

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：13801

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02475

研究課題名(和文)液胞が制御する核内染色体・核小体の再配置と核分解オートファジーとの連動機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of the molecular mechanisms of connected events, nucleolar dynamics and nucleophagy mediated by vacuoles

研究代表者

丑丸 敬史 (Ushimaru, Takashi)

静岡大学・理学部・教授

研究者番号：50262788

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：(1)ホスファチジルイノシトール3-キナーゼ複合体IIとCdc14フォスファターゼがそれぞれESCRT-0のリクルートとマイクロオートファジーを促進、および抑制することを見出した。(2)マイクロヌクレオファジーに必要な因子として、Cdc14フォスファターゼ、トポイソメラーゼII(Topto II)、Hmo1等を同定してその作用機序を解析した。(3)細胞周期、および液胞の分裂状態がマイクロオートファジー、マイクロヌクレオファジーに与える影響を解析、評価した。これらのうち、一部はすでに論文として報告し、一部は現在、論文作成中であり、残りも鋭意解析を進め論文として報告する予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マクロオートファジーに比べて、研究が遅れているマイクロオートファジーの解析が本研究から明らかになってきた。さらに、マイクロオートファジーの中でも核を分解するマイクロヌクレオファジーの分野で、当研究室は先導的な研究成果を発表している。特に、食われる側の核の内部での生理現象(染色体の動き)がマイクロヌクレオファジーと連動する現象のより詳細な解析が本研究によりなされた。神経細胞のような核膜崩壊が起こらない静止期細胞は核内に毒性をもつ変性タンパク質が蓄積しやすく、その機構とこれが関連するアルツハイマー病のような神経変性疾患の解明に役立つことが期待される。

研究成果の概要(英文)：(1) We found that phosphatidylinositol 3-kinase complex II and Cdc14 phosphatase promote and inhibit ESCRT-0 recruitment and microautophagy, respectively. (2) We identified Cdc14 phosphatase, topoisomerase II (Topto II), and Hmo1 as factors required for micronucleophagy and analyzed their mechanisms of action. (3) We analyzed and evaluated the effects of cell cycle and vacuolar division state on microautophagy and micronucleophagy. Some of these have already been reported in a paper, some are currently under preparation, and the rest will be analyzed and reported in a paper in the future.

研究分野：細胞生物学

キーワード：オートファジー ニュクレオファジー TORC1 核小体 栄養源飢餓 核小体 rDNA

1. 研究開始当初の背景

分裂を停止している神経細胞では、M期における核膜崩壊が起きないため、核内にタンパク質凝集体のような毒性構造物が蓄積しやすく、核内浄化機構の低下は神経変性疾患の原因となる。核を分解するヌクレオファジーは核内浄化を担うものの、その実態は不明である。モデル生物である出芽酵母は、細胞分裂時に核膜崩壊を起ささない”closed mitosis”を起こすため、核内浄化機構の解析のための良いモデルとなる。

栄養源飢餓は大規模にオートファジーを誘導し、核の一部である「核小体」もオートファジーにより分解される。出芽酵母のヌクレオファジーは、マイクロ型(マイクロヌクレオファジー)とマクロ型(マクロヌクレオファジー)に大別される。マイクロヌクレオファジーは液胞と核が接触するNVJ部位を介して、液胞が核の一部を直接飲み込み千切るようにして液胞内に取り込み分解する。しかし、これらのヌクレオファジーにより、DNA(染色体)は分解されず、核質部分からループアウトしたrDNA(rRNA遺伝子)も核小体の構成中心であるにもかかわらずヌクレオファジー分解を受けない。当研究室では、核小体が優先的にヌクレオファジーで分解される仕組みと、rDNAがヌクレオファジー分解から逃れる仕組みの解析を行い、すでに以下のことを明らかにしていた。(1) 栄養源飢餓処理後、rDNAは凝縮してNVJに対して遠ざかるように移動する一方で、核小体タンパク質はマイクロヌクレオファジー分解の場であるNVJに向かって移動し、rDNAと核小体タンパク質の解離を引き起こす(核小体リモデリング)。(2) 核小体リモデリングには、マイクロヌクレオファジーに必要な因子であるNvj1とVac8が関与することから、核小体リモデリングはマイクロヌクレオファジーに連動するイベントであることが示唆される。

2. 研究の目的

上記の研究成果と予備的知見を受けて、本研究では、飢餓時のヌクレオファジーに連動した染色体・核小体タンパク質の定方向性の移動に必要な核膜因子と核内因子の全容解明を目指した。外部のオルガネラが核内染色体の位置決めを行っている例は他になく、本研究は全く新しい染色体動態の姿を提示することができると期待できる。さらに本研究で、未開拓分野である核小体動態を明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

