

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05828

研究課題名(和文) 転写制御によるスフィンゴ脂質代謝のファインチューニングシステムの解析

研究課題名(英文) The Fine-Tuning System of Sphingolipid Metabolism by Transcriptional Regulation

研究代表者

田淵 光昭 (Tabuchi, Mitsuaki)

香川大学・農学部・教授

研究者番号：00294637

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)：生体膜を構成する脂質のグローバルなコントロールは、マスター転写制御因子と呼ばれる脂質代謝酵素やその制御因子遺伝子を標的とした少数の転写制御因子により制御されることが知られている。グリセロリン脂質やステロールについては、酵母及び哺乳動物においてマスター転写制御因子が明らかにされているが、スフィンゴ脂質代謝について不明であった。我々は、酵母においてC2H2型Znフィンガー転写因子Com2が、スフィンゴ脂質レベルの低下に伴って誘導され、下流にあるスフィンゴ脂質代謝に関わる遺伝子の発現を制御することでスフィンゴ脂質代謝を制御するマスター転写制御因子であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々は、転写因子Com2が長らく未解明であったスフィンゴ脂質代謝におけるマスター転写制御因子であることを明らかにした。Com2はスフィンゴ脂質低下に依存的に発現誘導され、この誘導は既知のスフィンゴ脂質感知に機能するTORC2-Ypk1シグナル経路の機能欠損株においても正常であることから、本経路とは独立した経路で細胞内スフィンゴ脂質量を感知していることを明らかにしている。酵母は、オートファジーなどの真核生物共通の生物学的プロセスの発見に貢献し、様々なヒト疾患の発症メカニズムの理解につながっている。本研究によりヒトにおけるスフィンゴ脂質代謝制御異常に関連した疾患の理解にもつながることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Global control of the lipids that make up biological membranes is known to be regulated by a small number of transcriptional regulators that target lipid-metabolizing enzymes and their regulator genes, called master transcriptional regulators. Master transcriptional regulators have been identified for glycerophospholipids and sterols in yeast and mammals, but not for sphingolipid metabolism. We have shown that the C2H2-type Zn finger transcription factor Com2 is a master transcriptional regulator of sphingolipid metabolism in yeast, which is induced upon reduction of sphingolipid levels and regulates the expression of genes involved in sphingolipid metabolism downstream.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：スフィンゴ脂質 TORC2 酵母 転写因子

1. 研究開始当初の背景

酵母は単細胞真核生物で遺伝学的解析が容易であり、酵母細胞膜を構成する脂質は高等動物細胞の脂質と共通する点も多く、脂質代謝を理解する上で優れたモデル系である。例えばスフィンゴ脂質代謝経路において小胞体におけるセラミド合成までの初期経路に機能する多くの代謝酵素が酵母変異株を用いた解析により同定され、高等動物・植物におけるスフィンゴ脂質代謝の理解につながっている。また、酵母は高温ストレスに伴い、スフィンゴ脂質合成量が一過的に上昇し、この高温下におけるスフィンゴ脂質の *de novo* 合成は、高温適応に不可欠であることが明らかにされている。この様に酵母には環境変化適応のためのスフィンゴ脂質代謝のファインチューニングシステムが存在することが明らかになっている。

我々は、形質膜のフォスホイシチド(PI4,5P₂)とその下流因子である Slm1 が Tor キナーゼ複合体 2 (TORC2) 経路を介してスフィンゴ脂質代謝を制御することを明らかにした [1]。さらに、Loewith らにより TORC2 キナーゼとその下流の Ypk1 キナーゼが形質膜上の複合スフィンゴ脂質レベルの低下を膜ストレスとして感知することで活性化し、スフィンゴ脂質合成の律速酵素であるセリンパルミトイル転移酵素(SPT)の抑制因子である Orm1/Orm2 をリン酸化することで負に制御し、結果としてスフィンゴ脂質代謝を調節することが明らかにされている [2]。この様に TORC2-Ypk1 経路を介したスフィンゴ脂質のファインチューニングシステムについては、分子レベルでかなり理解が進んでいる。しかし、グリセロリン脂質、コレステロールについては、転写レベルで代謝酵素の活性が制御されることが知られていることから、スフィンゴ脂質についても、同様に転写制御を介したスフィンゴ脂質代謝のファインチューニングシステムの存在が考えられるが、これについては未だに明らかにされていない。

