

令和 6 年 6 月 8 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20H02894

研究課題名（和文）酵母の呼吸代謝から発酵への転換におけるグルコース不活性化の総合理解

研究課題名（英文）Comprehensive understanding of glucose inactivation in the conversion from respiratory metabolism to fermentation in yeast

研究代表者

新谷 尚弘（Shintani, Takahiro）

東北大学・農学研究科・教授

研究者番号：70374973

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,400,000円

研究成果の概要（和文）：発酵に用いられる酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は炭素源の種類により、「発酵」と「好気呼吸」の間で代謝を大きく転換させる。好気呼吸から発酵へ転換される際、グルコースによって糖新生経路が不活性化される。代謝酵素に加えて、乳酸輸送体、酢酸輸送体、コハク酸-フマル酸輸送体が不活性化されることが新たに分かった。さらに、グルコース刺激に応答して不活性化される Gal2（ガラクトース輸送体）、Hxt6（高親和性グルコース輸送体）のエンドサイトーシスに必要なアミノ酸残基を明らかにした。膜輸送体の分解を担う液胞のバイオジェネシスにおける SNARE タンパク質 Ykt6 の役割を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞は栄養源などの外界シグナルに応答し、細胞のリモデリングを行って新たな環境に適応している。リモデリングは細胞成分の合成と分解の平衡によって成り立つ。本研究では、酵母の人類社会における最も重要な役割であるアルコール発酵に着目し、非発酵期から発酵期への転換におけるリモデリングをタンパク質分解に焦点を当てて解析した。糖新生経路における化合物の変換に加え、物質の移動を制御することにより適応する姿が明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：The yeast *Saccharomyces cerevisiae* used in fermentation undergoes a major metabolic shift between “fermentation” and “aerobic respiration” depending on the type of carbon source. During the transition from aerobic respiration to fermentation, glucose inactivates the glycolytic pathway. In addition to metabolic enzymes, lactate transporters, acetate transporters, and succinate-fumarate transporters are newly found to be inactivated. Furthermore, amino acid residues required for endocytosis of Gal2 (galactose transporter) and Hxt6 (high-affinity glucose transporter), which are inactivated in response to glucose stimulation, were identified. The role of SNARE protein Ykt6 in the biogenesis of vacuoles responsible for degradation of membrane transporters was clarified.

研究分野：応用微生物学

キーワード：出芽酵母 グルコース不活性化 エンドサイトーシス ユビキチン化 輸送体 液胞 転写因子

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞は外界環境にตอบสนองして、代謝経路や細胞構造を含む細胞の構成成分を最適化することで恒常性を保っている。特に、単細胞の微生物にとって栄養源の変化に対する適応は最重要課題と言える。外界の栄養を必要量取込み、足りないものは自ら合成する。これらの調節は、取込み輸送体や代謝酵素のアロステリック効果や翻訳後修飾を介した活性調節のほか、それらの量的な調節によっても行われる。「量」は合成と分解の総和であり、合成量と分解量の協調的な調節によって決まる。しかしながら、量の調節は長らく合成量の調節(特に遺伝子の転写調節)によって説明されており、分解調節に関する理解は遅れていた。

本研究で扱う酵母 *Saccharomyces cerevisiae* (以下、酵母)は、長きに渡りアルコール発酵に用いられてきた。グルコース、フルクトース、マンノースなどの発酵性炭素源があると、酸素が存在していてもエタノール発酵が優先的に起こり、呼吸や他の炭素源の取込みや代謝は抑制される。グルコースを炭素源とする標準的な培地で酵母を培養すると、グルコースの枯渇に伴い生育が一旦停止するが、発酵によって生成したエタノールを炭素源として生育を再開する。発酵から呼吸への転換期には、グルコース枯渇に伴い活性化する転写因子 Cat8 の制御下で、エタノール、酢酸、脂肪酸、乳酸、ピルビン酸からの糖新生に関わる遺伝子の転写が一気に活性化される。逆に呼吸期の培養にグルコースを添加すると、これら遺伝子の転写は素早く抑制される。興味深いことに、これらの遺伝子産物の中にはグルコースにตอบสนองしてタンパク質分解系で除去されるものもあり、合成系と分解系の迅速で且つ協調的な制御によって発酵と呼吸の切り替えを調節していると考えられる。現在まで、その分解系としてユビキチン-プロテアソーム系(UPS)、エンドサイトーシス、選択的オートファジー経路が報告されている。UPS では、ユビキチンリガーゼとして GID (glucose induced degradation) 複合体や SCF-Ucc1 複合体に関わる経路が知られている(Chen et al., 2017; Nakatsukasa et al., 2015)。申請者は、原形質膜上で乳酸・ピルビン酸の取込みを担う輸送体 Jen1 がグルコースにตอบสนองしてユビキチンリガーゼ Rsp5-Rod1 複合体によってユビキチン化される機構を明らかにした(Fujita et al., 2018)。このユビキチン化がエンドサイトーシスを介した液胞における Jen1 の分解の引き金となる。また、アルドラーゼ Ald6 は窒素飢餓(グルコース存在下)で選択的オートファジーによって分解されることが報告されている(Onodera & Ohsumi, 2004)。その選別機構は不明である。

