表現型を示すことから前孢子膜を曲げる経路において働くことが報告されている。

spo71 spo1 二重破壊株では、前孢子膜の大きさ、孢子形成は変化がないものの、*spo1* 単独破壊株と比較して、1 細胞あたりにできる前孢子膜の数が増加することから、*SPO71* 遺伝子との弱い相互作用があることが報告されている。そこで、本研究において *SPO73* も、*SPO71* 同様に *SPO1* 並びに SpoMBe pathway に働く他の因子である *SMA2* (Maier et al. 2008)との遺伝学的な相互作用があるかの検討を行った。

2-1 Spore Membrane bending pathway 孢子形成

SPO73 も、*SPO71* 同様に SpoMBe pathway に働く *SPO1* 並びに *SMA2* との遺伝学的な相互作用があるかを知るため、二重破壊株を作製し、その表現型の解析を行なった。野生株、*spo73* 破壊株、*spo1* 破壊株、*sma2* 破壊株、*spo1 spo73* 二重破壊株 *sma2 spo73* 二重破壊株のそれぞれ孢子形成を誘導し、孢子形成率をカウントした(Fig.1-2-1)。その結果、*spo1 spo73* 二重破壊株、*sma2 spo73* 二重破壊株において孢子形成するものが観察され、*spo73* 破壊株、*spo1* 破壊株、*sma2* 破壊株の単独遺伝子破壊株の孢子形成不全を回復した。

2-2 Spore Membrane bending pathway 前孢子膜

孢子が観察されたので、野生株、*spo73*破壊株、*spo1*破壊株、*spo1 spo73*二重破壊株の前孢子膜の大きさを計測した(Fig.1-2-2)。結果、*spo73*破壊株と比較して明瞭な優位差は検出されなかったものの、*spo1 spo73*二重破壊株において、前孢子膜が大きくなる傾向にあり、大きく伸長した前孢子膜も観察され、上記の9%が孢子形成した結果と合致していた。

2-3 Spore Membrane bending pathway 前孢子膜の形成数

*spo1*破壊株は孢子形成不全で、その前孢子膜は、減数分裂を完了した細胞の66%において、前孢子膜ができず、1細胞あたりに形成される前孢子膜の数が少なくなるが、*spo71*との二重破壊株では、その厳しい表現型が回復することが報告されている(Parodi et al. 2012)。そこで、*spo1 spo73*二重破壊株においても、前孢子膜形成不全の表現型の回復が起きないか観察を行った。*spo1*破壊株、*spo1 spo73*二重破壊株に対して前孢子膜マーカーG20と核マーカーHtb2-Mcherryを発現させ観察した。核が4つに分かれ、減数分裂が完了した細胞において、前孢子膜マーカー由来のGFPの蛍光が観察される細胞についてのみ、前孢子膜が観察されるか否かを分類した(Fig.1-2-3)。その結果、前孢子膜が*spo1*破壊株と比較して前孢子膜が形成されるか観察した。*spo1*破壊株では68%の細胞において前孢子膜が形成されないのに対して、*spo1 spo73*二重破壊株では27%となり、前孢子膜が形成されない割合が比較的緩やかとなった。

2-4 Spore Membrane bending pathway 前孢子膜の核の取り込み

二重破壊株において*spo1*破壊株と比較して前孢子膜が観察される細胞数が増加したので、前孢子膜による核の取り込みも改善されないか、観察した。結果1-2における野生株、*spo73*破壊株に加え、*spo1*破壊株、*spo1 spo73*二重破壊株において前孢子膜、核の観察を行い、核の取り込まれ具合を計測した。その結果、*spo1*破壊株、*spo1 spo73*二重破壊株それぞれにおいて4割ほどの細胞で前孢子膜が核を取り込めず、この割合は*spo73*破壊株単独の破壊株における割合とほぼ同程度であった。

考察

本章では、前孢子膜が小さな球状のまま留まる表現型を示す*spo73*破壊株の表現型を解析し、以前より報告のある*spo71*破壊株、および*vps13*破壊株の表現型との比較を行った。

*spo73*破壊株では野生株と比較して、前孢子膜が伸長せず、核を外してしまう表現型が観察された。また、孢子膜の内腔に輸送小胞が溜まることが観察され、LECが分解されないという表現型が観察された。これらの結果は*spo71*破壊株、および*vps13*破壊株の表現型似ており、*SPO73*も*SPO71*、*VPS13*と同様に、前孢子膜伸長に関わることが示唆された。

1 表現型の解析

母細胞の細胞質にレーザーを照射し退色させたとき、前孢子膜が退色するか否かで前孢子膜が閉鎖したかどうかを観察する FLIP アッセイにより、*vps13*破壊株では9割、*spo71*破壊株では7割ほどの細胞で起こらないことが報告されている(Park et al. 2013)。本研究では FLIP アッセイは行わなかったが、*spo73*破壊株において、*spo71*破壊株と同等の LEC が分解されず残る結果が得られたため、*spo73*破壊株においても、多くの前孢子膜は閉鎖しないと推察される。

