

研究終了報告書

「細胞外小胞生成に必要な遺伝子の網羅的同定とその解析」

研究期間：2018年10月～2022年3月

研究者：吉田 知史

1. 研究のねらい

ACBP (Acyl-CoA binding protein) は生体膜の恒常性維持に必須な分子量9kDの広く保存されたタンパク質であり、動物では血中のACBPが食欲を亢進させることが知られている。ACBPは飢餓に応答してオートファジー機構を利用して細胞外(血中)へと放出されるがその仕組みは未解明のままである。本研究ではモデル生物として出芽酵母を用いてACBPの“型破りな分泌機構”を解明し、さらにその知見に基づいて手軽に肥満を抑制する手法の開発への発展を目指している。我々の研究チームは酵母を用いて“ACBPの型破りな分泌機構”に関与する遺伝子群の網羅的な同定に成功し、Rim経路と呼ばれるストレス応答シグナル伝達経路がACBPの放出に中心的な役割を担うことを明らかにした。またACBPを細胞外へと放出する引き金となる誘導刺激は飢餓だとこれまで考えられていたが我々は飢餓とは別種類の脂質ストレスが重要な役割を果たしていることを明らかにした。細胞膜上での脂質ストレスがどのようにRim経路を活性化し、Rim経路がACBPの放出を促進するのかそのシグナル伝達機構の解明を目指しさらなる研究を進めている。本研究で同定したACBP放出に必須な遺伝子群の個々の機能解析が順調に進めば食欲や肥満を手軽にコントロールする薬の開発も可能になると期待される。

2. 研究成果

(1)概要

ACBP (Acyl-CoA binding protein) は生体膜の恒常性維持に必須な分子量9kDの広く保存されたタンパク質であり、動物では血中のACBPが食欲を亢進させることが知られている。ACBPは飢餓に応答してオートファジー機構を利用して細胞外(血中)へと放出されるがその仕組みは未解明のままである。本研究ではモデル生物として出芽酵母を用いてACBPの“型破りな分泌機構”を解明し、さらにその知見に基づいて手軽に肥満を抑制する手法の開発への発展を目指している。我々の研究チームは酵母を用いて“ACBPの型破りな分泌機構”に関与する遺伝子群の網羅的な同定に成功し、Rim経路と呼ばれるストレス応答シグナル伝達経路がACBPの放出に中心的な役割を担うことを明らかにした。またACBPを細胞外へと放出する引き金となる誘導刺激は飢餓だとこれまで考えられていたが我々は飢餓とは別種類の脂質ストレスが重要な役割を果たしていることを明らかにした。細胞膜上での脂質ストレスがどのようにRim経路を活性化し、Rim経路がACBPの放出を促進するのかそのシグナル伝達機構の解明を目指しさらなる研究を進めている。本研究で同定したACBP放出に必須な遺伝子群の個々の機

能解析が順調に進めば食欲や肥満を手軽にコントロールする薬の開発も可能になると期待される。

(2) 詳細

研究結果1

ACBP の放出に必要な遺伝子群の網羅的同定

我々は ACBP の細胞外放出機構を解明するためのモデルに酵母細胞を利用し、高感度な細胞外放出レポーターAcb1-nanoluc を作成した。酵母日必須遺伝子破壊株ライブラリーで Acb1-nanoluc の細胞外放出量を測定することで Acb1 の分泌に必要な遺伝子の網羅的同定に成功した。

我々の同定した Acb1 放出に必須な遺伝子群を大きく分類すると(i)膜のリモデリングに関与する ESCRT タンパク質群、(ii)アルカリストレス応答に関与する Rim101 シグナリング因子群、(iii)ABCトランスポーターなどの輸送タンパク質群、(iv)機能未知遺伝子群に分けることができる。これらのうち(i)~(iii)は酵母からヒトにまでよく保存されており ACBP 分泌の進化的な保存性が期待される。一方当初期待していたオートファジー関連遺伝子群は我々のスクリーニングでは同定されなかった。

研究結果2

ACBP の放出は飢餓出なく膜ストレスで誘導される

Acb1 放出に Rim101 経路が関与すること、オートファジー関連遺伝子群が必要ないことから我々は細胞外環境の栄養状況だけでなく pH 変化が Acb1 の放出に与える影響を検証した。一般的に用いられている Acb1 放出条件は2%リン酸カリウム培地であるが、この培地に2% グルコース、0.67%窒素源等の栄養を加えても Acb1 は正常に放出された。我々はアルカリ応答 Rim 経路が関与すること、2%リン酸カリウム培地は pH8.9 とアルカリ性を示すことから培地の酸性度に注目した。その結果 pH を7.0 以下に調整した2%リン酸カリウム培地では Acb1 の放出が起こらないこと、逆に pH を9.0 に調整した Tris-HCl 培地では Acb1 の放出が誘導されることを確認した。これらの結果は Acb1 放出の引き金が飢餓でなくアルカリストレスで誘導されることを強く支持し、また我々のスクリーニングでオートファジー遺伝子群でなく Rim 経路の遺伝子群が取得されてきたことの裏付けとなった。