上述の先行研究や申請者の研究から、呼吸代謝から発酵への転換において積極的な翻訳産物の分解が起こっていることが徐々に明らかになってきたが、その機構の全貌の理解は不十分な状況であった。

2. 研究の目的

「遺伝子発現制御」の定義を転写制御だけでなく翻訳産物のカタボリックな制御にまで広げ、その機構や生物学的意義の解明を通じて、細胞のリモデリングについて総合的な理解を深めることは重要である。環境中の利用可能な栄養源にตอบสนองして、いかに迅速に代謝経路も含めた自らの構成を最適化できるかが、生態系における微生物の生存に必要である。本研究では、酵母の呼吸代謝から発酵への転換に着目し、グルコース不活性化による細胞のリモデリングとそれを支える機構を明らかにすることを具体的な目的とした。

3. 研究の方法

(1)使用した酵母株、培地

Saccharomyces cerevisiae BY4741 株(*Mata his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0*)、BY4742 株(*Mata his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0*)を野生株として使用した。必要に応じて遺伝子破壊やプロモーター置換、プラスミド導入を行った。酵母の培養は、Hartwell's complete medium を用いて行った。

(2)グルコース不活性化を受けるタンパク質の探索

糖新生関連遺伝子(*ACS1, ADY2, ALD2, ALD6, CAT2, CRC1, IDP2, YAT1, YAT2, MLS1, SFC1, FBPI*)を $P_{tdh3-tc3}$ 配列の下流に連結した DNA コンストラクトを作製した。これらの遺伝子産物の C 末端に 3xFLAG タグが付加されるように設計された。このプラスミド DNA を保持する株は、標的遺伝子が解糖系遺伝子 *TDH3* のプロモーターから転写され、その mRNA の情報を基にタンパク質が翻訳される。培地にテトラサイクリンを添加すると、mRNA の 5'非翻訳領域に存在するテトラサイクリン・アプタマー(tc3)にテトラサイクリンが結合し、迅速に翻訳が抑制される。グリセロール・エタノールを炭素源とする培地でこれらの株を生育させたのち、培地にテトラサイクリンとグルコースを添加し、経時的に細胞を回収して細胞抽出液を調製した。これらを用いてウェスタンブロット解析を行い、グルコース添加後の残存タンパク質を検出した。

(3)糖新生関連遺伝子の転写活性化因子 Cat8 の分解機構の解析

CAT8-6HA および *SIP4-6HA* 遺伝子を含む YCp 型プラスミドを作製した。これらのプラスミドを保持する酵母株を用いた。グリセロール・エタノールを炭素源とする培地でこれらの株を生育させた

のち、培地にグルコースとシクロヘキシミド(翻訳阻害剤)を添加し、経時的に細胞を回収して細胞抽出液を調製した。これらを用いてウェスタンブロット解析を行い、グルコース添加後の残存タンパク質を検出した。

(4)グルコース誘導性エンドサイトーシスを受ける膜輸送体の分解機構の解析

乳酸輸送体 Jen1、グリセロール輸送体 Stl1、ガラクトース輸送体 Gal2、高親和性グルコース輸送体 Hxt6 の緑色蛍光タンパク質(GFP)融合体を発現する酵母株を用いて、これら輸送体の局在解析、ウェスタンブロット法による残存タンパク質量の解析を行った。必要に応じて、アミノ酸置換体を作製し、局在やタンパク質分解への影響を解析した。

