

氏 名 酒井 啓一郎

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第 2426 号

学位授与の日付 2023 年 3 月 24 日

学位授与の要件 生命科学研究科 基礎生物学専攻
学位規則第6条第1項該当

学位論文題目 分裂酵母の休眠からの復帰過程におけるシグナル伝達と細胞質流動性の研究

論文審査委員 主 査 中山 潤一
基礎生物学専攻 教授
青木 一洋
基礎生物学専攻 教授
上田 貴志
基礎生物学専攻 教授
佐藤 政充
早稲田大学 理工学術院 教授

(様式3)

博士論文の要旨

氏名 Sakai, Keiichiro

論文題目 分裂酵母の休眠からの復帰過程におけるシグナル伝達と細胞質流動性の研究

(Studies on the signal transduction and the cytoplasmic fluidity during dormancy breaking in fission yeast)

Cellular dormancy is a physiological state, in which cells are non-proliferative under stress conditions. To study cellular dormancy, fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*, is one of the valuable model organisms, because nitrogen depletion allows cells to enter a dormant state and form spores. Spore formation renders the cells resistant to several stresses. Glucose refeeding induces dormancy break of spores, resuming cell growth and proliferation. This process is called germination. In budding yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, it has been reported that stress tolerance under starvation or stress conditions requires a decrease in cytoplasmic fluidity. However, it remains unclear whether cytoplasmic fluidity reduces in fission yeast spores, and how the reduced cytoplasmic fluidity has an impact on stress tolerance and germination. In this study, I aimed to elucidate the relationship between cytoplasmic fluidity and germination in fission yeast spores by live cell imaging.

First, I quantified the cytoplasmic fluidity in fission yeast spores during germination by using a genetically encoded multimeric nanoparticle (GEM) with a diameter of 40 nm. The GEMs are homomultimeric scaffolds that self-assemble into stable particles. By tracking single fluorescent particles, I measured the effective diffusion coefficients of GEMs in vegetative cells and spores. I found that the diffusion coefficient in spores becomes approximately 30-fold smaller than that in vegetative cells. Further, such a solid-like cytoplasm of the spores was rapidly fluidized within an hour by glucose-induced germination. These results demonstrated that the spore

cytoplasm is in a solid-like state, and cytoplasmic fluidity rapidly increases in spores during germination. To investigate the mechanisms underlying the increase in the fluidity of spores, I focused on the glucose-stimulated cAMP-PKA pathway, because glucose induces spore germination. The depletion of genes associated with the cAMP-PKA pathway prevented cytoplasm fluidization and spore germination induced by glucose stimulation. This result strongly suggests that germination requires cytoplasmic fluidization. Trehalose, a disaccharide, is known to reduce the fluidity in vegetative budding yeast cells, and accumulate during sporulation in fission yeast. Therefore, I examined possible links between the cAMP-PKA pathway and trehalose synthesis/degradation. The GEMs imaging data demonstrated that the glucose-induced germination causes rapid trehalose degradation at the same time as increased cytoplasmic fluidity. Disruption of the trehalose-degrading gene, *ntp1*, inhibited cytoplasmic fluidization and spore germination, indicating that cytoplasmic fluidization needs trehalose degradation for germination. Furthermore, *pkal*-deficient mutant spores did not show any trehalose degradation. These data revealed that glucose-stimulated germination requires the activation of the cAMP-PKA pathway, followed by cytoplasmic fluidization via Ntp1-mediated trehalose degradation.

Next, to clarify the activation dynamics of the cAMP-PKA pathway during germination, I established live-cell imaging systems to visualize and manipulate the PKA activity. Because of the lack of tools to visualize the PKA activity in yeasts, I developed a PKA biosensor, called spPKA-KTR, which is based on the principle of kinase translocation reporter (KTR). spPKA-KTR shuttles between the nucleus and cytoplasm depending on its phosphorylation by PKA, and thus the subcellular localization of spPKA-KTR reflects PKA activity. As expected, glucose stimulation in vegetative cells induced translocation of spPKA-KTR from the nucleus to the cytoplasm, indicating PKA activation. To quantify the subcellular localization of spPKA-KTR, I tested a near-infrared fluorescent protein iRFP fused with nuclear localization signals

