

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：15201

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22283

研究課題名(和文)生存戦略としての単細胞生物の細胞死のメカニズム

研究課題名(英文)Cell death of single cell organism as a survival strategy

研究代表者

川向 誠(KAWAMUKAI, MAKOTO)

島根大学・学術研究院農生命科学系・教授

研究者番号：70186138

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文): 分裂酵母のura4遺伝子破壊株の細胞溶解のメカニズムを調べることを目的とした。ウラシルの枯渇が細胞溶解を誘導する主要因であり、細胞内に前駆体OMPが蓄積し、細胞内ではそれが引き金になっていると考えている。細胞溶解を抑圧する遺伝子変異のスクリーニングを行なった結果、サブレッサーの中にade6とade7変異体が含まれていた。Ade6はIMP合成の6段階目の反応を触媒し、Ade7は次の反応を触媒する。ade6とade7変異体では、いずれもポリリボシルアミノイミダゾールが蓄積することで赤色を呈することで知られており、UMP合成とIMP合成の共通の化合物が細胞溶解に影響していると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は分裂酵母を用いた単細胞生物における「細胞死」について焦点を当てた研究である。分裂酵母ura4欠損株はペプトンの存在下で、定常期に達すると劇的に細胞が溶解する。この時、細胞は単に死んでいるという状況ではなく、細胞が破裂したように劇的に溶解する。この現象は細胞が栄養源を枯渇した際には自身を溶解させ、内容物を放出し、一部の生存した細胞に栄養を提供することにより、集団としての生き残りをかけた生存戦略だと捉えることができる。このような現象は、細胞が生き残るために、長い年月をかけて発達させた仕組みとして、生物の生存戦略を理解する上で意義のある研究だと考えている。

研究成果の概要(英文): The mechanism by which cell lysis is induced in *Schizosaccharomyces pombe* ura4 mutants lacking uracil synthesis was investigated in this study. Cell lysis was induced when uracil was consumed in any media tested. Under the condition that induced cell lysis, a precursor OMP was significantly accumulated, that might be a trigger of cell lysis. When we screened the mutants that suppress cell lysis, we found lack of ade6 or ade7 clearly suppressed cell lysis in *S. pombe* ura4 mutants. These mutants involve de novo biosynthesis of IMP, suggesting the relevance of UMP synthesis and IMP synthesis, which share the common precursor.

研究分野：微生物遺伝学

キーワード：分裂酵母 細胞溶解 ウラシル アデニン 核酸合成 *S. pombe*

1. 研究開始当初の背景

分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* の *ura4* 遺伝子破壊株をポリペプトン含有培地である YPD 培地において培養することで劇的な細胞溶解が起こることを発見し、報告している (Matsuo, Y., *et al* PLoS ONE 2013)。この現象は細胞壁の一部、特に隔壁が弾け、その箇所より細胞の中身が流出する現象として観察することができる。その際に OMP という URA4 の基質となる前駆体物質が蓄積していく。この細胞溶解は、出芽酵母の *URA3* (*ura4* 遺伝子ホモログ) 破壊株では、観察されず OMP の蓄積も観察されないことから、分裂酵母に特異的に観察された。この細胞溶解を抑圧する変異体を探索したところ Pub1 (E3 ライゲース) がウラシルトランスポーターの局在制御に関わることを見出した (Nishino, K., *et al* PLoS ONE 2015)。ウラシルの枯渇条件が緩和されると細胞溶解は抑制される方向になり、ウラシルの枯渇が進行すると細胞溶解が促進される。さらに、細胞溶解は培地成分の中でも特に尿素が誘導を促進することを報告している (Nishino, K., *et al* B.B.B. 2017)。この時に尿素の効果は、アンモニアの濃度の変動が影響していると考えている。本研究では、この分裂酵母 *ura4* 遺伝子欠損株で観察される細胞溶解現象のさらなる解析を行なうことで、単細胞生物の生存戦略としての細胞溶解現象を理解しようとしている。しかしながら、細胞内では何がトリガーとなってどこに作用することによって細胞溶解が引き起こされるのか、なぜこのような仕組みを分裂酵母は有しているかなど、不明な点が多々残っている。

