

令和 4 年 6 月 23 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06632

研究課題名(和文) 出芽酵母小胞体ストレス応答を制御するキナーゼ・ホスファターゼの網羅的解析

研究課題名(英文) Comprehensive analysis of kinases and phosphatases that regulate the endoplasmic reticulum stress response in the budding yeast

研究代表者

水野 智亮 (Mizuno, Tomoaki)

筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号：80529032

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：出芽酵母小胞体ストレス応答に機能するキナーゼ・ホスファターゼを網羅的に抽出するために、全キナーゼ123種・全ホスファターゼ35種について遺伝子欠損株もしくは機能低下型変異株を作製し、小胞体ストレス感受性を調べた。その結果、34種が小胞体ストレス感受性を、16種が小胞体ストレス耐性を示すことを見出した。また、小胞体ストレス誘導性小胞体選択的オートファジーの制御機構について解析し、小胞体選択的オートファジー受容体Atg39の発現がSnf1 AMP活性化キナーゼによって正に、プロテインキナーゼAによって負に制御されていることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小胞体ストレス応答は細胞小器官である小胞体に不良タンパク質が蓄積した際に誘導される生体防御機構であり、酵母からヒトに至る真核生物で保存されている。ヒトにおいては、小胞体ストレス応答の破綻は糖尿病・神経変性疾患・がんなど多様な疾病の発病と進行に関与している。本研究では、細胞応答の中核を担うタンパク質リン酸化酵素・脱リン酸化酵素の中から小胞体ストレス応答に関与する因子を抽出できたこと、タンパク質リン酸化酵素群を介した小胞体分解機構を明らかにしており、小胞体ストレス応答に起因した疾病の予防と治療に貢献する可能性を秘めている。

研究成果の概要(英文)：To comprehensively extract kinases and phosphatases that function in the endoplasmic reticulum (ER) stress response in budding yeast, we generated gene-deficient or loss-of-function mutant strains for all 123 kinases and 35 phosphatases and examined their susceptibility to ER stress. As a result, we found that 34 mutants were sensitive to ER stress and 16 mutants were resistant to ER stress. We also analyzed the regulatory mechanism of ER stress-induced ER-selective autophagy (ER-phagy) and found that the expression of ER-phagy receptor Atg39 is positively regulated by Snf1 AMP-activated kinase and negatively regulated by protein kinase A.

研究分野：細胞内シグナル伝達

キーワード：小胞体ストレス キナーゼ ホスファターゼ オートファジー 遺伝子発現制御

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

真核細胞の細胞小器官である小胞体は、膜タンパク質・分泌タンパク質の合成の場であり、これらのタンパク質に対して糖鎖付加・フォールディングなどの修飾をおこなう場でもある。小胞体にはタンパク質の品質を管理するシステムが備わっており、糖鎖付加・フォールディングが正常におこなわれたタンパク質は小胞体から搬出されるが、未成熟タンパク質・不良タンパク質は小胞体に留め置かれる。未成熟タンパク質・不良タンパク質が小胞体内に蓄積した状態を小胞体ストレスと呼ぶ。細胞は、小胞体ストレスと感知すると、小胞体ストレス応答経路を活性化し、遺伝子発現を介した未成熟タンパク質・不良タンパク質の除去およびグローバルな翻訳抑制を介した小胞体への負荷軽減を誘導することによって、小胞体ストレスを緩和する。小胞体ストレス応答は、本来、小胞体さらには細胞の恒常性維持機構であるが、緩和できないレベルで小胞体ストレスが生じた場合、小胞体ストレス応答経路は細胞死を誘導する。小胞体ストレスは、環境変化・遺伝子変異など様々な要因によって引き起こされる。例えば、インスリンに変異が生じた場合には膵臓細胞の細胞死と糖尿病、ロドプシンに変異が生じた場合には網膜細胞の細胞死と網膜色素変性症が引き起こされる。また、がん細胞は、小胞体ストレスが生じやすい環境に晒されているにも関わらず、小胞体ストレス応答経路による細胞死誘導に対する抵抗性を獲得している。さらに発生過程における分泌細胞への分化過程でも小胞体ストレスが引き起こされることと小胞体ストレス応答が重要であることが知られており、小胞体ストレス応答の分子メカニズムを理解することは生物学的にも医学的にも極めて重要である。

