

令和元年6月24日現在

機関番号：34506

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07359

研究課題名(和文) 栄養環境とプロテアソーム経路とを連係するシグナル伝達ネットワークの解明

研究課題名(英文) Studies on the signal transduction network connecting the ubiquitin-proteasome system to the extracellular nutritional environment

研究代表者

武田 鋼二郎 (Takeda, Kojiro)

甲南大学・理工学部・准教授

研究者番号：90426578

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：分裂酵母をモデル系として、細胞外栄養環境の情報を、プロテアソーム系に伝達し連係させるシグナル伝達ネットワークの解明を目標とした。開始当初から、進化的に保存されたGreatwall Kinase (Gwl)/ α -Endosulfine(Ensa)-PP2A経路が、上の役割を担う可能性が指摘されていたため、これらに注目した。まず、分裂酵母ではGwl/Ensa経路についての報告がなかったため、この経路を構成する因子群を明らかとし、生理機能とあわせて学術論文として発表した。また、栄養環境とプロテアソーム、あるいはその局在制御系を連係するのがGwl/Ensa経路であるということを示唆する結果が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

プロテアソームに依存したタンパク質分解は、細胞周期やシグナル伝達などの真核生物に普遍的な生命現象に関与しているにとどまらず、老化や寿命への関連も指摘され注目されている。また、栄養状態や代謝が老化や寿命に大きな影響を持つことも広く受け入れられている。本研究は、栄養とプロテアソーム周辺を結びつける細胞内のシグナル伝達ネットワークに焦点をあわせている。また、実験材料は菌類である酵母であるものの、注目している分子群はいずれもヒトまで保存されたものであり、基礎医学分野への将来的な情報の提供という意味合いで学術的・社会的意義がある。

研究成果の概要(英文)：The aim of this research is to elucidate the signal transduction network that connects extracellular nutritional environment to regulations of intracellular proteolysis system, especially, the ubiquitin proteasome system, by using the fission yeast *S. pombe* as a model. Because we had preliminary results suggesting the evolutionally conserved Greatwall kinase (Gwl)/ α -Endosulfine (Ensa)-PP2A pathway may be involved, we focused on this pathway. We clarified proteins composing Gwl/Ensa-PP2A pathway in the fission yeast and the physiological functions of the pathway. We also obtained results strongly suggesting that the fission yeast Gwl/Ensa-PP2A pathway is engaged in transmitting extracellular nutritional information to the proteasome or the localization factor(s) of the proteasome.

研究分野：細胞生物学

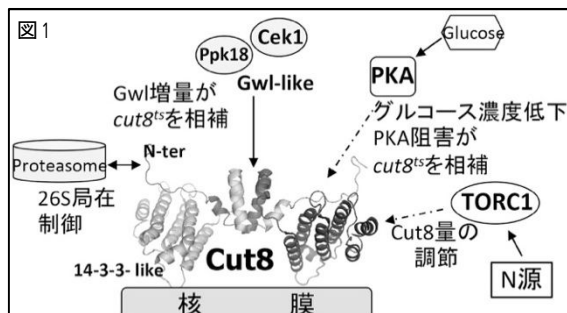
キーワード：栄養素 タンパク質分解 ホスファターゼ Greatwallキナーゼ 分裂酵母 プロテアソーム

様式 C - 19, F - 19 - 1, Z - 19, CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

プロテアソームは、細胞周期、シグナル伝達、転写制御など、広範な生命現象に関与しており、真核生物にとって必須な巨大プロテアーゼ複合体である。プロテアソームの基質タンパク質は、ユビキチン活性化酵素 (E1)、ユビキチン共役酵素 (E2)、ユビキチン連結酵素 (E3 リガーゼ) のはたらきによってポリユビキチン化され、そのポリユビキチン鎖がプロテアソームによって認識される。プロテアソームによる基質タンパク質の分解の制御は、主に、ユビキチンを基質に付加する E3 リガーゼの活性化、E3 リガーゼによる基質の認識、の段階でなされることが明らかとなっている。しかしながら、プロテアソーム自体の細胞内局在、活性の制御の理解は発展途上と言える。

