

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：11301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2021

課題番号：19K23656

研究課題名(和文)高浸透圧下における出芽酵母グリセロール輸送体のグルコース誘導性不活性化制御機構

研究課題名(英文)The study of glucose-induced inactivation of glycerol transporters under hyperosmotic conditions in yeast.

研究代表者

藤田 翔貴(Fujita, Shoki)

東北大学・農学研究科・助教

研究者番号：70845099

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文):モデル生物であり、発酵産業上有用な微生物である出芽酵母のグリセロール輸送体(Stl1)の分解機構を明らかにすることを旨とした。酵母をはじめとする真核細胞はグルコース(ブドウ糖)存在下では、グルコース資化を優先するためか、資化性が低い糖類などの輸送体を積極的に分解している。グリセロールは、高浸透圧環境下で細胞が生命活動を維持するために重要な役割を果たしている一方で、グルコースによって不活性化されることも知られている。本研究を通して、Stl1のグルコース依存的な分解に必要な領域を同定した。また、意外なことにStl1の分解は浸透圧の変化によって誘導されないことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞(原形質)膜上には、栄養源や分子の取り込みや排出を担う輸送体や環境外のシグナルを感知する受容体が存在し、それらの種類や量を調節することで、外界や細胞内の環境変化に適応している。必要な輸送体や受容体を合成する正制御に対して、不要なものを選択的に除去する負の制御の理解は遅れている。本研究では、グルコースというシグナル入力に対する輸送体分解制御機構において、最上流かつ最重要と考えられる''いかにして標的である輸送体選択的に認識しているのか''、その一般性を提唱するために重要な知見を得られた。

研究成果の概要(英文): In the adaptation to chaotic environmental changes, endocytic degradation of plasma membrane transporters and receptors plays a pivotal role in controlling the nutrient uptake rate and signal sensing. In eukaryotic cells, the studies of endocytic internalization of plasma membrane transporter have been pioneered by employing *S. cerevisiae*. Glycerol uptake and intracellular synthesis are critical role in the adaptation for high osmotic stress. Yeast glycerol transporter STL1, however, is strongly repressed by glucose-induced carbon catabolite repression. In this study, I revealed the region in Stl1 C-tail requisite to be recognized by the regulator (adaptor protein-ubiquitin ligase complex) of the ubiquitin conjugation and degradation of Stl1. In addition, Stl1 degradation is not induced by osmotic change, although it is rapidly induced in the presence of glucose.

研究分野：応用微生物学

キーワード：出芽酵母 輸送体 エンドサイトーシス ユビキチン グルコース抑制 浸透圧

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

哺乳類をはじめとするほとんどの生物は、地球上に大量に存在するグルコースを優先的に炭素源として資化する。細胞内に取込まれたグルコースは解糖系でエネルギー(ATP)とピルビン酸へと変換され、さらにミトコンドリアで好氣的なエネルギー生産に利用される。一方で、古来より発酵産業において利用してきた微生物である出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は、グルコース存在下では、好気条件下でもアルコール発酵によるエネルギー生産が優先される。それゆえ、グリセロールや乳酸といった非発酵性炭素源(呼吸基質)下で生育(呼吸によるエネルギー生産)していた酵母がグルコースに遭遇すると、呼吸基質の細胞内への取込みやそれらの資化経路を速やかに停止する。高浸透圧条件下で発現が誘導されるグリセロール輸送体 Stt1 もこの負の制御の対象であり、たとえ高浸透圧下であっても、グルコース依存的に分解される。しかしながら、なぜ高浸透圧というある種のストレス条件下において、リスクを伴うような制御を選択(高浸透圧へ適応するための手段の1つの放棄)するのか、その意義は明らかではない。

また、原形質膜上に多数存在する輸送体の分解は、輸送体のユビキチン化によって誘導されるエンドサイトーシスを介して起こる。近年、出芽酵母において輸送体のユビキチン化はユビキチンリガーゼ Rsp5 により触媒され、ARTs (Arrestin-Related Trafficking adaptors) ファミリーと呼ばれる α -アレスチンタンパク質群を含む 14 種類のタンパク質が標的タンパク質と Rsp5 のアダプターとして機能し、ユビキチン修飾を制御していることが明らかになってきた。一方で、多岐にわたる外界環境の変化に適応するためには、10 程度のアダプターにより多様な原形質膜タンパク質(レセプターも含め少なくとも 100 種以上)が画一的に制御されているとは考えにくい。アダプターによる標的膜タンパク質の認識・選別機構の全容は未だ解明されていない。

2. 研究の目的

本研究では、Stt1 のグルコース依存的な分解と浸透圧変化に応答した 2 つの分解シグナルのクロストーク制御を明らかにすることを目指した。複数のシグナル入力による原形質膜輸送体のクロストーク制御の解析例はほとんどないため、原形質膜上の輸送体やレセプターの総数に対して非常に少数であるアダプターが、どのように膜タンパク質を正確かつ選択的に認識し、除去しているのか、その機構の一端を理解できることを期待し、研究を遂行した。

3. 研究の方法

緑色蛍光タンパク質(GFP)を融合した Stt1 の部位欠損変異体やアミノ酸残基置換変異体を用いて、Stt1 の細胞膜上からの除去・分解が遅延する領域を探索した。また、グルコースによって分解が誘導されないメチオニン輸送体に Stt1 の一部を結合させた変異体を作製し、グルコース存在下での安定性を解析した。これらの実験を通して、Stt1 の分解に必要な領域の同定を試みた。

4. 研究成果

(1) Stt1 のグルコース依存的な分解制御機構

これまでの研究で、 α -アレスチン Rod1 がグルコースシグナル制御下で、Stt1 やモノカルボン酸輸送体 Jen1 のユビキチン化を制御していることを明らかにしてきた。現在までに、Jen1 の C 末端領域が分解調節領域として機能しており、グルコース依存的に Rod1 による認識を受け、近傍のリジン残基がユビキチン化されることを明らかにしてきた。そこで、まず初めに、Rod1 依存的な輸送体認識機構の理解を深めることを目的として、Rod1 による Stt1 の認識やそれに伴うユビキチン修飾に着目し解析を行った。本実験では、グルコースのシグナル入力のみの影響を解析したいため、Stt1 の誘導は乳酸を単一炭素源(分解を誘導するグルコースや Stt1 の輸送基質であるグリセロールを含まない条件)とした培地で行った(図 1、2)。まず、Stt1 の N 末端と C 末端領域の部分欠損体を作製し解析を行ったところ、Stt1 の C 末端領域(Stt1 C-tail)の部分欠損体でグルコース依存的な分解が抑制された(図 1)。さらに、Stt1 のグルコース依存的な分解は、Stt1 C-tail 中に存在しているリジン残基を同じく正の電荷を帯びる塩基性アミノ酸であるアルギニン残基に置換したところ、膜からの除去が抑制された(図 2)。

