

酵母におけるカルシニューリンを介する  
情報伝達系の発見とその機能に関する研究

広島大学大学院工学研究科

工業化学専攻

中村太郎

酵母におけるカルシニューリンを介する情報伝達系の発見とその機能に関する研究

広島大学大学院工学研究科  
工業化学専攻

中村太郎

## 目次

	PAGE
緒言	4
第1章 酵母カルシニューリンの生化学的解析	7
第1節 材料と方法	8
1-1 使用菌株	8
1-2 使用培地	8
1-3 DNA操作	9
1-4 融合タンパク質の発現及び精製	9
1-5 抗体の作製	12
1-6 タンパク質解析一般	13
1-7 カルシニューリン (CN)の活性測定	15
第2節 抗Cmp2抗体の作製	17
2-1 はじめに	17
2-2 $\beta$ -ガラクトシダーゼ-Cmp2融合タンパク質発現用プラスミドの構築	17
2-3 融合タンパク質の発現及び精製	18
2-4 抗Cmp2抗体の作製	18
第3節 酵母カルシニューリン (CN)の部分精製	18
3-1 はじめに	18
3-2 CMP2遺伝子産物 (Cmp2)の同定	18
3-3 酵母CNの精製条件の検討	18
3-4 酵母CNの部分精製	19
3-5 活性測定	20
3-6 CMP1, CMP2はCNをコードするか。	21
3-7 CMP1, CMP2以外のCN遺伝子は存在するか。	22
第4節 考察	23
第2章 CNによる細胞内Na <sup>+</sup> 濃度調節機構の解析	25
第5節 材料と方法	26
5-1 使用菌株	26
5-2 使用培地	27

5-3 イオン濃度測定用サンプルの調製	27
5-4 酵母Na <sup>+</sup> の排出の測定	27
5-5 等速電気泳動装置によるイオン濃度の測定	27
第6節 酵母細胞内のイオン濃度の測定及びCN遺伝子破壊の与える影響	29
6-1 はじめに	29
6-2 細胞内Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> 濃度の測定	29
6-3 Na <sup>+</sup> 排出の測定	30
6-4 K <sup>+</sup> の影響	31
6-5 FK506の影響	31
第7節 考察	32
第3章 バナジン酸耐性に必要な遺伝子SVS1の解析	34
第8節 材料と方法	35
8-1 使用菌株	35
8-2 使用培地	36
8-3 DNA操作	36
第9節 SVS1遺伝子の取得と解析	38
9-1 はじめに	38
9-2 SVS1遺伝子の取得	38
9-3 DNA塩基配列の決定	39
9-4 Svs1タンパクの予想アミノ酸配列上での解析	39
9-5 SVS1遺伝子の破壊	41
9-6 SVS1遺伝子の転写制御	42
第10節 SVS1遺伝子産物の解析	42
10-1 はじめに	42
10-2 抗Svs1抗体の作製	42
10-3 SVS1遺伝子産物の解析	42
第11節 Svs1とCNの遺伝学的関係	43
11-1 はじめに	43
11-2 CNはSVS1の転写を制御するか。	43
11-3 SVS1はCNと同じ情報伝達系で働くか。またその位置関係はどうか。	44
第12節 考察	45

第4章 CNとMAPキナーゼカスケードとの遺伝学的関係	46
第13節 材料と方法	47
13-1 使用菌株	47
13-2 使用培地	47
13-3 DNA操作	48
第14節 <i>crv</i> 変異株の取得	49
14-1 はじめに	49
14-2 <i>crv</i> 変異株の取得	49
14-3 <i>CRV2</i> , <i>CRV3</i> 遺伝子の取得	51
第15節 CNとMAPキナーゼカスケードの遺伝学的解析	53
15-1 CN, MAPキナーゼカスケード二重欠損株の解析 (I)	53
15-2 CN, MAPキナーゼカスケード二重欠損株の解析 (II)	54
15-3 CNはMAPキナーゼカスケードと共通のプロセスに関わるか。	55
15-4 グルカン合成系との関わり	56
15-5 $\alpha$ -factorによる停止からの復帰における両情報伝達系の関係	58
第16節 考察	59
総括	62
参考文献	65
謝辞	70



### 緒言

すべての生物は外界の情報を得、その情報を認識し、さまざまな対応をして生命活動を営んでいる。「生物」というものを定義したとき、回りの環境に適応するというのも最も重要な1つの条件であると思える。もちろん下等生物には高等生物のような高度な適応機構は存在しないがシンプルな機構を持っているし、ウイルスのようなものでも宿主を見分けるという一種の環境認識システムを持っている。すなわち回りの状況を認識し、それを細胞内へ伝え、それに適応するメカニズムの解明は生物の仕組みを理解する上で非常に重要であるといえる。

細胞が情報を細胞内に伝える機構の解明は古くから行われてきた。その中で原核生物と真核生物ではその仕組みが大きく異なること、真核生物の間では酵母のような下等単細胞生物と人間をはじめとする高等多細胞生物の間においても細胞内の基本的な仕組みはほとんどかわらないこと、などがわかってきた。その基本的な仕組みというのは細胞外の環境変化あるいは情報伝達因子（サイトカインなど）を受けとめるセンサーが存在しその情報をセカンドメッセンジャーと呼ばれる別の情報伝達因子に読みかえられて、その情報が増幅されしかるべき場所に伝えられていくというものである。このセカンドメッセンジャーとしてはcAMP, DG（ジアシルグリセロール）など多くのものが知られているがCa<sup>2+</sup>はその中でももっともメジャーなものの一つである。

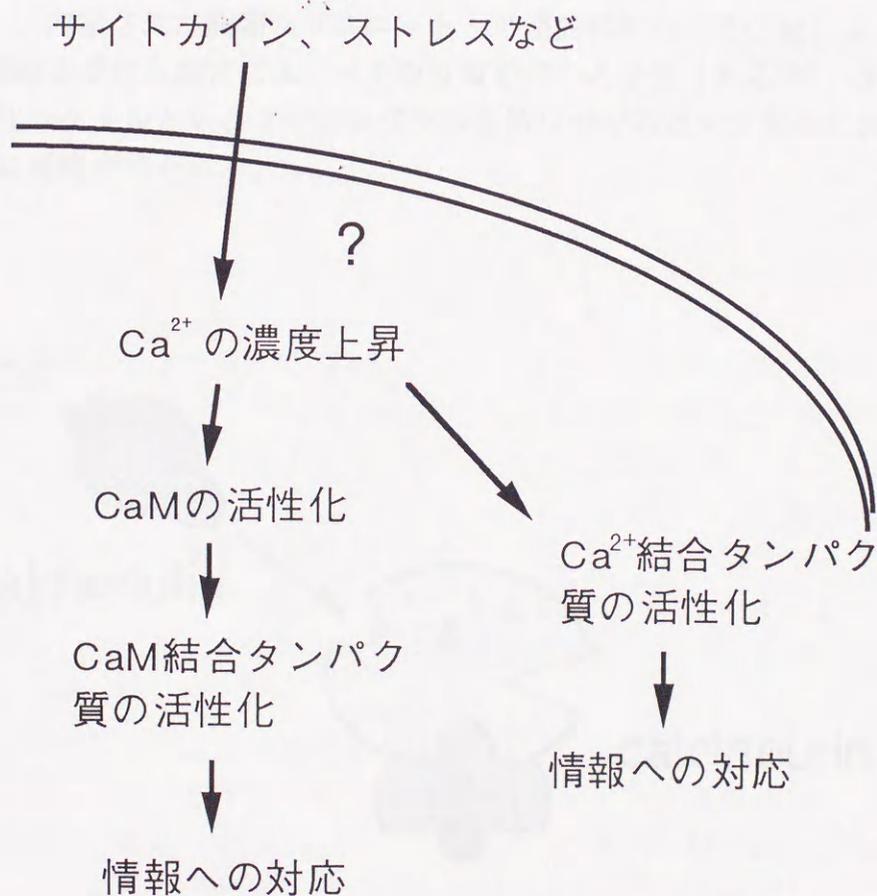


図1 Ca<sup>2+</sup>情報伝達系の予想図

Ca<sup>2+</sup>は他のイオンと異なり直接結合したり遊離したりすることによりそのタンパク質の機能を制御している。Ca<sup>2+</sup>は通常細胞内（細胞質）では細胞外の10万分の1という非常に低濃度に抑えられており、細胞外の情報などに応じて、細胞外あるいは小胞体、液胞、ミトコンドリアなどの細胞内Ca<sup>2+</sup>貯蔵庫から細胞質にCa<sup>2+</sup>が放出され、それに伴い一連のCa<sup>2+</sup>結合タンパク質を活性化しその情報に対応している<sup>(1)</sup>（図1）。このようなCa<sup>2+</sup>結合タンパク質の中でカルモジュリン (CaM)は特に興味深い性質を持っている。このタンパク質は分子量14~18kですべての真核生物に存在し、また生物種間で高い保存性が見いだされているタンパク質である<sup>(2)(3)(4)(5)(6)</sup>。CaMは酵素としての機能は持たないが、Ca<sup>2+</sup>と結合することにより活性化されCaM結合タンパク質と呼ばれる一連のタンパク質を活性化することが知られている<sup>(7)(8)</sup>。すなわちCa<sup>2+</sup>の濃度上昇という情報がCaMを介して細胞内に伝えられ多くの重要なイベントの制御に関わっていることが予想される（図1）。

当研究室では酵母においてCa<sup>2+</sup>情報伝達に関わる研究を行っており、このCaMに結合するタンパク質遺伝子のクローニングが行われてきた<sup>(9)(10)</sup>。その結果、動物細胞（ラット）のカルシニューリン (CN)の触媒サブユニットと高い相同性を有する（アミノ酸レベルで約50%）2つの遺伝子CMP1, CMP2が取得された<sup>(9)(11)(12)</sup>。CNはCaMによって活性化されるプロテインホスファターゼ (PPase)でCohenの分類ではPPase2Bという<sup>(13)</sup>。この酵素は約60kの触媒サブユニットと、CaMと相同性をもつ約20kの調節サブユニットからなり（図2）、内蔵された調節サブユニットと可逆的に結合するCaMによってCa<sup>2+</sup>による2段階の調節を受ける非常にユニークな性質を持つと予想される<sup>(14)</sup>。またCa<sup>2+</sup>シグナルとリン酸化シグナルという2つのシグナルを結びつけるという意味においてもその性質には非常に興味を持たれる。

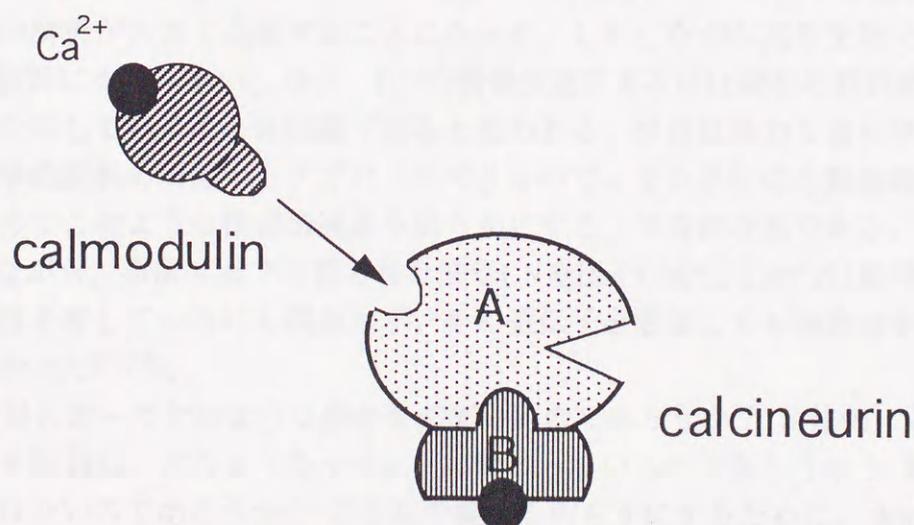


図2 カルシニューリン (CN)の予想図

この酵素の研究は古くから行われてきた。その結果、他のPPase（すなわち1, 2A, 2C型）に比べ基質特異性が高いこと、脳神経系に多く含まれていること（牛の脳においては全タンパク質の約1%）、グリコーゲン代謝に関わっていることなどが明らかにされた<sup>(15)(16)(17)</sup>。特に1989年Liuらが免疫抑制剤FK506及びcyclosporinA (CsA)のターゲットがこの酵素であることを明らかにして以来、非常に注目されるようになった<sup>(18)</sup>。図3に示すように免疫抑制剤FK506やCsAはその結合タンパク質 (FK506はFKBP、CsAはCyclophilin)を介してCNに結合し、その活性を阻害することが明らかにされた。

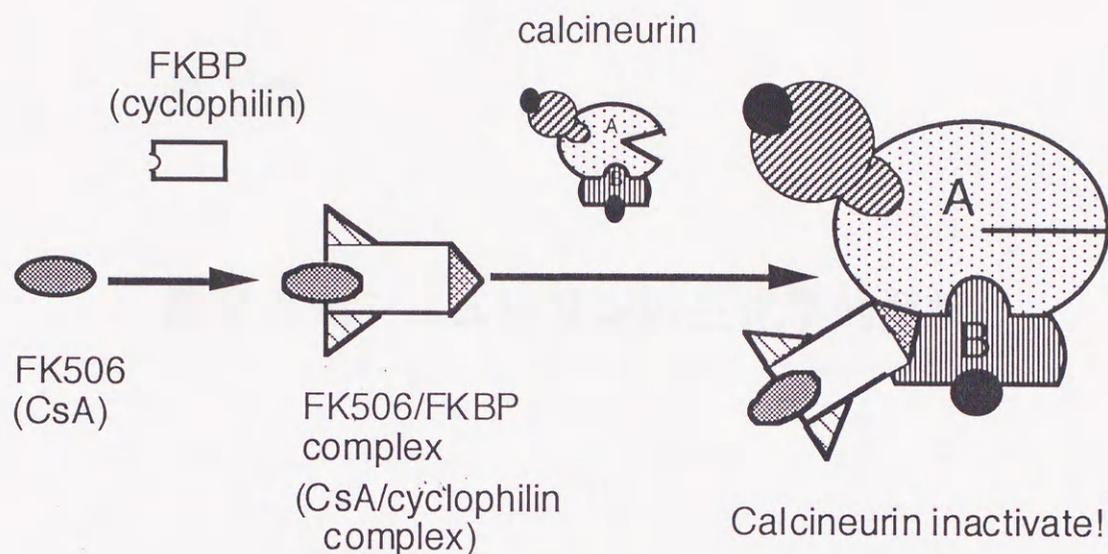


図3 免疫抑制剤によるCN活性の阻害

(CsA: cyclosporinA, FKBP: FK506結合タンパク質, cyclophilin: CsA結合タンパク質)

この結果によりCNが免疫の情報伝達に関わるということがわかっただけでなく、間接的ではあるが、CNに作用する低分子の阻害剤が発見されたことにより動物細胞において生理学的解析が大きく進展することになった。しかしながら高等生物では多くの情報伝達系が複雑にからみあい、今後、1つの情報伝達系あるいは複数の経路間のクロストークを明らかにしていくことは困難であると思われる。酵母は強力な遺伝学的解析、及び生理生化学的解析の両面からアプローチできるので、また系自体も動物細胞に比べてシンプルなのでこのような情報伝達系を明らかにする上で有用な系である。

しかしながら、当研究室で取得された酵母CN遺伝子CMP1, CMP2は動物細胞のものと同じ高い相同性を有しているにも関わらず、その遺伝子を破壊しても細胞の生育にはなんら問題はなかった<sup>(9)(11)</sup>。

