

健康に必須な細胞内リン酸恒常性維持を担う 分子機構について新知見！

ーリン酸と関係する難病の治療薬探索への応用に期待ー

【概要】

甲南大学（学長：中井伊都子／兵庫県神戸市）理工学部生物学科・統合ニューロバイオロジー研究所の武田鋼二郎教授、駒村灯智大学院生らの研究グループは、京都大学大学院生命科学研究科附属放射線生物研究センターの研究グループ（松本智裕教授、高堂将広研究員）との共同研究で、細胞内のリン酸恒常性（リン酸量を適切に一定に保つこと）において、リン酸の細胞内への取り込み、排出、そしてリン酸の重合によるポリリン酸合成という3点が重要であり、この機構の破綻は細胞を死に至らしめることを、分裂酵母を用いた研究で明らかにしました。生命にとってリン酸は欠くことのできない必須の栄養素ですが、反面、多すぎるリン酸は害となり、疾病を引き起こすことが知られています。しかしながら、ヒトをはじめとする動物の細胞レベルのリン酸恒常性の理解は途上であり、本研究によって酵母で得られた研究成果が動植物のリン酸恒常性、リン酸と関係する疾病の理解へ繋がることから期待されます。

特に、本研究ではリン酸排出に関わるXpr1というタンパク質が主に解析されましたが、Xpr1はヒトの「特発性基底核石灰化症」という難病の原因遺伝子としても知られています。扱いやすい酵母を用いることで、ヒトXpr1の分子機能（どのくらいリン酸を排出する能力があるか）の評価法や調節機構の解明が、今後、期待されます。

この成果は米国生化学・分子生物学会（ASBMB）の学術誌であるJournal of Biological Chemistry（Volume 299, Issue 12, December 2023）に掲載されます。

【研究成果のポイント】

- ・分裂酵母のリン酸恒常性維持には、リン酸取り込み阻害因子Par1、リン酸排出因子Xpr1、ポリリン酸合成酵素VTC複合体の3因子が重要であり、これら3因子は、細胞内の遊離リン酸濃度の致死的な上昇を防ぐことで、細胞増殖や生存に貢献している。
- ・リン酸排出因子Xpr1はヒトの遺伝疾患の原因遺伝子であり、分裂酵母を用いた研究で、分子機構や制御の解明、治療薬候補探索への応用も期待される。
- ・全ての生物がもつ、謎の多い生体高分子・ポリリン酸の生理機能の解明に繋がる。

【研究の背景】

リン酸はDNA、RNA や細胞膜の構成成分として、生物のエネルギー代謝の中心（エネルギー通貨 ATP）として、また、細胞内の数多くの生化学反応に関わることから、生物にとって極めて重要な物質です。そのため、リン酸は少なすぎても多すぎても不都合であり、一定の適切な量（恒常性）を維持する必要があります。ヒトにおいて、リン酸の恒常性の乱れは様々な疾病を引き起こします。

例えば、慢性腎臓病等によって引き起こされる、血清中のリン酸濃度が異常に高い状態である「高リン酸血症」は異所石灰化を介して様々な臓器障害をもたらします。また、大脳基底核にカルシウム等が異常に沈着（石灰化）する難病「特発性基底核石灰化症」は、細胞へリン酸を取り込むタンパク質（PiT-2）や細胞外へリン酸を排出するタンパク質（Xpr1）の異常が原因のひとつです。ヒトの場合、内分泌系による調節を受けた腎臓での排出等で維持される固体レベルのリン酸恒常性維持機構は理解が進展していますが、一つ一つの細胞レベルのリン酸恒常性は理解の途上にあるのが現状です（図1）。

酵母は単細胞の真核生物（ヒトや植物と同じグループ）であり、モデル生物として様々な研究に使われてきました。酵母の細胞レベルのリン酸恒常性は、我が国の酵母研究者の貢献もあって、動物と比べて多くが解明されていますが、完全解明には至っていないのが現状です。特に、細胞からのリン酸排出や、ポリリン酸（リン酸が重合した高分子）代謝と、細胞の生命維持、増殖能との関係は十分に理解されていませんでした。