らrDNA・核小体タンパク質の定方向性運動が損なわれるものを探す。rDNAと核小体タンパク質の動態は蛍光タンパク質を融合した指標タンパク質を用いてライブイメージング観察を行う。さらに、新規NVJタンパク質を同定するため、既知のNVJタンパク質を免疫沈澱法で精製し結合してくるものをLC-MS/MSで同定する。同定されたものに関しては上記と同様に、rDNA・核小体タンパク質の定方向性運動に関与するものを探す。(2) 定方向性の核内再構築に関与する核膜タンパク質の同定と解析

(1) で同定したNVJタンパク質と結合し、核内にNVJの位置情報を仲介する核内膜タンパク質を同定する。まず、CLIPが当該核外膜NVJタンパク質と直接結合するか、免疫沈澱法により検証する。もし結合しない場合には、結合性を有するものを免疫沈澱法により同定し、その中から候補タンパク質を絞り込む。さらに、その同定されたタンパク質とCLIPとの結合性を免疫沈澱法により検証する。候補タンパク質に関して、rDNA・核小体タンパク質の定方向性運動に関与するものを探す。

(3) 定方向性の核内再構築に関与する核内タンパク質の同定と解析

(2) で同定した核内膜タンパク質が最終的にはrDNAの凝縮を導くことで、rDNAの移動を起こすと予想している。飢餓による栄養要求性プロテインキナーゼTORC1の不活性化が定方向性の核内再構築を惹起する(当研究室の上記論文)。恐らく、TORC1シグナル伝達系により、cohibinもしくはコンデンシンのいずれかのサブユニットがリン酸化を受けることでコンデンシンのrDNAへのローディングが促進されるのではないかと予想する。1) 免疫沈澱法により精製したcohibinとコンデンシンのリン酸化部位をLC-MS/MSにより同定し、同様に解析する。

以上の結果をまとめ、学会発表および論文投稿する。

4. 研究成果

(1) NVJ欠損細胞NVJΔ細胞は、TORC1の不活性化後、rDNAの凝縮とrDNA核小体タンパク質の分離が失われた。マクロヌクレオファジー受容体である核膜タンパク質Atg39はNVJのエッジ部分に蓄積し、マイクロヌクレオファジーによって分解された。これらのことから、マクロヌクレオファジーもNVJの存在に依存していることを疑ったが、NVJΔ細胞でもマクロオートファジーは損なわれなかった。その一方で、マイクロヌクレオファジーと核小体リモデリングは消失した。本研究により、液胞はTORC1の制御のもと、NVJを介して核外から核内イベント、すなわち核小体ダイナミクスを制御していることが明らかになった(雑誌論文1)。

(2) NVJの核と液胞のオルガネラ間繋留タンパク質であるソーティングネキシンMdm1が、

TORC1 不活性化による核小体ダイナミクスを媒介した。Mdm1 は TORC1 不活性化後のヌクレオファジー誘導自体には必要なかったものの、核小体タンパク質の適切なヌクレオファジー分解に必要であった。このことは、TORC1 の不活性化によって、ヌクレオファジーと核小体ダイナミクスが独立して制御されることを示す。さらに、Mdm1 は栄養飢餓状態での生存に重要であった。ヒトの Mdm1 ホモログである SNX14 の変異は、神経発達障害を引き起こす。本研究は、選別ネキシンを介したマイクロオートファジーと神経発達障害との関係について、新たな知見を提供するものである (雑誌論文 2)。

(3) rDNA を含めた染色体は分裂期に機能するコンデンシンと Cdc14 プロテインホスファターゼ依存的に分裂期に凝縮する。当研究室では、すでにこれらの因子が飢餓誘導性の rDNA 凝縮に関与することを示していた。本研究で、間期 G1 期細胞では飢餓誘導性の rDNA 凝縮にコンデンシンは関与しなかった。その代わりに、Hmo1 がこの凝縮に関与することを見出した。さらに、rRNA の転写を抑制するヒストン脱アセチル化酵素 Rpd3 と Cdc14 はともに間期の rDNA 凝縮に必要であった。さらに、間期の rDNA の凝縮には、rDNA を核内膜につなぎとめる CLIP と cohibin が必要であった。最後に、これら間期における飢餓誘導性の rDNA 凝縮に関与する上記因子が飢餓下の G1 細胞の生存には必要であった。本研究は、間期染色体凝縮の新しい特徴を明らかにした (雑誌論文 3)。

