

平成 22 年 6 月 15 日現在

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20770167
 研究課題名(和文) 増殖静止期の核恒常性維持に関与するユビキチン・プロテアソーム経路因子の解明
 研究課題名(英文) Research on factors of the ubiquitin/proteasome system required for maintaining the nuclear homeostasis in the quiescence
 研究代表者 武田 鋼二郎 (TAKEDA KOJIRO)
 独立行政法人沖縄科学技術研究基盤整備機構・研究員
 研究者番号：90426578

研究成果の概要(和文)：分裂酵母をモデル生物として増殖静止期の細胞生存維持におけるタンパク質分解の重要性を研究した。ユビキチン/プロテアソーム系とオートファジーという細胞内の主要なタンパク質分解システムは、有害な酸化ストレスの蓄積から、静止期特異的に細胞を協調して守っている事がわかった。酸化ストレスの蓄積は核やミトコンドリアに顕著であり、これらの細胞内小器官の質的な維持にタンパク質分解系が深く関わっていることが予想される。

研究成果の概要(英文)：By adopting the fission yeast as a model organism, we studied essential roles of proteolysis systems in the maintenance of quiescent cells. We conclude that the ubiquitin/proteasome system and autophagy protect quiescent cells from lethal accumulation of oxidative stress. Oxidative stress are highly accumulated in the nucleus and mitochondria, suggesting that the proteolysis systems are deeply engaged in quality control of these organelles.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,800,000	540,000	2,340,000

研究分野：分子生物学、細胞生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：G0期 タンパク質分解 プロテアソーム オートファジー ミトコンドリア 酸化ストレス 寿命

1. 研究開始当初の背景

多細胞生物を構成する細胞のほとんどは細胞周期から逸脱し増殖を停止した状態、すなわち静止期(G0期)にある。また単細胞生物も、自然界では栄養源の制限等からほとんどが静止期にあると考えられる。このため、静止期の維持機構、静止期と増殖期の遷移の

制御機構は、医学的/生物学的に重要な課題であり近年注目を集めている。我々は分裂酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)をモデル生物として静止期の維持機構の解明に取り組んでいる。

2. 研究の目的

本研究では増殖期維持におけるユビキチン／プロテアソーム経路の役割に注目し、関連因子を解明する事を目標とした。静止期におけるプロテアソームの阻害が核形態、機能の維持に破綻をきたすという予備的な結果を得ていたため、プロテアソームと核機能の関連に注目した。

3. 研究の方法

分裂酵母は通常の培地から窒素源を除去する事で容易に静止期に誘導する事ができる。この静止期の状態で野生株では数ヶ月以上生存する事が可能であり、さらに窒素源を再添加することで増殖期へ復帰させる事が可能である。この分裂酵母の性質と、我々が構築して来た温度感受性変異株ライブラリを用いて遺伝学的実験が静止期においても可能である。具体的には、プロテアソームを構成するサブユニットの条件変異株、E1 ユビキチン活性化酵素 (E1)、E2 ユビキチン共役酵素 (E2)、E3 ユビキチン連結酵素 (E3) の遺伝子破壊株や条件変異株を我々は所持している。これらを利用した遺伝学的なアプローチを主に採用した。静止期において、これらのユビキチン／プロテアソーム経路の因子を阻害し、致死となるものを選択する。さらにその致死の原因を、光学顕微鏡、電子顕微鏡を用いた観察、質量分析機を用いたプロテオーム、メタボロームなどの網羅的解析によって明らかにすることを試みた。静止期維持におけるプロテアソームの基質の同定は、より深い制御機構の理解に欠かせないと考えられる。網羅的に基質を同定するために、ユビキチン化されたタンパク質を簡便かつ効率的に精製する手法の開発も並行しておこなった。

4. 研究成果

(1) 静止期でのプロテアソーム失活が引き起こす現象

静止期でユビキチン／プロテアソーム依存的タンパク質分解を阻害する為に、E1 の条件致死変異株 ptr3-1 とプロテアソームの条件致死変異株 mts3-1 及び pad1-932 を用いた。これらは低温(26°C)では生育に問題ないが高温 (37°C) では各タンパク質の機能が阻害される。各変異株を静止期に誘導してから温度をシフトし、E1 とプロテアソームの活性を阻害すると、24 時間後では役 40%、72 時間後ではほぼ 0%まで生存率が低下した。この結果は静止期においてもユビキチン／プロテアソーム依存的タンパク質分解がなんらかの必須機能を担っていることを示している。さらに細胞学的解析から静止期でのプロテアソームの阻害は、(a) 酸化ストレスの細胞内での蓄積、(b) ミトコンドリアの劇的な減少、(c) 核内への凝集物の蓄積や異常な小胞様構造の形成、という多面的な表現型を引き

起こす事が明らかとなった。さらに質量分析機を利用したプロテオーム解析からは、静止期でのプロテアソーム阻害が(a)ミトコンドリアタンパク質の劇的な減少、(b)主に酸化ストレスによって誘導されるストレスタンパク質の増大、が確認された。これらは先に述べた細胞学的な知見とよく一致する結果である。さらにメタボローム解析によって、静止期のプロテアソーム変異体では抗酸化活性を持つ化合物である、グルタチオンやエルゴチオネインが顕著に蓄積していることが明らかとなった。以上の結果は、静止期でのプロテアソームの失活は酸化ストレスの増大をもたらす事を示している。さらに、ミトコンドリアは酸化ストレスの主要な発生源である事、プロテアソーム変異体でのミトコンドリア異常を併せて考慮すると、静止期ではプロテアソームがなんらかの形でミトコンドリアの機能に関与している事が示唆された

