

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：13801

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06620

研究課題名(和文)酵母における持続的な熱ストレスに対する生体防御機構の解明

研究課題名(英文)Cellular responses to chronic heat stress in yeast

研究代表者

木村 洋子(Kimura, Yoko)

静岡大学・農学部・教授

研究者番号：80291152

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：我々は真夏の昼間の状態に似た持続的で垂致死的な熱ストレスが、細胞にどのような変化をもたらすかを、真核生物のモデル生物である酵母を用いて解析した。

酵母では熱ストレス時に液胞膜の陥入形成が起き、このとき液胞膜は相分離していること、さらに液胞膜陥入の形成がAtg8やAtg8結合タンパク質Hfl1を含む細胞内因子によって制御されていることを明らかにした。液胞膜の陥入形成はストレス時の液胞膜面積の急激な増加に対するバッファー機能として考えられるが、恒常的に液胞膜の陥入を起こしている変異株を見出し、さらにその変異株がストレス感受性になることを発見し、液胞膜の陥入は適切に制御されていることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

熱ストレスによる液胞膜の陥入形成の亢進、及び陥入を制御する分子の同定は申請者らによるオリジナルな発見である。液胞膜陥入は熱ストレス時の液胞膜の膜面積の急激な増加に応じて、そのまま液胞の体積を増やさないようにする細胞の制御機構の可能性があるが、細胞内因子によって制御されていることを申請者のグループが初めて明らかにした。

また通常では液胞が球状の形態をとるのは、エネルギー的に球状が最も安定であるからと考えられるが、恒常的に陥入形成している変異株の取得により、細胞には液胞を積極的に球状に保つ機能がある可能性や、さらに、液胞の形態変化は生命活動を制御する機構の一つである仮説も発展的に考えられた。

研究成果の概要(英文)：In yeast exposed to chronically high temperatures, vacuolar membranes get deformed and invaginations are formed. In this study, we showed that phase-separation of vacuolar membrane occurred after heat stress leading to the formation of the invagination. In addition, Atg8 and Hfl1, a vacuolar membrane-localized Atg8-binding protein, were found to suppress the excess vacuolar invaginations after heat stress. At that time, Hfl1 formed foci at the neck of the invaginations in wild-type cells, whereas it was efficiently degraded in the vacuole in the atg8 mutant. Interestingly, a combined mutation with the vacuole BAR domain protein lvy1 led to vacuoles in hfl1 lvy1 and atg8lvy1 mutants having constitutively invaginated structures; moreover, these mutants showed stress-sensitive phenotypes.

Our findings suggest that vacuolar invaginations result from the combination of changes in the physiochemical properties of the vacuolar membrane and other cellular factors.

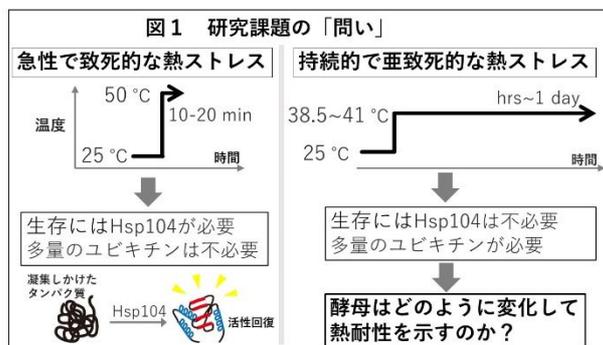
研究分野：分子細胞生物学

キーワード：熱ストレス 酵母 液胞 形態変化 陥入 相分離

1. 研究開始当初の背景

地球上で、生物体はさまざまな環境変化に晒されており、それらの環境変化に生物体はうまく対処して生き延びている。その中で高温の変化は、地球温暖化によって生物体を受ける機会がますます増えるストレスの一つである。熱ストレスに対して、多くの生物で熱ショックタンパク質 (Heat Shock Protein HSP) と呼ばれる一群のタンパク質の増加が起こること、主要な HSP は分子シャペロンであることが今までに明らかにされてきた。

