

ゲノム規模で単離した分裂酵母の胞子形成必須遺伝子産物の時間・空間配置の解析

●下田 親 ◆中村太郎

大阪市立大学大学院理学研究科

＜研究の目的と進め方＞

分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* は分子生物学や細胞生物学でよく用いられているモデル真核微生物である。 *S. pombe* のゲノムプロジェクトは数年前に終了しており、約4800個の遺伝子しか持たない事が明らかになった。分裂酵母はハプロイドで生育するが、窒素源が枯渇すると増殖を停止し、接合により二倍体化した後、減数分裂と胞子形成を行なう。胞子形成過程は高等生物と共通する減数分裂による核の分裂と、核を取り囲むように構築される前胞子膜（胞子の細胞膜）の形成過程からなる。胞子形成過程は二倍体母細胞の細胞質内で新たに細胞膜が形成されるという点できわめて興味深い生命過程といえる。また、ゲノム規模で遺伝子発現がドラスティックに変化する典型的な細胞分化過程と考えられており、優れたモデル系として注目されてきた。

細胞の構造、機能上の分化を分子レベルで解明することは重要な課題である。本研究の目的は分裂酵母における胞子形成に必須の遺伝子をゲノム規模で単離同定し、産物の時間的、空間的配置を明らかにすることにより、胞子形成という細胞形態形成過程の統一的な理解に到達することである。これまで申請者の研究グループでは胞子形成が欠損した多数の突然変異株を単離し、その原因遺伝子をクローニングしてきた。本プロジェクトではさらに多様な手段により、胞子形成必須遺伝子をゲノム規模で組織的に単離する。胞子形成必須遺伝子を全遺伝子の約5%と想定し、200～250個の単離を目指した。つぎに、分裂酵母のゲノムデータベース情報を利用してタンパク質を同定する。さらに、エピトープタグとGFP(緑色蛍光タンパク質)タグをつけた融合遺伝子を用い、胞子形成過程での遺伝子産物の発現時期と細胞内局在場所を決定する。これらの情報を統合することにより、増殖停止から、減数分裂を経て胞子形成へと至る細胞のシステム変換の動態をミクロとマクロの両視点から捉えることができる。

＜研究開始時の研究計画＞

1. 胞子形成欠損変異株の単離と性格付け：
コロニー染色法による胞子形成欠損変異株の取得を継続して行なう。また、条件致死変異株のプールより、胞子形成欠損変異株を顕微鏡観察により取得する。これらの変異株の停止段階と形態異常を位相差顕微鏡、蛍光顕微鏡 (DAPI染色、細胞骨格の抗体染色)、電子顕微鏡により観察する。
2. 胞子形成必須遺伝子のクローニングとその産物の同定：
機能相補を利用して、ゲノム (cDNA) ライブラリーより原因遺伝子をクローニングする。挿入断片の両端の塩基配列を決定し、分裂酵母ゲノムデータベースに照合することにより、全塩基配列を得る。サブクローニング等によりORFを決定し、タンパク質の情報(モチーフ、ホモロジー等)を得る。
3. 胞子膜タンパク質のMSフィンガープリンティングによる同定：

胞子を破壊し、胞子壁画分を得る。SDS/PAGEにより構成タンパク質を純化し、トリプシン処理後、マスマスペクトロメトリーにかける。得られたペプチドの分子量データよりタンパク質を同定する。

