

## 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25年 5月 2日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22580085

研究課題名（和文）

リボソーム生合成と小胞輸送の連携

研究課題名（英文）

Linkage between ribosome synthesis and vesicle transport

研究代表者

水田 啓子（MIZUTA KEIKO）

広島大学・大学院生物圏科学研究科・教授

研究者番号：40166012

研究成果の概要（和文）：リボソーム生合成調節と他の細胞内システムとの連携について解明する目的で、リボソーム生合成調節タンパク質 Rrs1 と Ebp2 の機能について詳細に検討した。Rrs1 と Ebp2 が核小体以外に核膜辺縁部にも局在することを見出し、リボソーム生合成のみならず、テロメアの恒常性維持にも機能することを示した。また、Rrs1 と Ebp2 が関与する小胞輸送経路からのシグナル伝達において、GSK3 が本シグナルにおけるリン酸化カスケードの一部であることを見出した。

研究成果の概要（英文）：To understand the linkage between ribosome biogenesis and other cellular systems, we investigated functions of *trans*-acting factors of ribosome biogenesis, Rrs1 and Ebp2. We found that Rrs1 and Ebp2 are localized at the periphery of the nuclear membrane and function on maintenance of telomere organization. We also found that GSK3 protein kinases constitute the phosphorylation cascade in the signal transduction pathway due to secretory defects, where Rrs1 and Ebp2 are involved.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：分子細胞生物学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：リボソーム生合成、小胞輸送、核小体、核膜、酵母

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 私たちは出芽酵母において、小胞輸送の異常からのシグナルによってリボソーム生合成が転写レベルで制御されることを示し、このシグナル伝達に重要な機能をもつ因子としてリボソーム生合成調節タンパク質 Rrs1 を同定した。さらに、Rrs1 と相互作用するリボソーム生合成調節タンパク質 Ebp2

も小胞輸送異常からのシグナル伝達に関わることを示した。

(2) ハンチントン病のモデルマウスのニューロンにおいて、発症過程の初期におこる小胞体ストレスによって、ヒトの Rrs1 遺伝子の発現が特異的に亢進することが報告された。これらの結果は、Rrs1 が小胞輸送異常からのシグナル伝達にも機能をもつ、酵母から

ヒトにまで進化的に保存されたりボソーム生合成調節タンパク質であることを示唆しているが、その詳細は不明である。

(3) 私たちは Rrs1 と相互作用するタンパク質を探索し、タンパク質リン酸化酵素 GSK3 ファミリーの1つを見出している。小胞輸送からのシグナル伝達において、タンパク質リン酸化酵素については、PKC が関与することが報告されており、シグナル伝達にはリン酸化カスケードが機能していることが予想されるが、その実態は明らかになっていない。

## 2. 研究の目的

リボソーム生合成調節とヒトの疾病の関連が数多く報告されているが詳細は不明である。これら疾病の発症機序を解明するためには、リボソーム生合成に関わるタンパク質の未知機能の解明やリボソーム生合成調節と他の細胞内システムとの連携について解明する必要がある。本研究では、申請者らが見出したリボソーム生合成調節タンパク質 Rrs1 と Ebp2 が関与する小胞輸送経路からのシグナル伝達機構に着目して、その機構について詳細に検討する。

## 3. 研究の方法

(1) Rrs1 と Ebp2 の局在を詳細に観察した。また、その機能を詳細に検討した。

(2) Rrs1 と相互作用するタンパク質として同定している、プロテインキナーゼ GSK3 が、小胞輸送からのシグナルにおけるリン酸化カスケードの一部であるのか、また、Rrs1 が GSK3 のターゲットであるのかを検討した。

(3) 温度感受性 *ebp2* 変異と合成致死を示す変異株をスクリーニングし、解析した。

(4) *ebp2* 変異株の温度感受性を過剰発現で抑圧する遺伝子を探索した。

## 4. 研究成果

(1) 出芽酵母において、Rrs1 と Ebp2 が核小体以外に核膜辺縁にも局在することを見出した。真核生物で高度に保存されている SUN ドメインタンパク質である Mps1 に依存して、Rrs1 と Ebp2 が核膜につなぎとめられていることを示した。温度感受性 *rrs1* 変異株と *ebp2* 変異株を用いて、Rrs1 と Ebp2 が核小体におけるリボソーム生合成以外に、核膜において、核の構造維持やテロメアの配置やサイレンシングに機能していることを示した。

