

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07394

研究課題名(和文) 低グルコースストレスに対する細胞応答メカニズムの遺伝学的解析

研究課題名(英文) genetic analysis of cellular adaptation to glucose starvation

研究代表者

齋藤 成昭 (Saitoh, Shigeaki)

久留米大学・付置研究所・教授

研究者番号：30352123

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：真核細胞は、細胞外の栄養状況の変化に適応するための仕組みを備えている。本研究では、グルコース飢餓ストレスに対する細胞応答機構の解明を目的とし、グルコース濃度の変化を感知するセンサー機構と、細胞表面で機能するグルコース輸送体の局在制御機構を、分裂酵母をモデルとした遺伝学的手法によって研究した。本研究の成果により、分裂酵母は、細胞外グルコース濃度そのものを感知する仕組みのほか、細胞内でのグルコース代謝速度を感知する仕組みを備えていることが明らかとなった。また、グルコース輸送体の細胞内局在は、TORC1、TORC2シグナル経路やエンドサイトーシス経路によって制御されていることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の遂行により、グルコース輸送体の遺伝子発現コントロールの仕組みや、局在制御メカニズムの一端が明らかとなった。ヒトにおいては、グルコース輸送体GLUT4の機能異常が糖尿病発症原因となることが知られている。それゆえ本研究の成果は、糖尿病発症につながる遺伝子異常の解明に結び付くだろう。また、糖尿病治療の新薬開発にも役立つと期待できる。

研究成果の概要(英文)：Eukaryotic cells can adapt to changes in nutrition in environment. To understand the mechanism underlying adaptation to glucose starvation stress, we performed genetic analyses of the glucose-sensing mechanism, and the mechanisms regulating the localization of glucose transporters on the cell surface. Here we show that the fission yeast cells monitor the intracellular glycolytic flux (i.e. the rate of glucose metabolism), and the extracellular glucose level independently. Furthermore, we found that the intracellular localization of the hexose transporter is regulated by the TORC1 and TORC2 signaling pathways, and pathways regulating the endocytosis.

研究分野：分子生物学

キーワード：栄養飢餓ストレス グルコース 細胞応答 解糖系

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

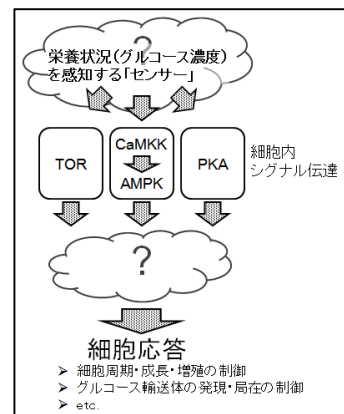
1. 研究開始当初の背景

真核細胞の成長や分裂増殖の速度は、その細胞を取り囲む微小環境中の物質(例えば成長因子や栄養素)によってコントロールされている。とりわけ単細胞真核生物の場合は、栄養素がそのコントロールにおいて重要な役割を果たしている。例えば本研究のモデルとして用いる分裂酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)の場合、培地中の窒素源(アンモニウムイオン)が枯渇すると、一過的に細胞周期の進行が早まり、2度分裂した後、成長・増殖が止まる。その後、周囲に接合フェロモンが存在する場合には有性生殖サイクルが進行し、存在しない場合には静止期(G0期)とよばれるステージに入り、様々なストレス(酸化ストレス等)に対して抵抗性を示すようになる。近年の研究により、多細胞生物においても同様に、細胞成長や分裂タイミングの決定において栄養素が重要な働きを担っていることが明らかになりつつある。例えばショウジョウバエの場合、幼虫期の栄養状態に応じて個々の細胞の分裂回数や大きさが変化し、その結果、成虫の個体サイズが変化する。これらの知見は、多細胞生物であるか単細胞生物であるかに関わらず、真核細胞には、(1)外部の栄養状態を感知し、(2)その変化に応答して細胞周期の進行や細胞成長をコントロールする仕組みが備わっていることを示している。国内外の多くの研究により、これらの仕組みにおいては、TOR(target of rapamycin)やPKA(cAMP依存性キナーゼ)、AMPK(AMP依存性キナーゼ)などの、進化的に保存されたタンパク質リン酸化酵素を介する細胞内シグナルネットワークが重要な役割を担っていることが示唆されている。

