

酵母膜マイクロドメインにおける高塩濃度ストレス応答機構と その生理的意義の解析

井沢 真吾

京都工芸繊維大学大学院工芸科学研究科応用生物学部門

概要 細胞膜には特定のタンパク質、ステロール、スフィンゴ脂質などが集合した“マイクロドメイン”と呼ばれる領域が形成されている。マイクロドメインには生理活性物質の受容体や G タンパク質などが局在する事から、シグナル伝達などにおいて重要だと考えられている。出芽酵母では Can1 や Tat2 など 22 種類のタンパク質が局在する MCC (membrane compartment of Can1) がマイクロドメインとして知られているが、そのストレス応答や機能については不明な点が多い。そこで本研究では、塩ストレスに対する MCC のストレス応答について検討した。塩ストレス条件下において、細胞膜上のアルギニントランスポーター Can1 やステロールが速やかに凝集し、肥大化したドットを形成する事を新たに見出した。肥大化ドットの形成はステロール結合性の filipin もしくはスフィンゴ脂質合成阻害剤の myriocin 処理によって強く阻害された事から、塩ストレス条件下での肥大化ドットの形成にはステロールの流動性やスフィンゴ脂質が必要であると考えられた。肥大化ドットの形成が非常に速やかに行われる事からその形成過程を time-lapse analysis で観察した結果、塩ストレス条件に移行後わずか数秒で、細胞収縮と並行して肥大化したドットが形成される様子が観察された。塩ストレス条件下での細胞膜の形態変化について透過型電子顕微鏡で解析したところ、細胞膜の深い陥入形成が確認された。一方、肥大化ドットの形成が抑制される filipin および myriocin 処理をおこなった細胞では深い陥入形成が観察されなかった。そのため、塩ストレスによる肥大化ドットの形成は、細胞膜の深い陥入形成を介して引き起こされる事が強く示唆された。肥大化ドット形成の生理的意義を明らかにするため、肥大化ドットが形成されない、もしくは形成が異常になる遺伝子欠損株の探索を行ったところ、*pil1Δ*株で極度に肥大化したドットの形成が観察された。WT と *pil1Δ*株について塩ストレス条件下での生育速度の比較を行ったが、顕著な差は見られなかった。以上の解析から、出芽酵母のマイクロドメインは塩ストレスに応答して非常にダイナミックに変化する事を明らかにし、細胞膜の陥入や肥大化 MCC の形成においてステロールとスフィンゴ脂質が重要な役割を担うことを見出した。

1. 研究目的

細胞膜には特定の脂質やタンパク質、ステロール、スフィンゴ脂質などが集合した“マイクロドメイン”あるいは“ラフト”と呼ばれる領域が形成されている。マイクロドメインには生理活性物質の受容体や G タンパク質などが存在している事から、シグナル伝達の場合などとして機能していると考えられている。出芽酵母の細胞膜マイクロドメインとして MCC (membrane compartment of Can1) もしくは eisosome が知られている¹⁾。このドメインには Can1、Tat2、Pil1 など 22 種類のタンパク質が局在する事が報告されて

いるが (Fig. 1)、そのストレス応答や機能については不明な点が多い²⁾。そこで本研究では、醸造過程などで生じる高浸透圧ストレスに対する MCC のストレス応答について検討した。

2. 実験方法

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* と耐塩性酵母 *Zygosaccharomyces rouxii* は SD 培地 (2% glucose, 0.67% yeast nitrogen base w/o amino acid, pH 5.5) で 28°C・120 rpm で OD₆₀₀=0.5 まで培養した。BY4741 (*MATa his3-1*

leu2-0 met15-0 ura3-0)を親株とし、各種遺伝子破壊株は Euroscarf knock out library から入手した。MCC における高浸透圧ストレス応答について検討を行うため、MCC の主要構成因子である Can1をはじめ Tat2, Fur4, Pil1, Lsp1, Nce102, Sur7, Abp1などにGFPおよびmRFP タグを融合したゲノム組込み型発現プラスミドを構築し活用した。高浸透圧条件下として 1 M NaCl または 1 M glucose 存在下での挙動を観察した。一細胞単位での高浸透圧ストレス応答について time-lapse analysis を行うためには、Fig. 2 に示した装置を作製した。ポリリジンでコーティングした流路に細胞を接着させ、高浸透圧培地を流路に流した際の応答を観察した。透過型電子顕微鏡解析用試料作製には 1 M NaCl を含む 3% glutaraldehyde、2% paraformaldehyde、および 2% オスミウム酸を用いて二重固定を行った。ステロールの可視化は filipin(最終濃度 5

mg/l)で 5 分間染色をおこない、蛍光顕微鏡観察をおこなった。細胞膜の染色は FM4-64 染色をおこなった。スフィンゴ脂質合成阻害剤である myriocin (Sigma 社製)と aureobasidin A (Takara Bio 社製)はそれぞれ最終濃度 4 μg/ml と 1 μg/ml となるように培地に添加し、3-5 時間 28°C で細胞を処理した。

