

Title	Functional Genomics of Protein Phosphatase In Saccharomyces cerevisiae - Genetic interaction with protein kinases and analysis of expression profile
Author(s)	平崎, 正孝
Citation	大阪大学, 2010, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/57496
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 ＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	平 崎 正 孝
博士の専攻分野の名称	博士(工学)
学位記番号	第 23771 号
学位授与年月日	平成22年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 工学研究科応用生物学専攻
学位論文名	Functional Genomics of Protein Phosphatase In <i>Saccharomyces cerevisiae</i> -Genetic interaction with protein kinases and analysis of expression profile- (出芽酵母プロテインホスファターゼのゲノム機能科学-プロテインキナーゼとの遺伝的相互作用と発現プロファイルの解析-)
論文審査委員	(主査) 教授 原島 俊 (副査) 教授 大竹 久夫 教授 紀ノ岡正博 教授 野地 博行 教授 福井 希一 教授 福崎英一郎 教授 藤山 和仁 教授 渡邊 肇

論文内容の要旨

第1章 緒言

タンパク質のリン酸化・脱リン酸化は真核生物における様々な細胞機能を制御する重要な普遍的な機構である。本研究を行った研究室では、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を材料として、タンパク質の脱リン酸化に関わるプロテインホスファターゼ (PPase) を対象にしたゲノムサイエンスを行ってきた。本研究の開始時に、出芽酵母では、ゲノムの塩基配列より、少なくとも32種のPPaseが推定されていた。30種の全非必須PPase遺伝子の破壊株において網羅的な表現型解析が行われた結果、それまでに報告のあった $\Delta ppz1$ 株に加え、新しく $\Delta siw14$ 株でもカフェイン感受性 (Caf^s) を示す事が見出された。 *SIW14* は、ストレス応答経路で機能している *WHI2* の破壊と合成致死を示す遺伝子として同定され、 *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、 *Siw14* と *Ppz1* のカフェイン応答における機能を明らかにする事によって、真核生物におけるカフェイン応答メカニズムの基本的な理解を深める事を目的とした。まず、第1章では、これまでの関連研究についてまとめた後、課題を明らかにした。第2章では、 $\Delta siw14$ 株が示すCaf^sを抑制するプロテインキナーゼ (PKase) を、PKaseの網羅的な破壊によって同定した。第3章では、第2章と同様な手法で、 $\Delta ppz1$ 株が示すCaf^sを、破壊によって抑制するPKaseの同定を行った。第4章では、全てのPPaseを対象に、その破壊株の発現プロファイルを取得し、これらと機能既知遺伝子 (RG: Reference Gene) 破壊株の発現プロファイルとの相関をピアソン相関係数で解析することによって、発現プロファイルから全PPaseの細胞内機能の推定を行った。最後に、第5章で本研究を総括するとともに、今後の研究について展望した。

第2章 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

Appase 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。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を抑制するPKase遺伝子の同定を行ったところ、 *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、 $\Delta siw14$ 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、 $\Delta siw14$ 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 $\Delta siw14$ 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、 $\Delta siw14$ 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。以上の結果より、 *Siw14* は、 *Npr1* と共に *Gln3* の細胞内局在を制御し、 $\Delta siw14$ 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。

第3章 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

$\Delta ppz1$ 株も、Caf^sを示す事が知られている。そこで、 $\Delta siw14$ 株と同様、その破壊によって $\Delta ppz1$ 株のCaf^sを抑制するPKaseを調べた結果、 *SAT4* または *HAL5* の破壊を導入する事で、 $\Delta ppz1$ 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、 $\Delta ppz1$ 株が示すNaCl耐性、NaCl添加時における *ENA1* (P-type Na⁺-ATPase) 遺伝子の発現上昇も抑圧された。 $\Delta ppz1$ 株における *ENA1* 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、 $\Delta ppz1$ 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。 *ENA1* 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ので、カフェインまたはNaCl添加時に $\Delta ppz1$ 株が示す *ENA1* 遺伝子の発現上昇が、 *Gln3* 依存性であるか否かを調べたところ、これらの表現型は、 *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ところ、 *Gln3* は、 $\Delta ppz1$ 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、 $\Delta ppz1$ 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、 $\Delta ppz1$ 株のCaf^sは *GLN3* の破壊によって抑圧されなかった。 $\Delta siw14 \Delta ppz1$ 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であった事から、 *Ppz1* と *Siw14* はカフェイン応答において異なる経路で働くことが示唆された。

