



# Genetic Screening for Regulators of Prz1, a Transcriptional Factor Acting Downstream of Calcineurin in Fission Yeast

小池, 敦資

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2012-09-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲5620

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1005620>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



(博士課程関係)

## 学 位 論 文 の 内 容 要 旨

### Genetic Screening for Regulators of Prz1, a Transcriptional Factor Acting Downstream of Calcineurin in Fission Yeast

分裂酵母におけるカルシニューリンによって活性化される転写因子 Prz1  
の制御因子の探索に向けた遺伝学的スクリーニング

神戸大学医学研究科医科学専攻  
分子薬理・薬理ゲノム学  
(指導教員：久野 高義教授)

小 池 敦 資

#### 【緒言】

カルシニューリン (CN) は、カルシウム ( $\text{Ca}^{2+}$ ) /カルモデュリン依存性脱リン酸化酵素であり、ヒトから酵母に至るまで高度に保存されている。哺乳類において、CN は免疫応答や記憶、神経可塑性など種々の  $\text{Ca}^{2+}$  を介した過程で重要な役割を果たしている。これらの多様な事象について、CN は転写因子である Nuclear factor of activated T cells (NFAT) を脱リン酸化することで制御している。脱リン酸化された NFAT は、細胞質から核へと移行し標的遺伝子の転写を誘導する。細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度が低下した場合、あるいは CN を阻害した場合、核内の NFAT は様々な kinase や核外輸送タンパク質によって、負に制御されている。分裂酵母において CN によって脱リン酸化される転写因子として Prz1 が知られている。本研究では、Prz1 における CN 以外の制御因子を同定すべく、Prz1 の過剰発現によって引き起こされる生育阻害を指標に遺伝学的スクリーニングを行った。その結果、Prz1 が様々なタンパク質によって制御を受けていることを明らかにしたので報告する。

#### 【方法】

1. 使用した株、培養条件および試薬  
本研究で使用した主な分裂酵母株を以下に記す。HM123 (野生株)、KP1395 (Prz1 過剰発現株)、KP2795 (Prz1 転写活性測定用株)。分裂酵母の培養には YPD 培地、EMM 培地を用いた。分裂酵母の遺伝学的操作は Moreno ら(1991)の方法に従った。分裂酵母の形質転換は酢酸リチウム法によって行った。タンパク質の異所性発現には *nmt1* プロモーターを用いた。
2. マルチコピーサプレッサーの取得  
Prz1 過剰発現株に分裂酵母ゲノムライブラリーを形質転換し、多コピーで Prz1 の過剰発現による生育阻害を抑圧するプラスミドを取得した。シーケンス解析によりプラスミドに含まれる遺伝子を同定した。
3. Calcineurin-dependent response element (CDRE)レポーターアッセイ  
Prz1 の転写活性を測定する為に CDRE レポーターアッセイを Deng ら(2006)の方法に従い行った。
4. *in vitro* kinase assay ならびに GST pull-down assay  
分裂酵母内で発現させた後、精製した GST-Prz1 を用いて *in vitro* kinase assay を行った。cAMP-dependent kinase subunit は New England Biolabs より購入した。GST pull-down assay については Sio ら(2006)の方法に従い行った。

#### 【結果】

1. Prz1 過剰発現株の表現型  
*nmt1* プロモーターを用いて Prz1 の過剰発現株を作製した。Prz1 過剰発現株は、生育阻害ならびに形態異常を示した。次いで Prz1 の転写活性を測定し、basal 値(無刺激状態における活性値)の比較を行ったところ、野生株よりも優位に高い転写活性が示された。またこれらの表現型は CN を阻害しても抑圧されなかった。
2. マルチコピーサプレッサーの同定  
Prz1 過剰発現株の示す生育阻害を指標として、分裂酵母ゲノムライブラリーを用いたスクリーニングを行った。その結果、*rad25*<sup>+</sup>、*pka1*<sup>+</sup>、*msn5*<sup>+</sup> (SPAC328.01C)、*pac1*<sup>+</sup>、*ifs1*<sup>+</sup>、*ape2*<sup>+</sup> 遺伝子を同定した。またこれらの遺伝子は生育阻害だけでなく、Prz1 過剰発現株が示す高い転写活性も抑圧することがわかった。