3. 結果

3. 1 塩ストレスによる MCC の肥大化

高浸透圧ストレス条件下において、細胞膜マイクロドメイン MCC がどのようなストレス応答を示すのか検討をおこなった。まず、MCC の主要な構成因子である細胞膜上アルギニントランスポーター Can1 の局在変化を GFP-fusion により蛍光顕微鏡下で観察した。非ストレス条件下で Can1-GFP は、細胞表面にミクロン程度のドット状に局在が

MCC = Membrane Compartment of Can1

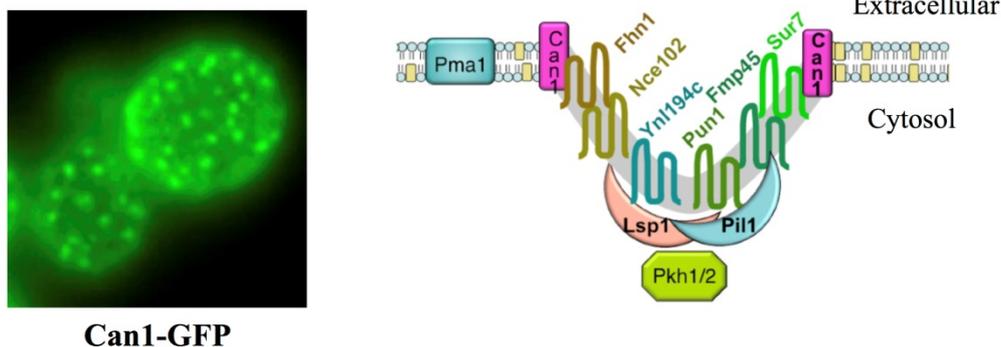


Fig. 1. Structure of MCC (Membrane Compartment of Can1) and its distribution image on the plasma membrane in *S. cerevisiae*

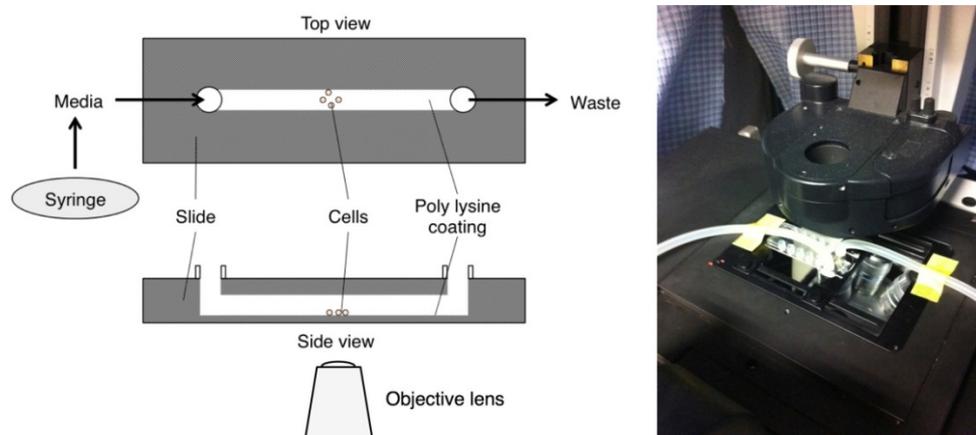


Fig. 2. The handmade equipment for single cell observation under high-salt stress conditions

観察された。一方、1 M NaCl や 1 M glucose といった高浸透圧ストレスに細胞をシフトすると、ドットサイズが顕著に大きくなるのが観察された (Fig. 3A)。経時的な変化について検討したところ、1 M NaCl 条件下では 5 分程度ドットの肥大化が完了し、約 30 分程度は 90% 前後の細胞で肥大化した MCC ドットが観察され続け、その後徐々に通常のサイズへと縮小した (Fig. 3B)。一方、1 M glucose 存在下でも速やかに肥大化ドットの誘導は完了したが、30 分後には大半の細胞が通常のサイズのドットを示すようになり、NaCl ストレスに比べ短時間しか肥大化ドットを保持しなかった (Fig. 3B)。NaCl 濃度の影響についても検討したところ、1 M までは濃度依存的に肥大化ドットの形成が増加した (Fig. 3C)。同様の現象は、ほかの MCC 構成因子で

