



免疫抑制薬感受性とクロライドイオン超感受性を示す分裂cis2変異体の単離と解析

夏, 宇杰
張, 英杰
呂, 亜濱
杉浦, 麗子

(Citation)

神戸大学医学部紀要, 60(2/3/4):177-184

(Issue Date)

2000-03

(Resource Type)

departmental bulletin paper

(Version)

Version of Record

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/00042543>



免疫抑制薬感受性とクロライドイオン超感受性

を示す分裂酵母*cis2*変異体の単離と解析

夏 宇杰, 張 英杰, 呂 亜濱, 杉浦 麗子

神戸大学医学部薬理学教室

(指導: 久野 高義教授)

連絡先: 神戸市中央区楠町7-5-1

神戸大学医学部薬理学教室(078-382-5442)

(平成12年1月18日受付)

要 約

免疫抑制薬はイムノフィリンと複合体を形成してカルシニューリン活性を阻害する。カルシニューリンは、すべての真核生物において非常に保存されており、分裂酵母ゲノム中にも1コピーのカルシニューリン遺伝子が存在する。免疫抑制薬を分裂酵母細胞に作用させるとカルシニューリン遺伝子を破壊した場合と同じく、通常の培地中での増殖には影響を及ぼさないが、細胞質分裂異常とクロライドイオン超感受性を示した。この結果に基づき、免疫抑制薬感受性とクロライドイオン超感受性を示す*cis* (chloride-and-immunosuppressant-sensitive) 変異体の単離を行った。*cis2*変異体は*cis*表現型に加えて、細胞質分裂異常、cell wall integrity異常を示した。*cis2*⁺遺伝子は2型のミオシン重鎖をコードしていた。*cis2*⁺遺伝子破壊は致死ではなく、免疫抑制薬感受性も示さなかったが、クロライドイオン超感受性を示した。*cis2*変異体および*cis2*⁺遺伝子破壊体のクロライドイオン超感受性は構成的活性を持つカルシニューリンの過剰発現、あるいはPmk1マップキナーゼホスファターゼであるPmp1の過剰発現により抑圧された。以上より、分裂酵母のクロライドイオン調節機構は、2型ミオシン重鎖を介してカルシニューリンとPmk1マップキナーゼ経路により拮抗的に調節を受けていることが示唆された。

緒 言

カルシニューリンは哺乳動物の中枢神経系に豊富に存在するCa²⁺/カルモジュリン依存性蛋白質脱リン酸化酵素である。更に、中枢神経系のみならず全身の組織に広く存在し、酵母からヒトに至るすべての真核

生物において、非常に保存された蛋白質であることが知られている^{1, 2)}。免疫抑制薬タクロリムス(FK506)およびシクロスポリンAは、イムノフィリンと複合体を形成し、カルシニューリンの酵素活性を阻害することにより免疫抑制作用を発揮する³⁾。近年、免疫抑制薬を用いた薬理実験によりカルシニューリンが細胞増殖や分化、細胞周期、アポトーシスおよび細胞内輸送などの多彩な機能に関与していることが明らかにされてきた。これらの多彩な細胞機能におけるカルシニューリンの作用機構を分子レベルで明らかにするには、カルシニューリンと機能的に関連する分子を単離および同定し、その機能を解析することが不可欠である。しかし、従来の生化学的手法あるいは高等動物細胞系のみでは標的分子を同定、解析することは困難であった。

分裂酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)は、強力な分子遺伝学的解析が可能な優れたモデル生物系として、細胞周期や細胞内情報伝達系などの細胞機能の解明に貢献してきた。分裂酵母細胞に免疫抑制薬を作用させても通常の培地における細胞増殖に影響はないが、細胞形態異常⁴⁾とクロライドイオン超感受性^{5, 6)}を示した。この表現型はカルシニューリン遺伝子(*ppb1*⁺)を破壊した場合と同様であったことから、分裂酵母においても免疫抑制薬がカルシニューリンの特異的阻害として作用することが示された⁴⁻⁶⁾。この実験結果に基づき、細胞増殖にカルシニューリンが必須である変異体、すなわち免疫抑制薬により生育不可能となる変異体でかつクロライドイオン超感受性を示す変異体(chloride and immunosuppressant-sensitive (*cis*) mutant)の単離と解析を行った。これらの変異体では、細胞増殖やクロライドイオン調節において、カルシニューリンと機能的に関連する遺

