

令和 3 年 6 月 2 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05438

研究課題名（和文）塩ストレス応答における細胞増殖メカニズムの解明

研究課題名（英文）Analysis of the cell growth mechanism under the response to salt stress

研究代表者

松尾 安浩（Matsuo, Yasuhiro）

島根大学・学術研究院農生命科学系・准教授

研究者番号：70596832

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、分裂酵母をモデル生物として、高濃度のストレス存在下で、細胞がどのように増殖が制御されているのかを解明することを目的とした。その結果、PKA経路が有糸分裂期を制御しており、PKA経路の機能低下が染色体分配の異常を引き起こすことを明らかにした。この表現型の解析を行う過程で、Mal3をマルチコピーサプレッサーとして単離した。Mal3を用いた解析で、PKA経路が微小管形成に關与していた。また、有糸分裂期と微小管形成の異常は、グルコースを制限することでも緩和されていた。塩ストレス存在下では、転写因子Rst2の機能欠損がpka1欠損株のストレス感受性を抑圧することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高濃度のストレスにตอบสนองするPKA経路の機能欠損が染色体分配の異常を引き起こすことを明らかにした。また、有糸分裂期の異常を引き起こす温度感受性変異体が示す単極性微小管形成や生育阻害をPKAの機能欠損やグルコース制限によって、抑圧されることがわかった。以上のことから、高濃度ストレス応答経路であるPKA経路が、細胞周期の有糸分裂期の制御に關与していることを明らかにした。また、PKA経路の標的因子を多数単離したため、高濃度ストレス応答経路の詳細な制御メカニズム解明に近づくことができた。

研究成果の概要（英文）：The mechanism, which is cells response to high concentration stress, was investigated in *Schizosaccharomyces pombe* in this study. The cAMP/PKA pathway regulated the mitosis progression. Loss of functional Pka1 caused the chromosome mis-segregation phenotype and showed the TBZ-sensitive phenotype. These phenotypes were rescued by Mal3-overexpression, which was isolated as multi-copy suppressor. The Mal3-overexpressed cells formed monopolar spindle formation and rescued in the pka1 mutant or in the limitation of glucose, indicating that Pka1 regulates the formation of proper microtubules. The pka1 mutant also showed the salt-sensitive phenotype and rescued by rst2 deletion, which is a transcription factor that regulates transition from mitosis to meiosis. These findings indicate that the cAMP/PKA pathway regulates the mitotic progression.

研究分野：酵母分子遺伝学

キーワード：ストレス応答 シグナル伝達 細胞増殖 分裂酵母 有糸分裂期制御

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

分裂酵母の野生株は、塩化カルシウムや塩化カリウムなどの塩ストレス存在下で、その環境に適応して増殖する。これは、その環境でのストレスの濃度によって、シグナル伝達経路を使い分けているためである。低濃度では、ストレス応答の MAP キナーゼ経路(SAPK 経路)が機能し、有糸分裂期の開始に関与することで「細胞増殖を一旦停止」させ、細胞をストレスに適応させる。そのため、SAPK 経路の機能欠損は、細胞増殖を続け、ストレスに適応できず、やがて死に至る。一方で、高濃度の塩ストレス下で、cAMP 依存的プロテインキナーゼ(PKA)経路の機能欠損株(*pka1Δ*)は、感受性を示し、細胞増殖を停止する(引用文献 1、2)。PKA が活性化した機能獲得株では、野生株と同様にゆっくりと細胞増殖を続ける。これらのことは、PKA 経路は高濃度のストレス存在下で細胞増殖を制御している。しかしながら、どのように細胞増殖を制御しているのかは明らかになっていない。

### 2. 研究の目的

本研究は、塩ストレス応答における細胞増殖(細胞周期)の制御機構の解明を目的とした研究である。野生株は、低濃度の塩ストレス条件下では、ストレス非存在下と同じように細胞が増殖する。高濃度ではゆっくりと細胞増殖するが、ある一定以上の濃度では、増殖を停止し、感受性を示す。この2つの違いは、低濃度と高濃度の塩ストレスにおけるストレス応答のシグナル伝達経路を使い分けているためである。低濃度に応答する MAP キナーゼ経路(SAPK 経路)に関しては、すでに多くの研究が行われているが、高濃度に応答する cAMP 依存的プロテインキナーゼ(PKA)経路に関する知見はあまりない。そこで、PKA 経路を介して、どのように高濃度ストレスに応答して、細胞増殖(細胞周期)を制御しているのかを明らかにすることを目的としている。

### 3. 研究の方法

分裂酵母の欠損株などの遺伝学的手法を用いて、ストレスへの感受性試験、タンパク質の発現や細胞内局在解析、細胞の顕微鏡解析などの解析を組み合わせることで研究を行った。

