

機関番号：14301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20380187

研究課題名（和文）メタボリックストレスによる細胞極性の破綻と増殖停止の分子機序

研究課題名（英文）Molecular mechanism of the collapse of cell polarity and arrest of cell growth by metabolic stress

研究代表者

井上 善晴（INOUE YOSHIHARU）

京都大学・大学院農学研究科・准教授

研究者番号：70203263

研究成果の概要（和文）：

メチルグリオキサール（MG）は解糖系から生成する普遍的な代謝物である。出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を MG で処理すると、細胞内でホスファチジルイノシトール(3,5)ビスリン酸レベルが上昇することを見いだした。さらに、MG 処理によりアクチンパッチの脱極性化とともに、核分配が阻害され、細胞分裂が停止することを見いだした。MG による核分裂阻害は、Pkc1 の構成的活性化変異体（Pkc1-R398P）を導入することにより部分的に抑制された。一方、MG は Cdc28 の Tyr19 を Swe1 依存的にリン酸化することを見いだすと同時に、Swe1 を欠損させることによっても MG による核分裂阻害が部分的に抑制されることを明らかにした。さらに、*swe1Δ*株に Pkc1-R398P を導入することで、MG による核分裂阻害の抑制に関して相加的な効果が観察された。

研究成果の概要（英文）：

Methylglyoxal (MG) is a natural metabolite derived from glycolysis. We found that the treatment of *Saccharomyces cerevisiae* cells with MG increases the intracellular levels of phosphatidylinositol (3,5) bisphosphate. We also found that MG depolarizes actin cytoskeleton, thereby inhibiting the nuclear division of *S. cerevisiae* cells. The MG-induced depolarization of actin cytoskeleton was repressed by the expression of a constitutively active allele of *PKC1* (Pkc1-R398P), and consequently, the nuclear division was partially restored. We also found that MG induces the phosphorylation of Tyr19 of Cdc28 in a Swe1-dependent manner. The disruption of *SWE1* partially alleviated the inhibitory effect of MG on the nuclear division. The expression of Pkc1-R398P in *swe1Δ* cells caused the additive effect in terms of alleviation of the MG-induced inhibition of nuclear division.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|------------|-----------|------------|
| 2008年度 | 6,700,000 | 2,010,000 | 8,710,000 |
| 2009年度 | 4,200,000 | 1,260,000 | 5,460,000 |
| 2010年度 | 4,200,000 | 1,260,000 | 5,460,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 15,100,000 | 4,530,000 | 19,630,000 |

研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学・応用分子細胞生物学

キーワード：酵母、代謝、ストレス、細胞分裂、極性成長、ホスファチジルイノシトール

1. 研究開始当初の背景

解糖系はすべての生物にとって普遍的な

エネルギー獲得機構であると同時に、あらゆる代謝の根幹を成す。栄養条件は細胞の増殖

を保証する最も重要なファクターの一つであるが、解糖系の過程で、典型的な2-オキソアルデヒドであるメチルグリオキサール (MG、 CH_3COCHO) が生成する。MG は一分子内にケト基とアルデヒド基をもつため反応性に富み、MG の代謝異常と糖尿病、ある種のガン、アルツハイマー病、自閉症などの種々の疾患との関連も指摘されている。しかしながら、MG の代謝異常 (MG レベルの上昇) がそういった疾患の原因なのか、あるいは結果なのかは明らかになっていない。その最大の原因は、MG がそういった疾患との関連において引き起こす細胞応答と、その分子メカニズムの実態が明らかにされていないことにある。

私はこれまでに、酵母をモデル生物として、MG の細胞内機能について解析を行ない、その代謝制御と、それに関わる遺伝子の発現制御機構の詳細を明らかにしてきた (*JBC*, 271, 25958-25965, 1996; *JBC*, 273, 2977-2983, 1998)。また、DNA マイクロアレー解析の結果から、MG 代謝異常株では細胞内 MG レベルが上昇し、転写因子 Yap1 が活性化していることを見いだした。さらに、MG による Yap1 の活性化機構の詳細を明らかにするとともに、MG による Cys 残基の新奇な修飾機構を見いだした (*MCB*, 24, 8753-8764, 2004)。

