

博士論文番号：1081005

酵母の機能未知遺伝子 *POG1* の  
分子機能と生理的役割の解析

大城 聡

奈良先端科学技術大学院大学

バイオサイエンス研究科 ストレス微生物科学研究室

(高木 博史 教授)

平成 26 年 8 月 11 日提出

## 目次

1. 序論	5
2. 材料と方法	10
2-1. 培地	10
2-2. 菌株	10
2-2-1. <i>rsp5</i> 変異株の作製	10
2-2-2. <i>pog1</i> 破壊株の作製	11
2-2-3. <i>rsp5</i> 変異 <i>pog1</i> 破壊株の作製	11
2-2-4. <i>ena</i> 破壊株の作製	11
2-2-5. <i>dma1 dma2</i> 二重破壊株の作製	11
2-2-6. <i>trp1</i> 破壊株の作製	11
2-2-7. <i>cln1 cln2</i> 二重破壊株の作製	12
2-2-8. $P_{POG1}::P_{TDH3}$ 株の作製	12
2-2-9. <i>Pog1yeGFP</i> 株の作製	12
2-2-10. その他の遺伝子破壊株	12
2-3. プラスミド	14
2-4. スポットテストによるストレス評価	21
2-5. $\alpha$ -factor による G1 アレスト評価 (halo assay)	21
2-6. 細胞内リチウムイオン含量の測定	21
2-7. 顕微鏡観察	22
2-8. 蛍光顕微鏡観察	22
2-9. リアルタイム PCR	22
2-10. ウェスタンブロッティングによる <i>Pog1</i> の検出	22
2-11. 酵母ツーハイブリットスクリーニング	23
2-12. 酵母ツーハイブリットによる相互作用解析	23
2-13. <i>Pog1</i> のリン酸化解析	24
2-14. 生育曲線	25
2-15. 高速液体クロマトグラフィー (LC-MS/SM) によるリン酸化部位 の同定	25
2-16. 細胞周期の解析	25

2-17. 細胞周期依存的な Pog1 のリン酸化解析	26
2-18. 細胞周期依存的な <i>POG1</i> の転写量解析	27
2-19. その他	27
3. 結果	28
3-1. <i>RSP5</i> および <i>POG1</i> のストレス耐性との関連性	28
3-1-1. 新たな <i>rsp5</i> 変異株の作製およびストレス耐性試験	28
3-1-2. サプレッサー遺伝子 <i>POG1</i> のストレス耐性試験	29
3-1-3. <i>RSP5</i> と <i>POG1</i> の遺伝学的解析	29
3-2. <i>POG1</i> の分子機能解析および過剰発現による表現型	31
3-2-1. <i>POG1</i> (promoter of growth) について	31
3-2-2. <i>POG1</i> 過剰発現株における G1 アレスト阻害	31
3-2-3. <i>POG1</i> 過剰発現株の生育曲線	33
3-2-4. G1 期同調後の細胞周期	34
3-2-5. <i>POG1</i> 過剰発現株の表現型・形態異常	35
3-2-6. <i>POG1</i> 過剰発現株の表現型・高温感受性	37
3-2-7. Pog1 の局在	38
3-2-8. Truncated-Pog1 過剰発現株の表現型および局在	38
3-3. <i>POG1</i> の過剰発現が示す塩化リチウム耐性機構の解析	42
3-3-1. 酵母の細胞内リチウム含量の測定	42
3-3-2. 塩化リチウム存在下における生育曲線	43
3-3-3. 塩化リチウム存在下における G1 期同調後の生育曲線	44
3-4. Pog1 と相互作用するタンパク質の同定と相互作用の解析	46
3-4-1. 酵母ツーハイブリッド法による Pog1 と相互作用するタンパク質の 探索	46
3-4-2. Pog1 と Dma2 の相互作用解析	48
3-4-3. Pog1 のリン酸化解析	52
3-4-4. アラニン置換型 Pog1 変異体と Dma2 の相互作用解析	53
3-4-5. T253A 変異体のリン酸化解析	55
3-4-6. LC-MS/MS によるリン酸化部位の同定	55
3-4-7. S152A 変異体のリン酸化解析	58

3-4-8. アラニン置換型 Pog1 変異体の相互作用およびリン酸化解析	59
3-4-9. Pog1 のリン酸化	61
3-5. 細胞周期依存的なリン酸化解析	62
3-5-1. Pog1 をリン酸化するキナーゼ	62
3-5-2. Cdk と Pog1 の相互作用	63
3-5-3. 細胞周期依存的な Pog1 のリン酸化解析	64
3-6. <i>POG1</i> の転写解析	65
3-7. Pog1 と Dma2 の相互作用の生理的意義	65
3-7-1. 塩化リチウム耐性	65
3-7-2. Dma2 による Pog1 の分解	67
3-7-3. <i>POG1</i> 過剰発現による生育抑制	68
3-7-4. Pog1 のユビキチン化	69
4. 考察	71
4-1. 遺伝学解析による <i>RSP5</i> と <i>POG1</i> の関係	71
4-2. <i>POG1</i> 過剰発現株が示す細胞周期の遅延	71
4-3. Truncated-Pog1 過剰発現株が示す異なる表現型	72
4-4. <i>POG1</i> 過剰発現株が示す塩化リチウム耐性	73
4-5. Pog1 のリン酸化修飾	74
4-6. <i>POG1</i> の転写	76
4-7. Pog1 と Dma2 の機能的関連性	77
4-8. 転写因子 Pog1 について	78
4-9. Pog1 分子機能と生理的役割	78
5. 謝辞	82
6. 参考文献	83



## 2. 序論

細胞は生育環境における様々なストレスに応答して、適応するための機能を備えている。当研究室では真核生物のモデルとして、また、各種発酵食品の製造にも重要な出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を材料に、新しいストレス応答・適応の分子機構を明らかにするとともに、ストレス耐性を付与した産業酵母の育種への応用を目的に研究を進めている。

*S. cerevisiae* のストレス応答として、ストレス応答性 MAP キナーゼ経路およびカルシウムイオンを介するシグナル伝達経路などが広く研究されている (1)。高温ストレスや熱ショックなどのストレスや接合因子に曝されると細胞内シグナル伝達経路が活性化され、さまざまな細胞応答が誘導されるが、ストレス応答性 MAP キナーゼ経路はそのストレス応答を核に伝える重要な経路である (1, 2)。また、カルシウムイオンはストレスに曝されることによって細胞内濃度が増加し、カルモジュリンと結合したカルシウムイオンによってプロテインフォスファターゼであるカルシニューリンを活性化し、ストレス応答を誘導することが知られている (3)。

また、ストレスに曝された際、*S. cerevisiae* は細胞周期を一時的に停止し、ストレス応答遺伝子の発現を誘導してストレスに適応することが知られています。そして、ストレスに適応後、細胞周期を再び再開するというストレス応答戦略を備えています。

さらに、*S. cerevisiae* は遺伝学的解析に優れた生物であり、遺伝子の破壊株および変異株を用いることで、ストレス応答に重要な遺伝子(*CNBI*, *HOG1* など)が同定されている (4, 5)。また、シャペロンやストレス応答性転写因子を過剰発現させることでストレス耐性を示すことも知られている。

当研究室では、1) アミノ酸であるプロリンの細胞保護機能 (6)、2) 抗酸化機構に関与する *N*-アセチル化酵素 Mpr1 (*sigma 1278b gene for L-proline analogue resistance*) の機能解析 (7) および 3) 酸化ストレスによって誘導される一酸化窒素 (NO) の生成機構と生理的役割 (8) などの *S. cerevisiae* におけるストレス耐性機構について研究を進めている。さらに、ストレス応答に関する遺伝子の同定を目的として、アゼチジン-2-カルボン酸 (AZC) を用いたストレス感受性株のスクリーニングを行い、AZC に高い感受性を示す株を取得してい

る (9)。AZC はプロリンの毒性アナログであり、新生タンパク質の際にプロリンと競合的に取り込まれ、異常タンパク質を生成し、高温・エタノールと同様の応答機構を誘導するため、ストレスのモデルとして使用した。この AZC 感受性株は酵母ユビキチンリガーゼの一つである Rsp5 の遺伝子 (*RSP5*) に変異があり、401 番目の Ala が Glu に置換していることを明らかにした (9)。また、*rsp5* 変異株はアミノ酸パーミアーゼ Gap1 の細胞膜からの取り込み活性が低下することによって、細胞内に AZC が過剰に流入することで、AZC 感受性を示すことを明らかとした (9)。さらに、興味深いことに *rsp5* 変異株は高温、エタノール、塩化リチウム、過酸化水素などのストレスにも強い感受性を示した (9)。以上の結果から、Rsp5 がストレス応答に関与するタンパク質であり、ストレスによって生じる異常タンパク質の除去 (修復・分解) に関与する可能性を提唱し、ストレス下におけるユビキチンシステムによる異常タンパク質の除去に関する分子機構の解明を行ってきた。

Rsp5 の機能として、基質タンパク質のユビキチン化を介して 1) 膜タンパク質であるパーミアーゼやレセプターのエンドサイトーシスの制御 (10, 11)、2) RNA ポリメラーゼ II における大サブユニットの分解 (12)、3) 不飽和脂肪酸の生合成 (13)、4) mRNA の適切な核外移行に関与すること (14) などが報告されている。当研究室では、*rsp5* 変異株を用いた詳細な解析により、ストレス下における Rsp5 の役割について、以下の 2 点を明らかにしている。1) Rsp5 がストレス関連転写因子 (Hsf1, Msn2/4) の転写後制御 (RNA の核外輸送) を介してストレスタンパク質の転写を調節し、異常タンパク質の修復に関与すること (15)、2) プロテオーム解析において、ストレス下で Rsp5 によりユビキチン化され、分解されるタンパク質 (Egd2, Pda1 など) を同定した (16)。また、エタノールストレスによって生じた変性細胞膜タンパク質を Rsp5 は選択的に認識し、ユビキチン化および分解する可能性を示唆する結果を得ている。

さらに、ストレス下における Rsp5 の機能を解析する目的で、*rsp5* 変異株の高温ストレス感受性を相補する多コピーサプレッサー遺伝子として *POG1* (promoter of growth) を同定している (17)。*POG1* は *rsp5* 変異株にゲノムライブラリープラスミドを導入した形質転換体の中から、高温ストレス感受性を相補するクローンを取得し、そのプラスミドに組み込まれたゲノム配列を解読することで単離した (17)。*POG1* が多コピーで *rsp5* 変異株の高温ストレス感受性を相互する原因として、ストレス応答タンパク質をコードする *HSP12* および

*DDR2* の転写が誘導されることを明らかにした (17)。しかしながら、*POG1* がコードするタンパク質 (*Pog1*) が直接的に *HSP12* および *DDR2* の転写を誘導するのかは明らかにされていない。*POG1* は過剰発現によって  $\alpha$ -factor 処理で引き起こされる G1 アレストを阻害することが報告されている (18)。G1 アレストを阻害する理由として、1) G1 サイクリンをコードする *CLN2* の転写を上昇させること (18)、2) 細胞周期開始に関与する遺伝子の発現を調節している SCB 結合因子 (SBF) によって転写されることから G1/S 期移行に関わる転写活性化因子であると推定されている (19)。また、*Pog1* によって転写される標的遺伝子として 96 遺伝子が推定されている (19)。さらに、推定標的遺伝子とその機能から分類すると、*POG1* は主に細胞周期制御、細胞骨格およびスピンドル形成に関わる遺伝子を転写することが推定されている。しかしながら、*Pog1* の機能を報告した論文は当研究室の論文を除くと上記において示した 2 報のみであり、詳細な機能が明らかにされたとは言いがたく、依然として機能未知の遺伝子であると考えられる。

当研究室では *POG1* 過剰発現株が示す表現型として、実験室酵母において著しい塩化リチウムを示すことを明らかにしている (17)。さらに、産業酵母への応用を目的とした解析から、実用パン酵母において *POG1* を過剰発現させると、高濃度ショ糖生地 (高浸透圧ストレス) での発酵力 (炭酸ガス発生量) が増加すること、逆に *POG1* を破壊すると、冷凍生地での発酵力が著しく向上するということが判明している (20)。以上のことから、*POG1* もストレス応答に関与する遺伝子であることが示唆された。

そこで、本研究ではストレス条件下における *Rsp5* と *Pog1* の関連性と機能解析、および *POG1* 過剰発現株が示す表現型の解析を行うことで、*POG1* のさらなる分子機能および生理的役割の解明を行うことを目的とした。

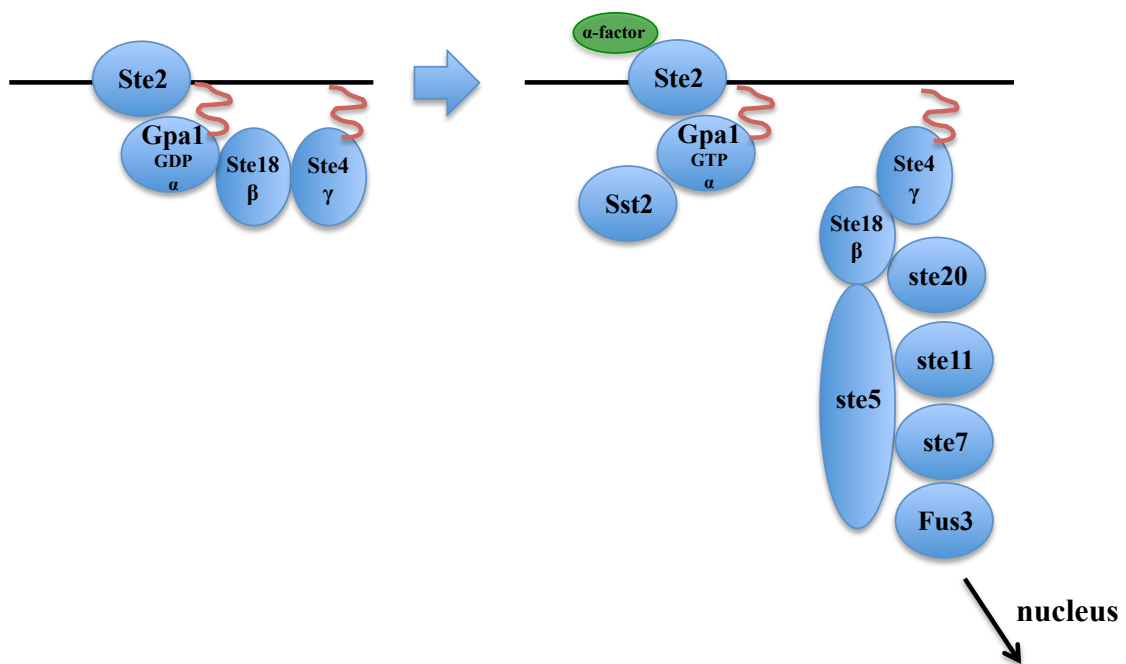


Fig. 1. フェロモン応答性 MAP キナーゼ

フェロモン ( $\alpha$ -factor) によって活性化される応答性 MAP キナーゼ経路。フェロモンが受容体に結合すること (右側) で G プロテイン複合体が活性化され、MAP キナーゼ経路を介してシグナルが核に伝えられる。 $\alpha$ -factor : フェロモン (接合因子)、Ste2 : フェロモン受容体、Gpa1, Ste18 & Ste4 : G プロテイン複合体 ( $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ )、Ste20 : キナーゼ、Ste11 : MAPKK キナーゼ、Ste7 : MAP キナーゼ、Fus3 : MAP キナーゼ、Ste5 : MAPK 足場タンパク質、Sst2 : GAPase 活性化タンパク質。

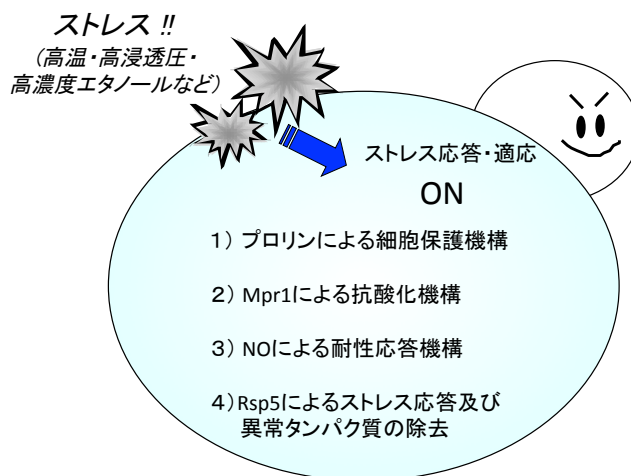


Fig. 2. 当研究室で見出したストレス応答・適応機構

1) アミノ酸であるプロリンによる細胞保護機構、2) *N*-アセチル化酵素 Mpr1 (sigma 1278b gene for L-proline analogue resistance) による抗酸化機構、3) 一酸化窒素 (NO) による抗酸化機構、4) ユビキチンリガーゼ Rsp5 によるストレス応答および異常タンパク質の除去機構。

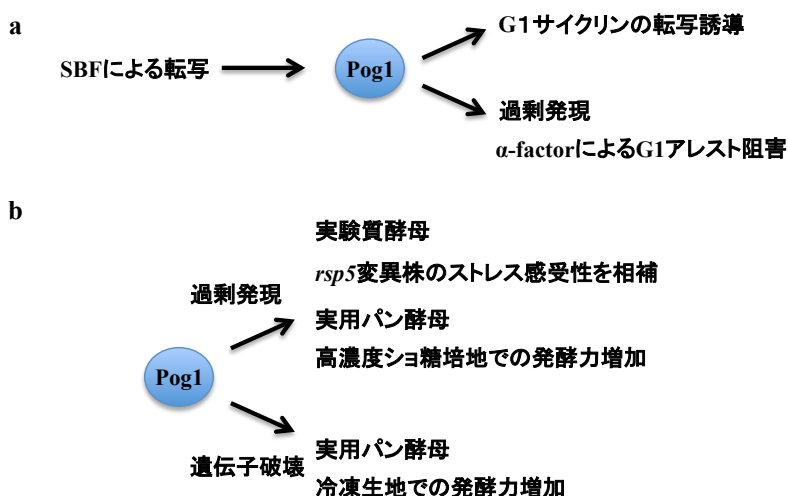


Fig. 3. *POG1* の機能

a) *POG1* は SCB 結合因子 (SBF) によって転写され (19)、G1 サイクリンの転写を誘導することから転写活性化因子と推定されている (18)。また、過剰発現によって  $\alpha$ -factor 処理による G1 アレストを阻害する (18)。b) *POG1* の表現型。*POG1* の過剰発現は *rsp5* 変異株のストレス感受性を相補し (実験室酵母)、また高濃度シヨ糖培地での発酵力増加させる (実用パン酵母)。さらに、*POG1* の破壊によって冷凍生地での発酵力が増加する (実用パン酵母)。

## 2. 材料と方法

### 2-1. 培地

酵母菌株の培養には YPD 培地 (2% glucose, 2% peptone, 1% yeast extract)、完全合成 (SC) 培地 (2% glucose, 0.67% bacto yeast nitrogen base without amino acids, 0.5% ammonium sulfate) を使用した。YPD 培地に 5-fluoroorotic acid monohydrate (5-FOA) (1 mg/ml, 和光純薬工業社)、hygromycin B (100 µg/ml, 和光純薬工業社)、G418 二硫酸塩 (100 µg/ml, ナカライテスク社) および nourseothricin (clonNAT, 100 µg/ml, LEXSY NTC 社) を加えた培地を遺伝子破壊後の選択培地として用いた。

SC 培地に酵母のアミノ酸要求性の相補あるいはプラスミド保持のためにドロップアウト混合物を添加したドロップアウト培地 (SC+ドロップアウト) を使用した。また、SC 培地に AZC (終濃度 20 µg/ml)、ソルビトール (終濃度 1M)、グルコース (40%)、塩化カリウム (終濃度 1M)、塩化ナトリウム (終濃度 1M)、塩化リチウム (終濃度 200 mM) を添加してストレス培地とした。

酵母ツーハイブリッドには SC-ura-his-trp 培地および SG-ura-his-trp+X-gal 培地を用いた。

大腸菌株の培養にはアンピシリン (100 µg/ml) 含有の Luria-Bertani (LB) 培地を使用した。

各培地は必要に応じて、2%寒天を添加して固体培地とした。

### 2-2. 菌株

生物遺伝資源センター(NBRC)から分譲していただいた BY4741(*MATa his3 Δ 1 leu2 Δ 0 met15 Δ 0 ura3 Δ 0*)系統株を酵母野生株として用いた。また、Open Biosystems 社が販売している BY4741 株の一遺伝子破壊株コレクション (Yeast MATa Collection YSC1053) から用いた。

大腸菌株については、DH5α [*FλΦ80lacZΔM15 ΔlacZYA argF*] *U169 deoR recA1 endA1 hsdR17(r<sub>k</sub><sup>-</sup>m<sub>k</sub><sup>+</sup>) supE44 thi-1 gyrA96*] をクローニング用に使用した。

#### 2-2-1. *rsp5* 変異株の作製

本研究室で構築した pRS406-*rps5*<sup>A401E</sup> を制限酵素 *Hpa* I で 1ヶ所切断した 2 本鎖 DNA 断片を BY4741 株に形質転換後、YPD+5-FOA 培地で形質転換体を選択

した。YPD+5-FOA 培地に生育した形質転換体を YPD 液体培地で 1 晩培養後、SC-ura 培地で生育した株を *rsp5* 変異株 (*rsp5*<sup>A401E</sup>) と選択した。ゲノム上の *RSP5* 遺伝子の塩基配列は DNA シークエンサー (3130xl Genetic Analyzer, Applied Biosystems 社製) により確認した。

#### 2-2-2. *pog1* 破壊株の作製

pFA6a-natNT2 からプライマー POG1-S1 と POG1-S2 を用いて *pog1::natNT2* 断片を作製した。この PCR 産物を BY4741 株に形質転換後、YPD+nourseothricin 培地で形質転換体を選択し、*pog1* 破壊株 ( $\Delta$ *pog1*) を作製した。

#### 2-2-3. *rsp5* 変異 *pog1* 破壊株の作製

*pog1* 破壊株の作製と同様に行った。pFA6a-natNT2 からプライマー POG1-S1 と POG1-S2 を用いて *pog1::natNT2* 断片を作製し、*rsp5* 変異株に形質転換後、YPD+nourseothricin 培地で形質転換体を選択し、*rsp5* 変異 *pog1* 破壊株 (*rsp5*<sup>A401E</sup>  $\Delta$ *pog1*) を作製した。

#### 2-2-4. *ena* 破壊株の作製

pFA6a-hphNT1 からプライマー ENA-S1 と ENA-S2 を用いて *ena1,2,5::hphNT1* 断片を作製した。この PCR 産物を BY4741 株に形質転換後、YPD+hygromycin B 培地で形質転換体を選択し、*ena* 破壊株 ( $\Delta$ *ena*) を作製した。

#### 2-2-5. *dma1 dma2* 2重破壊株の作製

pFA6a-natNT2 からプライマー DMA1-S1 と DMA1-S2 を用いて *dma1::natNT2* 断片を作製した。この PCR 産物を *dma2* 破壊株に形質転換後、YPD+nourseothricin 培地で形質転換体を選択し *dma1 dma2* 二重破壊株 ( $\Delta$ *dma1*  $\Delta$ *dma2*) を作製した。

#### 2-2-6. *trp1* 破壊株の作製

pFA6a-natNT2 からプライマー TRP1-S1 と TRP1-S2 を用いて *trp1::natNT2* 断片を作製した。この PCR 産物を BY4741 株に形質転換後、YPD+nourseothricin 培地で形質転換体を選択し、*trp1* 破壊株 ( $\Delta$ *trp1*) を作製した。

#### 2-2-7. *cln1 cln2* 破壊株の作製

pFA6a-hphNT1 からプライマー-CLN2-S1 と CLN2-S2 を用いて *cln2::hphNT1* 断片を作製した。この PCR 産物を *cln1* 破壊株に形質転換後、YPD+hygromycin B 培地で形質転換体を選択し、*cln1 cln2* 二重破壊株 ( $\Delta cln1 \Delta cln2$ ) を作製した。

#### 2-2-8. $P_{POG1}::P_{TDH3}$ 株の作製

pTAC-URA3- $P_{TDH3}$  からプライマー Up-POG1-URA3-ProTDH3 と Down-POG1-URA3-ProTDH3 を用いて URA3- $P_{TDH3}$  断片を作製した。この PCR 産物を BY4741 株に形質転換後、SC-ura 培地で形質転換体を選択し、 $P_{POG1}::P_{TDH3}$  株 ( $P_{POG1}::P_{TDH3}$ ) とした。

#### 2-2-9. Pogl-yeGFP 株の作製

pYM25 からプライマー-POG1-S3-F-C と POG1-S2-R-C を用いて yeGFP-hphNT1 断片を作製した。この PCR 産物を BY4741 株に形質転換後、YPD+hygromycin B 培地で形質転換体を選択し、Pogl-yeGFP 株 (Pogl-yeGFP) を作製した。

#### 2-2-10. その他の遺伝子破壊株

その他の遺伝子破壊株は、BY4741 株の一遺伝子破壊株コレクション (Yeast MATa Collection YSC1053) を用いた。本研究で使用した菌株を Table 1 に示す。



Table 1. 本研究で使用して酵母株リスト

菌株	遺伝子型	入手源
BY4741	<i>MATa his3D1 leu2D0 met15D0 ura3D0</i>	NBRC
<i>rsp5<sup>A401E</sup></i>	BY4741 <i>rsp5<sup>A401E</sup></i>	本研究
$\Delta$ <i>pog1</i>	BY4741 <i>pog1::natNT2</i>	本研究
<i>rsp5<sup>A401E</sup>Δpog1</i>	BY4741 <i>rsp5<sup>A401E</sup> pog1::natNT2</i>	本研究
$\Delta$ <i>dma1</i>	BY4741 <i>dma1::kanMX4</i>	Open Biosystems
$\Delta$ <i>dma2</i>	BY4741 <i>dma2::kanMX4</i>	Open Biosystems
$\Delta$ <i>dma1Δdma2</i>	BY4741 <i>dma1::natNT2 dma2::kanMX4</i>	本研究
$\Delta$ <i>pho85</i>	BY4741 <i>pho85::kanMX4</i>	Open Biosystems
$\Delta$ <i>trp1</i>	BY4741 <i>trp1::natNT2</i>	本研究
$\Delta$ <i>ena1,2,5</i>	BY4741 <i>ena1,ena2,ena5::hphNT1</i>	本研究
$\Delta$ <i>cln1</i>	BY4741 <i>cln1::kanMX4</i>	Open Biosystems
$\Delta$ <i>cln2</i>	BY4741 <i>cln2::kanMX4</i>	Open Biosystems
$\Delta$ <i>cln1 Δcln2</i>	BY4741 <i>cln1::kanMX4 cln2::hphNT1</i>	本研究
$P_{POG1}::P_{TDH3}$	BY4741 $P_{POG1}::URA3-P_{TDH3}$	本研究
Pog1-yeGFP	BY4741 $POG1::POG1yeGFP-hphNT1$	本研究

### 2-3. プラスミド

pAD4 (九州工業大学の仁川教授より分譲) は YEp 型のプラスミドで 2 $\mu$  DNA の複製起点と、酵母での選択用マーカー *LEU2* 遺伝子、および *E. coli* での複製起点と選択マーカーのアンピシリン耐性遺伝子を含んでいる。また、マルチクロニングサイトの上流に *ADHI* プロモーター、下流に *ADHI* ターミネーターが存在している。

pRS406-*rsp5*<sup>A401E</sup> は本研究室で保持しているプラスミドである。酵母のゲノム上に存在する *RSP5* に Ala401Glu 置換を導入するために用いた。

