

分裂酵母を用いた
低容量ストレス応答機構の解析

樽本 雄介

目次

要旨	2
略語表	3
第一章 序論	4
1-1 はじめに	5
1-2 低容量ストレスへの応答	5
1-3 翻訳制御と eIF2 α のリン酸化	5
1-3-1 ストレス応答時の翻訳制御	5
1-3-2 Gcn2	7
1-4 Cpc2/RACK1	7
1-5 本研究の目的	8
第二章 材料と方法	10
2-1 細胞	11
2-2 試薬・酵素	12
2-3 大腸菌、分裂酵母の培地ならびに操作	12
2-4 ストレス処理	12
2-5 ウェスタンブロット法と免疫沈降法	12
2-6 RT-PCR	13
2-7 試験管内リン酸化反応	13
2-8 ショ糖密度勾配遠心	13
第三章 結果	15
3-1 Cpc2 と eIF2 α のリン酸化の関連	16
3-2 Cpc2 による Gcn2 の制御機構	19
第四章 考察	28
4-1 Cpc2 による Gcn2 の制御	29
4-2 今後の展望	29
付録	31
参考文献	32
謝辞	36

要旨

生物は、生体内外の環境変化により種々のストレスを受ける。そのようなストレスの多くは、種類や強度が時間とともに変動し、単独では明確な表現型を示さない低容量のものである。しかし、ストレスの蓄積が、細胞や個体の老化、幹細胞の再生能の低下などに関与することが近年明らかになっており、晒される頻度の高い低容量ストレスへの応答は、個体や組織の維持に必須となる。つまり、細胞および生体の運命に深く関わる低容量ストレス応答の分子機構を解明することは、細胞のストレス応答を理解する上で重要である。

一般アミノ酸制御 (General amino acid control) とは、アミノ酸飢餓によって誘導される酵母のストレス応答の 1 つである。ストレスによって翻訳開始因子 eIF2 α のリン酸化が誘導され、全般的な翻訳効率が減少すると同時に、ストレス応答に必要な蛋白質の翻訳効率上昇が引き起こされる。本研究では、分裂酵母 *cpc2* 遺伝子破壊株がアミノ酸飢餓ストレスに対して高い感受性を示すことを明らかにし、Cpc2 が一般アミノ酸制御に関与することを見いだした。Cpc2 は真核生物間で高度に保存された蛋白質である。蛋白質間相互作用を介してシグナル伝達時の足場蛋白質として機能すること、および、リボソームに結合して翻訳制御に関与することが他の生物種の解析により報告されている。アミノ酸飢餓ストレス応答時には、eIF2 α のリン酸化酵素である Gcn2 が中心的役割を担う。本研究ではまず、分裂酵母 Gcn2 が自己リン酸化すること、および自己リン酸化が Gcn2 の活性化に必要であることを示した。さらに、Cpc2 がこの Gcn2 の自己リン酸化 (活性化) に重要であることを明らかにした。これと一致して、*cpc2* 遺伝子破壊株では *gcn2* 遺伝子破壊株と同様に、アミノ酸飢餓ストレスによる eIF2 α のリン酸化が観察されず、アミノ酸合成遺伝子の発現量が大きく低下した。以上の結果から、Cpc2 は Gcn2 の活性化を介して、eIF2 α のリン酸化依存的な翻訳制御を行い、アミノ酸飢餓ストレス応答に機能していると結論づけた。

低容量ストレス応答時の遺伝子発現においては、転写調節よりも翻訳調節の方が発現量の変化に対する寄与が大きいことが報告されている。Cpc2 は、ストレス応答時の翻訳を制御することによって、細胞の低容量ストレス応答に貢献することが示唆された。

略語表

3AT	: 3-amino-1H-1,2,4-triazole
ATP	: adenosine triphosphate
BPB	: bromophenol blue
cDNA	: complementary DNA
DNA	: deoxyribonucleic acid
DNase	: deoxyribonuclease
ECL	: enhanced chemiluminescence
EDTA	: ethylenediaminetetraacetic acid
EGTA	: ethylene glycol tetraacetic acid
HRP	: horseradish peroxidase
IgG	: immunoglobulin G
MOPS	: 3-(N-morpholino)propanesulfonic acid
mRNA	: messenger RNA
ORF	: open reading frame
PCR	: polymerase chain reaction
PAGE	: polyacrylamide gel electrophoresis
PKC	: protein kinase C
PMSF	: phenylmethylsulfonic acid
PVDF	: polyvinylidene difluoride
rRNA	: ribosomal RNA
RNA	: ribonucleic acid
RNase	: ribonuclease
ROS	: reactive oxygen species
RT	: reverse transcription
SDS	: sodium dodecyl sulfate
tRNA	: transfer RNA
TE	: Tris-EDTA
Tris	: tris-(hydroxymethyl)-aminomethane
TOR	: target of rapamycin
uORF	: upstream ORF

第一章

序論

1-1 はじめに

好気的環境下で生存する生物は、常に低容量の酸化ストレスと紫外線ストレスに晒されている。また、全ての生物は常に周囲から情報を得ながら生存しており、温度や浸透圧、栄養状態の変化など様々な環境変動を要因とするストレスを受ける。そのようなストレスへ適応するため、生物は複雑なストレス応答機構を進化の過程で獲得してきた。

1-2 低容量ストレスへの応答

生物が受けるストレスの多くは、単独では細胞死などの明確な表現型を示さないような比較的low容量のものであると考えられる。また、ストレスの強度や種類は時間とともに変動する場合が多い。それらに適切に応答することは生存と子孫の再生産に有利となるため、低容量ストレスや変動するストレス環境に対する応答機構は生物が備える基本的な機能として進化してきたと考えられる。しかし、表現型として観察することが困難な細胞応答を定量的に評価できる系がないことから、このような低容量ストレスに対する細胞応答の分子機構の理解は進んでいない。

1-3 翻訳制御と eIF2 α のリン酸化

1-3-1 ストレス応答時の翻訳制御

遺伝子発現パターンを変化させることは環境変化に対して迅速に対応するために重要である。主に転写レベルでの研究が以前から行なわれてきたが、近年では翻訳レベルでの制御も多く研究されている。一般に、転写を介した応答よりも、すでに存在する mRNA の翻訳調節の方が迅速に蛋白質量の変化につながる。出芽酵母での報告では、低容量ストレスに対しては転写応答よりも翻訳応答の方が遺伝子発現パターンに寄与することが示唆されている (Halbeisen and Gerber, 2009)。ストレス応答時の翻訳調節としては翻訳開始段階での制御が良く知られている (Holcik and Sonenberg, 2005)。GTP 結合蛋白質である翻訳開始因子 eIF2 (eukaryotic translation initiation factor 2) は開始メチオニル tRNA をリボソームへ運搬するために必須であり、この過程で eIF2、GTP、メチオニル tRNA からなる三量体形成が重要である (図 1-1)。開始コドン認識後、GTP が加水分解されて eIF2 がリボソーム複合体から解離することで後に続く翻訳過程を進行させる。細胞がストレスに晒されると、eIF2 の α サブユニットがリン酸化を受けて GDP-GTP 交換因子である eIF2B の機能を妨げるため、全般的な翻訳効率が減少する。一方で、ストレス応答に必要な遺伝子の翻訳効率が相対的に上昇することが報告されている。この制御は、mRNA の 5' 非翻訳領域に存在する小さな ORF (upstream ORF: uORF) に依存しており、出芽酵母 Gcn4 や哺乳類 ATF4 の例がよく知られている (Lu et al., 2004; Mueller and Hinnebusch, 1986; Vattam and Wek, 2004)。出芽酵母の eIF2 α キナーゼが Gcn2 だけであるのに対して、分裂酵母や哺乳類ではそれぞれ 3 つ (Gcn2, Hri1, Hri2) あるいは 4 つ (Gcn2, HRI, PKR, PERK) 存在する (Holcik and Sonenberg, 2005; Zhan et al., 2004)。

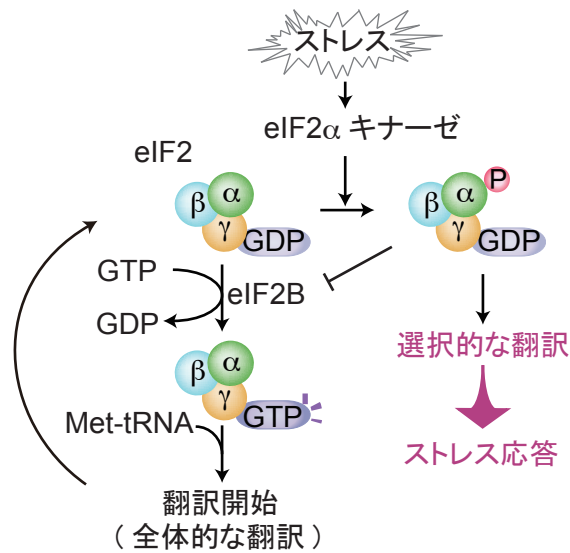


図 1-1 ストレス応答時の eIF2α のリン酸化による翻訳制御機構

Holcik M. and Sonenberg N. (2005) Nat. Rev. Mol. Cell Biol. を参考に作成した。eIF2 は α、β、γ の 3 つのサブユニットからなる。詳細は本文参照

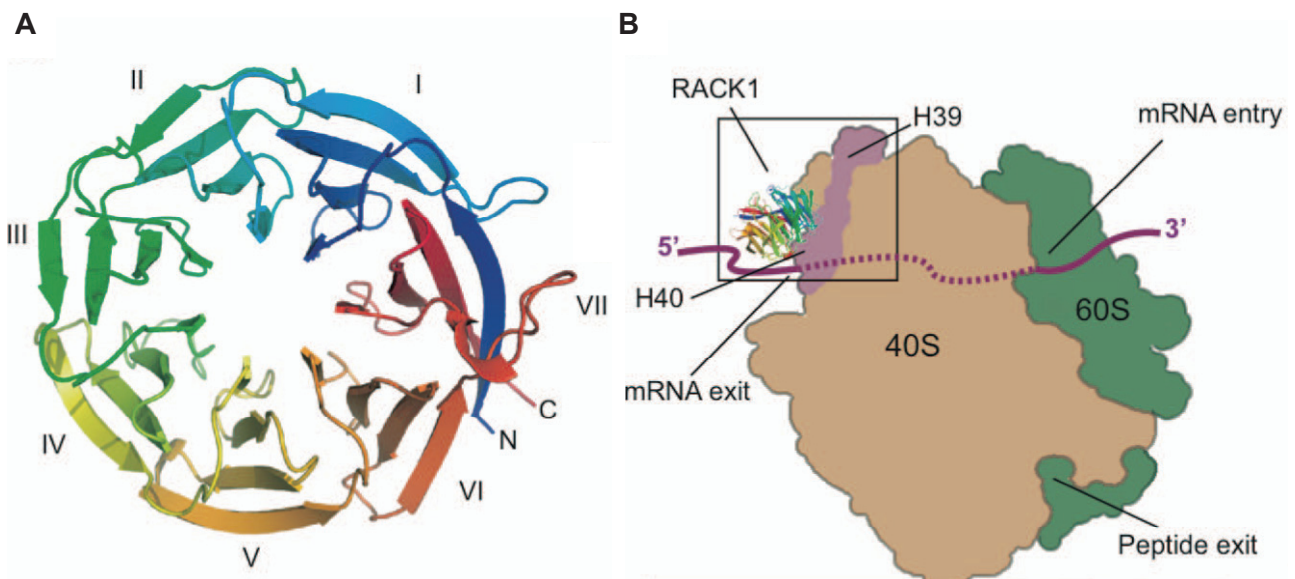


図 1-2 RACK1 の構造とリボソーム結合部位

Coyle SM *et al.* (2009) Mol. Cell. Biol. より引用。A、RACK1 のβプロペラ構造のリボンモデル。β シート 4 つから形成される WD40 ドメイン 7 つ (I~VII) が円錐状の立体構造を形成する。B、RACK1 はリボソーム 40S サブユニットの mRNA の出口に近い場所に結合する。H39 と H40 はそれぞれ 18S rRNA の helice 39 と 40 を指す。

eIF2 α リン酸化を介した細胞応答は、異なるストレスに対して全般的な翻訳低下と選択的な翻訳上昇という共通の翻訳応答を誘導することから、統合性ストレス応答 (integrated stress response) とも呼ばれる(Harding et al., 2003)。

