

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 27 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570214

研究課題名(和文) Pho85サイクリン依存性キナーゼによる環境ストレス応答と細胞周期制御の同調機構

研究課題名(英文) Coordination mechanisms of stress response with cell cycle regulation by the yeast Pho85 kinase

研究代表者

西沢 正文(Nishizawa, Masafumi)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：20218150

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円、(間接経費) 1,110,000円

研究成果の概要(和文)：酵母Pho85キナーゼは、環境条件の変化に応答する遺伝子発現を制御している。Pho85がアルカリストレス応答に機能する機構を解析した結果、(i) Pho85-Pho80がアルカリ条件下でのCLN2発現維持に必要であり、Pho81を介してアルカリストレスシグナルが伝達される、(ii) Pho85はその標的であるPho4、Rim101、Crz1およびCLN2発現を抑制するWhi5の活性を抑制する、(iii) Pho4によるCLN2発現抑制にはRpd3が関与していることがわかった。一方、Pho85-Pho4は、WHI5転写を促進するHCM1やSBFを活性化するMSA1の発現には影響しなかった。

研究成果の概要(英文)：When yeast cells encounter environmental stress, progression through the cell cycle is delayed, providing time for adaptation to the stress conditions. We found that CLN2 was downregulated under alkaline conditions, and that the Pho85-Pho80 complex was required to sustain CLN2 expression under alkaline conditions. We also found that Pho4 is necessary for adaptation to alkaline conditions, possibly by activating Ptk2. The alkaline stress signal was transmitted through Pho81 CKI to repress the Pho85-Pho80 activity, which leads to activation of transcription factors Pho4, Rim101, and Crz1, all of which inhibited CLN2 expression when overproduced. Whi5 represses CLN2 expression, and CLN2 expression level in a pho85 pho4 rim101 crz1 quadruple deletion mutant was stimulated when the Whi5 activity was repressed by overproduction of Pho85-Pc19. Rpd3 is involved in CLN2 repression by these factors.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・分子生物学

キーワード：ストレス応答 細胞周期 シグナル伝達

### 1. 研究開始当初の背景

細胞周期の制御は外界の環境条件や細胞内からのシグナルに応じて行われており、特に環境からのストレスに応じて細胞周期を制御することは細胞の生存にとって必須の過程である。DNA 傷害チェックポイントを介した制御、窒素源飢餓による TOR を介した制御、浸透圧ストレスによる Hog1 を介した制御などが詳しく調べられており、それには酵母系を用いた研究が大きな貢献をしてきた。細胞を取り巻く環境からはこれ以外にも栄養源枯渇、pH の変化など種々のストレスが存在するが、このような環境ストレスが細胞周期を制御する機構についてはまだ良くわかっていない。われわれや他のグループはこれまで酵母 Cdk ファミリーに属する Pho85 キナーゼ(Pho85)とその標的である転写因子 Pho4 の細胞機能の研究を行い、Pho85 が細胞生育に良好な環境条件(栄養状態 [Yeast 21: 903, 2004], 高塩濃度ストレス [Huang et al. Mol. Cell. Biol. 22: 5076, 2002], アルカリ条件 [Eukaryot. Cell 9: 943, 2010] など)を監視して、これらのストレスに応答する遺伝子の不必要な発現を抑制する一方、Pho4 はリン酸飢餓によるリン酸代謝系遺伝子発現以外に、アルカリストレス応答 (Eukaryot. Cell, 2010)やその他の環境ストレスに關与する遺伝子の発現を活性化することを示した (PLoS Biol. 6: e326, 2008)。

このように Pho4 は従来考えられていたリン酸代謝系遺伝子群だけでなく、広くストレス応答に關わる転写因子であり、その機能を Pho85 が抑えていると考えられる。Pho85 は Cdk インヒビター (CKI) の Sic1 や G0 期進入に必要な Rim15 をリン酸化して分解を促進することで (Mol. Biol. Cell 9: 2393, 1998; Wanke et al. EMBO J. 24: 4271, 2005), 細胞周期が進行するように働く。一方、Pho4 はヒドロキシ尿素による S 期の阻害(未発表)や DNA 傷害による G1 期停止に必要であること (Wysocki et al. Nat. Struct. Mol. Biol. 13: 908, 2006), Pho4 過剰発現により G2 期遅延が起きること (Sopko et al. Mol. Cell 21: 319, 2006) が報告されており、またわれわれは *pho4* 欠失株中では *CLN3* 転写が上昇することを発見している(未発表)。これらの結果は Pho85-Pho4 の系がストレスに応答した細胞周期制御に關与していることを強く示唆している。

