

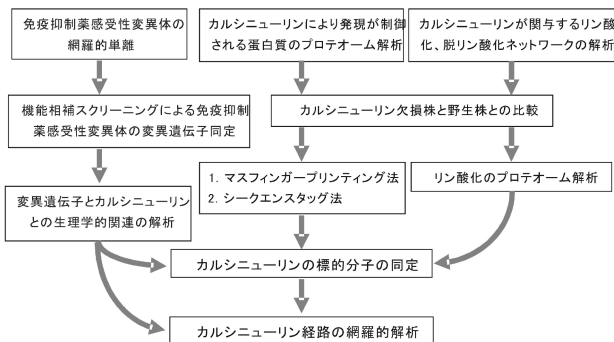
# モデル生物を用いたカルシニューリン経路の分子機構に関する機能ゲノム学的解析

●春藤 久人<sup>1)</sup> ◆久野 高義<sup>2)</sup> ◆杉浦 麗子<sup>3)</sup>

1) 神戸大学医学部保健学科 (現 神戸学院大学総合リハビリテーション学部) 2) 神戸大学大学院医学系研究科 3) 近畿大学薬学部分子医療薬科学研究室

## 〈研究の目的と進め方〉

カルシニューリンは酵母を含むすべての真核細胞生物に存在するプロテインホスファターゼである。モデル生物として分裂酵母を用いて、カルシニューリン経路の分子機構を明らかにすることが本研究の目的である。研究代表者らは、カルシニューリンの特異的阻害薬であるタクロリムスを用いたスクリーニングから、15種の免疫抑制薬感受性変異体を取得している。その原因遺伝子の機能解析により、カルシニューリンが細胞内輸送、細胞質分裂、細胞壁integrity維持、細胞形態形成および細胞周期など多彩な細胞機能に関与することが明らかになっている。具体的には以下の2つのテーマを進めている。(1)モデル生物である分裂酵母のゲノム全体の網羅的スクリーニングによる免疫抑制薬感受性遺伝子座位の同定と解析および(2)カルシニューリンにより発現が制御されるタンパク質のプロテオーム解析



## 〈研究開始時の研究計画〉

1. 新たな免疫抑制薬感受性遺伝子座位の同定とその機能解析
2. 分裂酵母プロテオーム解析による全タンパク質の網羅的同定
3. カルシニューリンにより発現が制御されるタンパク質のプロテオーム解析
4. カルシニューリンが関与するタンパク質脱リン酸化およびタンパク質リン酸化ネットワークの網羅的解析

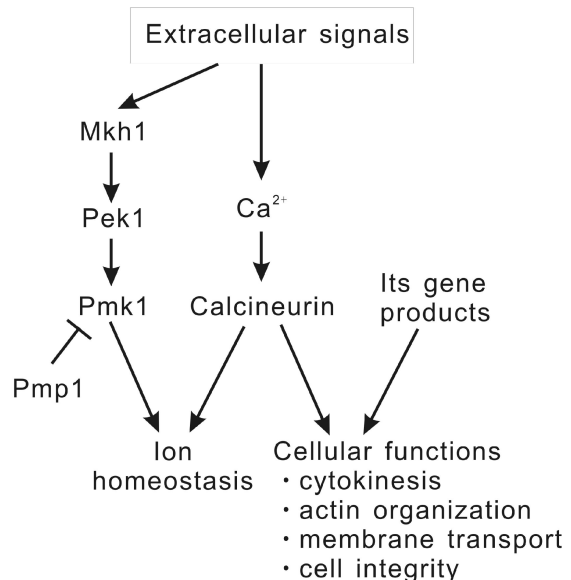
## 〈研究期間の成果〉

1. 免疫抑制薬感受性遺伝子座位の解析  
its8変異体の原因遺伝子はGPIアンカー合成酵素であるPig-n (ヒト) 及びMCD4 (出芽酵母) の分裂酵母ホモログをコードしており、細胞質分裂と細胞壁integrityの維持において重要な機能をCNとシェアしていることが示唆された(1-4).  
its5変異体の原因遺伝子は哺乳動物Rab11低分子量GTP結合蛋白質の分裂酵母ホモログであるYpt3をコードしていた。Its5/Ypt3は分泌経路の複数のステップにおいて機能し、カルシニューリンと機能的に関連していることを明らかにした(5).
2. 分裂酵母のプロテオーム解析  
分裂酵母発現タンパク質のプロファイリング：分裂酵

母可溶性および膜画分をSDSゲル電気泳動後、LC/MS法で解析した結果、可溶性画分から573種類、全体で1,302種類のタンパク質を同定出来た。検出したタンパク質の機能別分類から、多くのシグナル伝達系タンパク質を検出することが出来たことがわかった。

カルシニューリンにより発現が制御されるタンパク質のプロテオーム解析：野生株とカルシニューリン破壊株のそれぞれからの可溶性及び膜画分を二次元電気泳動で解析し発現タンパク質を比較した。その結果、カルシニューリン欠損で発現量が減少したタンパク質31種類、増加したタンパク質 17種類、等電点が変わったタンパク質 11種類が検出された。

