

令和 3 年 5 月 7 日現在

機関番号：33305

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K11084

研究課題名(和文)核内低分子量Gタンパク質遺伝子変異を用いたミトコンドリア機能制御の研究

研究課題名(英文) Regulation of mitochondrial function in the mutations of the GSP1 gene encoding nuclear small G protein.

研究代表者

林 直之 (Hayashi, Naoyuki)

金沢学院大学・人間健康学部・教授

研究者番号：50253456

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は核内低分子量Gタンパク質が細胞の栄養代謝と呼吸にどのように関わっているかを明らかにするものである。申請者は出芽酵母の核内低分子量Gタンパク質関係遺伝子変異でグリセロールを炭素源として資化できない変異を探索し、gsp1変異をはじめrna1、crm1、yrb2でグリセロール培地での増殖不能を認めた。一方で核内低分子量Gタンパク質遺伝子GSP1で分離した多数の変異の中にグリセロールを炭素源として資化できないものを発見し、この変異細胞中で、ミトコンドリアそのものの量が減少していることが共焦点レーザー顕微鏡による観察と定量PCR法でわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

出芽酵母の核内低分子量Gタンパク質遺伝子GSP1で分離した多数の変異の中にグリセロールを炭素源として資化できないものを発見し、この変異細胞中でミトコンドリアそのものの量が減少していることがわかった。この現象にはGSP1の62番目のリジン残基の変化が決定的であった。また、この変異株はグルコース以外の発酵性炭素源でも著しく増殖能が低下しており、酵母AMPKの細胞質内サブユニットのSIP2遺伝子の大量供給によって増殖能低下表現型が回復した。本研究を通し核内低分子量Gタンパク質遺伝子GSP1によってミトコンドリア機能とグルコース抑制能が調節されていることが強く示唆された。

研究成果の概要(英文)：The ras-like nuclear small G protein, Ran, functions in nuclear-cytosolic transport and regulatory signal transmission. Growth deficiency, due to mutations in the GSP1 gene, which encodes Ran, was allele specific. Specifically, the gsp1-1894 cells lost mitochondria, and could not grow on media containing glycerol, galactose or maltose. Growth deficiency on galactose medium was further suppressed by high dosage of the SIP2 DNA, which encodes the cytosolic beta-subunit of AMPK. This suggests that higher cytosolic activity of AMPK is required for the utilization of an alternative carbon source in gsp1-1894 cells. The gsp1-1894 cells grew better on a high salt medium (1 M NaCl), and had increased expression levels of GPD1-lacZ. Furthermore, disruption of the HOG1 gene suppressed their growth deficiency on glycerol medium. These findings suggest that altered activation of Hog1 in the gsp1-1894 cells resulted in the loss of mitochondria and inhibition of glycerol metabolism.

研究分野：分子生物学

キーワード：核内低分子量Gタンパク質 グリセロール代謝 マイトファジー MAPキナーゼ AMPK 浸透圧ストレス  
グルコース抑制 出芽酵母

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ロックフェラー大 Wente 博士とヴァンダービルト大 Rout 博士の共同研究による酵母の核膜孔タンパク質遺伝子変異における細胞寿命の研究で、ミトコンドリア機能が核膜孔タンパク質遺伝子変異細胞で損なわれていること、そして、核内低分子量 G タンパク質遺伝子 *GSP1* をその変異細胞に大量供給することで回復することが報告されていた。また、核が直接ミトコンドリアと細胞周期に応じて相互作用しミトコンドリアの機能が維持されていることを名古屋大佐々木博士のグループが報告している。申請者は変異細胞スクリーニングを済ませており、当時その細胞の生理機能を解析中であった。また、*GSP1* 以外にも核細胞質間の輸送系遺伝子変異 *crml* において非発酵性培地(グリセロール)での増殖不能を発見しており、研究を進展できる状況にあった。

### 2. 研究の目的

生育条件によって酵母細胞内のミトコンドリアの量と機能は能動的に調節されている。好気条件下ではミトコンドリアの増殖と分裂の活性化、嫌気条件下ではおそらく自食作用によってミトコンドリアを分解処理するシステム「マイトファジー」が働いていると考えられ、細胞増殖に応じた栄養代謝制御について研究を行う際、ミトコンドリア機能調節とミトコンドリアそのものの増殖制御は避けることのできない研究課題といえる。そこで出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の核内低分子量 G タンパク質関係遺伝子変異でグリセロールを炭素源として資化できない変異を探索し、*gsp1* 変異をはじめ *rna1*、*crml*、*yrb2* でグリセロール培地での増殖不能を認めた。ミトコンドリア機能の低下した細胞の生理状態とその回復を目指し、栄養学のみならず医学領域においても大いに貢献することを目指した。