ある Tat2 や Fur4、Nce102 でも確認された。

3. 2 MCC の肥大化におけるステロールとスフィンゴ脂質の役割

MCC などのマクロドメインには特定のタンパク質以外にエルゴステロールやスフィンゴ脂質が集積することが知られている。そこで、塩ストレス応答時におけるステロールおよびスフィンゴ脂質類の挙動を検討した。Filipin 染色でステロールの細胞内局在を検討したところ、MCC と同一の位置に強いシグナルが検出された (Fig. 4)。また、塩ストレスによりステロールの蓄積を示すドットも肥大化した。一方、filipin で前もってステロールを染色した後、塩ストレスで細胞を処理してもステロールおよび Can1-GFP の肥大化ドットの形成は誘導されなくなった。Filipin がステロール

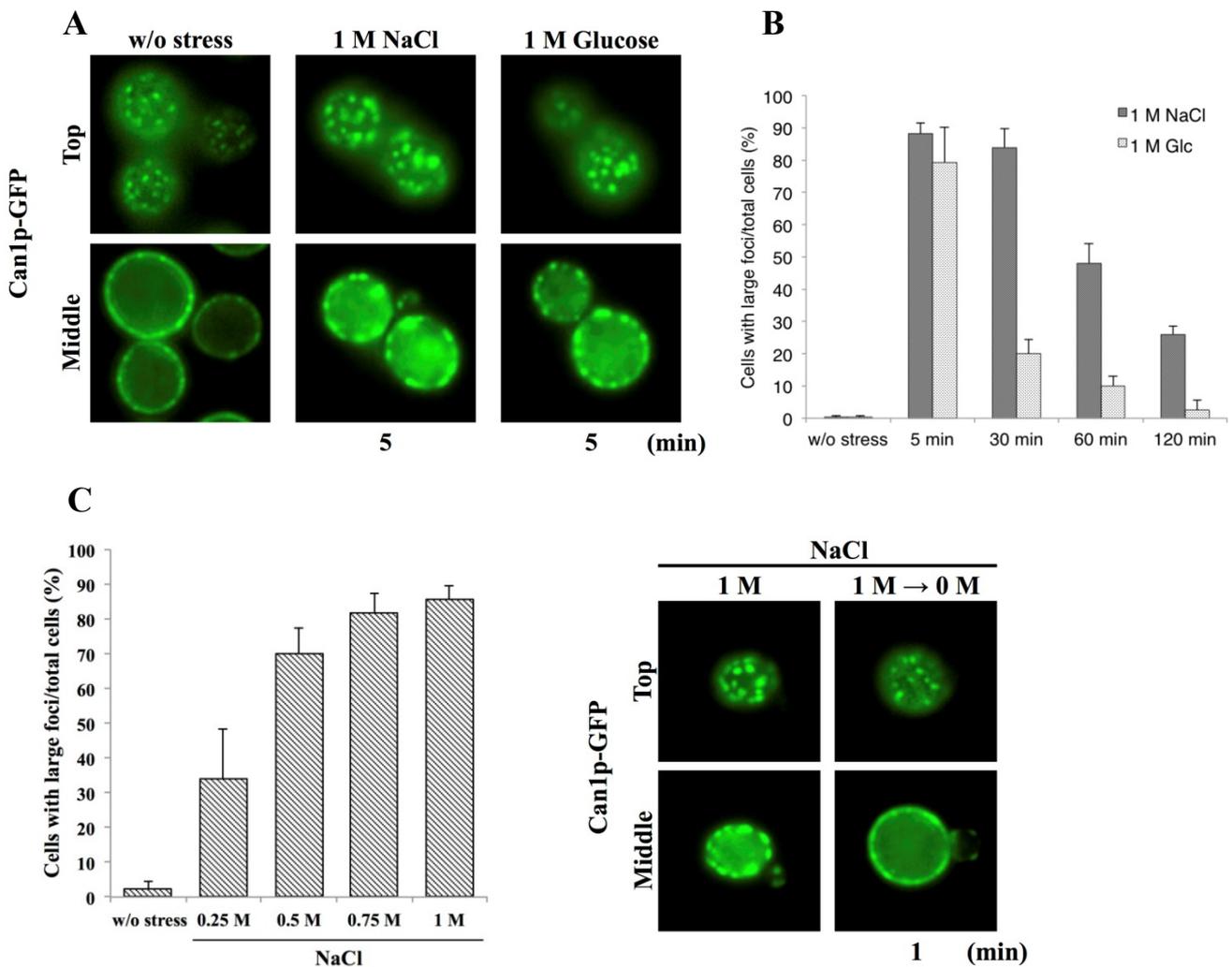


Fig. 3. Formation of large foci of Can1-GFP was induced by high-salt stress. (A) Representative images