

令和 5 年 6 月 4 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K05823

研究課題名(和文) 物理刺激を化学シグナルに変換する酵母TRPY1チャネルの活性制御機構の研究

研究課題名(英文) Analysis of yeast TRPY1 channel which convert physical stimulations into biochemical signals.

研究代表者

浜本 晋 (Hamamoto, Shin)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・特任助教

研究者番号：10533812

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)：出芽酵母液胞膜局在性陽イオンチャネルTRPY1は、高浸透圧ストレスに应答して液胞内のCa<sup>2+</sup>を細胞質に放出している。しかし、TRPY1チャネルの高浸透圧ストレス应答機構の詳細は不明である。TRPY1の活性制御に関連すると思われるタンパク質を推定するため、遺伝子破壊株コレクションを用いて高浸透圧ストレス条件において細胞質のCa<sup>2+</sup>濃度の上昇の見られない破壊株の探索を行った。その結果、複数個の遺伝子破壊株を同定した。これらの中には、液胞膜以外のオルガネラ膜局在性タンパク質が含まれており、これまでは着目されていなかった新たなTRPY1の活性制御機構の存在が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究における成果は、他の生体膜と比較して研究が遅れているオルガネラ膜に局在性を示すイオンチャネルの活性制御機構の一端を明らかにしたことである。出芽酵母は、発酵生産環境では高浸透圧ストレスに晒されているため、高浸透圧ストレスで活性化するTRPY1の研究で得られた知見の出芽酵母の発酵生産環境への応用が期待される。さらに、TRPY1と類似のイオンチャネルは広く高等生物に保存されており、多くの疾病をも関わっていることが知られているため、これらの疾病の原因解明への期待される。

研究成果の概要(英文)：Saccharomyces cerevisiae possesses a transient receptor potential (TRP) channel homolog TRPY1 in its vacuolar membrane. So far, studies have focused on the channel properties of TRPY1, but its regulation and physiological role remained to be elucidated. TRPY1 can be activated by hyperosmotic shock in vivo and release Ca<sup>2+</sup> from the vacuole into the cytoplasm, which can be measured by expressing aequorin in cytoplasm. To gain further observation of TRPY1 at a molecular level, we screened the collection of yeast single gene deletants for alterations in hyperosmotic response in an attempt to find factor that regulates the activity of TRPY1. We have identified several deletion mutant strains which shows decreased response against to hyperosmotic condition. Some of the deleted gene encoded organelle membrane protein and suggested a novel mechanism to activate TRPY1.

研究分野：イオン輸送

キーワード：イオン輸送 チャンネル オルガネラ 出芽酵母

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

出芽酵母の液胞は細胞体積の 60%程度を占める大きなオルガネラである。液胞は、有害物質の隔離や有用物質を貯蔵する役割を担っているため、それらの物質の輸送を担う液胞膜に局在性を示す輸送体は細胞内イオン恒常性の維持、ストレス応答、シグナル伝達などといった生体活動の維持に必要な分子装置である。これまでに多くの液胞膜の輸送体研究が行われ、ATP の加水分解で得られたエネルギーを利用して液胞内に  $H^+$  を輸送する  $H^+$  ポンプ、同様に ATP をエネルギーとする  $Ca^{2+}$  ポンプ、液胞内の  $H^+$  を細胞質に輸送して細胞質の  $Ca^{2+}$  を液胞内に輸送する  $H^+/Ca^{2+}$  対向輸送体、アミノ酸輸送体などの様々な輸送体の機能が明らかとなり報告されてきた。細胞質内の  $Ca^{2+}$  濃度を適切な値に制御している  $Ca^{2+}$  ポンプや  $H^+/Ca^{2+}$  対向輸送体とは異なり、液胞内の  $Ca^{2+}$  を細胞質に放出する輸送体として陽イオンチャネルの TRPY1 が見出されている。イオンチャネルの詳細な機能解析には電気生理学的手法の一つのパッチクランプ法が効果的であるが、出芽酵母の液胞膜のように小さくて脆弱なオルガネラ膜をパッチクランプ法に適用するには高度な操作が求められる。このような状況の中で、研究代表者は、細胞壁合成阻害と浸透圧調製法による酵母の巨大化に成功し、この巨大化酵母の液胞を用いたパッチクランプ法による TRPY1 の機能解析を行った。その結果、還元剤、細胞質の  $Ca^{2+}$  濃度の上昇によって TRPY1 が活性化することを見出した。