真核生物の良いモデル系である分裂酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) では、プロテアソームは核内に局在しており、ホモダイマーを形成する核タンパク質である Cut8 が制御している^{1,2}。結晶構造解析により、Cut8 はリン酸化タンパク質のアダプター 14-3-3 類似のドメインを持ち、そこで核膜と相互作用していること、N 末端でプロテアソームと相互作用することが明らかとなっている²。このように、分裂酵母では Cut8 を中心にプロテアソームの局在化機構の理解は進んでいるものの、それが細胞内外の環境変化に応答して制御される仕組みはほとんど理解されていない。ただ、これまでの知見から、いくつかのシグナル伝達因子が Cut8 と遺伝学的相互作用を示すことが知られており (図 1)、これらのシグナル伝達因子 (キナーゼ、ホスファターゼ) のネットワークが Cut8 あるいはプロテアソームそのものの制御に関わる可能性が考えられていた。Cut8 と最も強い遺伝学的相互作用を示すシグナル伝達因子は、Ser/Thr キナーゼである Cek1 である³。Cek1 は出芽酵母 Rim15、動物の Greatwall キナーゼ (以下、Gwl) のオルソログと考えられる。Gwl は、基質である



Endosulfine (Ensa) をリン酸化し、リン酸化 Ensa は B55 サブユニットを持つ 2A 型ホスファターゼ (PP2A^{B55}) に直接結合し、その活性

を阻害することで細胞周期の根幹に関わる⁴。この分子ネットワークは、出芽酵母でも保存されており、出芽酵母の Gwl オルソログ Rim15 の上流には、栄養代謝制御の主要な制御因子である TORC1 があり、TORC1 の不活性化が Rim15 の活性上昇をもたらさすことが明らかとなっている。興味深いことに、高温で Cut8 が失活する *cut8^{ts}* 変異株は、培地の栄養源 (グルコース) が乏しい状態では、高温感受性が抑制され生育可能になる。Cut8 と Rim15 オルソログである Cek1 が遺伝学的相互作用を示すことと合わせて考えると、培地の栄養状態の変化が、Cek1 などを通じて Cut8 あるいはプロテアソーム系に伝えられるシグナル伝達機構が存在する可能性が示唆されると言える。

分裂酵母においては、Cek1 以外に Ppk18, Ppk31 が Gwl とアミノ酸配列上の類似性を持ち、オルソログの可能性がある。分裂酵母 Mug134 が Ensa のオルソログと考えられる。しかし、研究開始当初は、これら Gwl/Ensa 経路の分裂酵母オルソログ候補の機能解析は報告されていなかった。また、申請者らは Cek1 以外に Ppk18 が Cut8 と遺伝学的相互作用を示すことを見出していたが、これらの相互作用が Gwl オルソログとしての機能によるものか (すなわち PP2A^{B55} 活性の変化が原因なのか)、については何も情報がない状態であった。

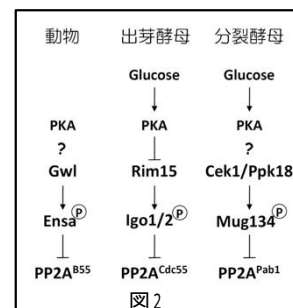
以上より、本研究開始時においては、細胞外栄養環境の情報が、分裂酵母 Gwl/Ensa 経路を通じて何らかの形でプロテアソーム依存的タンパク質分解周辺に伝えられている可能性が示唆されていっつも、その是非を問うには実験的な証拠を積み上げなければならない、という状況であり、これが本研究の動機である。

2. 研究の目的

研究申請時においては、以下の 2 点を目標として掲げていた。

(1) Cut8・プロテアソーム系と栄養環境変化を連係させるネットワークの解明

グルコース濃度低下や Cek1, Ppk18 の増量が *cut8^{ts}* を抑制することが判明しているが、これが図 2 で示すようなネットワークとしての関与なのか、否か、明らかではなかった。さらに Mug134 や PP2A^{B55} の活性の変動がどのように関わるのかも不明であった。酵母遺伝学の強みを生かし、全容を明らかにする。また、分裂酵母において、Gwl 類似キナーゼは Cek1, Ppk18, Ppk31 があり、Ensa オルソログとして Mug134 があるが、他生物種のような Gwl/Ensa-PP2A 経路が存在するかどうかは明らかではなく、上記の目標を達成するためには、まず、分裂酵母における Gwl/Ensa-PP2A 経路の存在を示し、その生理的な役割を明らかにする必要がある。



