



Loss of apm1, the μ 1 subunit of the clathrin-associated adaptor-protein-1 complex, causes distinct phenotypes and synthetic lethality with calcineurin deletion in fission yeast

喜多, 綾子

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2005-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲3381

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1003381>

※ 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。



【 107 】

氏 名・(本 籍) 喜多 綾子 (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1660号

学位授与の 要 件 学位規則第5条第1項該当

学位授与の 日 付 平成17年3月25日

【 学位論文題目 】

Loss of Apm1, the μ 1 Subunit of the Clathrin-
Associated Adaptor-Protein-1Complex, Causes
Distinct Phenotypes and Synthetic Lethality with
Calcineurin Deletion in Fission Yeast
(分裂酵母 μ -adaptin の細胞内輸送における役割
とカルシニューリンとの機能的関連)

審 査 委 員

主 査 教 授 横 崎 宏
教 授 山 村 博 平
教 授 中 村 俊 一

はじめに

カルシニューリン(CN)は Ca^{2+} /カルモデュリン依存性脱リン酸化酵素であり、ヒトから酵母に至る真核生物において高度に保存されている。免疫抑制薬であるシクロスポリン A 及びタクロリムス(FK506)は CN の酵素活性を特異的に阻害し免疫抑制効果を発揮する。臓器移植において、これらの免疫抑制薬は患者の生存率の著しい向上をもたらした。しかしながら免疫抑制薬による様々な副作用は臨床問題となり、これらの副作用も全身で CN の酵素活性が抑制された結果であると考えられるがその詳細なメカニズムは明らかになっていない。

そこで、遺伝学的手法を駆使でき、しかも哺乳動物に最も近い情報伝達経路をもつ分裂酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)をモデル生物として CN を介するシグナル伝達経路を明らかにしようと試みた。分裂酵母には 1 コピーの CN 遺伝子(*ppb1⁺*)が存在し、分裂酵母においても CN が FK506 の標的分子として機能することが明らかとなっている。野生細胞は FK506 が存在しても CN 遺伝子がノックアウトされても通常の増殖には問題がないが、培地に FK506 が存在すると生育不能となる変異体が既に複数取得されている。今回私はそれらの変異体の一つである *cis1*(chloride and immunosuppressant sensitive) 1-1 の原因遺伝子として、細胞内輸送に関与するクラスリンアダプタータンパク質複合体 AP-1 のサブユニットのひとつである $\mu 1$ アダプチンと相同性をもつ *apm1⁺* を同定し、Apm1 の生理機能、さらには CN との機能的関連について解析を行ったので報告する。

<結果>

1. *cis1⁺/apm1⁺* 遺伝子のクローニング

CN と重要な生理機能をわちあっている因子の同定を目的として、FK506 を培地に添加すると生育不能となる変異体 *cis1-1* を取得した。*cis1-1* 変異体の表現型を指標として *cis1⁺* 遺伝子を同定した。*cis1⁺* 遺伝子の塩基配列を決定した結果、高等生物におけるクラスリンアダプタータンパク質複合体 AP-1 のサブユニットのひとつである $\mu 1$ アダプチンと高い相同性をもつタンパク質 Apm1 をコードしていた。さらに、*cis1-1* の変異部位を同定した結果、*cis1-1* 変異体では、ストップコドン変異により、Apm1 の C 末 83 アミノ酸が欠損していることがわかった。

2. Apm1 の細胞内輸送における役割

apm1 ノックアウト細胞($\Delta apm1$)を作製した結果、 $\Delta apm1$ は通常の培地では生育可能であるが、*cis1-1* と同様の免疫抑制薬に対する感受性などの表現型を示した。高等生物で AP-1 複合体は細胞内輸送において重要な働きをしていることから、我々は $\Delta apm1$ を用いて電子顕微鏡解析を行い以下の所見を得た。1) $\Delta apm1$ では野生株と比較して、ゴルジ層の著しい肥厚が観察され、ゴルジ体に近接して分泌小胞が観察された。2) $\Delta apm1$ では、 $\sim 500\text{nm}$ の電子密度の高い異常なゴルジ膜と考えられる Berkeley bodies とよばれる構造が観察された。3) $\Delta apm1$ では、post-ゴルジ分泌小胞(100-150nm)の蓄積がみられ、その蓄積は制限温度下、および FK506 添加によ

り増悪した。これらの結果は Apm1 が細胞内輸送においてゴルジの機能、さらにはゴルジから細胞膜への分泌に重要な役割を果たしていることを強く示唆している。そこで、 $\Delta apm1$ における酸性フォスファターゼの分泌の定量化や *pho1⁺* leader peptide GFP 融合タンパク質(SPL-GFP)を用いて $\Delta apm1$ の分泌機能の低下を確認した。