核の取り込みに関して、*spo71*破壊株では核の取り込みに異常はないことが報告されている(Parodi et al. 2012)が本研究においては異常が観察された。この理由については、菌株のバックグラウンドの違いや実験条件の違いが挙げられる。

*spo73*破壊株、*spo71*破壊株において核の取り込みに失敗する核が多く観察される理由については、①核と反対側の方向に伸長する前孢子膜が多いこと、②LEC の大きさが不十分で核を取り込めず、前孢子膜が閉鎖しないため、核や前孢子膜が動いているうちに前孢子膜が核から離れることの、3 点が挙げられる。①について、分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* ではセプチンが前孢子膜の伸長する方向を決定することが報告されており(Onishi et al. 2010)また出芽酵母においても、酵母の標準菌である BY バックグラウンドとのハイブリッド株ではセプチンを破壊すると孢子形成に大きな影響があることが報告されている(Heasley and McMurray 2016)。*spo73*破壊株では前孢子膜が小さな球場のまま留まり、セプチンを構成するタンパク質は前孢子膜状に観察され、バー状構造はとらないことから、セプチンが正しく形成されないため、前孢子膜の伸長の方向がおかしくなり、核の取り込みに失敗した細胞が多く観察された可能性が考えられる。しかしながら、タイムラプス蛍光観察を行った結果、前孢子膜が核と反対側に伸長する様子は観察されなかったことから、セプチンの欠損によって、前孢子膜が核と反対側の方向に伸長し、核を外した前孢子膜が多くなったという可能性は低いと考えられる。タイムラプス蛍光観察から、取り込む箇所の核の大きさよりも前孢子膜の先端が小さいため、核を取り込めない様子が観察されたことから、②の可能性がより大きいことが考えられる。

LEP の分解について、LEC は anaphase promoting complex によって分解される。anaphase promoting complex or cyclosome (APC/C)を活性化する Ama1 というタンパク質の欠損株では、LEC 分解されず、孢子形成ができない(Diamond et al. 2009)。*ama1*破壊株では前孢子膜が大きく伸長するため、前孢子膜が伸長しない *spo73*破壊株において Ama1 は存在するが LEC は分解されないことから、前孢子膜が伸長して始めて何らかのスイッチが入り、Ama1 が APC/C を活性化し、LEP の分解が引き起こされることが考えられる。

電子顕微鏡による観察では *spo73*破壊株において前孢子膜二重膜内に小胞がたくさん蓄積された構造が観察された。前孢子膜と小胞の融合は細胞質側で起こり、前孢子膜近傍の

細胞質に小胞が蓄積された様子があまり観察されなかったことから、*spo73*破壊株において前胞子膜が小さな球状になるまでは小胞融合はうまくいっていると考えられる。二重膜間に小胞が多くたまった構造体としては MVB (multi vesicular body) が知られており、MVB とは、エンドサイトーシスの後期エンドソームに観察される構造体で、液胞に運ばれるべきたくさんの小胞がエンドソーム膜に取り込まれている構造体である。本研究で観察された構造体は MVB とは異なると推察している。それは、MVB の形成に必須な ESCRT-III の component である Snf7 (Hurley and Hanson 2010) を欠失させた *vps13* 破壊株でも同様の構造体が観察されているためである (Park and Neiman 2012)。前胞子膜が小さな球状に留まったときにのみに形成される、この MVB 様の構造体の形成メカニズムについても興味をもたれる。

PI4P は PI(4,5)P₂ の前駆体である。PI(4,5)P₂ は前胞子膜形成において重要な役割を果たすことが知られている。PI(4,5)P₂ により、ホスホリパーゼ D である Spo14 が活性化され、前胞子膜上で PA が産生されることで、SNARE タンパク質の一つである Spo20 を前胞子膜上へとリクルートすることで前胞子膜の膜融合が促進されることが知られている。このことから、PI(4,5)P₂ は前胞子膜の小胞融合を促進することが考えられており、前胞子膜が伸長しない *spo71* 破壊株、および *vps13* 破壊株における PI4P、PI(4,5)P₂ の量が減少している Park らの主張は妥当であると思われる。しかし、本研究においては、Park らが報告した結果と異なり、前胞子膜上の PI4P の量は野生株と *spo71* 破壊株、および *spo3* 破壊株で差は検出されなかった。

