

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 9 月 25 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24570221

研究課題名(和文) 環境グルコース濃度に応じたトランスポーター分子の機能発現制御メカニズムの解明

研究課題名(英文) Regulation of the expression and the function of glucose transporters in response to the environmental glucose concentrations.

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・教授

研究者番号：30352123

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：真核細胞が様々な生理プロセスを円滑に行うためには、主たるエネルギー源であるグルコースを効率的に取り込むことが必要である。グルコースは細胞膜上のグルコース輸送体を通じて細胞内へと運ばれるが、本研究で我々は、分裂酵母をモデルとして、そのゲノム中に含まれる八つのグルコース輸送体の機能発現制御について解析した。ヒト血糖値程度の低濃度のグルコースを分裂酵母細胞が利用するためにはGht5輸送体が必須であることが判明した。さらにGht5輸送体の遺伝子発現と細胞膜局在は、進化的に酵母からヒトに至るまで保存されたCaMKK経路、TORC2経路の二つのシグナル経路によって制御されていることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：To drive various energy-consuming cellular processes, eukaryote cells are required to efficiently incorporate glucose, which is the fundamental source of energy. Glucose is incorporated into the cell through glucose transporters, which locates on the cell membrane. In this study, we utilize fission yeast as a model, and analyze regulations of the expression and the function of glucose/hexose transporters. Among the eight transporters found in the fission yeast genome, the Ght5 transporter is found to be essential for cell to utilize low glucose concentrations equivalent to that of human blood. Furthermore, we find that the expression and the localization on the cell membrane of Ght5 are regulated through the CaMKK and the TORC2 signaling pathways, respectively, which are evolutionarily conserved from yeasts to man.

研究分野：分子生物学

キーワード：グルコース 輸送体 シグナル伝達 分裂酵母

## 1. 研究開始当初の背景

真核細胞にとって、グルコース(ブドウ糖)は主要なエネルギー源である。したがって、真核細胞がエネルギー依存的な様々な生理活動を行うためには、その細胞をとりまく環境(たとえば人体を構成する細胞の場合は血液など)から効率的にグルコースを細胞内へと取り込むことが必要となる。グルコースは親水性分子であるため、そのままでは細胞膜を透過することができない。細胞膜中にはグルコース輸送体とよばれる、グルコース分子を選択的に透過させるタンパク質が埋め込まれている。細胞をとりまく環境中からグルコースを効率的に取り込むためには、細胞膜上のグルコース輸送体の量や活性などが適切にコントロールされる必要があると思われるが、研究当初、そのコントロールの仕組みについては不明な点が多く残されていた。

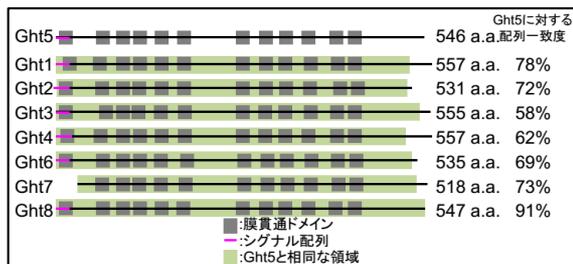
我々人類の場合、ゲノム中に13種のグルコース輸送体様遺伝子があることが分かっている。このうち、筋細胞や脂肪細胞で多く発現しているGLUT4輸送体の機能異常が糖尿病の発症機序と深いかわりを持つことが国内外の研究グループより指摘されていた。それゆえ、グルコース輸送体の機能コントロールメカニズムを理解することは、単に分子生物学上の疑問を解き明かすだけでなく、近年多くの日本国民の健康を脅かすメタボリックシンドロームである糖尿病に対するあらたな診断・治療法を開発するためにも重要であると考えられた。

本研究のモデル真核生物として用いた分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* のゲノム中には8種類のグルコース輸送体様遺伝子が存在することが分かっていた。分裂酵母は、細胞周期制御など、真核細胞の分裂増殖にかかわる根幹的メカニズムの解明のために広く用いられているモデル生物である。分裂酵母より得られた知見はそのまま哺乳類細胞にも当てはまることが多く、それゆえに真核生物の優れたモデル系であると考えられている。我々のグループによるこれまでの研究の結果、分裂酵母の8つのグルコース輸送体様遺伝子の多くは、環境中のグルコース濃度の増減に応じて、その発現量を変化させることが分かっていた。Ght5とよばれるグルコース輸送体は、環境中のグルコース濃度が低い(ヒト血糖値程度)場合に発現量が増大し、かつ、そのような低濃度グルコースしか存在しないような環境中での細胞増殖に必須であることが判明していた。しかしながら、本研究の開始当初には、これら8つのグルコース輸送体様遺伝子の役割の違いや、それぞれの機能制御メカニズムの詳細については不明のままであった。

