



Calcineurin is implicated in the regulation of the septation initiation network in fission yeast

呂，亜濱

(Degree)

博士（医学）

(Date of Degree)

2002-10-09

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙2646

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2002646>

※ 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。



【 141 】

氏名・(本籍) 呂 亜 濱 (中国)

博士の専攻分野の名称 博士(医学)

学位記番号 博ろ1848号

学位授与の要件 学位規則第4条第2項該当

学位授与の日付 平成14年10月9日

【学位論文題目】

Calcineurin is Implicated in the Regulation of the Septation

Initiation Network in Fission Yeast

(分裂酵母カルシニューリンは細胞隔壁形成開始
ネットワーク(SIN)の制御に関与する)

審査委員

主査教授 久野高義

教授 山村博平

教授 中村俊一

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 10 種類の変異株を取得している。その中の *its10* 変異体は細胞隔壁形成開始ネットワークを制御する重要な構成成分のひとつである *cdc7⁺* 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隔壁形成開始ネットワーク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、KP553 (*h⁻ leu1-32 cdc10-1*) *its10-1* 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

ニトロソグアニジンで HM123 を処理し、突然変異を誘発した株より、0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 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。取得了株は 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*～*its10*)。

3. *its10* 遺伝子のクローニング

Lithium acetate 法により *its10-1* 変異株を分裂酵母遺伝子ライブラリーで形質転換し、*its10* 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、ダイデオキシン法により遺伝子の塩基配列を決定した。

結果

1. *its10* 変異体の表現型

its10 変異株は、25°Cでは生育可能であったが、36°Cでは細胞が伸長し、生育不能になった。また、FK506 とシクロスボリン A にも感受性を示し、0.2M MgCl_2 にも感受性を示した。また、カルシニューリン(CN)破壊株と *its10* 変異株の二重変異体は致死であった。

2. *its10-1* 変異体の原因遺伝子の同定

its10 変異株を、分裂酵母遺伝子ライブラリーで形質転換し、*its10* 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後、分裂酵母ゲノムデータベースで検討した結果、*its10* 変異体の原因遺伝子は、細胞隔壁形成開始制御ネットワーク(Septation Initiation Network; SIN)の中で、重要な働きを担い、蛋白質リン酸化酵素をコードする *cdc7⁺* 遺伝子であることが明らかになった。そこで、今後は *its10-1* 変異体を *cdc7-i10* と改称する。

cdc7-24 変異株は、温度感受性以外に FK506 とシクロスボリン A に対して感受性を示すことが明らかになり、*cdc7-i10* 変異体と同一の表現型を示すことが分かった。一方で、*cdc7-24* 変異株は MgCl_2 に対する感受性を示さなかった。

さらに、*cdc7-i10* 変異体の mutation site を決定した結果、900 番目のトリプトファンがストップコドンに変化し、カルボキシ末端側 162 個のアミノ酸が欠失することがわかった。

以上の結果により、*cdc7-i10* 変異体は *cdc7-24* 変異体の新たな allele であることが判明した。

3. *cdc7-i10, cdc7-24, cdc7⁺* 遺伝子産物の細胞内局在

GFP-*cdc7⁺* 遺伝子、GFP-*cdc7-24* は、spindle pole body に局在するが、GFP-*cdc7-i10* は spindle pole body に局在せず、細胞質に一様に局在することがわかった。

4. FK506 が *cdc7-24* と *cdc7-i10* 変異株の隔壁形成に及ぼす影響

許容温度(25°C)で FK506 を添加すると、野生株に比べ *cdc7-24* と *cdc7-i10* 変異株では隔壁が正常な部位に存在する細胞の数は減少したが、隔壁がなく、かつ二つの核を含有する細胞数は増加し、隔壁がなく、かつ四つの核を含有する細胞数の割合も著しく上昇した。

5. FK506 が SIN pathway 変異体に及ぼす影響

SIN pathway 変異体(*cdc11-136; cdc14-118; spg1-B8; sid1-125; sid2-250* および *mob1-I*)の FK506 感受性を調べた結果、*sid1-125* 株および *cdc14-118* 株以外は全て強い感受性を示した。

6. 活性型カルシニューリン遺伝子の過剰発現は、SIN pathway 変異体の温度感受性および隔壁形成欠損を抑圧する

活性型カルシニューリン(*ppb1ΔC*)で、SIN pathway に関連する遺伝子の変異体を形質転換した結果、制限温度下では *sid1-125* 株以外はすべて温度感受性を抑圧した。

7. カルシニューリン欠損株の細胞隔壁形成異常

α -tubulin GFP 融合蛋白質(GFP-Atb2)を利用して、微小管ダイナミクスを

観察した結果、カルシニューリン欠損株では、細胞内微小管分布の異常が観察された。Calcofluor (CF)にて細胞隔壁を染色した結果、多隔壁かつ隔壁の肥厚が観察された。これらの点は、電子顕微鏡による解析結果と一致した。

