

カルシニュー - リンを介する細胞内シグナル伝達  
に関する分子遺伝学的研究

神戸大学大学院医学系研究科

久野 高義

# カルシニューリンを介する細胞内シグナル伝達に関する分子遺伝学的研究

神戸大学大学院・医学系研究科・ゲノム科学講座

分子薬理・薬理ゲノム学分野

久野高義

## 1. 研究の背景と目的

カルシニューリンは、酵母からヒトに至るまで高度に保存されたCa<sup>2+</sup>/カルモジュリン依存性蛋白質脱リン酸化酵素で、免疫応答や心臓発生など、多種多様な細胞機能に関与する事が報告されている。シクロスポリンやFK506等の免疫抑制薬は、カルシニューリン活性を抑制し、その薬理作用を発揮する。FK506には脳虚血後の神経細胞死を抑制する作用も報告されており、これもカルシニューリンを介したアポトーシスの抑制の結果であると考えられている。また、免疫抑制薬により腎不全、高血圧、高脂血症などの副作用が高頻度に認められる事は、よく知られている。これらの事実から、生体には、カルシニューリンと機能的に関連した様々な蛋白質が存在することが予想されるが、旧来の生化学的手法や分子生物学的手法のみでは、これらの蛋白質やコードする遺伝子を同定し、カルシニューリンとの関連を明らかにすることは、困難であった。

研究代表者等は、哺乳動物細胞に最も近い単細胞生物モデル系である分裂酵母にカルシニューリンが存在することに注目し、その解析を進めている。本研究は、酵母モデル系の利点を生かし、ゲノム情報、遺伝学、生化学、細胞生物学などを組み合わせた強力な分子遺伝学的研究を行う事により、1) カルシニューリンと機能的に関連する遺伝子群の単離と同定、2) これら遺伝子群によりコードされる蛋白質の生理機能の解明と哺乳動物ホモログの同定、更に3) これら遺伝子群に作用する薬物の開発と免疫抑制薬副作用軽減への応用を目的としている

## 2. 研究実施計画および研究方法

### 2.1 カルシニューリンと機能的に関連する遺伝子群の単離

2.1.1 カルシニューリン活性を生存に必須とする変異株の単離  
変異原処理した分裂酵母をレプリカ法により解析し、FK506を加えた培地では生育できない変異体を分離する。得られた変異体とカルシニューリンノックアウト株とを交配し、2重変異株の致死性を確認する。

### 2.1.2 変異遺伝子の同定

個々の変異株に遺伝子ライブラリーを導入し、FK506感受性を相補する遺伝子を分離する。分離した遺伝子と変異が起きている遺伝子が同一かどうかを遺伝学的方法により決定する。変異が起きている遺伝子でない場合でも、変異遺伝子と機能的に関連する遺伝子という事

になる。引き続き、これら遺伝子の部分配列を決定し、ゲノムデータベースをサーチし、遺伝子を同定する。

## 2.2 カルシニューリンの標的遺伝子/蛋白質群の同定

カルシニューリンノックアウト株は、クロライド感受性を示す。遺伝子ライブラリーを導入し、クロライド感受性を相補する遺伝子を分離する。カルシニューリンと異なる遺伝子が得られた場合、クロライド制御機構において、カルシニューリンと協同的に働いている遺伝子あるいはカルシニューリンの下流で働いている遺伝子という事になる。

## 2.3 上記の2.1および2.2で得られた遺伝子の機能解析

遺伝子ノックアウト、過剰発現、GFPタグによる細胞内局在、変異部位配列の同定と部位特異的変異導入などにより、それぞれの遺伝子の機能解析を行う。同時に、カルシニューリンとの結合、リン酸化・脱リン酸化による機能修飾等を調べ、カルシニューリンを介したシグナル伝達や他のシグナル伝達系による細胞機能調節での役割を明らかにする。