4. 単離遺伝子へのGFPおよびエピトープのタグgingと染色体への組みこみ：
単離したすべての遺伝子をGFPおよびその誘導体やエピトープタグとの融合遺伝子をプラスミド上に構築する(構築用ベクターは既に利用可能である)。次に、定法により染色体に組みこんだ株を作成する。
5. 同調的胞子形成培養を利用した遺伝子発現時期の同定：
pat1温度感受性変異を利用した温度シフト法により胞子形成を同調的に進める。経時的にRNA標品をとり、各遺伝子をプローブとしてノザン分析を行なう。
6. エピトープ融合タンパク質のウエスタン分析：
エピトープタグgingした株を上記と同様の同調培養を行なう。経時的にタンパク質標品をとり、エピトープタグに対するモノクローナル抗体を用いてウエスタン分析を行なう。
7. GFP融合タンパク質の細胞内局在の観察：
GFP融合遺伝子を持つ株を上記と同様の方法により同調的に胞子形成培養を行なう。GFP蛍光を顕微鏡観察し、シグナルの見られる時期と細胞内構造を明らかにする。
8. 情報の統合化とモデルの構築：
これらの解析により得られたすべての情報を整理し、胞子形成に必須の各タンパク質が、胞子形成過程のどの時期に出現し、細胞内のどこに局在するかを明らかにする。これらの情報をもとに分裂酵母における胞子形成のモデルを提案する。

＜研究期間の成果＞

1. 胞子形成欠損変異株の単離と性格付け：
・胞子形成欠損変異株として既に同定されていた20個の変異株のうち、未解析のspo7, spo9について調べた。
・子嚢あたり2個の二倍体胞子を作るgis変異株を多数単離し、遺伝解析により4個の新規胞子形成遺伝子を同定した。
・高温感受性 (ts) 変異株プールから胞子形成に欠損を示す多数の変異株 (sev) を単離し、遺伝解析により5個の新規遺伝子を同定した (文献3,11)。
・胞子形成条件で発現が誘導される遺伝子について、遺伝子破壊をおこない、形質を調べた。
・これらの未解析遺伝子群のクローニングと遺伝子解析については、以下の2で述べる。
2. 胞子形成必須遺伝子のクローニングとその産物の同定：
上記成果で述べた変異株を用い各変異形質を相補するDNA断片をクローニングし、spo7, spo9, gis1-gis3, sev1-sev5などを単離した。遺伝子産物を同定したとこ

ろ、これらの中には第二減数分裂に必須のCdc7様のプロテインキナーゼSpo4とその調節サブユニットSpo6 (文献12)、前胞子膜に局在するSpo3, Psy1、小胞輸送に関与するSpo14, Spo20 (文献8)、スピンドル極体構成タンパク質Spo2, Spo13, Spo15、新規のAPC制御因子Fzr1、新規の核膜局在タンパク質Spo21、RNA結合タンパク質Spo5、HECT型ユビキチンリガーゼPub2、PI3(P)5キナーゼSte12 (文献1)、ADAMファミリーメタロプロテアーゼMde10 (文献7)、DNA複製に必須のSev1/Cdt2 (文献3)、Sev4/Cta4カルシウム輸送P-type ATPase (文献11)、ファルネシル二リン酸合成酵素Spo9などが含まれていた。

3. 胞子膜タンパク質のMSフィンガープリンティングによる同定:

胞子壁主要タンパク質p23を精製し、MSフィンガープリンティング法を行ったが、同定に至らなかった。そこで、ペプチド断片の部分アミノ酸配列を決定した。この配列を基に分裂酵母ゲノムデータベースをサーチし、isp3遺伝子産物であることを明らかにした。isp3遺伝子は減数分裂過程で転写誘導される遺伝子として既に報告されている。遺伝子破壊株を作成し、変異形質を調べたが、特に顕著な胞子形成欠損形質は示さなかった。Isp3-GFP融合タンパク質を発現させたところ胞子表層に特異的なシグナルが観察され、胞子壁主要タンパク質であることが細胞生物学的な解析からも支持された。

4-1. 単離遺伝子へのGFPおよびエピトープのタグイングと染色体への組みこみ:

上記した遺伝子にGFPを融合させ染色体に組み込み、各遺伝子産物の細胞内局在を調べた。サイトゾル、核、小胞体、細胞膜などに局在を示すタンパク質を見いだした。特に、動物細胞の中心体に相当するスピンドル極体(SPB)に局在する5個の遺伝子産物を発見し、これらのSPBへのリクルートにヒエラルキーが存在することを発見したことは重要であると考えている。これらのタンパク質のうち、Spo13がもっとも細胞質側にあり、新規に合成される前胞子膜と密に接触している事実はこのタンパク質が直接、小胞融合による前胞子膜構築の初期過程に関わっていることを示唆する。また、分裂酵母カルモジュリンであるCam1が減数分裂時にSPBに局在し、胞子形成特異的なSPB構成タンパク質であるSpo15, Spo2, Spo3のSPB局在に必須であることがわかった。また、最近、Spo7タンパク質がやはり減数分裂時のSPBに局在することも明らかになった。