小胞体ストレス応答経路としては、高等真核生物では IRE1、ATF6、PERK という 3 種類の経路が、出芽酵母では Ire1 経路が主要な役割を果たしている (Mori. *J Biochem.* 2009, Walter and Ron. *Science.* 2011)。これらの経路の小胞体ストレス応答における重要性に疑う余地は残されていないが、出芽酵母非必須遺伝子破壊株の網羅的解析からは、その約 3% が小胞体ストレス感受性を示すことが報告されており (Parsons et al. *Nat Biotechnol.* 2004)、主要経路以外にも多数の因子が小胞体ストレス応答に関与していると考えられる。しかしながら、それらのほとんどについて小胞体ストレス応答における作用機序は明らかになっていない。

タンパク質リン酸化は、様々な環境変化に対する細胞応答に関与している。ストレス応答においても多数のキナーゼ・ホスファターゼが機能しており、出芽酵母では、Hog1 や Mpk1 などの MAP キナーゼ (MAPK)、Snf1 AMP 活性化キナーゼ (AMPK)、カルシニューリン (Calcineurin) などが小胞体ストレス応答に機能している (Bicknell et al. *JBC.* 2010, Torres-Quiroz et al. *JBC.* 2010, Babour et al. *Cell.* 2010, Mizuno et. al., *PLoS Genet.* 2015)。しかしながら、これら既知の因子でさえ、小胞体ストレス応答における活性制御機構や標的因子が十分に分かっていない。したがって、出芽酵母小胞体ストレス応答におけるキナーゼ・ホスファターゼの役割と制御機構には未解明な部分が多く残されている。

2. 研究の目的

本研究では、変異による小胞体ストレス感受性の変化を指標として、出芽酵母小胞体ストレス応答に機能するキナーゼ・ホスファターゼを網羅的に抽出することを第一の目的とした。小胞体ストレスによって誘導される小胞体選択的オートファジーを制御するキナーゼ・ホスファターゼの機能を明らかにすることを第二の目的とした。

3. 研究の方法

(1) 出芽酵母キナーゼ・ホスファターゼ変異株の網羅的作製

出芽酵母のキナーゼ全 123 種とホスファターゼ全 35 種について変異株を作製した。非必須遺伝子については、遺伝子破壊株を作製した。必須遺伝子については、The Decreased Abundance by mRNA Perturbation (DAmP) 法 (遺伝子の 3' 非翻訳領域にマーカー遺伝子を組み込むことで、転写産物の不安定化を引き起こし、mRNA レベルを 1/4~1/10 程度に減少させる技法) によって、機能低下型変異株を作製した。

(2) 出芽酵母キナーゼ・ホスファターゼ変異株の小胞体ストレス感受性の検討

糖鎖修飾を阻害することで小胞体ストレスを誘導するツニカマイシンを含む寒天培地上に野生株および変異株の培養液を滴下し、その後の生育を経時的に観察することで、小胞体ストレス感受性を検討した。

(3) 小胞体選択的オートファジー活性の測定

小胞体膜タンパク質である Sec63 と GFP の融合タンパク質 (Sec63-GFP) を発現する株を用い

た。小胞体選択的オートファジーが誘導されると、Sec63-GFP は液胞に運ばれ分解される。しかしながら、GFP は液胞中のプロテアーゼに対して抵抗性を示すため、Sec63-GFP が液胞で分解されると単体の GFP が残存する。そこで、小胞体ストレス誘導前後の野生株および変異株からタンパク質抽出液を調製し、抗 GFP 抗体を用いたウエスタンブロットをおこない、Sec63-GFP と GFP の量比を調べることで、小胞体選択的オートファジーの活性を測定した。