1-3-2 Gcn2

一般アミノ酸制御 (General amino acid control) とは、アミノ酸飢餓によって誘導される酵母のストレス応答の1つであり、全般的な翻訳量を低下させると同時に、アミノ酸合成に関わる酵素遺伝子などの発現を誘導する代謝応答である。出芽酵母において一般アミノ酸制御に重要な因子の1つとして同定された Gcn2 (general control noninducible 2) は、前述したように eIF2 α キナーゼである。複数ある eIF2 α キナーゼの中で、Gcn2 はアミノ酸飢餓やグルコース飢餓などの栄養状態のセンサーとして重要な役割を担う。出芽酵母における研究から、試験管内では Gcn2 がアミノアシル化されていない (アミノ酸が結合していない) tRNA と高い結合親和性をもつこと(Dong et al., 2000)、この結合は Gcn2 がもつヒスチジン tRNA 転移酵素様ドメイン内で起こることが示されている(Wek et al., 1995)。他の eIF2 α キナーゼ同様に、Gcn2 の活性化には自身の二量体形成が必要である(Qiu et al., 1998)。これらの実験事実と Gcn2 の X 線結晶構造解析から、二量体形成時はまだ抑制状態であり、tRNA の結合によって Gcn2 が構造変化を起こして活性化状態になるというモデルが提唱されている(Padyana et al., 2005)。また、キナーゼドメイン内の自己リン酸化が Gcn2 の活性化には必要である(Romano et al., 1998)。Gcn2 はカルボキシ末端でリボソームと相互作用しており(Zhu and Wek, 1998)、この相互作用はアミノアシル化されていない tRNA がリボソームに取り込まれた際の Gcn2 と tRNA の結合を促進していると予想されている。

トランス因子によっても Gcn2 の活性は制御される。例えば、出芽酵母 Gcn2 のセリン 577 のリン酸化は Gcn2 の活性を抑制する(Garcia-Barrio et al., 2002)。対応するキナーゼは明らかではないが、TOR (target of rapamycin) 経路によってリン酸化が負に制御されていることが知られている(Cherkasova and Hinnebusch, 2003)。一方、Gcn2 のアミノ末端は Gcn1-Gcn20 複合体を介してリボソームと結合しており、Gcn1 は Gcn2 の活性化に必須である(Sattlegger and Hinnebusch, 2005)。ただし、tRNA 結合以外の Gcn2 の活性調節については詳細な分子機構が明らかにされていない。

1-4 Cpc2/RACK1

RACK1 (receptor for activated C-kinase 1) は真核生物において高度に保存された蛋白質である (ホモログは哺乳類では RACK1、出芽酵母では Asc1、分裂酵母では Cpc2 と命名されている)。RACK1 はトリの肝臓およびヒトの B リンパ芽球細胞株由来の cDNA からはじめにクローニングされ(Guillemot et al., 1989)、活性化したプロテインキナーゼ C (PKC) と結合する因子として同定された(Ron et al., 1994)。トリプトファン (W) と

アスパラギン酸 (D) の配列が特徴的な WD40 モチーフを 7 つもち、三量体 G 蛋白質 β サブユニットと類似した β プロペラ構造をとる (図 1-2A)。その後の解析により RACK1 は PKC の多くのアイソフォーム以外にも、がん遺伝子として知られる Src ファミリーキナーゼ、細胞接着分子である β -インテグリンなど様々な蛋白質と相互作用することが報告され、細胞内の多くのシグナル伝達における足場 (scaffold) 蛋白質として機能すると考えられている(McCahill et al., 2002)。また、RACK1 ホモログがリボソームに結合していることが近年明らかとなり(Coyle et al., 2009; Sengupta et al., 2004; Shor et al., 2003) (図 1-2B)、翻訳制御に関する多くの報告がなされている(Baum et al., 2004; Ceci et al., 2003; Kouba et al., 2012; Kuroha et al., 2010; Shor et al., 2003)。ただし、様々な分子機構が提案されているため、RACK1 ホモログの翻訳制御における機能の全貌は不明な部分が多い。少なくとも一部のシグナル伝達因子との結合はリボソーム上で起こることから、外部からのシグナルを翻訳制御へと変換する役割が示唆されている(Nilsson et al., 2004)。なお、RACK1 のノックアウトマウスは原腸陥入が正常に起こらずに胎生致死となる (Volta et al., 2013)。

分裂酵母 Cpc2 (cross-pathway control 2) は、減数分裂誘導に関与する Ran1 (Pat1) に結合する因子として同定され(McLeod et al., 2000)、欠損すると減数分裂を誘導する窒素源枯渇時に G1 期での細胞周期停止が起こらず、接合・胞子形成が遅延する。また、増殖期でも G2/M 期移行の遅延がみられる(Nunez et al., 2010)。PKC との結合やリボソームとの結合も報告されており (Shor et al., 2003; Won et al., 2001)、シグナル伝達の足場タンパク質としての機能と翻訳制御への関与は他の生物種同様に保存されていると考えられる。

ストレス応答における RACK1 ホモログの機能として、特に eIF2 α リン酸化との関連としていくつか報告がある。出芽酵母 Asc1 は、翻訳開始因子の 1 つである eIF3c と結合して翻訳開始を促進することで、一般アミノ酸制御応答を負に調節している(Kouba et al., 2012)。ただし、アカパンカビでは一般アミノ酸制御 (アカパンカビでは cross-pathway control と呼ばれる) に必要な因子として cpc-2 (RACK1 ホモログ) が同定されており (Muller et al., 1995)、一般アミノ酸制御に対する RACK1 ホモログの機能は議論の余地がある。

1-5 本研究の目的

本研究では、低容量ストレス応答に機能する因子の探索、その機能の解明を行なうことを目的とした。そのために、ストレス応答のシグナル伝達経路がよりシンプルな形でヒトなどとの間で保存された分裂酵母を用いた遺伝学的な解析を計画した。

ストレスの蓄積が、細胞や個体の老化、幹細胞の再生能の低下などにつながることは近年明らかになっており、晒される頻度が高いことが予想される低容量ストレスに対する応答が、個体や組織の維持に重要であることが示唆される。つまり、低容量ストレス

応答は、細胞および生体の運命に大きく関わっており、その分子機構を解明することは細胞のストレス応答を理解する上で重要である。

第二章

材料と方法

2-1 細胞

本研究で用いた分裂酵母株とその遺伝子型を以下に示す。

JK316	h^+	<i>leu1-32 ura4-D18</i>
JK317	h^-	<i>leu1-32 ura4-D18</i>
JK1380	h^+	<i>ade6-M210 leu1-32</i>
YT2307	h^-	<i>cpc2::ura4⁺ leu1-32 ura4-D18</i>
YT2453	h^-	<i>hri2::ura4⁺ leu1-32 ura4-D18</i>
YT2459	h^-	<i>hri2::ura4⁺ gcn2::Kan^r leu1-32 ura4-D18</i>
YT2463	h^-	<i>hri1::ura4⁺ hri2::LEU2 gcn2::Kan^r leu1-32 ura4-D18</i>
YT2465	h^-	<i>rpS3:Flag:ura4⁺ leu1-32 ura4-D18</i>
YT2649	h^-	<i>tif211:Flag:ura4⁺ leu1-32 ura4-D18</i>
YT2727	h^-	<i>tif211:Flag:ura4⁺ gcn2::Kan^r leu1-32 ura4-D18</i>
YT2729	h^-	<i>tif211:Flag:ura4⁺ hri2::LEU2 leu1-32 ura4-D18</i>
YT2741	h^-	<i>tif211:Flag:ura4⁺ cpc2::LEU2 leu1-32 ura4-D18</i>
YT2824	h^-	<i>cpc2::ura4⁺ gcn2::Kan^r leu1-32 ura4-D18</i>
YT3033	h^-	<i>leu1-32</i>
YT3173	h^-	<i>hri2:: ura4⁺ cpc2::ura4⁺ leu1-32 ura4-D18</i>
YT3360	h^-	<i>gcn2::ura4⁺ leu1-32 ura4-D18</i>
YT3372	h^-	<i>5Flag:gcn2 leu1-32 ura4-D18</i>
YT3540	h^-	<i>cpc2::Kan^r leu1-32 ura4-D18</i>
YT3542	h^-	<i>cpc2_DE leu1-32 ura4-D18</i>
YT3559	h^-	<i>5Flag:gcn2 cpc2_DE:ura4⁺ leu1-32 ura4-D18</i>
YT3598	h^-	<i>5Flag:gcn2 cpc2::ura4⁺ leu1-32 ura4-D18</i>
YT3648	h^-	<i>5Flag:gcn2::ura4⁺ leu1-32 ura4-D18</i>
YT3656	h^-	<i>5Flag:gcn2_K585R leu1-32 ura4-D18</i>
YT3657	h^-	<i>5Flag:gcn2_T818/823A leu1-32 ura4-D18</i>
YT4279	h^+/h^-	<i>5Flag:gcn2/12myc:gcn2 ade6-M210/ade6-M216 leu1-32/leu1-32 ura4-D18/ura4-D18</i>
YT4280	h^+/h^-	<i>5Flag:gcn2/12myc:gcn2 cpc2::ura4⁺/cpc2::ura4⁺ ade6-M210/ade6-M216 leu1-32/leu1-32 ura4-D18/ura4-D18</i>
YT4281	h^+/h^-	<i>12myc:gcn2/gcn2⁺ ade6-M210/ade6-M216 leu1-32/leu1-32 ura4-D18/ura4-D18</i>
YT4299	h^-	<i>cpc2_W43* leu1-32 ura4-D18</i>
YT4309	h^-	<i>5Flag:gcn2 cpc2_W43* leu1-32 ura4-D18</i>
YT4376	h^+/h^-	<i>5Flag:gcn2/gcn2⁺ ade6-M210/ade6-M216 leu1-32/leu1-32 ura4-D18/ura4-D18</i>

2-2 試薬・酵素等

本研究では以下特に示さない限り、試薬類はナカライテスク社、酵素類は宝酒造、培地類は Difco 社の製品を用いた。

2-3 大腸菌、分裂酵母の培地ならびに操作

大腸菌の培地の組成、および基本的な操作は Sambrook らにならい(Sambrook et al., 1989)、必要に応じて終濃度 100 µg/ml のアンピシリンを加えて用いた。分裂酵母の培地の組成、および基本的な操作は Moreno らにならった(Moreno et al., 1991)。

2-4 ストレス処理

アミノ酸飢餓ストレスは、終濃度 10 mM の 3-アミノトリアゾール (3-amino-1H-1,2,4-triazole: 3AT) を EMM 培地に加えた。プレート上でのストレス処理は、32°Cの液体培地で培養した酵母を 10 倍ずつ希釈した系列を作製し、3AT を含むプレート上にスポットして培養した。

2-5 ウェスタンブロット法と免疫沈降法

全細胞抽出液の調製の場合は、対数増殖期で集菌した酵母をアルカリバッファー (1.85 M 水酸化ナトリウム、7.4% メルカプトエタノール) に懸濁して 10 分間氷上で静置した。等量の 50%トリクロロ酢酸を加え、さらに 10 分間氷上で静置した後、12,000 rpm で 2 分間遠心した。沈殿した蛋白質を 2 x サンプルバッファー (0.1 M Tris-HCl [pH 6.8]、4% SDS、20% グリセロール、200 mM DTT、0.2% BPB) に懸濁し、105°Cにて変性させたものを使用した。免疫沈降を行なう場合は、酵母にバッファーA (25 mM MOPS [pH 7.2]、15 mM EGTA、150 mM NaCl、0.1% ノニデット P-40、1 mM ジチオスレイトール、10% グリセロール、50 mM フッ化ナトリウム、1 mM PMSF、Complete (Roche)、PhosSTOP (Roche)) とジルコニアビーズを加え、マルチビーズショッカー (安井器械) で破碎して (破碎条件は 2,700 rpm、60 秒 x3) 細胞抽出液を調製した。リン酸化 Gcn2 の検出の際は FLAG M2 アガロースビーズ (Sigma) を用いて免疫沈降した。共沈降実験の際は、FLAG M2 抗体 (Sigma、F-3165) を用いた。免疫沈降したビーズは 300 mM NaCl を含むバッファーA で洗浄後、2 x サンプルバッファーに懸濁した。

