

異株を多数作製し、そのうち温度感受性を示す変異株が4つの遺伝子内相補性グループに分類されることから、各グループの CaM 変異はそれぞれ異なる必須標的タンパク質との結合に特異的に欠損を持つとの仮説を提唱した。この遺伝子内相補を利用した CaM の多重機能の分離は、後にエンドサイトーシスにおける CaM 機能の解析に応用されている。

私は博士過程において、出芽酵母の接合過程における Ca^{2+} シグナルの重要性と Ca^{2+} シグナル伝達系における CaM の中心的な役割に着目し、接合過程における CaM 機能の解析を行なった。アプローチとしては、まず細胞増殖やエンドサイトーシスにおける多重機能の分離に用いられた多数の CaM 変異が、実際に標的タンパク質との結合および活性化に特異的な欠損を与えるか否かを生化学的に検証した。次に接合欠損を示す CaM 変異を同定し、それらを遺伝子内接合相補という現象（後述）を用いて分類し、各分類群の表現型を解析することで、CaM の接合過程における多重機能の分離を試みた。さらに遺伝子内接合相補および遺伝子内相補のメカニズムについて解析を行ない、同じ標的タンパク質との結合に欠損を与える CaM 変異間においてもこれらの現象が観察されることを明らかにした。

結果と考察

1. CaM 変異が標的酵素との結合および活性化に与える影響

CaM 機能の解析において多数の CaM 変異株を用いることの最大の利点は、各 CaM 変異が複数の標的タンパク質との結合や活性化にさまざまな程度の欠損を与えることが期待できる点である。しかしながらこの点についての生化学的な証拠は得られていない。そこで二種の標的酵素、カルシニューリンと CaM 依存性プロテインキナーゼ (CaMK) について、CaM 変異が標的酵素との結合および活性化に特異的に欠損を与えるか否かを検討した。その結果、カルシニューリンあるいは CaMK の最大速度のみを低下させる CaM 変異や、カルシニューリンと CaMK の両方の最大速度を低下させる CaM 変異が存在することがわかった (表 1)。したがって各 CaM 変異は標的酵素の活性化にアレル特異的かつ標的酵素特異的に欠損を与えることが示され、CaM 機能の解析において多数の CaM 変異株を用いるアプローチの有効性に生化学的基盤が与えられた。

2. 接合過程における CaM の機能

接合過程における CaM 機能を調べるために、21 個の CaM 変異株について 34°C における同一変異株同士での接合能を測定した。その結果 *cmd1-228*, *cmd1-233*, *cmd1-234*, *cmd1-235*, *cmd1-239*, *cmd1-240*, *cmd1-242*, *cmd1-250*, *cmd1-251*, *cmd1-252* の計 10 個の変異株が野

生株の 20 %以下という著しい接合効率の低下を示した (図 1)。このうち *cmd1-233* を除く 9 個の CaM 変異株は野生株との接合には大きな欠損を示さなかった。このように同一変異株同士では接合できないが、野生株とは接合できる変異株を bilateral 変異株と呼ぶ。そこで次にこれら 9 個の bilateral 変異株について異なるアリル間での接合を調べた結果、*cmd1-228* と *cmd1-239*、*cmd1-228* と *cmd1-250* の間で著しい接合効率の回復が見られた (図 2)。このような異なるアリル間での接合効率の回復を、ヘテロ二倍体で観察される遺伝子内相補と区別して、「遺伝子内接合相補」と名付けた。したがって bilateral CaM 変異株は *cmd1-228* の属するグループと *cmd1-239*、*cmd1-250* の属するグループの二つの遺伝子内接合相補性グループに分類されることになる。次に各グループに属する CaM 変異株 *cmd1-228* および *cmd1-239* が接合過程のどのステップに欠損を持つかを調べたところ、両者ともに接合子の形成、細胞膜の融合は正常であったが、核融合に欠損を示すことがわかった (図 3)。

