オルガネラ間コンタクトサイトを介した細胞ストレス応答機構の解明

Elucidation of cellular stress response mechanisms mediated by inter-organelle contact sites

（細胞生物学会推薦）

代表研究者　山形大学　　田村康　　Yamagata University　　Yasushi TAMURA

Membrane contact sites (MCSs), where organelle membranes are closely apposed, act as dynamic platforms for lipid metabolism in response to metabolic and stress conditions. In yeast, the nucleus–vacuole junction (NVJ) expands during glucose starvation due to the recruitment of stress-responsive proteins, but the mechanisms driving this process and its physiological relevance have remained unclear. Here, we identify the yeast homologs of INSIG, Nsg1 and Nsg2, along with the intramembrane aspartyl protease Ypf1, as NVJ-localized proteins specifically induced by glucose starvation. Ypf1 facilitates the targeting of Nsg1, Nsg2, and the HMG-CoA reductases Hmg1 and Hmg2 to the NVJ, likely triggered by remodeling of the nuclear membrane in response to altered very long-chain fatty acid (VLCFA) metabolism. We further show that this membrane remodeling destabilizes Nsg1, enhancing Hmg1 localization and activity at the NVJ, while stabilizing Nsg2, which suppresses Hmg1 activation. These findings indicate that Nsg1 and Nsg2, previously known to regulate Hmg2, also negatively control Hmg1. Our results support a model in which VLCFA-driven changes in nuclear membrane properties enable cells to detect glucose starvation and adjust sterol metabolism accordingly. This study highlights how membrane properties at MCSs contribute to metabolic adaptation and lipid homeostasis.

研究目的

本研究では出芽酵母の核-液胞間コンタクトサイト NVJ（Nucleus-Vacuole Junction）がグルコース飢餓時に劇的に拡大する現象（図 1）の分子機構と生理的意義解明を目的に進めた。具体的には，①どのような因子がグルコース飢餓の何を感知して，②どのような因子をグルコース飢餓ストレス特異的に NVJ 領域に集積させ，③その結果何が起こるのか，を明らかにすることを目指した。

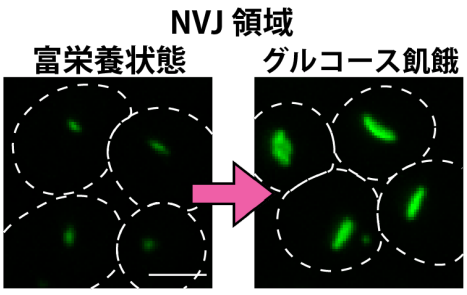

図 1 グルコース飢餓で拡大する NVJ

研究経過

Nsg1，Nsg2，および Ypf1 は，グルコース飢餓（GS）に応答して NVJ に集積する

我々は，MCS に集積するタンパク質を網羅的にビオチン化することで同定する，空間特異的な近接ビオチンラベリング法（CsFiND, Complementation assay using Fusion of split-GFP and TurboID）を開発し（Fujimoto et al. *Contact*, 2023），グルコース飢餓ストレス特異的に NVJ 領域に集積する因子として Ypf1, Nsg1, Nsg2 を同定していた。Ypf1 はプロセシングペプチダーゼで，Nsg1, Nsg2 はともに哺乳類の INSIG タンパク質のホモログであり，過去にステロール合成の律速酵素である HMG-CoA 還元酵素 Hmg2 の安定性に重要であることが報告されている [1,2]。

