

分裂酵母のシグナル伝達系の解析

Analysis of signal transduction in fission yeast

代表研究者 島根大学生物資源科学部助教授 川向 誠
Assoc. Prof. Faculty of Life and Environmental Science,
Shimane University.
Makoto Kawamukai

There are two main signal transduction pathways for sexual development in fission yeast. One is the Ras signal transduction responsible for pheromone signal and the other is cAMP signal transduction pathway responsible for nutritional signal. We isolated the new genes involved in these pathways. The *hcs* gene encoding HMGCoA synthase is presume to affect the ratio of farnesylation of Ras and/or the pheromone factor. Second gene we analyzed is the *sir2* gene encoding RNA helicase homolog, which involved in both Ras and cAMP pathways. The third gene called *moc1* is an unique gene that involved in both meiosis and mitosis. The adenylyl cyclase associated protein CAP was also characterized in this study.

研究目的

分裂酵母は栄養源の豊富な時は体細胞分裂過程により増殖し、栄養源飢餓と性フェロモンの存在下では接合し孢子形成を行う有性生殖を行う。分裂酵母のシグナル伝達系には栄養源を感じて伝達するシグナル伝達系とフェロモンのシグナルを伝えるシグナル伝達系、さらには浸透圧を感じするシグナル伝達系などがある。出芽酵母においてそれぞれのシグナル伝達系の概要が判明しているのに対し、分裂酵母では不明な点が多い。分裂酵母のフェロモンのシグナル伝達系にはG蛋白質とRasを中心とし、Mapキナーゼ系の因子がその下流で働いている。出芽酵母のRasはアデニル酸シクラーゼの活性調節を行っているのに対し、分裂酵母のRasの下流には高等生物におけるMAPキナーゼ系との共通が見られるプロテインキナーゼ群のSpk1, Byr1, Byr2が位置する。このように高等生物と分裂酵母のRas

のシグナル伝達系の並び方に共通性がみられ、分裂酵母の解析はより広く高等生物の解析にも役立つ。一方、栄養源のシグナル伝達系はcAMPが中心となり、cAMPを合成するアデニル酸シクラーゼは3量体型G蛋白質によってその活性が調節されており、この点においても分裂酵母の方が出芽酵母よりその構成がより高等生物型に近いことがわかる。またCapと呼ばれるタンパク質はアデニル酸シクラーゼに結合して、アデニル酸シクラーゼの活性を助けていると考えられている。本研究では分裂酵母でのシグナル伝達系に関わる因子を解析し、より普遍的な生物の基本システムを理解することを目的とした。

研究経過・成果

分裂酵母のRasシグナル伝達系

分裂酵母のRasはフェロモンのシグナル伝達に

関与し、*ras1*欠失株は有性生殖不能になる。これまでに高発現することにより*ras*をバイパスする遺伝子として*byr2*や*byr1*が単離されてきている。我々は*Ras*の周辺や下流にはまだまだその調節に関わる新しい因子が存在すると考え、遺伝学的なアプローチをとった。まず栄養源が豊富な培地で胞子形成を行わない条件下で効率よく胞子形成する変異株を変異剤処理を行うことによって複数単離した。その後にその変異株と*ras1*欠失株との2重変異株を作製し、*ras1*の要求性をバイパスする株を2株得た。この2株は*ras1*欠失に対して優性の性質を示した。また直接*ras1*株に変異処理を施し、上記2株と性質の異なる変異株も得ている。その中には*byr2*を破壊しても*byr2*の要求をバイパスするものが存在した。このような方法で単離した変異株の中には既知の遺伝子以外の変異であるものが含まれている可能性が高い。一方、優性不能型の出芽酵母の*RAS2*を発現させ、分裂酵母の*Ras*の機能を低下させた株を構築し、その株よりマルチコピーサプレッサーを単離した。その中には*byr2*も含まれているが、それ以外にRNAヘリカーゼをコードすると考えられる*sir2*遺伝子を得た。*sir2*遺伝子は下記に述べるようにアデニル酸シクラーゼ高発現株の抑制型遺伝子としても単離したが、*sir2*遺伝子そのものは増殖に必要であり広範囲に働いている遺伝子であると考えられる。