しかし、熱耐性の獲得について調べてみると、温度や条件によって獲得機構に違いがあることが考えられる。25-30 が至適生育温度の酵母では、急性で致死的な高温(例 50)を与えられた場合と、持続的に亜致死的な高温(例 40)を与えられた場合では、熱に対して生き延びる条件が異なっている (Finley et al Cell 1987、図1)。分子シャペロン Hsp104 は、急性で致死的な熱ストレスに対しては生存に必要であるが、亜致死的で持続的な熱ストレスには必要ではない。一方、十分量のユビキチンは、持続的な熱ストレスには必要であるが急性熱ストレスには必要でないからである。この違いは、前者の致死的な温度ではタンパク質の凝集をほどく活性がある Hsp104 が変性しかけたタンパク質を救うことが生存に喫緊に必要であり、後者の温度では酵母がユビキチンを用いた反応によって、熱ストレス耐性の状態に時間をかけて変化するためではないかと申請者は考えている。尚、ユビキチンは他のタンパク質を修飾する翻訳後修飾因子であり、ユビキチン化を受けたタンパク質は分解されたり、活性や局在が変化することが明らかにされている。しかし、亜致死的で持続的な熱ストレスに対して、酵母にどのような変化が起きているかは断片的な知見しか得られていない。



2. 研究の目的

研究の目的は、持続的な亜致死的な熱ストレスに対する細胞の熱耐性状態への変化及びストレスに対応する仕組みを解析し、このストレスに対する細胞の防御機構を解明することである。ただ、ユビキチンによって修飾されるタンパク質は非常に多く、酵母では全タンパク質の約 1/6 がユビキチン化を受ける。そこで、研究戦略をユビキチンのターゲットから決めるのではなく、細胞内の形態変化からアプローチする方法を取り、これが本研究の独自性の一つである。熱ストレス後にはいくつかの形態変化が観察されたが、目立った変化である液胞膜の陥入に焦点をおいて研究を行った。本研究ではこの形態変化と生理学的意義を、ユビキチンを含めどのような因子が働いているかに着目して解明し、形態的变化の大きい液胞の熱ストレスに対する新たな仕組みを明らかにすることを試みた。

持続的で亜致死的な熱ストレスは真夏の環境に類似しており、本研究で明らかになる細胞内変化は、地球温暖化によって高温に晒される生物に同様に起きることが考えられる。特に酵母は真核生物であるため、多くの生物のモデルになると考えられる。

3. 研究の方法

液胞は一重膜の細胞内小器官である。我々は、持続的な熱ストレス時に液胞膜の陥入構造が形成され、陥入形成が熱耐性の獲得と関係する事を明らかにした(Ishii et al Sci. Rep. 2018)。熱ストレス時にはエンドサイトーシスによる膜タンパク質の分解が亢進されること、またユビキチン量が少ない *ubi4* 変異株では液胞の陥入が小さく、またエンドソーム関連因子の ESCRT 変異株では陥入構造が形成されないことから、熱ストレス時には多くのエンドソームが液胞膜と融合して液胞膜の面積が一気に増えるが、液胞の体積を増やさないために、陥入が形成される可能性が示唆された。

しかし、単に液胞膜面積と液胞体積のバランス関係で陥入が起きるということだけでなく、陥入形成は制御されている結果を我々は得ている。最近我々は、*atg8* 欠損変異株では熱ストレス時に液胞膜の陥入が異常に亢進することを発見した(Ishii et al, Sci. Rep. 2019) (図2)。Atg8 はオートファジーだけでなくオートファジー以外の機能も有しているが、後者のオートファジー以外の機能が液胞膜の陥入抑制に働いていることを示した。Atg8 は熱ストレスによって発現が増大する HSP であることも明らかにした。また、陥入が起きない ESCRT 系の分子の変異との 2 重変異株 *vps24Δatg8Δ* や *vps23Δatg8Δ* では、熱ストレス後の陥入形成が抑えられたので、ESCRT の分子が Atg8

