

令和 4 年 5 月 13 日現在

機関番号：14101

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K15806

研究課題名(和文) 酵母における構造的糖質の細胞内代謝分解の仕組みとその意義

研究課題名(英文) Analyses of mechanism and physiological role of structural glycan degradation in yeast

研究代表者

梅川 碧里 (Umekawa, Midori)

三重大学・生物資源学研究所・准教授

研究者番号：60633097

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、出芽酵母において、糖タンパク質や細胞壁を構築する構造的糖質(非貯蔵性糖質)が細胞内で分解され代謝される分子機構およびその生理的意義の解明を目的として行った。そして、サイクリンの一つとして知られるCib4が糖質飢餓ストレスの応答に関与することおよびその分子経路を明らかにした [FEBS Lett (2019)]。また、出芽酵母の新規ヘキソキナーゼ酵素Emi2を同定し、グルコース飢餓ストレス条件において高発現することを明らかにした [J Appl Glycosci (2020)]。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖質は細胞の構築成分であるとともにエネルギー源として不可欠であるため、その代謝分解の分子メカニズムを細胞レベルで解明していくことはライフサイエンスの分野における重要課題の一つであり、本研究結果により当該分子メカニズムの一端が明らかとなった。また、本研究により得られた知見は、人類の食生活に不可欠の産業酵母である出芽酵母の代謝発酵のメカニズムの解明にも結びつくものであるため、学術的にも社会的にも意義があると考えている。

研究成果の概要(英文)：This study was carried out to clarify the mechanism and physiological roles of structural glycan degradation in yeast. As a result, we revealed that a cyclin Cib4 involves in starvation response and clarify the molecular mechanism [FEBS Lett (2019)]. In addition, we identified Emis as a novel hexokinase in yeast [J Appl Glycosci (2020)].

研究分野：応用分子細胞生物学

キーワード：酵母 栄養応答 代謝制御

## 1. 研究開始当初の背景

糖質は、ATP の生合成や、細胞壁や糖タンパク質などの構造的糖質を構築する主要な栄養素であり、その代謝分解および制御調節は細胞機能の恒常性維持に重要不可欠であると考えられるが、その分子メカニズムは未解明である。申請者は、細胞外環境に応じて細胞増殖を決定する真核モデル微生物である出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) を用いて、糖質及び糖質飢餓に対する細胞応答のメカニズム解明に取り組んできた。先行研究において、出芽酵母の主要な構造的糖質である高マンノシル糖鎖を単糖のマンノースまで分解する主要な細胞内マンノシダーゼ酵素が、栄養増殖時にはほとんど発現しないが、糖質飢餓時において高発現し活発化されることを明らかにしており[Biochem Biophys Acta (2016)]、当該糖鎖の分解は糖質飢餓時に重要な生理的役割を持つことが示唆された。出芽酵母は細胞内外において、マンノースに富む高マンノシル糖鎖を多数有しており、糖質飢餓条件において代謝分解が活発化される分子機構と生理的意義を明らかにすることが学術的に重要であり必要であると考えた。

## 2. 研究の目的

出芽酵母において、糖質飢餓時に高マンノシル糖鎖の代謝分解が活発化される分子機構および生理的意義を解明することを本研究の目的とした。

## 3. 研究の方法

研究代表者は、細胞内で高マンノシル糖鎖の代謝分解を担う糖加水分解酵素の細胞内活性を定量解析する手法をこれまでの研究において確率している。当該メカニズムに関わる新たな分子を同定するため、本定量法を用いて、糖質飢餓条件においても細胞内の高マンノシル糖鎖分解活性が活発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を試みた。キナーゼ、フォスファターゼおよびその捕囚子を含む約 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。得られた遺伝子欠損株および過剰発現株を用いて、既知の細胞内代謝経路が野生株とどのように異なるかを解析し、細胞内機能の解明を試みた。また、組換えタンパク質を作製し、in vitro でタンパク質の機能解析を行った。

