



# Its8, a Fission Yeast Homolog of Mcd4 and Pign, Is Involved in GPI Anchor Synthesis and Shares an Essential Function with Calcineurin in Cytokinesis

矢田, 朋子

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2002-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲2412

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1002412>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



【 5 9 】

氏 名・(本 籍) 矢田 朋子 (大阪府)

博士の専攻分野の名称 博 士 (医学)

学 位 記 番 号 博い第1381号

学位授与の 要 件 学位規則第4条第1項該当

学位授与の 日 付 平成14年3月31日

【学位論文題目】

**Its8,a Fission Yeast Homologue of Mcd4 and Pig-n,is Involved  
in GPI Anchor Synthesis and Shares an Essential Function with  
Calcineurin in Cytokinesis**

(M c d 4 及び P i g - n の分裂酵母ホモログである  
I t s 8 は G P I アンカー合成に関与し、細胞質分裂  
において必須の機能をカルシニューリンと分かち合う)

審 査 委 員

主査 教授 久野 高義

教授 奥村 勝彦

教授 中村 俊一

## 結言

分裂酵母は、シグナル伝達などの細胞内情報伝達メカニズムが高等動物細胞に最も近い単細胞モデル生物であり、遺伝子破壊などの操作も容易である。加えて分裂酵母細胞は高等動物細胞と同様の分裂の特徴を示すことから、細胞分裂、特に細胞質分裂の研究に適したモデル生物である。

カルシニューリン (CN) は、 $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin 依存性脱リン酸化酵素で、臓器移植に使用される FK506 及びシクロスポリン等の免疫抑制薬の標的分子であり、ヒトから酵母に至るまで保存されている。分裂酵母は、CN の触媒サブユニットをコードする 1 つの遺伝子 *ppb1* を持つ。遺伝子破壊により、細胞質分裂異常を来すことから、*ppb1* が細胞質分裂において重要であることが示唆されている。

CN と重要な機能を分かちあう変異株の原因遺伝子を同定し、その機能解析を行うために、CN 阻害薬 FK506 及び高温感受性を示す *its1-10* 変異株 (immunosuppressant and temperature sensitive) を単離した。この中で細胞質分裂における CN の機能を明らかにするために、10 変異株中最も著しい細胞質分裂異常の表現型を示す *its8* 変異体を解析した。

## 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<sup>-</sup> leu1*、野生株)、KP533 (*h<sup>-</sup> leu1 its8*)。分裂酵母の遺伝学的操作は Moreno ら (1991) の方法に従った。酵母細胞の形質転換は酢酸 Li 法で行った。FK506 は藤沢薬品工業より供与された。分子生物学的操作は Sambrook (1989) らの方法に従った。

### 2. *its8* 変異体の単離

ニトロソグアニジンで突然変異を誘発した分裂酵母野生株 HM123 (*h<sup>-</sup> leu1*) をスクリーニングし、0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  FK506 感受性かつ温度感受性 (36°C) を示す変異体を分離した。これらは 10 遺伝座位に分類され、*its1*~*10* と名付けた。

### 3. *its8* 遺伝子クローニング

酢酸 Li 法により *its8* 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 *its8* 変異体の表現型を抑圧するプラスミドを得た。取得した遺伝子が *its8* 変異体の原因遺伝子である事を integration mapping により確認した。ダイデオキシ法により塩基配列を決定した。

### 4. 遺伝子破壊

*its8* 遺伝子破壊は相同組換えによる one-step gene disruption により行なった。*its8* 遺伝子の ORF の一部を 1.8 kb *ura5* 遺伝子断片で置換した構築を作成した。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、四分子解析を行なった。遺伝子破壊の確認はサザンハイブリダイゼーションにより行なった。

### 5. cell wall integrity 測定

細胞を TE buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM EDTA, 1 mM 2-mercaptoethanol) で洗浄後  $\beta$ -glucanase (200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , Zymolyase) を含む TE buffer 中で震盪し、600 nm

の吸光度を経時的に測定、細胞融解をモニターした。

### 6. ミクロソーム mannose ラベル

野生株及び *its8* 変異体のミクロソームを GDP-[ $^3\text{H}$ ] mannose でラベルし、抽出した脂質質を GPI 特異的 Phospholipase D (GPI-PLD) 又は、反応 buffer で処理し、TLC で解析した。

### 7. 細胞内 GPI-anchor 型タンパク質の測定

細胞を myo-[2- $^3\text{H}$ ]inositol でラベルし、抽出したタンパクを SDS-PAGE で分離解析した。

## 結果

### 1. *its* 変異体のスクリーニング

CN と重要な機能を分かちあう変異株の原因遺伝子を同定し、その機能解析を行うために、CN 阻害薬 FK506 及び高温感受性を示す *its1-10* 変異株 (immunosuppressant and temperature sensitive) を単離した。これらの変異株は FK506 存在下あるいは制限温度下で生育できなかった。

