

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：15201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25660059

研究課題名(和文) 分裂酵母に劇的な細胞死を誘導するメカニズム

研究課題名(英文) Mechanism that induce cell lysis in fision yeast

研究代表者

川向 誠 (KAWAMUKAI, MAKOTO)

島根大学・生物資源科学部・教授

研究者番号：70186138

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：分裂酵母のura4遺伝子破壊株の細胞溶解のメカニズムを調べることを目的として研究を行った。まず、細胞溶解の引き金となっている条件を調べたところ、ウラシルの枯渇が細胞溶解を誘導する主要因であることが明らかになった。さらに細胞溶解が起こる条件下では、細胞内にOMPが蓄積していた。細胞溶解を抑圧する遺伝子変異のスクリーニングを行なった結果、pub1遺伝子の欠損がよいサプレッサーであった。Pub1はユビキチンリガーゼであり、これが欠損することにより、ウラシルトランスポーターであるFur4の局在性の変化を誘発した。そのことがPub1欠損による細胞溶解の抑圧をしている理由であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The mechanism by which cell lysis is induced in *Schizosaccharomyces pombe* ura4 mutants was investigated in this study. Cell lysis was induced when uracil was consumed in any media tested. Under the condition that induced cell lysis, a precursor OMP was significantly accumulated, that might be a trigger of cell lysis. When we screened the mutants that suppress cell lysis, we found lack of pub1, which encodes an E3 ubiquitin ligase, clearly suppressed cell lysis in ura4 mutants. Localization of the uracil transporter Fur4 was affected by deletion of pub1, that is the reason how pub1 works as a suppressor of cell lysis in ura4 mutants.

研究分野：遺伝子工学

キーワード：分裂酵母 細胞溶解 *S. pombe* ウラシル ura4

1. 研究開始当初の背景

分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* の *ura4* 遺伝子破壊株をポリペプトン含有培地である YPD 培地において培養することで劇的な細胞溶解が起こることを以前発見し、報告している (Matsuo, Y., *et al.*)。この細胞溶解では、細胞壁の一部が弾け、その箇所より細胞の中身が流出する現象として観察することができる。この細胞溶解は、出芽酵母の *URA3* (*ura4* 遺伝子ホモログ) 破壊株では、観察されず、分裂酵母特異的に観察された。これまでに、分裂酵母の細胞壁の合成に関与する遺伝子変異株等は細胞溶解を起こすことが報告されている (Cortes J. C., *et al.*) が、本研究で解析している細胞溶解現象はウラシル代謝に関与する *ura4* 遺伝子の破壊株であり、細胞の形態、細胞壁に関与することを示す報告はない。従って、この研究は細胞の形態や細胞壁が関与する新たな細胞内機構の発見に繋がるのではないかと考えている。この分裂酵母 *ura4* 遺伝子欠損株で観察される細胞溶解現象が、どのようなメカニズムによるものなのかが不明であることから、本研究を行なった。

2. 研究の目的

本研究は分裂酵母を用いた「細胞死」について焦点を当てた研究である。分裂酵母 *ura4* 欠損株はペプトンの存在下で、定常期に達すると劇的に細胞が溶解する。この時、細胞は単に死んでいるという状況ではなく、細胞が破裂したように劇的に溶解する。この現象は細胞が栄養源を枯渇した際には自身を溶解させ、一部の生存した細胞に栄養を提供することにより、集団としての生き残りをかけた生存戦略だと捉えることができる。このような積極的な死の現象は高等動物におけるアポトーシス死に通じるものがある。積極的に死んでいるのか、寿命で死んでいるのかは、明確に分けることが難しいが、両者は密接に関係していることは間違いない。細胞死の研究は、物質代謝、エネルギー代謝、ミトコンドリアの機能、シグナル伝達など多様な視点からの解析が必要である。分裂酵母で見られる溶解は、出芽酵母の *URA3* 変異株では見られないことから、何らかの代謝系の違いが考えられる。細胞溶解現象は、他種の *S. japonicus* においても観察されることから、細胞溶解は *Schizosaccharomyces* 属特異的な現象である。そこで、本研究ではこの細胞溶解現象のメカニズムを理解することを目的としている。

3. 研究の方法

分裂酵母の扱い、遺伝子破壊株の作製や遺伝子クローニングはこれまでに報告しているスタンダードな方法で行なった (Hayashi *et al.*)。YPD, YES, PM 培地成分の組成は、

すでに報告されている方法で行なった (Moreno *et al.*)。化合物の測定は LC-MS (Xebo-TQS) を用いて行なった。アルカリフォスファターゼ活性は、先に報告した方法に従って行なった (Matsuo *et al.*)

4. 研究成果

分裂酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) の *ura4* はマーカ遺伝子として広く使用されているが、分裂酵母の *ura4* 遺伝子の欠損株は、ウラシル要求性を示すことのみならず、5-Fluorotic acid に耐性を持つことが知られている。Ura4 タンパク質は *de novo* UMP 合成経路において、Orotidine-5-monophosphate (OMP) を脱炭酸反応により Uridine-5-monophosphate (UMP) に変換する OMP デカルボキシラーゼであり、新生 UMP 合成の最後の反応を担う酵素である (図 1)。

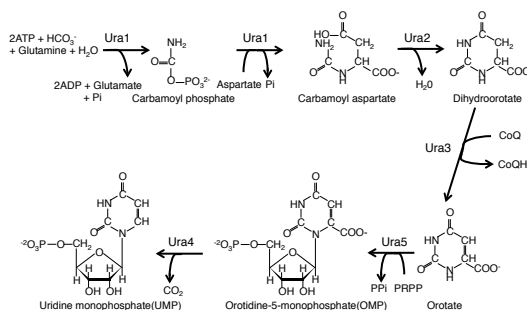


図 1、新生 UMP 合成経路

この経路に位置する酵素 (Ura1, Ura2, Ura3, Ura4, Ura5) の遺伝子破壊株は細胞外より取り込んだウラシルより UMP を合成する経路により、ウラシル添加することにより生育が可能である。しかしながら、細胞溶解が見られるのは *ura4* 遺伝子破壊株特異的な現象で、他のウラシル要求性株では観察されない。また、*ura4* 遺伝子と他の *ura* 遺伝子の二重遺伝子破壊株を作製した場合細胞溶解が抑圧される。また、細胞溶解は、YPD 培地に過剰量のウラシルを添加することで抑圧される。

まず、この *ura4* 遺伝子破壊株を YPD 培地で培養した時にどの段階で溶解するかを調べたところ、定常期に達する細胞は溶解することを見だし、その原因を調べることとした。YPD 培地で培養した際の培地中のウラシル濃度を測定したところ、細胞溶解が誘導される時期と培地中のウラシルが枯渇する時期がほぼ一致することが判った。さらに、ウラシルを一切含まない PM 最少培地でウラシル要求性株を培養すると生育は起こらないが、*ura4* 遺伝子破壊株は YPD 培地で培養したときより迅速かつ顕著に細胞溶解が誘導された。このことより、ウラシルの枯渇が細胞溶解を誘導する一因であることが明らかになった。また、他のウラシ

ル要求性株は細胞溶解が起こらないが、細胞の生育が停止していることが判った。また、PM 培地における細胞溶解は浸透圧調節剤であるソルビトールを添加することで抑圧される。これは、細胞溶解が浸透圧依存的な現象であることを示唆している。また、興味深いことにタンパク質合成阻害剤であるシクロヘキシミドを添加した場合も細胞溶解が抑圧されることを見いだした。このことから、*ura4* 遺伝子破壊株はウラシルの枯渇により何らかの機構で、能動的に細胞溶解が誘導される可能性が示唆された。

次に、LC-MS を用いて酵母細胞内の代謝物を測定した。その結果、YPD 培地で培養した Δ *ura4* 株にのみ OMP が蓄積しており、出芽酵母の *URA3* 破壊株では蓄積していないことが判った。*S. pombe* と同様に細胞溶解を起こす *S. japonicus* においても OMP の蓄積は見られた。また、ウラシルの添加により OMP の蓄積量が減少することが判った。OMP の蓄積は YES 培地で培養した場合や野生株、他の *ura* 遺伝子を破壊した株では見られないことから、OMP の蓄積が細胞溶解を誘導することを強く示唆する結果となった。細胞溶解の様子をカルコフラワーで、細胞壁染色試薬を用いて詳細に解析した。すると、細胞壁の一部が弾けて細胞壁が欠損する箇所がセプタムや細胞の先端付近という細胞壁合成が活発に行われている部分であることが明らかになった。また、浸透圧調節剤であるソルビトールを添加することで物理的に細胞溶解を抑圧することができることから、その際にどのような異常が起こっているかを観察した。その結果、*ura4* 遺伝子破壊株は野生株や *ura5* 遺伝子破壊株と比較して、細胞の伸長が起こっていることが明らかになった。また、*ura5* 遺伝子破壊株はウラシル枯渇時に細胞周期の進行が遅延するが、細胞の伸長は停止することが分かった。

以上の結果より *ura4* 遺伝子の破壊により前駆体である OMP が蓄積し、OMP が細胞の異常な伸長を引き起こし、その結果、細胞の先端において細胞壁の材料の不足や合成異常等の原因により細胞溶解が起こるのではないかと考えている。これらの結果より、OMP の蓄積と細胞溶解は密接に関係している可能性が示唆された。

さらに、非必須遺伝子破壊株のライブラリー3,400 株を用いて細胞溶解が抑圧される因子の探索を行なった。これらの遺伝子破壊株のライブラリー元来 *ura4* に変異が導入されているため、これらの株を YPD 培地で培養し、アルカリフォスファターゼの酵素活性を評価することにより細胞溶解の程度を調べた。その結果、*pub1* 変異体を含む、複数の株で細胞溶解が抑圧されている結果を得た (図 2)。

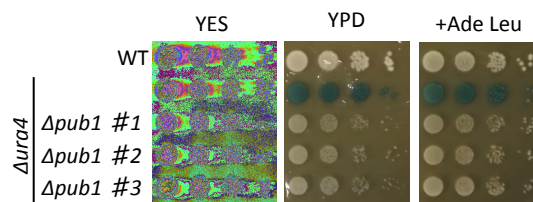


図 2. *pub1* 破壊による細胞溶解の抑圧状態の観察

次に、*pub1* 遺伝子がどこに影響を与えるかを知るためにウラシルトランスポーターである *Fur4* の破壊株を作製した。*pub1* 破壊株による細胞溶解が *fur4* 遺伝子を破壊することによって、再度溶解することが判った。このことは、*Pub1* が *Fur4* に何らかの影響を与えていることを示唆している (図 3)。

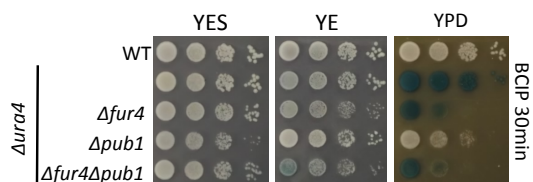


図 3. ウラシルトランスポーター *Fur4* の細胞溶解に与える影響

そこで、*Fur4* に GFP を融合させ、その局在を調べた。その結果、*Fur4*-GFP は、通常、ゴルジ体に局在するが、*pub1* を破壊することにより、膜への局在が亢進していた (図 4)。