4-2. cDNA/GFP融合ライブラリーによる検索:

胞子形成特異的なcDNAとGFPを融合させて構築した融合ライブラリーを発現させ、細胞の特異構造に局在するクローンを単離した。胞子形成と関連した構造への局在を示すクローンを中心に塩基配列を決定し、当該遺伝子を同定した。約2万クローンを検索し、1775個の遺伝子産物が特異的な細胞構造に局在することを認めた。

5. 同調的胞子形成培養を利用した遺伝子発現時期の同定:

分裂酵母の減数分裂特異的な転写因子として我々が見つけたMei4のターゲット遺伝子を次の方法で検索した。Mei4の認識配列GTAAACAをコアとする17塩基によりゲノムデータベースをサーチし、該当する遺伝子

を選択した。これらをクローン化し、遺伝子破壊することにより胞子形成における機能を調べた。このアプローチにより単離された主な遺伝子としてmde10に注目した。Mde10タンパク質はADAMファミリーに属するメタロプロテアーゼと考えられる。本タンパク質は胞子表層に局在する。また、遺伝子破壊株は野生型胞子が有する表面の突起構造が消失していた。胞子形成や胞子の発芽能には欠損が認められなかったが、エタノールなどの有機溶媒に対する胞子の抵抗性が失われていた (文献7)。ADAMファミリータンパク質のホモログは出芽酵母には存在していない。高等動物のADAMタンパク質の最も原初的なタンパク質として今後有用になるものと期待できる。

次に、Mei4タンパク質を通常発現していない栄養細胞で強制発現した時に、転写が高まる遺伝子をDNAマイクロアレイ解析により包括的にスクリーニングした。この結果、約100個の遺伝子で顕著な転写上昇が認められた。これらの遺伝子群の系統的な破壊を行う予定であったが、まだ一部しかできていない。そのなかで、特に注目すべき遺伝子として、Sec9が見いだされた。Sec9は酵母からヒトまで保存されているt-SNAREタンパク質で膜融合に関与することがわかっている。Sec9は必須遺伝子であるが、ランダムに突然変異を導入したライブラリーから胞子形成欠損の形質を示すものが取得でき、Sec9が前胞子膜構築に必須の役割を持つことが明らかになった (文献9)。

6. エピトープ融合タンパク質のウエスタン分析:

Spo4, Spo6, Spo2, Spo13, Spo15など主要な胞子形成必須遺伝子についてエピトープタグをつけ染色体に組み込んだ株を作成した。同調的な胞子形成培養をおこなない、ウエスタン解析を行った。ほとんどすべての遺伝子産物について、胞子形成の様々な時期に一過的に蓄積することが見いだされた。これらのパターンはノザン法やDNAマイクロアレイのデータからも予想されたことであるが、かなり急激なタンパク量の減少が見られた。胞子形成過程では液胞の酸性プロテアーゼなどの分解系が活性化することがよく知られている。このようなバルクのプロテオリシスにくわえて、ユビキチン-プロテアソーム系の関与も予想されるが、今後の課題である。

7. GFP融合タンパク質の細胞内局在の観察:

GFP融合ライブラリーのスクリーニング (上記4-2に記載) により同定された遺伝子群の中から、特に形成中の前胞子膜の伸長端に局在するタンパク質として、Act1 (アクチン)、Cam2が発見されたことに注目した。Cam2はI型ミオシンMyo1の調節軽鎖であること、myo1遺伝子破壊株が致死ではないが胞子形成不能となることがわかっているため、前胞子膜から閉じた細胞膜への形態形成過程にアクトミオシン系タンパク質が深く関わっていることが示唆された。さらに、GFP融合ライブラリーからアクトミオシン系タンパク質を選び観察したところ、前胞子膜伸長端に局在する複数のタンパク質を見いだした。