われわれは Pho4 の機能を研究する過程で Pho4 が Ptk2 キナーゼの発現を抑制することを見いだしたが (PLoS Biol. 6: e326, 2008), Ptk2 は G1 サイクリンの発現を抑える Whi5 をリン酸化することが報告されている (Ptacek et al. Nature 438: 678, 2005)。Whi5 は動物細胞の Rb の機能相同体と考えられており、Cdk4-サイクリン D1 が Rb をリン酸化するのに対し、Cdc28-Cln3 が SBF(E2F の機能相同体)を阻害している Whi5 をリン酸化してその阻害を解除し、G1 サイクリン転写を活性化

すると考えられている (Wagner et al. PLoS One 4: e4300, 2009)。また最近、Pho85 も Whi5 をリン酸化することが報告された (Huang et al. PLoS Biol 7: e1000188, 2009)。これらのことから、Pho85-Pho4 の系が Whi5 の制御を通してストレスに応答した G1 初期の制御を行っているとの仮説に至った。

### 2. 研究の目的

本研究計画では、環境ストレスに応答した細胞周期制御機構を解明するために、Ptk2 による Whi5 のリン酸化が Whi5 による SBF の阻害を強化する機構、ストレスシグナルが Pho85 活性を制御する機構、Pho4 による G1 サイクリン発現制御機構を明らかにすることで、Pho85-Pho4 系によるストレスに応答した G1 初期の制御機構を解明する。

### 3. 研究の方法

[平成 23 年度]

(1) Pho4 は Ptk2 を介して G1 サイクリン発現を抑制するか

野生型株、*ptk2* 株、*pho4* 株で *PHO4* および *PTK2* を過剰発現させたときの G1 サイクリン (*CLN2*) 発現をノーザン解析により調べる。次いで、Pho4 結合部位を欠く *ptk2* 変異株で *CLN2* 発現の Pho4 依存性を調べ、さらに *whi5* 株中で *PTK2* を過剰発現させたときの *CLN2* 発現を調べることで、Pho4 が Ptk2 を介して G1 サイクリン発現を抑制し、それには Whi5 が關与することを示す。

(2) Ptk2 による Whi5 のリン酸化が G1 サイクリン発現を抑制するか

Whi5 は Cdc28 と Pho85 によってリン酸化され、ウエスタン解析で複数のバンドを与えることが報告されている (Huang et al. PLoS Biol. 7:e1000188, 2009)。野生型株、*cdc28<sup>ts</sup>* *pho85*、*ptk2*、*cdc28<sup>ts</sup>* *pho85* *ptk2* 変異株それぞれについて Whi5 のウエスタン解析を行い、Whi5 が Ptk2 依存的にリン酸化されることを示す。Whi5 の Ser/Thr キナーゼによる 12 個所のリン酸化可能部位中 10 個所が Cdk によりリン酸化され、それらの部位のリン酸化の役割が異なることが報告されている (Wagner et al. PLoS One 4: e4300, 2009)。*cdc28<sup>ts</sup>* *pho85* 株を制限温度下で培養したときの Whi5 のリン酸化ペプチド解析を LC/MS/MS で行い、Ptk2 によるリン酸化部位を同定する。Ptk2 と Cdk によるリン酸化部位が重なり合っていない場合には、それぞれによるリン酸化部位の Ala 置換変異を種々組み合わせた変異体を作製し、それが *CLN2* 発現に与える影響を調べる。リン酸化部位が重なっていた場合には、Ptk2 の過剰発現で Ptk2 によるリン酸化が優先的に起こる条件下で、種々の Ala 置換変異体を発現させたときの *CLN2* 発現に与える影響を調べる。これらの実験によって、Ptk2 による Whi5 のリン酸化が G1 サイクリン発現を抑制することを示す。