CNは酵母においてどのような働きをしているのであろうか？ 具体的にどのようなタンパク質を制御し、どのようなイベントに関わっているのであろうか？ あるいはあまり重要ではないのであろうか？ これらの疑問を明らかにするために、本論文は第1章では生化学的、第2章では生理学的、第3章及び第4章では遺伝学的立場から酵母のCNの役割について解析する。そして総括ではそれらの結果をもとにCNの重要性について推察する。



はじめに

緒言で述べたように、当研究室でクローニングされた2つの遺伝子CMP1, CMP2はともに動物細胞のCN触媒サブユニットと高い相同性を有していた。しかしながら実際にこの遺伝子産物はCNとして働いているのか、また酵母CNの生化学的性質は動物細胞のものとは比べてどのような相違点があるのか、など疑問な点も多い。本章では実際に酵母からCNを精製し、その簡単な生化学的性質及び先の疑問点を明らかにし、次いでCMP1, CMP2以外にCNをコードする遺伝子が存在するかどうかを生化学的に解析し、考察した。

## 第1節 材料と方法

### 1-1 使用菌株

酵母 *Saccharomyces cerevisiae*

RAY3A<sup>(19)</sup> (*MATa trp1 leu2 ura3 his3*)

YLL24<sup>(9)</sup> (*MATa trp1 his3 cmp1::LEU2 cmp2::URA3*)

20B-12<sup>(20)</sup> (*MAT $\alpha$  trp1 pep4-3*)

HTT8b (*MATa trp1 leu2 ura3 pep4-3*)

HTT8c (*MATa trp1 cmp1::LEU2 cmp2::URA3 pep4-3*)

なおHTT8b, HTT8cはYLL24と20B-12をかけ合わせて作製した。

大腸菌 *Escherichia coli*

pop2136 (*clts 857*)

### 1-2 使用培地

YEFD培地

2% グルコース、1% 酵母エキス (オリエンタル酵母)  
2% ポリペプトン (日本製薬)、0.005% アデニン、  
0.003% ウラシル、(1.5% 寒天)、

2×YT培地

1.6% ポリペプトン、1% 酵母エキス、0.5% NaCl、  
(2% 寒天、1.25mg/ℓ アンピシリン)、  
※NaOH, またはKOHでpH7.0に調整

Super Broth培地

A: 1.2% バクトペプトン (DIFCO), 2.4% 酵母エキス、  
80% グリセリン  
B: 1M リン酸カリウムバッファー (pH7.5)  
※AとBをオートクレーブ後に混合

### 1-3 DNA操作

#### 1-3-1 大腸菌からプラスミドの取得

Sambrookらの方法に従った<sup>(21)</sup>。

#### 1-3-2 DNAの制限酵素消化

Sambrookらの方法に従った<sup>(21)</sup>。

#### 1-3-3 DNA粘着末端の平滑化

##### 5' 突出末端の平滑化

Sambrookらの方法に従った<sup>(21)</sup>。

##### 3' 突出末端の平滑化

TAKARA Blunting Kitを用いて行った。

#### 1-3-4 DNAの末端の脱リン酸化

Sambrookらの方法に従った<sup>(21)</sup>。

#### 1-3-5 アガロース電気泳動

Sambrookらの方法に従った<sup>(21)</sup>。

#### 1-3-6 アガロースゲルからDNA断片の回収

Sambrookらの方法に従った<sup>(21)</sup>。

#### 1-3-7 大腸菌の形質転換

Sambrookらの方法に従った<sup>(21)</sup>。(塩化カルシウム法)

野島らの方法に従った<sup>(22)</sup>。(高効率形質転換法)

### 1-4 融合タンパク質の発現及び精製

#### 1-4-1 牛脳からカルモジュリン (CaM)の精製

##### (a) boiling法<sup>(23)</sup>

特に述べない限り操作は4℃以下で行った。

牛脳約200gを氷冷した等量のBuffer 101 (50mM Tris-HCl (pH7.5), 1mM EDTA, 0.5mM PMSF)にいれてミキサーですりつぶした。遠心分離 (27000g, 30min)した上清を集め沈殿をもう一度Buffer101に懸濁、遠心した。集めた上清は100℃で3分処理した後、遠心分離 (27000g, 30min)した。遠心後の上清に最終濃度が5mMになるように100mM CaCl<sub>2</sub>をかくはんしながら加え、Buffer 102 (50mM Tris-HCl (pH7.5), 0.1mM CaCl<sub>2</sub>, 1mM β-mercaptoethanol)で平衡化した40mlのフェニルセファロース (ファルマシア)、またはフェニルセルロファイン (チッソ) に室温でチャージした。カラム容量の約10倍のBuffer102, Buffer102+0.5M NaClで洗浄後、カラム5倍量のBuffer103 (50mM Tris-HCl

(pH7.5), 5mM EGTA, 1mM  $\beta$ -mercaptoethanol)で溶出した。溶出液は5 lの脱イオン水に対して3回透析し、凍結乾燥した。適当な濃度(通常は1mg/ml)となるように脱イオン水にとかし、 $-80^{\circ}\text{C}$ で保存した。

#### (b) TCA法<sup>(24)</sup>

特に述べない限り操作は $4^{\circ}\text{C}$ 以下で行った。

牛脳約200gを氷冷したBuffer201 (50mM sodium phosphate buffer (pH5.7), 1mM EDTA)に懸濁し、家庭用ミキサーですりつぶした。遠心分離 (27000g, 30min)をし、上清を集め、沈殿はもう一度Buffer201で洗浄した。集めた上清にかくはんしながら最終濃度が3%になるように50% トリクロロ酢酸 (TCA)を加え、約10分間かくはんを続けた。かくはんを続けながら6N NaOHを徐々に加えpHが5.2になるようにし、さらに0.5M EDTA (pH7.5), 0.1M PMSFを最終濃度がそれぞれ1mM, 0.1mMになるように加えて約1時間かくはんを続けた。遠心 (5000g, 10min)後、沈殿を30mlの脱イオン水に懸濁し、1M Trisを加えてpH7.0にあわせ溶解した。10mM Tris-HCl (pH8.0)で100mlになるように希釈し、50%飽和になるように固体硫酸アンモニウムを加えた。30分間かくはんした後、遠心分離 (17000g, 20min)して上清を集めた。この上清に最終濃度が1%になるように50% TCAを加え30分かはんした。遠心分離 (17000g, 10min)した沈殿を、少量の脱イオン水に懸濁した後、1M Trisを加えとかし、最終濃度がそれぞれ5mM, 0.1mMになるようにEDTA, PMSFを加えたのち、5 lのBuffer202 (50mM Tris-HCl (pH7.5), 0.1mM EDTA)に対して透析した。透析後のサンプルを遠心分離 (27000g, 10min, room temp)により不溶物を除き、上清に最終濃度が5mMになるように $\text{CaCl}_2$ を加えた。Buffer203 (50mM Tris-HCl (pH7.5), 0.1mM  $\text{CaCl}_2$ )で平衡化したフェニルセファロース (またはフェニルセルロファイン) にチャージし、カラム容量の約10倍量のBuffer203, Buffer203+0.5M NaClで洗浄後、Buffer204 (50mM Tris-HCl (pH7.5), 1mM EDTA)で溶出した。溶出物は脱イオン水に対して透析後、凍結乾燥し適当な濃度になるように希釈して $-80^{\circ}\text{C}$ で保存した。

#### (c) CaM活性の検定

CaMは $\text{Ca}^{2+}$ が存在したときは、 $\text{Ca}^{2+}$ と結合することにより存在しないときに比べて形がコンパクトになる。これはSDS存在下でもみられることから、この性質を利用してCaMの活性は次のように調べた。Sample buffer (0.625M Tris-HCl (pH7.5), 5% SDS, 50% glycerol, 25%  $\beta$ -mercaptoethanol)中に $\text{CaCl}_2$ (1mM)をいれたもの、EGTA (5mM)を加えたものを用意しそれぞれにCaMを加えboilingせずに、SDS-PAGEを行った。この条件下で2つのバンドの泳動度に差があるときはそのCaMは活性をもつ、差がないときは活性を持たない。

#### 1-4-2 CNBr活性化ゲルを用いたタンパク質セファロースカラムの作製

CNBr活性化セファロース (ファルマシア) 必要量を取り、1mM HCl中に15分以上おくことにより膨潤させた。(1gの乾燥品は3.5mlのゲルになる。) 吸引ろ過器 (ミリポ

ア) を用いて1mM HClで洗浄と膨潤を繰り返し、最後にカップリングバッファー (0.1M NaCO<sub>3</sub> (pH8.3), 0.5M NaCl)で洗浄した。ゲルと等量のカップリングバッファーに懸濁し、カップリングさせるタンパク質を1mg/mlになるように加え、室温で約2時間かくはんした。このとき三角フラスコにゲルを入れ旋回培養器を用いて穏やかにかくはんした。

(マグネチックスターラーは使わない。) 吸引ろ過器でカップリングバッファーを除いた後、ゲルを等量のブロッキングバッファー (0.2M Glycine-KOH (pH8.0))に懸濁し、30℃で2時間かくはんしてブロッキングした。吸引ろ過器を用いてゲルをカップリングバッファーと酢酸バッファー (0.1M, pH4.0)で交互に4, 5回洗浄した。最後にカップリングバッファーで洗浄した後、保存用バッファー (タンパク質によって異なる。) に懸濁し4℃で保存した。

#### 1-4-3 融合タンパク質の大腸菌内での発現<sup>(25)</sup>

融合タンパク質発現用プラスミドを持った*E. coli* pop2136をSB+Ampicilin培地で一晚28℃で培養したものをOD<sub>600</sub>=0.1になるように500mlの新しいSB培地に植菌、OD<sub>600</sub>=3.0になるまで28℃で培養した。その後56℃に保温した等量のSBを無菌的に混合して42℃で目的の時間振とうさせた。

#### 1-4-4 融合タンパク質の精製

村上の方法を一部改変して行った<sup>(25)</sup>。

1-4-3の条件で融合タンパクを生産させた菌体を遠心分離 (1000g, 10min) で集め、少量のTE (20mM Tris-HCl (pH7.5), 1mM EDTA)で洗浄し、もう一度遠心分離した。沈殿を約20mlのTE+0.5mM PMSFに懸濁し、Sonicator (ASTRASON W-385, 20% output power)で菌体を破碎した。菌体が破碎されたかどうかは顕微鏡で確認した。この破碎物を遠心分離 (17000g, 10min)し、沈殿をもう一度TE+PMSFに懸濁して遠心分離した。沈殿を8Mの尿素を含むTE+PMSFを入れ、(100mlあたり10ml) を入れ懸濁後、氷中に30分おいた。そして遠心分離(17000g, 10min)を行い上清を回収した。沈殿はもう一度尿素処理した。この上清に終濃度が2MになるようにTE+PMSFを加えた後スターラーでかくはんしながらCaCl<sub>2</sub>を最終濃度が5mMになるように少しずつ入れた。これをTE+1mM CaCl<sub>2</sub>で平衡化したカルモジュリンセファロースカラムにチャージした。カラム10倍量のTE+1mM CaCl<sub>2</sub>, TE+CaCl<sub>2</sub>+0.5M NaClで洗浄後、カラム5倍量のTris-HCl (pH7.5)+1mM EGTAで溶出した。溶出物を脱イオン水に対して透析し、凍結乾燥を行い、濃度が約1mg/mlになるように蒸留水に懸濁した後、-80℃で凍結保存した。

#### 1-4-5 β-ガラクトシダーゼの生産及び精製

pEX2をもった*E. coli* pop2136を融合タンパク質の時と同じ条件でβ-ガラクトシダーゼを発現させる。菌体をSonicatorで破碎し、遠心分離を行い、沈殿をTE+PMSFで洗浄後、1×sample buffer 5~10ml加え、熱湯中に3~5分おいてタンパクを可溶化した。遠心分離 (17000g, 10min)して不溶物を除いた後、SDS-PAGEゲル (18×15cm, 厚さ3mm) に流して40mAの定電流で電気泳動を行った。電気泳動後、0.15Mの冷KClに浸し予測さ

れる分子量下で白く染まった部分を切り出した。切り出したゲルを透析チューブの中に  
入れReservoir buffer (25mM Tris, 192mM glycine)で中を満たしチューブを閉じ、  
Reservoir bufferを電気泳動層に満たして、80Vで3, 4時間かけてタンパク質を溶出した。  
それから逆方向に電流を1, 2分流し、チューブ内のReservoir bufferを回収した。ゲルの  
法はもう一度電氣的溶出を行った。電氣的溶出後、サンプルを脱イオン水に対して透析  
した。透析後サンプルを凍結乾燥し、少量の蒸留水にとかし、Lowry法(後述)により  
タンパクを定量した。そして濃度が1mg/mlになるように蒸留水に溶かして-80℃で凍結  
保存した。

## 1-5 抗体の作製

### 1-5-1 免疫サンプルの調製

免疫サンプルは濃度1mg/mlに調製した融合タンパク質溶液500 $\mu$ lと等量のアジュバント  
(初回免疫はFreund complete adjuvant, 2回目以降はincomplete adjuvant (DIFCO))を混  
ぜて、vortexとsonicatorによりかくはんをサンプルがエマルジョンになるまで繰り返した。  
エマルジョンになったかどうかは、その一滴を水面に落としたとき、拡散しないで  
滴状のまま水面に浮いているかどうかで調べた。

### 1-5-2 うさぎへの免疫

うさぎに注射する前にコントロールとして耳静脈から血液を5ml採取した。うさぎへ  
の注射は次のようにした。まずうさぎをしっかりと固定して背中が必要な面積をバリカ  
ンできれいに刈った後、70%エタノールで消毒した。そして前述のエマルジョン溶液  
1mlを10 $\mu$ lずつ100箇所以上皮下注射した。初回免疫から2週間ごとにブースターとして  
免疫を続けた。また抗体価の上昇を調べるために初回免疫から3週間後とそこから2週  
間ごとに採血した。抗体価はELISA法(1-5-4)によって測定した。

### 1-5-3 抗血清の取得

取得した血液は室温で4, 5時間放置後、遠心分離(1300g, 30min, 4℃)を行い上清を集  
め、NaN<sub>3</sub>を最終濃度が0.1%になるように加え、20 $\mu$ lずつエッペンドルフチューブに分  
注して、短期間は4℃、長期間は-80℃で保存した。また全採血後の血液は同じように遠  
心して、上清を集め、NaN<sub>3</sub>を加えた後、5mlずつにわけて-80℃で保存した。

### 1-5-4 ELISA法による抗体価の測定

TBS (20mM Tris-HCl (pH7.5), 500mM NaCl) 50 $\mu$ lに抗原0.1~1.0 $\mu$ gの割合で混合した。  
これをマイクロタイタープレート (FALCOM, 12 $\times$ 8well)に1wellあたり50 $\mu$ lずつ分注し  
て、1時間室温で静置した。反応液を振り落とし1wellあたり300 $\mu$ lのTBSで2回洗浄した。  
つぎにBlocking reagentを各wellあたり300 $\mu$ l入れて、30分間室温で静置した。その後、  
TTBS (TBS+0.05% Tween)で3回洗浄した。その次にTTBS 100 $\mu$ lを3列目を除いて分注し  
た。抗血清20 $\mu$ lとconjugation buffer (TTBS+1% BSA) 190 $\mu$ lを混合し、3列目にそのうち  
の100 $\mu$ lを分注し、4列目から分注してあるTTBSと混合して、そこから次の列に100 $\mu$ l

