

論文内容の要旨

応用生命工学専攻
平成10年度博士課程 進学
氏名：二井 勇人
指導教官名：前田 達哉

論文題目

酵母カルパイン様プロテアーゼ及びカルシニューリン を介したストレス応答シグナル伝達経路の解析

序

カルパインは、哺乳類細胞に普遍的に存在するカルシウム依存性システインプロテアーゼであり、タンパク質を限定分解し、機能修飾あるいはダウンレギュレーションを担うモジュレーター・プロテアーゼであると考えられている。カルシウムによって活性化される事から、重要な細胞内情報伝達経路であるカルシウムシグナリングに果たす役割に関して研究が進められてきたが、哺乳類ではカルパインの生理機能は明確になっていない。

近年になって、ショウジョウバエ、線虫、真菌などの下等真核生物からのカルパイン様プロテアーゼ^(注)の遺伝子クローニングが進んできている。これらの生物においては、哺乳類では不可能な遺伝学的な解析が容易であり、カルパインの生理機能解明に重要な知見が得られることが期待される。

本研究の対象である PalB ホモログ分子は、もっとも単純な真核生物である真菌類に至るまで保存されたカルパインシステムである。そのプロトタイプである *Aspergillus nidulans* の PalB は、菌体が外界のアルカリpH 環境に応答する際に遺伝子発現を調節するシグナル伝達経路を構成する分子である。遺伝子発現調節を行うのは、Zn フィンガー型転写因子 PacC であり、アルカリpH 環境に応答して PalB を介したプロセッシングにより活性化され、転写誘導を行う。私達は、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* のゲノム配列から PalB ホモログ分子 Cpl1p を同定し、解析を進めてきた。Cpl1p は酵母に存在するカルパイン様プロテアーゼとしては唯一のものである。酵母には、胞子形成初期遺伝子 (*IME1*) を誘導する転写因子 Rim101p が PacC ホモログ分子として同定されていた。解析の結果、酵母においても Cpl1p と Rim101p によるシグナル伝達経路 (*CPL1-RIM101* 経路) が存在し、アルカリ環境への適応と胞子形成時の情報伝達

(注) 典型的な哺乳類カルパインの持つドメイン構造;プロテアーゼ領域、C2 様カルシウム結合領域、カルモジュリン様カルシウム結合領域のうち、カルモジュリン様領域を持たないことから、カルパイン様プロテアーゼと呼ぶ。

に必要であること、Rim101p が PacC と同様にプロセッシングにより活性化されることが明らかとなった。

本研究では、*CPL1-RIM101* 経路の新規な構成因子を同定し、本経路のより詳細な制御機構を明らかにすることを目指した。さらに、転写制御される遺伝子群を同定することにより、本経路が塩ストレス応答に重要な機能を果たしていることを明らかにし、これまで解析の進んでいたカルシニューリンを介する塩ストレス応答経路とのクロストークを見出した。

結果

1. *CPL1-RIM101* シグナル伝達経路について

まず、プロセッシングによる Rim101p 活性化調節機構に関する知見を得る事を目的とし、*CPL1-RIM101* 経路の新規な構成因子の同定を行った。

Aspergillus palB-pacC 経路分子の酵母でのホモログ分子の候補の中から *CPL1-RIM101* 経路を構成する分子を探索した。候補分子の遺伝子破壊株を解析した結果、*cpl1* 及び *rim101* 遺伝子破壊株と同様にアルカリ環境に感受性を示す遺伝子群を見出した。これらの破壊株の感受性は *RIM101* の活性化型変異 (C 末端を欠損したプロセス型変異 *RIM101^{N531*}*) により抑圧され、また破壊株中で野生型 Rim101p のプロセッシングは観察されなかった。*CPL1-RIM101* 経路遺伝子として同定された遺伝子の中には、膜貫通領域を1個もしくは6個持ちセンサー分子ではないかと考えられる Rim9p と Rim30p (YNL294c)、SH3 結合領域を持つ Rim20p (YOR275c)、Rim8p (YGR045-046w) が含まれていた。さらに、酵母 two-hybrid 法により、これらの分子の中に Rim101p と相互作用するものがないか解析した結果、Rim101p と Rim20p 間の相互作用を見出した。Rim20p は Rim101p の C 末端側に結合する。この領域は、プロセッシングに際して切除される領域である事から、Rim20p がプロセッシングに調節的な役割を果たしていることが示唆された。また、さらなる相互作用因子の探索の結果、Rim20p が、カルパイン型のカルモジュリン様領域をもつ Fef1p と相互作用する事が明らかとなり、Rim101p のプロセッシングに Cpl1p とならんで Fef1p が積極的役割を果たしていることが示唆された。