蛋白質は SDS-PAGE で分離後、PVDF 膜 (Immobilon、Millipore) にセミドライ法で転写し、室温の 3%BSA (シグマ) で 1 時間ブロッキングした。用いた一次抗体は、以下の通りである。リン酸化 eIF2α抗体 (Invitrogen、44-728G)、Cdc2 (PSTAIRE) 抗体 (Santa

Cruz, sc-53)、FLAG M2 抗体 (Sigma, F-3165)、リン酸化 Gen2 抗体 (ADEDL(P)TTGVGC ペプチドを用いて MBL にて作製)、Cpc2 抗体 (組換え Cpc2 蛋白質を用いて Pocono Rabbit Farm and Laboratory で作製)、c-Myc 抗体 (Santa Cruz, sc-40)。二次抗体には HRP 標識抗マウス IgG 抗体あるいは HRP 標識抗ラビット IgG 抗体 (ともに GE Healthcare)、シグナルの検出には ECL (GE Healthcare) を使用した。

2 - 6 RT-PCR

全対数増殖期にある酵母に 10 mM 3AT あるいは 1 mM H₂O₂ を指定時間処理した後集菌した。細胞に 300 μ l RNA バッファー (20 mM Tris-HCl [pH 7.5]、10 mM EDTA、1% SDS、300 mM NaCl)、300 μ l フェノールクロロホルムとジルコニアビーズを加え、マルチビーズショッカーで破碎した (2,000 rpm、60 秒 x1)。65°C で 5 分間加温した後、150 μ l TE を加え、15,000 rpm 5 分遠心した。400 μ l の上清に対して再度フェノールクロロホルム処理を行ない、エタノール沈殿により核酸を回収した (50 μ l RNase フリー水に懸濁)。ゲノム DNA を除くために 0.625 U/g RNA の DNase I で処理した。cDNA は AMV Reverse Transcriptase (Life Sciences Advanced Technologies) およびランダムプライマー (9 塩基) を用いて合成した。定量 PCR は StepOnePlusTM リアルタイム PCR システム (life technologies) および Power SYBR Green PCR master mix (life technologies) を用いて行った。PCR 反応に用いたプライマーは付録 1 に示した。

2 - 7 試験管内リン酸化反応

対数増殖期にある酵母を回収後、バッファー B (50 mM Tris-HCl [pH 8.0]、5 mM EGTA、150 mM NaCl、0.1% ノニデット P-40、50 mM フッ化ナトリウム、1 mM Na₃VO₄、1 mM PMSF、Complete) とジルコニアビーズを加え、マルチビーズショッカーで破碎した (2,700 rpm、60 秒 x3)。FLAG M2 アガロースビーズを用いて免疫沈降し、バッファー B およびキナーゼバッファー (20 mM Hepes-KOH [pH 7.5]、20 mM MgCl₂、5 mM EGTA、2 mM dithiothreitol) で 2 回ずつ洗浄し、10 μ M ATP を含む 20 μ l のキナーゼバッファーへ懸濁した。5 μ M ATP と 0.2 μ l の [γ -³²P]ATP (10 mCi/ml) を含む 10 μ l のキナーゼバッファーを加え、30°C で 30 分間反応させた。SDS-PAGE でシグナルを分離後、Typhoon 9400 と ImageQuant ソフトウェア (ともに GE Healthcare) を用いて取り込まれた RI シグナルを検出した。

2 - 8 ショ糖密度勾配遠心

Shor らの方法を一部改変しておこなった (Shor et al., 2003)。対数増殖期にある酵母に対して 100 μ g/ml のシクロヘキシミドを加えた後に集菌した。細胞に 300 μ l の TSM バッファー (10 mM Tris-HCl [pH 7.4]、100 mM NaCl、30 mM MgCl₂、50 μ g/ml シクロヘキシミド、200 μ g/ml ヘパリン、1 mM PMSF、Complete) とジルコニアビーズを加え、マルチビー

ズショッカーで破碎した(2,700 rpm、60秒x1)。グラジエントバッファー(7.5 mM Tris-HCl [pH 7.4]、70 mM NH₄Cl、3.9 mM MgOAc)を用いて15-50% (w/v) のショ糖密度勾配を作製し、遠心(14,000 rpm 15分)した後の上清をのせた。Beckman SW41ローターで40,000 rpm 3時間の遠心分離した。分画したサンプルの回収はグラジエントステーション(Biocomp)を使用して行ない、それに合わせて260 nmの吸光度を測定した。

第三章

結果

Cpc2 はリボソーム結合蛋白質として知られているが、翻訳調節に果たす役割は不明な点が多い。本研究では、Cpc2 が特にストレス応答時の翻訳制御にどのように寄与するか解析した。

3-1 Cpc2 と eIF2 α のリン酸化の関連

翻訳開始因子 eIF2 α のリン酸化は、ストレス応答時の主要な翻訳制御機構の 1 つとして知られる (図 1-1)。そこで、*cpc2*⁺ 遺伝子破壊株におけるリン酸化 eIF2 α の動態を調べた。まず、熱ストレス (40°C、1 時間) と酸化ストレス (10 mM H₂O₂、1 時間) を連続して処理したところ、野生型株では eIF2 α のリン酸化が両ストレス処理に応じて 2 度増加することが観察された (図 3-1A、B)。一方、*cpc2* Δ 株では、熱ストレスによる eIF2 α リン酸化は正常に起こったが、酸化ストレス処理時のリン酸化量は大きく減少していた (図 3-1A、B)。分裂酵母には 3 つの eIF2 α キナーゼ (Gcn2、Hri1、Hri2) があり、酸化ストレス応答時には Gcn2 と Hri2 が共に活性化しうることが知られている (Zhan et al., 2004)。本実験のストレス条件においてどちらのキナーゼが酸化ストレス応答時の eIF2 α リン酸化に重要であるか調べるため、*hri2*⁺ 遺伝子と *gcn2*⁺ 遺伝子をそれぞれ破壊した株を作製し、リン酸化 eIF2 α の動態を調べた。その結果、*gcn2* Δ 株においてのみ、*cpc2* Δ 株でみられたような酸化ストレス処理時の eIF2 α リン酸化の欠損が再現されたことから (図 3-1C)、Cpc2 は酸化ストレス応答時の Gcn2 の機能に重要であることが示唆された。

分裂酵母の 3 つの eIF2 α キナーゼはストレスの種類に応じて果たす役割が異なり、熱ストレスや酸化ストレスでは 2 つ以上のキナーゼが活性化しうる (Zhan et al., 2004)。一方で、アミノ酸飢餓ストレス応答時には、Gcn2 が主要なキナーゼとして機能することが報告されている (Udagawa et al., 2008; Zhan et al., 2004)。そこで、Cpc2 と Gcn2 の関係をより詳細に検討するため、以降はアミノ酸飢餓ストレス応答時における Cpc2 の機能に着目して解析を続けることにした。3-アミノトリアゾール (3AT) はヒスチジン合成を競合的に阻害することで、ヒスチジン飢餓ストレスを誘導する薬剤である。3AT を含むプレート上での *cpc2* Δ 株の生育は、*gcn2* Δ 株と同様に著しく悪化した (図 3-2A)。ただし、コントロールプレート上でも *cpc2* Δ 株は野生型株と比較すると生育の遅延が観察された。*gcn2* Δ *cpc2* Δ 二重破壊株の 3AT プレート上での生育はそれぞれ単独の遺伝子破壊株と変わらなかったことから、Cpc2 は Gcn2 と同経路で 3AT への応答に機能していることが示唆された。続いて、各破壊株における eIF2 α リン酸化の動態を調べたところ、*cpc2* Δ 株では 3AT 処理で誘導されるリン酸化 eIF2 α の量が大きく減少していた (図 3-2B レーン 9-12)。ただし、*gcn2* Δ 株とはやや異なり、弱いリン酸化シグナルが遅れて現れた (図 3-2B レーン 11、12)。このシグナルは *gcn2* Δ *cpc2* Δ 二重破壊株でも観察されたことから Gcn2 には依存していなかった (図 3-2B レーン 13-16)。他の eIF2 α キナーゼの関与を検討するため、*hri2*⁺ 遺伝子破壊株および *cpc2*⁺ 遺伝子や *gcn2*⁺ 遺伝子との二重破壊株を作製し、同様にリン酸化 eIF2 α の動態を調べた。*hri2*⁺ 遺伝子の単独破壊は eIF2 α リン酸

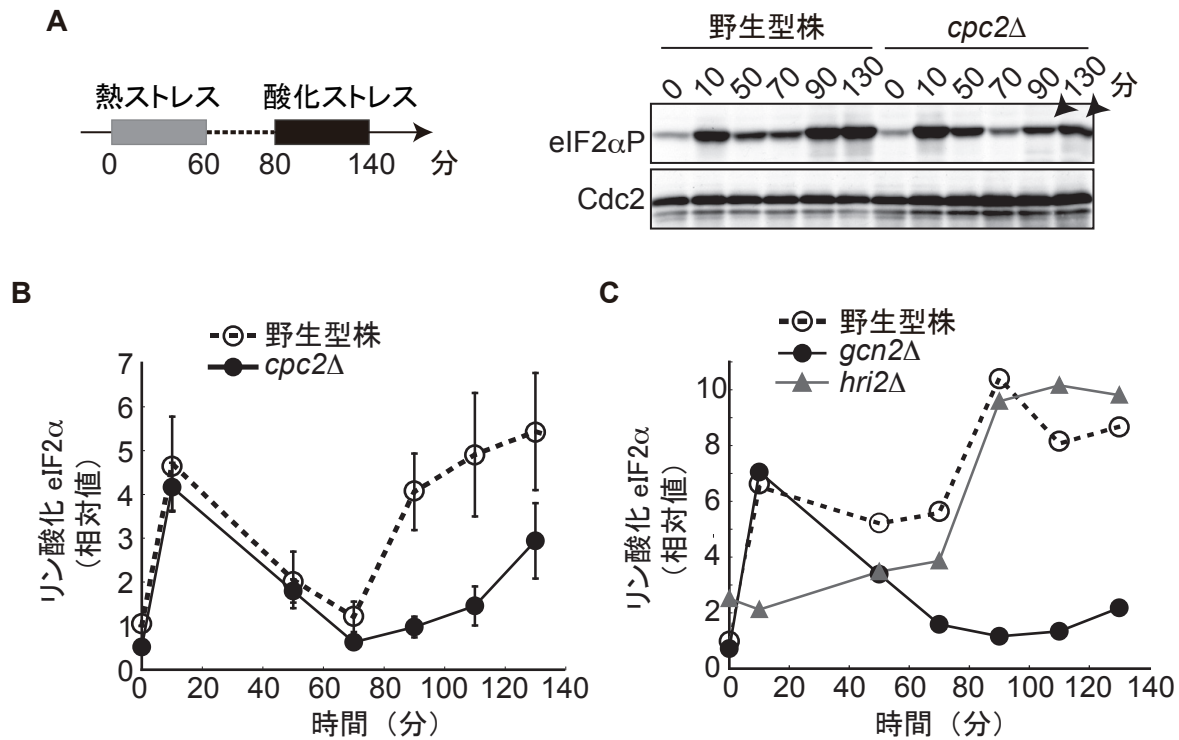


図 3-1 *cpc2Δ*株では Gcn2 依存的な eIF2 α のリン酸化量が減少する

A、野生型株および *cpc2Δ*株に、左図のような時間経過で熱ストレス (40°C、1 時間) + 酸化ストレス (10 mM H₂O₂、1 時間) 処理を行って経時的に細胞を回収し、リン酸化 eIF2 α (eIF2 α P) の量をウェスタンブロットにて調べた。Cdc2 は蛋白質量が一定であることのコントロール。*cpc2Δ*株では矢頭の点で野生型株と比べて eIF2 α のリン酸化量が減少した。**B**、**A** と同様の実験を FLAG タグが eIF2 α に付加された株を用いて行なった。リン酸化 eIF2 α の値を FLAG 抗体でのウェスタンブロットの値で補正した相対値を 3 回の実験の平均値と標準偏差で示した。**C**、**B** と同様の実験。ただし、一度の実験のデータを示す。*gcn2Δ*株では *cpc2Δ*株でみられたように酸化ストレス処理時のリン酸化 eIF2 α のシグナルが減少した。