cmd1-228 と *cmd1-239* の示す核融合の欠損がどの標的タンパク質の機能欠損によるものかを調べるため、5 個の標的タンパク質の変異株について、34°C での核融合能を調べた。その結果 *nuf1* 変異株のみが核融合に欠損を示すことがわかった (図 4)。そこで次に *cmd1-228* と *cmd1-239* の核融合の欠損が、Nuf1p との結合欠損により生じる可能性について検討した。まず最初に各 CaM 変異が Nuf1p との結合に与える影響について調べるために、免疫沈降法によりいくつかの CaM 変異株における CaM と Nuf1p の複合体形成を調べた。その結果、*cmd1-228* と *cmd1-239* において最も著しい Nuf1p との複合体形成欠損がみられた (図 5)。次にこの *cmd1-228* と *cmd1-239* における Nuf1p との複合体形成欠損が、接合欠損を引き起こす原因かどうかについて検討した。*NUF1* 優性変異である *NUF1-407* は CaM 結合部位を欠失しており、CaM 非依存的に機能することが知られている。もし *cmd1-228* と *cmd1-239* の接合欠損が Nuf1p との結合低下によるものならば、Nuf1-407p の発現によって CaM の Nuf1p への結合の必要性がバイパスされ、接合欠損が抑圧されることが予想される。そこで *NUF1-407* を 1 コピー導入して *cmd1-228* と *cmd1-239* の接合欠損の抑圧の有無を調べたところ、予想通り接合欠損の抑圧がみられた (図 6)。以上の結果から、*cmd1-228* および *cmd1-239* の接合欠損は Nuf1p との結合能の低下より生じることが明らかになり、この結合能の低下が核融合の欠損を引き起こすことが示唆された (図 7)。

3. 遺伝子内相補の新たなメカニズム

接合欠損変異株である *cmd1-228* と *cmd1-239* は共に細胞増殖に関して温度感受性を示し、温度感受性増殖についての 4 つの遺伝子内相補性グループのうちの異なるグループに分類される。この *cmd1-228* と *cmd1-239* の温度感受性増殖が接合欠損と同様に *NUF1-407* によって抑圧されるか否かを調べたところ、両者ともに温度感受性の抑圧がみられた (図

8)。一方、他の二つの遺伝子内相補性グループに属する *cmd1-226* と *cmd1-231* の温度感受性は *NUF1-407* によって抑圧されなかった。したがって *cmd1-228* および *cmd1-239* の増殖に関する温度感受性は Nuf1p との結合能の低下によるものであることが示された。次に *cmd1-228* と *cmd1-239* が共に Nuf1p との結合に欠損を示すにも関わらず、遺伝子内相補を示す原因を調べるため、各 CaM 変異のホモ二倍体と *cmd1-228* と *cmd1-239* のヘテロ 2 倍体について免疫沈降実験を行なった。その結果、半数体の場合と同様に、複合体形成能は *cmd1-228/cmd1-228* と *cmd1-239/cmd1-239* において最も著しく低下していた (図 9)。一方 *cmd1-228/cmd1-239* においては複合体形成の回復が見られた。したがって *cmd1-228* と *cmd1-239* の間で見られる遺伝子内相補は、各変異 CaM 単独では Nuf1p と結合できないにも関わらず、両変異 CaM が共存すると結合が回復するという新たなメカニズムによって生じることが示唆された。

まとめ

- 1) フェニルアラニン残基をアラニン残基に置換した 8 種の CaM 変異が、カルシニューリンと CaMK との結合および活性化に、アリル特異的かつ標的酵素特異的に欠損を与えることを示した。
- 2) 接合欠損を示す CaM 変異株は二つの遺伝子内接合相補性グループに分類され、各グループに属する *cmd1-228* および *cmd1-239* の接合欠損および核融合の欠損は、Nuf1p との結合能の低下により生じることが明らかになった。
- 3) *cmd1-228* と *cmd1-239* の間で見られる遺伝子内相補は、両変異 CaM が共存すると結合が回復するという新たなメカニズムによって生じることが示した。

yCaM	calcineurin		CaMK	
	K_{CaM}	V_{max}	K_{CaM}	V_{max}
	nM	%	μM	%
Cmd1p(wild-type)	61	100	0.40	100
Cmd1-221p(F12A)	100	54	1.7	101
Cmd1-216p(F16A)	170	102	2.1	77
Cmd1-219p(F19A)	130	13	1.1	30
Cmd1-222p(F16A/F19A)	630	20	N.D.	N.D.
Cmd1-239p(F65A/F68A)	81	64	1.5	90
Cmd1-225p(F89A)	98	86	N.D.	N.D.
Cmd1-226p(F92A)	160	89	N.D.	N.D.
Cmd1-227p(F140A)	230	59	N.D.	N.D.