## 3. 研究結果

### 3.1 カルシニューリンと機能的に関連する遺伝子群の単離，同定および解析

このアプローチは分裂酵母においてもカルシニューリンがFK506の標的であることを利用している。すなわち、野生型の分裂酵母は、培地に高濃度のFK506を添加しても細胞増殖に影響を認めないが、重要な生理機能をカルシニューリンと分かち合っているような遺伝子に変異が生じた場合、FK506添加によりカルシニューリン活性が阻害され、致死となることが予想される。つまり、カルシニューリンノックアウトと合成致死 (synthetic lethal) となるような突然変異体の取得により、カルシニューリンと機能的に関連する蛋白の同定が可能である。

このようなFK506感受性株をpreliminaryにスクリーニングした結果、驚くほど多くの超感受性座位が存在することが明らかとなった。この事実は、カルシニューリンと機能的に関連する蛋白質が多いこと、すなわちカルシニューリンの多様な生理機能を示唆している。そこで、単なるFK506 (免疫抑制薬) 感受性変異ではなく、免疫抑制薬かつ温度感受性変異体 (immunosuppressant and temperature sensitive; *its* 変異体) の分離を試みた。*its*の着眼点は、細胞周期・細胞内輸送などの重要な細胞機能を担う遺伝子 (増殖必須遺伝子) の温度感受性変異のなかにカルシニューリンと重複する生理機能を有するものを単離しようというものである。現在 *its* 1-8 を分離し、遺伝子産物の解析を行っている。以下に、このアプローチにより明らかされた分裂酵母カルシニューリンの細胞内機能について説明する。

#### 3.1.1 ホスファチジルイノシトール代謝と細胞質分裂

分裂酵母のカルシニューリン遺伝子 *ppb1+* は、カルシニューリンの触媒サブユニットをコードする遺伝子として、相同性を利用して単離され

た。その遺伝子破壊による表現型は、多核、多隔壁、分枝状の形態を呈し、分裂酵母カルシニューリンが、細胞質分裂、細胞極性に参与していることが示唆されている。前述したように、カルシニューリンの機能が欠損すると、正常な細胞質分裂が行われなことから、分裂酵母カルシニューリンは、細胞質分裂の研究にとって格好の題材と考えられる。カルシニューリンの細胞質分裂における重要性を示唆する新たな知見が筆者らのFK506感受性変異体の一つである *its3* および *its8* の解析により得られた。

*its3* 変異体の原因遺伝子を温度感受性およびFK506感受性を指標にしてクローニングした結果、phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase (PI4P5K) ホモログをコードしていることが明らかとなった。本遺伝子をノックアウトすると酵母が生育できないことから、生育に必須の遺伝子であることが明らかになった。さらに生化学的実験を行い、Its3蛋白質はPI4P5Kとして機能することを証明した。PI4P5Kはヒトから酵母まで高度に保存されており、PI4,5P2合成酵素としてアクチン細胞骨格系などの制御を介して細胞形態のコントロールに参与することが知られている。*its3* 変異体を高温で培養すると多核・多核壁の細胞の割合が上昇する。*its3* 変異体ではPI4,5P2の量が著しく低下していることから、分裂酵母のIts3はPI4,5P2の制御を介して細胞質分裂に参与していることが明らかとなった。興味深いことに、*its3* 変異体を許容温度でFK506存在下で培養すると、多核・多核壁細胞の割合は100%に達し、細胞は増殖を停止する。このことは、分裂酵母のカルシニューリンとPI4P5Kが協同的に細胞質分裂を制御している可能性を示唆する。さらに、Its3の細胞内局在を調べる目的で、GFPとIts3の融合蛋白質を分裂酵母内で発現させた。その結果、GFP-Its3はplasma membraneおよび収縮環形成部位に局在することが明らかとなった。次に、*its3* 変異体におけるIts3の細胞内局在を調べるため、GFP-*its3* mutant proteinを細胞内で発現させた。驚いたことに、GFP-*its3* mutant proteinは細胞質内にdiffuseに局在し、細胞膜や収縮環形成部位への局在は完全に失われていることが明らかとなった。このことはIts3の正常な局在が分裂酵母の細胞質分裂に必須であることを示唆している。

### 3.1.2 GPIアンカー合成と細胞質分裂

同様に、FK506感受性変異体の一つである *its8* の解析により、カルシニューリンとGPIアンカー蛋白質との関連、更にはGPIアンカー蛋白質と細胞質分裂との関連が明らかになったので以下に説明する