キーワード: カルシニューリン, 免疫抑制薬, クロライドイオン, 2型ミオシン重鎖, 分裂酵母

伝子に変異が起こっていることが予想される。

今回、我々は*cis*変異体のうち著しい細胞形態異常および細胞壁異常を示す*cis2*変異体についての解析結果を報告する。

方 法

1. 使用した株、培養条件および試薬

本研究で用いた分裂酵母株を以下に示す。HM123 (*h⁻leu1*, 野生株), KP877 (*h⁻leu1 cis2*, *cis2*変異体), KP502 (*h⁻leu1 ura4 cis2 ::ura4⁺*, *cis2⁺*遺伝子破壊株)。酵母細胞の培養にはYPD培地 (1% yeast extract, 2% polypeptone, 2% dextrose) およびEMM培地⁷⁾を用いた。分裂酵母の遺伝子学的操作はMorenoら (1991) の方法⁷⁾に従って行った。分裂酵母細胞の形質変換は酢酸リチウム法⁸⁾によって行った。FK506は藤沢薬品工業より供与された。分子生物学的操作についてはSambrookら (1989) らの方法⁹⁾に従って行った。

2. *cis2*変異体の単離

ニトロソグアニジン (N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine) で突然変異を誘発した分裂酵母野生株HM123 (*h⁻leu1*) をスクリーニングし、0.5 μg/ml FK506に対する感受性かつ MgCl₂ 0.15Mに対する感受性を示す変異体を分離した。相補性試験の結果、これらは5つの遺伝座位に分裂され、*cis1*~5と名付けた。

3. *cis2⁺*遺伝子クローニング

酢酸リチウム法により*cis2*変異体を分裂酵母遺伝子ライブラリーで形質転換し、多コピーで*ci2*変異体の表現型を抑圧するプラスミドを得た。この取得した遺伝子が*cis2*変異体の原因遺伝子であることをintegration mapping により確認した。ダイデオキシ法により遺伝子の塩基配列を決定した。

4. 遺伝子破壊

cis2⁺ 遺伝子破壊は相同組換えによる one-step gene disruption¹⁰⁾ により行った。*cis2⁺* 遺伝子の翻訳領域内の1.95kb *Bg*/II断片を1.8kb *ura4⁺* 遺伝子断片で置き換えた構築を作製した。この構築で2倍体細胞を形質転換し、選択培地上で、染色体遺伝子内にintegrationされた形質転換体を分離し、四分子解析を行った。遺伝子破壊の確認はサザンハイブリダイゼーションおよびPCRにより行った。

5. cell wall integrity 測定

細胞をTE buffer (10 mM Tris-HCl, pH7.5, 1mM EDTA, 1mM 2-mercaptoethanol) で洗浄後β-glucanase (100 μg/ml, Zymolyase) を含む5ml TE buffer中で激しく震盪し (at 30°C), 600 nmの吸光度を経時的に測定する事で細胞融解をモニターした。

結 果

1. *cis2*変異体の表現型

野生株に高濃度のタクロリムスあるいはシクロスポリンAを作用させても、生育に影響を与えなかったが、*cis2*変異体は低濃度のFK506 (0.5 μg/ml) あるいはシクロスポリンA (10 μg/ml) に対して強い感受性を示した (図1)。また、クロライドイオン感受性を検討したところ、*cis2*変異体はMgCl₂とKClに対して超感受性を示した (図1)。しかし、高濃度のソルビトールに対しては野生株と同程度の感受性を示した (データ提示せず)。

