

出芽酵母全プロテインホスファターゼの機能ゲノム科学

●原島 俊 ◆金子 嘉信

大阪大学大学院工学研究科生命先端工学専攻

＜研究の目的と進め方＞

タンパク質のリン酸化、脱リン酸化は、真核細胞機能の重要な制御機構のひとつである。ヒトやアラビドプシスなど、これまでにゲノムが明らかにされた真核生物では数百のプロテインキナーゼ (PKase) やプロテインホスファターゼ (PPase) の存在が明らかにされている。これらのPKaseやPPaseが、それぞれの生物で、どのような働きをしているかを網羅的に明らかにすることは、その制御機構が普遍的であるが故に、真核生物を理解するための一大プロジェクトのひとつであろう。それから得られる知見は、基礎生命科学においてはシグナル伝達による細胞応答機構の理解、発生・分化など高次の生命現象の理解、医学においては疾病の原因、発症のメカニズムや病理の理解、工業や農業などバイオ産業の観点からは有用酵素やタンパク質の活性制御、代謝工学による有用物質生産など幅広い応用が期待される。

このような背景のもと、本研究の目的は、ゲノムサイエンスのフロントランナーとして大きな貢献をしてきた出芽酵母を対象に、多数のPPaseに着目して、その機能の全体像を明らかにすることである (1, 2)。そのため、以下のような研究計画に従って研究を行った。

＜研究開始時の研究計画＞

- 1) 遺伝子破壊 (単独、二重) 株の網羅的な作製と表現型解析
- 2) 単独破壊株の発現プロファイルの解析による PPase の新しい機能の発見
- 3) PPase破壊株と機能既知遺伝子破壊株の発現プロファイルの比較解析による新しい表現型の発見
- 4) リン酸化転写因子 Pho4の脱リン酸化にかかわる PPaseの網羅的探索
- 5) PKase遺伝子との網羅的な二重破壊株の作成による PPaseの機能解析
- 6) 網羅的な解析によって発見した表現型に基づく、個別のPPaseについての機能解析

＜研究期間の成果＞

- 1) 全PPaseの単独破壊株及び全ての組み合わせの二重破壊株の構築とその網羅的な表現型解析 (3)

以前の研究で *siw14* 破壊株がカフェイン感受性を示す、*pph3* 破壊株が MMS に感受性を示す、*yvh1* 破壊株が低温増殖感受性を示すなど、これまでに知られていない種々の表現型を見出した。本研究では、単独破壊が致死でない 30 種の PPase について、全ての組み合わせ (435通り) の二重破壊株を構築し、その網羅的な表現型解析を行った。まず、二重破壊株は栄養培地上では全て致死ではないことがわかった。次に、これらの二重破壊株について網羅的な表現型解析を行ったところ、*Dpph21Dpph22* と *Dppz1Dppz2* の増殖遅延、*Dmsg5Dptc2* の NaCl, CaCl₂ 感受性、*Dmsg5Dptp2* の CaCl₂ 感受性のように、二重破壊株で初めて表現型を示す組み合わせがあることを見出した (図 1)。そうした PPase については、一般に機能重複が

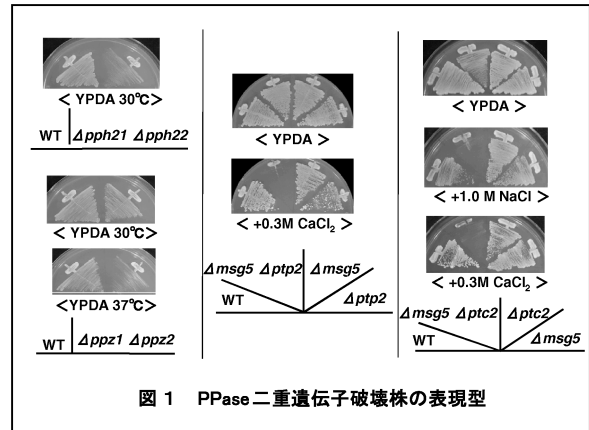


図 1 PPase 二重遺伝子破壊株の表現型

あると考えられているが、それぞれの単独破壊株の発現プロファイル解析したところ、全く異なる発現プロファイルを示すことがわかった。これらの結果より、それら 2 つの PPase は、特定の表現型においてのみ機能重複を示すが、野生型株においては異なる働きをしていることが示唆された。

