



Role of the Rab GTP-binding protein ypt3 in the fission yeast exocytic pathway, and its connection to calcineurin function

程, 紅

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2003-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲2678

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1002678>

※ 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。



【 72 】

氏 名 ・(本 籍) 程 紅 (中 国)

博士の専攻分野の名称 博士 (医学)

学 位 記 番 号 博い第1467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15年3月31日

【 学位論文題目 】

Role of the Rab GTP-Binding Protein Ypt3 in the Fission Yeast
Exocytic Pathway, and Its Connection to Calcineurin Function
(Rab family GTP 結合タンパク質 Ypt3 の分裂酵母 exocytic pathway に
おける役割及びカルシニューリンの機能との関連性)

審 査 委 員

主 査 教 授 久野 高義
教 授 山村 博平
教 授 中村 俊一

Ca²⁺/カルモデュリン依存性蛋白質脱リン酸化酵素であるカルシニューリン(CN)は、ヒトから酵母に至る全ての真核生物において高度に保存されており、多様な細胞応答において重要な役割を果たしている。免疫抑制薬 FK506 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活性を阻害することで薬理作用を発揮する。当研究室では、カルシニューリンと機能的に関連した遺伝子の単離を目的に、分裂酵母モデル系を用いて、FK506 存在下で細胞増殖を停止し、かつ温度感受性を示す変異株の取得を行ってきた。これまでに *its* 変異体(immunosuppressant- and temperature-sensitive mutants)として 8 種類の変異株を取得している。その中の *its5*変異体は細胞 exocytic pathway に重要な働きを果たしている *ypt3⁺*遺伝子の変異体であった。本研究により、カルシニューリンが細胞内輸送の制御に関与することが明らかとなった。

実験方法:

1、実験に用いた細胞株、培養条件および試薬

HM123 (*h⁺ leu1-32*) 野生株、*its5-1* 変異株、KP119 (*h⁺ leu1-32 ura4-D18 ppb1 ::ura4^r*) カルシニューリン破壊株。

酵母細胞の培養には、YPD 培地および EMM 培地を用いた。分裂酵母の遺伝学的操作は Moreno らの方法に従って行った。分子生物学的操作については Sambrook らの方法に従って行った。

2、*its* 変異株の単離

ニトロングアニジンで HM123 を処理し、突然変異を誘発した株より、0.5 μg/ml FK506 に感受性、かつ温度感受性(36℃)を示す変異体を取得した。取得した株は 8 種類の遺伝子座位に分類され、*its* 変異株と名付けた (*its1*~*its8*)。

3、*its5*遺伝子のクローニング

Lithium acetate 法により *its5-1* 変異株を分裂酵母遺伝子ライブラリーで形質転換し、*its5*変異株の表現型を相補する多コピー抑圧遺伝子を得た。獲得した遺伝子は、integration mapping により確認し、ダイデオキシ法により遺伝子の塩基配列を決定した。

結果

1. *its5-1*変異株の表現型及び原因遺伝子の同定

its5-1 変異株は、27℃では生育可能であったが、36℃では生育不能になった。また、FK506 とシクロスポリン A にも感受性を示した。また、カルシニューリン(CN)破壊株と *its5*変異株の二重変異体は致死であった。

its5-1 変異株を、分裂酵母遺伝子ライブラリーで形質転換し、*its5*変異体の表現型(温度感受性 36℃)を抑圧する遺伝子を得た。塩基配列を決定した後、分裂酵母ゲノムデータベースで検討した結果、*its5*変異体の原因遺伝子は、細胞内輸送に重要な働きを担い、Rab ファミリーGTP 結合タンパク質をコードする *ypt3⁺*遺伝子であることが明らかになった。そこで、今後は *its5-1* 変異体を *ypt3-i5*と改称する。*ypt3-i5*変異体の mutation site を決定した結果、よく保存されている 29 番目のアルギニンがヒスチジンに変化することがわかった。