### 2. *its8* 変異体の原因遺伝子の単離

細胞質分裂における CN の機能を明らかにするために、10 変異株中最も著しい細胞質異常の表現型を示す *its8* 変異体を解析した。*its8* 変異体の原因遺伝子を単離するため、*its8* 変異体を、分裂酵母多コピーライブラリーで形質転換を行い、*its* 表現型を相補するクローンをスクリーニングした。約 20 万の Leu<sup>+</sup>形質転換体から、FK506 プレートおよび 36 度で生育可能なクローンを 10 個得た。制限酵素のパターンから、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、*its8* 遺伝子であることが明らかとなった。その遺伝子は哺乳類及び出芽酵母で保存されている GPI アンカー合成酵素 (Pig-n, Mcd4) と高い相同性を示す蛋白質をコードしていた。

### 3. *Its8* の機能解析

1) GPI アンカー型蛋白質の減少: *its8* 変異体に GPI アンカー構成成分であるイノシトールをトリチウムラベル化したものを取り込ませた後、細胞内の蛋白質を抽出したところ *its8* 変異体では、GPI アンカー型蛋白質の全体量が低下しており、制限温度下ではさらに減少した。

2) GPI アンカー中間産物の異常: GPI アンカーの前駆体をマンノースラベルし、ミクロソーム画分を抽出し TLC で分離解析したところ、*its8* 変異体では野生株とは異なる中間産物が出現した。

3) 薬物標的分子としての *Its8*: Pig-n 及び Mcd4 の特異的阻害薬である BE49385A の効果を、*its8* 遺伝子の多コピーが抑圧したことから *Its8* 蛋白質もこれらと同様の機能を持つことが示唆された。

4) ヒトホモログ Pig-n の過剰発現による変異体表現型の相補: Pig-n の過剰発現が *its8* 変異体の免疫抑制薬感受性かつ高温感受性を部分的に相補した。

5) *Its8*-GFP の小胞体への局在: *Its8*-GFP 融合蛋白質を構築し野生株に形質転換し、

Its8-GFP 融合蛋白を蛍光顕微鏡により観察した。GPI アンカー合成の場である小胞体に Its8-GFP 融合蛋白は局在していた。

6) *its8* 変異体の変異部位の同定: *its8* 変異体の変異部位は一ヶ所であり、Pig-n 及び Mcd4 でも保存されている 288 番目の proline が serine に変化していた。

1)～6)の結果より、*its8* 遺伝子産物は GPI アンカー合成酵素であり、*its8* は、この酵素活性が低下している高温感受性変異体であることが明らかとなった。

4. *its8* 変異体の細胞質分裂異常

1) *its8* 遺伝子を破壊したところ、著明な細胞質分裂異常を示し、その増殖速度は野生株や *its8* 変異体と比べて著しく低下した。

2) *its8* 変異体の細胞形態変化: *its8* 変異体では、制限温度下で高頻度に多核多隔壁細胞が出現する。BE49385A 添加培地での野生株も同様の形態異常となった。

3) CN 抑制による *its8* 変異体の細胞質分裂異常増悪: CN 阻害薬である FK506 を培地に添加すると *its8* 変異体の細胞質分裂異常は増悪する。

4) *its8* 変異体の cell wall integrity: *its8* 変異体は細胞壁分解酵素である zymolyase に超感受性を示し、2)の表現型が高浸透圧下で相補されたことより、*its8* 変異体は cell wall integrity に異常があると考えられる。

考察

Its8 は GPI アンカー合成酵素であり、分裂酵母の生育に必須ではないが、細胞の CN 活性が低下するような条件においては必須であることが明らかになった。また、*its8* 変異体の細胞質分裂異常が、CN活性を抑制することで増悪したことより、GPI アンカーはカルシニューリンと協同的に細胞質分裂を制御することが明らかになった。GPI アンカーは細胞膜や細胞壁の機能維持に重要であると報告されており、CN がこれらにおいても重要な制御的役割を果たしていることより、これらの異常により細胞質分裂の異常が引き起こされることが明らかになった。

論文審査の結果の要旨

受付番号	甲第 1382 号	氏名	矢田 朋子
論文題目	Its8, a Fission Yeast Homologue of Mcd4 and Pig-n, is Involved in GPI Anchor Synthesis and Shares an Essential Function with Calcineurin in Cytokinesis Mcd4 及び Pig-n の分裂酵母ホモログである Its8 は GPI アンカー合成に関与し、細胞質分裂において必須の機能をカルシニューリンと分かち合う		
審査委員	主 査 久野 高義 副 査 奥村 勝彦 副 査 中村 俊一		
審査終了日	平成 13 年 10 月 2 日		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

