酵母における *RAS/cAMP* シグナル伝達経路による増殖制御†

田中一馬, 東江昭夫

(東京大学理学部)

酵母, 動物細胞を問わず, 真核細胞の増殖は主として G1 期において制御されている。増殖因子が存在する間, 細胞は増殖を続けるが, 増殖因子がなくなると, 細胞は分裂を G1 期で停止する。酵母等の単細胞真核生物ではこれら増殖因子は炭素源や窒素源といった栄養源に相当する。酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の場合 (以下酵母と略す), 栄養源枯渇により G1 期停止した細胞は, 栄養成長期の G1 期細胞とは生理的に違った状態にある。これらの細胞では栄養増殖時に合成される蛋白質の合成量は低下しており, かわりに, ストレス蛋白質に代表される一群の蛋白質の発現がみられる。G1 期で停止した細胞は熱や飢餓といったストレスに対する耐性を獲得しており, また, 二倍体細胞は 1% 程度の酢酸カリウムを含む培地で培養すると減数分裂過程を経て孢子形成することができる。これに対し, 培地の栄養が十分にあるときは, 細胞分裂後の G1 期の細胞は停止せず, 次の分裂過程を開始する。

以上のような複雑な生理的变化は, 細胞が細胞外の栄養状態を感知し, その情報を核や細胞内の随所へ伝え, 種々の遺伝子の発現や蛋白質の修飾等を介して行われると考えられる。この, 膜から核へのシグナルの少なくとも一部を担っていると考えられるのが, *RAS/cAMP* シグナル伝達経路である。

1. *RAS/cAMP* シグナル伝達経路

現在明らかにされている, *RAS/cAMP* 経路の全体像を図 1 に, 主な構成遺伝子について表 1 に示した。結論から言うと, *RAS/cAMP* 経路は, 培地の栄養状態という情報を, 次のような過程を通じて細胞内へ伝えていると考えられる。良好な栄養条件→*CDC 25* 蛋白質の活性

化, あるいは *IRA 1/IRA 2* 蛋白質の不活性化→GTP 結合型 *RAS* 蛋白質の増加→アデニル酸シクラーゼ (*CYR 1* 遺伝子産物) の活性化→*cAMP* 量の増加→*cAMP* 依存プロテインキナーゼ (*BCY 1*, *TPK 1/TPK 2/TPK 3* 遺伝子産物) の活性化→細胞増殖。これに対し, 栄養条件が悪い場合, 各蛋白質は逆の制御を受け, 結果的には *cAMP* 依存プロテインキナーゼ活性が低下することにより, 細胞は G1 期で停止する。各遺伝子は正の制御に働いているか, 負の制御に働いているかにより, 大きく 2 つに分けることができる。正制御の代表的なものは *CDC 25*, *RAS 1/RAS 2*, *CYR 1*, *TPK 1/TPK 2/TPK 3* 遺伝子等で, これらの遺伝子の変異は新たな細胞分裂を開始することができず, 致死となる。これに対し, *IRA 1/IRA 2*, *PDE 1/PDE 2*, *BCY 1* 等は *RAS* 経路を負に制御する遺伝子であり, これらの遺伝子の変異は, 栄養源の枯渇にตอบสนองして G1 期で停止することができない。以下, これら *RAS/cAMP* 経路を形成する遺伝子について, もう少し詳しくみてみよう。

2. *RAS1/RAS2* と *CYR1* 遺伝子

前に述べたように, *RAS 1/RAS 2* 遺伝子は, ヒト *ras* 発癌遺伝子のホモログであり, 両者は構造的, 機能的によく似通っていることが示されている^(1,2)。 *ras* の C 末端はファルネシル基による修飾を受け, これにより *ras* 蛋白質は細胞膜に局在する。 *ras* 蛋白質は, いわゆるグアニンヌクレオチド結合蛋白質であり, GTP あるいは GDP に結合し, また, 弱い GTP 加水分解活性を有する。 *RAS* 蛋白質のシグナル伝達因子としての活性は, どちらのグアニンヌクレオチドに結合しているかにより制御されている。すなわち, GTP 結合型は活性型としてエフェクターである *CYR 1* 産物⁽³⁾を活性化するが, GDP 結合型はこの点において不活性型である^(4,5)。アデニル酸シクラーゼは分子量約 240 kd のポリペプチドで, やはり細胞膜に局在する。 *RAS* による *CYR 1* 産物の活性化には, *SRV 2/CAP 1* 蛋白質が必要であ

† Growth Control of Yeast by the *RAS/cAMP* Signalling Pathway.
Kazuma TANAKA and Akio TOH-E (Department of Biology, Faculty of Science, University of Tokyo, Tokyo 113)

図 1 酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の RAS/cAMP 経路
RAS/cAMP 経路において機能する主な遺伝子をシグナルの流れに沿って示した。

