

平成22年5月10日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007～2009

課題番号：19380193

研究課題名（和文） 出芽酵母プロテインホスファターゼの機能ゲノム科学

研究課題名（英文） Functional genomics of protein phosphatases in yeast

研究代表者

原島 俊 (HARASHIMA SATOSHI)

大阪大学・工学研究科・教授

研究者番号：70116086

研究成果の概要（和文）：出芽酵母のプロテインホスファターゼ（PPase）の機能を明らかにするプロジェクトの一環として、Siw14、Yvh1、Ptp2、Msg5 の4つのPPaseの機能を解析した。Siw14については、転写因子Gln3の細胞内局在と転写活性化能の制御メカニズムを、Yvh1については、rRNAのプロセッシングとmRNAの安定性への関与を、またPtp2とMsg5については、カルシウム感受性を制御しているメカニズムを明らかにした。また、32種の非必須PPaseの全ての破壊株の発現プロファイルのピアソン解析によって、これまで明らかにされていないいくつかの新しい表現型を見出した。

研究成果の概要（英文）：We have been engaged in a project to explore the function of all the protein phosphatases in *S. cerevisiae*. As a part of this project, we have investigated in this study the function of four protein phosphatases, Siw14, Yvh1, Ptp2 and Msg5. We have revealed that Siw14 regulates localization and activity of transcriptional activator Gln3 and Yvh1 is involved in mRNA stability as well as rRNA processing. We have also clarified a mechanism by which Ptp2 and Msg5 are involved in calcium response in redundant manner.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	6,700,000	2,010,000	8,710,000
2008年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
2009年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
年度			
年度			
総計	15,000,000	4,500,000	19,500,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学・応用分子細胞生物学

キーワード：プロテインホスファターゼ、酵母、リン酸化・脱リン酸化、プロテインキナーゼ、核局在

1. 研究開始当初の背景2

どのような生命現象であれ、その生命反応を惹起する方向（感作）とそれをもとに戻す

方向（脱感作）のペアとなった反応が必要である。この正負の両反応が精密にコントロールされてこそ、生命の営みは破綻をきたさず

に進行する。タンパク質の「リン酸化・脱リン酸化」は、そうした可逆的な細胞機能制御様式の代表的なものである。リン酸化はプロテインキナーゼ (PKase)、脱リン酸化はプロテインホスファターゼ (PPase) によって行われる。ゲノム解析から、ヒトやアラビドプシスでは数百のPKaseやPPaseの存在が明らかにされている。これらのPKaseやPPaseが、それぞれの生物の細胞の中で、どのような働きをしているかを網羅的に明らかにするプロジェクトは、その制御機構が普遍的であるが故に、生命を理解するための一大プロジェクトのひとつであろう。これからの生命科学は、生命現象に重要な遺伝子やタンパク質の個々の機能を明らかにするとともに、全体像の理解が必要不可欠である。網羅的、系統的な解析から得られる知見は、これまでの個別で断片的な研究の積み重ねとは違った次元の生命に対する理解を我々に与えてくれるに違い無い。そこで、申請者らは、このような生命の全体像を明らかにする研究を、代表的な真核リファレンス生物である出芽酵母を材料に、PKaseに比較して研究が遅れているPPaseを対象に行うことを計画した。

本プロジェクトを開始した当初、出芽酵母には少なくともPKaseが117個、PPaseが32個知られていた。そこで、申請者らは、それらのPPaseを対象にして、その単独破壊株 (32通り) や全ての組み合わせの二重破壊株 (435通り) を網羅的に構築し、系統的な表現型解析から、PPaseが関与する細胞生理を明らかにしてきた。本研究は、そうした研究成果を踏まえ、出芽酵母 PPase についてのゲノム機能科学研究をさらに発展させようとするものであり、その最終目標は、出芽酵母が持つ全てのPPaseの機能を明らかにし、脱リン酸化による細胞機能制御の全体像を明らかにすることにある。

2. 研究の目的2

既述のように、ヒトを始めとする高等動植物が持つ数百のPPaseは、進化の時間軸で、より古い酵母などの下等真核生物のPPaseから分岐したものである。従って、真核リファレンス生物である出芽酵母のPPaseによる細胞機能制御の全体像を明らかにすることは、ヒトを始めとする高等動植物におけるPPase 機能の全体像の理解に資する知見と