研究結果3

Acb1 放出における Rim101 経路の役割とは何か？

Rim101 経路は細胞膜のストレスにより ESCRT-III 依存的に活性化され、Rim101 タンパク質のプロセッシングを経て下流で様々な遺伝子発現を誘導する(図2)。Acb1 の放出には Rim101 経路のすべての因子が必要で、しかも刺激を与えてから4時間以上の時間が必要なことから Rim 経路依存的な遺伝子発現が関与している可能性が高いと考えられる。名古屋大学理学部の小原圭介講師との共同研究で遺伝子発現プロファイルを解析し、我々の同定した Acb1 放出必須遺伝子群のうち複数の遺伝子が Rim 依存的に

転写誘導されることを明らかにした。これらの遺伝子産物は細胞膜に局在するトランスポーターであるため我々はこれらの遺伝子産物が直接 Acb1 を輸送する可能性の検証を進めている。

ACBP の型破りな分泌の解明に向けて。

Acb1 の型破りな分泌はオートファゴソームと MVB を必要とすることから膜輸送であると考えられてきた。しかし我々の新しいモデルでは膜輸送を介す必要性はない。Acb1 放出条件(2% リン酸カリウム培地、2時間及び4時間)での急速凍結細胞を電子顕微鏡解析したが細胞膜直下、細胞壁、あるいは細胞外に直径 100 nm 以下の膜構造体を確認することはできなかった。

Acb1 タンパク質の挙動を確認するために同じ条件下で抗 Acb1 抗体を利用し免疫電顕を行ったところ、細胞膜直下や細胞壁、異常な細胞内膜構造体(CUPS?)近傍に Acb1 抗体のシグナルが検出された。この局在パターンは Malhotra らが論文に報告したとおりである(Curwin et al., eLife 2016)が、同様のシグナルが *acb1* 破壊株でも高頻度で検出されたためその特異性には疑問が残る。いずれにせよ小胞内(あるいは多胞体内)に Acb1 が検出されることはなかった。

Malhotra らのグループは Acb1 以外にも Sod1 (16 kD.), Trx1 (11 kD.), Trx2 (11 kD.), Ahp1 (18 kD), Gpp1(25 kD.) などが型破りな分泌で放出されることを報告した (Curwin JCB. 2020)。これらのタンパク質に共通するのは分泌シグナルペプチを持たないことだけでなく分子量が比較的小さく細胞質中に豊富に存在することである。このことから Acb1 放出には選択的な膜輸送ではなく細胞膜に小さな孔(ポア)が開くことで単量体の小さな細胞質中タンパク質が漏れ出している可能性がある。

我々がレポーターとして用いている Acb1-nanoluc(28 kD.)はネガティブコントロールの GFP-nanoluc (47 kD.)と比べて顕著に細胞外へと放出されることから Acb1 依存的な輸送のレポーターとして利用してきた。新たに nanoluc (19 kD.)単独のタンパク質を酵母に発現させ、リン酸カリウム培地培養したところ Acb1-nanoluc よりも高い効率で単独の nanoluc が細胞外へと放出されることがわかった。つまり我々が追い求めてきた現象は Acb1 特異的な輸送機構というよりも小さなたんぱく質が細胞外へ漏れ出す仕組みであった可能性が高い。

このような現象は動物の炎症性ピロトーシスでも観察されており、炎症に応答して Gasdermin D たんぱく質が細胞膜に小さな孔を開け、そこから IL1b が漏出することが知られている。Gasdermin D に似たタンパク質は菌類にも存在することが報告されているが出芽酵母では配列上の相同タンパク質は見つかっていない。

我々はこの現象を突き止めるために Acb1-nanoluc を用いたレポーターアッセイでなく、最初に報告された酵母 Acb1 が粘菌の胞子形成を誘導する生理活性アッセイ(Duran et al., JCB 2010)に立ち戻った。Duran らの生理活性アッセイは Acb1 を放出する酵母の培養液を細胞性粘菌にかけると高感度で胞子形成を誘導する(SDF-2 活性)というものである。このシンプルな系が機能すれば非選択的なタンパク質漏出に關与する因子の同定も容易いと考えた。

細胞性粘菌のエキスパートである東京大学教養学部の澤井哲教授・桑名悟史研究員の協力で Duran 論文と同一の細胞性粘菌株・培養条件で追試を試みたが酵母培養液中に含まれる Acb1 で粘菌の孢子形成を誘導することはできなかった。この結果には酵母の培養条件や Acb1 の修飾など幾つかの可能性が考えられる。そこで粘菌の SDF-2 ペプチドおよび酵母 Acb1 をペプチド合成し、この合成ペプチドが粘菌の孢子形成を誘導できるか直接検証した。粘菌の培養濃度、培養時間、ペプチド濃度など様々な条件を検証してみたが論文で報告されているペプチド濃度 (Anjard PNAS 2005) の 1000 倍濃度にしてもこれらのペプチドでは孢子形成を誘導できなかった。