その他様々なスクリーニングにより得られた遺伝子についてもできる限りGFP融合遺伝子を染色体に組み込んだ株を作成し、蛍光シグナルを顕微鏡観察した。前胞子膜形成には膜小胞との融合が重要であるが、その中心的な機能を担う、シタキシンホモログPsy1、VAMPホモログSyb1およびSNAP-25ホモログSec9につ

いては、特に詳細に生細胞でのタイムラプス観察を含めて解析した（文献9）。第一減数分裂後にPsy1が子嚢の細胞膜から前胞子膜に劇的に局在を移す現象を発見した。Psy1変異体の解析から、この局在変化が前胞子膜形成に重要であることがわかった。また、Syb1タンパク質も同様に前胞子膜へ集合することも観察している。さらに、真核生物で高度に保存されているRab7ファミリーの低分子量GTPaseの分裂酵母ホモログYpt7についても解析した。Ypt7は液胞の機能を通して胞子形成に深く関わることを明らかにした（文献10）。

8. 情報の統合化とモデルの構築：

分裂酵母の胞子形成に必須の機能を持つ遺伝子をゲノムワイドにスクリーニングする本研究課題により多数の新規遺伝子を同定することができた。また、これらの遺伝子産物の発現時期と細胞内局在を網羅的に検討した。その結果、胞子形成という細胞分化過程における重要なプロセスを浮かび上がらせることに成功した。ポイントは次の3つである。

- 1) 胞子の細胞膜である前胞子膜の構築に必須のSPBの構造変換と関与するSPB構成タンパク質の同定。前胞子膜がSPBの近傍より形成が始まることは既によく知られていた。本研究により前胞子膜構築に必須の役割を担うSPB構成タンパク質を少なくとも5個同定することができた。
- 2) 前胞子膜構築に関与するSNAREタンパク質の役割決定と動態の解明。前胞子膜が母細胞の細胞膜で新生される際、膜小胞との融合が必須であること、t-SNAREであるPsy1タンパク質が前胞子膜前駆構造に局在を移すことの意義を明確に示した。
- 3) 新規に構築される膜コンパートメント（胞子細胞膜）の閉鎖機構の解明。伸長しつつある前胞子膜の開口部にF-アクチンから成るリング構造が存在することが強く示唆された。このリングが収縮する機構はきわめて興味深い。

これらのプロセスの分子レベルでの解明は十分ではなかったが、今後の研究の展開に必要な材料、実験系はすべて準備が整ったと考えている。

〈国内外での成果の位置づけ〉

分裂酵母の胞子形成遺伝子の包括的な解析と、遺伝子産物の時空配置の解明は一定のインパクトを与えることが出来た（文献4,6）。国際会議での数度の招待講演はかなりの反響を呼んだ。また、国際一流紙であるJ. Cell Sci.のコメンタリーに招待総説論文の寄稿を要請され、掲載された（文献6）。出芽酵母*Saccharomyces cerevisiae*でも胞子形成過程の研究が2つのグループで活発に行われている。分裂酵母と出芽酵母の研究は互いに刺激し合いながら、「細胞新生過程の分子細胞生物学」というべき新しい研究領域を生み出しつつある。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

胞子形成関連遺伝子をゲノム規模で網羅し、それらの時間空間配置を明らかにするという当初の目標は概ね達成できた。当初計画は妥当であり、特に大きな予想できない困難はなかった。しかし、200を越える遺伝子産物があるレベルまで詳細に時空配置を解析するには、もっとシステムティックな実験系を構築する必要があった。そのようなシステムを構築する努力が欠けていたことを反省し、改善を図る必要があった。

