

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：34506

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K06647

研究課題名(和文) 真核細胞におけるポリリン酸の新奇な生理機能と制御系の探求

研究課題名(英文) Studies on novel physiological functions and regulatory mechanisms of inorganic polyphosphate in eukaryotes

研究代表者

武田 鋼二郎 (Takeda, Kojiro)

甲南大学・理工学部・教授

研究者番号：90426578

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)：リン酸が重合したポリマーであるポリリン酸(PolyP)の新奇な生理機能や制御機構について、分裂酵母*S. pombe*を材料として研究を行った。リン酸輸送体をふに制御することで、リン酸の細胞への取り込みを制限するユビキチンリガーゼPqr1に着目し、その遺伝子破壊株ではPolyPが液胞に過剰に蓄積すること、液胞に過剰に蓄積したPolyPは液胞内のタンパク質分解系を阻害することでオートファジー依存性タンパク質分解の異常を導くことを示した。この成果は、PolyPと飢餓誘導性オートファジー依存性タンパク質分解とのリンクを最初に指摘したものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PolyPは全ての生物が有すると言われているが、リン酸貯蔵体としての役割がある一方、血液凝固やエネルギー代謝への関与、疾病との関わり(筋萎縮性側索硬化症)、タンパク質PolyP化という翻訳後修飾の発見なども報告されている。PolyPは単なる貯蔵体を越えた生体分子ということになるが、まだ未発見の機能や制御系の存在が予想される。本研究では、PolyPとオートファジー依存性タンパク質分解との関係性を初めて指摘することができ、この点が本研究の意義の第一である。

研究成果の概要(英文)：We investigated the novel physiological functions and regulatory mechanisms of polyphosphate (PolyP), a phosphate polymer, using the fission yeast *S. pombe* as a model organism. Our study specifically focused on the ubiquitin ligase Pqr1, which regulates phosphate transporters to restrict phosphate uptake into the cell. In the pqr1 gene-deleted strain, PolyP accumulated excessively in the vacuole. Moreover, this excessive accumulation of PolyP interferes with vacuolar proteolytic systems, required for autophagy-dependent proteolysis. These findings provide the first evidence linking PolyP to autophagy-dependent proteolysis during starvation.

研究分野：細胞生物学

キーワード：ポリリン酸 リン酸 分裂酵母 オートファジー 静止期 栄養

## 1. 研究開始当初の背景

ポリリン酸 (PolyP) は、数個から数百の無機リン酸が重合した高分子であり、全ての生物が有すると言われている。PolyP にはリン酸貯蔵体としての役割がある一方、血液凝固やエネルギー代謝への関与、疾病との関わり (筋萎縮性側索硬化症)、タンパク質 PolyP 化という翻訳後修飾の発見なども報告されている。PolyP は単なる貯蔵体を越えた生体分子ということになるが、まだ未発見の機能や制御系の存在が予想される。特に、社会的な関心の深い多細胞動植物における PolyP の代謝や制御機構については知見が乏しく、特に、多細胞動植物の PolyP 合成酵素は未同定である。

単細胞真核生物である酵母 (出芽酵母) においては、PolyP の代謝機構については理解が進んでいる。液胞膜状の VTC 複合体が液胞内腔での PolyP 合成に関わり、Ppx1, Ppn1, Ppn2 といった酵素が PolyP の分解に関わることが明らかとなっている。しかしながら、PolyP 量の制御機構や、その必須機能については理解が完全ではない状況であった。

