

分裂酵母モデル系における免疫抑制薬
超感受性変異体の解析

神戸大学医学部助教授

春藤 久人

分裂酵母モデル系における免疫抑制薬超感受性変異体の解析

1. 研究の背景と目的

タクロリムス(FK506)やシクロスポリン(CsA)は、イムノフィリンと総称されるそれぞれの細胞質中レセプター蛋白質に結合して、 Ca^{2+} /カルモデュリン依存性プロテインホスファターゼ(カルシニューリン:CN)の活性を抑制することにより、免疫抑制作用を発揮する。一方、FK506やCsAは免疫系以外の組織や細胞に対しても作用を及ぼす。例えば中枢神経系における神経細胞保護作用、Long term depressionの抑制、神経伝達物質の放出や細胞内 Ca^{2+} 放出チャネルの感受性増強などの作用、あるいは腎障害、高血圧、高脂血症などの副作用が報告されている。これらの作用についてもCN活性阻害が関わっていると考えられるが、今のところまだ明確な作用機序は解明されていない。我々は、迅速かつ強力な遺伝学的アプローチが駆使できる分裂酵母モデル系を用いて免疫抑制薬超感受性変異体を取得し、その原因遺伝子の単離及び解析により、免疫抑制薬の作用点について分子レベルで解析した。その結果、 β -アダプチンがCNと機能的に関連しており、FK506の新しい作用点であることを見いだした。哺乳動物細胞では、 β -アダプチンはEGFレセプターやLDLレセプター等のエンドサイトーシスの際に形成されるクラスリン被覆小胞のcomponentの一つで、レセプターとクラスリンを繋ぐアダプターとして機能すると考えられていることから、 β -アダプチンはFK506の副作用の一つである高脂血症の発現に深く関与していることが示唆された。その他に、CNと機能的に関連する蛋白質をコードする遺伝子を数種類、単離している。

2. 研究方法・研究内容

(1) 免疫抑制薬超感受性変異体の分離と解析

ニトロソグアニジン処理により突然変異を誘発した分裂酵母野生株(HM123)をレプリカ法により解析し、FK506超感受性変異体を分離する。変異体間で交配させる遺伝学的解析により、FK506超感受性を賦与する変異遺伝子座位を分類する。さらに、必須遺伝子における変異を分離するために、FK506超感受性かつ温度感受性を示す変異体を解析する。これらの変異体とCN遺伝子を破壊した変異体とを交配し、生じる子孫の細胞の表現型から、CN遺伝子との合成致死性を調べ、両遺伝子の関連を遺伝学的に解析する。

(2) 免疫抑制薬超感受性変異を相補する遺伝子の単離

個々の変異体に分裂酵母多コピー遺伝子ライブラリーを導入し、FK506超感受性かつ温度感受性を相補する遺伝子を単離する。このスクリーニングによって、突然変異によりFK506超感受性かつ温度感受性を賦与する遺伝子以外に、その変異遺伝子と機能的に関連した遺伝子(例えば下流で作用する因子など)を単離することが可能である。これらの遺伝子のDNA配列を決定することにより、コードするアミノ酸配列を推測し、各種データベースを検索する。

(3) 単離した遺伝子の機能解析

単離された遺伝子の破壊及び過剰発現により、遺伝子産物の機能を解析する。また、単離した遺伝子を大腸菌発現ベクターに組み込み、大量発現させた蛋白質を用いて、蛋白化学的解析によりCN及びFKBPとの相互作用を調べる。さら

