

令和元年5月31日現在

機関番号：63904

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18542

研究課題名(和文) 栄養応答に異常を示す分裂酵母新規変異体の解析

研究課題名(英文) Analysis of novel nutrient response mutants in fission yeast

研究代表者

大坪 瑶子(Otsubo, Yoko)

基礎生物学研究所・細胞応答研究室・特任助教

研究者番号：80580266

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、細胞に普遍的に備わる、栄養状態に応答して適切な反応を行う制御機構の解明を目標に、分裂酵母の栄養源飢餓応答の解析を進めた。栄養源飢餓応答に異常を示す分裂酵母変異株を複数株取得し、解析を行った。変異株の原因遺伝子の多くがtRNA関連因子だったことから、栄養源枯渇時のシグナル伝達経路にtRNAが重要な役割を担っている可能性を考え、研究を進めた。その結果、tRNAの前駆体が栄養状態に応じたTORキナーゼの活性調節に重要な働きをしていることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、断片化したtRNAが、ストレス条件下で蓄積されることや、翻訳制御、RNAi、がん細胞の増殖制御に関わっていることが明らかとなっており、tRNAがこれまで知られていた普遍的な翻訳機構のみならず、様々な生命現象に関与している可能性が示されてきている。このような動向の中で、本研究では、tRNAの前駆体が栄養状態に応じたTORキナーゼの活性調節に重要な働きをしているという全く新しい調節機構を見出すことができた。TORキナーゼに関しては、ヒトにおいて多数の疾患に関わっていることが報告されており、本研究で得られた成果が将来的にそれらに対処する上で有益な情報となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：The goal in this study is to elucidate mechanisms underlying cellular responses to nutrients in an eukaryotic model organism, fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. We have isolated multiple nutrient response mutants in fission yeast. Most of the genes responsible for these mutants were involved in the expression or modification of tRNAs. We have characterized these tRNA related factors in nutrient responses and found a novel mode of regulation of the TOR kinase activity by tRNA precursors in response to nutrient availability.

研究分野：細胞内シグナル伝達経路

キーワード：栄養応答 TORキナーゼ 有性生殖 分裂酵母 tRNA

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞が生存していくためには、外界の環境の変化に柔軟、かつ適切に対応していくことが不可欠である。栄養状態の変化は、細胞が頻繁に遭遇し、大きな影響をもたらす環境要因の一つである。細胞は、自身をとりまく環境の栄養状態を感知して、増殖、分化を適切に切り換えながら、変化に適応する必要がある。栄養応答過程は、細胞にとって最も基本的な制御機構の一つと言えるが、その詳細な分子機構には、未だ多くの謎が残されている。

これまでに、単細胞真核生物である分裂酵母の栄養源枯渇時に行われる有性生殖の制御機構について研究を行ってきた。分裂酵母は、栄養が豊富な環境では、体細胞分裂を繰り返し、無性生殖により増殖していく。培地中の栄養が枯渇すると、分裂を停止し、有性生殖過程へと移行して、減数分裂を行い、最終的に孢子を形成する。これまでの解析から、有性生殖過程への移行に、TOR キナーゼ経路が大きく関与していることが示されている。TOR キナーゼは、酵母からヒトまで真核生物全般に広く保存された Ser/Thr キナーゼであり、細胞が環境変化に応答して、成長、増殖を制御する過程で中心的役割を果たすことが知られている (Wullschlegel et al. 2006)。研究代表者は、分裂酵母の TOR キナーゼが、哺乳類などと同じ複合体を形成していること (Matsuo, Otsubo et al. 2007, Otsubo and Yamamoto. 2008)、TOR キナーゼが減数分裂開始因子などを標的にしていることなどを報告してきた (Nakashima, Otsubo et al. 2012, Otsubo et al. 2014)。しかしながら、これまで明らかにしてきたことのみでは、栄養状態の変化から有性生殖開始に至る過程を十分には説明できない状況にあった。

2. 研究の目的

分裂酵母 TOR キナーゼの一つである Tor2 は、栄養が豊富な状態で有性生殖を抑制する働きをもつ。Tor2 を失活させると、分裂酵母細胞は栄養状態に関わらず、分裂を停止し、有性生殖を開始してしまう。研究代表者は、栄養応答に関わる新規の因子を単離することを目的として、Tor2 変異株と同様に栄養源が豊富な環境でも有性生殖を開始してしまう変異株を複数株取得した。これらを *hmt* (hyper mating and temperature sensitive) 変異株と名付けた (表 1)。*hmt* 変異の原因遺伝子として、アミノアシル tRNA 合成酵素や RNA ポリメラーゼ III などの tRNA 関連因子が複数得られた。そこで、栄養源枯渇時のシグナル伝達経路に tRNA が重要な役割を担っている可能性を考え、研究を進めた。

