

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06648

研究課題名(和文) ヒト細胞と分裂酵母に共通する低ヘキソース環境順応メカニズムの解明

研究課題名(英文) evolutionarily conserved mechanisms underlying cellular adaptation to glucose-limited conditions

研究代表者

齋藤 成昭 (Saitoh, Shigeaki)

久留米大学・付置研究所・教授

研究者番号：30352123

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトを含むほとんどすべての真核生物にとってヘキソースは主たる炭素源であるが、真核細胞を取り囲む微小環境中に常に潤沢なヘキソースが存在するとは限らない。それゆえ、真核細胞には、低ヘキソース環境に順応するための機構が備わっているものと予想される。

本研究では、真核生物が普遍的に備える「低ヘキソース環境」順応機構を明らかにするため、分裂酵母及びヒト培養細胞をモデルとして用い、そのような順応機構にかかわる遺伝子を網羅的に同定し、それらの分子機能を解析した。ミトコンドリア機能や、TORC2シグナルを介したエンドサイトーシス経路の制御が低ヘキソース環境への順応に重要であると判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題で言う「低ヘキソース環境」とは、健常人の血糖値と同程度のヘキソースを含む培養環境である。それゆえ本研究は「正常血糖値レベルのヘキソースを含む体液中で、なぜヒト細胞は活動できるのか？」という問いに答える研究であると言える。本研究の成果はがんや2型糖尿病の診断や治療法の開発につながるものと期待される。

研究成果の概要(英文)：While hexose is the primary source of carbon in most eukaryotes including humans, abundant hexose is not always available in microenvironments surrounding eukaryote cells. Thus, eukaryote cells possess molecular mechanisms enabling adaptation to hexose-limited environments.

In this study, to reveal the evolutionarily conserved mechanisms underlying adaptation to hexose-limited environments, we utilized fission yeast and human cultured cells and screened for genes involved in such mechanisms. Mitochondria functions, and regulation of endocytosis via TORC2 signaling pathway are found to play pivotal roles in cellular adaptation to hexose-limited environments.

研究分野：分子生物学

キーワード：糖代謝 グルコース TORC2 ミトコンドリア 分裂酵母 ヒト培養細胞

## 1. 研究開始当初の背景

ヒトを含むほとんどすべての真核生物にとって、ヘキソース(グルコース、フルクトースなど)は主たる炭素源であり、エネルギー源である。解糖系によるヘキソース代謝産物は核酸などの生体高分子を生合成するための原料となり、また生み出される ATP は、エネルギー依存的な種々の生体プロセスの進行に不可欠である。しかしながら、真核細胞を取り囲む微小環境中に常に潤沢なヘキソースが存在するとは限らない。またヘキソースは比較的反応性の高い化合物であるため、高濃度のヘキソースは細胞にとって有害である。そのため、たとえば健康な人の場合、血液中のグルコース濃度(=血糖値)は5mM 前後の低値に抑えられている。それゆえ真核細胞には、そのような低濃度のヘキソースしか存在しない環境(以下、「低ヘキソース環境」とよぶ)に順応するための分子機構が備わっていると考えられる。ほとんどすべての真核細胞がヘキソースを利用していることを考慮すると、すべての真核生物に共通するような「低ヘキソース環境」順応機構が存在すると予想されるが、その全容は未解明であった。