(5)膜輸送体の分解を支える液胞の形態形成および液胞輸送経路の解析

液胞の機能・形態維持に関わるとされている soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor (SNARE) である Ykt6、Nyv1、Vam7 などの変異株を用いて、液胞のバイオジェネシスにおける Ykt6 の役割を解析した。

4. 研究成果

(1)グルコース不活性化を受けるタンパク質の探索

転写因子 Cat8 はグルコースの枯渇に応答して活性化し、非発酵性炭素源の利用や糖新生経路に関わる遺伝子群の発現を活性化する。そこで、Cat8 支配下にある遺伝子産物がタンパク質レベルでも制御を受けていると仮定し、それらのグルコースに応答した分解を網羅的に調査した。上記方法にて、目的タンパク質のグルコース添加後の残存量を解析した結果、Sfc1(コハク酸-フマル酸輸送体)、Ady2(酢酸輸送体)がグルコース不活性化を受けることが新たに明らかとなった。先行研究により知られている糖新生経路の代謝酵素(Fbp1、Idl1、Mdh2、Pck1)の不活性化に加えて、輸送体(Jen1、Ady2、Sfc1)がグルコース不活性化を受けることは、代謝経路の最上流としての栄養源の取り込みが制御されていることを示唆するものである。

(2)糖新生関連遺伝子の転写活性化因子 Cat8 の分解機構の解析

転写因子 Cat8 と Sip4 は Carbon source-responsive element (CSRE) に結合し、その下流に存在する糖新生関連遺伝子の発現を促進する。SIP4 遺伝子は Cat8 の標的遺伝子の一つである。CAT8 および SIP4 遺伝子の転写もグルコース抑制を受けることが知られている。CAT8-6HA および SIP4-6HA 遺伝子を自身のプロモーター制御下で発現させ、その翻訳産物をウェスタンブロット法で解析した。非発酵性炭素源(グリセロールとエタノール)を含む培地で野生株を培養したのち、グルコースおよびシクロヘキシミドを含む培地に変換し、経時的に残存タンパク質量を解析したところ、いずれのタンパク質も3時間以内に消失した。プロテアソーム阻害剤 MG132 を培地に添加すると、この消失は抑制されたことから、これら転写因子はプロテアソームによって分解されていることが示唆された。そこで、ユビキチン化酵素遺伝子破壊株ライブラリー(イエール大学 Hochstrasser 教授より供与)を用いて、Cat8 のユビキチン化に関わる酵素の探索を開始した。現在スクリーニング中である。

(3)グルコース誘導性エンドサイトーシスを受ける膜輸送体の分解機構の解析

Jen1、Stl1、Gal2、Hxt6 はいずれもグルコース不活性化を受ける膜輸送体である。グルコースに応答したエンドサイトーシスは -アレステチンである Rod1 による認識が引き金となって起こる。そこで、これらの輸送体の分解に必要な配列を明らかにすることにより、Rod1 による認識配列の共通性を見出すことを目指した。

筆者らはアラニン・スキャニング法によって Jen1 の C 末端近傍に存在する His-Ile-Glu 配列が Rod1 による認識に重要であること、特に Glu 残基が重要であることを明らかにしていた(Fujita et al., *J. Biol. Chem.*, 2018, **293**, 10926-10936)。そこで、Glu 残基の重要性を詳細に解析するために、この残基を他の全てのアミノ酸に置換する部位飽和変異を行い、Jen1 の分解を解析した。その結果、すべての変異体で Jen1 の分解速度は著しく低下し、Glu 残基が必須であることが明らかとなった。タンパク質立体構造予測プログラム AlphaFold を用いて Jen1 と Rod1 の相互作用モデルを構築したところ、この Glu は Rod1 のリシン残基と相互作用することが推測された。現在、Rod1 の変異体を作製し、解析を進めているところである。

Stl1 のユビキチン化部位を解析したところ、Jen1 と同様に C 末端テールにユビキチン化されるリシン残基が存在することが明らかとなった。さらに、このリシン残基近傍に存在する Phe-Gly-Glu 配列が Stl1 のエンドサイトーシスに重要であることが分かった。

Hxt6 と Gal2 は期異質特異性が異なるが、全長に渡って 70%以上の相同性を示すタンパク質である。これらのユビキチン化部位を解析したところ、Jen1 や Stl1 と異なり、N 末端テールにユビキチン化部位が存在し、その近傍の Asp-Glu-Ile/Leu 配列がエンドサイトーシスの開始に重要であることが明らかとなった。

