

## 塩化カリウムストレスにおける分裂酵母 cAMP/PKA 経路の機能解析

松尾安浩

## 目 的

細胞が浸透圧などのストレスにさらされた際、そのストレス下で生き残るためにストレスに応答する情報伝達経路が活性化される。分裂酵母においてストレスに応答する情報伝達経路はいくつか知られており、情報伝達経路の機能解析は進んでいる。しかしながら、cAMP 依存的に応答する情報伝達経路に関しては、いくつかの論文で有糸分裂過程の抑制 (Maeda, T. et al., 1994) や糖新生への関与 (Byrne, S. M. et al., 1993)、経時的老化への関与 (Roux, A. E. et al., 2006)、浸透圧ストレス応答 (Yang P. et al., 2003) などの機能が示されているが、実際にこの経路の下流因子及び標的タンパク質に関しては明らかになっていない。

そこで、本研究では分裂酵母の cAMP/PKA 経路の塩化カリウムストレス応答に注目して、この情報伝達経路の標的タンパク質の同定を行い、その機能を解析するとともにその経路との関係性をあきらかにすることを目的としている。

## 方 法

## 1. タンパク質相互作用の解析

分裂酵母のデータベースからカリウムに関係する因子を探索し、その中から関連性を検討した。それらの因子が実際にプロテインキナーゼ A (Pka1) に関係するかどうかを調べるために、cDNA を PCR によってクローニングし、酵母ツーハイブリッド法を用いてタンパク質間相互作用を解析した。

## 2. 遺伝学的解析

分裂酵母を用いて遺伝子破壊株を作製し、*pka1* 破壊株と今回標的タンパク質として同定した因子の破壊株及びそれらの二重破壊株で塩化カリウムに対する感受性に変化がないかを解析した。

## 3. タンパク質の局在及び発現解析

分裂酵母のゲノム上に GFP をタグgingした株を作製し、これを用いて塩化カリウム存在下での局在や発現がどのように変化しているかを蛍光顕微鏡による観察とウェスタン解析によって調べた。

## 結 果

分裂酵母の *cyr1Δ* や *pka1Δ* は、塩化カリウムに対して感受性を示すことが知られている (Yang, P. et al., 2003,

Gupta, DR. et al., 2011) が、その他の浸透圧ストレスである塩化ナトリウムやソルビトールに感受性を示さないことを明らかにした。そこで、分裂酵母のデータベースを用いてカリウムに関連する因子を調べたところ 6 つの候補が得られた。また、すでに Pka1 はタンパク質局在が核と細胞質である (Matsuo, Y. et al., 2008) ため、その中から局在がミトコンドリアと予想されているものを除き、4 つ (Trk1, Trk2, Kha1, SPCC965.06) に絞った。これらの因子が Pka1 と実際に関連性があるかどうかを調べるために cDNA をクローニングし、酵母ツーハイブリッド法によるタンパク質間の相互作用を解析した。その結果、Trk1 を除く 3 つの因子が Pka1 と相互作用することを明らかにした。これらの因子と Pka1 の関連性を調べるために、今回まだ機能が明らかになっていない因子である SPCC965.06 に注目して関連性を解析した。

遺伝学的に SPCC965.06 と Pka1 の関連性を解析するため SPCC965.06 の破壊株を作製した。また、この破壊株と *pka1Δ* との二重破壊株を作製し、塩化カリウムに対する感受性を解析したところ、*SPCC965.06Δ* の単独破壊株は感受性を示さなかったのに対して、*pka1Δ SPCC965.06Δ* の二重破壊株は *pka1Δ* の単独破壊株よりも感受性が増加している結果が得られた。このことから、SPCC965.06 は Pka1 欠損下で重要な役割を示している可能性が示唆された。

次に、GFP を用いて SPCC965.06 のタンパク質局在を観察したところ野生株と *pka1Δ* の間では、局在パターンに大きな変化はなかったが、蛍光の強度に差が見られたため発現量の違いがあることが示唆された。そのため、ウェスタン解析によってタンパク質発現を解析したところ、野生株に比べて *pka1Δ* で発現が上昇していた。また、1.2M の塩化カリウムが存在する条件では、野生株でも SPCC965.06 の発現が増加していることを見出した。以上のことから SPCC965.06 は、塩化カリウム存在下で Pka1 に依存して発現が増加していることが示唆された。

## 考 察

今回、*pka1Δ* で通常発現がそれほど高くない SPCC965.06 の発現が増加している結果が得られた。このことから SPCC965.06 が、Pka1 の下流にあるカリウム特異的な標的タンパク質であることが示唆される。しかしながら、Pka1 はタンパク質キナーゼであり、転写因子

ではないので Pka1 が下流の転写因子をリン酸化することで制御し、転写因子がその下流の SPCC965.06 の発現の増加を引き起こしている可能性が示唆される。また、SPCC965.06 のタンパク質としての機能はまだ明らかではないので、このタンパク質が塩化カリウムストレス存在下でどのように機能しているのかを明らかにしていく必要がある。

### 引用文献

- Byrne, S. M., Hoffman, C. S. (1993) Six git genes encode a glucose-induced adenylate cyclase activation pathway fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Cell Sci.* **105**, 1095-1100.
- Gupta, D. R., Paul, S. K., Oowatari, Y., Matsuo, Y., Kawamukai, M. (2011) Multistep regulation of protein kinase A in its localization, phosphorylation and binding with a regulatory subunit in fission yeast. *Curr. Genet.* **57**, 353-365.
- Maeda, T., Watanabe, Y., Kunitomo, H., Yamamoto, M. (1994) Cloning of the *pka1* gene encoding the catalytic subunit of the cAMP-dependent protein kinase in *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Biol. Cell* **269**, 9632-9637.
- Matsuo, Y., McInnis, B., Marcus, S. (2008) Regulation of the subcellular localization of cyclic AMP-dependent protein kinase in response to physiological stresses and sexual differentiation in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Eukaryot. Cell* **7**, 1450-1459.
- Roux, A. E., Quissac, A., Chartrand, P., Ferbeyre, G., Rokeach, L. A. (2006) Regulation of chronological aging in *Schizosaccharomyces pombe* by the protein kinase Pka1 and Sck2. *Aging Cell* **5**, 345-357.
- Yang, P., Du, H., Hoffman, C. S., Marcus, S. (2003) The phospholipase B homolog Plb1 is a mediator of osmotic stress response and nutrient-dependent repression of sexual differentiation in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol. Gen. Genomics* **269**, 116-125.