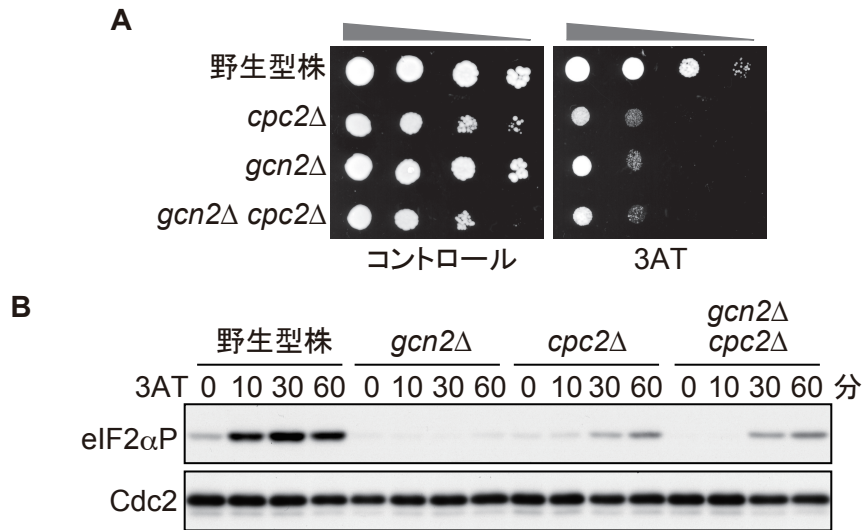


図 3-2 Cpc2 はアミノ酸飢餓ストレス時の eIF2α のリン酸化および生存に必要である
A、各株を 10 mM 3- アミノトリアゾール (3AT) を含むプレート上にスポットした。*cpc2*Δ株は *gcn2*Δ株と同程度の感受性を示し、二重破壊株において相加的な影響を示さなかった。**B**、10 mM 3AT 処理後の各株を経時的に回収し、リン酸化 eIF2α の量をウェスタンブロットにて調べた。Cdc2 は蛋白質量が一定であることのコントロール。*cpc2*Δ株では Gcn2 依存的な eIF2α のリン酸化が消失した。

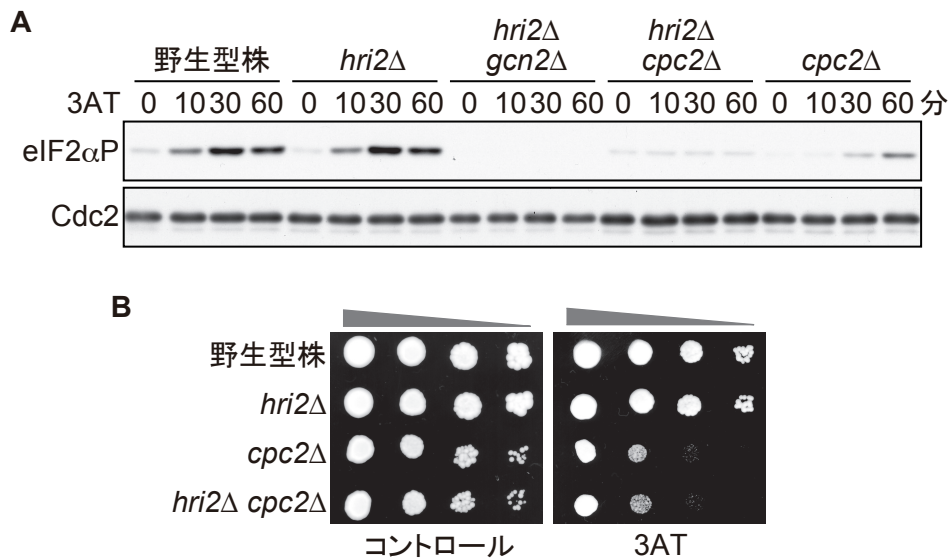


図 3-3 *cpc2*Δ株では Hri2 依存的な eIF2α リン酸化が起こる
A、10 mM 3AT 処理後の各株を経時的に回収し、リン酸化 eIF2α の量をウェスタンブロットにて調べた。Cdc2 は蛋白質量が一定であることのコントロール。*cpc2*Δ株で観察される遅延した弱いリン酸化 eIF2α は Hri2 依存的であった。**B**、各株を 10 mM 3AT を含むプレート上にスポットした。Hri2 の欠損は *cpc2*Δ株の 3AT 感受性には影響しなかった。

化に影響しなかったが (図 3-3A レーン 5-8)、*hri2Δ cpc2Δ*二重破壊株においては *cpc2Δ*株で見られていた弱い eIF2 α リン酸化シグナルが消失したことから (図 3-3A レーン 13-16)、*cpc2Δ*株ではなんらかのストレスが蓄積することで Hri2 が活性化することが示唆された。しかし、*hri2Δ cpc2Δ*二重破壊株の 3AT 感受性は *cpc2Δ*株と違いがなかったため (図 3-3B)、遅延して起こる eIF2 α リン酸化の、細胞の生存における意義は不明である。これらの結果から、Cpc2 が Gcn2 依存的な eIF2 α リン酸化に必要であることが示された。

出芽酵母や哺乳類では eIF2 α のリン酸化は uORF 依存的な翻訳応答を誘導し、ストレス応答に重要な転写因子の発現量を増加させること、その転写因子によって多くのストレス応答性遺伝子の発現誘導が起こることが知られている (Ameri and Harris, 2008; Hinnebusch, 2005)。分裂酵母では、同様の機構で制御される転写因子は未だ同定されていないが、出芽酵母の一般アミノ酸制御応答と同様に、アミノ酸合成に関与する遺伝子群の転写上昇が起こることが報告されている (Udagawa et al., 2008)。そこで、そのような遺伝子の発現状態が *cpc2Δ*株で変化するか検討した。3AT 処理時のマイクロアレイ解析によって発現上昇することが報告されている遺伝子のうち 9 遺伝子 (*his4⁺*、*SPAC56E4.03*、*SPCC364.07*、*SPAC10F6.13c*、*arg3⁺*、*dld1⁺*、*lys3⁺*、*leu3⁺*、*SPBC19F5.04*) を選択し、定量 RT-PCR を用いて 3AT 処理後の mRNA 発現量を調べた。すでに報告されているように (Udagawa et al., 2008)、これらの 9 遺伝子はすべて Gcn2 依存的に発現の上昇が確認できた (図 3-4)。*cpc2Δ*株では、ほとんどの遺伝子の発現が起こらなくなっており、多少発現している遺伝子についてもその発現量が野生型株と比較すると低い (*lys3⁺*)、あるいは 3AT 処理による発現誘導が起こらない (*SPAC10F6.13c*) といった状態であった。この結果は、Cpc2 がこれらの遺伝子の適切な発現誘導に重要であることを示しており、出芽酵母や哺乳類のように翻訳制御された転写因子によってこれらの遺伝子の発現が誘導されると仮定すれば、Cpc2 が Gcn2 依存的な eIF2 α リン酸化に必要であるという考えを支持している。

3-2 Cpc2 による Gcn2 の制御機構

出芽酵母や哺乳類の Gcn2 は活性化時にキナーゼドメイン内を自己リン酸化し、このリン酸化は Gcn2 が活性をもつために必須である (Romano et al., 1998)。分裂酵母 Gcn2 における報告はないが、出芽酵母 Gcn2 と同様の役割を検討するため、出芽酵母 Gcn2 の自己リン酸化部位に対応する分裂酵母 Gcn2 のアミノ酸 (スレオニン 818 番と 823 番) をアラニン置換した株を作製した (図 3-5、*gcn2_TA*)。同時に、キナーゼ活性に必須のアミノ酸 (リシン 585 番) をアルギニン置換した株も準備した (図 3-5、*gcn2_KR*)。野生型株から免疫沈降した Gcn2 を試験管内で [γ -³²P]ATP と混ぜて反応させるとリン酸基の取り込みが見られたが、これらは *gcn2_TA* 変異株および *gcn2_KR* 変異株では著しく減少した (図 3-5B)。この結果は、リン酸化が Gcn2 自身のキナーゼ活性に依存するこ

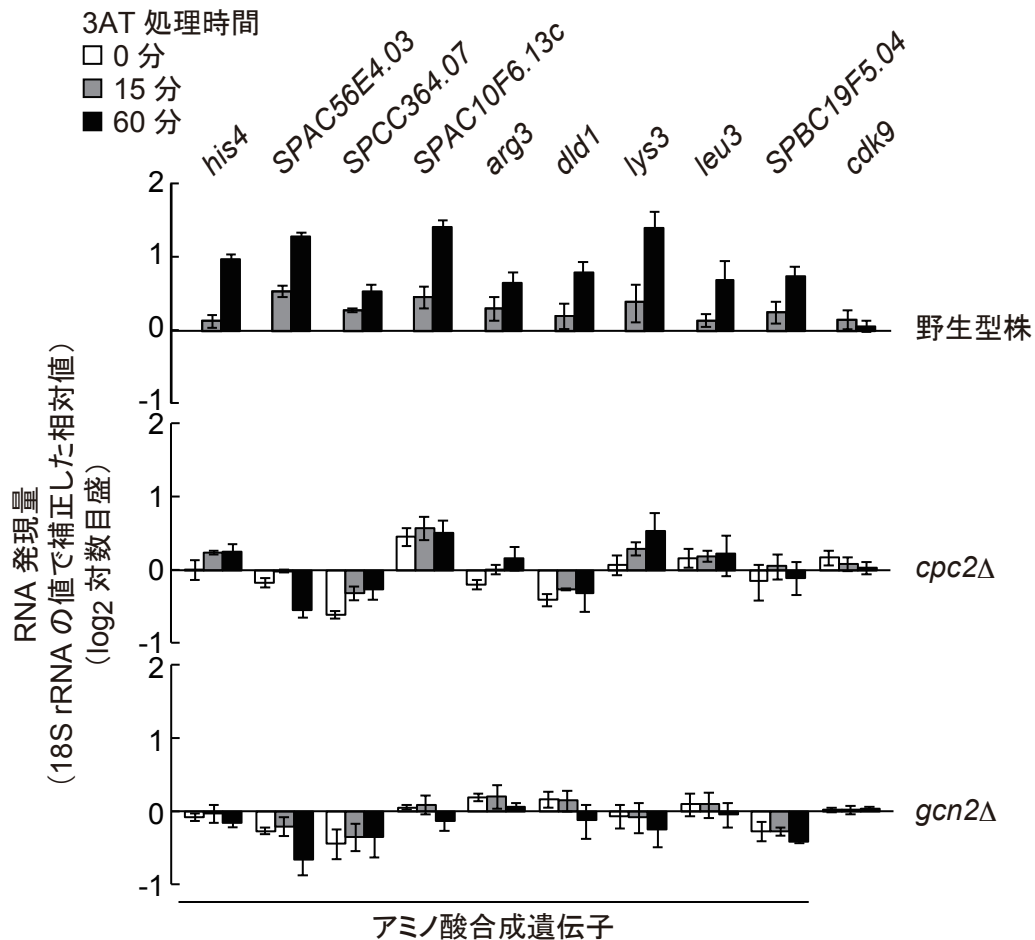


図 3-4 Cpc2 はアミノ酸飢餓ストレス時のアミノ酸合成遺伝子の発現誘導に重要である
 野生型株、*cpc2Δ*株、*gcn2Δ*株に 10 mM の 3AT を処理した際の遺伝子発現量を定量 RT-PCR により調べ、18S rRNA の値で補正した相対値で示した。*cpc2Δ*株では *gcn2Δ*株と同様にアミノ酸合成に関与する遺伝子の発現が減少する。アミノ酸合成遺伝子：*his4*, イミダゾールグリセロールリン酸合成酵素（推定）；*SPAC56E4.03*, 芳香族アミノ酸アミノ基転移酵素（推定）；*SPCC364.07*, D-3- ホスホグリセリン酸脱水素酵素（推定）；*SPAC10F6.13c*, アスパラギン酸アミノ基転移酵素（推定）；*arg3*, オルニチンカルバミル転移酵素；*dld1*, ジヒドロリポアミド脱水素酵素；*lys3*, サッカロピン脱水素酵素；*leu3*, 2- イソプロピルリンゴ酸合成酵素；*SPBC19F5.04*, アスパラギン酸キナーゼ（推定）。*cdk9* はコントロールとして用いた。縦軸は log₂ スケール。各棒グラフは 3 回の実験の平均と標準誤差を示す。