2. 研究の目的

本研究は分裂酵母を用いた「細胞死」について焦点を当てた研究である。分裂酵母 *ura4* 欠損株はペプトンの存在下で、定常期に達すると劇的に細胞が溶解する。この時、細胞は単に死んでいるという状況ではなく、細胞が破裂したように劇的に溶解する。この現象は細胞が栄養源を枯渇した際には自身を溶解させ、一部の生存した細胞に栄養を提供することにより、集団としての生き残りをかけた生存戦略だと捉えることができる。細胞溶解現象は、他種の *S. japonicus* においても観察されることから、細胞溶解は *Schizosaccharomyces* 属特異的な現象である。そこで、本研究ではこの細胞溶解現象のメカニズムを理解することを目的としている。

3. 研究の方法

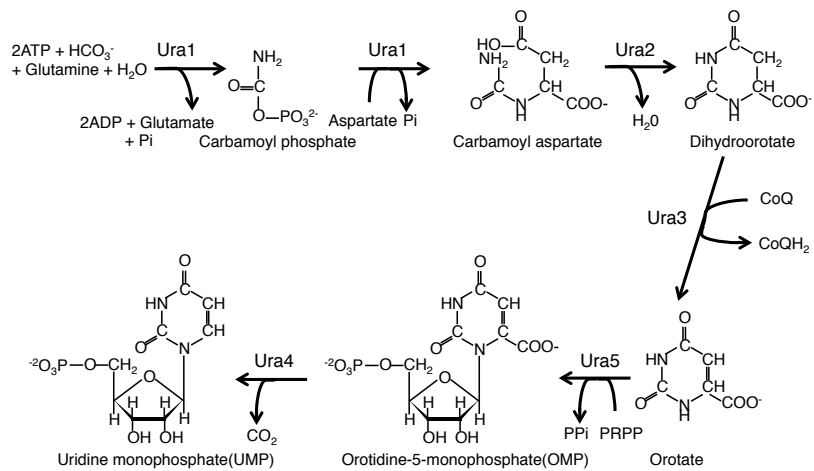
分裂酵母の扱い、遺伝子破壊株の作製や遺伝子クローニングはこれまでに報告しているスタンダードな方法で行なった。YPD, YES, PM 培地成分の組成は、すでに報告されている方法で行なった (Moreno *et al.* Method Enzymol. 1991)。化合物の測定は LC-MS (Xevo-TQS) を用いて行なった。アルカリフォスファターゼ活性は、先に報告した方法に従って行なった (Matsuo, Y., *et al* PLoS ONE 2013)

4. 研究成果

分裂酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) の *ura4* はマーカ遺伝子として広く使用されているが、分裂酵母の *ura4* 遺伝子の欠損株は、ウラシル要求性を示すことのみならず、5-Fluorotic acid に耐性を持つことが知られている。Ura4 タンパク質は *de novo* UMP 合成経路において、Orotidine-5-monophosphate (OMP) を

脱炭酸反応により Uridine-5-monophosphate (UMP) に変換する OMP デカルボキシラーゼであり、新生 UMP 合成の最後の反応を担う酵素である (右図)。