(2) 栄養環境変化が Cut8・プロテアソーム系の何に伝達されるのか。

(1)であきらかとなったネットワークが Cut8・プロテアソーム系のどの側面に作用するのか。すなわち、Cut8 やその周辺分子のリン酸化状態の変化を通じてプロテアソームの局在に関わるのか、あるいはプロテアソーム自体の量や活性に関わるのか。これらについて遺伝学的、生化学的な実験を組み合わせてアプローチする。

3. 研究の方法

前述の研究の目的(1)(2)ともに、実験材料としては分裂酵母を用いる。

(1)に関しては次のような方法をとった。分裂酵母における Gwl/Ensa-PP2A 経路の存在の証明のためには、Gwl オルソログ候補 3 遺伝子、Ensa オルソログである *mug134⁺* 遺伝子の遺伝子破壊株を用いた遺伝学的実験を採用した。さらに、精製タンパク質を用いた *in vitro* Phosphatase assay も並行して行い、生化学・遺伝学両面からアプローチを行う。Cut8・プロテアソーム系をとりまくシグナル伝達ネットワークの証明のためには、同様に Gwl オルソログの遺伝子破壊、*mug134⁺* の遺伝子破壊と *cut8^{ts}* 変異株を組み合わせた遺伝学的実験を中心においた。さらに、Cut8・プロテアソーム系をとりまくシグナル伝達ネットワークの未同定の新規因子を発見するために、dosage suppressor screening を行なった。

(2)については、栄養源低下や Gwl (Cek や Ppk18) 増量が *cut8^{ts}* 変異株の高温感受性を抑制している際、プロテアソームの局在回復を伴うのか、否かを明らかにしたのち、プロテアソームの量や活性を生化学的に調べる、という方針を立てていた。

4. 研究成果

(1) 分裂酵母の Gwl/Ensa-PP2A^{B55} 経路の生理的役割

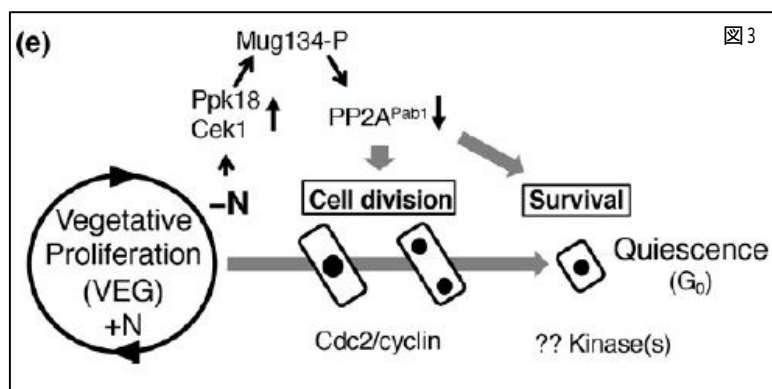
本項目については、応募書類にも記載した通り、申請時前から着手して解析が進んでいたが、論文投稿し研究を完成させることができたのは、本研究課題の最終年度である 2018 年度であった⁵。この論文では、プロテアソーム依存的タンパク質分解と分裂酵母 Gwl の関わりについての解析には踏み込んでいないが、本研究課題を進める上での基礎となる。

前述の通り、分裂酵母には Gwl 類似キナーゼは Cek1, Ppk18, Ppk31 の 3 種類がある。このうち、全てが Gwl の機能的オルソログと言えるのか、また、実際にこれらのキナーゼ依存的に Ensa 類似の Mug134 がリン酸化され、PP2A^{B55} の活性を阻害するのか、などは、研究開始時点では報告がなかった。我々は、Gwl 類似キナーゼの 3 遺伝子、*mug134⁺* 遺伝子、全てを遺伝子破壊し、その表現型を解析した。また、Mug134 の Gwl キナーゼによるリン酸化が、分裂酵母においても PP2A^{B55} 活性を阻害するのか、生化学的な実験によって確認を行なった。得られた結果の要点は以下の通りである。

分裂酵母においては、Gwl の主要オルソログは Ppk18 であり、Cek1 は重複的な機能を持つ。Ppk31 の機能は未解明であり、Gwl のオルソログではない可能性が高い。

分裂酵母において、Gwl と Ensa (Mug134) は、栄養増殖には不要であるが、窒素源枯渇によって誘導される静止期 (G₀ 期) への進入と維持に必須である。