次に細胞壁消化酵素であるβ-glucanaseに対する感受性を検討した。*cis2*変異体は野生株と比較して、β-glucanaseに対して強い感受性を示した (図2)。この結果から、*cis2*変異はcell wall integrityの異常を引き起こすことが示唆された。

2. *cis2*変異体の細胞形態

*cis2*変異体は、細胞質分裂の異常 (多隔壁) と細胞極性の異常がみられた (図3)。

3. *cis2⁺*遺伝子のクローニング

cis2⁺ 遺伝子を単離するために、*cis2*変異体を分裂酵母遺伝子ライブラリーで形質転換し、表現型を相補するクローンをスクリーニングした。約10万のLeu⁺形質転換体から、FK506プレート上および0.15MMgCl₂を含むプレート上で生育可能なクローンを7個得た。制限酵素パターンおよびサザンハイブリダイゼーションの結果から、これらはすべて同一の遺伝子由来の断片を含んでおり、integration mappingの結果、*cis2⁺* 遺伝子であることが示された。*cis2⁺* 遺伝子を含む多コピーシャトルベクターを変異体に導入すると変異体の免疫抑制薬感受性とクロライドイオン超感受性は抑圧された (図4 A)。また、*myo2⁺* 遺伝子の過剰発現によっても部分的に抑圧された (図4 A)。*cis2*変異体の表現型を相補する最小の断片の塩基配列を決定したところ、6,312塩基対のopen reading frameを含み、2,104アミノ酸からなる蛋白質をコードしてい

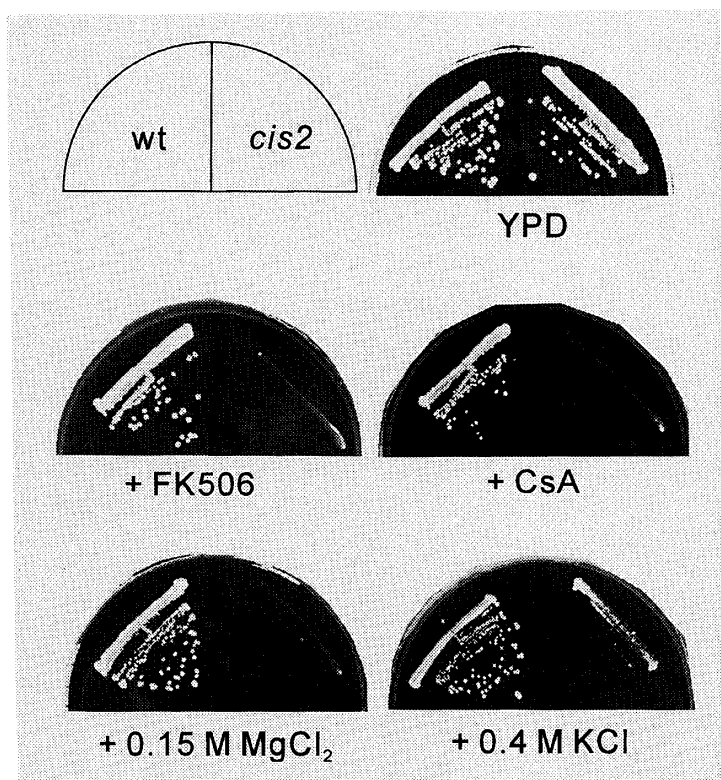


図1 : *cis2*変異体の表現型

*cis2*変異体は免疫抑制薬感受性かつクロライドイオン超感受性を示す。すべてYPD培地で、FK506プレートはFK506 0.5 μ g/ml を、シクロスポリン (CsA) プレートはCsA 50 μ キメモリを含む。