(4) 小胞体選択的オートファジー受容体の mRNA 量およびプロモーター活性の測定

mRNA 量はリアルタイム PCR 法によって解析した。プロモーター活性については、各遺伝子上流配列約 1kbp と GFP 遺伝子を連結したコンストラクトをゲノムに挿入した株を作製し、GFP mRNA 量をリアルタイム PCR 法によって解析することで調べた。

4. 研究成果

(1) 出芽酵母キナーゼ・ホスファターゼ変異株の網羅的作製と小胞体ストレス感受性検討

出芽酵母キナーゼ全 123 種については、非必須キナーゼ 102 種の遺伝子破壊株と必須キナーゼ 21 株の機能低下型変異株を作製した。ホスファターゼ全 35 種については、非必須ホスファターゼ 31 種の遺伝子破壊株と必須ホスファターゼ 4 株の機能低下型変異株を作製した。作製した変異株全てについて小胞体ストレス感受性を調べた結果、34 種が小胞体ストレス感受性を、16 種が小胞体ストレス耐性を示すことを見出した。

(2) Snf1 AMPK は、転写抑制因子 Mig1・Mig2 を負に制御することで小胞体選択的オートファジー受容体 Atg39 の発現を誘導し、小胞体ストレス誘導性小胞体選択的オートファジーを正に制御する

小胞体ストレスは、細胞内内容物の分解とリサイクルに関与する基本的なプロセスであるオートファジーも誘導する。オートファジーは非選択的オートファジーと選択的オートファジーに分けられ、出芽酵母では小胞体ストレスによって非選択的オートファジーが誘導されることが知られていたが、小胞体選択的オートファジーが誘導されるかは不明であった。そこで、小胞体ストレスによって小胞体選択的オートファジーが誘導されるかについて、小胞体膜タンパク質である Sec63 と GFP の融合タンパク質(Sec63-GFP)の分解を指標にして検討したところ、小胞体ストレス誘導剤であるツニカマイシンの添加によって、オートファジーによる Sec63-GFP の分解が検出された。選択的オートファジーは積み荷特異的なオートファジー受容体を必要とし、出芽酵母小胞体選択的オートファジーでは Atg39 と Atg40 がオートファジー受容体として機能することが知られていた。そこで、Atg39 と Atg40 が小胞体ストレスによる Sec63-GFP の分解に必要なか検討した。その結果、Atg39Atg40 二重欠損株では Sec63-GFP の分解がほとんど見られなかった。このことから、出芽酵母では小胞体ストレスによって小胞体選択的オートファジーが誘導されることが明らかになった。また、Atg40 欠損と比較して、Atg39 欠損によって小胞体ストレス誘導性小胞体選択的オートファジーが大きく阻害されたことから、小胞体ストレス誘導性小胞体選択的オートファジーにおいては、Atg39 が主要なオートファジー受容体として機能することが明らかになった。

選択的オートファジーが誘導される条件下でオートファジー受容体が発現誘導される例が知られていた。そこで小胞体ストレス誘導前後における Atg39 mRNA 量を調べたところ、小胞体ストレスによって Atg39 mRNA 量が顕著に増加することが明らかになった。また、小胞体ストレスによる Atg39 mRNA 量の増加は、Atg39 プロモーターの活性化を介していることを見出した。次に、我々が小胞体ストレス応答に機能することを独自に見出したキナーゼ・ホスファターゼを含む既知の小胞体ストレス応答関連因子が小胞体ストレスによる Atg39 プロモーターの活性化に関与しているか検討した。その結果、AMP 活性化プロテインキナーゼ(AMPK)である Snf1 の欠損によって、小胞体ストレスによる Atg39 プロモーターの活性化が阻害されることを見出した。Snf1 は転写因子をリン酸化、活性制御することで遺伝子発現を制御することが知られていた。そこで既知の Snf1 下流で機能する転写因子の中から、Atg39 プロモーター活性を制御する因子を探索した。その結果、Mig1 および Mig2 という 2 種類の転写抑制因子の欠損によって、Atg39 プロモーター活性が上昇することを見出した。また、Atg39 プロモーターには Mig1・Mig2 が結合することが予想される配列が 3 カ所存在することを見出し、これらに変異を導入すると Atg39 プロモーター活性が上昇した。以上の結果から、Mig1・Mig2 は Atg39 の転写抑制因子として機能していることが明らかになった。