我々は、分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* の *pqr1*<sup>+</sup>(SPAC6B12.07c) 遺伝子破壊株 ( $\Delta pqr1$ ) を研究する過程で、 $\Delta pqr1$  株は細胞内に PolyP を過剰蓄積すること、過剰蓄積した PolyP が栄養飢餓時に必要なタンパク質分解によるアミノ酸リサイクルを未知の分子機構で阻害し、細胞寿命に悪影響を与えることを発見した。*pqr1*<sup>+</sup>は、SPX ドメインと RING finger を持つユビキチン(Ub)リガーゼをコードする。SPX は、細胞内のリン酸量のセカンドメッセンジャーと考えられている Inositol pyrophosphate (IPP) が結合するリン酸濃度センサーとして機能することが報告されている。Pqr1 は細胞膜に存在する高親和型リン酸輸送体 Pho84 を Ub 化し endocytosis によって取り込むことで、細胞外からのリン酸流入を適切に調節していることが、本研究開始時点で明らかとなっていた。 $\Delta pqr1$  では、リン酸輸送体を負に制御できない結果、リン酸取り込みの亢進と細胞内への PolyP 過剰蓄積が起こり、窒素源飢餓時に細胞寿命を維持できない。PolyP 過剰蓄積は、液胞内でのオートファジー依存的タンパク質分解を阻害することで細胞寿命に悪影響を与えることが強く示唆されるが、その分子機構は不明であり、PolyP の新奇生理機能が隠されている可能性は高いと考えられた。

## 2. 研究の目的

上記を背景として、本研究は以下の3つの問いに答えることを目的とした。すなわち、

- (1) PolyP の新奇生理機能の理解
- (2) PolyP 量の変化や異常に対する細胞応答の理解
- (3) PolyP に関わる新規遺伝子群の網羅的研究

## 3. 研究の方法

我々が取り扱いに習熟しているモデル生物である分裂酵母を材料として、上記の(1)~(3)の目的のそれぞれについて、以下のようなアプローチを取ることを、研究申請時に計画した。

### (1) PolyP の新奇生理機能の理解

「背景」に記載した、PolyP 過剰蓄積によって飢餓誘導性オートファジー依存的タンパク質分解に異常が認められる  $\Delta pqr1$  株を手掛かりとして、遺伝学的・細胞生物学的解析によって、どのような分子機構によって PolyP がオートファジーに影響するのか、を解明することを短期的な目的とした。オートファジーやオートファジー依存的タンパク質分解への関与は、PolyP の機能として報告されていない新奇なものである。

### (2) PolyP 量の変化や異常に対する細胞応答の理解

### (3) PolyP に関わる新規遺伝子群の網羅的研究

これらに関しては、「A: PolyP 量変化への細胞応答の全体像の理解」と「B: PolyP 過剰蓄積による致死性の抑圧変異のスクリーニング」という2つのアプローチを計画した。また、(3)の一環として「C: PolyP 量が減少/増加する遺伝子破壊株の同定」というアプローチも検討した。

### A: PolyP 量変化への細胞応答の全体像の理解

PolyP 過剰変異 ( $\Delta pqr1$ )、PolyP 過少変異 ( $\Delta vtc4$ ) を用いる。まず、様々な培養条件で、PolyP 量の過剰・過少が引き起こす異常 (生存率、増殖速度等) を検討する。特に PolyP の合成が必須となるような条件を明らかとすれば、そのような条件下においてトランスクリプトーム解析を行うことで、PolyP の存在が細胞にどのような影響を与えるか、について情報が得られる。その上で、発現が大きく変動する遺伝子を個別に解析する。

## B: PolyP 過剰蓄積による致死性の抑圧変異のスクリーニング

前述の通り、PolyP 過剰蓄積が窒素源飢餓時のオートファジー依存的タンパク分解の阻害を引き起こす機構は未知であり、理解することが出来れば PolyP の新しい生理機能や制御系を理解する手がかりが得られる。その為に、*Δpqr1* の致死性を抑圧する新たな遺伝子変異 (抑圧変異) の網羅的同定を行う。