## 2. 研究の目的

上述のような背景を受け、本研究では、分

裂酵母の8つのグルコース輸送体(Ght1~Ght8)について、それぞれの機能発現制御メカニズムを理解することを目指した。とりわけ、ヒト血糖値程度の低濃度グルコース環境での細胞増殖に必須となるGht5の解析に特に重点を置いた。環境中グルコース濃度の変化に応じた遺伝子発現量制御に関わる分子メカニズムを明らかにするとともに、発現した輸送体タンパク質を細胞膜上で正しく機能させるために必要になると予想される、タンパク質局在化メカニズムの理解を目指した。また、分裂酵母をモデルとした本研究より得られる成果が、ヒト細胞においてどの程度適応可能であるかについて検討した。



## 3. 研究の方法

実験解析を行うためのモデル生物としては、分裂酵母を使用した。遺伝子操作が可能である単細胞真核生物である分裂酵母はモデル生物として広く用いられている。先述した通り、細胞増殖などの根幹的な生理プロセスに関わる分子機構は分裂酵母からヒト細胞にいたるまで共通していることが分かっている。

まず、培養液中のグルコース濃度を变化させた時に、8つのグルコース輸送体の遺伝子発現がどのように変化するかについて、遺伝子転写および翻訳にどのような変化が生じるか検討した。また、各輸送体遺伝子にGFP(緑色蛍光タンパク質)を付加した遺伝子組換え体を作成し、各輸送体の細胞内局在変化を視覚化した。

次に、上記の解析で明らかになった遺伝子発現制御や細胞内局在に異常を示すような突然変異体を体系的に取得し、変異遺伝子を特定することで、グルコース輸送体の機能発現制御に関わる分子メカニズムを遺伝子レベルで明らかにした。

また、上記の解析と並行し、各輸送体遺伝子を破壊した遺伝子欠失酵母株を作成し、それらの遺伝子欠失株の性質を調べることで、各輸送体が果たす分子機能を推定した。

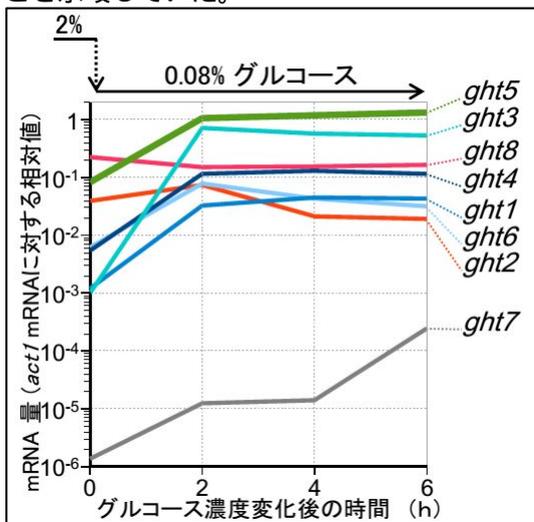
## 4. 研究成果

### (1) グルコース輸送体遺伝子の機能分類

8つのグルコース輸送体遺伝子の内のいずれか一つを破壊した遺伝子欠失株を作成し、そのそれぞれについて高濃度グルコース(3%)、低濃度グルコース(<0.08%)存在下で

の増殖能を検討したところ、*ght5* 遺伝子を欠く欠失株以外は、どちらの条件においても正常株と同程度に生育した。一方、*ght5* 遺伝子を欠く遺伝子欠失株は高濃度グルコース存在下では生育したが、低濃度グルコース存在下では生育できなかった。このことより、8つの輸送体のうち唯一 Ght5 のみが、低濃度グルコースの細胞内取り込みに関わっているものと推察された。なお、ここで言う「低濃度グルコース」とは、ヒト血糖値と同程度であり、自然な生理的条件下においても十分に生じ得る細胞外環境であると考えている。

次に、8つのうちいくつかの輸送体遺伝子を同時に欠いた欠失株を作成し、同様に増殖能を検討したところ、Ght1、2、5、8の4つを同時に欠く欠失株は、高濃度グルコース存在条件においても生育できず、他の炭素源であるグルコン酸存在条件下でのみ増殖可能であった。この結果より、高濃度グルコースの取り込みには、これら4つの輸送体が重複して機能しているものと推察された。興味深いことに、Ght1、2、8の3遺伝子を同時に欠く欠失株は、高濃度、低濃度グルコース存在環境のいずれにおいても、ほぼ正常株と同程度の増殖能を示した。先の結果と併せると、この結果は、低濃度グルコースの細胞内取り込みには Ght5 が必要かつ充分であることを示唆していた。



