

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24570195

研究課題名(和文) プロテインフォスファターゼ関連因子の組織的探索と新規染色体機能制御機構の解析

研究課題名(英文) Systematic screening of genes interacting with protein phosphatases and analysis of their new mechanism for chromosome function.

研究代表者

中世古 幸信 (NAKASEKO, Yukinobu)

京都大学・生命科学研究科・准教授

研究者番号：30231468

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：タンパク質は細胞内で機能する際に様々な修飾を受けてその機能が調節される場合が多く知られている。中でもリン酸化、脱リン酸化反応は、非常に多くのタンパク質が受ける修飾の一つであり、それらのタンパク質の活性自体、あるいは他の分子との相互作用に関与する事が示されてきた。本研究では分裂酵母を材料とした網羅的遺伝学的アプローチを用い、タンパク質脱リン酸化酵素と機能的に相互作用する遺伝子を複数同定し、その遺伝子を解析した。

研究成果の概要(英文)：Many proteins are known to have various modifications for functional regulation in the cell. Among them, phosphorylation/dephosphorylation is one of the major modifications that regulates activity of protein itself or interactions with other molecules. In this study, multiple genes that functionally interact with the protein phosphatases were identified and analyzed by a comprehensive genetic approach using fission yeast.

研究分野：分子生物学

キーワード：染色体構築 染色体機能 染色体分配

1. 研究開始当初の背景

(1) タンパク質は細胞内で機能する際に様々な修飾を受けてその機能が調節される場合が多く知られている。中でもリン酸化、脱リン酸化反応は、非常に多くのタンパク質が受ける修飾の一つであり、それらのタンパク質の活性自体、あるいは他の分子との相互作用に関与する事が示されてきた。特にリン酸化反応については、例えば多くのガン化を引き起こす因子がリン酸化酵素である等、多くの知見が分子レベルで解析され、解明されている。しかしながら脱リン酸化反応については、リン酸化反応と比較するとまだまだ不明な点が多い。この原因はリン酸化反応と比較すると、基質調整等の生化学的解析が困難な点が挙げられる。脱リン酸化の解析には、生化学的手法が不可欠であるが、それ以外の手法を組み合わせる事で、より多くの情報を得る事が可能と考えられる。そこで本研究では研究の開始点として、ポストゲノム的手法を組み合わせた新規遺伝学的アプローチを用い、タンパク質脱リン酸化反応に関与する遺伝子間機能ネットワークの理解としてこの問題に取り組む事を考えた。

(2) プロテインフォスファターゼのうち、1型はグリコーゲン代謝や細胞周期制御、2A型は細胞形態や細胞周期制御に関与するのに対し、2C型についてはストレス応答制御への関与が示されている事が複数の報告でなされている。これらの事象は染色体機能制御にも深く関与すると考えられる。これらの解析において、その機能制御機構には触媒サブユニットの存在に加えて、多くの異なる種類の制御サブユニットが存在する例が見いだされている。プロテインフォスファターゼはプロテインキナーゼに比べて触媒サブユニットの分子種が極めて少ないため、未知の制御サブユニットがさらに多くの染色体機能制御機構に関与する事が十分予想される。そこで、これらの触媒サブユニットを制御する因子、ならびに基質因子を網羅的に同定すれば、それらが形成するタンパク質複合体としてのプロテインフォスファターゼの新たな活性制御機構、並びに新たな標的因子を見いだす事が可能となると考えられた。

2. 研究の目的

プロテインフォスファターゼはプロテインキナーゼに比較して触媒サブユニットの分子種が少なく、これまでの解析から触媒サブユニットについてはほぼ全ての遺伝子が同定されたが、その機能を制御する種々の制御因子、ならびにそれらの制御機構は明らかではない。また脱リン酸化の基質因子についても多くのものが同定されていない。本研究では、プロテインフォスファターゼ群の制御因子ならびに基質因子を網羅的に同定することにより、細胞増殖制御におけるタンパク質のリン酸化/脱リン酸化の作用機序を脱

リン酸化に焦点を置いて解明する。実際に行なう解析は、遺伝学的手法によるプロテインフォスファターゼと機能的に相互作用する遺伝子の網羅的探索、ならびに同定した遺伝子についての他の遺伝子との機能的ネットワークの解析の2点である。これらの結果を基に、プロテインフォスファターゼの機能を制御する因子ならびに基質因子についてバイオインフォーマティクスの解析の基礎となるデータを集積する。最終的にはそれらの因子群の遺伝子機能を解明し、個々のプロテインフォスファターゼの作用機序を遺伝子ネットワークとして分子レベルで明らかにするのが本研究の目的である。