表 1. *hmt* 変異株の原因遺伝子

mutant	responsible gene
<i>hmt1</i>	<i>nrs1</i> (asparaginyl-tRNA synthetase)
<i>hmt2</i>	<i>prs1</i> (prolyl-tRNA synthetase)
<i>hmt3</i>	<i>tad3</i> (tRNA-specific adenosine-34 deaminase subunit)
<i>hmt4</i>	<i>rpc34</i> (DNA-directed RNA polymerase III subunit)
<i>hmt5</i>	<i>sfc4</i> (RNA polymerase III specific TFIIIC)
<i>hmt6</i>	<i>cts1</i> (CTP synthetase)
<i>hmt7</i>	<i>pcm1</i> (mRNA capping methyltransferase)
<i>hmt8</i>	<i>pat1</i> (serine / threonine protein kinase)

3. 研究の方法

栄養が豊富な環境下でも有性生殖を開始してしまう分裂酵母 *hmt* 変異株の詳細な解析を進めた。特に、複数単離された tRNA 関連因子に注目し、tRNA 関連因子が有性生殖開始時の栄養応答機構にどのような役割を担っているのかを、Tor2 キナーゼとの関係に注目しつつ探った。また、*hmt* 変異株の原因遺伝子の多くが tRNA の合成、成熟に関わるものだったという事実から、tRNA 自体が栄養応答機構の重要なファクターである可能性が考えられた。そこで、栄養源枯渇時に tRNA の生合成系に変化が生じていないかをノザン解析や定量 PCR によって調べ、栄養状態の変化と tRNA の関係について検討した。

4. 研究成果

(1) tRNA 関連因子が原因遺伝子であった *hmt* 変異株では、Tor2 キナーゼ依存的にリン酸化されることが知られている Atg13 や Psk1 のリン酸化状態が低下していた。この結果から、tRNA に関連する *hmt* 変異では Tor2 の活性が下がっていることがわかった。

(2) ノザンプロットにより、分裂酵母野生型株で窒素源枯渇が tRNA の発現量やアミノアシル化に与える影響を調べたところ、顕著な変化は見出せなかった。しかし、tRNA の前駆体の発現量が窒素源枯渇後に大きく減少していることがわかった (図 1)。

さらに詳細に tRNA 前駆体の発現量の変化を調べたところ、窒素源枯渇後短時間で tRNA 前駆体の発現量が減少しだすことが明らかとなった。また、窒素源枯渇後に窒素源を再添加すると、短時間で窒素源枯渇前の発現量に戻ることも観察された。これらのことから、tRNA 前駆体の発現量は、窒素源の状態に応答して速やかに変化していることがわかった。

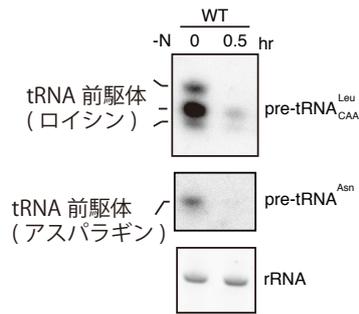


図1. tRNA 前駆体は窒素源枯渇により減少する

(3) Tor2 キナーゼは窒素源枯渇で活性が低下する。窒素源枯渇時の tRNA 前駆体の発現量低下は、Tor2 の活性が窒素源枯渇でも保たれる *tor2* 変異体でも同様に見られたことから、tRNA 前駆体の発現量の変化は Tor2 の上流で生じていると考えられた。

(4) tRNA 前駆体の過剰発現システムを構築した。具体的には、tRNA のプロセッシングに関わる因子の過剰発現と tRNA 前駆体を直接過剰発現するという 2 つの方法で構築した。tRNA 前駆体を過剰発現した分裂酵母細胞では、窒素源枯渇時の Tor2 の不活性化が阻害されていることがわかった。さらに、有性生殖開始も抑圧されていることが判明した。

以上のことから、tRNA 前駆体が、栄養状態に応じた TOR キナーゼの活性調節に重要な働きをしていることがわかったので、これを論文にまとめて発表した(図2) (Otsubo et al. 2018)。