当研究室の中村の研究結果により、*spo73* 破壊株において、前胞子膜上で Sac1 の PI4P フォスファターゼを過剰発現させると孢子形成不全を回復する結果が得られており、前胞子膜上の PI4P を減少させることで前胞子膜が伸長することが示されている。よって中村の研究結果においては、Park らの主張とは異なり、前胞子膜が伸長する野生株においては前胞子膜が伸長しない *spo73* 破壊株よりも前胞子膜上の PI4P が少ないことが推測される。前胞子膜上の PI4P の量は野生株と *spo71* 破壊株、および *spo3* 破壊株で差は検出されなかったという本研究結果は、中村の研究結果と矛盾は生じず、合致していると考えられる。本研究で用いた PI4P マーカーの感度が良いため、前胞子膜上の PI4P をほとんど検出し、野生株と *spo73* 破壊株の微量な PI4P 量の差を検出できなかったと考えられる。

2. Spore Membrane bending pathway との関係

本研究により、*SPO73* は前胞子膜を湾曲させる経路 (SpoMBe pathway) に働く *SPO1* 遺伝子及び *SMA2* 遺伝子と遺伝学的関係があることが示された。*spo1 spo73* 二重破壊株、*sma2 spo73* 二重破壊株において孢子形成するものが観察された。さらに、二重破壊株において孢子形成する細胞も観察されたことから、その遺伝学的関係は *SPO71* 遺伝子よりも強く観察された。

spo1 spo73 二重破壊株、*sma2 spo73* 二重破壊株において孢子形成するものが観察された理由としては、野生株では膜を伸長と曲率の制御が拮抗して前孢子膜を形成する力を生み出すが、その両方を欠損することで偶発的に前孢子膜が伸長し、孢子形成が行われたと考えられる。

Spore Membrane bending pathway 前孢子膜の形成数

spo73 破壊株においては、ほとんどの細胞前孢子膜が観察される一方で *spo1* 破壊株は孢子 68%において、前孢子膜が観察されない。*spo1 spo73* 二重破壊株において 27%となった。前孢子膜が観察される割合が増加した。*spo1* 破壊株において前孢子膜が観察されない理由として、前孢子膜の先端である LEP が開き過ぎることにより、前孢子膜が異常に幅広く伸長するために、伸長途中で分解されてしまったことが考えられる。その証拠はないものの、*SPO73* との遺伝子二重破壊株において観察される細胞が増加することから、前孢子膜の口の開き具合が穏やかとなって、前孢子膜の分解が起きづらくなり観察される細胞が増加したことも考えられる。

核の取り込みについて、*SPO1* 遺伝子との二重破壊株を作製することで LEP が大きくなることで *spo73* 破壊株の核の取り込みの失敗が改善されることが期待されたが、観察された前孢子膜においては核の取り込みの割合は変化することはなかった。

本章により、*SPO73* 遺伝子の破壊株の表現型は *SPO71*、*VPS13* 遺伝子破壊株と似ており、Spo73 は Spo71、Vps13 と同経路で前孢子膜伸長に関わる可能性が高いことが示唆された。また、Spo73 と Spo71 は共に前孢子膜を曲げる力と拮抗して働くことが考えられる。