YEp24 は YEp 型のプラスミドで 2 $\mu$  DNA の複製起点と、酵母での選択用マーカー *URA3* 遺伝子、および *E. coli* での複製起点と選択マーカーのアンピシリン耐性遺伝子を含んでいる。

pAD4-POG1 は研究室保有のものを使用した。

pAD4-CLN1 は酵母ゲノムを鋳型にプライマー CLN1-PstI と CLN1-SalI を用いて PCR を行い、PCR 断片および pAD4 を *PstI* と *SalI* で制限酵素処理した後に、ライゲーションさせることで構築した。

pAD4-MSG5 は酵母ゲノムを鋳型にプライマー MSG5-PstI と MSG5-SacI を用いて PCR を行い、PCR 断片および pAD4 を *PstI* と *SacI* で制限酵素処理した後に、ライゲーションさせることで構築した。

YEp24-POG1 は pAD4-POG1 を制限酵素 *BamHI* で切断した断片 BamHI-P<sub>ADHI</sub>-POG1-T<sub>ADHI</sub>-BamHI および YEp24 を *BamHI* で制限酵素処理した後に、ライゲーションさせることで構築した。

pAD4-HADMA2 は酵母ゲノムを鋳型にプライマー SalI-HA-DMA2 と DMA2-SmaI を用いて PCR を行い、PCR 断片および pAD4 を *SalI* と *SmaI* で制限酵素処理した後、ライゲーションすることで構築した。

pAD4-HADMA2 (without *BamHI*) は鋳型にアミノ酸置換を導入する残基に相当する塩基を置換したプライマー DMA2-BamHI-mutant-F と DMA2-BamHI-mutant-R を用いて QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene 社)の方法に準じて構築した。

YEp24-HADMA2 は pAD4-HADMA2 (without *BamHI*) を *BamHI* で制限酵素処理した BamHI-HADMA2-BamHI 断片を YEp24 の *BamHI* サイトにライゲーションすることで構築した。

pYM25 は yeGFP 配列と hygromycin B 耐性遺伝子 *hphNT1* 配列を持つプラスミ

ドである。標的遺伝子の C 末端側に *yeGFP* 配列を付加する際に用いる。PCR-TOOLBOX から用いた。

pTAC-URA3-P<sub>TDH3</sub> は *URA3* 配列と *TDH3* プロモーター配列を持つプラスミドである。

pGilda (東京工業大学の岸努先生より分譲) は酵母ツーハイブリッド法に用いた bait プラスミドであり、ガラクトースによって bait タンパク質を発現する。

pSH18-34 (東京工業大学の岸努先生より分譲) は酵母ツーハイブリッド法に用いたレポータープラスミドであり、*LacZ* を発現する。

pJG4-5-cDNA (東京工業大学の岸努先生より分譲) は酵母ツーハイブリッド法に用いた pray プラスミドであり、ガラクトースによって pray タンパク質を発現する。

pJG4-5 は pJG4-5-cDNA ライブラリーから取得した cDNA が挿入されていないプラスミドである。pJG4-5 空ベクターとして用いた。

pAD4-POG1(51-351)、pAD4-POG1(101-351)、pAD4-POG1(151-351)、pAD4-POG1(201-351)、pAD4-POG1(251-351)および pAD4-POG1(301-351)は酵母ゲノムを鋳型にそれぞれプライマー POG1-HindIII-51 と POG1-PstI、POG1-HindIII-101 と POG1-PstI、POG1-HindIII-151 と POG1-PstI、POG1-HindIII-201 と POG1-PstI、POG1-HindIII-251 と POG1-PstI および POG1-HindIII-301 と POG1-PstI の組み合わせで PCR を行い、PCR 断片および pAD4 を *HindIII* と *PstI* で制限酵素処理した後に、ライゲーションすることで構築した。

pAD4-POG1yeGFP、pAD4-POG1(51-351)yeGFP、pAD4-POG1(101-351)yeGFP および pAD4-POG1(151-351)yeGFP はゲノム上 *POG1* 遺伝子の C 末端に *yeGFP* を導入した POG1yeGFP 株のゲノムを鋳型にプライマー POG1-HindIII と pYM25-yeGFP-SmaI-R、POG1-HindIII-51 と pYM25-yeGFP-SmaI-R、POG1-HindIII-101 と pYM25-yeGFP-SmaI-R および POG1-HindIII-151 と pYM25-yeGFP-SmaI-R の組み合わせた PCR を行い、PCR 断片および pAD4 を *HindIII* と *SmaI* で制限酵素処理した後に、ライゲーションさせることで構築した。

pGilda-POG1 は酵母ゲノムを鋳型にプライマー *EcoRI*-POG1 と POG1-*NotI* を用いて PCR を行い、PCR 断片および pGilda を *EcoRI* と *NotI* で制限酵素処理した後に、ライゲーションさせることで構築した。

pGilda-POG1(51-351)、pGilda-POG1(101-351)、pGilda-POG1(151-351)、

pGilda-POG1(151-351)、pGilda-POG1(201-351)、pGilda-POG1(251-351) および pGilda-POG1(301-351)は酵母ゲノム鋳型にそれぞれプライマーEcoRI-POG1-51 と POG1-NotI、EcoRI-POG1-101 と POG1-NotI、EcoRI-POG1-151 と POG1-NotI、EcoRI-POG1-201 と POG1-NotI、EcoRI-POG1-251 と POG1-NotI および EcoRI-POG1-301 と POG1-NotI の組み合わせで PCR を行い、PCR 断片および pGilda を *EcoRI* と *NotI* で制限酵素処理した後に、ライゲーションさせることで構築した。

pJG45-DMA2 は東京工業大学の岸努先生より分譲していただいた pJG45-cDNA ライブラリーから酵母ツーハイブリッドから取得したプラスミドである。

pJG45-DMA2(-RING)および pJG45-DMA2(-FHA)は酵母ゲノムを鋳型にそれぞれプライマーDMA2-FHA-F と DMA2-FHA-R および DMA2-RING-F と DMA2-RING-R の組み合わせで PCR を行い、PCR 断片および pJG45-DMA2 を *AscI* と *NotI* で制限酵素処理した後に、ライゲーションさせることで構築した。

pGilda-POG1<sup>T202A</sup>、pGilda-POG1<sup>T244A</sup>、pGilda-POG1<sup>T253A</sup>、pGilda-POG1<sup>T344A</sup>、pGilda-POG1<sup>T253A</sup>、pGilda-POG1<sup>S152A</sup> および pGilda-POG1<sup>T253E</sup> は pGilda-POG1 を鋳型にアミノ酸置換を導入する残基に相当する塩基を置換したプライマー POG1-T202A-F と POG1-T202A-R, POG1-T244A-F と POG1-T244A-R, POG1-T253A-F と POG1-T253A-R, POG1-T344A-F と POG1-T344A-R, POG1-T351-F-pGilda と POG1-T351-R-pGilda および POG1-T253E-F と POG1-T253E-R のそれぞれの組み合わせを用いて QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit のプロトコールに従って構築した。

pGilda-POG1<sup>S152A/T253A</sup> は pAD4-POG1<sup>T253A</sup> を鋳型にプライマーS152-F と S152-R を用いて QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit のプロトコールに従って構築した。

pJG45-DMA2<sup>G298E</sup> は pJG45-DMA2 を鋳型にプライマーDMA2-G298E-F と DMA2-G298E-R で G298E 置換に相当する塩基を QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit のプロトコールに従って構築した。

pJG45-DMA2<sup>G298E/S326A/H329L</sup> は pJG45-DMA2<sup>G298E</sup> を鋳型にプライマー DMA2-S326A-H329L-F と DMA2-S326A-H329L-R の組み合わせで、S326A および H329L 置換に相当する塩基を QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) のプロトコールに従って構築した。

pAD4-POG1<sup>S152A</sup> および pAD4-POG1<sup>T253A</sup> は pAD4-POG1 を鋳型にアミノ酸置換を導入する残基に相当する塩基を置換したプライマー S152-F と S152-R および POG1-T253A-F と POG1-T253A-R のそれぞれの組み合わせを用いて QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit のプロトコールに従って構築した。

pAD4-POG1<sup>S152A/T253A</sup> は pAD4-POG1<sup>T253A</sup> を鋳型にプライマー S152-F と S152-R を用いて QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit のプロトコールに従って構築した。

pJG45-PHO85 および pJG45-CDC28 は酵母ゲノムを鋳型にそれぞれプライマー PHO85-AscI-F と PHO85-NotI-R および CDC28-AscI-F と CDC28-NotI-R の組み合わせで PCR を行い、PCR 断片および pJG45-DMA2 を *AscI* と *NotI* で制限酵素処理した後に、ライゲーションさせることで構築した。

pFA6-hphNT1 は Hygromycin B 耐性遺伝子 *hphNT1* 配列を持ち、遺伝子破壊の際の鋳型として用いた。PCR-TOOLBOX から用いた。

pFA6-natNT2 は Nourseothricin 耐性遺伝子 *natNT2* 配列を持ち、遺伝子破壊の際の鋳型として用いた。PCR-TOOLBOX から用いた。

本研究で使用したプライマーを Table 2 に示す。

Table 2. 本研究で使用したプライマーリスト

名称	オリゴヌクレオチド配列 (5'-3')
POG1-S1	ATGAAGCAGGAGCCACATAGACAATCCGAAGAAAAAGAGAATGCGTACGC TGCAGGTCGAC
POG1-S2	TCATGTGGGAGGAGGATGTTTTGGTGTATGAATGAGTTAATCGATGAATTC GAGCTCG
ENA-S1	CTTAATTCACATTTATTTGAGGCAACAATACGTATATTTACTAATTAAGAT GCGTACGCTGCAGGGTCGAC
ENA-S2	AATAAAAAAATCTAAACTATTACGTAAGGGGGAGAAGGGATAAGGGATGC CTTAATCGATGAATTCGAGCTCG
DMA1-S1	GTCGATTTCTGTGCACATACGTTCTGTATAGTGGTTATTCCTGGATGCGTA CGCTGCAGGTCGAC
DMA1-S2	ATATATATATATATATATATATATATATAGCTCAAAAATTCATGTGATTAATCG ATGAATTCGAGCTCG
TRP1-S1	GCACGTGAGTATACGTGATTAAGCACACAAAGGCAGCTTGGAGTATGCGTA CGCTGCAGGTCGAC
TRP1-S2	GAATAAACGAATGAGGTTTCTGTGAAGCTGCACTGAGTAGTATGTTAATCG ATGAATTCGAGCTCG
CLN2-S1	GAAAATCTTTTCTTTTCCATTCATTCATTAATTTAACGACAGACATGCG TACGCTGCAGGTCGAC
CLN2-S2	GGTACGTTTGGCAAATTGGCATTCAATTTATCATGAAAAGAACAGGAATTA TCGATGAATTCGAGCTCG
CLN1-PstI	AAAACCTGCAGAAAAGATCATGAACCAC
CLN1-SalI	CCAAAAGTCGACGAAAATGGTCACAGTTGAG
MSG5-PstI	AAAACCTGCAGATAAGTGCACATGCAATTTTC
MSG5-SacI	CCAAAAGAGCTCATGCTGTCCCTTAAGGAAG
POG1-PstI	ACCCCTGCAGACTGCACGTCATGTGGGA
POG1-HindIII-51	CCAAGCTTGCCATATTATGTCATCGCAAACAGAAAAGTC
POG1-HindIII-101	CCAAGCTTGCCATATTATGAAGATACGCGAGTCAAATC
POG1-HindIII-151	CCAAGCTATGCCGTCTCCGATAACGACAAAAG
POG1-HindIII-201	CCAAGCTTATGTATACTTTACCTATGCCTGC
POG1-HindIII-251	CCAAGCTTATGTCCCAGACACCAGTGATGAG

Table 2. 本研究で使用したプライマーリスト (続き)

名称	オリゴヌクレオチド配列 (5'-3')
POG1-HindIII-301	CCAAGCTTATGGACCAGTCAAGAAAAAGTTTTAG
POG1-HindIII	ACCCAAGCTTGCCATATTATGAAGCAGGAG
pYM25-yeGFP-SmaI-R	CCTCCCGGGTTATTTGTACAATTCATCC
EcoRI-POG1	GCGAATTCATGAAGCAGGAGCCACATAG
POG1-NotI	ATAAGAATGCGGCCGCTCATGTGGGAGGAGGATGTT
EcoRI-POG1-51	GCGAATTCATGTTCATCGCAAACAGAAAAGTC
EcoRI-POG1-101	GCGAATTCATGAAGATACGCGAGTCAAATC
EcoRI-POG1-151	GCGAATTCATGCCGTCTCCGATAACGACAAAAG
EcoRI-POG1-201	GCGAATTCATGTATACTTTACCTATGCCTGC
EcoRI-POG1-251	GCGAATTCATGTCCCAGACACCAGTGATGAG
EcoRI-POG1-301	GCGAATTCATGGACCAGTCAAGAAAAAGTTTTAG
DMA2-FHA-F	GAATTCGGCGCGCCGGAATTCAGCTGACCACCATGTACACGCCATCCCTGC
DMA2-FHA-R	GGGGCGGCCGCGATCCCCGGGAATTGCCATGTTATTCTTCTCAATACCTG
DMA2-RING-F	CCCGGCGCGCCGGAATTCAGCTGACCACCGAGCTAAATAGATCATGG
DMA2-RING-R	GGGGCGGCCGCGATCCCCGGGAATTGCCATGTTAAGGATGGCTATCAACATCC
POG1-T202A-F	CAACCAGGCGCATATGCTTTACCTATGCCTGC
POG1-T202A-R	GCAGGCATAGGTAAAGCATATGCGCCTGGTTG
POG1-T244A-F	CAAGCTCAGCTTCTGCTATGAGCTCAAACCTCG
POG1-T244A-R	CGAGTTTGAGCTCATAGCAGGAAGCTGAGCTTG
POG1-T253A-F	GAGCTCAAACCTCGGAGTCCCAGGCTCCAGTGATGAGCTCACAGTTTCTTTTC
POG1-T253A-R	GAAAGAAACTGTGAGCTCATCACTGGAGCCTGGGACTCCGAGTTTGAGCTC
POG1-T253E-F	GAGCTCAAACCTCGGAGTCCCAGGATCCAGTGATGAGCTCACAGTTTCTTTTC
POG1-T253E-R	GAAAGAAACTGTGAGCTCATCACTGGATCCTGGGACTCCGAGTTTGAGCTC
POG1-T344A-F	CAATTTTCTCATTCATGCTCCAAAACATCCTCCTC
POG1-T344A-R	GAGGAGGATGTTTTGGAGCATGAATGAGAAAATTG
POG1-T351A-F	CAAACATCCTCCTCCCGCTTGACGTGCAGTCTGC
POG1-T351A-R	GCAGACTGCACGTCAAGCGGGAGGAGGATGTTTTG
POG1-T351A-F-pGilda	CAAACATCCTCCTCCCGCTTGAGCGGCCGCTCGAG
POG1-T351A-R-pGilda	CTCGAGCGGCCGCTCAAGCGGGAGGAGGATGTTTTG
DMA2-G298E-F	CCCAATTGGTTATTGAACGCTATACTGAGCGTG

Table 2. 本研究で使用したプライマーリスト (続き)

名称	オリゴヌクレオチド配列 (5'-3')
DMA2-G298E-R	CACGCTCAGTATAGCGTTCAATAACCAATTGGG
DMA2-S326A-H329L-F	TAAATCCAAAGTTGTTGCTAGGACATTGGGTTGTTTTAAAGTTG
DMA2-S326A-H329L-R	CAACTTTAAAACAACCCAATGTCCTAGCAACAACCTTGGATTTA
POG1-S152A-F	CATCTTACGATACCGGCTCCGATAACGACAAAG
POG1-S152A-R	CTTTGTCGTTATCGGAGCCGGTATCGTAAGATG
Up-POG1-URA3-PtoTDH3	GAAATTGAAAAAAAAATAAGTAAAGACGAAAATCAAAGTGGATGCCATATT CAGGGTCCATCCCCTTTTC
Down-POG1-URA3-PRoTDH3	CCTTTCGGCTTCTCTTTTTCTTCGGATTGTCTATGTGGCTCCTGCTTCATTTT GTTTGTATTATGTGTGTT
pJG4-5-F	CGGATCAGGCGATTAACGTG
POG1-F	GACCAATGGCTGTTGAACGA
POG1-R	AGCTGTCACGGTTGTACCAGAA
PHO85-AscI-F	GAATTCGGCGCGCCGGAATTCAGCTGACCACCATGTCTTCTTCTCACAG
PHO85-NotI-R	GGGGCGGCCGCGATCCCCGGGAATTGCCATGTTATTATGAAGCGTGGTGG TAGTAC
CDC28-AscI-F	GAATTCGGCGCGCCGGAATTCAGCTGACCACCATGAGCGGTGAATTAGC
CDC28-NotI-R	GGGGCGGCCGCGATCCCCGGGAATTGCCATGTTATTATGATTCTTGAAG



#### 2-4. スポットテストによるストレス評価

SC-leu 培地を用い、30°Cで一晩培養して定常期まで増殖させた。新しい SC-leu 培地に OD<sub>600</sub> が 0.1 になるように前培養液を添加して、本培養を行った。30°C、8~10 時間培養後、細胞を原液から 10<sup>-1</sup> から 10<sup>-3</sup> までの希釈系列を作製し、3 μl ずつ各培地にスポット後、25°C、3 日間培養した。

#### 2-5. α-Factor による G1 アレスト評価 (halo assay)

SC-leu 培地を用い、30°Cで一晩培養して定常期まで増殖させた。50 ml のファルコンチューブに 2 ml の蒸留水と細胞数を合わせた各酵母菌株を加え、さらに電子レンジで加熱した 1% 寒天を含む蒸留水 2 ml と混ぜ合わせて、Sc-leu 固体培地上に薄く塗布し、細胞を広げた。α-factor (5 μg, ペプチド研究所社) をしみ込ませたろ紙を作製した固体培地上に載せて生育を観察した。コントロールには滅菌水を用いた。

#### 2-6. 細胞内リチウムイオン含量の測定

SC-leu 培地を用い、30°Cで一晩培養して定常期まで増殖させた。新しい SC-leu 培地に OD<sub>600</sub> が 0.1 になるように前培養液を添加して、本培養を行った。OD<sub>600</sub> が 1.0 になるまで増殖した細胞に終濃度が 200 mM になるように塩化リチウムを添加した。塩化リチウム添加して 1 時間、6 時間あるいは 12 時間培養後、3,000 rpm, 5 分間遠心分離し、細胞を回収した。上清を除き、SC-leu 培地で 3 回、細胞を洗浄後、500 μl の滅菌水に懸濁し、100°C, 15 分間熱水抽出を行った。15,000 rpm, 5 分間遠心分離し、上清を新しいエッペンチューブに移して、終濃度が 10% になるようにトリクロロ酢酸を加えて、15,000 rpm, 5 分間遠心分離することでタンパク質を除いた。上清を 1 ml テルモシリンジ(テルモ社)と DISMIC13cp 0.20 mm フィルター (アドバンテック社) を使用して濾過し、解析サンプルとした。解析サンプルはマイクロ波導入プラズマ質量分析装置 (MIP-MS, P-6000, 日立社製) を用いてリチウム含量を測定した。リチウムイオンの検量線作製にはリチウム標準液 (1,002 mg/l, 和光純薬工業社) を用いた。測定は本学物質創成科学研究科の藤原正裕技術職員に依頼した。

## 2-7. 顕微鏡観察

SC-leu 培地を用い、30°Cで一晩培養して定常期まで増殖させた。新しい SC-leu 培地に OD<sub>600</sub> が 0.1 になるように前培養液を添加して、本培養を行い、対数増殖期の細胞を観察した。顕微鏡は Axiovert 200M (Carl Zeiss 社製) を用い、画像を HBO 100 Microscope Illuminating System (Carl Zeiss 社製) デジタルカメラで取り込み、Adobe Photoshop Elements 5.0 (Adobe Systems 社製) を用いて画像解析を行った。

## 2-8. 蛍光顕微鏡観察

SC-leu 培地を用い、30°Cで一晩培養して定常期まで増殖させた。新しい SC-leu 培地に OD<sub>600</sub> が 0.1 になるように前培養液を添加して、本培養を行った。対数増殖期まで培養した細胞を回収し、核染色を行うため、細胞に DAPI 試薬の VECTASHIELD (Vector Laboratories) を 2  $\mu$ l 加えて観察した。蛍光顕微鏡は Axiovert 200M を用い、画像を HBO 100 Microscope Illuminating System デジタルカメラで取り込み、Adobe Photoshop Elements 5.0 を用いて画像解析を行った。

## 2-9. リアルタイム PCR

各酵母細胞はマルチビーズショッカー (MB601U, 安井器械社製) を使用して、ガラスビーズ (0.5 mm) で破碎した。その後、全 RNA を RNeasy Mini Kit (QIAGEN 社) を使用して、調整した。RNA から cDNA への逆転写は High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems 社) を用いて行った。リアルタイム PCR は、SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems 社) を用いて行った。反応組成は 25  $\mu$ l の Master Mix に、終濃度 100 nM の正方向と逆方向のプライマーと、10 ng の cDNA を加えた。反応条件は、50°C 2 分間→95°C 10 分間その後、95°C 15 秒間→60°C, 1 分間を 40 サイクルとした。内在性コントロールとしては *PGK1* 遺伝子を用い、 $\Delta \Delta cT$  法による計算を行った。

## 2-10. ウェスタンブロッティングによる Pog1 の検出

酵母細胞から全タンパク質を抽出するにはトリクロロ酢酸 (TCA) 抽出法を用いた。酵母菌体を遠心分離で集菌した後、10%TCA 溶液に懸濁し、マルチビーズショッカー (MB601U, 安井器械社製) を用いて破碎した (2,700 rpm, 30 秒オン →30 秒オフを 7 サイクル, 0°C)。破碎後のサンプルを 15,000 rpm, 10 分間

遠心分離し、沈殿にサンプルバッファー (0.5 M Tris-HCl [pH=6.8], 2 % SDS, 10 % glycerol, 0.5% 2-mercaptoethanol, 0.0125% BPB) を加えて懸濁した後、100°C 2 分間煮沸することで溶解した。溶解後のサンプルを 15,000 rpm, 10 分間遠心分離し、上清をサンプルとした。サンプルのタンパク質濃度は Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad 社) を用いて測定した。サンプルは 12% の SDS ポリアクリルアミドゲルで電気泳動を行い、PVDF メンブレン (MerckMillipore 社) に転写した。PVDF メンブレンは Blocking buffer (TBS buffer, 0.1% Tween 20, 3% skim milk) で 1 時間室温においてブロッキングした。一次抗体は抗 Pog1 抗体 (Pog1 の 295-309 アミノ酸配列を抗原としてウサギに免疫して作製したペプチド抗体)、二次抗体には抗 rabbit-IgG (Promega 社) あるいは TrueBlot anti-rabbit IgG HRP (Rockland 社) を必要に応じて使い分けて用いた。一次抗体は Can get signal solution 1 (東洋紡社) に 2000 倍希釈して用いた。また、二次抗体は Can get signal solution 2 (東洋紡社) に 2000 倍希釈して用いた。ECL plus Western blotting Detection System (GE Healthcare 社) を利用し、ルミノメーター (LAS-4000, 富士フィルム社製) で検出した。

#### 2-11. 酵母ツーハイブリットスクリーニング

酵母ツーハイブリット法は、岸ら (21, 22) の方法を参考に、以下の方法で行った。また、必要なプラスミド pGilda、pSH18-34 および cDNA ライブラリー (pJG4-5-cDNA) は東京工業大学の岸努先生より分譲していただいた。

*trp1* 破壊株に pGilda-POG1, pSH18-34, pJG45-cDNA を導入し、SC-his-ura-*trp* の選択培地で形質転換体を取得した。形質転換体はベルベット布を用いて SG-his-ura-*trp*+X-gal 培地にレプリカし、30°C で培養した。2~3 日間培養後に青いコロニーを 1 枚のプレートから 1 株ずつ取得し、およそ 100 株選択した。選択した株を再度 SG-his-ura-*trp*+X-gal 培地にストリークすることで相互作用候補株として選択した。pJG45-cDNA に含まれている cDNA の同定はプライマー pJG45-F を用いた塩基配列の決定によって行った。

#### 2-12. 酵母ツーハイブリットによる相互作用解析

目的のタンパク質を発現させるために、各遺伝子を pGilda および pJG4-5 プラスミド挿入したタンパク質発現プラスミドおよび pSH18-34 を *trp1* 破壊株に導入後、SC-his-ura-*trp* 培地で生育した形質転換体を 10  $\mu$ l の滅菌水に懸濁し、その内、

3  $\mu$ l を SC-his-ura-trp 培地にスポットした。一晚培養した後、ベルベット布を用いて SG-his-ura-trp+X-gal 培地にレプリカし、30°C で培養してコロニーの色の変化を観察した。

## 2-13. Pog1 のリン酸化解析

各酵母株を SC-leu 培地を用い、30°C で一晚培養して定常期まで増殖させた。新しい SC-leu 培地に OD<sub>600</sub> が 0.1 になるように前培養液を添加して、本培養を行い、対数増殖期まで増殖させた。菌体は 3,000 rpm, 2 分間遠心分離して回収し、1,200  $\mu$ l の Lysis buffer (PBS, 1% Protease Inhibitor Cocktail (Sigma 社)) に懸濁後、マルチビーズショッカーを用いて破碎した 2,700 rpm, 30 秒オン,  $\rightarrow$ 30 秒オフを 7 サイクル, 0°C)。破碎後の抽出物を 15,000 rpm, 5 分間の遠心分離を 3 回行い、上清をライセートとした。ライセートに Protein G Sepharose G 4 Fast Flow (GE Healthcare 社) および抗 Pog1 抗体を添加して、4°C で 1 時間免疫沈降した。免疫沈降後、Lysis buffer で Protein G Sepharose G 4 Fast Flow を 3 回洗浄した。フォスファターゼ処理するサンプルは PMP バッファーに Protein G Sepharose G 4 Fast Flow 懸濁して、Lambda Protein Phosphatase ( $\lambda$  PPase, New England BioLabs 社) を 0.5  $\mu$ l 加えて 37°C で 30 分間反応させた。 $\lambda$  PPase 阻害には  $\lambda$  PPase 添加と同時に阻害剤混合液 (終濃度 10 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 50 mM NaF, 50 mM  $\alpha$ -glycerophosphate, 20 mM p-nitrophenylphosphate, 50 mM EDTA) を添加した。反応後、Lysis buffer で 3 回洗浄し、サンプルバッファー (0.5 M Tris-HCl [pH=6.8], 2% SDS, 10% glycerol, 0.5% 2-mercaptoethanol, 0.0125% BPB) を加えて溶出した。3,000 rpm, 2 分間遠心分離後の上清をサンプルとし、100°C, 2 分間熱処理を行った。サンプルは 35  $\mu$ M Phos-tag (NARD Institutes 社) および 35  $\mu$ M MnCl<sub>2</sub> を含む、あるいは含まない 12% の SDS ポリアクリルアミドゲルで電気泳動を行い、PVDF メンブレン (MerckMillipore 社) に転写した。PVDF メンブレンは Blocking buffer (TBS buffer, 0.1% Tween 20, 3% skim milk) で 1 時間室温においてブロッキングした。一次抗体は抗 Pog1 抗体、二次抗体には TrueBlot anti-rabbit IgG HRP を用いた。一次抗体は Can get signal solution 1 (東洋紡社) に 2,000 倍希釈して用いた。また、二次抗体は Can get signal solution 2 (東洋紡社) に 2,000 倍希釈して用いた。ECL plus Western blotting Detection System (GE Healthcare 社) を利用し、ルミノメーターで検出した。Phos-tag を含む SDS ポリアクリルアミドゲルは電気泳動後、5 mM EDTA を含む転写バッファーに 10 分間、2 回浸すことで Mn イオン