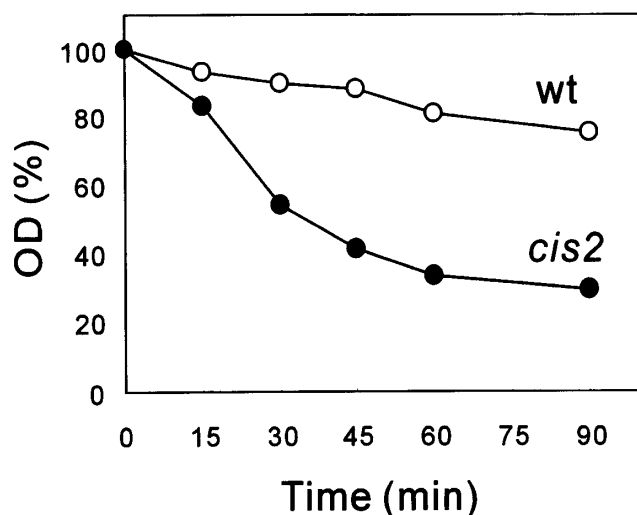


図2 : *cis2*変異体におけるcell wall integrity

野生株HM123 (○), *cis2*変異体 (●) のcell wall integrity. 酵母細胞の細胞壁を100 μ g/ml β -glucanase (30°C) で消化した。0分の時点での吸光度を100%として、経時的变化を表した。

た。*cis2*⁺遺伝子はすでに報告されている。*myo3*⁺/*myo2*⁺遺伝子^{11,12}と同一であり、2型ミオシン重鎖をコードしていた。分裂酵母Cis2蛋白質は分裂酵母Myo2¹³, 出芽酵母Myo1蛋白質¹⁴およびヒトの非筋ミオシン重鎖¹⁵とそれぞれ57%, 49%, および47%のホモロジーを示した。Cis2は他のミオシン重鎖と同様に、ATP結合およびアクチン結合ドメイン, IQモチーフ, そして長いコイルドコイル領域を持っていた。

4. *cis2*⁺遺伝子破壊

cis2⁺遺伝子の機能を解析するために、遺伝子破壊を行った。*cis2*⁺遺伝子のcoding regionの一部を*ura4*⁺マーカーで置換した構築で、野生型2倍体細胞を形態転換させた。こうして得られたヘテロ接合2倍体細胞の四分子解析を行った。いずれの子のうからでも、4つの孢子すべて生育可能であった。以上の結果より、*cis2*⁺遺伝子破壊は必須遺伝子ではないことが判明した。*cis2*⁺遺伝子破壊株は免疫抑制薬に対する感受性を示さなかったが、野生株が生育可能な0.2MMgCl₂を含む培地で生育不能であり、クロライドイオン超感受性である事が示された (図4B)。

5. Cis2ミオシン重鎖とカルシニューリンおよびマップキナーゼ経路との遺伝子学的相互作用

*cis2*変異体と*cis2*⁺遺伝子破壊株に構成的活性化型カルシニューリン遺伝子 (*ppb1* Δ C) を過剰発現させたところ、これらの株のクロライドイオン感受性が抑圧された (図5)。一方、野生型のカルシニューリン遺伝子 (*ppb1*⁺) の過剰発現ではこのような効果は認められなかった。また、Pmk1マップキナーゼ経路において抑制因子として働く事が知られている^{5,6}マップキナーゼホスファターゼPmp1およびマップキナーゼキナーゼのドミナントネガティブ変異体Pek1^Aを*cis2*⁺遺伝子破壊株に過剰発現したところ、同様にクロライドイオン感受性が抑圧された (図5)。一方、*cis2*変異体の免疫抑制薬感受性は構成的活性化型カルシニューリン遺伝子の過剰発現によって抑圧されなかった (図5)。*cis2*変異体とカルシニューリン破壊株とを掛け合わせ、四分子解析を行った。その結果、二重変異 (*cis2* Δ