(3) ストレスシグナルはどのようにして

Pho4 を活性化するか

Pho4 は Pho85 によって活性が抑えられる。Pho85 は Pcl (サイクリン)によって活性化され、Pho81 (CKI)によって阻害される。したがって、ストレスシグナルによって Pcl 発現が抑制または不安定化、あるいは Pho81 が活性化されれば、Pho4 が活性化される。われわれはアルカリストレスによって G1 サイクリンの発現が低下し、それには Pho85 が関与すること(未発表)、また Pho4 が酵母のアルカリ応答過程に必要であることを報告している (Eukaryot. Cell 9: 943, 2010)。そこで、まずアルカリストレス条件下で発現が抑えられる *PCL* 遺伝子をノーザン法で探索する。また、*pho81* 株あるいは *PHO81<sup>c</sup>* 構成的活性化変異株中での *CLN2* 発現を解析して、Pho81 の関与を調べる。これらの実験によって、アルカリストレスシグナルの標的がサイクリンあるいは CKI のどちらかまたは両方を明らかにする。

[平成 24 年度]

(1) Ptk2 による Whi5 のリン酸化が Whi5 の機能を制御する機構

Whi5 の制御機構に関して、以下の事項を調べる。野生型 Whi5, Cdk によるリン酸化部位変異体、Ptk2 によるリン酸化部位変異体それぞれを bait として Rpd3 (または Hos3) および Swi6 との共免疫沈降により、リン酸化がこれらの因子との結合に及ぼす影響を解析する。Ptk2 過剰発現株中での野生型 Whi5 の *in vivo* でのリン酸化状態を LC/MS/MS で解析し、Ptk2 によるリン酸化が Cdk によるリン酸化の効率に及ぼす影響を調べる。Whi5 は Cdk でリン酸化されると核外へ排出され、G1 後期では細胞質に存在する。GFP 標識した野生型 Whi5 および上記のリン酸化部位変異体の G1 後期(出芽細胞)での細胞内局在を調べ、Ptk2 によるリン酸化が Whi5 の核外輸送に及ぼす影響を調べる。

(2) ストレスシグナルはどのようにして Pho4 を活性化するか

アルカリストレスによって発現が抑えられる Pcl が見つければ、それを欠失させたときの *CLN2* 発現に対する影響を調べる。また、その *PCL* 遺伝子のプロモーターを解析してストレスシグナルの伝達に関わる転写因子を調べる。ストレス条件下での Pcl タンパク質の安定性をウエスタン法で調べる。Pho81 が標的となっている場合には、同様にして発現およびタンパク質の安定性を調べる。アルカリストレスのシグナル伝達経路について、リン酸飢餓シグナル同様イノシトールポリリン酸経路を通して Pho81 に伝達されるか (Lee et al. Science 316: 109, 2007)、アルカリ応答に関与する RIM 経路を介して伝達されるのかをそれぞれの経路の変異株を用いて調べる。

(3) Pho85-Pho4 の系が G1 サイクリン発現を制御する機構

Azf1 はグルコース存在下で *CLN3* 上流に結

合してその発現を活性化する事が報告されており (Slattery et al. Eukaryot. Cell 5: 313, 2006)、現在関連する研究で Ptk2 による Azf1 のリン酸化が *CLN3* 発現を抑制するかどうかを調べている。これが確認できていれば、Azf1 のリン酸化による *CLN3* 発現抑制機構について、*CLN3* プロモーターへの結合、*CLN3* プロモーター活性への影響、Azf1 の安定性、Azf1 の核輸送について調べる。[平成 25 年度]

(1) Pho85-Pho4 の系が G1 サイクリン発現を制御する機構

研究計画の進捗状況に応じて Pho85-Pho4 による G1 サイクリン発現制御機構の解析を継続し、ストレス応答と G1 初期制御の同調機構の解明を目指す。もし、Ptk2 による Azf1 と Whi5 の制御が確認できなかった場合には、Pho4 による Hcm1 の制御の可能性を調べる。Hcm1 は *WHI5* と *FKH2* の細胞周期依存的な発現に必要なフォークヘッド様の転写因子であり (Pramila, et al. Genes Dev. 20: 2266, 2006)、*HCM1* の上流域および ORF には Pho4 の結合可能配列が存在する。*HCM1* 発現に影響するストレス条件とその Pho4 依存性を調べる。