小胞体ストレスによって Snf1 が活性化すること、Snf1 によるリン酸化によって Mig1・Mig2 が核外移行することが明らかにされていた。そこで、小胞体ストレスによって Mig1・Mig2 がリン酸化・核外移行するか調べた。その結果、小胞体ストレスによって Mig1・Mig2 のリン酸化状態が昂進し、核外移行が促進すること、これらは Snf1 の欠損によって阻害されることを見出した。次に、Snf1-Mig1・Mig2 による Atg39 プロモーター活性の制御が小胞体ストレス誘導性小胞体選択的オートファジーに重要であるか検討した。その結果、小胞体ストレス誘導性小胞

体選択的オートファジーが Snf1 欠損によって阻害されること、Mig1・Mig2 二重欠損によって昂進することを見出した。以上の結果から、小胞体ストレス応答において Snf1 AMPK は、転写抑制因子である Mig1・Mig2 を負に制御することによって Atg39 の発現を誘導し、小胞体選択的オートファジーを正に制御すると考えられた。これらの研究結果は 2020 年 PLoS Genetics 誌に論文として発表した(Mizuno et. al., PLoS Genet. 2020)。

(3) PKA は、転写活性化因子 Msn2・Msn4 を負に制御することで小胞体選択的オートファジー受容体 Atg39 の発現を抑制し、小胞体ストレス誘導性小胞体選択的オートファジーを負に制御する

前述の解析から、小胞体ストレスによって小胞体選択的オートファジー受容体 Atg39 の転写が活性化されること、さらには小胞体ストレスによる Atg39 転写活性化は Snf1 欠損によって阻害されることが明らかになった。しかしながら、Snf1 欠損株においても小胞体ストレスによる Atg39 転写活性化は残存していたことから、Snf1 以外にも小胞体ストレスによる Atg39 転写活性化に関与する因子が存在することが予想された。そこで、そのような因子を同定するため、Atg39 プロモーター制御下でヒスチジン合成酵素を発現するコンストラクトを構築し、過剰発現によってヒスチジン合成酵素の発現を誘導する因子を遺伝学的にスクリーニングした。その結果、Msn2 および Msn4 という 2 種類の転写活性化因子の過剰発現によって、Atg39 プロモーター活性が上昇することを見出した。次に、Msn2・Msn4 が小胞体ストレスによる Atg39 転写活性化に関与するか調べたところ、Msn2・Msn4 二重欠損によって小胞体ストレスによる Atg39 転写活性化が部分的に阻害された。また、Atg39 プロモーターには Msn2・Msn4 が結合することが予想される配列(STRE)が 2 カ所存在することを見出し、これらに変異を導入すると小胞体ストレスによる Atg39 転写活性化が部分的に阻害された。以上の結果から、Msn2・Msn4 は Atg39 の転写抑制因子として機能していることが明らかになった。