2) 全 PPase 破壊株の発現プロファイル解析と機能分類

破壊株が致死である *GLC7*、*CDC14* を除く 30 株の単独遺伝子破壊株について、DNA マイクロアレイ解析を行った (九大農学院、久原 哲教授、田代康介助教授との共同研究)。PPase は、環境変化にตอบสนองしたシグナル伝達に関与すると言われており、栄養が豊富な培地においては働

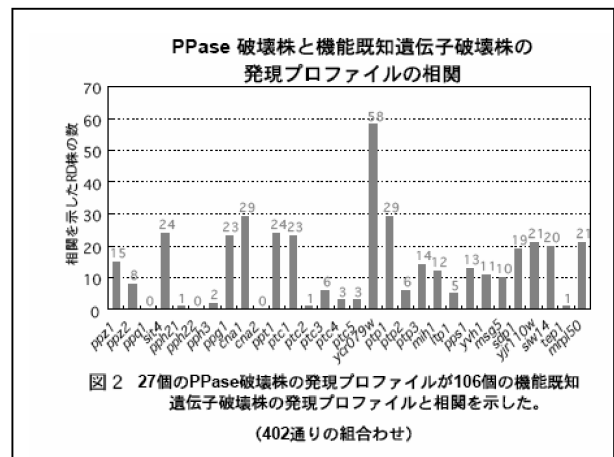


図 2 27 個の PPase 破壊株の発現プロファイルが 106 個の機能既知遺伝子破壊株の発現プロファイルと相関を示した。(402通りの組み合わせ)

いていないと考えられている。まず、このことが正しいかどうかを検証するため、30°C、栄養培地において培養した各 PPase 遺伝子破壊株の発現プロファイル解析した。その結果、これまでそれらの PPase との関連が知られていなかった多数の遺伝子の発現が変化していることがわかった。これより、PPase は、ストレス条件下以外でも多様な細胞機能に関わっているという新しい PPase 像が明らかになった。

3) 機能既知遺伝子破壊株の発現プロファイルとの比較解析による表現型発見

30種の PPaseの発現プロファイルと、既に機能が明らかにされている316種の遺伝子の破壊株の発現プロファイル（ロゼッタ社などで公表されているもの）について、全ての組み合わせ（9480通り）で、ピアソンの相関係数に基づいて類似度を解析した。その結果、27種のPPaseと106種の機能既知遺伝子を含む合計407通りの組み合わせにおいて、正または負の相関があることを見いだした（図2）。この解析結果に基づき、相関を示したReference株で知られている表現型をPPase破壊株について調べることにより、これまでに知られていない新しい表現型を見いだすことができた。

4) リン酸化転写因子 Pho4の脱リン酸化にかかわるPPaseの網羅的検索（4、5）

出芽酵母リン酸シグナル伝達系（PHO系）の転写活性化因子 Pho4は、リン酸化型が核内に局在し、非リン酸化型が細胞質に局在する。リン酸化はPho85 キナーゼによることが明らかにされているが、脱リン酸化に関与するPPaseは知られていない。Pho4の脱リン酸化にかかわるPPase遺伝子やその関連遺伝子を同定するため、致死とならない遺伝子破壊株4,800株のPHO系表現型を網羅的に解析した。その結果、PPase破壊株の表現型に異常は見い出せなかったが、これまで知られていなかったイノシトールポリリン酸合成系に関わるPLC1、ARG82、KCS1遺伝子が、PHO系の調節に関与していることが明らかになった。