グルコース(ブドウ糖)は、ほとんどの真核細胞においてエネルギー源・炭素源となる主要な栄養素である。我々は「グルコース濃度の変化に対する細胞応答」を、分裂酵母を用いて解析してきた。分裂酵母は通常、2~3%のグルコースを含む培地を用いて培養するが、培地中のグルコース濃度をヒト血糖値程度(0.08%)まで急速に低下させると、

(i)一過的に細胞周期の進行がG2期で停止し、

(ii)細胞膜上に発現するグルコース輸送体が再編成される、ことが判明した。これらの細胞応答は、グルコース濃度の低い「低グルコースストレス環境」下で細胞が成長・増殖し続けるために必須であり、またそのようなストレス下での経時的細胞寿命とも強く関連することが明らかになった。興味深いことに、(i)の細胞周期応答にはWee1とよばれる、やはり進化的に保存されたタンパク質リン酸化酵素が、(ii)のグルコース輸送体の再編には上述のTORやAMPK、そしてAMPKの上流で機能するCaMKK(カルモジュリン依存性キナーゼキナーゼ)が関与することが判明した。



2. 研究の目的

本研究は、上述の研究成果のさらなる発展を目指すものである。具体的には、細胞外グルコース濃度の変化を感知する「センサー機構」と、その変化に応じてグルコース輸送体の遺伝子発現や配置を制御する「応答機構」に関わる遺伝子群を、分裂酵母を用いた遺伝学的スクリーニングによって同定する。このスクリーニングで同定される遺伝子は、上述のシグナル伝達機構の上流もしくは下流で機能している可能性が高い。それらの遺伝子産物の分子機能を統合的に理解することにより、グルコース濃度変化に対する細胞応答を引き起こす分子メカニズムの全体像を解明する。

3. 研究の方法

1) グルコースセンサー機構にかかわる遺伝子の同定

グルコース濃度の変化を感知する「センサー機構」にかかわる遺伝子のスクリーニングは、次に述べるa)、b)二つの方法で行った。

a) 解糖系など、グルコース代謝にかかわると予想される遺伝子を欠損させた遺伝子破壊株を作成し、その変異体中でのGht5グルコース輸送体の発現量を解析した。Ght5遺伝子の発現は、細胞外グルコースが高い時には抑制され、一方、グルコース濃度が低い時には高レベルとなる(抑制時の数倍程度)。もし、解析対象とする遺伝子破壊細胞中で、Ght5遺伝子発現量がグルコース濃度変化に応答しなくなれば、破壊した遺伝子が「センサー機構」にかかわっているものと推定できる。

b) 以前の研究で、我々は、Ght5遺伝子と同様にGht3ヘキソース輸送体の遺伝子発現もグルコース濃度に応じて変化するを見出している。分裂酵母の生育に必要な遺伝子のプロモーターをGht3遺伝子プロモーターと置き換えた遺伝子組み換え酵母細胞株は、培地中のグルコース濃度が低い場合は生育できるものの、グルコース濃度が高い場合は、生育に必要な遺伝子の発現が抑制されるため、致死となる。この細胞株を、高濃度グルコースを含む培地中で培養し、生育可能となった「復帰突然変異株」を単離した。次いで、そのような「復帰突然変異株」の中から、a)と同様にGht5遺伝子発現量がグルコース濃度変化に応答できなくなっている変異株を選択した。選択した変異株の全ゲノム配列を次世代シーケンサーで解析し、変異遺伝子を同定した。

