

論文内容の要旨

応用生命化学専攻
平成 27 年度博士課程進学
氏 名 中村 毅
指導教員名 東原 和成

論文題目

出芽酵母における脂質代謝制御およびプロテインホスファターゼの局在制御を介した
前孢子膜伸長の分子機構の研究

背景および目的

真核生物の細胞および内部のオルガネラは生体膜で形作られている。生体膜は境界として内と外を仕切ることに加えて、袋状の構造体として特有の形態を形成して機能する。形態形成の異常はある種の神経疾患やがんに関連するため、膜構造体が機能を果たすためには適切な形態をとることが重要である。しかしながら、形態を制御する分子機構には未だ不明な点が多く、モデルを用いた体系的研究が求められている。出芽酵母の孢子形成の過程で形成される前孢子膜は、輸送小胞の融合により新規に合成され、形態変化を経て成熟する。そのため前孢子膜の形成過程は、生体膜形成のモデルとして捉えることができる。

出芽酵母の二倍体は栄養飢餓条件になると、第一・第二減数分裂を経て、細胞内に4つの一倍体孢子を形成する。この過程で、紡錘極体 (SPB) の細胞質側に輸送小胞が集合し、互いに融合することで、前孢子膜の形成が開始する。その後、前孢子膜は核やオルガネラを包み込みながら、小さな球状からカシューナッツ状に伸長した後に、開口部が閉鎖して大きな球状に変形する。閉鎖により生じた膜間に孢子壁が形成され孢子が完成する。

当研究室において、前孢子膜の伸長に異常をきたす変異株のスクリーニングが行われ、それまで知られていた *vps13Δ* に加えて、*spo73Δ*、*spo71Δ*、および *gip1Δ* が取得された。*Spo73*、*Spo71*、*Vps13* の3タンパク質は SSV 複合体を形成して機能することが提唱されているものの、前孢子膜伸長に寄与する分子機構は未だ不明である。*spo73Δ* のさらなる解析により、孢子形成能を部分的に回復するマルチコピーサプレッサーとして、細胞膜上で PI4P を生成する PI4K 複合体の遺伝子 (*STT4* の遺伝子断片 および *EFR3*) が取得されたことから、前孢子膜の伸長と PI4P の関連が示唆されていた。

また、*Gip1* は1型プロテインホスファターゼ (PP1) の孢子形成時特異的な調節サブユニットで、触媒サブユニットの *Glc7* とともに前孢子膜伸長に寄与する。*Gip1* は前孢子膜の形成過程にともないその局在をダイナミックに変化させるが、局在を制御する分子機構や

脱リン酸化の標的タンパク質については示唆的なデータしか得られていなかった。

このように、前孢子膜形成の分子機構には未だ不明な点が多い。そこで本研究では、(1) マルチコピーサプレッサーによる *spo73Δ* の孢子形成能の部分的な回復 (サプレッション) の分子機構、(2) Gip1 の局在を制御する分子機構の2点を明らかにし、生体膜の形態制御に関する新たな知見を得ることを目指した。

1. *spo73Δ* のマルチコピーサプレッサーの解析

spo73Δ のマルチコピーサプレッサーとして PI4K 複合体の遺伝子が取得されたので、孢子形成時の PI4K 複合体の局在および PI4P の細胞内分布を観察した。その結果、PI4K 複合体は前孢子膜に局在し、Efr3 は発現量によって局在パターンが変化することが示された。また、マーカーを用いた観察から、前孢子膜は PI4P に富んだ膜構造であることが示された。