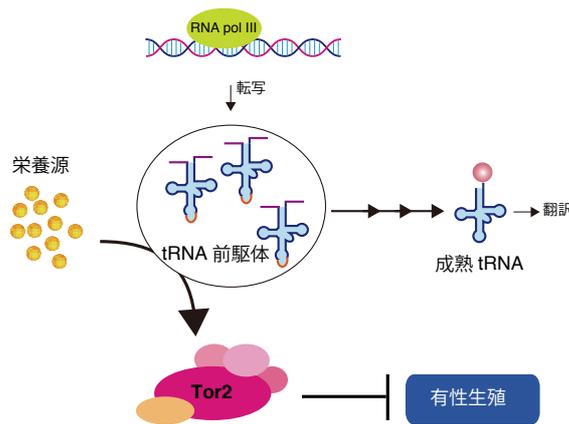


図2. tRNA 前駆体による Tor2 活性調節のモデル図

(5) tRNA 前駆体の発現量が窒素源枯渇時に大きく減少することがわかったので、tRNA 前駆体の発現量がどのように調節されているか調べた。転写制御の他に、tRNA 前駆体の安定性を制御しているシステムが存在する可能性を考え、tRNA の品質管理に関わることが知られている RNA 分解複合体エクソソームの変異体で窒素源枯渇時の発現量を観察したが、tRNA 前駆体の発現量はこの変異体でも減少していた。引き続き、窒素源枯渇に応答した tRNA 前駆体の発現量低下に異常が生じる変異体を探索中である。また、tRNA 前駆体とは独立の経路に異常が生じていると考えられる *hmt* 変異株についても解析を行った。このうち、CTP 合成酵素 Cts1 と減数分裂の開始を抑圧するキナーゼ Pat1 に関して、TOR キナーゼ経路と関わりがあることを示唆する結果が得られたので、今後、TOR キナーゼ経路との関係や栄養応答機構における詳細な役割を明らかにしていく予定である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① [Otsubo Yoko](#), Matsuo Tomohiko, Nishimura Akiko, Yamamoto Masayuki, Yamashita Akira, tRNA production links nutrient conditions to the onset of sexual differentiation through the TORC1 pathway, *EMBO reports*, 19, e44867, 2018、査読有り
DOI: 10.15252/embr.201744867
- ② Shichino Yuichi, [Otsubo Yoko](#), Kimori Yoshitaka, Yamamoto Masayuki, Yamashita Akira, YTH-RNA-binding protein prevents deleterious expression of meiotic proteins by

tethering their mRNAs to nuclear foci, eLife, 7, e32155, 2018, 査読有り
DOI: 10.7554/eLife.32155

- ③ Otsubo Yoko, Nakashima Akio, Yamamoto Masayuki, Yamashita Akira, TORC1-Dependent Phosphorylation Targets in Fission Yeast, Biomolecules, 7, 50, 2017, 査読有り
DOI: 10.3390/biom7030050

[学会発表] (計 9 件)

- ① Otsubo Yoko, Yamamoto Masayuki, Yamashita Akira, Novel regulatory factors in the TORC1-mediated nutrient sensing pathway in fission yeast(招待講演)、第 41 回日本分子生物学会、2018 年
- ② 大坪瑶子、山本正幸、山下朗、分裂酵母 *S. pombe* の tRNA 前駆体による TORC1 制御、酵母遺伝学フォーラム第 51 回研究報告会、2018 年
- ③ 大坪瑶子、山本正幸、山下朗、分裂酵母における tRNA 前駆体による TORC1 活性制御、第 8 回 TOR 研究会、2018 年
- ④ 大坪 瑶子、山本正幸、山下 朗、tRNA 前駆体による TOR キナーゼ活性調節機構、第 20 回日本 RNA 学会年会、2018 年
- ⑤ 大坪瑶子、山本正幸、山下朗、分裂酵母の tRNA 前駆体による TORC1 制御、第 40 回日本分子生物学会、2017 年
- ⑥ 大坪瑶子、山本正幸、山下朗、分裂酵母における tRNA 前駆体による TORC1 制御、第 7 回 TOR 研究会、2017 年
- ⑦ 大坪瑶子、山本正幸、山下朗、分裂酵母における tRNA 前駆体による TORC1 制御(招待講演)、日本遺伝学会第 89 回大会、2017 年
- ⑧ 中嶋昭雄、山下朗、大坪瑶子、松田真弥、鎌田真司、瓜谷眞裕、山本正幸、吉川潮、減数分裂における分裂酵母 TORC1 の制御、第 40 回日本分子生物学会年会、2017 年
- ⑨ 大坪瑶子 山本正幸 山下朗、分裂酵母における tRNA 前駆体による TORC1 制御の可能性、第 6 回 TOR 研究会、2016 年

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

細胞応答研究室

<http://www.nibb.ac.jp/pombe/index.html>

基礎生物学研究所プレスリリース

論文① <http://www.nibb.ac.jp/press/2018/01/18.html>

論文② <http://www.nibb.ac.jp/press/2018/02/13.html>