を除去後、ブロットティングを行った。

#### 2-14. 生育曲線

各酵母菌株を SC-leu 培地で一晚培養して定常期まで増殖させた。その後、30 ml の SC-leu 培地に OD<sub>600</sub> が 0.1 になるように前培養を添加し、300 ml フラスコを用いて培養した。2 時間おきに分光光度計を用いて OD<sub>600</sub> の値を測定した。塩化リチウム添加による培養は終濃度 200 mM の塩化リチウム含有 SC-leu 培地 (SC-leu+200 mM LiCl) を用いた。また、 $\alpha$ -factor (終濃度 2.5  $\mu$ M) を添加して細胞周期を G1 期に同調させた細胞の生育曲線測定も、同様の方法で行った。

#### 2-15. 高速液体クロマトグラフィー (LC-MS/MS) によるリン酸化部位の同定

各酵母菌株を SC-leu 培地で一晚培養して定常期まで増殖させた。その後、100 ml の SC-leu 培地に OD<sub>600</sub> が 0.1 になるように前培養を添加し、500 ml フラスコを用いて培養した。対数増殖期まで増殖させた細胞を回収した。合計 500 ml の培養スケールで細胞を準備した。細胞を 1,200  $\mu$ l Lysis buffer (PBS, 1% Protease Inhibitor Cocktail) に懸濁後、マルチビーズショッカーを用いて破碎した (2,700 rpm, 30 秒オン,  $\rightarrow$ 30 秒オフを 7 サイクル, 0°C)。破碎後の抽出物を 15,000 rpm, 5 分間の遠心分離を 3 回行い、上清をライセートとした。ライセートに Protein G Sepharose G 4 Fast Flow および抗 Pog1 抗体を添加して、4°C, 1 時間の免疫沈降を行った。免疫沈降後、Lysis buffer で洗浄し、Sample buffer を加えて溶出した。3,000 rpm 2 分間遠心分離して、上清をサンプルとし、100°C, 2 分間熱処理を行った。サンプルは 12% の SDS ポリアクリルアミドゲル (バイオクラフト社) で電気泳動を行い、SYPRO Ruby Protein gel stain (Perkin Elmer 社) を用いて染色し、ルミノメーターで検出した。染色されたバンドについては本学バイオサイエンス研究科の倉田理恵技術職員に解析を依頼した。

#### 2-16. 細胞周期の解析

各酵母菌株を SC-leu 培地で一晚培養して定常期まで増殖させた。その後、OD<sub>600</sub> が 0.1 になるように前培養を添加し、再度前培養を行った。対数増殖期まで細胞を増殖させて、OD<sub>600</sub> の値を測定し、30 ml の SC-leu 培地に OD<sub>600</sub> が 0.5 になるように前培養液を添加し、300 ml フラスコを用いて本培養を行った。以下の薬剤を培地に添加することで細胞周期を同調させた。 $\alpha$ -factor は終濃度 2.5

$\mu\text{M}$  となるように添加して 1.5 時間培養後に再び  $\alpha$ -factor を等量添加し、合計 3 時間培養して細胞周期を同調させた。hydroxyurea (ナカライテスク社) は終濃度  $10 \mu\text{M}$  となるように添加して 1.5 時間培養後に再び hydroxyurea を等量添加し、合計 3 時間培養して細胞周期を同調させた。nocodazole (和光純薬工業社) は終濃度  $33 \mu\text{M}$  となるように添加し、2 時間培養して細胞周期を同調させた。細胞周期を同調させた細胞は SC-leu 培地で 3 回洗浄後、50 ml の SC-leu 培地に再懸濁して培養を再開し、経時的にサンプルを回収した。回収したサンプルは 15,000 rpm 1 分間遠心分離後、上清を除いて 1 ml の 70% エタノールの懸濁し、1 時間氷中に置き細胞を固定した。3,000 rpm, 2 分間遠心後、上清を除いて、PI 染色溶液 (PBS, propidium iodide ( $20 \mu\text{g/ml}$ , ナカライテスク社), RNase ( $0.1 \text{ mg/ml}$ , QIAGEN 社)) を加えた 1 時間  $37^\circ\text{C}$  でインキュベートした。サンプルを 3,000 rpm 2 分間遠心後、上清を除いて、PBS で 3 回洗浄し、PBS に再懸濁して C6 accuri フローサイトメーター (BD Biosciences 社製) に供した。FL3-A パラメーターを用いて測定し、CFlow Plus 解析プログラムを用いて細胞周期の解析を行った。

## 2-17. 細胞周期依存的な Pog1 のリン酸化解析

各酵母菌株を SC-leu 培地で一晚培養して定常期まで増殖させた。その後、 $\text{OD}_{600}$  が 0.1 になるように前培養を添加し、再度前培養を行った。対数増殖期まで細胞を増殖させて、 $\text{OD}_{600}$  の値を測定し、30 ml の SC-leu 培地に  $\text{OD}_{600}$  が 0.5 になるように前培養液を添加し、300 ml フラスコを用いて本培養を行った。 $\alpha$ -factor を終濃度  $2.5 \mu\text{M}$  となるように添加して 1.5 時間培養後に再び  $\alpha$ -factor を添加し、合計 3 時間培養して細胞周期を同調させた。

細胞周期を同調させた細胞は SC-leu 培地で 3 回洗浄後、50 ml の SC-leu 培地に再懸濁して培養を再開し、経時的にサンプルを回収した。回収したサンプルは 3,000 rpm, 2 分間遠心分離後、上清を除いて 10%TCA に懸濁し、マルチビーズショッカーを用いて破碎した (2,700 rpm, 30 秒オン,  $\rightarrow$ 30 秒オフを 7 サイクル,  $0^\circ\text{C}$ )。破碎後のサンプルを 15,000 rpm, 10 分間遠心分離し、沈殿にサンプルバッファー (0.5 M Tris-HCl [ $\text{pH}=6.8$ ], 2 % SDS, 10 % glycerol, 0.5% 2-mercaptoethanol, 0.0125% BPB) を加えて懸濁した後、 $100^\circ\text{C}$ , 2 分間煮沸することで溶解した。溶解後のサンプルを 15,000 rpm 10 分間遠心分離し、上清をサンプルとした。タンパク質の濃度は Bio-Rad Protein Assay を用いて測定した。サンプルは 12% の SDS-ポリアクリルアミドゲルで電気泳動を行い、PVDF メンブレ

ン (MerckMillipore 社) に転写した。PVDF メンブレンは Blocking buffer (TBS buffer, 0.1% Tween 20, 3% skim milk) で 1 時間室温においてブロッキングを行った。一次抗体は抗 Pog1 抗体、二次抗体には TrueBlot anti-tabbit IgG HRP (RockLand 社) を必要に応じて使い分けて用いた。一次抗体は Can get signal solution 1 (東洋紡社) に 2,000 倍希釈して用いた。また、二次抗体は Can get signal solution 2 (東洋紡社) に 2,000 倍希釈して用いた。ECL plus Western blotting Detection System (GE Healthcare 社) を利用し、ルミノメーター (LAS-4000, 富士フィルム社) で検出した。

#### 2-18. 細胞周期依存的な *POG1* の転写量解析

各酵母菌株を SC-leu 培地で一晚培養して定常期まで増殖させた。その後、OD<sub>600</sub> が 0.1 になるように前培養を添加し、再度前培養を行った。対数増殖期まで細胞を増殖させて、OD<sub>600</sub> の値を測定し、30 ml の SC-leu 培地に OD<sub>600</sub> が 0.5 になるように前培養液を添加し、300 ml フラスコを用いて本培養を行った。 $\alpha$ -factor を終濃度 2.5  $\mu$ M となるように添加して 1.5 時間培養後に再び  $\alpha$ -factor を添加し、合計 3 時間培養して細胞周期を同調させた。細胞周期を同調させた細胞については、SC-leu 培地で 3 回洗浄後、50 ml の SC-leu 培地に再懸濁して培養を再開し、経時的に培養液を回収し、15,000 rpm, 1 分間遠心分離後、上清を除いて細胞を回収した。RNA の抽出およびリアルタイム PCR は「2-9. リアルタイム PCR」の方法に従って行った。

#### 2-19. その他

大腸菌からのプラスミド調製は、アルカリ SDS 法をベースにした QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN 社) を用いて行った。その他、大腸菌の形質転換、DNA の制限酵素による切断、連結などの遺伝子操作は「バイオマニュアルシリーズ①遺伝子工学の基礎技術」(羊土社) および「バイオ実験イラストレイテッド」(秀潤社) に、酵母の取り扱いや遺伝子操作は「バイオマニュアルシリーズ⑩酵母による遺伝子実験法」(羊土社) および「生物化学実験法 39 酵母分子遺伝子実験法」(学会出版センター) に従った。

### 3. 結果

#### 3-1. *RSP5* および *POG1* のストレス耐性との関連性

##### 3-1-1. 新たな *rsp5* 変異株の作製およびストレス耐性試験

これまでのストレス感受性評価、および多コピーサプレッサー遺伝子のスクリーニングに用いていた *rsp5* 変異株はエチルメタンサルホン酸 (EMS) 処理により取得した。そのため、*S. cerevisiae* のゲノム上のほかの部位に変異が入っている可能性があるため、多コピーサプレッサー遺伝子である *POG1* が *rsp5* 変異以外の変異点を相補する可能性が残されていた。そこで、*rsp5* 変異株の表現型が本当に *RSP5* の変異によるものかどうかを確認する目的で、BY4741 系統株の *RSP5* を相同組換えにより変異型遺伝子 (*rsp5*<sup>A401E</sup>) に置換した *rsp5* 変異株を新たに作製した。新たに作製した *rsp5* 変異株のストレス感受性を評価したところ、これまで用いていた *rsp5* 変異株と同様に、AZC、高温 (37°C)、塩化リチウム、ソルビトールなどに対して感受性を示すことを確認した (Fig. 4)。また、塩化カリウム、高濃度グルコースにも感受性を示した (Fig. 4)。これらの結果から、*RSP5* が酵母のストレス応答・耐性に関与することが改めて示された。

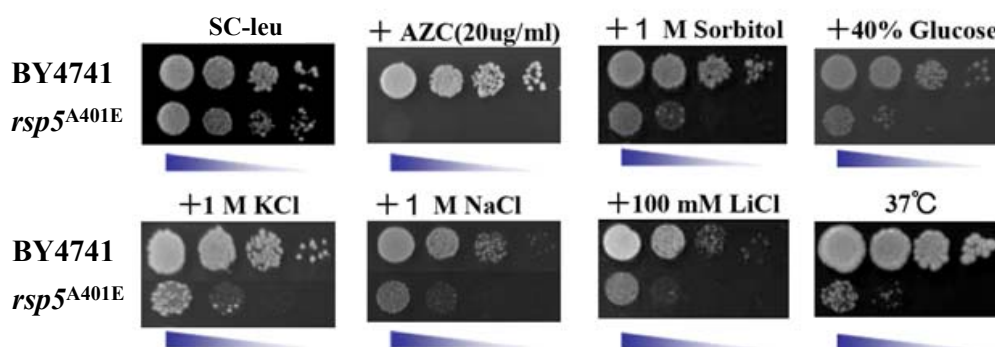


Fig. 4. 新たに作製した *rsp5* 変異株のストレス耐性試験

*S. cerevisiae* BY4741 株 (Wild type) の野生株および *rsp5* 変異株 (*rsp5*<sup>A401E</sup>) に pAD4 を導入した株を用いた。OD<sub>600</sub> を 1.0 に調整した細胞原液を用いて 10<sup>-1</sup> から 10<sup>-3</sup> までの希釈系列を作製し、3  $\mu$ l ずつ各培地にスポット後、25°C、3 日間培養した。



### 3-1-2. サプレッサー遺伝子 *POGI* のストレス耐性試験

次に、作製した *rsp5* 変異株を用いて多コピーサプレッサー遺伝子 *POGI* の導入によるストレス感受性の相補実験を行った。その結果、*POGI* を *rsp5* 変異株に過剰発現させることで、高温 (37°C)、塩化リチウム、塩化カリウム、ソルビトール、高濃度グルコースなどのストレス感受性を相補した (Fig. 5)。このことから、*POGI* は *RSP5* の変異 (*rsp5*<sup>A401E</sup>) によるストレス感受性に対する多コピーサプレッサー遺伝子として機能することが示された。また、野生株においても *POGI* を過剰発現させることで、塩化リチウム、塩化ナトリウムに対する耐性の向上が観察された (Fig. 5)。

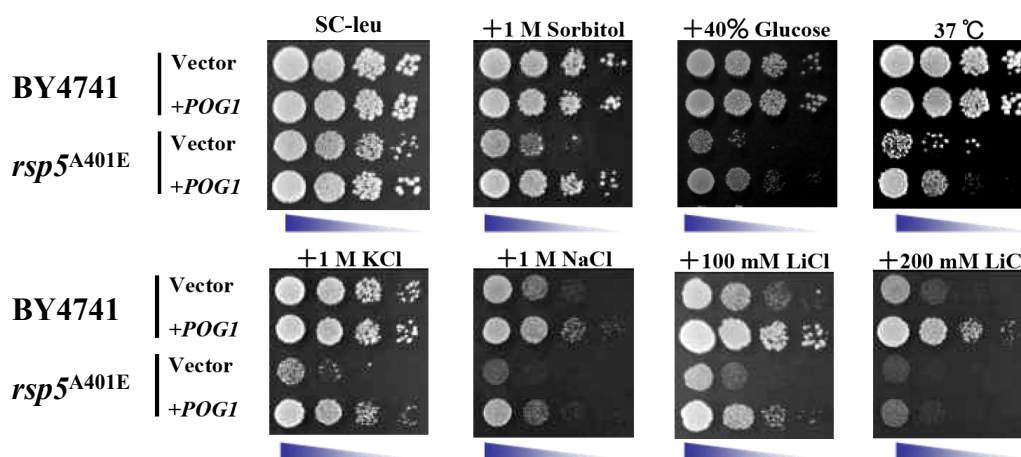


Fig. 5. *POGI* 過剰発現株のストレス耐性試験

*S. cerevisiae* BY4741 株 (Wild type) の野生株および *rsp5* 変異株 (*rsp5*<sup>A401E</sup>) に pAD4 (Vector) あるいは pAD4-*POGI* (+*POGI*) を導入した株を用いた。OD<sub>600</sub> を 1.0 に調整した細胞原液を用いて 10<sup>-1</sup> から 10<sup>-3</sup> までの希釈系列を作製し、3 μl ずつ各培地にスポット後、25°C、3 日間培養した。

### 3-1-3. *RSP5* と *POGI* の遺伝学的解析

*POGI* は *rsp5* 変異株の高温感受性を相補する多コピーサプレッサー遺伝子として当研究室で単離されているが、*POGI* を過剰発現させることで野生株においても塩化リチウム、塩化ナトリウムに対して耐性を示した (Fig. 5)。*POGI* 自身が酵母のストレス応答・耐性に関与している可能性を考え、*POGI* を破壊した株

(*pog1* 破壊株) を作製し、*rsp5* 変異株と同様に表現型を解析した (Fig. 6)。その結果、*pog1* 破壊株は野生株と比較して、高温、ソルビトール、塩化ナトリウム、高濃度グルコースに感受性を示した。塩化リチウムに関しては野生株と比較して生育に差は見られなかった。また、*rsp5* 変異株の *POG1* を破壊した二重変異株 (*rsp5* 変異 *pog1* 破壊株) を作製し、表現型を確認したところ、*rsp5* 変異株よりも高温、塩化カリウム、ソルビトールに感受性を示した (Fig. 6)。

各菌株のストレス耐性を解析した結果から、ストレス下における *RSP5* と *POG1* の関係について、1) 野生株に *POG1* を過剰発現させることで、塩化リチウムおよび塩化ナトリウムに対して耐性が向上すること、2) *pog1* 破壊株は様々なストレスに感受性を示すこと、3) *rsp5* 変異株の *POG1* を破壊した *rsp5* 変異 *pog1* 破壊株は *rsp5* 変異株よりもストレスに感受性を示すことが明らかとなった。

以上のことから、*RSP5* と *POG1* は共に酵母のストレス耐性に関与する遺伝子であるが、両遺伝子間に遺伝学的な相互作用はないものと考えられた。

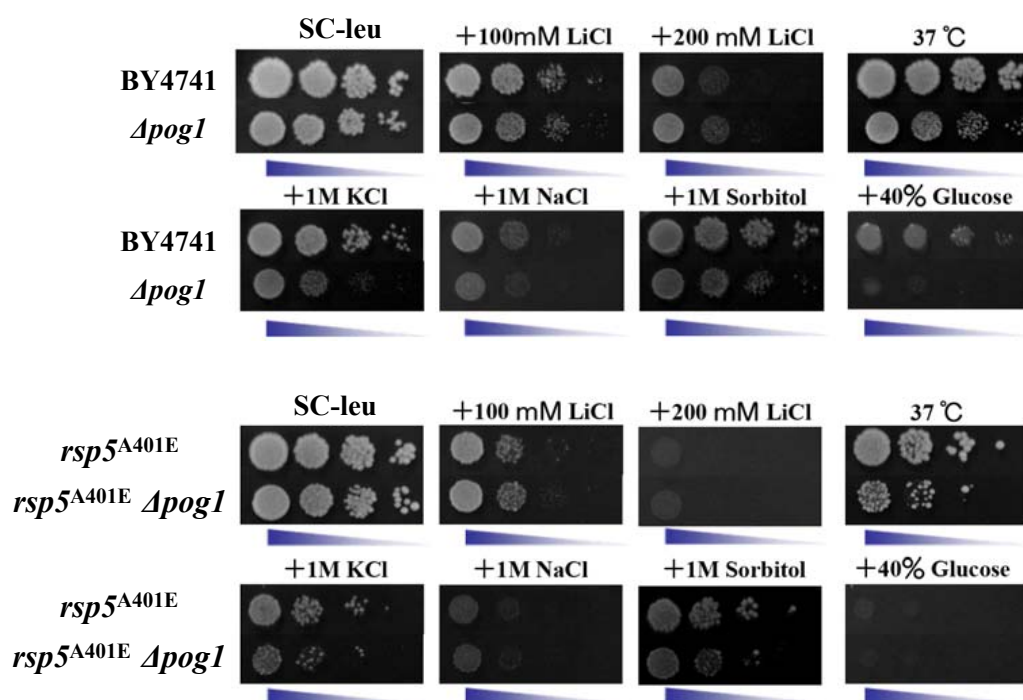


Fig. 6. *pog1* 破壊株および *rsp5* 変異 *pog1* 破壊株のストレス耐性試験

*S. cerevisiae* *rsp5* 変異株および *rsp5* 変異 *pog1* 破壊株に pAD4 を導入した株を用いた。OD<sub>600</sub> を 1.0 に調整した細胞原液を用いて 10<sup>-1</sup> から 10<sup>-3</sup> までの希釈系列を作製し、3 μl ずつ各培地にスポット後、25°C、3 日間培養した。

### 3-2. *POG1* の分子機能解析および過剰発現による表現型

#### 3-2-1. *POG1* (promoter of growth) について

*POG1* の過剰発現株が示す塩化リチウム耐性の表現型および *POG1* の分子機能解析を行うこととした。

*POG1* (promoter of growth) 遺伝子の機能としては、これまでに *POG1* を過剰発現させることで、接合因子  $\alpha$ -factor の添加による G1 アレストを阻害することが報告されている (18)。G1 アレスト阻害の原因として、G1 サイクリンである *CLN2* を転写することが示唆されたこと、また細胞周期の開始に関与する SCB 結合因子 (SCB-binding factor : SBF) によって転写されることから *POG1* は G1/S 期移行に関わる転写活性化因子であると推定されている (19)。興味深いことに、*POG1* がコードするタンパク質 (Pog1) の一次構造上 (351 アミノ酸残基) には既知のドメインやモチーフが保存されておらず、他の酵母である分裂酵母、原核生物から高等生物のゲノム上にオルソログ遺伝子が存在しないため、依然として機能が未知な遺伝子と考えられる。一次構造上の特徴としては N 末端側に酸性アミノ酸が多く、C 末端側に塩基性アミノ酸が多く存在する。

#### 3-2-2. *POG1* 過剰発現株における G1 アレスト阻害

*POG1* 過剰発現株は  $\alpha$ -factor による G1 アレストを阻害することが表現型として報告されている (18)。そこでまず、halo assay 法を用いて *POG1* の過剰発現が  $\alpha$ -factor 処理による G1 アレストに及ぼす影響を調べた (Fig. 7)。*POG1* の過剰発現には当研究室で構築した pAD4-*POG1* プラスミドを用いた。G1 アレスト阻害のポジティブコントロールとして、*MSG5* および *CLN1* を用いた。*Msg5* は  $\alpha$ -factor によるフェロモン応答 MAP キナーゼの下流に位置する Fus3 キナーゼを阻害することで G1 アレストを阻害する。また、*Cln1* は G1 サイクリンであり、 $\alpha$ -factor 存在下でも細胞周期を進行させることで、G1 アレストを阻害する。

*POG1* を過剰発現させた方法と同様に、pAD4 に各遺伝子を連結させた pAD4-*MSG5* プラスミドおよび pAD4-*CLN1* プラスミドを構築して用いた。*MSG5* および *CLN1* 過剰発現株は  $\alpha$ -factor による G1 アレストを阻害し、 $\alpha$ -factor 存在下でも生育することが確認できた。しかしながら、*POG1* 過剰発現株においては  $\alpha$ -factor 処理による G1 アレストが阻害されず、生育できないことが明らかとな

った (Fig. 7)。この結果は *POG1* の過剰発現による表現型として報告されている「G1 アレスト阻害」(18) とは一致しなかった。

また、フローサイトメーターを用いて  $\alpha$ -factor 処理によって細胞周期が阻害されるかどうか解析した (Fig. 8)。しかしながら、halo assay 法において G1 アレストが見られたのと同様に、 $\alpha$ -factor 処理によって *POG1* 過剰発現株は G1 期で同調していることが明らかとなった。

以上のことから、*POG1* 過剰発現株が  $\alpha$ -factor 処理後の G1 アレストを阻害するというこれまでの報告 (18) を本研究の範囲では確認できなかった。また、本研究で用いている *S. cerevisiae* BY4741 株においては  $\alpha$ -factor 処理によって G1 アレストが引き起こされることが明らかとなった。これまでの報告 (18) と本研究の結果が異なった原因としては、1) 用いた菌株の遺伝的背景が違っていること、2) *Pog1* 過剰量に違いがあることが可能性として考えられた。

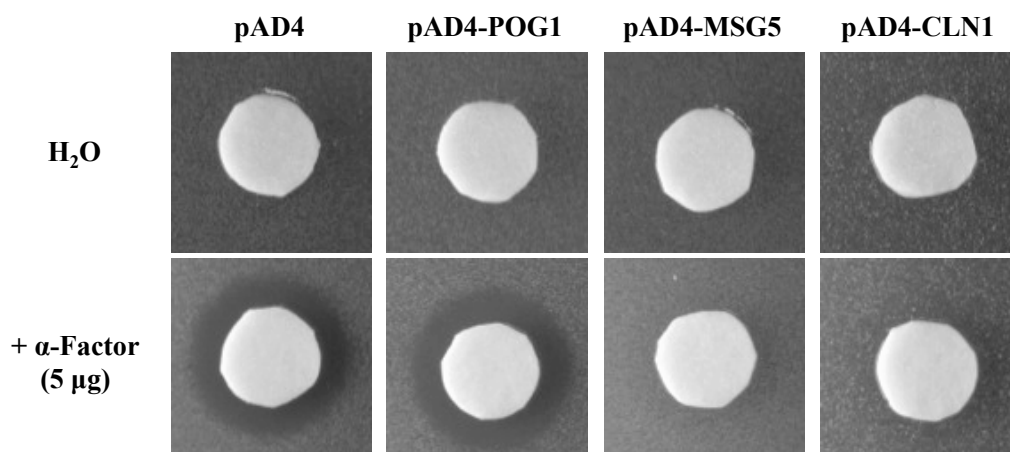


Fig. 7. halo assay 法を用いた  $\alpha$ -factor 添加による G1 アレスト解析

*S. cerevisiae* BY4741 株の野生株に pAD4、*POG1* を過剰発現する pAD4-POG1、*MSG5* を過剰発現する pAD4-MSG5、*CLN1* を過剰発現する pAD4-CLN1 をそれぞれ導入した形質転換体を用いた。各形質転換体を培地に塗布した後、5  $\mu$ g の  $\alpha$ -factor をしみ込ませたろ紙を培地上に置いて、25 $^{\circ}$ C、2日間培養した。滅菌水 (H<sub>2</sub>O) をコントロールとして用いた。

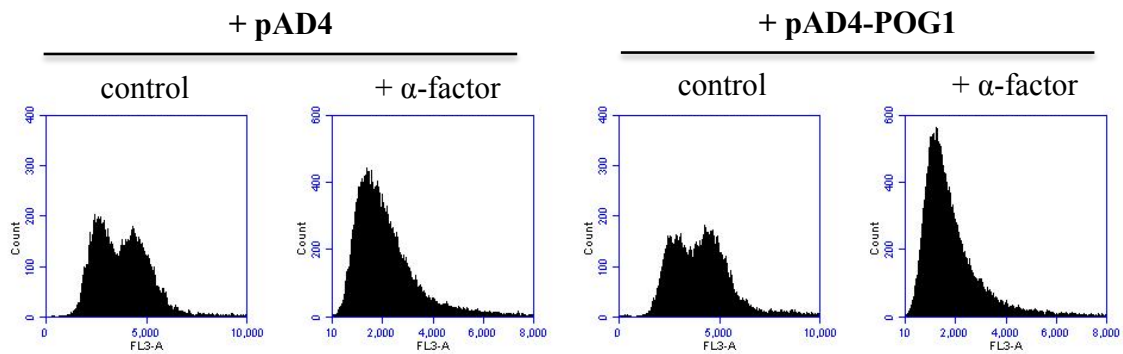


Fig. 8. フローサイトメーターを用いた $\alpha$ -factor 処理による G1 アレスト解析  
*S. cerevisiae* BY4741 株の野生株に pAD4 あるいは pAD4-POG1 をそれぞれ導入した形質転換体を用いた。 $\alpha$ -factor 非処理細胞 (control) および $\alpha$ -factor 処理細胞 (+ $\alpha$ -factor) をエタノール処理で固定し、propidium iodide (PI) 染色後、C6 accru フローサイトメーターを用いて細胞周期を解析した。

### 3-2-3. *POG1* 過剰発現株の生育曲線

本研究においては、*POG1* の過剰発現による G1 アレスト阻害の表現型を確認することができなかった (Figs. 7&8)。そこで次に、野生株と *POG1* 過剰発現株の生育速度を比較するため、生育曲線を作製した (Fig. 9)。その結果、*POG1* 過剰発現株は野生株と比較して、生育速度がやや低下している傾向が見られた。