### 3. 研究の方法

#### (1) 酵母の培養

平板培地、液体培地共に複合栄養培地として 2%ポリペプトン、1%酵母エキス、そして炭素源としてグルコースまたはガラクトースを 2%、グリセロールの場合は 3%添加して使用した。形質転換体を培養する合成培地では 0.66%イーストナイトロゲンベース w/o アミノ酸に必要なアミノ酸と炭素源は前述の複合培地と同様の割合で添加して使用した。平板培地の場合、これに 2%培地用寒天を加えた。培養温度条件は 30℃を使用したが、温度感受性変異株については 27℃で培養した。

#### (2) $\beta$ ガラクトシダーゼ活性測定

液体培地で培養した酵母細胞を等分して遠心分離機で集菌し、1つを比較用の誘導前のもの、残りを 1 M NaCl 液体培地を混合し 90 分振とう培養後集菌し誘導後のものとした。その後 SM 緩衝液で一回洗浄。0.2 mL の破碎用緩衝液に懸濁しガラスビーズを添加した。各サンプルを氷浴上で維持しながら 30 秒 6 回ミキサーに激しく混ぜ細胞を破碎し抽出液を得た。

細胞抽出液 0.1 mL を 0.9 mL の 28℃で維持した Z 緩衝液に混和し、0.1 mL の ONPG を基質として添加し反応させた。時間を計測し、200 g/L  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  で反応を停止して 420 nm の吸光度を測定した。

#### (3) ミトコンドリア観察

蛍光顕微鏡によるミトコンドリア観察では 1000 倍希釈した MitoTracker RED で酵母細胞を染

色した。定量 PCR 法では、ミトコンドリア DNA の検出プローブとして *COX3* 遺伝子 (5' CTGGTTATTCTGAGCTTATTTCCATT 3' と 5' GGGTGGTCAACATGCACCTAA 3' )、コントロールとして染色体 DNA の検出プローブとして *ACT1* 遺伝子 (5' TCGTCCAATTTACGCTGGTT 3' と 5' CGGCCAAATCGATTCTCAA 3' ) を使用した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 非発酵性炭素源グリセロール代謝不能変異株のスクリーニング

核内低分子量 G タンパク質 Ran による代謝調節の可能性を探るために、Ran 関係遺伝子変異でグリセロールを炭素源として資化できない変異を探索し、*gsp1* 変異をはじめ *rna1*、*crml1*、*yrb2* で見出した。特に Ran の酵母相同遺伝子 *gsp1* 変異<sup>1)</sup> のグリセロール代謝不能はアレル特異的であり (Figure 1)、*gsp1-1894* 変異において 62 番目のリジンのグルタミン酸への置換 (K62E) を持つ変異 DNA がこの変異のグリセロール代謝不能を相補しないので K62E が決定的であることがわかった (Figure 2)。

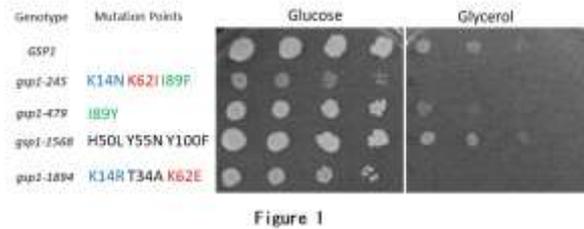


Figure 1

##### (2) ミトコンドリア機能の欠損

グリセロールを炭素源として代謝する

ためにはミトコンドリア機能が必要であることから、ミトコンドリアの蛍光顕微鏡観察を行ったところ、*gsp1-1894* 変異細胞ではミトコンドリアの明確な染色像が観察されなかった。さらに定量 PCR 法でミトコンドリア DNA 量を検討した結果、*gsp1-1894* 変異細胞ではほとんどミトコンドリア DNA が検出できなかった。

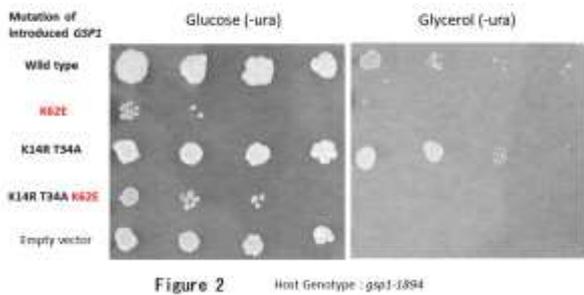


Figure 2 Host Genotype: *gsp1-1894*

##### (3) Hog1 キナーゼの可能性

野生型 *GSP1* DNA を *gsp1-1894* 変異細胞に導入すればミトコンドリア量は回復することから、ミトコンドリアに対する食作用 (マイトファジー) による消失の可能性を検討するためにマイトファジーを誘導する MAP キナーゼ遺伝子 *HOG1*<sup>2)</sup> の変異を導入したところ、*gsp1-1894* 細胞と *hog1* 細胞の交雑で得られた *gsp1-1894* 変異だけを持つ細胞がグリセロール代謝能を失っていくのに対し、その交雑で得られた二重変異の細胞はグリセロール代謝能を失わないことが分かった (Figure 3)。このまた、Hog1 キナーゼは高浸透圧下でグリセロール合成系酵素遺伝子 *GPD1* の発現を誘導し<sup>3)</sup>、グリセロールを蓄積させる。1 M NaCl 添加した高浸透圧条件にて、*gsp1-1894* 細胞は野生型細胞

