

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 4日現在

機関番号：37104

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011年度

課題番号：22770199

研究課題名（和文） 効率的グルコース消費に必須な生体システムの解明

研究課題名（英文） Identification and analysis of biological systems required for efficient glucose consumption

研究代表者 齋藤 成昭 (Saitoh Shigeaki)

久留米大学・分子生命科学研究所・准教授

研究者番号：30352123

研究成果の概要（和文）：

効率的なグルコース利用は、真核細胞が生理活動を行う上で必須です。本研究により、ヒト血糖値と同等の低濃度グルコースを効率的に利用するためには、CaMKKとTORC2とよばれる2つのタンパク質リン酸化酵素が必要であることが明らかとなりました。低濃度グルコースの効率的利用にはヘキソーストランスポーター機能の活性化が必須ですが、CaMKKはトランスポータータンパク質の発現制御、一方、TORC2はその局在制御に関わる可能性が示唆されました。これらの知見は血糖値制御メカニズムの理解を深めるものと期待できます。

研究成果の概要（英文）：

Efficient utilization of glucose is vital for a variety of physiological activities in eukaryotes. Our study using fission yeast reveals that two protein kinases, CaMKK and TORC2, are required for efficient utilization of low glucose concentrations, which are equivalent to a human blood glucose level. CaMKK is found to be involved in regulation of abundance of hexose transporter proteins, full function of which is essential for incorporation of low glucose concentrations, while TORC2 is involved in proper targeting of the transporters on the cell surface. These results may provide new insight into the cellular mechanism maintaining the blood glucose level.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2012年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：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：細胞機能、グルコース代謝、遺伝学、分裂酵母

1. 研究開始当初の背景

グルコース（ブドウ糖）は、真核生物にとって主要なエネルギー源です。それゆえ、細胞が効率的にグルコースを摂取・消費するこ

とは、エネルギー依存的な様々な生理的プロセスを進めるために不可欠であり、したがって細胞の生存・増殖に必須であると言えます。しかしながら、「細胞レベルでの効率的なグルコース利用」にどのような仕組みが働いて

いるのかについては、ほとんど知見が得られていませんでした。

本研究でモデル生物として用いた分裂酵母は、通常の実験室環境では2~3%の高濃度グルコースを含む培地で培養されています。しかしながら実は、0.1%程度の低濃度グルコースしか含まない培地中でも生育できることが分かりました。しかも驚くべきことに、その時の増殖速度は、高濃度グルコース環境で培養する場合とほぼ同等でした。さらに、カルモジュリンキナーゼキナーゼ(CaMKK)に機能欠損を有する酵母細胞は、高濃度グルコース環境では生育できるにも関わらず、低濃度グルコース環境では生育できないことも明らかとなりました。この知見は、「低グルコース環境での生育には、何らかの特別な生理機構が必要となる」ことを強く示唆しています。

2. 研究の目的

上述のような背景を受け、本研究では分裂酵母をモデル生物として用いて、低濃度グルコース環境での細胞増殖に必要な遺伝子を網羅的に同定し、その機能を解明することを目指しました。なお、ここで「低濃度」と称している0.1%程度のグルコース濃度は、実はヒトの空腹時血糖値とほぼ同等です。それゆえ、本研究の遂行により、ヒト血糖値コントロールの仕組みに関して細胞レベルでの知見が得られる可能性が期待できました。