HMGC_oAシンターゼ (*hcs*) 遺伝子

上記で述べた高胞子形成を誘導する変異株を用いてその性質を相補する遺伝子を何種類か単離した。その中で解析を行った遺伝子の1つにヒト、ラット、チキン、ハムスターなどの高等生物のHMGC_oAシンターゼ遺伝子と高い相同性を示すものが存在し、*hcs* (HMGC_oA Synthase) と命名した。HMGC_oAシンターゼはHMGC_oAレダクターゼとともにメバロン酸からイソプレノイド化合物へと合成されていく過程の鍵の酵素であり

出芽酵母では活性化型の*Ras*を抑制する変異としてHMGC_oAシンターゼやHMGC_oAレダクターゼ遺伝子の変異が知られている。出芽酵母においては*Ras*の活性にはファルネシル化が重要であり、イソプレノイド量の減少により*Ras*の活性が落ちたための現象ではないかと考えられている。我々は分裂酵母での*hcs*の役割を知るための2倍体より一方の*hcs*を破壊した株を作製し、4分子分析を行った。その結果*hcs*破壊株はそのままでは生育せず5mg/mlのメバロン酸の添加により生育が可能になった。このことは分裂酵母のHMGC_oAシンターゼ遺伝子は一種類であることを示している。ちなみに出芽酵母は2種類のHMGC_oAシンターゼ遺伝子を有しているという報告がある。HMGC_oAレダクターゼの阻害剤であるブラバスタチンを添加した野生株分裂酵母では胞子形成能が減少し、確かにメバロン酸経路と胞子形成の関係が見られた。分裂酵母も出芽酵母と同様に*Ras*フェロモンのファルネシル化による活性の調節がメバロン酸経路で行われていると考えている。

分裂酵母のcAMPシグナル伝達系と*moc1*遺伝子

分裂酵母は栄養源飢餓状態では接合胞子形成過程を経る有性生殖を行う。その際cAMPの量的な変動が鍵を握る。cAMPの合成ができないアデニル酸シクラーゼ遺伝子変異株では富栄養源下でも接合胞子形成過程を行い、逆に過剰cAMP存在下では貧栄養下でも接合胞子形成過程を経ない。cAMPの合成を担うアデニル酸シクラーゼはG蛋白質の調節を受けるとされており、cAMPはフォスフォジエステラーゼによる分解を受ける。cAMPの調節機構をさらに調べるために、アデニル酸シクラーゼ遺伝子を高発現させることにより部分的に有性生殖不能になっている株に野生型ライブラリーを導入し、その性質を抑圧する遺伝子をクローニングした。その結果、上記で述べた*sir2*とともに*moc1*と命名した興味深い遺

伝子を見いだした。*moc1*遺伝子はMuticopy sup-
pressor of Over expression of adenyllyl Cyc-
laseより命名した。*moc1*遺伝子を含むDNAの断
片の塩基配列決定により、*moc1*は408アミノ酸
からなる蛋白質をコードしていることが判明し
た。DNA・蛋白質データベースとの相同性
検索から*moc1*遺伝子と相同性を有する遺伝子が
出芽酵母に存在する事が判明した。*moc1*遺伝子
を *ura3* マーカーで破壊した株は、有性生殖不能、
細胞伸張、高温感受性、ストレス感受性などの
多面的な性質を示した。この性質は浸透圧制御
に関わるシグナル伝達系の *wis1* 変異株と類似の
性質を示した。このことからcAMPシグナル伝達
系と浸透圧シグナル伝達系の接点が示唆された。

アデニル酸シクラーゼ結合タンパク質 (Cap)

Capタンパク質はアデニル酸シクラーゼの結合
タンパク質としてまず出芽酵母で次いで分裂酵
母で見いだされたものである。Cap蛋白質は3つ
のドメイン構造を持ち、そのことが出芽酵母で
良く調べられている。N末側のドメインはアデ
ニル酸シクラーゼと結合し、C末側のドメイン
はアクチンの結合ドメインである。中央にはポ
リプロリン配列を持つ領域が存在しSH3ドメイ
ンを持つ蛋白質と相互作用する(図1)。それ
ではもっと高等生物あるいは他の生物ではどう
であろうか。われわれは分裂酵母の *cap* 変異株に直
接ヒトのライブラリーを導入し相補できる遺伝

