

令和 6 年 6 月 15 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19H02923

研究課題名(和文) ユビキチン修飾を介した炭素代謝系の環境応答機構の解明

研究課題名(英文) Environmental response mechanism of carbon metabolic system via ubiquitin modification

研究代表者

中務 邦雄 (Nakatsukasa, Kunio)

名古屋市立大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号：90547522

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：微生物は発酵生産過程において過酷な環境変化に曝される。微生物に環境耐性を付与して有用物質を大量生産させるには、環境変化に対する応答機構(代謝制御、遺伝子発現制御など)を明らかにする必要がある。本研究では、出芽酵母を材料に、ユビキチン修飾を介した炭素代謝系の新たな環境応答機構の解明を目指した。研究期間中に、脂肪分解(リポリシス)を担う酵素の細胞周期における制御機構、飢餓状態においてリボソームの生合成を微調整するメカニズムなどを明らかにして報告した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

微生物は自然界において、温度、凍結、乾燥、化学物質、浸透圧、pH、低栄養、異常タンパク質蓄積など、多様なストレスに曝されている。このようなストレスや環境の変化に対して、微生物は遺伝子発現、タンパク質間相互作用、酵素活性、代謝経路などを制御することで、巧みに適応している。しかし、発酵食品、バイオ燃料、アミノ酸、酵素など、有用物質を工業的に大量生産させる過程では、細胞の増殖が阻害され、死に至るような環境変化に曝されることがありえる。本研究では、環境変化に対する応答機構を解明して、工業的に有利な環境耐性を備えた微生物の創出を目指そうとする点に学術的意義と社会的意義がある。

研究成果の概要(英文)：Microorganisms are exposed to severe environmental changes during fermentation and production process. In order to make microorganisms tolerant to environmental changes and fermentation processes, it is necessary to elucidate the response mechanisms (metabolic regulation, gene expression regulation, etc.) to environmental changes. In this study, we aimed to elucidate a new environmental response mechanism of the carbon metabolism system via ubiquitin modification in budding yeast. We reported the regulatory mechanism of the triacylglycerol lipase during the cell cycle and the mechanism that fine-tunes ribosome biosynthesis under starvation conditions.

研究分野：応用分子細胞生物学

キーワード：出芽酵母 代謝 ユビキチン 炭素代謝系

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

微生物は発酵生産過程で過酷な環境変化に曝される。微生物の活力低下と死滅を防ぎ、有用物質を大量生産させるには、環境変化に対する微生物の代謝制御機構、遺伝子発現制御機構を明らかにしたうえで、環境耐性の微生物を創出することが重要である。代謝制御の仕組みとして、古くから代謝酵素のアロステリック制御、フィードバック制御、フィードフォワード制御などが研究されてきた。分子生物学の発展以降、代謝酵素の転写・翻訳レベルの制御も明らかにされてきた。近年、ユビキチン修飾系による代謝制御の報告が続いているが、散発的な報告にとどまっている。ユビキチン修飾系による未知の代謝制御機構が存在するものと考えられる (Nakatsukasa et al., Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 2015 に詳述)。本研究では出芽酵母を材料に、ユビキチン修飾を介した炭素代謝系の環境応答機構の解明を目指した。

2. 研究の目的

ユビキチン修飾を介した炭素代謝系の環境応答機構の解明を目的とした。

3. 研究の方法

出芽酵母の遺伝学、生化学、細胞生物学、分子生物学の手法を用いた。

4. 研究成果

(1) リポリシス (脂肪分解) の環境応答機構の解析

トリアシルグリセロール (TAG) は分子内に脂肪酸をもつ生体分子であり、細胞内の脂肪滴と呼ばれる構造体に貯蔵されている。細胞分裂、休止細胞の再増殖などの過程においては、大量のエネルギーおよび生体膜が必要となる。このとき、TAG を加水分解 (リポリシス) するリパーゼが活性化され、遊離した脂肪酸がエネルギーと生体膜の原材料として使われる。リポリシスは真核生物に広く保存された反応であり、その不全はヒトにおいては肥満やリポジストロフィーなど重篤な疾患の引き金となるが、リポリシスの活性制御メカニズムには不明な点が多い。

