

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月23日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21510228

研究課題名（和文） 細胞極性を制御する多機能タンパク質複合体の構造と機能

研究課題名（英文） Structure and function of multifunctional protein complex regulating cell polarity

研究代表者

川崎 博史 (Kawasaki Hiroshi)

横浜市立大学・大学院生命ナノシステム科学研究科・准教授

研究者番号：70169704

研究成果の概要（和文）：

細胞の非対称分裂に代表される細胞極性は、様々な生命機能の発現の根幹にある重要な現象である。本研究では、出芽パターンの決定に関与する多機能タンパク質複合体（KEOPS/EKC複合体あるいはBud32複合体とも呼ばれている）の翻訳後修飾やタンパク質間相互作用の解析によって出芽酵母の細胞極性の決定機構を明らかにする。

Bud32 を欠損させるとランダムな部位から出芽が起こることは既に報告されていたが、複合体の構成タンパク質をコードする遺伝子の欠損株を用いた解析から、Bud32 を含む複合体が、出芽部位選択に関与することを明らかにした。出芽部位選択には、Bud32 のキナーゼ活性が必須であった。Bud32 は Sch9 によってリン酸化されるが、このリン酸化は、Bud32 複合体による出芽部位選択には関係していなかった。出芽部位のマーカーである Bud8 と Bud9 のうち、Bud9 を欠損させると、Bud32 複合体の欠損によるランダムな出芽が観察されなくなったので、Bud32 複合体は Bud9 の局在を制御していると考えられた。実際、Bud32 複合体の欠損株では、Bud8 の局在は正常であったが、Bud9 の局在は異常であった。Bud8, Bud9 の局在に関連している Rax2 の局在は、Bud32 複合体欠損株では正常であった。Split-GFP 法による細胞内での Bud8, Bud9 と Rax2 との相互作用を考慮すると、Bud32 複合体は、Rax2 と Bud9 との相互作用を制御していると考えられた。

研究成果の概要（英文）：

Cell polarization is a fundamental process by which cells establish asymmetry along a defined axis at a specific time point. The polarization generally occurs by an asymmetric distribution of specific proteins, nucleic acid or organelles in response to spatial cues. In the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*, such polarization induces asymmetric growth to form a bud which becomes the daughter cell. The deletion of *BUD32* causes a random budding specifically in diploid cells. Bud32p, an atypical kinase, is involved in a signaling cascade of Sch9p kinase, a yeast homolog of Akt/PKB. In this study, we revealed that the Bud32 complex is involved in bipolar budding by regulating the localization of Bud9p. The kinase activity of Bud32p, which is essential for the functions of the EKC/KEOPS complex, was also required for bipolar bud site selection. However, the mutation of Bud32p at the phosphorylation site by Sch9p did not affect bipolar budding. *BUD9* was necessary for random budding in the each deletion mutant of EKC/KEOPS components. The asymmetric localization of Bud9p was dependent on the complex, but Bud8p and Rax2p were not. *RAX2* was genetically upstream of *EKC/KEOPS* genes for the regulation of bipolar budding. Split-GFP analysis revealed that Bud9p physically interacted with Rax2p at the birth scar in budded mother cells. These observations suggest that the interaction of Rax2p with Bud8p and Bud9p may contribute to the translocation of bipolar landmarks to the correct sites. We concluded that the EKC/KEOPS complex is specifically involved in the regulation of Bud9p localization downstream of Rax1p/Rax2p.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成21年度	1,400,000	420,000	1,820,000
平成22年度	1,200,000	360,000	1,560,000
平成23年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：複合領域