(4) 出芽酵母では、液胞形態は分裂と融合によって動的に制御されている。液胞融合は栄養欠乏状態で誘発され、TORC1 不活性化によって媒介される。本研究で、出芽酵母の液胞分裂を制御するシステムを開発し調べたところ、液胞断裂はマイクロオートファジーを促進したが、マクロオートファジーには影響しなかった。液胞の断片化は複数の NVJ を形成した。液胞の断片化によって生じた複数の液胞は、マイクロヌクレオファジーを促進した。しかし、液胞の形態は、TORC1 の不活性化によって引き起こされる核小体リモデリング、rDNA 凝縮、rDNA と核小体タンパク質の分離には影響を与えなかった (雑誌論文 4)。

(5) ミクロヌクレオファジーの基盤になる現象であるマイクロオートファジーについて調べた。出芽酵母におけるマイクロオートファジーの誘導には ESCRT を介した液胞膜のリモデリングが重要である。栄養枯渇と TORC1 プロテインキナーゼの不活性化により、ESCRT-0 複合体 (Vps27/Hse1) が液胞膜に動員され、ESCRT を介したマイクロオートファジーが誘導される。分裂期タンパク質脱リン酸化酵素 Cdc14 は TORC1 不活性化後のマクロオートファジー誘導において、TORC1 を介したリン酸化と拮抗することを当研究室ですでに報告している。本研究では、Cdc14 が TORC1 不活性化後のマイクロオートファジー誘導を抑制することを見出した。Cdc14 の機能不全は TORC1 不活性化後の Hse1 の液胞膜へのリクルートを促進し、ESCRT-0 複合体形成を促進した。逆に、CDC14 の過剰発現は TORC1 不活性化後の Hse1 の液胞膜へのリクルートとマイクロオートファジーの誘導を損った (雑誌論文 5)。

(6) ホスファチジルイノシトール 3-リン酸 (PI3P) はホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ (PI3K) によって生成される。PI3K 複合体 I (PI3KC1) が生成する PI3P はマクロオートファジーに必要であるが、PI3KCII とマイクロオートファジーの飢餓時の生理的役割はほとんど知られていない。本研究では、PI3KCII によって液胞膜上に産生された PI3P がマイクロオートファジーの誘導と飢餓後の生存に必要であることを示した。PI3KCII は、TORC1 不活性化後の液胞表面における Vps27 のリクルートと ESCRT-0 複合体の形成に必要であった。液胞膜への Vps27 の強制的な動員は、PI3KCII 欠損細胞におけるマイクロオートファジー誘導の欠損をレスキューした。このことは、マイクロオートファジー誘導における PI3P の重要な役割は、液胞表面への Vps27 の動員であることを示している。この液胞膜に結合した Vps27 は、PI3KCII または Vps27 を欠損した細胞において、栄養飢餓時の生存率を回復させることができた。本研究により、液胞膜上の PI3KCII-PI3P-Vps27 経路が、ESCRT を介したマイクロオートファジー誘導と栄養ストレス適応に重要であることが明らかになった。この結果は、マイクロヌクレオファジー研究の有意義な指針となるものである (雑誌論文 6) (図 1)。

(7) 上述のように、Cdc14 プロテインホスファターゼがマイクロオートファジーに関与したことから、飢餓、TORC1 不活性化後の Cdc14 の動態について検証した。その結果、TORC1 不活性化によって、通常は核小体に格納され不活性化している Cdc14 が核小体から放出されて活性化することを明らかにした。さらに、この現象がある種の抗がん剤の効きを損なうことが示された。本研究は免疫抑制剤や抗腫瘍剤として TORC1 阻害剤を使用する際の望ましくない副作用に関する情報を提供するものである (雑誌論文 7)。