遺伝学的解析が可能なモデル生物として広く利用されている分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* は、実験室環境下では通常、高濃度(111~167mM/2%~3%)のグルコースを含む培地を用いて培養される。しかしながら実は、分裂酵母は5mM 程度のグルコースもしくはフルクトースしか含まないような低ヘキソース培地中でも高濃度グルコース培地中とほぼ同等の速さで分裂増殖できることを申請者らは見出した。さらに、分裂酵母が低ヘキソース環境で増殖するためには、TORC2 経路や CaMKK-AMPK 経路、MAP キナーゼ経路などといった「タンパク質リン酸化シグナル伝達経路」が必須であることを明らかにした。これらのシグナル経路は、細胞外のヘキソース濃度の変化に应答して、ヘキソース輸送体タンパク質を介した細胞内へのヘキソースの取り込み量や細胞周期進行をコントロールすることにより、細胞を低グルコース環境に順応させる。これらのシグナル伝達経路は、酵母からヒトにいたる真核生物の間で幅広く保存されているが、興味深いことに哺乳類においては、これらのシグナル経路と 2 型糖尿病との関連性が示唆されている。この事実は、上述の予想のとおり、真核細胞において普遍的な「低ヘキソース環境」順応機構が存在することを強く示唆している。ヒトの場合、そのような順応機構を失った細胞は、体液中の血糖値が正常レベルまで下がった状況(=「低ヘキソース環境」)では活動できなくなるだろう。そのため、これらのシグナル経路の異常が高血糖症状を惹起するのかもしれないと予想された。

## 2. 研究の目的

上述のような背景を踏まえ、本研究課題では、「真核細胞は、どのような仕組みで低ヘキソース環境に順応するのか?」を核心的な「問い」として、その「問い」に答えるために、「真核細胞が普遍的に備える、低ヘキソース環境への順応機構」の全体像の解明を目的とする。先述の通り、本研究課題で言う「低ヘキソース環境」とは、健康人の血糖値と同程度のヘキソースを含む培養環境である。それゆえ、上記の問いは、「正常血糖値レベルのヘキソースを含む体液中で、なぜヒト細胞は活動できるのか?」とも言い換えられる。

真核細胞が低ヘキソース環境に順応するためには、

- 1) 細胞周囲のヘキソース濃度が低いことを感知し(=センサー機構)、
- 2) 感知したシグナルを伝達し(=シグナル伝達)
- 3) そのシグナルに应答して遺伝子発現プロファイルや各種の細胞機能を最適化、

必要がある。3)に関しては、低濃度のヘキソースを効率的に利用するために、例えば高親和性ヘキソース輸送体タンパク質を増量したり、ミトコンドリア呼吸能を亢進させたり、あるいは、そのような発現・機能最適が完了するまで一時的に細胞周期進行を停止させたり、といったような種々の細胞機能の調節を想定している。

## 3. 研究の方法

遺伝学解析の可能な分裂酵母モデルと、ヒト培養細胞モデルを用いた解析を並行して実施し、両者に共通するような分子メカニズムを抽出する。

本課題では、上記の1)~3)のプロセスに関わる遺伝子(群)を体系的にスクリーニングして同定した。具体的には、まず低グルコース環境での生育不全を示す分裂酵母変異体を体系的に取得し、その変異遺伝子(low glucose sensitive genes; lgs 遺伝子)を決定した。次いで、分裂酵母 lgs 遺伝子の相同遺伝子をヒトゲノムデータベースより探索し、それらがヒト培養細胞においても低ヘキソース環境での生育に不可欠であるか否かについて、RNAi 法を用いて検証した。こ

のようにして同定されたヒトや分裂酵母の Igs 遺伝子が、上記 1)~3)のいずれに関わっているかについて、分子細胞生物学的な手法を用いて検討した。

また、本課題を遂行する過程で、分裂酵母細胞内において必須遺伝子 (= 細胞の生存に不可欠な遺伝子) の発現を抑制する新手法の開発が必要となった。低ヘキソース環境での生育に関わる遺伝子の多くは必須遺伝子であると予想されたが、それらの遺伝子機能を効率的に解析するためには、任意のタイミングでそれらの発現を抑制する必要がある。この目的を達成するため、CRISPRi 法の分裂酵母への導入を試みた。