3. 研究の方法

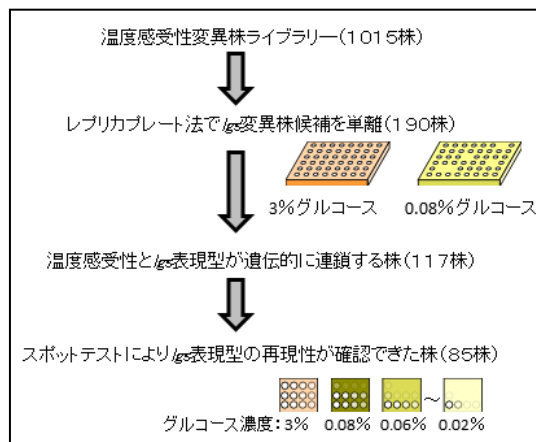
(1) 上述のCaMKK変異株と同様に、「低濃度グルコース環境での細胞増殖が特異的に阻害される」変異株(*Igs*株; low glucose sensitive)がスクリーニングにより多数得られていました。そこで、本研究ではそれぞれの*Igs*変異株について、その責任遺伝子を同定し、さらにその変異表現型を解析することで当該遺伝子の生理機能を解明しようとしました。

(2) *Igs*変異株の解析と並行して、トランスクリプトーム解析を行いました。具体的には、細胞を高濃度グルコース環境から低濃度グルコース環境に移した時に発現が誘導もしくは抑制される遺伝子を、マイクロアレイ解析により決定しました。

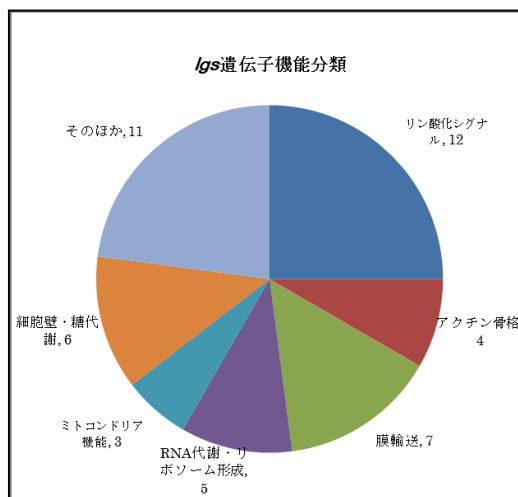
4. 研究成果

(1) まず1015株の温度感受性変異株ライブラリーより得られた約200株の*Igs*変異候補株を遺伝学的に解析し、さらにスポッ

トテストによって表現型の再現性を確認しました。その結果、最終的に85株の*Igs*変異株を取得しました(次図参照)。



次いで、各変異株について、その責任遺伝子を決定しました。現在までに64株で遺伝子決定が完了しています。いくつかの変異株では、同じ遺伝子に変異が生じていることが判明したため、合計48の*Igs*遺伝子(=低濃度グルコース環境での細胞増殖に必須な遺伝子)が明らかとなりました。推定される生理機能に従って*Igs*遺伝子を分類すると次図のようになります。

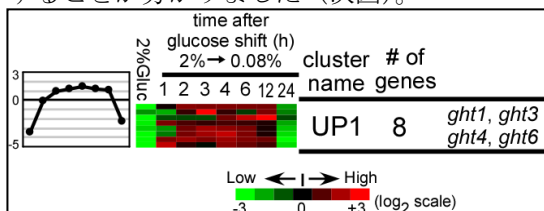


決定された*Igs*遺伝子の大半はヒトから酵母まで進化的に保存されていました。この結果は、低濃度グルコース利用に関わる生理メカニズムがヒトから酵母まで広く保存されている可能性を強く示唆しています。興味深いことに、同定された48遺伝子のうち4分の1を、タンパク質リン酸化・脱リン酸化シグナル伝達に関わると思われるものが占めていました。さらに、そのうち4つがTORC2とよばれるキナーゼ複合体に関与するものでした。TORC2は、target of rapamycin(TOR)

とよばれる、進化的に保存されたキナーゼを含む複合体です。

次いで、各 *Igs* 変異体についてグルコースの消費速度を測定しました。この消費速度は、培養液中に残存するグルコース量を経時的に測定することで算出しました。その結果、先述の CaMKK 変異体、TORC2 変異体、そして Sds23 という脱リン酸化酵素阻害因子の変異体では、低グルコース環境で培養したときに限り、グルコース消費速度が著しく低下していることが判明しました。Sds23 は CaMKK と拮抗的に働く脱リン酸化酵素の阻害因子であると考えられています。したがって、この結果は、CaMKK および TORC2 という二つのタンパク質リン酸化シグナル経路が、低濃度グルコースの効率的利用に必須であることを示しています。さらに詳細に調べたところ、これらの変異体では低濃度グルコースの細胞内への取り込み速度が、野生株に比べて大きく低下していました。