続いて、マルチコピーサプレッサーの各種欠失変異体を用いて、Stt4frag および Efr3 のどの領域がサプレッションに重要であるかを解析した。その結果、どちらも PI4K 複合体タンパク質の Ypp1 と結合する領域が重要であることが示された。また、Stt4frag がキナーゼドメインを欠失したN末端断片であることに着目し、Stt4 のキナーゼ活性とサプレッションの関係を検討した。その結果、野生型ではなくキナーゼ不活性型 Stt4 の過剰発現によりサプレッションが見られた。一方で、発現量による Efr3 の局在パターンの変化に着目し、Efr3 を過剰発現させたときの Stt4 の局在を解析したところ、前孢子膜ではなく細胞膜に局在するようになることが示された。これらの結果から、マルチコピーサプレッサーは前孢子膜上の PI4K 複合体の機能を阻害することでサプレッションを起こすことが示唆された。そこで、*spo73Δ* において孢子形成時特異的に Stt4 の発現を抑制したところ、実際にサプレッションが見られた。さらに、前孢子膜の周長を計測した結果、サプレッションの過程で前孢子膜伸長が回復していることが示された。

以上より、前孢子膜上の Stt4 の機能を阻害すると、PI4P 量が増加しなくなることが予想された。そこで、前孢子膜上の PI4P 量とサプレッションが関連するのかを検討するために、PI4P 4-ホスファターゼ Sac1 の触媒ドメイン (Sac1-P) を用いて、前孢子膜上の PI4P 量の選択的な減少を試みた。その結果、ホスファターゼ活性型の Sac1-P と前孢子膜マーカータンパク質のキメラタンパク質を過剰発現させることで、*spo73Δ* においてサプレッションが見られた。しかしながら、既存の PI4P マーカータンパク質である GFP-2×PH^{Osh2} を用いた解析では、Sac1-P による前孢子膜上の PI4P 量の減少を検出することはできなかった。そこで、新たな PI4P マーカーとして、前孢子膜とゴルジ体それぞれの PI4P を認識する PH^{Osh2} と P4M-SidM を融合した GFP-Osh2-P4M キメラタンパク質を作製した。この GFP-Osh2-P4M は栄養増殖時には GFP-2×PH^{Osh2} と同様の局在を示す一方で、孢子形成時には前孢子膜とゴルジ体の両方に局在した。さらに、GFP-Osh2-P4M の局在を観察することで、Sac1-P キメラタンパク質による前孢子膜上の PI4P 量の減少を検出することに成功した。また、野生株と *spo73Δ* の比較から、*spo73Δ* では前孢子膜上の PI4P 量が増加してい

る可能性が示された。

ここまでの結果から、*spo73Δ* では PI4P の代謝に異常をきたしている可能性が示唆された。そこで、他の PI4K および PI4P 4-ホスファターゼの局在を観察したが、野生株と *spo73Δ* の間で差を見出すことができなかった。また、他のホスホイノチシドの分布を観察したところ、前孢子膜への分布が見られなかったことから、前孢子膜伸長には PI4P の寄与が大きいことが示された。したがって、*spo73Δ* のサプレッションの全貌の解明には PI4P の量の変化によって機能や局在が変わる因子を同定する必要があることが示された。

2. *spo73Δ* の表現型の詳細な解析および PI4P 量の変化の影響を受ける因子の探索

spo73Δ のサプレッションの分子機構を解明するために、*spo73Δ* の表現型を詳細に解析した。まず、前孢子膜形成と小胞輸送の関連に着目し、エンドソームに局在するタンパク質を観察したところ、一部のタンパク質が前孢子膜に局在することが示された。さらに、Kex2 や、栄養増殖時に細胞膜に局在していた Snc1 (Snc1 [P_{TDH3}])は、野生株の伸長している前孢子膜には局在しないのに対し、*spo73Δ* では前孢子膜に局在した。また、Kex2 や Snc1 [P_{TDH3}] の局在変化は他の前孢子膜伸長不全を示す変異株でも見られたことから、前孢子膜からエンドソームへの輸送経路が存在することが示唆された。加えて、前孢子膜が伸長できない細胞ではこの経路に異常をきたしていることが示唆された。

PI4P は小胞体-細胞膜接触部位における脂質交換に関与することから、前孢子膜上の PI4P 量を減少させることで脂質の輸送に変化が生じることが予想される。そこで、この接触部位の形成を担う Ist2 や Tcb3 の局在を観察したところ、野生株では前孢子膜近傍に局在していた。すなわち、小胞体-前孢子膜接触部位が形成されていることが示唆された。一方で *spo73Δ* では、Ist2 は前孢子膜近傍に局在しない、あるいは子囊細胞質側から近接していることが示された。これらの結果から、*spo73Δ* では小胞体-前孢子膜接触部位の形成に異常をきたしている可能性が示された。