#### 4. 研究成果

##### (1) 分裂酵母/ヒト Igs 遺伝子の単離同定

分裂酵母遺伝子破壊株ライブラリー (約 3200 株) 温度感受性変異株ライブラリー (約 1000 株) に含まれる分裂酵母変異株を高グルコース (3%) と低グルコース (0.08%) 寒天培地に塗布し、低グルコース培地での生育が特異的に阻害されるような遺伝子破壊株・変異株を網羅的に取得した。次いで得られた酵母株における変異遺伝子を、全ゲノムシーケンス法などを利用して決定した。このようにして同定された遺伝子を Igs 遺伝子と名付けた。本スクリーニングにより約 240 の Igs 遺伝子が同定された。

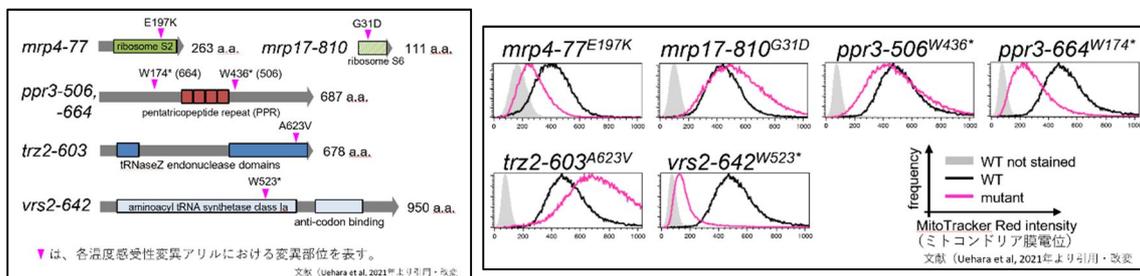
遺伝子破壊株ライブラリーからは非必須遺伝子、温度感受性変異株ライブラリーからは必須遺伝子が同定されるものと予想される。温度感受性変異株ライブラリーからも多くの Igs 遺伝子が同定されたことから、必須遺伝子の機能解析を容易にする新手法の開発が必要であると考えられた。

上述のような方法で同定された分裂酵母 Igs 遺伝子のホモログ (相同遺伝子) をヒトゲノムデータベースより探索したところ、約 350 の候補遺伝子 (ヒト Igs 遺伝子候補) が見つかった。それらについて、HeLa 細胞で siRNA 法による発現抑制を行った。Igs 遺伝子候補をノックダウンした HeLa 細胞を高グルコース (5.5mM)、低グルコース (0.4mM) MEM 培地で培養し、比増殖率を測定した。低グルコース培地と高グルコース培地でのノックダウン細胞の比増殖率の差が、統計的に有意 (差が標準偏差の 2 倍以上) であったものを「ヒト Igs 遺伝子」と名付けた。このスクリーニングにより、40 のヒト Igs 遺伝子が同定された。ヒトと分裂酵母で共通するこれら 40 の Igs 遺伝子は、「真核細胞が普遍的に備える、低ヘキソース環境への順応機構」に関与しているものと予想された。

##### (2) ミトコンドリア機能にかかわる Igs 遺伝子群

ジーンオントロジー解析などの情報学的手法により、分裂酵母/ヒト Igs 遺伝子の多くがミトコンドリア機能に関与しているものと推測された。そこで、分裂酵母温度感受性変異株ライブラリーのスクリーニングより同定された 5 つの Igs 遺伝子 (*mrp4*, *mrp17*, *ppr3*, *trz2*, *vrs2*) についてさらに詳しい解析を行った。これらの 5 つの遺伝子は、ミトコンドリアゲノムにコードされた遺伝子の発現 (転写・翻訳) に関与するものと推定されている。

