

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K06211

研究課題名(和文)オルガネラ(液胞/リソソーム)による細胞周期制御機構の解明

研究課題名(英文)Study of mechanism of vacuole/lysosome-mediated cell cycle progression

研究代表者

神 唯(Jin, Yui)

東京工業大学・科学技術創成研究院・特任准教授

研究者番号：40802335

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：申請者は、細胞分裂時におけるオルガネラ分配の分子機構を明らかにする目的で研究を行ってきた。その中で、オルガネラ分配の生理学的意義を問い求めた結果、オルガネラである液胞が細胞周期進行、特にG1初期の進行に必須であることを明らかにした(Jin and Weisman, 2015)。液胞による細胞周期制御機構のさらなる解析を目指し、遺伝学的スクリーニングにより新規にBUR1遺伝子を同定した。最終的に、Bur1はSch9を介してTORC1経路に関わることを明らかにした。この結果は、液胞を介した細胞周期制御には様々なインプットがあることを強く示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では液胞を介した細胞周期制御に関わる新規因子Bur1を同定、機能解析を行うことで、TORC1に関わる新規因子の同定にも繋がった。本研究の研究成果から液胞を介した細胞周期制御には、細胞の状態、細胞内外の栄養環境、ストレス有無など複数のインプットが重要になっていることが明らかになってきた。

研究成果の概要(英文)：Applicant have studied about mechanism of organelle inheritance during cell cycle. During the study, applicant have had a question about cell biological significance of organelle inheritance, and found that one of organelle, vacuole/lysosome is critical for cell cycle progression especially at G1 phase. In the period of the grant, the applicant did genetic screening to find new gene(s) for the mechanism, and found BUR1 gene. Finally applicant found that the Bur1 function for TORC1 activation through Sch9. These discoveries suggest that multiple signals converge on Sch9 to promote cell cycle progression.

研究分野：細胞生物学

キーワード：液胞 リソソーム 細胞周期 TORC1

1. 研究開始当初の背景

申請者は、細胞分裂時におけるオルガネラ分配の分子機構を明らかにする目的で研究を行ってきた。その中で、オルガネラ分配の生理学的意義を問い求めた結果、オルガネラである液胞が細胞周期進行、特に G1 初期の進行に必須であることを明らかにした (Jin and Weisman, 2015)。この事実は、細胞周期の G1、G2 期が何のために存在するのかという根源的な問いに対する答えにつながると思え、さらなる知見を得るために本研究を計画してした。

2. 研究の目的

本研究は液胞による細胞周期制御機構の解明を目指している。当初は、本研究期間内 (平成 30-32 年度) に、1) BUR1 (CDK9) の機能解析を行うことで、液胞からのシグナルがどのように細胞周期制御に至るのかについて詳細を明らかにする。2) 生化学的な観点から、質量分析を用いた液胞構成因子の網羅的解析により、細胞周期進行に関わる液胞構成因子候補の選定及び、その因子の細胞周期進行における役割の解明を目指す。上記の研究と並行して、さらなる変異体スクリーニングを行い、3) オルガネラチェックポイント制御に関わる遺伝子の同定を目指す。4) 新規液胞生成の過程を分子レベルで明らかにする。

3. 研究の方法

液胞からのシグナルを介した細胞周期制御について検証する。すでに申請者は、*vac17* 変異体と合成致死性を示す新たな変異体を一つ単離し、原因遺伝子として *BUR1* を同定している。*BUR1* はサイクリン依存性リン酸化タンパク質をコードする。申請者は、a) 遺伝学的解析から *BUR1* は TORC1 の上流で機能する、b) *in vitro* において、TORC1 経路の下流で機能する AGC キナーゼ Sch9 を直接リン酸化することを明らかにしている。すでに *in vitro* でのリン酸化部位を質量分析により複数同定しており、まずは Bur1 からのシグナル伝達に重要な Sch9 のリン酸化部位の選定を行う。さらに蛍光顕微鏡を用い、Bur1 は Sch9 を介し細胞内の「どこで」さらには「いつ」機能するのか、細胞周期に沿った、その空間的及び時間的分子制御機構を明らかにする。