### 4. 研究成果

本研究では、下記の項目で研究を行い、それぞれの課題で進展することができた。

#### (1) PKA 経路による細胞周期制御

分裂酵母の PKA 経路が細胞周期に影響を及ぼすのかを明らかにするために、有糸分裂や DNA 合成期の阻害剤である薬剤への感受性試験を行った。結果として、有糸分裂期の阻害剤であるチアベンダゾール(TBZ)に感受性を示すことを明らかにした(図1)。チアベンダゾールに感受性を示すことが明らかになったので、PKA の機能欠損によ

って、有糸分裂期で染色体分配到に影響があるのかを解析した。その結果、*pka1* 欠損株は、染色体分配の異常を引き起こしていることが明らかになった(図2)。これらのことから PKA 経路が有糸分裂期を制御していることを明らかにした。

*pka1* 欠損株は、核分裂前に隔壁が形成される有糸分裂期の異常を示した(図2)。そこで、有糸分裂期の異常を示す変異体である *cut7-446* 変異体を用いた解析を行った。*cut7-446* 変異体は、許容温度である 25°C では生育に影響はないが、制限温度である 37°C では、単極性微小管を形成あるいは核分裂前に隔壁を形成した状態で増殖が停止する。この *cut7-446* 変異体の表現型を *pka1* 欠損株が抑圧することを明らかにした。PKA 経路はグルコース応答経路として知られており、グルコース制限状態では、PKA 経路の機能低下を引き起こすことが明らかになっている(引用文献 1、3)。そのため、グルコース制限によっても同様のことが起こるのかを解析したところ、通常状態で起こる *cut7-446* 変異体の表現型がグルコース制限によって抑圧された。以上のことから PKA 経路が細胞周期で有糸分裂期を特異的に制御していることを明らかにした。

#### (2) 塩ストレス存在下での制御メカニズム

PKA 経路の機能欠損は塩化カリウムや塩化カルシウムなどの塩ストレスに感受性を示す(図1)。PKA 経路は、プロテインキナーゼである Pka1 が下流因子をリン酸化して、制御しており、主要な標的因子として転写因子 Rst2 がある(引用文献 4)。そこで、転写因子 Rst2 が PKA 経路を介して塩ストレスに応答しているのかを解析した。Pka1 は Rst2 を負に制御しているため、*rst2*

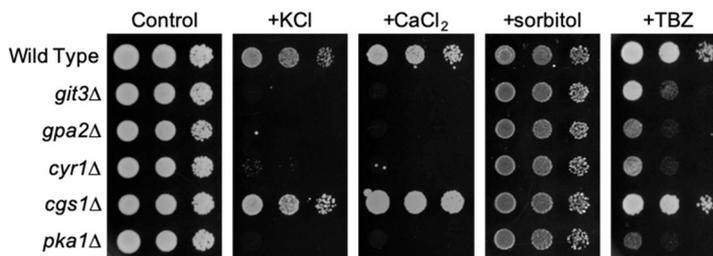


図1 分裂酵母PKA経路欠損株のストレス感受性

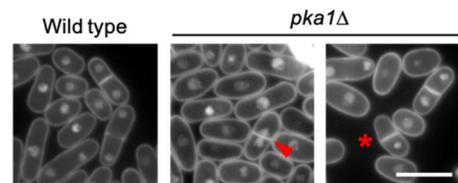


図2 *pka1*欠損株は染色体分配の異常を示す

欠損株が *pka1* 欠損株の塩ストレス感受性を抑圧するのかを解析したところ、*pka1 rst2* 二重欠損株では、塩ストレスに感受性を示さず、*rst2* 欠損によって抑圧されていた。次に塩ストレス存在下での Rst2 の細胞内局在を解析したところ PKA 経路に制御され、核と細胞質に局在することがわかった。一方で、Rst2 は、塩ストレス存在下で PKA 経路とは別の経路によって、リン酸化されていた。そのため、塩ストレス存在下では、PKA 経路は転写因子 Rst2 以外の標的因子が存在していることが示唆された。

### (3) 標的因子の同定と解析

標的因子の同定を行うために、塩ストレスである塩化カリウム、塩化カルシウム、有糸分裂期の阻害剤であるチアベンダゾール存在下で、*pka1* 欠損株の感受性を抑圧するマルチコピーサプレッサーのスクリーニングを行った。その結果、塩化カルシウムで 54 因子、塩化カルシウムで 28 因子、チアベンダゾールで 15 因子を単離することができた。これらに関しては、マルチコピーサプレッサーがどの遺伝子であるかを解析し、ほとんどの単離因子を同定することができた。この中で、チアベンダゾールで抑圧する因子として、Mal3 に注目し、なぜ *pka1* 欠損株の感受性を抑圧できるのかを解析した。結果として、Mal3 の N 末端に存在している微小管結合ドメインが高発現によって、*pka1* 欠損株の染色体分配異常を抑圧していることが原因であることを明らかにした。また、Mal3 高発現は、野生株で生育阻害と単極性微小管形成を引き起こす。この異常は、*pka1* 欠損株あるいはグルコース制限下で抑圧されることを明らかにした。