カルシニューリン (CN)は、 $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin 依存性脱リン酸化酵素で、臓器移植に使用される FK506 及びシクロスポリン等の免疫抑制薬の標的分子であり、ヒトから酵母に至るまで保存されている。分裂酵母は、CN の触媒サブユニットをコードする1つの遺伝子 *ppb1* を持つ。遺伝子破壊により、細胞質分裂異常を来すことから、*ppb1* が細胞質分裂において重要であることが示唆されている。CN と重要な機能を分かちあう変異株の原因遺伝子を同定し、その機能解析を行うために、CN 阻害薬 FK506 及び高温感受性を示す *its1-10* 変異株 (immunosuppressant and temperature sensitive) を単離した。この中で細胞質分裂における CN の機能を明らかにするために、10 変異株中最も著しい細胞質分裂異常の表現型を示す *its8* 変異体を解析した。

#### 実験方法と結果

##### 1. *its* 変異体のスクリーニング

CN と重要な機能を分かちあう変異株の原因遺伝子を同定し、その機能解析を行うために、CN 阻害薬 FK506 及び高温感受性を示す *its1-10* 変異株 (immunosuppressant and temperature sensitive) を単離した。

##### 2. *its8* 変異体の原因遺伝子の単離

*its8* 変異体の原因遺伝子を単離するため、*its8* 変異体を、分裂酵母多コピーライブラリーで形質転換を行い、*its* 表現型を相補するクローンをスクリーニングした。integration mapping の結果、*its8* 遺伝子であることが明らかとなった遺伝子は哺乳類及び出芽酵母で保存されている GPI アンカー合成酵素 (Pig-n, Mcd4) と高い相同性を示す蛋白質をコードしていた。

##### 3. *Its8* の機能解析

1) GPI アンカー型蛋白質の減少: *its8* 変異体に GPI アンカー構成成分であるイノシトールをトリチウムラベル化したものを取り込ませた後、細胞内の蛋白質を抽出したところ *its8* 変異体では、GPI アンカー型蛋白質の全体量が低下しており、制限温度下ではさらに減少した。

2) GPI アンカー中間産物の異常: GPI アンカーの前駆体のマンノースをトリチウムラベルし、GPI アンカー中間産物を TLC で分離解析したところ、*its8* 変異体では野生株とは異なる中間産物が出現した。

3) 薬物標的分子としての *Its8*: Pig-n 及び Mcd4 の特異的阻害薬である BE49385A の効果を、*its8* 遺伝子の多コピーが抑圧したことから *Its8* 蛋白質もこれらと同様の機能を持つことが示唆された。

4) ヒトホモログ Pig-n の過剰発現による変異体表現型の相補: Pig-n の過剰発現が *its8* 変異体の免疫抑制薬感受性かつ高温感受性を部分的に相補した。

5) *Its8*-GFP の小胞体への局在: *Its8*-GFP 融合蛋白質を蛍光顕微鏡により観察した。GPI アンカー合成の場である小胞体に *Its8*-GFP 融合蛋白質は局在していた。

6) *its8* 変異体の変異部位の同定: *its8* 変異体の変異部位は一ヶ所であり、Pig-n 及び Mcd4 でも保存されている 288 番目の proline が serine に変化していた。

1) ~ 6) の結果より、*its8* 遺伝子産物は GPI アンカー合成酵素であり、*its8* は、この酵素活性が低下している高温感受性変異体であることが明らかとなった。

##### 4. *its8* 変異体の細胞質分裂異常

1) *its8* 遺伝子を破壊したところ、著明な細胞質分裂異常を示し、その増殖速度は野生株や *its8* 変異体と比べて著しく低下した。

2) *its8* 変異体の細胞形態変化: *its8* 変異体では、制限温度下で高頻度に多核多隔壁細胞が出現する。

BE49385A 添加培地での野生株も同様の形態異常となった。

3) CN 抑制による *its8* 変異体の細胞質分裂異常増悪: CN 阻害薬である FK506 を培地に添加すると *its8* 変異体の細胞質分裂異常は増悪する。

4) *its8* 変異体の cell wall integrity: *its8* 変異体は細胞壁分解酵素である zymolyase に超感受性を示し、2) の表現型が高浸透圧下で相補されたことより、*its8* 変異体は cell wall integrity に異常があると考えられる。

#### 考察

*Its8* は GPI アンカー合成酵素であり、分裂酵母の生育に必須ではないが、細胞の CN 活性が低下するような条件においては必須であることが明らかになった。また、*its8* 変異体の細胞質分裂異常が、CN 活性を抑制することで増悪したことより、GPI アンカーはカルシニューリンと協同的に細胞質分裂を制御することが明らかになった。GPI アンカー型蛋白質は細胞膜や細胞壁の機能維持に重要であると報告されており、CN も同様の機能が知られている。細胞膜や細胞壁が異常となることによって、細胞質分裂異常が引き起こされることが明らかとなった。

免疫抑制薬は臓器移植における必須の薬物であるが、その副作用のメカニズム、特に遺伝学的背景については不明点が多い。本研究は、カルシニューリンと GPI アンカー合成酵素の間に遺伝学的関係が存在することを明らかにした最初の知見であり、GPI アンカー合成酵素に遺伝的な異常がある場合には重篤な副作用が出現することを示唆する価値ある研究と認める。よって、本研究者は博士(医学)として学位を得る資格があると認める。