

出芽酵母前孢子膜形成におけるメンブレンコンタクトサイトの役割

舘川 宏之

東京大学大学院 農学生命科学研究科

研究成果

出芽酵母の細胞内新規膜形成の過程である前孢子膜形成時に、小胞体と前孢子膜間でメンブレンコンタクトサイト(MCS)が形成され、複数のタンパク質が協調的に働いて膜のリン脂質を制御し、膜の伸長に重要な役割を果たすことを示した。

研究の目的

近年、細胞内においてオルガネラや細胞膜の膜同士は近接して MCS を形成し、その間で脂質等のやりとりが行われていることが明らかにされている。我々は、出芽酵母の前孢子膜形成を、細胞内における新規生体膜形成のモデルとして研究してきており¹⁾²⁾、この過程において MCS 関連タンパク質(Vps13)とその孢子形成時特異的な結合タンパク質 Spo71 そして Spo73 が前孢子膜上に共に局在し膜の伸長に必須な役割を果たすこと明らかにしてきた³⁾⁴⁾。さらに、前孢子膜上の phosphatidylinositol 4-phosphate (PI4P)を減少させることによって *spo73* 破壊株における前孢子膜の伸長停止が回復することを示し、リン脂質の制御の重要性を明らかにしている。細胞膜上の PI4P のレベルは tether タンパク質を介した小胞体との MCS によって下げられることが知られており⁵⁾、我々は、前孢子膜と小胞体との間にも MCS が形成されてリン脂質の制御が行われ、その下流で膜脂質の供給と膜伸長が起こるといふ仮説を立てている。本研究では、出芽酵母前孢子膜伸長時の MCS の存在を確認し、その役割を明らかにすることを目的とし、これらを通して細胞内新規膜形成の分子機構に迫ることを目指す。

出芽酵母は、幅広く産業利用されており、酵母を自在に操るためにも、その孢子形成の全貌を明らかにすることは重要であると考えられる。

方法

細胞膜と小胞体の間で MCS を形成する tether タンパク質は7つ報告されており、それらに GFP もしくは GFPEnvy タグを付加し、前孢子膜マーカーである Spo20⁵¹⁻⁹¹-mKate2 と共に、野生株、*spo73* 破壊株、*spo71* 破壊株、*vps13* 破壊株で発現させ、孢子形成時に蛍光顕微鏡観察を行なった。

Split-GFP 法による解析を行った。tether タンパク質の一つである Tcb3 に GFPstrand 11 を、前孢子膜の膜タンパク質である Dtr1 に GFPstrand1-10 をそれぞれ融合して同時に発現させ、孢子形成時における GFP の蛍光を、前孢子膜マーカーと共に観察した。

結果

細胞膜と小胞体の中で MCS を形成する tether タンパク質のうち代表的なものについて、胞子形成時における細胞内局在を観察した。その結果、野生株においては、tether タンパク質はいずれも前胞子膜マーカーと共局在し (図 1 左)、tether タンパク質が前胞子膜に局在することが強く示唆された。これに対して、*spo73* 破壊株 (図 1 右)、*spo71* 破壊株、*vps13* 破壊株においては、共局在が見られず、これらの遺伝子が tether タンパク質の前胞子膜への局在化に必要であることが示された。

また、tether タンパク質の前胞子膜への局在をさらに確認するため、Split-GFP 法を用いて、小胞体膜貫通領域をもつ tether タンパク質である Tcb3 が前胞子膜の膜貫通タンパク質 Dtr1 の近傍に存在するかを調べた。その結果、前胞子膜上に GFP の蛍光が観察され、Dtr1 と Tcb3 が互いに近傍に存在することが確認された。以上より、小胞体と PSM の間に MCS が形成されていることが明らかになった。

結論

出芽酵母前胞子膜形成において、栄養増殖時には細胞膜と小胞体間の MCS を形成する tether タンパク質が、Vps13, Spo71, Spo73 によって前胞子膜上にリクルートされて、前胞子膜と小胞体間の MCS を形成し、おそらく前胞子膜上の PI4P のレベルを調節することにより、膜の伸長に寄与することが示された。細胞内における新規膜構造形成の分子機構に迫る重要な知見を得ることができた。

文献

- 1) Tachikawa H, Bloecher A, Tatchell K, Neiman AM. (2001) Gip1p-Glc7p phosphatase complex regulates septin organization and spore wall formation. *J. Cell Biol.* **155**: 797-808
- 2) Nakamura TS, et al. (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
- 3) Park JS, Okumura Y, Tachikawa H, Neiman AM (2013) *SPO71* encodes a developmental stage-specific partner for Vps13 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic Cell* **12**(11): 1530-1537
- 4) Okumura Y, et al. (2016) The Dysferlin domain-only protein, Spo73, is required for prospore membrane extension in *Saccharomyces cerevisiae* *mSphere* **1**(1): 00038-15
- 5) Manford AG et al. (2012) ER-to-plasma membrane tethering proteins regulate cell signaling and ER morphology. *Dev. Cell* **23**(6) 1129-1140