第4章 発現プロファイルの比較によるプロテインホスファターゼの細胞内機能の推定

PPaseの機能を理解するためには、個々のPPaseの機能解析とともに、PPaseの全体像の解析も重要である。研究開始時に、316個のRG破壊株の発現プロファイルが公開されていた。そこで、全 *Appase* 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 *Appase* 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合せがあることを見出した。こうした発現プロファイルの相関を示す遺伝子の組合せが、同一もしくは類似の細胞機能に関与しているならば、それらの遺伝子の破壊株は同一、もしくは逆の表現型を示す可能性があろう。そこで、RG破壊株で既知の表現型を実験的に *Appase* 株で調べた結果、いくつかの新規の表現型を示す *Appase* 株を見出した。

第5章 総括

本研究では、 $\Delta siw14$ 、および $\Delta ppz1$ 株のCaf^sをその破壊によって抑制するPKaseのシステマティックな同定、および、 *Appase* 株とRG破壊株との発現プロファイルのピアソン相関解析によって、研究開始時に発芽酵母で知られていた全PPaseの細胞内機能の解明を行った。以上の結果より、PPaseとの二重破壊で、 *Appase* 株の表現型を抑制するPKaseを網羅的に探索する今回のゲノムサイエンスの手法は、破壊株の表現型が既知であれば、いずれのPPaseについても有効な機能解析法となることを示すことができた。また、PPaseの全体像を理解する上で、 *Appase* 株と機能既知遺伝子の発現プロファイルとのピアソン相関解析は、 *Appase* 株の新しい表現型を発見するために有効な方

法論であることがわかった。これらの結果より、PPaseの細胞機能を理解するためには、個別のPPase機能の分子レベルでの解析と発現プロファイルなどを利用したグローバルな解析をバランスよく行うことが必要であると結論した。

論文審査の結果の要旨

本論文は、出芽酵母の全プロテインホスファターゼ(PPase)の細胞内機能の解明を目指すことを目的とし、その研究成果をまとめたものであり、緒論(一章)、本文(二、三、四章)、総合討論(五章)の5章からなっている。

第一章の緒論では、出芽酵母のPPaseを対象に研究を行う意義、それに基づき出芽酵母PPaseの現在の知見、さらに、PPaseのカフェイン応答における機能を解明することの有用性を述べ、本研究の目的と意義を明確にしている。

第二章では、 Δ *siw14*破壊株が示すカフェイン感受性(Caf^s)を抑制するプロテインキナーゼ(PKase)の同定を、PKaseの網羅的な破壊により行っている。 Δ *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の推定の基、*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 Δ *siw14*株のCaf^sを抑制するPKase遺伝子の同定を行った結果、*NPR1*の破壊によってCaf^sが抑制される事を見出している。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が、 Δ *siw14*株のCaf^sは、*GLN3*の破壊によっても抑制され、Siw14は、Npr1と共にGln3のリン酸化状態、及び、細胞内局在を制御することを見出した。以上の結果より、 Δ *siw14*株のCaf^sは、Gln3の核内への蓄積が原因であると結論付けている。

第三章では、第二章と同様な手法で、 Δ *ppz1*株が示すCaf^sを、破壊によって抑制するPKaseの同定を行っている。 Δ *ppz1*株も、Caf^sを示すため、 Δ *siw14*株と同様、その破壊によって Δ *ppz1*株のCaf^sを抑制するPKaseを調べた結果、*SAT4*又は*HLL5*の破壊を導入する事で、 Δ *ppz1*株のCaf^sが抑制される事を見出している。この結果をもとに、Siw14とNpr1同様、Ppz1がGln3のリン酸化状態や細胞内局在をSat4やHal5と共に制御するかを調べ、その予想が正しいことを見出している。さらに、 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であった事から、Ppz1とSiw14はカフェイン応答において異なる経路で働く結論付けている。

第四章では、全てのPPaseを対象に、その破壊株の発現プロファイルを取得し、これらと機能既知遺伝子(RG: Reference Gene)破壊株の発現プロファイルとの相関をピアソン相関係数で解析することによって、発現プロファイルから全PPaseの細胞内機能の推定を試みている。研究開始時に、316個のRG破壊株の発現プロファイルが公開されていたため、まず、全 Δ *ppase*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ている。その結果、相関係数>0.2の時、32種のPPaseのうち26個の Δ *ppase*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ている。この結果をもとに、RG破壊株で既知の表現型を、実験的に Δ *ppase*株で調べた結果、いくつかの新規の表現型を示す Δ *ppase*株を見出している。これらの結果より、機能未知遺伝子の破壊株の新規表現型を見出す上でピアソンの相関解析は有用であると結論付けている。

第五章の総合討論では、PPaseのゲノム機能科学において、本研究で行ったゲノムサイエンスの手法の有用性と、本研究で得られた成果と知見をまとめるとともに、この分野についての今後の展望を述べている。

以上のように、本論文は、高等真核生物で多数見出されているPPaseの細胞生理を研究する上で、その研究指針となりうる多くの知見をもたらしたものである。よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。