of Can1 foci under hyperosmotic conditions. (B) Time course of the large foci formation of Can1-GFP by 1 M NaCl. (C) Effects of NaCl concentrations on Can1 foci.

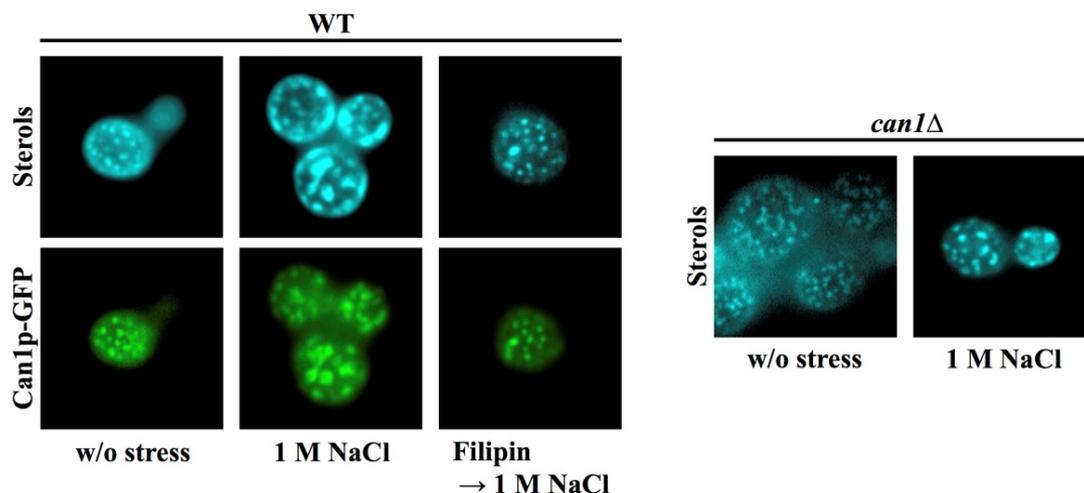


Fig. 4. Sterols colocalized with Can1-GFP and formed large foci by 1 M NaCl. Deficiency of Can1 had little effect on the localization of sterols.

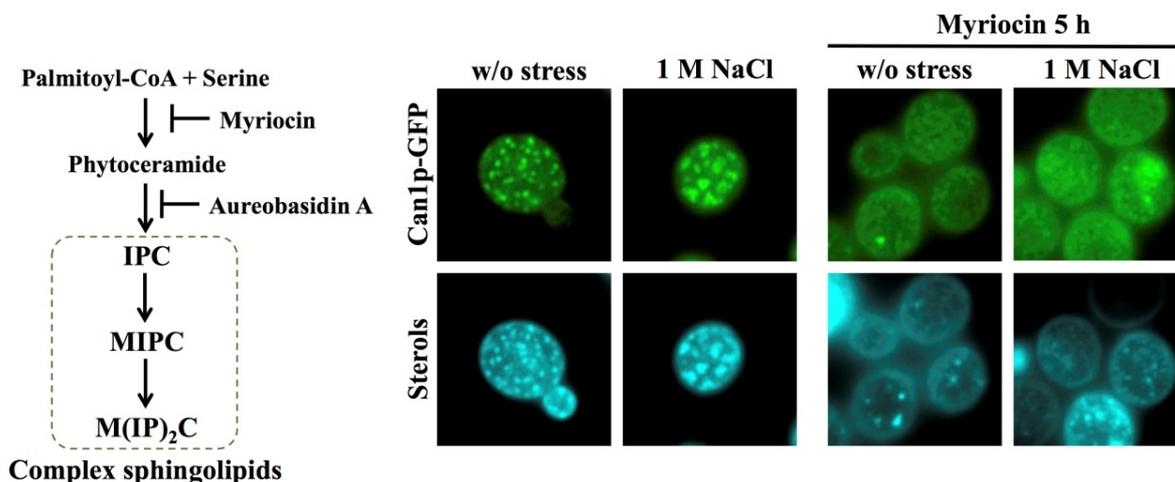


Fig. 5. Inhibition of sphingolipids-synthesis blocked the formation of large foci of Can1-GFP and sterols