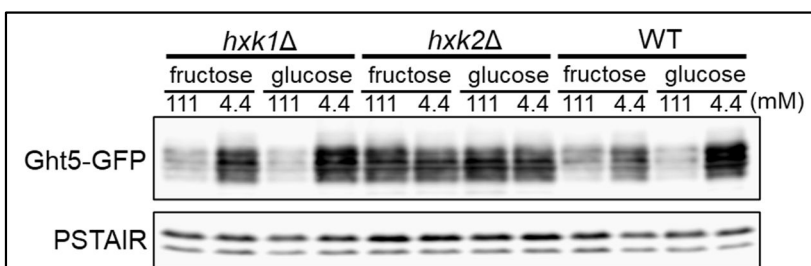
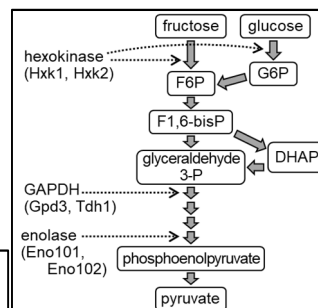
2) グルコース輸送体の配置制御にかかわる遺伝子の同定

以前の研究で我々は、TORC2 キナーゼを中心とするシグナル伝達経路に欠損を持つ変異体細胞では、Ght5 グルコース輸送体が正しく細胞表面に局在化できず、細胞質内に蓄積することを明らかにしていた。TORC2 経路に欠損を持つ *gad8* 遺伝子変異株を低グルコース培地で培養し、生育可能となった復帰突然変異株を単離し、その中から、Ght5 の細胞表面局在が回復している株を選別した。選択した変異株の全ゲノム配列を次世代シーケンサーで解析し、変異遺伝子を同定した。

4. 研究成果

1 - a)

右に解糖系の概略図を示す。解糖系にかかわる酵素をコードする遺伝子のうち、遺伝子破壊株の得られた、*hvk1*、*hvk2*、*gpd1*、*tdh1*、*eno101*、*eno102* 遺伝子を解析したところ、下図に示す通り、*hvk2* 遺伝子破壊株(以下 *hvk2* と表記する)では、細胞外のヘキソース濃度の高低にかかわらず、*ght5* 遺伝子が恒常的に高レベルで発現していることを見出した。



この結果は、hexokinase(Hxk2)が欠損したことによる解糖系フラックス(解糖系の代謝速度)の低下が、*ght5* 遺伝子の恒常的発現の原因となっていることを示唆していた。一方、Scr1 と呼ばれる転写因子は、細胞外のヘキソース濃度が高い時には核に、低い時には細胞質に局在化するが、そのヘキソース濃度に応じた局在変化は、*hvk2* においても正常であった。これらの結果より、分裂酵母は、細胞外のヘキソース濃度と、細胞内の解糖系フラックスをそれぞれ別々の仕組みで感知しているものと結論した。

1 - b)

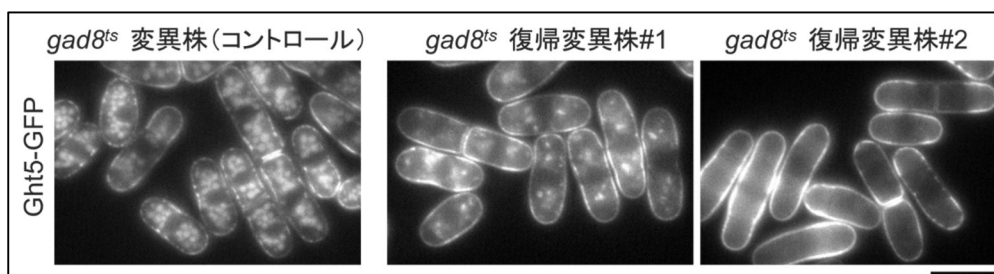
方法の項で述べたスクリーニングを実施し、約 50 株の変異体を得た。それらのゲノムを解析したところ、変異遺伝子は、以下の 3 グループに分類できた。

- 1) PKA シグナル経路にかかわるもの
- 2) クロマチンリモデリング因子(SWI-SNF 複合体)にかかわるもの
- 3) *hvk2* 遺伝子

このスクリーニングにおいて *hvk2* 遺伝子の変異体を得られたことは、期待通りの変異体を得られていることを示唆している。細胞外グルコース濃度の変化、もしくは解糖系フラックスの変化は、PKA シグナル経路とクロマチンリモデリング因子を介して、*ght5* 遺伝子の発現量を変化させているのかもしれない。現在、その可能性についてさらなる解析を実施している。