出芽酵母の Tgl4 (Triacylglycerol lipase 4) はマウスのトリアシルグリセロールリパーゼ (Adipose triglyceride lipase : ATGL) の機能的オルソログである。Tgl4 は Cdk1/Cdc28 を介したリン酸化により細胞周期の G1 後期に活性化され、TAG を加水分解して脂肪酸を遊離させる。遊離した脂肪酸は S 期における DNA 合成および生体膜合成の原材料として使われ、G1 → S 期への移行が進む。しかし、細胞周期において Tgl4 を不活性化するメカニズムの解析は進んでいなかった。また、Tgl4 はリボソームによって合成された後、速やかに分解される短寿命タンパク質であるとの報告があったが、細胞周期における Tgl4 分解の意義と制御は解析されていなかった。

我々は最初に、細胞周期における Tgl4 のリン酸化状態と安定性を解析するために、Tgl4 に対する特異的抗体を作製した。この抗体を使って、酵母ライセート中の Tgl4 をウエスタンブロッティングにより検出したところ、リン酸化・非リン酸化の二つの分子種が観察された。次に、シクロヘキシミドチェイス法により Tgl4 の安定性を解析した。その結果、以前の報告とは異なり、Tgl4 は安定なタンパク質であることが分かった。我々の結果と以前の報告が異なる詳しい理由は明らかでないが、本研究では特異的抗体により内在性の Tgl4 を解析したのに対して、以前の報告では Tgl4 にエピトプタグを付加した融合タンパク質が用いられていた。おそらく、エピトプタグの付加により Tgl4 が不安定化してしまったものと考えられる。

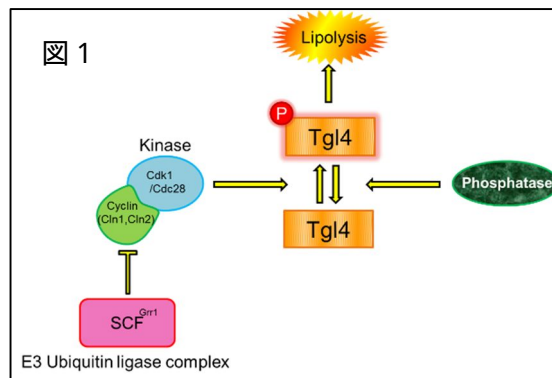
シクロヘキシミドチェイス法は、抗生物質であるシクロヘキシミドにより細胞内のタンパク質合成反応を阻害した後、タンパク質量の経時的な変化を測定することで、その安定性 (分解) を解析する手法である。細胞をシクロヘキシミドで処理すると、先述の通り Tgl4 の総量は変化しなかったが、リン酸化 Tgl4 が減少して非リン酸化 Tgl4 が増加する現象、すなわち Tgl4 の脱リン酸化が亢進されることが観察された。Tgl4 の脱リン酸化はプロテアソーム阻害により抑制されたことから、Tgl4 の脱リン酸化には何らかのユビキチンリガーゼが関与している可能性が示唆された。出芽酵母には約 80 種類のユビキチンリガーゼがあり、そのなかでも SCF ユビキチンリガーゼ複合体 (Skp1-Cul1-F box protein) が大きなファミリーを形成している。Tgl4 の脱リン酸化に SCF ユビキチンリガーゼが関与する可能性を検証するために、Skp1 および Cul1 (酵母 Cdc53) の温度感受性変異株 (それぞれ *skp1-11* 株、*cdc53-1* 株) を用いたところ、Tgl4 の脱リン酸化が抑制された。Tgl4 の脱リン酸化は、SCF 複合体と協調して働くユビキチン連結酵素 Cdc34 の温度感受性変異株 (*cdc34-2*) においても抑制された。次に、Tgl4 の脱リン酸化に関わる F ボックスタンパク質を探索した。出芽酵母には約 20 種類の F ボックスタンパク質がコードされている。それらの変異株をシクロヘキシミドで処理して Tgl4 の脱リン酸化を調べた結果、Grr1 の変異株で抑制された。以上の結果から、シクロヘキシミドに依存した Tgl4 の脱リン酸化は、ユビキチンリガーゼ SCF^{Grr1} 複合体とプロテアソームに依存することが明らかになった。

