

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：34315

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2016

課題番号：25850246

研究課題名(和文)酵母の液胞内糖質のリサイクル機構と生理機能の解明～ヒト代謝疾患治療への基盤構築～

研究課題名(英文)Analyses of recycling mechanism and function of vacuolar carbohydrate in yeast

研究代表者

梅川 碧里 (Umekawa, Midori)

立命館大学・生命科学部・助教

研究者番号：60633097

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)：出芽酵母の液胞内での糖質分解の機構とその生理的意義を明らかにするために、本研究ではまず、液胞内糖鎖の代謝分解を担うAms1酵素の栄養シグナルに応じた制御機構を明らかにした。その結果、Ams1酵素は転写レベル及び翻訳後レベルで栄養飢餓に応じて強く誘導されることを明らかにした。栄養豊富な条件ではTORキナーゼ複合体により強く抑制されているが、栄養源が枯渇すると、TORキナーゼ複合体による抑制が解除され、ストレス応答性転写因子により転写誘導されるとともに、液胞内でプロテアーゼ依存的なプロセッシングを受けることで翻訳後レベルでも活性化されることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the recycling mechanism and function of vacuolar carbohydrate in yeast, I focused on regulatory mechanism of Ams1 enzyme respond to nutrition. As a result, it was found that this enzyme was strongly upregulated respond to starvation at both transcription level and post-translational level. It was also revealed that this enzyme was tightly suppressed by TORC1 in nutrient rich condition, but induced by a stress-induced transcriptional factor and by protease dependent processing in the vacuoles. These results suggested that yeast may recycle degradation product of intracellular mannose in the vacuole especially in starved condition.

研究分野：細胞生物学

キーワード：nutrition sensing carbohydrate metabolism

1. 研究開始当初の背景

細胞内不要物質の分解除去を担うのはリソソームであり、酵母や植物では液胞がこれに相当する。出芽酵母において発見された「オートファジー」は、不要となったタンパク質やオルガネラ等のさまざまな細胞内成分を液胞へ運び込み、分解へと導く主要な経路であり、酵母からヒトに至る全ての真核生物に共通な生命維持に必須の細胞内浄化機構である。オートファジーは、アミノ酸などの栄養源が枯渇した時に誘導され強く活性化されることから、単なる細胞内浄化機構ではなく、栄養飢餓時に細胞内自己成分を積極的に分解することによって、生命維持に最低限必要な栄養源を供給する「細胞内不要物質のリサイクルシステム」としての生理機能をも担うと考えられている。最近では、オートファジーの不全が糖尿病やリソソーム病などの代謝不全症と関連することを示唆した報告が増えているがメカニズムは全くわかっておらず、未解明な「オートファジーの細胞内生理機能」を分子レベルで解明することが必要であり、重要課題となっている。

2. 研究の目的

細胞内で不要となったタンパク質やオルガネラなどのさまざまな物質は、細胞内消化器官であるリソソーム(酵母では液胞)に輸送され、分解される。リソソーム(液胞)で生じた分解産物は細胞質に供給され細胞内でリサイクルされると考えられているが、そのメカニズムは明らかでない。本研究では、モデル生物である出芽酵母の液胞における細胞内物質のリサイクル機序を分子レベルで解明することによって、ヒトのリソソーム病などの疾病の治療に応用する基盤を構築することを目的とする。

3. 研究の方法

出芽酵母の液胞内での糖質分解の機構とその生理的意義を明らかにすることを目的として以下の方法で研究を行った。

(1) Ams1 の活性制御機構の解明

液胞内糖鎖の代謝分解を担う Ams1 酵素の栄養シグナルに応じた制御機構を明らかにすることとした。

出芽酵母を異なる栄養条件下で培養し、Ams1 の活性変動を解析した。また、栄養応答に関わる主要な制御因子である TOR キナーゼ経路や Protein kinase A 経路の関与について調べた。