4. 研究成果

(1) Pho4 による G1 サイクリン発現抑制機構

アルカリストレス条件下で *CLN2* 発現は低下するが、*pho85* 株ではさらに顕著になる。一方、*whi5* 欠失株では *CLN2* 発現は上昇する。Pho4 を過剰発現させると、野生型株、*ptk2* 株、*whi5* 株のいずれにおいても *CLN2* 発現は低下した。逆に Ptk2 を過剰発現させると野生型株、*pho4* 株、*whi5* 株のいずれにおいても *CLN2* 発現は上昇した。これらの結果は、Pho4 には Whi5 とは独立な *CLN2* 発現制御経路があること、Ptk2 はアルカリストレス条件下で *CLN2* 転写を活性化する事を示している。アルカリストレス条件下でも通常条件に比べ *Cln2* の安定性に大きな違いは見られなかったことから、*CLN2* 発現制御は主に転写レベルで行われることが示唆された。Pho4 と Whi5 の関連をさらに解析した結果、Rim101, Pho4, あるいは Crz1 を *whi5* 欠失株中で過剰発現させると Rim101 と Crz1 の場合は *CLN2* 発現が野生型レベルであったが、Pho4 過剰発現の場合には低下したままであった。HDAC である Rpd3 を欠失させるとアルカリ条件下でも Pho4 過剰発現下でも *CLN2* 発現が回復した。このことは、Whi5 同様 Pho4 も Rpd3 に依存して *CLN2* を抑制していることを示している。

*CLN2* プロモーター領域のクロマチン構造を End-labeling 法で解析したところ、Rpd3 によりヌクレオソームの配置が変化することを示唆する結果が得られた。そこで、Rpd3 HDAC の関与について、*CLN2* プロモーター領域のクロマチン構造を Primer extension 法により高解像度で解析したところ、Rpd3 の有無、アルカリ条件、Pho4 過剰発現のいずれによつ

てもヌクレオソームの配置変化を観察することはできなかった。また、ヌクレオソーム構造の変化に關与する Nap1 を欠失させても CLN2 発現への影響は見られなかった。Rpd3S 複合体のサブユニットの一つである Rco1 を欠失させると、CLN2 発現上昇がアルカリ条件下でも観察される一方、Pho4 過剰発現による CLN2 発現の低下は観察されなかった。これに対し、Rpd3L 複合体のサブユニットの一つである Sds3 を欠失させると CLN2 発現には変化がなかったが、Pho4 過剰発現による CLN2 発現の低下を Rco1 欠失よりも更に抑圧することができた。しかしながら CLN2 発現回復の程度は Rpd3 欠失よりも低かった。これらの結果は、Rpd3 による CLN2 発現制御には Rpd3 の 2 種の複合体が關与しているが、その機構はクロマチン構造の変化を介していないと考えられる。そこで、CLN2 発現制御に關与する可能性が考えられる、WHI5 転写を促進する HCM1, MBF および SBF を活性化する MSA1, そして Cln3 を安定化する AZF1, それぞれの発現に対する Pho85-Pho4 の影響を調べたが、いずれの場合も顕著な変化は観察されなかった。

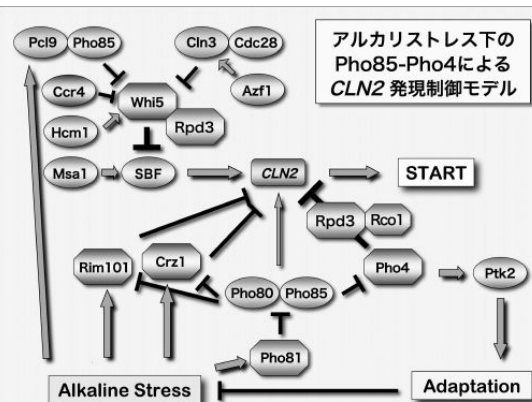
Pho4 過剰発現が CLN3 転写に及ぼす影響について調べたところ、whi5 欠失株中では CLN3 転写量が低下し、rpd3 欠失株中では野生型株と変わらないレベルであった。このことは、Pho4 による制御が G1 サイクリンの種類によって異なる可能性を示している。