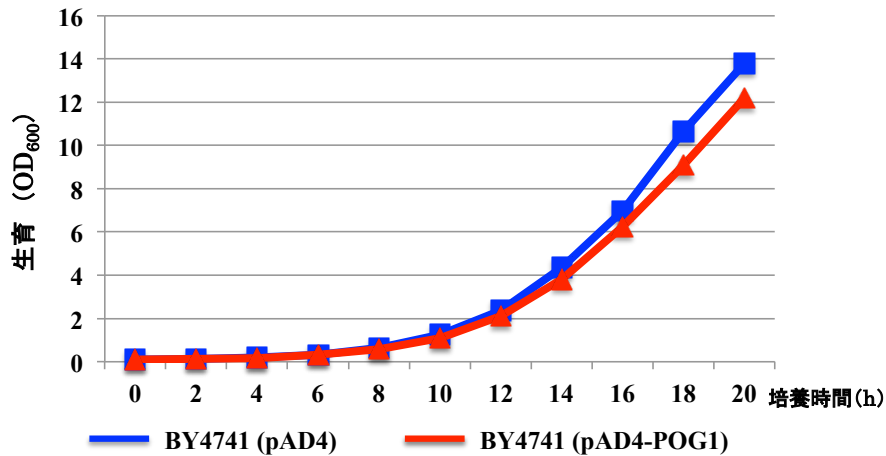


Fig. 9. *POG1* 過剰発現株の生育曲線

*S. cerevisiae* BY4741 株の野生株に pAD4 あるいは pAD4-*POG1* をそれぞれ導入した形質転換体を用いた。OD<sub>600</sub> を 0.1 に合わせて培養を開始し、2 時間おきに分光光度計を用いて OD<sub>600</sub> の値を測定した。

#### 3-2-4. G1 期同調後の細胞周期

*POG1* 過剰発現株では若干の生育遅延が見られた。そこで、細胞周期を詳細に解析するために、細胞周期を G1 期に同調させた後の細胞周期の進行を解析した (Fig. 10)。*S. cerevisiae* 野生株は培地および培養条件によって異なるが 90 分から 120 分で出芽を繰り返し、増殖する。そこで、細胞周期を G1 期に同調させ、細胞周期を 3 時間後まで解析した。その結果、野生株では 90 分後には G2 期のピークが現れるのに対して、*POG1* 過剰発現株では 90 分後においても G2 期のピークが検出されないことが明らかとなった。*pog1* 破壊株においては細胞周期に野生株と違いは見られません。

このことから、*POG1* の過剰発現によって G1 期からの細胞周期の移行が遅延していることが示唆された。

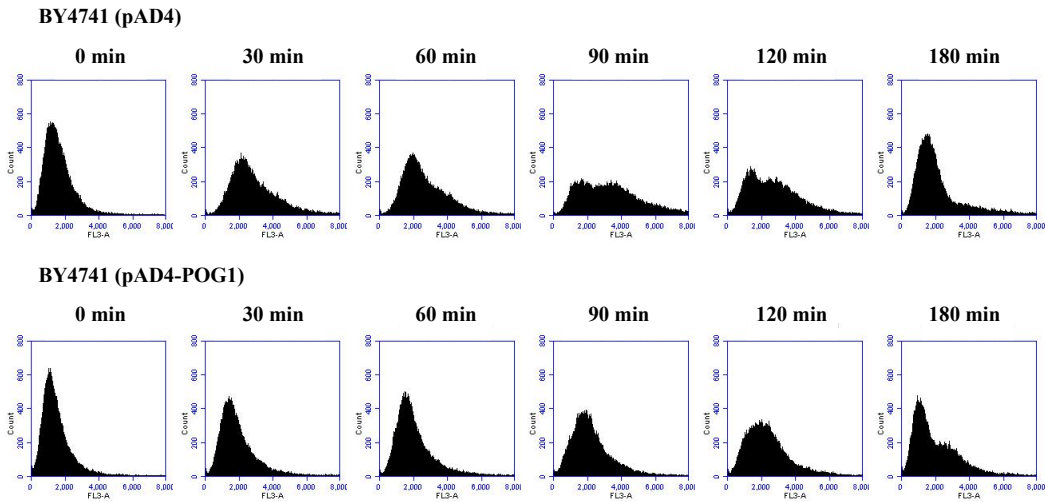


Fig. 10. G1 期同調後の細胞周期

*S. cerevisiae* BY4741 株の野生株に pAD4 あるいは pAD4-POG1 をそれぞれ導入した形質転換体を用いた。α-Factor 処理によって細胞周期を G1 期に同調後、培養を行い、経時時間毎に細胞を回収した。細胞はエタノール処理で固定し、Propidium iodide (PI) 染色を行った。C6 accuri フローサイトメーターを用いて解析した。

### 3-2-5. *POG1* 過剰発現株の表現型・形態異常

*POG1* 過剰発現株は野生株と比較して生育速度がやや低下すること (Fig. 9)、および G1 期同調後の細胞周期が遅延することが明らかとなった (Fig. 10)。そこで、細胞形態にも違いが見られるのではないかと考え、顕微鏡を用いて細胞形態を観察した (Fig. 11)。*S. cerevisiae* 野生株は通常、タマゴ型の丸い形をした細胞形態を示すが、*POG1* 過剰発現株は細胞が横に細長く伸びた形態を示すことが明らかとなった。また、ゲノム上の *POG1* プロモーターを *TDH3* のプロモーターに置換した株 ( $P_{POG1}::P_{TDH3}$ ) に pAD4-POG1 を導入した形質転換体 ( $P_{POG1}::P_{TDH3}$  (pAD4-POG1)) を作製し、細胞形態を確認した (Fig. 11)。 $P_{POG1}::P_{TDH3}$  (pAD4-POG1) 株はこれまで用いている *POG1* 過剰発現株 (BY4741 (pAD4-POG1)) よりも *POG1* を過剰発現していると考えられる。その結果、 $P_{POG1}::P_{TDH3}$  (pAD4-POG1) 株は BY4741 (pAD4-POG1) 株よりもさらに細胞形態が横に伸長し、母細胞から出芽した娘細胞が細胞質分裂できず、数珠状に伸



びた形態を示すことが明らかになった。また、 $P_{POG1}::P_{TDH3}$  (pAD4-POG1) 株は  $P_{POG1}::P_{TDH3}$  (pAD4) 株および BY4741 (pAD4-POG1) 株よりもさらに塩化リチウム耐性を示すことが明らかとなった (Fig. 12)。

以上のことから、*POG1* 過剰発現株は形態異常を示すことが明らかとなった。また、*POG1* 過剰発現株が示す表現型は *Pog1* の発現量に依存して表現型が強く現れることが示唆された。

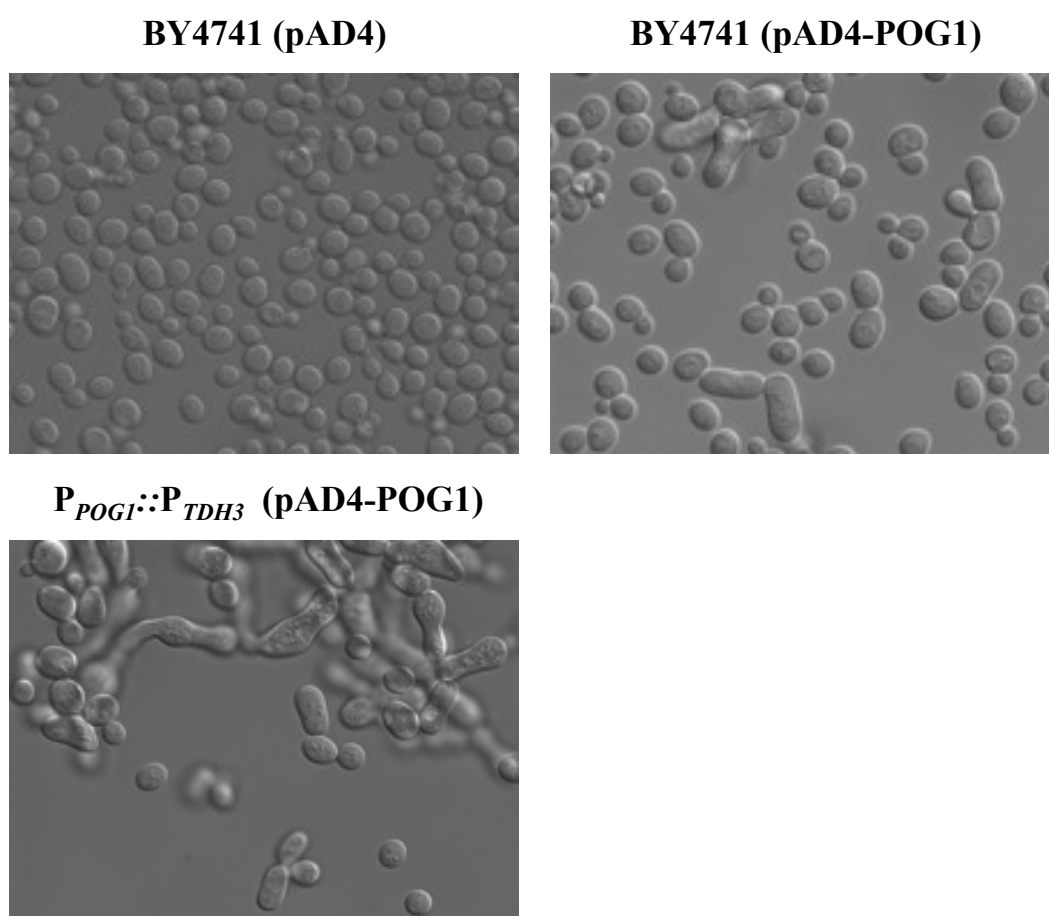


Fig. 11. *POG1* 過剰発現株の細胞形態

*S. cerevisiae* BY4741 株の野生株に pAD4 あるいは pAD4-POG1 をそれぞれ導入した形質転換体および  $P_{POG1}::P_{TDH3}$  株に pAD4-POG1 を導入した形質転換体を用いた。顕微鏡を用いて細胞形態を観察した。



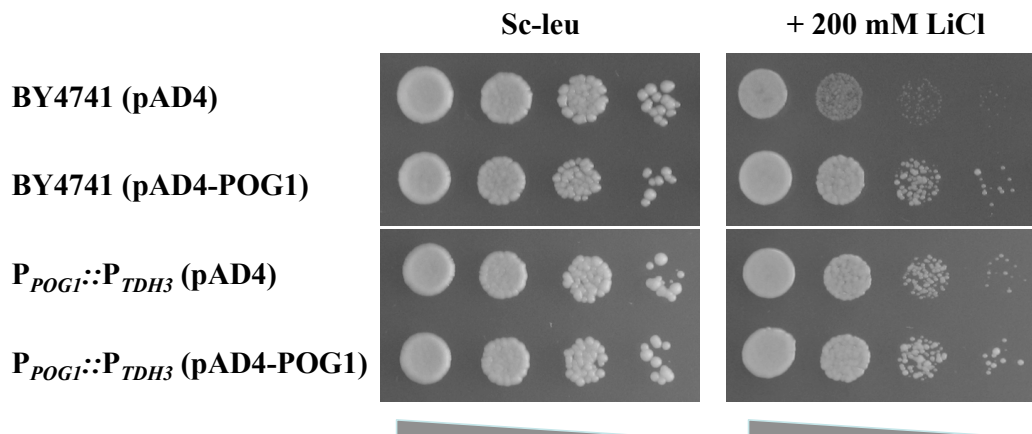


Fig. 12. *POG1* 過剰発現株のリチウム耐性試験

*S. cerevisiae* BY4741 株の野生株および  $P_{POG1}::P_{TDH3}$  株に pAD4 あるいは pAD4-*POG1* をそれぞれ導入した形質転換体を用いた。OD<sub>600</sub> を 1.0 に調整した細胞原液を用いて  $10^{-1}$  から  $10^{-3}$  までの希釈系列を作製し、3  $\mu$ l ずつ各培地にスポット後、25°C、3 日間培養した。

### 3-2-6. *POG1* 過剰発現株の表現型・高温感受性

これまでに *POG1* 過剰発現株が示す表現型として 1) 塩化リチウム耐性、2) 形態異常を見出した。他にも *POG1* の過剰発現による表現型を解析したところ、39°C の高温に対して感受性を示すことが明らかとなった (Fig. 13)。

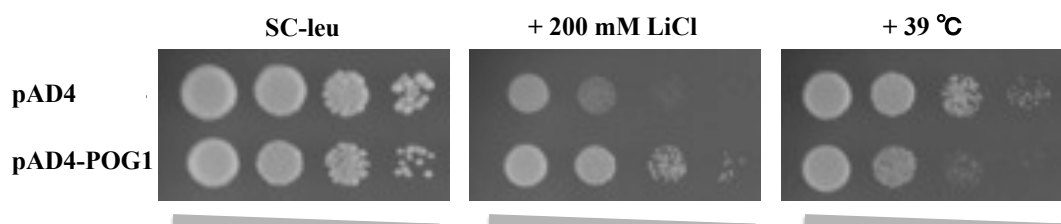


Fig. 13. *POG1* 過剰発現株の高温ストレス耐性試験

*S. cerevisiae* BY4741 株の野生株に pAD4 あるいは pAD4-*POG1* をそれぞれ導入した形質転換体を用いた。OD<sub>600</sub> を 1.0 に調整した細胞原液を用いて  $10^{-1}$  から  $10^{-3}$  までの希釈系列を作製し、3  $\mu$ l ずつ各培地にスポット後、25°C、3 日間培養した。

### 3-2-7. Pog1 の局在

Pog1 は転写活性化因子であると推定され、GFP を付加した Pog1-GFP 融合タンパク質は核に局在することが報告されている (18)。本研究においても、Pog1 タンパク質の細胞内局在を観察するため、蛍光タンパク質 yeGFP を Pog1 の C 末端側に付加し、Pog1-yeGFP 融合タンパク質を発現するプラスミド

(pAD4-POG1yeGFP) を構築した。野生株に pAD4-POG1yeGFP を導入した形質転換体を用いて、Pog1-yeGFP の局在を観察した (Fig. 14)。また、核の染色には 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) を用いた。その結果、DAPI 染色による蛍光と Pog1-yeGFP 融合タンパク質による蛍光が共局在することから、Pog1 は核に局在することが確認できた。

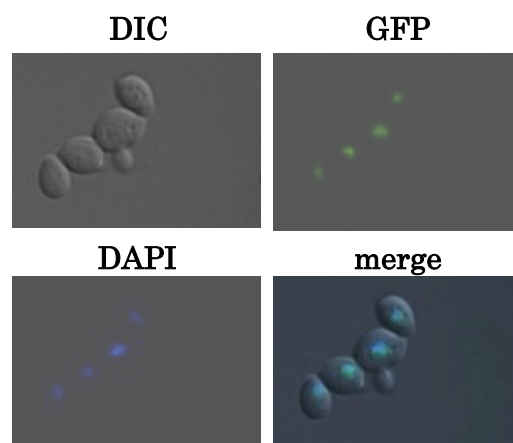


Fig. 14. Pog1-yeGFP の局在観察

*S. cerevisiae* BY4741 株の野生株に pAD4-POG1yeGFP を導入した形質転換体を用いた。蛍光顕微鏡を用いて Pog1-yeGFP 融合タンパク質の局在を観察した。核の染色には DAPI を用いた。

### 3-2-8. Truncated-Pog1 発現株の表現型および局在

Pog1 は既知のドメインやモチーフが保存されていないため、一次構造から機能を予測することができない。そこで、Pog1 の分子機能および過剰発現によって見られる表現型に必要な領域を同定するために、N 末端側から 50 アミノ酸残基ずつ欠失させた Truncated-Pog1 (Pog1 (51-351)、Pog1 (101-351)、Pog1 (151-351)、Pog1 (201-351)、Pog1 (251-351) および Pog1 (301-351)) を発現するプラスミ

ド (pAD4-POG1(51-351)、pAD4-POG1(101-351)、pAD4-POG1(151-351)、pAD4-POG1(201-351)、pAD4-POG1(251-351)および pAD4-POG1(301-351))を構築した。構築した各プラスミドを野生株に導入することで各 Truncated-Pog1 過剰発現株を作製し、スポットテストによって表現型を評価し、顕微鏡観察によって細胞形態を解析した (Fig. 15)。その結果、Pog1(51-351)および Pog1(101-351)を過剰発現した株は塩化リチウム耐性を示すが、N 末端から 101 アミノ酸残基以上欠失させた Truncated-Pog1 (Pog1(151-351)、Pog1(201-351)、Pog1(251-351) および Pog1(301-351)) を過剰発現した株は塩化リチウム耐性を示さないことが明らかとなった。また、Pog1(51-351)を過剰発現した株は形態異常および高温感受性を示すが、N 末端から 51 アミノ酸残基以上欠失させた Truncated-Pog1 (Pog1(51-351)、Pog1(151-351)、Pog1(201-351)、Pog1(251-351) および Pog1(301-351)) を過剰発現した株は形態異常および高温感受性を示さないことが明らかとなった。

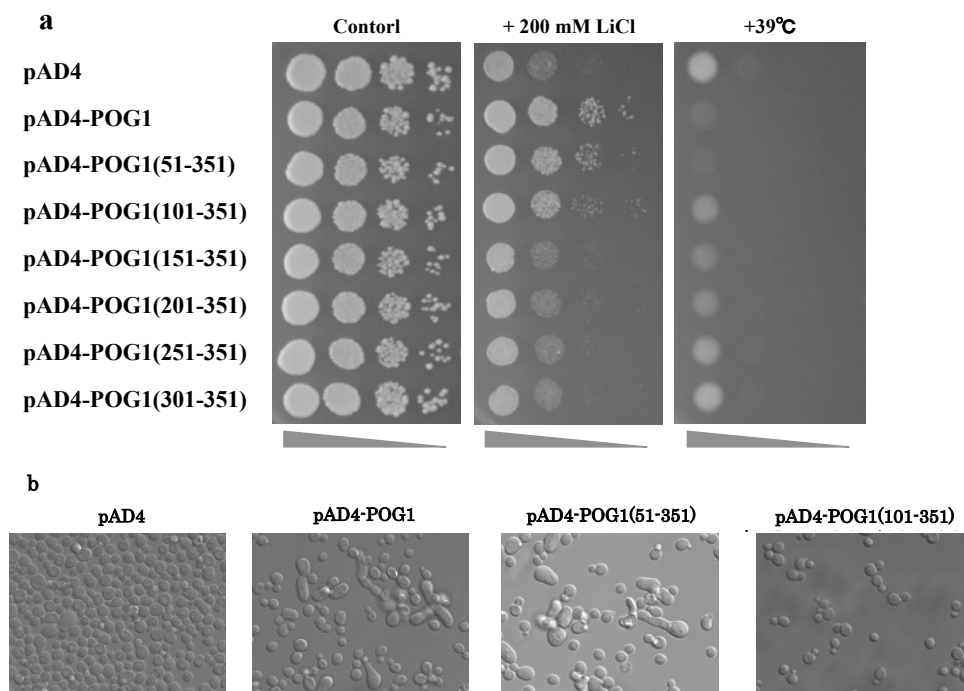


Fig. 15. Truncated-Pog1 過剰発現株の表現型

*S. cerevisiae* BY4741 株の野生株に pAD4、pAD4-POG1、pAD4-POG1(51-351)、pAD4-POG1(101-351)、pAD4-POG1(151-351)、pAD4-POG1(201-351)、pAD4-POG1(251-351) および pAD4-POG1(301-351) を導入した形質転換体を用いた。a) 各 Truncated-Pog1 発現プラスミドを導入した形質転換体を用いて、塩化リチウム耐性、高温 (39°C) 感受性をスポットテストで評価した。OD<sub>600</sub> を 1.0 に調整した細胞原液を用いて 10<sup>-1</sup> から 10<sup>-3</sup> までの希釈系列を作製し、3 μl ずつ各培地にスポット後、25°C、3 日間培養した。b) 顕微鏡を用いて各 Truncated-Pog1 発現プラスミドを導入した形質転換体の細胞形態を観察した。

Pog1-yeGFP 融合タンパク質の蛍光顕微鏡観察において Pog1 は核に局在することが明らかになった (Fig. 14)。また、1) 野生型 Pog1、Pog1 (51-351) および Pog1 (101-351) を過剰発現する株は塩化リチウム耐性を示すこと、2) 野生型 Pog1 および Pog1 (51-351) を過剰発現する株は高温感受性および形態異常を示すことが明らかとなり、欠失させた Pog1 のアミノ酸配列のサイズの違いによって表現型が違えることが示唆された (Fig. 15)。そこで、各 Truncated-Pog1-yeGFP 融合タンパク質の細胞内局在を解析するために、各 Truncated-Pog1-yeGFP 発現

プラスミド (pAD4-POG1-yeGFP、pAD4-POG1(51-351)-yeGFP、pAD4-POG1(101-351)-yeGFP および pAD4-POG1(151-351)-yeGFP) を構築した。構築したプラスミドを野生株に導入することで各 Truncated-Pog1-yeGFP 融合タンパク質過剰発現株を作製し、各 Truncated-Pog1-yeGFP タンパク質の局在観察を行った (Fig. 16)。その結果、Pog1-yeGFP 融合タンパク質と同様に Pog1(51-351)-yeGFP 融合タンパク質および Pog1(101-351)-yeGFP 融合タンパク質は核に局在するが Pog1(151-351)-yeGFP 融合タンパク質は細胞質に局在することが明らかとなった。

以上のことから Pog1 は核に局在することで表現型を示すことが示唆された。また、Pog1(51-351)yeGFP および Pog1(101-351) yeGFP は共に核に局在するが、表現型には違いが見られることが明らかとなった。さらに、Pog1 の 101-151 番目のアミノ酸配列に核に局在するために必要な配列が含まれていると考えられた。

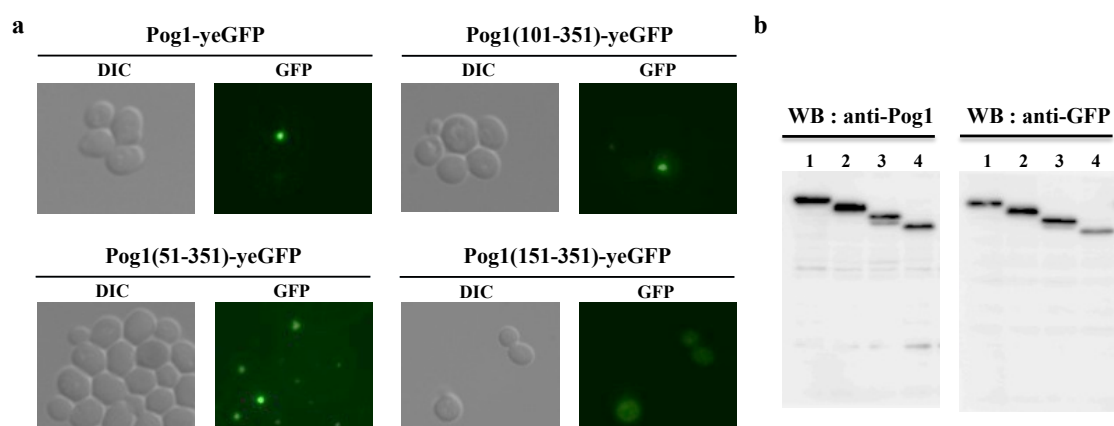


Fig. 16. Truncated-Pog1-yeGFP 融合タンパク質の局在観察および発現確認

*S. cerevisiae* BY4741 株の野生株に pAD4-POG1yeEGFP、pAD4-POG1(51-351)yeFGFP、pAD4-POG1(101-351)yeFGFP および pAD4-POG1(151-351)yeFGFP を導入した形質転換体を用いた。a) 蛍光顕微鏡を用いて各 Pog1-yeGFP 融合タンパク質の局在を観察した。b) 各形質転換体を用いて各 Pog1-yeGFP 融合タンパク質の発現をウェスタンブロッティングによって解析した。各サンプルは 1. Pog1yeGFP、2. Pog1(51-351)yeGFP、3. Pog1(101-351)yeGFP、4. Pog1(151-351)yeGFP である。一次抗体は抗 Pog1 抗体と抗 GFP 抗体を用いた。

以上のことから、*POGI* 過剰発現株が示す 1) 塩化リチウム耐性、2) 形態異常、3) 高温感受性の表現型は、異なるメカニズムに起因することが示唆された。また、*Pog1* タンパク質の 101-151 番目のアミノ酸配列に塩化リチウム耐性の表現型に必要な配列が含まれており、*Pog1* の 51-101 番目のアミノ酸配列に形態異常および高温感受性の表現型に必要な配列が含まれていることが示唆された。各 *POGI* の過剰発現が示す表現型および細胞内局在を Table 3 に示す。

Table 3. 各 *POGI* の過剰発現が示す表現型および細胞内局在のまとめ

	リチウム耐性	高温感受性	形態異常	核局在
<i>POGI</i>	○	○	○	○
<i>POGI(51-351)</i>	○	○	○	○
<i>POGI(101-351)</i>	○	×	×	○
<i>POGI(151-351)</i>	×	×	×	細胞質
<i>POGI(201-351)</i>	×	×	×	-
<i>POGI(251-351)</i>	×	×	×	-
<i>POGI(301-351)</i>	×	×	×	-

○：確認できる。×：確認できない。-：未確認。

### 3-3. *POGI* の過剰発現が示す塩化リチウム耐性機構の解析

#### 3-3-1. 細胞内リチウム含量の測定

*POGI* 過剰発現株が塩化リチウムに対して著しい耐性を示すことを明らかにしている (Fig. 5)。そこでまず、塩化リチウム耐性の表現型について解析することにした。リチウムイオンはカチオントランスポーターによって細胞内に取り込まれることが報告されている (23)。また、細胞内に過剰に蓄積したリチウムイオンは P-type ATPase sodium pump である *Ena* ファミリー遺伝子 (*ENA1*, *ENA2*, *ENA5*) によって排出されることが報告されている (23, 24)。*POGI* 過剰発現株が示す塩化リチウム耐性機構として、細胞外へのリチウムイオンの排出を亢進する可能性が考えられた。そこで、野生株、*POGI* 過剰発現株および *Ena* ファミリー遺伝子破壊株 ( $\Delta ena$ ) を用いて、塩化リチウム培地で 6 時間培養後の細胞

内リチウム含量を測定した (Fig. 17)。リチウムの定量にはマイクロ波導入プラズマ質量分析装置 (MIP-MS) を用いた。解析結果は、測定したリチウム量をサンプル容量および細胞濁度で割ることで比較した。その結果、野生株と *POG1* 過剰発現株の細胞内リチウム含量に有意な差は見られなかった。一方、 $\Delta ena$  株においてはリチウムが細胞内に蓄積していることが明らかとなった。このことは、*Ena* ファミリー遺伝子が細胞内に流入したリチウムイオンの排出に重要であるということを確認することができたと考えられる。