また、細胞は、細胞外のリン酸か、それとも細胞内のリン酸を検知しているのかの長年の問題を解決するため、NMRによって種々の変異株の細胞内リン酸濃度を測定したところ、細胞が検知するのは、細胞内のオルトリン酸であることがわかった。この結果より、Pho4のリン酸化、(脱)非リン酸化を導くシグナルは、細胞質内にあるセンサーによって検知されていることが明らかとなった。

5) PPaseと基質を共有するPKaseの網羅的な同定

PPaseと基質を共有する PKaseを同定し、PKaseの側面からPPaseの機能を明らかにする新しい方法論を考えた。すなわち、PPase破壊株では、当該PPaseの基質タンパクのリン酸化型の過剰な蓄積が起こり、このことが、

は、Sat4あるいはHal5とペアになって、転写活性化因子Gln3のリン酸化、脱リン酸化を制御し、カフェインシグナル応答を調節する可能性を示唆することができた（図4）。また、これらの成果より、その他のPPaseについても、同様なストラテジーによって、基質の同定を含むPPaseの機能を網羅的に明らかにできる新しい方法論を確立することができたと結論した。

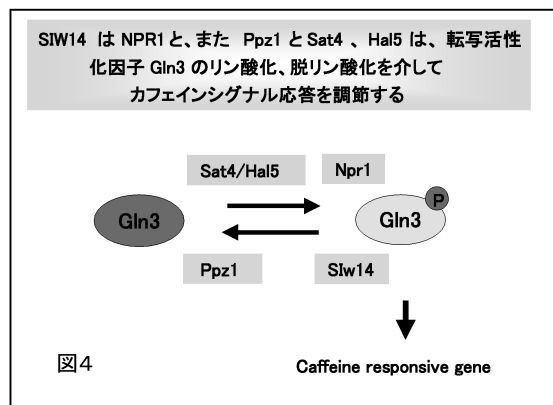


図4

6) 個別の PPase機能の解析

i) Pph3のDNA損傷応答における機能

Pph3の破壊株がDNAのアルキル化によりDNA損傷を引き起こすMMS (methyl methanesulfonate) に対して感受性を示すことを見いだした。これまでの研究から、Pph3が細胞構造維持や細胞周期の調節に関与しているこ

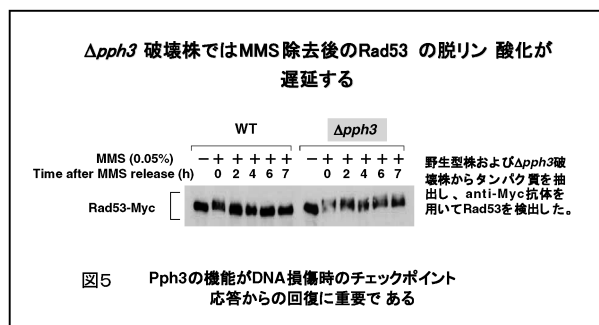
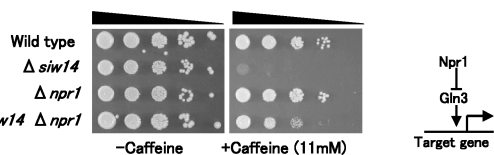


図5 Pph3の機能がDNA損傷時のチェックポイント応答からの回復に重要である

NPR1を破壊すると $\Delta siw14$ 株のカフェイン感受性は抑圧される



プロテインキナーゼ Npr1:

図3 栄養が豊富な条件化では、転写活性化因子Gln3を負に制御し、その標的遺伝子の発現を阻害することが報告されている。

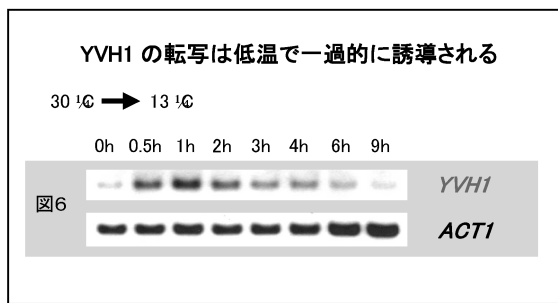
PPase破壊株で見られる表現型の原因であると考えた。もしこの予想が正しければ、PPaseと基質を共有するPKase遺伝子を破壊すれば、PPase破壊株が示す表現型が抑圧されると期待される。この考えが正しいかどうかを、カフェイン感受性 (Cafs) を示すsiw14破壊株とppz1破壊株を対象に、破壊が致死でない102種のPKaseとの二重破壊株を網羅的に作製して調べた。その結果、siw14については npr1破壊変異が（図3）、またppz1については、sat4 と hal5 の2つの破壊変異が、Cafsを抑圧することを見出した。これらの結果と、これまでに NPR1について知られている事実より、Siw14は Npr1と、また、Ppz1

とは報告されている。しかし、DNA損傷応答における機能についてはほとんど知られていない。そこで、DNA損傷時のPph3の機能解析を行ったところ、MMS処理後のDNA複製の再開に遅延が見られること、Rad53の脱リン酸化が野生型株に比べて著しく遅れることを見出した。これらの結果より、Pph3はRad53のリン酸化状態を直接、あるいは間接的に制御することにより、DNA損傷時のチェックポイント応答の不活性化において重要な働きをしていることが明らかとなった。

iii) Yvh1の機能解析（6）

既にyvh1遺伝子破壊株が低温感受性増殖を示すことを述べた。YVH1転写物を解析したところ、低温で一過的に転写誘導が起こることが明らかになり、Yvh1は低温での増殖に重要な役割を持つPPaseであることがわかった（図6）。S. cerevisiaeのYVH1遺伝子はワクシニアウィルスに存在するDual-Specificity PPase 遺伝子YVH1のyeastホモログ遺伝子(Yeast Vaccinia virus H1 gene)として同定された。yvh1遺伝子破壊株では30℃での増殖、胞子形成頻度やグリコーゲンの蓄積に低下が見られることから、Yvh1は複数の細胞機能に関与すると考えられている。しかし、その基質や制御因子は明らかになっていない。Yvh1をbaitとして two-hybridスクリーニングを行った結

果、zebrafishにおいて初期発生に必要なpescadillo遺伝子のyeastホモログ遺伝子として同定されていた必須遺伝子Yph1 (Yeast Pescadillo Homolog 1) のC末端側領域をコー



ドするcDNAを2種類取得した。2つのタンパクの結合領域をtwo-hybrid法により解析したところ、Yph1のBRCTモチーフがYvh1の活性触媒領域と結合することがわかった。Yvh1の活性触媒領域がYph1と結合することから、Yph1がYvh1の基質タンパク質である可能性が考えられたが、リン酸化タンパク質ではなかった。次に、yvh1破壊株の低温感受性を抑圧する優性の抑圧変異を得た。原因遺伝子をクローン化したところ、mRNAのターンオーバーに関係するMRT4遺伝子の変異(MRT4-500と命名)であることがわかった。MRT4-500優性変異は、Dyvh1株の胞子形成欠損を完全に回復した。

iii) SIT4のテロメア機能への関与(7)

真核生物のテロメア機能にPPaseが関与しているか否かを明らかにするため、全PPase遺伝子破壊株のテロメア関連表現型を解析した。その結果、sit4破壊株においてテロメア長が短くなっていること、サブテロメア領域のサイレンシングに欠損が見られること、Sir3タンパクのリン酸化が亢進していること、核小体に構造異常が見られること、sgs1変異株と同様寿命が短くなっていることが見い出された。これらの結果より、Sit4が芽酵母のテロメア機能に関与していることが示唆された。