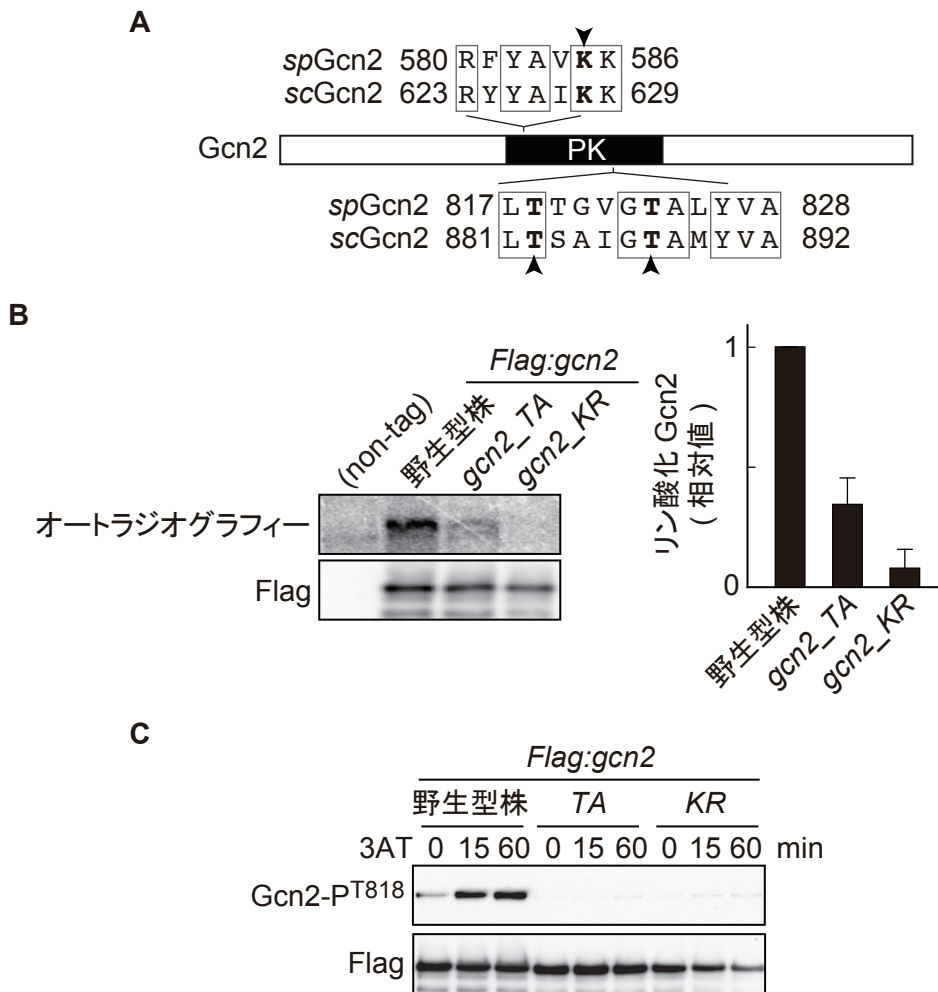


図 3-5 分裂酵母 Gcn2 は自己リン酸化する

A、Gcn2 の構造を模式的に示したもの。出芽酵母 (Sc) Gcn2 の自己リン酸化部位 (スレオニン 882 と 887) とそれに対応する分裂酵母 (Sp) Gcn2 のアミノ酸配列を示す。また出芽酵母 Gcn2 のリシン 628 はキナーゼ活性に必須のアミノ酸である。PK: キナーゼドメイン。**B**、各細胞から FLAG 抗体で免疫沈降した Gcn2 を用いて試験管内リン酸化反応を行い、取り込んだ ^{32}P を検出した (オートラジオグラフィー)。反応に用いた Gcn2 の量は FLAG 抗体によるウェスタンブロットで検出した。オートラジオグラフィーの値を FLAG シグナルで補正したリン酸化 Gcn2 の相対値を 3 回の実験の平均値と標準誤差で右のグラフに示した。gcn2_TA: 自己リン酸化部位に変異を持つ株 (T818A、T823 変異)、gcn2_KR: キナーゼ活性を失った株 (K585R 変異)。**C**、10 mM 3AT 処理した各株を経時的に回収し、FLAG 抗体による免疫沈降後にリン酸化 Gcn2 抗体 (Gcn2-PT⁸¹⁸) を用いてウェスタンブロットを行なった。FLAG は蛋白質量が一定であることのコントロール。野生株でのみ Gcn2 のスレオニン 818 のリン酸化が見られた。

と、スレオニン 818 番、823 番のどちらかあるいは両方がリン酸化の標的となることを示しており、出芽酵母 *Gcn2* と同様に、分裂酵母 *Gcn2* も自己リン酸化することが示唆された。また、*gcn2_TA* 変異株ではわずかにリン酸基の取り込みが観察されたことから、*Gcn2* は他のアミノ酸も自己リン酸化しうることを意味していた。*Gcn2* 自己リン酸化の細胞内での意義を検討するため、*Gcn2* スレオニン 818 のリン酸化に対する抗体 (*Gcn2*-P^{T818}) を作製した。3AT 処理した野生型株において抗体反応のシグナルが増加したこと、*gcn2_TA* 株では検出されなかったことから (図 3-5C)、この抗体が特異的に *Gcn2* のリン酸化を認識していること、*Gcn2* のリン酸化が 3AT 処理により細胞内で誘導されることが示された。さらに、*gcn2_TA* 変異株では、*gcn2_KR* 変異株と同様に 3AT 処理による eIF2 α のリン酸化が見られなくなる (図 3-6A)、および、3AT 処理に対して高感受性になることから (図 3-6B)、*Gcn2* の自己リン酸化は分裂酵母においても *Gcn2* の活性化に必須であることが明らかとなった。興味深いことに、3AT 処理による *Gcn2* の自己リン酸化は *cpc2 Δ* 株において著しく減少していた (図 3-7)。この結果は、*Cpc2* が *Gcn2* の活性化に重要であることを示している。

cpc2⁺ 遺伝子領域はイントロンに核小体低分子 RNA (*snoU24b*) をコードしている (図 3-8A)。本研究で使用した *cpc2⁺* 遺伝子を *ura4⁺* マーカーの挿入により破壊した株では、*Cpc2* の発現だけでなく、*snoU24b* の発現も失われていた (図 3-8B、C)。出芽酵母では、*ASC1* (*Cpc2* のホモログ) の遺伝子破壊株で見られた表現型の 1 つが、イントロンに含まれる核小体低分子 RNA の欠損に起因することが明らかとなっている (Kouba et al., 2012)。本研究でも同様の可能性を検討するため、スクリーニングから得られた 1-9 変異株で見つかったトリプトファン 43 番の終止コドンへの置換 (ナンセンス変異) を新たに導入した株を作製した (図 3-8、*cpc2_W43**)。期待されたように、*cpc2_W43** 変異株では、*Cpc2* の発現は完全に失われていたが、*snoU24b* は正常に発現していることが確認された (図 3-8B、C)。このときみられた *cpc2* mRNA の減少はナンセンス変異依存 mRNA 分解機構 (nonsense-mediated RNA decay) に依るものだと考えられる (図 3-8B)。*cpc2_W43** 変異株は、3AT に対して高感受性となり (図 3-8D)、*Gcn2* の活性化 (自己リン酸化) も欠損したことから (図 3-8E)、これまで観察してきた *Gcn2* の制御に関する一連の表現型は *snoU24b* ではなく、*cpc2⁺* 遺伝子の欠損に起因することが確認された。

Cpc2 がどのようにして *Gcn2* の活性化を制御しているか手がかりを得るため、*Gcn2* のリボソームへの局在化と二量体形成に着目した。これらは出芽酵母 *Gcn2* の活性化に必須であることが報告されているが (Narasimhan et al., 2004; Qiu et al., 1998; Zhu and Wek, 1998)、分裂酵母における知見はなかった。まず、リボソームの分画をショ糖密度勾配遠心法により行い (図 3-9A)、*Gcn2* がどの画分に存在しているか調べた。ここでは *Gcn2* と rpS3 (リボソーム 40S サブユニットを構成する蛋白質の 1 つ) に FLAG タグを付加した株を用いている。野生型株では、多くの *Gcn2* が rpS3 と同じ画分から検出され (図 3-9B レーン 6-19)、分裂酵母 *Gcn2* も出芽酵母と同様にリボソームへ局在することが確

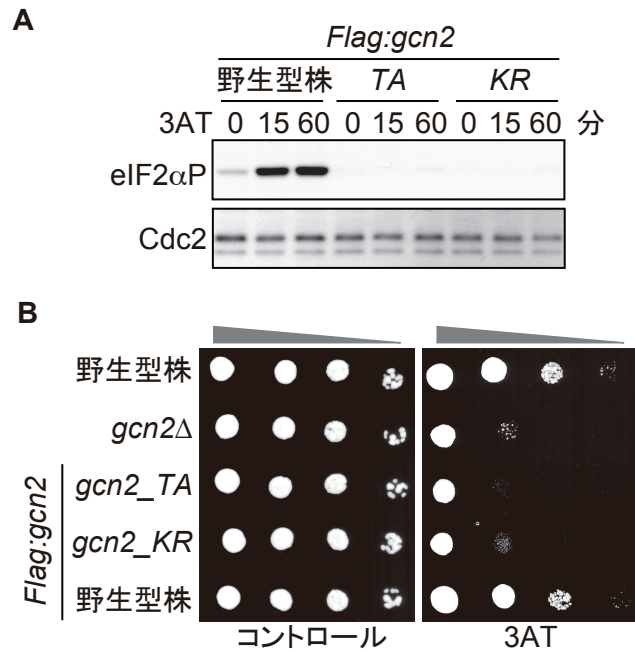


図 3-6 自己リン酸化は Gcn2 の活性化と細胞のアミノ酸飢餓ストレス下での生存に必須である
A、10 mM 3AT 処理後の各株を経時的に回収し、リン酸化 eIF2 α の量をウェスタンブロットにて調べた。Cdc2 は蛋白質量が一定であることのコントロール。自己リン酸化部位の変異株 (*gcn2_TA*) では eIF2 α のリン酸化が起こらなかった。**B**、各株を 10 mM 3AT を含むプレート上にスポットした。*gcn2_TA* 株は *gcn2* Δ 株と同様に 3AT 感受性となった。

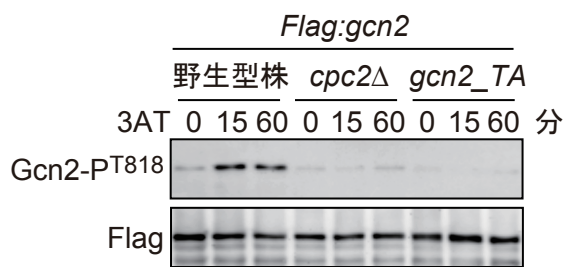


図 3-7 Cpc2 は Gcn2 の活性化に重要である
 10 mM 3AT 処理した各株を経時的に回収し、FLAG 抗体による免疫沈降後にリン酸化 Gcn2 抗体 (Gcn2-PT⁸¹⁸) を用いてウェスタンブロットを行なった。FLAG は蛋白質量が一定であることのコントロール。野生株で見られる Gcn2 のスレオニン 818 のリン酸化は *cpc2* Δ 株では大きく減少した。