以上のことから、*POG1* 過剰発現株が示すリチウム耐性は細胞内に流入したリチウムイオンを細胞外に排出するためではないことが明らかになった。

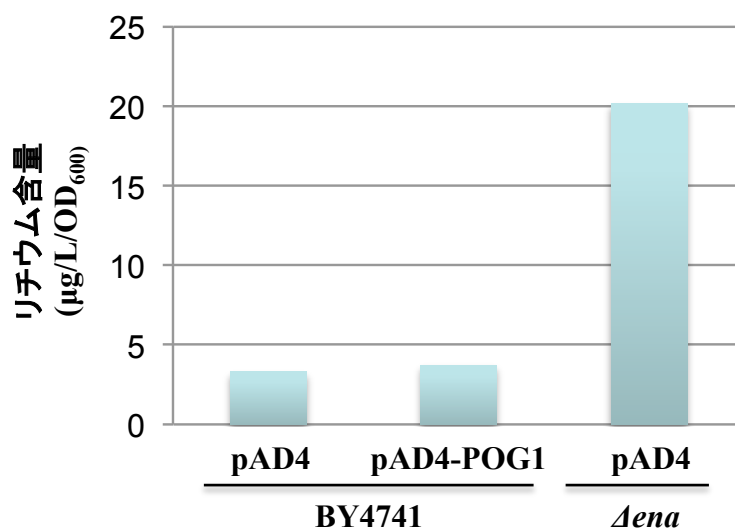


Fig. 17. 酵母の細胞内リチウム含量

*S. cerevisiae* BY4741 株の野生株に pAD4 あるいは pAD4-*POG1* を導入した形質転換体、および  $\Delta ena$  株に pAD4 を導入した形質転換体を用いた。塩化リチウム含有培地で 6 時間培養した細胞の細胞内リチウム含量を MIP-MS を用いて測定した。

### 3-3-2. 塩化リチウム存在下における生育曲線

次に、野生株と *POG1* 過剰発現株の塩化リチウム含有培地における生育を比較するために、生育曲線を作製した (Fig.18)。しかしながら、両株とも塩化リ

チウムによって生育は抑制されるが、同濃度の塩化リチウムを含む寒天培地において見られる顕著な生育の違いは見られなかった。

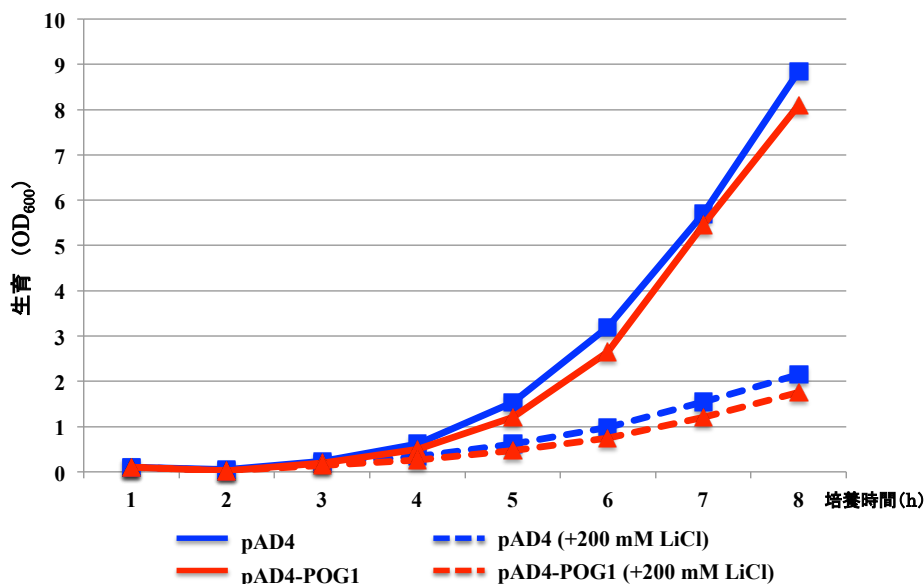


Fig. 18. 塩化リチウムの添加が生育に及ぼす影響

*S. cerevisiae* BY4741 株の野生株に pAD4 あるいは pAD4-POG1 を導入した形質転換体を用いた。塩化リチウム非添加の培地での生育曲線（直線）、および終濃度 200 mM の塩化リチウム含有培地での生育曲線（点線）を示す。

### 3-3-3. 塩化リチウム存在下における G1 期同調後の生育

野生株と *POG1* 過剰発現株は共に塩化リチウム添加培地において生育が抑制されることが明らかとなった (Fig. 18)。塩化リチウムによる生育抑制を詳細に解析するために、 $\alpha$ -factor 処理によって細胞周期を G1 期に同調させた細胞を用いて、塩化リチウム含有培地における生育曲線を作製した (Fig. 19)。細胞周期を G1 期に同調させた細胞においても、塩化リチウムによる生育抑制が確認できた (Fig. 19 点線の比較)。また、*POG1* 過剰発現株は G1 期同調後の細胞周期遅延することを明らかにしているが (Fig. 10)、G1 期の同調させた細胞の生育曲線において、*POG1* 過剰発現株は野生株と比較して遅延していることを確認することができた (Fig. 19 実線の比較)。しかしながら、G1 期の同調させた細胞の生育曲線を用いて、塩化リチウム非添加培地における生育速度を 100 とし、塩化リ



チウム添加培地における生育の割合を示したところ、*POG1* 過剰発現株は野生株と比較して塩化リチウムによる生育抑制が軽減していることが明らかとなった (Fig. 20)。

以上のことから、*POG1* 過剰発現株も野生株と同様に塩化リチウムによる生育の遅延が見られるが、塩化リチウムによる生育抑制を緩和することでリチウム耐性となることが示唆された。

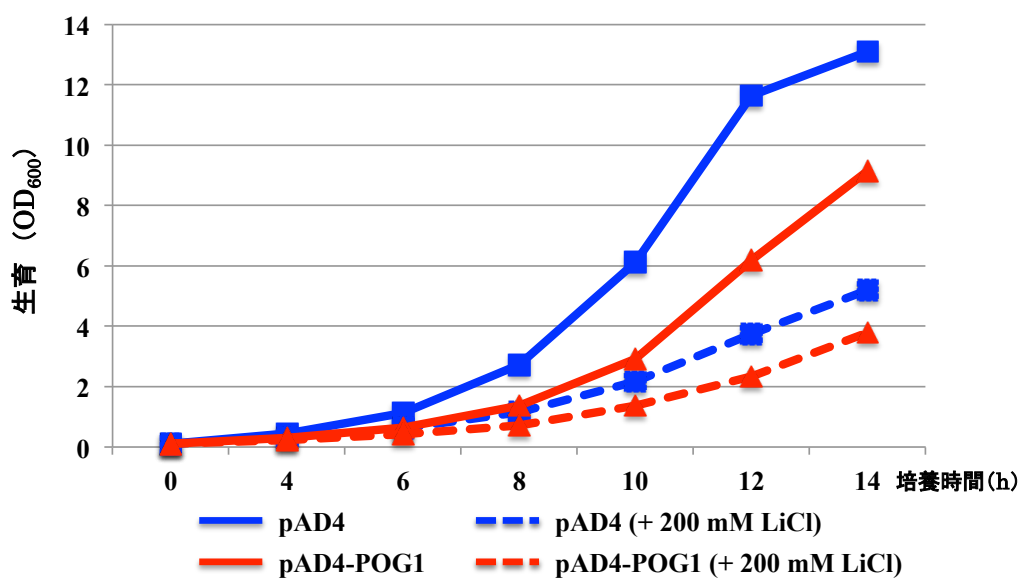


Fig. 19. G1 期同調後の生育曲線

*S. cerevisiae* BY4741 株の野生株に pAD4 あるいは pAD4-POG1 をそれぞれ導入した形質転換体を用いた。塩化リチウム非添加の培地での生育曲線 (実線) および、終濃度 200 mM の塩化リチウム培地での生育曲線 (点線) を示す。30°C で培養した。

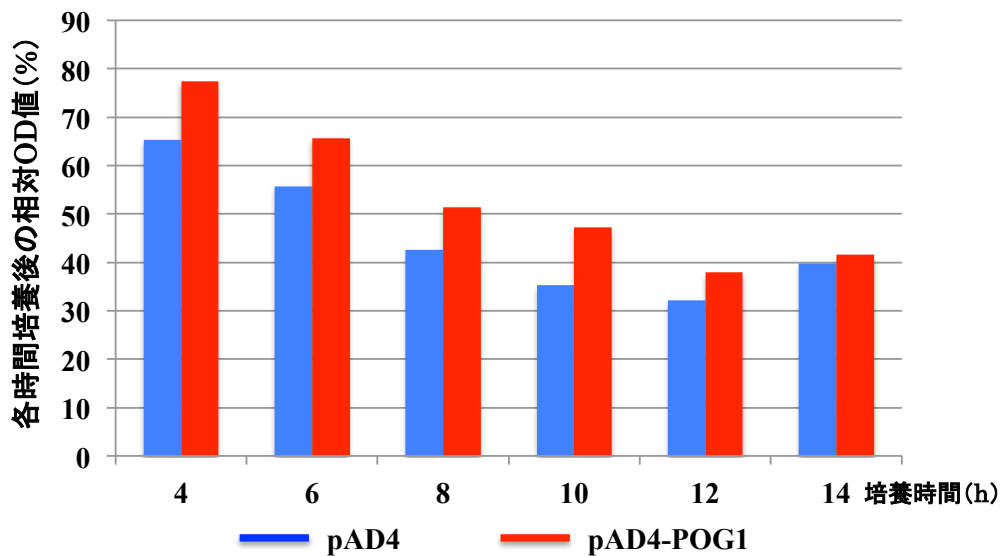


Fig. 20. 塩化リチウムによる生育抑制

Fig. 19 の生育曲線を用いた塩化リチウムによる生育抑制の解析。塩化リチウム非添加培地における生育を 100 とし、塩化リチウム添加培地における生育の相対値を示す。

### 3-4. Pog1 と相互作用するタンパク質の同定と相互作用の解析

#### 3-4-1. 酵母ツーハイブリッドによる Pog1 と相互作用するタンパク質の探索

Pog1-yeGFP 融合タンパク質の局在や Truncated-Pog1 過剰発現株の表現型の解析から、Pog1 は核に局在し機能すること、また N 末端側が Pog1 の機能に重要であることが示唆された (Figs. 15&16)。しかしながら、依然として POG1 の過剰発現株が示す各表現型を示す POG1 の機能は不明である。そのため、Pog1 の機能を解析する手法の一つとして、酵母ツーハイブリッドスクリーニングによって Pog1 タンパク質と相互作用するタンパク質の同定を行った。まず、酵母ツーハイブリッドスクリーニングの bait プラスミドである pGilda に POG1 を挿入した pGilda-POG1 を構築した。構築した pGilda-POG1、pJG4-5-cDNA (cDNA ライブラリープラスミド) およびレポーター遺伝子を持つ pSH18-34 プラスミドをスクリーニング用酵母株 ( $\Delta trp1$ ) に形質転換して、形質転換体を取得した。得られた形質転換体を SG-his-ura-trp+X-gal 培地で生育させ、青色のコロニーを選択することで約 100 株の相互作用候補株を取得した。一次スクリーニングにおいて選択した株を再度、SG-his-ura-trp+X-gal 培地にストリークを行い、コロニーの

色を比較することによって相互作用を再確認し、68 株を Pog1 相互作用タンパク質の候補株として分離した。次に、各候補株から pJG4-5-cDNA プラスミドを抽出し、cDNA の塩基配列を決定することで Pog1 タンパク質と相互作用するタンパク質をコードする遺伝子を同定した。塩基配列が確認された 67 株のうち、24 株が RING 型ユビキチンリガーゼをコードする *DMA2* であった (Table 4)。また、*AGP1* と *ERP3* を 2 株ずつ取得し、残りの候補株はそれぞれ異なる遺伝子を含んでいた。取得した候補株において高い頻度で *DMA2* が存在し (同定した遺伝子の約 34 パーセント)、また、*DMA2* のホモログ遺伝子である *DMA1* も 1 株取得したことから、*Dma2* が Pog1 の相互作用タンパク質である可能性が示された。そこで、抽出した pJG4-5-*DMA2* および pGilda-*POG1* を  $\Delta trp1$  株に導入し、得られた形質転換体を用いて再度相互作用を解析したところ、Pog1 と *Dma2* の相互作用が確認できた (Fig. 21)。

以上のことから、Pog1 と相互作用するタンパク質の有力な候補として *Dma2* に着目し、解析を行うことにした。*DMA2* の機能としては、セプチンの制御、スピンドルの局在制御など細胞周期のチェックポイントに関与していると報告されている (25~29)。

Table 4. Pog1 と相互作用する候補タンパク質をコードする遺伝子リスト

24 samples	<i>DMA2</i>
2 samples	<i>AGP1, ERP3</i>
1 sample	<i>TOS8, RPL2A, DPB11, MIR1, UBX5, PRY2, DMA1, CRG1, BBC1, SWS2, SPH1, MDM32, IOC2, DUS1, PET122, AGA2, YJU2, DAPI, POT1, MSA1, CBP3, ERG28, RPL15B, YDL062W, YGL165C, YLR184W, YCR085W, YDR535C, YOL047C, YBR012C, YBR116C, YKR012C, YNL195C, YLR311C, YLR294C.</i>

酵母ツーハイブリッドスクリーニングにおいて取得した Pog1 タンパク質の相互作用候補株から pJG4-5-cDNA 抽出し、cDNA の塩基配列を決定することで相互作用タンパク質をコードする遺伝子を同定した。

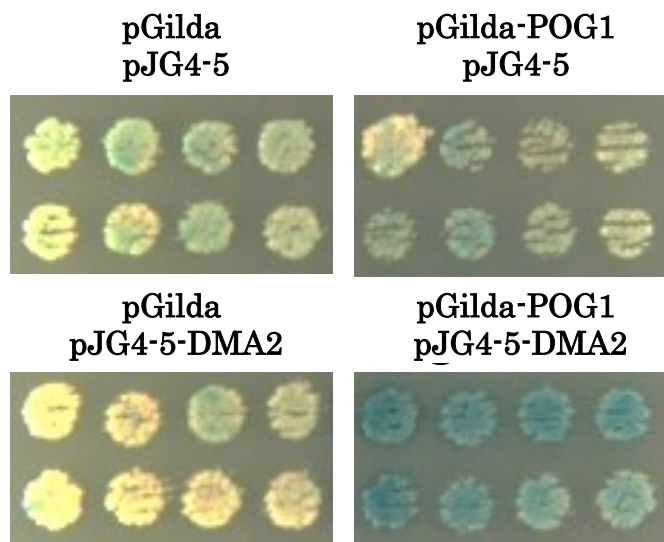


Fig. 21. Pog1 と Dma2 の相互作用

酵母ツーハイブリッドスクリーニングによって取得した pJG4-5-DMA2、pGilda-POG1 および pSH18-34 プラスミドをそれぞれの組み合わせで *trp1* 破壊株導入した形質転換体を用いて Pog1 と Dma2 の相互作用を解析した。形質転換体は 8 株ずつ用いた。

### 3-4-2. Pog1 と Dma2 の相互作用解析

Dma2 タンパク質を Pog1 タンパク質の相互作用タンパク質として取得した。そこで、酵母ツーハイブリッド法を用いて両タンパク質の詳細な相互作用の解析を行った。Pog1 は一次構造上の配列に既知のドメインおよびモチーフが存在しないが、Dma2 の一次構造上の配列には中央部に基質結合ドメインである Forkhead-associated (FHA) ドメイン、および C 末端側にユビキチンリガーゼ活性を示す Really Interesting New Gene (RING) ドメインが存在している (Fig. 22)。

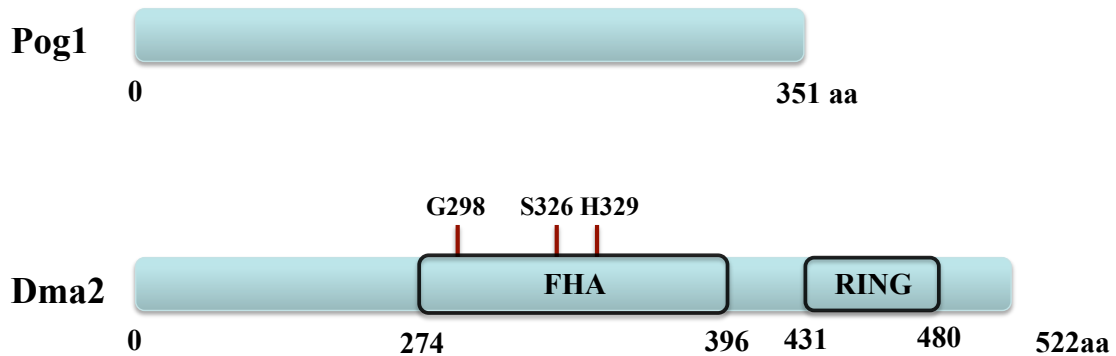


Fig. 22. Pog1 および Dma2 の一次構造

Pog1 の一次構造配列には既知のドメインおよびモチーフが存在しない。全長は 351 アミノ酸残基からなる。Dma2 の一次構造配列には、中央部分に Forkhead-associated (FHA) ドメイン (274-396 アミノ酸配列)、C 末端側に Really Interesting New Gene (RING) ドメイン (431-480 アミノ酸配列) が存在する。FHA ドメインは 298 番目のグリシン、326 番目のセリンおよび 329 番目のヒスチジンが基質との相互作用に重要であることが報告されている(30)。全長は 522 アミノ酸残基からなる。

そこでまず、N 末端から 50 残基ずつ欠失させた各 Truncated-Pog1 発現プラスミド (pGilda-POG1(51-351)、pGilda-POG1(101-351)、pGilda-POG1(151-351)、pGilda-POG1(201-351)、pGilda-POG1(251-351)および pGilda-POG1(301-351)) を構築し、Dma2 との相互作用を解析した (Fig. 23a)。その結果、Pog1 の N 末端から 201 残基以上欠失させると相互作用しなくなることから、Pog1 の C 末端側 (201-351 番目のアミノ酸配列) と Dma2 が相互作用することが明らかとなった。次に、FHA ドメインあるいは RING ドメインを除いた Truncated-Dma2 発現プラスミド (pJG45-DMA2(-FHA) および pJG45-DMA2(-RING)) を構築して、Pog1 との相互作用を解析した (Fig. 23b)。その結果、FHA ドメインを削った Truncated-Dma2(-FHA) と相互作用が見られなくなり、RING ドメインを除いた Truncated-Dma2(FHA) と相互作用することから、Pog1 は RING ドメインを除いた領域と相互作用することが明らかとなった。

以上のことから、Pog1 の C 末端側 (201-351 番目のアミノ酸配列) のアミノ酸配列と Dma2 の RING ドメイン以外のアミノ酸配列が相互作用することが示唆

された。次に、Pog1 タンパク質が Dma2 タンパク質の FHA ドメインと相互作用するのか解析を行うことにした。FHA ドメインはアミノ酸置換によって基質タンパク質との相互作用を消失させることができると報告されている (30)。そこで、基質タンパク質との相互作用を消失させた変異型 Dma2 (*dma2*<sup>G298E/S326A/H329L</sup>) を発現する pJG4-5-DMA2<sup>G298E/S326A/H329L</sup> プラスミドを構築し、Pog1 タンパク質との相互作用を解析した (Fig.21b)。その結果、Pog1 と *dma2*<sup>G298E/S326A/H329L</sup> は相互作用しないことが明らかとなった。

以上のことから、Pog1 タンパク質は Dma2 タンパク質の FHA ドメインと相互作用することを示唆された (Fig. 23c)。

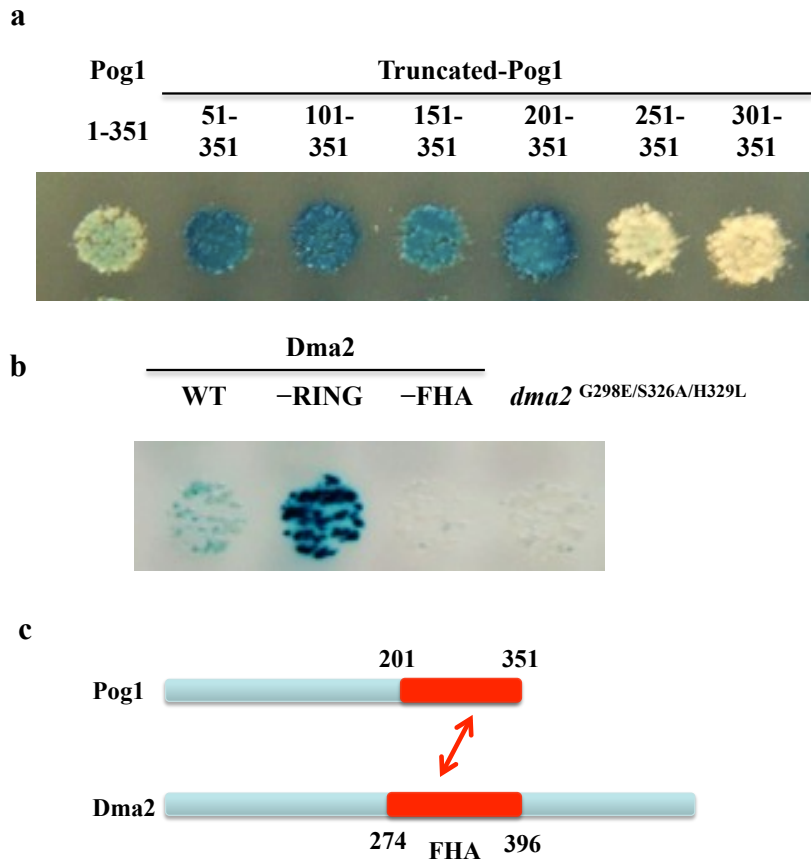


Fig. 23. Truncated-Pog1 と Truncated-Dma2 の相互作用の解析

a) Truncated-Pog1 と Dma2 との相互作用解析。各 Truncated-Pog1 発現プラスミド (pGilda-POG1(51-351)、pGilda-POG1(101-351)、pGilda-POG1(151-351)、pGilda-POG1(201-351)、pGilda-POG1(251-351) および pGilda-POG1(301-351)) を構築して、Dma2 との相互作用の解析を行った。b) Pog1 と変異 Dma2 との相互作用解析。FHA ドメインあるいは RING ドメインを除いた Truncated-Dma2 発現プラスミド (pJG45-DMA2(-FHA) および pJG45-DMA2(-RING)) を構築して、Pog1 との相互作用の解析を行った。また、FHA ドメインの基質結合能を消失させるアミノ酸置換を導入した変異型 Dma2(*dma2*<sup>G298E/S326A/H329L</sup>) 発現プラスミドを pJG45-DMA2<sup>G298E/S326A/H329L</sup> 構築し、Pog1 との相互作用を解析した。c) Pog1 と Dma2 との相互作用のまとめ。Pog1 の 201 番目から 351 番目のアミノ酸配列と Dma2 の FHA ドメインが相互作用することが示された。

### 3-4-3. Pog1 のリン酸化解析

Pog1 の C 末端側 (201-351 番目のアミノ酸配列) と Dma2 の FHA ドメインが相互作用することが明らかとなった (Fig. 23)。FHA ドメインは基質タンパク質と結合する領域であるが、特に基質タンパク質内のリン酸化型スレオニン残基に結合することが報告されているため(17)、Pog1 がリン酸化されている可能性を解析した (Fig. 24)。リン酸化の解析には、タンパク質の電気泳動においてリン酸化タンパク質と非リン酸化タンパク質を移動度の違いから分離できる Phos-tag 分子を含んだ 12%の SDS-ポリアクリルアミドゲルを用いた。POG1 過剰発現株から調製した細胞抽出物を用いて、抗 Pog1 抗体で免疫沈降を行い、回収した Pog1 タンパク質を電気泳動後、ウエスタンブロッティングを用いて Pog1 タンパク質を検出した。その結果、2本のバンドを検出することができた。移動度がシフトしたバンドがリン酸化によるものか解析するために、ホスファターゼ ( $\lambda$  PPase) 処理を行ったところ、上段のバンドは検出されなかった。また、 $\lambda$  PPase 処理と共に  $\lambda$  PPase 阻害剤を添加することで、移動度がシフトしたバンドが検出されることが明らかになった (Fig. 24a)。

以上のことから、Pog1 タンパク質はリン酸化修飾を受けていることが示された。また、Phos-tag 分子を含まない SDS-ポリアクリルアミドゲルにおいてもリン酸化によるバンドシフトが検出されることが明らかとなった (Fig. 24b)。



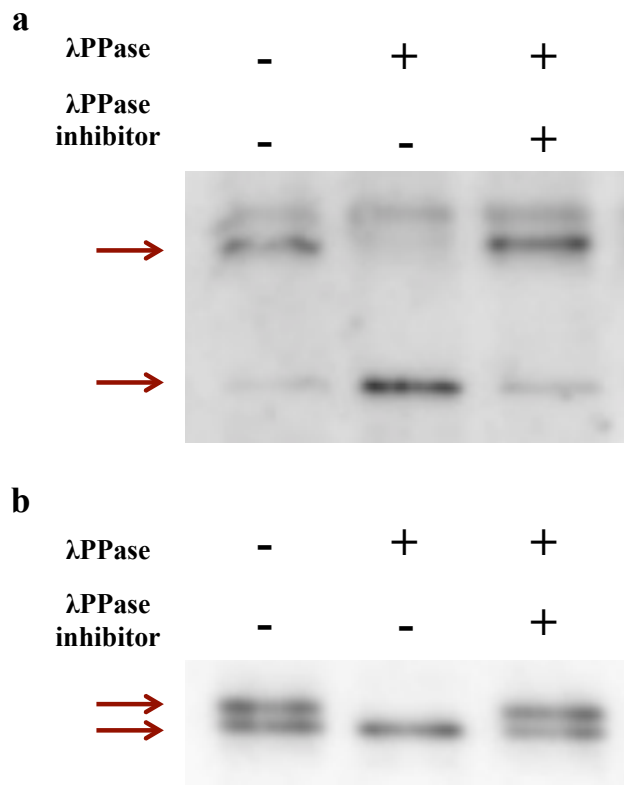


Fig. 24. Pog1 のリン酸化解析

a) Phos-tag (35  $\mu$ M) を含んだ SDS-ポリアクリルアミドゲル、b) SDS-ポリアクリルアミドゲルにおいて Pog1 のリン酸化を解析した。いずれも  $\lambda$ PPase 処理、および  $\lambda$ PPase+ $\lambda$ PPase inhibitor 処理を行った。一次抗体には抗 Pog1 抗体を用いた。

#### 3-4-4. アラニン置換型 Pog1 変異体と Dma2 との相互作用

これまでに、Pog1 の 201-351 番目のアミノ酸配列と Dma2 の FHA ドメインが相互作用することが示唆された (Fig. 23)。また、Phos-tag を含有した SDS-ポリアクリルアミドゲルを用いた解析から、Pog1 タンパク質はリン酸化されることが明らかとなった (Fig. 24)。次に、FHA ドメインはリン酸化型スレオニン残基と相互作用することから、Pog1 の 201-351 番目のアミノ酸配列に含まれる 5 個のスレオニン残基をそれぞれアラニンに置換したアラニン置換 Pog1 発現用プラスミド (pGilda-POG1<sup>T202A</sup>、pGilda-POG1<sup>T244A</sup>、pGilda-POG1<sup>T253A</sup>、pGilda-POG1<sup>T344A</sup> および pGilda-POG1<sup>T351A</sup>) を構築し、Dma2 との相互作用を解析した (Fig. 25)。その結果、T202A 変異体、T244A 変異体、T344A 変異体およ

び T351A 変異体は Dma2 と相互作用するが、T253A 変異体は Dma2 と相互作用しないことが明らかとなった。また、253 番目のスレオニン(Thr253)のリン酸化状態をミミックするグルタミン酸に置換した T253D 変異体発現プラスミド (pGilda-POG1<sup>T253D</sup>) を構築し、Dma2 との相互作用を解析したが、相互作用は見られなかった。

以上のことから、Pog1 の Thr253 が Dma2 の FHA ドメインとの相互作用に必要であることが示唆された。また、T253D 変異体が FHA ドメインと相互作用しないことから Pog1 の Thr253 がリン酸化されることが、Dma2 との相互作用に必要であることが示唆された。