〈国内外での成果の位置づけ〉

ヒトをはじめとするいくつかの高等真核生物においてゲノムが明らかにされ、数百のPPaseが存在することが推定されている。本研究は、そうした高等生物におけるPPaseの機能を明らかにするための先駆的な研究と位置づけられるものである。その意味で、新しく得られた個別の知見は高等生物におけるPPaseの機能を考察する上で有用な知見となるであろう。また、PPaseとペアで働くPKaseを同定するため、PPaseと全てのPKaseとの二重破壊株を構築するアプローチが有効であるなど、新しい方法論を提示できたことから、本研究は、PPaseとPKase関連学問分野に有意な貢献ができたものと思っている。また、上記のPPase Pkase二重破壊株や、全ての組み合わせのPPase二重破壊株シリーズは世界のどこにも無いリソースである。外国を含むいくつかの研究室からのリクエストに答えて、分譲を行っている。これらのことより、ゲノムサイエンスの基盤として重要な「リソース」という面からも、PPase関連分野の進展にいくばくかの貢献ができたものと思っている。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

研究を進める論理的な面では予想外の困難はなかった。ただ、PPaseとPKaseの全ての組み合わせの二重破壊株の作成ができなかったなど実際の面での困難はあった。その主たる理由は、研究費の関係で、博士研究員を雇用

することができなかったためと考えている。また、網羅的な研究から多くの表現型を発見したが、個別の深い研究になるとどうしても研究のスピードが低下した。ここでも博士研究員の雇用が必要不可欠と思われる。

〈今後の課題〉

1) PPase機能の網羅的な解析

全てのPPaseとPKaseの二重破壊株を網羅的に構築し、その表現型を解析する。こうした解析によって、全てのPPaseとPKaseについて、基質を共有するPPaseとPKaseのペアを同定することを目指す。その成果は、PPaseの新しい機能の発見に結びつくだけでなく、PKaseの機能についても新規な知見をもたらすものと考えている。

2) PPase機能の個別の解析

PPZ1, SIW14の機能解析：ppz1, siw14破壊株におけるGln3のリン酸化状態を解析し、カフェイン感受性との関連をさらに強固にする。ppz1, siw14破壊株の発現プロファイルも利用して、カフェイン感受性をもたらすGln3の標的遺伝子を同定する。

YVH1の解析：60Sリボソームサブユニットの生合成や複製に必要なYph1(=Nop7)やmRNAのターンオーバーに必要なMrt4がYvh1と相互作用する事を見出した。Nop7は核小体に存在することが示されているので、Yvh1が、Nop7およびMrt4と複合体を形成することを証明し、Yvh1が、核小体でリボソームの生合成に関与している特異なPPaseであることを証明していく。

PPH3の解析：DNA障害チェックポイントの終結に欠損があることを明らかにしたので、DNA障害チェックポイントにかかわるRAD9, MEC1などの遺伝子との遺伝的相互作用を、二重変異株の作成を通して解析する。これには、pph3破壊株のMMS感受性を抑圧するPKaseの破壊変異についての情報を取り入れつつ研究を進める。

PPG1の解析：これまでほとんど研究されていないPPG1についても研究を行う。既に、ppg1破壊株がコンゴレッド、カルコフラワーに対して感受性を示すこと、またppg1破壊株において、細胞壁の糖タンパクをコードするCWP1遺伝子の転写が上昇することを見い出している。CWP1は、CWP2とTIR1とともに細胞周期のS/G2で転写される。そこで、ppg1破壊株では、細胞壁の障害シグナルによって細胞壁構成タンパクの遺伝子発現が誘導されるとの仮定のもとに、抑圧変異の分離や、ppg1破壊株ではCWP2やTIR1遺伝子の転写も上昇しているかを調べ、細胞壁障害シグナル伝達系の存在とPPG1の関与について解析を行う。