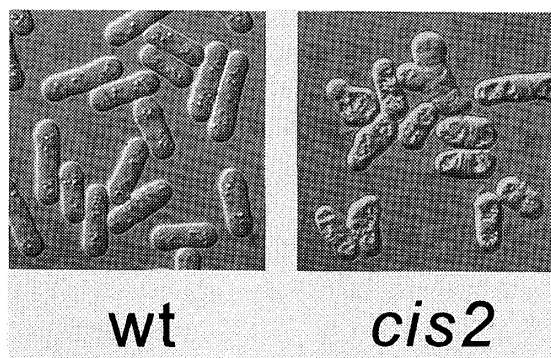


図3 : *cis2* 変異体の細胞形態

細胞は YPD 培地で27℃で培養した。ノマルスキー微分干渉像を示している。

ppb1) を持ったものは生育できなかった (データ提示せず)。

考 察

我々は、分裂酵母モデル系を用いてカルシニューリンの生理機能を解明する目的で、*cis*変異体の単離を行い、5種類の遺伝子座位 (*cis1*~*5*) を同定している。本研究により*cis2*⁺遺伝子はミオシン重鎖をコードしており、クロライドイオン調節および細胞形態形成に必須の機能を持つことが明らかとなった。

酵母の細胞骨格は、外部環境からの種々のストレスから細胞を防御する構造であると同時に、細胞の生活

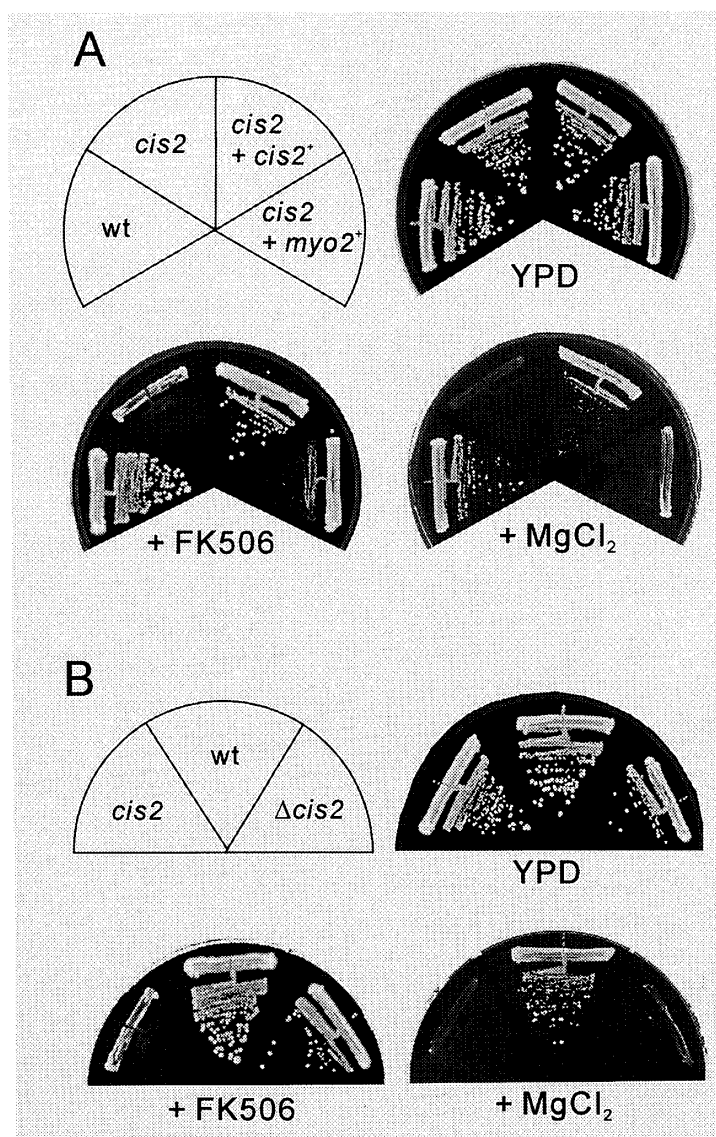


図4 : *cis2*⁺遺伝子の同定と破壊

A. *cis2*⁺遺伝子の同定

cis2⁺変異体を単離した*cis2*⁺遺伝子ともう一つの分裂酵母2型ミオシン重鎖遺伝子である*myo2*⁺遺伝子により形質転換した細胞を図1と同様にFK506あるいは0.15MMgCl₂を含むYPD培地にストリークした。