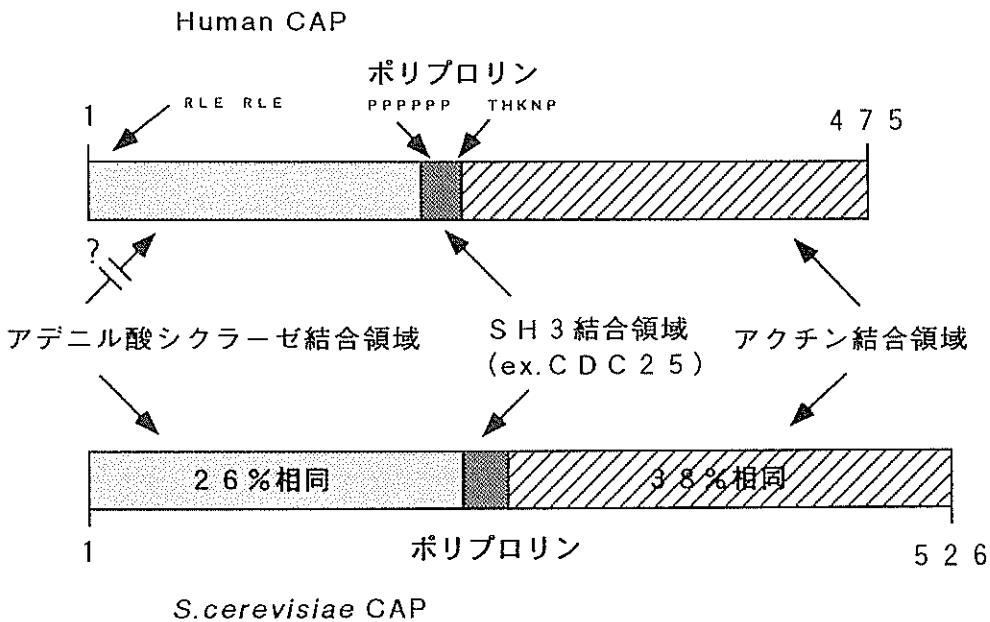


図1 CAPタンパク質の3つのドメイン

子を単離したところヒト *cap* ホモログ遺伝子の単離に成功した。出芽酵母、及び分裂酵母では Cap はアデニル酸シクラーゼ結合タンパク質としてまた細胞骨格形成に関わるタンパク質として同定されているが、ヒト Cap タンパク質と酵母アデニル酸シクラーゼの結合は見られなかった。酵母のツーハイブリッド系を用いた実験を行ったところヒト Cap ホモログと結合しうるものの中にはアデニル酸シクラーゼと思われるものはとれていない。むしろ Cap はアクチン結合タンパク質として保存されており、このことは免疫沈降実験、ツーハイブリッド実験などで確かめることが出来た。

今後の課題と発展

今回、分裂酵母でのシグナル伝達系を解析する目的で2種類の経路に注目した。1つは Ras シグナル伝達系でもう1つは cAMP シグナル伝達系である。Ras シグナル伝達系の解析により HMG CoA シンターゼ遺伝子や RNA ヘリカーゼ遺伝子を単離した。前者の機能ははっきりとしてきているが後者の機能がはっきりとせず今後の課題となる。一方 cAMP シグナル伝達系については *moc1* と命名した新たな遺伝子の単離を行い、アデニル酸シクラーゼ結合蛋白質のホモログの解析を行った。*moc1* は未知の部分が多くさらに遺伝学的な解析と生化学的な解析が必要となる。Cap 蛋白質については高等生物での機能が次の焦点となる。

謝辞

上記の研究を推進するのに、研究の助成をいただいた日産科学振興財団に厚く感謝を申し上げます。この研究に協力を頂いた信州大学千菊夫先生、コールドスプリングハーバー研究所 M. Wigler 博士に感謝いたします。

発表論文

1. Kawamukai, M., Adachi, Y., Nakagawa, T., and Matsuda, H. Genes that suppress the phenotype caused by high expression of *cyr1* in *S. pombe*. Yeast Genetics and Molecular Biology Meeting. p.169 (1994)
2. Katayama, S., Nakagawa, T., Matsuda H., and Kawamukai, M. Characterization of *sam* mutations which induce hyper sporulation in fission yeast. Yeast Genetics and Molecular Biology Meeting. p.170 (1994)
3. Kawamukai, M., Adachi, Y., Nakagawa, T., and Matsuda, H. Analysis of the *moc1* and *moc2* genes that are involved in both meiosis and mitosis in *S. pombe*. Yeast 11, S106 (1995)
4. Katayama, S., Adachi, N., Takao, K., Nakagawa, T., Matsuda H., and Kawamukai, M. Molecular cloning and sequencing of the *hcs* gene, which encodes 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A synthase of *S. pombe*. Yeast (in press)