*its8* 変異体の原因遺伝子を温度感受性およびFK506感受性を指標にしてクローニングした結果、出芽酵母およびヒトのGPIアンカー合成酵素 (MCD4、Pig-n) のホモログをコードしていることが明らかとなった。GFP-Its8融合蛋白質を発現させ、生細胞を用いて蛍光顕微鏡下で観察した結果、Its8は小胞体に局在することが明らかになった。さらに生化学的実験を行い、Its8蛋白質はGPIアンカー蛋白質合成に重要であるこ

とと*its8*変異体ではGPIアンカー合成が低下していることを証明した。*its3*変異体と同様、*its8*変異体を高温で培養すると多核・多核壁の細胞の割合が上昇したことから、分裂酵母の*Its8*はGPIアンカー合成の制御を介して細胞質分裂に関与していることが明らかとなった。一方、*its3*変異体と異なり、*its8*変異体の制限温度下における細胞質分裂異常と増殖阻害は培地の浸透圧を高めることで抑圧された。さらに、*its8*変異体は細胞壁分解酵素に対して超感受性を示したことから、*Its8*が細胞壁統合性の維持に関与することが示唆された。また、FK506を培地に加えてカルシニューリン活性を阻害したところ、野生株よりもはるかに多くの多核多隔壁細胞が出現した後に増殖を停止した。

上記の結果から、カルシニューリンは、*Its3*や*Its8*等の遺伝子産物と複雑に相互作用しながら、細胞質分裂を制御していると推測される。今後、*its*変異体の遺伝子クローニングとその解析は、細胞質分裂におけるカルシニューリンおよびその関連遺伝子の機能を解き明かす有力な手段となると考えられる。

### 3.2 カルシニューリンの標的遺伝子/蛋白質群の同定

まず、分裂酵母カルシニューリンがどのような細胞機能に関与しているのかを解明する目的で、カルシニューリン遺伝子破壊株の表現型を徹底的に解析した。その結果カルシニューリン遺伝子破壊株は野生株が生育できる低濃度のCl<sup>-</sup>が培地に存在すると生育不能となる(Cl<sup>-</sup>超感受性)ことから、カルシニューリン遺伝子の機能がCl<sup>-</sup>ホメオスタシスに必須であることが示唆された。免疫抑制薬FK506の存在下では、野生株もカルシニューリン欠損株と同様、Cl<sup>-</sup>に対する超感受性を示すことから、カルシニューリンが、FK506の標的として機能するという図式は、分裂酵母においても保存されていることが明らかとなった。

#### 3.2.1 新規MAPキナーゼホスファターゼPmp1の過剰発現はカルシニューリンノックアウトを抑圧する

カルシニューリンノックアウト株がCl<sup>-</sup>に超感受性を示すことから、カルシニューリンは、Cl<sup>-</sup>調節機構において重要な役割を果たしていると考えられる。そこで我々は、カルシニューリンの制御するCl<sup>-</sup>ホメオスタシスに関与する分子の同定を目的として、カルシニューリン欠損株の示すCl<sup>-</sup>超感受性を多コピーで抑圧するような遺伝子(multicopy suppressor)の取得を行い、2種の遺伝子を単離した。第一番目の遺伝子はヒトCL100、出芽酵母MSG5、mouse P A C -1等のdual-specificity phosphataseのメンバーと高いホモロジーを有する高度に保存された新規遺伝子であることが判明した。dual-specificity phosphataseは、MAP キナーゼのtyrosineとthreonineの両残基を脱リン酸化することにより、MAPキナーゼを負に制御することが知られている。そこで我々はこの遺伝子を*pmp1*<sup>+</sup> (pombe MAP kinase phosphatase)と命名した。