なることが期待される。また、個別のPPaseについての知見は、基礎生命科学においてはシグナル伝達による細胞の応答機構の理解、発生・分化など高次の生命現象の理解、医学や医療においては疾病の原因、発症のメカニズムや病理の理解、工業や農業などの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の理解、代謝工学による有用物質の生産への展開など幅広い応用が期待される。本研究では、4つのPPase (Siw14, Yvh1, Ptp2, Msg5) を対象に個別の分子生物学的研究を実施するとともに、全てのPPaseを対象にしたゲノム科学的な研究も行った。

3. 研究の方法2

研究は、網羅的、系統的というゲノム科学の手法を適用して全体像の理解に努めつつ、同時に、それぞれのPPaseの個別の機能を分子生物学的な解析法で明らかにするという欲張った方法論で進めた。

4. 研究成果2

(1) チロシンホスファターゼSiw14の機能解析2

PPase 破壊株の網羅的な表現型によって、これまでに報告のあった $\Delta ppz1$ 株に加え、新しく $\Delta siw14$ 株もカフェイン感受性 (Caf^s) を示す事を見出した。PPZ1は細胞周期制御、イオンホメオスタシスで働くことが知られている。カフェインはすべての真核生物によく保存されているMAP Kinase (MAPK) 経路など、重要な細胞生理に影響を及ぼす事が報告されている。そこで、本項目では、真核生物におけるカフェイン応答メカニズムについて基本的な理解を深めるため、以下のような研究を行った。

①2プロテインホスファターゼ Siw14 は、プロテインキナーゼ Npr1 と共に転写活性化因子 Gln3 の細胞内局在を制御する2

$\Delta ppase$ 株では、リン酸化型基質の過剰な蓄積、あるいは非リン酸化型基質の不足が起こっており、この現象が表現型の原因であると考えた。もし、そうであれば、PPaseと基質を共有するPKaseを破壊すれば、表現型が抑圧される可能性があるだろう。そこで、SIW14と102種の非必須PKase遺伝子との二重破壊

株を作成し、その破壊が Caf^s を抑圧する PKase 遺伝子をスクリーニングしたところ、*NPR1* の破壊によって Caf^s が抑圧される事を見出した。Npr1 は、リン酸化転写活性化因子 Gln3 の活性を制御することが知られていたため、次に、*GLN3* の破壊による影響を調べた。その結果、 Δ *siw14* 株の Caf^s は *GLN3* の破壊によっても抑圧された。これらの結果より、 Δ *siw14* 株が Caf^s を示すには、Gln3 が必要であることがわかった。

次に、Gln3 がどのようなメカニズムで Δ *siw14* 株の Caf^s に関与しているかを明らかにするため、Gln3 の局在とリン酸化状態との関連を調べた。Gln3 は、窒素源豊富な培地で培養した野生型株では細胞質に局在することが知られている。しかし、 Δ *siw14* 株では核内に蓄積し、この核内蓄積は *NPR1* の破壊によって抑圧された。また、Gln3 のリン酸化レベルは、*SIW14* や *NPR1* の破壊によって減少した。これらの結果より、Siw14 は、Npr1 と共に Gln3 の細胞内局在を制御し、 Δ *siw14* 株の Caf^s は、Gln3 の核内への蓄積が原因であると考えられた。

②2 プロテインホスファターゼ Ppz1 とプロテインキナーゼ Sat4 または Hal5 も、リン酸化を制御する事によって Gln3 の細胞内局在を調節する 2 2

Δ *siw14* 株と同様、その破壊によって Δ *ppz1* 株の Caf^s を抑圧する PKase をスクリーニングした結果、*SAT4* 又は *HAL5* の破壊を導入する事で、 Δ *ppz1* 株の Caf^s が抑圧される事を見出した。また、*SAT4* もしくは *HAL5* 遺伝子の破壊によって、 Δ *ppz1* 株が示す NaCl 耐性や、NaCl 添加時における *ENAI* (P-type Na⁺-ATPase) 遺伝子の発現上昇も抑圧された。 Δ *ppz1* 株における *ENAI* 遺伝子の発現上昇は、カフェイン添加時にも見られることを見出したが、その発現上昇も *SAT4* もしくは *HAL5* の破壊によって抑圧された。これらの結果より、 Δ *ppz1* 株が示す Caf^s と NaCl 耐性には関連があることが示唆された。