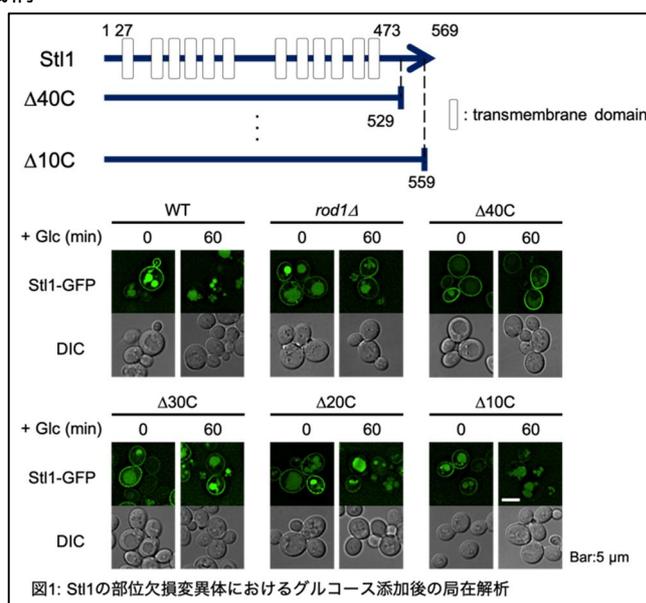


図1: Stt1の部位欠損変異体におけるグルコース添加後の局在解析

また、エンドサイトーシスが著しく抑制される *VRP1* 欠損株を用いることで、本来は分解の対象となるユビキチン化された Stl1 の検出を試みたところ、529 番目のリジン基置換変異体では、Stl1 のユビキチン化が阻害されていることが明らかになった(図2)。さらに、ユビキチン付与に必要なリジン残基周辺のアミノ酸に着目したところ、酸性アミノ酸を含む F532GE 配列への変異導入によって抑制されることが明らかとなった(図2)。以上の結果より、Stl1 C-tail は Rod1 による認識部位とユビキチン化部位を内包していることが示唆された。

これまでに、申請者の研究を含む先行研究によって、メチオニン輸送体 Mup1 はグルコースおよび Rod1 によって分解が誘導されないことが明らかになって

いる。本研究では、Mup1 に Stl1 の一部を結合させた変異体 Mup1-Stl1C を作製し、グルコースの有無による原形質膜上での安定性を検証した。その結果、野生型の Mup1 はグルコースの存在に依存せず、原形質膜上に局在する一方で、Stl1 の C 末端領域を付加させることで、Mup1 はグルコース依存的に分解されることが明らかになった。ゆえに、Rod1 は Stl1 の C 末端領域に結合し、ユビキチン化を行なっていることが示唆された(図3)。