## C: PolyP 量が減少/増加する遺伝子破壊株の同定

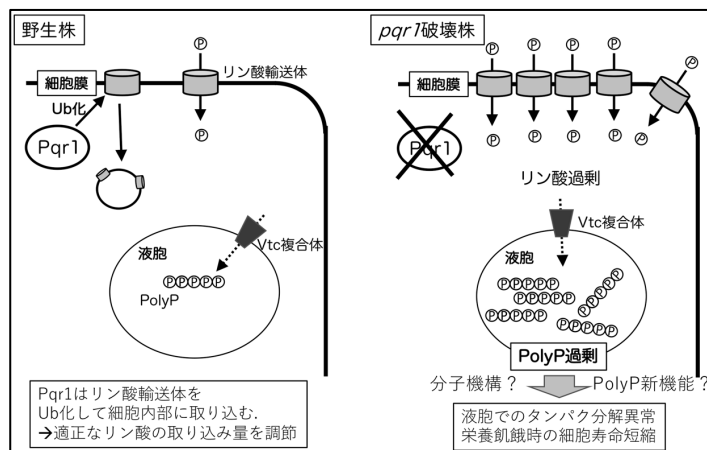
本研究期間内に、Bioneer 社の分裂酵母の非必須遺伝子破壊株ライブラリーを用いることができるようになったため、細胞内 PolyP 量が変動する遺伝子破壊株を同定する試みを行なった。

## 4. 研究成果

### (1) PolyP の新奇生理機能の理解

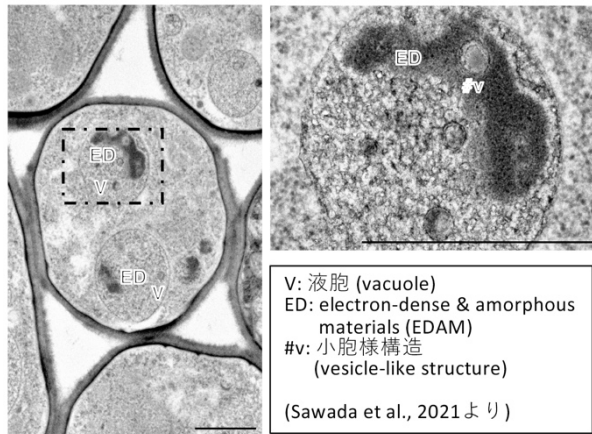
2021 年までの本研究によって、分裂酵母 *Pqr1* の解析を行い、その成果を *The Journal of Biological Chemistry* 誌に発表した (Sawada, et al. JBC. 2021)。この論文で明らかとされたことは、PolyP とオートファジー依存的なアミノ酸リサイクルとの間のリンクを示したことであり、本研究の主要な成果の一つである。論文の概要は以下の通りである。

分裂酵母 *Pqr1* は、リン酸濃度センサーと言われる SPX ドメインを有する RING finger 型の Ub ligase であり、分裂酵母の主要なリン酸取り込み因子である *Pho84* を Ub 化しそのエンドサイトーシスによる細胞内取り込みを促進することで、分裂酵母細胞のリン酸取り込みを制限している。*Pqr1* 機能欠損は、細胞内への過剰なリン酸取り込みと、それに引き続く、液胞内への PolyP 過剰蓄積 (Vtc 複合体に依存) を引き起こす。液胞内での PolyP 過剰蓄積は、細胞の窒素源感知やオートファジー機構の発動には影響しないが、液胞内に取り込まれたオートファゴソーム内容物の分解を阻害する。そのため、PolyP 過剰蓄積は、窒素源枯渇条件においては液胞内タンパク分解によるアミノ酸リサイクルを損なう結果、致命的な効果を持つ (図 1)。PolyP 過剰蓄積が起こる細胞においては、液胞内のタンパク質分解酵素の成熟 (液胞プロテアーゼは適切に切断されることで活性化する) に異常をきたすことが、本研究によって明らかとなった。



(図 1) *Pqr1* によるリン酸取り込み制御の破綻と PolyP 過剰蓄積の効果

*Pqr1* 機能欠損によって、PolyP が過剰蓄積し、タンパク質分解が阻害された液胞内においては、電子顕微鏡解析では電子密度の高い不定形の構造 (EDAM, electron-dense and amorphous material) が観察された (図 2)。EDAM が過剰蓄積した PolyP を反映しているのか、取り込まれた細胞質成分が分解されずに異常凝集したものなのか、現時点では不明であるが、液胞内の PolyP の生理的な役割を理解する上で重要なのではないかと我々は考えている。