Tgl4 のリン酸化酵素 Cdk1/Cdc28 は G1 サイクリン Cln1/Cln2 により活性化される。一方、Cln1/Cln2 は SCF^{Grr1} によるユビキチン化を介してプロテアソームによって分解される短寿命タンパク質である。すなわち、Cln1/Cln2 の量はリボソームによる合成と SCF^{Grr1} を介した分解のバランスにより制御されているが、シクロヘキシミド処理により合成を阻害すると、Cln1/Cln2 は

SCF^{Grr1} を介して分解され量が減少し、Cdk1/Cdc28 を活性化できなくなる。その結果、Tgl4 が脱リン酸化状態に偏ってしまうのではないかと予想した。言い換えれば、Tgl4 のリン酸化状態は Cdk1/Cdc28 によるリン酸化と未知の脱リン酸化酵素による脱リン酸化によって動的に制御されている可能性が考えられた。そこで、出芽酵母のホスファターゼ変異株ライブラリーを用いて、Tgl4 の脱リン酸化酵素を探索した。その結果、Cdc14 の温度感受性変異株において Tgl4 の脱リン酸化が強く抑制された。以上の結果から、Tgl4 のリン酸化と脱リン酸化はそれぞれ Cdk1/Cdc28 と Cdc14 により制御されることが明らかになった (図 1)。

最後に、細胞周期中における Tgl4 のリン酸化状態の変化を解析した。細胞をファクター、ヒドロキシ尿素、ノコダゾールにより、それぞれ G1 期、S 期、G2/M 期に同調させ、Tgl4 のリン酸化状態と脱リン酸化をシクロヘキシミド処理により解析した。G1 期に同調した細胞では大部分の Tgl4 が脱リン酸化状態にあったが、S 期および G2/M 期に同調した細胞では大部分の Tgl4 がリン酸化された状態にあった。各周期に同調した細胞をシクロヘキシミド処理したところ、S 期に同調した細胞ではリン酸化 Tgl4 が時間とともに徐々に脱リン酸化されていったが、G2/M 期に同調した細胞では、Tgl4 はリン酸化されたままの状態であった。すなわち、Tgl4 は G1 期においては脱リン酸化状態、すなわち不活性の状態にあるが、S 期から G2/M 期にかけては Cdk1/Cdc28 によってリン酸化され活性化されることが分かった。脱リン酸化は S 期で軽度におこり、G2/M 期ではほとんど起こらないものと考えられた。

