



Zinc finger protein prz1 regulates Ca^{2+} but not Cl^- homeostasis in fission yeast : identification of distinct branches of calcineurin signaling pathway in fission yeast

平山, 園子

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2003-09-30

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲2888

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1002888>

※ 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。



【 138 】

氏 名 ・(本 籍) 平山 園子 (兵庫県)

博士の専攻分野の名称 博士 (医学)

学 位 記 番 号 博い第1533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9月30日

【 学位論文題目 】

Zinc Finger Protein Prz1 Regulates Ca^{2+} but not
 Cl^- Homeostasis In Fission Yeast:

Identification of Distinct Branches of Calcineurin Signaling
Pathway in Fission Yeast

(Zinc finger 型蛋白 Prz1 は分裂酵母の Ca^{2+} の恒常性を制御するが Cl^- の恒常性は
制御しない分裂酵母のカルシニューリンシグナル伝達経路の別経路の同定)

審 査 委 員

主 査 教 授 久野 高義

教 授 山村 博平

教 授 横山 光宏

Zinc Finger Protein Prz1 Regulates Ca^{2+} but Not Cl^- Homeostasis in

Fission Yeast

IDENTIFICATION OF DISTINCT BRANCHES OF CALCINEURIN SIGNALING PATHWAY IN FISSION YEAST

Zinc finger 型蛋白 Prz1 は分裂酵母の Ca^{2+} の恒常性を制御するが Cl^- の恒常性は制御しない

分裂酵母のカルシニューリンシグナル伝達経路の別経路の同定

【緒言】

カルシニューリンは Ca^{2+} /カルモデュリン依存性の Ser/Thr タンパク質脱リン酸化酵素であり、触媒サブユニットと制御サブユニットからなる。哺乳動物細胞ではカルシニューリンは、T 細胞活性化や心肥大のような種々の Ca^{2+} を介した過程で重要な役割を果たしている。これら多くの事象において、カルシニューリンは NE-AT ファミリーの因子を制御している。NF-AT 転写因子は、カルシニューリンによって脱リン酸化され活性化し細胞質から核へ移行する。FK506 によりカルシニューリンは特異的に阻害されるが、これら免疫抑制薬はカルシニューリンの多くの役割を同定するのに有効である。

我々は、分裂酵母 *S.pombe* におけるカルシニューリンのシグナル経路について実験を行ったがこれは、このシステムが遺伝子解析に適しており、より高度なシステムとの関連性においても多くの利点があるためである。

ここでは、出芽酵母の Crz1 と高い相同性をもつ zinc finger タンパク質をコードする分裂酵母の *prz1*⁺ 遺伝子をクローニングし、カルシニューリンとの関係について検討した。

【方法】

酵母の培養には YPD 培地、EMM 培地を用いた。交配および胞子形成には SPA 培地を使用した。分裂酵母の遺伝学的操作は Moreno らの方法に従って行った。*prz1*⁺ 遺伝子は分裂酵母のゲノム遺伝子を鋳型にして PCR で増幅された。タンパクの異所性発現には *nmt1* プロモーターを用いた。

Prz1 の mobility shift の解析には、GFP-Prz1 を発現している野生株とカルシニューリン破壊株からタンパクを抽出し、SDS-PAGE で分離、抗 GFP 抗体で検出した。RNA は Kohrer と Domdey の方法にて抽出し Northern blotting 法で検出した。

【結果】

分裂酵母の遺伝子 *prz1*⁺ の同定

カルシニューリン反応性の出芽酵母の zinc finger 型転写因子である Crz1 のタンパク質配列を用い、BLAST program にて検索した。Sanger Center の分裂酵母のたんぱく質のデータベース上より Crz1 と非常に相同性が高い SPAC4G813c の遺伝子を Ppb1-responsible zinc finger protein より *prz1* と命名した。

prz1 は、Crz1 と高い相同性のある、C 末端の 3 つの C2H2 型の zinc finger モチーフを含む 681 アミノ酸からなるタンパクをコードしていた。

Prz1 はカルシニューリンにより脱リン酸化される

カルシニューリン破壊株および野生株から単離された GFP-Prz1 をカルシニューリン特異的な阻害剤 FK506 で処理し、SDS-PAGE ゲルで泳動すると FK506 で処理していない野生株由来の GFP-Prz1 よりも大きな分子量を示した。一方、50mM の CaCl_2 で処理した細胞から単離した GFP-Prz1 タンパクは、小さい分子量を示した。

in vitro の系で分子量の変化は Ca^{2+} と calmodulin に依存しており FK506 を添加すると阻害されることが示された。

高濃度の細胞外 Ca^{2+} や高温により誘導された Prz1 の mRNA はカルシニューリン活性に依存する。

Prz1 mRNA 量は、生育培地に CaCl_2 を添加した後 27°C で培養すると野生株では速やかに増加するがカルシニューリン破壊株では増加しない。

42°C に温度シフトすると野生株では Prz1 mRNA 量が非常に増えて、シフトしてから 20 分後にピーク値に達するがカルシニューリン破壊株では増加しない。