3. 研究の方法

脱リン酸化反応の解析には生化学的解析が不可欠であるが、これらの解析に加えて遺伝学的手法を導入する事で新たな因子の同定を試みた。また、なるべく多くの情報を得るために遺伝子全体を網羅的に探索するアプローチが必要であると考えた。そこで、分裂酵母をモデルとした遺伝学的アプローチを採用した。分裂酵母は上記の3種のプロテインフォスファターゼ触媒サブユニットのアミノ酸配列が真核生物を通じて広く保存されている事から、相互作用する遺伝子についてもアミノ酸配列、作用機序共に保存されていると考えられる。また、基礎となる材料としては、分裂酵母ランダム変異株ライブラリーを用いた。この変異株ライブラリーは分裂酵母高温感受性株をランダムに分離した、つまり表現型による選択をかけていない変異株の集団であるという特色を持つ。また変異株ライブラリーは約1000株からなり、全て高温感受性である事から分裂酵母の生育に必須な遺伝子のほとんどを網羅していると考えられる。このライブラリーの変異株の一株ずつに上記のプロテインフォスファターゼ触媒サブユニット遺伝子を導入し、まずその変異株の生育に与える影響を解析する。次に生育に影響が見られた変異株について変異遺伝子の特定、ならびにサプレッサー遺伝子の特定を行なう。ここで述べるサプレッサー遺伝子は遺伝子の増量によるサプレッサー遺伝子(多コピーサプレッサー)である。すなわち、変異遺伝子、サプレッサー遺伝子共に変異株の高温感受性を相補するプラスミドとして同定される。これらの同定された遺伝子はプロテインフォスファターゼ増量により生物学的な効果が認められる事から、プロテインフォスファターゼの機能に密接に関連するものと考えられ、機能調節因子、あるいは基質因子等の候補と期待される。一連の解析をライブラリー中の全ての変異株について行ない、より多くの情報を蓄積することにより、これまで同定されていなかった遺伝子間の機能的ネットワークを見いだすことが期待される。

4. 研究成果

(1)変異株ライブラリーの変異株 1 株ずつについて、基本的に以下に述べる 3 種の遺伝子についてスクリーニングを行なった。プロテインフォスファターゼ触媒サブユニットをコードする遺伝子として、1 型プロテインフォスファターゼとして、Dis2 を、2 型プロテインフォスファターゼとして、Ppa2(2A 型)、Ptc1(2C 型)を用いてスクリーニングを行なった。これらの遺伝子を他コピープラスミドにより変異株に導入し、個々の変異株の生育状況を調べた結果、生育を回復する変異株が複数得られた。まず全体として Ptc1 を用いたスクリーニングでは多くの候補変異株が得られたのに対し、不思議な事に Dis2 および Ppa2 により顕著に生育を阻害あるいは回復する変異株は見いだせなかった。推測される理由としては 2C 型と比較して、1 型あるいは 2A 型プロテインフォスファターゼは多くの調節因子が報告されており、触媒サブユニットの増量だけでは生物学的な効果を起こすような脱リン酸化活性の変動は見込めないのかも知れないという事が考えられる。あるいは後者の 2 つは極めて相同性の高いパラログがそれぞれ 1 コピー存在する事で、プラスミドの導入のより、別の制御機構が新たに協調的に働く可能性も考えられる。試みに、1 型、および 2A 型についてはこれまでに知られている制御サブユニットを共発現する系を作成したが、予備的なスクリーニングでは候補となる変異株は同定できなかった。

(2)Ptc1 については多くの候補変異株が同定され、それらの遺伝子の解析も多数行なった。遺伝子についてはその変異遺伝子の情報に加え、他コピーサプレッサー遺伝子の情報を加える事によりさらに多くの候補遺伝子が同定された。それらの遺伝子群の解析を進めた結果、機能的に大別して 4 つのグループが見出された。まず 1 番目のグループとして MAP キナーゼ Sty1/Spc1 変異関連株を同定した。MAP キナーゼはこれまでにストレス応答に重要な機能を果たす遺伝子として報告されており、Ptc1 との関連も報告されているため新規の知見ではないが、スクリーニングの有効性を指示している事が確認できたと考えている。さらにそれらの株の中には Ptc1 以外の 2C 型プロテインフォスファターゼや Rab ゲラニルゲラニル転移酵素エスコートタンパク質で相補されるものを見いだした。これらの結果は MAP キナーゼ経路と Ptc1 以外のプロテインフォスファターゼ、ならびに後述のプレニル化反応関連因子との機能的関連を示唆する結果である。2 番目のグループとして Rab ゲラニルゲラニル転移酵素エスコートタンパク質に変異を持つ株を同定した。これらの株についても Ptc1 以外に、ファルネシルピロリン酸合成酵素や未同定の Rab ゲラニルゲラニル転移酵素アルファサブユニ