## 4. 研究成果

(1) 上述した手法により当該メカニズムに関わる新規分子をスクリーニングした結果、サイクリンの一つとして知られる Cib4 の遺伝子欠損株においては、野生株と異なり、糖質飢餓条件においても高マンノシル糖鎖分解活性が殆ど上昇しないことが見いだされた。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 Cib4 の欠損株においても確認できた。[FEBS Lett. 594:1329-1338 (2020)]。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ことを明らかにしている。Cib4 の欠損株では、糖質飢餓条件における高マンノシル糖鎖分解の活発化は生じないが、アミノ酸飢餓に応じた同経路の活発化は野生株と同程度まで上昇した。このことから、Cib4 は糖質の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を示唆された。また、Cib4 以外の他の既知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。このことから、Cib4 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、Cib4 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、Cib4 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。Cib4 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、Cib4 が酵母の糖質飢餓応答および高マンノシル糖鎖の分解活性の制御調節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、Cib4 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。これらの成果は、FEBS Letters 誌に掲載され、当該号の Highlight article に選抜された[FEBS Lett. 594:1329-1338 (2020)]。

(2) 糖質飢餓に応答して高発現し、高マンノシル糖鎖の分解により生じるマンノースを代謝する新規ヘキシキナーゼ酵素である Emi2 についても同定するに至った。出芽酵母の主要なヘキシキナーゼとして知られる Hxk2 は高グルコース条件で対数増殖時に高発現するが、それとは異なり、Emi2 は対数増殖時にはほとんど発現しないが、糖質飢餓に応答して高発現することがわかった。また、グルコースおよびマンノースに対する親和性は Hxk2 よりも高いが、代謝回転速度は Hxk2 よりも非常に低いことから、低グルコース条件下でゆっくりと代謝する酵素であることも示唆された。これらの成果は日本応用糖質科学会誌に掲載された [J App Glycosci. 67: 103-109 (2020)]。ほかにも、出芽酵母の糖質代謝に関わる新規分子を同定し、機能解析を進めている。成果の一部は日本農芸化学会や日本応用糖質科学会、酵母遺伝学フォーラムなどの国内学会にて成果発表を行っており、現在論文作成中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Midori Umekawa, Kaito Hamada, Naoto Isono, Shuichi Karita	4. 巻 67
2. 論文標題 The Emi2 protein of <i>Saccharomyces cerevisiae</i> is a hexokinase expressed under glucose limitation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J App Glycosci.	6. 最初と最後の頁 103-109
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5458/jag.jag.JAG-2020_0007	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 Umekawa M, Shiraishi D, Fuwa M, Sawaguchi K, Mashima Y, Katayama T, Karita S.	4. 巻 -
2. 論文標題 Mitotic cyclin Clb4 is required for the intracellular adaptation to glucose starvation in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 FEBS Lett.	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） 10.1002/1873-3468.13722.	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 該当する

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 梅川碧里, 濱田海斗, 磯野直人, 苅田修一
2. 発表標題 グルコース欠乏に応じて発現する出芽酵母のヘキソキナーゼEmi2
3. 学会等名 日本応用糖質科学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 濱田海斗, 磯野直人, 苅田修一, 梅川碧里
2. 発表標題 ユニークな基質特異性を持つ出芽酵母の新規ヘキソキナーゼ
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 白石大貴、澤口和奈、不破真凜、真島要輔、片山高嶺、苅田修一、梅川碧里
2. 発表標題 出芽酵母の糖質飢餓応答に関わる新規因子の同定と機能解析
3. 学会等名 日本応用糖質科学会大会2019年度大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 梅川碧里、澤口和奈、不破茉綸、白石大貴、苅田修一
2. 発表標題 Saccharomyces cerevisiaeの糖質飢餓応答に関わる分子機構の解析
3. 学会等名 第52回酵母遺伝学フォーラム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 不破茉綸、白石大貴、澤口和奈、苅田修一、梅川碧里
2. 発表標題 パン酵母の糖質飢餓ストレス応答に関わる新規因子の細胞内機能
3. 学会等名 応用糖質科学会中部支部講演会三重講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 梅川碧里、西川彩乃、磯野直人、苅田修一
2. 発表標題 Saccharomyces cerevisiaeの新規ヘキソキナーゼの同定と機能解析
3. 学会等名 第54回酵母遺伝学フォーラム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 梅川碧里、西川彩乃、磯野直人、苅田修一
2. 発表標題 Saccharomyces cerevisiaeの新規ヘキシキナーゼの同定
3. 学会等名 日本応用糖質科学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西川綾乃、磯野直人、權藤みつぎ、苅田修一、梅川碧里
2. 発表標題 Saccharomyces cerevisiaeの新規糖キナーゼNgk1の機能解析
3. 学会等名 日本応用糖質科学会中部支部例会名古屋講演会
4. 発表年 2021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