表 1 RAS/cAMP シグナル伝達経路にかかわる遺伝子

遺伝子	遺伝子産物の機能あるいは活性
<i>RAS1/RAS2</i>	ras 発癌遺伝子産物のホモログ。GTP/GDP 結合活性および GTPase 活性を有する。
<i>CDC25</i>	RAS 蛋白質の結合ヌクレオチドを交換することにより RAS を活性化。
<i>IRA1/IRA2</i>	高等動物における GAP に相当する。RAS の GTPase 活性を活性化することにより, RAS の機能を負に制御する。
<i>CYR1(CDC35)</i>	アデニル酸シクラーゼ。
<i>CAP1 (SRV2)</i>	アデニル酸シクラーゼに結合している 70 kd 蛋白質。RAS によるアデニル酸シクラーゼの活性化に必要。
<i>PDE1/PDE2</i>	cAMP フォスフォジエステラーゼ。cAMP を分解。
<i>BCY1</i>	cAMP 依存性プロテインキナーゼ調節サブユニット。
<i>TPK1/TPK2/TPK3</i>	cAMP 依存性プロテインキナーゼ触媒サブユニット。

る^(6,7)。CAP1 は分子量 70 kd の蛋白質であり, CYR1 産物と *in vivo* において強く結合している (1% Lubrol-PX, 0.5 M NaCl 存在下で解離しない)。RAS による CYR1 産物の活性化機構はまだ詳細には明らかにされておらず, RAS が CYR1 と直接相互作用するのか, あるいは CAP1 を介して CYR1 を活性化するのか, またあるいは CAP1, CYR1 両方と相互作用するのかは, 今後明らかにされるべき問題である。

ヒトを含む, 高等動物細胞のみならず, 分裂酵母でも ras によるシグナル伝達経路は精力的に研究されているが, これらにおいて, ras が直接制御するエフェクターが何であるのか, まだ明らかにされていない。ヒト ras

産物が酵母のアデニル酸シクラーゼを活性化し, また, 一部改変した酵母 RAS 遺伝子がヒト細胞をトランスフォームすることが示されており, したがって, *Saccharomyces* 酵母の系とのアナロジーから, 当初これらにおいてもアデニル酸シクラーゼがエフェクターである可能性が想定され, 積極的に調べられたが, 結果はすべて否定的であり, 現在では, 高等動物や分裂酵母では ras のエフェクターはアデニル酸シクラーゼではないとする考え方が優勢である⁽⁸⁻¹⁰⁾。これが現在 ras 経路の研究において今後解決されるべき, もっともホットな問題となっている。

3. RAS の制御遺伝子, CDC25 と IRA1/IRA2

細胞外の栄養状態というシグナルは、まず RAS の GTP/GDP 結合状態に翻訳されるわけであるが、この制御にかかわっているのが CDC25 および IRA1, IRA2 遺伝子である。CDC25 遺伝子は RAS の正の制御遺伝子であり、GTP に結合した RAS 蛋白質の生成に必要である。CDC25 蛋白質の生化学的活性は RAS に結合した GDP を GTP へと交換する反応の促進であると考えられていたが⁽¹¹⁻¹³⁾、最近実際にこのことが *in vitro* で示された⁽¹⁴⁾。IRA1, IRA2 は筆者らが研究している遺伝子で、その機能は RAS の負制御、すなわち GTP 結合型の RAS を GDP 結合型へと導くことにある^(15,16)。IRA2 の生化学的活性は RAS 蛋白質が持つ弱い GTPase を活性化することであり、いわゆる GAP (GTPase Activating Protein) ファミリーに属する。

細胞外栄養状態がなんらかの形で CDC25 や IRA1/IRA2 蛋白質の活性に反映されていることはほぼ間違いないであろうが、これがどのような機構によるものなのか、まだ明らかにされてはいない。ただ、グルコースが cAMP 合成を刺激することが知られており、この方面から次第に明らかにされてゆくことを期待したい。

4. BCY1, TPK1/TPK2/TPK3 遺伝子

アデニル酸シクラーゼにより合成された cAMP は cAMP 依存性プロテインキナーゼ (cAPK) を活性化し、種々の蛋白質がリン酸化されることにより、細胞増殖過程が進行すると考えられる。cAPK は調節サブユニット 2 つと触媒サブユニット 2 つからなるヘテロテトラマーで、調節サブユニットは BCY1 遺伝子に⁽¹⁷⁾、触媒サブユニットは TPK1/TPK2/TPK3 遺伝子によりコードされる⁽¹⁸⁾。調節サブユニットは触媒サブユニットに結合することによりその活性を阻害しており、cAMP が調節サブユニットに結合すると触媒サブユニットが遊離し、活性化される。現在までのところ、cAPK によりリン酸化され、細胞増殖を進行させるターゲット蛋白質についてはまだよくわかっていない。

図には示さなかったが、RAS/cAMP 経路にかかわるプロテインキナーゼに、さらに SCH9 と YAK1 が知られている。SCH9 は発現量が増すと TPK プロテインキナーゼの増殖に必要な機能を肩代わりできるものであるが、sch9 単独変異株は増殖速度の低下を示す⁽¹⁹⁾。TPK1/TPK2/TPK3 遺伝子の場合、おのおのの単独変異がとくに表現型を持たないことから、SCH9 は固有の機能