ずつ分注する操作を繰り返すことによって20倍から5120倍の希釈系列を作製した。分注後1時間室温で静置した後サンプルを捨てTTBSで3回洗浄した。次に2列目から12列目には1wellあたり100 $\mu$ lのprotein A peroxidase conjugate buffer (Protein A peroxidase (ZYMED LABORATORIES INC)をconjugation bufferで1:50000に希釈したもの)を入れ1列目には100 $\mu$ lのTTBSを入れた。そしてこの状態で1時間静置した後、サンプルを捨てTTBSで5回洗浄し、マイクロタイタープレートをひっくり返してペーパータオルで完全に水気をふき取った。次に各wellに基質溶液 (Solution A, B (BIO-RAD社)を等量に混合) 50 $\mu$ lずつ分注し発色させた。そして適当に発色したところで2% (W/V)シユウ酸溶液50 $\mu$ lずつを入れ反応を停止させた。そして3倍希釈してOD<sub>414</sub>を測定した。

#### 1-5-5 抗血清の精製

得られた抗血清は抗原タンパクを用いたカラムにより精製した。まず取得した抗血清約5mlをPBS (10mM sodium phosphate buffer (pH7.5), 0.9% NaCl)で平衡化した $\beta$ -ガラクトシダーゼセファロースカラム1mlに通して $\beta$ -ガラクトシダーゼを認識する抗体を取り除いた。この操作を2, 3回行った後、す通りの画分を同じく平衡化した融合タンパク質セファロースカラムにチャージした。カラム10倍量のPBS, ABS (100mM acetate buffer (pH4.8), 500mM NaCl)で洗浄後、0.2M glycine-HCl (pH2.6)で抗体を溶出した。フラクションは100 $\mu$ lずつ集め、目的の抗体の存在する画分はELISA法によって確認した。

### 1-6 タンパク質解析一般

#### 1-6-1 酵母破碎液の調製

酵母破碎液の大まかな分画は次のようにして行った。5mlのYEPDで対数増殖期中期(3~5 $\times 10^7$ cells/ml)まで培養した菌体を遠心集菌しTE (20mM Tris-HCl (pH7.5), 1mM EDTA)で洗浄後、100 $\mu$ lのTE+0.5mM PMSFに懸濁し、等量のグラスビーズ (NIPPON RIKAGAKU KIKAI GMB-40)を入れvortexをし、菌体の破碎を行った。このとき氷中にとどき入れながらサンプルの温度を低温に保った。顕微鏡で菌体が破碎されたことを確認した後、サンプルを遠心分離 (15000rpm, 10min, 4 $^{\circ}$ C, TOMY MPX-150)した。沈殿はもう一度TE+PMSFで洗浄後、100 $\mu$ lの1 $\times$ sample bufferに懸濁してSDS-PAGEのサンプルとし (沈殿画分)。また上清には25 $\mu$ lの5 $\times$ sample bufferを加えSDS-PAGEのサンプルとした (可溶性画分)。また破碎後のサンプルにそのまま5 $\times$ sample bufferを加えSDS-PAGEのサンプルとした (Total画分)。なおサンプルはSDS-PAGE直前に遠心分離 (15000rpm, 10min)し、不純物を取り除いた。

#### 1-6-2 ウェスタン法<sup>(26)</sup>

Transfer用泳動タンク (BIO-RAD; TRNS-BLOT<sup>TM</sup> cell)にTransfer buffer (25mM Tris, 192mM glycine) 3 $\ell$ 満たし、冷却器付き恒温槽中で氷冷した。またゲルの大きさに切った転写膜 (MILLIPORE; Immobilon<sup>TM</sup>)をメタノールに軽く浸し、次いでTransfer bufferに浸して、5~10分間振とうして平衡化した。ゲルホルダーにスポンジTransfer bufferに浸したろ紙を順に重ね、その上にSDS-PAGEの終了したゲルを置き、さらに転写膜を重

ねて、Transfer bufferに浸したろ紙、スポンジを重ねてゲルホルダーを閉じた。ゲルホルダーを泳動タンクにセットし、35V, 30min次いで100V, 1hr転写を行った。このとき分子量マーカーはサンプルと同時に転写を行い、転写終了後アミドブラック溶液

(0.1% アミドブラック10B、25% イソプロパノール、10% 酢酸)に1分間浸した後、脱色液(10% メタノール、10% 酢酸)で脱色し、水洗後ペーパータオルの上で風乾した。

転写の終わった膜を軽くTBST (10mM Tris-HCl (pH8.0), 150mM NaCl, 0.05% Tween20)でリンスした後、ブロッッキング溶液(1% BSAを含むTTBS)浸し、37°Cで約1時間放置した。膜を軽くTBSTでリンスした後、1次抗体溶液(精製抗体をTBSTで500倍希釈したもの)5mlに浸し、室温で約1時間放置して反応を行った。反応後、膜をTBSTで3回(5分)洗って、次に二次抗体溶液(Anti Rabbit IgG alkali phosphate buffer (Promega)をTTBSで10000倍に希釈した液)に浸し室温で約1時間放置して反応させた。反応後、膜をTBSTで3回洗った後、発色液(Alkali phosphatase buffer (100mM Tris-HCl (pH9.5), 100mM NaCl, 5mM MgCl<sub>2</sub>) 10mlにNBT 40 $\mu$ l, BCIP 20 $\mu$ l (ともにPromega)をとかしたもの)に浸してタンパク質を発色させた。発色は光を遮断するためにアルミホイルに包み37°Cで行った。バンドが適当な濃さになったときに膜を脱イオン水に浸して反応を停止した。

### 1-6-3 ゲルオーバーレイ法

#### (A) <sup>125</sup>I-標識カルモジュリンの作製<sup>(27)</sup>

カルモジュリン40 $\mu$ gを反応buffer (160mM Imidazole-HCl (pH7.0), 0.1mM CaCl<sub>2</sub>, LPO/GO solution (65nM Lactoperoxidase (SIGMA), 230nM Glucose oxidase (Boehringer Mannheim Biochemicals))100 $\mu$ lに懸濁し、Na<sup>125</sup>I (540 $\mu$ Ci) (アマシヤム)を加えて軽く混合し、30°C, 4分間保温した。次に2.5mg/mlのグルコース8.8 $\mu$ lを加え混合し、30°C, 15分間反応させた。14Mの $\beta$ -メルカプトエタノール2 $\mu$ l加えることによって反応を停止させ、100mM CaCl<sub>2</sub>を8 $\mu$ l, 2mM NaIを16 $\mu$ lを加え、これをBuffer102 (1-4-1参照)で平衡化したフェニルセファロース0.5mlにチャージした。カラム10倍量のBuffer102+5mM NaIで洗浄後、Buffer103 (1-4-1参照)で溶出した。フラクションは100 $\mu$ lずつ取り、各フラクションの放射線量を $\gamma$ カウンター (PACKARD AUTO-GAMMA 5650)で測定し、放射線量の高いフラクションの活性があることをSDS-PAGEで確認後、ゲルオーバーレイに用いた。

#### (B)ゲルオーバーレイ法<sup>(28)</sup>

SDS-PAGEを同じサンプルについて3セット行った(クマシー染色用、Ca<sup>2+</sup>存在下用、Ca<sup>2+</sup>非存在下用)。SDS-PAGE終了後のゲルのうち1枚をクマシー染色し、残りの2つをBuffer301 (固定用 40% メタノール、10% 酢酸)で30分間室温で緩やかに振とうしてタンパクバンドを固定した。10% エタノールでゲルをリンスした後、10% エタノールを加えて2時間振とうし、ゲル中のSDSを除去した。この操作を6回以上繰り返した後、0.1M Imidazole-HCl (pH7.0)で30分間緩やかに振とうし、エタノールの除去及びゲルの

平衡化を行った。2枚のゲルのうち1つはCa<sup>2+</sup>存在下 (1mM)、もう1つは 非存在下 (5mM EGTA)のBuffer302 (20mM Imidazole-HCl (pH7.0), 100mM KCl, 0.5% BSA, 0.02% NaN<sub>3</sub>)で2時間室温で緩やかに振とうし、平衡化した。ゲルと等量のBuffer302 (1mM CaCl<sub>2</sub>を含むもの、5mM EGTAを含むものそれぞれ) に10<sup>6</sup>cpm/6mlとなるように<sup>125</sup>I-標識したカルモジュリンを入れてビニールシート内で一晚反応させた。反応後、ゲルをBuffer302 (1mM CaCl<sub>2</sub>を含むもの、5mM EGTAを含むものそれぞれ) 2時間、3回洗浄した。洗浄後ゲルを乾燥し、オートラジオグラフィにかけた。

#### 1-6-4 酵母形質膜の単離<sup>(29)</sup>

1 ℓ のYEPD培地に酵母を中期対数増殖期まで培養し、遠心集菌し (1700g, 5min), TE (50mM Tris-HCl (pH7.5), 1mM EDTA)で2回洗浄後の菌体をBuffer401 (50mM Tris-HCl (pH7.5), 5mM EDTA, 1mM EGTA, 0.3M Sucrose, 5mg/ml BSA, 1mM PMSF) 約30mlに懸濁した後、フレンチプレス (20000pSi, American instrument company)で破碎した。遠心分離 (4300g, 10min)後の上清をもう一度遠心分離 (15000g, 20min)し、その上清をさらに超遠心 (180000g, 1hr)し、沈殿を取得した。この沈殿を20mlのBuffer403 (50mM Tris-HCl (pH7.5), 1mM EGTA, 10% glycerol, 1mM PMSF)にホモゲナイザー (WHEATON)で懸濁した。もう一度超遠心し、沈殿を5mlのBuffer403にホモゲナイザーで懸濁し膜サンプルとした。

#### 1-6-5 酵母形質膜カルモジュリン結合タンパク質の部分精製

田原の方法に従った。<sup>(30)</sup>

#### 1-6-6 酵母核の単離

平賀の方法に従った。<sup>(31)</sup>

#### 1-6-7 タンパク定量

Lowry法により行った。<sup>(32)</sup>

### 1-7 カルシニューリン (CN)の活性測定

#### 1-7-1 酵母からCNの部分精製

実験結果3-4に示した。

#### 1-7-2 基質の調製

<sup>32</sup>P-カゼインの作製はP. Cohenらの方法<sup>(33)</sup>を改変して行った。dephosphorylated casein (SIGMA) 0.5mgを500μlのReaction buffer (25mM MES-KOH (pH6.5), 4mM MgOAc, 0.25mM EGTA, 2mM sodium-2-phosphoglycerate, 0.4mM β-mercaptoethanol)にとかし、protein kinase A溶液 (cAMP dependent protein kinase catalytic subunit (SIGMA) 1mg (41units)を4μlのDTT溶液 (6mg/ml)にとかしたものと、及び<sup>32</sup>P-ATP (Amersham) 20μCiを加え30℃、1時間反応させた。最終濃度が10%になるようにTCAを加え、反応を停止

した。5000rpm, 5minの遠心後の沈殿を5% TCAで洗浄する操作を3回以上繰り返し、遊離の $^{32}\text{P}$ を除いた。沈殿は最後に蒸留水で2回リンスし、50mM Tris-HCl (pH8.5)に40000cpm/10 $\mu\text{l}$ になるように溶かして基質とした。

### 1-7-3 カルシニューリンの活性測定

反応buffer (20mM Tris-HCl (PH7.5), 1mg/ml BSA, 0.3mM  $\text{MgCl}_2$ ) 70 $\mu\text{l}$ に酵素を含むサンプルを30 $\mu\text{l}$ 入れ、30 $^\circ\text{C}$ で必要な時間反応させた。 $\text{Ca}^{2+}$  (2mM), カルモジュリン (10 $\mu\text{g}$ ), EGTA(5mM)は必要に応じて加えた。反応は100% TCAを最終濃度が10%になるように加えて停止させた。10% TCAを400 $\mu\text{l}$ 加えた後、10000rpm, 5分の遠心分離後の上清400 $\mu\text{l}$ をチェレンコフ法で測定した。測定にはPACKARD TRI-CARB 300Cを用いた。

## 実験結果

### 第2節 抗Cmp2抗体の作製

#### 2-1 はじめに

CMP1及びCMP2遺伝子産物 (Cmp2)を解析するのに先立って、Cmp2に対する抗体を作製した。抗Cmp1抗体はすでに村上によって作製されている(25)。

#### 2-2 $\beta$ -ガラクトシダーゼ-Cmp2融合タンパク質発現用プラスミドの構築

抗原は大腸菌内で発現させた $\beta$ -ガラクトシダーゼとCmp2の融合タンパク質を用いた。発現プラスミドにはpEX2を用いた。このプラスミドはファージの強力なプロモーターであるcroをもち42°Cでヒートショックをかけると下流のLacZ遺伝子の発現が誘導される。図4に示すようにpEX2のEcoRI部位にCMP2遺伝子の約1.8kbのEcoRI-EcoRI断片を挿入し発現用プラスミドを作製した。

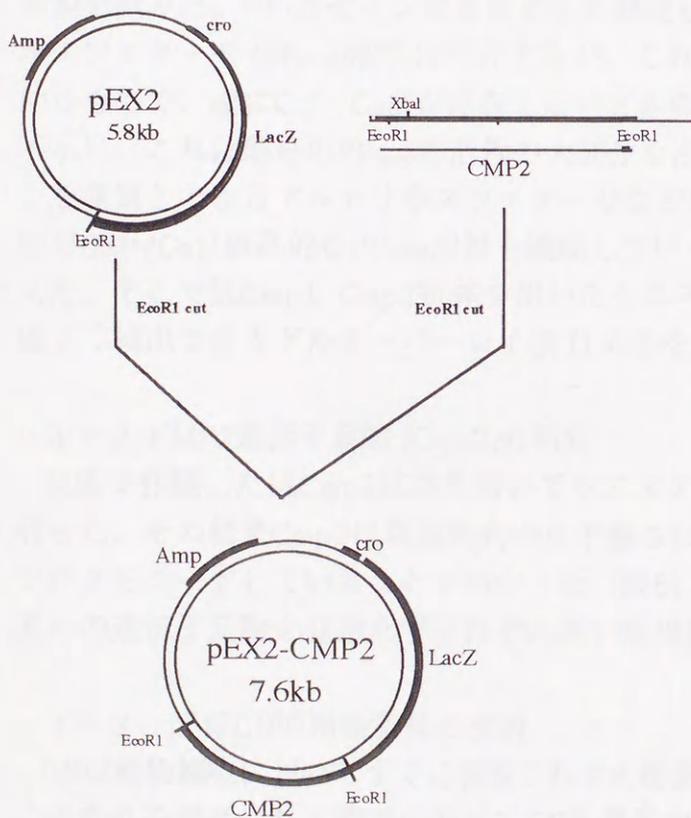


図4 融合タンパク質発現用プラスミドの構築



図5 精製融合タンパク質

### 2-3 融合タンパク質の発現及び精製

1-4-5の方法で融合タンパク質を発現、精製した。図5に示すように融合タンパク質は予想通りほぼ160kdの位置に1バンドまで精製された。よってこの抗原を用いて抗体の作製を行った。

### 2-4 抗Cmp2抗体の作製

2-3で精製した融合タンパク質を抗原として抗Cmp2抗体の作製を行った。1-5に示した方法でうさぎに免疫し、取得した抗血清に抗体価をELISA法で測定した。その結果、7週間目以降は抗体価は定常状態に達したので、13週間目に全採血を行い、1-5-5に示す方法で抗Cmp2抗体を精製した。

## 第3節 酵母カルシニューリン (CN)の部分精製

### 3-1 はじめに

前節で作製した抗Cmp2抗体、村上によって作製された抗Cmp1抗体を用いて酵母CNの精製を試みた。 $^{32}\text{P}$ -カゼインを基質として測定した結果、酵母破碎液中にはプロテインホスファターゼ (PPase)活性は存在するが、これらは $\text{Ca}^{2+}$ /カルモジュリン (CaM) 非依存的なもので、逆に $\text{Ca}^{2+}$ /CaMが存在しないときの方がはるかに活性が高かった (データ不示)。これは酵母のPPaseの活性の大部分を占めるCN以外のPPase、あるいはカゼインを基質とできるアルカリホスファターゼなどの影響が強いと考えられる。これらの理由で $\text{Ca}^{2+}$ /CaM依存的なPPase活性を濃縮していく方法ではCNの精製は困難であると考えた。そこで抗Cmp1, Cmp2抗体を用いたウエスタン法、及びCaM結合タンパク質を感度よく検出できるゲルオーバーレイ法 (1-6-3)を用いて酵母CNの精製条件を検討した。