さらに、細胞表面とエンドサイトーシス経路をサイクルしている v-SNARE である Synaptobrevin (Syb1) は、野生株ではゴルジ/エンドソーム、中隔、成長端に局在するのに対し、 $\Delta apm1$ では中隔、成長端の局在が失われ、細胞質内に大きな塊として局在した。この塊状の局在は、ゴルジ/エンドソームと一致した。

3. Apm1 は、ゴルジ/エンドソーム、紡錘体(SPB)、中隔に局在した。

Apm1-GFP の局在を観察したところ、Apm1 はゴルジ/エンドソームのみならず、核、特に紡錘体に強い蛍光がみられ、中隔にも局在した。Apm1-GFP は、SPB のマーカである Sad1 と SPB において共局在し、さらに two-hybrid 解析により、Apm1 と Sad1 の結合も確認した。

4. *apm1* 破壊細胞は、細胞質分裂・液胞融合・細胞壁の異常を呈した。

$\Delta apm1$ は、制限温度下、FK506 添加において、高頻度に多核・多隔壁細胞が出現し、細胞質分裂の異常を示した。また、野生細胞にみられる低浸透圧ストレス下での液胞の融合がみられず、液胞は断片化していた。さらに、 $\Delta apm1$ は、細胞壁分解酵素である β -glucanase に超感受性を示し、細胞壁の異常が示された。

5. *apm1⁺* と *ypt3⁺* の遺伝学的関係

我々はすでに CN と機能的に関連する細胞内輸送に関わる因子として低分子量 G 蛋白質 Rab ファミリーに属する Ypt3 を同定し、Ypt3 がゴルジおよびゴルジからの分泌に関与することを報告している。そこで *apm1⁺* と *ypt3⁺* の遺伝学的関係を解析したところ、*apm1* 破壊株と *ypt3-i5* 変異体の二重変異は致死となり、Apm1 と Ypt3 が細胞増殖に必須な役割を分かち合っていることが示唆された。

まとめ

本研究では、CN と合成致死となる変異体、*cis1-1/apm1-1* の原因遺伝子であるクラスリンアダプタータンパク質複合体の構成成分 $\mu 1$ をコードする *apm1⁺* を同定し、Apm1 のノックアウト細胞の表現型を解析することで、Apm1 の細胞内輸送における役割を明らかにした。

まず、電子顕微鏡所見より Apm1 ノックアウト細胞では、ゴルジの異常、ゴルジに近接する大きな分泌小胞が見られたことは Apm1 がゴルジにおける小胞形成に重要であることを示している。また、Apm1 ノックアウト細胞では本来ならば細胞膜まで運ばれるべき v-SNARE(Syb1)がゴルジ/エンドソームに蓄積し、Apm1-GFP がゴルジ/エンドソームに局在したことも、Apm1 のゴルジ/エンドソームにおける機能を強く示唆するものである。

一方 post-ゴルジと考えられる分泌小胞の蓄積がみられたことは Apm1 がゴルジにおける機能のみならずゴルジから細胞膜へ至る分泌の過程においても重要な機能を

有することを示唆している。Apm1 ノックアウト細胞における細胞質分裂、液胞融合、細胞壁の異常といった表現型は、ゴルジから細胞膜へ至る分泌の過程が障害された結果を反映していると考えられる。Apm1 と Ypt3 あるいは Apm1 と CN の遺伝学的関係は、これらの分子が細胞内輸送、細胞質分裂、液胞融合、細胞壁 integrity などの生理機能において、重要な働きを分かち合っている可能性を示唆している。