構成的に活性化したカルシニューリンが発現していると Prz1 mRNA は増加する。

カルシニューリンの活性化により GFP-Prz1 の局在は細胞質から核へ移動する。

GFP-Prz1 は、野生株でもカルシニューリン破壊株でもほとんど細胞質に局在した。

出芽酵母の GFP-Prz1 と同様に、 Ca^{2+} を添加しカルシニューリンを活性化すると GFP-Prz1 の局在は核へと移行する。

また、細胞周期特異的に GFP-Prz1 は細胞壁形成前の分裂している細胞の核に蓄積する。また、これは細胞質分裂と細胞壁形成におけるカルシニューリンの役割と一致している。

これらの条件下でカルシニューリン阻害剤 FK506 を添加すると、GFP-Prz1 の核局在が阻害される。

Prz1 の serine-rich-lesion である 240 アミノ酸残基が欠失した GFP-Prz1 fusion は *prz1* 破壊株の生育を部分的相補し、また FK506 で処理をしても常に核局在を示した。

Prz1 破壊株は Ca^{2+} に超感受性であるが Cl^- には感受性を示さない。

カルシニューリン破壊株は Cl^- に超感受性で、0.15M MgCl_2 や 0.3M KCl 添加培地では生育できないが、*prz1* 破壊株は、カルシニューリン破壊株が生育できなかった 0.2M MgCl_2 を含む YPD プレートでも正常な生育をした。*prz1* 破壊株もカルシニューリン破壊株も 0.15M CaCl_2 、あるいは 0.15M $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ を添加すると生育できなかった。

出芽酵母では、カルシニューリンが制御する Ca^{2+} ポンプをコードした PMCl の転写に Crz1 が必要であるが、Northern blot analysis から、カルシニューリンが欠損しても *prz1* が欠損しても Pmcl の mRNA 量が明らかに減少することが示された。

prz1 破壊株とカルシニューリン破壊株は細胞形態と Mating に関してまったく異なる phenotype を示す。

カルシニューリン破壊株は長く伸び、複数の細胞壁や分岐構造をしているが、*prz1* 破壊株は野生株と変わらない細胞形態をしている。

さらに、カルシニューリン破壊株は生殖不能状態であるが *prz1* 破壊株は fertile で mating 効率と細胞形態は野生株とは変わらない。

prz1 破壊株を FK506 で処理するとカルシニューリン破壊株の表現形と同じような表現形を示した。

カルシニューリンが欠失すると合成致死になるが *prz1* が欠失しても合成致死にはならない変異株がある。

免疫抑制剤 FK506 を用いたカルシニューリン依存性の変異株；*its* 変異株はカルシニューリンと遺伝的相互関係があり合成致死を示し、カルシニューリンと本質的な機能を共有している機能的なタンパク質をコードしている。それらの遺伝子と *prz1* 遺伝子との関係を調べるため、*its* 変異体と *prz1* 破壊株の間で tetrad 分析を行った。*prz1* 破壊株は $\text{PI}(4)\text{P}_5$ キナーゼや Rab/Ypt ファミリーの small GTPase をコードしている *its3* や *its5/ypt3-45* 変異体と合成致死を示した。一方、*its2/cps1*、*its8*、*its10/cdc7* 遺伝子は *prz1* 破壊株とは合成致死は示さず、二重変異株が得られた。

Prz1 は、カルシニューリンや Pmk1 MAK キナーゼ経路によって antagonistically に制御される Chloride イオンの恒常性とは関係がない。

Pmk1 に関する MAP キナーゼをコードする *pmp1+* 遺伝子を過剰発現するとカルシニューリン破壊株の Cl^- 超感受性を suppress する。一方、*pmp1+* 遺伝子を過剰発現しても *prz1* 破壊株の Ca^{2+} イオン超感受性には影響しない。さらに、*prz1+* 遺伝子を過剰発現してもカルシニューリン破壊株の MgCl_2 の超感受性を suppress しない。