#### 3.2.2 Pmk1 MAPK経路とカルシニューリン経路は拮抗的に機能

する。

Pmp1の過剰発現がMAPキナーゼを負に制御することによりカルシニューリン遺伝子破壊を抑圧しているのであれば、MAPキナーゼの遺伝子破壊によっても同様の効果(カルシニューリンロックアウトの抑圧)が得られることが推測される。現在までに、分裂酵母においては、3つのMAPキナーゼ経路が同定されている。すなわち、接合に關与するByr2-Byr1-Spk1経路、ストレス応答に關与するWis1-Sty1/Spc1経路、そして我々が同定した細胞質分裂、細胞形態に關与するPmk1 MAPキナーゼ経路である。そこで我々はカルシニューリンロックアウトとMAPキナーゼ経路のダブルロックアウト株を作製した。その結果、カルシニューリンロックアウトは、*pmp1*<sup>+</sup>遺伝子の過剰発現で抑圧されたのと同様に、*pmk1*<sup>+</sup>遺伝子ロックアウト(*pmk1ppb1*二重ロックアウト)によっても抑圧された。このことはPmp1ホスファターゼがPmk1 MAPKを介して機能している可能性を示唆する。実際、大腸菌で発現、精製したPmp1を分裂酵母内で発現精製したPmk1と*in vitro*で反応させた結果、Pmp1はPmk1を脱リン酸化することが明らかとなった。また*in vivo*において、野生株から抽出したPmk1のチロシンリン酸化レベルは*pmp1*遺伝子破壊株において上昇し、Pmp1の過剰発現によって消失することが明らかとなった。さらに、Pmp1とPmk1は*in vivo*で結合した。以上の生化学的実験から、Pmp1は、Pmk1を標的として脱リン酸化しすることが証明された。

以上の結果から、分裂酵母では、カルシニューリン経路とPmk1-MAPキナーゼ経路は、拮抗的にCl<sup>-</sup>ホメオスタシスを制御していることが明らかとなった。

### 3.2.3 新規MAPキナーゼキナーゼPek1の過剰発現はカルシニューリンロックアウトを抑圧する

カルシニューリンロックアウトの多コピー抑圧因子として単離された第2番目の遺伝子は、塩基配列決定の結果、哺乳動物のMEKと高い相同性を示すことが明らかとなった。MEKはERK/MAPKのtyrosineとthreonine両残基をリン酸化することで活性化するMAPキナーゼキナーゼである。そこで我々はこの遺伝子を*pek1*<sup>+</sup> (*pombe* MEK 1)と命名した。

次に我々はこのPek1キナーゼの標的であるMAPキナーゼを同定する目的で遺伝学的・生化学的検証を行った。まず、Pek1のロックアウト株を作製し、その表現型を解析した結果、Pmk1ロックアウトと同様の形態異常を示した。さらに、Pek1とPmk1のダブルロックアウト株もPmk1ロックアウトと酷似していた。この事実はPek1がPmk1 MAPキナーゼ経路で機能するMAPキナーゼキナーゼである可能性を示唆している。そこでPmk1のチロシンリン酸化に対するPek1の影響を検討したところ、Pek1遺伝子破壊株ではPmk1のチロシンリン酸化は完全に消失し、Pek1の恒常的活性化型を発現させるとPmk1のチロシンリン酸化は

著しく上昇した。さらに、Pek1とPmk1は*vivo*で結合した。以上の結果を総合して、Pek1はPmk1の上流で機能し、Pmk1を活性化するPmk1 MAPキナーゼキナーゼであることが明らかになった。

この結果は非常に意外であった。何故なら、同一の遺伝学的スクリーニングによって、Pmk1 MAPキナーゼに対する脱リン酸化酵素（負の制御因子であるPmp1）とリン酸化酵素（活性化因子であるPek1）が単離されるという一見矛盾する結果が得られたからである。

3.2.4 Pek1MAPキナーゼキナーゼは活性化と抑制の両機能を有する分子スイッチとして機能する

そこで我々は次のような仮説を考えた。「Pek1 MAPキナーゼキナーゼはMAPキナーゼに対する活性化の機能のみならず抑制の機能も有する。そしてこの活性化と抑制の機能はPek1のリン酸化状態に依存する」この仮説を検証するべく以下の実験を行った。