本研究ではまず，Ypf1, Nsg1, Nsg2 に加え，過去にルコース飢餓ストレス特異的に NVJ 領域に集積する

因子として報告されていた HMG-CoA 還元酵素 Hmg1 がどのようなメカニズムで NVJ に集積するのかを検討した。具体的には。既知の NVJ 集積タンパク質の欠損株に加え，Ypf1, Nsg1, Nsg2 欠損細胞を作製し，これらの細胞内における Ypf1, Nsg1, Nsg2 局在を観察した。その結果，NVJ のコアサブユニットとである Nvj1 を欠損すると，Ypf1, Nsg1, Nsg2 が NVJ 領域に局在できないことがわかった（図 2A）。その一方で， Ypf1，Nsg1，Nsg2 の欠失は Nvj1 の局在に影響を与えなかった（図 2B）。さらにグルコース飢餓条件下ではこれらのタンパク質の発現量および分子量が変化した（図 2C, D）。具体的には Nsg1 は減少，Nvj1 と Nsg2 は増加した。Nvj1 と Nsg2 はグルコース飢餓時にリン酸化されて安定化すること，Ypf1 はグルコース飢餓条件下で N 末端の Asn28 が特異的に糖鎖修飾を受けることが明らかとなった（図 2E, F）。この糖鎖修飾は構造変化により Asn28 が内腔側に露出することを示唆している。Ypf1, Nsg1, Nsg2 の欠失は，GS 条件下における互いの発現レベルや修飾状態には影響を与えなかった（図 2G）。

Ypf1 と Snf1 は，GS 依存的な NVJ のリモデリングに必要である

さらに解析を進めたところ，Ypf1 がグルコース飢餓条件下における NVJ の再構築において中心的な役割を果たすことを見出した。すなわち，Ypf1 欠損細胞では Nsg1, Nsg2, Hmg1, Hmg2 が NVJ 局在を示さなくなるが，それ以外の NVJ 因子，Nvj1, Nvj2, Vac8, Osh1, Tsc13 の局在には影響しなかった（図 2H）。一方，Nsg1 および Nsg2 は Ypf1 や Hmg1 の局在には必要なかった（図 2I）。また Ypf1 の欠損は他の NVJ 因子の発現量に影響しなかった（図 2J）これらの結果から，Ypf1 はグルコース飢餓を感知し，他の因子を NVJ にリクルートするセンサーとして機能することが示唆された。

Ypf1 の上流調節因子について検討したところ，エルゴステロール応答性転写因子 Upc2 やそのパラログ Ecm22[4] の欠失は Ypf1 や Hmg1 の局在に影響しなかったが，グルコース応答性の AMPK である Snf1[5] の欠失は，Ypf1 と Hmg1 の NVJ 局在を著しく阻害した（図 2K）。また，Snf1 欠失により，グルコース飢餓依存的な Ypf1 の糖鎖修飾や，Nvj1 と Nsg2 のリン酸化が抑制され，Nvj1 の安定性も低下した（図 2L）。これらの結果から，Snf1 欠失によって Ypf1 がグルコース飢餓依存的な構造変化を起こせなくなること，あるいは Nvj1 の量的減少が原因で NVJ 局在が阻害される可能性が考えられた。しかし，*snf1*Δ 細胞でも Nvj1 は NVJ に局在しており，Nvj1-GFP の発現では量的増加は抑制されるものの，Ypf1 と Hmg1 の局在には影響しなかった（図 2M）。以上のことから，Snf1 が関与する Ypf1 の構造変化が NVJ 局在に本質的に重要であり，それが欠如することが他因子の NVJ 局在を阻害する主因であると考えられる。