表1 変異 CaM

CaMK の活性

化のミカエリス定数と最大速度。

てはリン酸化カゼイン、CaMKについてはケンプトアミドを基質として用い、様々な CaM 濃度における酵素活性を測定した。 K_{CaM} はミカエリス定数で、酵素活性が最大速度の半分を示す時の CaM 濃度、 V_{max} は最大速度で、野生型 CaM (Cmd1p) の最大速度を 100 % として表してある。測定に用いた CaM 濃度の範囲において、酵素活性が低すぎるためにミカエリス曲線を回帰できなかったもの (N.D.) については、結合能が著しく低下していることを表面プラズモン共鳴を用いた定量的結合アッセイによって確かめている (岡野、修士論文)。

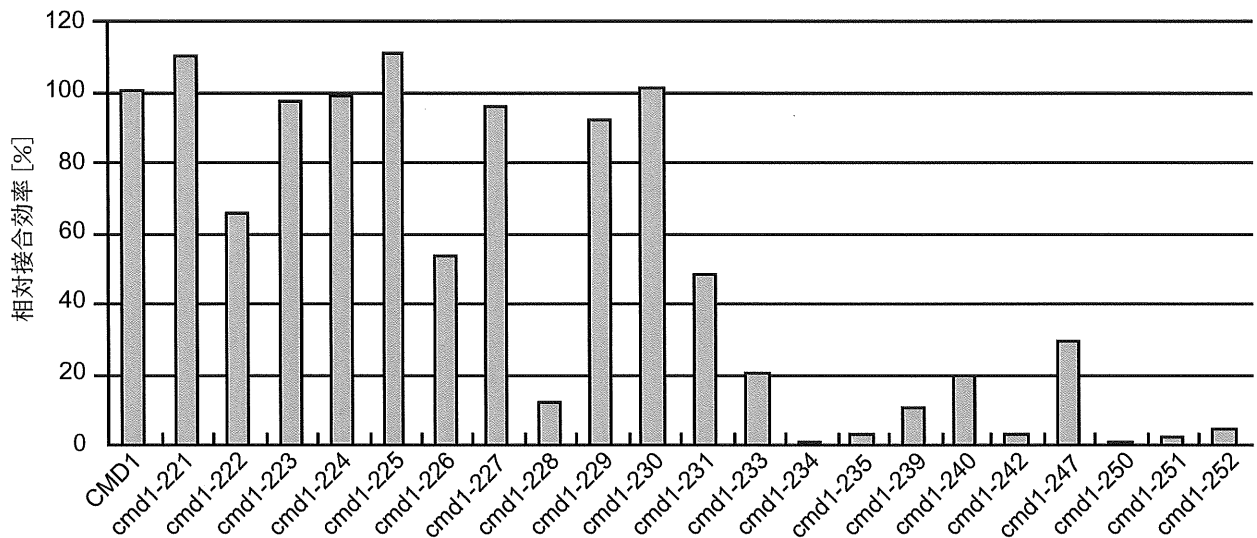


図1 *cmd1* 変異株の同一変異株同士での接合効率。各変異株の MATa および MAT α 細胞を混合し、完全寒天培地上で 34°C で 3 時間接合させた。二倍体細胞のみが増殖可能な寒天培地上のコロニー数を、半数体細胞と二倍体細胞の両方が増殖可能な寒天培地上のコロニー数で割ったものを接合効率として計算した。図では野生株同士での接合効率を 100 % とした相対接合効率で示してある。