分裂酵母においても、Gwl によってリン酸化された Mug134 は PP2A^{B55} 活性を阻害する。



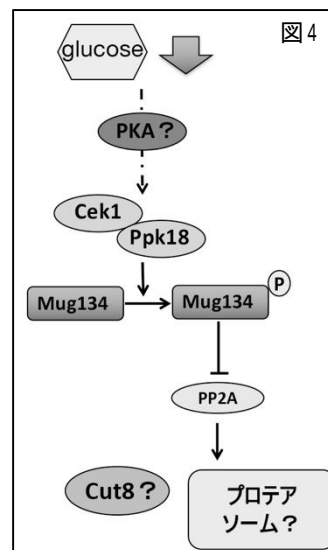
以上より、「分裂酵母においては、Ppk18 と Cek1 に依存した Mug134 のリン酸化による

PP2A^{B55} 活性制御は、窒素源枯渇後の静止期進入時と静止期確立後の 2 つの時期において、必須な機能を果たす (図 3)」と結論し、2018 年に上記内容をまとめた論文が公刊された⁵。

(2) Cut8・プロテアソーム系と栄養環境変化を連係させるネットワークの解明

前述の通り、分裂酵母においても、Gwl (Ppk18, Cek1)-Ensa (Mug134)-PP2A^{B55} 経路が保存されていることが明らかとなった。これまでに、Cek1 や Ppk18 の増量が *cut8^{ts}* の高温感受性を抑制することがわかっていたので、次には、この現象が、(a)Gwl-Ensa-PP2A^{B55} 経路を介してのものなのか、(b)Cek1 や Ppk18 単独の活性上昇の帰結なのか、が問題となる。この問題を明らかと

するために、Ensa オルソログである Mug134 の遺伝子破壊株 ($\Delta mug134$)、Ppk18 によるリン酸化サイトをアラニンに置換した $mug134^{S64A}$ 変異、Cek1 や Ppk18 の大量発現系を用いた遺伝学的実験を行なった結果、Cek1、Ppk18 と Cut8 との遺伝学的相互作用には Mug134 のリン酸化が必須であることが明らかとなった。さらに、error-prone PCR を用いて PP2A の B55 サブユニットである $pab1$ 遺伝子にランダムに変異を導入してスクリーニングを行なった結果、PP2A^{B55} の活性低下によって $cut8^{ts}$ の高温感受性が抑制されることが明らかとなった。また、前述の通り、 $cut8^{ts}$ の高温感受性は培地のグルコース濃度の低下によって抑制されるのであるが、この抑制には機能的に Gwl (Cek1, Ppk18) および Mug134 が必要であることが判明した。以上の結果をまとめると、培地の栄養源→Gwl (Cek1, Ppk18)→Mug134→PP2A^{B55} という情報伝達の結果、PP2A^{B55} 活性が変動することが、Cut8 あるいはプロテアソーム周辺に作用することが強く示唆された (図 4)。



上記の通り、PP2A^{B55} プロテアソームあるいは Cut8 周辺に作用することが示唆されるが、具体的な基質は何なのか、また拮抗的に機能するキナーゼは何なのか、ネットワークの全容を解明するためには、これらの点を明らかにする必要がある。そのため我々は $cut8^{ts}$ 変異に対する dosage suppressor screening を新たに行い、新規関連因子の取得を目指した。分裂酵母のゲノムライブラリーを $cut8^{ts}$ 変異体に導入し、18.1 万の形質転換体を解析した。その結果、最終的に安定して高温感受性を抑制するクローンが 21 クローン得られた。遺伝学的な解析は未完了であるが、21 クローンの中には、M 期で機能することが報告されている Ser/The キナーゼ、核輸送に関わる因子など、本課題と関わりの深い機能を持つ遺伝子が複数含まれていた。