2)

方法の項で述べた通り、Ght5 の細胞表面局在が回復した *gad8* 復帰突然変異株を約 50 株取得した。下図に復帰株細胞中での Ght5 局在の例を示す。程度の差はあるが、いずれの株において



も、コントロール株と比較して細胞質中の Ght5 量が減少し、代わりに、細胞表面に局在する Ght5 量が増加していた。ゲノム解析の結果、変異遺伝子は以下のグループに大別できた。

- 1) エンドサイトーシス経路にかかわる遺伝子
- 2) TORC1 シグナル経路にかかわる遺伝子
- 1) の遺伝子変異が得られたことは、TORC2 経路がエンドサイトーシス経路を阻害することで

Ght5 の細胞表面局在を維持していることを示している。TORC2 経路が TORC1 経路と協調的もしくは拮抗的に働いて、Ght5 の細胞内局在をコントロールしているのかもしれない。

本研究の遂行により、グルコース輸送体の遺伝子発現コントロールの仕組みや、局在制御メカニズムの一端が明らかとなった。ヒトにおいては、グルコース輸送体 GLUT4 の機能異常が糖尿病発症原因となることが示唆されている。本研究の成果は、糖尿病発症につながる遺伝子異常の解明に結び付くだろう。また、本計画で同定された遺伝子群は、新たな創薬ターゲットになるものと期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Toyoda Yusuke, Akarlar Busra, Sarov Mihail, Ozlu Nurhan, Saitoh Shigeaki	4. 巻 592
2. 論文標題 Extracellular glucose level regulates dependence on GRP 78 for cell surface localization of multipass transmembrane proteins in HeLa cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 FEBS Letters	6. 最初と最後の頁 3295 ~ 3304
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/1873-3468.13232	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 Nakazawa Norihiko, Teruya Takayuki, Sajiki Kenichi, Kumada Kazuki, Villar-Briones Alejandro, Arakawa Oriie, Takada Junko, Saitoh Shigeaki, Yanagida Mitsuhiro	4. 巻 131
2. 論文標題 The putative ceramide-conjugation protein Cwh43 regulates G0 quiescence, nutrient metabolism and lipid homeostasis in fission yeast	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Cell Science	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/jcs.217331	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 -

1. 著者名 Takeda Aoi, Saitoh Shigeaki, Ohkura Hiroyuki, Sawin Kenneth E., Goshima Gohta	4. 巻 44
2. 論文標題 Identification of 15 New Bypassable Essential Genes of Fission Yeast	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Structure and Function	6. 最初と最後の頁 113 ~ 119
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1247/csf.19025	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

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 2件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 齋藤成昭
2. 発表標題 Cellular Mechanisms for Proliferation Under Low Glucose Conditions
3. 学会等名 THE 9th INTERNATIONAL FISSION YEAST MEETING (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 齋藤成昭
2. 発表標題 グルコース濃度低下に対する細胞周期応答メカニズム
3. 学会等名 日本遺伝学会第89回大会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 齋藤成昭、増田史恵、副島朗子、森礼郁、上原理沙、柳田充弘
2. 発表標題 グルコース濃度低下に対する細胞周期応答メカニズム
3. 学会等名 2017年度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 齋藤成昭、寺田裕子、副島朗子、増田史恵、石川健
2. 発表標題 分裂酵母Ght5トランスポーターの発現は細胞外ヘキソース濃度と細胞内解糖系フラックスによって制御される
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石川健、齋藤成昭
2. 発表標題 解糖系メタボライト、フルクトース 1, 6ビスリン酸、はグルコース濃度に応答する遺伝子の発現を調節する
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 齋藤成昭
2. 発表標題 S. pombe cells monitor intracellular glycolytic flux and extracellular hexose concentration independently, regulating Ght5 hexose transporter expression
3. 学会等名 THE 10th INTERNATIONAL FISSION YEAST MEETING (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>研究紹介 http://www.kurume-u.ac.jp/site/lifescience/list93-261.html</p>
--

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