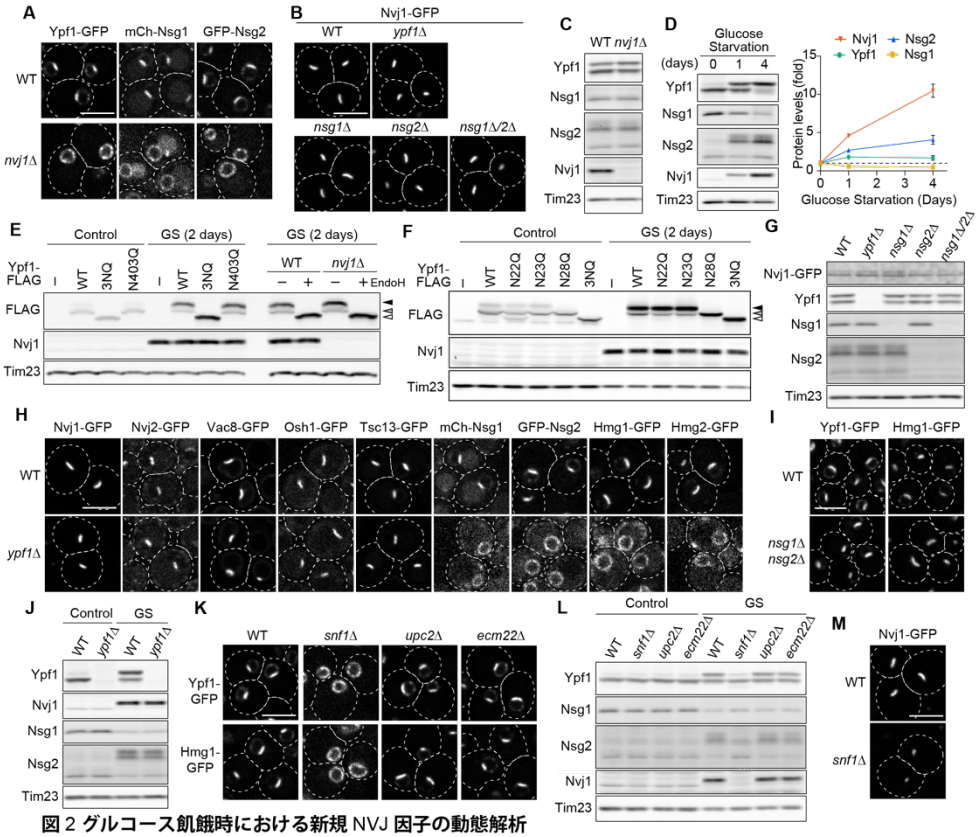

図 2 グルコース飢餓時における新規 NVJ 因子の動態解析
(A) WT, *nvj1*Δ株における NVJ 因子の細胞内局在 (B) NVJ 因子欠損株における Nvj1 の細胞内局在
(C, D) WT, *nvj1*Δ株のウェスタンブロッティング (E, F) Ypf1 変異体のウェスタンブロッティング
(G) NVJ 因子欠損株のウェスタンブロッティング (H) WT, ypf1Δ株における NVJ 因子の細胞内局在
(I) *nsg1*Δ*nsg2*Δ株における Ypf1 と Hmg1 の細胞内局在 (J, L) 各遺伝子欠損株のウェスタンブロッティング
(K, M) 各遺伝子欠損株のウェスタンブロッティングにおける Ypf1, Hmg1, Nvj1 の細胞内局在
GS，グルコース飢餓

Ypf1 は，極長鎖脂肪酸（VLCFA）代謝の変化を介してグルコース飢餓を感知するセンサーとして機能する

Ypf1 の N 末端 Asn28 が GS 依存的に糖鎖修飾を受けることから（図 2F），グルコース飢餓により膜との相互作用様式が変化し，Ypf1 の構造変化が起きたと考えられる。これを検証するため，脂質代謝関連遺伝子欠損株を用いて Ypf1 の糖鎖修飾に影響する因子をスクリーニングしたところ，極長鎖脂肪酸（Very Long Chain Fatty Acid, VLCFA）合成酵素 Elo3 欠損株では，グルコース飢餓の有無に関わらず Ypf1 の糖鎖修飾が促進され，さらに Nvj1 と Nsg2 のリン酸化および安定化，Nsg1 の不安定化が起こり，Ypf1 の NVJ 局在も促進された（図 3）。これらの結果から，VLCFA 合成の抑制がグルコース飢餓時の NVJ リモデリングを促進することが示唆された。 また，Ypf1 の N 末端が NVJ 局在に重要であるかを調べたところ，N 末端 29–74 番目の領域が必要であることが判明した。さらに，Ypf1 と Nvj1 の直接的な電荷相互作用が関与する可能性も検討したが，電荷反転変異体やアラニン置換変異体の解析から，Ypf1-E35A 変異のみが局在異常を示し，明確な静電的相互作用の証拠は得られなかった。これらの結果は，Nvj1 と Ypf1 の N 末端領域が NVJ リモデリングに重要であるが，両者の間に未知の媒介因子が存在する可能性を示唆する。