### 2. 研究の目的

出芽酵母の細胞質の  $Ca^{2+}$  の検出を目的としたイクオリンを用いた *in vivo* の実験では、高浸透圧処理によって TRPY1 が液胞から細胞質に  $Ca^{2+}$  を放出することが報告されている。高浸透圧処理により、細胞質の水の細胞外への流出に続いて液胞内の水の細胞質への流出が生じることが予想される。液胞内の水の流出によって生じた液胞内の膨圧の低下によって液胞膜の膜張力に変化が生じて TRPY1 が活性化したことが示唆された。パッチクランプ法では膜張力を任意の圧力に設定することが可能であることを生かし、研究代表者によって膜張力の変化に伴う TRPY1 の活性の変化が観察されるか検討したが、膜張力に依存した TRPY1 の活性化は観察されなかった。このことより、物理的刺激である浸透圧の変化が直接 TRPY1 を活性化するのではなく、未同定の活性化因子が TRPY1 の活性化に関わっていることが推察された。本研究では、未同定の活性化因子を出芽酵母一遺伝子欠損株コレクションより見出すことを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) イクオリンアッセイによる細胞質の $Ca^{2+}$ 濃度変化の検出

オワンクラゲから単離されたアポイクオリンと発光基質であるセレンテラジンの複合体に  $Ca^{2+}$  が結合すると発光が生じる。アポイクオリン遺伝子を導入発現した出芽酵母をセレンテラジンを含む培養液で培養した後に集菌と洗浄を行なった。次に、Nivo マルチモードマイクロプレートリーダー(パーキンエルマー・ジャパン)のディスペンサーから終濃度 1M NaCl を添加して発光検出モードを用いてイクオリン発光を検出した。

#### (2) 一次スクリーニング

出芽酵母の一遺伝子破壊株コレクション 5100 株にアポイクオリン遺伝子発現ベクターを形質転換した。さらに、遺伝子破壊株であることによって染色体上からの TRPY1 の発現レベルの低下が生じる可能性があるため、恒常的に発現誘導している TRPY1 遺伝子発現ベクターを遺伝子破壊株コレクションに形質転換した。アポイクオリン遺伝子と TRPY1 遺伝子発現ベクターを導入した遺伝子破壊株コレクションを用いてイクオリンアッセイを行い、発光強度が全体の下位 20% に相当する 1000 株を選抜した。

#### (4) 二次スクリーニング

一次スクリーニングで選抜した 1000 株のイクオリン発光の値をイクオリン量を用いて規格化した。

#### (5) ウェスタンブロット法によるタンパク質の定量

イクオリンアッセイ終了後の菌体を回収後、抽出バッファーとガラスビーズを加えて激しく懸濁し、タンパク質を抽出した。タンパク質濃度の測定後に SDS-PAGE とウェスタンブロット実験を行い(Anti Aequorin 抗体(コスモバイオ))、画像解析によるイクオリンの発現量の数値化を行なってイクオリン発光値の規格化に使用した。

#### (6) TRPY1:mGFP の共焦点顕微鏡による局在解析

TRPY1:mGFP 遺伝子発現ベクターを形質転換した出芽酵母の蛍光画像を共焦点顕微鏡 FV1200(Olympus)を用いて取得した。TRPY1:mGFP の液胞膜への局在化を液胞膜染色蛍光試薬の FM4-64 を用いて共染色して検討した。

#### 4. 研究成果

高浸透圧ストレスに応答して液胞から細胞質に  $\text{Ca}^{2+}$  を放出する出芽酵母液胞膜の陽イオンチャネル TRPY1 の活性制御因子を同定することを目的に、出芽酵母一遺伝子破壊株コレクション 5100 株にイクオリン遺伝子を導入して高浸透圧応答の低下する遺伝子破壊株の取得を目指した。

