

【2019 年度杉山産業化学研究所研究助成報告書】

三重大学大学院生物資源学研究科 梅川碧里

研究題目：「パン酵母の栄養ストレス応答に関わる新たな因子の同定とその機能解明」

本研究は、産業微生物であるパン酵母 *Saccharomyces cerevisiae* (以下、酵母)が、環境中の栄養条件の変化に応答して細胞内代謝経路を制御調節する仕組みを解明することを目的として行った。パン酵母の糖質応答や代謝の仕組みはグルコースが過剰に存在する条件で解明が進められてきたが、炭素源ストレス応答の仕組みに関する知見は乏しい。また、真核生物の栄養応答に重要な TOR キナーゼがどのように炭素源ストレス応答に関わるのかについても未解明である。そこで、本研究においては、酵母を用いて炭素源飢餓ストレス応答に関わる新たなタンパク質を同定し、同定したタンパク質の細胞内代謝と細胞の生命維持における役割を明らかにすることを試みた。

報告者は先行研究において、酵母が炭素源飢餓ストレスにさらされると、細胞内の高マンノシル糖鎖の代謝分解を担うマンノシダーゼ酵素の細胞内活性が著しく上昇することを見出すとともに、当該酵素は、栄養応答に重要な TOR キナーゼの不活化によって誘導されることを明らかにした[1]。そこで報告者は、マンノシダーゼ酵素の細胞内活性を簡易的に定量する手法を樹立し、炭素源飢餓条件においてもマンノシダーゼ酵素が活性化しない一遺伝子欠損株をノックアウトコレクションからスクリーニングすることにより、炭素源飢餓応答に関わる新たなタンパク質を見出すことを試みた。キナーゼ、フォスファターゼおよびその捕因子を含む約 500 の遺伝子欠損株についてスクリーニング解析を行った結果、サイクリンの一つである Clb4 の遺伝子欠損株において、炭素源飢餓に応じたマンノシダーゼ活性が殆ど上昇しないことが見いだされた(図 1)。同様の結果は、遺伝子型の異なる 2 種類の実験室酵母株について新たに作製した Clb4 の欠損株においても確認できた。報告者は先行研究において、野生株では、マンノシダーゼの細胞内活性は炭素源の枯渇のみならずアミノ酸の枯渇によっても著しく上昇する