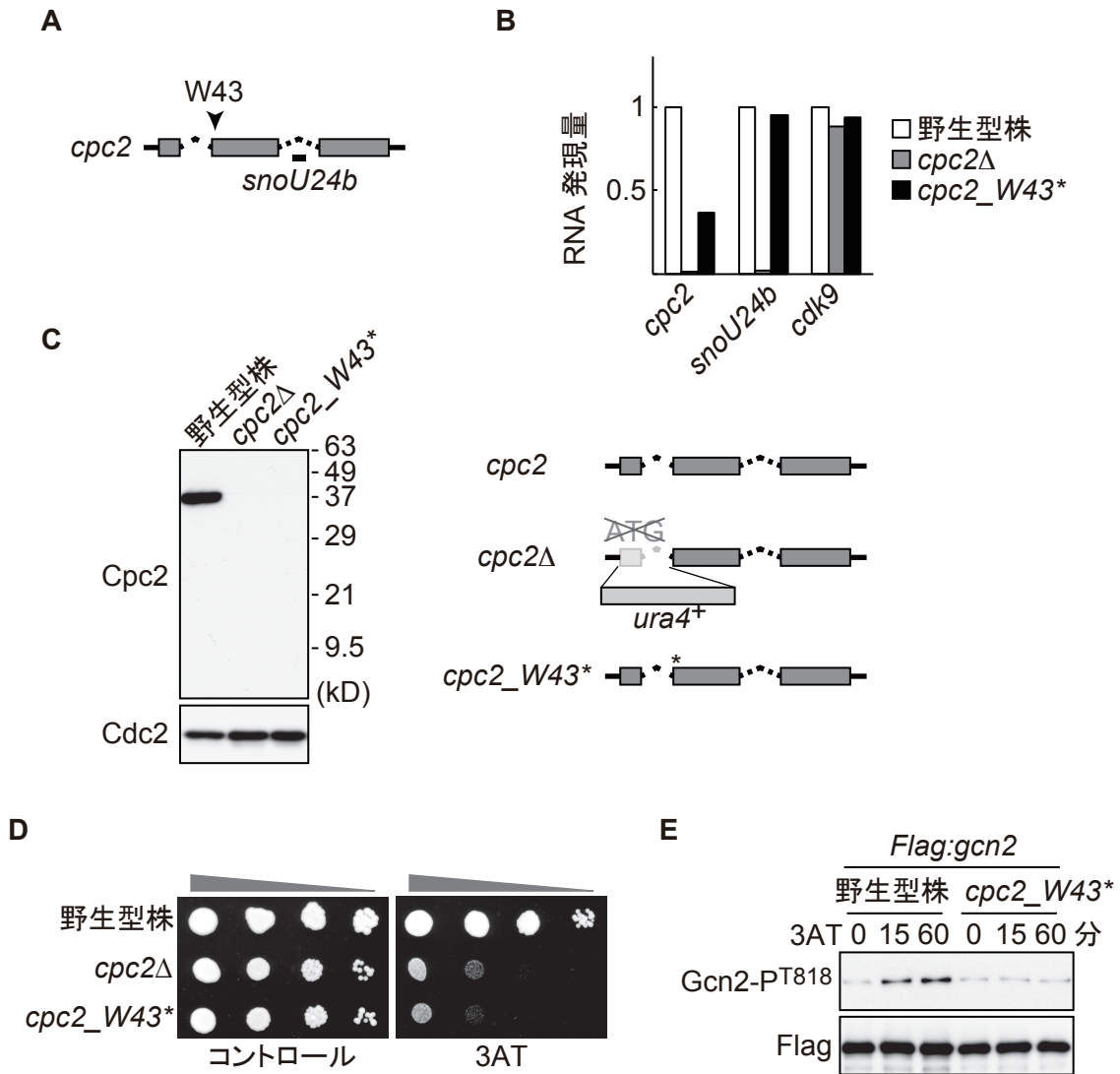


図 3-8 アミノ酸飢餓ストレス応答には *snoU24b* ではなく *Cpc2* が重要である

A、*snoU24b* が *cpc2*⁺ 遺伝子のイントロンにコードされている。トリプトファン 43 番の位置を矢頭で示す。**B**、各株における遺伝子発現量を定量 RT-PCR により調べ、18S rRNA の値で補正した相対値で示した。2回の実験の平均を示す。*cpc2*Δ株において *snoU24b* の発現量が減少していたが、*Cpc2* のトリプトファン 43 番を終止コドンに置換した (*cpc2_W43*^{*}) 株では正常に発現していた。**C**、各株の *Cpc2* の発現量を *Cpc2* 抗体を用いて検討した。*Cdc2* は蛋白質量が一定であることのコントロール。**D**、各株を 10 mM 3AT を含むプレートにスポットした。*cpc2_W43*^{*} 株は *cpc2*Δ株と同様に 3AT 感受性を示した。**E**、10 mM 3AT 処理した各株を経時的に回収し、FLAG 抗体による免疫沈降後にリン酸化 *Gcn2* 抗体 (*Gcn2*-PT⁸¹⁸) を用いてウェスタンブロットを行なった。FLAG は蛋白質量が一定であることのコントロール。*cpc2_W43*^{*} 株では *Gcn2* のリン酸化が誘導されなかった。

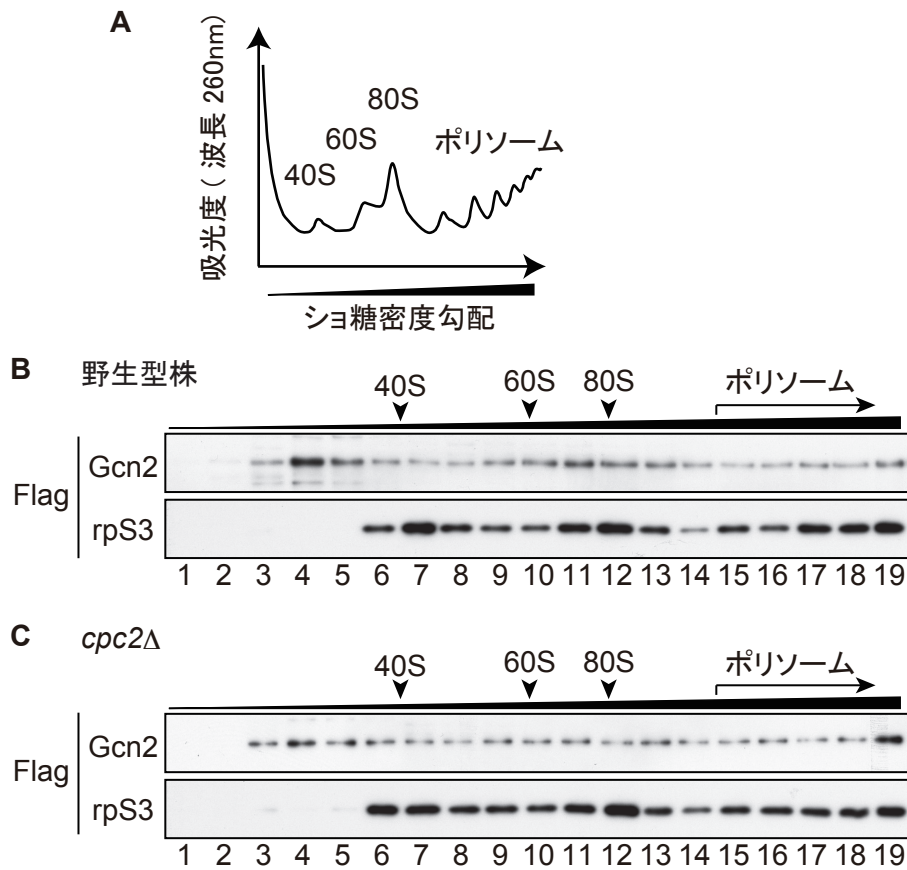


図 3-9 Gcn2 のリボソーム局在に Cpc2 は必要ない

A、シヨ糖密度勾配遠心によるリボソーム分画の様子を模式的に示した。**B**、**C**、Gcn2 およびリボソーム蛋白質 (rpS3) に FLAG タグを付加した株を用いてリボソームの分画を行い、FLAG 抗体によるウェスタンブロットで検出した。野生型株 (**B**)、*cpc2Δ*株 (**C**) ともに Gcn2 がリボソームへ結合していることが確認された。

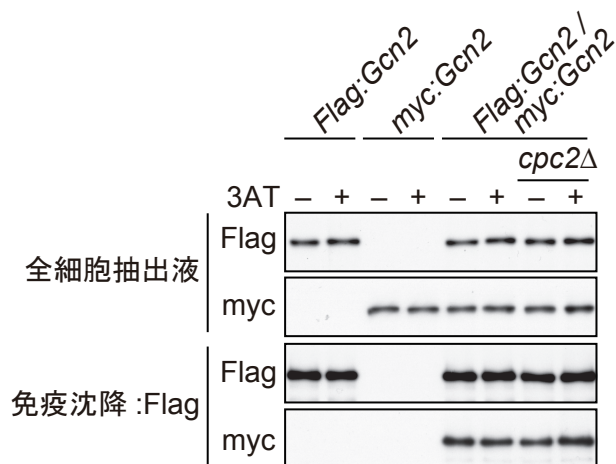


図 3-10 Gcn2 の二量体形成に Cpc2 は必要ない

FLAG タグおよび Myc タグを付加した Gcn2 をヘテロに発現する二倍体細胞を用いて、FLAG 抗体による免疫沈降後、FLAG および Myc 抗体によるウェスタンブロットで Gcn2 を検出した。3AT は 10 mM にて 15 分処理した。野生型株で見られる FLAG-Gcn2 と Myc-Gcn2 の共沈は、*cpc2Δ*株においても野生型株と同様に検出された。

認められた。このリボソーム局在は *cpc2Δ* 株でも観察されたため (図 3-9C)、Gcn2 は Cpc2 非依存的にリボソームへ結合できることが示唆された。次に、Gcn2 の二量体形成を検討するため、FLAG タグあるいは Myc タグを付加した Gcn2 を発現する *gcn2* アレルをヘテロにもつ二倍体細胞を作製した。野生型株、*cpc2Δ* 株ともに FLAG 抗体による免疫沈降複合体中に Myc タグ付き Gcn2 が検出されたことから (図 3-10 レーン 5-8)、分裂酵母 Gcn2 は出芽酵母 Gcn2 のように二量体を形成することが示唆され、その形成に Cpc2 は関与しないことがわかった。以上の結果から、Cpc2 は Gcn2 のリボソーム結合や二量体化の制御とは異なる機構で、Gcn2 の活性化に機能していることが示された。

Cpc2 のリボソーム結合が Gcn2 の活性化制御に必要であるか検討するため、出芽酵母で報告されていた知見に基づき (Sengupta et al., 2004)、リボソームへの結合に必要な 2 つの塩基性アミノ酸 (アルギニン 36 番とリシン 38 番) を酸性アミノ酸 (アスパラギン酸とグルタミン酸) に置換した株を作製した (*cpc2_DE*)。シヨ糖密度勾配遠心法を用いて分画し、すでに報告があるように Cpc2_DE 変異体がリボソームへ結合しないことを確認した (図 3-11A) (Nunez et al., 2009)。*cpc2_DE* 変異株における eIF2 α および Gcn2 のリン酸化動態を調べた結果、野生型株と同程度に 3AT 処理によるリン酸化が誘導された (図 3-11B、C)。また、3AT プレート上での生育にもこの Cpc2 の変異は影響がなかったことから (図 3-11D)、Cpc2 のリボソーム結合は Gcn2 の制御には必須ではないことが示された。

分裂酵母 Cpc2 が Gcn2 の制御を介してリン酸化 eIF2 α 依存的な応答を正に制御するという上記の実験結果は、出芽酵母 Asc1 が一般アミノ酸制御応答を負に制御するという知見 (Hoffmann et al., 1999; Kouba et al., 2012) とは逆の細胞応答に思われる。この表現型の違いが何に起因するか検討するため、分裂酵母 *cpc2* 変異株で観察される Gcn2 活性化の欠損が、出芽酵母 Asc1 あるいはヒト RACK1 の発現により抑圧されるか検討した。分裂酵母 Cpc2、出芽酵母 Asc1 とヒト RACK1 の cDNA を分裂酵母発現用プラスミド (pREP2) にそれぞれクローニングした。まず、各蛋白質のアミノ末端に FLAG タグを挿入したプラスミドを分裂酵母に導入し、各蛋白質が分裂酵母内で同程度発現していることを確認した (図 3-12A レーン 2-4)。次に、*cpc2_W43** 変異株に発現プラスミドを導入して Gcn2 の自己リン酸化を調べたところ、Cpc2 を発現させた場合と比較してシグナルはやや弱い、RACK1 や Asc1 を発現した場合にも 3AT 処理で誘導される Gcn2 のリン酸化が検出されたことから (図 3-12B)、RACK1 や Asc1 は分裂酵母内で Cpc2 による Gcn2 制御の機能を相補できることが示唆された。このことは、分裂酵母と出芽酵母での表現型の違いは、Cpc2 と Asc1 自身のアミノ酸配列の違いに由来する立体構造の違いではなく、各酵母において Cpc2 あるいは Asc1 と相互作用する因子の構造あるいは機能的な違いに依るものであると考えられた。

