

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：63801

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2023

課題番号：20K22637

研究課題名（和文）光応答を介した概日リズム非依存的な細胞周期制御メカニズムの研究

研究課題名（英文）Study on the circadian rhythm-independent cell-cycle regulation mediated by photoreponse of *S. japonicus*

研究代表者

三宅 裕可里 (MIYAKE, Yukari)

国立遺伝学研究所・遺伝形質研究系・特任研究員

研究者番号：80874560

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：ジャポニカス分裂酵母は環境変化に応じて酵母型あるいは菌糸型で増殖する。この酵母は概日リズムを持たないが、光や温度を感知して細胞分裂を活性化する祖先型生物時計を持つと考えられる。本研究では、酵母型-菌糸型の形態移行時に発現が変動する遺伝子群を同定した。また、この酵母の光・温度応答にはジャポニカス分裂酵母固有の遺伝子に加えて他の分裂酵母や真菌類にも保存される遺伝子群が関与していること、光・温度応答の情報伝達経路にはクロストークが存在することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

自然環境中において光や温度は周期的に変化するが、これらは天候や季節などに大きく左右される。本研究成果からジャポニカス分裂酵母は光と温度という2つの異なる応答システムを併用することでその変化を柔軟に感知し、多様な環境下で概日リズムと同等の細胞周期制御を実現しているものと考えられる。加えて他の真菌類にも保存される遺伝子群の光・温度応答への関与が示唆されたことは、今後の真菌全体の、複数の感知システムを介した応答メカニズムの解明にもつながるものである。

研究成果の概要（英文）：Schizosaccharomyces japonicus can grow both as unicellular yeast and filamentous hyphae, depending on environmental changes. Although *S. japonicus* does not show circadian rhythms, it can still synchronously activate the cytokinesis of hyphae in response to light or temperature change. In this study, we isolated up- or down-regulated genes during the yeast-to-hypha transition. Hundreds of gene-deletion mutants showed that this organism responds to light or temperature stimuli by using both unique genes and genes conserved among other fission yeast and fungi. This study also suggested that the cross-regulation exists between the two signal transduction pathways of light and temperature response.

研究分野：ゲノム生物学

キーワード：ジャポニカス分裂酵母 光応答 菌糸誘導 遺伝子発現変動

1. 研究開始当初の背景

(1) 生物の光応答

生物にとって光とは、生命の起源から維持されてきた環境シグナルであり、光に対する応答は原核生物(単細胞)である細菌から、多細胞真核生物である植物や動物まで多様な生物で確認されている。光応答の最も進化したシステムとして概日リズムが挙げられる。この機構は幅広い真核生物で確認されている。概日リズムを持つ生物は光の刺激を与えない環境下でも細胞周期を一定の時間間隔で維持することができる。この時間周期は光刺激によって同期される。つまり、概日リズムは光応答を基盤とした発展型生物時計と言える(図1)では、概日リズムはどのようにして獲得されたのだろうか。これを明らかにするには、より祖先型の生物時計の理解が必要と考えられる。

(2) ジャポニカス分裂酵母のタイマー型生物時計

真菌は菌糸と呼ばれる特徴的な増殖を行う。酵母は真菌の一種でありながら菌糸を作らない。しかし、一部の酵母は栄養条件などの環境変化に応じて「酵母型」と「菌糸型」の増殖を行い、二形性酵母と呼ばれる。分裂酵母のモデルとして知られる *Schizosaccharomyces pombe* の近縁種「ジャポニカス分裂酵母」は二形性酵母であり、菌糸形成を誘導する環境条件として栄養ストレスとDNA損傷ストレスの2つがある(Furuya & Niki, 2010)。近年、菌糸型ジャポニカス分裂酵母が波長470 nmの青色光を感知し、18~20時間後に細胞分裂を活性化することが示された(Okamoto *et al.* 2013)。この応答を制御するWcs1、Wcs2はアカパンカビ(*Neurospora crassa*)の光受容体WC-1、WC-2のホモログであり、2つの因子は複合体を形成し光受容体として機能する。WC-1、WC-2複合体は時計遺伝子の発現制御を介して概日リズムを作り出し、24時間の周期で細胞活動を連続的に行う。一方、ジャポニカス分裂酵母は概日リズムを示さない。しかし、この酵母は光刺激をスイッチとして時間の計測を始め、18~20時間後に細胞分裂を行う。したがって、寒天培地上で増殖する菌糸は24時間ごとの光刺激に応答して細胞分裂を行い、その結果として周期的な縞模様を形成する。これはいわば「キッチンタイマー」型の生物時計であり、より高度な概日リズムが出現する前の、祖先型の生物時計であると考えられる(図1)。