以上の結果は未発表であり、今後の解析が期待される。

(3) 栄養環境変化が Cut8・プロテアソーム系の何に伝達されるのか。

本項目に関しては、プロテアソームや Cut8 に関わる PP2A^{B55} の同定に至らなかったのが不十分な解析に止まっている。まず、 $cut8^{ts}$ 変異体で Cek1 や Ppk18 を増量した際のプロテアソーム局在を (予備的なレベルであるが) 解析した結果、野生型のようにプロテアソームが強く核局在することはなく、どちらかという、高温感受性を示す $cut8^{ts}$ 変異体と同様に、プロテアソームは細胞全体に拡散して存在していた。しかしながら、 $cut8^{ts}$ 変異の高温感受性自体は回復していた。また、Cek1 や Ppk18 の増量は、 $cut8^{null}$ 変異 ($\Delta cut8$) の高温感受性も抑制した。以上の結果は、Gwl/Ensa-PP2A^{B55} の作用点は Cut8 機能そのものではなく、それ以外にあると考えられる。Cut8 欠失による高温での致死性は、プロテアソームの異常な局在による M 期タンパク質分解の遅延にある。実験的な証拠はないが、Gwl/Ensa-PP2A^{B55} の作用点の候補として、プロテアソーム自体、あるいはその量や複合体形成に関わる因子が挙げられる。Cek1 や Ppk18 増量時のプロテアソームのタンパク質分解活性や、分子集合状態を解析することが重要と考えられるが、本研究課題の期間中には、そこまで進めることができなかった。今後の解析が期待される。

最後に、本研究課題とは直結しないが、酵母のエタノール発酵能と Gwl、PP2A との関わりについての共同研究が進展し、2018 年度に論文公刊に至った⁶。

[引用文献]

1. Tatebe and Yanagida. Curr Biol. 2000.
2. Takeda et al. PNAS. 2011.
3. Samejima and Yanagida. MCB. 1994.
4. Mochida et al. Science. 2010.
5. Aono et al. Genes Cells. 2019.
6. Watanabe et al. Appl Environ Microbiol. 2018.

5. 主な発表論文等

(雑誌論文) (計 2 件)

- (1) Aono S, Haruna Y, Watanabe YH, Mochida S, Takeda K. The fission yeast Greatwall-Endosulfine pathway is required for proper quiescence/G₀ phase entry and maintenance. Genes to cells. 査読有 2019 Feb;24(2):172-186. doi: 10.1111/gtc.12665.
- (2) Watanabe D, Kajihara T, Sugimoto Y, Takagi K, Mizuno M, Zhou Y, Chen J, Takeda K, Tatebe H, Shiozaki K, Nakazawa N, Izawa S, Akao T, Shimoi H, Maeda T, Takagi H. Nutrient Signaling via the TORC1-Greatwall-PP2A^{B55} Pathway Responsible for the

〔学会発表〕(計5件)

- (1) 武田鋼二郎
栄養と連係する細胞内タンパク分解
甲南大学統合ニューロバイオロジー研究所第5回シンポジウム, 2018年3月21日, 神戸
- (2) 鈴木奈津美, 岸本卓也, 武田鋼二郎
分裂酵母のプロテアソーム 5 サブユニット Pts1 と遺伝的相互作用する因子の解析
第39回日本分子生物学会年会, 2016年11月30日~12月2日, 横浜
- (3) 石井眞弘, 武田鋼二郎
低グルコース環境での呼吸阻害が分裂酵母の細胞周期に与える影響
第39回日本分子生物学会年会, 2016年11月30日~12月2日, 横浜
- (4) 青野壮馬, 前川ちか, 田中築樹, 山下大智, 武田鋼二郎
分裂酵母 Greatwall/ -Endosulfine 経路とタンパク質分解系に関わる新規因子の探索
第39回日本分子生物学会年会, 2016年11月30日~12月2日, 横浜
- (5) 石井眞弘, 増田史恵, 森礼郁, 柳田充弘, 斎藤成昭, 武田鋼二郎
低グルコース濃度かつ呼吸阻害環境における分裂酵母の能動的細胞周期停止
第49回酵母遺伝学フォーラム研究報告会, 2016年9月9日~11日, 神戸

〔その他〕アウトリーチ活動などの情報

2018年度 「ひらめきときめきサイエンス」(甲南大学 統合ニューロバイオロジー研究所 主催)において, 中学生対象の研究紹介

2017年度 「ひらめきときめきサイエンス」(甲南大学 統合ニューロバイオロジー研究所 主催)において, 中学生対象の研究紹介

2016年度 「ひらめきときめきサイエンス」(甲南大学 統合ニューロバイオロジー研究所 主催)において, 中学生対象の研究紹介

6. 研究組織

(1) 研究分担者: 研究分担者はおかない

(2) 研究協力者: 研究協力者はおかない

科研費による研究は, 研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため, 研究の実施や研究成果の公表等については, 国の要請等に基づくものではなく, その研究成果に関する見解や責任は, 研究者個人に帰属されます。