1) 液胞依存的な細胞周期進行における *BUR1* の役割の解明

遺伝学的、生化学的手法を用い、Bur1 が持つ二つのドメイン (キナーゼドメイン、推定天然変性領域) の機能解析を行う。

2) *BUR1* の TORC1 経路との関係性の解明

ラパマイシン感受性テストを用いて Bur1 と TORC1 の関係性を明らかにする。

3) Bur1 キナーゼの標的の解明

下流遺伝子 Sch9 のリン酸化状態をウエスタンブロットティングで調べる。*in vitro* リン酸化実験により Bur1 が Sch9 を直接リン酸化しているかどうか調べる。さらに *in vitro* リン酸化反応後に質量分析を行うことによりリン酸化アミノ酸を同定する。同定したアミノ酸のリン酸化が *in vivo* で重要かどうかを検証する。

4) Bur1 の細胞内での機能

Bur1 の細胞内局在を核内移行シグナル (NLS) や、核外移行シグナル (NES) を付加し、Bur1 の機能変化について検証する。

4. 研究成果

1) Bur1 はN末にキナーゼドメインを持ち、C末は天然変性領域 (IDR) と考えられる。Bur1 は必須遺伝子であるが、Bur1 の IDR は必須ではなく、C末欠失変異体 *bur1-ΔC* は通常の培養条件では野生型とほぼ同じように増殖する。液胞分配変異 *vac17Δ* と二重変異にすると顕著な G1 期進行遅延が認められた。この G1 期進行遅延の原因は、新規液胞生成の異常ではなく、新規液胞の機能異常によるものであることを顕微鏡解析により明らかとした (図 1)。

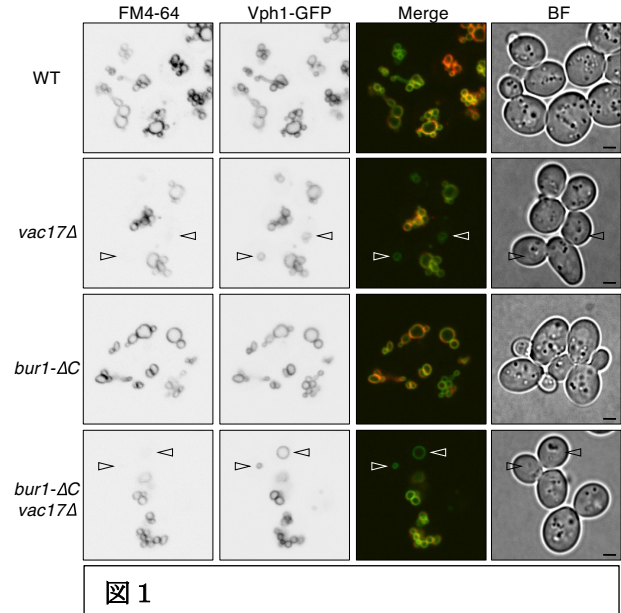


図 1

2) TORC1 の機能喪失 (*tor1Δ*) によりラパマイシン感受性を増すことが知られている。まず、*bur1-ΔC* はラパマイシン感受性が *tor1Δ* と同様に上昇することを見出した。さらに、*tor1Δ bur1-ΔC* 二重変異体はラパマイシンへの感受性がさらに上昇することを突き止めた。また *bur1-ΔC* 変異体では、TORC1 の標的である Sch9 のリン酸化が減少していることを発見した (図 2)。以上の結果は、Bur1 と TORC1 は並列に働いていることを強く示唆している。