B. *cis2*⁺遺伝子破壊体の性質

cis2⁺遺伝子破壊株をFK506あるいは0.2MMgCl₂を含むYPD培地にストリークした。

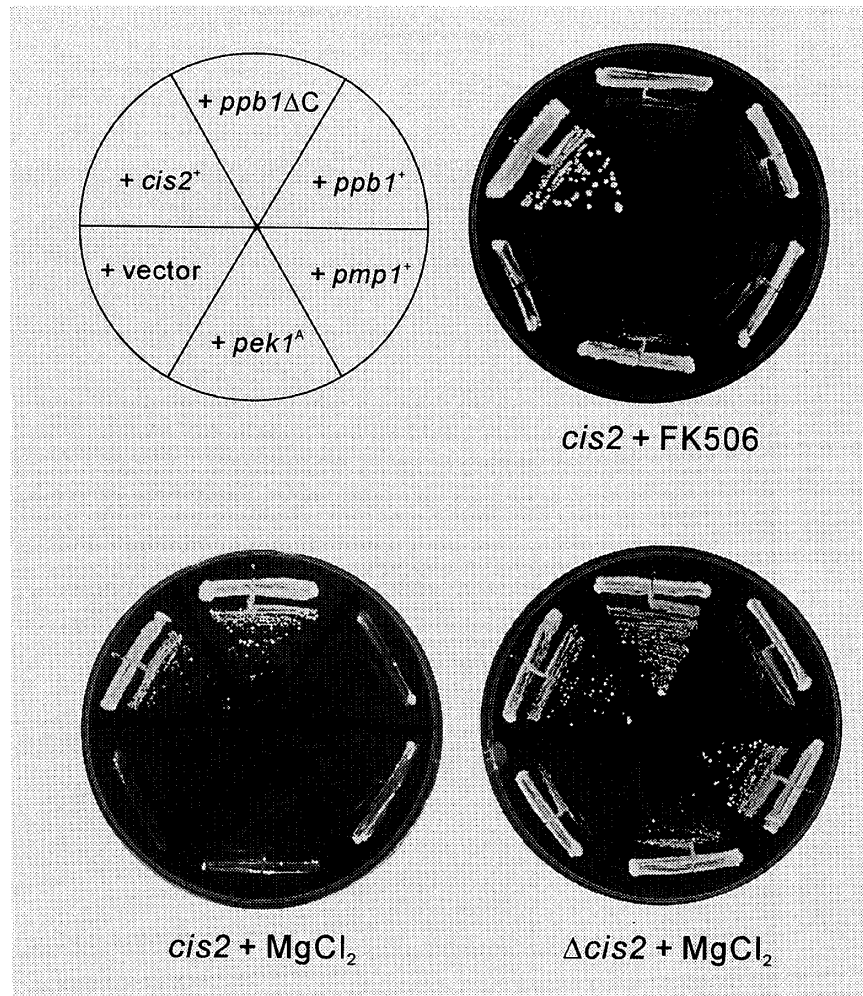


図5：*cis2*⁺遺伝子とカルシニューリンおよびマップキナーゼ系との遺伝学的関係

cis2⁺変異体 (*cis2*), *cis2*⁺遺伝子破壊株 ($\Delta cis2$) あるいはこれらに各種遺伝子を過剰発現したものを図4と同様にFK506あるいはMgCl₂を含むYPD培地にストリークした。

環および細胞分裂周期に対応した細胞形態に極めて重要である。分裂酵母は円柱状あるいは桿状の細胞形態を示し、細胞成長時には一定の直径を保ったまま、長く軸方向にのみ延長する。さらに核分裂に続いて細胞質分裂が起こる。従って、細胞成長、細胞極性および細胞分裂などが正常に遂行されるためには、細胞周期を通じて細胞骨格が正確に機能することが重要である。

