

令和 4 年 9 月 9 日現在

機関番号：63902

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06649

研究課題名(和文) 分裂酵母の栄養源飢餓に応答する分子機構の解析

研究課題名(英文) Molecular mechanisms underlying cellular responses to nutrient starvation in fission yeast

研究代表者

大坪 瑶子(Otsubo, Yoko)

核融合科学研究所・ヘリカル研究部・特任助教

研究者番号：80580266

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)：本研究では、細胞に普遍的に備わる、栄養状態に適切に応答するための制御機構の解明を目標に、分裂酵母の栄養飢餓応答の解析を進めた。これまでに、tRNAの前駆体がTORキナーゼの活性調節に関わるという結果が得られている。tRNAとTOR両者に関連する候補因子を新規に単離した。また、TORキナーゼの下流で、有性生殖に関連する遺伝子の発現制御機構の解析を進め、有性生殖関連転写産物が体細胞周期で選択的に認識され分解される仕組みを明らかにした。さらに、硫黄飢餓時のTORキナーゼの活性変化についても解析を進めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

栄養飢餓応答は、細胞にとって最も基本的なシステムの一つである。本研究により、真核生物に広く保存されたTORキナーゼの働きについてより深く理解が進むとともに、細胞の基本原則の解明に繋がっていくことが期待される。また、飢餓応答システムの変化や破綻が、老化の進行やガンや糖尿病等の発症に関わっていることから、本研究が、将来的には新しい診断法や治療法の開発等に活用されることも期待できる。

研究成果の概要(英文)：This study aims to clarify mechanisms underlying cellular responses to nutrients using a eukaryotic model organism, fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. We have previously found that tRNA precursors regulate TOR kinase activity in response to nutrient availability. In this study, we isolated a novel candidate related to both tRNA and TOR. We also revealed the downstream mechanism of TOR kinase, by which meiotic transcripts were selectively recognized and degraded during mitotic growth. Furthermore, we demonstrated the TOR activity was affected by sulfur availability.

研究分野：細胞内シグナル伝達経路

キーワード：栄養応答 TORキナーゼ 有性生殖 分裂酵母

## 1. 研究開始当初の背景

細胞が生存していくためには、外界の環境の変化に柔軟、かつ適切に対応していくことが不可欠である。細胞が頻繁に遭遇し、大きな影響をもたらす環境変化の一つとして、細胞の栄養状態が挙げられる。細胞は、自身をとりまく環境の栄養状態を感知して、増殖、分化といったモードを適切に切り換えながら、変化に適応する必要がある。真核細胞では、栄養源を認識して応答する機構において、広く保存された TOR キナーゼが中心的な機能を担っていることが知られている。しかし、TOR キナーゼがどのように栄養源を認識し、分裂や分化を調節しているのか、詳細な制御機構には未だ不明な点が多い。

研究代表者は、単細胞真核生物である分裂酵母 *S. pombe* の窒素源枯渇に応答して行われる有性生殖の制御機構について研究を行ってきた。分裂酵母は、栄養が豊富な環境では、体細胞分裂を繰り返し、無性生殖により増殖していく。培地中の窒素源が枯渇すると、分裂を停止し、有性生殖過程へと移行して、減数分裂を行い、最終的に孢子を形成する。これまでの研究代表者等の解析から、有性生殖過程への移行に、TOR キナーゼが大きく関与していることが示されている。研究代表者は、これまでに分裂酵母の TOR キナーゼが哺乳類などと同様に二つの複合体である TOR キナーゼ複合体 1 (TORC1) と TOR キナーゼ複合体 2 (TORC2) を形成し、有性生殖の開始に対して、対照的な働きをしていることを明らかにしてきた (Matsuo, Otsubo et al., 2007; Otsubo and Yamamoto, 2008)。二つの複合体のうちの一つである TORC1 は、栄養が豊富な状態で有性生殖を抑制する働きを持つ。TORC1 の活性を低下させると、分裂酵母細胞は栄養状態に関わらず、分裂を G1 期で停止し、有性生殖を開始してしまう。TORC1 経路に注目し、解析を進めた結果、これまでに、TORC1 が減数分裂制御因子 *Mei2* などの複数の因子を標的にしていることを明らかにしてきた (Nakashima, Otsubo et al. 2012, Otsubo et al. 2014)。さらに、タンパク質の合成に必須な tRNA 前駆体による栄養状態に応答した TORC1 の活性調節という新たな制御機構が存在することを見出した (Otsubo et al., 2018)。しかしながら、これまで明らかにしてきたことのみでは、栄養状態の変化から有性生殖開始に至る過程を十分には説明できない状況にあった。