2. *ypt3⁺*、*ypt3-i5*遺伝子産物の細胞内局在

GFP-Ypt3 は、主に間期細胞の成長端と分裂期細胞の中央部に局在し、この局在は F-アクチンに依存した。加えて、細胞質に散在する点状の局在も観察されたが、この局在は F-アクチンに依存しなかった。一方、GFP-*ypt3-i5*は以上のような局在せず、細胞質と核が均一に染まった。

3. *ypt3-i5*変異株は細胞質分裂異常を示す

許容温度(27℃)でも、野生株に比べ *ypt3-i5*変異株では中隔を持つ細胞の数が多かった。制限温度に移すか、FK506 を添加すると、*ypt3-i5*変異株では、中隔を持つ細胞の割合が著しく上昇し、多核多隔壁細胞も多数観察された。

4. *ypt3-i5*変異株は細胞壁 integrity 異常を示す

*ypt3-i5*変異株の温度感受性は培地に浸透圧安定剤 sorbitol の添加によって抑圧された。Halo assay によって、*ypt3-i5*変異株は SDS に感受性を示すことがわかった。zymolyase 処理すると、*ypt3-i5*変異株は野生株より早く溶解した。

5. Ypt3は液胞の融合に関与する

*ypt3-i5*変異株では、液胞が断片化していて、低浸透圧ストレスをかけても液胞の融合が観察できなかった。また、Ypt3を過剰発現すると、野生株の液胞が異常に大きくなって、FK506 をかけると、また断片化した状態に戻った。

6. *ypt3-i5*変異株には、異常な膜構造が蓄積する

電子顕微鏡を用いて、許容温度(27℃)で培養した *ypt3-i5*変異株には、異常な膜構造が観察された。制限温度に移すか、FK506 を添加することにより、異常な膜構造がさらに多くなった。微細観察と統計処理することにより、これらの膜構造は post-Golgi vesicle と異常な Golgi であることが明らかになった。

7. *ypt3-i5*変異株は exocytosis の異常を示す

許容温度(27℃)では、野生株でも *ypt3-i5*変異株でも、酸性ホスファターゼの leader sequence に融合させた GFP(SPL-GFP)は ER から Golgi を経て、培地に分泌された。一方、制限温度に移すと、*ypt3-i5*変異株では、細胞内に顕明な蛍光塊が溜まっていて、培地中に SPL-GFP が検出できなかった。FK506 の添加された *ypt3-i5*変異株にも、同様な局在が観察され、培地に分泌された SPL-GFP の量も著しく減少した。

考察

本研究では、温度感受性かつ免疫抑制薬感受性を示す *ypt3-i5*変異体の機能解析によって、Ypt3は分裂酵母の exocytic pathway に重要な役割を果たしていることが示唆された。Ypt3の変異は細胞内分泌異常を引き起こし、それによって、*ypt3-i5*変異株は細胞質分裂異常も示した。これらの異常はカルシニューリンの機能が失われる時には致死になる。また、Ypt3 は、cell wall integrity 及び液胞融合機能にも影響を及ぼすことも示唆された。さらに、本研究に示している Rab family とカルシニューリンの機能的及び遺伝学的 interaction は分裂酵母 exocytic pathway とカルシニューリンの機能との関連についての初めての報告である。今後、Ypt3とカルシニューリンの interaction のメカニズムを明らかにすることによって、真核細胞の輸送系と形態形成との関連性が解明できると思われる。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲第 1470 号	氏名	程 紅
論文題目	Role of the Rab GTP-Binding Protein Ypt3 in the Fission Yeast Exocytic Pathway, and Its Connection to Calcineurin Function Rab family GTP 結合タンパク質 Ypt3 の分裂酵母 exocytic pathway における役割及びカルシニューリンの機能との関連性		
審査委員	主 査 久野高義 副 査 山 村 平 平) 副 査 中 村 俊 一)		
審査終了日	平成 14 年 12 月 26 日		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

カルシニューリンは高度に保存された Ca^{2+} /カルモデュリン依存性蛋白質脱リン酸化酵素である。当研究室では、カルシニューリンと機能的に関連した遺伝子の単離を目的に、分裂酵母モデル系を用いて、FK506 存在下で細胞増殖を停止し、かつ温度感受性を示す変異株の取得を行ってきた。これまでに *its* 変異体 (immunosuppressant- and temperature-sensitive mutants) として 10 種類の変異株を取得している。その中の *its 5* 変異体は細胞 exocytic pathway に重要な働きを果たしている *ypt3⁺* 遺伝子の変異体であった。本研究により、カルシニューリンが細胞内輸送の制御に関与することが明らかとなった。