〈今後の課題〉

本研究課題では5年間の研究により200を越える胞子形成関連遺伝子をクローニングし、その産物の時空配置を概ね解明できたと考える。胞子形成の素過程に関わる遺伝子産物を分類し整理することも出来た。しかし、各プロセスを構成するタンパク質についてその構造と機能を分子レベルで解き明かすことは十分に行えなかった。例えば、SPB上での前胞子膜形成の開始機構は、研究の進展と共に主要なターゲットとなるテーマになった。SPBと前胞子膜上で減数分裂の特定の時期に集合するタンパク質を同定できた。しかし、これらのタンパク質が具体的にどのように相互作用しつつ、その機能を果たすのかという疑問について明らかに出来たことは少ない。今後は、タンパク質相互作用および生化学的な解析の深化が必要と考える。この点では転写因子Mei4を栄養細胞で過剰発現させると栄養細胞中に前胞子膜様の膜コンパートメントが形成されるという、我々の発見は、セミンヴィトロ系につながるものとして重視している。これを突破口にして、より詳細なモデルの構築につなげたい。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

1) 論文

1. 0303251408
Morishita, M., Morimoto, F., Kitamura, K., Koga, T., Fukui, Y., Maekawa, H., Yamashita, I., and Shimoda, C. Phosphatidylinositol 3-phosphate 5-kinase is required for the cellular response to nutritional starvation and mating pheromone signals in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genes Cells* 7: 199-215 (2002).
2. 0303251423
Nakamura-Kubo, M., Nakamura, T., Hirata, A., and Shimoda, C. The fission yeast *spo14+* gene encoding a functional homologue of budding yeast *Sec12* is required for the development of forespore membranes *Mol Biol Cell* 14: 1109-1124 (2003).
3. 0303251444
Yoshida, S., Al-Amadi, H., Nakamura, T., McNerny, C., and Shimoda, C. The *Schizosaccharomyces pombe* *cdt2+* gene, a target of G1-S phase-specific transcription factor complex DSC1, is required for mitotic and premeiotic DNA replication. *Genetics* 164: 881-893 (2003).
4. 0403190938
Shimoda, C., and Nakamura, T. Control of late meiosis and ascospore formation. *The Molecular Biology of Schizosaccharomyces pombe* (ed. R. Egel) Springer-Verlag Berlin (2004)
6. 0403190945
Shimoda, C., Forespore membrane assembly in yeast: coordinating SPBs and membrane trafficking. *J Cell Sci* 117: 389-396 (2004).
7. 0403190955
Nakamura, T., Abe, H., Hirata, A., and Shimoda, C. The ADAM family protein *Mde10* is essential for the development of spore envelopes in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Eukaryotic Cell* 3: 27-39 (2004).
8. 0602021210
Nakase, Y., Nakamura, T., Okazaki, K., Hirata, A., and Shimoda, C. The *Sec14* family glycerophospholipid-transfer protein is required for structural integrity of the spindle pole body during meiosis in fission yeast. *Genes*

Cells 9: 1275-1286 (2004).

9. 0602021230

Nakamura, T., Kashiwazaki, J., and Shimoda, C. A fission yeast SNAP-25 homologue, SpSec9, is essential for cytokinesis and sporulation. *Cell Struct. Funct.* 30: 15-24 (2005).

10. 0602021243

Kashiwazaki, J., Nakamura, T., Iwaki, T., Takegawa, K., and Shimoda, C. A Role for fission yeast Rab GTPase Ypt7p in sporulation. *Cell Struct. Funct.* 30: 43-49 (2005).

11. 0602021254

Yoshida, S., Nakamura, T., and Shimoda, C. The cation-transporting P-type ATPase Cta4 is required for assembly of the forespore membrane in fission yeast. *Genes and Genetic Systems* 80: 317-324 (2005).

2. その他の文献

5. 0303251455

中瀬由起子、中村太郎、下田 親: 酵母の胞子形成の現状: 細胞膜構築の原理解明をめざして. *実験医学* 21: 676-680 (2003).

12. 0602021303

中村太郎、淡路 萌、下田 親: 第二減数分裂制御にかかわる新しいCdc7/Dbf4キナーゼ複合体Spo4/Spo6. *実験医学* 23: 1410-1415 (2005).