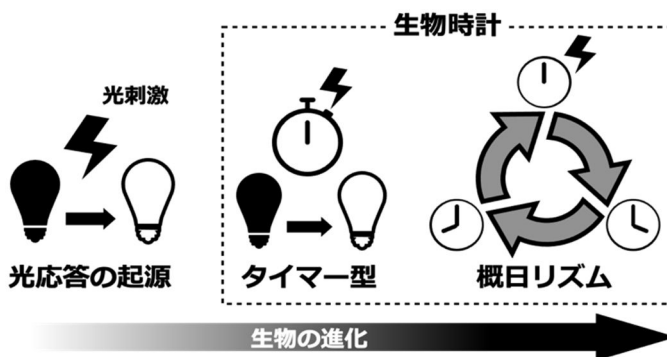


図1. 生物の光応答の発展

2. 研究の目的

自然環境において、明暗変化は日の出の時刻に起こる。ジャポニカス分裂酵母は日の出による光刺激を受け、18~20時間経過後の夜間に細胞分裂を行っているものと考えられる。ジャポニカス分裂酵母の光感知システムは高感度であり、波長470 nmの青色光を月明かり程度の輝度であっても感知する。これにより日の出の弱い光もいち早く感知して応答しているものと思われる。以上から本研究では、ジャポニカス分裂酵母の光応答メカニズムの詳細を明らかとすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 寒天培地を用いた菌糸の光応答の観察

ジャポニカス分裂酵母は寒天培地上での培養中に光刺激を与えると18~20時間後に同調的な細胞分裂の活性化が起こる。この応答は寒天培地上での縞模様の形成という形で観察することができる。加えてこの酵母は光のみでなく温度変化をも感知して細胞分裂を誘導することが明らかとなった(Okamoto *et al.* 2013)。温度に対する応答は光応答とは異なるシステムによって制御されていることがわかっている。

以上から野生株および各種遺伝子欠損株を用いて光・温度刺激による縞形成の有無を観察することにより新規の光・温度応答因子の探索を行った。更に既知の光・温度応答主要因子の遺伝子発現プラスミドを用いてこれらの因子が互いの応答に及ぼす影響を検討した。

(2) RNA-Seq 法による全遺伝子発現変動解析

野生株および光応答主要因子 (*wcs1*, *wcs2*, *drk1*) の変異株を用いて光刺激による全遺伝子の発現パターンの変化を網羅的に解析した。これにより、光刺激によるタイマー型生物時計の起動後、時間経過に伴って細胞内でどのような遺伝子が順次活性化 (あるいは抑制) され、細胞内の活動が制御されているかを明らかにすることを旨とした。

光応答特異的な発現変動遺伝子の同定と並行して、酵母型、酵母菌系間の形態移行時、菌系型の3つの段階において特異的に発現している遺伝子群の同定を目的として、野生株、菌系形成能欠損株 *chk1* 株、温度依存的菌系形成株 *chk1-hyp* 株の3株 (Furuya & Niki 2010) を用いた全遺伝子発現変動解析を行った。

(3) 顕微鏡下における細胞形態変化の継時観察

DNA 損傷ストレスや栄養条件悪化による酵母型から菌系型への移行において、一細胞レベルでは「菌系型への移行」、「環境条件の好転による菌系型から酵母型への移行」のいずれも環境変化が生じてから6~7時間で起きることが報告されている (Furuya & Niki, 2010)。この細胞形態変化のタイミングを一細胞レベルで理解するため、顕微鏡下での観察を行った。