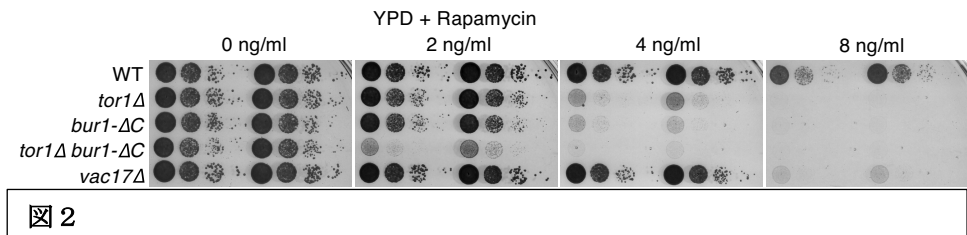


図 2

3) *in vitro* において Bur1 が Sch9 を直接リン酸化していることを明らかにした (図 3)。次に質量分析により推定リン酸化アミノ酸を 11 個同定した。同定したアミノ酸のうち一部は TORC1 の標的と重なり、一部はすでに知られている Pkh のリン酸化部位と重なる。Bur1 単独の標的部位として S709, T710, S711 を同定した。これらセリン、スレオニンをアラニンに置換した変異体 Sch9-3A は細胞増殖が遅延する表現系を示した (図 4)。この結果は Bur1 によるこれら 3 アミノ酸のリン酸化が Sch9 の機能に重要であることを示唆している。さらに、免疫沈降実験により、Bur1 の C 末は、*in vitro* リン酸化反応には必要であるが、Sch9 との *in vitro* での結合には重要ではないことを示唆する結果を得た (図

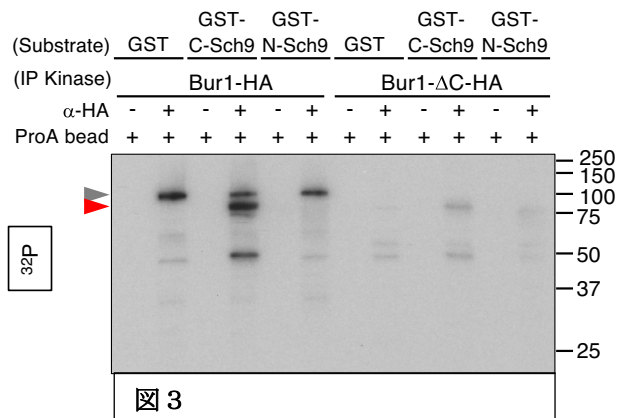


図 3

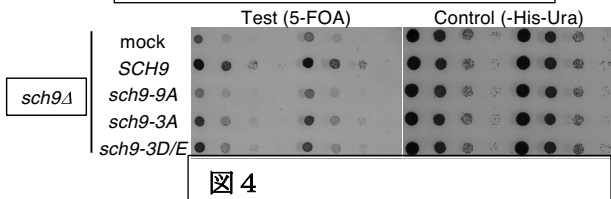
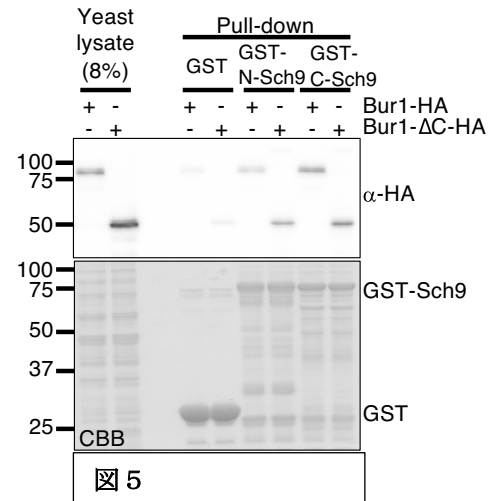
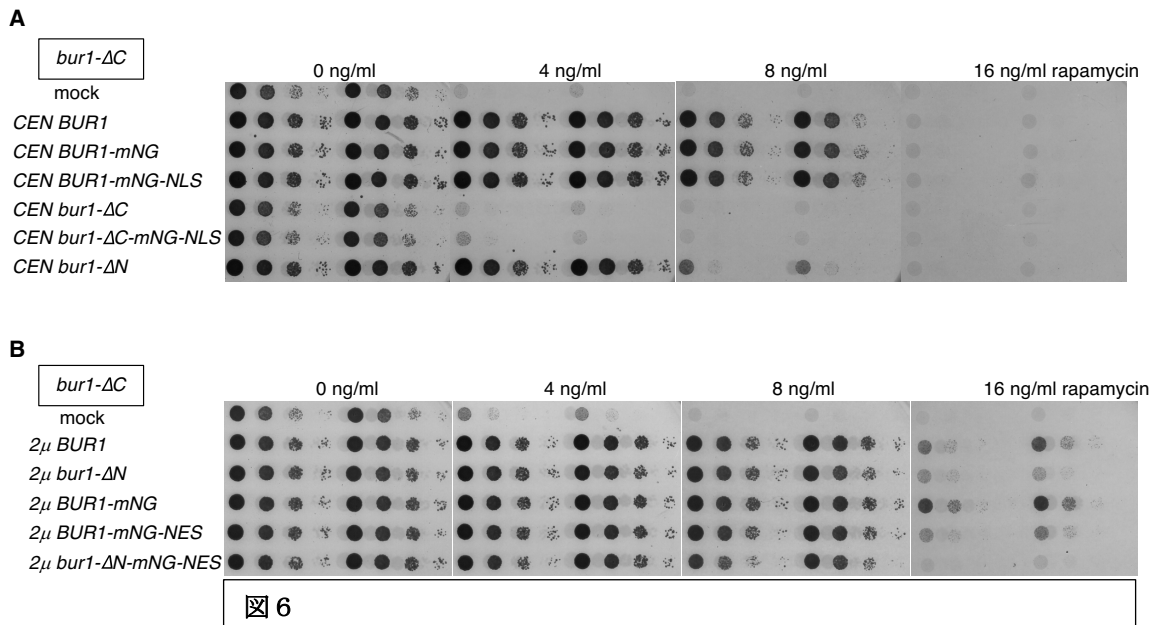