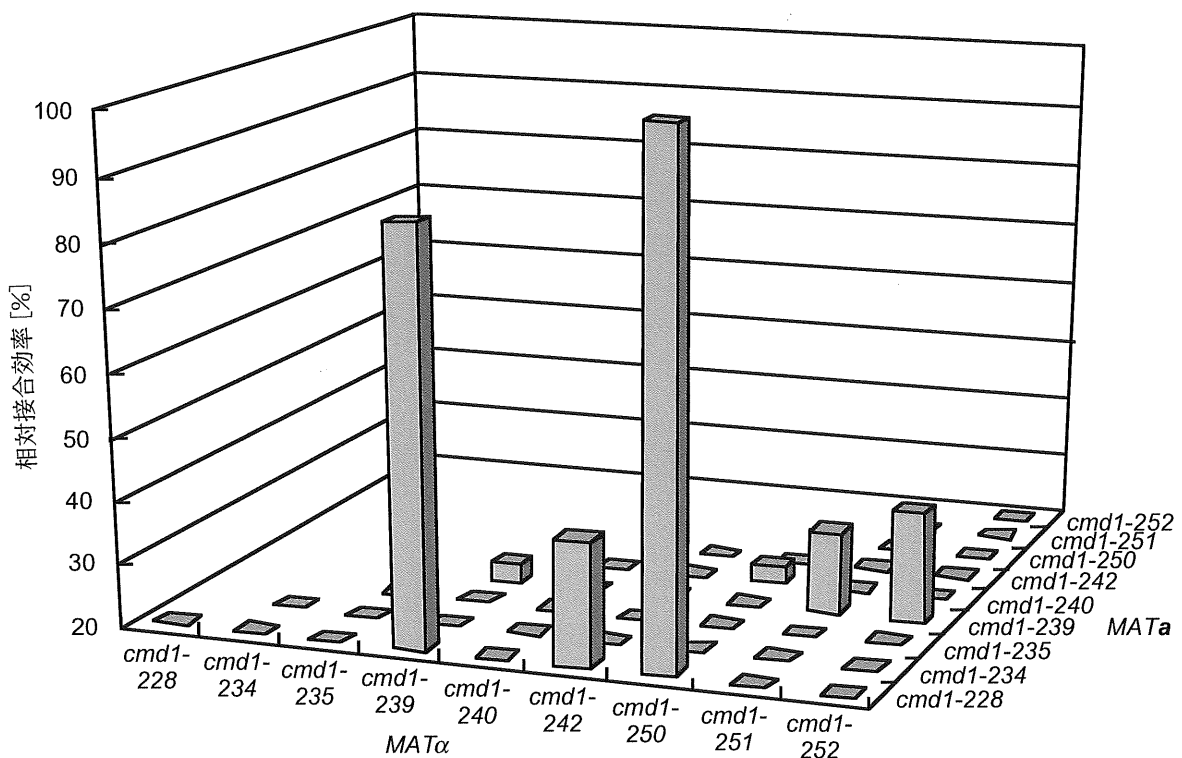


図2 接合欠損を示す *cmd1* 変異株間での接合効率。完全寒天培地上で 34°C で 3 時間接合させ、接合効率を測定した。図では野生株同士での接合効率を 100 % とした相対接合効率で示してある。

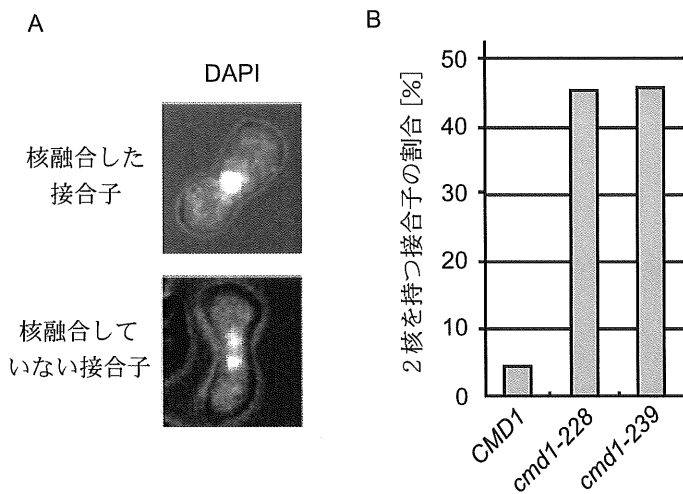


図3 *cmd1-228*と*cmd1-239*の核融合能。完全寒天培地上で34℃で1.5時間接合させた細胞を、エタノール固定後にDAPI染色し、核融合の有無を観察した。A、核融合した接合子と核融合していない接合子。B、芽を持たないまたは小さな芽を持つ接合子のうちの核融合していないものの割合。

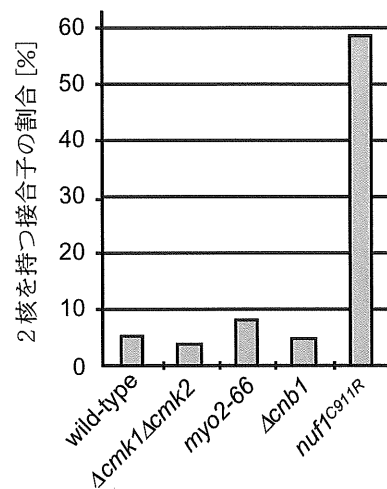


図4 標的タンパク質の変異体の核融合能。完全寒天培地上で34℃で1.5時間接合させた細胞を、エタノール固定後にDAPI染色し、芽を持たないまたは小さな芽を持つ接合子について核融合の有無を調べた。

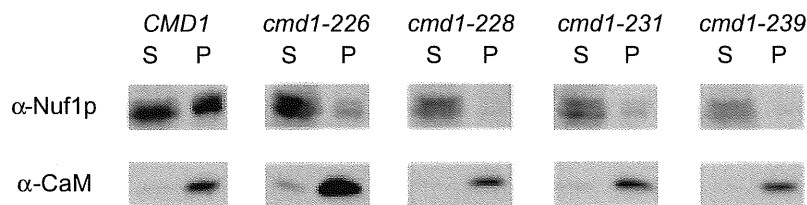


図5 *cmd1*変異株におけるCaMとNuf1pの複合体形成。25℃で対数増殖期まで培養後、37℃でさらに2時間培養した細胞の抽出液を抗CaM血清で免疫沈降し、上清(S)と沈降物(P)を抗Nuf1p抗体および抗CaM血清でイムノブロットした。

