

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 31 日現在

機関番号：14301  
 研究種目：挑戦的萌芽研究  
 研究期間：2007～2011  
 課題番号：19657039  
 研究課題名（和文） 栄養源枯渇におけるゲノム安定性の制御  
 研究課題名（英文） Regulation of genome stability under nutritional starvation  
 研究代表者  
 中瀬 由起子 (NAKASE YUKIKO)  
 京都大学・放射線生物研究センター・研究員  
 研究者番号：80402923

研究成果の概要（和文）：

研究代表者はこれまで、細胞の増殖を制御するシグナル伝達経路（TSC シグナル伝達経路）が栄養源（アミノ酸）の取り込みに対してどのように応答しているのかを分子レベルで明らかにすることを試みてきた。その結果、アミノ酸受容体の局在を制御するユビキチンリガーゼ Pub1 とアレスチン様タンパク質 Any1 の単離に成功し、それらのタンパク質が協調して、TSC シグナル伝達経路の下流でアミノ酸取り込みの制御に機能していることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

The TSC-Rheb signaling pathway plays critical roles in the regulation of cell growth under various conditions. In *Schizosaccharomyces pombe*, the amount of amino acid transporters at the cell surface is tightly regulated in response to environmental condition. However, how cellular localization of amino acid transporters is regulated under certain conditions remains obscure. Here we demonstrate that ubiquitin ligase Pub1 and arrestin-like protein Any1 coordinate regulation of amino acid transporters and TSC-Rheb signaling pathway controls this regulation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,500,000	0	1,500,000
2008 年度	1,467,681	0	1,467,681
2009 年度	1,000,000	0	1,000,000
2010 年度	870,469	0	870,469
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	5,838,150	300,000	6,138,150

研究分野：生物学

科研費の分科・生物科学、機能生物化学

キーワード：細胞情報伝達機構

1. 研究開始当初の背景  
 細胞の増殖を制御するシグナル伝達経路

(TSC シグナル伝達経路) は、ヒトから酵母まで保存されている。分裂酵母 *tsc1/2* 遺伝

子が欠損すると、アミノ酸取り込み能が低下することはわかっていたが、どのような分子メカニズムによって引き起こされているのかはわかっていなかった。

## 2. 研究の目的

TSC シグナル伝達経路が栄養源（アミノ酸）の取り込みに対してどのように応答しているのかを分子レベルで明らかにすることを試みてきた。

## 3. 研究の方法

- (1) 分裂酵母 *tsc2* 遺伝子破壊株の示す欠損が抑圧されるような温度感受性サブレッサー変異体を単離し、原因遺伝子の機能解析を行う。
- (2) 分裂酵母 *rhb1* 遺伝子に点変異を入れ恒常的に活性型になる変異株 (*rhb1-DA*) を単離し、機能解析を行う。

## 4. 研究成果

- (1) *tsc2* 遺伝子破壊株の示す形質が抑圧され、かつ高温感受性を示す変異株の取得を試みた。その結果、中枢神経系で発現増加が見られるユビキチンリガーゼ Nedd4 のホモログをコードする *pub1*<sup>+</sup> とエンドサイトーシスに関与するアレクチンのホモログ *any1*<sup>+</sup> の変異体を得た。Pub1, Any1 それぞれの変異体では、アミノ酸受容体の局在制御が異常になることがわかった。また、高等生物における実験から、TSC を欠失したグリア細胞では興奮性アミノ酸であるグルタミン酸の取り込み低下が観察され、Rheb がアミノ酸受容体の内在化を制御して神経細胞の保護に寄与することを示唆するものであった (Saito et al., 2005)。Rhb1 抗体による免疫沈殿を行ったところ、Rhb1 とともに Pub1 も共沈してくることがわかった。これらのことから、Rhb1 は直接的に Pub1 に働きかけてアミノ酸受容体の局在制御を行っている可能性が示唆された。
- (2) *rhb1* 遺伝子に点変異を入れ恒常的に活性型になる変異株の単離を試みた結果、数種類の変異株の取得に成功した。その中の二株 (*rhb1-DA4*, *rhb1-DA8*) に注目し、解析を行ったところ、興味深いことに、*DA4* と *DA8* はアミノ酸の取り込みへの異常形質は *tsc2* 遺伝子破壊株と同様に示したにも関わらず、*DA8* は窒素源枯渇時の形質が異なっていた (Murai et al., 2009)。ヒト培養細胞を用いて *rheb-DA4* と *DA8* が mTOR に対してどう振舞うかを生化学的に検証したところ、*DA4* は栄養源

