

令和 4 年 6 月 27 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K06204

研究課題名(和文) アクチン重合阻害剤に対するテトラヒメナの耐性能獲得機構の研究

研究課題名(英文) Study of the mechanism by which Tetrahymena acquires resistance to actin polymerization inhibitors

研究代表者

沼田 治 (Numata, Osamu)

筑波大学・生命環境系・名誉教授

研究者番号：50189354

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：アクチンの細胞内濃度の制御機構は不明である。我々は、アクチン重合阻害剤ラトランキュリンA(LA)に対するテトラヒメナの耐性獲得現象を発見した。これには、数十種類の遺伝子転写誘導が伴う。この転写調節機構を明らかにするため、LA処理後、発現量が増加する3種類の転写調節因子(LITAF、YEATS、TCX11)を調べたが関連性はなかった。次に顕著に発現量が増加するACT2遺伝子上流の転写調節領域を調べ、塩基配列TRR1～3を見出した。これら全てを欠損するとLA処理後のACT2タンパク質量が半減した。現在、TRR1～3に結合する転写調節因子を探索し、転写調節機構の実体解明を目指している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

筋収縮や細胞運動、細胞質分裂で重要な働きをするアクチンの細胞内濃度の制御機構は不明である。我々は、アクチン重合阻害剤ラトランキュリンA(LA)に対するテトラヒメナの耐性獲得現象を発見した。これには、数十種類の遺伝子転写誘導とアクチン分子の活発な合成分解が伴う。この分子機構の根底には、アクチンの最適用量と品質を感知・制御する「細胞骨格ホメオスタシス」の存在が伺えた。本研究の核心は、「細胞がアクチンの量をどのように感知し、制御するか？」という問いに、LAで攪乱した状態から、テトラヒメナが適切な細胞骨格機能を回復する過程を調べ、解答を得ることである。

研究成果の概要(英文)：The mechanisms regulating the intracellular concentration of actin are unknown. We have discovered the phenomenon of Tetrahymena acquiring resistance to the inhibitor of actin polymerization, latrunculin A (LA). This is accompanied by the induction of dozens of gene transcriptions. To elucidate the mechanism of this transcriptional regulation, we examined three transcriptional regulators (LITAF, YEATS, and TCX11) whose expression levels increased after LA treatment, but found no association. Next, we examined the transcriptional regulatory region upstream of the ACT2 gene, which is significantly upregulated, and found the sequences TRR1-3. Deletion of all of these sequences halved the amount of ACT2 protein after LA treatment. They are now searching for transcriptional regulators that bind to TRR1-3 in order to elucidate the substance of the transcriptional regulatory mechanism.

研究分野：細胞生物学

キーワード：テトラヒメナ アクチン 細胞骨格ホメオスタシス アクチン重合阻害剤 転写調節 LITAF YEATS 転写調節配列

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

テトラヒメナは、水中の微生物等をその口部装置から食胞内に取り込み、栄養源にする。ラトランキュリン A (LA) 等のアクチン重合阻害剤で処理すると、その食胞形成は直ちに阻害される。ところが数時間後には、テトラヒメナはアクチン細胞骨格を回復し、その後、しばらくの間は薬剤耐性能を示す。我々はこの一連の過程で、主要なアクチン (ACT1) のタンパク量の減少と、反対に ACT1 及び別のアクチンアイソフォーム ACT2 の遺伝子の転写が著しく亢進することを発見した。さらに薬剤処理耐性能の獲得には、それらに加えて複数のアクチン細胞骨格構成因子、アクチンをフォールディングする分子シャペロンと翻訳後修飾因子、タンパク質リン酸化酵素やユビキチンリガーゼ、及び転写因子やヒストンアセチル化酵素などの遺伝子の転写量の増加が伴うのを見つけた。一方、アクチンの阻害ではなく、ACT1 遺伝子を過剰発現した細胞でも、ACT2 の転写量は著しく増加し、最初の薬剤処理に対して耐性を示す。そのため、本現象は薬剤特異的なものではない。以上の知見から我々は、テトラヒメナはアクチン細胞骨格の正常な機能が攪乱されると、アクチンの生合成と分解のターンオーバーを著しく活性化し、その上で元の適切な状態に戻すしくみをもつと考えた。

2. 研究の目的

アクチンは全ての真核生物に重要な細胞骨格であり、その繊維の重合はモノマーの細胞内濃度と平衡状態にある。しかし、細胞内アクチン濃度がどのように決まるか、その制御機構は不明である。我々は、アクチン重合阻害剤に対するテトラヒメナの耐性獲得現象を発見した。これには、数十種類の遺伝子転写誘導とアクチン分子の活発な合成分解が伴う。幾つかの根拠から、この分子機構の根底には、アクチンが細胞機能を健全に発揮できるよう、最適な量と品質を感知・制御する「細胞骨格ホメオスタシス」ともいえる制御機構の存在が伺えた。本研究ではテトラヒメナのユニークなアクチン阻害剤耐性機構を研究することで、この新たな分子機構の実体を探る。本研究課題の核心は、細胞がアクチンの量をどのように感知し、制御するかという問いに対し、アクチン重合阻害剤で攪乱した状態から、テトラヒメナが適切な細胞骨格機能を回復する過程を調べ、解決に挑むことである。