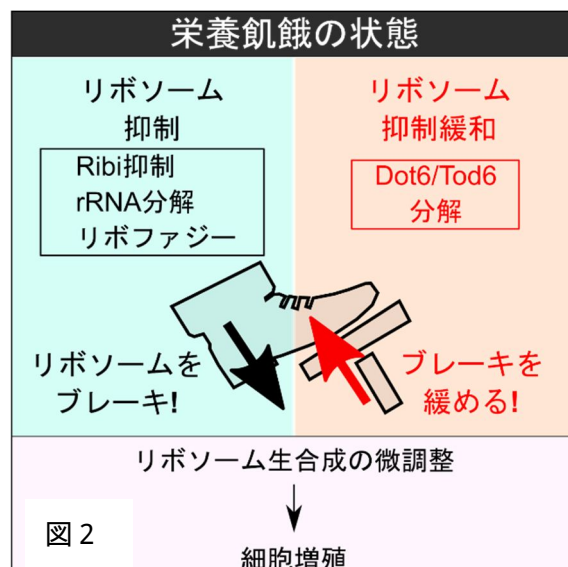
この結果と一致して、細胞周期を G1 で停止させ再開させると、細胞が S 期と G2/M 期に進行するにつれて、リン酸化 Tgl4 が徐々に出現した。その後、細胞が再び G1 期に入ると、リン酸化 Tgl4 の量が減少し、非リン酸化 Tgl4 の量が増加した。*cdc14-1* 細胞を G1 期に停止させ、37 °C の制限温度で細胞周期を再開させると、過去の報告通り、これらの細胞は G2/M 期から G1 期に進行しなかった。G2/M 期で停止した *cdc14-1* 細胞において、Tgl4 のリン酸化は維持された。これらの結果は、M 期から G1 期への移行時に Cdc14 が Tgl4 の脱リン酸化に関与することを示唆するが、他のリン酸化酵素が G2/M 期移行時に Tgl4 を脱リン酸化する可能性は否定できない。以上をまとめると、Tgl4 は細胞周期を通じて安定なタンパク質であり、Cdk1/Cdc28 を介するリン酸化と、おそらく Cdc14 を介する脱リン酸化により、その活性が動的に制御されていることが示唆された (Nakatsukasa et al., Biochemical and Biophysical Research Communications (2022) Aug 11; doi.org/10.1016/j.bbrc.2022.08.022)。



(2) 飢餓状態においてリボソームの生合成を微調整するメカニズムの解明

細胞が飢餓状態に陥ると、リボソームの生合成および翻訳反応が抑制される。具体的には、リボソーム RNA の分解、リボソームタンパク質の会合抑制、リボソーム特異的なオートファジー、リボソーム生合成因子 (ribosome biogenesis: ribi) の発現抑制などが起こる。このうち、リボソーム生合成因子の抑制に関わる転写調節因子として、Dot6 および Tod6 が知られている。細胞が飢餓状態になると Dot6 と Tod6 が活性化され、リボソーム生合成因子の発現が抑制される。

我々は細胞内の様々なタンパク質の安定性を調べる過程で、細胞を飢餓状態にシフトすると Dot6 と Tod6 が速やかに分解されることを見出した。Dot6 と Tod6 は飢餓状態においてリボソーム生合成因子の抑制に必要なにもかかわらず、なぜ分解されるのだろうか。これを明らかにするために、Dot6 および Tod6 を強制的に過剰発現させることで、飢餓状態においても Dot6 と Tod6 が蓄積した状態を作り出した。すると、リボソームの生合成が過度に抑制されてしまい、細胞の生存にも悪影響を及ぼすことが分かった。つまり、細胞が飢餓状態に陥ったとしてもリボソームの生合成を過度に抑制してしまうのは得策でなく、Dot6 と Tod6 の分解を介して抑制を「微調整 (ファインチューニング)」することが重要だと考えられた (図 2) (Kusama et al., iScience (2022) Feb 26; 25(3):103986. doi: 10.1016/j.isci.2022.103986. eCollection 2022 Mar 18.)