### 3-2 CMP2遺伝子産物 (Cmp2)の同定

前節で作製した抗Cmp2抗体を用いてウエスタン法により酵母細胞内でCmp2の同定を行った。その結果Cmp2は塩基配列から予想される分子量よりもやや小さい約64kdのタンパクをコードしていることがわかった (図6)。また抗Cmp1抗体、抗Cmp2抗体はお互いの遺伝子産物を認識せずそれぞれ高い特異性を持っていることがわかった。

### 3-3 酵母CNの精製条件の検討

CNは動物細胞においてすでに精製されその酵素学的解析もよくなされている(34)(35)(36)。この条件を参考にして酵母においてCNを精製する条件を検討した。まずこの酵素が細胞内のどこに局在するかをウエスタン法によって調べた (図6)。サンプルは1-6-1に示す方法で調製した。その結果Cmp1, Cmp2はともに可溶性画分、沈殿画分両方に存在することがわかった。よって精製の容易な可溶性画分を用いて行うことにした。

まずCaMセファロースカラムにかける前に、大まかな精製及び細胞内のCaMを除く操作を行うために超遠心分離 (160000g, 1hr)後の上清をDE52陰イオン交換カラム

(Whatman)にかけた。0から0.5Mまで0.05MずつNaClの濃度を上げて溶出して各溶出画分のタンパク質をウエスタン法及びゲルオーバーレイ法によって確認した結果、Cmp1,

Cmp2は0から0.15Mまでにその大部分が溶出されることがわかった。この溶出液に固形硫酸アンモニウムを40%飽和までとそこから10%ごとの沈殿を同じくウエスタン法及びゲルオーバーレイ法で確認した結果、60%飽和までにそのほとんどが沈殿することがわかった。50から60%飽和までは他の画分に比べて少なかったため実際の精製には55%飽和までの画分を使うことにした。その画分はCa<sup>2+</sup>を含むbufferに懸濁し、CaMセファロースカラムにかけた。

1 2 3                    1 2 3

図6 抗Cmp1, 抗Cmp2抗体を用いたCMP1, CMP2遺伝子産物の酵母細胞内局在性

lane1: 酵母破碎液 Total画分  
lane2:                    可溶性画分  
lane3:                    沈殿画分

Anti-Cmp1  
antibody

Anti-Cmp2  
antibody

### 3-4 酵母CNの部分精製

3-3で決定した条件を用いて酵母からCNを部分精製した。精製過程での分解を防ぐため、菌は液胞のプロテアーゼ欠損変異 $pep4-3$ を持った株HTT8b (野生株)、HTT8c (CN欠損株)を用いた。(これらの株はYLL24と20B-12を掛け合わせて作製した。) また精製の過程はすべて4°Cで行った。

まず目的の菌体を中期対数増殖期 ( $3 \sim 5 \times 10^7$  cells/ml)まで6 lのYEPD培地で培養し、遠心集菌 (1700g, 5min)した。集めた菌はTE (20mM Tris-HCl (pH7.5), 1mM EDTA)で2回洗浄し、BufferA (20mM Tris-HCl (pH7.5), 1mM EDTA, 1mM EGTA, 5mM  $\beta$ -mercaptoethanol, protease inhibitor mixture (0.5mM PMSF, 5 $\mu$ g/ml Leupeptin, 5 $\mu$ g/ml Pepstatin))で1回洗浄した後、BufferAに $5 \times 10^9$  cells/mlになるように懸濁し、氷冷したフレンチプレス(20000pSi)にかけて菌体を破碎した。破碎の確認は顕微鏡で行った。破碎液は遠心分離 (27000g, 20min)し、さらにその上清を超遠心分離 (160000g, 1hr)し、上清を取得した。この上清を20mlのDE52陰イオン交換カラムにかけ200mlのBufferAで洗

浄後、100mlの0.15M NaClを含むBufferAで溶出した。溶出液に55%飽和になるように固形硫酸アンモニウムを加え30分以上かくはんした。遠心分離 (12000g, 20min)後の沈殿をBufferA 100mlに懸濁した後、もう一度硫酸処理を行った。沈殿は30mlのBufferB (20mM Tris-HCl (pH7.5), 5mM  $\beta$ -mercaptoethanol, 0.1mM  $\text{CaCl}_2$  1mM Mg-acetate, protease inhibitor mixture)に懸濁し、6mlのCaMセファロースカラムにチャージした。60mlのBufferB, 0.2M NaClを含むBufferBで洗浄後、20mlのBufferC (BufferBの $\text{CaCl}_2$ のかわりに1mM EGTAを含む) で溶出した。溶出液を5 lのBufferD (20mM Tris-HCl (pH7.5), 1mM Imidazole, 1mM Mg-acetate, 0.1mM EGTA, 5mM  $\beta$ -mercaptoethanol)に対して透析し、1mlのヘパリンアガロースカラム(Pierce)にチャージした。カラムを10mlのBufferCで洗浄し、その洗浄液を200 $\mu$ lずつ集めた。その後BufferDの0~0.6MまでのNaClの直線勾配をかけ200 $\mu$ lずつフラクションを集めた。集めたフラクションは活性測定用に保存した。

### 3-5 活性測定

まず、CaM結合タンパク (すなわち3-4の条件で精製したときのCaMセファロースカラムの溶出液をPolyvinylpyrrolidone (片山化学) を用いて濃縮したもの) のPPase活性を1-7-3の方法に従って測定した。結果は図7に示す。この結果このPPase活性は $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ が存在するときに約10倍活性化された。 $\text{Ca}^{2+}$ のみを加えてもあまり活性化されなかった。また、CaMの拮抗阻害剤といわれるTFP (Trifluoperazine)を加えると、活性は大幅に減少しちょうど $\text{Ca}^{2+}$ のみを加えたときと同じぐらいになった。type1あるいは2A型のPPase阻害剤であるオカダ酸には動物細胞に同じくほとんど活性が阻害されなかった。また動物細胞のものと同じように $\text{Mn}^{2+}$ の添加により約20%さらに活性化された。これらの結果からこのPPase活性はCNによるものでさらに動物細胞のものと同じ様な基本的性質を持つことが明らかになった。またこの画分はウエスタン法でみるように (図8) Cmp1, Cmp2が高い割合で含まれることが明らかになった。

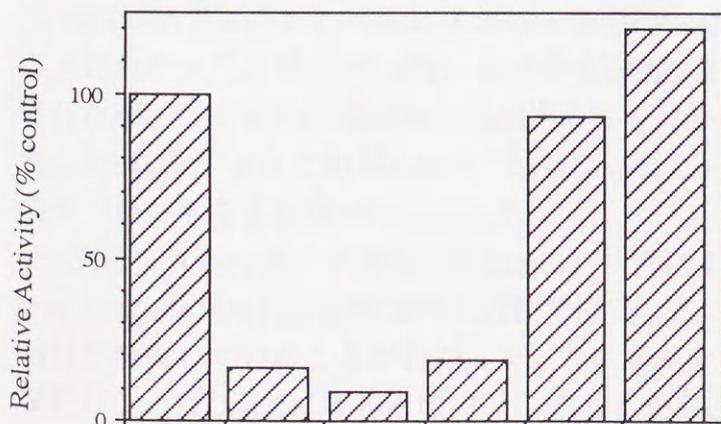


図7 酵母CaM結合タンパク質  
におけるPPase活性  
(反応時間15分)

反応液中の各成分 (最終濃度)

$\text{CaCl}_2$  (2mM),  
CaM (bovine calmodulin 1mg)  
TFP (100mg)  
O.A. (okadaic acid 100nM)  
 $\text{Mn}^{2+}$  ( $\text{MnCl}_2$  1mM)

$\text{Ca}^{2+}$	+	+	-	+	+	+
CaM	+	-	+	+	+	+
			+ TFP	+ O.A.	+ Mn <sup>2+</sup>	

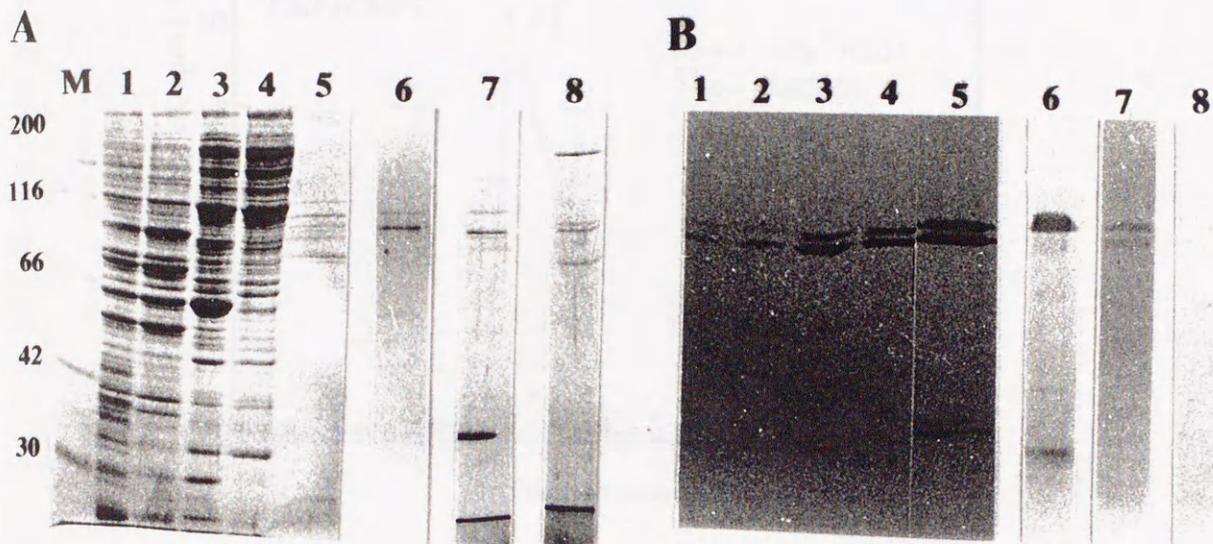


図8 CN精製各ステップにおけるタンパク質とCmp1, Cmp2の動向

(A: クマシー染色、B: 抗Cmp1, Cmp2抗体を用いたウエスタン解析)

(1: Total, 2: 超遠心後の上清, 3: DE52カラム後, 4: 硫安分画後, 5: CaMセファロースカラム後, 6: ヘパリンアガロースカラム (P1), 7: 同 (P2), 8: 同 (P3))

### 3-6 Cmp1, Cmp2はCNをコードするか

図9に示すようにヘパリンアガロースのPPase活性は大きく3つのピークに分かれることがわかった。ピーク1 (P1)、ピーク2 (P2)はともにCa<sup>2+</sup>/CaM存在時に大きく活性化されたが、ピーク3 (P3)はCa<sup>2+</sup>/CaMあるなしにかかわらず、値がほとんど変化しなかった。図8に示すようにP1はCmp2、P2はCmp1, Cmp2両方のタンパクに富み、P3はどちらのタンパクも含まれなかった。

次にこれらのピークがCmp1, Cmp2の活性によるものか調べるためにCN欠損株 (cmp1cmp2株)のPPase活性を同じ方法で測定した (図9)。CN欠損株ではP1, P2ともに活性が消失していることがわかった。ウエスタン法の結果と合わせて考えるとP1, P2の活性はCmp1, Cmp2によるもので、このことからCmp1, Cmp2はCNをコードしていることが明らかになった。

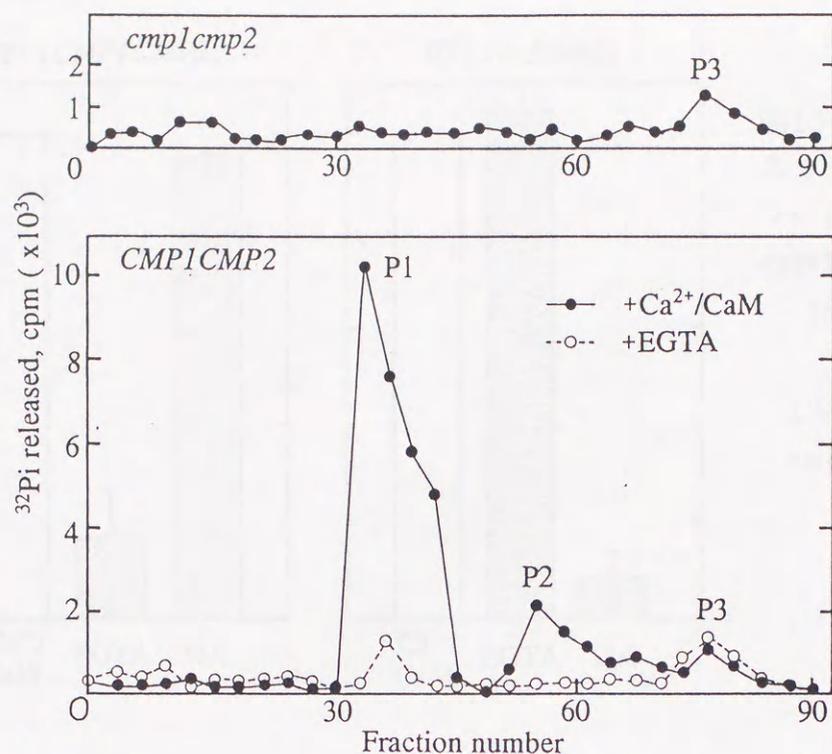


図9 ヘパリンアガロースカラム溶出フラクション中のPPase活性  
(反応時間30分)

3-7 *CMP1*, *CMP2*以外のCN遺伝子は存在するか。

緒言でも述べたように*CMP1*, *CMP2*遺伝子を両方破壊しても細胞は生育が可能であった。この理由としては①CNが細胞にとって重要ではない。②*CMP1*, *CMP2*以外の別のCN遺伝子が存在し、それが*CMP1*, *CMP2*の役割を補っている。の2つが考えられる。このことを確かめるためにCN欠損株に残ったPPase活性P3の正体を確かめてみた。図9に親株に存在するP1, P2、CN欠損株に存在するP3の活性の性質について調べた結果を示した。P1, P2はともにCa<sup>2+</sup>/CaM依存性を示しまたオカダ酸に非感受性なCN特有の性質を示した。これに対してP3はCa<sup>2+</sup>/CaM依存性は全く示さず、オカダ酸に対して感受性を示した。これはCN以外のPPase (1型、2A型) にみられる性質である。P3はCN以外の別のPPaseであることがわかった。この精製系は可溶性画分からのものなので他の画分についても調べてみた。形質膜 (1-6-5)、核 (1-6-6)のCaM結合タンパク質にはCa<sup>2+</sup>/CaM依存的なPPase活性は検出できなかった (データ不示)。これらの結果から酵素学的には*CMP1*, *CMP2*以外にCNをコードする遺伝子は存在しないことが強く示唆される。

