

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：12608

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2023

課題番号：19K22418

研究課題名（和文）核酸分子が制御する動物の新たな恒常性維持・栄養応答機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation and characterization of a novel starvation-response in animals controlled by nucleic-acid molecules

研究代表者

増田 真二（Masuda, Shinji）

東京工業大学・生命理工学院・教授

研究者番号：30373369

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：グアノシンテトラリン酸（ppGpp）は細菌の栄養飢餓時に重要な役割を果たす。申請者はこれまで、光合成細菌と植物におけるppGppの存在と役割を示してきたが、動物でのppGppの機能は不明である。本研究では、ショウジョウバエの視細胞にppGppを高蓄積させることでその機能を解明することを目指した。その結果、ppGppの高蓄積組織内で細胞死が引き起こされることがわかった。この結果から、ppGppが動物細胞内でも機能しうることがわかった。この研究は、動物におけるppGppの役割を理解し、新たな栄養応答機構を解明する上で重要なものとなる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

すべての生物にとって栄養状態をモニタリングするシステムは必須であり、その制御機構の解明は重要な課題である。特に多細胞生物では、栄養状態の調節の破綻が癌や老化と関連しており、その研究の重要性が増している。バクテリアでは、グアノシンテトラリン酸（ppGpp）が栄養飢餓状態を耐え忍ぶために重要な役割を果たしている。動物におけるppGppの役割に関する本研究の成果は、動物の新たな栄養応答機構を解明する上で重要な知見を提供する。

研究成果の概要（英文）：Guanosine tetraphosphate (ppGpp) plays a crucial role during nutritional starvation in bacteria. We previously demonstrated the presence and role of ppGpp in photosynthetic bacteria and plants, but its function in animals remains unclear. This study aims to elucidate the function of ppGpp by accumulating it in the photoreceptor cells of *Drosophila*. The results showed that high accumulation of ppGpp in the tissues induces cell death. This finding indicates that ppGpp can function within animal cells as well. This research is important for understanding the role of ppGpp in animals and for uncovering new mechanisms of nutritional response.

研究分野：分子生物学

キーワード：緊縮応答 栄養飢餓 ppGpp

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

外界や自身の栄養状態をモニタリングするシステムは全ての生物にとって必須と考えられ、その制御機構の同定と機能の解明は生物学の中心的課題であり続けてきた。特に多細胞生物において、個体の栄養状態に応じて分化・分裂を適切に調節する仕組みの破綻が癌や老化の進行と深く関わる可能性が指摘されており、その研究の重要性は日々増している。しかし栄養状態のモニタリングシステムの全容は未だ不明な点が多い。

バクテリアは、栄養飢餓状態に遭遇した際、セカンドメッセンジャーであるグアノシントラリン酸 (ppGpp) を介して遺伝子発現や代謝酵素の活性を制御し、その飢餓状態を耐え忍ぶ。この応答は緊縮応答と呼ばれ、バクテリアにとって必須かつ普遍的な栄養飢餓応答である。近年のゲノム解析の進展により、ppGpp の代謝に関わる酵素が動物や植物から続々と発見されている。申請者はこれまでに、モデル植物シロイヌナズナの組換え体の解析と、LC-MS/MS を用いた独自の ppGpp 高感度定量系を駆使し、ppGpp の植物における役割に関する先駆的な成果を上げると共に (e.g., *Nature Plants* 2015) この定量系を動物個体に応用し、一定量の ppGpp がショウジョウバエ等の動物個体内に存在することを世界に先駆けて明らかにした。しかし動物における ppGpp の具体的な機能は未だ不明である。

2. 研究の目的

本研究では、ショウジョウバエを主な材料とし、未知の動物型 ppGpp 合成酵素遺伝子を単離すると共に、ショウジョウバエの視細胞における ppGpp の機能を詳細に調べることで、既知のラパマイシン標的タンパク質 (TOR) やインスリン様成長因子 (IGF) のシグナルとは独立した、動物の新たな恒常性維持・栄養応答機構の存在を実験的に証明することを目指した。

3. 研究の方法

1) 組換えショウジョウバエの作成と解析

多彩な遺伝学的手法を導入できるショウジョウバエを用いて、時期・組織特異的に ppGpp を高蓄積する組換え体を作成し、その表現型を精査することで、後生動物における ppGpp の生理機能を明らかにする。

2) 動物型 ppGpp 合成・分解酵素の解析

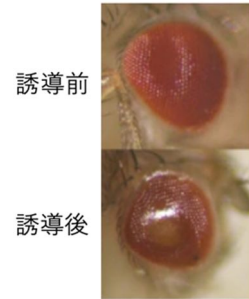
試験管内で ppGpp 分解活性を示す酵素 Mesh1 が後生動物から同定されているが (*Nat. Struct. Mol. Biol.* 2010) 既知の ppGpp 合成酵素遺伝子は動物のゲノム上に見つからない。無菌的に生育させたショウジョウバエからも ppGpp が検出された我々の未発表データを踏まえると、検出された ppGpp は共生細菌由来ではなく、内在性の未知の ppGpp 合成酵素により生合成されたものである可能性が高い。この未知の ppGpp 合成酵素遺伝子の同定を目指す。