(2) 出芽酵母において、GSK3 ファミリーに属する4つのプロテインキナーゼが知られてい

る。このうちの1つ Rim11 を、Rrs1 と相互作用するタンパク質として同定した。

(3) 出芽酵母の4つの GSK3 をコードする遺伝子をすべて破壊すると、小胞輸送を遮断した時のリボソームタンパク質遺伝子群の転写抑制が非常に弱められた。この結果は、本シグナル伝達に GSK3 が関与していることを示唆している。

(4) *ebp2* 変異株における2つの欠陥—リボソーム生合成と核膜における機能—のうち、核小体における Ebp2 の機能を回復させないで核膜における機能のみを回復する系を確立した。

(5) 小胞輸送遮断時のシグナル伝達にはアクチンと微小管の制御系が必要であることを示唆する結果を得た。

(6) *EBP2* と機能的に関連する遺伝子を探索した。温度感受性 *ebp2* 変異と合成致死を示す変異株4つの原因遺伝子はいずれも *BRX1* であった。Brx1 は Ebp2 と密接に連携しながらリボソーム生合成に機能する調節タンパク質であることを示した。

(7) 温度感受性 *ebp2* 変異と条件的な合成致死を示す変異株を2つ取得し、解析した。原因遺伝子は N(alpha)-acetyltransferase の1つである NatA の触媒サブユニットと調節サブユニットをそれぞれコードする *ARD1* と *NAT1* であった。この結果は、NatA が Ebp2 と密接に関わりながらリボソーム生合成に機能していることを示唆している。

(8) リボソームタンパク質 L36 をコードする遺伝子の過剰発現により、*ebp2* 変異株の温度感受性が抑圧されることを見出した。

(9) NatA の標的タンパク質として、Ebp2, L36 および Brx1 に絞り、N末端のメチオニンの隣のアミノ酸残基をアセチル化されないプロリンに改変して解析した。その結果、Ebp2 と L36 の改変はどちらも *ebp2* 変異株の生育に影響を及ぼさなかったが、Brx1 の改変は *ebp2* 変異と合成致死を示した。以上の結果から、Ebp2 がリボソーム生合成において正常に機能するためには、Brx1 の N末端のアセチル化が必要である可能性がある。

## 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 6件)

(1) Kun Wan, Kanako Tsuchihashi, Kazuhiro Kanda, Kaori Shimoji, Keiko Mizuta.

N<sup>6</sup>-Acetyltransferase NatA is involved in ribosome synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 査読有, 77, 2013, 631-638

- (2) Kentaro Kajiwara, Tetsuya Muneoka, Yu Watanabe, Takefumi Karashima, Hiroshi Kitagaki, Kouichi Funato, Perturbation of sphingolipid metabolism induces ER stress-mediated mitochondrial apoptosis in budding yeast. *Mol. Microbiology*, 査読有, 86, 2012, 1246-1261
- (3) Kaori Shimoji, Jelena Jakovljevic, Kanako Tsuchihashi, Yuka Umeki, Kun Wan, Suzuka Kawasaki, Jason Talkish, John L. Woolford, Jr., Keiko Mizuta, Ebp2 and Brx1 function cooperatively in 60S ribosomal subunit assembly in *Saccharomyces cerevisiae*, *Nucleic Acids Res.*, 査読有, 40, 2012, 4574-4588
- (4) Chihiro Horigome, Keiko Mizuta, Ribosome biogenesis factors working with a nuclear envelope SUN domain protein: New players in the solar system, *Nucleus*, 査読有, 3, 2012, 22-28
- (5) Chihiro Horigome, Takafumi Okada, Kyoko Shimazu, Susan M. Gasser, Keiko Mizuta, Ribosome biogenesis factors bind a nuclear envelope SUN domain protein to cluster yeast telomeres, *EMBO J.*, 査読有, 30, 2011, 3799-3811
- (6) Guillaume A. Castillon, Auxiliadora Aguilera-Romero, Javier Manzano-Lopez, Sharon Epstein, Kentaro Kajiwara, Kouichi Funato, Reika Watanabe, Howard Riezman, Manuel Muñoz, The yeast p24 complex regulates GPI-anchored protein transport and quality control by monitoring anchor remodeling, *Mol. Biol. Cell*, 査読有, 22, 2011, 2924-2936

