

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19079

研究課題名（和文）核はなぜ球なのか？：細胞核形態のダイナミズムと生理機能の合目的性の探索

研究課題名（英文）Dynamism of nuclear morphology and exploration for the co-ordination of the nuclear shape and its physiological function

研究代表者

井上 善晴（Inoue, Yoshiharu）

京都大学・農学研究科・教授

研究者番号：70203263

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）：酵母のスピンデル極体（SPB）はG1/S相移行期に複製され、Kar9が古いSPBに非対称的に局在することでSPBの配向性を規定する。本研究で、解糖系由来の代謝産物であるメチルグリオキサール（MG）が、Kar9の非対称な局在を乱し、SPBの適切な配向性に影響を与えることを明らかにした。MGはDNA損傷チェックポイント経路を活性化し、Mec1依存的にKar9の非対称局在を攪乱した。DNAアルキル化剤であるメタンサルホン酸メチルもまた、Kar9の非対称局在化を阻害した。この結果は、DNA損傷チェックポイント経路の活性化が、SPBの適切な位置決めに必要なKar9の非対称な局在を乱すことを示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞周期を通して核膜が消失しないclosed mitosisを行う酵母では、核分裂は核というオルガネラを母細胞から娘細胞へ分配するプロセスであると捉えることができる。核は球形をしているが、核分配の際には成長軸に沿って伸長する。核が娘細胞（芽）に入るためには、S期において複製されたスピンデル極体（SPB）のうち、鑄型となるold SPBが芽に入る必要がある。そのSPBの配向性を制御するのがKar9である。したがって、Kar9の局在の乱れは核の分配に影響を与える可能性が考えられる。本研究では、代謝物がKar9の非対称性分布を攪乱させることで核分配に影響を及ぼすことを明らかにした点に意義がある。

研究成果の概要（英文）：Yeast spindle pole bodies (SPBs) are replicated during the G1/S phase transition, and asymmetric localization of Kar9 to old SPBs specifies the orientation of SPBs. In this study, we show that methylglyoxal (MG), a metabolite derived from the glycolytic system, disrupts the asymmetric localization of Kar9 and affects the proper orientation of SPBs. MG activates the DNA damage checkpoint pathway and disrupts asymmetric localization of Kar9 in a Mec1-dependent manner. The DNA-alkylating agent, methyl methanesulfonate, also inhibited asymmetric localization of Kar9. These results suggest that activation of the DNA damage checkpoint pathway disrupts the asymmetric localization of Kar9, which is required for proper SPB positioning.

研究分野：応用微生物学

キーワード：メチルグリオキサール 酵母 核分裂 スピンデル極体 Kar9 DNA損傷チェックポイント

1. 研究開始当初の背景

真核生物である酵母は、細胞周期を通して核膜が消失しない closed mitosis を行う。したがって、酵母の核分裂は、核というオルガネラの分配という視点で捉えることができる。酵母の核膜には微小管形成中心であるスピンドル極体 (SPB) が存在し、細胞周期の G1/S 期に複製される。元からあった SPB (old SPB) には Kar9 というタンパク質が局在し、old SPB の芽への配向を担保し、新たに複製された SPB (new SPB) は母細胞側に配向する。

筆者の研究室では、あらゆる生物種において普遍的に存在する解糖系というグルコースからエネルギーを作り出す過程で生じる代謝物であるメチルグリオキサール (MG) が、酵母の核形態をジェリービーンズのように扁平に変形させることを発見した (Biochem. J. 475:263-2652, 2018)。また、MG 存在下では核分裂が停止し、それに伴って細胞の増殖も停止したが、MG を除くと各形態が球形に復帰するとともに、細胞増殖が再開した。このことは、核形態が核分裂や細胞増殖と密接に関連している可能性を示唆していると考えられた。

2. 研究の目的

筆者の研究室では以前、MG 感受性変異株のスクリーニングから DNA 損傷の修復に関連する変異株を取得している (J. Biol. Chem. 292:15039-15048, 2017)。そこで本研究では、MG による核分裂・核分配の阻害が DNA 損傷に起因するのか、また DNA 損傷が Kar9 の非対称性分布ならびに SPB の配向性に影響を及ぼすことで核分裂・核分配の阻害をもたらすのかについて検討を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) Kar9 と SPB の蛍光顕微鏡観察