に結合することにより、流動性が抑制されてステロールは凝集しなくなると考えられている。Can1-GFP も肥大したドットを形成しなくなったことから、MCC の凝集にはステロールの流動性が必要だと考えられる。

マイクロドメインにはステロールのみならずスフィンゴ脂質も蓄積することから、スフィンゴ脂質の合成を阻害した場合の影響を検討した。Fig. 5 に示すように酵母のスフィンゴ脂質合成は myriocin や aureobasidin A によって阻害される。そこで、これらの薬剤によってスフィンゴ脂質の合成を阻害すると、非ストレス条件下での MCC ドットがほぼ消失することを見出した。また、塩ストレス条件下においても、ステロールおよび Can1-GFP のドット形成がほとんど

認められなかった (Fig. 5)。

肥大化 foci の形成はステロール結合性の filipin もしくはスフィンゴ脂質合成阻害剤処理によって強く阻害された事から、高浸透圧ストレス条件下での肥大化ドットの形成にはステロールやスフィンゴ脂質が必要であると考えられた。肥大化ドットの形成が非常に速やかに行われる事から、高浸透圧ストレス条件下での肥大化ドットの形成過程を time-lapse analysis で観察した。その結果、高浸透圧ストレス条件移行後わずか数秒で、細胞収縮と同時に肥大化したドットが形成される様子が観察された (Fig. 6)。