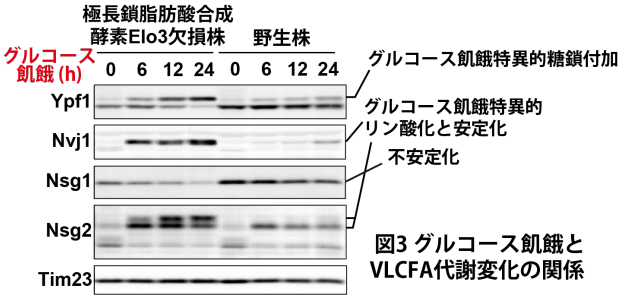

図3 グルコース飢餓と VLCFA代謝変化の関係

Nsg1/Nsg2 二重欠損細胞では，グルコース飢餓条件下において脂質滴が顕著に蓄積する

Nsg1 と Nsg2 の両方を欠損させた酵母細胞では，グルコース飢餓条件下において脂肪滴（LD）の顕著な蓄積が観察された（図 4）。これは HMG-CoA 還元酵素 Hmg1 および Hmg2 の異常な活性化と関係していると考えられる。オートファジー因子である Atg1 を欠損細胞や，Nsg1 と Nsg2 に加えて Hmg1 を欠損した細胞では LD が蓄積しなかったことから，LD 蓄積はリポファジー異常によるものではなく，Hmg1 の活性過剰が主因であることが示唆された（図 4）。グルコース飢餓条件では，Nsg1 の不安定化と Nsg2 の安定化が起こり，これが Hmg1 の NVJ への局在と活性に影響を与える。特に，Nsg1 が存在する状態では Hmg1 の NVJ 局在は抑制され，グルコース飢餓によって Nsg1 が不安定化すると Hmg1 が NVJ に蓄積して活性化される。一方，Nsg2 はグルコース飢餓によって安定化し Hmg1 活性を負に制御すると考えられる。Nsg1 と Nsg2 の同時欠損時の LD の蓄積が，Hmg1 の欠損によって見られなくなるが，Hmg2 の欠損では同様の効果を示さなかった。これらの結果は，Nsg1 と Nsg2 が Hmg1 の過剰活性化を抑制する役割も果たすことを示唆する。

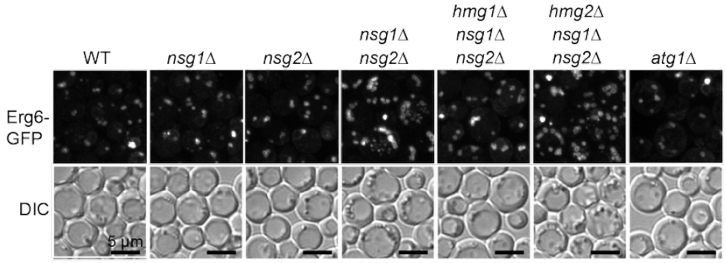

図4. NVJ因子欠損株における脂肪滴の観察(Erg6は脂肪滴マーカー)

Nsg1 と Nsg2 の欠損によりエルゴステロール合成が異常促進する

そこで実際に Nsg1, Nsg2 欠損株でステロール合成が促進しているか，^{14}C-酢酸を用いた代謝標識実験により検討した。その結果，グルコース飢餓条件下で，Nsg1, Nsg2 欠損細胞においてエルゴステロールエステルおよびその前駆体スクアレンの著しい蓄積が観察された（図 5）。一方，Hmg1 を併せて欠損させた細胞では，これらの脂質の蓄積は見られなかった。グルコース飢餓 Nsg1 または Nsg2 単独の欠損では明確な変化はなく，両者の同時欠損が Hmg1 活性の制御に重要であることが示された（図 5）。これらの結果から，INSIG ホモログである Nsg1 と Nsg2 は，これまで知られていた Hmg2 の安定性制御に加えて，Hmg1 の活性を抑制する新たな役割を持つことが示された。この抑制機構は，グルコース飢餓条件下での過剰なステロール合成を防ぐ負のフィードバック機構として機能していると考えられる。本研究では，グルコース飢餓条件に応答して VLCFA を含む脂質組成が変化し，NVJ の膜構造が再編成されることで，Hmg1 の活性が適切に制御されるという新たな細胞ストレス応答機構を明らかにすることができた。これにより，NVJ および VLCFA のストレス応答にお