に、この蛋白質標品を抗原にして家兎を免疫し、特異的抗体を作成する。これを用いて免疫細胞化学的手法により細胞内局在を調べる。

3. 研究結果

(1) 免疫抑制薬超感受性かつ温度感受性変異体の取得および原因遺伝子の単離と同定：ニトロソグアニジンで処理した野生株 (HM123)、約 10 万コロニーをスクリーニングし、FK506 に超感受性を示し、かつ温度感受性 (制限温度 36 °C) を示す変異体を 6 種類、取得した。相補性試験によりこれらの遺伝子座位は全て異なり、*its1*~*its6* (immunosuppressant- and temperature-sensitive mutant) と名付けた。分裂酵母遺伝子ライブラリーから、これらの *its* 変異体を宿主として、その表現型を相補する遺伝子の単離を行った。*its1*⁺遺伝子は β -アダプチンを、*its2*⁺遺伝子は (1-3)- β -グルカン合成酵素を、*its3*⁺遺伝子はホスファチジルイノシトール 4-リン酸 5-キナーゼ (PI(4)P5K) をコードしていた。

(2) *its1*⁺遺伝子は 690 アミノ酸からなる β -アダプチンをコードしていた (図 1)。*its1*⁺遺伝子産物は他種の β -アダプチンホモログと共通構造を持ち、N 末端側のコアの部分占める brick-like head portion で高い相同性を示した (ヒト β -アダプチンと 46.2%、出芽酵母 β -アダプチンと 34.9% のアミノ酸が同一)。 β -アダプチンはエンドサイトーシスの初期に形成されるクラスリン被覆小胞において、細胞膜受容体の細胞質内ドメインとクラスリンを繋ぐアダプター複合体 (AP-2) の高分子量サブユニットである。このことから、*its1*⁺遺伝子産物は細胞内輸送系に関与していることが示唆された。さらに、*its1* 遺伝子破壊体は細胞の成育や形態に異常を認めなかったが、免疫抑制薬超感受性かつ温度感受性を示した。温度感受性は浸透圧安定剤 (1.2M ソルビトール) により回復し、細胞壁グルカン分解酵素 (ノボザイム及び β -グルカネース) に感受性を示したことから、*Its1* は細胞壁合成に関与することが示唆された。

its1⁺遺伝子の coding region を発現ベクターに挿入し、GST (Glutathione-S-transferase) 融合蛋白質として、大腸菌内で大量発現させた。現在、精製した recombinant protein を家兎に免疫して抗体を作成中である。

its1⁺遺伝子の coding region の C 末端に HA (Influenza hemagglutinin) tag を挿入して、*nmt1* プロモーターの下流で大量発現させた。現在、抗 HA 抗体により、*its1*⁺遺伝子産物の細胞内局在を解析中である。

(3) *its2*⁺遺伝子は 1570 アミノ酸からなる (1-3) β -グルカン合成酵素をコードしており、*cps1*⁺遺伝子 (スピンドル毒感受性変異体の原因遺伝子) と同一であった。(1-3) β -グルカン合成酵素は細胞壁の主成分であるグルカンの合成に関与する重要な酵素であり、*its2* 変異体も *its1* 遺伝子破壊体と同様に細胞壁グルカン分解酵素に感受性を示した。現在、*its2* 遺伝子破壊体を作製し、その表現型を解析中である。

(4) *its3*⁺遺伝子は coding region 内に 2 カ所のイントロンを持ち、500 アミノ酸からなるホスファチジルイノシトール 4-リン酸 5-キナーゼ (PI(4)P5K) をコードしていた (図 2)。*its3*⁺遺伝子産物はヒト II 型 PI(4)P5K、出芽酵母の小胞輸送や形態形成に関与している *Fab1*、および G2/M 移行期に機能していると考えられる *Mss4* などの PI(4)P5K と相同性を有することから、*its3*⁺遺伝子産物も細胞内輸送に関与していることが示唆された。*its3* 遺伝子破壊体は成育不可能