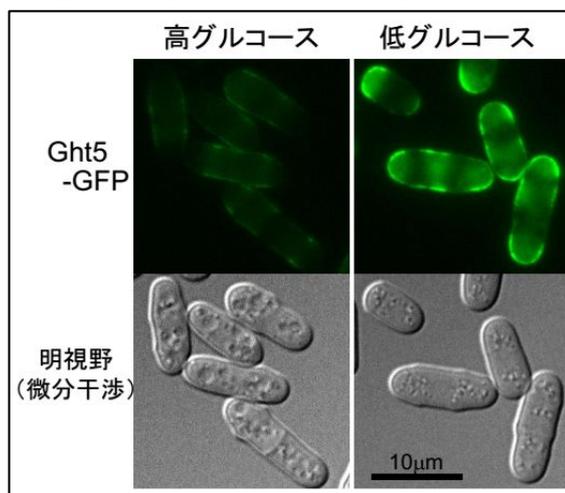
## (2) グルコース輸送体遺伝子の発現制御

8つの輸送体遺伝子の mRNA 量を定量的逆転写 PCR 法によって測定した。培養液中のグルコース濃度を 2% から 0.08% に低下させたところ、*ght2* と *ght8* の mRNA 量は約半分にまで減少した。一方、Ght1、3、4、5 の mRNA 量は、数倍に増加した。絶対量を比較すると、低グルコース条件下においては、8つの輸送体のうち、*ght5* 遺伝子の mRNA 量が最大であった。この結果は、先に述べた Ght5 が低濃度グルコースの取り込みに不可欠であるという結果とも矛盾しない。免疫プロット法により、タンパク質翻訳量を測定したところ、転写量の変化と呼応して、グルコース濃度の低下に伴い、Ght2、8 輸送体の量は減少し、一方、

Ght1、3、4、5 の4つの輸送体の量は増加していた。低グルコース環境下では、Ght5 のタンパク発現量が最大であった。

## (3) グルコース輸送体の細胞内局在

グルコース輸送体遺伝子のそれぞれに GFP を付加した遺伝子組換え体を作成し、それぞれの輸送体タンパク質の細胞内局在を検討した。8つの輸送体のうち、Ght6、7の2つについては、その発現量が少ないため、有意な蛍光シグナルを検出することができなかった。しかしながら、他の6つについては、細胞正面に局在化することが明らかとなった。ただし、細胞表面に均質に存在するわけではなく、高濃度グルコース存在環境においては細胞中央部により多く集まっており、一方、グルコース濃度低下に伴い新たに合成された輸送体タンパク質は細胞の両端部に集まる傾向があった。このような細胞表面での局在量の偏りの生理的意味は現在のところ不明である。偏りを生み出す分子メカニズムの理解とともに、今後の検討課題である。



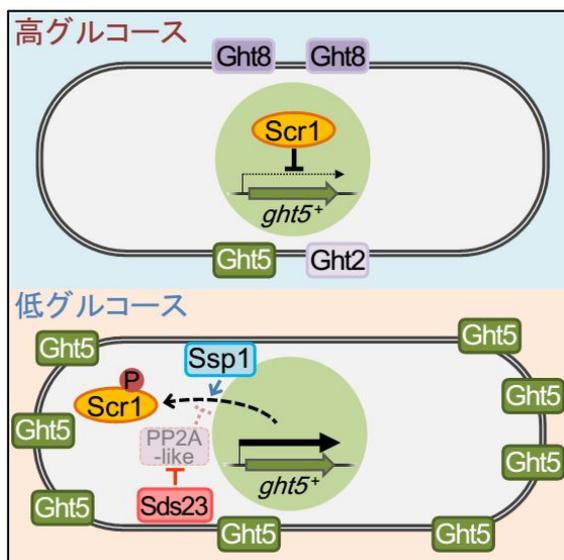
## (4) *ght5* 遺伝子発現および細胞表面局在化に関わる制御メカニズム