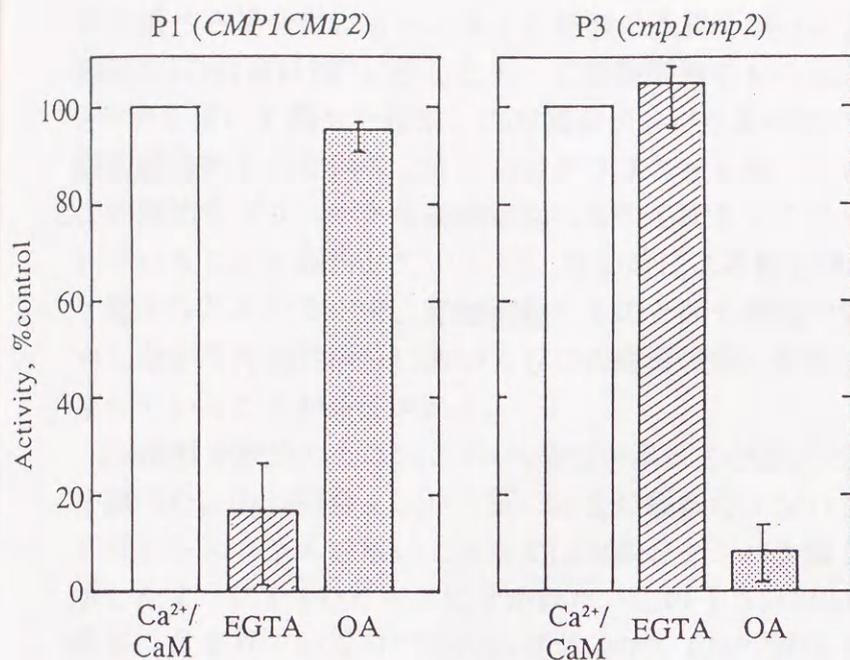


図10 ヘパリンアガロースカラム溶出フラクションのPPase活性のピークの性質

(濃度は図7に同じ)

CMP1CMP2 (HTT8b)

cmp1cmp2 (HTT8c)

#### 第4節 考察

酵母には動物細胞に存在する4つのタイプのPPaseのうち3つ(1型, 2A型, 2C型)存在することが知られている(37)。これらのPPaseは細胞内に割合多く存在し、活性測定も比較的容易にできる。しかしながら酵母においては2B型のPPase(カルシニューリン: CN)はまだ活性測定はもとより存在さえも知られていなかった。当研究室で得られた遺伝子CMP1, CMP2はDNA塩基配列から予想されるアミノ酸配列からは動物細胞のCNと高い相同性が見いだされたがこの遺伝子が本当にCNとして機能するのかを確かめるには実際に酵母のCNを精製してその生化学的性質を調べなければならない。すでに精製されている動物細胞の条件を参考にして精製を始めた。酵母からCNを精製するには多くの問題点があった。まずCNの酵母細胞内での含量は他のPPaseに比べて非常に少ないことである。実際に酵母破碎液のクルードの状態ではCN活性は測定できなかった。よって精製条件は通常行われる活性を濃縮する方法はあきらめてCmp1, Cmp2タンパク質を追跡する方法を用いた。しかしながらCMP1, CMP2以外のCNが存在した場合、この方法ではとりのがす可能性が考えられるのでCaM結合タンパク質を感度よく検出するゲルオーバーレイ法も合わせて行った。精製ステップはCaMセファロースアフィニティカラムを中心とし、種々の条件を検討した。

CaM結合タンパク質におけるCN活性はCa<sup>2+</sup>/CaM存在時にないときに比べて約10から12倍に活性化された。基質にはカゼインを用いた。カゼインがin vivoでCNの基質であることは確認されていないが(酵母においてはカゼインの存在は確認されていない。)、①真のCNの基質はまだ確認されていないこと ②動物細胞においてin vitroでCNの基質になりうるということが確認されていること ③本実験は酵母CNの酵素学的性質を細かく調べるのではなくこれまでの遺伝学的解析の結果を裏付けるのが第1の目的であること。などの理由でいわば人工基質のようなつもりで用いた。基質特異性など細かく生化学的性

質を調べる場合にはもっと多くの種類の基質を用いる必要があるだろう。この活性における酵母CNの性質は図7に示したように動物細胞のものによく似ていた。また抗Cnb1抗体(38)(39)を用いて調べた結果、CaM結合タンパク質中にバンドが検出されたので酵母CNも動物細胞のものと同じように調節サブユニット持っていることがわかった。Cyertらはこの調節サブユニットも動物細胞のものと同じようにN末がミリスチン酸により修飾されていることを報告している(39)。脂肪酸による修飾は膜に局在するためのものであると考えられているので、動物細胞のものと同じ機構で働いていることも考えられる。しかしながら可溶性画分においてもこの酵素は多く存在するので細胞内でさまざまな働きをしていることが予想される。

CN活性を検出した次はこのCN活性が本当にCMP1, CMP2によるものであるかどうかを調べた。CaM結合タンパク質にはまだ複数のタンパク質が存在しているのでヘパリンアガロースカラムを用いてさらにCaM結合タンパク画分を分画した。その結果、図9に示したように3つのピークに分かれた。このうち2つのピークはCmp1, Cmp2タンパクが豊富に含まれていたのでこの活性がCMP1, CMP2遺伝子産物によるものであることが予想される。さらにこのことを強く証明するためにCN欠損株で同じように活性を測定したところ、先の2つのピークは消失した。

①CMP1, CMP2がアミノ酸レベルで動物のCN触媒サブユニットと高い相同性があったこと ②精製段階におけるCNの活性の動向と抗Cmp1, 抗Cmp2抗体によるウエスタン法によるCmp1, Cmp2の動向が一致したこと ③CMP1, CMP2両遺伝子破壊株においてCN活性が消失したこと。これら3つの理由よりCMP1, CMP2はCNをコードしていることが結論づけられた。

また緒言でも述べたようにCNは動物細胞の研究から非常に重要な役割を果たしていることが考えられるが、酵母においてCMP1, CMP2を破壊しても細胞は生育可能であった。この理由としては①CNは細胞にとってさほど重要ではない。②CMP1, CMP2以外にCNをコードしている遺伝子が他に存在していてこの遺伝子がCMP1, CMP2の役割をカバーしている。の2つが考えられる。当研究室ではすでにCNに保存されている領域を使って緩い条件のサザン法及びPCR法によって新たなCMP遺伝子の取得を試みたが得られなかった。しかしながら新たなCMP遺伝子の予想アミノ酸配列がCmp1, Cmp2とかなり異っているという可能性も考えられる。この問題を解決するためにCN欠損株でのCN残存活性をもっと細かく調べてみた。図9の結果及び形質膜画分、及び核画分にもCNが存在しないことから、生化学的にもCMP1, CMP2以外のCN遺伝子は存在しないことが強く示唆される。①カゼインを基質とできないアミノ酸配列のかなり異なるCN ②Cmp1, Cmp2に比べて非常に失活しやすいCNの存在 など可能性がないわけではないがCNはCMP1, CMP2のみによってコードされているとあって間違いないだろう。

このことを言い換えると「CNは酵母において重要ではない」という結論に至ってしまう。しかしながらCN欠損は通常の増殖に影響がないというだけで、CNが通常の増殖に直接関係しない重要なプロセスに関わる可能性も十分考えられる。

「CNは細胞内でどのような働きをしているのであろうか？」

次章ではCNの細胞内での役割について解析する。

## 第2章

### CNによる細胞内Na<sup>+</sup>濃度調節機構の解析



はじめに

酵母のカルシニューリン (CN) 遺伝子 *CMP1*, *CMP2* を両方破壊しても細胞は正常に生育した。また、第1章で示したようにCNをコードする遺伝子は *CMP1*, *CMP2* のみである。CNは細胞内でどのような役割を果たしているのでしょうか。CN欠損株の形質を細かく調べたところ *CMP2* 破壊株は高濃度の  $\text{Na}^+$  に対して感受性になることが明らかにされた<sup>(40)</sup>。この形質は *CMP1* 欠損と重ねることにより強められること、CN調節サブユニット *CNB1* の欠損株でも同様にみられることも同時に明らかになった。

またCN欠損株は酵母において  $\text{Na}^+$  と同じ輸送系で調節されている  $\text{Li}^+$  に対しても感受性になることも明らかになった。これら感受性は培地中に  $\text{K}^+$  を添加することによって抑圧されたことから、CNが細胞内  $\text{Na}^+$  濃度の調節機構に深く関わっている可能性が強く示唆された<sup>(40)(41)</sup> (図11)。本章ではこのCNによる細胞内  $\text{Na}^+$  濃度調節機構について生理学的に解析する。

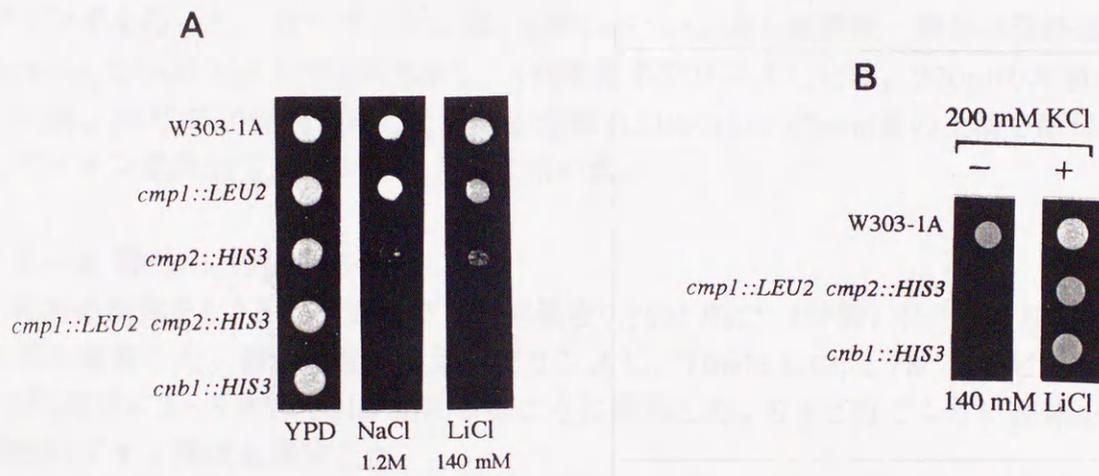


図11 CN欠損株は  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Li}^+$  に対して感受性を示す。

(使用菌株: *cmp1*: DHT22-1c, *cmp2*: DHT22-1d, *cmp1cmp2*: DHT22-1a, *cnb1*: DHT14)

## 第5節 材料と方法

### 5-1 使用菌株

酵母 *Saccharomyces cerevisiae*

- W303 (*MATa/MAT $\alpha$  ade2-1/ade2-1 his3-11,15/his3-11,15 leu2-3,112/leu2-3,112 trp1-1/trp1-1 ura3-1/ura3-1 can1-100/can1-100*) from Rothstein
- W303-1A (*MATa* 他はW303に同じ)
- WHU3B (*HIS3+ URA3+* 他はW303-1Aに同じ)
- DHT23-1b (*cmp1::URA3 cmp2::HIS3* 他はW303-1Aに同じ)
- DHT22-1a (*cmp1::LEU2 cmp2::HIS3* 他はW303-1Aに同じ)
- DHT22-1c (*cmp1::LEU2* 他はW303-1Aに同じ)

DHT22-1d (*cmp2::HIS3* 他はW303-1Aに同じ)  
DHT14 (*cnb1::HIS3* 他はW303-1Aに同じ)  
DHF1 (*fkbl::HIS3* 他はW303-1Aに同じ)

## 5-2 使用培地

YEPD培地 (1-2参照)

pHはHClで調整した。ただし、この場合滅菌はフィルターを用いた。イオン、薬剤等は培地をオートクレーブ後55℃まで下げて加えた。

## 5-3 イオン濃度測定用サンプルの調製

Gaxiolaらの方法を改変して行った。(42)

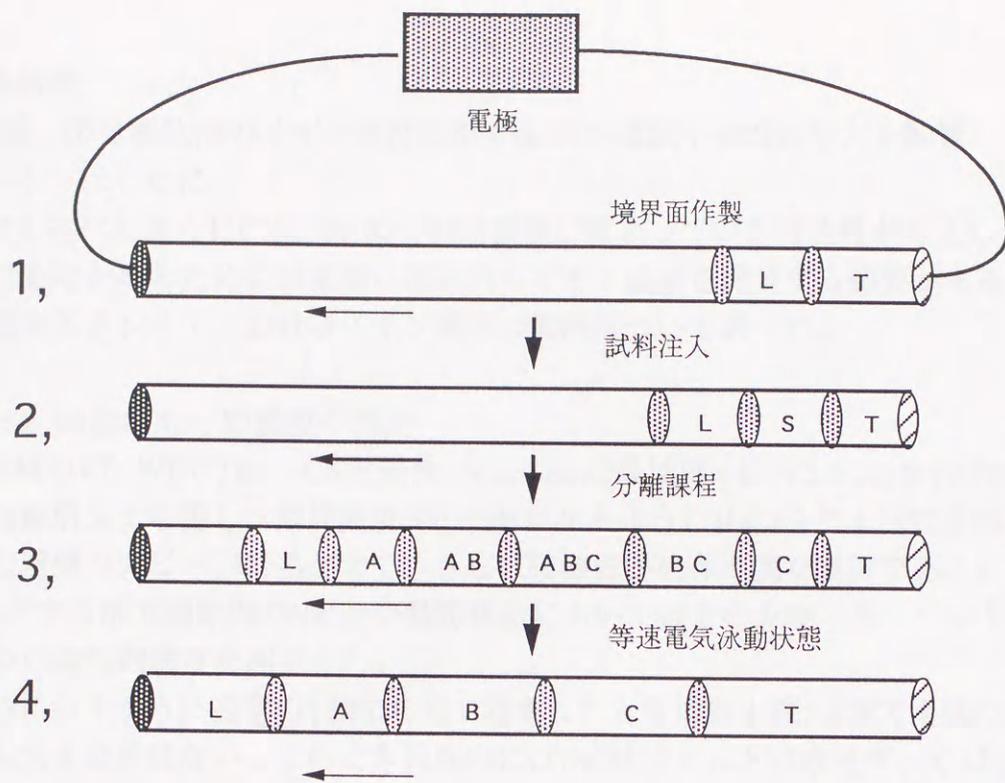
目的の菌体を100mlのYEPD培地に植え、中期対数増殖期まで培養した。この培地に目的の濃度になるようにNaCl, KCl, 薬剤などをいれ再び振とうする。目的の時間にサンプリングを行った。サンプリングは、1回5ml行い、遠心集菌後、菌体は洗浄液 (1.5M Sorbitol, 20mM MgCl<sub>2</sub>)で3回洗浄し、1回蒸留水でリンスした後、200μlの蒸留水に懸濁した後、95℃で30分間処理した。遠心分離 (15000rpm, 10min)後の上清を酵母抽出液としてイオン濃度測定用サンプルとして用いた。

## 5-4 酵母Na<sup>+</sup>の排出の測定

目的の菌体を5-3と同じ方法で (最終濃度0.85M NaCl, 4時間) Na<sup>+</sup>を取り込ませてから遠心集菌した。菌体を軽く蒸留水でリンスし、70mM LiCl, 1.7M ソルビトールを含むYEPD培地に3~5×10<sup>7</sup>cells/mlになるように懸濁した。5-3と同じように菌体を処理し細胞内イオン濃度を測定した。

## 5-5 等速電気泳動装置によるイオン濃度の測定

(原理) (43)(44)等速電気泳動法 (IP法) は、キャピラリーに試料をいれこの両端に電圧をかけ、試料中に含まれるイオンをその移動度の差により分離する方法である。IP法は試料イオンよりも移動度の大きいイオンを含むリーディング電解液と、試料電解液より移動度の小さいイオンを含むターミナル電解液の2種類を用い、この両者の境界面に試料を注入した後、通電を行うと、図12に示したような分離過程を経て連続したゾーンが形成される。定常状態に達したときの各イオンの泳動度は等しく一定となり、文字通り等速電気泳動である。また、IP法は連続した試料ゾーンを形成し、各試料濃度はリーディング電解液に支配されて濃縮あるいは希釈されるという特徴があり、試料境界面はシャープである。また各ゾーンにおけるイオン濃度は一定であり、このゾーンの幅をはかればイオン濃度を測定できる。原理からIP法は定量的に高い再現性が得られ、試料のイオンの分離はもとより、イオン濃度を測定するのにも適している。またイオン電極や原子吸光法のようにサンプルを直接測定せず、サンプルをいったん分離して測定するので夾雑物などの影響も非常に受けにくい。ここでは酵母細胞内イオン濃度をこのIP法を用いて測定する。