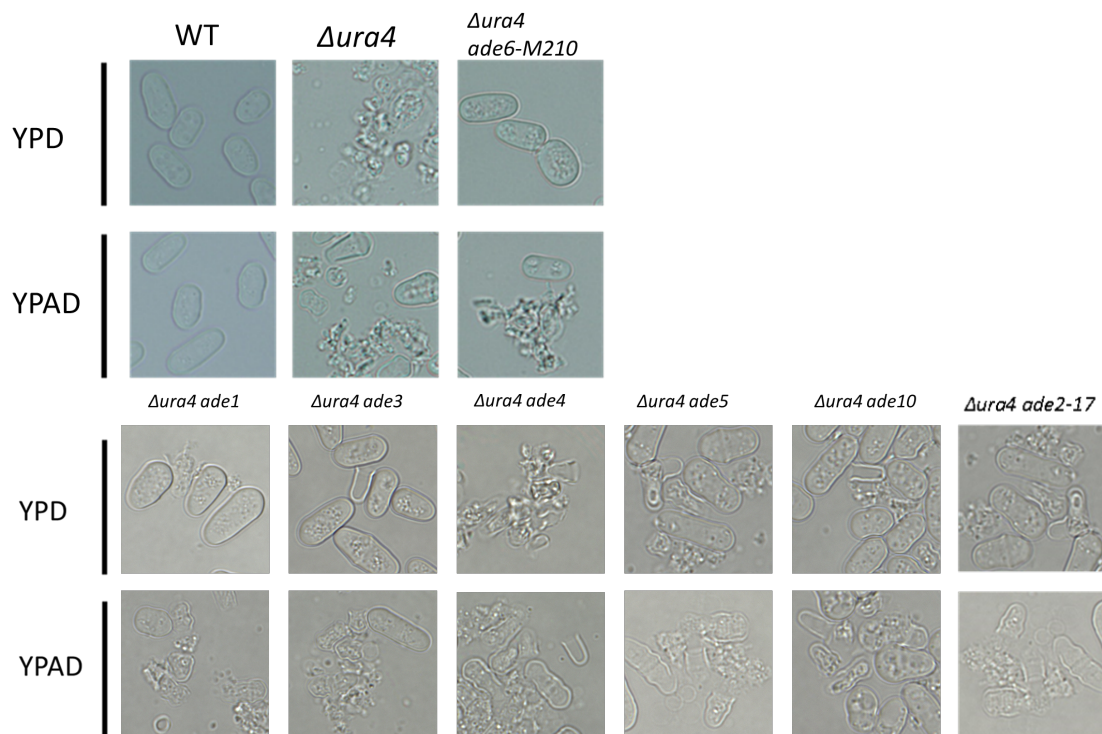
この経路に位置する酵素 (Ura1, Ura2,



Ura3, Ura4, Ura5) の遺伝子破壊株は細胞外より取り込んだウラシルより UMP を合成する経路により、ウラシル添加することにより生育が可能である。しかしながら、細胞溶解が見られるのは *ura4* 遺伝子破壊株特異的な現象で、他のウラシル要求性株では観察されない。また、*ura4* 遺伝子と他の *ura* 遺伝子の二重遺伝子破壊株を作製した場合細胞溶解が抑圧される。細胞溶解の様子をカルコフラワーで、細胞壁染色試薬を用いて詳細に解析した。すると、細胞壁の一部が弾けて細胞壁が欠損する箇所がセプタムや細胞の先端付近という細胞壁合成が活発に行われている部分であることが明らかになった。また、浸透圧調節剤であるソルビトールを添加することで物理的に細胞溶解を抑圧することができた。

この現象を詳細に解析するために、非必須遺伝子破壊株のライブラリー3,400株を用いて細胞溶解が抑圧される因子の探索を行なった。これらの遺伝子破壊株のライブラリー元来 *ura4* に変異が導入されているため、これらの株を YPD 培地で培養し、アルカリフォスファターゼの酵素活性を評価することにより細胞溶解の程度を調べた。その結果、複数の株で細胞溶解が抑圧されることを見出した。その中の1つ Pub1 に関してはすでに解析を行い論文発表している (Nishino, K., *et al* PLoS ONE 2015)。

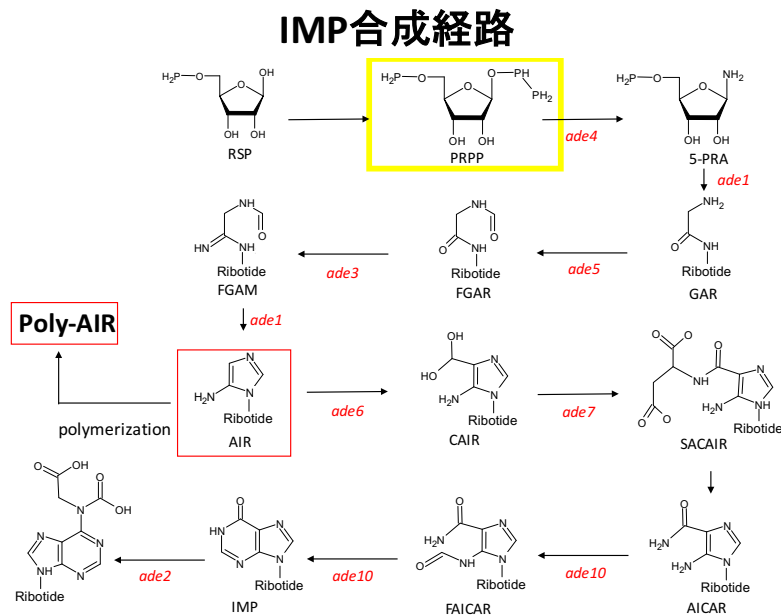
一連の過程で、アデニン要求性株が細胞溶解を抑圧することを見出した。分裂酵母の *ura4* 欠損株で *ade6-M210* の変異を持つ株が、YPD培地での細胞溶解を抑圧し、YPAD培地では細胞溶解を起こしている結果を得た。アデニン要求性を示す変異体はIMP合成に欠損があることが大部分である。そこで、アデニンの要求性と細胞溶解抑圧現象に関連があると考え、*ade1*, *ade2-17*, *ade3*, *ade4*, *ade5*, *ade6-M26*, *ade6-M216*, *ade6-M375*, *ade7-L465*, *ade10* と *ura4* 欠損株の2重変異体を作製し、細胞の観察を行った。その結果 *ade6-M26*, *ade6-M216*, *ade6-M375*, *ade7-L465* の変異を持つ株では、アデニン添加の有無に関わらず、細胞溶解を抑圧した。