(NLS-iRFP-NLS) as a nuclear marker. Unexpectedly, NLS-iRFP-NLS did not fluoresce at all in fission yeast. To overcome this issue, I tried to develop a method for iRFP imaging in fission yeast. In a series of experiments, I found that phycocyanobilin (PCB) functions as a chromophore for iRFP and enhances its fluorescence more than biliverdin (BV), which is a conventional chromophore for iRFP. The addition of purified PCB to cells expressing NLS-iRFP-NLS outperformed the addition of BV regarding iRFP fluorescence intensity. Further, I applied a PCB biosynthesis system, SynPCB, to iRFP imaging in fission yeast, allowing NLS-iRFP-NLS fluorescence imaging without adding purified PCB. To manipulate cAMP level and PKA activity, I introduced a photoactivated adenylate cyclase bPAC into fission yeast. Combining spPKA-KTR with bPAC enabled to visualization and manipulation of intracellular PKA activity in vegetative fission yeast cells. However, unfortunately, spPKA-KTR could not function in spores due to its aggregation.

In summary, I found that cytoplasmic fluidization plays an essential role in germinating fission yeast spores through trehalose degradation via the cAMP-PKA pathway. Because macromolecules such as RNA polymerase and ribosomes are comparable in size to GEMs, their diffusion could be suppressed in spores. Therefore, it is suggested that spores maintain dormancy by decreasing transcription and/or translation, and cytoplasmic fluidization triggers dormancy breaking and germination initiation through resuming RNA and/or protein synthesis. PKA imaging system with spPKA-KTR and bPAC would provide an experimental basis for investigating PKA activity dynamics in fission yeast.

博士論文審査結果

Name in Full
氏名 酒井 啓一郎Title
論文題目 分裂酵母の休眠からの復帰過程におけるシグナル伝達と細胞質流動性の研究

細胞休眠は、ストレス条件下で細胞が増殖しない生理的な状態のことを指す。細菌、酵母、哺乳類細胞を始めとする様々な細胞は、休眠状態となることで外環境からの化学的・物理的なストレスに対する耐性を持つが、環境条件が良好になると休眠から復帰して細胞増殖を再開する。分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* は、窒素欠乏により細胞が休眠状態に入り、胞子を形成するため、細胞休眠の研究に適したモデル生物の一つである。胞子は様々なストレスに耐性を持つが、グルコースの再供給により、胞子の休眠状態を解除し、細胞の成長・増殖を再開させる。この過程は発芽と呼ばれる。休眠状態のストレス耐性機構として、細胞質の流動性の低下が報告されている。出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* では、飢餓やストレス条件下で細胞質の流動性を低下させることでストレス耐性を上昇させていることが報告されている。しかし、分裂酵母の胞子において細胞質流動性が低下しているのか、また、細胞質流動性の低下がストレス耐性や発芽にどのように影響するのかについては不明であった。

そこで出願者は、分裂酵母胞子の細胞質流動性と発芽の関係をライブセルイメージングにより明らかにすることに取り組んだ。分裂酵母に組み込んだ遺伝子から古細菌に由来する自己集合能を持つタンパク質を発現させて、細胞内で直径 40 nm の多量体ナノ粒子 (GEM) を形成させることで、分裂酵母胞子の発芽時の細胞質流動性を定量化した。出願者は、単一蛍光粒子を追跡することにより、栄養増殖期の細胞と胞子における GEM の実効拡散係数を測定した。その結果、胞子の拡散係数は栄養増殖期の細胞の拡散係数と比べて約 30 倍低下しており、細胞質流動性が著しく低下していることが明らかになった。さらに、この胞子の細胞質流動性は、グルコース添加による発芽によって 1 時間以内に急速に栄養増殖期の細胞のレベルまで回復することがわかった。これらの結果から、胞子の細胞質は固体的な状態にあり、発芽の際に細胞質の流動性が急速に高まることが明らかとなった。胞子の流動性上昇のメカニズムを調べるために、出願者はグルコース刺激によって誘導される cAMP-PKA 経路に注目した。cAMP-PKA 経路に関連する遺伝子を欠損させると、グルコース刺激による細胞質流動化および胞子の発芽が阻害された。この結果は、発芽には細胞質の流動化が必要であることを強く示唆している。出芽酵母のストレス耐性時における細胞質流動性の低下は二糖類であるトレハロースの蓄積が関与していること、さらに分裂酵母の胞子形成期にトレハロースが蓄積することが報告されていることから、出願者はトレハロースに着目した。グルコースによる発芽は、細胞質流動性の上昇とほぼ同じ時間スケールでトレハロースの急速な分解を引き起こすことが明らかとなった。また、トレハロース分解遺伝子 *ntp1* を欠損させると細胞質の流動化と胞子の発芽が阻害されたことから、トレハロース分解が細胞質流動化と発芽に必要であることが示された。さらに、