一方、細胞外 MG が二成分制御系を介して p38-MAP キナーゼ系を活性化することを明らかにした (*JBC*, 280, 253-260, 2005; *JBC*, 280, 36708-36713, 2005; *JBC*, 281, 9086-9092, 2006)。さらに、MG 代謝酵素が欠損した変異株では MG による p38-MAP キナーゼのリン酸化状態が長く継続することを見だし (*JBC*, 281, 9086-9092, 2006)、その原因が p38 を脱リン酸化するチロシンホスファターゼの MG による阻害に起因することを明らかにした (*BBRC*, 363, 942-947, 2007)。また、MG は細胞外 Ca^{2+} イオンの細胞内への一過的な流入を誘導し、 Ca^{2+} /カルモジュリン依存性プロテインホスファターゼ (カルシニューリン) の活性化を引き起こすことを見いだした (*JBC*, 280, 253-260, 2005)。これらのことから、細胞内外の MG はシグナル伝達系活性化のイニシエーターとして機能していることが明らかとなり、代謝物によるシグナル伝達=メタボリックシグナリング=という概念を提唱するに至った。

メタボリックシグナリングの概念をさらに発展させるため、平成 17-19 年度の科学研究費補助金 (基盤研究 B、メタボリックシグナリング:解糖系代謝中間体によるシグナル伝達の意義とメカニズム、代表:井上善晴) を受けて、MG が引き起こす種々の細胞応答機構について解析を進めた。その結果、高濃度の MG は酵母を含むあらゆる細胞に致死的に作用することは以前から知られていたが、

非致死量の低濃度の MG は可逆的に酵母の増殖を停止させることを見いだした。さらにその解析の過程で、MG はホスファチジルイノシトール代謝を変動させることを見いだした。すなわち、MG 感受性変異株をスクリーニングしたところ、ホスファチジルイノシトール代謝、とくにホスファチジルイノシトール (3,5) ビスリン酸 ($\text{PtdIns}(3,5)\text{P}_2$) 合成に関わる遺伝子の欠損株が多く取得された。また、MG 処理によって $\text{PtdIns}(3,5)\text{P}_2$ レベルの上昇が見られたことから、 $\text{PtdIns}(3,5)\text{P}_2$ は MG に対する細胞応答に重要な役割を果たしていることが予想された。

2. 研究の目的

本研究では、出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) をモデル生物として用い、MG による $\text{PtdIns}(3,5)\text{P}_2$ 代謝変動の分子機構、ならびに細胞増殖阻害機構についての分子機構を明らかにすることを目的として研究を行った。前者については、 $\text{PtdIns}(3,5)\text{P}_2$ の合成や分解に関わる因子の欠損変異株を用いることで、細胞内での $\text{PtdIns}(3,5)\text{P}_2$ レベルの変動を解析することを目的とした。後者については、出芽酵母は極性成長細胞のモデルとしても用いられていることから、極性成長に重要なアクチンの局在性と、核分裂に焦点をあて、MG による細胞極性への影響と、細胞増殖の関係を明らかにすることを試みた。

3. 研究の方法

(1) ホスファチジルイノシトールの分析
 ^3H 標識した myo-イノシトールを酵母に取り込ませてホスファチジルイノシトール分子種を分離し、デアシル化した後に HPLC で分析した (*Methods*, 20, 465-473, 2000)。

(2) アクチン染色

アクチンの染色にはローダミン-ファロイジンを、核の染色には Hoechst 33342 を用い、蛍光顕微鏡を用いて観察した。

(3) 細胞内タンパク質の局在観察

GFP、あるいは DsRed を付加したタンパク質を発現させ、蛍光顕微鏡を用いてそれぞれのタンパク質の細胞内での局在性を観察した。

4. 研究成果

(1) MG による $\text{PtdIns}(3,5)\text{P}_2$ レベルの制御

MG 処理により $\text{PtdIns}(3,5)\text{P}_2$ レベルが上昇した。 $\text{PtdIns}(3,5)\text{P}_2$ の合成は Fab1 によるが、 $\text{PtdIns}(3,5)\text{P}_2$ に作用するホスファターゼとして、Fig4、Inp52、Inp53 が知られている。そこで、これらの遺伝子の破壊株を構築し、MG 処理による $\text{PtdIns}(3,5)\text{P}_2$ レベルの変動について検討を行った。その結果、*inp52Δinp53Δ* 二重破壊株では $\text{PtdIns}(3,5)\text{P}_2$ のベースのレベルの上昇が観察され、MG 処理により顕著に