### 3. 14-3-3 タンパク質、Rad24 と Rad25 は Prz1 に直接結合することで Prz1 を制御する

14-3-3 タンパク質は生物間で非常に高度に保存されており、分裂酵母において Rad24 と Rad25 の 2 種が 14-3-3 タンパク質として報告されている。まず Rad25 だけでなく Rad24 も Prz1 の制御因子になり得るか検討を行った。その結果、Rad24 も Prz1 過剰発現の表現型を抑圧できることがわかった。さらに *rad24* ノックアウト ( $\Delta rad24$ ) 株は CN 阻害薬であるタクロリムスに感受性を示した ( $\Delta rad25$  株は示さず)。また  $\Delta rad24$  株に Rad25 を過剰発現させることで、タクロリムス感受性を部分的に相補することができた。以上の結果より、CN が関与する生理的プロセスにおいて Rad24 は主要な役割を担っており、Rad24 と Rad25 は互いに機能を分かち合っていることが示唆された。また GST pull-down assay によって Rad24、Rad25 ともに Prz1 と直接結合することを示した。さらに Prz1 の N 末端より 421 番目から 426 番目の位置に 14-3-3 タンパク質の結合モチーフが存在しており、Rad24 はその部位に結合することが明らかとなった。

### 4. Prz1 のリン酸化における Pka1 の影響

cAMP-dependent protein kinase (PKA) の触媒サブユニットをコードする遺伝子 *pka1*<sup>+</sup> 遺伝子がマルチコピーサプレッサーとして取得されたことから、cAMP も Prz1 の転写活性に影響を及ぼすかどうかについて検討を行った。その結果、培地中に cAMP を添加することで Ca<sup>2+</sup> 刺激によって応答する Prz1 の転写活性は抑制された。次に Pka1 が Prz1 を直接リン酸化することで制御しているのかどうか検討を行った。Prz1 はタクロリムスの添加 (CN による脱リン酸化の阻害) によって分子量が増大することが Hirayama ら (2003) によって確認されている。そこでまず、cAMP が Prz1 の mobility shift に影響するかどうかを検討したところ、cAMP による mobility shift は確認されなかった。また PKA によってリン酸化された基質を特異的に認識する抗体 (Phospho-(Ser/Thr) PKA substrate Antibody) は、Pka1 による転写因子 Rst2 のリン酸化を認識できるのに対し、Pka1 による Prz1 のリン酸化を確認することができなかった。次に一部のタンパク質では、PKA がリン酸化する部位に 14-3-3 タンパク質が結合するという報告をもとに、 $\Delta pka1$  株を用いて Prz1 と Rad24 あるいは Rad25 が結合するかどうかを検討した。その結果、 $\Delta pka1$  株においても野生株同様に結合が認められた。以上の結果より Pka1 の Prz1 における制御機構は間接的である可能性が示唆された。一方で *in vitro* の系において、Prz1 は哺乳類の PKA によってリン酸化されることが確認できたことから、Pka1 によって Prz1 が直接リン酸化される可能性を排除することはできなかった。

### 5. Msn5 は Prz1 の核外輸送に関与する

SPAC328.01c 遺伝子は出芽酵母 Msn5p のホモログであることから *msn5*<sup>+</sup> と命名した。Msn5p は Prz1 の機能的ホモログである Crz1p の核外輸送に関与するという報告から、Msn5 も Prz1 の核外輸送に関与しているのではないかと予想した。 $\Delta msn5$  株における GFP-Prz1 の局在を確認したところ、通常環境下でも大部分が核に局在していた。この結果より Msn5 は Prz1 の核外輸送に関与していることが示された。さらに  $\Delta msn5$  株では野生株に比べ Prz1 の転写活性の減少が確認された。Prz1 の N 末端より 240 個のアミノ酸を削った truncated mutant (GFP-Prz1<sub>241..681</sub>) においても、核への局在ならびに転写活性の低下が認められた。以上の結果から、Prz1 の転写活性には効率的な細胞質-核シャットリングが重要な役割を担っていることが示唆された。

### 6. マルチコピーサプレッサーが内因性レベルの Prz1 に及ぼす影響

今回同定したマルチコピーサプレッサーが内因性レベルの Prz1 に及ぼす影響について検

討を行った。まず野生株に各遺伝子を過剰発現させ、Ca<sup>2+</sup> 刺激によって応答する Prz1 の転写活性を測定した。その結果、Rad24、Rad25 あるいは Pka1 の過剰発現によって、Prz1 の転写活性はコントロールと比べて優位な減少を示した。他の遺伝子については、コントロールと同程度の活性を示した。次に各遺伝子に対する変異株を用いて、転写活性の測定を行った。その結果、 $\Delta rad24$ 、 $\Delta rad25$  株では、野生株と比べて優位に高い転写活性を示した。一方、 $\Delta pka1$ 、 $\Delta msn5$ 、 $\Delta tfs1$  株ならびに *pac1* 変異株では優位な減少を示し、 $\Delta ape2$  株は野生株と同様の活性を示した。