次に、*CPL1-RIM101* 経路の生理機能についての知見を得るために、本経路により転写を制御されるターゲット遺伝子のスクリーニングを行った。

実際には、ゲノム DNA への *lacZ* 挿入ライブラリーを用い、活性化型変異体である Rim101^{N531*}p により活性化される遺伝子を同定した。その結果、これまでに知られていた *IME1* を含む胞子形成初期遺伝子群に加え、*ENA1* (Na⁺などの排出を行う P-type ATPase)、*STV1* (液胞型 H⁺-ATPase 100k サブユニット)、*PHO8* (液胞アルカリホスファターゼ) など、細胞内イオン環境の調節もしくは外界のイオン環境への応答に関わる遺伝子群をターゲット遺伝子として見出した。塩ストレス応答に必要な *ENA1* などのターゲット遺伝子の発見を踏まえて、*cpl1*, *rim101* 遺伝子破壊株の表現形を検討した結果、Na⁺や Li⁺などの1価の陽イオンストレスに対する感受性を示す事が明らかとなり、*CPL1-RIM101* 経路が塩ストレス応答時にも機能する事が明らかになった。

2. 塩ストレス応答における *CPL1-RIM101* 経路とカルシニューリン経路のクロストークについて

塩ストレス応答における *CPL1-RIM101* 経路のターゲット遺伝子として *ENA1* を見出したが、カルシウム・カルモジュリン依存性プロテインホスファターゼであるカルシニューリンを介した

塩ストレス応答経路が、やはり *ENA1* の転写活性化にあずかることが知られていた。カルシニューリンは転写因子 Crz1p の脱リン酸化を介して *ENA1* を誘導すると報告されている。これをふまえ、*CPL1-RIM101* 経路とカルシニューリン経路間の関係を調べる事を目的とし、以下の実験を行った。

酵母には、カルシニューリン触媒サブユニット遺伝子が2個 (*CNA1*, *CNA2*)、調節サブユニット遺伝子が1個 (*CNB1*) 存在する。*CNB1* 遺伝子の破壊によりカルシニューリンの機能が失われることが知られているので、*cnb1* 破壊株を作製し、カルシニューリン破壊株とした。また、*ENA1* のプロモーター領域に *lacZ* 遺伝子をつないだレポーター遺伝子を作製し、以後の解析に用いた。カルシニューリン破壊株と *cpl1*, *rim101* 破壊株を比較した結果、いずれもアルカリ pH、高 Na^+ や Li^+ に対して感受性を示し、非常によく似た表現形を持つ事が明らかとなった。また、野性株、*cpl1*, *rim101* 破壊株での、塩ストレスによる *ENA1* 誘導の比較から、誘導のうち Rim101p 依存的な画分は Cpl1p 依存的な画分より大きく、Rim101p の制御する画分には Cpl1p 非依存的な部分が含まれることが示された。このことから、Cpl1p 以外の Rim101p 活性化因子の存在が予想された。これを踏まえ、塩ストレス下での Rim101p の挙動をウェスタンブロットティングにより検討したところ、プロセッシングに加え、脱リン酸化と思われるバンドが出現した。このバンドはカルシニューリン破壊株では見られず、カルシニューリン依存的な脱リン酸化であることが示唆された。*in vitro* での実験で、カルシニューリンが Rim101p を直接脱リン酸化する可能性を検討したところ、精製カルシニューリンは、免疫沈降により精製した Rim101p を、カルシウムとカルモジュリン存在下で脱リン酸化することができた。以上より、Rim101p がカルシニューリンの標的となる事が明らかとなり、Rim101p の活性化機構には、プロセッシングと脱リン酸化という2通りが存在する事が示された。