【考察】

今回我々は、カルシニューリン依存性に反応する因子に結合し、出芽酵母で種々のターゲット遺伝子の転写を制御する C2H2 タイプの zinc finger 型のタンパクで、 Crz1 と同性的の高い分裂酵母の遺伝子である Prz1 の同定と characterization を行った。

分裂酵母の Prz1 はカルシニューリンに脱リン酸化され、カルシニューリンが活性化すると、その局在は細胞質から核へ移行する。しかし、出芽酵母の場合と異なり、*prz1* 破壊株はカルシニューリン破壊株の表現形と全く異なっている。 Ca^{2+} に対する超感受性を除き、*prz1* 破壊株はカルシニューリン破壊株で見られたような変形した細胞形態や、接合能力の欠如、 Cl^- 超感受性のような典型的な表現形を示さなかった。これらの結果から、少なくとも 2 つのカルシニューリンを介した経路が存在すると考えられた。

1 つ目は Pmcl の発現を制御する Prz1 依存性の経路である。*prz1* 破壊株の Ca^{2+} 感受性は Pmcl mRNA の減少と一致しており、出芽酵母と分裂酵母では Ca^{2+} のホメオスタシスの調整機構が類似していると考えられる。さらに、*prz1* 破壊株はカルシニューリン破壊株と合成致死になる *its* 変異体との間の遺伝的關係より、これら遺伝子と Prz1 は重複した機能があると考えられた。

2 つ目の経路は Pmk1 MAP キナーゼと拮抗的に機能し、細胞形態や Cl^- ホメオスタシスを制御すると考えられた。さらに *prz1* 破壊株は、 β -グルカン合成酵素や GPI 合成酵素、SIN 経路に関与した遺伝子をコードする *its* 変異体とは合成致死にならず、これら 3 つの遺伝子は第 2 のカルシニューリンシグナル経路と遺伝的に相関すると考えられた。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲第1534号	氏名	平山 園子
論文題目	<p>Zinc Finger Protein Prz1 Regulates Ca^{2+} but not Cl^- Homeostasis In Fission Yeast: Identification of Distinct Branches of Calcineurin Signaling Pathway in Fission Yeast</p> <p>(Zinc finger 型蛋白 Prz1 は分裂酵母の Ca^{2+} の恒常性を制御するが Cl^- の恒常性は制御しない 分裂酵母のカルシニューリンシグナル伝達経路の別経路の同定)</p>		
審査委員	<p>主 査 久野 高義</p> <p>副 査 山 下 茂 子</p> <p>副 査 柳 山 光 広</p>		
審査終了日	平成 15 年 6 月 24 日		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

カルシニューリンは Ca^{2+} /カルモデュリン依存性の Ser/Thr タンパク質脱リン酸化酵素であり、触媒サブユニットと制御サブユニットからなる。哺乳動物細胞ではカルシニューリンは、T細胞活性化や心肥大のような種々の Ca^{2+} を介した過程で重要な役割を果たしている。これら多くの事象において、カルシニューリンは NF-AT ファミリーの因子を制御している。NF-AT 転写因子は、カルシニューリンによって脱リン酸化され活性化し細胞質から核へ移行する。FK506 によりカルシニューリンは特異的に阻害されるが、これら免疫抑制薬はカルシニューリンの多くの役割を同定するのに有効である。

申請者等のグループは、分裂酵母 *S.pombe* におけるカルシニューリンのシグナル経路について実験を行ったがこれは、このシステムが遺伝子解析に適しており、より高度なシステムとの関連性においても多くの利点があるためである。申請者は、出芽酵母の Crz1 と高い相同性をもつ zinc finger タンパク質をコードする分裂酵母の *prz1* 遺伝子をクローニングし、カルシニューリンとの関係について検討した。

結果、

1. 分裂酵母の遺伝子 *prz1* 遺伝子の同定

Sanger Center の分裂酵母のデータベース上より出芽酵母 Crz1 と非常に相同性が高い遺伝子 (SPAC4G8.13c) を同定し、Ppb1-responsible zinc finger protein より *prz1* と命名した。*prz1* は、Crz1 と高い相同性のある、C 末端の3つの C2H2 型の zinc finger モチーフを含む 681 アミノ酸からなるタンパクをコードしていた。

2. Prz1 はカルシニューリンにより脱リン酸化される

カルシニューリン破壊株および野生株から単離された GFP-Prz1 をカルシニューリン特異的な阻害剤 FK506 で処理し、SDS-PAGE ゲルで泳動すると FK506 で処理していない野生株由来の GFP-Prz1 よりも大きな分子量を示した。一方、50mM の CaCl_2 で処理した細胞から単離した GFP-Prz1 タンパクは、小さい分子量を示した。