2. 研究の目的

我々は、セラミド合成酵素制御サブユニット Lip1 のドキシサイクリン(Dox)依存的に発現が抑制される *lip1-1* 変異株を作製した[3]。*lip1-1* 変異株は、スフィンゴ脂質合成阻害剤である Myriocin (Myr) に対して Dox 依存的に強い感受性を示し、Dox 依存的 Myriocin 感受性を抑圧するマルチコピーサブレッサーとして機能未知な C2H2 タイプ転写因子 Com2 を見出した。本研究では、転写因子 Com2 が如何にしてスフィンゴ脂質代謝を制御するのかを解析することで転写制御を介したスフィンゴ脂質代謝のファインチューニングシステムを分子レベルで明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、以下の手法により Com2 のスフィンゴ脂質代謝における役割について解析した。

(1) スフィンゴ脂質合成低下時における Com2 および下流候補 Ypk1, Lcb1 の発現解析

野生株および Com2 欠損株 (*com2Δ*) を 1 μM Myr で処理し、経時的にサンプリングし、細胞から Total RNA を抽出し、RT-PCR により *COM2* およびその下流にある *YPK1*, *LCB1* mRNA を解析した。

また、Com2 の発現がスフィンゴ脂質合成低下時にどの様に变化するか、また、Com2 発現が下

流に位置すると考えられる Ypk1 や Lcb1 の発現にどの様に影響するかをウエスタンブロッティングにより解析を試みた。

(2) YPK1 および LCB1 の LacZ レポーター解析

Com2 の下流に存在すると考えられた YPK1 および LCB1 のプロモーター活性を測定するため、YPK1 および LCB1 プロモーター領域約 500 bp を LacZ レポータープラスミドに組み込み P_{YPK1}-LacZ および P_{LCB1}-LacZ プラスミドを作製した。作製したプラスミドを Com2 発現をドキシサイクリン(Dox)により調節可能な P_{ietoff}-GFP-COM2 株に形質転換し、Com2 発現依存的な YPK1 および LCB1 のプロモーター活性を β ガラクトシダーゼ (βGal)活性を指標に解析した。

(3) ゲノム編集による P_{YPK1} CBS 株の作製

CRISPR-Cas9 を用いたゲノム編集による YPK1 プロモーター領域からの Com2-binding site: CBS を除去した株を作製し、CBS を欠損することによる Ypk1 の発現と Myr に対する感受性を調べた。

(4) スフィンゴ脂質分析

各種変異株からスフィンゴ脂質を抽出後、薄層クロマトグラフィー (TLC) により展開し、展開後の TLC を銅リン酸法によりスフィンゴ脂質を検出した。検出されたスフィンゴ脂質は、Image J により定量解析を行った。

4 . 研究成果

(1) Com2 は、Ypk1 の転写制御を介してスフィンゴ脂質代謝を制御する

セラミド合成に異常により Dox 依存的に Myr 超感受性を示す *lip1-1* 株の Myr 超感受性を抑圧するマルチコピーサプレッサーとして機能未知転写因子 Com2 を取得した。*lip1-1* 株の Myr 超感受性を抑圧するマルチコピーサプレッサーには、Com2 以外に、スフィンゴ脂質合成の活性化に機能する Ypk1 キナーゼも含まれていたことから、Com2 と Ypk1 は同一のスフィンゴ脂質代謝制御経路にあると考えられた。Com2 は、高度にリン酸化されており、その配列には Ypk1 リン酸化モチーフを複数含んでいたことから、当初、Com2 は、Ypk1 によりリン酸化されることでスフィンゴ脂質代謝を制御することが考えられた。しかし、遺伝学的解析結果から、COM2 は、遺伝的に YPK1 の上流に位置することが考えられた。YPK1 のプロモーター領域を調べたところ、すでに Com2 の結合配列として明らかにされている 5'-ATAGGG-3' という配列 [4]が存在していたことから、Com2 は、転写レベルで Ypk1 の発現を制御することでスフィンゴ脂質代謝を制御することが考えられた。興味深いことに、Com2 の発現は、Myr 処理によるスフィンゴ脂質合成低下に伴って上昇し、それと同様に Ypk1 の発現も転写及び翻訳レベルで上昇した。一方、Com2 欠損株 (*com2*)では、Myr 依存的な Ypk1 の発現がキャンセルされており、Myr 依存的な Ypk1 の発現は、Com2 に依存することがわかった。