であり、*its3*⁺遺伝子は必須遺伝子であった。

(5) *its1*⁺及び *its3*⁺遺伝子と CN との遺伝学的解析 (図 3) : CN 遺伝子破壊体は *its1* 遺伝子破壊体あるいは *its3* 変異体と合成致死を示した。*its1* 遺伝子破壊体と *its3* 変異体は合成致死を示し、両者間に遺伝学的相互作用があることが認められた。さらに、*its1* 遺伝子破壊体の表現型を *its3*⁺遺伝子が多コピーで抑圧した。以上の結果より、CN、*its1*⁺(β -アダプチン)及び *its3*⁺遺伝子産物 (PI(4)P5K) の3つの分子は機能的に密接に関連しながら、細胞増殖に必要な機能を共有していることが示唆された。

(6) エンドサイトーシスにおける CN の機能 : これらの結果をもとにした、エンドサイトーシス初期のクラスリン被覆小胞形成のモデルを示す (図 4)。ダイナミンは微小管結合高分子量 GTPase で、エンドサイトーシスに重要な機能を果たしている。ダイナミンは SH(Src homology)3 結合ドメインで adaptor protein-2 (AP-2) 内のアダプチンと結合すると同時に、PH(Pleckstrin homology)ドメインで細胞膜の PIP₂(PI(4)P5K の反応生成物)と結合すると考えられる。ダイナミン GTPase 活性は CN による脱リン酸化で抑制され、GTP 結合型ダイナミン (活性型) となり、クラスリン被覆ピットを頸部で切取ることにより、被覆小胞を形成する。C キナーゼによるリン酸化により GTPase 活性は促進され、GDP 結合型ダイナミン (不活性型) になると考えられる。このように、ダイナミンを中心として、*Its1*、*Its3* および CN が協同的に作用して、エンドサイトーシスあるいは細胞内輸送を進行させる方向に働いているものと思われる。

4. 研究がもたらす効果および波及効果

CN は中枢神経系に豊富に存在する Ca²⁺/カルモデュリン依存性プロテインホスファターゼであり、その生理機能については長らく、解明されていなかった。しかし、FK506 や CsA などのイムノフィリンリガンドが登場し、CN がその標的であることが報告されて以来、免疫系組織をはじめとして、それ以外の組織や細胞において、CN が種々の生理機能に重要な役割を果たしていることが証明されつつある。酵母のような下等真核生物にも CN が存在し、イムノフィリンリガンドの標的であることに着目して、我々は分裂酵母モデル系を用いて CN の生理機能を明らかにすべく、研究を進めている。その結果、CN と協同的に働いている蛋白質として、 β -アダプチンおよび PI(4)P5K をコードする遺伝子を単離し、CN が細胞内輸送系に重要な役割を果たしていることを証明した。それに加えて、*its2*⁺遺伝子産物である (1-3) β -グルカン合成酵素をコードする遺伝子を単離した。出芽酵母との analogy から、この酵素自体が細胞内輸送系に乗って細胞膜へ運ばれ機能している可能性が高く、このことも CN の細胞内輸送系における重要性を示唆している。さらに、もう一つのアプローチとして、CN 欠損変異体の表現型の解析と多コピー抑圧遺伝子の単離を行ったところ、dual-specificity phosphatase のメンバーと相同性を有する新規遺伝子 *dsp1*⁺を単離した。その解析により、CN が細胞形態形成や細胞増殖などの現象に関わっており、イオンホメオスタシスにおいては、MAP キナーゼ経路及び C キナーゼ経路と拮抗的に作用していることが明らかとなった。このような標的分子の同定は従来の生化学的、分子生物学的手法を用いては困難であり、それゆえ、

迅速かつ強力な遺伝学的手法が駆使できる酵母モデル系の最大の利点を十分に発揮できた成果である。今回の結果により、CN の絡む細胞機能に關与する数種類の遺伝子を単離し、その解析により詳細なデータが得られたことは、CN の多岐にわたる生理機能を解明する一助となることが期待される。他の免疫抑制薬超感受性変異体についても遺伝子クローニングを行い、既に新規遺伝子を数種、取得している。現在、その遺伝子機能を解析中である。