実験方法：

1、実験に用いた細胞株

HM123 (*h⁺ leu1-32*) 野生株、KP162 (*h⁺ leu1-32 its5-1*) *its 5-1* 変異株、KP119 (*h⁺ leu1-32 ura4-D18 ppb1::ura4⁺*) カルシニューリン破壊株。

2、*its* 変異株の単離

ニトログアニジンで HM123 を処理し、突然変異を誘発した株より、0.5 $\mu\text{g/ml}$ FK506 に感受性、かつ温度感受性 (36°C) を示す変異体を取得した。取得した株は 10 種類の遺伝子座位に分類され、*its* 変異株と名付けた (*its 1*～*its 10*)。

結果

1、*its 5* 変異体の表現型

its 5 変異株は、27°C では生育可能であったが、36°C では生育不能になった。また、FK506 とシクロスポリン A にも感受性を示した。

2、*its 5-1* 変異体の原因遺伝子の同定

its 5 変異株を、分裂酵母遺伝子ライブラリーで形質転換し、*its 5* 変異体の表現型 (FK506 感受性および温度感受性 36°C) を抑圧する遺伝子を得た。塩基配列を決定した結果、*its 5* 変異体の原因遺伝子は、*ypt3⁺* 遺伝子であることが明らかになった。そこで、*its5-1* 変異体を *ypt 3-i5* と改称した。

3、*ypt3⁺* の遺伝子産物の細胞内局在

GFP-Ypt3 は、主に間期細胞の成長端と分裂期細胞の中央部に局在し、この局在は F-アクチンに依存する；そのほか、細胞質に散在する点状の局在も観察できて、この局在は F-アクチンに依存しなかった。

4、*ypt 3-i5* 変異株は細胞質分裂異常、細胞壁 integrity 異常、液胞融合異常を示す

許容温度 (27°C) でも、野生株に比べ、*ypt 3-i5* 変異株では中隔を持つ細胞の数が多し。制限温度下に移すか、FK506 を添加すると、*ypt 3-i5* 変異株では、中隔を持つ細胞の割合も著しく上昇し、多核多隔壁細胞も多く観察できた。

*ypt3-i5*変異株の温度感受性は培地に浸透圧安定剤 sorbitol の添加によって抑圧された;*ypt3-i5*変異株は SDS に感受性を示す;zymolyase 処理すると、*ypt3-i5*変異株は野生株より早く溶解する。

*ypt3-i5*変異株では、液胞が断片化していて、低浸透圧ストレスをかけても融合できない。Ypt3 を過剰発現させると、野生株の液胞が異常に大きくなって、FK506 をかけると、また断片化状態に戻る。

5、*ypt3-i5*変異株には、異常な膜構造が蓄積する

電子顕微鏡を用いて、*ypt3-i5*変異株には、異常な膜構造が観察できた。制限温度下に移すか、FK506 を添加することにより、異常な膜構造がさらに多くなった。微細観察と統計処理によって、これらの膜構造は post-Golgi vesicle と異常な Golgi であることが判明した。

考察

*ypt3-i5*変異体では、異常な Golgi とともに post-Golgi vesicle も蓄積することは、Ypt3 は exocytic pathway の Golgi と post-Golgi という多段階で働いていることが示唆される。また、*ypt3-i5*変異体は細胞質分裂、細胞壁 integrity, 及び液胞融合の異常を示す。これらの表現型は総て細胞内輸送の異常で解釈できる。また、*ypt3*変異体は、免疫抑制薬に対する感受性を示し、カルシニューリン破壊株と合成致死を示す。このことは Ypt3 と Calcineurin の機能的関連性が示唆する。

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な点が多い。本研究は、カルシニューリンが細胞内輸送系の制御に関与することを明らかにした最初の知見であり、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。