(2) Com2 のスフィンゴ脂質合成低下依存的な発現上昇は、TORC2-Ypk1 経路非依存的である Com2 の発現は、Myr 処理によるスフィンゴ脂質合成低下に依存して上昇したことから、スフィンゴ脂質量を感知して転写レベルで発現情報していることが考えられた。これまでに酵母においては、Tor キナーゼ複合体 2 (TORC2)とその下流に位置する Ypk1 がスフィンゴ脂質量の低下を膜ストレスとして感知することでスフィンゴ脂質代謝を活性化すること[2]が知られていた事

から、Com2 の発現は TORC2-Ypk1 経路の下流に位置することが考えられた。しかし、TORC2-Ypk1 経路を温度感受性変異株 (*slm1^{ts} slm2 Δ , tor2^{ts}, ypk1^{ts} ypk2) を用いて不活化した条件においても、Myr 依存的な Com2 の発現上昇が見られたことから、Com2 は、TORC2-Ypk1 経路とは独立した感知機構によりスフィンゴ脂質量を感知し、その発現を制御していることが考えられた。*

(3) YPK1 および LCB1 プロモーターの解析

Com2 は、5'-ATAGGG-3' という Com2 結合配列 (CBS) に特異的に結合することが明らかにされている。そこで、YPK1 以外にこの配列をもった遺伝子がないかを *S. cerevisiae* ゲノムから探索したところ、スフィンゴ脂質代謝の初発酵素であるセリンパルミトイル転移酵素 (SPT) の触媒サブユニットをコードする LCB1 のプロモーター領域にも CBS が存在することを見出した。そこで、YPK1 および LCB1 のプロモーター領域に LacZ 遺伝子を融合したレポータープラスミドを作製し、それぞれのプラスミドを GFP-Com2 を Dox 依存的に発現調節可能な P_{tetoff} -GFP-COM2 株に形質転換し、これらの形質転換体について Dox の有無における β Gal 活性を指標にプロモーター活性を解析した。その結果、YPK1 および LCB1 のプロモーター活性は、Dox 非存在下の Com2 過剰発現時には、Dox 存在下の Com2 発現抑制時に比べて、それぞれ 6 倍および 2.7 倍発現が上昇した。また、この発現上昇は、それぞれのプロモーターから CBS を除去したレポータープラスミドでは、完全にキャンセルされたことから、この発現上昇は、CBS 依存的であった。以上の結果から、Com2 は、スフィンゴ脂質合成低下時にその発現が誘導され、下流の YPK1 や LCB1 のプロモーター領域に CBS を介して結合することで、それらの遺伝子発現を上げ、結果としてスフィンゴ脂質代謝を活性化することが考えられた。

(4) YPK1 プロモーターから CBS 配列を除去した株はスフィンゴ脂質合成が低下する

次に、YPK1 プロモーター上の Com2 依存的な YPK1 発現のスフィンゴ脂質合成の役割をより明確にするために、ゲノム編集により YPK1 プロモーター上の CBS を除去した $P_{YPK1}\Delta$ CBS 株を作製した。作製した $P_{YPK1}\Delta$ CBS 株を用いた Myr 処理時の Ypk1 の発現を調べたところ、通常野生株で見られる Ypk1 の発現上昇は、 $P_{YPK1}\Delta$ CBS 株ではキャンセルされており、低濃度の Myr 処理によるスフィンゴ脂質合成の低下を TLC により調べたところ、本変異株では、野生株よりも *com2* 株同様に低下していた。一方、 P_{tetoff} -GFP-COM2 株を用いて Dox 非存在下での Com2 過剰発現時には低濃度の Myr で処理してもスフィンゴ脂質合成の低下が回復しており、Com2 がスフィンゴ脂質合成を Ypk1 を介して直接的に促進することが明らかになった。

