

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：63904

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K15110

研究課題名（和文）固体化した細胞質をもつ休眠細胞からの復帰機構の解明

研究課題名（英文）Analysis of the mechanism underlying dormancy breaking of solid cytoplasm

研究代表者

後藤 祐平（Goto, Yuhei）

基礎生物学研究所・定量生物学研究部門・助教

研究者番号：50814620

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：細胞内の生化学反応はこれまで流動的な細胞質を想定して議論されてきた。しかし、細胞質の物性はストレス応答などにより固体に近い状態まで流動性を失うこともある。そのような固い細胞質でシグナル伝達がどのように行われているのかは未だ分かっていない。本研究では、分裂酵母の休眠期脱出をモデルとして、固体化した細胞質がどのように環境応答し休眠状態を脱しているのかの分子機構解明を目指した。本研究の成果として、休眠細胞の細胞質物性制御における新しい分子機構を見出した。休眠細胞が活動を再開させるための一番早い段階で、細胞質流動性の制御が必要であり、また、その細胞質流動性を担う分子実態を明らかにすることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、近年着目され始めてきた細胞質の物理化学的特性、とくに細胞質の流動性に注目して、その分子機構と生理学的意義を明らかにすることを試みた。その結果、細胞質流動性の制御が細胞休眠からの復帰に重要な役割を果たしていることを発見し、試験管内での生化学反応だけでは規定できない細胞内でのシグナル伝達制御の一端を明らかにすることができた。休眠は病原微生物や、がん幹細胞などが薬剤耐性を起こす原因の一つでもあり、その分子機構の解明や、細胞質流動性的人為的操作手法の開発は、これらの薬剤耐性に対する効果的な対処法を生み出す基盤となりうる。

研究成果の概要（英文）：Intracellular biochemical reactions have so far been discussed assuming a fluid cytoplasm. However, cytoplasm lose its fluidity to a near-solid state in response to stress. It is still unknown how signal transduction takes place in such solid cytoplasm. Using the dormancy breaking of fission yeast spore as a model, we aimed to elucidate the molecular mechanisms of how the solidified cytoplasm responds to its environment and emerges from dormancy. As a result of this study, we found a novel molecular mechanism regulating cytoplasmic fluidity, which is required for dormancy breaking.

研究分野：細胞生物学

キーワード：休眠 細胞質流動性 分裂酵母 トレハロース PKA シグナル伝達 定量イメージング

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞内容物の物性は細胞内生化学反応に大きな影響を与える。栄養飢餓などのストレスを受けると細胞内生化学反応を抑制して細胞増殖を停止、ストレス耐性を得ることが知られている。この時、細胞質の流動性が著しく失われることが近年になって定量的に調べられてきた(Matthias et al., 2016, eLife)。しかし、外部からの栄養刺激によって細胞は再び増殖を開始する。通常の細胞内シグナル伝達は流動的な細胞質での物質拡散を前提としており、固体化した細胞質で増殖再開シグナルがどのように伝達されているのかはほとんど分かっていない。固体化した細胞質では拡散律速の生化学反応速度低下や、逆に、排除体積効果による生化学反応の亢進などにより細胞全体への影響は容易には予想できない。

また、細胞質の固体化度合いの強さはストレス耐性には有利に働く一方、増殖再開には不利に働くと考えられる。しかし、細胞質固体化度合いによるストレス耐性と増殖再開能のトレードオフはこれまでにほとんど議論されていない。

2. 研究の目的

固体化した細胞質での増殖再開シグナルを担う分子は分かっていない。そこで、休眠状態から復帰特異的に必要な因子をスクリーニングし、それらの因子の分子機構解明を第一の目的とする。また二つ目の目的として、細胞質固体化を任意に操作できる制御系の開発を目指す。細胞質固体化度合いの定量的な操作により、ストレス応答と増殖再開能を構成的に理解することを目的とする。本研究で具体的には、「分裂酵母胞子の発芽(休眠打破)」を固体化した細胞質からの復帰モデルシステムとして以下の目的の遂行を目指す。