図 4

5)。これらの結果は、Bur1はC末を介して自身のリン酸化活性を制御していることを強く示唆している。



4) Bur1にNLSやNESを付加し、Bur1が核でTORC1に関与するのか、細胞質(液胞膜)で関与するのかを検討した。結果、NLSを付加したBur1に機能的な差異は認められなかったが、NESを付加したBur1は機能の低下が認められたため(図6)、TORC1活性化のある時点でBur1は核内でその活性化に関与することを示唆している。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yamasaki Akinori, Jin Yui, Ohsumi Yoshinori	4. 巻 18
2. 論文標題 Mitotic phosphorylation of the ULK complex regulates cell cycle progression	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS Biology	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） 10.1371/journal.pbio.3000718	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 Jin Yui, Jin Natsuko, Oikawa Yu, Benyair Ron, Koizumi Michiko, Wilson Thomas E, Ohsumi Yoshinori, Weisman Lois S	4. 巻 23
2. 論文標題 Bur1 functions with TORC1 for vacuole mediated cell cycle progression	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 EMBO reports	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） 10.15252/embr.202153477	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 3件/うち国際学会 4件）

1. 発表者名 神 唯、Lois Weisman、大隅 良典
2. 発表標題 Organelle quality control through cell division cycle
3. 学会等名 第43回 日本分子生物学会年会（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yui Jin, Natsuko Jin, Thomas E. Wilson, Yoshinori Ohsumi, and Lois S. Weisman
2. 発表標題 An essential cyclin-dependent kinase, Bur1 (Cdk9), is required for G1 progression through the cell-cycle and functions in parallel with TORC1 signaling from the vacuole.
3. 学会等名 Gordon Research Conference on Molecular Membrane Biology meeting（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 神 唯、神 奈亜子、Lois S. Weisman、大隅良典
2. 発表標題 液胞を介した細胞周期制御機構におけるBur1キナーゼの役割
3. 学会等名 第52回 酵母遺伝子学フォーラム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yui Jin, Natsuko Jin, Thomas E. Wilson, Lois S. Weisman, and Yoshinori Ohsumi
2. 発表標題 Multiple inputs to the vacuole are required for G1 progression
3. 学会等名 第42回 日本分子生物学会年会（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 神 唯
2. 発表標題 TORC1経路に関わる新規キナーゼBur1/CDK9-オルガネラを介した細胞周期制御-
3. 学会等名 第41回 日本分子生物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 神 唯、小泉 美智子、大隅 良典
2. 発表標題 How has the vacuole/lysosome matured for cell cycle progression?
3. 学会等名 第44回 日本分子生物学会年会（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

Yui Jin - Google Scholar
<https://scholar.google.com/citations?user=0IFcpkoAAAAJ&hl=ja>
Yui Jin - Tokyo Tech World Research Hub Initiative
<https://www.wrhi.iir.titech.ac.jp/people/jin-yui/>
Tokyo Tech World Research Hub Initiative (WRHI)
<http://www.wrhi.iir.titech.ac.jp/people/jin-yui/#tab-03>

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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
米国	University of Michigan			