(2) ミトコンドリアの劇的な減少のメカニズム

静止期でのプロテアソーム失活が引き起こすミトコンドリアの劇的な減少のメカニズムを探索する過程で、ミトコンドリアの減少がセリンプロテアーゼの阻害剤である PMSF によって阻害される事が明らかとなった。分裂酵母では PMSF は液胞 (リソソームに相当) でのタンパク質分解を阻害する事はわかっていたため、ミトコンドリアも液胞内で分解される事が予想された。細胞質のタンパク質やオルガネラを液胞内で分解するには、これらを液胞へと輸送するオートファジーと呼ばれる機構が必須である。細胞質成分が隔離膜と呼ばれる脂質二重膜で取り囲まれ、オートファゴソームと呼ばれる小胞に取り込まれる。オートファゴソームはその後に液胞と融合し内容物が液胞に取り込まれて分解される。我々は、静止期でのミトコンドリア分解がオートファジーに依存しているのではないかと考え、オートファゴソーム形成に必須な Atg8 遺伝子の破壊株を作成した。プロテアソーム変異と Atg8 遺伝子破壊株の二重変異株では、静止期にプロテアソームを阻害してもミトコンドリアは全く分解されなかったため、我々は静止期のミトコンドリア分解はオートファジーによるものと結論した。

(3) 静止期におけるミトコンドリア分解の意義

何故、静止期にプロテアソームを阻害するとオートファジーによってミトコンドリアが分解されなければならないのだろうか？ プロテアソームとオートファジーの二重変異株 (以下、mts3 Δatg8) はプロテアソーム単

独の変異株 (mts3) よりも、非常に早く生存率を低下させた。この際、mts3 Δ atg8 変異株では酸化ストレスの蓄積が非常に顕著であった。抗酸化剤である N-acetyl cysteine (NAC) を培養液に添加する事で mts3 Δ atg8 の致死性は緩和された。酸化ストレスは主にミトコンドリアに蓄積していた。ミトコンドリアが酸化ストレスの主要な発生源であることを併せて考えると、これらの結果は、オートファジーによるミトコンドリアの分解は酸化ストレスの増大に対応する細胞の防御機構のひとつであることが示唆される。静止期においてはプロテアソームは何かの形でミトコンドリアの機能維持に関与し、その破綻は酸化ストレスの産生亢進をもたらす。この事態に対応して、オートファジーは酸化ストレスの発生源であるミトコンドリアを分解することで、酸化ストレスの致死的な蓄積を防止している。以上のようなプロテアソームとオートファジーの協調関係が静止期の生存維持に必要な等ではないかと考えられる。

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 4 件)

(1) 武田鋼二郎

分裂酵母静止期細胞におけるプロテアソームとオートファジーに協調：ミトコンドリア品質管理と寿命維持
細胞工学 29, 429-430, 2010 査読無し

(2) Takeda, K and Yanagida, M

In quiescence of fission yeast, autophagy and the proteasome collaborate for mitochondrial maintenance and longevity
Autophagy 掲載予定, 2010 査読無し

(3) Takeda, K., Yoshida, T., Kikuchi, S., Nagao, K., Kokubu, A., Oluskal, T., Villar-Briones, A., and Yanagida, M.

Synergistic roles of the proteasome and autophagy for mitochondrial maintenance and chronological lifespan in fission yeast
Proc Natl Acad Sci USA, 107(8), 3540-3545, 2010 査読有り

(4) Sajiki, K., Hatanaka, M., Nakamura, T., Takeda, K., Shimanuki, M., Yoshida, T., Hanyu, Y., Nakaseko, Y., and Yanagida, M.

Genetic control of cellular quiescence in *S.pombe*
J Cell Sci, 122(9), 1418-1429, 2009 査読有り

[学会発表] (計 8 件)

主要なもののみ記載

(1) 武田鋼二郎

タンパク質分解系の協調によるミトコンドリア品質管理と寿命維持—分裂酵母をモデルとしたアプローチ—
京都大学医学部老年内科学セミナー, 2010 年 4 月 23 日, 京都大学(招待講演)

(2) Kojiro Takeda

Mitochondrial regulations and the maintenance of *S.pombe* cells under limited nutrient condition
The 3rd Workshop on transcriptional and signaling network of lifestyle related diseases, Kamakura, 2010 年 2 月 20 日

(3) Kojiro Takeda

The proteasome and autophagy system cooperatively contributes to the maintenance of G0 phase by reducing cellular oxidative stress
4th International Workshop on Cell Regulations in Division and Arrest, Okinawa, Japan, 2009 年 11 月 29 日-12 月 3 日

(4) Kojiro Takeda

The proteasome and autophagy system cooperatively contributes to the maintenance of G0 phase by reducing cellular oxidative stress
The 5th International Fission Yeast Meeting, 2009 年 10 月 26-31 日, 東京

(5) Kojiro Takeda

The quality control of mitochondria is achieved by Ub/proteasome and autophagy in fission yeast G0 phase, 8th J-mit meeting, 2008 年 12 月 18 日, 東京女子医科大学 (招待講演)

(6) 武田鋼二郎

The quality control of mitochondria is achieved by Ub/proteasome and autophagy in fission yeast G0 phase

The 31st annual meeting of the Molecular Biology Society of Japan, 2008 年 12 月 9-12 日、神戸

(7) Kojiro Takeda

The selective degradation of mitochondria is induced by ubiquitin/proteasome dysfunction in fission yeast G0 phase, EUROMIT7, 2008 年 6 月 11-14 日, スtockホルム

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計◇件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

研究成果が 2010 年 2 月に、沖縄タイムズ、
京都新聞、読売新聞で報道された。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

武田 鋼二郎 (TAKEDA KOJIRO)
独立行政法人沖縄科学技術研究基盤整備
機構・研究員
研究者番号：90426578

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