3. 3 塩ストレスによる陥入形成と MCC 肥大化

FM4-64 で細胞膜を染色したところ、NaCl ストレス条件

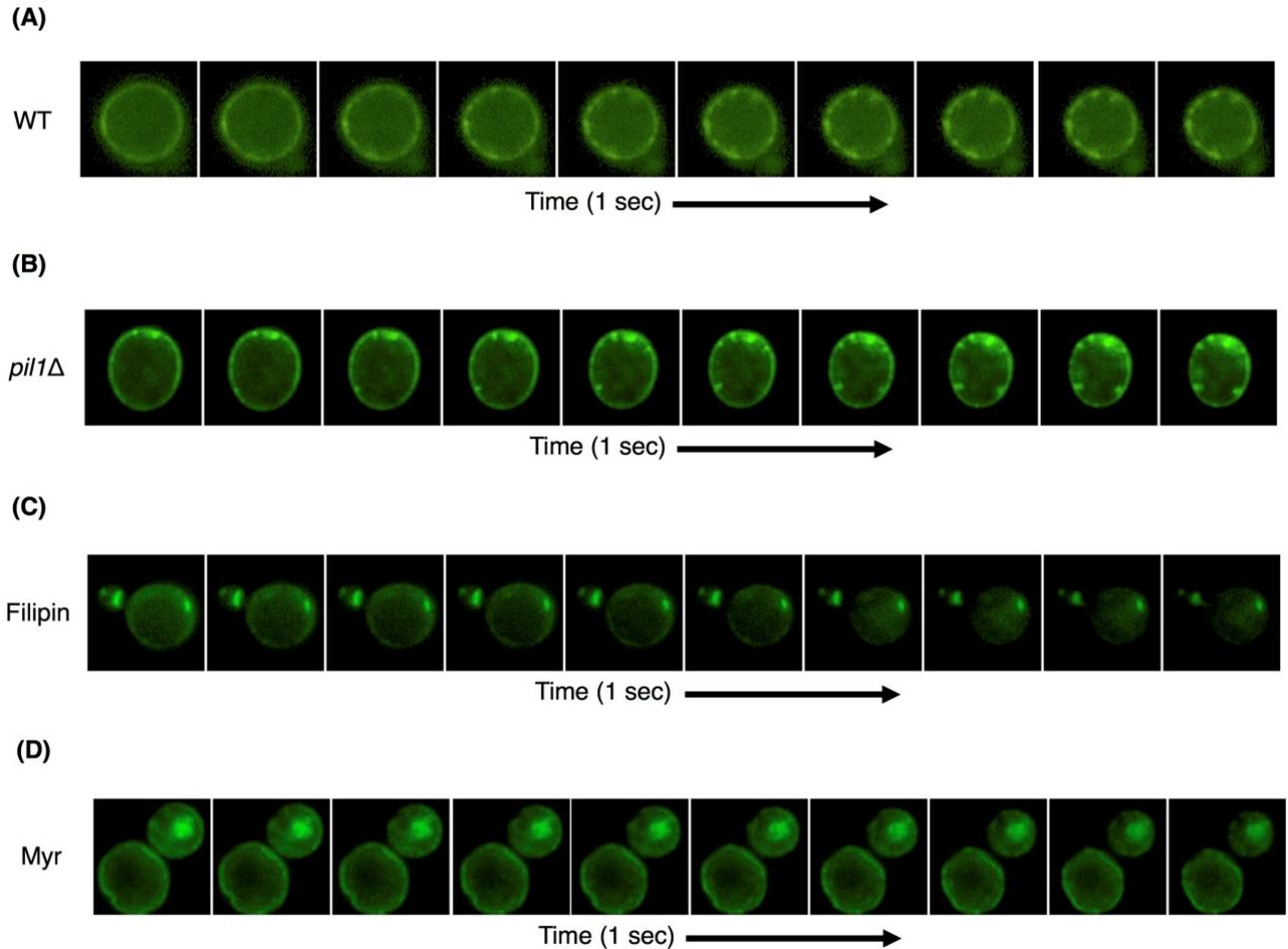


Fig. 6. Time-lapse analysis of MCC large foci formation

下では細胞膜上に比較的大きな凝集を確認することができ、膜構造に変化が生じている可能性が示唆された。細胞収縮による細胞膜上の変化がMCCの肥大化ドット形成に関与しているのではないかと予想し、高浸透圧ストレス条件下での細胞膜の形態変化に関して透過型電子顕微鏡を用いて解析を行った。その結果、高浸透圧ストレス条件下で細胞膜の深い陥入形成が観察された(**Fig. 7**)。一方、肥大化ドットの形成が抑制される filipin および myriocin 処理をおこなった細胞では、高浸透圧ストレス条件下で細胞膜の深い陥入形成は観察されなかった。以上の結果から、NaCl による高浸透圧ストレス条件下でのMCC 肥大化したドットの形成は、細胞膜の深い陥入形成を介して引き起こされる事が強く示唆された。

3. 4 塩ストレスによるMCC 肥大化の生理的意義

肥大化ドット形成の生理的意義を明らかにするため、NaCl による高浸透圧ストレス条件下で肥大化ドットが形成

されない、もしくは形成が異常になる遺伝子欠損株の探索を行った。非必須遺伝子破壊株 4717 株を対象に検討を行った結果、非ストレス条件下でMCC の形成が強く阻害される *pil1Δ*株で極度に肥大化したドットの形成が観察された(**Fig. 8**)。WTと *pil1Δ*株について高浸透圧ストレス条件下での生育速度の比較を行ったが、顕著な差は見られなかった。

3. 5 耐塩性酵母 *Zygosaccharomyces rouxii* における解析

醤油や味噌等の製造に用いられる耐塩性酵母 *Z. rouxii* についても filipin 染色などの解析を通じて、塩ストレスおよび高糖度ストレスに対する応答を検討した。*S. cerevisiae* の場合と異なり *Z. rouxii* ではステロールの肥大化ドットなどは観察されず、細胞膜の性質や構造が両酵母で大きく異なることが示唆された。