これまでの研究で、分裂酵母が低グルコース環境下で増殖するためには、TORC2 シグナル経路、CaMKK シグナル経路、の二つの独立したタンパク質リン酸化シグナル経路が必要であることが判明していた。一方、(1)で述べた通り、本研究により Ght5 輸送体も低グルコース環境下での細胞増殖に必須であることが明らかとなった。そこで、このシグナル経路と Ght5 輸送体の関係性を調査したところ、TORC2 シグナル経路は低グルコース環境下で Ght5 輸送体が細胞表面に局在化するのに必要であり、一方、CaMKK シグナル経路はグルコース濃度低下に伴う *ght5* 遺伝子の転写誘導に必須であることが明らかとなった。TORC2 シグナル経路に関わる遺伝子に欠損を持つ変異体酵母細胞では、Ght5 タンパク質が細胞表面に正しく局在化できず、細胞質中に蓄積した。また、CaMKK シグナル経路に欠損を持つ変異体細胞中では、培養液中のグルコース濃度を低下させて

も Ght5 の mRNA 量は低いままに抑えられていた。

*ght5* 遺伝子の発現制御メカニズムについて更なる解析を進めたところ、高濃度グルコース存在下では、Zn フィンガーモチーフを持つ Scr1 という転写抑制因子が *ght5* 遺伝子の発現を抑制していることが明らかとなった。グルコース濃度の低下に伴い Scr1 は核内から細胞質へと排出される。Scr1 が核外へと排出されることで転写抑制が解除され、*ght5* 遺伝子の転写が活性化すると推察された。さらに、先に述べた CaMKK シグナル経路は、この Scr1 の排出に必須であることが明らかとなった。CaMKK シグナル経路に欠損を持つ細胞中では、環境中のグルコース濃度の高低に関わらず、恒常的に Scr1 が核内に蓄積していた。

TORC2 シグナル経路、CaMKK シグナル経路は酵母からヒトに至るまで、進化の過程で高度に保存されている。国内外からの過去の文献を調査したところ、これらの遺伝子異常と糖尿病症を示唆する報告が見つかった。ヒト筋細胞・脂肪細胞において TORC2 シグナル経路は、インシュリン刺激に応答した GLUT4 輸送体の細胞表面への局在化に必須であり、一方 CaMKK シグナル経路は筋収縮刺激に応答した GLUT4 遺伝子転写の促進に必須であるとする報告がなされていた。我々の今回の研究成果と比較検討すると、分裂酵母およびヒト細胞におけるグルコース輸送体機能発現制御メカニズムは驚くほど類似しているものと推察された。



## 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2件)

1. Saitoh S., Mori A., Uehara L., Masuda F., Soejima S., and Yanagida M.  
Mechanisms of expression and translocation of major fission yeast glucose transporters regulated

by CaMKK/phosphatases, nuclear shuttling, and TOR.

Mol Biol Cell. (2015) Jan 15;26(2):373-86.

査読有り

2. Saitoh S., Yanagida M.: Does a shift to limited glucose activate checkpoint control in fission yeast?

FEBS Lett. 588:2373-2378, (2014) 査読無し

[学会発表](計7件)

1. 齋藤成昭: 低濃度グルコース環境下での細胞増殖に必須な2つのシグナル経路  
甲南大学 統合ニューロバイオロジー研究所セミナー, 2015年3月 兵庫県神戸市

2. 齋藤成昭: 生理的低濃度グルコースの利用に必要な分子メカニズムの解明

第32回 YEAST WORKSHOP

2014年11月 広島県呉市

3. 齋藤成昭: 低グルコース環境への適応に必須な2つのシグナル経路

第14回日本抗加齢医学会総会

2014年6月 大阪府大阪市

4. 齋藤成昭: 低グルコース環境での生育に必要な分裂酵母 Ght5 グルコース輸送体の機能発現は TORC2 と CaMKK によって制御される

第36回日本分子生物学会年会

2013年12月 兵庫県神戸市

5. 齋藤成昭: 低グルコース環境での細胞増殖に必須な2つのシグナル経路

2013年度国立遺伝学研究所研究会「染色体DNAの安定維持の分子メカニズム」

2013年9月 静岡県三島

6. 齋藤成昭: 低グルコース環境での細胞増殖に必須な2つのシグナル経路

第31回内分泌代謝学サマーセミナー

2013年7月 大分県由布市

7. Saitoh S.: Epigenetic mechanism stabilizing chromosomes with multiple centromeres.

7th International Fission Yeast Meeting

June 24-29 (2013), London, UK

[その他]

ホームページ等

[http://www.lsi.kurume-u.ac.jp/cell\\_biology/research\\_in\\_detail\\_1.html](http://www.lsi.kurume-u.ac.jp/cell_biology/research_in_detail_1.html)

## 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・教授

研究者番号: 30352123