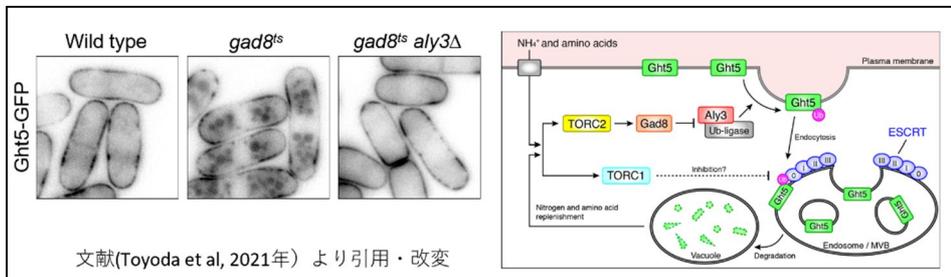
ミトコンドリアでの呼吸 (酸化リン酸化) によって、少ないグルコース分子から多くのエネルギーを生み出すことができる。それゆえにミトコンドリアは低濃度ヘキソースの効率的利用に必須となるのであろうと予想された。この仮説を検討するために、上記の 5 つの遺伝子変異体酵母においてミトコンドリア膜電位 (呼吸活性の指標) を測定したところ、3 つの遺伝子変異株では予想に反し、膜電位の低下は観察されなかった。この結果は、ミトコンドリアの、呼吸以外の何らかの分子機能が低ヘキソース環境への順応に不可欠であることを示唆していた。これらの成果を論文としてとりまとめ、open biology 誌に発表した (Uehara et al, 2021 年 <https://doi.org/10.1098/rsob.200369>)。



ヒト Igs 遺伝子においても、ミトコンドリア機能に関与すると予想されるものが多く含まれていた。Igs 遺伝子をノックダウンした HeLa 細胞において膜電位を測定したところ、分裂酵母の場合と同様に、膜電位には顕著な異常があらわれないものが多く含まれていた。

### ( 3 ) TORC2 シグナル経路によるグルコース輸送体の局在制御

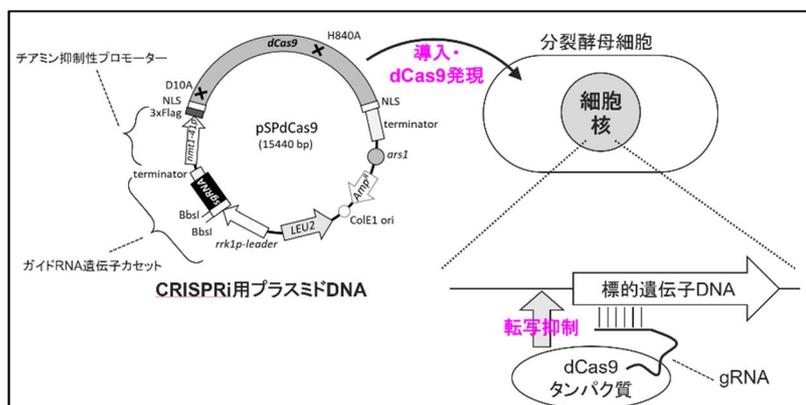
TORC2 シグナル経路は酵母からヒトに至る進化の過程で高度に保存されている。TORC2 キナーゼ複合体の構成因子をコードする *tor1* 遺伝子、*ste20* 遺伝子、TORC2 キナーゼの活性調節にかかわる *ksg1* 遺伝子、そして TORC2 によって制御される *gad8* 遺伝子が分裂酵母 *Igs* 遺伝子として同定された。我々が以前に行った研究で、これらの遺伝子が変異するとヘキソース輸送体タンパク質が正常に細胞膜上へ局在化できなくなることが判明していた。その分子メカニズムを解明するため、*gad8* 変異体の低グルコース感受性を抑制するサプレッサー遺伝子変異体のスクリーニングを行った。このスクリーニングによって得られた遺伝子の多くは、細胞膜から液胞へのエンドサイトーシス経路にかかわっていることが予想された。この結果は、TORC2 シグナル経路は、ヘキソース輸送体のエンドサイトーシスを抑制することで輸送体の細胞膜局在を保障していることを示唆している。得られたサプレッサー変異体の中でも *aly3* と名付けた遺伝子の変異体が最も強力な抑制効果を示した。*aly3* 遺伝子は、ユビキチンリガーゼと基質タンパク質の相互作用を仲介する アレスチンをコードしている。その分子機能から推定されるように、*gad8* 変異体ではヘキソース輸送体タンパク質 Ght5 がモノユビキチン化修飾を受けており、さらにそのユビキチン化修飾が *aly3* 依存的であることが判明した。細胞膜タンパク質のユビキチン化修飾はエンドサイトーシスの引き金となる。TORC2 は Aly3 アレスチンの機能を抑制することでヘキソース輸送体タンパク質 Ght5 のユビキチン化を抑制し、その結果、液胞へのエンドサイトーシスを抑制するのだろう。この成果を論文としてとりまとめ、Journal of Cell Science 誌に公表した ( Toyoda et al, 2021年 <https://doi.org/10.1242/jcs.257485> )。