(2) 上記の *Igs* 変異株の解析と並行して行ったトランスクリプトーム解析では、低濃度グルコース環境では約 800 遺伝子の発現量が増加することが明らかとなりました。経時的な発現プロファイルの変化に基づいてクラスター解析を行ったところ、その中でも 8 つの遺伝子の発現量が増加することが分かりました (次図)。



興味深いことに、このクラスターに含まれる 8 つの遺伝子のうちの 4 つが、ヘキソーストランスポーターをコードしていました。ヘキソーストランスポーターは、膜貫通タンパク質で、ヘキソース (グルコースを含む) の、細胞膜を超えた細胞外から細胞内への拡散を促進します。それゆえ、これらのトランスポーターの発現上昇が、低濃度グルコースの利用に必須である可能性は十分に考えられました。

分裂酵母のゲノムを探索したところ、ヘキソーストランスポーターをコードすると思われる遺伝子が 8 つ見つかりました (*ght1*~*ght8*)。それぞれのトランスポータータンパク質の量を免疫ブロット法で調べたところ、① *Ght5* タンパク質の量が最大であること、② 低グルコース環境で培養すると *Ght1*、*Ght3*、*Ght4*、*Ght5*、*Ght6* の量が増加すること、③ 逆に *Ght2*、*Ght8* の量はわずかに減少すること、などが明らかとなりました。

(3) 上記の (1)、(2) の結果を総合すると、CaMKK シグナル経路および TORC2 シグナル経路がヘキソーストランスポータータンパク質の発現もしくは機能制御に関与している可能性が示唆されました。そこで、それぞれの *Igs* 変異体中でのトランスポーターの発現量を調べたところ、CaMKK 変異体と Sds23 変異体では、*Ght5* の発現量が (mRNA 量、タンパク質量ともに) 著しく低下していました。それに対して TORC2 変異体では、タンパク質自体は十分に発現しているようでした。しかしながら、GFP 融合タンパク質を利用して細胞内局在を調べたところ、TORC2 変異細胞では、*Ght5* トランスポーターが細胞膜に正しく局在できず、細胞質中に蓄積していることが明らかとなりました。

これらの知見より、CaMKK シグナル経路はヘキソーストランスポーターの発現制御に関与しており、一方 TORC2 シグナル経路はトランスポータータンパク質の細胞膜ターゲティングに関わっているものと考えられました。低濃度グルコース環境では、これらの 2 つの経路が連携して働くことにより、グルコース取り込みが活性化し、効率的なグルコース利用が可能になるのだらうと予想しています。現在、これらの結果をまとめた論文の投稿準備を進めています。

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 1 件)

① Pluskal T., Hayashi T., Saitoh S., Fujisawa A., Yanagida M.

“Specific biomarkers for stochastic division patterns and starvation-induced quiescence under limited glucose levels in fission yeast” (査読あり)

FEBS Journal 278 : 1299-1315, 2011 年
doi:10.1111/j.1742-4658.2011.08050.x

[学会発表] (計 2 件)

① 齋藤 成昭

「Target of Rapamycin complex 2 (TORC2) signaling pathway is required for utilizing low glucose」

The 6th international fission yeast meeting
2011 年 6 月 28 日、ボストン (米国)

② 齋藤 成昭

「Systematic identification of fission yeast *Igs* genes required for cell proliferation under glucose limited conditions」

第 34 回日本分子生物学会年会
2011 年 12 月 14 日、横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

齋藤 成昭 (Saitoh Shigeaki)

久留米大学・分子生命科学研究所・准教授

研究者番号：30352123

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし