

令和 2 年 7 月 15 日現在

機関番号：32689

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04781

研究課題名(和文) 環境変化にตอบสนองしてRho1GTPaseがシグナルアウトプットを変化させる仕組み

研究課題名(英文) A mechanism that switches the signaling specificity of Rho1 GTPase

研究代表者

吉田 知史 (Yoshida, Satoshi)

早稲田大学・国際大学院・教授

研究者番号：60519320

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：出芽酵母Rho1GTPaseはヒト発がん遺伝子RhoAの相同遺伝子でストレス応答時にはPKCを介したMAPキナーゼ経路の活性化を、栄養増殖時にはPP2Aを介した細胞壁合成を促進することが知られている。しかしRho1がどのようにしてPKCとPP2Aという2種類の異なる標的を使い分けているのかは謎であった。本研究では Rho1-PKC経路とRho1-PP2A経路はそれぞれポジティブフィードバックによって安定化すること及びPKCとPP2Aがお互いに阻害しあうことを明らかにした。これらの結果はRho1下流の二つの経路がどちらか一方のみしか活性化できないことをうまく説明することができる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Rhoの過剰発現や異常な活性化は癌、糖尿病、神経疾患、発生異常等さまざまな疾患の原因となることが知られているが効率よくRhoの活性そのものを阻害する薬剤の開発はほとんど進んでいない。本研究ではRhoシグナル伝達系のアキレス腱として下流のエフェクターであるPKCとPP2A間の相互作用が重要であることを明らかにした。PKCやPP2Aという阻害剤開発が十分に進んでいる分子を標的とすることでRho関連疾患の制御や治療が可能であると期待される。

研究成果の概要(英文)： Budding yeast Rho1 GTPase activates PKC-MAP kinase pathway in a stressful condition while it promote cell wall synthesis via PP2A-Cdc55 pathway in a growth condition. A key question in this study was to understand how Rho1 specifically select its targets (PKC and PP2A) in different growth conditions. We have shown that activity of both Rho1-PKC and Rho1-PP2A pathways are maintained by positive feedback mechanisms and that activity of PKC and PP2A are mutually antagonistic. Mutual antagonism between two Rho1 effectors may explain why only one pathway downstream of Rho1 is activated at a time.

研究分野：細胞生物学

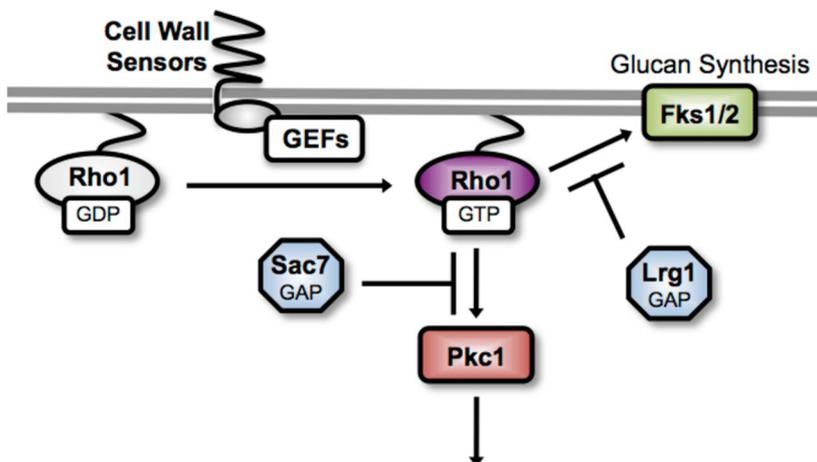
キーワード：RhoGTPase PKC PP2A 酵母

1. 研究開始当初の背景

RhoA の過剰発現や変異は癌、糖尿病、神経疾患、発生異常等さまざまな疾患の原因となる。しかし RhoA の異常が病変を引き起こすメカニズムはほとんど分かっていない。RhoA には多数の標的分子が存在することが知られており、その標的分子全てを一斉に活性化するのではなく、刺激(入力シグナル)の種類に応じて特定の標的(出力シグナル)のみを選択的に活性化していると考えられているが RhoA がどのようにして特別な標的のみを選び好みしているのかは謎のままであった。

2. 研究の目的

本研究では複雑な RhoA シグナル伝達系を単純化して捉えるために比較的シンプルな出芽酵母 Rho1(下図)を利用して Rho シグナル伝達の特異性が生まれる分子メカニズムの解明に挑戦した。



Rho の活性化(GTP 結合)ステップそのものではなく活性化後に特定のシグナル伝達系のみが選択的に刺激される原理を明らかにすることで疾患を引き起こす原因となりうる特定の downstream シグナル経路のみを標的するような薬の開発が可能になると期待できる。

3. 研究の方法

出芽酵母には3種類の Rho1GEF (Rom1, Rom2, Tus1), 2種類の Rho1GAP (Lrg1, Sac7), そして主要な標的として Pkc1-MAP kinase 経路と Fks1/2 による細胞壁合成経路の2つが知られている。我々は Pkc1 下流の MAP kinase の活性及び細胞壁グルカン量を指標として用いてこれらの活性への GEF 及び GAP の関与を解析した。

A. Rho1 シグナル特異性への GEF と GAP の関与

我々はまずそれぞれの Rho1GEF, Rho1GAP がシグナル選択性に与える影響を解析した。

Rho1GEF それぞれ単独破壊では表現系を示さないものの3重変異株は致死であった。同様に Rho1GAP の2重破壊株も致死であったが SAC7 破壊株では Pkc1 の異常な活性化、LRG1 の破壊株では細胞壁合成の異常な亢進が見られ GAP レベルでの制御が Rho1 のシグナルアウトプットに大きな影響力を与えることがわかった。Rho1GAP の活性を定量する必要性から酵母細胞内での Rho1GAP 活性を測定する生化学アッセイ系を構築した (Jonasson et al., 2016)。

B. Rho1 の新規標的因子として PP2A^{Cdc55} の同定

Rho1GEF に依存せずに Rho1 シグナル系を制御する因子を同定する目的で Rho1GEF3 重変異株の致死性を抑圧するマルチコピサプレッサーの同定を行い CDC55 を単離した。Cdc55 は PP2A(タンパク質脱リン酸化酵素 2A)の制御サブユニットである。さらに解析を進め Rho1 と Cdc55 は Zds1/2 というアダプタータンパク質を介して結合し Rho1 による細胞壁合成を促進することを明らかにした (Jonasson et al., 2016)。PP2A^{Cdc55} がどうやって Rho1 依存的な細胞壁合成を制御するのかその機構の解析を進め Cdc55 が Rho1GAP である Lrg1 の活性を負に制御していることを突き止めた (Jonasson et al., 2016)。

C. Pkc1 経路と PP2A 経路の関係

CDC55 の変異株では細胞壁が弱くなる一方 Pkc1 シグナルが増強されていた。逆に CDC55 の活性を上昇させると Pkc1 シグナルは抑制されていた (Jonasson et al., 2016)。この原因はもう一つの Rho1 GAP である Sac7 のタンパク量の安定化によることを明らかにした (Jonasson, Iwai, Yoshida. 投稿準備中)。Sac7 は Pkc1 によるリン酸化依存的にプロテアソームで分解される (Jonasson, Iwai, Yoshida. 投稿準備中) が PP2A^{CDC55} による脱リン酸化が Sac7 の安定化に必須であると考えられる。

これらの結果から Rho1 シグナル伝達系には2つの重要な制御機構があることが明らかになった。

D. ストレス応答時に Rho1 が Pkc1 を活性化するメカニズム

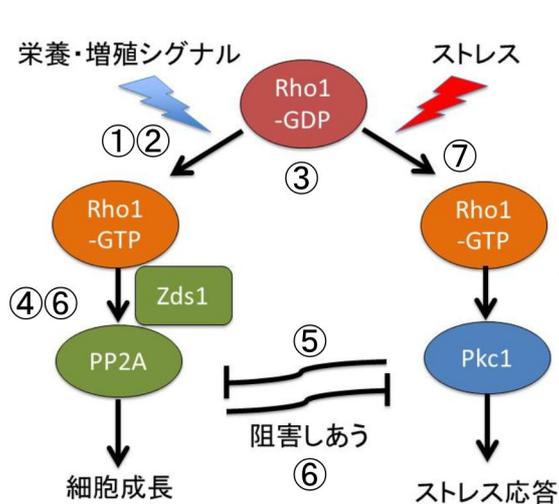
脂質恒常性の異常や低浸透圧ショックは細胞膜伸張ストレスを引き起こし Rho1-Pkc1 の活性化を引き起こすがこのとき細胞壁の合成は起こらない。我々は低浸透圧ショック時の Rho1-Pkc1 の活性化が mTORC2-Akt1 経路によるものであることを明らかにした (Hatakeyama et al., 2017)。mTORC2-Akt1 経路による Rho1-Pkc1 の活性化には脂質フリッパーゼの不活性化に伴う細胞膜のリモデリング (Hatakeyama et al., 2017) と mTORC2-Akt1 による Rho1 の serine78 のリン酸化 (Hatakeyama and Yoshida. 投稿準備中) の両者が必須である。Rho1 のリン酸化については変異体等の解析は終了した。現在リン酸化特異的抗体を作成して vivo での証明を目指している。

4. 研究成果

我々の研究グループは酵母 Rho1 の解析で世界をリードしてきた(下図)。これまで Rho1 がどのようにしてストレス応答と細胞壁合成を切り替えているのかは長い間謎であった。今回 Rho1 の標的として PP2A を新しく同定したことは複雑な Rho シグナル伝達を理解する上で非常に重要な意味を持つ。本研究では Rho1-PKC 経路と Rho1-PP2A 経路はそれぞれポジティブフィードバックによって安定化すること及び PKC と PP2A がお互いに阻害しあうことを明らかにした。これらの結果は Rho1 下流の二つの経路がどちらか一方のみしか活性化できないことをうまく説明することができる。

本研究期間の途中、研究室の引越し、立ち上げなどで全ての研究成果が論文として出版できたわけではない。しかし当該研究分野における重要な発見はすでに複数報の論文として発表したこと。現在2本の論文を投稿準備中であることから当初の目標は十分に達成できたと考えている。

Yeast Rho1 signaling



1. Yoshida et al., *Science* 2006
2. Yoshida et al., *EMBO Rep.* 2008
3. Yoshida et al., *Genes Dev.* 2009
4. Rossio and Yoshida. *JCB* 2011
5. Kono et al., *Cell* 2012
6. Jonasson et al., *JCB* 2016
7. Hatakeyama et al., *JCS* 2017

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Takaine Masak, Ueno Masaru, Kitamura Kenji, Imamura Hiromi, Yoshida Satoshi	4. 巻 132
2. 論文標題 Reliable imaging of ATP in living budding and fission yeast	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Cell Science	6. 最初と最後の頁 649-659
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/jcs.230649	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 Ito Hiroaki, Sugawara Takeshi, Shinkai Soya, Mizukawa Satoshi, Kondo Ayaka, Senda Hisamichi, Sawai Kengo, Ito Koki, Suzuki Sayaka, Takaine Masakatsu, Yoshida Satoshi, Imamura Hiromi, Kitamura Kenji, Namba Toshinori, Tate Shin-ichi, Ueno Masaru	4. 巻 511
2. 論文標題 Spindle pole body movement is affected by glucose and ammonium chloride in fission yeast	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 820 ~ 825
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2019.02.128	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 Hatakeyama R, Kono K, Yoshida S.	4. 巻 130
2. 論文標題 Ypk1 and Ypk2 kinases maintain Rho1 at the plasma membrane by flippase-dependent lipid remodeling after membrane stresses.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Cell Science	6. 最初と最後の頁 1169-1178
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/jcs.198382	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 該当する
1. 著者名 Kazuto Ohashi, Romanas Chaleckis, Masak Takaine, Craig E. Wheelock, Satoshi Yoshida	4. 巻 7
2. 論文標題 Kynurenine aminotransferase activity of Aro8/Aro9 engage tryptophan degradation by producing kynurenic acid in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 12180
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-017-12392-6	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 該当する