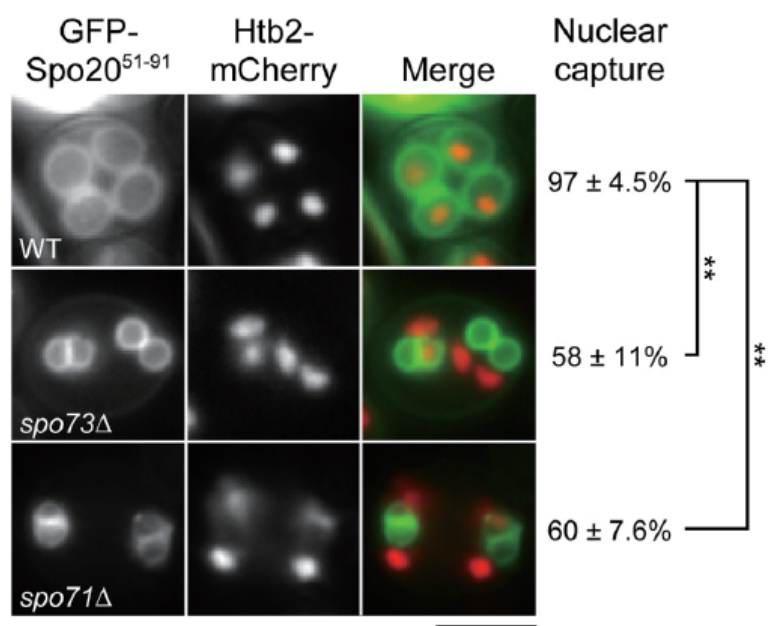


Fig1-2 核の取り込みについて

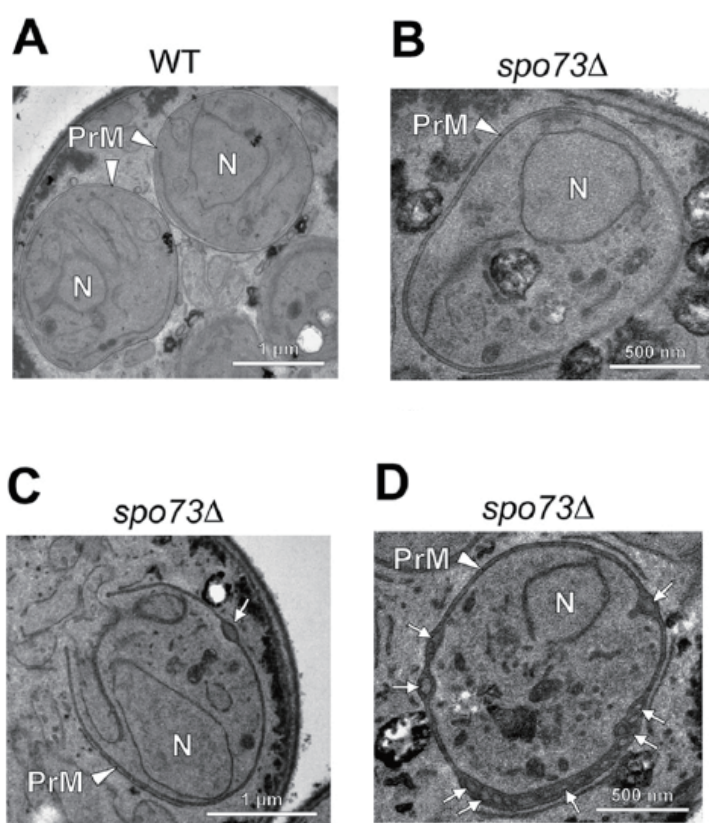


Fig.1-3 電子顕微鏡による観察

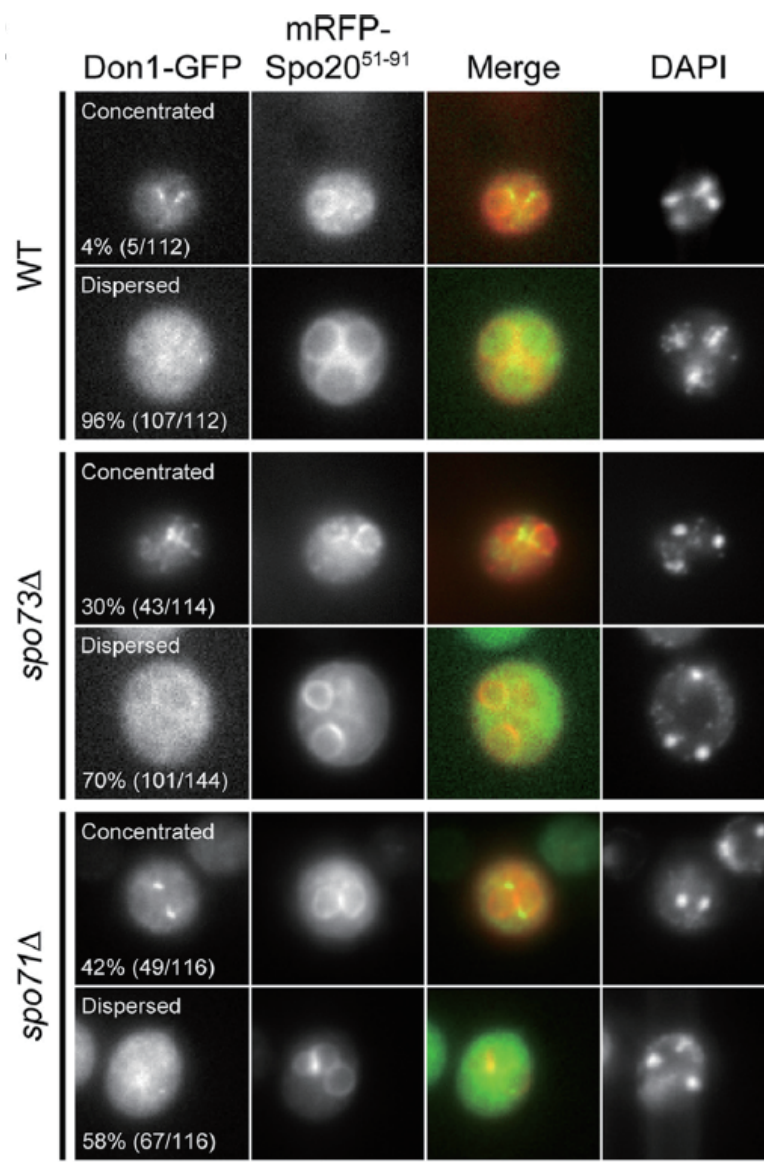


Fig.1-4 LEC の分解について

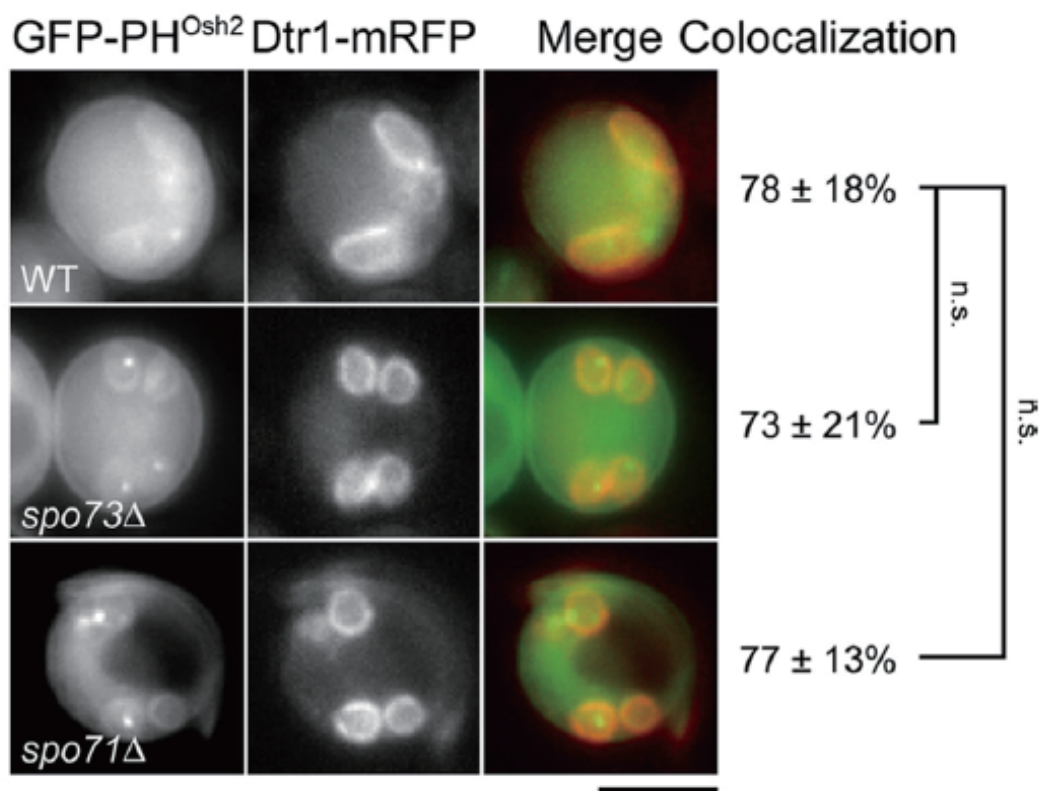


Fig.1-5 PI4P について

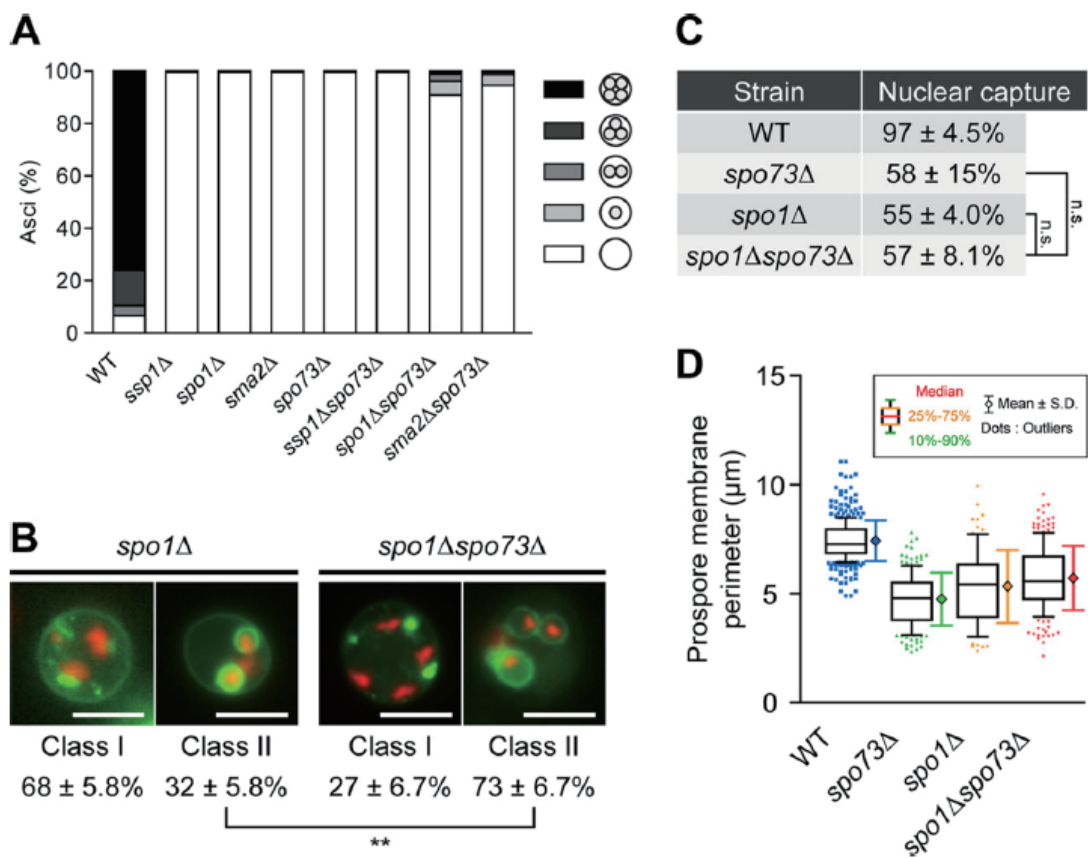


Fig.1-6 SPO1 との関係について

第二章 Spo73 の細胞内局在と相互作用の解析

本章の内容は、学術雑誌論文として出版する計画があるため公表できない。
5年以内に出版予定。

第三章 Gip1 の Glc7 結合配列と機能についての解析

本章の内容は、学術雑誌論文として出版する計画があるため公表できない。
5年以内に出版予定。

総合討論

本研究では、**Spo73** と **Gip1** に着目し研究を行った。**Spo73** は **Spo71** と結合し、**Vps13** と共に複合体を形成して、前胞子膜伸長に関わることが示唆された。**Gip1** は **VRF (492-494)** の領域で **Glc7** と結合し、前胞子膜伸長に関連すること、**Gip1** 自身も脱リン酸化されることが示唆された。また、**Spo73 / Spo71 / Vps13** と **Gip1** は別経路で前胞子膜伸長に寄与すると推測された。現在の課題としては、**Gip1-Glc7** のターゲットや、**Spo73 / Spo71 / Vps13** の下流で働く因子を特定することであり、今後、それらの因子を解析することで前胞子膜伸長の分子機構が明らかになり、さらに、生体膜の形態形成について、知見が深められることが期待される。

参考文献

- Bajgier, B K, M Malzone, M Nickas, and A M Neiman. 2001. "SPO21 Is Required for Meiosis-Specific Modification of the Spindle Pole Body in Yeast." *Molecular Biology of the Cell* 12 (6): 1611–21. doi:10.1091/mbc.12.6.1611.