Jen1、Stl1、Gal2、Hxt6 の結果を総合すると、ユビキチン化される Lys 残基の 2-4 残基後にエンドサイトーシスに重要な配列が存在することが分かった。これらの配列はいずれも Glu 残基を有し、Rod1 との相互作用に関わっていると推測された。

興味深いことに、Hxt6 と Gal2 にはユビキチン化される Lys 残基の前方に保存された Ser-XXX-

Xxx-Ser-Xxx-Xxx-Ser 配列が存在し、Ser 残基の変異により、いずれの輸送体も著しくエンドサイトーシスが阻害されることが明らかとなった。この配列はカゼイン・キナーゼ 1 (CK1) のリン酸化配列と一致しており、Hxt6 と Gal2 のエンドサイトーシスには CK1 によるリン酸化が必要であると推測した。そこで、原形質膜に局在する CK1 である Yck1/Yck2 の温度感受性変異株を用いて Hxt6 と Gal2 の局在および分解を解析したところ、それらのエンドサイトーシスが阻害されることが明らかとなった。今後、この部位のリン酸化を実証し、Rod1 との相互作用にどのような影響を与えるか解析する。

(5) 膜輸送体の分解を支える液胞の形態形成および液胞輸送経路の解析

エンドサイトーシスされた輸送体は、ゴルジ体、エンドソームを経由して液胞へと輸送され、分解される。液胞は細胞周期を通じて分裂と融合を繰り返し、娘細胞へと継承する。駅方の再融合には SNARE タンパク質が関わっている。受容膜に局在する 3 種類の Q-SNARE と供与膜に存在する R-SNARE が会合することにより、膜融合が起こる。*S. cerevisiae* は 24 種類の SNARE を持ち、それらの組み合わせにより、小胞膜輸送の正確性が保たれている。*in vitro* 実験では Nyv1 と呼ばれる R-SNARE が液胞同士の融合に関わっていることが示されているが、*nyv1* 変異株の液胞の形態は正常であり、その関与は認められていなかった。筆者らは Ykt6 の新しい変異株を作製し、Nyv1 と Ykt6 が機能重複していることを明らかにした。

興味深いことに、原形質膜で働く R-SNARE である Snc1 およびそのパラログ Snc2 が機能不全であるとき、Ykt6 がそれらの機能を相補していることが明らかとなった。さらに、エンドソームでは Ykt6 と Snc2 が機能重複していることが明らかとなった。

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 Watanabe Hayate, Urano Shingo, Kikuchi Nozomi, Kubo Yurika, Kikuchi Ayumi, Gomi Katsuya, Shintani Takahiro	4. 巻 300
2. 論文標題 Ykt6 functionally overlaps with vacuolar and exocytic R-SNAREs in the yeast <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 107274 ~ 107274
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbc.2024.107274	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5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 三浦佑太、安藝萌、五味勝也、新谷尚弘
2. 発表標題 出芽酵母のアミノ酸ストレスに対する応答
3. 学会等名 日本農芸化学会2023年度大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 渡部颯、久保優里花、浦野慎吾、五味勝也、新谷尚弘
2. 発表標題 出芽酵母の液胞同型融合におけるYkt6とNyv1の機能重複に対する遺伝学的洞察
3. 学会等名 日本農芸化学会2023年度大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 田中 瑞己、藤田 翔貴、河原崎 泰昌、山形 洋平、新谷 尚弘、五味 勝也
2. 発表標題 麹菌においてカーボンカタボライト抑制を制御する脱ユビキチン化酵素CreBはユビキチンリ ガーゼアダプターCreDの転写誘導とタンパク質安定性を制御する
3. 学会等名 第20回糸状菌分子生物学コンファレンス
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田中 瑞己, 藤田 翔貴, 河原崎 泰昌, 山形 洋平, 新谷 尚弘, 五味 勝也
2. 発表標題 麹菌においてカーボンカタボライト抑制を制御する脱ユビキチン化酵素CreBはユビキチンリガーゼアダプターCreDの転写誘導とタンパク質安定性を制御する
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2021年

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Stl1 のグルコース不活性化 に必要な - アレスチンRod1 によるStl1 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
研究 分担 者	藤田 翔貴 (Fujita Shoki) (70845099)	東北大学・農学研究科・助教 (11301)	

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