の有無に関わらず常に mTOR を活性化していたのに対して、*DA8* は野生型と大きな差はなかった。これらのことから、Rhb1 は Tor2 (分裂酵母 mTOR ホモログ) とはまた別のエフェクターを介してアミノ酸取り込みを制御している可能性が浮上し、それが方法 (1) で単離された Pub1 である可能性が示唆された。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① Nakase M, Nakase Y, Chardwiriyaapreecha S, Kakinuma Y, Matsumoto T, Takegawa K. Intracellular trafficking and ubiquitination of the *Schizosaccharomyces pombe* amino acid permease Aat1p. *Microbiology*. 2012 Mar;158(Pt 3):659-73. 査読有  
DOI: 10.1099/mic.0.053389-0
- ② Nakase Y, Hirata A, Shimoda C, Nakamura T. Ectopic overproduction of a sporulation-specific transcription factor induces assembly of prespore-like membranous compartments in vegetative cells of fission yeast. *Genetics*. 2009 Nov;183(3):1195-9. 査読有  
DOI: 10.1534/genetics.109.106906
- ③ Murai T, Nakase Y, Fukuda K, Chikashige Y, Tsutsumi C, Hiraoka Y, Matsumoto T. Distinctive responses to nitrogen starvation in the dominant active mutants of the fission yeast Rheb GTPase. *Genetics*. 2009 Oct;183(2):517-27. 査読有  
DOI: 10.1534/genetics.109.105379
- ④ Nakamura T, Asakawa H, Nakase Y, Kashiwazaki J, Hiraoka Y, Shimoda C. Live observation of forespore membrane formation in fission yeast. *Mol Biol Cell*. 2008 Aug;19(8):3544-53. 査読有  
DOI: 10.1091/mbc.E08-04-0414
- ⑤ Nakase Y, Nakamura-Kubo M, Ye Y, Hirata A, Shimoda C, Nakamura T. Meiotic spindle pole bodies acquire the ability to assemble the spore plasma membrane by sequential recruitment of sporulation-specific components in fission yeast. *Mol Biol Cell*. 2008 Jun;19(6):2476-87. 査読有  
DOI: 10.1091/mbc.E08-02-0118

〔学会発表〕(計 3 件)

- ① 中瀬由起子、中瀬 舞、村井朋香、大坪  
瑠子、山本正幸、竹川 薫、松本智裕  
TSC-Rheb シグナル伝達経路はユビキチ  
ンリガーゼ Pub1 とアレクチン様タンパ  
ク質 Any1 の機能を介してアミノ酸トラ  
ンスポーターの局在を制御している  
第 35 回日本分子生物学会 2011 年 12 月 1  
日 横浜
- ② 中瀬由起子、村井朋香、中瀬 舞、竹川  
薫、松本智裕  
TSC-Rhb-TOR シグナル伝達経路におけ  
るアミノ酸透過酵素の制御機構  
酵母遺伝学フォーラム 2010 年 9 月 9 日  
奈良
- ③ 中瀬由起子、村井朋香、松本智裕  
TSC-Rheb-Tor 経路とエンドサイトーシ  
ス経路との関わり  
第 9 回日本分子生物学会 春期シンポジ  
ウム 2009 年 5 月 11 日宮崎

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中瀬 由起子 (NAKASE YUKIKO)  
京都大学・放射線生物研究センター・研究  
員  
研究者番号：80402923

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

松本 智裕 (MATSUMOTO TOMOHIRO)  
京都大学・放射線生物研究センター・セン  
ター長  
研究者番号：80212223