- Briza, Peter, Edith Bogengruber, Albert Thür, Michael Rützler, Martin Münsterkötter, Ian W. Dawes, and Michael Breitenbach. 2002. "Systematic Analysis of Sporulation Phenotypes in 624 Non-Lethal Homozygous Deletion Strains of *Saccharomyces Cerevisiae*." *Yeast* 19 (5): 403–22. doi:10.1002/yea.843.
- Coluccio, Alison, Edith Bogengruber, Michael N. Conrad, Michael E. Dresser, Peter Briza, and Aaron M. Neiman. 2004. "Morphogenetic Pathway of Spore Wall Assembly in *Saccharomyces Cerevisiae*." *Eukaryotic Cell* 3 (6): 1464–75. doi:10.1128/EC.3.6.1464-1475.2004.
- Coluccio, Alison E, Rachael K Rodriguez, Maurice J Kernan, and Aaron M Neiman. 2008. "The Yeast Spore Wall Enables Spores to Survive Passage through the Digestive Tract of *Drosophila*." *PLoS ONE* 3 (8). doi:10.1371/journal.pone.0002873.
- Diamond, Aviva E, Jae-Sook Park, Ichiro Inoue, Hiroyuki Tachikawa, and Aaron M Neiman. 2009. "The Anaphase Promoting Complex Targeting Subunit Ama1 Links Meiotic Exit to Cytokinesis during Sporulation in *Saccharomyces Cerevisiae*." *Molecular Biology of the Cell* 20 (1): 134–45. doi:10.1091/mbc.E08-06-0615.