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 9件）

1. 著者名 Kawarasaki Tomoyuki, Nakatsukasa Kunio	4. 巻 9
2. 論文標題 Metabolomics analysis of an AAA-ATPase Cdc48-deficient yeast strain	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Heliyon	6. 最初と最後の頁 e13219 ~ e13219
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.heliyon.2023.e13219	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 Nakatsukasa Kunio, Fujisawa Munetaka, Yang Xiaotan, Kawarasaki Tomoyuki, Okumura Fumihiko, Kamura Takumi	4. 巻 626
2. 論文標題 Triacylglycerol lipase Tgl4 is a stable protein and its dephosphorylation is regulated in a cell cycle-dependent manner in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 85 ~ 91
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2022.08.022	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 Obara Keisuke, Yoshikawa Taku, Yamaguchi Ryu, Kuwata Keiko, Nakatsukasa Kunio, Nishimura Kohei, Kamura Takumi	4. 巻 13
2. 論文標題 Proteolysis of adaptor protein Mmr1 during budding is necessary for mitochondrial homeostasis in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1 ~ 15
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-022-29704-8	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 Kusama Kino, Suzuki Yuta, Kurita Ena, Kawarasaki Tomoyuki, Obara Keisuke, Okumura Fumihiko, Kamura Takumi, Nakatsukasa Kunio	4. 巻 25
2. 論文標題 Dot6/Tod6 degradation fine-tunes the repression of ribosome biogenesis under nutrient-limited conditions	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 103986 ~ 103986
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2022.103986	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 Nakatsukasa Kunio, Wigge Sylvia, Takano Yuki, Kawarasaki Tomoyuki, Kamura Takumi, Brodsky Jeffrey L.	4. 巻 68
2. 論文標題 A positive genetic selection for transmembrane domain mutations in HRD1 underscores the importance of Hrd1 complex integrity during ERAD	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Current Genetics	6. 最初と最後の頁 227 ~ 242
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00294-022-01227-1	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 Okumura Fumihiko, Oki Nodoka, Fujiki Yuha, Ikuta Rio, Osaki Kana, Hamada Shun, Nakatsukasa Kunio, Hisamoto Naoki, Hara Taichi, Kamura Takumi	4. 巻 11
2. 論文標題 ZSWIM8 is a myogenic protein that partly prevents C2C12 differentiation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific 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) 10.1038/s41598-021-00306-6	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 Nakatsukasa Kunio	4. 巻 22
2. 論文標題 Potential Physiological Relevance of ERAD to the Biosynthesis of GPI-Anchored Proteins in Yeast	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 1061 ~ 1061
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22031061	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 Okumura Fumihiko, Fujiki Yuha, Oki Nodoka, Osaki Kana, Nishikimi Akihiko, Fukui Yoshinori, Nakatsukasa Kunio, Kamura Takumi	4. 巻 23
2. 論文標題 Cul5-type Ubiquitin Ligase KLHDC1 Contributes to the Elimination of Truncated SELENOS Produced by Failed UGA/Sec Decoding	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 100970 ~ 100970
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2020.100970	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 Nakatsukasa Kunio	4. 巻 22
2. 論文標題 Potential Physiological Relevance of ERAD to the Biosynthesis of GPI-Anchored Proteins in Yeast	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 1061 ~ 1061
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22031061	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 *Nakatsukasa K., Kawarasaki T., and Moriyama A.	4. 巻 128
2. 論文標題 Heterologous expression and functional analysis of the F-box protein Ucc1 from other yeast species in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 704-709
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbiosc.2019.06.003.	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8件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 池田 貴成, 中務 邦雄
2. 発表標題 モデル基質を用いた核膜孔複合体の品質管理機構の解析
3. 学会等名 第95回 日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中務邦雄
2. 発表標題 Accumulation of non-imported mitochondrial metabolic enzyme elicits ectopic metabolic stress
3. 学会等名 第15回小胞体ストレス研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 川原崎智之, 西尾和也, 杉浦悠毅, 此島彩乃, 水島恒裕, 中務邦雄
2. 発表標題 Defective import of mitochondrial metabolic enzyme elicits ectopic metabolic stress
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 川原崎智之, 西尾和也, 杉浦悠毅, 此島彩乃, 水島恒裕, 中務邦雄
2. 発表標題 Excess non-imported mitochondrial metabolic enzyme elicits ectopic metabolic stress
3. 学会等名 第74回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中務邦雄
2. 発表標題 Quality control of enzymatically active mitochondrial precursor protects cells against ectopic metabolite stress
3. 学会等名 第73回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中務邦雄
2. 発表標題 細胞質に誤局在したクエン酸合成酵素の分解による代謝恒常性の維持
3. 学会等名 第72回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 川原崎智之, 中務邦雄
2. 発表標題 Maintenance of metabolic homeostasis by the proteasomal degradation of cytosolically mislocalized citrate synthase.
3. 学会等名 第72回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 草間幾乃, 中務邦雄
2. 発表標題 A possible novel mechanism for the regulation of ribosome biogenesis under starvation conditions
3. 学会等名 第72回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2020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
---------	---------