4. 研究成果

(1) 光・温度応答に寄与するジャポニカス分裂酵母固有遺伝子の探索

分裂酵母のモデル生物である *Schizosaccharomyces pombe* とジャポニカス分裂酵母を含む近縁種3種のゲノム比較から、これら4種の分裂酵母は約3900の共通遺伝子を持ち、更にそれぞれが100以上の固有遺伝子をゲノム上に持つことが明らかとなっている (Rhind *et al.* 2011)。ジャポニカス分裂酵母に固有の401遺伝子それぞれの破壊株を用いて寒天培地上での光・温度応答による縞形成の有無を観察し、新規の光・温度応答因子の探索を行った。その結果、光・温度応答に必須な新規遺伝子は見つからなかった。よってジャポニカス分裂酵母は既知の固有因子に加えて他の分裂酵母や真菌類にも共通するシステムを利用して光や温度に応答していることが示唆された。

(2) 光応答時の全遺伝子発現変動解析

光刺激による全遺伝子の発現変動を RNA-seq 法により解析するため、野生株、光応答の制御因子をコードする *wcs1*, *wcs2*, *drk1* 遺伝子の単一欠損株の計4株を用いて実験を行った。トポイソメラーゼ阻害剤 CPT を培地に加えて菌系誘導を行ったのち、(i)暗条件から明条件への変化、(ii)明条件から暗条件への変化、(iii)恒常的な暗条件、(iv)恒常的な明条件、の4条件で継時的に菌系細胞サンプルを得た。

まず野生株における暗条件から明条件への変化による光応答時の遺伝子発現変動パターンを RNA-seq により分析した。複数回にわたり同様の実験を行なったが、発現変動パターンに再現性が見られないことから、実験条件の見直しを行った。野生株を CPT 添加・暗条件下で培養し、菌系形態に移行したことを確認後、暗条件から明条件へと光条件を変化させた。明条件への移行後は、RNA-seq による分析のための実験時と同様に一定時間ごとに培養液を希釈して濁度調整を行いながら、継時的に顕微鏡で観察した。次に同様の実験を光刺激を与えずに行い、2条件での細胞形態を比較した。その結果、細胞形態に光刺激の有無による差は見られなかった。このことから、培養液の希釈によって細胞形態が影響を受けており、これによって光応答による細胞形態変化を捉えることができているものと推察している。

(3) 光・温度応答のクロストーク

ジャポニカス分裂酵母の光応答、温度応答システムの情報伝達経路を明らかにすることを旨とし、光応答の主要因子 (*Wcs1*, *Wcs2*, *Drk1*) と温度応答の主要因子 (*Trj1*) が、もう一方の応答に及ぼす影響を検討した。各主要因子の欠損株に発現プラスミドを導入して各因子の細胞内ゲノム量を増やし、光や温度に対する応答を寒天培地上での縞形成の有無で判定した。その結果、*drk1* 欠損株では *Wcs1*, *Wcs2*, あるいは *Trj1* の細胞内ゲノム量増加により光応答が回復し、また *trj1* 欠損株では *Wcs1*, *Wcs2*, あるいは *Drk1* の細胞内ゲノム量増加により温度応答が回復した。このことから光・温度応答の情報伝達経路には *Drk1* および *Trj1* を介したクロストークが存在することが示唆された (図2)。自然環境中におけ

