

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K14769

研究課題名（和文）分裂酵母における新規キナーゼNnk1による寿命制御機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the lifespan control mechanism by a novel kinase Nnk1 in fission yeast

研究代表者

島崎 高史（Shimasaki, Takafumi）

名古屋大学・創薬科学研究科・助教

研究者番号：50821998

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、分裂酵母において経時寿命の制御に関与するNnk1タンパク質の機能解析を行った。Nnk1タンパク質はC末端領域にキナーゼドメインを保持しているが、そのリン酸化基質や生理学的機能については明らかになっていなかった。解析の結果、Nnk1タンパク質が細胞壁ストレス応答に関与すること、その応答に重要なPmk1 MAPKの活性化に必要であることが明らかになった。またリン酸化プロテオミクス解析から、Nnk1タンパク質の活性低下によって幾つかの栄養トランスポーターのリン酸化レベルが低下することが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では新たに、Nnk1が適切な細胞成長や細胞壁ストレス応答に重要な因子である、Pmk1 MAPKの活性制御に関与する結果が得られた。Pmk1は分裂酵母のみでなく、哺乳類にまで広範に保存されたMAPKであるため、今回得られた知見は他の生物種に応用できる可能性がある。また、Pmk1以外にも網羅的解析によって、Nnk1タンパク質のリン酸化標的候補をいくつか同定することができた。そしてこれらの候補の中には、各種栄養トランスポーターが含まれていた。今回の成果はこれらのトランスポーターの活性制御に関する新たな知見になることが期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we performed a functional analysis of the Nnk1 protein, which is involved in the control of chronological lifespan in fission yeast. The Nnk1 protein contains a kinase domain in the C-terminal region, but its phosphorylation substrates and physiological functions have not been elucidated. The analysis revealed that the Nnk1 protein is involved in cell wall stress response and is required for the activation of Pmk1 MAPK, which is important for the response. In addition, phosphorylation proteomic analysis revealed that decreased activity of the Nnk1 protein reduces the phosphorylation levels of several nutrient transporters.

研究分野：細胞生物学

キーワード：経時寿命 分裂酵母 Nnk1タンパク質 細胞壁ストレス

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

これまでに様々なモデル生物を用いて寿命研究が行われてきたが、寿命に関連する因子やシグナル経路が種を超えて保存されていることが明らかになっている。その中でも酵母は遺伝学的解析の行いやすさなどの理由から、優れたモデル生物として寿命研究に用いられている。酵母を用いた寿命研究において、経時寿命は細胞分裂しない状況下での生存期間として評価される。

これまでに我々は分裂酵母を用いた経時寿命の研究を行う過程で、*nnk1+* 遺伝子に生じた変異 (*nnk1-35* 変異) が分裂酵母の経時寿命を大きく延長することを発見していた。Nnk1 タンパク質は、C 末端領域にキナーゼドメインを持つ全長 781 アミノ酸から構成され、その類似タンパク質は酵母から哺乳類まで多様な生物種にみられるが、明確なオルソログは同定されておらず、その標的であるリン酸化基質や生理学的機能についても明らかになっていない。

長寿命の原因変異である *nnk1-35* 変異は、アミノ酸レベルでは 744 番目のグルタミン酸が終始コドンに置き換わったナンセンス変異であり、この変異による長寿命の表現型は野生型の Nnk1 タンパク質を高発現することで抑制されることから、*nnk1-35* 変異は機能低下型の劣性変異であることが予想されていた。

2. 研究の目的

本研究の主要な目的は、新規の寿命制御因子である Nnk1 タンパク質の生理学的機能、および寿命制御メカニズムの解明である。分裂酵母は基本的な細胞内メカニズムが高等生物とも類似しており、カロリー制限応答や PKA や TOR といった種々の寿命制御因子も保存されており、優れた寿命研究モデルである。分裂酵母における Nnk1 タンパク質による寿命制御メカニズムの解明を通して、高等生物の寿命制御の理解に寄与する普遍的な知見を得ることを目指す。また細胞レベルでの寿命制御メカニズムの理解は、より複雑な高等生物における寿命制御メカニズムの理解にも役立つと考えられる。そのため、Nnk1 という未知の寿命制御因子の解析を通じて、細胞寿命制御の 1 つの仕組みを理解することを目的とする。