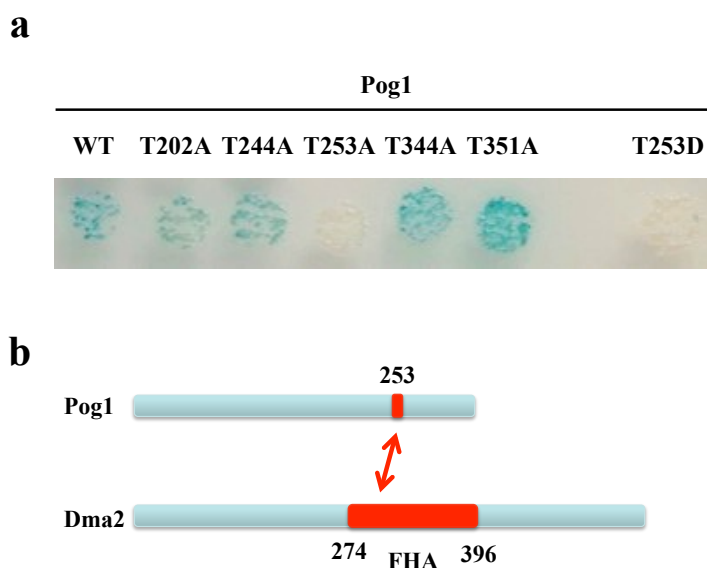


Fig. 25. アラニン置換型 Pog1 変異体と Dma2 との相互作用解析

a) Pog1 の 200-351 番目のアミノ酸配列内にあるスレオニン残基をアラニンに置換したアラニン置換型 Pog1 変異体を発現するプラスミド (pGilda-POG1<sup>T202A</sup>、pGilda-POG1<sup>T244A</sup>、pGilda-POG1<sup>T253A</sup>、pGilda-POG1<sup>T344A</sup> および pGilda-POG1<sup>T351A</sup>) を構築し、Dma2 との相互作用を解析した。また、Thr253 をグルタミン酸に置換した T253E 変異体を発現するプラスミド (pGilda-POG1<sup>T253E</sup>) を構築し、Dma2 との相互作用を解析した。b) Pog1 と Dma2 との相互作用のまとめ。Pog1 の Thr253 と Dma2 の FHA ドメインが相互作用することが示された。

### 3-4-5. T253A 変異体のリン酸化解析

アラニン置換 Pog1 変異体の解析から Pog1 の Thr253 が Dma2 との相互作用に必要であることから、Thr253 がリン酸化されている可能性が示唆された (Fig. 25)。そこで、アラニンに置換した T253A 変異体のリン酸化を Phos-tag を含有した SDS-ポリアクリルアミドゲルを用いて解析した (Fig. 26)。しかしながら、Phos-tag ゲルにおいて野生型 Pog1 タンパク質と同様に T253A 変異体ではバンドシフトが見られることから、T253A 変異体は Thr253 以外の残基でリン酸化されていることが明らかとなった。

以上のことから、今回の解析では Thr253 のリン酸化を確認することができず、Pog1 には Thr253 以外にもリン酸化されるアミノ酸残基が存在することが示唆された。しかしながら、T253A 変異体が Dma2 と相互作用しないことから、Thr253 以外のリン酸化は Dma2 との相互作用には関与していないと考えられる。

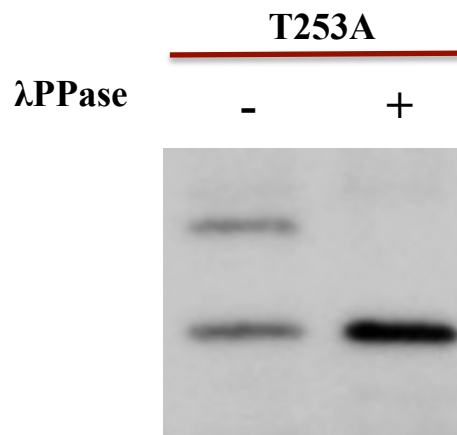


Fig. 26. T253A 変異体のリン酸化解析

Phos-tag (35  $\mu$ M) を含有した SDS-ポリアクリルアミドゲルを用いて T253A 変異体のリン酸化を  $\lambda$  PPase 処理の有無によって解析した。一次抗体には抗 Pog1 抗体を用いた。

### 3-4-6. LC-MS/MS によるリン酸化部位の同定

Phos-tag を用いた解析から Pog1 はリン酸化されていることが示唆された (Fig. 22)。また、相互作用の解析から Thr253 がリン酸化される可能性があるが、リ

ン酸化部位が複数箇所存在することが示唆された (Fig. 24)。そこで、LC-MS/MS によって Pog1 タンパク質のリン酸化部位を網羅的に解析した (Fig. 25)。

LC-MS/MS 解析では、Pog1 の全アミノ酸配列の 43 パーセントを同定することができた (Fig. 25a)。LC-MS/MS を用いてリン酸化解析を行う際、トリプシン消化を行い、タンパク質をペプチド断片にまで切断する必要がある。しかしながら、Pog1 のアミノ酸配列の Thr253 を含む中央部分の約 140 アミノ酸領域にはリジンやアルギニンが存在せず、トリプシン消化でペプチド断片まで切断できないことから Thr253 を含むペプチドを同定できなかった。また、このことから Thr253 のリン酸化を確認できないことが明らかとなった。

しかしながら、LC-MS/MS 解析によって同定されたペプチド断片 Query 2059 配列 (DTNNDNNHLLTIPSPITTK) にリン酸化修飾されたアミノ酸が含まれていることが明らかとなり (Fig. 25b)、そのリン酸化修飾部位は 152 番目のセリン (Ser152) であることが判明した (Fig. 25 c&d)。

以上のことから、相互作用解析からリン酸化を推定した Thr253 のリン酸化は技術的な問題のために LC-MS/MS によって検出できなかったが、Ser152 がリン酸化されることが明らかとなった。

a

```

1  MKQEPHRQSE EKEKPKGPMA VEREQHTSLS SGTTVTASTG DESTNSRPVE
51  SSQTEKSLSL RIRILKQLGF DDIQELNACD TGLVEQFLNV RLINDTKELE
101 KIRESNLAKL NQIIDKCMES DKISDSTLNK ILDMSMNRDT NNDNNNHLTI
151 PSPITTKKRK INASELASPR GHRRYRSDIP TVSEVETGVG YPQIHQQPGA
201 YTLPMFANQW MSNPYMQPPQ PQVQQIMPQY LYPPGMGPQA QLPTMSSNSE
251 SQTPVMSSQF LSLNQHGlyQ QNIGAHFVMS MGPQANIYGQ QHQLQPGQER
301 DQSRKSFshr RSQSANISMA NFRSPMRNPQ PASSQRPVNF LIHTPKHPPP
351 T

```

b

Query	Start - End	Observed	Mr (expt)	Mr (calc)	ppm	M	Score	Expect	Rank	U	Peptide
<a href="#">1822</a>	1 - 7	314.4927	940.4564	940.4549	1.61	1	13	1.7	1	U	- .MKQEPHR.Q + Oxidation (M)
<a href="#">1687</a>	17 - 23	388.1926	774.3707	774.3694	1.66	0	58	3.5e-005	1	U	K.GPMAVER.E + Oxidation (M)
<a href="#">1260</a>	57 - 61	288.1798	574.3451	574.3438	2.13	0	18	0.4	1	U	K.SLSLR.I
<a href="#">2099</a>	67 - 91	965.4733	2893.3982	2893.3916	2.25	0	39	0.018	1	U	K.QLGFDDIQELNACDTGLVEQFLNVR.L + Carbamidomethyl (C)
<a href="#">1643</a>	92 - 97	352.2037	702.3928	702.3912	2.28	0	23	0.19	1	U	R.LINDTK.E
<a href="#">1919</a>	92 - 101	401.5598	1201.6574	1201.6554	1.71	1	38	0.0053	1	U	R.LINDTKELEK.I
<a href="#">1819</a>	102 - 109	465.7726	929.5306	929.5294	1.25	1	26	0.086	1	U	K.IRESNLAK.L
<a href="#">1502</a>	104 - 109	331.1801	660.3457	660.3442	2.20	0	20	0.29	1	U	R.ESNLAK.L
<a href="#">2076</a>	110 - 130	617.8058	2467.1940	2467.1934	0.25	2	42	0.0075	1	U	K.LNQIIDKCMESDKISDSTLNK.I + Carbamidomethyl (C); Oxidation (M)
<a href="#">1998</a>	117 - 130	548.5801	1642.7184	1642.7178	0.36	1	44	0.0022	1	U	K.CMESDKISDSTLNK.I + Carbamidomethyl (C); Oxidation (M)
<a href="#">1852</a>	131 - 138	506.2336	1010.4526	1010.4525	0.069	0	43	0.0016	1	U	K.ILDMSMNR.D + 2 Oxidation (M)
<a href="#">1853</a>	131 - 138	506.2336	1010.4526	1010.4525	0.069	0	39	0.0041	1	U	K.ILDMSMNR.D + 2 Oxidation (M)
<a href="#">2049</a>	139 - 157	703.6786	2108.0139	2108.0134	0.25	0	30	0.099	1	U	R.DTNNDNNHLTIPSPITTK.K
<a href="#">2059</a>	139 - 157	730.3347	2187.9823	2187.9797	1.18	0	56	0.00024	1	U	R.DTNNDNNHLTIPSPITTK.K + Phospho (ST)
<a href="#">1917</a>	160 - 170	395.8918	1184.6537	1184.6513	2.04	1	43	0.0015	1	U	R.KINASELASPR.G
<a href="#">1879</a>	161 - 170	529.2866	1056.5587	1056.5563	2.23	0	87	4.1e-008	1	U	K.INASELASPR.G
<a href="#">1980</a>	311 - 323	499.9132	1496.7177	1496.7154	1.55	1	47	0.0012	1	U	R.RSQSANISMANFR.S + Oxidation (M)
<a href="#">1948</a>	312 - 323	671.3150	1340.6155	1340.6143	0.88	0	69	6.2e-006	1	U	R.SQSANISMANFR.S + Oxidation (M)
<a href="#">2054</a>	328 - 346	711.0523	2130.1351	2130.1334	0.79	0	25	0.13	1	U	R.NPQPASSQRPVNFLIHTPK.H
<a href="#">2055</a>	328 - 346	533.5412	2130.1357	2130.1334	1.07	0	11	3.2	1	U	R.NPQPASSQRPVNFLIHTPK.H

Fig. 27. LC-MS/MSによるPog1のリン酸化解析

a) Pog1の全アミノ酸配列。LC-MS/MSによって同定されたアミノ酸配列を赤字で示す。b) 同定されたペプチド断片配列。Q2059配列にリン酸化されたアミノ酸残基が存在することが示された。

c

Score	Mr(calc)	Delta	Sequence	Site Analysis
56.2	2187.9797	0.0026	<a href="#">DTNNDNNHHLTIPSPITTK</a>	Phospho S14 91.23%
43.0	2187.9797	0.0026	<a href="#">DTNNDNNHHLTIPSPITTK</a>	Phospho T17 4.39%
42.6	2187.9797	0.0026	<a href="#">DTNNDNNHHLTIPSPITTK</a>	Phospho T18 3.92%
33.3	2187.9797	0.0026	<a href="#">DTNNDNNHHLTIPSPITTK</a>	Phospho T11 0.46%
12.3	2187.9797	0.0026	<a href="#">DTNNDNNHHLTIPSPITTK</a>	Phospho T2 0.00%
9.4	2187.9784	0.0039	<a href="#">KFESTLMLMGKCVPISTK</a>	
7.4	2187.9784	0.0039	<a href="#">KFESTLMLMGKCVPISTK</a>	
7.1	2187.9784	0.0039	<a href="#">KFESTLMLMGKCVPISTK</a>	
6.1	2187.9784	0.0039	<a href="#">KFESTLMLMGKCVPISTK</a>	
6.0	2187.9784	0.0039	<a href="#">KFESTLMLMGKCVPISTK</a>	

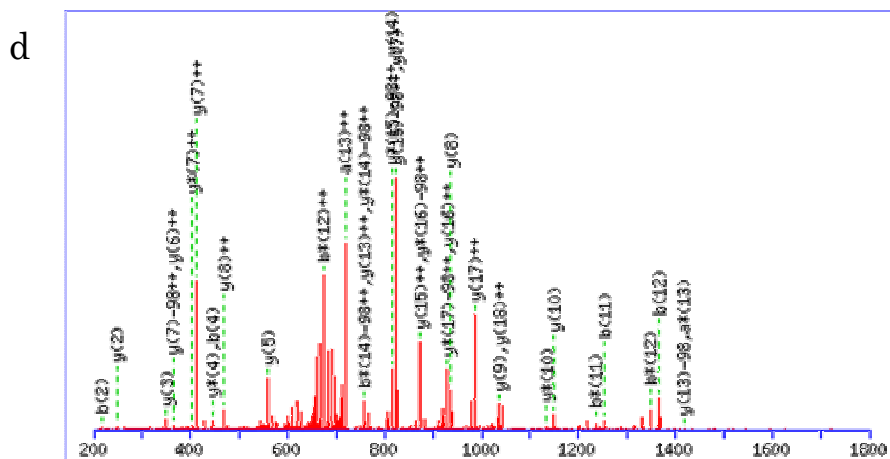


Fig. 27. LC-MS/MS による Pog1 のリン酸化解析

- c) リン酸修飾されていると同定された Query 2059 (DTNNDNNHHLTIPSPITTK) 配列の中からリン酸化されているアミノ酸を同定。  
d) Query 2059 (DTNNDNNHHLTIPSPITTK) 配列をイオン化して LC-MS/MS で検出されたピーク。

### 3-4-7. S152A 変異体のリン酸化解析

LC-MS/MS 解析から Pog1 タンパク質の Ser152 がリン酸修飾されることを明らかにした (Fig. 27)。そこで、Ser152 をアラニンに置換した S152A 変異体のリン酸化を Phos-tag を含有した SDS-ポリアクリルアミドゲルを用いて解析した

(Fig. 28)。その結果、野生型 Pog1 タンパク質で見られるバンドシフトが観察されなかった。

このことから、Pog1 の Ser152 がリン酸化修飾されることが示唆された。また、Ser152 および Thr253 をそれぞれアラニンに置換した S152A/T253A 変異体においてもバンドのシフトは観察されなかった。

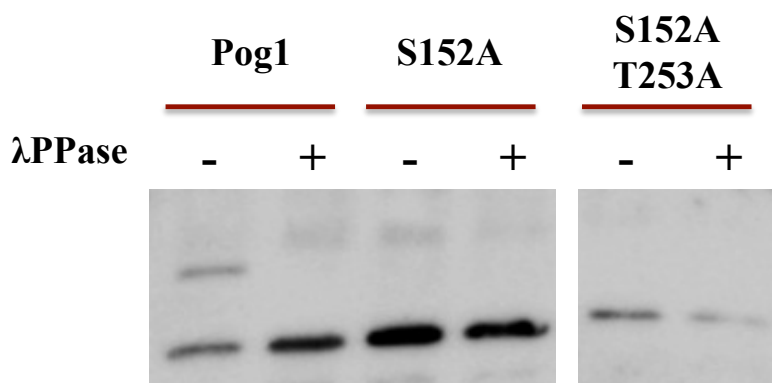


Fig. 28. S152A および S152A/T253A 変異体のリン酸化解析

Phos-tag (35  $\mu$ M) を含有した SDS-ポリアクリルアミドゲルを用いて S152A および S152A/T253A 変異体のリン酸化を  $\lambda$  PPase 処理の有無により解析した。一次抗体には抗 Pog1 抗体を用いた。

### 3-4-8. アラニン置換型 Pog1 変異体の相互作用およびリン酸化解析

S152A 変異体はリン酸化修飾されていないことが明らかになった (Fig. 28)。各 Truncated-Pog1 と Dma2 の相互作用解析から、Ser152 が存在しなくても Pog と Dma2 は相互作用することを明らかにし、また、S152A 変異体はリン酸化されないことを明らかにしているが、Dma2 との相互作用を酵母ツーハイブリッド法により解析した (Fig. 29)。その結果、S152A 変異体と Dma2 は相互作用することが明らかとなった。Dma2 の FHA ドメインはリン酸化タンパク質を基質として相互作用する報告されており (30)、本研究においてもアラニン置換型 Pog1 変異体および FHA ドメイン変異型 (*dma2*<sup>G298E/S326A/H329L</sup>) の相互作用解析から、Dma2 はリン酸化された Pog1 と相互作用すると考えられる。しかしながら、S152A 変異体はリン酸化されていないにも関わらず、Dma2 と相互作用すること

が示唆された。

そこで、酵母ツーハイブリッド法に用いたプラスミド (pGilda) から発現させたアラニン置換型 Pog1 変異体 (S152A、T253A および S152A/T253A) のリン酸化を解析した (Fig. 30)。その結果、野生型 Pog1 ではリン酸化によるバンドシフトが検出されるが、T253A 変異体および S152A/T253A 変異体はリン酸化されていないことが明らかとなった。また、S152A 変異体はリン酸化されていた。

この結果は、多コピープラスミド pAD4 を用いて発現させたアラニン置換型 Pog1 変異体のリン酸修飾状態とは異なるものであった。

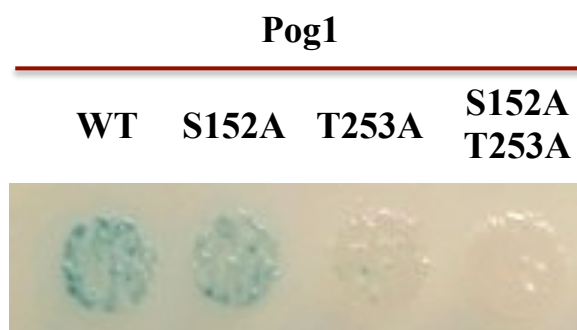


Fig. 29. アラニン置換型 Pog1 変異体と Dma2 との相互作用  
S152A 変異体、T253A 変異体および S152A/T253A 変異体と Dma2 との相互作用を解析した。

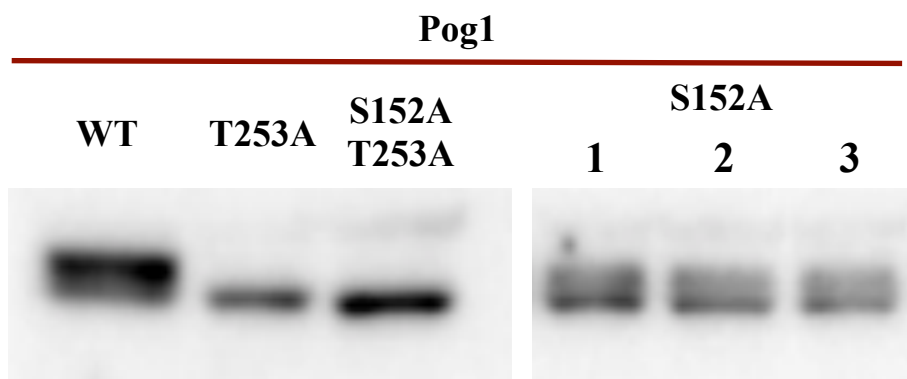


Fig. 30. アラニン置換型 Pog1 変異体のリン酸化解析  
酵母ツーハイブリッド法に用いた pGilda プラスミドから発現させた S152A、T253A および S152A/T253A 変異体のリン酸化を解析した。S152A 変異体については 3 サンプル用いた。一次抗体には抗 Pog1 抗体を用いた。



### 3-4-9. Pog1 のリン酸化

多コピープラスミド (pAD4) から発現する野生型 Pog1 と酵母ツーハイブリッド法に用いたプラスミド (pGilda) から発現する相互作用解析のために DNA 結合ドメインが付加された Pog1 ではリン酸化状態が異なることが明らかとなった (Figs. 26, 28&30)。そこで、pAD4 プラスミドおよび pGilda プラスミドから発現させた Pog1 タンパク質のリン酸化について結果をまとめ、リン酸化修飾に関する考察を行った (Table 5)。

リン酸化修飾部位に関して、pAD4 から発現させた S152A 変異体はリン酸化が見られないが、T253A 変異体はリン酸化が見られる。しかしながら、pGilda プラスミドから発現させた S152A 変異体はリン酸化が見られるが、T253A 変異体はリン酸化が見られない。また、両プラスミドから発現させた S152A/T253A 変異体ではともにリン酸化が見られない。

以上のことから、Pog1 のリン酸化部位は Ser152 および Thr253 の 2 箇所に限られると考えられる。さらに、酵母ツーハイブリッド法による Pog1 と Dma2 の相互作用解析から、Thr253 のリン酸化が Dma2 との相互作用には必要であると考えられる。

pAD4 から発現する Pog1 は、他にタグに由来するアミノ酸残基が付加されていない野生型の配列であるが、pGilda プラスミドから発現する Pog1 は相互作用解析のために DNA 結合ドメインが付加されている。そのため、pAD4 から発現させた Pog1 のリン酸化修飾が本来の翻訳後修飾である可能性が高い。つまり、Pog1 は S152A 変異体でリン酸化されず、T253A 変異体ではリン酸化されていると考えられる。pGilda から発現した S152A 変異体には DNA 結合ドメインが付加しているために、何らかの影響で Thr253 がリン酸化されるのではないかと考えられる。そのため、酵母ツーハイブリッド法において S152A 変異体が Dma2 と相互作用する結果になったと考えられる。

予期せぬことであったが、DNA 結合ドメインの付加が Pog1 タンパク質のリン酸化に及ぼす影響によって、Ser152 と Thr253 の 2 箇所がリン酸化修飾を受けている可能性を示唆することができた。

Table 5. アラニン置換型 Pog1 変異体のリン酸化状態

Pog1 プラスミド	S152A変異体	T253A変異体	S152A/T253A変異体
pAD4	×	○	×
pGilda	○	×	×

pAD4 プラスミドおよび pGilda プラスミドから発現させたアラニン置換型 Pog1 変異体のリン酸化状態 (○:リン酸化あり, ×: リン酸化なし)。

### 3-5. 細胞周期依存的なリン酸化解析

#### 3-5-1. Pog1 をリン酸化するキナーゼ

Pog1 は Ser152 および Thr253 がリン酸化されることが示唆された。両残基はリン酸化予測プログラム NetPhosK ([www.cbs.dtu.dk/services/NetPhosK](http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhosK)) において共にリン酸化が予測されており、また、哺乳類のキナーゼである Cdk5 がリン酸化すると予測されている (Table 6)。 *S. cerevisiae* における Cdk5 のオルソログは Cyclin-dependent Kinase (Cdk) の 1 つである Pho85 である。Pho85 は網羅的な酵母ツーハイブリッド解析において Pog1 と相互作用することが報告されている (31)。また、酵母のもう 1 つの Cdk である Cdc28 の網羅的な基質スクリーニングにおいて、Pog1 は Cdc28 によってリン酸化されることが報告されている (32)。さらに、Ser152 および Thr253 は Cdk によってリン酸化されると推定される配列 (Ser/Thr-Pro) の一部である。

以上のことから、Pog1 のリン酸化には Cdk である Pho85 および Cdc28 が関与していることが示唆された。

Table. 6. NetPhosK によるリン酸残基の予測

Site	Kinase	Score
Ser152	Cdk5	0.53
Thr253	Cdk5	0.63

NetPhosK を用いて Pog1 のリン酸化残基を予測した。Ser152 および Thr253 の結果のみ示す。Score 値は 1 に近いほどリン酸化の確率が高い。

### 3-5-2. Cdk と Pog1 の相互作用

Pog1 をリン酸化するキナーゼとして、Cdk である Pho85 および Cdc28 の可能性が示された。そこで、酵母ツーハイブリッド法を用いて Pog1 と Pho85 および Cdc28 との相互作用を解析した (Fig. 31)。その結果、Pho85 および Cdc28 と野生型 Pog1 との相互作用は見られないが、Pog1(101-351)、Pog1(201-351)および Pog1(251-351)と相互作用することが明らかとなった。この結果は、Pog1 をリン酸化するキナーゼが Pho85 および Cdc28 であることを示唆するものである。

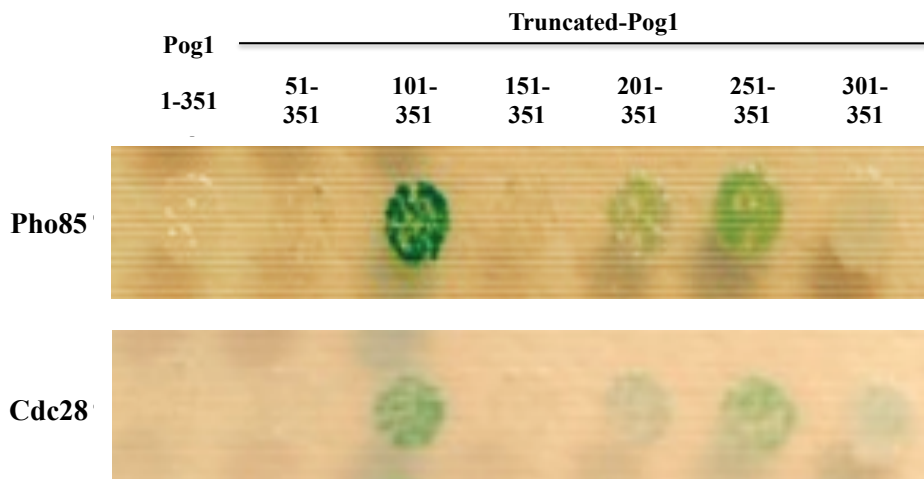


Fig. 31. Pog1 と Pho85 および Cdc28 との相互作用解析

pJG4-5-PHO85 および pJG4-5-CDC28 プラスミドを構築し、各 Truncated-Pog1 タンパク質との相互作用の解析を行った。

### 3-5-3. 細胞周期依存的な Pog1 のリン酸化解析

Pog1 タンパク質が Cdk である Pho85 および Cdc28 によってリン酸化される可能性が示唆されたため (Fig. 31)、Pog1 は細胞周期依存的にリン酸化されることが考えられた。そこで、 $\alpha$ -factor 処理によって G1 期に同調させた細胞のリン酸化を解析した (Fig. 32)。その結果、細胞周期同調後の G1 期において Pog1 はリン酸化されているが、細胞周期の進行に伴ってリン酸化レベルが減少し、120 分後には再びリン酸化されることが明らかとなった。また、細胞周期同調後の G1 期において、リン酸化された Pog1 の上部にもバンドが見られた。Pog1 は 152 番目のセリンと 253 番目のスレオニンがリン酸化されることが示唆されていることから、上部に見られるバンドは 2 カ所リン酸化された Pog1 の可能性がある。

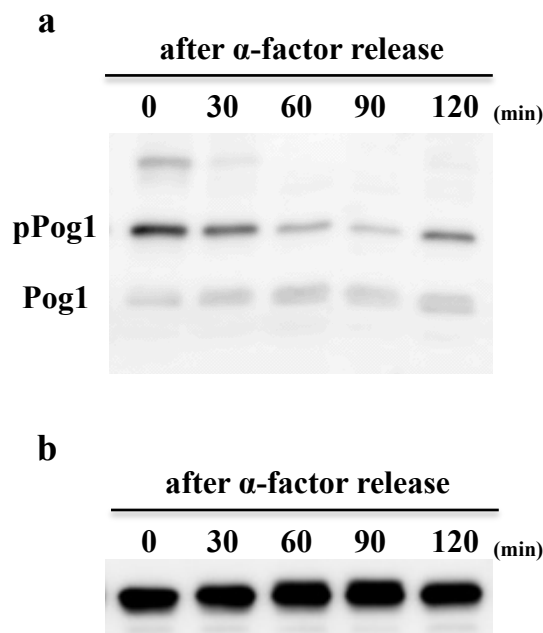


Fig. 32. G1 期同調後の細胞周期依存的な Pog1 のリン酸化解析

*S. cerevisiae* BY4741 株の野生株に pAD4-POG1 を導入した形質転換体を用いた。 $\alpha$ -Factor 処理によって細胞周期を G1 期に同調させた細胞を  $\alpha$ -Factor を除去後、培養することで細胞周期依存的なリン酸化レベルを解析した。a) Phos-tag (35  $\mu$ M) を含有した SDS-ポリアクリルアミドゲルでリン酸化を解析した。b) SDS-ポリアクリルアミドゲルを用いて Pog1 タンパク質量を解析した。一次抗体には抗 Pog1 抗体を用いた。