## 2. 研究の目的

研究代表者はこれまでに、栄養状態に応じて、tRNA 前駆体が TORC1 の活性を調節することを見出している (Otsubo et al., 2018)。しかし、tRNA 前駆体がどのように栄養を感知し、どのように TORC1 の活性を制御しているかは不明である。そこで、本研究では、栄養応答と有性生殖開始の間をつなぐ tRNA 前駆体による制御機構の実体を、分子レベルで明らかにすることを目標として解析を進めた。また、これまでに、栄養応答に異常を示す変異株を複数取得している。これら変異体の原因遺伝子と TORC1 の関係を調べて、TORC1 を中心とした栄養応答における新たな制御機構を明らかにすることも行った。

## 3. 研究の方法

tRNA 前駆体がどのようにして TORC1 の活性を調節しているのか明らかにするために、tRNA と TORC1 経路をつなぐ新規因子の探索を行った。また、研究代表者がこれまでに単離してきた栄養応答に異常を示す変異株の原因遺伝子が、有性生殖開始時の栄養応答機構にどのような役割を担っているのかを、TORC1 との関係に注目しつつ探った。これらに加えて、栄養応答機構の全貌を明らかにするために、本研究では、TORC1 の下流で、有性生殖に関連する遺伝子の発現制御機構についての解析も進めた。また、窒素源飢餓応答に加えて、それ以外の栄養応答と TORC1 の関係性についても検討を行った。

## 4. 研究成果

### (1) tRNA-TORC1 経路に関わる新規因子の探索

tRNA 前駆体に結合し、TORC1 の活性制御に関わるタンパク質を単離することを目的として、RNA 結合タンパク質 U1A の結合配列を挿入した tRNA 前駆体と、YFP を融合した U1A を共発現できるような株を作製した。この株を使って RNA 免疫沈降を行ったところ、tRNA 前駆体自身の結合は確認できたが、目的とする tRNA 結合タンパク質の単離には至らなかった。そこで、分裂酵母のオンラインデータベースを利用した探索を進めた。オンラインデータベースから、tRNA に関連するとされている既知の因子を抽出した。その中から、TOR キナーゼの阻害剤に対して感受性を示す変異株の原因遺伝子として報告されている因子や、TOR キナーゼ阻害剤添加により遺伝子発現が変化する因子を探索した。その結果、tRNA 前駆体のプロセッシングに関わる因子が、tRNA と TOR 両者に関連する因子の候補として単離された。TORC1 の変異株とこの因子の破壊株の二重変異株を作製したところ、栄養が豊富な培地上で、TORC1 の変異株よりも高い割合で、接合した細胞が観察された。また、この際、TORC1 の活性が大きく低下していることも確認できた。さら

に、TORC1 の変異株でこの因子を高発現させると、接合亢進の表現型が部分的に抑圧された。これらことから、この因子が tRNA を介した TORC1 の活性調節経路で何らかの役割を担っている可能性が考えられたので、現在、さらに詳細な解析を進めている。

#### (2) 栄養応答に異常を示す変異株の解析

これまでに、栄養応答に異常を示す変異株を複数取得している。これら変異体の原因遺伝子と TORC1 の関係を調べた結果、減数分裂の開始を抑圧するキナーゼ Pat1 が、TORC1 の下流で働く可能性が見出された。そこで、Pat1 が TORC1 によって直接リン酸化されるかを *in vitro* kinase assay によって検討したが、今のところ、Pat1 が TORC1 によって直接リン酸化されることを示す結果は得られていない。現在、TORC1 と Pat1 の関係をより詳細に検討中である。