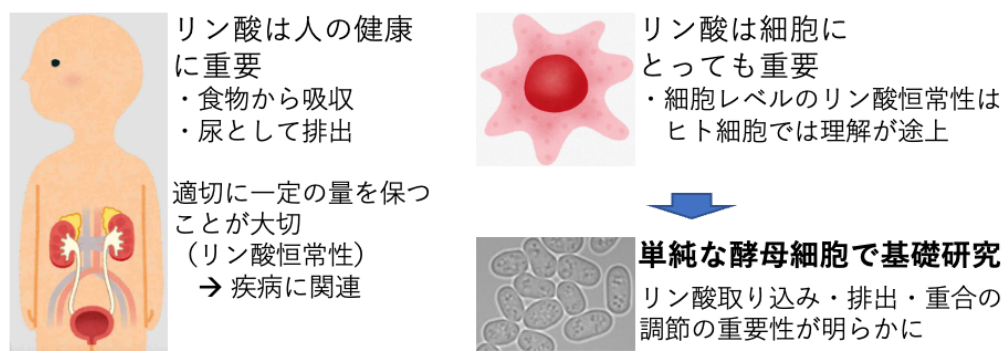


図1 リン酸恒常性は重要だが未解明な部分も多い

武田グループは、分裂酵母の細胞レベルのリン酸恒常性維持機構の研究を行ってきました。同グループのこれまでの研究によって、Pqr1 の異常によって、細胞に多量のリン酸が取り込まれると、VTC 複合体によって合成されるポリリン酸が液胞（vacuole）に過剰蓄積し、細胞のリサイクル機構であるオートファジーが損なわれることが発見されていました（Sawada et al. JBC 2021）。また、Pqr1 が欠損した細胞において、同時に VTC 複合体が欠損すると、ポリリン酸の過剰蓄積が起こらないため、オートファジーは正常に戻ります。

一方、Pqr1 異常によって過剰に取り込まれたリン酸は、VTC 複合体が欠損しているのでポリリン酸にもなれません。この状態で、細胞はどのようにして増えすぎたリン酸をやりくりして生存を維持するのでしょうか。このメカニズムを追求する過程で、細胞外にリン酸を排出する可能性がある Xpr1 に注目し、今回の研究につながりました。（図2）。

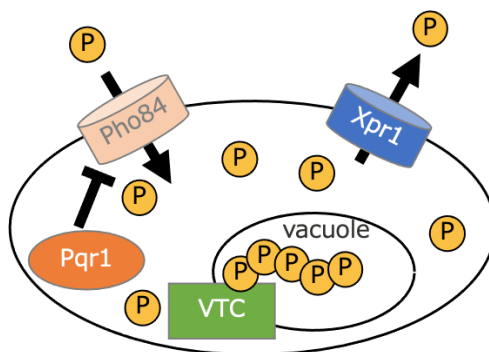


図2 分裂酵母内のリン酸恒常性維持機構

P はリン酸、Pho84 は細胞内にリン酸を取り込むリン酸輸送体（ヒト PiT-2 と類似）を示す。

【研究内容と成果】

今回の研究では、Pqr1、Xpr1、VTC 複合体のうち、2 つが欠失していても通常の培養条件では分裂酵母は増殖可能ですが、3 つを同時に欠損した三重遺伝子破壊株は通常の培地では生存不可で、リン酸濃度を 1/100 に減少させた低リン酸条件でのみ増殖可能でした。すなわち、この3因子によるリン酸の制御が酵母細胞の生存に必須であることになります。

それでは、この3因子の欠損は細胞にどのような悪影響を及ぼし、死に至らしめるのでしょうか。3因子はいずれも、細胞質や核内の遊離リン酸濃度を低下させるはたらきを担っているため(図2)、3因子の機能不全によって、細胞内の遊離リン酸濃度が致死的に高くなってしまう可能性が考えられました。この仮説を検証するためには三重破壊株を解析することが望まれるのですが、三重破壊株が不安定で実験することが困難であったため、Pqr1 と Xpr1 の二重破壊株 ($\Delta pqr1\Delta xpr1$) を用いた解析がおこなわれました。 $\Delta pqr1\Delta xpr1$ は、野生株(異常のない酵母)では生育可能な高いリン酸濃度(200~500 mM)で生育が阻害されます。野生株や $\Delta pqr1\Delta xpr1$ を、通常の条件から高リン酸濃度培地に移して細胞内のリン酸量を定量すると、 $\Delta pqr1\Delta xpr1$ では総リン酸量が3~5倍に増加すること、遊離リン酸量に限定しても2倍以上増加すること(図3)、が明らかとなりました。Pqr1 が機能しないために細胞内へのリン酸取り込み量が増大し、Xpr1 の機能欠損が原因で余剰のリン酸を排出できないために、細胞内の遊離リン酸濃度が過剰となって致死となることが示唆されました。細胞内の数多くの生化学反応にリン酸は関わります。そのため、リン酸濃度の過剰は、多くの重要な生化学反応に影響し、致死的效果をもつと考えられます。そのような事態を防ぐために、酵母は、リン酸取り込み制限(Pqr1)、リン酸排出(Xpr1)、ポリリン酸として隔離(VTC 複合体)という三重の防御策を進化の過程で獲得してきた、と考えられます。