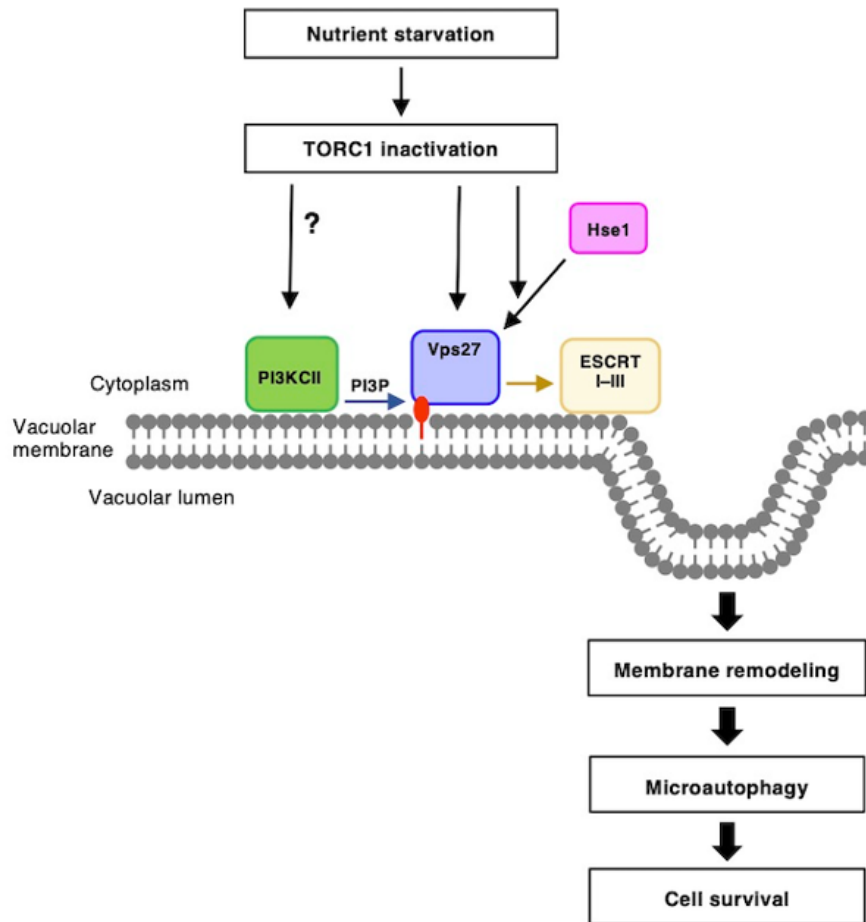


図1 PI3KCII-PI3P-Vps27経路によるマイクロオートファジー制御

[雑誌論文] (計7件)