(図2) Pqr1 欠損細胞の液胞に形成される不定形の構造

- (2) PolyP 量の変化や異常に対する細胞応答の理解
- (3) PolyP に関わる新規遺伝子群の網羅的研究

(2) (3) の目標のためにとったアプローチ A と B は、本研究の期間内には論文発表などの成果をあげることが出来なかった。

#### A: PolyP 量変化への細胞応答の全体像の理解

*Δpqr1* においては、PolyP が過剰となり、その結果としてオートファジー依存性的アミノ酸リサイクル異常と飢餓条件での細胞生存率の低下という表現型が観察されるが、これは「異常」時に発生する事象であり、通常の状況下での PolyP の生理機能を反映するものとは限らない。PolyP の役割を理解するためには、PolyP 合成が損なわれる際に起こる異常を見出す必要があると考えられる。そのため、野生株と VTC 複合体 (PolyP 合成酵素) の遺伝子破壊株を用いてそのような条件を探索したが、生理的な条件では見つからなかった。ただし、他の遺伝子破壊と組み合わせると VTC 複合体の存在が細胞の生存に必須となることを見出し、現在、その結果を含む論文を投稿中である。

#### B: PolyP 過剰蓄積による致死性の抑圧変異のスクリーニング

*Δpqr1* は、PolyP 過剰蓄積によるオートファジー依存性的タンパク質分解の異常によって、窒素源枯渇下においては速やかに生存率を低下させる。この表現型を利用して、抑制変異を取得し遺伝解析を行うことを計画した。小規模なスクリーニングを実施したが、窒素源枯渇条件での培養を長期間行っても *Δpqr1* の生存率低下は数%程度までにとどまった。窒素源除去と窒素源再添加を繰り返すなどして、より顕著に生存率を低下させる条件を検討したが、抑制変異スクリーニングを効率的に行えるような条件を見つけるに至らなかった。

#### C: PolyP 量が減少/増加する遺伝子破壊株の同定

Bioneer 社の分裂酵母の非必須遺伝子破壊株ライブラリーを用いて、PolyP 量が野生株と比べて顕著に増加あるいは減少する遺伝子破壊株を同定するための方法について探索的研究を行った。細胞内 PolyP 量を定量するためには、現在のところ、細胞をフェノール存在化で破壊、抽出液中の核酸成分を分解したのち PolyP を精製し、その後、強酸あるいは PolyP 分解酵素で加水分解して、リン酸をマラカイトグリーン法で定量する、という方法がある。この方法は、数千ものサンプル数の網羅的スクリーニングには向かないため、別の方法を試行した。

まず、これまでの研究の経過から、細胞内の PolyP 量は細胞中の総リン酸量の大部分を占めるため、PolyP 量≒総リン酸量となることがわかっている。そのため、PolyP 量が増加する変異株では、総リン酸量が大きく変動するのではないかと考えた。細胞内総リン酸量の定量は、細胞全体を 1 M の硫酸で処理し、細胞内のリン酸化合物を加水分解して抽出したリン酸の量を測定することで求めることができるため、PolyP 定量と比べて簡易である。しかしながら、細胞の培養を 96 wells plate で行なって、細胞の洗浄と加水分解処理までを効率的に行うための試行錯誤に、現状では止まっており、成果を得るには至らなかった。

別の PolyP 定量法として、細胞内 PolyP を蛍光染色し、蛍光強度によって定量する方法があ

る。この路線では、すでに他生物種で報告された方法を分裂酵母に応用し、DAPIあるいはPolyP結合タンパク質を用いて細胞内 PolyP を染色することには成功している。網羅的スクリーニングを実施するには至っていないが、分裂酵母細胞内 PolyP の可視化については論文報告を検討している。