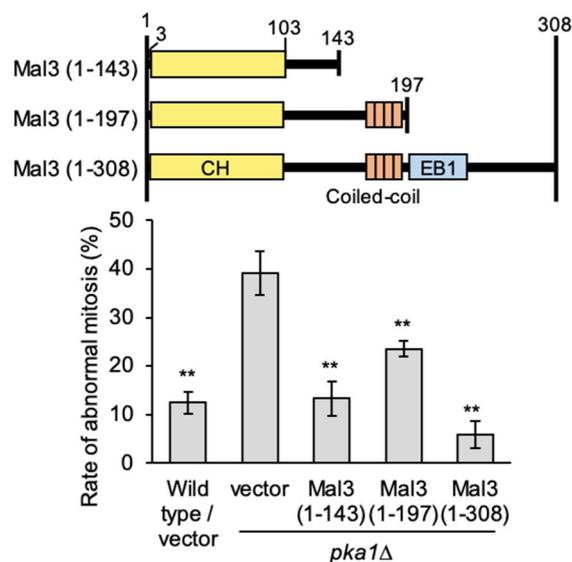


図3 Mal3高発現による*pka1*欠損株の染色体分配異常の抑圧

タンパク質の発現の変化による標的因子の同定も試みた。野生株と *pka1* 欠損株からタンパク質を抽出し、ナノ LC-MS/MS 解析によって、野生株に比べ *pka1* 欠損株で発現量が増加したタンパク質の同定を行った。その結果、5.4 倍量増加した Mug14 タンパク質を同定した。この Mug14 タンパク質は、転写レベルでも発現が *pka1* 欠損株で増加していた。この Mug14 の発現が転写レベルで増加していたため、転写因子 Rst2 による制御を予測して解析し、*mug14* プロモーター上に存在する STREP モチーフ (CCCCTC) を介して、Rst2 が発現制御していることを明らかにした。

### (4) 他の分裂酵母での機能の保存性

他の分裂酵母として、*Schizosaccharomyces japonicus* を用いて、*pka1* 欠損株がどのような表現型を持っているのかを薬剤やストレスへの感受性試験を行い、他の分裂酵母で共通した表現型が存在していることを見出した。

### 引用文献

1. Matsuo Y., McInnis B., Marcus S., Regulation of the subcellular localization of cyclic AMP-dependent protein kinase in response to physiological stresses and sexual differentiation in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Eukaryot. Cell*, 7:1450-1459, (2008).
2. Matsuo Y., Kawamukai M., cAMP-dependent protein kinase involves calcium tolerance through the regulation of Prz1 in *Schizosaccharomyces pombe*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 81: 231-241, (2017).
3. Gupta D.R., Paul S.K., Oowatari Y., Matsuo Y., Kawamukai M., Complex formation, phosphorylation, and localization of protein kinase A of *Schizosaccharomyces pombe* upon glucose starvation. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 75:1456-1465, (2011).
4. Takenaka K, Tanabe T, Kawamukai M, Matsuo Y., Overexpression of the transcription factor Rst2 in *Schizosaccharomyces pombe* indicates growth defect, mitotic defects, and microtubule disorder. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 82:247-257, (2018).