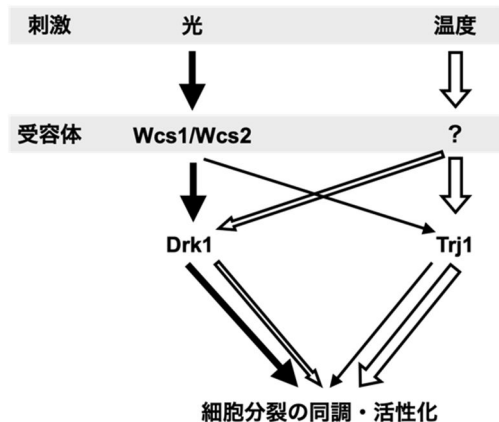


図2. 光・温度応答情報伝達モデル

る明暗変化や温度変化は日の出の時刻周辺で起こることから、ジャポニカス分裂酵母は光と温度という2つの異なる感知システムを併用することにより、日照や気温といった季節や天候、地形などに大きく左右される環境要因を柔軟に感知し、多様な環境下で概日リズムと同等の細胞周期制御を実現しているものと考えられる。今後、光・温度応答主要因子の下流制御因子を同定し、情報伝達経路の詳細を明らかにすることにより、概日リズムを介さない柔軟な環境適応機構の理解に貢献し、更には真菌全体の、複数の感知システムと転写制御を介した長周期応答メカニズムの解明にも迫ることができると考える。

(4) 酵母 菌糸間形態移行時および酵母/菌糸特異的に発現する遺伝子群の同定と機能的分類 菌糸誘導時の細胞形態変化

菌糸型ジャポニカス分裂酵母の光応答による最終的な表現型は菌糸から酵母への形態移行を伴う細胞分裂の活性化である。現在までに同定されているジャポニカス分裂酵母の光応答主要因子 *Wcs1*、*Wcs2* はいずれも真菌全体で広く保存されており、転写因子として機能することが示唆されている。光応答の情報伝達経路がどの段階で細胞周期制御に関わっているのかを明らかにするためには、*Wcs1*、*Wcs2* の制御する遺伝子の探索を行うと共にジャポニカス分裂酵母の酵母 菌糸間の形態移行時にどのような遺伝子群が機能しているかについても理解する必要がある。

よって光応答特異的な発現変動遺伝子の同定と並行して、酵母型、酵母 菌糸間形態移行期、菌糸型の各形態で特異的に発現している遺伝子群の同定を目指し、野生株、温度依存的菌糸形成株 *chk1-hyp* 株の2株 (Furuya & Niki 2010) を用いて (i) 薬剤 CPT による菌糸誘導、(ii) 温度による菌糸誘導、の2条件における転写変動解析を計画した。まず菌糸誘導後の細胞形態変化を顕微鏡で継時的に観察し、各時間の細胞について菌糸の形態的特徴である「細胞伸長」「液胞の発達」「顆粒状の物質の蓄積」の3点で評価し、「酵母型」「中間体」「菌糸型」の3つに分類した (図 3A)。その結果、酵母、菌糸、そしてそれらの中間的特徴を示す細胞の割合は菌糸誘導後3時間と6時間で大きく変化することが見出された (図 3B)。また CPT 添加による菌糸誘導では12時間、温度変化による菌糸誘導では15時間経過時点で菌糸型の細胞の割合が最も高く、その後は死細胞の増加が観察された。