3. 研究の方法

研究計画 1 「細胞が重合してないアクチンの増加を感知し、それが一群の遺伝子の転写誘導を促すのか？」

これまでの RNA seq で、LA 処理時に転写量が顕著に増加する遺伝子を同定・分類した。これらの遺伝子を破壊し、細胞が LA 耐性能を獲得するか、またアクチンの発現量に影響するか調べる。

研究計画 2 「アクチンの分解機構」

アクチンの分解機構をユビキチン経路や選択的オートファジー経路等に着目

して調べる。

研究計画3「アクチン量の不足を、細胞がどのように感知して、必要なアクチン量を合成するのか？」

アクチン量の不足やアクチンの異常を、細胞がどのように感知して、必要なアクチン量を合成するのかを調べる。さらに、LA 処理後の転写調節のしくみを解明する。

4. 研究成果

研究計画1「細胞が重合していないアクチンの増加を感知し、それが一群の遺伝子の転写誘導を促すのか？」

ACT1 あるいは、繊維化しないACT1 の過剰発現で、LA 処理直後から LA 耐性を示すことが分かった。この結果は、ACT1 の単量体アクチン量の増加が、ACT2 と LA 耐性能獲得遺伝子群の発現誘導を引き起こしていることを示す。

RNA seq で、ラトランキュリン A (LA) 処理時に転写量が顕著に増加する遺伝子を同定・分類し、アクチン束化因子フィンプリンの遺伝子 (FIM1) に着目した。FIM1 破壊株は普段は野生株と同様に食胞を形成するが、LA 耐性能を獲得できなくなった。したがって、LA 耐性能獲得にはアクチン遺伝子の発現に加えて多くの遺伝子の発現が不可欠であると考えられる。

LA 処理後 20 分で ACT2 の発現が誘導された。これは LA 処理によって増加した ACT1 単量体が速やかに転写因子 X を活性化して、非常に早く ACT2 の発現上昇を誘導することを示す。

研究計画2「アクチンの分解機構」ではテトラヒメナの ATG8 の3つのアイソフォームをクローニングし、GFP 融合タンパク質を作成し、それらの局在性を調べた。

研究計画3「アクチン量の不足を、細胞がどのように感知して、必要なアクチン量を合成するのか？」

ラトランキュリン A (LA) 処理時に転写量が顕著に増加する遺伝子を RNA seq で、同定・分類し、3種類の転写因子 (LITAF、YEATS、TCX11) の発現量が増加していることを見出した。これらと ACT2 発現上昇の関係を詳細に調べた。3種類の転写因子遺伝子の発現を抑制しても、LA 処理で ACT2 発現上昇が見られたので、これらが LA 耐性能獲得に必須で無いと結論した。しかし、YEATS の過剰発現は LA 耐性能の獲得を早めた。YEATS は LA 耐性能の獲得に補助的に働く可能性がある。

ACT2 遺伝子上流に存在する転写調節領域の探索を行い、転写調節領域の候補となる塩基配列 TRR1~TRR3 を見出した。これら全てを欠損した TRR1~3 株では LA 処理後の ACT2 のタンパク質量が野生株と比較して半減した。この結果から、TRR1~3 は ACT2 の転写に関与している可能性が高いと結論した。これらの配列に結合する転写調節因子の同定が今後の課題である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Rikuri Morita, Osamu Numata, Kentaro Nakano, Masak Takaine	4. 巻 534
2. 論文標題 Cell cycle-dependent phosphorylation of IQGAP is involved in assembly and stability of the contractile ring in fission yeast	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 1026-1032
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2020.10.043.	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7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 沼田 治、中野 賢太郎
2. 発表標題 Study on the acquisition mechanism of resistance to actin polymerization inhibitor in Tetrahymena -Existence of actin homeostasis control mechanism-
3. 学会等名 European congress of protistology - ISOP joint meeting（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 沼田 治
2. 発表標題 テトラヒメナの4種類のアクチンの性状と機能
3. 学会等名 第52回日本原生動物学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 阿久津 智晃、沼田 治、中野 賢太郎
2. 発表標題 アクチン重合阻害剤に対するテトラヒメナの耐性能獲得機能の研究（3） 転写因子LITAFの働きについて
3. 学会等名 生体運動研究合同班会議
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 沼田 治、中野 賢太郎
2. 発表標題 テトラヒメナの4種類のアクチンの性状と機能
3. 学会等名 生体運動研究合同班会議
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 沼田 治, 清水 祐太, 赤澤 大樹, 中野 賢太郎
2. 発表標題 テトラヒメナにおけるアクチン重合阻害剤に対する耐性能獲得機構の研究 アクチンホメオスタシス制御機構の存在
3. 学会等名 原生生物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Minoru Hagita, Kota Fujito, Osamu Numata, Kentaro Nakano
2. 発表標題 Functional analysis of a ciliate specific actin-related protein, tAtp, localized in cilia of Tetrahymena thermophila
3. 学会等名 細胞生物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 沼田治、清水祐太、赤澤大樹、中野賢太郎
2. 発表標題 アクチン重合阻害剤に対するテトラヒメナの耐性能獲得機構の研究(2)
3. 学会等名 生体運動研究合同班会議
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 運動による生活体力の維持ないし増進効果の増強剤	発明者 武政徹、麻見直美、 武田紘平、沼田治他3 名	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-150774	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

筑波大学オルガネラ細胞生物学研究室 https://www.biol.tsukuba.ac.jp/organelle/index.html
--

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 分担者	中野 賢太郎 (Nakano Kentaro) (50302815)	筑波大学・生命環境系・教授 (12102)	

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
---------	---------