L: リーディングイオン、T: ターミナルイオン、S: 試料  
 AB, ABC, BC: A, B, C それぞれの混合ゾーン

図12 等速電気泳動の原理

(測定法)

等速電気泳動装置はShimadzu Isotachophoretic analyzer IP-2Aを用いた。リーディング電解液 (6mM HCl, 2mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 80%(V/V) methanol (液クロ用))、ターミナル電解液 (10mM CdCl<sub>2</sub>, 80%(V/V) methanol (液クロ用)) をそれぞれリザーバタンクに満たし、オペレーションスイッチ (OS) をRINCEの位置に合わせ、pressureが0.5の位置にきて約5秒間キャピラリーを洗浄した。OSをFILLの位置の合わせ、約3秒間待ち、キャピラリーにリーディング電解液を満たした。OSをINJ/CTFの直前で止め、pressureが0になるのを確認してから、OSをINJ/CTFの位置に合わせ、サンプリングボックスのふたを開けマイクロシリンジでサンプルを適量 (100 $\mu$ lまで通常2 $\mu$ l打ち込む) 注入した。サンプリングボックスのふたを閉めた後、OSをRUNの位置に合わせSTARTスイッチを押して測定を開始した。設定条件は1st STAGE=150 $\mu$ A, 12min, 2nd STAGE=100 $\mu$ A, 13min (合計25min), TEMP=25 $^{\circ}$ C、レコーダーはShimadzu R112を用いた。

イオン濃度はチャートに記入してある微分のピークからピークの終わりまでの長さを測り、濃度の明らかな標準液のピーク間の長さと比較して求めた。

## 実験結果

### 第6節 酵母細胞内のイオン濃度の測定及びCN遺伝子破壊の与える影響

#### 6-1 はじめに

先にも述べたようにCNはNa<sup>+</sup>濃度調節機構に関わっている可能性が考えられる。この可能性を確かめるためには実際に細胞内のイオン濃度を測定する必要がある。そこで、高塩濃度ストレス下におけるイオン濃度の動向について調べた。

#### 6-2 細胞内Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>濃度の測定

野生株 (WT: WHU3B)、CN欠損株 (*cmp1cmp2*破壊株: DHT23-1b)をYEPD培地で中期対数増殖期まで培養し、最終濃度が0.85MになるようにNaClを加え(野生株と破壊株との間で増殖のスピードに差がでて、さらに破壊株が生存可能な濃度である。)、5-3, 5-5に示す方法で細胞内のNa<sup>+</sup>及び動物細胞においてはそのカウンターパートとして知られるK<sup>+</sup>の細胞内濃度を測定した。

図13に示すように通常のYEPD培地で培養したときは野生株、CN欠損株の間で両イオンとも大きな差はない。このとき細胞内にはNa<sup>+</sup>はほとんど存在せず、K<sup>+</sup>は1.5 $\mu$ mol/mg protein含まれていた。Na<sup>+</sup>添加後細胞内Na<sup>+</sup>濃度は上昇し逆にK<sup>+</sup>濃度は減少していった。このときCN欠損株の細胞内Na<sup>+</sup>濃度は破壊株に比べて異常に高く逆にK<sup>+</sup>濃度は異常に低かった。塩添加後10時間ではCN欠損株は野生株に比べてNa<sup>+</sup>濃度は約2倍、K<sup>+</sup>濃度は約半分であった。以上の結果からCN欠損株がNa<sup>+</sup>に対して感受性を示すのは高Na<sup>+</sup>培地での細胞内Na<sup>+</sup>濃度が異常に高いことに起因することがわかった。

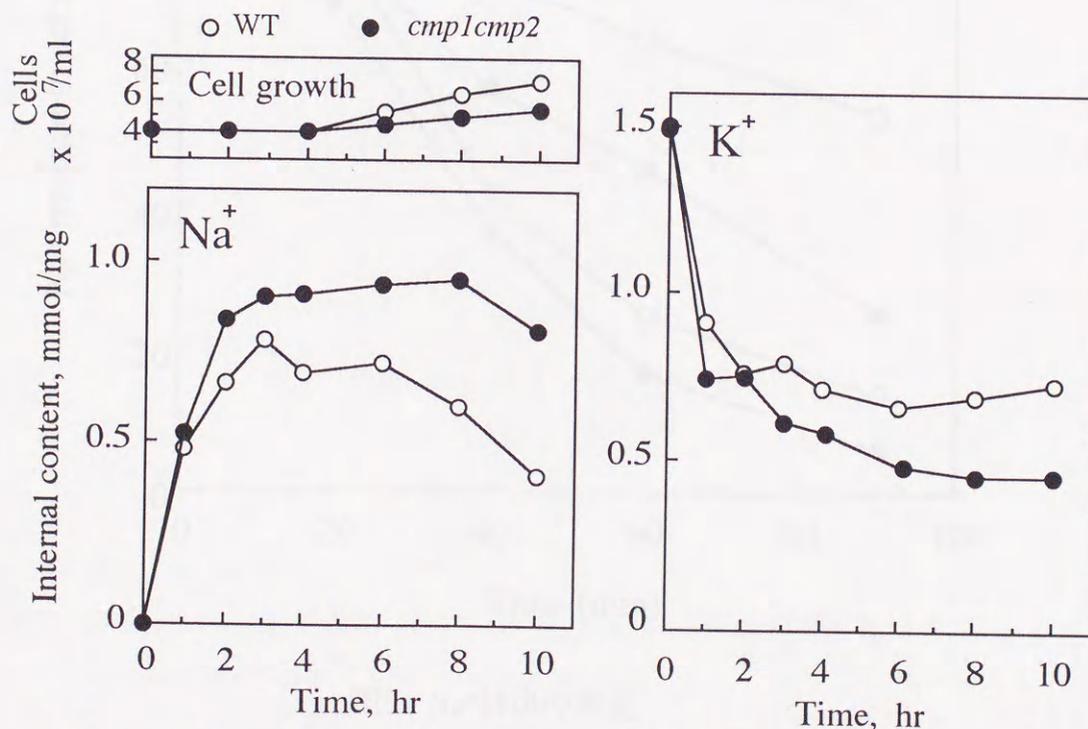


図13 野生株とCN欠損株のNa<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>濃度の動向  
野生株 (WT: WHU3B)、CN欠損株 (*cmp1cmp2*: DHT23-1b)

### 6-3 Na<sup>+</sup>排出の測定

さきにも述べたCN欠損株の異常に高いNa<sup>+</sup>濃度を引き起こす原因としては①Na<sup>+</sup>の取り込み系が異常に活性化されている。②Na<sup>+</sup>排出系に欠陥がある。などの理由が考えられる。そこでより解析が容易な排出について解析してみた (図14)。

5-4に示した条件で菌体にNa<sup>+</sup>を取り込ませ、Na<sup>+</sup>を含まない培地に移した。このときストレスのかかった条件で解析を行うため培地中には0.85M Na<sup>+</sup>とほぼ同じ作用を示す70mM Li<sup>+</sup>を用い、浸透圧の影響を考え、0.85M Na<sup>+</sup>と同じ浸透圧である1.7M ソルビトールを培地中に添加した。

予想通り排出のスピードは野生株に比べてCN欠損株は遅いことがわかった。すなわちNa<sup>+</sup>のターンオーバーの効率がCN欠損株では悪くなり、これにより細胞内のNa<sup>+</sup>の濃度が異常に上昇するものと思われる。またこの実験においてK<sup>+</sup>の細胞内濃度は野生株、CN欠損株の間でほとんど差がなかった (データ不示)。これによりCNは主に排出系の制御によりNa<sup>+</sup>濃度調節に関わっているものと考えられる。

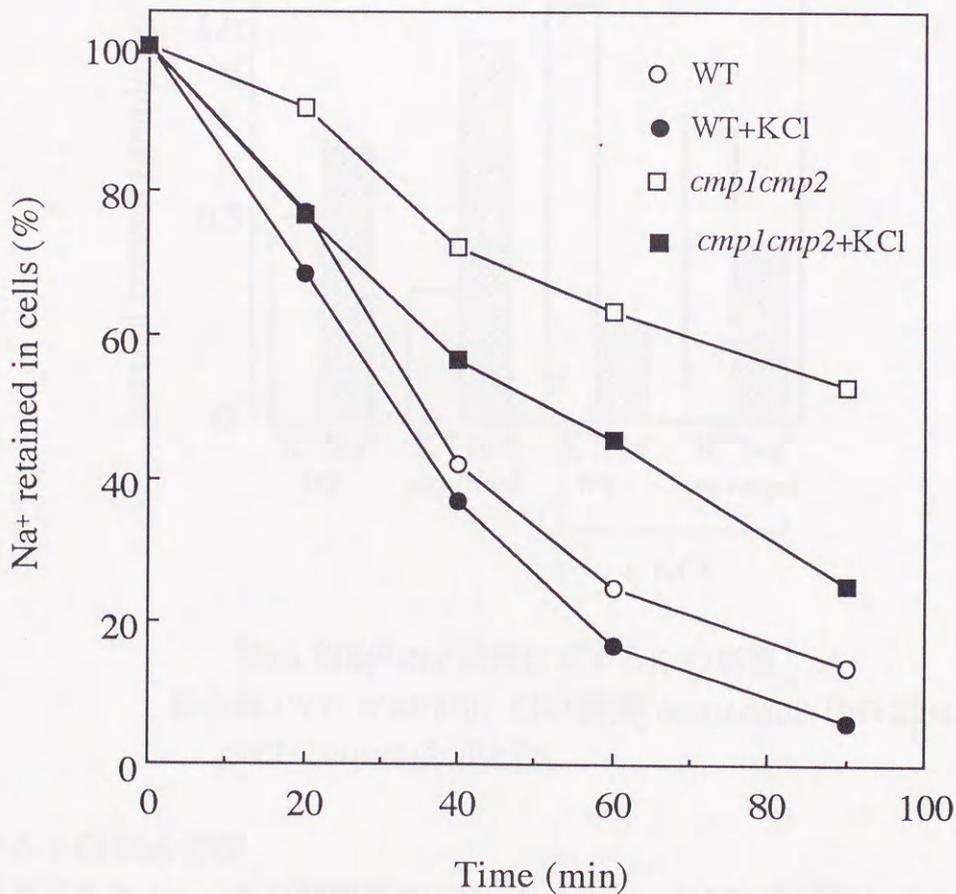


図14 Na<sup>+</sup>排出の測定  
野生株 (WT: WHU3B)、CN欠損株 (*cmp1cmp2*: DHT23-1b)  
KCl (200mM)を加えた。

#### 6-4 K<sup>+</sup>の影響

先に述べたようにCN欠損株のNa<sup>+</sup>感受性はK<sup>+</sup>の添加により抑圧される。高等動物では細胞膜にNa<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>ATPaseが存在し、Na<sup>+</sup>とK<sup>+</sup>は交換反応によって細胞内の濃度が調節されている。また6-2の結果によりK<sup>+</sup>の存在がNa<sup>+</sup>濃度調節系において重要なポイントになることが示唆される。よってK<sup>+</sup>の添加が細胞内Na<sup>+</sup>濃度に与える影響について調べてみた。

6-2と同じ条件で6時間Na<sup>+</sup>を取り込ませ、細胞内のNa<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>濃度を測定した。このとき同時に200mM KClを添加したものも用意しそのイオン濃度を比較した。図15に示すようにCN欠損株にKClを添加したときそのNa<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>の割合が野生株の割合に近づくことがわかった。また図14に示したようにK<sup>+</sup>の添加によりCN欠損株の排出のスピードは野生株に近づくことがわかった。以上の結果からCN欠損株のNa<sup>+</sup>感受性がK<sup>+</sup>の添加によって抑圧されるのは、細胞内のNa<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>濃度の動向がK<sup>+</sup>の添加によって野生株に近づくためであると思われる。酵母においても細胞内Na<sup>+</sup>濃度の調節はK<sup>+</sup>が非常に重要な役割を果たしていることがわかった。

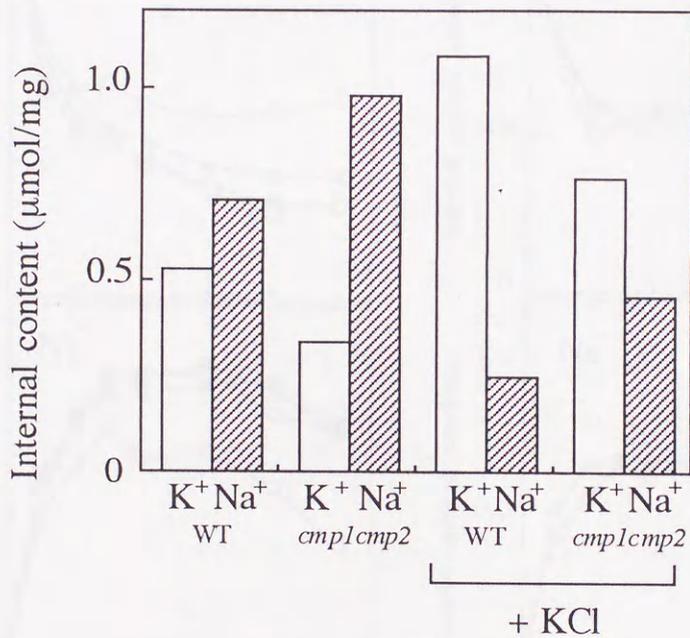


図15 細胞内Na<sup>+</sup>濃度に対するK<sup>+</sup>の影響  
野生株 (WT: WHU3B)、CN欠損株 (*cmp1cmp2*: DHT23-1b)  
KCl (200mM)を加えた。

#### 6-5 FK506の影響

緒言で述べたように免疫抑制剤FK506, CyclosporinAはCNの活性を阻害することが知られている。また酵母においてもこの作用は同様にみられることも知られている(18)(45)。先に述べたイオン濃度の動向がCNによるものであるならば野生株にFK506を作用させたときのイオン濃度の動向がCN破壊株のイオン濃度の動向に一致するはずである。それについて調べてみた。6-2と同じ条件でNa<sup>+</sup>を取り込ませた。図16Aに示したように予

想通り野生株にFK506を作用させたときその $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ 濃度の動向はCN欠損株のものに一致した。またCN欠損株にFK506を作用させてもほとんどその影響がみられなかったことから、FK506がCNに作用していることが示唆される。

FK506はFK506結合タンパク質 (FKBP) を介してCNに作用する。先の作用がFK506によるものであるならば酵母のFKBP (Fkb1) 欠損株<sup>(46)(47)(48)(49)</sup>においてその作用がみられないはずである。図16Bに示すようにFkb1欠損株においてFK506の作用はみられなかった。以上のことからFK506はCNに作用し、同時にCNが細胞内 $\text{Na}^+$ 濃度調節に関わっていることが明らかになった。