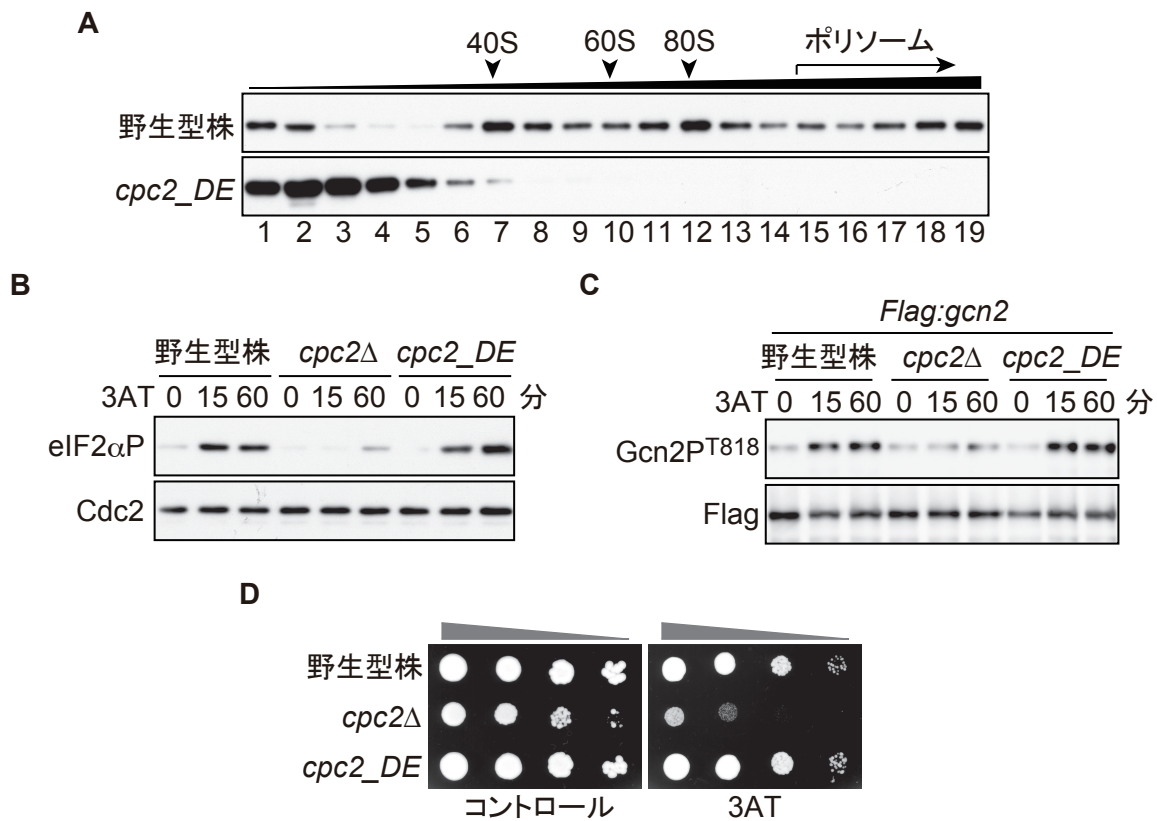


図 3-11 リボソームに結合しない Cpc2 は Gcn2 を制御できる

A、野生型株および *cpc2_DE* 株からの細胞抽出液を用いてショ糖密度勾配遠心によるリボソームの分画を行なった後、Cpc2 抗体にてウェスタンブロットを行なった。Cpc2_{DE} 変異体はリボソームに結合しない。**B**、10 mM 3AT 処理後の各株を経時的に回収し、リン酸化 eIF2 α の量をウェスタンブロットにて調べた。Cdc2 は蛋白質量が一定であることのコントロール。**C**、10 mM 3AT 処理した各株を経時的に回収し、FLAG 抗体による免疫沈降後にリン酸化 Gcn2 抗体 (Gcn2-P^{T818}) を用いてウェスタンブロットを行なった。FLAG は蛋白質量が一定であることのコントロール。**D**、各株を 10 mM 3AT を含むプレートにスポットした。*cpc2_DE* 株は Gcn2 のリン酸化、eIF2 α のリン酸化ともに正常で、3AT 感受性を示さなかった。

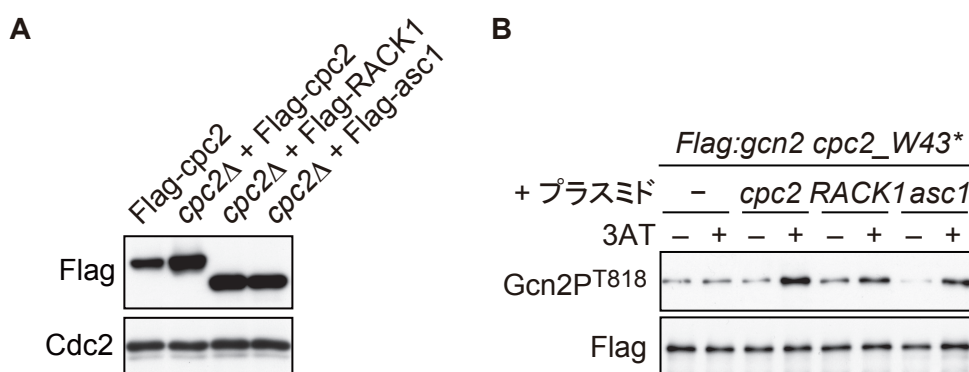


図 3-12 ヒト RACK1 および出芽酵母 Asc1 は Cpc2 による Gcn2 の制御を代替できる

A、*cpc2 Δ* 株に FLAG タグ付きの Cpc2、RACK1 および Asc1 を発現するプラスミドを導入し、発現量を FLAG 抗体によるウェスタンブロットで調べた。Cdc2 は蛋白質量が一定であることのコントロール。左端のレーンは内在 *cpc2* 遺伝子領域にタグ配列を導入した株である。**B**、10 mM 3AT 処理した各株を経時的に回収し、FLAG 抗体による免疫沈降後にリン酸化 Gcn2 抗体 (Gcn2-P^{T818}) を用いてウェスタンブロットを行なった。FLAG は蛋白質量が一定であることのコントロール。Cpc2、RACK1 および Asc1 の発現により、*cpc2 Δ* 株でみられる Gcn2 制御の欠損を相補できる。

第四章

考察

4-1 Cpc2 による Gcn2 の制御

RACK1 ホモログはリボソームに局在し、全般的な翻訳(Ceci et al., 2003; Kouba et al., 2012)、あるいは特定の遺伝子の翻訳を制御している(Coyle et al., 2009)。分裂酵母 *cpc2Δ* 株では全般的な翻訳量はそれほど変化しないが、いくつかの蛋白質の発現量が翻訳レベルで減少している(Shor et al., 2003)。一方、RACK1 ホモログは翻訳制御とは別にリボソーム外でも機能することが知られており(Warner and McIntosh, 2009)、分裂酵母においても一部の Cpc2 はリボソーム外で検出される(図 3-11A)。Cpc2_DE 変異体を用いた実験結果より、Cpc2 による Gcn2 の制御にはリボソーム結合は必須ではない(図 3-11)。このことは、翻訳の異常によりなんらかの蛋白質の(定常状態での)発現量が低下した結果、間接的に Gcn2 の制御が異常になったという可能性が低いことを意味している。むしろ、Cpc2 が Gcn2 と相互作用する因子の結合や活性を制御することによって、Gcn2 の活性化を促進していると考えられる。Cpc2 がリボソーム外で Gcn2 の活性化を促進しているのか、リボソームに結合した Gcn2 を制御しているのかは現時点では不明である。Cpc2 と Gcn2 のリボソームへの結合部位はそれぞれ 40S サブユニットの mRNA 出口近傍、60S サブユニットの mRNA 入口近傍と離れており、一時的にリボソームから乖離した Cpc2 がリボソーム上の Gcn2 を制御している可能性はある。Cpc2 が直接 Gcn2 と結合できるかも分かっておらず、作用機序を想定することは困難であるが、Cpc2 は足場蛋白質として Gcn2 とそれを活性化する蛋白質の相互作用を促進している可能性が考えられる。

*cpc2Δ*株では、*gcn2Δ*株とは異なり、3AT 処理時に Hri2 依存的に弱い eIF2 α リン酸化が遅れて観察された(図 3-2、3-3)。長時間の 3AT 処理は酸化ストレスを引き起こし、Gcn2 は抗酸化ストレス応答も誘導していることが知られている(Nemoto et al., 2010)。一方、酸化ストレス応答に重要な Atf1 蛋白質量が *cpc2Δ*株で減少することを考慮すると(Nunez et al., 2009)、*cpc2Δ*株では Gcn2 依存的な応答と Atf1 依存的な応答の両者が欠損することで酸化ストレスが発生し、Hri2 が活性化する可能性が考えられた。しかし、*gcn2Δ atf1Δ*二重破壊株では遅延して起こる eIF2 α リン酸化は観察されなかったため(図 4-1)、Cpc2 は別の分子機構によって Hri2 の活性化を制御していることが示唆された。

4-2 今後の展望

Cpc2 は哺乳類を含む他の生物種に良く保存されたホモログが存在していることから、本研究で得られる知見は分裂酵母だけにとどまらず、他の生物種にも適用できる可能性がある。例えば、がん細胞は初期段階において低酸素、低栄養などの種々のストレスを断続的に受けることが知られており、低容量ストレス応答がその生存、悪性化に影響すると考えられる。本研究により解析するその分子機構がヒトなどでも保存されているならば、その解明は薬剤の標的候補を提供することで再生医療やがん治療などへ貢献することが期待される。

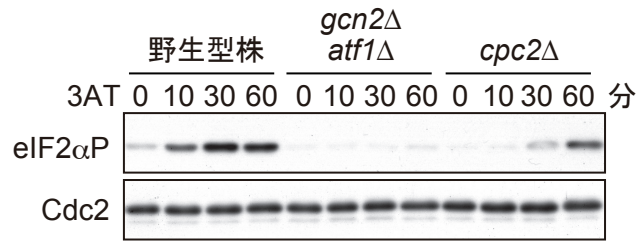


図 4-1 *gcn2Δ atf1Δ*株では *cpc2Δ*株で見られるような遅延した eIF2α のリン酸化は起こらない
10 mM 3AT 処理後の各株を経時的に回収し、リン酸化 eIF2α の量をウェスタンブロットにて調
べた。Cdc2 は蛋白質量が一定であることのコントロール。

付録

本研究で使用したプライマー

定量 RT-PCR

his4_fwd_1038rt	TAGATCAGGTGCCGACAAAG
his4_rvs_1183rt	CCGAAATAACAACCTGCCTGA
SPAC56E4.03_fwd_1196rt	GCTACATCCATGCCGATAAA
SPAC56E4.03_rvs_1313rt	CTAGGGTCAACAACGAACCA
SPCC364.07_fwd_437rt	TCAACTCTCCATACGCCAAC
SPCC364.07_rvs_558rt	CACCTTGTTCCACTCACCAC
SPAC10F6.13c_fwd_937rt	TTTGCTGAATGGGAACAAGA
SPAC10F6.13c_rvs_1018rt	CAACAAGAGAATCGCGAAGA
arg3_fwd_836rt	GTCATCCCGAGGAAGTGTCT
arg3_rvs_917rt	GTCCATTTGCGGTTCTCTG
dld1_fwd_1196rt	CTGAAGTTGCTTGGGTTGGT
dld1_rvs_1311rt	GGCATCCATATTGGTCTTGG
lys3_fwd_588rt	TCTGGTTATTGGGGCTCTTG
lys3_rvs_686rt	TTAATGTCCCAGCGAAGAATG
leu3_fwd_778rt	TCTCTCCATCCCCATAACGA
leu3_rvs_872rt	CCAAACAAACAGCCCTCAA
SPBC19F5.04_fwd_158rt	GCAGCACAGATACCAAAGCA
SPBC19F5.04_rvs_255rt	AACCAAATCATGCACAGAACC
cdk9_fwd_941rt	CTCTTTGCGGTGCTATTTTG
cdk9_rvs_1039rt	TTGCTGGATATGGTGGTGT
18SrRNA_fwd_743rt*	GGGAACCAGGACTTTTACCTTGA
18SrRNA_rvs_795rt*	AACTTGCCTGCTTTGAACACTCTA
cpc2_fwd_441rt	CTCTGACTGGGTTTCTTGTGTG
cpc2_rvs_570rt	GCCATAGTGAGAAGTGCGAAG
snoU24b_fwd_21rt	TATTTGCTACTTCGGAGGCCTTA
snoU24b_rvs_70rt	GGTGATTTGTTTTGTCTCATCG

