

出芽酵母の胞子形成時における細胞内顆粒の動態解析

田口 将大 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 入江 賢児 (筑波大学 医学医療系)

【背景】

液-液相分離現象とは、タンパク質の天然変性領域 (Intrinsically disordered region: IDR) と RNA が相互作用することにより、顆粒状の凝集体を形成することである。IDR のアミノ酸変異によって生じる相分離の異常が神経変性疾患と関連していることや、その他様々な細胞レベルの生理機能を担っていることが明らかとなり、生命科学分野において注目されている現象の一つである。

真核生物の細胞内には多様な凝集体が存在する。その中でも Processing body (P body) とストレス顆粒 (以下二つを合わせて顆粒と呼ぶ。) は、翻訳抑制や RNA 分解といった翻訳レベルの遺伝子発現調節機能を担っている。顆粒は RNA や IDR を有するタンパク質によって構成されており、構成するタンパク質の中には、その構成量が動的に変動するものもある。よって生命現象に対応させて顆粒の動態を捉えることにより、翻訳レベルでの遺伝子発現調節を従来とは異なる視点で明らかにできると考えられる。

本研究では、出芽酵母の胞子形成過程に着目し、顆粒の動態を捉える。その過程の中で、*de novo* 膜形成、前胞子膜の伸長、娘染色体の囲い込み、膜の閉じ込み等を達成するには、翻訳レベルの遺伝子発現調節が必要だと考えられる。顆粒の動態解析により、胞子形成過程の顆粒による翻訳調節について明らかにしたい。

【目的】

本卒業研究を「上記目的を達成するための基礎データ収集」と位置づける。そこで、顆粒に局在するタンパク質の胞子形成時における細胞内分布を詳細に解析する。

【材料と方法】

酵母株の作製

RNA 結合タンパク質 (RBP) の細胞内分布を網羅的に解析した報告¹から顆粒に局在する RBP を 25 種類選出し、GFP コレクション (全遺伝子の 3'末に GFP 配列がタグ付けされた株) から該当する株のゲノム DNA を抽出した。それをテンプレートとし、目的の断片を PCR によって増幅した。相同組換え法により二倍体の SK1 株 [前胞子膜マーカー (mCherry-Spo20⁵¹⁻⁹¹) 導入済み] に形質転換させ、18 種類の株 (以下 TF 株) を作製した。他の 7 種類は、前胞子膜マーカー導入済みの AN117-4B 株と GFP コレクション株を交配させることによって作製した (以下 Mated 株)。

通常培養

YPD 液体培地 3 ml に各酵母を播種し、30°C で 16~17 時間培養した後、培養液 0.3 ml を YPD 液体培地 3 ml に懸濁し、さらに 3~4 時間培養したものを mid-log phase にある酵母として以下の実験を行った。

栄養増殖時における細胞内顆粒形成の誘導

mid-log phase にある酵母の培養液を YPD から SD -glucose 3 ml に交換し、30°C で 30 分間培養して栄養飢餓ストレスをかけた後に、蛍光顕微鏡で GFP シグナルを確認し、撮影した。

胞子形成の誘導

YPD 液体培地 3 ml に二倍体の酵母を懸濁し、24 時間培養した後、培養液 0.5 ml を YPA 液体培地 15 ml に懸濁し、30°C で

らに 16 時間培養した。次に培養液を 2% 酢酸カリウム培地 10 ml に交換し、培養した。約 6 時間後の第二減数分裂が開始するタイミングに合わせて、蛍光顕微鏡で GFP と mCherry のシグナルを確認し、撮影した。

蛍光顕微鏡観察と画像処理

THUNDER イメージングシステム (Leica Microsystem) を用いて観察、撮影した。撮影後 Thunder imaging system の Z-Projection (Maximum intensity projection) を行った。

【結果】

栄養飢餓によって顆粒に局在しても、胞子形成過程では顆粒に局在しない RBP もあった (図 1)。一方で胞子形成全過程を通して確認された RBP (顆粒) は前胞子膜近傍に点在した。

また Pab1 は③から④にかけて前胞子膜に沿って局在した (図 2)。

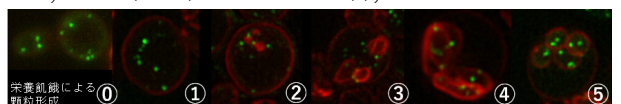
【考察と展望】

前胞子膜近傍への顆粒の点在は、胞子形成に関わる翻訳レベルの遺伝子発現調節に関わっていることが予想される。したがって、前胞子膜近傍での顆粒の内外での構成要素の動態を捉えることで、膜近傍で調節される遺伝子の特異性と調節に必要な分子メカニズムの詳細を調べていきたい。

また Pab1 の結果から前胞子膜伸長の細胞骨格として働くセプチン 2 と相互作用する可能性がある。したがってそれらを介在する詳細な分子メカニズムを明らかにしていきたい。

【参考文献】

1. Parker, R. et al. (2013) Nat. Struct. Mol. Biol. 20, 127-133
2. Neiman, A. M. (2011) Genetics 189(3), 737-765



RBP	①	②	③	④	⑤
XRN1	+	+	+	+	+
DHH1	+	+	+	+	+
DCP2	+	+	+	+	+
EDC3*	+	+	ND	+	ND
UPF1	+	+	ND	+	+
POP2	+	+	+	+	+
CCR4	+	ND	ND	ND	ND
PAT1*	+	+	ND	ND	+/-
PAB1*	+	-	-	-	-
PUB1*	+	-	-	-	-

図 1. 胞子形成過程における RBP の局在の状態

ここに示した 10 個の RBP は、選出した 25 個の中で、栄養飢餓ストレスを受けて顆粒を形成した RBP であり、それらの胞子形成時における局在の状態を、+: 顆粒が形成された、-: GFP の蛍光は確認できたが顆粒は形成されなかった、ND: GFP の蛍光が見られなかったとして表している。上の段にある画像は、Xrn1-GFP と前胞子膜マーカー (mCherry-Spo20⁵¹⁻⁹¹) を一例として示している。画像内の番号は、①: 栄養飢餓ストレスによる顆粒形成の誘導、②: 減数分裂前、③: 前胞子膜形成開始、④: 前胞子膜伸長前期、⑤: 前胞子膜伸長後期、⑤: 減数分裂完了を示している。

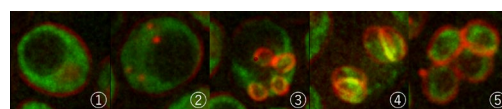


図 2. 胞子形成過程における Pab1-GFP と前胞子膜マーカーの挙動