Ams1 の制御栄養シグナルに応じたマンノシド糖鎖の代謝に関わる新規の分子を同定し、細胞内分子メカニズムを明らかにすることを試みた。関連分子の探索は、種々の出芽酵母遺伝子欠損株を用いて、細胞内の Ams1 活性の変動を指標として解析

した。

(2) 出芽酵母の液胞内での糖鎖分解の機序の解明

出芽酵母の細胞内の糖鎖構造は解析されているが、実際に液胞内にどのような構造の糖鎖がどれくらい存在するかについては明らかでない。研究成果(1)により、細胞内マンノシド糖鎖の代謝分解を担う Ams1 酵素は栄養飢餓時に液胞で強く活性化されることが示唆されたが、酵素の基質となる糖鎖が栄養飢餓時に量的・構造的にどう変化するのかは判っていない。そこで、異なる栄養条件下で培養した出芽酵母の液胞を単離し、液胞内の糖鎖の定性的・定量的解析を行った。

4. 研究成果

(1) - 出芽酵母を異なる栄養条件下で培養し、無細胞抽出画分中のマンノシド分解活性の変動を定量した。また、種々の遺伝子欠損株を作製し、Ams1 の酵素活性やタンパク質の発現量、遺伝子の転写量などを解析した。その結果、Ams1 酵素は転写レベル及び翻訳後レベルで栄養飢餓に応じて強く誘導されることを明らかにした。栄養豊富な条件下では TOR キナーゼ複合体により強く抑制されているが、栄養源が枯渇すると、TOR キナーゼ複合体による抑制が解除され、ストレス応答性転写因子 Msn2/4 により転写誘導されるとともに、液胞内でプロテアーゼ依存的なプロセッシングを受けることで翻訳後レベルでも活性化されることが判った(図1)。これらの結果から、出芽酵母は栄養飢餓時に細胞内のマンノシド糖鎖を積極的に代謝し、利用している可能性が示唆された。すなわち本研究によって、オートファジーを介した液胞における糖質分解の重要性を実験的に示す重要な知見が得られた。

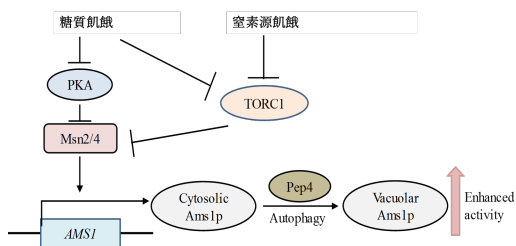


図1 Ams1 の活性制御機構

(1) -

さまざまな出芽酵母の遺伝子欠損株を異なる栄養条件下で培養し、Ams1 の活性の変動を解析した。その結果、細胞表面に存在することが報告されている機能未知の分子の遺伝子欠損株において、栄養条件下における Ams1 の活性が著しく上昇していることを見出した。本遺伝子欠損株では、富栄養条件下における細胞増殖が遅延していた。そして、栄養飢餓時に誘導されるオートファジーが

富栄養条件下においても誘導されていたことから、本遺伝子欠損によって細胞が富栄養条件下においても飢餓状態にシフトしていることが示唆された。すなわち、本遺伝子は細胞表層で細胞外の栄養シグナルを細胞内に伝達する機能を担っていることが示唆された。グルコースのアナログの取り込み効率を解析した結果、本遺伝子欠損株においては、取り込み効率が顕著に低下しており、細胞内のATPレベルも野生株と比較して著しく低下していたことから、細胞外のグルコースの効率的な取り込みに関与し、TORキナーゼ経路を活性化する役割を担うことが示唆された。本研究によって、未解明な糖質シグナルに応じたTORキナーゼ経路の活性化機構の一端を明らかにすることが出来た。引き続き本遺伝子の分子機能について詳細に明らかにしていく。