考察

cdc7 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 *cdc7* 遺伝子産物とカルシニューリンが、細胞増殖に必須な生理機能を共有していることを示唆する。*cdc7-i10* 変異体のカルボキシ末端側 162 個のアミノ酸が欠失することにより、spindle pole body に局在出来なくなる他、MgCl₂ にも感受性を示す。この点では、既知の *cdc7-24* 変異体と異なる。また、活性型カルシニューリン遺伝子を過剰発現させると、SIN pathway 関連遺伝子変異体の温度感受性および隔壁形成欠損を抑圧することができる。興味深いことに *sid1-125* と *cdc14-118* 変異体は、FK506 に感受性を示さず、活性型カルシニューリン遺伝子を過剰発現させても温度感受性を抑圧することができなかつたという点である。よって、Sid1/Cdc14 複合体はカルシニューリンの標的分子ではないかと考えられる。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	乙 第1851号	氏名	口 亞 滉
論文題目	Calcineurin is Implicated in the Regulation of the Septation Initiation Network in Fission Yeast 分裂酵母カルシニューリンは細胞隔壁形成開始ネットワーク (SIN) の制御に関与する		
審査委員	主査 久野高義 副査 山本博平 副査 中村俊一		
審査終了日	平成14年9月17日		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

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。本研究により、カルシニューリンが細胞質分裂開始ネットワークの制御に関与することが明らかとなった。

結果と考察

1. *its10* 変異株の表現型

分裂酵母 *its10* 変異株は、25°Cでは生育可能であったが、36°Cでは細胞が伸長し、生育不能になった。また、FK506 とシクロスボリン A にも感受性を示し、0.2M MgCl_2 にも感受性を示した。また、カルシニューリン(CN)破壊株と *its10* 変異株の二重変異株は致死であった。

2. *its10-1* 変異株の原因遺伝子の同定

its10 変異株を、分裂酵母遺伝子ライブラリーで形質転換し、*its10* 変異株の表現型(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後、分裂酵母ゲノムデータベースで検討した結果、*its10* 変異株の原因遺伝子は、細胞隔壁形成開始制御ネットワーク(Septation Initiation Network; SIN)の中で、重要な働きを担い、蛋白質リン酸化酵素をコードする *cdc7*⁺ 遺伝子であることが明らかになった。そこで、*its10-1* 変異体を *cdc7-i10* と改称した。

cdc7-24 変異株は、温度感受性以外に FK506 とシクロスボリン A に対して感受性を示すことが明らかになり、*cdc7-i10* 変異体と同一の表現型を示すことが分かった。一方で、*cdc7-24* 変異株は MgCl_2 に対する感受性を示さなかった。

さらに、*cdc7-i10* 変異体の mutation site を決定した結果、900 番目のトリプトファンがストップコドンに変化し、カルボキシ末端側 162 個のアミノ酸が欠失することがわかった。

以上の結果により、*cdc7-i10* 変異体は *cdc7-24* 変異体の新たな allele であることが判明した。

3. *cdc7-i10, cdc7-24, cdc7* 遺伝子産物の細胞内局在

GFP-*cdc7*⁺ 遺伝子、GFP-*cdc7-24* は、spindle pole body に局在するが、GFP-*cdc7-i10* は spindle pole body に局在せず、細胞質に一様に局在することがわかった。

4. FK506 が *cdc7-24* と *cdc7-i10* 変異株の隔壁形成に及ぼす影響

許容温度(25°C)で FK506 を添加すると、野生株に比べ *cdc7-24* と *cdc7-i10* 変異株では隔壁が正常な部位に存在する細胞の数は減少したが、隔壁がなく、かつ二つの核を含有する細胞数は増加し、隔壁がなく、かつ四つの核を含有す

る細胞数の割合も著しく上昇した。

5. FK506 が SIN pathway 変異体に及ぼす影響

SIN pathway 変異体(*cdc11-136, cdc14-118, spg1-B8, sid1-125, sid2-250* および *mob1-1*)の FK506 感受性を調べた結果、*sid1-125* 株および *cdc14-118* 株以外は全て強い感受性を示した。

6. 活性型カルシニューリン遺伝子の過剰発現は、SIN pathway 変異体の温度感受性および隔壁形成欠損を抑圧する

活性型カルシニューリン(*ppb1ΔC*)で、SIN pathway に関連する遺伝子の変異体を形質転換した結果、制限温度下では *sid1-125* 株以外はすべて温度感受性を抑圧した。

7. カルシニューリン欠損株の細胞隔壁形成異常

α -tubulin GFP 融合蛋白質(GFP-Atb2)を利用して、微小管ダイナミクスを観察した結果、カルシニューリン欠損株では、細胞内微小管分布の異常が観察された。Calcofluor (CF)にて細胞隔壁を染色した結果、多隔壁かつ隔壁の肥厚が観察された。これらの点は、電子顕微鏡による解析結果と一致した。

8. 考察

cdc7 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 *cdc7*⁺ 遺伝子産物とカルシニューリンが、細胞増殖に必須な生理機能を共有していることを示唆する。*cdc7-i10* 変異体のカルボキシ末端側 162 個のアミノ酸が欠失することにより、spindle pole body に局在出来なくなる他、 MgCl_2 にも感受性を示す。この点では、既知の *cdc7-24* 変異体と異なる。また、活性型カルシニューリン遺伝子を過剰発現させると、SIN pathway 関連遺伝子変異体の温度感受性および隔壁形成欠損を抑圧することができる。興味深いことに *sid1-125* と *cdc14-118* 変異体は、FK506 に感受性を示さず、活性型カルシニューリン遺伝子を過剰発現させても温度感受性を抑圧することができなかつたという点である。よって、*Sid1/Cdc14* 複合体はカルシニューリンの標的分子ではないかと考えられる。

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質分裂開始ネットワーク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。