Pek1は上流のMAPキナーゼキナーゼキナーゼ（MAPKKK）によってセリン残基とスレオニン残基がリン酸化され活性化される。そこで非リン酸化型の変異Pek1Aとリン酸化型変異のPek1<sup>DD</sup>を作製し、これらの遺伝子をカルシニューリンノックアウトに発現させ、その影響を調べた。その結果予想通り、非リン酸化型のPek1がPmk1シグナルに対する抑制の効果を、リン酸化型のPek1がPmk1シグナルに対する活性化の効果を有することが明らかになった。

そうすると、Pek1のリン酸化状態をスイッチする鍵は上流のMAPKKKであるMkh1であるということになる。そこでMkh1を過剰発現させその影響を調べた結果、Pek1のPmk1シグナルに対する抑制の効果をMkh1は打ち消した。このことはすなわち、Mkh1によってリン酸化されることにより、Pek1は抑制因子から活性化因子へと変換された可能性を示唆する。これらの一連の実験結果から次のようなモデルが考えられる。外界からのシグナルが小さいときには非リン酸化型のPek1がPmk1と強く結合することにより、その活性を抑制し、シグナルの伝達にブレーキをかけている。次に外界からの刺激がある一定の閾値を越えると活性化因子に変化したPek1がPmk1をリン酸化し、細胞応答が引き起こされる。情報伝達系にPek1のような分子スイッチが存在すると、小さなシグナルにはFilter がかけられた結果、外界の刺激はAll-or-Noneのドラステイックな細胞応答へと変換されると推測される。Pek1以外にも、出芽酵母のKSS1 MAPKがリン酸化依存的に抑制因子から活性化因子へと変化することが報告されている。このような分子スイッチは、MAPK経路だけでなく、他のキナーゼカスケードにおいても、生体がシグナル伝達を制御する普遍的なメカニズムの一つである事が示唆された。

#### 4. 生活や産業への貢献および波及効果

本研究では、分裂酵母をモデル系としてカルシニューリンの生理機能

を解析し、幾つかの新しい重要な知見を得ることができた。今後、カルシニューリンの標的分子、カルシニューリンとPmk1 MAPK経路のクロストークを解明する分子の同定など、動物細胞の実験系では困難と思われる課題について、分裂酵母の系が解決の糸口を与えてくれることが期待される。分裂酵母モデル系を用いた遺伝学的手法は、カルシニューリンの機能解明にきわめて有力である。カルシニューリンは、我々の予想をはるかに超えた多様な細胞機能を営んでいると考えられる。

FK506超感受性変異株の解析は、カルシニューリンの機能を探り、臓器移植において必須の薬物であるFK506の副作用を解明するという観点からも医学への貢献が期待される。また、酵母はいわゆる「水虫」などを引き起こす真菌類と遺伝学的に非常に近く、真菌類の病原性とカルシニューリンの関係も極めて重要である。我々は本研究の成果に基づき、真菌の新しい治療法を提案し、現在特許を申請中である。真菌症は高齢者や免疫抑制薬投与患者などに日和見感染することが知られている。即ち、真菌症は医療の向上とともに増加することが予想されるが、決定的な治療法を欠いているのが現状である。我々の開発した新しい治療法が薬剤耐性真菌も含めた難治性の真菌症に対抗する新しい武器となることが期待される。

## 5. 発表論文

1. Genetic Interaction between Calcineurin and Type 2 Myosin and their Involvement in the Regulation of Cytokinesis and Chloride Ion Homeostasis in Fission Yeast.  
Fujita-M; Sugiura-R; Lu-Y; Xu-L; Xia-Y; Shuntoh-H; Kuno-T  
Genetics, in press
2. Its8, a Fission Yeast Homologue of Mcd4 and Pig-n, is Involved in GPI Anchor Synthesis and Shares an Essential Function with Calcineurin in Cytokinesis.  
Yada-T; Sugiura-R; Kita-A; Itoh-Y; Lu-Y; Hong-Y; Kinoshita-T; Shuntoh-H; Kuno-T  
J-Biol-Chem. 2001 April; 276 (17):13579-86
3. Molecular genetic analysis of the calcineurin signaling pathways.  
Sugiura-R; Sio-SO; Shuntoh-H; Kuno-T  
Cell-Mol-Life-Sci. 2001 Feb; 58 (2):278-88