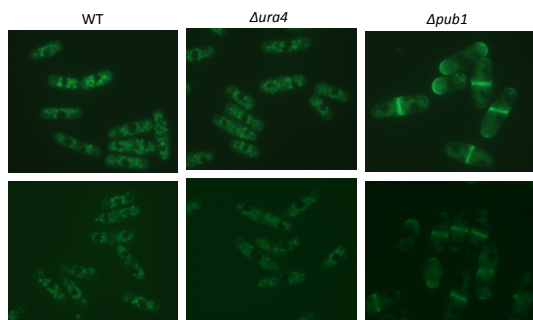


図 4. *Fur4*-GFP の細胞内局在

このことは、*Pub1* による *Fur4*-GFP の局在性の変化を誘導するものであった。すなわち、*Pub1* が *Fur4* に何らかの影響を与え、ゴルジ体に留まっているが、*pub1* が欠損するとその制御がなくなり、細胞膜上に留まるため、ウラシルの取り込みが亢進しているため細胞溶解が抑圧されると考えた。

本研究では、分裂酵母 *ura4* 変異株が YPD 培地で細胞溶解する発見を契機として、そのメカニズムの研究に取り組んだ。細胞溶解する主要因は、細胞内に取り込むウラシル量の枯渇にあり、細胞内では OMP が蓄積する。ウラシルの取り込みには Fur4 というトランスポーターが働いており、この Fur4 の局在性の制御に Pub1 が関与していることが判明した。

<引用文献>

- 1) Matsuo Y, Nishino K, Mizuno K, Akihiro T, Toda T, Matsuo Y, Kaino T, Kawamukai M. Polypeptone induces dramatic cell lysis in *ura4* deletion mutants of fission yeast. PLoS One. 2013; 8(3): e59887.
- 2) Cortés JC, Sato M, Muñoz J, Moreno MB, Clemente-Ramos JA, Ramos M, Okada H, Osumi M, Durán A, Ribas JC. Fission yeast Ags1 confers the essential septum strength needed for safe gradual cell abscission. J Cell Biol. 2012 ;198(4):637-56.
- 3) Hayashi K, Ogiyama Y, Yokomi K, Nakagawa T, Kaino T, Kawamukai M. Functional conservation of coenzyme Q biosynthetic genes among yeasts, plants, and humans. PLoS One. 2014 Jun 9;9(6):e99038.
- 4) Moreno S, Klar A, Nurse P. Molecular genetic analysis of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. Methods Enzymol. 1991;194:795-823

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 0 件)

[学会発表] (計 4 件)

- ① 分裂酵母 Δ *ura4* 株の細胞溶解を促進するポリペプトン中の成分の探索、榎間満咲・西野耕平・松尾安浩・川向誠、日本農芸化学会中四国支部第39回講演要旨集、講演要旨集、p. 27 (2014)
- ② 分裂酵母 *ura4* 破壊株における細胞溶解時の代謝物、西野耕平・榎間満咲・松尾祐児・川向誠、第47回酵母遺伝学フォーラム講演要旨集、p. 84 (2014)
- ③ Cell lysis of fission yeast Δ *ura4* strains is triggered by depletion of uracil. 西野耕平・榎間満咲・松尾安浩・川向誠、第37回日本分子生物学会年会 プログラム p. 151 (2014)
- ④ 分裂酵母の細胞溶解を引き起こす外的要因、榎間満咲・西野耕平・松尾安浩・川向誠、日本農芸化学会 2015年

度大会プログラム集、p. 99 (2015)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://yoshiki.life.shimane-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川向 誠 (KAWAMUKAI Makoto)

島根大学・生物資源科学部・教授

研究者番号：70186138

(2) 研究分担者

松尾安浩 (MATSUO Yasuhiro)

島根大学・生物資源科学部・助教

研究者番号：70596832

(3) 連携研究者

戒能智宏 (KAINO Tomohiro)

島根大学・生物資源科学部・准教授

研究者番号：90541706

(4) 研究協力者

西野耕平 (Nishino Kohei)

鳥取大学大学院連合農学研究科・博士課程

2年