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

キーワード：プロテオミクス

1. 研究開始当初の背景

酵母細胞において出芽部位選択は細胞極性が関係する重要な生命現象である。出芽酵母では、一倍体は一方の極から出芽し (Axial budding pattern)、二倍体は両方の極のいずれかから出芽する (Bipolar budding pattern)。いずれにおいても、Ras-like GTPaseであるBud1/Rsr1が出芽部位の決定の根幹に関与している。しかしながら、Bud1は細胞膜に一様に分布する。Bud1のGTPase activating factor (GAP)であるBud2やGDP-GTP exchange factor (GEF)であるBud5が出芽予定部位に局在していることが明らかにされ、局所的なBud1の活性化の機構の一端が明らかになっている。一倍体と二倍体で共通する機構に加え、Axial budding 特異的に出芽部位をマークするタンパク質群やBipolar budding 特異的な出芽部位マーカータンパク質が存在する。これまでに、Axial budding のマーカーとしてBud3, Bud4やBud10/Axl2などが知られている。また、Bipolar budding のマーカーとしてはBud8, Bud9が知られている。一倍体においても二倍体においても出芽部位選択は多くの遺伝子が関与する非常に複雑な過程である。例えば二倍体では、網羅的な欠損株の表現型の解析から数十の遺伝子が同定されている。この複雑な過程を、遺伝学的な解析による遺伝子間の制御関係や相互作用としてだけではなく、プロテオーム解析によるタンパク質の相互作用ネットワークとして解明し理解することは、非常に重要である。出芽部位決定から出芽に至るまでには、かなりの数の遺伝子が関与するが、それらの遺伝子、タンパク質はこれまでの網羅的な解析の結果からある程度明らかになっている。網羅的な解析によ

てこれらの遺伝子、タンパク質の相互作用ネットワークも少しは明らかになってきているが、未解明な部分は大きい。網羅的な解析で明らかにされてきた静的な相互作用ネットワークだけではなく、相互作用がどのようにダイナミックに変化し、制御されているかを理解することが今後の課題となっている。相互作用の制御のほとんどはリン酸化などの翻訳後修飾を通じて行われるので、相互作用ネットワークに存在するタンパク質複合体の翻訳後修飾を解析する必要がある。出芽部位には様々なタンパク質が集積、離散して出芽に至る。このプロテオームのダイナミクスを出芽部位に存在するタンパク質複合体の同定や翻訳後修飾部位の解析によって明らかにし、タンパク質の出芽部位への離合集散のメカニズムに迫りたい。酵母は、その生活史において二倍体が主要な状態であると考えられているが、二倍体を用いた研究はあまり多くない。二倍体における出芽パターンであるBipolar budding patternは、細胞極性を解明するためによりモデルとなると考えられる。二倍体における出芽部位選択に関わるタンパク質の機能ネットワークの全貌を複合体の相互作用、翻訳後修飾の解析によって物理化学的な実体として明らかにし、理解することが細胞極性の確立の機構を解明するために必要である。

2. 研究の目的

二倍体において見られるBipolar buddingの過程を、遺伝学的な遺伝子間の制御関係の解析だけではなく、タンパク質の相互作用ネットワークをプロテオミクスによる解析から明らかにする。相互作用の制御のほとんどはリン酸化などの翻訳後修飾を通じて行わ

れるので、相互作用ネットワークの中のタンパク質複合体における翻訳後修飾の解析を行わなければならない。その手始めとして、Bipolar budding に関与しているが、その機能が解明されていないタンパク質が形成する複合体を単離することから着手する。

Bud32 は、二倍体の Bipolar Budding に関係する遺伝子の網羅的な解析から発見された。二倍体欠損株の表現型はランダムな出芽パターンを示す。Bud32 はヒト PRPK (p53 related protein kinase) のホモログである。Two-hybrid 法や TAP 法などによる網羅的な解析により、プロテオソームのサブユニットなど様々なタンパク質との相互作用が報告されている。Bud32 は、Bipolar budding の発現において Bud1 の下流において機能すると考えられるが、その詳細は明らかではない。また、最近 Bud32 を含む複合体が、一倍体においてテロメアの伸長制御や転写制御に関係するという報告がなされたが、これと出芽部位選択の関連についても不明である。

Bud32 複合体は、核ではなく、膜近傍で機能して出芽パターンを決定していると考えられる。この局在を翻訳後修飾が決定している可能性が考えられるので、核、細胞質から単離した複合体の翻訳後修飾を詳細に解析する。また、出芽部位に局在するタンパク質、例えば Bud5, Bud9 などとの相互作用を調べる。膜タンパク質の相互作用解析のために、光増感や架橋によるタグの導入法を新たに開発する。これらの解析から、Bud32 複合体が相互作用するタンパク質を同定し、そのネットワークを拡大してゆく。また、出芽部位に局在することが明らかにされている Bud5, Bud9, Septins などが形成する複合体を単離し、解析する。