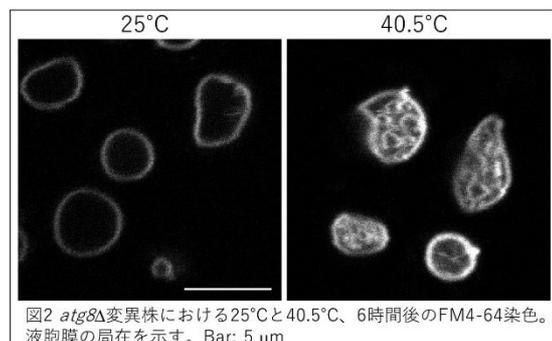


図2 *atg8Δ*変異株における25°Cと40.5°C、6時間後のFM4-64染色。液胞膜の局在を示す。Bar: 5 μm

より先に働いている可能性が示された。さらに興味深いことに、BAR ドメインを持つ液胞膜タンパク質をコードする *IVY1* との 2 重変異株 *ivy1Δatg8Δ* では、通常の生育温度でも恒常的に液胞膜の陥入が起きるを見出した。つまり、通常温度では *Ivy1* または *Atg8* があれば液胞膜の陥入形成が抑えられるが、熱ストレス時には *Atg8* が陥入の抑制に必要であることを明らかにした。

以上のように液胞膜の陥入は、陥入形成や抑制に働く因子によって制御されていることを見出しているが、実際にそれらの因子がどのように働いているかは全く不明であり、熱ストレス時の液胞膜の実態すら不明である。本研究ではこれらの点を解明して、液胞膜の恒常性維持の重要性を明らかにする。

4. 研究成果

(1) 熱ストレス時の液胞膜は相分離している。

熱ストレス時に液胞膜タンパク質の局在 (*Vph1*-GFP, *Zrc1*-GFP, *Ybt1*-GFP) が不均一な分布を示すことから、熱ストレス時の液胞膜に膜ドメインが形成される可能性が示唆された。そこで急速凍結・凍結切断レプリカ電子顕微鏡解析を行ったところ膜ドメインの存在が確認された (図3, 順天堂大・辻、藤本博士との共同研究)。また人工膜では、相分離によって液体秩序 (Lo) 相と液体無秩序 (Ld) 相に分離する。熱ストレス処理した酵母の液胞膜も、Ld 相に結合する試薬 Fast DiI によって不均一に染色され、Ld ドメインの存在が示された。さらに *Vph1*-GFP の局在により、Ld ドメインが陥入の根元にある傾向があることがわかった。したがって、熱ストレスにより液胞膜で相分離が起き、それにより液胞膜の陥入が形成される可能性が示された。(論文リバイス中)

(2) 持続的熱ストレス時の液胞膜陥入を抑える因子 Atg8 と Hfl1 の発見

一方で、熱ストレス時の液胞膜は、単に液胞膜表面積の増加に従って陥入を形成しているのではない事を示唆する結果が得られた。2019年に我々は *atg8Δ* 欠損変異株では、25℃ では正常の液胞形態を示すが熱ストレス時に液胞膜の陥入が異常に亢進することを発見した (Ishii et al Sci. Rep. 2019) Atg8 はオートファジーの必須因子であるが、オートファジーとは独立した機能も持ち、液胞膜の陥入形成を抑える機能は後者の機能であった。さらに Atg8 と結合する液胞膜タンパク質 Hfl11 の変異株においても同様に熱ストレスに異常陥入が起きた (論文リバイス中)。また、これらの変異株における異常な陥入箇所は、液胞膜の相分離箇所に支配されていなかった。したがって、これらの結果より、液胞膜陥入形成は細胞内因子によっても制御されている事が示された。