1. Most Naoshia Tasnin, Tsuneyuki Takuma, Tasnuva Sharmin, Shamsul Morshed, and Takashi Ushimaru* (2021) The vacuole controls nucleolar dynamics and micronucleophagy via the NVJ. **Biochem Biophys Res Commun.** 158-165. doi: 10.1016/j.bbrc.2021.02.141.
2. Tasnuva Sharmin, Tsuneyuki Takuma, Shamsul Morshed, and Takashi Ushimaru* (2021) Sorting nexin Mdm1/SNX14 regulates nucleolar dynamics at the NVJ after TORC1 inactivation. **Biochem Biophys Res Commun.** 552:1-8. doi: 10.1016/j.bbrc.2021.03.033.
3. Yuri Takeichi, Tsuneyuki Takuma, Kotaro Ohara, Most Naoshia Tasnin, and Takashi Ushimaru* (2022) Interphase chromosome condensation in nutrient-starved conditions requires Cdc14 and Hmo1, but not condensin, in yeast. **Biochem Biophys Res Commun.** 611:46-52. doi: 10.1016/j.bbrc.2022.04.078.
4. Tsuneyuki Takuma and Takashi Ushimaru* (2022) Vacuolar fragmentation promotes fluxes of microautophagy and micronucleophagy but not of macroautophagy. **Biochem Biophys Res Commun.** 614:161-168. doi: 10.1016/j.bbrc.2022.05.021.
5. Tasnuva Sharmin, Shamsul Morshed, Most Naoshia Tasnin, Tsuneyuki Takuma, and Takashi Ushimaru* (2021) Cdc14 phosphatase downmodulates ESCRT-0 complex formation on vacuolar membranes and microautophagy after TORC1 inactivation. **Biochem Biophys Res Commun.** 561:158-164. doi: 10.1016/j.bbrc.2021.05.021.
6. Most Naoshia Tasnin, Kisara Ito, Haruko Katsuta, Tsuneyuki Takuma, Tasnuva Sharmin, and Takashi Ushimaru* (2022) The PI3 kinase complex II-PI3P-Vps27 axis on vacuolar membranes is critical for microautophagy induction and nutrient stress adaptation. **Journal of Molecular Biology** 434:167360. doi: 10.1016/j.jmb.2021.167360.
7. Chihiro Yamada, Aya Morooka, Seira Miyazaki, Masayoshi Nagai, Satoru Mase, Kenji Iemura, Most Naoshia Tasnin, Tsuneyuki Takuma, Shotaro Nakamura, Shamsul Morshed, Naoki Koike, Md. Golam Mostofa, Muhammad Arifur Rahman, Tasnuva Sharmin, Haruko Katsuta, Kotaro Ohara, Kozo Tanaka, and Takashi Ushimaru* (2021) TORC1 inactivation promotes APC/C-dependent mitotic slippage in yeast and human cells. **iScience.** 25:103675. doi: 10.1016/j.isci.2021.103675.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7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 Tasnin Most Naoshia, Ito Kisara, Katsuta Haruko, Takuma Tsuneyuki, Sharmin Tasnuva, Ushimaru Takashi	4. 巻 434
2. 論文標題 The PI3 Kinase Complex II?PI3P?Vps27 Axis on Vacuolar Membranes is Critical for Microautophagy Induction and Nutrient Stress Adaptation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 167360 ~ 167360
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jmb.2021.167360	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 Yamada Chihiro, Morooka Aya, Miyazaki Seira, Nagai Masayoshi, Mase Satoru, Iemura Kenji, Tasnin Most Naoshia, Takuma Tsuneyuki, Nakamura Shotaro, Morshed Shamsul, Koike Naoki, Mostofa Md. Golam, Rahman Muhammad Arifur, Sharmin Tasnuva, Katsuta Haruko, Ohara Kotaro, Tanaka Kozo, Ushimaru Takashi	4. 巻 25
2. 論文標題 TORC1 inactivation promotes APC/C-dependent mitotic slippage in yeast and human cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 103675 ~ 103675
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2021.103675	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 -
1. 著者名 Sharmin Tasnuva, Morshed Shamsul, Tasnin Most Naoshia, Takuma Tsuneyuki, Ushimaru Takashi	4. 巻 561
2. 論文標題 Cdc14 phosphatase downmodulates ESCRT-0 complex formation on vacuolar membranes and microautophagy after TORC1 inactivation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 158 ~ 164
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.05.021	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 Sharmin Tasnuva, Takuma Tsuneyuki, Morshed Shamsul, Ushimaru Takashi	4. 巻 552
2. 論文標題 Sorting nexin Mdm1/SNX14 regulates nucleolar dynamics at the NVJ after TORC1 inactivation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 1 ~ 8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.03.033	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 Tasnin Most Naoshia, Takuma Tsuneyuki, Sharmin Tasnuva, Morshed Shamsul, Ushimaru Takashi	4. 巻 550
2. 論文標題 The vacuole controls nucleolar dynamics and micronucleophagy via the NVJ	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 158 ~ 165
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.02.141	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 Tsuneyuki Takuma and Takashi Ushimaru	4. 巻 614
2. 論文標題 Vacuolar fragmentation promotes fluxes of microautophagy and micronucleophagy but not of macroautophagy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 161-168
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2022.05.021	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 Yuri Takeichi, Tsuneyuki Takuma, Kotaro Ohara, Most Naoshia Tasnin, and Takashi Ushimaru	4. 巻 611
2. 論文標題 Interphase chromosome condensation in nutrient-starved conditions requires Cdc14 and Hmo1, but not condensin, in yeast	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 46-52
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2022.04.078	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6件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 丑丸 敬史、秋月亮磨、大矢天音
2. 発表標題 ストレスセンサーとしてのTORC1の機能の解析
3. 学会等名 第44回 日本分子生物学会年会 (パンフィコ横浜) (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 丑丸 敬史、Most Naoshia Tasnin、Tasnuva Sharmin、Md. Golam Mostofa
2. 発表標題 NVJが制御する核小体局在移動とマイクロヌクレオファジー
3. 学会等名 第73回日本細胞生物学会大会（京都みやこめッセ）（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宅間恒行、丑丸敬史
2. 発表標題 飢餓下の出芽酵母における複数のNVJが核小体リモデリングに及ぼす影響の解析
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム第54回研究報告会（Web開催）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 勝田晴子、尾崎稜太、丑丸敬史
2. 発表標題 DNAダメージは出芽酵母TORC1の複合体解体を伴う局在変化をもたらす
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム第54回研究報告会（Web開催）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大矢天音、秋月亮磨、丑丸敬史
2. 発表標題 タンパク質毒性ストレス下におけるTORC1の局在移動と活性低下機構の解析
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム第54回研究報告会（Web開催）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大原公太郎、武市有莉、丑丸敬史
2. 発表標題 出芽酵母M期における飢餓誘導性rDNA凝縮の分析
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム第54回研究報告会 (Web開催)
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
---------	---------