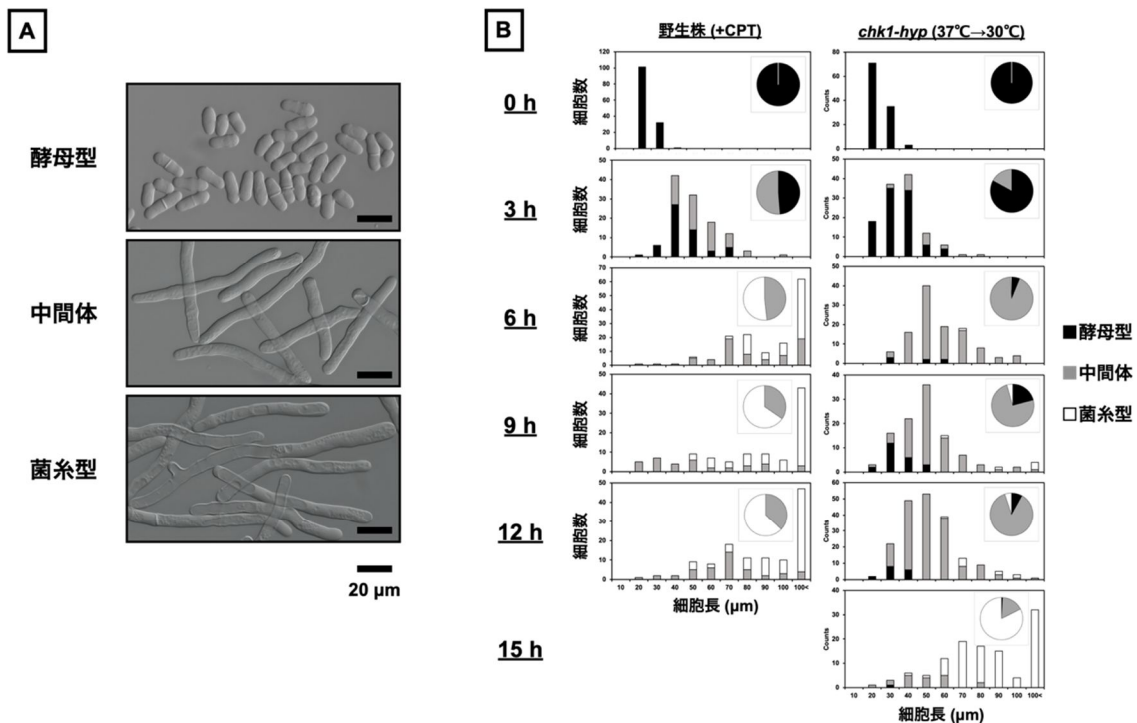


図3. 菌糸誘導後の細胞形態変化

酵母・菌糸特異的に発現する遺伝子群の同定と機能的分類

酵母から菌糸への形態変化について、(i) 野生株を用いた CPT 添加による菌糸誘導、(ii) 温度感受性菌糸形成株 *chk1-hyp* 株を用いた温度変化による菌糸誘導、の2条件下での全遺伝子発現変動を RNA-seq 法により継時的・網羅的に解析した。菌糸誘導前 (0 時間) と誘導後 (CPT 添加条件では 12 時間経過後、温度条件変化では 15 時間経過後) を比較した結果、両条件で共通して発現が増加した 177 遺伝子、発現が減少した 74 遺伝子を、菌糸誘導によって発現が変動した遺伝子群として同定することができた。これらの遺伝子群は光によって発動するタイマー型生物

時計を介さない、酵母から菌糸への形態移行で発現が変動するものと考えられる。

同定された遺伝子群について、ジャポニカス分裂酵母のゲノムデータベース (JaponicusDB) および分裂酵母のモデル生物である *S. pombe* のゲノムデータベース (PomBase) を用いて分類を行った。その結果、菌糸誘導によって発現が増加した 177 遺伝子の内 56 遺伝子は機能未知であり、さらにその内 14 遺伝子はジャポニカス分裂酵母に固有の遺伝子であることが明らかとなった。残りの機能的分類が可能であった 121 遺伝子には代謝系、生合成系で機能する遺伝子の割合が多く含まれていることが示された。一方発現が減少した 74 遺伝子については機能未知遺伝子が 2 つ見られ、ジャポニカス分裂酵母固有の遺伝子は見られなかった。機能的分類が可能であった 72 遺伝子にはリボソーム生合成に関与する遺伝子が多く含まれていることが明らかとなった。今後は顕微鏡観察下において細胞形態の割合が大きく変化した菌糸誘導 3 時間後、6 時間後を中心に全遺伝子発現変動解析を行うことで移行期に機能する遺伝子群を同定し、酵母 菌糸間形態移行メカニズムの詳細を明らかとしたい。

< 引用文献 >

- Furuya K, & Niki H. (2010). The DNA Damage Checkpoint Regulates a Transition between Yeast and Hyphal Growth in *Schizosaccharomyces japonicus*. *Molecular and Cellular Biology*, 30(12), 2909-2917. doi:10.1128/MCB.00049-10
- Okamoto S, Furuya K, Nozaki S, Aoki K, and Niki H. (2013). Synchronous Activation of Cell Division by Light or Temperature Stimuli in the Dimorphic Yeast *Schizosaccharomyces japonicus*. *Eukaryot Cell*12. doi:10.1128/ec.00109-13
- Rhind N, Chen Z, Yassour M, *et al.* Comparative functional genomics of the fission yeasts. *Science*. 2011 May 20;332(6032):930-6. doi: 10.1126/science.1203357.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------