次に、Msn2・Msn4 を制御する因子に着目した。前述の遺伝学的スクリーニングでは、Msn2・Msn4 に加えて、Pde2 が分離されていた。Pde2 は cAMP リン酸ジエステル加水分解酵素であり、cAMP 量を減少させることによってプロテインキナーゼ A(PKA)の活性を負に制御することが知られていた。さらに PKA は Msn2・Msn4 を負に制御することが知られていた。これらの知見から、Pde2 は、PKA を負に制御することによって Msn2・Msn4 を正に制御し、Atg39 の転写を正に制御していることが予想された。そこで Pde2 の過剰発現によって Atg39 プロモーター活性が上昇するか調べたところ、Pde2 の過剰発現は Msn2・Msn4 および STRE 依存的に Atg39 プロモーター活性を上昇させることを見出した。次に小胞体ストレスによる Atg39 転写活性化に関与するか調べたところ、Pde2 ともう一つの出芽酵母 cAMP リン酸ジエステル加水分解酵素である Pde1 をともに欠損した株では小胞体ストレスによる Atg39 転写活性化が部分的に阻害された。次に、PKA は Msn2・Msn4 の核外移行を促進することが知られていたことから、小胞体ストレス前後における Msn2 の細胞内局在を解析した。その結果、小胞体ストレスによって Msn2 の核局在は促進され、この促進は Pde1・Pde2 欠損によって阻害された。以上の結果から、過去の文献を踏まえると、定常条件下では PKA が Msn2・Msn4 の核外移行を促進することによって Atg39 の転写活性化を抑制しているのに対して、小胞体ストレス存在下では PKA が不活性化されることによって Msn2・Msn4 による Atg39 の転写活性化が起こると考えられた。これらの研究結果は 2021 年 Scientific Reports 誌に論文として発表した(Mizuno et. and Irie, Sci Rep. 2021)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Lien Pham Thi Kim, Viet Nguyen Thi Minh, Mizuno Tomoaki, Suda Yasuyuki, Irie Kenji	4. 巻 14
2. 論文標題 Pop2 phosphorylation at S39 contributes to the glucose repression of stress response genes, HSP12 and HSP26	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0215064
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0215064	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Mizuno Tomoaki, Muroi Kei, Irie Kenji	4. 巻 16
2. 論文標題 Snf1 AMPK positively regulates ER-phagy via expression control of Atg39 autophagy receptor in yeast ER stress response	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS Genetics	6. 最初と最後の頁 e1009053
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pgen.1009053	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Valderrama Arvin Lapiz, Fujii Shiori, Duy Duong Long, Irie Kaoru, Mizuno Tomoaki, Suda Yasuyuki, Irie Kenji	4. 巻 26
2. 論文標題 Pbp1 mediates the aberrant expression of genes involved in growth defect of ccr4 and pop2 mutants in yeast <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 381 ~ 398
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/gtc.12846	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Higuchi Yudai, Fujii Shiori, Valderrama Arvin Lapiz, Irie Kaoru, Suda Yasuyuki, Mizuno Tomoaki, Irie Kenji	4. 巻 85
2. 論文標題 The eIF4E-binding protein Eap1 has similar but independent roles in cell growth and gene expression with the cytoplasmic deadenylase Ccr4	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 1452 ~ 1459
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/bbb/zbab056	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tuong Vi Dang Thi, Fujii Shiori, Valderrama Arvin Lapiz, Ito Ayaka, Matsuura Eri, Nishihata Ayaka, Irie Kaoru, Suda Yasuyuki, Mizuno Tomoaki, Irie Kenji	4. 巻 16
2. 論文標題 Pbp1, the yeast ortholog of human Ataxin-2, functions in the cell growth on non-fermentable carbon sources	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0251456
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0251456	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Mizuno Tomoaki, Irie Kenji	4. 巻 11
2. 論文標題 Msn2/4 transcription factors positively regulate expression of Atg39 ER-phagy receptor	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 11919
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-91480-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Fujii Shiori, Duy Duong Long, Valderrama Arvin Lapiz, Takeuchi Risa, Matsuura Eri, Ito Ayaka, Irie Kaoru, Suda Yasuyuki, Mizuno Tomoaki, Irie Kenji	4. 巻 570
2. 論文標題 Pan2-Pan3 complex, together with Ccr4-Not complex, has a role in the cell growth on non-fermentable carbon sources	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 125 ~ 130
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.07.007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 遠藤雅、入江賢児、水野智亮
2. 発表標題 RGG-motifタンパク質による小胞体ストレス応答の制御
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム第54回研究報告会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------