Kar9-GFP 株の作成には pRS404KAR9tGFP (J. Cell Biol. 167:231-244, 2004) を用いた。SPB の観察は、Spc29-RFP 株 (Mol. Biol. Cell 17:4069-4079, 2006) ならびに Spc110-DsRed 株 (Sci. Rep. 10:13887, 2020) を用いて行った。

(2) MEC1 遺伝子の破壊

MEC1 遺伝子は必須遺伝子であるが、SML1 遺伝子破壊株のバックグラウンドでは破壊が可能であるので、sml1Δ::his5+株を用いて mec1Δ::URA3 株を構築した。

4. 研究成果

(1) MG は Kar9 の非対称性分布を崩壊させる

MG 処理によって Kar9 の局在性が変化するかどうかを検討した。Kar9 は通常、old SPB 上に局在する (非対称分布)。Spc29-RFP と Kar9-GFP が発現した株で観察すると、Kar9 は芽の方に配向した old SPB 上に観察される (図 1)。ところが、MG で処理した細胞では、Kar9 の old SPB 上での非対称性分布が見られなくなったり、核内で old SPB と new SPB の間のスピンドル上に局在する細胞が観察された (図 1A)。

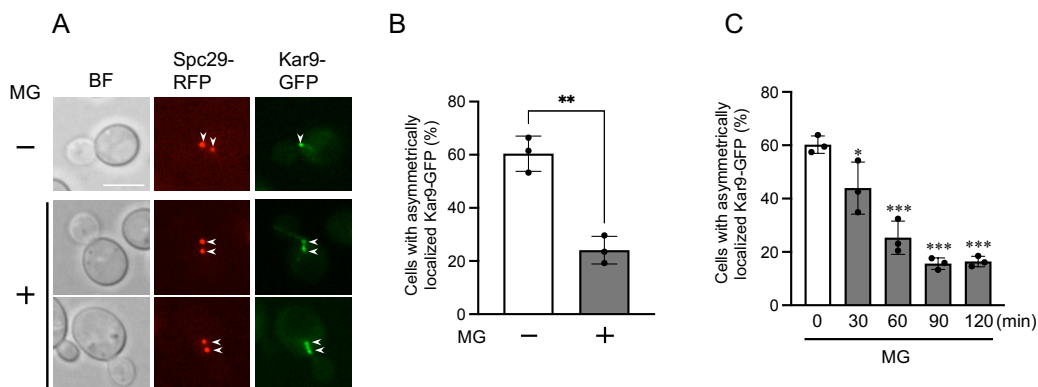


図 1 MG が Kar9 の局在に及ぼす影響

(A) Kar9-GFP ならびに Spc29-RFP を発現する細胞を対数期まで培養し、10 mM MG を添加して 90 分後の局在性を観察した。(B) (A) の条件で MG 処理した細胞を 100 個程度観察して局在性を定量化した (n=3、平均 ± 標準偏差)。(C) 10 mM MG 処理後の Kar9 の非対称性の崩壊を経時的に観察した (n=3、平均 ± 標準偏差)。

Kar9 の非対称分布の割合を定量化した結果、MG で処理しない細胞では約 60% の細胞で非対称性分布が認められるのに対し、MG で処理すると Kar9 が非対称分布している細胞の割合が 20% 程度にまで低下した (図 1B)。また、MG の処理濃度に応じて Kar9 の非対称性分布が崩壊

した (図 1C)。

(2) MG は SPB の配向性を攪乱する

Old SPB が芽へ、new SPB が母細胞側に配向するには Kar9 の非対称性分布が関与する。図 1 で示したように、MG 処理によって Kar9 の非対称性分布が一部崩壊したことから、SPB の old と new の配向性について Spc110 を用いて検討した。Spc110-DsRed を用いて観察すると、old SPB は大きく、new SPB は小さく見えるので区別できる。その結果、MG で処理すると old SPB が母細胞側に配向する細胞が観察された (図 2A)。定量化したところ、通常は約 90% の細胞では old SPB が芽に配向しているのに対し、MG 処理によりその割合が約 70% に低下した (図 2B)。しかしながら、Kar9 を欠損させた細胞では、old SPB と new SPB の配向性はほぼランダム (50%) になったが (図 2B)、MG 処理では 70% 程度にとどまったことから、MG は Kar9 欠損ほどの強い SPB の配向性の乱れは引き起こさないと考えられた。