ENAI 遺伝子は、Gln3 によって発現が制御される事が知られている。そこで、次に、カ

フェインまたは NaCl 添加時に Δ *ppz1* 株が示す *ENAI* 遺伝子の発現上昇が、Gln3 依存的であるか否かを調べたところ、これらの表現型も、*GLN3* の破壊によって抑圧された。そこで、Gln3 の局在とリン酸化状態に及ぼす *PPZ1* 破壊の影響を調べた結果、Gln3 は、 Δ *ppz1* 株で核内に蓄積し、この核内蓄積は *SAT4* または *HAL5* の破壊によって抑圧された。また、Gln3 のリン酸化レベルは、*PPZ1*、*SAT4* や *HAL5* の破壊によって減少した。以上の結果より、 Δ *ppz1* 株が Caf^s を示すには、Gln3 が必要であることが示唆された。しかし、予想に反して、 Δ *ppz1* 株の Caf^s は、*GLN3* の破壊によって抑圧されなかった。 Δ *siw14* Δ *ppz1* 株は、それぞれの単独破壊株よりも、カフェインに対する感受性が加算的に強くなった事から、Ppz1 と Siw14 はカフェイン応答において異なる経路で働いていると考えられた。

③2 転写活性化因子 Gln3 の細胞内局在及び転写活性化能を制御するリン酸化部位の同定 2 2 2

Gln3 は、通常、高リン酸化状態で細胞質に存在するが、Caf またはラパマイシン (以下 Rap) を添加するとリン酸化状態が低下して核に移行し、標的遺伝子群の発現上昇を引き起こす。 Δ *siw14* 破壊株では、Gln3 のリン酸化レベルが野生型株に比べて低下し核に局在しており、Caf を添加するとこのリン酸化状態はさらに低下し、これに応じて、標的遺伝子群の発現量が増加する。

一方、 Δ *siw14* Δ *npr1* 二重破壊株では Caf 添加の有無にかかわらず、Gln3 は細胞質に留まり、この時 Gln3 のリン酸化状態は Δ *siw14* 破壊株と同様なレベルに低下していた。Gln3 のリン酸化レベルが同じであるにもかかわらず、 Δ *siw14* 破壊株と Δ *siw14* Δ *npr1* 二重破壊株で Gln3 の細胞内局在や転写活性化能に違いがあることから、Gln3 は複数のリン酸化部位を有し、それぞれのリン酸化部位が細胞内局在と転写活性化能を制御するのではと考えた。しかし、Gln3 のリン酸化部位は明らかにされておらず、また、そのリン酸化酵素や脱リン酸化酵素も同定されていない。そこで、次に、Gln3 の細胞内局在および転写活性化能を制御するリン酸化部位を特定することを試みた。その結果、他の研究者によ

って示唆されている Gln3 の核局在に必要なアミノ酸領域 (334-365) の 355 番目のセリン残基がリン酸化されると Gln3 は細胞質に局在し、脱リン酸化されると核に局在することを見出した。この結果より、Siw14 が Gln3 の Ser-355 のリン酸化状態を制御している可能性が示唆された。また、この 355 番目のセリン残基が、リン酸化されることによって Gln3 の転写活性化能が発揮される事も分かった。しかし、予想外にも、S355A、S355D 変異を持つ Gln3 は、どちらも野生型同様、Caf および Rap によって脱リン酸化されたため、355 番目のセリン残基は、どちらも重要なリン酸化部位ではあるが、Caf や Rap によって脱リン酸化される部位ではないことが示唆された。

そこで、Caf または Rap によって脱リン酸化される部位を同定するために、3 つに分割した Gln3 タンパク質のそれぞれを産生する株を構築し、Caf および Rap によるリン酸化状態を結果、Gln3 タンパク質の 301~509 番目のアミノ酸残基の中に Caf および Rap によって脱リン酸化される部位が存在する事が示唆された。