3. 低分子量GTP結合タンパク質RabファミリーであるYpt3/Its5の機能解析を行った。Its5は細胞質分裂、細胞壁形成、および液胞の融合などの生理機能に重要な役割を果たすことが明らかとなり、カルシニューリンが細胞内輸送系の制御に重要な役割を果たしていることが示唆された(5).
4. 細胞隔壁形成に関与するタンパク質リン酸化酵素Its10/Cdc7の機能解析を行った。その結果、カルシニューリンがseptation initiation network経路をターゲットにして機能することが示唆された。この結果より、カルシニューリンは隔壁形成とcell separationの両方のステップで重要な役割を果たしていることが示唆された(6).
5. カルシニューリン依存性発現を示すZinc finger型転写因子Prz1の機能解析を行った。Prz1はカルシニューリンにより脱リン酸化され核内に移行し、Pmc1 Ca<sup>2+</sup>ポンプの発現を調節して、Ca<sup>2+</sup>ホメオスタシスに関与することが示唆された。さらに、prz1破壊株とカルシニューリン破壊株の解析から、カルシニューリンシグナリングカスケードには少なくとも2つの経路が存在することが示唆された(7).



### 〈国内外での成果の位置づけ〉

研究代表者らは免疫抑制薬感受性変異体を用いた研究成果によりカルシニューリンの分子遺伝学的及び分子生物学的研究において世界をリードしている。また、谷口寿章博士（理研播磨）との共同研究により研究代表者らは分裂酵母のプロテオーム解析の成果を挙げている。これまでに発芽酵母のプロテオーム解析で約1,500種類のタンパク質を同定した報告がある。ゲノムサイズを考えると、分裂酵母全ORF (4,824個)のうちの1,302タンパク質の同定は世界的レベルであると考えられる。

### 〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

細胞抽出液を二次元電気泳動法で分離する手法では、発現量の少ないタンパク質の検出は不可能であった。細胞抽出液をfractionationしSDS-PAGEで分離した後、ゲル片に切り分ける方法により、検出タンパク質の数は飛躍的に増加したが、微量発現タンパク質の検出（例えばシグナル伝達系タンパク質）は依然として困難である。三連四重極型質量分析計による解析が困難なため、脱リン酸化およびリン酸化ネットワークの網羅的解析が行えなかった。

### 〈今後の課題〉

免疫抑制薬感受性変異体の変異遺伝子同定とその機能解析を引き続き行う。  
カルシニューリン経路により転写調節を受ける遺伝子群をDNAマイクロアレイを用いて網羅的に解析する。

### 〈研究期間の全成果公表リスト〉

1.0111121404

Zhang, Y.J., Sugiura, R., Lu, Y.B., Asami, M., Maeda, T., Itoh, T., Takenawa, T., Shuntoh, H., Kuno, T., Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase *its3* and calcineurin *Ppb1* coordinately regulate cytokinesis in fission yeast., *J. Biol. Chem.*, 275, 35600-35606 (2000).

2.0111121413

Yada, T., Sugiura, R., Kita, A., Itoh, Y., Lu, Y.-B., Hong, Y.-G., Kinoshita, T., Shuntoh, H., Kuno, T., *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., *J. Biol. Chem.*, 276, 13579-13586 (2001).

3.0209261919

Sugiura, R., Sio, S.O., Shuntoh, H., Kuno, T., Calcineurin phosphatase in signal transduction: lessons from fission yeast, *Genes Cells*, 7, 619-627 (2002).

4.0209261924

Fujita, M., Sugiura, R., Lu, Y., Xu, L., Xia, Y., Shuntoh, H., Kuno, T., Genetic interaction between calcineurin and type 2 myosin and their involvement in the regulation of cytokinesis and chloride ion homeostasis in fission yeast, *Genetics*, 161, 971-981 (2002).

5.0209261931

Cheng, H., Sugiura, R., Wu, W., Fujita, M., Lu, Y., Sio, S.O., Kawai, R., Takegawa, K., Shuntoh, H., Kuno, T., Role of the Rab GTP-binding protein *Ypt3* in the fission yeast exocytic pathway, and its connection to calcineurin function, *Mol. Biol. Cell*, 13, 2963-2976 (2002).

6.0209261935

Lu, Y., Sugiura, R., Yada, T., Cheng, H., Sio, S.O., Shuntoh, H., Kuno, T., Calcineurin is implicated in the

regulation of the septation initiation network in fission yeast, *Genes Cells*, 10, 1009-1019 (2002).

7.Hirayama, S., Sugiura, R., Lu, Y., Maeda, T., Kawagishi, K., Yokoyama, M., Tohda, T., Hama, Y., Shuntoh, H., Kuno, T., Zinc Finger Protein *Prz1* Regulates  $Ca^{2+}$  but not  $Cl^-$  Homeostasis in Fission Yeast: Identification of Distinct Branches of Calcineurin Signaling Pathway in Fission Yeast, *J. Biol. Chem.*, 278, 18078-84 (2003).