Fig.1 Domain structure of β -adaptins

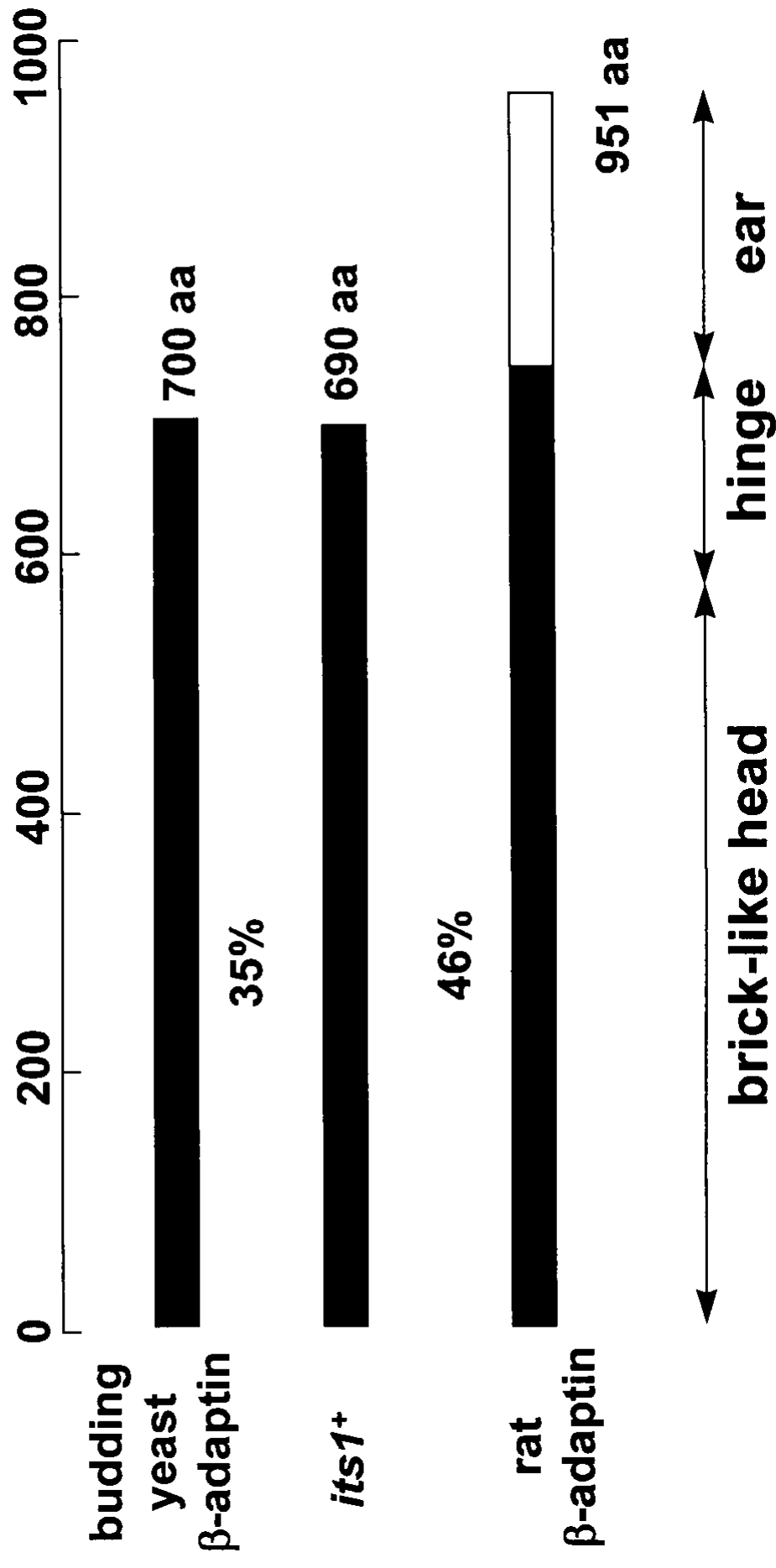


Fig2. Homlogy of Its3 to other PI(4)P5K homologs