[学会発表] (計 37 件)

- (1) 水田啓子、出芽酵母における小胞輸送からリボソーム生合成へのシグナル伝達、第2回 RIBOSOME MEETING、2013年3月28日、東京農工大学
- (2) 万壜、リボソーム生合成における N<sup>6</sup>-アセチル化修飾の役割、第2回 RIBOSOME

MEETING、2013年3月28日、東京農工大学

- (3) 前田隼助、分裂酵母の核小体と核膜に局在する Ebp2 の機能解析、第30回 Yeast Workshop、2012年11月17日、山口
- (4) 芳形菜美、*aur1* 変異株の表現型を抑圧する多コピーサプレッサーの取得、第30回 Yeast Workshop、2012年11月17日、山口
- (5) 辛島健文、小胞輸送におけるオキシステロール結合タンパク質の機能解析、第30回 Yeast Workshop、2012年11月17日、山口
- (6) 水田啓子、リボソーム生合成調節タンパク質の新たな機能、第20回 酵母合同シンポジウム(招待講演)、2012年9月7日、京都大学
- (7) 矢吹友佳理、分泌経路遮断時のシグナル伝達にはアクチンと微小管の制御系が必要である、第49回 酵母遺伝学フォーラム、2012年9月4日-6日、京都大学
- (8) Keiko Mizuta, Ribosome biogenesis factors, Ebp2 and Rrs1, involved in telomere clustering with a nuclear envelope SUN domain protein in yeast, The 9th International Conference on Ribosome Synthesis (招待講演), Aug. 22-26 2012, Banff, Canada
- (9) Kun Wan, N-terminal acetyltransferase NatA is involved in ribosome synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*, The 9th International Conference on Ribosome Synthesis, Aug. 22-26 2012, Banff, Canada
- (10) 水田啓子、リボソームの組立てと細胞増殖、第15回 真核微生物交流会(招待講演)、2012年6月29日、酒類総合研究所
- (11) 水田啓子、リボソーム生合成調節タンパク質の核膜における機能、第1回 RIBOSOME MEETING、2012年3月16日、広島大学
- (12) 万壜、出芽酵母のリボソーム生合成における Ebp2 の機能解析、第1回 RIBOSOME MEETING、2012年3月15日、広島大学
- (13) 梅木悠花、出芽酵母の60Sリボソームサブユニット生合成における *EBP2* と *BRX1*