3. Prz1 mRNA はカルシニューリン活性に依存して変化する

Prz1 mRNA 量は、生育培地に CaCl_2 を添加した後 27°C で培養すると野生株では速やかに増加するがカルシニューリン破壊株では増加しない。構成的に活性化したカルシニューリンが発現していると Prz1 mRNA は増加する。

4. カルシニューリンの活性化により Prz1 の局在は細胞質から核へ移動する

GFP-Prz1 は、野生株でもカルシニューリン破壊株でもほとんど細胞質に局在した。 Ca^{2+} を添加しカルシニューリンを活性化すると GFP-Prz1 の局在は核へと移行する。また、細胞周期特異的に GFP-Prz1 は細胞壁形成前の分裂している細胞の核に蓄積する。これらの条件下でカルシニューリン阻害剤 FK506 を添加すると、GFP-Prz1 の核局在が阻害される。

5. Prz1 破壊株は Ca^{2+} に超感受性であるが Cl^- には感受性を示さない

カルシニューリン破壊株は Cl^- に超感受性で、0.15M MgCl_2 や 0.3M KCl 添加培地では生育できないが、*prz1* 破壊株は、カルシニューリン破壊株が生育できなかった 0.2M MgCl_2 を含む YPD プレートでも正常な生育をした。*prz1* 破壊株もカルシニューリン破壊株も 0.15M CaCl_2 、あるいは 0.15M $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ を添加すると生育できなかった。

6. *prz1* 破壊株とカルシニューリン破壊株は細胞形態と Mating に関してまったく異なる phenotype を示す

カルシニューリン破壊株は長く伸び、複数の細胞壁や分岐構造をしているが、*prz1* 破壊株は野生株と変わらない細胞形態をしている。さらに、カルシニューリン破壊株は生殖不能状態であるが *prz1* 破壊株は fertile で mating 効率と細胞形態は野生株とは変わらない。*prz1* 破壊株を FK506 で処理するとカルシニューリン破壊株の表現形と同じような表現形を示した。

7. カルシニューリンが欠失すると合成致死になるが *prz1* が欠失しても合成致死にはならない変異株がある

prz1 破壊株は PI(4)P5 キナーゼや Rab/Ypt ファミリーの small GTPase をコードしている *its3* や *its5/ypt3-i5* 変異体と合成致死を示した。一方、*its2/cps1*、*its8*、*its10/cdc7* 変異株は *prz1* 破壊株とは合成致死は示さず、二重変異株が得られた。

8. Prz1 は、Pmk1 MAK キナーゼ経路によって制御される Chloride イオンの恒常性とは関係がない

Pmk1 に関する MAP キナーゼをコードする *pmp1'* 遺伝子を過剰発現するとカルシニューリン破壊株の Cl⁻ 超感受性を抑圧する。一方、*pmp1'* 遺伝子を過剰発現しても *prz1* 破壊株の Ca²⁺ イオン超感受性には影響しない。さらに、*prz1'* 遺伝子を過剰発現してもカルシニューリン破壊株の MgCl₂ の超感受性を抑圧しない。

. 考察.

申請者は、カルシニューリン依存性に反応する因子に結合し、出芽酵母で種々のターゲット遺伝子の転写を制御する C2H2 タイプの zinc finger 型のタンパクで、Crz1 と相同性の高い分裂酵母の遺伝子である Prz1 の同定と characterization を行った。分裂酵母の Prz1 はカルシニューリンに脱リン酸化され、カルシニューリンが活性化すると、その局在は細胞質から核へ移行する。しかし、出芽酵母の場合と異なり、*prz1* 破壊株はカルシニューリン破壊株の表現形と全く異なっている。Ca²⁺ に対する超感受性を除き、*prz1* 破壊株はカルシニューリン破壊株で見られたような変形した細胞形態や、接合能力の欠如、Cl⁻ 超感受性のような典型的な表現形を示さなかった。これらの結果から、少なくとも 2 つのカルシニューリンを介した経路が存在すると考えられた。1 つ目は Pmc1 の発現を制御する Prz1 依存性の経路である。2 つ目の経路は Pmk1 MAP キナーゼと拮抗的に機能し、細胞形態や Cl⁻ ホメオスタシスを制御すると考えられた。

免疫抑制薬は臓器移植における必須の薬物であり、その作用機序としてはカルシニューリン活性の抑制が知られている。本研究は、カルシニューリンの標的となる転写調節因子について研究したものであるが、従来発見されていなかった新規標的遺伝子を単離し、その性質について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。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。