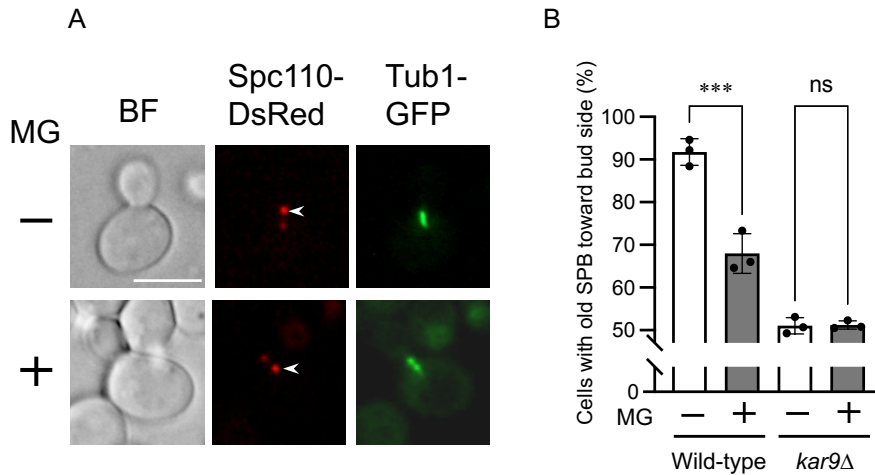


図 2 MG が SPB の配向性に及ぼす影響

(A) Spc110-RsRed (SPB) と Tub1-GFP (スピンドル) を発現させた細胞を対数期まで培養し、10 mM MG で処理して 90 分後の局在を観察した。(B) (A) の条件で MG 処理した細胞を 100 程度観察して SPB の配向性を定量化した (n=3、平均 ± 標準偏差)。

(3) MG は DNA 損傷を引き起こす

筆者の研究室ではこれまでに、DNA 修復に関連する Rad1、Rad50、Rad51 などの欠損株が MG 感受性を示すことを見出している (*J. Biol. Chem.* 292:15039-15048, 2017)。DNA 損傷シグナルは DNA 損傷チェックポイント経路を活性化し、DNA 損傷のセンサーキナーゼである Mec1 や Tel1 により Rad53 がリン酸化される。そこで、MG や DNA アルキル化剤であるメタンсульфон酸メチル (MMS) に対する Mec1 欠損株の感受性を検討した。MEC1 は必須遺伝子であるが、リボヌクレオチドレデクターゼインヒビターをコードする SML1 欠損のバックグラウンドでは MEC1 の破壊が可能である。その結果、mec1Δ株は MG や MMS に対して感受性を示した (図 3A)。また、MG や MMS は Rad53 のリン酸化を Mec1 依存的に誘導した (図 3B、3C)。これらのことから、MG は DNA 損傷を引き起こしている可能性が考えられた。

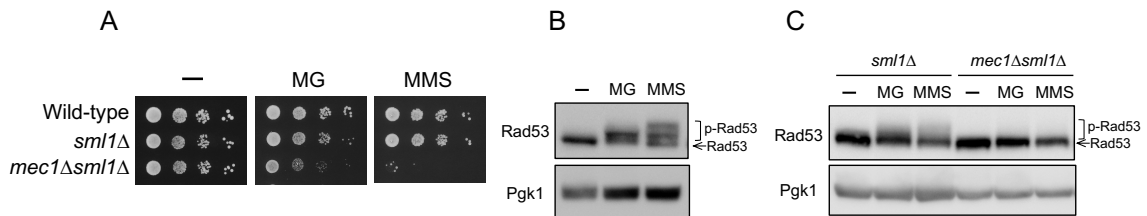


図 3 MG が DNA 損傷に及ぼす影響

(A) 各株を対数期まで培養後、滅菌生理食塩水で希釈し、4 mM MG あるいは 0.01% MMS を含む SD 最小培地に細胞をスポットして 28°C で 3 日間培養した。(B) 対数成育期まで培養した野生株を 10 mM MG、あるいは 0.04% MMS で 60 分間処理し、ウエスタンブロッティングにより Rad53 のリン酸化を観察した。(C) sml1Δならびに sml1Δmec1Δ株を対数期まで培養し、(B) と同様の条件で処理したのちに Rad53 のリン酸化を検討した。