- の機能的関連、第 1 回 RIBOSOME MEETING、2012 年 3 月 15 日、広島大学
- (14) 曲野美紀、分裂酵母におけるリボソーム生合成調節と核小体分配、第 1 回 RIBOSOME MEETING、2012 年 3 月 15 日、広島大学
- (15) 水田啓子、出芽酵母 Ebp2 と Rrs1 の核小体と核膜における機能、酵母細胞プロジェクト研究センター春季シンポジウム、2012 年 3 月 9 日、広島大学
- (16) 船戸耕一、酵母スフィンゴ脂質による細胞分裂の制御、酵母細胞プロジェクト研究センター春季シンポジウム、2012 年 3 月 9 日、広島大学
- (17) 竹中渉、出芽酵母のリボソーム生合成調節因子 Ebp2p と Rrs1p の核膜における機能、第 29 回 Yeast Workshop、2011 年 11 月 11 日、徳島文理大学
- (18) 矢吹友佳理、Arp2/3 複合体は分泌経路遮断時のシグナル伝達に関与する、第 29 回 Yeast Workshop、2011 年 11 月 11 日、徳島文理大学
- (19) 吉住俊介、スフィンゴ脂質合成遺伝子 AUR1 と合成阻害剤に感受性を示した酵母破壊株の遺伝子の遺伝学的解析、第 29 回 Yeast Workshop、2011 年 11 月 11 日、徳島文理大学
- (20) 廣田彩花、ふたつの TORC をつなぐスフィンゴ脂質の役割、第 29 回 Yeast Workshop、2011 年 11 月 11 日、徳島文理大学
- (21) 中園航太、スフィンゴ脂質による TORC1 の機能調節に関与する遺伝子の探索、第 29 回 Yeast Workshop、2011 年 11 月 11 日、徳島文理大学
- (22) 水田啓子、リボソーム生合成調節タンパク質の核膜における機能、第 73 回酵母研究会、2011 年 9 月 13 日、甲南大学 (招待講演)
- (23) 岡野樹、液胞の形態維持におけるスフィンゴ脂質の役割、酵母遺伝学フォーラム第 4 4 回研究報告会、2011 年 9 月 7 日、九州大学
- (24) 万堃、リボソーム生合成における  $N^{\alpha}$ -アセチル化修飾の役割、酵母遺伝学フォーラム第 4 4 回研究報告会、2011 年 9 月 5 日、九州大学
- (25) 廣田彩香、ふたつの TORC をつなぐ酵母スフィンゴ脂質の役割、酵母遺伝学フォーラム第 4 4 回研究報告会、2011 年 9 月 5 日、九州大学
- (26) Keiko Mizuta, Ribosome biogenesis factors involved in telomere organization with a nuclear envelope SUN protein, 25th International Conference on Yeast Genetics and Molecular Biology, July 11-16 2011, Olsztyn-Kortowo, Poland
- (27) 矢吹友佳理、酵母のリボソーム生合成調節タンパク質 Ebp2 の核膜における機能、日本農芸化学会中四国支部創立 10 周年記念 第 30 回講演会、2011 年 5 月 21 日、岡山大学
- (28) 水田啓子、リボソーム生合成調節と染色体の恒常性維持、酵母細胞プロジェクト研究センター春季シンポジウム、2011 年 3 月 11 日、広島大学
- (29) 船戸耕一、酵母スフィンゴ脂質による TORC の制御、酵母細胞プロジェクト研究センター春季シンポジウム、2011 年 3 月 11 日、広島大学
- (30) 水田啓子、Chromosome Dynamics in Yeast, The 3<sup>rd</sup> International Symposium on Food and Environment in Asia、2010 年 12 月 20 日、広島大学
- (31) 榎麻衣、出芽酵母における 2 $\mu$ プラスミドの分配機構、第 28 回 Yeast Workshop、2010 年 11 月 12 日、福山
- (32) 川良はるか、分裂酵母における Rrs1 の機能解析、第 28 回 Yeast Workshop、2010 年 11 月 12 日、福山
- (33) 張章、出芽酵母の細胞形態の調節におけるスフィンゴ脂質の役割、第 28 回 Yeast Workshop、2010 年 11 月 12 日、福山
- (34) 岡野樹、出芽酵母の TORC1 活性調節におけるスフィンゴ脂質の役割、第 28 回 Yeast Workshop、2010 年 11 月 12 日、福山
- (35) 万堃、リボソーム生合成に及ぼす  $N^{\alpha}$ -アセチル化修飾の影響、酵母遺伝学フォーラム第 4 3 回研究報告会、2010 年 9 月 10 日、ならまちセンター
- (36) 曲野美紀、分裂酵母における Ebp2 の機能解析、酵母遺伝学フォーラム第 43 回

研究報告会、2010年9月10日、ならまちセンター

- (37) 岡田貴文、出芽酵母における染色体外遺伝因子  $2\mu\text{m}$  プラスミドの分配機構、酵母遺伝学フォーラム第43回研究報告会、2010年9月11日、ならまちセンター

[その他]

ホームページ

<http://home.hiroshima-u.ac.jp/keim77/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

水田 啓子 (MIZUTA KEIKO)

広島大学・大学院生物圏科学研究科・教授  
研究者番号：40166012

### (2) 研究分担者

船戸 耕一 (FUNATO KOUICHI)

広島大学・大学院生物圏科学研究科・准教授  
研究者番号：30379854

### (3) 連携研究者

なし