神戸大学大学院医学系研究科（博士課程）

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 1678 号	氏 名	喜多 綾子
論文題目	Loss of Apm1, the μ 1 Subunit of the Clathrin-Associated Adaptor-Protein-1 Complex, Causes Distinct Phenotypes and Synthetic Lethality with Calcineurin Deletion in Fission Yeast. 分裂酵母 μ -adaptin の細胞内輸送における役割とカルシニューリンとの機能的関連		
審査委員	主 査 横 崎 宏 副 査 山 本 裕 平 副 査 中 村 俊 一		
審査終了日	平成 17 年 2 月 22 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脱リン酸化酵素であり、ヒトから酵母に至る真核生物において高度に保存されている。シクロスポリンAおよびタクリムス(FK506)はカルシニューリンの酵素活性を特異的に阻害し、免疫抑制効果を発揮する。臓器移植において、これらの免疫抑制薬はレシピエント生存率の著明な向上をもたらした。しかしながら、免疫抑制薬の様々な副作用は臨床上の問題となり、これらも全身でカルシニューリンの酵素活性が抑制された結果と考えられるがその詳細なメカニズムは明らかになっていない。本研究では、遺伝学的手法を駆使でき、しかも哺乳類に最も近い情報伝達系路を持つ分裂酵母をモデル生物として、カルシニューリンを介するシグナル伝達系路の解明を試みた。分裂酵母には1コピーのカルシニューリン遺伝子(*ppb1*⁺)が存在し、カルシニューリンがFK506の標的分子として機能することが明らかとなっている。野生細胞ではFK506存在下でカルシニューリン遺伝子がノックアウトされても通常の増殖には問題がないが、培地にFK506が存在すると生育不能となる変異体が既に複数取得されている。それらの変異体の一つである *cis* (*chloride and immunosuppressant sensitive*)/*I-1* の原因遺伝子を同定し、その生理機能さらにはカルシニューリンとの機能的関連について解析した。

cisI-1 変異体の表現型を指標として *cisI*⁺ 遺伝子を同定し、塩基配列決定した結果、高等生物におけるクラスリンアダプタータンパク質複合体 AP-1 のサブユニットの一つである μ 1 アダプチンと高い相同性を持つタンパク質 Apm1 をコードしていた。さらに、*cisI-1* の変異体ではストップコドン変異により Apm1 の C 末 83 アミノ酸が欠損していることが明らかとなった。

apm1 ノックアウト細胞(Δ *apm1*)を作成したところ、通常の培地では生育可能であるが、免疫抑制薬感受性など *cisI-1* と同様の表現型を示した。高等生物で AP-1 複合体は細胞内輸送において重要な役割を担うことから、 Δ *apm1* の電子顕微鏡解析を行ったところ、野生株と比較してゴルジ層の著しい肥厚ならびにゴルジ体に近接して分泌小胞がみられ、 $\sim 500\text{nm}$ の電子密度の高い異常なゴルジ膜と考えられる Berkeley bodies が観察され、制限温度下および FK506 添加により増悪する post-ゴルジ分泌小

胞の蓄積を認めた。これらの所見から Apm1 が細胞内輸送においてゴルジ機能、さらにはゴルジから細胞膜への分泌に重要な役割を果たしていることが示唆され、酸性フォスファターゼ分泌定量ならびに *Pho1*⁺ leader peptide GFP 融合タンパクを用いた解析により、 Δ *apm1* の分泌機能が低下していることが確認された。さらに Δ *apm1* では、細胞表面とエンドサイトーシス経路をサイクルする synaptobrevin の中隔、成長端での局在が失われ、細胞質内にゴルジ/エンドソームと一致する塊状の局在が認められた。

次に、Apm1-GFP を用いた観察では、ゴルジ/エンドソームのみならず、核、特に紡錘体に強い蛍光がみられ、中隔にも局在し、SPB において Sad1 と共局在していた。Apm1 と Sad1 の結合は two-hybrid 解析により確認された。 Δ *apm1* は、制限温度下、FK506 添加で、高頻度に多核・多隔壁細胞が出現し、細胞分裂の異常を示した。また、低浸透圧ストレス下での液胞融合がみられず、液胞は断片化していた。さらに、 Δ *apm1* は細胞壁分解酵素 β -glucanase に超感受性を示し、細胞壁の異常が示された。

最後に、カルシニューリンと機能的に関連し、ゴルジおよびゴルジからの分泌に関与する低分子量タンパク質 Rab ファミリーに属する Ypt3 をコードする *ypt3*⁺ と *apm1*⁺ の遺伝学的関係を調べたところ、*apm1* 破壊株と *ypt3-i5* 変異体の二重変異は致死となり、Apm1 と Ypt3 が細胞増殖に必須な役割を分かち合っていることが明らかとなった。

以上のごとく本研究は、免疫抑制薬 FK506 存在下で生育不能となる分裂酵母変異体を用いてカルシニューリンを介するシグナル伝達系路を研究したものであるが、新たにカルシニューリンと合成致死となる変異体 *cisI-1/apm1-1* の原因遺伝子であるクラスリンアダプタータンパク質複合体構成成分 μ 1 をコードする *apm1*⁺ を同定し、Apm1 のノックアウト細胞の表現型を解析からその細胞内輸送における役割を明らかにしたものとして、価値ある集積と認める。よって、本研究者は、博士(医学)の学位を得る資格があると認める。