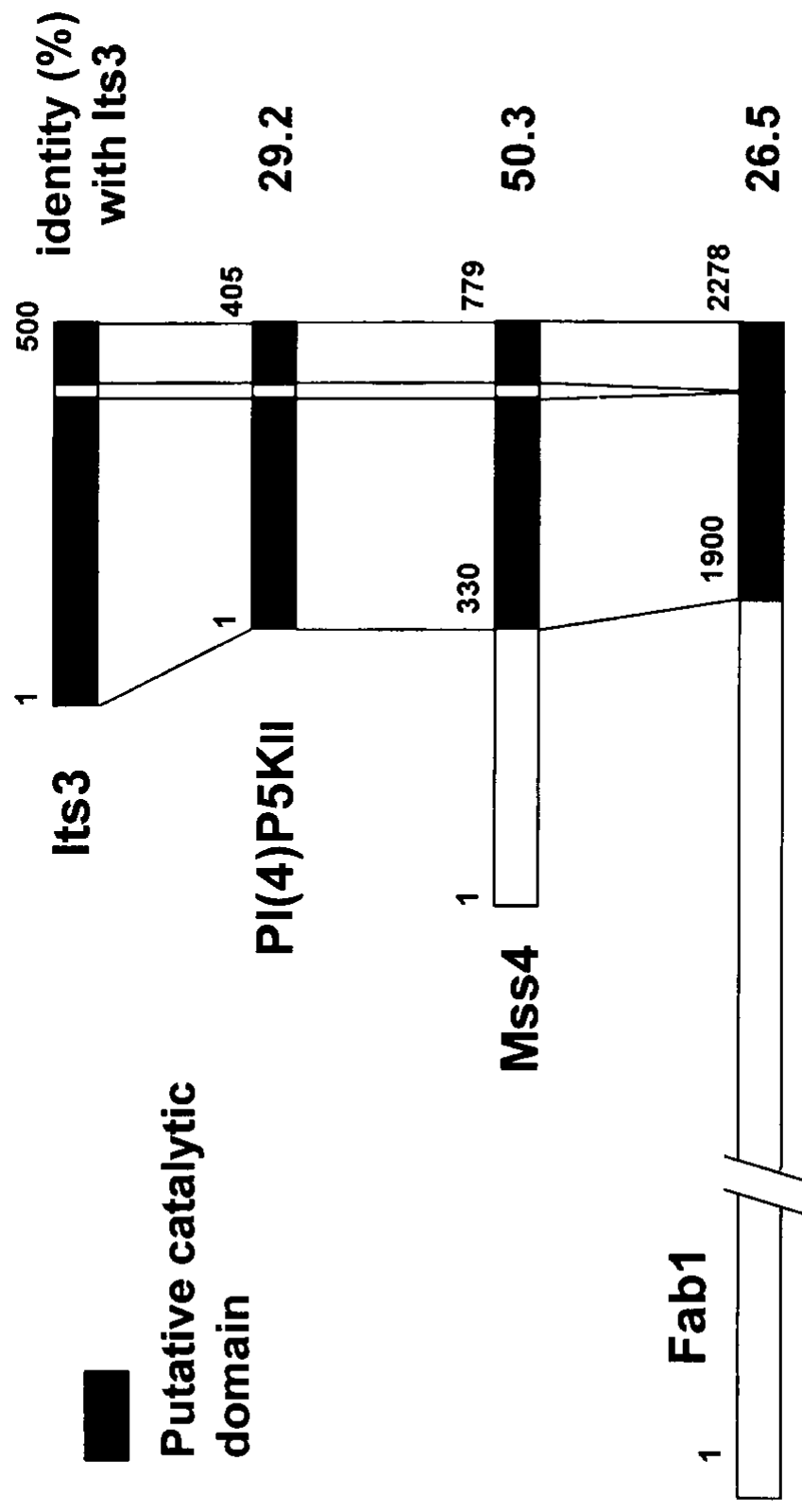


Fig.3 Genetic interactions between *its1*⁺, *its3*⁺ and *ppb1*⁺