### 3-6. *POG1* の転写解析

*Pog1* のリン酸化レベルは細胞周期依存的に変動することが明らかになった (Fig. 32)。そこで、*POG1* の転写量も細胞周期依存的に変動するのかどうか、リン酸化の挙動解析と同様に  $\alpha$ -factor 処理で G1 期に同調後の細胞を用いて解析した (Fig. 33)。その結果、G1 期から S 期に移行に伴って転写量が増加することが判明し、その後転写量は減少し、一定に保たれることが明らかとなった。

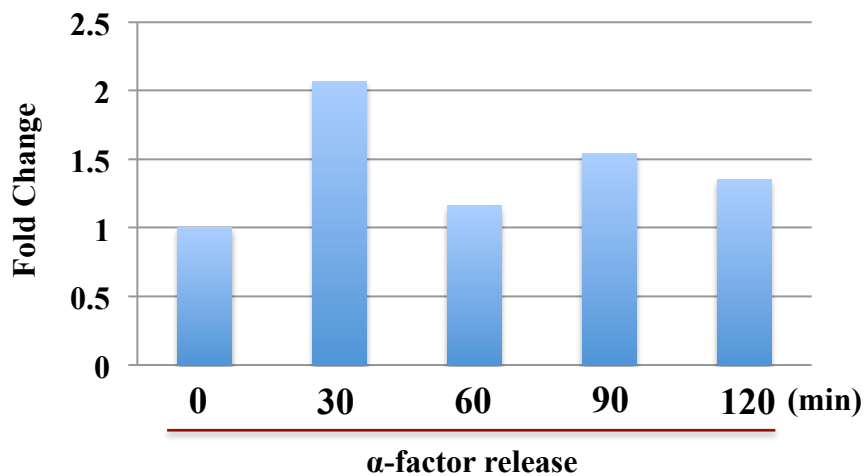


Fig. 33. G1 期同調後の *POG1* の転写量解析

*S. cerevisiae* BY4741 株の野生株に pAD4 を導入した形質転換体を用いた。  $\alpha$ -Factor 処理によって細胞周期を G1 期に同調させた細胞を  $\alpha$ -factor を除去後、培養することで 30 分ごとに細胞を回収し、細胞周期依存的な転写を解析した。転写量はリアルタイム PCR を用いて解析した。G1 期同調した際の *POG1* 転写量を 1 として細胞周期進行に伴う転写量の変化を示す。

### 3-7. *Pog1* と *Dma2* の相互作用の生理的意義

#### 3-7-1. 塩化リチウム耐性

*POG1* の分子機能として転写および翻訳後修飾の解析を行い、また、*Pog1* と相互作用するタンパク質としてユビキチンリガーゼ *Dma2* を同定した。次に、*Pog1* と *Dma2* の相互作用に意義を明らかにするために、1) *POG1* 過剰発現株における *DMA2* の過剰発現、2) *dma1 dma2* 二重破壊株における *POG1* の過剰

発現が塩化リチウム耐性に及ぼす影響をスポットテストで評価した (Fig. 34)。その結果、*DMA2* を過剰発現させることによって、*POG1* 過剰発現株で見られた塩化リチウム耐性が抑制されることが明らかとなった。また、*dma1 dma2* 二重破壊株は塩化リチウムに対して感受性を示すが、*dma1 dma2* 二重破壊株においても *POG1* を過剰発現させることで塩化リチウムに耐性を示すことが明らかとなった。

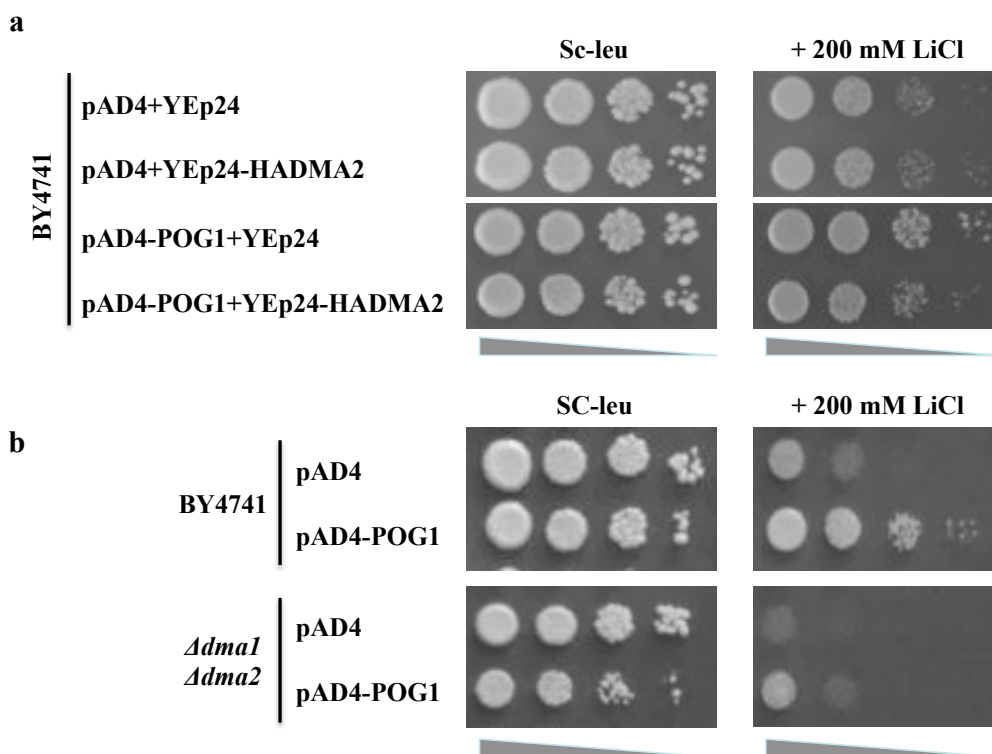


Fig. 34. Pog1 と Dma2 の共過剰発現および *dma1 dma2* 二重破壊株における塩化リチウム耐性試験

a) *S. cerevisiae* BY4741 株に pAD4 および YEp24、pAD4-POG1 および YEp24-HADMA2、pAD4-POG1 および YEp24、pAD4-POG1 および YEp24-HADMA2 をそれぞれ導入した形質転換体を用いた。b) *S. cerevisiae* BY4741 株および *dma1 dma2* 二重破壊株に pAD4 あるいは pAD4-POG1 を導入した形質転換体を用いた。OD<sub>600</sub> を 1.0 に調整した細胞原液を用いて、10<sup>-1</sup> から 10<sup>-3</sup> までの希釈系列を作製し、3  $\mu$ l ずつ各培地にスポット後、25°C、3 日間培養した。

### 3-7-2. Dma2 による Pog1 の分解

*DMA2* を過剰発現させることで *POG1* 過剰発現株が示す塩化リチウム耐性の表現型が抑制されることが明らかとなった (Fig. 34)。このことからユビキチンリガーゼである *Dma2* が *Pog1* を分解し、*Pog1* タンパク質を制御している可能性が示された。そこで、BY4741 株および *dma1 dma2* 二重破壊株における各 *Pog1* タ存在量を比較した (Fig. 35)。ゲノム上からの *Pog1* タンパク質の発現をウエスタンにおいて確認できないことから、プラスミドから *Pog1* タンパク質を過剰発現させて実験を行いました。その結果、*dma1 dma2* 二重破壊株では野生株よりも *Pog1* タンパク質の量が増加しており、分解が抑えられていることが明らかとなった (Fig. 35a)。また、*Dma2* と相互作用しないアラニン置換型 *Pog1* 変異体タンパク質 (S152A、T253A および S152A/T253A) の量が野生型 *Pog1* より増加していることから、分解が抑えられていることが明らかとなった (Fig. 35b)。

以上のことから、*Dma2* タンパク質を過剰発現させることで *Pog1* タンパク質の量が減少することが示された。

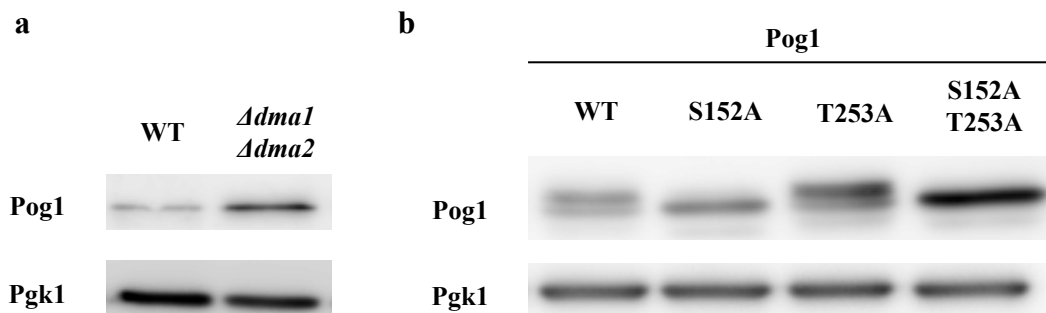


Fig. 35. *Dma2* による *Pog1* の分解

a) *S. cerevisiae* BY4741 株の野生株および *dma1 dma2* 二重破壊株に pAD4-POG1 を導入した形質転換体を用いた。b) アラニン置換型 *Pog1* 変異体 (S152A、T253A および S152A/T253A) タンパク質を比較した。*S. cerevisiae* BY4741 株の野生株に pAD4-POG1、pAD4-POG1<sup>S152A</sup>、pAD4-POG1<sup>T253A</sup> および pAD4-POG1<sup>S152A/T253A</sup> をそれぞれ導入した形質転換体を用いた。一次抗体には抗 *Pog1* 抗体を用いた。

### 3-7-3. *POG1* の過剰発現による生育抑制

*POG1* 過剰発現株は野生株と比較して生育速度が若干低下することが明らかになっている (Fig. 9)。*dma1 dma2* 二重破壊株において *Pog1* タンパク質が蓄積することから、*dma1 dma2* 二重破壊株に *POG1* を過剰発現させると生育抑制が見られるのではないかと考えられた。そこで、*dma1 dma2* 二重破壊株および *dma1 dma2* 二重破壊株に *POG1* を過剰発現させた場合の生育を解析した (Fig. 36)。その結果、*dma1 dma2* 二重破壊株は野生株と比較して生育速度が遅いことが明らかとなった。また、*dma1 dma2* 二重破壊株に *Pog1* を過剰発現させることで生育がさらに遅延することが判明した。pAD4 導入株の生育を 100 とした際に、pAD4-*POG1* 導入株の生育の割合を野生株と *dma1 dma2* 二重破壊株と比較すると、*POG1* 過剰発現によって *dma1 dma2* 二重破壊株では著しく生育が抑制されることが明らかとなった (Fig. 37)。

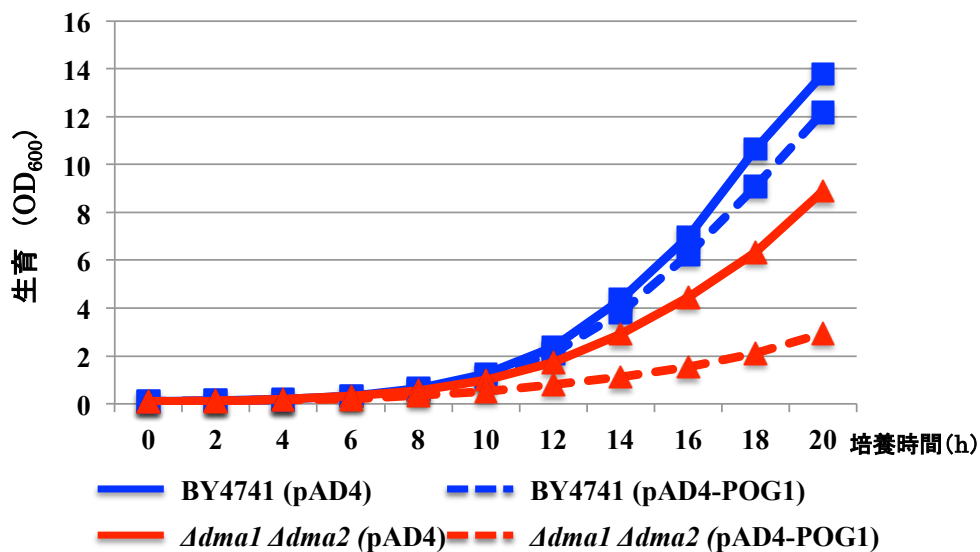


Fig. 36. *POG1* の過剰発現が生育に及ぼす影響

*S. cerevisiae* BY4741 株の野生株および *dma1 dma2* 二重破壊株に pAD4 あるいは pAD4-*POG1* を導入した形質転換体を用いた。OD<sub>600</sub> を 0.1 に合わせて 30°C で培養し、2 時間おきに分光光度計を用いて OD<sub>600</sub> の値を測定した。



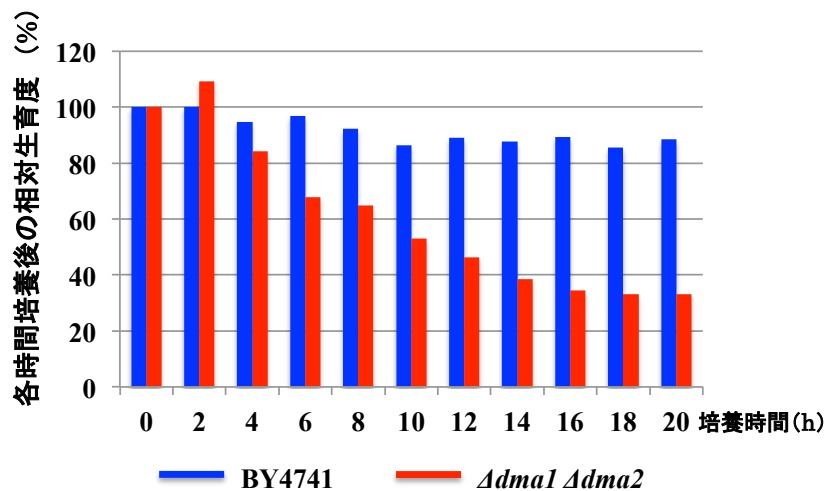


Fig. 37. *POG1* の過剰発現による生育抑制

*S. cerevisiae* BY4741 株の野生株および *dma1 dma2* 二重破壊株に pAD4 あるいは pAD4-*POG1* を導入した形質転換体を用いた。Fig. 34 の生育曲線を用いて *POG1* の過剰発現による生育抑制を解析した。pAD4 導入株の生育を 100 とし、pAD4-*POG1* 導入株における生育の相対値を示す。

#### 3-7-4. Pog1 のユビキチン化

*DMA2* を過剰発現させることで *POG1* 過剰発現株の塩化リチウム耐性が緩和されること (Fig. 34)、また *dma1 dma2* 二重破壊株において Pog1 タンパク質が増加することが明らかとなった (Fig. 35a)。*Dma2* はユビキチンリガーゼであることから、Pog1 がユビキチン化修飾されるのか解析を行った (Fig. 38)。Myc タグが付加された Myc-Ub を *CUPI* プロモーターの制御下で過剰発現させることで、Pog1 のユビキチン化を検出した (20)。その結果、Myc-Ub を誘導し、かつ *POG1* を過剰発現させた培地においてのみ、Pog1 タンパク質のバンドの上段に新たなバンドが検出された。この新たに検出されたバンドは Pog1 タンパク質のバンドより約 10kDa 大きいサイズである。さらに、アラニン置換型 Pog1 変異体タンパク質 (S152A、T253A および S152A/T253A) と *dma1 dma2* 二重破壊株においては Pog1 タンパク質のバンドの上段にバンドは検出されなかった。

この結果から、Pog1 はユビキチン化されることが示唆された。またこのユビキチン化には *Dma2* が必要であり、かつ Pog1 と *Dma2* の相互作用が必要であることが示唆された。

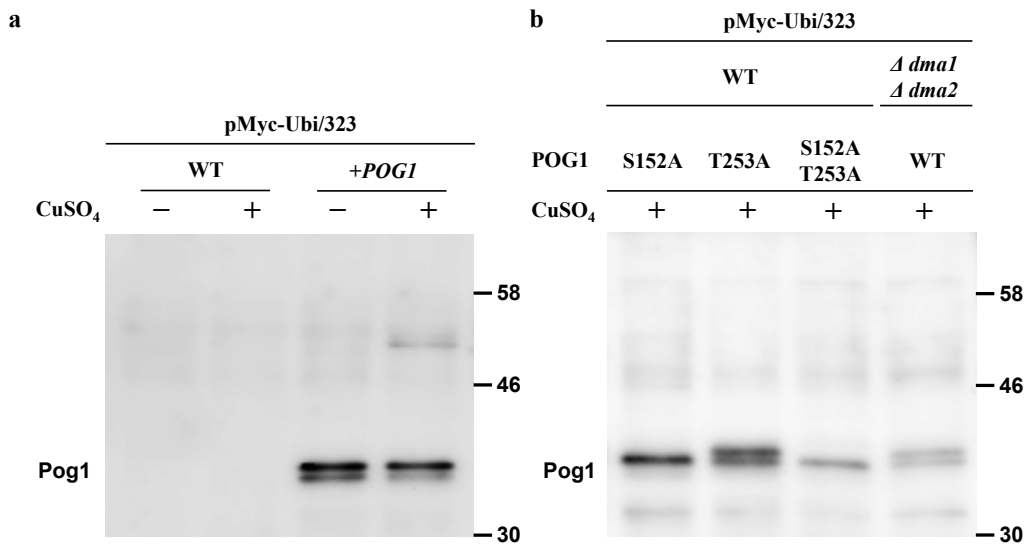


Fig. 38. Pog1 のユビキチン化

a) *S. cerevisiae* BY4741 株の野生株に pAD4、YEp24-HADMA2 および pMYC-Ubi/323 を導入した形質転換体と pAD4-POG1、YEp24-HADMA2 および pMYC-Ubi/323 を導入した形質転換体を用いた。b) *S. cerevisiae* BY4741 株の野生株に YEp24-HADMA2 および pMYC-Ubi/323 と pAD4-POG1(S152A)、pAD4-POG1(T253A)あるいは pAD4-POG1(S152A/T253A)をそれぞれ導入した形質転換体を用いた。また、*dma1 dma2* 二重破壊株 pAD4、YEp24 および pMYC-Ubi/323 を導入した形質転換体も用いた。Myc-Ub は pMYC-UBi/323 プラスミドから *CUPI* プロモーターの制御下で過剰発現させた。*CUPI* プロモーターによる発現誘導は CuSO<sub>4</sub> (終濃度 0.1μM) を添加することで行った。一次抗体には抗 Pog1 抗体を用いた。

## 4. 考察

### 4-1. 遺伝学的解析による *RSP5* と *POG1* の関係

当研究室ではこれまでに、プロリンの毒性アナログである AZC を用いた AZC 感受性株のスクリーニングによって *rsp5* 変異株 (*rsp5*<sup>A401E</sup>) を取得し (4)、さらに *rsp5* 変異株が示す高温ストレス感受性を相補する多コピーサプレッサー遺伝子として *POG1* を同定している (7)。*POG1* の機能から *rsp5* 変異株が示すストレス感受性の原因およびストレス下における *RSP5* の機能を明らかにすることを目的に、遺伝学的解析による *RSP5* と *POG1* の関係性について研究を行った。

その結果、*POG1* を過剰発現させることで、*rsp5* 変異株の高温感受性および塩化リチウム感受性を相補するが、興味深いことに、1) 野生株においても *POG1* を過剰発現させることで、塩化リチウムおよび塩化ナトリウムに対して耐性が向上すること (Fig. 5)、2) *pog1* 破壊株は様々なストレスに感受性を示すこと (Fig. 6)、3) *rsp5* 変異株の *POG1* を破壊するとさらにストレスに感受性を示すこと (Fig. 6) から、*RSP5* と *POG1* は共に酵母のストレス耐性に関与する遺伝子であるが、両遺伝子間に遺伝学的な相互関係はないものと考えられた。

### 4-2. *POG1* 過剰発現株が示す細胞周期の遅延

*POG1* の機能として過剰発現させた際に、 $\alpha$ -factor 処理による G1 アレストを阻害することが報告されている (18)。また、G1 アレストを阻害するメカニズムとして、G1 サイクリンをコードする *CLN2* の転写を誘導し、細胞周期を進行させることが示唆され、さらに SCB 結合タンパク質 (SBF) によって *POG1* は転写されることから、*POG1* は G1/S 期移行に関わる転写活性化因子をコードしていると推定されている (19)。そこで、これまで推定されている *POG1* の機能を確認する目的で、halo assay 法を用いて *POG1* 過剰発現株の  $\alpha$ -factor 処理による G1 アレストに対する影響を調べた。しかしながら、当研究室で用いている *S. cerevisiae* BY4741 株に多コピープラスミド pAD4 を用いて *POG1* を過剰発現させても G1 アレストは阻害されなかった (Fig. 7)。また、フローサイトメーターを用いた解析においても、*POG1* の過剰発現による G1 アレストの阻害を確認することができなかった (Fig. 8)。また、*POG1* 過剰発現株は野生株と比較して若干ではあるが生育が遅延することが明らかとなり (Fig. 9)、G1 期に同期させ

た細胞を用いた細胞周期の解析において、*POGI* 過剰発現株は G1 期から S 期への移行が野生株より遅延していることが明らかとなった (Fig. 10)。

したがって、本研究では *POGI* の過剰発現株が G1 サイクリンを転写誘導することから  $\alpha$ -factor 処理による G1 アレストを阻害し、細胞周期を進行させるというこれまでの報告 (18) を確認することができず、またこれまでの報告 (18) とは異なり、*POGI* の過剰発現させることで G1 期からの細胞周期が遅延することが示された。*POGI* の過剰発現による G1 アレスト阻害が見られない原因として実験に用いている酵母株の遺伝的背景が違っていることが可能性として考えられた。また、動物細胞において発現量によって機能が正と負に変化する転写因子が存在することが知られている。これまでの報告 (18) でも本研究と同様にマルチプラスミドを用いて *Pog1* タンパク質を過剰発現させているが、過剰発現に用いた異なるプラスミドによる発現量の違いが原因である可能性も考えられた。

#### 4-3. Truncated-Pog1過剰発現株が示す表現型

*POGI* の過剰発現が示す表現型としてこれまでに報告している 1) 塩化リチウム耐性に加えて、本研究では新たに 2) 細胞形態異常 (Fig. 11)、3) 高温感受性 (Fig. 13) を見出した。*POGI* の機能および表現型に必要な領域を同定するために各 Truncated-Pog1 過剰発現株が示す表現型を解析した結果、1) 塩化リチウム耐性は野生型 *Pog1*、*Pog1*(51-351)および *Pog1*(101-351)の過剰発現によって見られること、2) 高温感受性および形態異常は野生型 *Pog1*、*Pog1*(51-351)の過剰発現によって見られることを明らかにした (Fig. 15)。*Pog1* タンパク質の N 末端側から欠失させたアミノ酸配列の違いによって表現型が異なることから、1) 101~150 番目のアミノ酸配列は塩化リチウム耐性の表現型に必須であり、2) 51~100 番目のアミノ酸配列が高温感受性および形態異常の表現型に必須であることが示唆された。このことから、*POGI* 過剰発現株の表現型である塩化リチウム耐性と高温感受性および形態異常は *POGI* の別々の機能から生じている可能性が示された。

yeGFP を付加した *Pog1*-yeGFP 融合タンパク質の局在観察において野生型 *Pog1*-yeGFP、*Pog1*(51-351)-yeGFP および *Pog1*(101-351)-yeGFP は核に局在するが、*Pog1*(151-351)-yeGFP は細胞質に局在することを明らかにした (Fig. 16)。N 末

端から 150 アミノ酸残基を欠失させた Pog1(151-351)は過剰発現による表現型が見られず、野生型 Pog1 と異なって細胞質に局在することから、Pog1 の機能として核への局在が必要であることが示された。また、Pog1 のアミノ酸配列において 101~150 番目のアミノ酸配列が核に局在するために必要であることも判明した。

以上の結果から、Pog1 タンパク質は核内において機能し、複数の機能を有していることが示唆された (Fig. 39)。

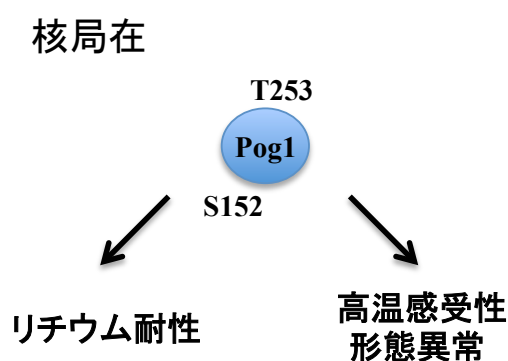


Fig. 39. Pog1の局在および機能

Pog1は核に局在することで機能するタンパク質であり、過剰発現による表現型（塩化リチウム耐性、高温感受性および形態異常）は異なるPog1の機能から生じると考えられる。

#### 4-4. POG1 過剰発現株が示す塩化リチウム耐性

一般的に、細胞内に流入したリチウムやナトリウム、カリウムなどの塩ストレスは塩による代謝阻害に関わる「イオンストレス」と、水分の吸収に関わる「浸透圧ストレス」に区別される。リチウムはナトリウムやカリウムと比較して低濃度 (200 mM) で *S. cerevisiae* の生育を阻害することから (Fig. 4)、「浸透圧ストレス」よりも「イオンストレス」による細胞毒性がより強いと考えられる。また、細胞内に流入したリチウムの「イオンストレス」としての細胞毒性については 1) イノシトール代謝の阻害 (33, 34)、2) リチウムイオンがタンパク質の  $Mg^{2+}$  結合部位への取り込みによる機能阻害 (35) などが報告されている。そのため、細胞内に過剰に流入したリチウムイオンは P-type ATPase である

Enaファミリー遺伝子 (*ENA1*, *ENA2*, *ENA5*) によって細胞外に排出されること細胞毒性が緩和されることが知られており、当研究室においてもリチウム処理によって*ENA1*遺伝子の転写が誘導されることを確認している。そこで、*POGI*過剰発現株は細胞内に流入したリチウムイオン細胞外に排出することで「イオンストレス」を軽減し、耐性を示すのではないかと考えた。しかしながら、MIP-MS解析の結果から、細胞外にリチウムイオンを排出して耐性を獲得しているのではないと考えられた (Fig. 17)。次に、塩化リチウムは*S. cerevisiae*の生育抑制を引き起こすが (Fig. 18)、 $\alpha$ -factorによって細胞周期をG1期に同調した後の細胞を用いて、塩化リチウム添加培地における生育速度を測定した。その結果、野生株と比較して*POGI*過剰発現株は塩化リチウムによる生育抑制を緩和していることが明らかとなった (Figs. 19 & 20)。