ける意義が再定義されるとともに，エルゴステロールやスクアレンといった商業的に有用な脂質の酵母ベースの大量生産技術への応用可能性も示された。

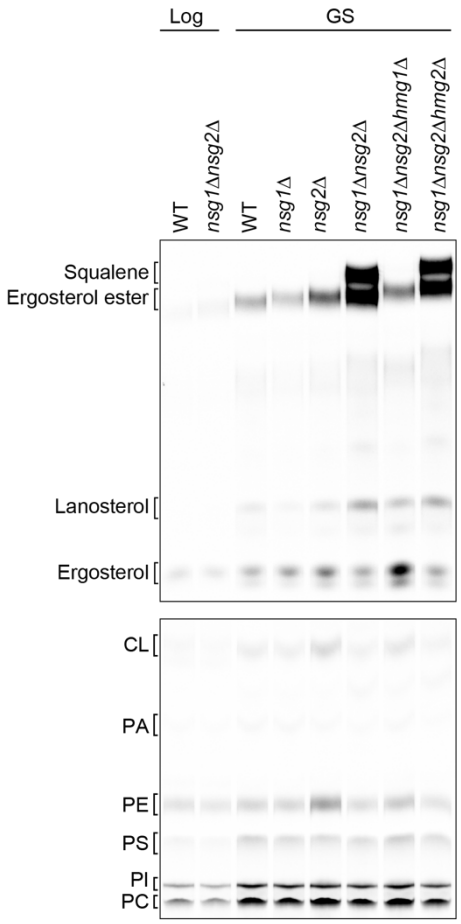

図5. Nsg1/2が欠損するとグルコース飢餓時(GS)のエルゴステロール合成が活性化する

考察

本研究では，膜接触部位（MCS）が脂質代謝やストレス応答の調整に果たす動的な役割に注目し，核-液胞接合部であるNVJのリモデリングとその生理的意義の解明を行った。その結果，Ypf1 が，グルコース飢餓時に Nsg1, Nsg2, Hmg1, Hmg2 を NVJ にリクルートすること，Nsg1 と Nsg2 が Hmg1 の活性を負に制御することを見出した。興味深いことにグルコース飢餓時に Nsg1 は不安定化し，Nsg2 は安定化するという対照的な制御を受けており，これは Hmg1 の活性を微調整するフィードバック機構を構成していると考えられる。この調節機構は VLCFA 代謝の変化によって引き起こされると推定され，VLCFA の合成酵素 Elo3 の欠損がグルコース飢餓時の NVJ リモデリングを促進することを見出した。しかしながらElo3の欠損が引き起こす核膜の物理的な膜特性への影響が，具体的にどのようなものは不明である。今後の研究によって，グルコース飢餓依存的な NVJ の再編成を引き起こす，膜の性質変化の実態を明らかにする必要がある。

また Ypf1 がどのようにグルコース飢餓依存的な NVJ 因子を NVJ にリクルートするのかも不明である。Ypf1 と Nvj1 の内腔ドメインが NVJ 局在に必要であるが，これらの因子間の直接的な相互作用は確認されてなかった。未知の仲介因子の存在が示唆されるため，今後の研究で明らかにすべきだろう。また，Ypf1 はグルコース飢餓に応答して構造変化を伴う可能性があり，これは新たな膜応答型バイオセンサーの開発にも応用できると遺体される。