1. 著者名 Jonasson EM, Rossio V, Hatakeyama R, Abe M, Ohya Y, Yoshida S	4. 巻 212
2. 論文標題 Zds1/Zds2-PP2ACdc55 complex specifies signaling output from Rho1 GTPase	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Journal of Cell Biology	6. 最初と最後の頁 51-61
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1083/jcb.201508119	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 該当する

[学会発表] 計38件 (うち招待講演 17件 / うち国際学会 5件)

1. 発表者名 大橋一登、高稲 正勝、吉田知史
2. 発表標題 過剰トリプトファンはTORを抑制する
3. 学会等名 大阪大学蛋白研セミナー “TOR を介した細胞成長統御の総合的理解” (第8回TOR 研究会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高稲 正勝、吉田知史
2. 発表標題 Tor複合体はATPセンサーか?
3. 学会等名 大阪大学蛋白研セミナー “TOR を介した細胞成長統御の総合的理解” (第8回TOR 研究会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 吉田知史
2. 発表標題 TORC1とTORC2のクロストーク
3. 学会等名 大阪大学蛋白研セミナー “TOR を介した細胞成長統御の総合的理解” (第8回TOR 研究会) (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大橋一登、高稲 正勝、吉田知史
2. 発表標題 過剰トリプトファンによるアミノ酸インバランスはTORを標的とする
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム 第51回 研究報告会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高稲 正勝、吉田知史
2. 発表標題 ATP 濃度恒常性の生理的意義
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム 第51回 研究報告会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宮崎光江、高稲正勝、吉田知史
2. 発表標題 型破りな分泌関連遺伝子群の網羅的同定とその解析
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム 第51回 研究報告会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 吉田知史
2. 発表標題 型破りな分泌の謎に迫る
3. 学会等名 酵母細胞研究会 第51回 例会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宮崎光江、高稲正勝、吉田知史
2. 発表標題 型破りな分泌関連遺伝子群の網羅的同定とその解析
3. 学会等名 日本分子生物学会年会 (パシフィコ横浜)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高稲正勝、吉田知史
2. 発表標題 細胞内ATP 濃度の可視化により見えてきたATP 濃度恒常性の生理的意義
3. 学会等名 日本分子生物学会年会 (パシフィコ横浜)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Satoshi Yoshida
2. 発表標題 Genes involved in type III unconventional protein secretion in budding yeast
3. 学会等名 International membrane biology research forum (OIST) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高稲 正勝、今村博臣、吉田知史
2. 発表標題 ATP 濃度とタンパク質凝集の知られざる関係
3. 学会等名 日本遺伝学会 第91回年会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 ATP 濃度恒常性とその破綻
2. 発表標題 高稲 正勝、今村博臣、吉田知史
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム 第51回 研究報告会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大橋一登、高稲 正勝、吉田知史
2. 発表標題 アミノ酸インバランスによる細胞毒性
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム 第51回 研究報告会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大橋一登、高稲 正勝、吉田知史
2. 発表標題 過剰トリプトファンによるアミノ酸インバランス機構について
3. 学会等名 第9回TOR 研究会(久留米大学)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高稲 正勝、吉田知史
2. 発表標題 ATP 濃度を維持する分子メカニズム
3. 学会等名 第9回TOR 研究会(久留米大学)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高稲 正勝、今村博臣、 吉田知史
2. 発表標題 ATP 濃度とタンパク質凝集の知られざる関係
3. 学会等名 日本遺伝学会 第91回年会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高稲 正勝、今村博臣、 吉田知史
2. 発表標題 ATP 濃度恒常性とその破綻
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム 第51回 研究報告会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Satoshi Yoshida
2. 発表標題 Genes involved in type III unconventional protein secretion in budding yeast
3. 学会等名 International membrane biology research forum (OIST) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高稲 正勝、吉田知史
2. 発表標題 細胞内ATP 濃度の可視化により見えてきたATP 濃度恒常性の生理的意義