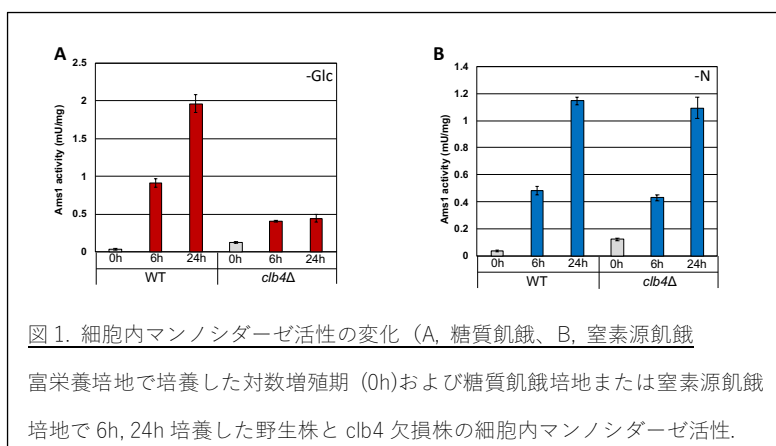


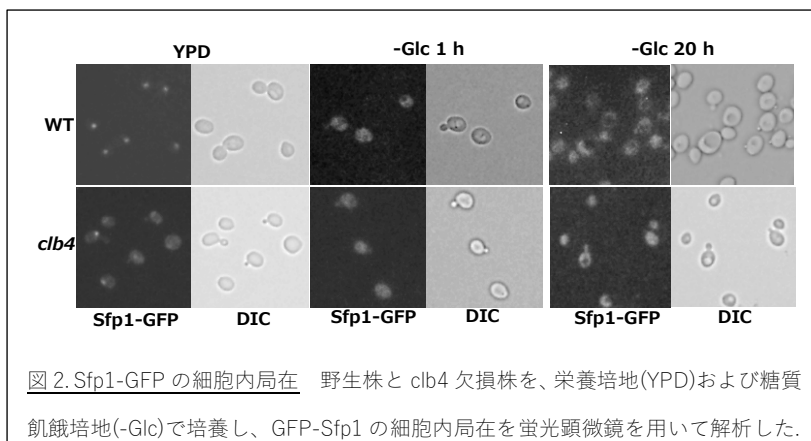
図 1. 細胞内マンノシダーゼ活性の変化 (A, 糖質飢餓、B, 窒素源飢餓)

富栄養培地で培養した対数増殖期 (0h)および糖質飢餓培地または窒素源飢餓培地で 6h, 24h 培養した野生株と clb4 欠損株の細胞内マンノシダーゼ活性.

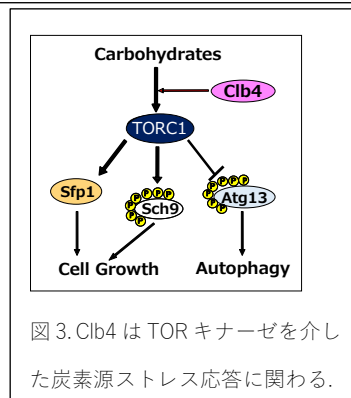
ことを明らかにしている。Clb4 の欠損株では、炭素源飢餓条件におけるマンノシダーゼ活性の上昇は損なわれたが、アミノ酸飢餓条件におけるマンノシダーゼ活性は野生株と同程度まで上昇したことから、Clb4 は炭素源

飢餓に特異的に応答して細胞内代謝経路の制御に関わることが示唆された(図1)。さらに、Clb4 以外の他のサイクリンの欠損株においては、糖質飢餓条件におけるマンノシダーゼ活性の上昇は損なわれなかったことから、Clb4 は他のサイクリンとは異なり、糖質飢餓に応じた細胞内代謝経路制御に不可欠の役割を持つことがわかった。また、Clb4 の欠損株では、マンノシダーゼ酵素を制御する TOR キナーゼの活性が、糖質の有無に関わらず亢進しており、制御不全が生じていることを示唆する結果が得られた。次に、TOR キナーゼの下流で制御されており、炭素源に応じて細胞周期の G2/M 期移行を制御する転写因子 Sfp1 の核局在について顕微鏡を用いて解析した。その結果、Clb4 の欠損株では、野生株と異なり、糖質の有無に関わらず Sfp1 が細胞質に分散していた(図2)。Clb4 の欠損株の富栄養条件における細胞増殖は野生株と同程度であったが、糖質飢餓条件における経時寿命が野生株と比較して著しく低下した。

以上の結果から、Clb4 が酵母の炭素源飢餓応答に重要な新たなタンパク質であることが見いだされた。そして、Clb4 は炭素源飢餓に応じた TOR キナーゼおよびその下流の転写因子を介して細胞内代謝経路と細胞周期を制御する役割を有するこ



とが示唆された(図3)。上述の成果は、FEBS letters 誌に掲載され、当該号の Highlight article に選抜された[3]。本研究で得られた成果を手がかりとし、未解明な酵母の炭素源飢餓ストレス応答の仕組みの解明に引き続き取り組んでいきたい。



<文献>

- [1] Umekawa et al., "The signaling pathways underlying starvation-induced upregulation of α -mannosidase Ams1 in *Saccharomyces cerevisiae*." Biochim Biophys Acta. 1860:1192-1201 (2016)
- [2] Umekawa et al., "Ecm33 is a novel factor involved in efficient glucose uptake for nutrition-responsive TORC1 signaling in yeast." FEBS Lett. 591:3721-3729 (2017)
- [3] Umekawa et al., "Mitotic cyclin Clb4 is required for the intracellular adaptation to glucose starvation in *Saccharomyces cerevisiae*" FEBS Lett. 594: 1329-1338 (2020)