Ade6 は、IMP合成の6段階目の反応を触媒し、5-アミノイミダゾールリボシドの炭素化反応を触媒し、Ade7は次の反応を触媒する。*ade6*と*ade7*変異体では、ポリリボシルアミノイミダゾールが蓄積することで赤色を呈することで知られ

ていることから、この化合物の蓄積が細胞溶解に影響している可能性が考えられた。次に、LC-MSを用いて酵母細胞内の代謝物を測定した。予備的な結果としてOMPの蓄積が、細胞溶解をする株では見られるのに対して、溶解が抑制される株では、OMPの蓄積が現象していた。

ピリミジンの *de novo* 合成経路とプリン合成経路が共通の化合物PRPP (ホスホリボシルピロリン酸) を用いていることから、この化合物を介して、OMPの合成に影響した可能性が推測される。



本研究は単細胞集団の「生存戦略」を「細胞死」の観点から、分裂酵母を用いて推進したものである。本研究の発端は、ウラシル合成に必須な Ura4 を欠損した分裂酵母はウラシルが枯渇すると、劇的に細胞が溶解することを発見したことに始まる。この時、分裂酵母は単に収縮して死んでいるわけではなく、破裂して内容物を放出して劇的に細胞溶解している。この現象は細胞が栄養源を枯渇した際に、自身を溶解させ、一部の生存した細胞に栄養を提供することで、細胞集団としての生き残るための生存戦略だと捉えることができる。つまり、1つ1つの細胞が死んでも、他の細胞に栄養を分け与えて種を保存するための生存戦略である。高等動物におけるアポトーシス死があるが、単細胞生物では、生存を賭けた積極的な「細胞死」の仕組みがあると考えている。細胞溶解する主要因は、細胞内に取り込むウラシル量の枯渇にあり、細胞内では OMP が蓄積する。この OMP の蓄積が回避できると細胞溶解は避けられる。出芽酵母の *URA3* 破壊株では OMP が蓄積していないことや、出芽酵母では UMP の代謝にミトコンドリアの酵素を必要としないことから、ミトコンドリアの関与が少ない生物であることが違いを生んでいると考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Tanabe Takuma, Yamaga Masayuki, Kawamukai Makoto, Matsuo Yasuhiro	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 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 Biosci Biotechnol Biochem	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 Shin-ichi Inamura, Takuma Tanabe Makoto Kawamukai Yasuhiro Matsuo	4. 巻 -
2. 論文標題 Expression of Mug14 is regulated by the transcription factor Rst2 through the cAMP-dependent protein kinase pathway in Schizosaccharomyces pombe.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Current Genetics	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) なし	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 章 佳君、河野 真歩、深町 拓紀、松尾 安浩、川向 誠
2. 発表標題 分裂酵母の接合過程を亢進させる優性変異
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 岩崎雅史, 戒能智宏, 松尾安浩, 川向 誠
2. 発表標題 分裂酵母 ura4 変異体の細胞溶解現象とアデニン要求性との関連
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度中四国支部大会
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
研究分担者	松尾 安浩 (MATSUO YASUHIRO) (70596832)	島根大学・学術研究院農生命科学系・准教授 (15201)	

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