3. 学会等名 日本分子生物学会年会 (パシフィコ横浜)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宮崎光江、高稲正勝、 吉田知史
2. 発表標題 型破りな分泌関連遺伝子群の網羅的同定とその解析
3. 学会等名 日本分子生物学会年会（パシフィコ横浜）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 吉田知史
2. 発表標題 型破りな分泌の謎に迫る
3. 学会等名 酵母細胞研究会 第51回 例会（キリンビール横浜工場）（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 吉田知史
2. 発表標題 TORC1とTORC2のクロストーク
3. 学会等名 大阪大学蛋白研セミナー “TOR を介した細胞成長統御の総合的理解” （第8回TOR 研究会）（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宮崎光江、高稲正勝、 吉田知史
2. 発表標題 型破りな分泌関連遺伝子群の網羅的同定とその解析
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム 第51回 研究報告会 （九州大学医学部100年講堂）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高稲 正勝、吉田知史
2. 発表標題 ATP 濃度恒常性の生理的意義
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム 第51回 研究報告会 (九州大学医学部100年講堂)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大橋一登、高稲 正勝、吉田知史
2. 発表標題 過剰トリプトファンによるアミノ酸インバランスはTORを標的とする
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム 第51回 研究報告会 (九州大学医学部100年講堂)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Satoshi Yoshida
2. 発表標題 ATP homeostasis visualized by a novel biosensor QUEEN
3. 学会等名 Japan-Canadian Frontiers of Science Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 高稲 正勝、今村 博臣、吉田 知史
2. 発表標題 出芽酵母の細胞内ATP濃度変動を制御する仕組み
3. 学会等名 日本生体エネルギー研究会 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 吉田知史
2. 発表標題 出芽酵母TORC2-SGKによるPkc1活性化のメカニズム
3. 学会等名 TOR研究会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Masak Takaine, Hiromi Imamura, Satoshi Yoshida
2. 発表標題 Visualization of energy status of each single yeast cell
3. 学会等名 生命科学系学会合同年次大会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 高稲 正勝、今村 博臣、吉田 知史
2. 発表標題 出芽酵母の細胞内ATP濃度変動を制御する仕組み
3. 学会等名 生命科学系学会合同年次大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 大橋一登、高稲正勝、吉田知史
2. 発表標題 キヌレニンアミノ転移酵素はトリプトファン毒性を中和する
3. 学会等名 生命科学系学会合同年次大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 吉田知史
2. 発表標題 Pkc1キナーゼとPP2Aホスファターゼの拮抗がRho1 GTPaseの出力シグナルを安定化させる
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム年会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 高稲正勝、今村博臣、吉田知史
2. 発表標題 出芽酵母の細胞内ATP濃度変動を制御する仕組み
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム年会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 大橋一登、Romanas Chaletkis、高稲正勝、Craig Wheelock、吉田知史
2. 発表標題 キヌレニンアミノ転移酵素はトリプトファン毒性を中和する
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム年会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Satoshi Yoshida
2. 発表標題 A mechanism that specifies signaling output of Rho1 GTPase
3. 学会等名 14th International Conference on Yeast（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Satoshi Yoshida
2. 発表標題 A mechanism that regulates Rho1 signaling specificity
3. 学会等名 UK-Japan Frontiers of Science Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Masak Takaine, Hiromi Imamura, Satoshi Yoshida
2. 発表標題 In vivo imaging of cytoplasmic ATP in living yeast cells reveals a profound effect of oxidative stress on ATP level
3. 学会等名 日本生物物理学会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 高稲正勝、今村博臣、吉田知史
2. 発表標題 細胞質ATP濃度の可視化により見えてきた、酸化ストレス下における酵母の生存戦略
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2016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
研究 分担 者	高稲 正勝 (Takaine Masak) (20573215)	群馬大学・未来先端研究機構・助教 (12301)	