④ Gln3 の核局在と TOR 経路との関連性 2

Gln3 の細胞内局在は、3 つのメカニズムによって制御されていることが知られている。1 つ目は TOR (Target Of Rapamycin) キナーゼが Gln3 をリン酸化することで Gln3 を細胞質に隔離し、標的遺伝子群の転写を抑制している。2 つ目は Ure2 と呼ばれる調節因子が Gln3 と結合することで Gln3 の核への移行を抑制している。3 つ目は PPase Sit4 が活性化されることで、おそらく Gln3 が脱リン酸化され、Gln3 と Ure2 の結合が解離し、その結果 Gln3 が核に移行して標的遺伝子群の転写が活性化されるメカニズムである。そこで、Siw14 と Gln3 の制御に関わる因子 Tor1、Ure2 および Sit4 との関連性を Gln3 のリン酸化レベル、細胞内局在、転写活性化能を指標にして調べた。その結果、i) Siw14 は TOR キナーゼによるメカニズムとは異なるメカニズムによって Gln3 の細胞内局在を制御していること、ii) Sit4 は Gln3 の細胞内局在ではなく、転写活性化能を制御していること、iii) Siw14 は、形成された Gln3-Ure2 複合体を維持するために機能している可能性が示唆された。Gln3、Ure2 とともにリン酸化タンパ

ク質であり、2 つのタンパク質のリン酸化レベルが高いと複合体を形成し、リン酸化レベルが減少すると複合体が解離すると考えられている。しかし、Siw14 は PPase であり、破壊すると基質のリン酸化レベルは上昇すると考えられるので、Gln3 は直接の基質ではない。従って、Siw14 による Gln3 のリン酸化の制御には仲介する PKase が存在することが考えられる。Gln3 の 355 番目のセリン残基がリン酸化されると Gln3 は細胞質に局在し、脱リン酸化されると核に局在することを見出したので、この結果は、この未同定の PKase が Siw14 とともに、Gln3 の Ser-355 のリン酸化状態を制御している可能性を示唆している。

(2) チロシン PPase PTP2、dual2 specificity PPase MSG5 の重複機能の解析 2

ptp2Δ msg5Δ 二重破壊株は、カルシウム感受性 (Ca1^s) を示す。この表現型を引き起こすメカニズムを明らかにするため、細胞周期の解析を行ったところ、i) G1 期から S 期への移行が遅れていることがわかった。また、発現プロファイルの解析より、ii) CLN2 の転写レベルが低下していること、iii) 細胞壁構築を制御する Slt2 経路の活性化、さらに iv) 液胞の断片化が起こっていることが明らかになった。これらの結果は、Ptp2p と Msg5p が、細胞周期、細胞壁構築、液胞の形態形成の複数の細胞生理において、重複した機能を持って重要な働きをしていることを示している。

Ptp2 と Msg5 の機能をさらに明らかにするため、*ptp2 msg5* 二重破壊株が示す Ca1^s を抑圧する PKase の破壊変異をスクリーニングした。その結果、 $\Delta bck1$ 、 $\Delta mkk1$ 、 $\Delta slt2/\Delta mpk1$ 、 $\Delta mck1$ 、 $\Delta ssk2$ and $\Delta yak1$ の 6 つの破壊変異を同定した。Bck1p、Mkk1p、Slt2p は、Slt2 経路の構成因子であり、Mck1p は、その下流の調節因子である。Ssk2p は、浸透圧応答経路の構成因子で、Yak1 は、cAMP-dependent PKA 経路の抑制因子である。いくつかの PKase の破壊変異が、抑圧変異となり得ることは、これまでに明らかにされている Slt2 経路以外にも、HOG、Yak1、Mck1 が関係する調節系が、カルシウム感受性に関係することを意味している。