- Enyenihi, Akon H, and William S Saunders. 2003. "Large-Scale Functional Genomic Analysis of Sporulation and Meiosis in *Saccharomyces Cerevisiae*." *Genetics* 163 (1): 47–54. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12586695>.
- Heasley, Lydia R, and Michael A McMurray. 2016. "Roles of Septins in Prospore Membrane Morphogenesis and Spore Wall Assembly in *Saccharomyces Cerevisiae*." *Molecular Biology of the Cell* 27 (3): 442–50. doi:10.1091/mbc.E15-10-0721.
- Hurley, James H, and Phyllis I Hanson. 2010. "Membrane Budding and Scission by the ESCRT Machinery: It's All in the Neck." *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 11 (8): 556–66. doi:10.1038/nrm2937.
- Knop, Michael, and Katrin Strasser. 2000. "Role of the Spindle Pole Body of Yeast in Mediating Assembly of the Prospore Membrane during Meiosis." *The EMBO Journal* 19 (14): 3657–67.
- Lam, Chien, Ethan Santore, Elizabeth Lavoie, Leor Needleman, Nicholas Fiacco, Carey Kim, and Aaron M Neiman. 2014. "A Visual Screen of Protein Localization during Sporulation Identifies New Components of Prospore Membrane-Associated Complexes in Budding Yeast." *Eukaryotic Cell* 13 (3): 383–91. doi:10.1128/EC.00333-13.