次に、カルシウム・カルモジュリン非依存的に活性を示す活性化型カルシニューリン変異体、*CNA2ΔC* (C 末端欠損変異体) を用いた解析を行った。*CNA2ΔC* による *ENA1* の誘導は、*rim101* 破壊株中においては低下したが、一方、*cpl1* 破壊株中では誘導の低下はほとんど見られなかった。また、カルシニューリン破壊株と *cpl1* 破壊株においては、塩ストレス下でそれぞれ Rim101p のプロセッシング、脱リン酸化のみが観察された。以上より、プロセッシングと脱リン酸化は独立して起こり、別々に Rim101p を制御しているとの結論を得た。Rim101p のリン酸化部位については、N 末端の Ser に富んだ領域中に含まれることを示唆する結果を得ている。この領域は、哺乳類におけるカルシニューリンの基質である NFATc と相同性を有していた。

最後に、Rim101p の細胞内局在について、GFP 融合タンパク質を用いた解析を行った。Rim101p は、非ストレス下で細胞質及び核に一様に局在し、塩ストレス条件下でも劇的な局在の変化は検出されなかったが、プロセス型 Rim101p (Rim101^{N531*} p) では核への蓄積が観察されることから、活性化時には核への移行が起こっていると考えている。

3. 哺乳類における Cpl1p 相同分子、PalBH について

Cpl1p をはじめとした PalB ホモログ分子では、カルパインのカルモジュリン様領域の代りに特徴的な C 末端領域 (PBH 領域) が存在する。*CPL1-RIM101* 相同経路の哺乳類での解析に向け、哺乳類における PalB ホモログ分子を探索し、以下の結果を得た。

はじめに、PBH 領域のアミノ酸配列を用いて EST データベースを探索し、哺乳類における PalB ホモログ分子をコードすると考えられるヒトおよびマウス EST を同定した。さらに、この配列をもとに、RACE 法により、全長 cDNA をクローニングし、それぞれ hPalBH、mPalBH (human and mouse PalB homologues) と命名した。PalBH mRNA は組織普遍的に発現してお

り、PalBH が細胞における基本的かつ必須の機能に関与することを示唆している。また、hPalBH 遺伝子は、Moyamoya disease などの連鎖が知られている第3染色体上の3p24領域に存在する事を明らかにした。COS 細胞中に発現した PalBH が核に局在することから、PalBH の核内での機能が示唆される。

考察

本研究により、*CPL1-RIM101* 経路が塩ストレス応答に重要な機能を果たし、これまで解析の進んでいたカルシニューリンを介する塩ストレス応答経路とクロストークすることを明らかにした。Rim101p のプロセッシングと脱リン酸化によるクロストークの意義については、両経路が Rim101p を独立に活性化できることから、それぞれの経路が異なる入力シグナルに応答して機能していることが考えられる。実際にアルカリ環境での Rim101p 活性化においては、塩ストレス下とは違い Rim101p のプロセッシングだけが観察され、脱リン酸化は検出されない。さらに、プロセス型および脱リン酸化型 Rim101p により誘導される遺伝子のレポーターに違いがある可能性も残されている。また、Rim101p のリン酸化に必要な領域が哺乳類でのカルシニューリン基質 NFATc との間に相同性を有していたことから、NFATc の場合と同様に脱リン酸化されたこの領域が核移行への機能を担うことが考えられ、カルシニューリンによる転写因子制御の普遍性を示唆している。

一方、Rim101p のプロセッシングによる制御機構については、新たに同定した Fef1p-Rim20p-Rim101p 間の相互作用とプロセッシングとの関連が考えられる。特にカルパイン型カルモジュリン様領域を持つ Fef1p が、カルパイン様プロテアーゼである Cpl1p の機能制御を行うことが考えられる。Cpl1p が他のカルパインシステムと同じくカルシウムにより制御されるか、現在解析中である。また、哺乳類における Cpl1p 相同分子 PalBH の発見から、酵母での知見を哺乳類に外挿し、経路構成分子の同定が可能であると考えている。これらの解析を通じて、哺乳類での *CPL1-RIM101* 相同経路の生理機能についても明らかにしたい。

A Novel Ion Stress Response Pathway in Yeast