(3) Dual-specificity PPase Yvh1の機能解析2

Yvh1pは、栄養増殖、胞子形成など多様な細胞生理に関与していることが知られている。Yvh1の機能をさらに明らかにするために、Yvh1破壊株が示す増殖遅延表現型の抑圧変異株を分離した。SVH1-1 (suppressor of $\Delta yvh1$ deletion)と命名した抑圧変異は優性であり、MRT4 (mRNA turnover) 遺伝子の変異で、68番目のグリシンをアスパラギンに置換させる変異 (MRT4(G68D)と命名) であることがわかった。興味深いことに、Yvh1破壊株で低下しているmRNAや成熟25S, 18S, and 5.8S rRNAの量、さらには35S rRNAの前駆体のプロセッシングが、 $\Delta yvh1$ MRT4(G68D)株では、完全に回復していた。さらに、MRT4(G68D)抑圧変異は、glycogenの蓄積や胞子形成の欠損表現型も抑圧した。yvh1破壊株でみられる胞子形成初期遺伝子IME2の発現低下も回復していた。しかし、胞子形成の初期遺伝子IME1の発現は野生型と同様なレベルであった。これらの結果より、Yvh1p がrRNA のプロセッシングに重要な働きをしており、また、IME1の転写後のプロセスに関与している可能性が示唆された。

(4) 発現プロファイルの比較による PPase の細胞内機能の推定 2

研究開始時に、316種の遺伝子 (RG:Reference Gene) の破壊株の発現プロファイルが公開されていた。そこで、全ての PPase 破壊株の発現プロファイルと316種のRG破壊株の発現プロファイルについて、ピアソンの相関解析を行うことにより、全 PPase の細胞内機能推定を行った。その結果、P (相関係数) >0.2 の時、32種のPPaseのうち26個の $\Delta ppase$ 破壊株が、それぞれ1から29個のRG破壊株と、正または負の相関を示すこと、また、合計350通りの相関を示す組み合わせがあることを見出した。そこで、RG破壊株と、その破壊株が正または負の相関を示したPPaseについて、RG破壊株で既知の表現型を、 $\Delta ppase$

株で実験的に調べた結果、いくつかの $\Delta ppase$ 株で、新規の表現型を見出すことができた。

5. 主な発表論文等2

(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4件)

1. Hermansyah, Laviña W, Sugiyama M, Kaneko Y, Harashima S. Identification of protein kinase disruptions as suppressors of the calcium sensitivity of *S. cerevisiae* Deltapt2 Deltams5 protein phosphatase double disruptant. *Arch Microbiol.* 2010 192(3):157-65.
2. Hirasaki M, Nakamura F, Yamagishi K, Numamoto M, Shimada Y, Uehashi K, Muta S, Sugiyama M, Kaneko Y, Kuhara S, Harashima S. Deciphering cellular functions of protein phosphatases by comparison of gene expression profiles in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biosci Bioeng.* 2010 109(5):433-41.
3. Hermansyah, Sugiyama M, Kaneko Y, Harashima S. Yeast protein phosphatases Ptp2p and Msg5p are involved in G1-S transition, CLN2 transcription, and vacuole morphogenesis. *Arch Microbiol.* 2009 191(9):721-33.
4. Hirasaki M, Kaneko Y, Harashima S. Protein phosphatase Siw14 controls intracellular localization of Gln3 in cooperation with Npr1 kinase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene.* 2008 15;409(1-2):34-43.

2

[学会発表] (計15件) 2

1. Walter Lavina, Hermansyah, 杉山峰崇, 金子嘉信, 原島 俊: 「Calcineurin & HOG pathway-independent suppression of the calcium sensitivity of the *ptp2* Δ *msg5* Δ protein phosphatase double disruptant by *ssk2* Δ disruption」、第32回日本分子生物学会年会、2009年12月、横浜
2. 沼本 穂、杉山峰崇、金子嘉信、原島 俊: 「出芽酵母プロテインホスファターゼ Siw14 は Gln3-Ure2 複合体の解離を抑制することで Gln3 の細胞内局在を制御する」、第32回日本分子生物学会年会、2009年12月、横浜
3. Walter Lavina, Hermansyah, Minetaka Sugiyama, Yoshinobu Kaneko, Satoshi