またここでFkb1の株のイオン濃度の動向が野生株と若干異なるのはこの株が野生株に比べて通常の増殖が遅いためであると思われる。

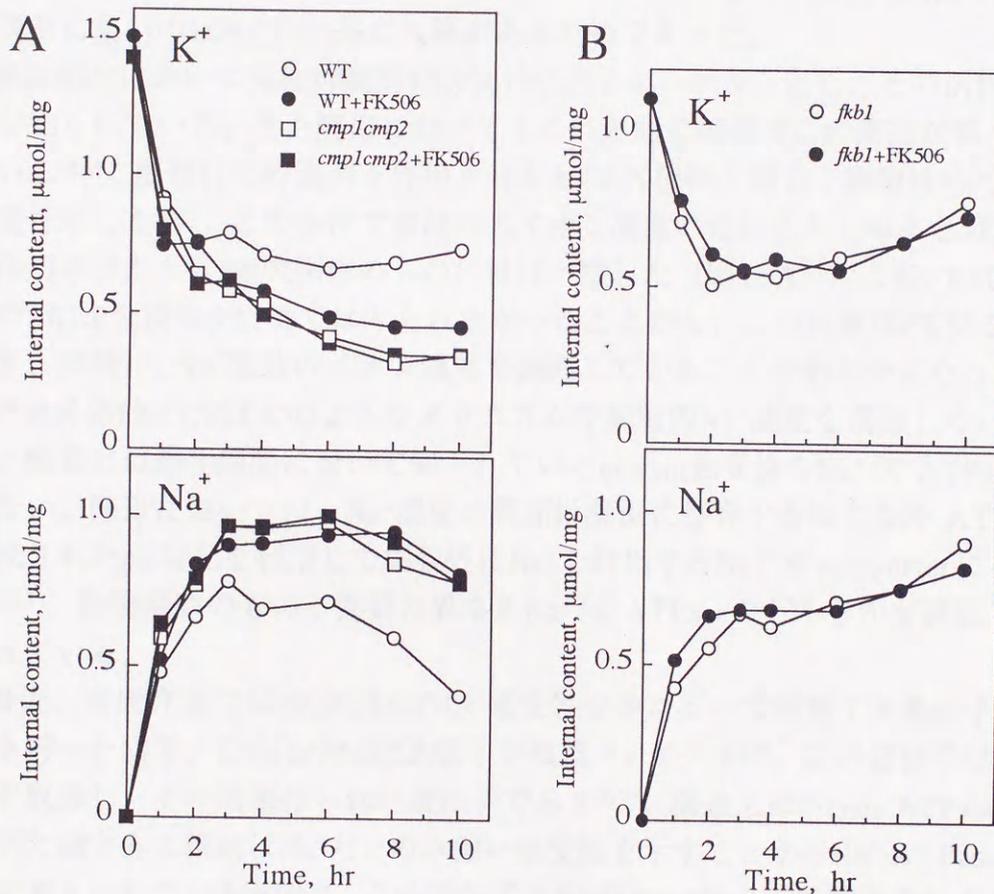


図16 細胞内 $\text{Na}^+$ 濃度に対するFK506の影響

野生株 (WT: WHU3B)、CN欠損株 (*cmp1cmp2*: DHT23-1b)

FK506結合タンパク質 (FKBP) 欠損株 (*fkb1*: DHF1)

FK506は最終濃度が $1\mu\text{g/ml}$ になるように培養のはじめから加えた。

## 第7節 考察

酵母のCN欠損株は生育可能であった。その他大きな表現形はみられなかった。動物細胞においてCNは非常に重要な系に関わっていることが知られているし、Cmp1, Cmp2は

動物細胞のCNとアミノ酸レベルで約50%と非常に高い相同性がみられたことから、酵母においても重要な働きをしていることが考えられた。細かくCN欠損株の形質を調べた結果Na<sup>+</sup>に対して感受性を示すことが明らかにされた<sup>(40)</sup>。これらの形質はCN欠損株が細胞内のNa<sup>+</sup>の濃度調節がうまくできないことに起因するのではないかと考え、野生株とCN欠損株での細胞内のNa<sup>+</sup>濃度を等速電気泳動装置を用いて測定した。このときNa<sup>+</sup>のカウンターパートとして知られるK<sup>+</sup>の濃度も同時に測定した。通常の培地で培養したときは両者の間で大きな差はみられなかったが、Na<sup>+</sup>を加えるとCN欠損株は予想通り野生株に比べて細胞内Na<sup>+</sup>は異常に高く、逆にK<sup>+</sup>濃度は異常に低かった。培地にK<sup>+</sup>を同時に加えると、CN欠損株のNa<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>濃度は野生株と同じようになった。CN欠損株のNa<sup>+</sup>感受性が培地中へのK<sup>+</sup>の添加によって抑圧されるのはこの感受性が細胞内のこの2つのイオン濃度の動向が野生株に近づくためであった。またCN欠損株の細胞内Na<sup>+</sup>濃度が異常に高いのはNa<sup>+</sup>排出系に欠陥があるためであった。

動物細胞において免疫抑制剤FK506はCaNをターゲットとし、その活性を阻害することが知られている。また酵母においてもこれと同じ機構でこの薬剤が働くことが知られている<sup>(45)</sup>。酵母にこの薬剤を作用させるとCN欠損株と同じく細胞はNa<sup>+</sup>、Li<sup>+</sup>に対して感受性を示した<sup>(46)</sup>。この条件で細胞内のイオン濃度の動向をみると野生株にFK506を作用させたときCN欠損株のものにはほぼ一致した(図16A)。このFK506の作用は酵母のFKBP欠損株*fkb1*株ではみられなかったことから、この現象はFK506によるものであり、同時にCNが細胞内イオン濃度を調節していることが明らかになった。

では具体的にCNはどのようなメカニズムで細胞内Na<sup>+</sup>濃度を調節しているのだろうか。酵母には動物細胞において知られているouvain感受性のNa<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>ATPaseは知られていない。酵母においては、Na<sup>+</sup>濃度の調節は酵母に存在する強力なH<sup>+</sup>-ATPaseによって形成されたpH勾配を利用して細胞外にNa<sup>+</sup>を放出するNa<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>antiporterによるものか<sup>(50)(51)</sup>、動物細胞のものと性質の異なるNa<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>ATPaseのどちらかが調節していると考えられている。

最近、当研究室ではCN欠損株のLi<sup>+</sup>感受性を多コピーで相補する遺伝子のクローニングを行った結果、*ENA1/PMR2*遺伝子が取得された<sup>(41)(52)</sup>。この遺伝子はLi<sup>+</sup>感受性変異株を取得し、その結果得られた遺伝子である<sup>(53)</sup>。構造上はP-type ATPase<sup>(54)</sup>でこの遺伝子が欠損すると細胞はNa<sup>+</sup>/Li<sup>+</sup>のみ強い感受性を示すことからNa<sup>+</sup>-ATPaseとして働くことが考えられている<sup>(53)(55)</sup>。この遺伝子の転写はNa<sup>+</sup>によって誘導されるがこの転写誘導の一部がCNによって制御されていることが最近明らかになった<sup>(56)</sup>。CNは排出系を中心にNa<sup>+</sup>濃度を調節していると考えられるがNa<sup>+</sup>ストレスによって*ENA1*の転写量を増やしNa<sup>+</sup>排出を強めると考えればこのメカニズムが説明できる。しかしながら①*ENA1*はCN以外にもNa<sup>+</sup>によって誘導される転写調節系を持つこと<sup>(57)(58)</sup>②*ena1*株でCNを高発現するとNa<sup>+</sup>耐性があがること<sup>(57)</sup>③*ena1*株でさらにCNを欠損させると細胞のNa<sup>+</sup>感受性がさらに強まること<sup>(57)</sup>以上のことからCNはEna1以外にもターゲットを持ちいくつかの機能タンパク質を制御することによって細胞内Na<sup>+</sup>濃度を調節しているものと考えられる。



はじめに

酵母においてCNがどのような役割を果たしているかを知るためにはCN関連遺伝子を取得してその解析を行うことが重要である。第2章で述べたNa<sup>+</sup>, Li<sup>+</sup>感受性の他にCN破壊株はバナジン酸に対しても感受性になることが明らかにされた(図17)<sup>(59)</sup>。バナジン酸は形質膜ATPaseやチロシンホスファターゼの阻害剤として知られ<sup>(60)(61)</sup>、この薬剤の関わる系とCNの関係には非常に興味を持たれる。ここではCNの下流で働く遺伝子を取得する目的でこのバナジン酸感受性を多コピーで相補する遺伝子の取得と解析について述べる。

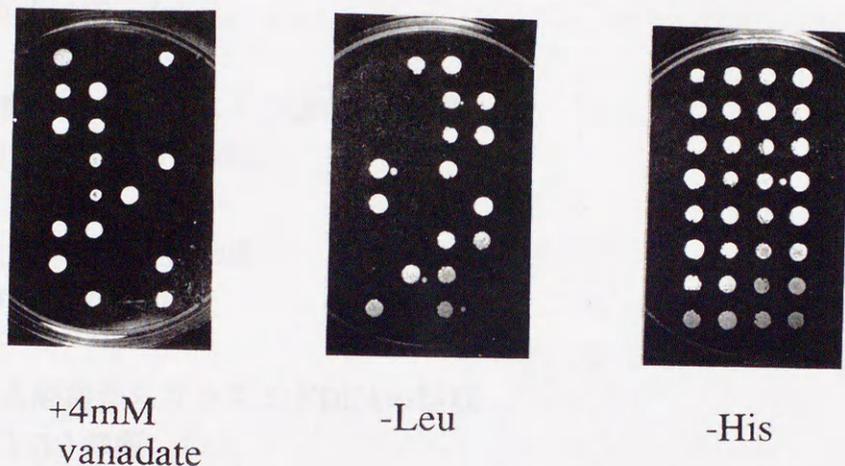


図17 CN欠損株はバナジン酸に対して感受性を示す。

CMP1 (LEU2で破壊), CMP2 (HIS3で破壊) を同時に欠損する株 (すなわち -HIS培地、-LEU培地、どちらでも生育可能な株) はバナジン酸感受性になる。

## 第8節 材料と方法

### 8-1 使用菌株

酵母 *Saccharomyces cerevisiae*

RAY3A-D	(MATa/MAT $\alpha$ his3/his3 leu2/leu2 trp1/trp1 ura3/ura3)
RAY3A	(MATa his3 leu2 trp1 ura3)
YLL34 <sup>(62)</sup>	(cmp1::LEU2 cmp2::HIS3 他はRAY3Aに同じ)
YLN1 <sup>(62)</sup>	(cnb1::HIS3 他はRAY3Aに同じ)
TNP15	(svs1::URA3 他はRAY3Aに同じ)
TNP20	(svs1::HIS3 他はRAY3Aに同じ)
TNP59	(cmp1::LEU2 cmp2::HIS3 svs1::URA3 他はRAY3Aに同じ)

大腸菌 *Escherichia coli*

DH5 $\alpha$  (*supE44*  $\Delta$ *lacU169* ( $\phi$  80 *LacZ*  $\Delta$ *M15*) *hsdR17* *recA1*  
*endA1* *gryA96* *thi-1* *relA1*)

JM109 (*recA1* *endA1* *gryA96* *thi-1* *hsdR17* *supE44*  $\Delta$ (*lac-proAB*)  
[*F'* *traD36* *proAB* *lacI*  $\Delta$ *M15*],  $\lambda$ -

8-2 使用培地

YEFD培地、2 $\times$ YT培地 (第1章 1-2)、MM培地<sup>(63)</sup>

8-3 DNA操作

8-3-1 酵母の形質転換

Itoの方法に従った<sup>(64)</sup>。

8-3-2 酵母からプラスミドDNAの回収

田口の方法に従った<sup>(65)</sup>。

8-3-3 大腸菌の形質転換

第1章 1-3-7 参照

8-3-4 大腸菌からプラスミドDNAの回収

第1章 1-3-1参照

8-3-5 サザン法

Southern, Sambrookらの方法したがった<sup>(66)(21)</sup>。

8-3-6 ノーザン法

①酵母からmRNAの取得はSchmittの方法に従った<sup>(67)</sup>。

②ノーザン法はManiatisの方法に従った<sup>(68)</sup>。プローブはSVS1 ORF内PvuII-PvuII約400bpを用いた。

8-3-7 DNAの塩基配列の決定

DNAの塩基配列の決定はTAKARAのAmpliTaq™ Sequencing Kitを用い、付属の説明書の方法に従って行った。

8-3-8 SVS1遺伝子の取得

SVS1遺伝子の取得は難波、劉によって行われた<sup>(69)(62)</sup>。CN欠損株 (YLL34)に、YE<sub>p</sub>24ゲノムライブラリーを形質転換し、約7000個の形質転換体からバナジン酸感受性を相補する遺伝子が1個取得された (条件4.5~5.0mM YEFD培地)。

### 8-3-9 SVS1遺伝子の破壊

p102の*SaII-SmaI*領域をpBlueScriptの同制限部位につなげた。*BstEII*, *PstI*消化した後切断断片を平滑化し、同じく両端を平滑化した*URA3*, あるいは*HIS3*遺伝子を挿入した。破壊の際はこのプラスミドを*SphI*で切断し、線状にして酵母に形質転換した。破壊の確認はゲノムDNAを*SphI*消化し、*SVS1*の*SphI-SphI*領域をプローブとしてサザン法により行った。

### 8-3-10 SVS1転写誘導の解析

対数増殖期前期 ( $1 \times 10^7$  cells/ml)の細胞に最終濃度が6.0mMになるようにバナジン酸を添加し、経時的に菌体をサンプリングし、Schmittらの方法<sup>(67)</sup>に従ってmRNAを回収した。プローブは*SVS1*はORF内の約0.4kbの*PvuII-PvuII*断片、*ACT1*は約1.1kbの*XhoI-KpnI*断片を用いた。プローブのラベリングはMultiprime DNA labeling kit (Amersham)を用いた。

### 8-3-11 HA標識SVS1遺伝子の作製

HAのエピトープ配列を含む46merのオリゴヌクレオチドを合成した。

①5'-CCACATTTACCCTTACGATGTTCTGATTACGCTTAAGCTTGGTAC-3'

②5'-CAAGCTTAAGCGTAATCAGGAACATCGTAAGGGTAAATGTGGGTAC-3'

この2つを等量混ぜ合わせ65°Cで5分間処理した後、pUCSVS1 (pUC19の*SaII-SmaI*部位にp102の*SaII-SmaI*断片を挿入したもの)の*KpnI*部位にこのヌクレオチドを挿入した。挿入の確認はヌクレオチド内にある*HindIII*で切断されるかどうかで行い、方向はシーケンズによって確かめた。

### 8-3-12 CN高発現用プラスミドの作製

YEPCMP1CNB1は*CMP1*を含む約3.6kbの*XbaI-HindIII*断片と*CNB1*を含む約1.5kbの*EcoRV-EcoRV*断片をYE24に接続して作製した。YEPCMP2CNB1は*CMP2*を含む約3.2kbの*BglIII-PvuII*断片と、*CNB1*を含む約1.5kbの*EcoRV-EcoRV*断片をYE24に接続して作製した。

### 8-3-13 培養液中から細胞外分泌タンパク質の取得

菌体を中期対数増殖期まで培養した5mlの培養液を遠心集菌後の上清に最終濃度が5%になるようにトリクロロ酢酸を加え、氷中に1hrおいた後、遠心分離 (15000rpm, 10min, 4°C, TOMY MPX-150)し、タンパクを沈殿させた。沈殿を蒸留水で1回リンスした後、100μlの蒸留水に懸濁し、5×sample bufferを20μl加えて、boilingしてSDS-PAGE用のサンプルに用いた。

(実験結果)

### 第9節 SVS1遺伝子の取得と解析

#### 9-1 はじめに

CN欠損株は $\text{Na}^+$ ,  $\text{Li}^+$ の他にバナジン酸に対しても感受性になることが明らかにされた<sup>(59)</sup>。先にも述べたようにバナジン酸は形質膜ATPase、チロシンホスファターゼの阻害剤として知られその系とCNとの関わりを明らかにすることは非常に重要であると考えられる。そこでCNの周辺で働く遺伝子を取得するためにこのバナジン酸感受性を多コピーで相補する遺伝子の取得が試みられた<sup>(62)(69)</sup>。