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 Sawada N, Ueno S, Takeda K.	4. 巻 297
2. 論文標題 Regulation of inorganic polyphosphate is required for proper vacuolar proteolysis in fission yeast	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Biol Chem	6. 最初と最後の頁 100891
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbc.2021.100891	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17件（うち招待講演 3件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 西村智貴、佃楓音、駒村灯智、武田鋼二郎
2. 発表標題 分裂酵母pqr1xpr1の高リン酸濃度超感受性の多コピー抑圧因子の探索
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム第55回研究報告会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤山佳穂、野瀬夏鈴、佃楓音、武田鋼二郎
2. 発表標題 分裂酵母におけるポリリン酸の必須性の検討
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム第55回研究報告会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大久保一敬、高堂将広、西村智貴、駒村灯智、松本智裕、武田鋼二郎
2. 発表標題 分裂酵母Xpr1依存的なリン酸排出活性
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム第55回研究報告会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kojiro Takeda
2. 発表標題 Where 's Wally? Seeking polyphosphate synthases and related proteins of higher eukaryotes by yeast genetics
3. 学会等名 iCeMS Seminar (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 西村智貴、佃楓音、駒村灯智、武田鋼二郎
2. 発表標題 分裂酵母SPXドメインタンパク質によるリン酸恒常性維持
3. 学会等名 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤山佳穂、野瀬夏鈴、佃楓音、武田鋼二郎
2. 発表標題 分裂酵母におけるポリリン酸の必須性の検討
3. 学会等名 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大久保一敬、高堂将広、西村智貴、駒村灯智、松本智裕、武田鋼二郎
2. 発表標題 分裂酵母Xpr1依存的なリン酸排出はリン酸恒常性維持を介して正常な細胞増殖に寄与する
3. 学会等名 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 西村智貴、紙谷竜馬、興梠佑里香、武田鋼二郎
2. 発表標題 分裂酵母におけるリン酸源枯渇時のポリリン酸関連因子の役割
3. 学会等名 第54回酵母遺伝学フォーラム研究報告会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 武田鋼二郎、澤田尚哉、大内慧太、野瀬夏鈴
2. 発表標題 分裂酵母SPX-RING型E3リガーゼPqr1によるリン酸取り込み制限の必須性
3. 学会等名 第54回酵母遺伝学フォーラム研究報告会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 武田鋼二郎
2. 発表標題 分裂酵母の経時寿命におけるポリリン酸量制御の重要性
3. 学会等名 国立遺伝学研究所研究集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kojiro Takeda, Naoya Sawada, Shiori Ueno
2. 発表標題 Regulation of intracellular level of polyphosphate and survival in cellular quiescence
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2020年



1. 発表者名 澤田 尚哉、上野 菜里、武田 鋼二郎
2. 発表標題 分裂酵母の経時寿命維持におけるポリリン酸量制御の重要性
3. 学会等名 第9回TOR研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kojiro Takeda
2. 発表標題 SPX-RING ubiquitin ligase Pqr1 regulates intracellular levels of phosphate and polyphosphate, ensuring proper autophagic proteolysis
3. 学会等名 10th International Fission Yeast Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 澤田尚哉、上野菜里、太田圭佑、紙谷竜馬、羽原ひな、興相佑里香、武田鋼二郎
2. 発表標題 分裂酵母の経時寿命維持におけるポリリン酸制御の重要性
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 澤田尚哉、上野菜里、神崎さやか、武田鋼二郎
2. 発表標題 リン酸取り込み制御に関わるE3リガーゼPqr1欠損が引き起こすオートファジー依存的タンパク質分解異常
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 澤田尚哉、上野菜里、神崎さやか、武田鋼二郎
2. 発表標題 リン酸取り込み制御に関わるE3リガーゼPqr1欠損が引き起こすオートファジー依存的タンパク質分解異常
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 武田鋼二郎
2. 発表標題 分裂酵母の経時寿命におけるポリリン酸量制御の重要性
3. 学会等名 関西学院大学理工学部講演会（招待講演）
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

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