遺伝子破壊により、TRPY1 の遺伝子発現量が野生株と比較して低下している可能性も考えられるため、恒常的に TRPY1 遺伝子を発現させるベクターも遺伝子破壊株コレクションに導入した。一次スクリーニングでは、イクオリンアッセイの発光シグナルの下位 20% の遺伝子破壊株を候補として獲得した。次に、得られた候補株のイクオリン発現量をウェスタンブロット法により解析し、その値を一次スクリーニングにおけるイクオリン発光の値の規格化に用いた。その結果、値の低かった 379 株を二次スクリーニング後の候補株とした。さらに、遺伝子破壊によって TRPY1 の液胞膜局在性に異常が生じている可能性があるため、二次スクリーニングで得られた 379 株に TRPY1::mGFP 遺伝子を導入して TRPY1 の細胞内局在性の解析を行ったところ、TRPY1 の正常な液胞膜局在が観察されたのは 48 株のみであった。次に、これらの 48 株で破壊されていた遺伝子をクローニングして出芽酵母野生株に過剰発現させたところ、12 個の遺伝子導入株で野生株よりも強いイクオリン発光が観察された。12 個の遺伝子の中には、グルタチオン合成遺伝子が含まれており、これまでの TRPY1 研究において還元剤が TRPY1 を活性化させることが報告されていることから本スクリーニングが適切に行われたと考えられた。グルタチオン合成遺伝子を除いた 11 個の新規の制御因子候補の中には、複数の機能未知遺伝子が含まれていた。その中の一つの ECS1 (仮称) は、小胞体 (ER) 膜に発現する膜タンパク質であり、動物細胞におけるホモログタンパク質は ER 内の  $\text{Ca}^{2+}$  恒常性に関わっていることが報告されている。ECS1 と TRPY1 のタンパク間相互作用を検討するために、pET システムによる大腸菌発現系を用いて TRPY1 の細胞質領域である N 末端領域と C 末端領域の組換えタンパク質の作成を試みた。しかし、いずれも封入体が形成されてしまったため、pCold システムに変更して組換えタンパク質の発現を試みたところ、これらの可溶性画分への発現に成功した。これらの組換えタンパク質と ECS1 との相互作用をプルダウンアッセイを用いて検討したが、残念ながら相互作用は観察されなかった。

候補遺伝子産物の中に機能未知ではあるがミトコンドリアに局在化するものが複数個見出された。ER とミトコンドリアに局在化するタンパク質による TRPY1 の活性制御機構は、それらの機能が未解明であるために推測することが困難であった。近年、異なるオルガネラとオルガネラの相互作用により、オルガネラ間で脂質や  $\text{Ca}^{2+}$  のやり取りが行われていることが報告されている。それらのオルガネラ膜が接する箇所はオルガネラコンタクトサイトと称されており、出芽酵母では ER 膜とミトコンドリア膜のコンタクトサイト (ERMES)、液胞膜とミトコンドリアのコンタクトサイト (vCLAMP)、液胞膜と ER 膜のコンタクトサイト (NVJ) が知られている。これらのオルガネラコンタクトサイトはいずれも複数のタンパク質による複雑な複合体によって形成されている。これらのオルガネラコンタクトサイトを形成するタンパク質をコードする遺伝子の破壊株を用いてイクオリンアッセイを行い、オルガネラコンタクトサイトと TRPY1 活性の関係を検討した。その結果、vCLAMP の構成因子の Ypt7 の欠損株以外と NVJ の構成因子の欠損株では野生株と比較して大きな変化は見られなかった。ypt7 欠損株の液胞を蛍光染色試薬 FM4-64 で染色して共焦点顕微鏡で観察したところ、液胞が細かく分断されて形状に異常が見られた。このことから、ypt7 欠損株では液胞膜の TRPY1 以外の  $\text{Ca}^{2+}$  輸送体が正常に機能しないことにより、元々の液胞内の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度が低いことから TRPY1 による  $\text{Ca}^{2+}$  の放出量が低下したと推察された。一方で、ERMES を形成する 5 つの構成因子の欠損株ではいずれもイクオリン活性が低下した。液胞の形状に異常が見られるか各欠損株を共焦点顕微鏡を用いて観察したが、いずれの欠損株の液胞も野生株と形状に違いは見られなかった。