- (1) 休眠打破特異的 TN-seq(Transposon sequence)による、固体化細胞質での増殖再開シグナル伝達に必須な因子のスクリーニングを行う。
- (2) 細胞質固体化を操作することで、ストレス応答と増殖再開のトレードオフにおける閾値決定機構の解明を目指す。

3. 研究の方法

(1) 固体化細胞質での休眠増殖再開シグナル伝達必須因子のスクリーニング

休眠からの復帰に必要な遺伝子の特異的なスクリーニングはこれまで困難であったので、本研究では、休眠復帰特異的な遺伝学的スクリーニングの手法「休眠打破特異的 TN-seq (Transposon sequence)」を新たに提案する。このスクリーニング手法は、時期特異的プロモーターによる胞子形成後のトランスポゼースの発現、トランスポゾン挿入によるランダム変異導入、その後の次世代シーケンサーによる変異部位の同定と栄養増殖期の細胞との比較により行われる。この手法の最大の利点は、分裂酵母が休眠に至るまでの複数のプロセス(増殖停止、接合、減数分裂、胞子形成)に影響を与えず、胞子からの増殖再開の際に必要な遺伝子のみを探索できることである。また、スクリーニングに使用した時期特異的プロモーターにより Cre リコンビナーゼや dCas9 を発現させることで、スクリーニングによって得られた候補遺伝子の時期特異的ノックアウトやノックダウンを行い、休眠から復帰する際のそれらの候補遺伝子の機能を調べる。ノックアウト、過剰発現、局在解析を通して候補遺伝子の機能を明らかにする。また、休眠に必要な遺伝子の報告はこれまでに幾つか存在するが、それらが休眠の導入、維持、脱出のどの段階に必要なかはわかっておらず、細胞質固体化の制御に直接関与している因子がある可能性がある。そのため、それらの遺伝子のノックアウトにより細胞質固体化制御に異常が出るものを探す candidate screening も行う。

それらの候補遺伝子が哺乳類まで進化的に保存されたものであった場合、ヒト培養細胞において、増殖因子や栄養などの枯渇による細胞周期停止からの再開にそれらの因子が必須であるかを CRISPR/Cas9 によるノックアウトを用いて調べる。

(2) 細胞質固体化人為操作手法の開発

細胞質固体化後の増殖再開を構成的に理解するためには、可逆性の高い細胞質固体化手法が必要である。細胞質固体化に関わる3つの細胞内状態変化(pH, ATP, 水)を可逆的に操作するために、以下の3種類手法を開発し、最も性能のよかったものをその後の解析に用いる。

細胞内 pH の可逆的操作 (Opto-Proton Pump)

細胞内 pH 低下は効率よく細胞質の流動性を下げることが出芽酵母および分裂酵母で明らかにされている(Matthias et al., eLife, 2016)。通常酵母細胞ではプロトン輸送性 ATPase の Pma1 などにより細胞外へとプロトンを排出することで pH が維持されている。そこで、Pma1 を光により制御する Opto-Proton Pump を開発する。Pma1 は 10 個の膜貫通ドメインを持ち、細胞質側の C 末端には自己抑制活性を有す R ドメインを持つことが知られている(Werner et al., Science,

2002)。そこで、Pma1 の自己抑制 R ドメインの近傍に、青色光により構造変化する LOV (Light Oxygen Voltage) ドメインを挿入し、光依存的に Pma1 の活性が抑制される変異体を作製する。Pma1 の機能は生存に必須であることから、LOV 周辺のリンカーにランダム変異を導入し、光依存的に細胞増殖できなくなるクローンを取得する。

ATP 量の可逆的操作 (Opto-解糖系 Trap)