分裂酵母ゲノム中には今回同定されたCis2/Myo3/Myo2の他に、もう1つ2型ミオシン重鎖をコードする必須遺伝子*myo2*⁺が存在する¹³⁾。Myo2は、*cdc4*⁺遺伝子がコードするミオシン軽鎖と複合体をつくる事^{16, 17)}、Myo2とCis2/Myo3/Myo2は、部分的に重複した機能を果たしている事^{11, 12)}、更にこれらのミオシン重鎖は収縮環に存在し、細胞質分裂において重要な役割を果たしている事^{11, 12, 16, 179)}が明らかにされている。本研究において*cis2*変異体は、*cis2*⁺遺伝子破壊株よりも著しいクロライドイオン感受性と破壊株には認められない免疫抑制薬感受性を示したが、変異により遺伝子破壊を上回るドミナントネガティブな効果が

現れたものと考えられた。即ち、Cis2変異蛋白質は、正常な機能を持たないばかりでなく、Myo2の機能まで抑制している可能性が高い。この事は、*cis2*変異をヘテロに持つ2倍体でも野生2倍体に比してクロライドイオン感受性がゆゆ高い事からも支持された（データ提示せず）。現在、変異部位の決定を行っているところであるが、これまでの結果からC末端のコイルドコイル領域に変異が存在する事が示唆されている（データ提示せず）。

*cis2*変異体が免疫抑制薬感受性を示し、カルシニューリン遺伝子破壊株と合成致死性を示す事は、2型ミオシン重鎖とカルシニューリンとの間に機能的な関連が即座異なる事を示唆する。この可能性は、構成的活性型カルシニューリンの過剰発現により*cis2*変異体および*cis2*⁺遺伝子破壊株の示すクロライドイオン超感受性が抑圧された事により再確認された。また、クロライドイオン調節においてカルシニューリンと拮抗的に働いていると考えられるPmk1マップキナーゼ経路を抑制するPmp1やPek1^Δ過剰発現によっても同様の

結果が得られた事も、2型ミオシン重鎖とカルシニューリンとの間に機能的な関連が存在するという我々の仮説を強く支持している。おそらく2型ミオシン重鎖は、カルシニューリンとPmk1マップキナーゼ経路の下流に位置し、ミオシン軽鎖など磷酸化、脱磷酸化を介して細胞骨格の機能を調節することでクロライドイオンや細胞質分裂の調節を行っていると考えられる。