(5) Com2 は、スフィンゴ脂質合成のマスター転写因子である

本研究により C2H2 型転写因子 Com2 は、細胞内スフィンゴ脂質量に依存してその発現を上昇させることで、下流の Ypk1 や Lcb1 の発現を上昇させ、結果として、スフィンゴ脂質代謝をポジティブに制御することを明らかにした [5]。興味深いことに $P_{YPK1}\Delta$ CBS 株および $P_{LCB1}\Delta$ CBS 株および $P_{YPK1}\Delta$ CBS $P_{LCB1}\Delta$ CBS 二重変異株は、*com2* 株ほど強い Myr 感受性を示さなかったことから Com2 には、YPK1 や LCB1 以外にも標的があることが考えられた。グリセロリン脂質やステロールの合成については、マスター転写因子によって、合成に関わる代謝酵素の発現が制御されることが酵母やヒトにおいて明らかにされていたが、スフィンゴ脂質代謝についてはマスター転写因子は全く明らかにされていなかった [6]。Com2 は、スフィンゴ脂質合成低下時にその下流の複数の標的に作用することでスフィンゴ脂質合成を促進するマスター転写因子として機能することが考えられた。

興味深いことに Com2 の発現上昇は、既知のスフィンゴ脂質量センシングに機能する TORC2-Ypk1 経路に依存しないことから未知のスフィンゴ脂質量センシング機構の存在を示唆していた。今後は、Com2 をレポーターとして、この未知のスフィンゴ脂質量センシング機構を明らかにすることで酵母からヒトにまで保存されたスフィンゴ脂質センシング機構が明らかになることが期待される。

【引用文献】

- [1] M. Tabuchi, A. Audhya, A.B. Parsons, C. Boone, S.D. Emr, The phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and TORC2 binding proteins Slm1 and Slm2 function in sphingolipid regulation, *Mol Cell Biol* 26 (2006) 5861-5875.
- [2] D. Berchtold, M. Piccolis, N. Chiaruttini, I. Riezman, H. Riezman, A. Roux, T.C. Walther, R. Loewith, Plasma membrane stress induces relocalization of Slm proteins and activation of TORC2 to promote sphingolipid synthesis, *Nat Cell Biol* 14 (2012) 542-547. 10.1038/ncb2480.
- [3] Y. Ishino, N. Komatsu, K.T. Sakata, D. Yoshikawa, M. Tani, T. Maeda, K. Morishige, K. Yoshizawa, N. Tanaka, M. Tabuchi, Regulation of sphingolipid biosynthesis in the endoplasmic reticulum via signals from the plasma membrane in budding yeast, *FEBS J* 289 (2022) 457-472. 10.1111/febs.16189.
- [4] T. Siggers, J. Reddy, B. Barron, M.L. Bulyk, Diversification of transcription factor paralogs via noncanonical modularity in C2H2 zinc finger DNA binding, *Mol Cell* 55 (2014) 640-648. 10.1016/j.molcel.2014.06.019.
- [5] Komatsu N., Ishino Y., Shirai R., Sakata K.-T., Tani M., Maeda T., Tanaka N., T. M., Transcriptional regulation of sphingolipid metabolism in budding yeast, *bioRxiv* (2021). <https://doi.org/10.1101/2021.11.05.467429>.
- [6] D.K. Breslow, J.S. Weissman, Membranes in balance: mechanisms of sphingolipid homeostasis, *Mol Cell* 40 (2010) 267-279. 10.1016/j.molcel.2010.10.005.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Komatsu Nao, Ishino Yuko, Shirai Rina, Sakata Ken-taro, Tani Motohiro, Maeda Tatsuya, Tanaka Naotaka, Tabuchi Mitsuaki	4. 巻 未定
2. 論文標題 Transcriptional regulation of sphingolipid metabolism in budding yeast	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 未定
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/2021.11.05.467429	査読の有無 無
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 Sakata Ken taro, Hashii Keisuke, Yoshizawa Koushiro, Tahara Yuhei O., Yae Kaori, Tsuda Ryohei, Tanaka Naotaka, Maeda Tatsuya, Miyata Makoto, Tabuchi Mitsuaki	4. 巻 未定
2. 論文標題 Coordinated regulation of TORC2 signaling by MCC/eisosome associated proteins, Pil1 and tetraspan membrane proteins during the stress response	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular Microbiology	6. 最初と最後の頁 未定
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/mmi.14903	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 -