酵母の ATP 産生は解糖系がメインである (Takaine et al., JCS, 2019)。そこで、解糖系の必須因子であるピルビン酸キナーゼとホスホフルクトキナーゼを光によりトラップし不活性化するシステムを考案する。光受容タンパク質である PhyB に多量体化ドメインである MP、酵母内在性のピルビン酸キナーゼやホスホフルクトキナーゼに PhyB と光依存的に結合する PIF を融合させ、光依存的にそれらの酵素をトラップし反応場から隔離する。細胞内 ATP 量は ATP 蛍光センサー QUEEN によりモニターする。

細胞質脱水の可逆的操作

細胞外液の浸透圧を上げることで細胞から脱水することは比較的容易である。しかし、細胞は高浸透圧に対してグリセロール合成の亢進などにより適応を見せるため、任意の脱水状態を調整・維持することは困難である。そこで、グリセロール合成の最終ステップに必要なグリセロール-3-リン酸ホスファターゼのノックアウトの株を使用する。微小流体デバイスにより細胞外液の浸透圧を変化させ、細胞内水分を定量的に脱水する。

自己会合するナノスケール粒子 (Delarue et al., 2018, Cell) のイメージングによるマイクロレオロジー解析により、細胞質固体化を定量的に測定し、これら 3 手法のうち効率よく定量的に細胞質固体化を引き起こせる条件を探索する。

定量的に誘導した固体化状態の細胞質を持つ細胞に各種ストレス (DNA 損傷、UV 照射、物理刺激) を与えた後の生存率、また、非ストレス下で細胞質固体化を解除した時の増殖再開能を網羅的に調べ、細胞質固体化とストレス応答のトレードオフの閾値を調べる。また、スクリーニングした候補遺伝子や、既知のストレス応答遺伝子の破壊株でこの閾値がどのように変化するかを調べ、閾値決定の分子機構に迫る。

4. 研究成果

(1) 固体化細胞質での休眠増殖再開シグナル伝達必須因子のスクリーニング

当初予定していた TN-seq を用いたスクリーニングは、実験系の立ち上げまで行うことができたので、今後この系を用いてスクリーニングを行なっていく。Candidate screening では細胞質固体化制御に関わる因子を単離することができた。休眠状態の分裂酵母の胞子では、細胞質の流動性が失われていることを本研究及び所属研究室での最近の研究から明らかにしてきた。この失われた流動性は、休眠脱出シグナルを受け取ると即座に回復することから、このシグナル伝達の下流で細胞質の流動性を制御している因子の存在が考えられた。このアイデアと合致する様に、休眠脱出シグナルを司る cAMP-PKA 経路の因子のノックアウトでは、細胞質流動性は回復しなかった。cAMP-PKA 経路の下流で細胞質流動性の制御を行っている因子を探索したところ、トレハロースの分解酵素のノックアウトにより細胞質流動性の回復が不全となることがわかった。それに続く、遺伝学的解析や生化学的な解析により、分裂酵母休眠胞子ではトレハロースの蓄積により細胞質流動性が低下 (=細胞質固体化) しており、休眠脱出シグナルを細胞が受け取ると、cAMP-PKA 経路を介してトレハロース分解酵素が活性化することで、細胞質流動性が回復するというモデルを提唱する。

(2) 細胞質固体化人為操作手法の開発

本研究では、光遺伝学をベースにした細胞質固体化の人為的操作手法の開発を試みた。開発の前段階として、分裂酵母で使用可能な光遺伝学ツールはほとんど報告されていなかったためにその基盤整備をした。青色光で使用可能な光遺伝学ツールである、Cry2-C1B, iLiD-sspB, BcLOV4などを分裂酵母に導入することに成功し、タンパク質二量体化制御、局在制御などを行うことができるようになった。また、緑色蛍光タンパク質のイメージングと同時に光操作を行うために、青色光での光操作系の開発も行った。以前我々が報告した SynPCB システムを用いることで、PhyB-PIF などの赤色光遺伝学ツールを分裂酵母に導入することに成功した。