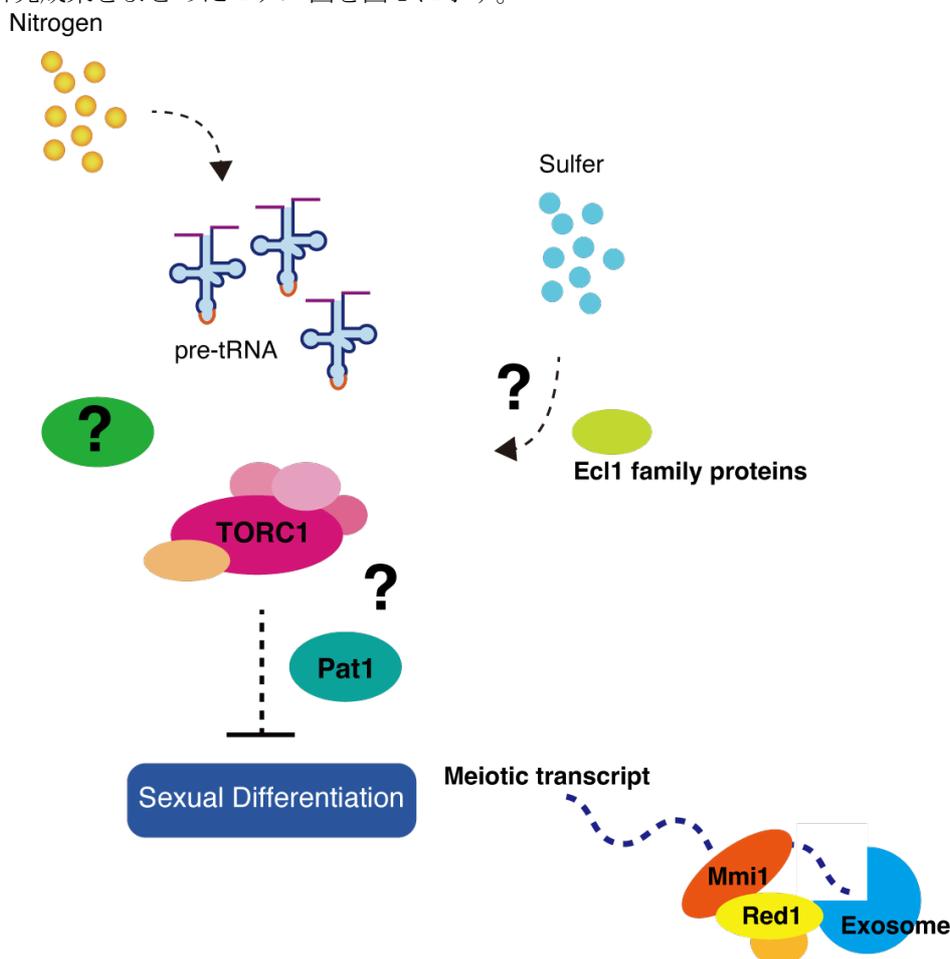
#### (3) 有性生殖に関連する遺伝子の発現制御機構の解析

栄養源認識から有性生殖開始までの制御機構の全貌を明らかにするために、TORC1 の下流の、有性生殖に関連する遺伝子の発現制御機構の解析を進めた。体細胞分裂期には、有性生殖過程に特異的に発現する遺伝子群の転写産物に、RNA 結合タンパク質 Mmi1 が結合し、RNA 分解複合体エクソソームによる選択的な分解が行われることが知られている。本研究では、Mmi1 とエクソソームが Red1 を含む MTREC/NURS 複合体を介して相互作用することで、有性生殖関連転写産物の選択的な分解が起きることを明らかにした。この結果を論文にまとめて発表した。

#### (4) 硫黄飢餓と TORC1 活性の解析

窒素源飢餓によって TORC1 の活性は低下する。酵母細胞を培養する培地中には、窒素源の他に、炭素源、各種ミネラル等の様々な栄養源が含まれる。ミネラルの一種である硫黄を枯渇させ、TORC1 の活性を調べたところ、硫黄飢餓時でも TORC1 の活性が窒素源飢餓時と同様に低下することがわかった。また、この活性低下が寿命制御に関わる Ec11 ファミリー依存的事であることが明らかになったので、これらをまとめて論文として発表した。今後は Ec11 ファミリーと TORC1 の関係についてより詳細に解析を進めるとともに、様々な栄養素の飢餓と TORC1 活性変化について調べていく予定である。