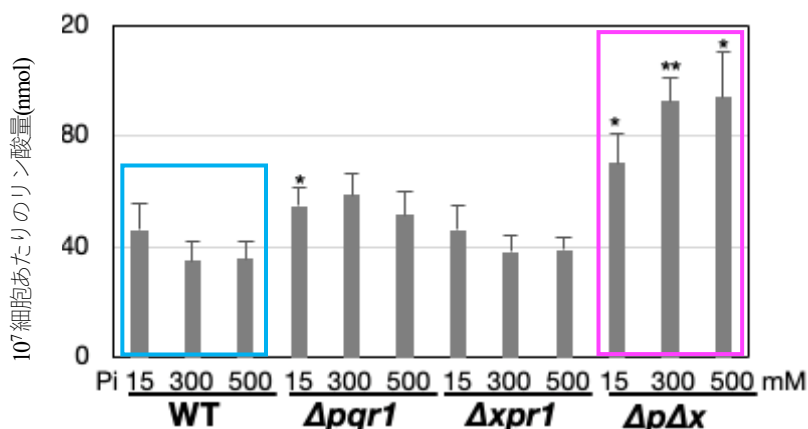


図3 細胞内遊離リン酸量の定量

野生株 (WT), Pqr1 遺伝子破壊株 ($\Delta pqr1$), Xpr1 遺伝子破壊株 ($\Delta xpr1$), 二重破壊株 $\Delta pqr1\Delta xpr1$ ($\Delta p\Delta x$) の細胞あたりの遊離リン酸量を比較した。横軸の数値は培養液に含まれるリン酸濃度 (mM) を示す。野生株 (左端) と比較すると、二重破壊株 $\Delta pqr1\Delta xpr1$ 株 (右端) では、培地のリン酸濃度が上昇するとリン酸恒常性が保たれず、遊離リン酸が過剰に蓄積する。

【今後の展望】

・疾病の原因でもあるリン酸排出因子 Xpr1 の研究の発展

ヒト Xpr1 は、特異性大脳基底核石灰化症の原因遺伝子であることから医学的に注目されていますが、そのリン酸排出の分子機構や活性制御機構については完全には解明されていません。本研究の過程で、分裂酵母の Xpr1 は状況に応じてリン酸排出活性を変化させることが明らかとなっており(図4)、Xpr1 の分子機構や制御を解析する上で分裂酵母は非常に優れたモデルと言えます。使いやすい酵母を用いて Xpr1 の分子機構を明らかとし、疾病治療薬の候補化合物を探索する道が開けました。

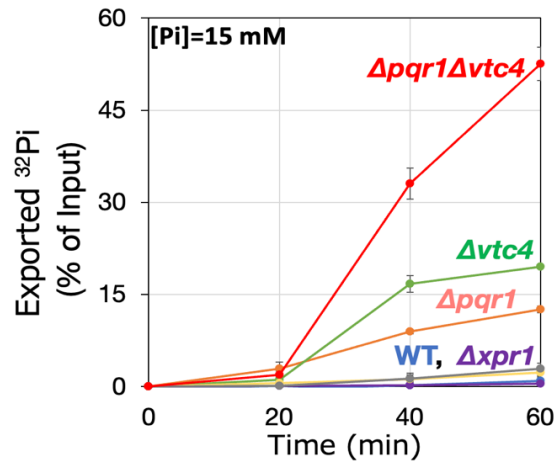


図4 ラジオアイソトープを用いたリン酸排出活性の定量

縦軸は細胞からのリン酸排出量、横軸は測定開始後の時間経過を示す。
野生株(WT)と比較してPqr1とVTC複合体の遺伝子破壊株($\Delta pqr1$ と $\Delta vtc4$)では、リン酸排出活性が増加する。二重破壊株 $\Delta pqr1\Delta vtc4$ では、リン酸排出活性の増大がさらに著しい。