本研究によりこれらの光遺伝学ツールを分裂酵母で使用する基盤を整えることができたため、今後は申請時に提案した細胞質固体化制御ツールの開発を進めていく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 1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 Sakai Keiichiro, Kondo Yohei, Goto Yuhei, Aoki Kazuhiro	4. 巻 -
2. 論文標題 Cytoplasmic fluidization triggers breaking spore dormancy in fission yeast	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/2023.09.27.559686	査読の有無 無
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 Sakai Keiichiro, Aoki Kazuhiro, Goto Yuhei	4. 巻 41
2. 論文標題 Live cell fluorescence imaging and optogenetic control of PKA kinase activity in fission yeast Schizosaccharomyces pombe	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Yeast	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/yea.3937	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 Sakai Keiichiro, Kondo Yohei, Goto Yuhei, Aoki Kazuhiro	4. 巻 -
2. 論文標題 Cytoplasmic fluidization triggers breaking spore dormancy in fission yeast	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 bioRxiv	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） 10.1101/2023.09.27.559686	査読の有無 無
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12件（うち招待講演 0件/うち国際学会 5件）

1. 発表者名 酒井啓一郎, 後藤祐平, 近藤洋平, 青木一洋
2. 発表標題 蛍光性ナノ粒子を用いた休眠細胞内の細胞質流動性の可視化
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 トレハロース分解に伴う分裂酵母胞子の細胞質の流動化
2. 発表標題 酒井啓一郎, 後藤祐平, 近藤洋平, 青木一洋
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム第56回研究報告会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 酒井 啓一郎, 後藤 祐平, 近藤 洋平, 青木 一洋
2. 発表標題 トレハロース分解による細胞質流動化が酵母胞子の増殖再開を駆動する
3. 学会等名 第75回 日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yuhei Goto, Keiichiro Sakai, Kazuhiro Aoki
2. 発表標題 Efficient biosynthesis of linear tetrapyrroles enables Phytochrome-based near-infrared imaging and red optogenetics 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

1. 発表者名 Keiichiro Sakai, Yuhei Goto, Yohei Kondo, Kazuhiro Aoki
2. 発表標題 Cytoplasmic fluidization via trehalose degradation promotes spore germination 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

1. 発表者名 Keiichiro Sakai, Yuhei Goto, Yohei Kondo, Kazuhiro Aoki
2. 発表標題 Trehalose-mediated structural barrier regulates cytoplasmic fluidity in fission yeast spore
3. 学会等名 RIKEN BDR Symposium
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Keiichiro Sakai, Yuhei Goto, Yohei Kondo, Kazuhiro Aoki
2. 発表標題 Regulation of cytoplasmic fluidity and its role during dormancy breaking in fission yeast spore
3. 学会等名 10th Annual Winter q-Bio conference (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yuhei Goto, Hironori Sugiyama, Yohei Kondo, Kazuhiro Aoki
2. 発表標題 Quantitative visualization and manipulation of CDK activity in fission yeast cell cycle
3. 学会等名 10th Annual Winter q-Bio conference (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 酒井 啓一郎, 後藤 祐平, 近藤 洋平, 青木 一洋
2. 発表標題 トレハロースによる酵母胞子内の細胞質流動性の可逆的な制御
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 酒井啓一郎, 後藤祐平, 近藤洋平, 青木一洋
2. 発表標題 酵母胞子の形成・復帰過程における分子混雑の可逆的な制御
3. 学会等名 第60回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Keiichiro Sakai, Yuhei Goto, Yohei Kondo, Kazuhiro Aoki
2. 発表標題 Regulation of germination initiation by nutrient sensing pathway in fission yeast spores
3. 学会等名 BRITISH YEAST GROUP 2022: FROM GENOMES TO CELLS (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 酒井 啓一郎, 後藤 祐平, 青木 一洋
2. 発表標題 cAMP/PKA経路依存的な分裂酵母胞子の固体化の解消
3. 学会等名 第74回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2022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
---------	---------