を持っていると考えられる。YAK1 遺伝子の変異は TPK1/TPK2/TPK3 変異の増殖不能を抑圧することができるが、yak1 単独変異株はとくに表現型を持たない⁽²⁰⁾。yak1 変異がどのようなメカニズムで、tpk 変異を抑圧するのか、そのメカニズムに興味を持たれる。

おわりに

これまでに明らかにされてきた、RAS/cAMP 経路の全容について、かいつまんで述べさせていただいた。より詳しくは、優れた総説が出ているので参照いただきたい⁽²¹⁾。この経路において使われている遺伝子 (蛋白質) は、高等動物のシグナル伝達経路において多用される、著名なものばかりであり、酵母の系が真核細胞におけるシグナル伝達経路研究のモデル系として、格好のものであることがわかりいただけると思う。RAS/cAMP 経路の研究において、今後解明されるべき点は次の 3 つに集約されよう。(1) 細胞外栄養のシグナルがどのように CDC25 や IRA1/IRA2 に伝えられているのか。(2) cAPK の下流に存在し、酵母細胞の G1 期制御にかかわるリン酸化ターゲット蛋白質およびその遺伝子の同定。(3) RAS 蛋白質が CYR1 産物を活性化する際の分子機構。近い将来に新たな発展がみられることを期待したい。

- (1) S. Powers, T. Kataoka, O. Fasano, M. Goldfarb, J. Strathern, J. Broach, and M. Wigler: *Cell*, **36**, 607-612 (1984).
- (2) D. Defeo-Jones, E. Scolnick, R. Koller, and R. Dhar: *Nature*, **306**, 707-709 (1983).
- (3) T. Kataoka, D. Broek, and M. Wigler: *Cell*, **43**, 493-505 (1985).
- (4) T. Toda, I. Uno, T. Ishikawa, S. Powers, T. Kataoka, D. Broek, S. Cameron, J. Broach, K. Matsumoto, and M. Wigler: *Cell*, **40**, 27-36 (1985).
- (5) J. Field, J. Nikawa, D. Broek, B. MacDonald, L. Rodgers, I. A. Wilson, R. A. Lerner, and M. Wigler: *Mol. Cell. Biol.*, **8**, 2159-2165 (1988).
- (6) J. Field, A. Vojtek, R. Ballester, G. Bolger, J. Colicelli, K. Ferguson, J. Gerst, T. Kataoka, T. Michaeli, S. Powers, M. Riggs, L. Rodgers, I. Wieland, B. Wheland, and M. Wigler: *Cell*, **61**, 319-327 (1990).
- (7) M. Fedor-Chaiken, R. J. Deschenes, and J. R. Broach: *Cell*, **61**, 329-340 (1990).
- (8) C. Birchmeier, D. Broek, and M. Wigler: *Cell*, **43**, 615-621 (1985).
- (9) S. K. Beckner, S. Hattori, and T. Y. Shih: *Nature*, **317**, 71-72 (1985).

- (10) Y. Fukui, T. Kozasa, Y. Kaziro, T. Takeda, and M. Yamamoto : *Cell*, **44**, 329—336 (1986).
- (11) D. Broek, T. Toda, T. Michaeli, L. Levin, C. Birchmeier, M. Zoller, S. Powers, and M. Wigler : *Cell*, **48**, 789—799 (1987).
- (12) L. Robinson, J. B. Gibbs, M. S. Marshall, I. S. Sigal, and K. Tatchell : *Science*, **235**, 1218—1221 (1987).
- (13) J. H. Camonis, M. Kalekine, B. Gondre, H. Garreau, E. Boy-Marcotte, and M. Jacquet : *EMBO J.*, **5**, 375—380 (1986).
- (14) S. Jones, M.-L. Vignais, and J. R. Broach : *Mol. Cell. Biol.*, **11**, 2641—2646 (1991).
- (15) K. Tanaka, K. Matsumoto, and A. Toh-e : *Mol. Cell. Biol.*, **9**, 757—768 (1989).
- (16) K. Tanaka, M. Nakafuku, F. Tamanai, Y. Kaziro, K. Matsumoto, and A. Toh-e : *Mol. Cell. Biol.*, **10**, 4303—4313 (1990).
- (17) T. Toda, S. Cameron, P. Sass, M. Zoller, J. D. Scott, B. McMullen, M. Hurwitz, E. G. Krebs, and M. Wigler : *Mol. Cell. Biol.*, **7**, 1371—1377 (1987).
- (18) T. Toda, S. Cameron, P. Sass, M. Zoller, and M. Wigler : *Cell*, **50**, 277—287 (1987).
- (19) T. Toda, S. Cameron, P. Sass, and M. Wigler : *Genes Dev.*, **2**, 517—527 (1988).
- (20) S. Garrett and J. Broach : *Genes Dev.*, **3**, 1336—1348 (1989).
- (21) J. B. Gibbs and M. Marshall : *Microbiol. Rev.*, **53**, 171—185 (1989).