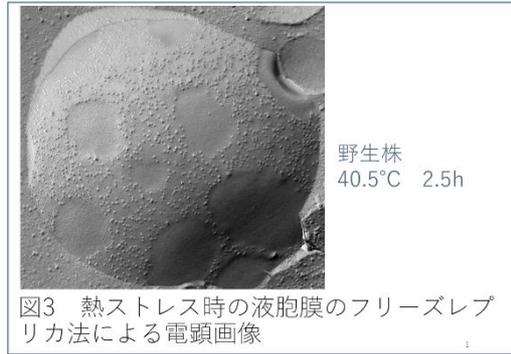


図3 熱ストレス時の液胞膜のフリーズプレブリカ法による電顕画像

(3) 恒常的に液胞膜が陥入する *ivy1Δatg8Δ*、*ivy1Δhfl11Δ* 変異株の取得

atg8Δ 株と種々の変異株との 2 重欠損変異株の解析により、BAR ドメインを持つ液胞膜タンパク質 Ivy1 との 2 重変異株 *ivy1Δatg8Δ* では、通常の生育温度でも恒常的に液胞膜の陥入が起きることを見出した (Ishii et al 2019)。さらに *ivy1Δhfl11Δ* 2 重変異株においても同様の陥入が見られた (図 4, 論文リバイス中)。したがって通常の温度でも Ivy1

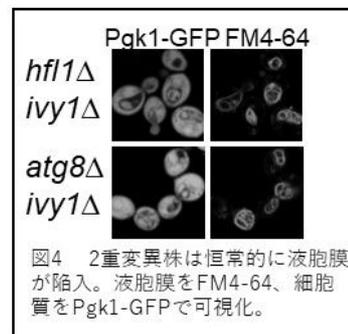


図4 2重変異株は恒常的に液胞膜が陥入。液胞膜を FM4-64、細胞質を Pgc1-GFP で可視化。

または Atg8/Hfl11 が働いて液胞膜の陥入形成が抑えられており、非ストレス下でも液胞膜の構造を滑らかな球形に保つ仕組みがある可能性が考えられた。また *ivy1Δatg8Δ* 株と *ivy1Δhfl11Δ* 株は共に細胞膜・細胞壁に障害を与える SDS、及び液胞機能を障害する $ZnCl_2$ に対して感受性を示し、その感受性は熱ストレスによりさらに強められた。そして SDS 処理によって液胞膜は陥入が異常に亢進した (論文リバイス中)。したがって、液胞膜の陥入は形成されなくても、また陥入が過剰に亢進してもストレスに対して感受性になることが示唆され、液胞膜の恒常性維持の重要性が明らかになった。

(4) 液胞膜タンパク質 Hfl11 の動態解析

atg8Δ 変異株でも *hfl11Δ* 変異株と同じように熱ストレス時に膜陥入が起きるが、*atg8Δ* 変異株では熱ストレス時に Hfl11 が液胞で分解されることを、Hfl11 に 3xflag を付加して発現させた酵母を用いた解析により明らかにした (図 5, 論文リバイス中)。これは、Atg8 の膜陥入における機能は Hfl11 タンパク質の安定化であり、Hfl11 が熱ストレス時の過剰な陥入形成の抑制に直接機能していることを示唆している。

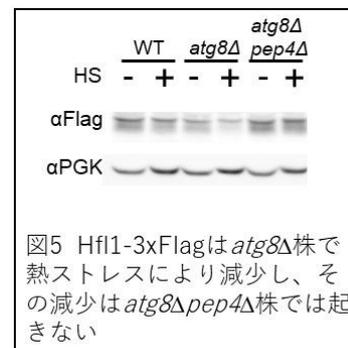


図5 Hfl11-3xFlag は *atg8Δ* 株で熱ストレスにより減少し、その減少は *atg8Δ pep4Δ* 株では起きない

以上の結果より、熱ストレス時には液胞膜は相分離するという物理化学的な変化を起こし膜陥入形成が起きるといこと、そしてさらに細胞内因子によっても、液胞膜陥入が制御されることが示された。また異常な陥入を恒常的に起こす変異株の発見とそれらの性質により、液胞膜陥入が適切に起きることが細胞にとって重要であることが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5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 0件）