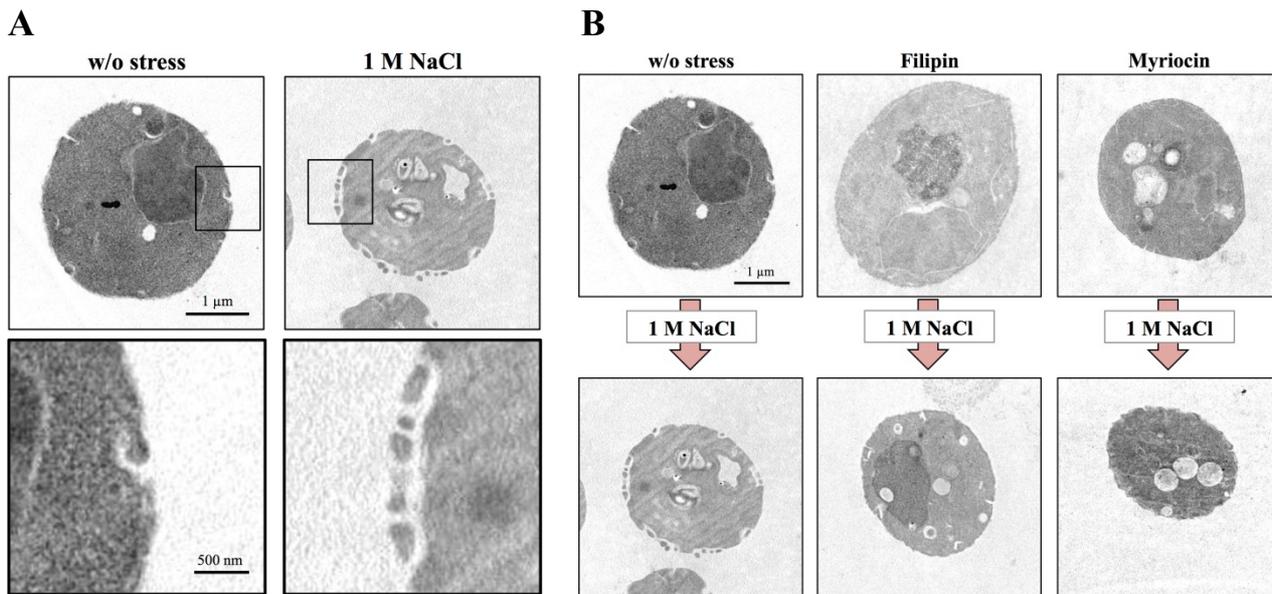


Fig. 7. Deep invaginations were induced by high-salt stress (TEM analysis). Treatment with filipin or myriocin blocked the formation of deep invaginations.

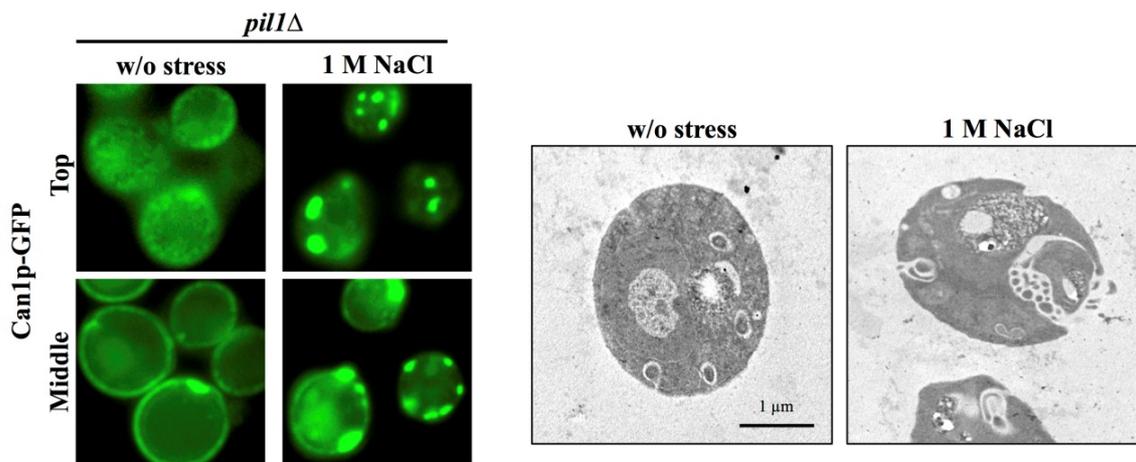


Fig. 8. The *pil1Δ* mutant formed giant invaginations and Can1-GFP foci under high-salt stress

4. 考 察

解析結果から、出芽酵母の細胞膜マイクロドメインは高浸透圧ストレスに対応して非常にダイナミックに変化している事が明らかになった。また、塩ストレスによって細胞膜上に深い陥入が形成されることを電子顕微鏡観察によって確認した。最近の報告を考慮すると、これは高浸透圧による脱水作用により細胞サイズが減少した際に細胞膜の湾曲が形成され、湾曲部分にMCCが蓄積したと考えられる³⁾。今回の解析では、細胞膜の陥入形成においてステロ

ールとスフィンゴ脂質の重要性も示唆された。これらは細胞膜の湾曲の形成・安定化において重要な役割を担う事が報告されている事から⁴⁾、ステロールの流動性阻害もしくはスフィンゴ脂質の欠損によって細胞膜の湾曲形成が抑制され、その結果肥大化ドットの形成が阻害されたと考えられる。