- Liu, Song, Kirilee A. Wilson, Travis Rice-stitt, Aaron M. Neiman, and James A. Mcnew. 2007. "In Vitro Fusion Catalyzed by the Sporulation-Specific T-sNARE Light-Chain Spo20p Is Stimulated by Phosphatidic Acid." *Traffic* 8 (11): 1630–43. doi:10.1111/j.1600-0854.2007.00628.x.
- Maier, Peter, Nicole Rathfelder, Martin G Finkbeiner, Christof Taxis, Massimiliano Mazza, Sophie Le Panse, Rosine Haguenaue-Tsapis, and Michael Knop. 2007. "Cytokinesis in Yeast Meiosis Depends on the Regulated Removal of Ssp1p from the Prospore Membrane." *The EMBO Journal* 26 (7): 1843–52. doi:10.1038/sj.emboj.7601621.
- Maier, Peter, Nicole Rathfelder, Celine I Maeder, Julien Colombelli, Ernst H K Stelzer, and Michael Knop. 2008. "The SpoMBe Pathway Drives Membrane Bending Necessary for Cytokinesis and Spore Formation in Yeast Meiosis." *The EMBO Journal* 27 (18): 2363–74. doi:10.1038/emboj.2008.168.
- Marston, Adele L, Wai-Hong Tham, Hiral Shah, and Angelika Amon. 2004. "A Genome-Wide Screen Identifies Genes Required for Centromeric Cohesion." *Science (New York, N.Y.)* 303 (5662): 1367–70. doi:10.1126/science.1094220.
- Mathieson, Erin M, Cindi Schwartz, and Aaron M Neiman. 2010. "Membrane Assembly Modulates the Stability of the Meiotic Spindle-Pole Body." *Journal of Cell Science* 123 (Pt 14): 2481–90. doi:10.1242/jcs.062794.
- Mathieson, Erin M, Yasuyuki Suda, Mark Nickas, Brian Snyderman, Trisha N Davis, Eric G D Muller, and Aaron M Neiman. 2010. "Vesicle Docking to the Spindle Pole Body Is Necessary to Recruit the Exocyst during Membrane Formation in *Saccharomyces Cerevisiae*." *Molecular Biology of the Cell* 21 (21): 3693–3707. doi:10.1091/mbc.E10-07-0563.
- Mendonsa, Rima, and JoAnne Engebrecht. 2009. "Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate and Phospholipase D-Generated Phosphatidic Acid Specify SNARE-Mediated Vesicle Fusion for Prospore Membrane Formation." *Eukaryotic Cell* 8 (8): 1094–1105. doi:10.1128/EC.00076-09.
- Moreno-borchart, Alexandra C, Katrin Strasser, Martin G Finkbeiner, Anna Shevchenko, Andrej Shevchenko, and Michael Knop. 2001. "Prospore Membrane Formation Linked to the Leading Edge Protein (LEP) Coat Assembly." *The EMBO Journal* 20 (24): 6946–57.
- Nakanishi, Hideki, Pablo de los Santos, and Aaron M Neiman. 2004. "Positive and Negative Regulation of a SNARE Protein by Control of Intracellular Localization." *Molecular Biology of the Cell* 15 (4): 1802–15. doi:10.1091/mbc.E03-11-0798.
- Nakanishi, Hideki, Masayo Morishita, Cindi L Schwartz, Alison Coluccio, JoAnne Engebrecht, and Aaron M Neiman. 2006. "Phospholipase D and the SNARE Sso1p Are