PtdIns(3,5) P_2 レベルの上昇が観察された。一方、*fig4* Δ 株では MG による PtdIns(3,5) P_2 レベルの上昇が観察されなくなった。また、*inp52* Δ *inp53* Δ *fig4* Δ 株では、PtdIns(3,5) P_2 のベースレベルの上昇は認められるものの、MG による PtdIns(3,5) P_2 レベルの上昇は観察されなくなった。Fig4 は PtdIns(3,5) P_2 に対するホスファターゼとして機能すると同時に、Vac7、Vac14 とともに Fab1 の活性化因子として機能することが知られている。従って、MG は Fig4 を介して Fab1 の活性に影響を与え、結果的に PtdIns(3,5) P_2 レベルの上昇を引き起こしていると考えられた。

(2) MG によるアクチンの脱極性化

出芽酵母は出芽により増殖を行う。すなわち、母細胞から娘細胞が出芽し、それが成長し、やがて娘細胞が母細胞から切り離される。このように、成長の方向性は母細胞から娘細胞に向かっており、そこに極性が生じる。細胞の極性維持に重要な役割を果たしている因子の一つにアクチンがある。酵母においてアクチン重合体は大きく分けて2つの構造に分類される。すなわち、アクチンパッチとアクチンケーブルである。アクチンパッチは、出芽初期には芽（娘細胞）に集積する。

高濃度の MG 処理は細胞死を引き起こすのに対し、中低濃度の MG 処理は、可逆的な細胞増殖阻害を引き起こすことをわれわれの研究グループでは既に明らかにしている (JBC, 280, 253-260, 2005; FEMS Microbiol. Lett. 243, 87-92, 2005)。そこで、中低濃度の MG による細胞増殖の阻害時におけるアクチン極性について検討を行った。その結果、出芽酵母を MG で処理すると、芽に集積していたアクチンパッチは、約 30 分で細胞全体に拡散し、細胞は極性を失うことを見いだした。アクチンパッチの極性維持には低分子量 G タンパク質 Rho1 が重要な役割を果たし、その機能的下流には C キナーゼである Pkc1 が位置している。そこで、Rho1 や Pkc1 の活性化変異体 (Rho1-Q68L や Pkc1-R398P) 導入株における MG によるアクチンパッチの極性変化について検討を行った。その結果、これらの変異体では MG によるアクチンパッチの脱極性化が抑制されることを見いだした。

(3) MG による核分裂阻害

中低濃度の MG 処理により細胞増殖が阻害された酵母細胞の核を Hoechst 33342 で染色して蛍光顕微鏡で観察したところ、芽（娘細胞）が十分に成長しているにもかかわらず、娘細胞へ核が移行していない細胞が蓄積していることを見いだした。そこで、染色体分配のための重要なマシナリーであるスピンドル極体 (SPB、動物細胞の中心体に相当) を、SPB 構成タンパク質に DsRed タグを付加

して蛍光顕微鏡を用いて観察したところ、M 期終期 (telophase) の状態にまで芽が成長しても、SPB が娘細胞に移動できないことを見いだした。この時、その他のオルガネラ (小胞体、ミトコンドリア、液胞) は娘細胞に輸送されていたことから、核の分配のみが特異的に阻害されていることが明らかとなった。そこで、その原因について詳細に解析を行った結果、Myo2 と astral microtubule 結合タンパク質 (Bik1、Bim1) のアダプタータンパク質である Kar9 の SPB における非対称分布の崩壊と、それに伴う SPB の配向性の乱れによることを明らかにした。

MG により極性成長が阻害され、それと同時に SPB の娘細胞への移行と核分裂が阻害されたことから、MG 処理により G2/M 期で細胞周期が停止している可能性が示唆された。そこで、細胞周期進行に重要な役割を果たすサイクリン依存性プロテインキナーゼ Cdc28 の活性状態を検討した。その結果、MG 処理により Cdc28 の Tyr19 がリン酸化された。またそのリン酸化は、*swel* Δ 株では起こらなかった。一方、本研究において、Pkc1 の構成的活性化変異体 Pkc1-R398P の導入株では、MG によるアクチンの脱極性化が抑制されることを見いだしていることから、MG による核分裂阻害と Pkc1 との関与について検討を行った。その結果、Pkc1-R398P の導入により MG による核分裂阻害が部分的に抑制された。これらのことから、Cdc28 と Pkc1 がパラレルに MG による核分裂阻害に関与することが強く示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計5件)