PTP2の解析：PTP2の単独破壊株は、コンゴレッドに感受性を示すことが知られていたが、本研究でカルコフラワーにも感受性を示すことを見いだした。これよりPtp2が細胞表層に関係するPPaseであることが推定される。さらに興味深いことに、ptp2 msg5二重破壊株で初めてCaCl2感受性の表現型を示すことを見い出した。Ptp2はチロシンホスファターゼであるのに対し、Msg5はセリン-スレオニン-チロシンのいずれでも脱リン酸化する可能性のあるdual-specificity PPaseである。この事実は、異なるファミリーに属するPPaseの間で機能重複がある面白い可能性を示している。この可能性を基質の同定によって追求していく。

PTC2の解析：ptc2 msg5二重破壊株で、初めてNaClおよびCaCl2に感受性を示すことを見いだした。Ptc2については、Ptc1/Ptc3、Ptp2/Ptp3とともにHog1を脱リン酸化して、浸透圧シグナル伝達系を負に制御することが知られている。しかし、上記の表現型より、Ptp2同様、細胞表層にも関係することが示唆される。Ptc2の多機能性

を、two-hybrid法によるパートナー同定の観点から証明していく。また、同じMsg5との組合わせであるのに、ptp2破壊はCaCl₂のみに感受性を、ptc2破壊は、NaClおよびCaCl₂の両者に感受性を示す。このメカニズムを、Ptp2とPtc2のキメラタンパクを作製することを通して明らかにしていく。

SIT4の解析：sit4破壊株は著しく増殖遅延を示す。またsit4変異株は、細胞周期のG1からSへの進行、テロメア機能、カリウムの排出、TATA結合タンパクのプロモータへの結合、非発酵性基質の資化、ユビキチン依存性タンパク分解など多様な細胞生理にかかわっている。本研究で、sit4破壊株が、ハイグロマイシンに感受性であることを見出したので、これを指標に抑圧変異を分離するとともに、この表現型を抑圧するPKaseの変異を同定する。こうした解析によって、PPaseの中でも多彩な生理機能に関係しているSit4の特殊性に迫る。以上の網羅的、個別的な解析を統合して、出芽酵母のPPaseがかかわる細胞機能についての全貌を表現する細胞図を描く。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

1 .0602072347

原島 俊、ポストゲノムのフロントランナー、出芽酵母ゲノムゲノム研究の現状、化学と生物、40:738-748 (2002)

2. 0602072323

Harashima S, Kaneko Y.

Functional genomics of protein phosphatase genes in budding yeast, Tanpakushitsu Kakusan Koso. 46(16 Suppl):2414-2428 (2001).

3. 0201260037

Sakumoto N., Matsuoka, I. Mukai, Y., Ogawa, N., Kaneko, Y., Harashima, S. A series of double disruptants for protein phosphatase genes in *Saccharomyces cerevisiae* and their phenotypic analysis. *Yeast*, 19:587-599 (2002).

4. 0601300115

Auesukaree C, Tochio H, Shirakawa M, Kaneko Y, Harashima S. Plc1p, Arg82p, and Kcs1p, enzymes involved in inositol pyrophosphate synthesis, are essential for phosphate regulation and polyphosphate accumulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*. 280, 25127-25133 (2005).

5. 0601300121

Auesukaree C, Homma T, Tochio H, Shirakawa M, Kaneko Y, Harashima S. Intracellular phosphate serves as a signal for the regulation of the PHO pathway in *Saccharomyces cerevisiae*.

J Biol Chem. 279(17):17289-17294 (2004)

6. 0201260024

Sakumoto N., Yamashita, H., Mukai, Y., Kaneko, Y., Harashima, S. Dual-specificity protein phosphatase Yvh1p, which is required for vegetative growth and sporulation, interacts with yeast pescadillo homolog in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun*. 289:608-615 (2001)

7 .0601282306

Hayashi, N., Nomura, T., Sakumoto, N., Mukai, Y., Kaneko, Y., Harashima, S., Murakami, S. The SIT4 gene, which encodes protein phosphatase 2A, is required for telomere function in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.*, 47: 359-367 (2005).