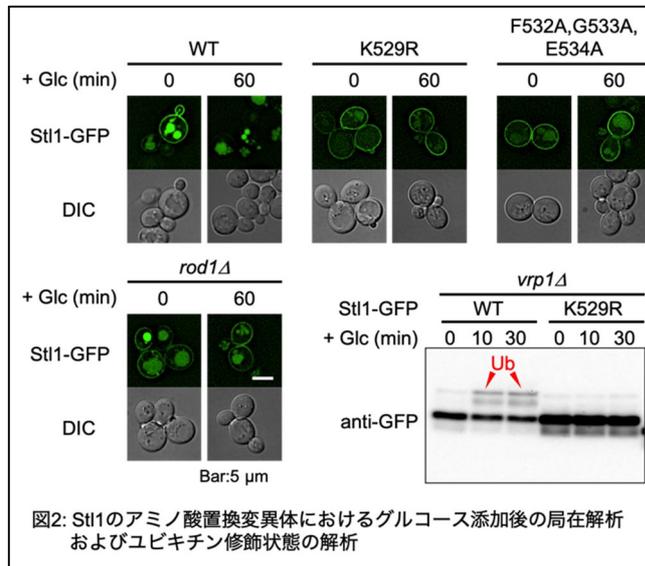


図2: Stl1のアミノ酸置換変異体におけるグルコース添加後の局在解析およびユビキチン修飾状態の解析

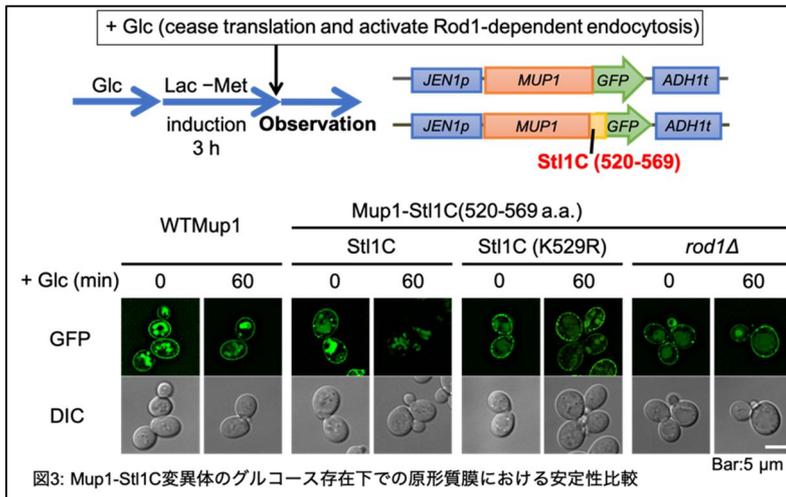


図3: Mup1-Stl1C変異体のグルコース存在下での原形質膜における安定性比較

(2) Stl1 の浸透圧依存的な分解制御機構

一方で、Stl1 のプロモーターをメチオニン濃度で制御可能な *MET25* プロモーターを利用することで、グルコース非存在下で Stl1-GFP の発現を誘導し、メチオニン添加により遺伝子発現を停止させた後に、浸透圧依存的な分解を観察した。遺伝子発現停止(メチオニン添加)後、NaCl を添加することで高浸透圧ストレスを与えた結果、グルコースや輸送基質であるグリセロール存在下では分解が誘導された(シグナル依存的分解と基質取込に伴う構造変化によって誘導される分解)。その一方で、一定時間が経過しても Stl1 は安定であった。先行研究によって、STL1 の遺伝子発現は NaCl による高浸透圧ストレスを与えると、一時的に *STL1* mRNA 量が増加し、経時的(浸透圧変化に適応した後)に mRNA 量が減少していくことが報告されている。一方で、タンパク質レベルでは高浸透圧条件に対する適応が完了しても、グルコースが存在しないと分解が誘導されないことが初めて明らかになった。

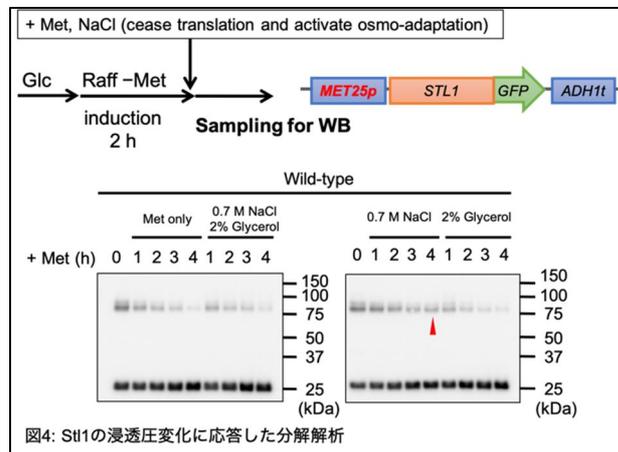


図4: Stl1の浸透圧変化に応じた分解解析

(3) Std1 が高浸透圧下においてもグルコースによって分解される意義

Std1 の発現は高浸透圧への適応する手段の一つである一方で、高浸透圧下であってもグルコースによって分解が促進されることも報告されている。そこで、Std1 が分解されないことで生じる細胞へ不利益(Std1 がグルコース依存的に分解される意義)を検証するため、1)の研究を通して取得した原形質膜上に安定して局在する Std1 変異体と野生株を用いて、いくつかの浸透圧ストレス条件(いずれもグルコースを含む)下での生育比較を行なった。しかしながら、本研究を通して検証した条件下では生育に優位な差は認められなかった。原因として、原形質膜上に存在する小孔であるアクアグリセロポリンの機能の関与が考えられる。アクアグリセロポリンはグリセロールを細胞外へ排出する役割を担っており、Std1 変異体発現株は、アクアグリセロポリンの存在量を増加させることで、Std1 変異体を介したグリセロールの必要以上の取り込みを緩和しているのではないかと予想している。そのため、目立った生育差が認められなかったのではないかと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 藤田翔貴 五味勝也 新谷尚弘
2. 発表標題 出芽酵母グリセロール輸送体Stt11のグルコース不活性化に必要な -アレスチンRod1によるStt11認識領域の探索
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021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
---------	---------