- Necessary for Vesicle Fusion during Sporulation in Yeast.” *Journal of Cell Science* 119 (Pt 7): 1406–15. doi:10.1242/jcs.02841.
- Nakanishi, Hideki, Yasuyuki Suda, and Aaron M Neiman. 2007. “Erv14 Family Cargo Receptors Are Necessary for ER Exit during Sporulation in *Saccharomyces Cerevisiae*.” *Journal of Cell Science* 120 (5): 908–16. doi:10.1242/jcs.03405.
- Neiman, Aaron M. 2005. “Ascospore Formation in the Yeast *Saccharomyces Cerevisiae*.” *Microbiology and Molecular Biology Review* 69 (4): 565–84. doi:10.1128/MMBR.69.4.565.
- Neiman, Aaron M. 1998. “Prospore Membrane Formation Defines a Developmentally Regulated Branch of the Secretory Pathway in Yeast.” *Journal of Cell Biology* 140 (1): 29–37. doi:10.1083/jcb.140.1.29.
- Neiman, Aaron M., Luba Katz, and Patrick J. Brennwald. 2000. “Identification of Domains Required for Developmentally Regulated SNARE Function in *Saccharomyces Cerevisiae*.” *Genetics* 155 (4): 1643–55.
- Nickas, Mark E., and Aaron M. Neiman. 2002. “Ady3p Links Spindle Pole Body Function to Spore Wall Synthesis in *Saccharomyces Cerevisiae*.” *Genetics* 160 (4): 1439–50.
- Nickas, Mark E., Cindi Schwartz, and Aaron M. Neiman. 2003. “Ady4p and Spo74p Are Components of the Meiotic Spindle Pole Body That Promote Growth of the Prospore Membrane in *Saccharomyces Cerevisiae*.” *Eukaryotic Cell* 2 (3): 431–45. doi:10.1128/EC.2.3.431-445.2003.
- Onishi, Masayuki, Takako Koga, Aiko Hirata, Taro Nakamura, Haruhiko Asakawa, Chikashi Shimoda, Hiroyuki Tachikawa, John R Pringle, and Yasuhisa Fukui. 2010. “Role of Septins in the Orientation of Forespore Membrane Extension during Sporulation in Fission Yeast.” *Molecular and Cellular Biology* 30 (8): 2057–74. doi:10.1128/MCB.01529-09.
- Park, Jae-sook, and Aaron M Neiman. 2012. “VPS13 Regulates Membrane Morphogenesis during Sporulation in *Saccharomyces Cerevisiae*,” 3004–11. doi:10.1242/jcs.105114.
- Park, Jae-sook, Yuuya Okumura, Hiroyuki Tachikawa, and M Neiman. 2013. “SPO71 Encodes a Developmental Stage-Specific Partner for Vps13 in *Saccharomyces Cerevisiae*” 12 (11): 1530–37. doi:10.1128/EC.00239-13.
- Parodi, Emily M., Crystal S. Baker, Cayla Tetzlaff, Sasha Villahermosa, and Linda S. Huang. 2012. “Spo71 Mediates Prospore Membrane Size and Maturation in *Saccharomyces Cerevisiae*.” *Eukaryotic Cell* 11 (10): 1191–1200. doi:10.1128/EC.00076-12.
- Patel, Pryank, Richard Harris, Stella M. Geddes, Eugen Matthias Strehle, James D. Watson, Rumaisa Bashir, Katharine Bushby, Paul C. Driscoll, and Nicholas H. Keep.

2008. "Solution Structure of the Inner DysF Domain of Myoferlin and Implications for Limb Girdle Muscular Dystrophy Type 2B." *Journal of Molecular Biology* 379 (5): 981–90. doi:10.1016/j.jmb.2008.04.046.
- Rabitsch, Kirsten P., Attila Tóth, Marta Gálová, Alexander Schleiffer, Gotthold Schaffner, Elisabeth Aigner, Christian Rupp, et al. 2001. "A Screen for Genes Required for Meiosis and Spore Formation Based on Whole-Genome Expression." *Current Biology* 11 (13): 1001–9. doi:10.1016/S0960-9822(01)00274-3.
- Rudge, Simon A., Andrew J. Morris, and JoAnne Engebrecht. 1998. "Relocalization of Phospholipase D Activity Mediates Membrane Formation during Meiosis." *Journal of Cell Biology* 140 (1): 81–90. doi:10.1083/jcb.140.1.81.
- Rudge, Simon A., Chun Zhou, and JoAnne Engebrecht. 2002. "Differential Regulation of *Saccharomyces Cerevisiae* Phospholipase D in Sporulation and Sec14-Independent Secretion." *Genetics* 160 (4): 1353–61.
- Rudge, Simon a, Vicki a Sciorra, Michelle Iwamoto, Chun Zhou, Thomas Strahl, Andrew J Morris, Jeremy Thorner, and JoAnne Engebrecht. 2004. "Roles of Phosphoinositides and of Spo14p (Phospholipase D)-Generated Phosphatidic Acid during Yeast Sporulation." *Molecular Biology of the Cell* 15 (1): 207–18. doi:10.1091/mbc.E03-04-0245.
- Sula, Altin, Ambrose R Cole, Corin Yeats, Christine Orengo, and Nicholas H Keep. 2014. "Crystal Structures of the Human Dysferlin Inner DysF Domain." *BMC Structural Biology* 14 (1): 3. doi:10.1186/1472-6807-14-3.
- Tachikawa, Hiroyuki, Andrew Bloecher, Kelly Tatchell, and Aaron M. Neiman. 2001. "A Gip1p-Glc7p Phosphatase Complex Regulates Septin Organization and Spore Wall Formation." *Journal of Cell Biology* 155 (5): 797–808. doi:10.1083/jcb.200107008.