(4) DNA 損傷は Mec1 依存的に Kar9 の非対称性分布に影響する

これまでの解析から、MG は DNA 損傷を引き起こしている可能性が示唆された。MMS は DNA アルキル化剤として DNA 損傷を引き起こすことがすでに明らかとなっている。そこで、もし

DNA 損傷がシグナルとなって Kar9 の非対称性分布の崩壊が引き起こされているとするなら、MMS でも MG と同様に Kar9 の非対称性分布が崩壊することが予想される。検討した結果、MMS 処理によっても MG と同様に Kar9 の非対称性分布が一部、崩壊した (図 4)。またそれは Mec1 に依存していた。すなわち、*mec1*Δ株では野生株と比べ Kar9 の非対称性分布の割合が有意に低下していた (野生株 65%、*mec1*Δ株 40%) が、MG や MMS 処理をしても非対称性分布の更なる崩壊は観察されなかった (図 4)。これらのことから今回、DNA 損傷は Mec1 を介して Kar9 の非対称性分布に影響を与えることが明らかになった。

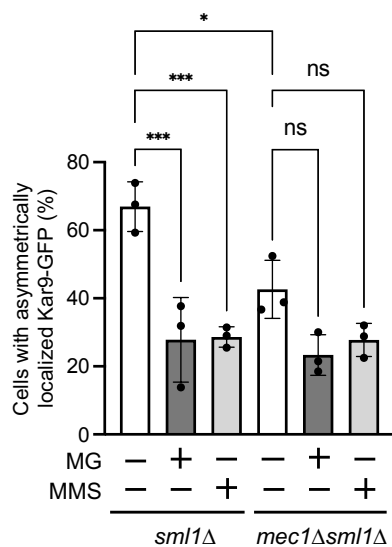


図 4 DNA 損傷が Kar9 の非対称性分布に及ぼす影響

Kar9-GFP ならびに Spc29-RFP を発現する *sml1*Δ および *sml1*Δ*mec1*Δ 株を対数期まで培養し、4 mM MG を添加して 90 分、あるいは 0.01% MMS を添加して 180 分後の Spc29 と Kar9 の局在性を観察した。1 回の実験あたり 100 個程度の細胞を観察して定量化した (n=3、平均 ± 標準偏差)。

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 0件）

1. 著者名 Nomura Wataru, Ng Su-Ping, Takahara Terunao, Maeda Tatsuya, Kawada Teruo, Goto Tsuyoshi, Inoue Yoshiharu	4. 巻 135
2. 論文標題 Roles of phosphatidylserine and phospholipase C in the activation of TOR complex 2 signaling in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Cell Science	6. 最初と最後の頁 jcs259988
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/jcs.259988	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 -

1. 著者名 Ng Su-Ping, Nomura Wataru, Takahashi Haruya, Inoue Kazuo, Kawada Teruo, Goto Tsuyoshi, Inoue Yoshiharu	4. 巻 479
2. 論文標題 Methylglyoxal induces multiple serine phosphorylation in insulin receptor substrate 1 via the TAK1-p38-mTORC1 signaling axis in adipocytes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical Journal	6. 最初と最後の頁 2279 ~ 2296
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1042/BCJ20220271	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 -

1. 著者名 Hayashida Momoko, Nomura Wataru, Shiojiri Atsusi, Inoue Yoshiharu	4. 巻 685
2. 論文標題 Activation of the DNA damage checkpoint perturbs asymmetric localization of Kar9 to spindle pole bodies in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochemical Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 149157
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2023.149157	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4件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 井上善晴
2. 発表標題 酵母における染色体分配阻害と核形態変化に及ぼす糖代謝関連毒物の影響
3. 学会等名 日本毒性学会学術年会（シンポジウム）（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 ン・スービン、野村 亘、高橋春弥、井上和生、後藤 剛、河田照雄、井上善晴
2. 発表標題 Methylglyoxal induces insulin resistance in adipocytes via the TAK1-p38-mTORC1 signaling axis
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田井聖人、野村 亘、池田佳代、井上善晴
2. 発表標題 Saccharomyces cerevisiaeのメチルグリオキサール代謝におけるSfa1の役割
3. 学会等名 日本農芸化学会2023年度大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 林田ももこ、野村 亘、井上善晴
2. 発表標題 メチルグリオキサールはDNA損傷チェックポイントを介して出芽酵母のスピンデル極体におけるKar9の非対称性分布を崩壊させる
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
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
---------	---------