cAMP-PKA 経路の *pka1* 遺伝子を欠損する変異体胞子はトレハロースの分解を全く示さなかった。これらのデータから、グルコース刺激による発芽には、cAMP-PKA 経路の活性化、次いで Ntp1 を介したトレハロース分解による細胞質流動化が必要であることが明らかとなった。

次に、出願者は、発芽時の cAMP-PKA 経路の活性化ダイナミクスとその意義を明らかにするために、PKA 活性を可視化し、操作するライブセルイメージングシステムの開発に取り組んだ。酵母では PKA 活性を可視化するツールが報告されていなかったため、kinase translocation reporter (KTR) の原理を応用した PKA バイオセンサー spPKA-KTR を開発した。spPKA-KTR は PKA によってリン酸化されると、細胞質から核内へと移行するようにデザインされており、その細胞内局在から PKA 活性を推定することができる。期待通り、栄養増殖期の細胞にグルコースを刺激すると、spPKA-KTR は核から細胞質へ移動し、PKA が活性化することが示された。spPKA-KTR の細胞内局在を画像解析にて定量するために、核マーカーとして近赤外蛍光タンパク質 iRFP と核局在シグナルを融合したものの (NLS-iRFP-NLS) を栄養増殖期の細胞に発現させたところ、NLS-iRFP-NLS は分裂酵母では全く蛍光を発しないことが分かった。この問題を解決するために、分裂酵母で iRFP を使った近赤外蛍光イメージングする手法の開発を行った。一連の実験の結果、シアノバクテリアが持つ青色発色団のフィコシアノビルリン (PCB) が iRFP の発色団として機能し、従来の iRFP の発色団であるビリベルジン (BV) よりもその蛍光を増強することを発見した。さらに、PCB 生合成システム SynPCB を分裂酵母に導入し、精製 PCB を添加せずに iRFP を用いた近赤外蛍光イメージングを可能にした。次に、cAMP 量と PKA 活性を操作するために、光活性化アデニル酸シクラーゼ bPAC を分裂酵母に導入した。spPKA-KTR と bPAC を組み合わせることで、栄養増殖期における分裂酵母の細胞内 PKA 活性の可視化、および光操作が可能となった。しかし、残念ながら胞子では spPKA-KTR は凝集してしまい、機能しなかったため、胞子の発芽過程における PKA 活性の可視化と光操作にはさらなる改良が必要なことが分かった。

以上の出願者の研究は、分裂酵母胞子の発芽には、cAMP-PKA 経路を介したトレハロース分解により、細胞質流動化が必須の役割を果たすことを見出したものであり、細胞の休眠機構の理解につながると期待される。RNA ポリメラーゼやリボソームなどの高分子は GEM と同程度の大きさであるため、胞子ではその拡散が抑制される可能性がある。したがって、胞子は転写や翻訳を低下させることで休眠を維持し、細胞質流動化によって RNA やタンパク質の合成を再開させることで休眠打破や発芽を促していることが示唆された。また、spPKA-KTR と bPAC を用いた PKA イメージングシステムは、分裂酵母における PKA 活性の動態を調べるための実験基盤を提供するものであると思われる。以上を鑑み、出願者の研究は博士の学位を授与するに相応しいと審査委員会は評価した。