また本研究期間中に Mesh1 は ppGpp 分解酵素ではなく、NADPH 脱リン酸化酵素であるという報告がなされた (*Nat. Metab.* 2020, 2: 270) 。そこで NADPH と Mesh1 の共結晶構造から NADPH の結合に重要かつ Mesh1 に特異的に保存されているアミノ酸に変異を導入し、その変異 Mesh1 タンパク質の酵素活性と、その変異をゲノム上に持つショウジョウバエの作出と解析を行うことで、Mesh1 本来生理機能を明らかにすることを目指した。

4. 研究成果

1) 組換えショウジョウバエの作成と解析

先の研究でショウジョウバエ中に枯草菌の ppGpp 合成酵素 YjbM を恒常的に発現させると致死異性をもたらすことがわかっている。そこで本研究では時期・組織特異的に ppGpp を高蓄積する組換え体を作成し、その表現型を精査することで、後生動物における ppGpp の生理機能を明らかにすることとした。多くの場合、致死性をもたらす因子は、目で特異的に発現させることで致死性を回避でき、その発現効果を調べることができるとされている。そこで、目特異的な GMR プロモータ依存で



Gal4 を発現するラインと組み合わせ（掛け合わせ）ることで、視細胞特異的に YjbM を発現、ppGpp 合成を誘導させ、その後の表現型を詳細に調べた。さらに発現の漏れが他組織で起こる可能性を排除するために、温度感受性フリップパーゼの系を組み合わせ、ppGpp 合成のバックグラウンドを抑えることを試みた。この実験により、目で時期特異的に ppGpp 合成酵素を蓄積させると、細胞死が引き起こされることがわかった（上図）。このことは、ppGpp が動物細胞内でも機能しうることを示している（Ito et al. 2020 *Commun. Biol.*）。

近年 Mesh1 が NADPH 脱リン酸化酵素であるという報告がなされた（*Nat. Metab.* 2020, 2: 270）。実際精製した Mesh1 は試験管内で NADPH を脱リン酸化することが示されている。これを検証する目的で、報告された NADPH と Mesh1 の共結晶構造（*Nat. Metab.* 2020, 2: 270）を基に NADPH の結合に重要と思われる Mesh1 の特定の 2 つのアミノ酸に変異を導入するためのコンストラクトを作成し、そのコンストラクトをショウジョウバエの Mesh1 遺伝子座にゲノム編集技術を用いて導入した。得られたラインのゲノム PCR とその産物のシーケンシングにより、目的の点変異 Mesh1 を発現する個体を複数ライン単離することに成功した。今後それらの表現型を解析することで、Mesh1 の生理学的重要性に関する知見を得ることができると考えられる。

2) 動物型 ppGpp 合成・分解酵素の解析

ゲノム編集によりショウジョウバエの染色体に導入した変異と同様の変異 Mesh1 を大腸菌で発現させ、精製する系を構築した。この変異タンパク質の一つは NADPH を基質とした脱リン酸化活性を失っていることがわかった。この変異タンパク質の ppGpp 分解活性を調べ、さらにこの変異タンパク質を発現するショウジョウバエの表現型を調べることで、Mesh1 の本来の基質を明らかにできると考えられる。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Sugimoto, Y. and Masuda, S.	4. 巻 67
2. 論文標題 In vivo localization and oligomerization of PixD and PixE for controlling phototaxis in the cyanobacterium <i>Synechocystis</i> sp. PCC6803	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J. Gen. Appl. Microbiol.	6. 最初と最後の頁 54-58
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2323/jgam.2020.06.001	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 Ito Doshun, Kawamura Hinata, Oikawa Akira, Ihara Yuta, Shibata Toshio, Nakamura Nobuhiro, Asano Tsunaki, Kawabata Shun-ichiro, Suzuki Takashi, Masuda Shinji	4. 巻 3
2. 論文標題 ppGpp functions as an alarmone in metazoa	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 671
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-020-01368-4	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 Shimizu Takayuki, Masuda Shinji	4. 巻 167
2. 論文標題 Persulphide-responsive transcriptional regulation and metabolism in bacteria	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 125-132
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jb/mvz063	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1件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Doshun Ito, Hinata Kawamura, Yuta Ihara, Takashi Suzuki, Shinji Masuda
2. 発表標題 The role of the ppGpp dependent stringent response in animals
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

プレスリリース：後生動物細胞からの内生グアノシン4リン酸（ppGpp）の検出に成功
<https://www.titech.ac.jp/news/2020/048325.html>

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