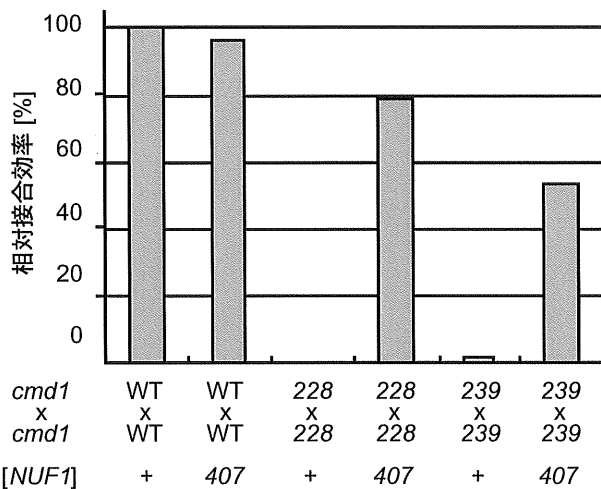


図6 *NUF1-407*による*cmd1-228*と*cmd1-239*の接合欠損の抑圧。完全寒天培地上で34℃で3時間接合させ、接合効率を測定した。*[NUF1]*の+や407は、*MATa*株の*AUR1*部位に*NUF1*または*NUF1-407*が挿入されていることを示す。図ではWT x WT [+]*の接合効率を100%とした相対接合効率で示してある。*

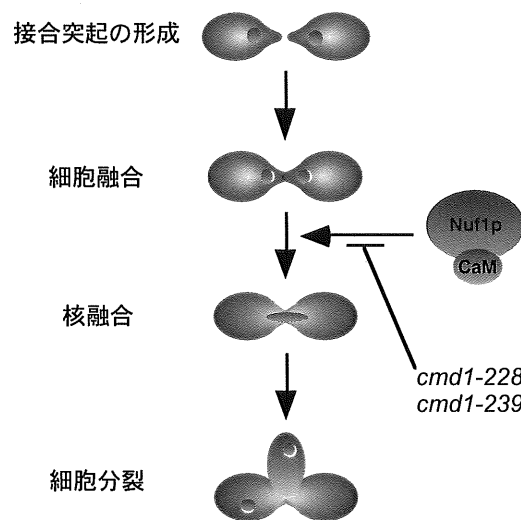


図7 接合過程におけるCaMの機能

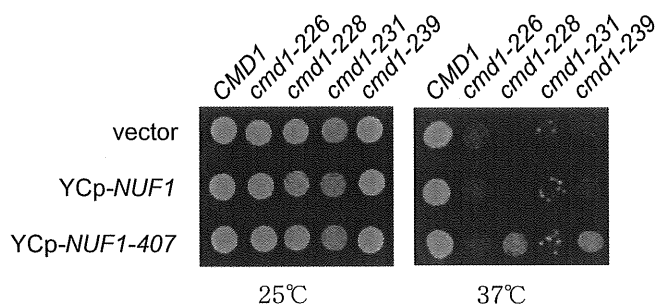


図8 *NUF1-407*による*cmd1*変異株の温度感受性の抑圧。各変異株に*NUF1*または*NUF1-407*を低コピープラスミドで導入し、許容温度(25℃)または制限温度(37℃)下での完全寒天培地上での増殖を調べた。

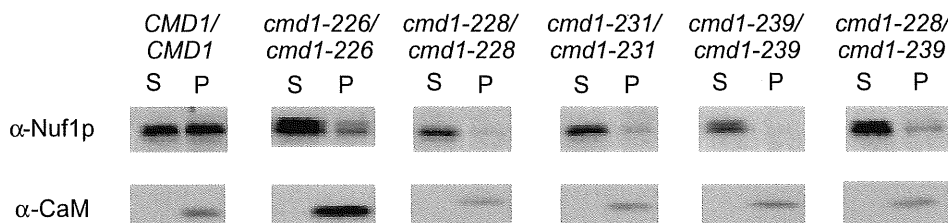


図9 *cmd1*二倍体変異株におけるCaMとNuf1pの複合体形成。25℃で対数増殖期まで培養後、37℃でさらに2時間培養した細胞の抽出液を抗CaM血清で免疫沈降し、上清(S)と沈降物(P)を抗Nuf1p抗体および抗CaM血清でイムノブロットした。