ット、ゲラニルゲラニル転移酵素、亜鉛フィンガータンパク質、Ptc1 以外の 2C 型プロテインフォスファターゼ等の遺伝子がサプレッサー遺伝子として相補する事を見いだした。3 番目のグループとしてファルネシルピロリン酸合成酵素変異株を同定した。これらもまた Ptc1 以外にも既知のゲラニルゲラニル転移酵素や未同定 Rab ゲラニルゲラニル転移酵素アルファサブユニット、等の遺伝子がサプレッサー遺伝子として相補する事を見いだした。4 番目のグループとして Spr18 変異株を新たに同定した。Spr18 は SMC5/6 複合体のサブユニットで、染色体の構築や DNA 修復等の各機能に必須なタンパク質である。Spr18 変異株からはいずれも上述のプレニル化関連の遺伝子との機能相互作用は観察されなかったがトポイソメラーゼとの相互作用が観察された。以上の結果から、上述の 4 グループの変異株群はいずれも Ptc1 と機能相互作用するが、最初の 3 グループについては Ptc1 以外にも共通する遺伝子が見いだされた事から、これら 3 グループ間の機能相互作用の存在が新たに示唆された。また共通に見出された遺伝子群がタンパク質のプレニル化反応に関与する遺伝子が多い事は、イソプレノイドによる未知の制御機構が 2C 型プロテインフォスファターゼの機能に関与している事が示唆される。それに対して Spr18 は Ptc1 以外に共通な遺伝子が見いだされないことから、それらとは別の経路により生体内で機能する事が示唆された。Spr18 の変異株についてはさらに解析を進め、Ptc1 だけでなく他の複数のプロテインフォスファターゼによっても、異なる相補性を示しながら相補される事を明らかにした。また逆反応を司るプロテインキナーゼについても解析を進め、プロテインキナーゼの増量により生育が阻害されること、ならびにキナーゼ活性のみ無くした点変異で阻害効果は見失われる事を見出した。この事はリン酸化、脱リン酸化反応が SMC5/6 の機能に直接関与する事を示唆している。またプロテインキナーゼについてはプロテインフォスファターゼのように複数の遺伝子による相補は見られなかったため、SMC5/6 の特異的なリン酸化部位が機能制御に効果がある事が示唆された。

(3)以上の結果から、分裂酵母突然変異株ライブラリーを用いたスクリーニングにより、プロテインフォスファターゼに機能的に関連する因子についてこれまでに報告されていなかった候補遺伝子とそれらの機能について新たな情報を得る事ができた。また多くの遺伝子について網羅的にスクリーニングできるという点においても効率の良い方法であると考えられる。したがってこれらの知見は生化学的な知見に加えて、異なる視点で行なえる解析という点でプロテインフォスファターゼの解析には有効なアプローチのひとつと考えられる。今後これらの遺伝子が

どのような機構でプロテインフォスファターゼの機能に関連するのかが大変興味深い。今回同定されて遺伝子がプロテインフォスファターゼ調節因子であるのか、あるいは基質因子であるのか等の解析が重要と考えられる。そのためには遺伝子同士の物理的相互作用の解析やフォスファターゼ活性の測定、活性変化の測定等の生化学的解析が不可欠となる。本研究で同定された機能グループのうち、多くはプレニル化反応に関与するものであった。プレニル化反応は主にタンパク質の膜への局在に重要である事がこれまでに示されてきたが、上記の結果はリン酸化/脱リン酸化反応との関連を強く示唆しており、タンパク質の膜への局在機構の調節にプロテインフォスファターゼの関与があるとすれば興味深い。また、プレニル化反応には現在3種類の酵素の存在が知られているが、いずれの酵素も今回のスクリーニングで同定されている点はプレニル化反応とリン酸化/脱リン酸化反応の接点がひとつの遺伝子ではなく、複数存在する事を示しているかも知れない。さらに、プレニル化反応はRasタンパク質によるがん化の進行やマラリア、トリパノソーマ等の感染にも関わる事が示されている事から、プロテインフォスファターゼもこれらの現象に関与しているのかも知れない。

(2)研究分担者 無し

(3)連携研究者 無し

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計1件)

Nakamura T., Pluskal T., Nakaseko Y. and Yanagida M. Impaired coenzyme A synthesis in fission yeast causes defective mitosis, quiescence-exit failure, histone hypoacetylation and fragile DNA. *Open Biology* 査読あり, 2(9), 2012, 120117
DOI:10.1098/rsob.120117

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

該当無し

6. 研究組織

(1)研究代表者

中世古 幸信 (NAKASEKO, Yukinobu)

京都大学・生命科学研究科・准教授

研究者番号: 30231468