- Harashima Mechanism involved in the suppression of calcium sensitivity of *PTP2 Δ MSG5 Δ* protein phosphatase double disruptant by *ssk2* disruption. YEAST GENETICS AND MOLECULAR BIOLOGY NEWS JAPAN No.42 2009.7 つくば
4. 沼本 穂、平崎正孝、杉山峰崇、金子嘉信、原島 俊：「出芽酵母 Δ *Siw14* のカフェイン応答における Gln3 の転写活性と Cell wall integrity の影響」、第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会、2008 年 12 月、神戸
5. Masataka Hirasaki, Hermansyah, Minetaka Sugiyama, Yoshinobu Kaneko, Satoshi Harashima Functional Genomics of Protein Phosphatases in a Single Celled Eukaryote. 8th International Conference on Protein Phosphatases 2008.11 前橋
6. 沼本 穂、平崎正孝、杉山峰崇、金子嘉信、原島 俊：「出芽酵母脱リン酸化酵素 *Siw14* のカフェイン、ラパマイシン応答における機能」、日本生物工学会第 60 回大会、2008 年 8 月、仙台
7. 沼本 穂、杉山峰崇、金子嘉信、原島 俊：「出芽酵母プロテインホスファターゼ *Siw14* による転写因子 Gln3 の機能制御」、酵母遺伝学フォーラム第 42 回研究報告会、2008 年 7 月、つくば
8. Hermansyah, Minetaka Sugiyama, Yoshinobu Kaneko, Satoshi Harashima Double deletion of *PTP2* and *MSG5* genes encoding protein phosphatases causes a defect in vacuolar morphology in *Saccharomyces cerevisiae*. 2008 YEAST GENETICS AND MOLECULAR BIOLOGY MEETING. 2008.7 Toronto
9. Hermansyah、杉山峰崇、金子嘉信、原島 俊：「Protein kinases whose disruption suppress calcium sensitivity of protein phosphatase Δ *ptp2* Δ *msg5* double disruptant in *Saccharomyces cerevisiae*」、第 30 回日本分子生物学会年会第 80 回日本生化学会大会合同大会、2007 年 12 月、横浜
10. 平崎正孝、金子嘉信、原島 俊：「酵母プロテインホスファターゼ *Siw14* はプロテインキナーゼ *Npr1* と共に Gln3 の細胞内局在を制御する」、第 30 回日本分子生物学会年会第 80 回日本生化学会大会合同大会、2007 年 12 月、横浜
11. 杉山峰崇、酒井大樹、原島 俊：「出芽酵母プロテインホスファターゼ *Yvh1p* の欠失は 35S rRNA 前駆体の蓄積を引き起こす」、第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会合同大会、2007 年 12 月、横浜
12. 杉山峰崇、酒井大樹、原島 俊：「出芽酵母プロテインホスファターゼ *Yvh1p* の欠失は 35S rRNA 前駆体の蓄積を引き起こす」、酵母遺伝学フォーラム第 40 回研究報告会、2007 年 9 月、大阪
13. Hermansyah、杉山峰崇、金子嘉信、原島 俊：「Systematic screening of protein kinase gene disruption as suppressor for calcium sensitivity of *ptp2 msg5* protein phosphatase double mutation in *Saccharomyces cerevisiae*」、酵母遺伝学フォーラム第 40 回研究報告会、2007 年 9 月、大阪
14. 平崎正孝、金子嘉信、原島 俊：「プロテインホスファターゼ *Siw14* はプロテインキナーゼ *Npr1* と共に Gln3 の細胞内局在を制御する」、酵母遺伝学フォーラム第 40 回研究報告会、2007 年 9 月、大阪
15. Masataka Hirasaki, Yoshinobu Kaneko, Satoshi Harashima Protein phosphatase *Siw14* controls intracellular localization of Gln3 in cooperation with *Npr1* kinase in *Saccharomyces cerevisiae*. EuroPhosphatases 2007 2007.7 Aveiro (Portugal)
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
原島 俊 (HARASHIMA SATOSHI)
大阪大学・工学研究科・教授
研究者番号：70116086
- (2) 研究分担者
金子 嘉信 (KANEKO YOSHINOBU)
大阪大学・工学研究科・准教授
研究者番号：90161182
- (3) 研究分担者
杉山 峰崇 (SUGIYAMA MINETAKA)
大阪大学・工学研究科・助教
研究者番号：80379130