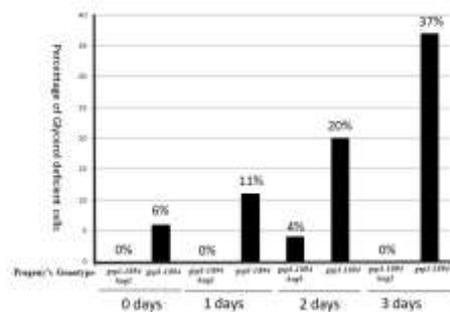


Figure 3

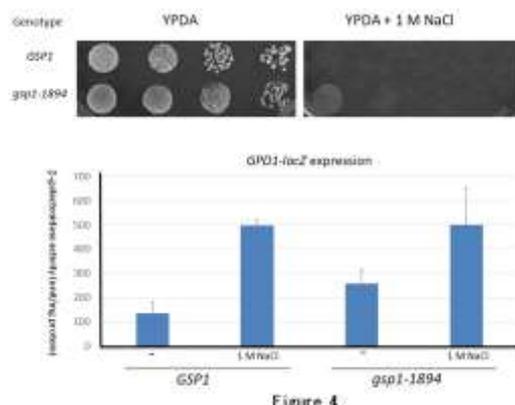
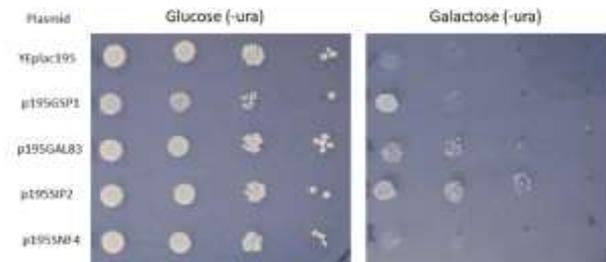


Figure 4

よりも高い耐性を示し、*GPD1* の発現を *GPD1-lacZ* のによる  $\beta$  ガラクトシダーゼ活性で評価すると被誘導条件下ですでに約 2 倍の活性を示し構成的発現状態であることが分かった (Figure 4)。これらのことから *gsp1-1894* 細胞におけるミトコンドリア消失とグリセロール代謝能の喪失は亢進状態になった Hog1 キナーゼによるものであることが推察される。

#### (4) AMPK の可能性

グルコース以外の発酵性炭素源であるマルトースやガラクトースの資化性を検討すると *gsp1-1894* 細胞はどちらも増殖能がなく、グリセロール代謝能の喪失はグルコース抑制からの解除が不能である可能性が考えられた。そこで、酵母の AMPK の制御サブユニット *SNF4*、*SIP2*、*GAL83* をそれぞれ多コピーベクターで導入し増殖能の回復を観察すると細胞質内  $\beta$  サブユニットをコードする *SIP2* 遺伝子<sup>4)</sup> の導入



でよく回復することが分かり (Figure 5)、細胞質内の AMPK 活性の低下が *gsp1-1894* 細胞内で起こりグルコース抑制の解除ができなくなっていたと推察される。また、AMPK が Hog1 に対し抑制的に機能することが筑波大の水野博士らによって報告されており<sup>5)</sup>、*gsp1-1894* 細胞での Hog1 機能亢進の原因の一つとも考えられる。

#### (5) 結論

核内低分子量 G タンパク質のシステムは、栄養やストレスのような外界の条件に応じた炭素源代謝調節、特に MAP キナーゼ Hog1 によるミトコンドリア機能の制御、またさらに AMPK によるグルコース抑制制御に深くかかわっており、外界の条件に応じて信号伝達系を相互に調和させ代謝を制御していると考えられる。

#### 引用文献

- 1) Oki M, Noguchi E, Hayashi N, Nishimoto T. Mol Gen Genet 257:624-634 (1998)
- 2) Mao K, Wang K, Zhao M, Xu T, Kilonsky DJ. J Cell Biol 193:755-767 (2011)
- 3) Albertyn J, Hohmann S, Thevelein JM, Prior BA. Mol Biol Cell 14:4135-4144 (1994)
- 4) Zhang J, Olsson L, Nielsen J. Mol Microbiol 77:371-383 (2010)
- 5) Mizuno T, Masuda Y, Irie K. PLoS Genet 11:e1005491 (2015)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Naoyuki Hayashi, Masaya Oki	4. 巻 66
2. 論文標題 Altered metabolic regulation owing to gsp1 mutations encoding the nuclear small G protein in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Current Genetics	6. 最初と最後の頁 335-344
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00294-019-01022-5	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 林直之、沖昌也
2. 発表標題 出芽酵母の核内Gタンパク質遺伝子変異におけるグリセロール代謝制御
3. 学会等名 日本遺伝学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 林直之、沖昌也
2. 発表標題 Ran-RCC1系遺伝子変異におけるグリセロール代謝
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム
4. 発表年 2018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
---------------------------	-----------------------	----

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