#### (2) アルカリストレスシグナルの伝達機構

Pho85-Pho80 が存在すればアルカリ条件下でも CLN2 発現が維持されること、pho81 株および vip1 株では CLN2 発現が低下しないことから、アルカリストレスシグナルは低リン酸シグナルと同様、Pho81 CKI を通して Pho85-Pho80 に伝えられることがわかった。また、Pho85-Pcl9 は Whi5 の抑制や CLN3 の発現に必要であるが、pcl9 株では CLN2 発現が低下すること、PCL9 発現はアルカリ条件下で低下することもわかった。

アルカリストレスシグナル伝達には Rim101, Pho4, Crz1 の 3 つの転写因子が關与することが報告されているが、これらはどれも Pho85 によって抑制される。Rim101, Pho4, あるいは Crz1 をそれぞれ過剰発現させると CLN2 発現が低下する一方、Rim101, Pho4, Crz1 の 3 つを同時に欠失させることで pho85 欠失による CLN2 発現低下が抑圧されたことから、アルカリストレスシグナルは Pho85 活性を低下させることで、これら 3 種の転写因子の活性を上昇させてストレス応答を起こしていると考えられる。pho85 rim101 crz1 pho4 四重欠失株中で Pho85-Pcl9 を過剰発現させ、Whi5 を抑制すると、CLN2 発現が昂進することを見だし、このことをさらに確認することができた。

アルカリストレスによる細胞周期制御に Pho85-Pho4 の系が關わる機構についての遺伝学的解析を進めることで、ここに記したような新しい知見が得ることができた(図参



照)。ただ、分子機構の解明は今後の課題として残されている。今回われわれが明らかにした機構は、細胞がその分裂をストレスに应答して巧妙に制御している機構を示しており、Pho85-Pho4 が種々のストレスに应答して細胞機能を制御する機構の解析と合わせることで、細胞のストレス応答の全体像の解明へとつながるであろう。

#### 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)

- (1) Yoshimasa Saito, Hidekazu Suzuki, Toshiki Taya, Masafumi Nishizawa, Hitoshi Tsugawa, Juntaro Matsuzaki, Kenro Hirata, Hidetsugu Saito, and Toshifumi Hibi. 2012. Development of a novel microRNA promoter microarray for ChIP-on-chip assay to identify epigenetically regulated microRNAs. Biochem. Biophys. Res. Commun. 426: 33-37. 査読有.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.20>

[学会発表](計7件)

- (1) 西沢正文. 酵母が教えてくれるストレスマネージメント. 日本生物工学会大会. 2013年9月20日. 広島国際会議場.
- (2) 西沢正文. アルカリストレス応答における Pho85-Pho4 の標的. 第46回酵母遺伝学フォーラム研究報告会. 2013年9月8日. 仙台市, 東北学院大学土樋キャンパス.
- (3) M. Nishizawa. Pho85-Pho4 functions in the regulation of 1 cyclin expression under alkaline stress conditions. 26th International Conference on Yeast Genetics and Molecular Biology. 2013年8月29日-9月3日. Goethe University, Frankfurt, Germany.
- (4) 西沢正文. アルカリストレスによる細胞周期制御における Pho85-Pho4 の標的. 第35回日本分子生物学会年会. 2012年12月14日. 福岡国際会議場, マリンメッセ福岡.
- (5) 西沢正文. アルカリストレス応答における Pho85-Pho4 の標的. 第45回酵母遺伝

学フォーラム研究報告会.2012年9月5日.京都大学宇治キャンパスおうばくプラザきはだホール.

- (6) 西沢正文,東江昭夫.Pho85-Pho4 system functions in the regulation of cell cycle progression when yeast cells are exposed to alkaline stress. 第34回日本分子生物学会年会.2011年12月16日.パシフィコ横浜.
- (7) 西沢正文,東江昭夫.Pho85-Pho4 はアルカリストレスによる細胞周期制御に関与する.第44回酵母遺伝学フォーラム研究報告会.2011年9月6日.九州大学医学部百年講堂.

〔図書〕(計1件)

- (1) 西沢正文.化学同人.酵母の生命科学と生物工学.2013年.p.31-50,p.183-196.

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ:

<http://square.umin.ac.jp/masyeast/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

西沢 正文(Nishizawa, Masafumi)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号:20218150