3. 今後の展開

我々はアルカリストレスから Rim 経路を介した Acb1 の放出という新しいモデルの提唱に一步步近づいている。近日中に新しいモデルを提唱する論文を発表する予定ではあるがこれまでの他グループの論文との整合性をとるために慎重な裏付けを必要とし、想定以上の時間と労力を費やしながらか研究を進めている。

4. 自己評価

本研究は申請者の既存の研究プロジェクトとは関連がなく細胞外微粒子領域のために提案した全く新規の研究課題であった。新しい研究分野でプロジェクトを一から立ち上げて進めていくことは新しい知識や技術、異分野の研究者との交流も含めて非常に知的に充実した研究であった。また本研究が早稲田大学へ移動した直後に始動したことは研究室の立ち上げ等で大変大きな恩恵となった。一方で、新規研究分野であるがためにデータ・経験の蓄積が少なく、想定以上に研究遂行に時間と労力がかかったこと、研究室の立ち上げ、引っ越し、コロナ禍による閉鎖等で研究活動が度々停止し、また申請者が体調を崩してしまい未だに論文発表に至っていないのは痛恨の極みである。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数: 5件

1. Masak Takaine, Hiromi Imamura, Satoshi Yoshida

[High and stable ATP levels prevent aberrant intracellular protein aggregation in yeast.](https://doi.org/10.7554/eLife.67659)

eLife 10.7554/eLife.67659 2022 年 4 月 19 日

概要 細胞内タンパク質の可溶化にミリモルレベルのアデノシン三リン酸(ATP)が関与していることが知られている。しかし、生理的な条件下でのこの高い ATP レベルの意義や、ATP を維持する機構は依然として不明である。我々は、AMP 活性化プロテインキナーゼ (AMPK) とアデニル酸キナーゼ (ADK) が協力し、グルコースレベルに関わらず、細胞内の ATP レベルを維持することを明らかにした。ATP 減少型酵母変異体のシングルセルイメー

ジングにより、これらの変異体では ATP レベルが確率的に一過性に枯渇し、内因性タンパク質やハンチンチン、 α シヌクレインなどの病原性タンパク質の細胞毒性凝集が促進されることが明らかとなった。さらに、ATP 減少型変異体において ATP 量を薬理学的に上昇させると、 α -シヌクレインの凝集体の蓄積とその細胞毒性が抑制されることが確認された。本研究は、細胞内 ATP のホメオスタシスがプロテオスタシスを保証することを証明し、細胞内 ATP レベルの高い変動を抑制することが細胞毒性タンパク質の凝集を防ぐことを明らかにし、AMPK と ADK が神経変性疾患などのタンパク質異常を防ぐ重要な因子であることを示唆するものであった。

2. Farzan Ghanegolmohammadi, Hiroki Okada, Yaxuan Liu, Kaori Itto-Nakama, Shinsuke Ohnuki, Anna Savchenko, Erfei Bi, Satoshi Yoshida, Yoshikazu Ohya

[Defining Functions of Mannoproteins in *Saccharomyces cerevisiae* by High-Dimensional Morphological Phenotyping.](#)

Journal of fungi (Basel, Switzerland) 7(9) 2021 年 9 月 17 日

概要マンノプロテインは、酵母の細胞壁の最外層に局在する非フィラメント型の糖タンパク質である。マンノプロテインは、酵母の細胞壁最外層に局在する非フィラメント型糖タンパク質であり、その生理的な役割は、適切なツールが限られているため、完全には解明されていない。マンノプロテインの改変は細胞の形態に影響を与える可能性があるため、我々は *Saccharomyces cerevisiae* のマンノプロテイン変異体を高次元形態学的表現型により検討した。マンノプロテイン変異体は、ガウス混合モデリングを用いたクラスタリング解析により、形態学的に 7 つのグループに分類された。さらに、様々なオミックスデータに基づく検討により、形態学的表現型はマンノプロテインの機能をより深く理解するための補完的なツールであることが示された。

3. Masak Takaine, Masaru Ueno, Kenji Kitamura, Hiromi Imamura, Satoshi Yoshida

[Reliable imaging of ATP in living budding and fission yeast](#)

Journal of Cell Science 132(8) jcs230649-jcs230649 2019 年 4 月 15 日

概要アデノシン三リン酸(ATP)は、すべての生物にとって必須の主要代謝産物である。しかし、単一の生細胞内での ATP の動態についての理解は非常に限られていた。我々は ATP バイオセンサー QUEEN を最適化し、生きた酵母の中で ATP のダイナミクスを空間的・時間的に良好な分解能でモニターした。その結果、野生型酵母では、炭素源や細胞周期によらず、ATP 濃度が安定に維持されていることがわかり、ATP を特定の濃度に維持する機構が存在することが示唆された。さらに、ATP 濃度と増殖速度に明確な相関がないことから、ATP 濃度は必ずしも代謝活性の指標とはならないことも明らかにした。酵母における QUEEN の使用は、ATP 動態の簡便で信頼性の高いアッセイを提供し、真核生物の細胞代謝に関するいくつかの未解決の疑問に答えることになると期待できる。

(1)特許出願

研究期間全出願件数:0件(特許公開前のものも含む)

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)