以上のことから、*POGI*過剰発現株が示す塩化リチウム耐性は、細胞外にリチウムイオンを排出するためではなく、細胞が「リチウムイオンストレス」に適応するためのメカニズムを予め備えている可能性が示唆された。当研究室では、*POGI*が多コピーで*rsp5*変異株の高温ストレス感受性を相補する理由として、ストレス応答タンパク質をコードする*HSP12*および*DDR2*の転写が誘導されることを報告しており (7)、*POGI*の過剰発現によってストレス応答タンパク質をが恒常的に高発現している可能性が示唆された (Fig. 40)。そのため、*POGI*の過剰発現株が塩化リチウム耐性を示す可能性が考えられた。

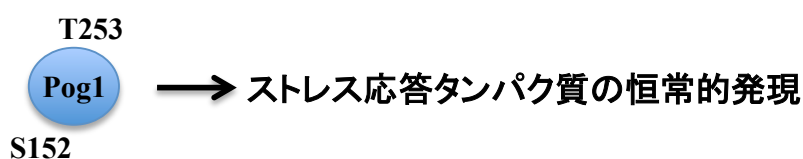


Fig. 40. *POGI*の過剰発現による塩化リチウム耐性機構モデル

ストレス応答遺伝子の転写を恒常的に誘導することでリチウムイオンストレスに予め備えている可能性が考えられる。

#### 4-5. Pog1のリン酸化修飾

酵母ツーハイブリッドスクリーニングによって、Pog1タンパク質と相互作用するタンパク質としてRING型ユビキチンリガーゼであるDma2を同定した

(Table 4 & Fig. 21)。Dma2のFHAドメインはリン酸化されたタンパク質との相互作用が知られている(30)。そこで、Pog1タンパク質のリン酸化を解析したところ、Ser152とThr253がリン酸化されることが明らかになった(Figs. 26, 28&30)。また、Thr253のリン酸化がDma2との相互作用に必要であることを明らかにした(Fig. 25)。さらに、細胞内の生理的条件を反映すると考えられるpAD4プラスミドから発現させたアラニン置換型Pog1変異体(S152A変異体およびT253A変異体)のリン酸化状態を解析したところ、T253A変異体においてはリン酸化修飾が観察されたが、S152A変異体はリン酸化修飾を受けていないことが判明した(Figs. 26&28)。

以上のことから、Pog1タンパク質はまずSer152がリン酸化され、その後、Thr253がリン酸化されることで、Dma2との相互作用が可能になるという「二段階のリン酸化」によって制御されている可能性が示唆された(Fig. 41)。

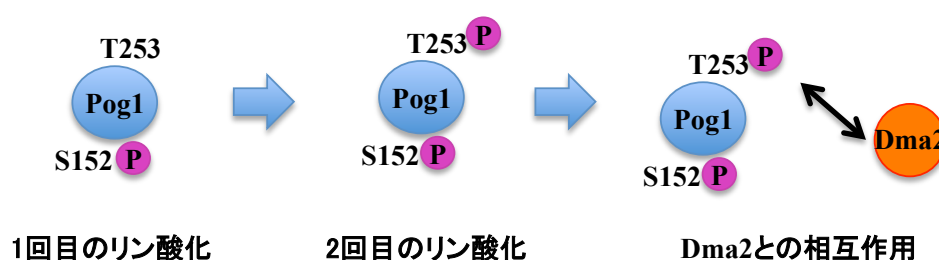


Fig. 41. Pog1のリン酸化モデル

Pog1タンパク質の「二段階のリン酸化」モデル。最初にSer152がリン酸化されることで、Thr253がリン酸化され、さらにリン酸化されたThr253がDma2タンパク質と相互作用する。

また、Pog1をリン酸化するキナーゼとして、これまでの報告から cyclin-dependent kinaseであるPho85およびCdc28が候補として考えられたことから(Table 6)、酵母ツーハイブリッド法によってPog1とPho85およびCdc28の相互作用を解析した。その結果、Pog1は両タンパク質と相互作用することが示唆された(Fig. 31)。しかしながら、Truncated-Pog1とPho85およびCdc28については相互作用が確認できたが、Pog1の全長と両キナーゼとの相互作用は検出されなかった。このことは、Pog1のN末端側の立体構造が両タンパク質との相互作用

に何らかの影響を及ぼしている可能性が考えられた。一方、CdkがPog1のキナーゼであると考えられたことから細胞周期におけるPog1のリン酸化を解析した。その結果、興味深いことに、Pog1のリン酸化レベルはG1期において高く、細胞周期がS期進行に伴って減少し、再び増加する傾向が観察された (Fig. 32)。

以上のことから、Pog1のリン酸化レベルは細胞周期依存的に制御されており、Dma2との相互作用も細胞周期によって変化することが示唆された (Fig. 42)。

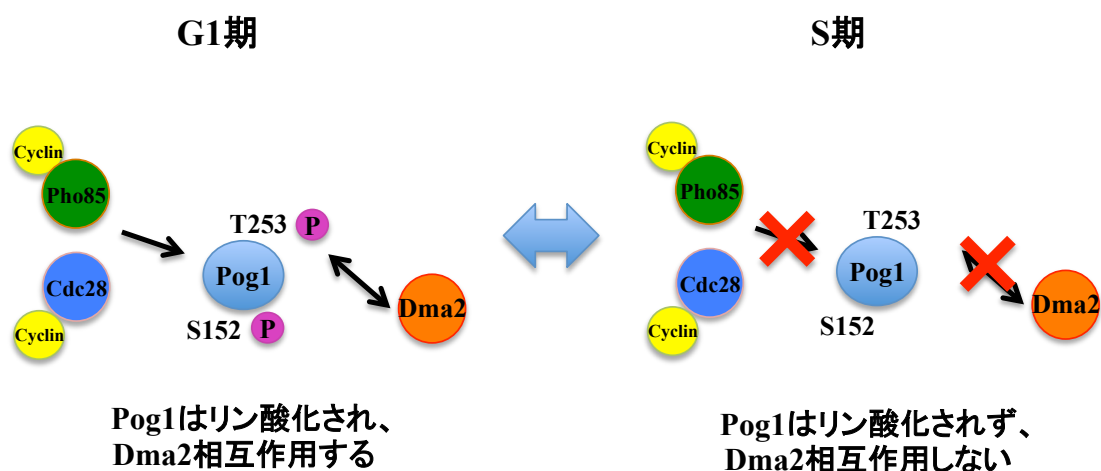


Fig. 42. Pog1の細胞周期依存的なリン酸化モデル

細胞周期におけるPog1のリン酸化制御およびDma2との相互作用モデル。細胞周期依存的にPog1はリン酸化され、Dma2との相互作用が制御されている。

#### 4-6. *POG1*の転写

Pog1は細胞周期依存的にリン酸化による機能制御を受けている可能性が明らかとなった (Fig. 31)。そこで、*POG1*の転写レベルにおいても細胞周期依存的に制御されているか、リアルタイムPCRを用いて解析した。その結果、細胞周期をG1期に同調した細胞の転写量と比較して、G1期からS期への細胞周期の進行に伴って*POG1*の転写が誘導され、細胞周期が進行するにつれ転写量は低下することが明らかとなった (Fig. 33)。



以上のことから、Pog1の細胞周期依存的なリン酸化による翻訳後修飾以外に、*POG1*は転写レベルにおいても制御されることが明らかとなり、細胞周期のG1/S期移行あるいはS期において転写が誘導されることが示唆された (Fig. 43)。

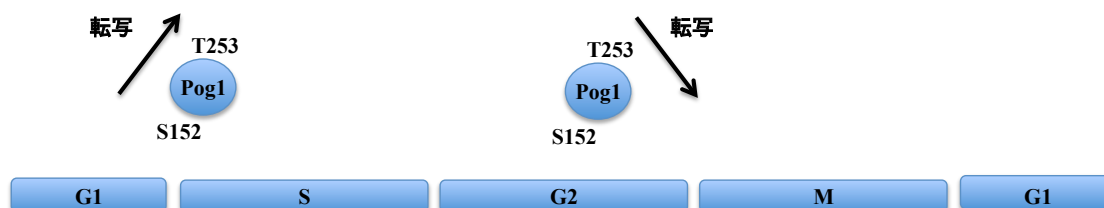


Fig. 43. 細胞周期における*POG1*の転写

*POG1*はG1/S期移行あるいはS期において転写が誘導され、細胞周期が進行するにつれ転写量は低下する

#### 4-7. Pog1とDma2の機能的関連性

Pog1とDma2との相互作用を解析した実験から、Thr253がリン酸化されたPog1とDma2のFHAドメインが相互作用することが示唆された。さらに、1) *POG1*および*DMA2*の両遺伝子を共過剰発現させることで、*POG1*の過剰発現による塩化リチウム耐性が抑制されること (Fig. 34)、2) *dma1 dma2* 二重破壊株においてPog1タンパク質が増加すること (Fig. 35)、3) Dma2との相互作用を阻害したアラニン置換型Pog1変異体タンパク質は野生株においても増加すること (Fig. 35)、4) Pog1タンパク質はユビキチン化されること (Fig. 38) を明らかにした。

以上の結果から、Pog1はDma2の基質であることが考えられた (Fig. 44)。

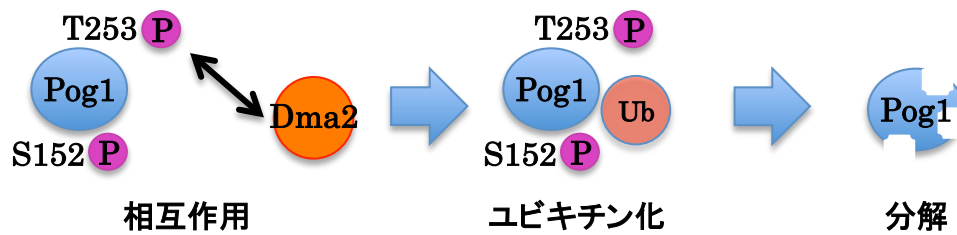


Fig. 44. Pog1とDma2の機能的関連性

リン酸化されたThr253とDma2が相互作用することで、Pog1はユビキチン化され、分解へと導かれる。

#### 4-8. 転写因子Pog1について

これまで報告からPog1は転写活性化因子であると推定され、推定転写遺伝子として96遺伝子が報告されている (19)。そこで、DNAマイクロアレイを行ったが、Pog1過剰発現によって報告されている96遺伝子の転写誘導を確認することが出来なかった。本研究において、Pog1が核に局在することを確認し、核局在しないTruncated-Pog1過剰発現はPog1過剰発現による表現型が見られなくなることを明らかにしている。そこで、Pog1が転写活性化因子であることを確認する必要があると考えられる。

#### 4-9. Pog1の分子機能と生理的役割

本研究において 1) *POG1*過剰発現株は塩化リチウム耐性のほかに、高温感受性および細胞形態異常を示すこと (Fig. 11&13)、2) Pog1は細胞質分裂を制御するユビキチンリガーゼであるDma2と相互作用すること (Fig. 21)、3) Pog1はリン酸化修飾されること (Fig. 24)、4) リン酸化されたPog1はDma2と相互作用すること (Fig. 25)、5) Pog1はDma2によってユビキチン化されること (Fig. 38)、6) Pog1のリン酸化は細胞周期依存的に変動し、G1期からS期進行に向けて減少すること (Fig. 32)、7) *POG1*の転写は細胞周期依存的に変動し、G1/S期移行あるいはS期進行に向けて転写が誘導されること (Fig. 23) を明らかにした。

これらの結果を総合的にまとめ、Pog1の分子機能および生理的役割を考察する。POG1は細胞周期がG1/S期移行あるいはS期移行においてその転写が誘導されること、また、S期においてPog1のリン酸化が減少すること、つまり、Dma2との相互作用が起こらず、分解が引き起されないと考えられることから、G1/S期移行あるいはS期において機能するタンパク質であることが示唆された。さらに、S期における機能としては、1) POG1過剰発現株の表現型として細胞形態異常が見られること、2) Pog1は細胞質分裂を制御しているユビキチンリガーゼDma2の基質であることから、細胞質分裂を抑制する機能が存在するのではないかと考えられた。*S. cerevisiae*はG1期後期からセプチン形成が始まり、出芽の形成が開始される。そこで、例えばPog1はDNAの複製が不完全である場合や、スピンドル形成が不十分な状態で娘細胞が母細胞から出芽しないように細胞質分裂を抑制しているのではないかと考えられる。また、Pog1は細胞質分裂の準備が整った後、チェックポイント機能を有しているDma2によって分解されることで、細胞周期が進行するのではないかと考えられる。以上のことから、Pog1の分子機能と生理的役割に関するモデルをFig. 45に示す。

また、実用パン酵母においては、POG1を過剰発現させることで、高ショ糖培地（高浸透圧ストレス）発酵力が著しく向上した（20）。その理由としては、POG1の過剰発現による塩化リチウム耐性で見られたようにストレス応答タンパク質が恒常的に発現するためではないかと考えられた。また、POG1の過剰発現は細胞周期にも何らかの影響を及ぼしている。*S. cerevisiae*はストレスに曝されると細胞周期を停止し、ストレス遺伝子の転写を誘導することでストレスに適応する機構が存在する。POG1の過剰発現株が示す細胞周期の抑制とストレス耐性の表現型から、POG1はストレス下に作用する機能があるのかもしれない。また、POG1の発現を人為的かつ細胞のストレス応答に最適化した制御を行うことでさらなるストレス耐性酵母の育種につながる可能性がある。

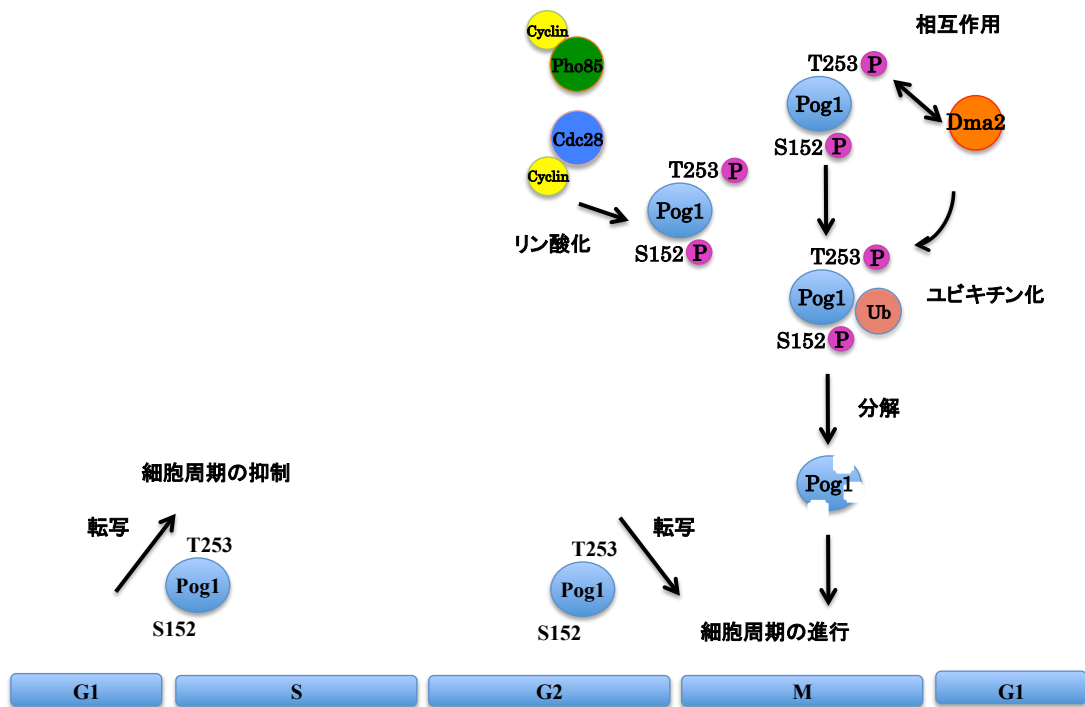


Fig. 45. Pog1 の分子機能と生理的役割

1) S 期において転写された *POG1* は細胞周期を抑制する、2) Pog1 は細胞周期依存的に Cdk によってリン酸化される (Ser152 および Thr253)。3) リン酸化された Pog1 は Dma2 の FHA ドメインと相互作用する。3) Dma2 は Pog1 にユビキチンを付加する。4) ユビキチン化された Pog1 は分解へと導かれる。5) Pog1 を分解することで Dma2 によるチェックポイントが機能し、細胞周期が進行する。また、*POG1* 過剰発現株が示す表現型 (塩化リチウム耐性、高温感受性および形態異常) の分子機構としては、Pog1 タンパク質を過剰にかつ細胞周期非依存的に発現させることで、細胞周期を通じて細胞内に Pog1 タンパク質が増加し、適切な細胞周期の進行のために必要とされる Pog1 タンパク質の抑制が不十分となるからであると考えられる。そのため、細胞周期の進行を抑制する Pog1 タンパク質の機能に起因して各表現型が現れる可能性がある。また、*POG1* の過剰発現が引き起こす G1 期における細胞周期の遅延においても、本来は抑えられるべき Pog1 タンパク質が G1 期において機能する可能性が存在するのかもしれない。

本研究では *POG1* の機能を制御する分子機構として、1) 転写レベルでの制御、2) リン酸化による制御、3) ユビキチン化によるタンパク質レベルの量的制御を明らかにした。また、**Pog1** には細胞周期を適切に進行させるために、細胞質分裂を抑制する機能が存在するのではないかと考えている。しかしながら、現段階では **Pog1** タンパク質がどのように細胞質分裂を抑制しているのかは不明である。今後は *POG1* を過剰発現させても、各表現型が抑制される遺伝子破壊株を取得することで、**Pog1** によって制御されている遺伝子またはタンパク質の同定し、**Pog1** の分子機能を明らかにできると考えている。

## 5. 謝辞

本研究の遂行ならびに論文の作製において直接ご指導下さいました奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科 ストレス微生物科学研究室の高木博史教授に厚くお礼申し上げます。

また、日頃より様々なご助言を下された同研究室の吉田信行助教（現 静岡大学 工学部 准教授）、大津巖生助教、渡辺大輔助教、森ヶ崎 進博士（現 同大学院大学 細胞シグナル研究室 博士研究員）、佐々木俊弥博士（現 株式会社ネオ・モルガン研究所）、喜多島 萌氏（株式会社 CAC エクシケア）をはじめ、一緒に研究生生活を過ごした中で成長させていただき、ご討論して下さいました同研究室の皆様にお礼申し上げます。

MIP-MS による細胞内リチウム含量測定には本学物質創成科学研究科の藤原正裕技術職員に大変お世話になりました。また、LC-MS/MS によるリン酸化の解析には本バイオサイエンス研究科の深尾陽一郎特任准教授ならびに倉田理恵技術職員に大変お世話になりました。お礼申し上げます。

最後に、これまで心身ともに支え続けてくれた両親ならびに兄弟に心から感謝の意を表します。本当に有難うございました。

## 6. 参考文献

- 1) 大隈 良典, 下田 親 (2007) 酵母のすべて 一系統、細胞から分子まで, (シュプリンガー・ジャパン株式会社), pp.293-304.
- 2) Dohlman, HG. & Slessareva, JE. (2006) Pheromone signaling pathway in yeast. *Sci STKE*, **364**, 3642006cm6
- 3) Hirata, D., Harada, S., Namba, H. & Miyakawa, T. (1995) Adaptation to high-salt stress in *Saccharomyces cerevisiae* is regulated by Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent phosphoprotein phosphatase(calucineurin) and cAMP-dependent protein Kinase. *Mol Gen Genet*, **249**, 257-264.
- 4) Mendoza, I., Rubio, F., Rodriguez-Navarro, A. & Pardo JM. (1994) The proteins phosphatase calucineurin is essential for NaCl tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, **25**, 8792-8796.
- 5) Saito, H. & Posas, F. (2012) Response to hyperosmotic stress. *Genetics*, **192**, 289-318.
- 6) Takagi, H. (2008) Proline as a stress protectant in yeast: physiological function, metabolic regulations, and biotechnological applications. *Appl Microbiol Biotechnol*, **81**, 211-223.
- 7) Takagi, H. (2009) Novel yeast acetyltransferase Mpr1 regulates reactive oxygen species mediated by proline metabolism. *Seikagaku*, **81**, 891-895.
- 8) Nishimura, A., Kawahara, N. & Takagi, H. (2013) The flavoprotein Tah18-dependent NO synthesis confers high-temperature stress tolerance on yeast cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **430**, 137-143.
- 9) Hoshikawa, C., Shichiri, M., Nakamori, S. & Takagi, H. (2003) A nonconserved Ala401 in the yeast Rsp5 ubiquitin ligase is involved in degradation of Gap1 permease

and stress-induced abnormal proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, **100**, 11505-11510.

10) Dupre, S., Urban-Grimal, D., & Haguenaer-Tsapis, R. (2004) Ubiquitin and endocytic internalization in yeast and animal cells. *Biochim Biophys Acta*, **1695**, 89-111.

11) Wang, G., Yang, J. & Huibregtse JM. (1999) Functional domains of the Rsp5 ubiquitin-protein ligase. *Mol. Cell. Biol*, **19**, 342–352.

12) Somesh, BP., Sigurdsson, S., Saeki, H., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. & Svelstrup, JG. (2007) Communication between distant sites in RNA polymerase II through ubiquitylation factors and the polymerase CTD. *Cell*, **129**, 57-68.

13) kaliszewski, P., Szkopinska, A., Ferreira, T., Swiezewska, E., Berges, T. & Zoladek, T. (2008) Rsp5 ubiquitin ligase and the transcriptional activators Spt23p and Mga2p are involved in co-regulation of biosynthesis of end products of the mevalonate pathway and triacylglycerol in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta*, **10**, 627-634.

14) Fujii, K., Kitabatake, M., Sakata, T., Miyata, & Ohno, M. (2009) A role of ubiquitin in the clearance of nonfunctional rRNAs. *Genes Dev*, **23**, 963-974.

15) Haitani, Y. & Takagi, H. (2008) Rsp5 is required for the nuclear export of mRNA of HSF1 and *MSN2/4* under stress conditions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Cells*, **13**, 105-116.

16) Hiraishi, H., Shimada, T., Ohtsu, I., Sato, T. & Takagi, H. (2009) The yeast ubiquitin ligase Rsp5 downregulates the alpha subunit of nascent polypeptide-associated complex Egd2 under stress conditions. *FEBS J*, **276**, 5287-5297.

17) Demae, M., Murata, Y., Hisano, M., Haitani, Y., Shima, J. & Takagi, H. (2007) Overexpression of two transcription factors, Kin28 and Pog1, suppresses the stress



sensitivity caused by the *rsp5* mutation in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Lett*, **277**, 70-78.

18) Leza, MA. & Elion, EA. (1999) POG1, a novel yeast gene, promotes recovery from pheromone arrest via the G1 cyclin CLN2. *Genetics*, **151**,531-543.

19) Horak, C., Luscombe, NM., Qian, J., Bertone, P., Piccirillo, S., Gerstein, M. & Snyder, M. (2002). Complex transcriptional circuitry at the G1/S transition in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev*, **16**, 3017-3033.

20) Sasano, Y., Haitani, Y., Hashida, K., Oshiro, S., Shima, J. & Takagi, H. (2013) Improvement of fermentation ability under baking-associated stress conditions by altering the POG1 gene expression in baker's yeast. *Int J Food Microbiol*, **165**, 241-245.

21) Kishi, T., Ikeda, A., Nagao, R. & Koyama, N. (2007) The SCF<sup>Cdc4</sup> ubiquitin ligase regulates calcineurin signaling through degradation of phosphorylated Rcn1, an inhibitor of calcineurin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, **104**, 17418-17423.

22) Kishi, T., Ikeda, A., Koyama, N., Fukada, J. & Nagao, R. (2008) A refined two-hybrid system reveals that SCF(Cdc4)-dependent degradation of Swi5 contributes to the regulatory mechanism of S-phase entry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, **105**, 14497-14502.

23) Garciadeblas, B., Rubio, F., Qulntero, FJ., Banuelos, MA., Haro, R. & Rodriguez-Navarro, A. (1993) Differential expression of two genes encoding isoforms of the ATPase involved in sodium efflux in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet*, **236**, 363-368.

24) Ruiz, A. & Arino, J. (2007) Function and regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* ENA sodium ATPase system. *Eukaryot Cell*, **12**, 2175-2183.

- 25) Cassani C., Raspelli E., Santo N., Chirolì., Lucchini G. & Fraschini R. (2013) *Saccharomyces cerevisiae* Dma proteins participate in cytokinesis by controlling two different pathways. *Cell cycle*, **12**, 2794-2808.
- 26) Merlini L., Fraschini R., Boettcher B., Barral Y., Lucchini G. & Piatti S. (2012) Budding yeast dma proteins control septin dynamics and the spindle position checkpoint by promoting the recruitment of the Elm1 kinase to the bud neck. *PLoS Genet*, **8**, e1002670.
- 27) Raspelli E., Cassani C., Lucchini G. & Fraschini R. (2011) Budding yeast Dma1 and Dma2 participate in regulation of Swe1 levels and localization. *Mol Biol Cell*, **22**, 2185-2197.
- 28) Brooks L 3<sup>rd</sup>., Heimsath, EG Jr., Loring, GL. & Brenner, C. (2008) FHA-RING ubiquitin ligases in cell division cycle control. *Cell Mol Life Sci*, **65**, 3458-3466.
- 29) Fraschini, R., Bilotta, D., Lucchini, G. & Piatti, S. (2004) Functional Characterization of Dma1 and Dma2, the Budding Yeast Homologues of *Schizosaccharomyces pombe* Dma1 and Human Chfr. *Mol Biol Cell*, **15**, 3796-3810.
- 30) Bieganowski, P., Shilinski, K., Tschikis, PN. & Brenner, C. (2004) Cdc123 and checkpoint forkhead associated with RING proteins control the cell cycle by controlling eIF2gamma abundance. *J Biol Chem*, **279**, 44656-44666.
- 31) Yu, H., Braun, P., Yildirim, MA., Lemmens, I., Venkatesan, K., Sahalie, J., Hirozane-Kishikawa, T., Gebreab, F., Li, N., Simonis, N., Hao, T., Rual, JF., Dricot, A., Vazquez, A., Murray, RR., Simon, C., Tardivo, L., Tam, S., Svrikapa, N., Fan, C., de Smet, AS., Motyl, A., Hudson, ME., Park, J., Xin, X., Cusick, ME., Moore, T., Boone, C., Snyder, M., Roth, FP., Barabasi, AL., Tavernier, J., Hill, DE. & Vidal, M. (2008) High-quality binary protein interaction map of the yeast interactome network. *Science*, **322**, 104-110.

- 32) Ubersax, JA., Woodbury, El., Quang, PN., Paraz, M., Blethrow, JD., Shah, K., Shokat, KM. & Morgan, DO. (2003) Targets of the cyclin-dependent kinase Cdk1. *Nature*, **425**, 859-864.
- 33) Murray, M. & Greenberg, M.L. (2000) Expression of yeast *INM1* encoding inositol monophosphatase is regulated by inositol, carbon source and growth stage and is decreased by lithium and valproate. *Mol. Microbiol*, **36**, 651-661.
- 34) Vaden, D.L., Ding, D., Peterson B. & Greenberg M.L. (2001) Lithium and valproate decrease inositol mass and increase expression of the yeast *INO1* and *INO2* genes for inositol biosynthesis. *J. Biol. Chem*, **276**, 15466-15471.
- 35) Phiel, C.J. & Klein, P.S. (2001) Molecular targets of lithium action. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **41**, 789-813.