・謎めいた高分子・ポリリン酸の生理機能の解明へ

本研究の成果は、謎の多いポリリン酸の生理的役割について、解明の緒となる可能性があります。ポリリン酸の生理機能については、血液凝固の促進や難病の筋萎縮性側索硬化症(ALS)との関わりなど、医学的に重要な報告も多いのですが、ポリリン酸が「なぜ、どのように」生命にとって重要なのか、明確な回答は出ていないのが現状です。本研究によって、少なくとも酵母におけるポリリン酸の必須性が明らかとなりつつありますので、これを契機に、他生物種でのポリリン酸の果たす役割について理解が進むことが期待されます。

【用語説明】

酵母(分裂酵母)：単細胞の菌類で、細胞のなりたちや遺伝子がヒトと類似することから研究のモデルとして利用されています。

特発性基底核石灰化症：脳内の大脳基底核や小脳歯状核などに、カルシウム等が病的に沈着する病気で難病に指定されています(難病情報センター <https://www.nanbyou.or.jp/entry/3838>)。同じ家系内で発症する例が知られており、原因遺伝子としてリン酸輸送に関わる遺伝子(*SLC20A2*, *XPR1*)が知られています。*SLC20A3*は細胞内にリン酸を取り込むPiT-2というタンパク質の遺伝子で、PiT-2は分裂酵母のPho84(図2)と類似の働きをしています。*XPR1*はリン酸排出因子の遺伝子で、今回、解析された分裂酵母Xpr1と同じ働きをします。

ポリリン酸：リン酸が数珠上に繋がった(重合)高分子で、すべての生物の細胞に含まれているとされます。多彩な生命現象に関わることで報告されていますが、その生理的機能、役割は完全には理解されていません。ヒトにおいては、血小板に多く含まれ、血液凝固に関与することがわかっています。また、最近、難病である筋萎縮性側索硬化症(ALS)の発症に関わるという報告がありました(Arredondo et al. Neuron 2022)。しかしながら、ヒトなどの多細胞動物や植物では、生体に含まれるポリリン酸がどのように合成されるのか、解明が進んでいません。一方、酵母はポリリン酸の合成と分解に関わる酵素が解明されているため、ポリリン酸の生理機能の解明のための研究対象として優れています。

オートファジー：細胞の飢餓応答のひとつです。飢餓に瀕すると、細胞は自らの成分を液胞(vacuole)やリソソームといった細胞小器官に取り込み、分解してリサイクルします。これがオートファジーで、酵母からヒトまで、基本的な分子メカニズムは共通しています。

【発表雑誌】

[学術誌名] Journal of Biological Chemistry

<https://doi.org/10.1016/j.jbc.2023.105454>

[論文タイトル] Phosphate uptake restriction, phosphate export, and polyphosphate synthesis contribute synergistically to cellular proliferation and survival

[著者] Masahiro Takado¹, Tochi Komamura², Tomoki Nishimura², Ikkei Ohkubo², Keita Ohuchi², Tomohiro Matsumoto¹, and Kojiro Takeda^{2,3}

1 京都大学大学院生命科学研究科附属放射線生物研究センター、2 甲南大学大学院自然科学研究科、3 甲南大学統合ニューロバイオロジー研究所

以上

《プレスリリース全体に関するお問い合わせ先》

甲南学園広報部

〒658-8501 神戸市東灘区岡本 8-9-1

電話 078-435-2314 FAX 078-435-2546 Email: kouhou@adm.konan-u.ac.jp

《研究内容について》

甲南大学理工学部生物学科 教授 武田鋼二郎

電話 078-435-2516 E-mail: takeda@konan-u.ac.jp

プレスリリース配信先：兵庫県教育委員会記者クラブ、神戸市政記者クラブ、大阪科学・大学記者クラブ