3. 研究の方法

Bipolar budding の出芽部位のランドマークとなっている Bud8, Bud9 など Bud32 複合体の制御関係を明らかにするために、Bud32 複合体の構成タンパク質の欠損株での Bud8, Bud9 の局在や、Bud32 複合体の出芽部位への集積が起こる時期があるかどうかを、それぞれの GFP 融合タンパク質を発現させることで確認する。さらに、出芽部位に局在する Bud2, Bud5, Bud8, Bud9 などのタンパク質と相互作用するタンパク質を TAP 法や Split-GFP 法などを併用して同定し、それらの欠損株や変異株の表現型を解析する。Bud32 複合体の構成タンパク質の欠損株で、これらのタンパク質の局在を解析し、出芽部位への局在が観察されなくなるものを探す。これらのタンパク質間の制御関係を物理化

学的な実体として解明する。

Bud32 複合体などを酵母の様々な細胞画分や出芽状態の異なった細胞から TAP 法によって単離し、その翻訳後修飾などを解析する。また、細胞画分や細胞の状態の違いによる複合体の状態の差異を解析する。

TAP 法は、タンパク質複合体を単離する方法としても、細胞内のタンパク質相互作用を解析する方法としても優れた方法であるが、出芽部位選択から出芽に至る過程に関与する膜タンパク質が多く関与するプロテオームを同定する方法としては完璧ではない。そこで、より弱い相互作用や一時的な相互作用まで検出できる方法を開発する。具体的には、GFP 等の蛍光基の光増感反応を利用する方法などを利用して、蛍光基などを導入したタンパク質と *in vivo* 架橋によって架橋されたタンパク質を単離同定する方法を検討する。

これらの方法を組み合わせて、出芽部位選択から出芽に至る過程に関わるサブプロテオームを多機能タンパク質複合体である Bud32 複合体を核として解析してゆく。解析の結果明らかになったサブプロテオームの構成タンパク質遺伝子の欠損株やその翻訳修飾部位の変異株などを作成し、表現型を解析する。

以上の解析によって得られた結果を総合して、機能的なネットワークの全貌を明らかにしたい。

4. 研究成果

Bud32 欠損株と野生型株での翻訳後修飾やタンパク質発現の差異を検討するために iTRAQ による定量プロテオミクス解析を行った。タンパク質の発現の差異に関しては、リボソーム関連分子が大きく変動していた。最近、この多機能タンパク質複合体が RNA 修飾を通じて翻訳制御に関わるという報告がなされたので、それとの関連に注目しながら変動したタンパク質の解析を行った。特に翻訳後修飾を網羅的に検出するために、質量差を許容して LC-MSMS の結果を探索する手法を検討した。この方法で、多くの翻訳後修飾を受けたペプチドを検出できることを明らかにした。しかしながら、極性と関連するネットワークの変動は見いだせなかった。

タンパク質の翻訳後修飾の解析、特にリン酸化を簡便に効率良く検出するために、チタニアなどコートした MALDI プレートも用いてリン酸化ペプチドを選択的に濃縮する方法を検討した。チタニアをコートしないステンレス板でもリン酸化ペプチドを濃縮し、分離が可能であることを明らかにした。いくつかの金属酸化物をコートしたプレートでのリン酸化ペプチドの分析が可能なことや、チタニア

の薄層の生成法についても検討し、プレート上でのリン酸化ペプチドの分離濃縮も試みた。

Bud32 と相互作用するタンパク質を新たに検出する方法を検討した。GFP による光増感を利用することを考えていたが、より特異的に GFP シグナルを得るために Split GFP 法を検討した。これは、GFP の N 末端断片と C 末端断片を別々のタンパク質に融合させ、相互作用があったときに GFP 蛍光が検出できる方法である。Bud8 と Rax2 との相互作用検出に応用し、細胞内での相互作用部位を特定できた。この相互作用特異的な GFP 蛍光の発光を用いて、近傍タンパク質への標識転移を検討した。また、より効率的に光増感反応を起こすために GFP の代わりに KillerRed を用いて二分子蛍光相補性解析が行えるようにするためのデザインを行った。