### ( 4 ) 分裂酵母 CRISPRi 法の開発

細胞の生存に不可欠な必須遺伝子は、その機能不全が細胞死につながるため機能解析が困難である。分裂酵母の場合、例えば高温条件でのみ機能が欠損するような「温度感受性変異体」アレルを利用することで必須遺伝子の解析が可能となるが、温度感受性変異体アレルの取得は偶然による部分が大きく、すべての必須遺伝子で必ず温度感受性変異体が得られるとは限らない。上述の通り、必須遺伝子には *Igs* 遺伝子が多く含まれると予想されたが、それらを体系的に解析するためには、温度感受性変異に代わる新たな解析法の開発が必要となった。

ゲノム編集で用いられる Cas9 タンパク質の DNA 切断活性欠損変異型タンパク質である dCas9 タンパク質は、DNA に結合することはできるが DNA を切断できないため DNA 上にとどまり続け、RNA ポリメラーゼによる遺伝子転写を阻害する。この性質を利用した CRISPRi 法を分裂酵母へ導入することに成功した。dCas9 タンパク質が結合する DNA 配列は、dCas9 と複合体を形成する sgRNA の配列によって任意に選択できるが、遺伝子の転写開始点近傍、およびその約 100 塩基下流に dCas9 タンパク質が結合するように sgRNA 配列を設計すると高い転写抑制効率が得られることが判明した。この成果をとりまとめ、G3 誌に公表した ( Ishikawa et al, 2021年 <https://doi.org/10.1093/g3journal/jkab051> )。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Toyoda Yusuke, Soejima Saeko, Masuda Fumie, Saitoh Shigeaki	4. 巻 134
2. 論文標題 TORC2 inhibition of -arrestin Aly3 mediates cell surface persistence of <i>S. pombe</i> Ght5 glucose transporter in low glucose	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Cell Science	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） 10.1242/jcs.257485	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 Toyoda Yusuke, Saitoh Shigeaki	4. 巻 11
2. 論文標題 Fission Yeast TORC2 Signaling Pathway Ensures Cell Proliferation under Glucose-Limited, Nitrogen-Replete Conditions	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biomolecules	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） 10.3390/biom11101465	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 Uehara Lisa, Saitoh Shigeaki, Mori Ayaka, Sajiki Kenichi, Toyoda Yusuke, Masuda Fumie, Soejima Saeko, Tahara Yuria, Yanagida Mitsuhiro	4. 巻 11
2. 論文標題 Multiple nutritional phenotypes of fission yeast mutants defective in genes encoding essential mitochondrial proteins	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Open Biology	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） 10.1098/rsob.200369	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 Ishikawa Ken, Soejima Saeko, Masuda Fumie, Saitoh Shigeaki	4. 巻 11
2. 論文標題 Implementation of dCas9-mediated CRISPRi in the fission yeast <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 G3 Genes Genomes Genetics	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） 10.1093/g3journal/jkab051	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0件

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 情報取得装置、プログラム、組換えベクターの製造方法及び遺伝子発現抑制方法	発明者 石川健、齋藤成昭	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2021-167824	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------	---------