SSV 複合体タンパク質のうち、Spo71 と Vps13 はどちらも脂質と相互作用するため、Sac1-P キメラタンパク質を発現させることにより Spo71、Vps13 とサプレッションの関係を検討した。その結果、*spo71Δ* および *spo71Δ spo73Δ* ではサプレッションが見られたことから、Spo71 は *spo73Δ* のサプレッションに寄与しないことが示された。一方で、*vps13Δ* ではサプレッションが見られず、Vps13 を過剰発現させると Sac1-P キメラタンパク質による *spo73Δ* のサプレッションの効率が上昇することから、Vps13 がサプレッションの中心的役割を担う可能性が示された。また、野生株と *spo73Δ* のどちらにおいても Vps13 は前孢子膜に局在することから、PI4P 量の減少は Vps13 の機能に影響する可能性が示された。

3. Gip1 の局在機構の解析および脱リン酸化のターゲットの探索

Gip1 は PP1 の孢子形成時特異的な調節サブユニットで、前孢子膜の形成過程にともないその局在をダイナミックに変化させる。そこで、各種マーカータンパク質を用いて Gip1

の局在を詳細に解析した結果、Gip1 は SPB、前孢子膜 (小さな球状)、セプチン構造、前孢子膜 (大きな球状)、核へとその局在を変化させることが示された。

Gip1 の局在を制御する分子機構を明らかにするために、Gip1 の欠失変異体シリーズを解析した。その結果、孢子形成に必要な領域は C 末端の 477–589 残基であることが示された。また局在を観察すると、N 末端側が前孢子膜やセプチン構造への局在を、C 末端側が SPB への局在を、中央部分が核への局在をそれぞれ制御していることが示唆された。

次に、欠失変異体の解析から得られた局在を制御する領域について詳細に解析した。その結果、Gip1 は N 末端領域の両親媒性ヘリックスを介して前孢子膜に、ヘリックスに隣接する 133–222 残基の領域でセプチン構造に、複数の核局在シグナル、特に 231–232 残基を介して核に、C 末端領域の Ady4 との結合を介して SPB に局在することが示された。

N 末端領域が前孢子膜への局在を制御する一方で、C 末端領域が孢子形成に必要であることから、局在化シグナルと孢子形成における機能が分離できるかを検討した。その結果、Glc7 との結合に必要な VRF 領域を含む C 末端領域が前孢子膜に局在することが Gip1 の機能に十分であることが示された。

前孢子膜の伸長不全を示す変異株のうち、Spo73–Spo71–Vps13 は SSV 複合体を形成して機能する。そこで、SSV 複合体タンパク質と Gip1 との関係について検討した。その結果、*gip1Δ* と *spo73Δ* あるいは *vps13Δ* の二重破壊株では前孢子膜が相加的に小さくなることなどから、SSV 複合体と Gip1–Glc7 は独立に前孢子膜伸長に関与することが示された。

総括

本研究では、前孢子膜上の PI4P 量を減少させることで *spo73Δ* のサプレッションが起きることを明らかにし、PI4P 量の減少が Vps13 の機能に影響を与える可能性を示した。また、Gip1 がダイナミックに局在を変化させる分子機構を明らかにし、C 末端の領域を介して脱リン酸化の基質を認識する可能性を示した。今後の課題としては、PI4P の下流で働く因子と Gip1–Glc7 の脱リン酸化の標的タンパク質を明らかにすることであり、Bio ID などの手法を用いて網羅的に解析することで、生体膜形成の分子機構の理解が深まることが期待される。

発表論文

[Nakamura, T.S.](#), Numajiri, Y., Okumura, Y., Hidaka, J., Tanaka, T., Inoue, I., Suda, Y., Takahashi, T., Nakanishi, H., Gao, X.D., Neiman, A.N., and 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.

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, e00038-15.