1. 著者名 KIMURA Yoko	4. 巻 58
2. 論文標題 To Seek for Integrated Understandings of Cellular Responses to Higher Temperatures	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 KAGAKU TO SEIBUTSU	6. 最初と最後の頁 151 ~ 156
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1271/kagakutoseibutsu.58.151	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 木村洋子	4. 巻 7
2. 論文標題 熱ストレスによる酵母細胞の形態的、生理的变化と生存戦略	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 日本醸造協会誌	6. 最初と最後の頁 446-452
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 -

1. 著者名 木村洋子	4. 巻 73
2. 論文標題 ストレスに対する液胞の形態変化	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 生体の科学	6. 最初と最後の頁 230-234
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 無
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 Hitoshi Ouchi , Takuya Namiki , Kenji Iwamoto , Nobuo Matsuzaki , Makoto Inai , Mihaya Kotajima , Jing Wu , Jae-Hoon Choi , Yoko Kimura , Hirofumi Hirai , Xiaonan Xie , Hirokazu Kawagishi , Toshiyuki Kan	4. 巻 84
2. 論文標題 S-Adenosylhomocysteine Analogue of a Fairy Chemical, Imidazole-4-carboxamide, as its Metabolite in Rice and Yeast and Synthetic Investigations of Related Compounds	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Nat Prod .	6. 最初と最後の頁 453-458
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.jnatprod.0c01269	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13件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 渡邊祐希、辻琢磨、樋口美由紀、藤本豊土、木村洋子
2. 発表標題 熱ストレス時の液胞膜とその動態の解析
3. 学会等名 第55回酵母遺伝学フォーラム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 清水翔太、服部里菜、清水直樹、木村洋子
2. 発表標題 出芽酵母におけるユビキチン・プロテアソーム系による熱ストレス時の核膜孔複合体の品質管理
3. 学会等名 日本臨床ストレス応答学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 清水翔太、服部里菜、木村洋子
2. 発表標題 出芽酵母のユビキチン・プロテアソーム系による熱ストレス時の核膜孔複合体の品質管理
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 清水耀介、辻琢磨、木村将文、藤本豊土、木村洋子
2. 発表標題 熱ストレス時の酵母液胞の形態変化
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高橋直花、木村洋子
2. 発表標題 持続的熱ストレスに対する酵母ミトコンドリア脆弱性の解明
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 渡邊祐希、樋口美由紀、木村洋子
2. 発表標題 液胞膜陥入形成に関与するAtg8結合タンパク質Hf11の解析
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 木村洋子
2. 発表標題 持続的な熱ストレス時の細胞内変化と機能制御
3. 学会等名 第23回酵母合同シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 木村洋子
2. 発表標題 酵母における持続的な熱ストレス時の液胞形態変化と液胞膜ホメオスタシス制御機構の解析
3. 学会等名 第94回日本生化学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 浅川琴美、木村洋子
2. 発表標題 酵母Alixファミリータンパク質とその標的タンパク質との特異的相互作用の解析
3. 学会等名 日本生化学会中部支部例会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小山彩・林加奈・石井彩音・渡邊祐希・高橋直花・木村洋子
2. 発表標題 持続的な熱ストレス時の液胞の形態変化と液胞形態維持機構の解明
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム第53回研究報告会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 木村洋子
2. 発表標題 持続的な熱ストレスによる出芽酵母の液胞の形態変化
3. 学会等名 第93日本生化学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 木村洋子
2. 発表標題 液胞の形態変化からみる熱ストレス応答と液胞膜ホメオスタシス
3. 学会等名 Biothermology Workshop 2020 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 古田島 美颯、崔 宰熏、呉 静、謝 肖男、木村 洋子、道羅 英夫、大西 利率、平井 浩文、浅川 倫宏、大内 仁志、稲井 誠、菅 敏幸、河岸 洋和
2. 発表標題 ICAの代謝産物であるS-ICAr-Hの存在意義についての研究
3. 学会等名 日本農芸化学会
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