3. 研究の方法

Nnk1 タンパク質に GFP タグを融合した株を作製し、Nnk1 タンパク質が細胞内のどの場所で機能するタンパク質であるかを解析した。また Nnk1 タンパク質の活性が低下している *nnk1-35* 変異株を用いて、各種の遺伝学的・生化学的解析を行なった。Nnk1 は生育に必須の因子であるため、当初は欠損変異株を用いた解析は行えないと考えていたが、この *nnk1-35* 変異株が高温条件で培養した際に、生育不全 (高温感受性) を示すことが明らかになったため、高温条件で Nnk1 タンパク質の活性が消失する現象も実験系に取り入れた。

また Nnk1 タンパク質のリン酸化基質を網羅的に同定するために、リン酸化プロテオミクス解析を実施した。Control となる野生株と *nnk1-35* 変異株を共に高温条件で培養し、Nnk1 タンパク質の活性低下によって引き起こされる細胞内のリン酸化レベルの変化を解析した。

4. 研究成果

まず今回の解析によって、Nnk1 タンパク質が細胞の分裂面や細胞膜付近に局在することが明らかになった。また *nnk1-35* 変異株が細胞壁ストレスを引き起こす薬剤に対して著しい感受性を示したことから、細胞壁ストレス応答経路と Nnk1 タンパク質の関連性を解析した結果、Nnk1 タンパク質そのものがリン酸化されていた。さらに Nnk1 タンパク質は、分裂酵母の適切な細胞成長や細胞壁ストレス応答に重要な因子である、Pmk1 MAPK の活性化に重要な役割を担うことが新たに判明した。以上の結果から、Nnk1 タンパク質は分裂酵母の細胞壁ストレス応答において重要な役割を担っていることが示唆された (図 1)。

さらにリン酸化プロテオミクスによる網羅的な解析により、Nnk1 タンパク質の活性低下によってリン酸化レベルの低下する基質候補が複数同定された。これらの中でも特にリン酸化レベルの低下が大きいものとして、幾つかの栄養取り込みに関与するトランスポーターが含まれていた。細胞内への栄養取り込みを担うトランスポーターは、外部の栄養条件やストレス条件によって活性が変化することが知られているが、その詳細なメカニズムについては未だ不明な点が多い。現在、これらのトランスポーターが Nnk1 タンパク質の基質である可能性や、寿命制御機構に関与する可能性についても解析を行なっている。

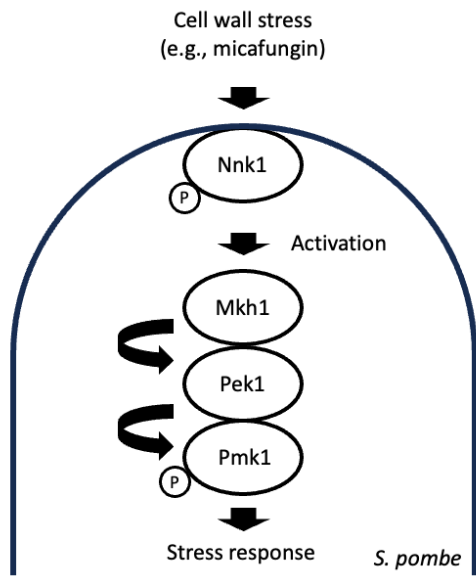


図 1 : 細胞壁ストレスに応答した Nnk1 による Pmk1 経路の活性化機構

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Takafumi Shimasaki
2. 発表標題 Characterization of nnk1+ that regulates chronological lifespan in fission yeast
3. 学会等名 11th International Fission Yeast Meeting POMBE 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

〔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
---------	---------