本研究のスクリーニングにより、複数個のミトコンドリア局在性機能未知タンパク質が TRPY1 の活性に関わっていること、ER に局在化する機能未知の ECS1、そして ER とミトコンドリアのオルガネラコンタクトサイトである ERMES が TRPY1 の活性制御に関わっている可能性が示唆された。今後は、本研究で見出された機能未知タンパク質の分子機能を明らかにすることにより、TRPY1 の活性制御がどのように行われているのか推察することが可能になると考えられる。また、それらのタンパク質と TRPY1 のタンパク間相互作用が存在するのか検討する必要がある。これまでに TRPY1 がヘテロ複合体を形成することは全く報告されておらず、オルガネラ膜に局在性を示すイオンチャネル研究の新たな境地を切り開ききっかけとなることが期待される

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Margherita Festa, Velia Minicozzi, Anna Boccaccio, Laura Lagostena, Antonella Gradogna, Tianwen Qi, Alex Costa, Nina Larisch, Shin Hamamoto, Emanuela Pedrazzini, Stefan Milenkovic, Joachim Scholz-Starke, Matteo Ceccarelli, Alessandro Vitale, Petra Dietrich, Nobuyuki Uozumi, Franco Gambale, Armando Carpaneto	4. 巻 6
2. 論文標題 Current Methods to Unravel the Functional Properties of Lysosomal Ion Channels and Transporters.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cells.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells11060921	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 該当する
1. 著者名 Sugawara Keita, Toyoda Hayato, Kimura Mami, Hayasaka Shunsuke, Saito Hiromi, Kobayashi Hiroshi, Ihara Kunio, Ida Tomoaki, Akaike Takaaki, Ando Eiji, Hyodo Mamoru, Hayakawa Yoshihiro, Hamamoto Shin, Uozumi Nobuyuki	4. 巻 478
2. 論文標題 Loss of cell wall integrity genes cpxA and mrcB causes flocculation in Escherichia coli	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical Journal	6. 最初と最後の頁 41 ~ 59
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1042/BCJ20200723	査読の有無 無
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 Masaru Tsujii, Kota Kera, Shin Hamamoto, Takashi Kuromori, Toshiharu Shikanai, Nobuyuki Uozumi	4. 巻 9 (1), 10040
2. 論文標題 Evidence for potassium transport activity of Arabidopsis KEA1-KEA6.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Report	6. 最初と最後の頁 なし
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-46463-7	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 Shun Amemiya, Hayato Toyoda, Mami Kimura, Hiromi Saito, Hiroshi Kobayashi, Kunio Ihara 3, Kiyoto Kamagata 4, Ryuji Kawabata 5, Setsu Kato, Yutaka Nakashimada, Tadaomi Furuta, Shin Hamamoto, Nobuyuki Uozumi	4. 巻 294 (33)
2. 論文標題 The mechanosensitive channel YbdG from Escherichia coli has a role in adaptation to osmotic up-shock.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 12281-12292
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA118.007340	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 上原千央, 柴田あすか, 浜本晋, 辻井雅, 石丸泰寛, 笠原紳, 魚住信之
2. 発表標題 ER 局在性陽イオン輸送体 Spo75 の欠損は酸化還元状態の乱れを引き起こす
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム 第53回研究報告会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 上原千央, 柴田あすか, 浜本 晋, 笠原 紳, 吉見 啓, 阿部敬悦, 高木智子, 永田典子, 魚住信之
2. 発表標題 酵母の 4 種類の Ca <sup>2+</sup> 輸送体の生理的役割
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 上原千央, 柴田あすか, 浜本晋, 笠原紳, 魚住信之
2. 発表標題 出芽酵母の Ca <sup>2+</sup> 輸送体 酵母 OSCAs によるストレス応答への寄与
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

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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