* (Gomez et al., 2005)を参考に

参考文献

- Ameri, K., and Harris, A.L. (2008). Activating transcription factor 4. *Int J Biochem Cell Biol* *40*, 14-21.
- Baum, S., Bittins, M., Frey, S., and Seedorf, M. (2004). Asc1p, a WD40-domain containing adaptor protein, is required for the interaction of the RNA-binding protein Scp160p with polysomes. *Biochem J* *380*, 823-830.
- Ceci, M., Gaviraghi, C., Gorrini, C., Sala, L.A., Offenhauser, N., Marchisio, P.C., and Biffo, S. (2003). Release of eIF6 (p27BBP) from the 60S subunit allows 80S ribosome assembly. *Nature* *426*, 579-584.
- Cherkasova, V.A., and Hinnebusch, A.G. (2003). Translational control by TOR and TAP42 through dephosphorylation of eIF2alpha kinase GCN2. *Genes Dev* *17*, 859-872.
- Coyle, S.M., Gilbert, W.V., and Doudna, J.A. (2009). Direct link between RACK1 function and localization at the ribosome in vivo. *Mol Cell Biol* *29*, 1626-1634.
- Dong, J., Qiu, H., Garcia-Barrio, M., Anderson, J., and Hinnebusch, A.G. (2000). Uncharged tRNA activates GCN2 by displacing the protein kinase moiety from a bipartite tRNA-binding domain. *Mol Cell* *6*, 269-279.
- Garcia-Barrio, M., Dong, J., Cherkasova, V.A., Zhang, X., Zhang, F., Ufano, S., Lai, R., Qin, J., and Hinnebusch, A.G. (2002). Serine 577 is phosphorylated and negatively affects the tRNA binding and eIF2alpha kinase activities of GCN2. *J Biol Chem* *277*, 30675-30683.
- Gomez, E.B., Espinosa, J.M., and Forsburg, S.L. (2005). *Schizosaccharomyces pombe* mst2+ encodes a MYST family histone acetyltransferase that negatively regulates telomere silencing. *Mol Cell Biol* *25*, 8887-8903.
- Guillemot, F., Billault, A., and Auffray, C. (1989). Physical linkage of a guanine nucleotide-binding protein-related gene to the chicken major histocompatibility complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* *86*, 4594-4598.
- Halbeisen, R.E., and Gerber, A.P. (2009). Stress-dependent coordination of transcriptome and translome in yeast. *PLoS Biol* *7*, e1000105.
- Harding, H.P., Zhang, Y., Zeng, H., Novoa, I., Lu, P.D., Calton, M., Sadri, N., Yun, C., Popko, B., Paules, R., *et al.* (2003). An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Mol Cell* *11*, 619-633.
- Hinnebusch, A.G. (2005). Translational regulation of GCN4 and the general amino acid control of yeast. *Annu Rev Microbiol* *59*, 407-450.
- Hoffmann, B., Mosch, H.U., Sattlegger, E., Barthelmess, I.B., Hinnebusch, A., and Braus, G.H. (1999). The WD protein Cpc2p is required for repression of Gcn4 protein activity in yeast in the absence of amino-acid starvation. *Mol Microbiol* *31*, 807-822.

- Holcik, M., and Sonenberg, N. (2005). Translational control in stress and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 318-327.
- Kouba, T., Rutkai, E., Karaskova, M., and Valasek, L. (2012). The eIF3c/NIP1 PCI domain interacts with RNA and RACK1/ASC1 and promotes assembly of translation preinitiation complexes. *Nucleic Acids Res* 40, 2683-2699.
- Kuroha, K., Akamatsu, M., Dimitrova, L., Ito, T., Kato, Y., Shirahige, K., and Inada, T. (2010). Receptor for activated C kinase 1 stimulates nascent polypeptide-dependent translation arrest. *EMBO Rep* 11, 956-961.
- Lu, P.D., Harding, H.P., and Ron, D. (2004). Translation reinitiation at alternative open reading frames regulates gene expression in an integrated stress response. *J Cell Biol* 167, 27-33.
- McCahill, A., Warwicker, J., Bolger, G.B., Houslay, M.D., and Yarwood, S.J. (2002). The RACK1 scaffold protein: a dynamic cog in cell response mechanisms. *Mol Pharmacol* 62, 1261-1273.
- McLeod, M., Shor, B., Caporaso, A., Wang, W., Chen, H., and Hu, L. (2000). Cpc2, a fission yeast homologue of mammalian RACK1 protein, interacts with Ran1 (Pat1) kinase To regulate cell cycle progression and meiotic development. *Mol Cell Biol* 20, 4016-4027.
- Moreno, S., Klar, A., and Nurse, P. (1991). Molecular genetic analysis of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Methods Enzymol* 194, 795-823.
- Mueller, P.P., and Hinnebusch, A.G. (1986). Multiple upstream AUG codons mediate translational control of GCN4. *Cell* 45, 201-207.
- Muller, F., Kruger, D., Sattlegger, E., Hoffmann, B., Ballario, P., Kanaan, M., and Barthelmess, I.B. (1995). The cpc-2 gene of *Neurospora crassa* encodes a protein entirely composed of WD-repeat segments that is involved in general amino acid control and female fertility. *Mol Gen Genet* 248, 162-173.
- Narasimhan, J., Staschke, K.A., and Wek, R.C. (2004). Dimerization is required for activation of eIF2 kinase Gcn2 in response to diverse environmental stress conditions. *J Biol Chem* 279, 22820-22832.
- Nemoto, N., Udagawa, T., Ohira, T., Jiang, L., Hirota, K., Wilkinson, C.R., Bahler, J., Jones, N., Ohta, K., Wek, R.C., *et al.* (2010). The roles of stress-activated Sty1 and Gcn2 kinases and of the protooncprotein homologue Int6/eIF3e in responses to endogenous oxidative stress during histidine starvation. *J Mol Biol* 404, 183-201.
- Nilsson, J., Sengupta, J., Frank, J., and Nissen, P. (2004). Regulation of eukaryotic translation by the RACK1 protein: a platform for signalling molecules on the ribosome. *EMBO Rep* 5, 1137-1141.
- Nunez, A., Franco, A., Madrid, M., Soto, T., Vicente, J., Gacto, M., and Cansado, J. (2009). Role for RACK1 orthologue Cpc2 in the modulation of stress response in fission yeast. *Mol*

Biol Cell 20, 3996-4009.

Nunez, A., Franco, A., Soto, T., Vicente, J., Gacto, M., and Cansado, J. (2010). Fission yeast receptor of activated C kinase (RACK1) ortholog Cpc2 regulates mitotic commitment through Wee1 kinase. *J Biol Chem* 285, 41366-41373.

Padyana, A.K., Qiu, H., Roll-Mecak, A., Hinnebusch, A.G., and Burley, S.K. (2005). Structural basis for autoinhibition and mutational activation of eukaryotic initiation factor 2alpha protein kinase GCN2. *J Biol Chem* 280, 29289-29299.

Qiu, H., Garcia-Barrio, M.T., and Hinnebusch, A.G. (1998). Dimerization by translation initiation factor 2 kinase GCN2 is mediated by interactions in the C-terminal ribosome-binding region and the protein kinase domain. *Mol Cell Biol* 18, 2697-2711.

Romano, P.R., Garcia-Barrio, M.T., Zhang, X., Wang, Q., Taylor, D.R., Zhang, F., Herring, C., Mathews, M.B., Qin, J., and Hinnebusch, A.G. (1998). Autophosphorylation in the activation loop is required for full kinase activity in vivo of human and yeast eukaryotic initiation factor 2alpha kinases PKR and GCN2. *Mol Cell Biol* 18, 2282-2297.

Ron, D., Chen, C.H., Caldwell, J., Jamieson, L., Orr, E., and Mochly-Rosen, D. (1994). Cloning of an intracellular receptor for protein kinase C: a homolog of the beta subunit of G proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 839-843.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A LABORATORY MANUAL* (Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Sattlegger, E., and Hinnebusch, A.G. (2005). Polyribosome binding by GCN1 is required for full activation of eukaryotic translation initiation factor 2{alpha} kinase GCN2 during amino acid starvation. *J Biol Chem* 280, 16514-16521.

Sengupta, J., Nilsson, J., Gursky, R., Spahn, C.M., Nissen, P., and Frank, J. (2004). Identification of the versatile scaffold protein RACK1 on the eukaryotic ribosome by cryo-EM. *Nat Struct Mol Biol* 11, 957-962.

Shor, B., Calaycay, J., Rushbrook, J., and McLeod, M. (2003). Cpc2/RACK1 is a ribosome-associated protein that promotes efficient translation in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biol Chem* 278, 49119-49128.

Udagawa, T., Nemoto, N., Wilkinson, C.R., Narashimhan, J., Jiang, L., Watt, S., Zook, A., Jones, N., Wek, R.C., Bahler, J., *et al.* (2008). Int6/eIF3e promotes general translation and Atf1 abundance to modulate Sty1 MAPK-dependent stress response in fission yeast. *J Biol Chem* 283, 22063-22075.

Vattem, K.M., and Wek, R.C. (2004). Reinitiation involving upstream ORFs regulates ATF4 mRNA translation in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 11269-11274.

Volta, V., Beugnet, A., Gallo, S., Magri, L., Brina, D., Pesce, E., Calamita, P., Sanvito, F., and Biffo, S. (2013). RACK1 depletion in a mouse model causes lethality, pigmentation deficits and

- reduction in protein synthesis efficiency. *Cell Mol Life Sci* 70, 1439-1450.
- Warner, J.R., and McIntosh, K.B. (2009). How common are extraribosomal functions of ribosomal proteins? *Mol Cell* 34, 3-11.
- Wek, S.A., Zhu, S., and Wek, R.C. (1995). The histidyl-tRNA synthetase-related sequence in the eIF-2 alpha protein kinase GCN2 interacts with tRNA and is required for activation in response to starvation for different amino acids. *Mol Cell Biol* 15, 4497-4506.
- Won, M., Park, S.K., Hoe, K.L., Jang, Y.J., Chung, K.S., Kim, D.U., Kim, H.B., and Yoo, H.S. (2001). Rkp1/Cpc2, a fission yeast RACK1 homolog, is involved in actin cytoskeleton organization through protein kinase C, Pck2, signaling. *Biochem Biophys Res Commun* 282, 10-15.
- Zhan, K., Narasimhan, J., and Wek, R.C. (2004). Differential activation of eIF2 kinases in response to cellular stresses in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics* 168, 1867-1875.
- Zhu, S., and Wek, R.C. (1998). Ribosome-binding domain of eukaryotic initiation factor-2 kinase GCN2 facilitates translation control. *J Biol Chem* 273, 1808-1814.

謝辞

本研究の機会を与え、指導教員として豊富な知識による助言と斬新なアイデアで研究の指針を示してくださり、また、研究室スタッフとして運営に関する経験を積ませていただいた石川冬木教授に心より深く感謝いたします。本研究を進めるにあたり、基礎からの丁寧なご指導と叱咤激励してくださった助教の加納純子博士（現、大阪大学准教授）に深く感謝いたします。研究上数多くの丁寧な助言をいただいたと共に、研究室運営においてもお世話になりました助教の鍋谷彰博士（現、富山化学工業株式会社）に感謝いたします。また、実験材料や技術指導などいただいた大阪市立大学の中村太郎博士、東京大学の山本正幸博士（現、かずさ DNA 研究所）、京都大学の犬野睦人博士、北畠真博士、共同研究をさせていただいた自治医科大学の間野博行博士（現、東京大学教授）、上野敏秀博士、当研究室に在籍していた中條萌絵子博士（現、京都大学農学研究科）に感謝いたします。

研究に行き詰まった際に励ましてくださり、研究上のサポートをしていただいた三好知一郎博士（現、ミシガン大学）、三河拓己博士（現、京都大学医学部附属病院）、齊藤基輝博士（現、富士フイルム株式会社）をはじめとする石川研究室のみなさまに感謝いたします。研究室における煩雑な事務処理を引き受けてくださった秘書の片山安希子氏、阪本真弓氏、佐々木睦氏、藤巻加奈氏、前川文氏、白淵愛依子氏、山崎恵莉子氏にお礼申し上げます。学会等で議論およびアドバイスいただいた多くの研究者のみなさまに感謝いたします。

最後に、惜しめない経済援助をいただき、常に温かく見守ってくださった両親と、一番近くで支えてくれた妻に深く感謝いたします。