謝 辞

ご指導いただきました久野高義教授に謝意を表します。

文 献

- 1) Cyert, M.S., Kunisawa, R., Kaim, D., Thorner, J.: Yeast has homolog (CNA1 and CNA2 gene products) of mammalian calcineurin, a calmodulin-regulated phosphoprotein phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88 : 7376-7380, 1991.
- 2) Ito, A., Hashimoto, T., Hirai, M., Takeda, T., Shuntoh, H., Kuno, T., Tanaka, C.: The complete primary structure of calcineurin A, calmodulin binding protein homologous with protein phosphatase 1 and 2A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 163 : 1492-1497, 1989.
- 3) Liu, J., Farmer, J. D., Lane, W.S., Friedman, J., Weissman, I., Schreiber, S.L.: Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP. *FK506 complexes.* *Cell* 66 : 807-815, 1991.
- 4) Yoshida, T., Toda, T., Yanagida, M.: A calcineurin-like gene *ppb1⁺* in fission yeast: mutant defects in cytokinesis, cell polarity, mating and spindle pole body positioning. *J. Cell Sci.* 107 : 1725-1735, 1994.
- 5) Sugiura, R., Toda, T., Shuntoh, H., Yanagida, M., Kuno, T.: *ppb1⁺*, a suppressor of calcineurin deficiency, encodes a novel MAP kinase phosphatase in fission yeast. *EMBO J.* 17 : 140-148, 1998.
- 6) Sugiura, R., Toda, T., Dhut, S. Shuntoh, H., Kuno, T.: The MAPK kinase Pek1 acts as a phosphorylation-dependent molecular switch. *Nature* 399 : 479-483, 1999.
- 7) Moreno, S., Klar, A., Nurse, P.: Molecular genetic analysis of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Methods Enzymol.* 194 : 795-823, 1991.
- 8) Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K., Kimura, A.: Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J. Bacteriol.* 153 : 163-168, 1983.
- 9) Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T.: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- 10) Rothstein, R. J.: One-step gene disruption in yeast. *Methods Enzymol.* 101 : 202-211, 1983.
- 11) Motegi, F., Nakano, K., Kitayama, C., Yamamoto, M., Mabuchi, I.: Myo3, a second type-11 myosin heavy chain in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* *FEBS Lett.* 420 : 161-166, 1997.
- 12) Bezanilla, M., Forsburg, S.L., Pollard, T.D.: Identification of a second myosin-11 in *Schizosaccharomyces pombe* : Myp2p is conditionally required for cytokinesis *Mol. Biol. Cell.* 8 : 2693-2705, 1997.
- 13) Kitayama, C., Sugimoto, A., Yamamoto, C.: Type II myosin heavy chain encoded by the *myo2* gene composes the contractile ring during cytokinesis in *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Cell Biol.* 137 : 1309-1319, 1997.
- 14) Watts, F.Z., Shiels, G., Orr, E.: The yeast *MYO1* gene encoding a myosin-like protein required for cell division *EMBO J.* 6 : 3499-3505, 1987.
- 15) Tothaker, L.E., Gonzalez, D.A., Tung, N., Lemons, R.S., Le Beau, M.M., Arnaout, M.A., Clayton, L.K., Tenen, D.G.: Cellular myosin heavy chain in human leukocytes: isolation of 5' cDNA clones, characterization of the protein, chromosomal localization, and upregulation during myeloid differentiation. *Blood* 78 : 1826-1833, 1991.
- 16) MoCollum, D., Feoktistova, A., Gould, K.L.: Phosphorylation of the myosin-11 light chain does not regulate the timing of cytokinesis in fission yeast. *J. Biol. Chem.*

274 : 17691-17695,1999.

- 17) Naqvi, N.I., Eng, K., Gould, K.L., Balasubranian, M.K.: Evidence for F-actin-dependent and-independent mechanisms involved in assembly and stability of the medial actomyosin ring in fission yeast. EMBO J.18 : 854-862, 1999.

Isolation and characterization of *cis2*, *Schizosaccharomyces pombe* mutant, which is sensitive to immunosuppressants and chloride ion.

Yujie Xia, Yingjie Zhang, Yabin Lu, Reiko Sugiura

Department of Pharmacology, Kobe University School of Medicine

(Director : Professor Takayoshi Kuno)

Calcineurin is a conserved

Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein phosphatase that plays a critical role in Ca^{2+} -mediated signaling in various cell types and is a target molecule of immunosuppressants, FK506 and cyclosporin A. Fission yeast cells lacking functional calcineurin ($\Delta ppb1$) are viable; however, showed cytokinesis abnormality and Cl^- -sensitive growth defect. Wild-type cells treated with FK506 showed an identical phenotype to $\Delta ppb1$, suggesting that FK506 inhibited calcineurin activity in fission yeast. To characterize regulatory pathways that overlap with calcineurin, we have isolated mutants that show immunosuppressant- and chloride ion-sensitivity (*cis* mutant) in fission yeast. We have identified 5 genetic loci (*cis1-5*) that display the mutant phenotype. *cis2* mutant showed abnormal cell morphology (multiseptated, and branched). Cells displayed increased sensitivity to β -glucanase. These data suggest that *cis2* gene is involved in maintaining cell wall integrity. *cis2* gene encoded for a type 2 myosin heavy chain. *cis2* mutation was synthetically lethal with calcineurin deletion, indicating that *cis2* and calcineurin shared an essential function for cell viability. These results suggest that calcineurin plays an important role in cell morphogenesis through regulation of type 2 myosin heavy chain.

Key words : calcineurin, immunosuppressant, chloride ion, type 2 myosin heavy chain, fission yeast