- ① Inoue, Y., Maeta, K. and Nomura, W. (2011) Glyoxalase system in yeasts: Structure, function, and physiology. *Seminars in Cell & Developmental Biology — Cell Biology of Glyoxalase in Microbial System and Human Disease* (eds. Thornalley, P. J. and Rabbani, N.), vol. 22, pp. 278-284. (査読有)
- ② Takatsume, Y., Ohdate, T., Maeta, K., Nomura, W., Izawa, S., and Inoue, Y. (2010) Calcineurin/Crz1 destabilizes Msn2 and Msn4 in the nucleus in response to Ca²⁺ in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical J.* 427 (2), 275-287. (査読有)
- ③ Nomura, W., Maeta, K., Kita, K., Izawa, S., and Inoue, Y. (2010) Methylglyoxal activates Gcn2 to phosphorylate eIF2 α

independently of the TOR pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 86 (6), 1887-1894. (査読有)

- ④ Ohdate, T., Izawa, S., Kita, K., and Inoue, Y. (2010) Regulatory mechanism for expression of *GPX1* in response to glucose starvation and Ca^{2+} in *Saccharomyces cerevisiae*: Involvement of Snf1 and Ras/cAMP pathway in Ca^{2+} signaling. *Genes Cells* 15 (1), 59-75. (査読有)
- ⑤ Nomura, W., Maeta, K., Kita, K., Izawa, S., and Inoue, Y. (2008) Role of Gcn4 for adaptation to methylglyoxal in *Saccharomyces cerevisiae*: methylglyoxal attenuates protein synthesis through phosphorylation of eIF2 α . *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 376 (4), 738-742. (査読有)

[学会発表] (計7件)

- ① 野村 亘、井上善晴. 「ホスホリパーゼ C と TORC2 を介した PKC 制御機構の解析」第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会・合同大会、2010 年 12 月 10 日、神戸
- ② 野村 亘、喜多恵子、井沢真吾、井上善晴. 「Role of TORC2 in activation of MAPK in yeast」第 32 回日本分子生物学会年会、2009 年 12 月 10 日、横浜
- ③ 野村 亘、喜多恵子、井沢真吾、井上善晴. 「Plc1 を介した Pkc1-Mpk1 シグナル伝達系の活性化機構」第 42 回酵母遺伝学フォーラム、2009 年 7 月 30 日、つくば
- ④ 野村 亘、前田和宏、喜多恵子、井沢真吾、井上善晴. 「出芽酵母におけるホスホリパーゼ C を介した Pkc1-Mpk1 経路の新奇活性化機構」(Involvement of phospholipase C in methylglyoxal-induced activation of the Pkc1-Mpk1 MAPK pathway in the budding yeast) 第 61 回日本細胞生物学会合同大会、2009 年 6 月 4 日、名古屋
- ⑤ 橋本真希、野村 亘、喜多恵子、井沢真吾、井上善晴. 「解糖系代謝物メチルグリオキサールによる jellybeans 型の核形態変化」日本農芸化学会、2009 年度大会、2009 年 3 月 29 日、福岡
- ⑥ 野村 亘、喜多恵子、井沢真吾、井上善晴. 「スピンドル極体の配向形成における PtdIns(3,5)P₂ の役割」(Role of PtdIns(3,5)P₂ in determination of the orientation of spindle pole body in yeast) BMB2008-第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会、2008 年 12 月 9 日、神戸
- ⑦ 野村 亘、前田和宏、喜多恵子、井沢真

吾、井上善晴. 「メチルグリオキサールによる Kar9 の SPB への非対称分布の崩壊」第 41 回酵母遺伝学フォーラム、2008 年 9 月 10 日、北海道

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井上 善晴 (INOUE YOSHIHARU)
京都大学・大学院農学研究科・准教授
研究者番号：70203263

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者