1. 著者名 Ishino Yuko, Komatsu Nao, Sakata Ken taro, Yoshikawa Daichi, Tani Motohiro, Maeda Tatsuya, Morishige Kanta, Yoshizawa Koushiro, Tanaka Naotaka, Tabuchi Mitsuaki	4. 巻 289
2. 論文標題 Regulation of sphingolipid biosynthesis in the endoplasmic reticulum via signals from the plasma membrane in budding yeast	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The FEBS Journal	6. 最初と最後の頁 457 ~ 472
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/febs.16189	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12件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 小松楠於, 白井里樹, 吉澤昂志郎, 石野裕子, 谷 元洋, 上野俊哉, 前田達哉, 田中直孝, 田淵光昭.
2. 発表標題 転写因子Mlm2によるYPK1転写制御を介したスフィンゴ脂質代謝制御機構の解明
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム 第53回研究報告会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ishino, Y., Yoshikawa, D., Komatsu, N., Sakata, K., Tani, M., Maeda, T., Morishige, K., Yoshizawa, K., Tanaka, N. and Tabuchi, M.
2. 発表標題 Dysfunction of Lip1 causes hyperphosphorylation and translocation of ceramide synthase Lag1 dependent on TOR complex2- and Pkh1/2-Ypk1 signaling pathways in budding yeast
3. 学会等名 CELL BIO Virtual 2020, An Online ASCB/EMBO Meeting (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小松楠於, 石野裕子, 谷 元洋, 上野俊哉, 前田達哉, 田中直孝, 田淵光昭.
2. 発表標題 出芽酵母スフィンゴ脂質代謝制御に関わる機能未知転写因子Mim2の機能解析
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム 第52回研究報告会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小松楠於, 石野裕子, 谷 元洋, 上野俊哉, 前田達哉, 田中直孝, 田淵光昭.
2. 発表標題 出芽酵母における機能未知転写因子Mim2を介した新規スフィンゴ脂質ファイチャーニングシステムの解明
3. 学会等名 第37回 YEAST WORKSHOP
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 上野俊哉, 石野裕子, 小松楠於, 田中直孝, 田淵光昭.
2. 発表標題 スフィンゴ脂質量低下を感知する転写因子Mim2の発現制御機構の解析
3. 学会等名 第37回 YEAST WORKSHOP
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 上野俊哉, 石野裕子, 小松楠於, 田中直孝, 田淵光昭.
2. 発表標題 スフィンゴ脂質量低下を完治する転写因子Mlm2の発現制御機構の解析
3. 学会等名 日本農芸化学会 2019年度西日本・中四国支部合同沖縄大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 白井里樹, 小松楠於, 石野裕子, 間嶋 淳, 田中直孝, 田淵光昭
2. 発表標題 出芽酵母における転写制御を介したスフィンゴ脂質代謝制御機構の解明
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉澤昂志郎, 坂田健太郎, 前田達哉, 田中直孝, 田淵光昭
2. 発表標題 出芽酵母eisosome機能解明のためのsde変異株の原因遺伝子の解析
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 坂田健太郎, 吉澤昂志郎, 橋井圭介, 田原悠平, 宮田真人, 前田達哉, 田中直孝, 田淵光昭
2. 発表標題 Eisosomeに局在するPil1と4回膜貫通タンパク質(6-Tsp)はTORC2-Ypk1経路を制御することでSDS感受性に関与する
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小松楠於、白井里樹、石野裕子、谷 元洋、前田達哉、田中直孝、田淵光昭
2. 発表標題 転写制御を介したスフィンゴ脂質代謝制御機構の解析
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉澤昂志郎、坂田健太郎、田中直孝、田淵光昭
2. 発表標題 出芽酵母エイソソーム機能解明のためのsde変異株の単離と原因遺伝子の同定
3. 学会等名 日本農芸化学会中四国支部第59回講演会（例会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 白井里樹、小松楠於、石野裕子、間嶋 淳、田中直孝、田淵光昭
2. 発表標題 出芽酵母における転写制御を介したスフィンゴ脂質代謝制御機構の解明
3. 学会等名 日本農芸化学会中四国支部第59回講演会（例会）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>酵母遺伝学フォーラム第52回研究報告会にて、学生発表賞受賞 https://www.ag.kagawa-u.ac.jp/?p=24005</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
研究 分 担 者	船戸 耕一 (Funato Kouichi) (30379854)	広島大学・統合生命科学研究科(生)・准教授 (15401)	

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