(2) 出芽酵母の液胞内糖鎖の定性的・定量的解析を行うため、まず液胞の単離方法の確立を試みた。酵母の液胞単離に習熟している京都大学・奥博士及び東京大学・鈴木博士の助力を得ながら行った。細胞質、小胞体、液胞に局在するマーカータンパク質の移行を指標として、フィコールを用いた密度勾配遠心により試みた。その結果、糖鎖を多く含む細胞質画分及び小胞体画分を分離して液胞画分を精製することができた。精製した液胞画分を用いて糖鎖の定量的・定性的分析を行ったところ、高分子量の糖鎖が栄養飢餓時に蓄積することを示唆する予備データが得られた。今後引き続き、詳細な解析を行う。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 4 件)

Umekawa M* (責任著者), Ujihara M, Makishima K, Yamamoto S, Takematsu H, Wakayama M

“The signaling pathways underlying starvation-induced upregulation of α -mannosidase Ams1 in *Saccharomyces cerevisiae*.” *Biochim Biophys Acta*. 1860(6):1192-1201 (2016)

DOI: 10.1016/j.bbagen.2016.02.018.

(査読付原著論文)

Klionsky DJ, Umekawa M *et al.* (全 2467 名、応募者 2144 番目) “Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. (3rd edition)” *Autophagy* 12(1):1-222 (2016)

DOI: 10.1080/15548627.2015.1100356.

(査読付総説論文)

[学会発表](計 8 件)

○梅川碧里、氏原将人、中井大貴、若山守「出芽酵母の栄養応答に関わる新規細胞表層タンパク質の機能解析」日本農芸化学会 2017 年度大会、2017 年 3 月 19 日、京都女子大学(京都府京都市)(口頭発表、査読無)

○梅川碧里、氏原将人、槇島一樹、竹松弘、若山守「出芽酵母は栄養飢餓時に α -マンノシダーゼ Ams1 を誘導する」第 89 回日本生化学会大会、2016 年 9 月 26 日、仙台国際センター(宮城県仙台市)(口頭発表・査読有)

Umekawa M, Ujihara M, Makishima K, Yamamoto S, Takematsu H, Wakayama M. “Nutrient starvation induces α -mannosidase Ams1 in *Saccharomyces cerevisiae*” The Allied Genetics Conference 2016 2016 年 7 月 15 日、フロリダ(アメリカ合衆国)(ポスター発表)

梅川碧里、氏原将人、槇島一樹、竹松弘、若山守「出芽酵母の α -マンノシダーゼ Ams1 の細胞内活性制御」第 17 回関西グライコサイエンスフォーラム、2016 年 5 月 14 日、大阪市立大学(大阪府大阪市)(口頭発表・査読有)

○氏原将人、槇島一樹、山本祥平、若山守、梅川碧里「出芽酵母の α -マンノシダーゼ Ams1 の発現制御機構の解析」第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会合同大会、2015 年 12 月 2 日、神戸ポートアイランド(兵庫県明石市)(ポスター発表、査読無)

○梅川碧里、氏原将人、槇島一樹、山本祥平、若山守「出芽酵母 α -マンノシダーゼ Ams1 の活性制御機構の解析」酵母遺伝学フォーラム第 48 回研究報告会、2015 年 9 月 2 日、広島大学(広島県東広島市)(ポスター発表・査読無)

○梅川碧里、槇島一樹、氏原将人、山本祥平、若山守「出芽酵母 α -マンノシダーゼ Ams1 の活性制御機構の解析」日本生化学会第 62 回近畿支部例会、2015 年 5 月 16 日、立命館大学(滋賀県草津市)(口頭発表・査読有)

梅川碧里「出芽酵母のオートファジー制御に関わる Ksp1 キナーゼの解析」第 77 回酵母研究会講演会 2014 年 3 月 11 日、京都テルサ(京都府京都市) 招待講演

[図書](計 1 件)

梅川碧里、芦田久、山本憲二「糖鎖の新機能開発・応用ハンドブック～創薬・医療から食品開発まで～」総ページ数 678 頁 担当部分: 第 3 章第 8 節酵素合成 V: エンド型グリコシダーゼを利用した糖鎖合成 エヌ・ティ

一・エス出版 405-407 頁 (2015 年)

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

梅川 碧里 (UMEKAWA, Midori)
立命館大学・生命科学部・助教
研究者番号 : 60633097