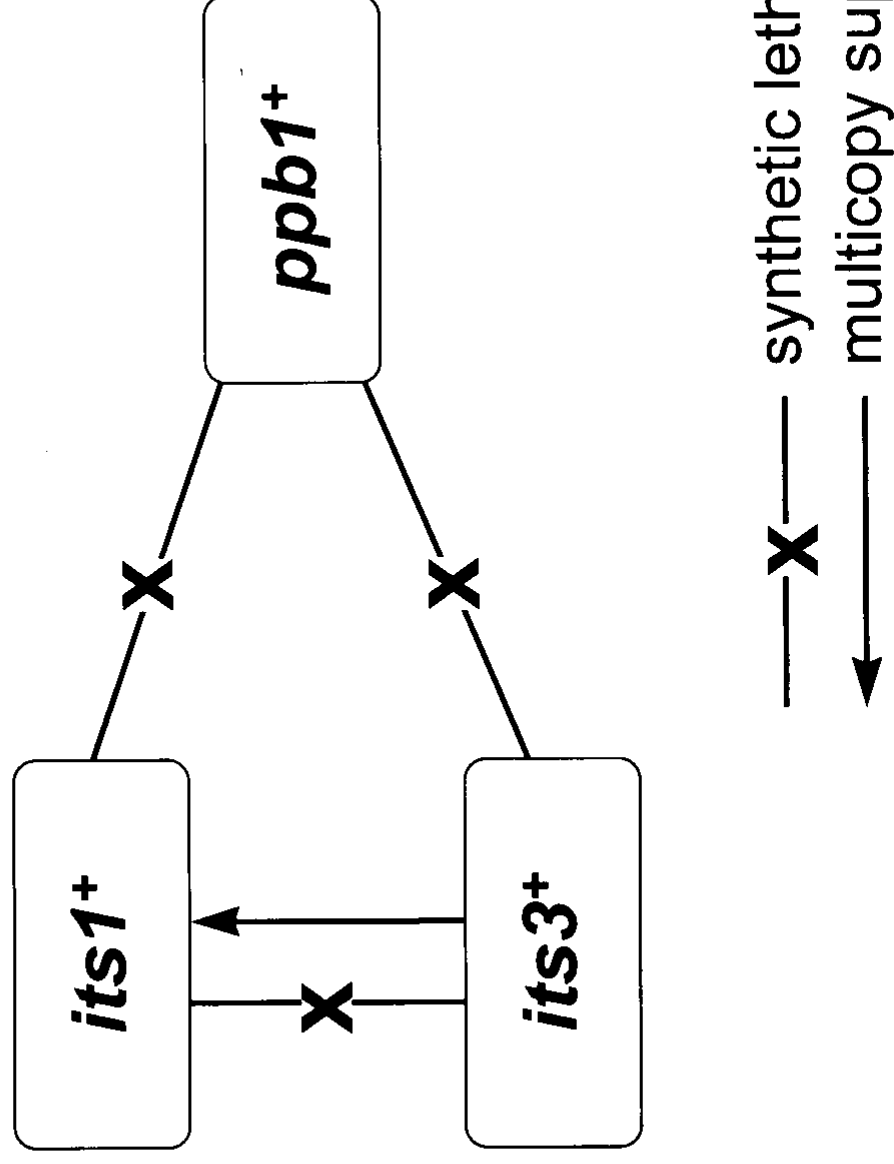


Fig.4 Hypothetical mechanism of clathrin-mediated endocytosis