Bud32 を欠損させるとランダムな部位から出芽が起こることは既に報告されていたが、複合体の構成タンパク質をコードする遺伝子の欠損株を用いた解析から、Bud32 を含む複合体が、出芽部位選択に関与することを明らかにした。出芽部位選択には、Bud32 のキナーゼ活性が必須であった。Bud32 は Sch9 によってリン酸化されるが、このリン酸化は、Bud32 複合体による出芽部位選択には関係していなかった。Bud32 欠損株で出芽マーカーである Bud8, Bud9 の局在を GFP 融合タンパク質として発現させ検討した。出芽部位のマーカーである Bud8 と Bud9 のうち、Bud9 を欠損させると、Bud32 複合体の欠損によるランダムな出芽が観察されなくなったので、Bud32 複合体は Bud9 の局在を制御していると考えられた。実際、Bud32 複合体の欠損株では、Bud8 の局在は正常であったが、Bud9 の局在は異常であった。Bud8, Bud9 の局在に関連している Rax2 の局在は、Bud32 複合体欠損株では正常であった。Bud32 複合体は、Bud9 の局在制御に関係していることを明らかにした。Split-GFP 法による細胞内での Bud8, Bud9 と Rax2 との相互作用を考慮すると、Bud32 複合体は、Rax2 と Bud9 との相互作用を制御していると考えられた。

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 7 件)

- 1) Yokoyama, R., Iwafune, Y., Kawasaki, H., and Hirano, H. Isoelectric focusing of high-molecular-weight protein complex under native conditions using agarose gel Anal. Biochem. 387:60-63 (2009)

- 2) Kawasaki, H. Relationship between the Hydrophobicity and Molecular Weight of Peptides in a liquid chromatography-mass spectrometry-based Proteomic Analysis of Yeast. *Medicine and Biology* 153:358-362 (2009)
- 3) Kawasaki, H. Hydrophobicity scale for proteins. *Medicine and Biology* 153:568-574 (2009)
- 4) Kato, Y., Kawasaki, H., Arakawa, N. and Hirano, H. Subcellular localization of the interaction of bipolar landmarks Bud8p and Bud9p with Rax2p in *Saccharomyces cerevisiae* diploid cells *Biochemical and Biophysical Research Communications* 399:525-530 (2010)
- 5) Kawasaki, H. Calculation and visualization of protein charge at various pH values using a spreadsheet *Medicine and Biology* 154:558-561 (2010)
- 6) Masuishi, Y., Arakawa, N., Kawasaki, H., Miyagi, E., Hirahara, F., Hirano, H. Wild-type p53 enhances annexin IV gene expression in ovarian clear cell adenocarcinoma. *FEBS J.* 278 : 1470-1483 (2011)
- 7) Kato Y., Kawasaki H., Ohya Y., Morishita T., Iwasaki H., Kokubo T., Hirano H. Cell Polarity in *Saccharomyces cerevisiae* Depends on Proper Localization of the Bud9 Landmark Protein by the EKC/KEOPS Complex. *Genetics* 188:871-882 (2011)

[学会発表] (計 4 件)

- 1) 加藤悠、川崎博史、大山良文、岩崎博史、古久保哲朗、平野久 二倍体出芽酵母 Bud32 複合体の細胞極性制御に関する機能 第 8 2 回日本生化学会大会
- 2) 加藤 悠、川崎 博史、平野 久 出芽酵母二倍体における Bud32p 複合体による極性制御機構日本ヒトプロテオーム機構第 7 回大会
- 3) 加藤 悠、川崎博史、荒川憲昭、平野 久 スプリット GFP 法を用いた二倍体出芽酵母の出芽マーカーの相互作用の解析 日本ヒトプロテオーム機構第 8 回大会 (日本プロテオーム学会 2010 年会) 第 6 回日本臨床プロテオーム研究会連合大会
- 4) 増石 有佑、荒川 憲昭、川崎 博史、宮城悦子、平原 史樹、平野 久 卵巣明細胞腺癌におけるアネキシン IV は新規 p53 標的遺伝子であり抗癌剤抵抗性に関与する 第 8 3 回日本生化学会大会・第 3 3 回日

本分子生物学会年会・合同大会

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川崎 博史 (Kawasaki Hiroshi)
横浜市立大学・生命ナノシステム科学研究
科・准教授
研究者番号：70169704

(2) 連携研究者

秋本 和憲 (Akimoto Kazunori)
横浜市立大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：70285104