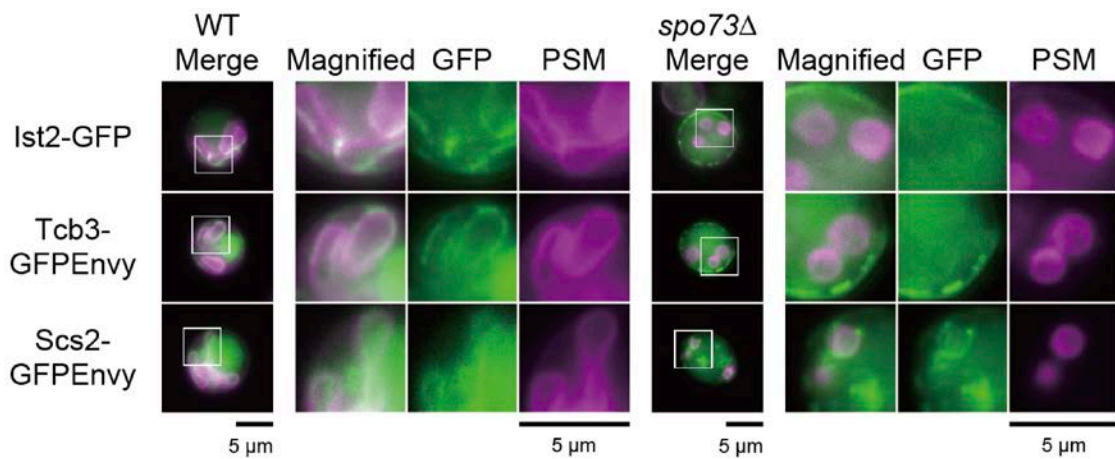


図1 tether タンパク質の胞子形成時における局在と Spo73 との関係
 野生株(WT)と *spo73*破壊株における、Ist2, Tcb3, Scs2 の胞子形成条件下における
 細胞内局在を前胞子膜マーカー(PSM)と比較して観察した。

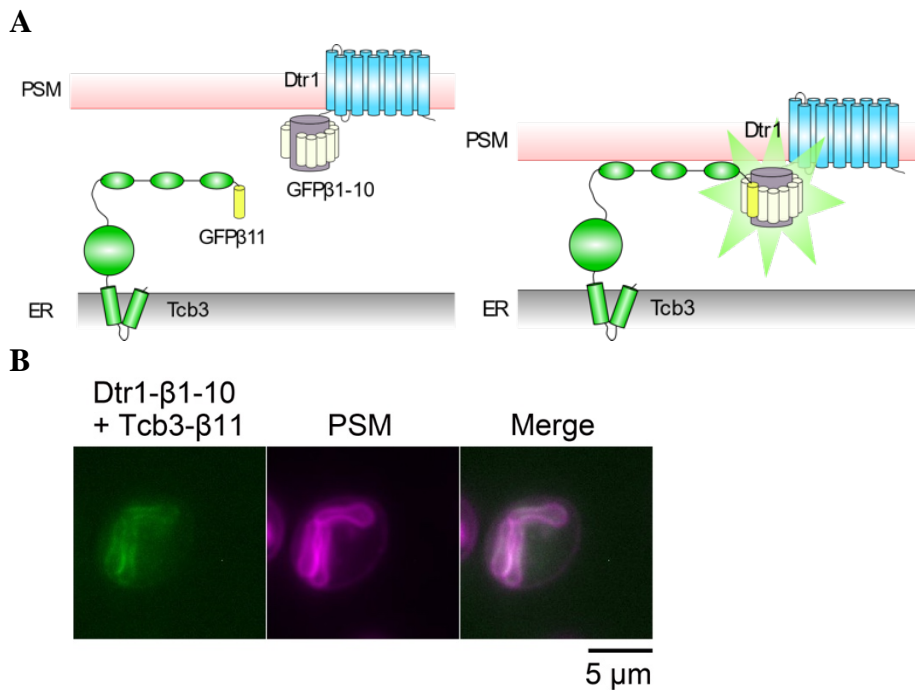


図2 Split-GFP 法を用いた前胞子膜と小胞体間の MCS の可視化
 A Split-GFP 法の模式図。Tcb3 と Dtr1 が近接している場合のみ GFP の蛍光が観察
 される。B 胞子形成時における GFP の蛍光を前胞子膜マーカーと合わせて観察した。