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Takuma Tanabe, Masayuki Yamaga, Makoto Kawamukai, Yasuhiro Matsuo	4. 巻 14
2. 論文標題 Mal3 is a multi-copy suppressor of the sensitivity to microtubule-depolymerizing drugs and chromosome mis-segregation in a fission yeast pka1 mutant	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLoS ONE	6. 最初と最後の頁 e0214803
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0214803	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Ikuhisa Nishida, Kazumasa Yokomi, Kouji Hosono, Kazuhiro Hayashi, Yasuhiro Matsuo, Tomohiro Kaino, Makoto Kawamukai	4. 巻 103
2. 論文標題 CoQ10 production in Schizosaccharomyces pombe is increased by reduction of glucose levels or deletion of pka1	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Applied Microbiology and Biotechnology	6. 最初と最後の頁 4899-4915
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00253-019-09843-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Takuma Tanabe, Makoto Kawamukai, Yasuhiro Matsuo	4. 巻 84
2. 論文標題 Glucose limitation and pka1 deletion rescue aberrant mitotic spindle formation induced by Mal3 overexpression in Schizosaccharomyces pombe	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 1667 ~ 1680
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/09168451.2020.1763157	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ikuhisa Nishida, Ryota Yanai, Yasuhiro Matsuo, Tomohiro Kaino, Makoto Kawamukai	4. 巻 15
2. 論文標題 Benzoic acid inhibits Coenzyme Q biosynthesis in Schizosaccharomyces pombe	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0242616
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0242616	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計20件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 松尾安浩
2. 発表標題 分裂酵母のストレス応答経路に関する研究
3. 学会等名 日本農芸化学会中四国支部第54回講演会（例会）（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takuma Tanabe, Masayuki Yamaga, Makoto Kawamukai, Yasuhiro Matsuo
2. 発表標題 Mal3 is a multi-copy suppressor of the sensitivity to microtubule-depolymerizing drugs and chromosome mis-segregation in a fission yeast pka1 mutant
3. 学会等名 EMBO Workshop on Fission Yeast The 10th International Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ikuhisa Nishida, Kazumasa Yokomi, Kouji Hosono, Kazuhiro Hayashi, Yasuhiro Matsuo, Tomohiro Kaino, Makoto Kawamukai
2. 発表標題 Coenzyme Q10 production in Schizosaccharomyces pombe is increased by reduction of glucose levels or deletion of pka1
3. 学会等名 EMBO Workshop on Fission Yeast The 10th International Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田部卓磨、川向 誠、松尾安浩
2. 発表標題 分裂酵母EB1ファミリータンパク質Mal3の過剰発現で引き起こされる表現型の 解析
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム第52回研究報告会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 稲村真一、田部卓磨、川向 誠、松尾安浩
2. 発表標題 分裂酵母pka1欠損株で発現上昇する因子の探索および解析
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム第52回研究報告会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田部卓磨、川向 誠、松尾安浩
2. 発表標題 分裂酵母 EB1ファミリータンパク質 Mal3の過剰 発現で引き起こされる表現型の解析
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 稲村真一、田部卓磨、川向 誠、松尾安浩
2. 発表標題 分裂酵母 cAMP/PKA経路によって制御される Mug14の解析
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西田郁久、戒能智宏、松尾安浩、川向 誠
2. 発表標題 安息香酸は分裂酵母のCoQ 生合成を顕著に阻害する
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 稲村真一、田部卓磨、川向 誠、松尾安浩
2. 発表標題 分裂酵母cAMP/PKA 経路の標的因子Mug14 の解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 竹中航平、酒井智健、田部卓磨、川向 誠、松尾安浩
2. 発表標題 分裂酵母pka1欠損株のTBZ感受性を抑圧する転写因子の網羅的解析
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム第51回研究報告会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田部卓磨、川向誠、松尾安浩
2. 発表標題 分裂酵母EB1ファミリータンパク質Mal3の過剰発現で引き起こされる表現型の解析
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム第51回研究報告会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田部卓磨、川向誠、松尾安浩
2. 発表標題 グルコース制限はスピンドルチェックポイント因子であるMad1の機能低下を引き起こす
3. 学会等名 日本農芸化学会2018年度中四国支部大会（第52回講演会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 竹中航平、酒井智健、田部卓磨、川向 誠、松尾安浩
2. 発表標題 pka1欠損株のTBZ感受性を抑圧する転写因子の解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2018年度中四国支部大会（第52回講演会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 稲村真一、田部卓磨、川向 誠、松尾安浩
2. 発表標題 分裂酵母pka1破壊株において高発現するMug14の解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2018年度中四国支部大会（第52回講演会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田部卓磨、川向誠、松尾安浩
2. 発表標題 分裂酵母EB1ファミリータンパク質Mal3の過剰発現が引き起こす生育阻害の解析
3. 学会等名 第41回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 竹中航平、酒井智健、田部卓磨、川向 誠、松尾安浩
2. 発表標題 pka1欠損株のTBZ感受性を抑圧する転写因子の解析
3. 学会等名 第41回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 竹中航平、田部 卓磨、川向 誠、松尾 安浩
2. 発表標題 分裂酵母pka1欠損株のTBZ感受性を抑圧する転写関連因子の解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 稲村真一、田部卓磨、川向 誠、松尾安浩
2. 発表標題 分裂酵母pka1欠損株で高発現するMug14の解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田部 卓磨、川向 誠、松尾 安浩
2. 発表標題 グルコース制限はスピンドルチェックポイントMad1の機能低下を引き起こす
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 稲村真一、田部卓磨、川向 誠、松尾安浩
2. 発表標題 分裂酵母Mug14の転写因子Rst2による発現制御機構
3. 学会等名 2020年度日本農芸化学会中四国支部大会（第57回講演会）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	田部 卓磨  (Tanabe Takuma)	鳥取大学大学院・連合農学研究科・博士課程	
研究協力者	稲村 真一  (Inamura Shin-ich)	島根大学大学院・自然科学研究科・修士課程	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------