以上の研究成果をまとめたモデル図を図 1 に示す。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Ohtsuka Hokuto, Hatta Yoshiko, Hayashi Kana, Shimasaki Takafumi, Otsubo Yoko, Ito Yurika, Tsutsui Yu, Hattori Nobutake, Yamashita Akira, Murakami Hiroshi, Aiba Hirofumi	4. 巻 1
2. 論文標題 Cdc13 (cyclin B) is degraded by autophagy under sulfur depletion in fission yeast	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Autophagy Reports	6. 最初と最後の頁 51 ~ 64
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/27694127.2022.2047442	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 Ohtsuka Hokuto, Kobayashi Mikuto, Shimasaki Takafumi, Sato Teppei, Akanuma Genki, Kitaura Yasuyuki, Otsubo Yoko, Yamashita Akira, Aiba Hirofumi	4. 巻 10
2. 論文標題 Magnesium depletion extends fission yeast lifespan via general amino acid control activation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 MicrobiologyOpen	6. 最初と最後の頁 1176-1176
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/mbo3.1176	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 Otsubo Yoko, Kamada Yoshiaki, Yamashita Akira	4. 巻 11
2. 論文標題 Novel Links between TORC1 and Traditional Non-Coding RNA, tRNA	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Genes	6. 最初と最後の頁 956 ~ 956
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/genes11090956	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 Yoshimura Shinji, Otsubo Yoko, Yamashita Akira, Ishikawa Kenji	4. 巻 60
2. 論文標題 Insights into normothermic treatment with direct irradiation of atmospheric pressure plasma for biological applications	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Applied Physics	6. 最初と最後の頁 010502 ~ 010502
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.35848/1347-4065/abcbd2	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 Shichino Yuichi、Otsubo Yoko、Yamamoto Masayuki、Yamashita Akira	4. 巻 16
2. 論文標題 Meiotic gene silencing complex MTREC/NURS recruits the nuclear exosome to YTH-RNA-binding protein Mmi1	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS Genetics	6. 最初と最後の頁 e1008598
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pgen.1008598	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 -

[学会発表] 計7件(うち招待講演 1件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 大坪瑠子、定塚勝樹、吉村信次、山下朗
2. 発表標題 酵母を用いた常温大気圧プラズマに対する細胞応答機構の解明
3. 学会等名 日本物理学会 第77回年次大会(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山下 朗、後藤 祐平、酒井啓一郎、大坪瑠子、青木 一洋
2. 発表標題 分裂酵母のTORC1 biosensorの開発
3. 学会等名 第11回TOR研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 後藤 祐平、大坪 瑠子、鎌田 芳彰、山下 朗、青木 一洋
2. 発表標題 Development of single-cell measurement system by using FRET biosensors of the TORC1 activity in living yeast cells
3. 学会等名 第3回ExCELLSシンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 七野悠一、大坪瑶子、山本正幸、山下朗
2. 発表標題 分裂酵母のRed1による減数分裂転写産物の選択的分解機構
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 後藤 祐平、大坪 瑶子、鎌田 芳彰、山下 朗、青木 一洋
2. 発表標題 酵母一細胞レベルでのTORC1活性測定法の開発
3. 学会等名 第二回ExCELLSシンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 七野悠一、大坪瑶子、山本正幸、山下朗
2. 発表標題 分裂酵母の Red1 による減数分裂転写産物の選択的分解機構
3. 学会等名 第52回酵母遺伝学フォーラム研究報告会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山下 朗、大坪 瑶子、後藤 祐平、青木 一洋
2. 発表標題 分裂酵母TORC1経路の細胞生物学的解析
3. 学会等名 第9回TOR研究会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

研究室ホームページ <a href="https://www.nibb.ac.jp/pombe/">https://www.nibb.ac.jp/pombe/</a> 基礎生物学研究所プレスリリース <a href="https://www.nibb.ac.jp/press/2020/02/05.html">https://www.nibb.ac.jp/press/2020/02/05.html</a>
--

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