### 【考察】

Prz1 過剰発現株の表現型を抑圧する遺伝子を同定することで、Prz1 の制御に関与する因子の同定につながると予想した。本研究によって、7 種のマルチコピーサプレッサーを同定することができた。これらは全て Prz1 の過剰発現によって引き起こされる高い転写活性を抑えるのに対し、内因性レベルの Prz1 の活性については 3 種のタンパク質 (Rad24、Rad25、Pka1) しか抑えることができなかった。このことから、Prz1 の転写活性にはカルシニューリン依存的・非依存的経路の関与が示唆された。また各種遺伝子の変異体における Prz1 の転写活性の影響を調べた結果より、Rad24 と Rad25 は、Prz1 の負の制御に関与していることが示唆された。一方、Pka1、Msn5、Pac1、Tfs1 に関してはノックアウトによって Prz1 の転写活性が優位に減少したことから、Prz1 を負に制御するだけでなく、CN 依存的な Prz1 の活性制御に関与していることが示唆された。また Ape2 はノックアウトでも転写活性に影響を示さなかったことから、CN 非依存的な Prz1 の活性制御に関与していることが示唆された。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第2274号	氏 名	小池 敦資
論文題目 Title of Dissertation	分裂酵母におけるカルシニューリンによって活性化される転写因子 Prz1 の制御因子の探索に向けた遺伝学的スクリーニング Genetic Screening for Regulators of Prz1, a Transcriptional Factor Acting Downstream of Calcineurin in Fission Yeast		
審査委員 Examiner	主 査 衛 康博 Chief Examiner 副 査 古瀬 幹夫 Vice-examiner 副 査 井垣 達史 Vice-examiner		

（要旨は1, 000字～2, 000字程度）

カルシニューリン (CN) は、Ca <sup>2+</sup> /カルモデュリン依存性脱リン酸化酵素であり、ヒトから酵母に至るまで高度に保存されている。哺乳類では、CN は転写因子である Nuclear factor of activated T cells (NFAT) を脱リン酸化することで制御している。脱リン酸化された NFAT は、細胞質から核へと移行し標的遺伝子の転写を誘導する。細胞内 Ca <sup>2+</sup> 濃度が低下した場合、または CN を阻害した場合、核内の NFAT は様々な kinase や核外輸送タンパク質によって負に制御されている。分裂酵母では CN によって脱リン酸化される転写因子として Prz1 が知られている。本研究では、Prz1 の制御における CN 以外の因子を同定するために、Prz1 の過剰発現によって引き起こされる生育阻害を指標に遺伝学的スクリーニングを行った。
まず Prz1 の過剰発現株を作製し表現型を調べたところ、Prz1 過剰発現株は、生育阻害、形態異常及び高い転写活性を示すことが明らかとなった。次に制御因子の同定にむけて、Prz1 過剰発現株の示す生育阻害を指標として、分裂酵母ゲノムライブラリーを用いたスクリーニングを行った結果、 <i>rad25</i> <sup>+</sup> 、 <i>pka1</i> <sup>+</sup> 、 <i>msn5</i> <sup>+</sup> (SPAC328.01C)、 <i>pac1</i> <sup>+</sup> 、 <i>tfp1</i> <sup>+</sup> 、 <i>ape2</i> <sup>+</sup> 遺伝子を同定した。
得られた遺伝子の内 <i>rad25</i> <sup>+</sup> 遺伝子は 14-3-3 タンパク質をコードするが、分裂酵母には 2 種類の 14-3-3 ( <i>Rad25</i> 、 <i>Rad24</i> ) が存在する。そこで <i>Rad24</i> も Prz1 の制御因子になり得るか検討を行ったところ、 <i>Rad24</i> も Prz1 過剰発現の表現型を抑制できることがわかった。また GST pull-down assay により <i>Rad24</i> 、 <i>Rad25</i> ともに Prz1 と直接結合することが示された。
cAMP-dependent protein kinase (PKA) の触媒サブユニットをコードする遺伝子 <i>pka1</i> <sup>+</sup> 遺伝子がマルチコピーサプレッサーとして取得されたことから、cAMP も Prz1 の転写活性に影響を及ぼすかどうか検討を行った。その結果、cAMP を添加することで Ca <sup>2+</sup> 刺激によって応答する Prz1 の転写活性は抑制された。次に <i>Pka1</i> が Prz1 を直接リン酸化することで制御しているのかどうか検討を行った。cAMP が Prz1 の mobility shift を誘導するかどうかを検討したところ、cAMP による mobility shift は確認されなかった。また PKA によりリン酸化された基質を特異的に認識する抗体を用いた解析では、Prz1 のリン酸化は確認されなかった。次に PKA がリン酸化する部位に 14-3-3 が結合するという既報を踏まえ、 <i>Δpka1</i> 株を用いて Prz1 と <i>Rad24</i> または <i>Rad25</i> が結合するかどうかを検討したところ、 <i>Δpka1</i> 株においても野生株同様に結合が認められた。以上の結果より <i>Pka1</i> の Prz1 における制御機構は間接的である可能性が示唆された。一方 <i>in vitro</i> の系において、Prz1 は哺乳類の PKA によってリン酸化されることから、 <i>Pka1</i> によ

[illegible]