Nsg1 の安定性はエルゴステロール中間体であるラノステロールによって調節されていることがわかっている[1]。グルコース飢餓時にはエルゴステロール合成が活性化することで，ラノステロールが枯し Nsg1 が不安定化するのかもしれない。また Nsg2 の安定化に関しては，Nsg2 のリン酸化により制御されると考えられる。また今回，Hmg1 の欠損が Hmg2 の安定性を向上させることがわかった。この結果から，Nsg1/2 とは独立した未知の因子による Hmg2 の安定性っても安定化される可能性がある。

本研究の成果は，産業応用への波及効果も期待できる。スクアレンは，アジュバント，化粧品，栄養補助食品に利用される産業的にも有用な脂質である。現在スクアレンの製造は深海ザメの肝油に依存しているが，酵母を用いた生産が可能になれば，持続可能な生産戦略に貢献できる可能性がある。今回明らかとなった Nsg1/Nsg2 による内在的なフィードバック制御を解除することで，有用脂質の生産量の向上に寄与できるかもしれない。これにより，環境倫理的にも優れたスクアレン生産プラットフォームの構築が期待される。

参考文献

1. Theesfeld, C. L. & Hampton, R. Y. Insulin-induced Gene Protein (INSIG)-dependent Sterol Regulation of Hmg2 Endoplasmic Reticulum-associated Degradation (ERAD) in Yeast. *J. Biol. Chem.* **288**, 8519–8530 (2013).
2. Wangeline, M. A. & Hampton, R. Y. An autonomous, but INSIG-modulated, role for the sterol sensing domain in mallostery-regulated ERAD of yeast HMG-

CoA reductase. *J. Biol. Chem.* **296**, 100063 (2021).
3. Rogers, S., Hariri, H., Wood, N. E., Speer, N. O. & Henne, W. M. Glucose restriction drives spatial reorganization of mevalonate metabolism. *eLife* **10**, e62591 (2021).
4. Vik, Å. & Rine, J. Upc2p and Ecm22p, Dual Regulators of Sterol Biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 6395–6405 (2001).
5. Lin, X. The regulation of Saccharomyces cerevisiae Snf1 protein kinase on glucose utilization is in a glucose-dependent manner. *Curr. Genet.* **67**, 245–248 (2021).

研究の発表

口頭発表

1. 田村康，動的なオルガネラコンタクトサイト形成によって調節される脂質代謝機構，日本植物学会第 88 回大会
2. 田村康，動的なオルガネラコンタクトサイト形成による脂質代謝調節，第 76 回日本細胞生物学会
3. 田村康，脂質輸送制御によるオルガネラ量の調節機構，第 96 回日本生化学会大会

ポスター発表

1. 藤本慎太郎，田村康　オルガネラコンタクトサイト特異的な近接ラベリング手法:CsFiND，　第 97 回日本生化学会大会
2. 藤本慎太郎, 田村康, グルコース飢餓依存的な新規核-液胞間コンタクトサイト局在タンパク質の機能解析　第 76 回日本細胞生物学会大会
3. Shintaro Fujimoto, Yasushi Tamura, Identification of novel nucleus-vacuole junctions proteins, YEAST LIPID CONFERENCE 2024, Homburg, Germany
4. 藤本慎太郎，田村康，核-液胞間コンタクトサイトの新規因子の同定と機能解析，第 75 回日本細胞生物学会
5. 藤本慎太郎，田村康，核-液胞間コンタクトサイトに集積する新規因子の同定と機能解析，第 89 回日本生化学会東北支部例会・シンポジウム
6. 藤本慎太郎，尾野雅哉，吉丸哲郎，片桐豊雅，田村康，出芽酵母におけるオルガネラ膜間コンタクトサイト局在タンパク質の解析，第 95 回日本生化学会大会

誌上発表

1. Fujimoto S., and Tamura Y.* Glucose Starvation Sensing through Membrane Remodeling at the Nucleus-Vacuole Junction Coordinates Ergosterol Biosynthesis, *bioRxiv*. 2015