一方、Can1の欠損株(*can1Δ*)では、野生株同様にステロールの肥大化ドット形成が塩ストレスによって誘導されたが、Pil1の欠損株(*pil1Δ*)では極めて大きなドットが形成さ

れた。さらに、非常に大きな細胞膜の陥入が *pil1Δ*株で確認されたことから、Pil1 が塩ストレス応答時の陥入サイズの制御に関与している可能性が考えられた。MCCや細胞膜の塩ストレス応答において Pil1 が制御因子としても重要な役割を担っているのではないかと現在考えており、更なる解析を進めている。

5. 今後の課題

肥大化ドットの形成制御に関与する分子機構について情報を加えた上で、学術誌への論文投稿を予定している。出芽酵母における高浸透圧ストレスへの適応には HOG-MAP kinase 経路 (HOG 経路) が中心的な役割を担う事が知られている。高浸透圧ストレスによる HOG 経路の活性化は filipin による前処理によって抑制される事が報告されており、HOG 経路による肥大化 foci 形成への何らかの関与も予想される⁵⁾。今後、HOG 経路の活性化について WT と *pil1Δ*、もしくは肥大化 foci 形成が見られない遺伝子欠損株を用いて比較・検討したいと考えている。また、*S. cerevisiae* と *Z. rouxii* で見られた塩応答性の違いについても、その分子機構を解明することにより基礎研究のみならず実用面でも重要な知見が得られると考えられるので、解析を進展させたいと考えている。

参考文献

- 1) Grossmann G, Malinsky J, Stahlschmidt W, Loibl M, Weig-Meckl I, Frommer WB, Opekarova M, and Tanner W. (2008) Plasma membrane microdomains regulate turnover of transport proteins in yeast. *J. Cell Biol.* **183**, 1075-1088.
- 2) Douglas LM, Wang HX, Li L, and Konopka JB. (2011) Membrane compartment occupied by Can1 (MCC) and eisosome subdomains of the fungal plasma membrane. *Membranes* **1**, 394-411.
- 3) Olivera-Couto A and Aguilar PS. (2012) Eisosomes and plasma membrane organization. *Mol. Genet. Genomics.* **287**, 607-620.
- 4) Schneiter R, Hitomi M, Ivessa AS, Fasch EV, Kohlwein SD, and Tartakoff AM. (1996) A yeast acetyl coenzyme A carboxylase mutant links very-long-chain fatty acid synthesis to the structure and function of the nuclear membrane-pore complex. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 7161-7172.
- 5) Tanigawa M, Kihara A, Terashima M, Takahara T, and Maeda T. (2012) Sphingolipids regulate the yeast high osmolarity-responsive HOG pathway. *Mol. Cell. Biol.* **32**, 2861-2870.

Study on the Response of Yeast MCC Microdomain against High Salt Concentration Stress

Shingo Izawa

Department of Applied Biology, Kyoto Institute of Technology

Summary

Plasma membrane is the forefront of sensing environmental changes and has an important role for induction of proper stress responses. It has many kinds of proteins and lipids, which do not distribute randomly. Some kinds of proteins and lipids assemble and form lateral membrane compartments called as “rafts” or “microdomains”. It was reported that these domains were rich in sterols and sphingolipids. MCC (membrane compartments of Can1p)/eisosome is known as a plasma membrane microdomain in budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*, and it includes 22 proteins such as Can1, Tat2, Fur4, and Pil1. Since its functions and stress responses remain to be clarified, we investigated the stress response of the MCC under high-salt hyperosmotic conditions that are commonly found during the process of brewing and bread-making. High-salt stress caused the accumulation of Can1 and sterols following the formation of their large foci on the plasma membrane. Additionally, such a stress response was inhibited by pre-treatment with filipin and myriocin, a sterol-binding reagent and a sphingolipid biosynthesis inhibitor, respectively. These results indicate that plasma membrane sterols and sphingolipids are presumably required for the formation of MCC large foci. Analysis using transmission electron microscopy (TEM) clarified that deep invagination of the plasma membrane was induced under hyperosmotic conditions. Our findings suggest that making deep invagination of the plasma membrane causes the formation of MCC large foci under high-salt hyperosmotic conditions. In contrast, a salt-tolerant yeast *Zygosaccharomyces cerevisiae* did not form large foci of sterols under conditions of high-concentration salt stress. This finding clearly indicates the difference in the physiological characteristics of membrane microdomains between *S. cerevisiae* (baker’s yeast) and *Z. rouxii* (soy sauce yeast).