#### 9-2 SVS1遺伝子の取得

SVS1 (Suppressor of Vanadate Sensitivity of calcineurin-deficient mutant) 遺伝子はCN欠損株のバナジン酸感受性を多コピーで相補する遺伝子として取得された(8-3-8)。SVS1は多コピーでCN欠損株のバナジン酸感受性は相補するが、 $\text{Na}^+$ ,  $\text{Li}^+$ 感受性あるいは「 $\alpha$ -factorによるG1期停止から通常の細胞周期への復帰ができない」形質は相補することができなかった(図18)。SVS1遺伝子を含む取得プラスミドの活性領域の検討は図19のように行いSphI-SphI約1.6kbの間の塩基配列の決定を行った。

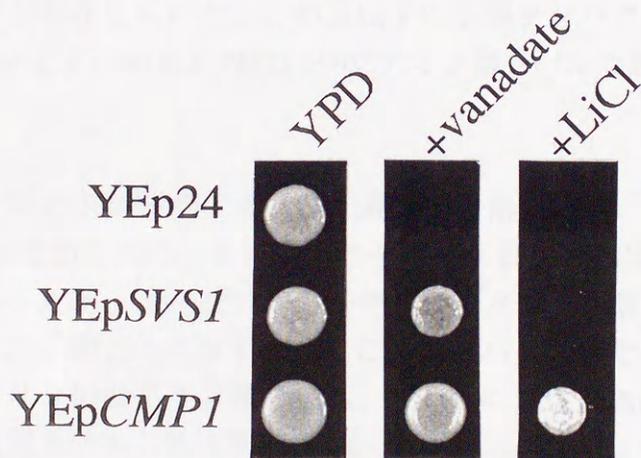


図18 SVS1遺伝子はCN欠損株のバナジン酸感受性を相補する  
(使用菌株 YLL34, vanadate (5.2mM), LiCl (70mM))

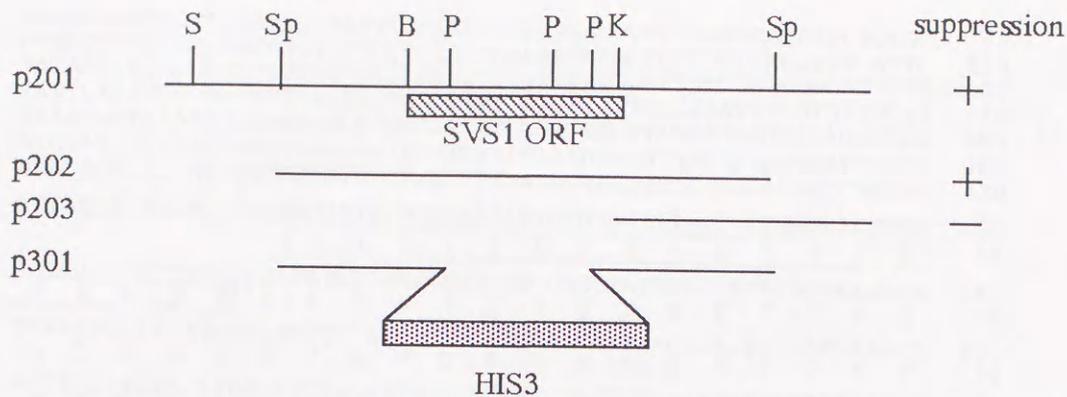


図19 SVS1遺伝子の必須領域の検討

p102は取得されたプラスミド（データ不示）でp201はp102をSaIIで切断し、self ligationしたものである。

### 9-3 DNA塩基配列の決定

塩基配列を決定した結果SVS1は750bpのORFを有し、260個のアミノ酸からなるタンパク質をコードしていた（図20）。この遺伝子は新規でアミノ酸レベルで部分的、全体的に相同性の高いタンパク質は見いだせなかった。またSVS1遺伝子の3'末端側約400bp後方に別のORFが存在していた。この遺伝子の予想タンパクは酵母の減数分裂時の組み替えに関係しているといわれるPMS1(70)にアミノ酸レベルで高い相同性が見られた（データ不示）。

### 9-4 Svs1タンパクの予想アミノ酸配列上での解析

Svs1pはこれまで知られているいずれのタンパク質とも部分的、全体的に高い相同性は見いだせなかったが、DNA配列から予想されるタンパク質にはかなり特徴を持っていることがわかった。図20Aに示すようにこのタンパク質はセリン、スレオニンに非常に富んでいる。セリンは全アミノ酸の15%、スレオニンは25%にも達する。また親水性・疎水性領域の検討をKyteらの方法(71)に従って解析した結果、図20Bに示すように全体的に親水性のタンパク質であるのにも関わらず、N末付近は非常に疎水性に富んでいることがわかった。この領域のアミノ酸配列を調べてみるとAla-X-Alaという分泌シグナルにみられるコンセンサス配列がみられることがわかり(72)、この部分は分泌シグナルとして働いていることが予想される。よってSvs1pは分泌タンパク質として働いている可能性が考えられた。

A

GGAACAAACATTTTGATTTC	60
GTTATTGTTTGGGAAAGCATTCTCGGCTAGAAGAATGAAACTGGCGCTCAGGTTTGATTC	120
TATAACTACGGCAGTTTTCCTATTCTATTTTCGTTTTTTGATTTTCCCGCCGCATTGGA	180
TATTCAATTTCGGCAGCTAATAATTGGCATTTCGTGTTCTTAAGTAATTCGTGTTTCAA	240
ATAACCGTAAACAGAGAAAAGACCCAAGAATTCAGATGGCTTAGAAGAGGTAGACATTAA	300
ATCAATCTGTATGTGATGGAGAGGGAGTGATTTAAAAGACGTAAGAAAATGAATTATCA	360
AGATCCGTTATGGCCATCTAGTCTCTTTCTGTACACTAGTTGTCTAACACAACCAACAA	420
ATTAGAATATATATCGCAATGATTTTCAAATATTGTGTAGTTTACTACTGGTAACCTCC	480
<u>M I F K I L C S L L L V T S</u>	14
<u>A A C T T C G C T T C T G C C T T A T A T G T C A A T G A A A C T A C G A G C T A T A C A C C A T A C A C G A A G A C A</u>	540
<u>N F A S A</u> L Y V N E T T S Y T P Y T K T	34
TAACTCCAACATACTCTGTTTTCACCTCAAGAGACAACATTAACGTACAGCGATGAAACA	600
L T P T Y S V S P Q E T T L T Y S D E T	54
ACCACCTTCTACATAACATCTACTTTTACTCTACCTACTGGTTCACTACCTCCCAATCA	660
T T F Y I T S T F Y S T Y W F T T S Q S	74
GCTGCTATTATTAGTACACCTACTGCAAGTACACCTACTGCAAGCAGCCTAGCCTAACT	720
A A I I S T P T A S T P T A S T P S L T	94
ACGTCCACAAATGAATACACCACCACCTATTCTGACACAGACACCACCTACACGTCTACT	780
T S T N E Y T T T Y S D T D T T Y T S T	114
CTGACCTTACTTACATAAATACTCTATCTACGGAATCCGCCAACGAGAAGGCTGAACAG	840
L T S T Y I I T L S T E S A N E K A E Q	134
ATTTCCACGAGCGTCACAGAAATTGCTTCTACAGTAACCGAATCGGGCAGTACATACACC	900
I S T S V T E I A S T V T E S G S T Y T	154
TCTACTTTGACCTCAACCTTATTGGTTACTGTATATAATTCCCAAGCTAGTAATACAATA	960
S T L T S T L L V T V Y N S Q A S N T I	174
CGGACATCCACAGCTGGGGACGCCGCTCCAATGTTGATGCCTTAGAAAAGTTAGTCTCT	1020
A T S T A G D A A S N V D A L E K L V S	194
GCTGAACATCAATCTCAGATGATTCAAACCACATCCGCCGATGAACAGTACTGTAGTGCG	1080
A E H Q S Q M I Q T T S A D E Q Y C S A	214
TCTACCAAGTATGTTACAGTTACAGCTGCTGCAGTTACCGAAGTGGTTACTACTACGGCG	1140
S T K Y V T V T A A A V T E V V T T T A	234
GAGCCTGTTGTTAAATACGTTACTATAACTGCCGATGCTAGTAATGTTACAGGTTCTGCT	1200
E P V V K Y V T I T A D A S N V T G S A	254
AACAACGGTACCCACATTTAATGCGTGACGTTGAATCGAGAAAAAAGCTACTTTTAAAG	1260
N N G T H I *	260
AAACCTTTACTAGTTATCCTATATGGGATCACTAGTATTTTTTTGATTTACGATTCAATAA	1320
ATAGACTAGAGACAACCTTTCATATCATTCCTTAAAAAATACATAAAGCGCAAATCAACC	1380
CCATTGATACATATATAAGTAGTTCATATGACTTTCAAGAACAATAGTAGCTTTTCTA	1440
AATAATCAATAAGTAGCACAAAATCTGTCTGTTGTACGCTTATATTTAGTTTGCCTTTA	1500
TTTGCAGCGCCACGAGAAGGGCAGGAAAAAAGATCAATAGTTTGCAATAAACATCGA	1560
ATGATGATTTCAACCACCGATACA	1584

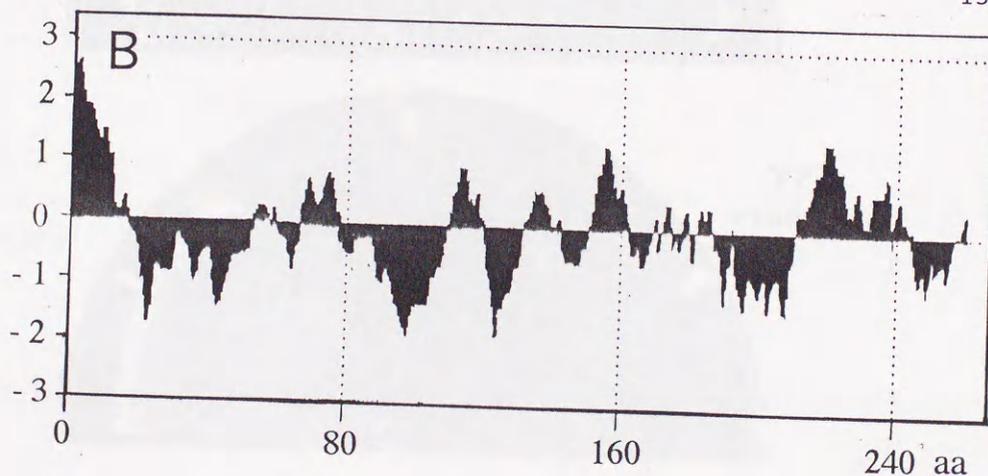


図20 SVS1遺伝子の (A)塩基配列及び予想アミノ酸配列と (B)予想タンパクの疎水性・親水性領域の解析(71)

(A) セリン、スレオニン残基には下線を、分泌シグナルと思われる領域は囲った。

### 9-5 SVS1遺伝子の破壊

Svs1の細胞内での機能を調べるために8-3-9に従って破壊用プラスミドを構築し、酵母ゲノム上のSVS1遺伝子の破壊を行った(図19)。破壊の確認はSphI-SphI領域をプローブとしてサザン法によって行った(データ不示)。

遺伝子破壊の結果SVS1は細胞の生育には必須でないことがわかった。しかしながら予想通りSVS1欠損株はバナジン酸に対して感受性を示した(図21)。このバナジン酸感受性はCN欠損株よりも弱いものであった。またバナジン酸以外にもCN欠損株にみられた $\text{Na}^+$ 、 $\text{Li}^+$ 、高pH<sup>(41)</sup>感受性、「 $\alpha$ -factorによるG1期停止からの復帰ができない」といった形質はみられなかった。このほかにも温度感受性、低温感受性、ヒートショック感受性などにはならず、種々の金属イオン( $\text{K}^+$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Sr}^{2+}$ 、 $\text{Co}^{2+}$ 、 $\text{Cd}^{2+}$ 、 $\text{Ba}^{2+}$ 、 $\text{NH}_4^+$ 、 $\text{SO}_4^{2-}$ 、 $\text{SO}_3^{2-}$ 、 $\text{NO}_2^-$ 、 $\text{CrO}_4^{2-}$ 、 $\text{AsO}_4^{2-}$ 、種々の薬剤(hygomycinB, chloramphenicol, Ethidium bromide, amyloride, haloperidol, syringomycin, JG957, trifluoperazine, fluphenazine, cycloheximide, FK506, cyclosporinA, nystatin, cerulenin, puromycin)、その他のストレス(エタノール、 $\text{H}_2\text{O}_2$ 、浸透圧、SDS、 $\beta$ -メルカプトエタノール、pH、炭素源利用)に対しても野生株と比べて感受性、耐性にはならなかった。

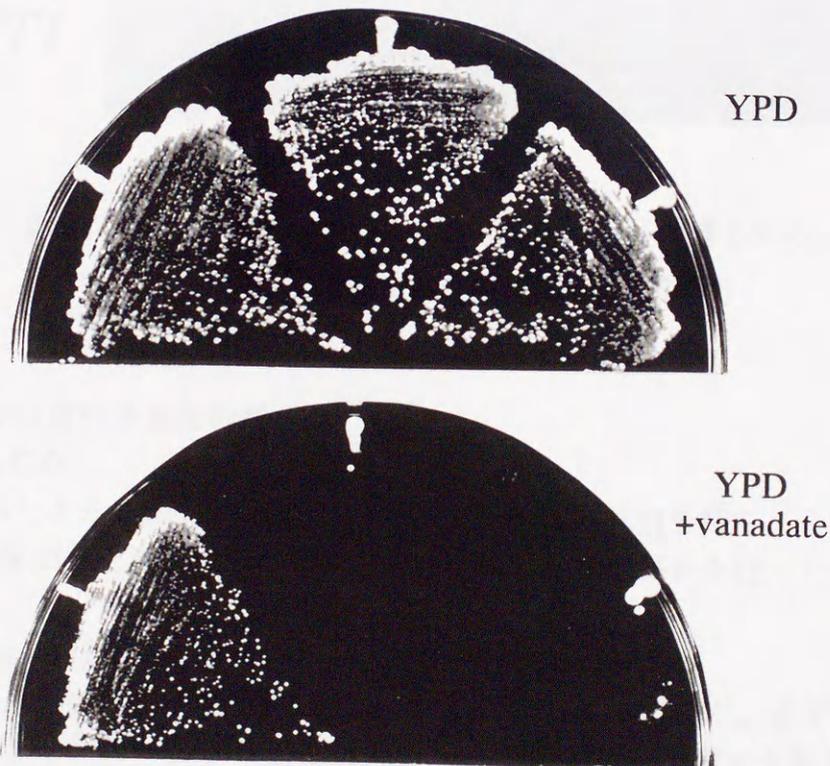


図21 SVS1遺伝子破壊株はバナジン酸に対して感受性を示す。  
(左から時計回りにwild type: RAY3A, *cnp1cnp2*: YLL34, *svs1*: TNP20, バナジン酸の濃度は5.6mMである。)

### 9-6 SVS1遺伝子の転写制御

これまでの解析からSVS1はバナジン酸耐性に関わる遺伝子であることがわかった。アミノ酸配列上からSvs1pは機能タンパク質として働く可能性が高いのでバナジン酸によって誘導される可能性もあると考えられる。それについて調べてみた。8-3-10の方法で細胞からmRNAを回収し、ノーザン法を行った。インターナルマーカールとしてアクチン遺伝子 (ACT1)を用いた。図22に示すようにSVS1mRNAはバナジン酸により顕著に誘導されていることがわかった。またこの誘導はLi<sup>+</sup>, cycloheximide, heatshockなどに対して全くみられず、バナジン酸特異的であることがわかった。

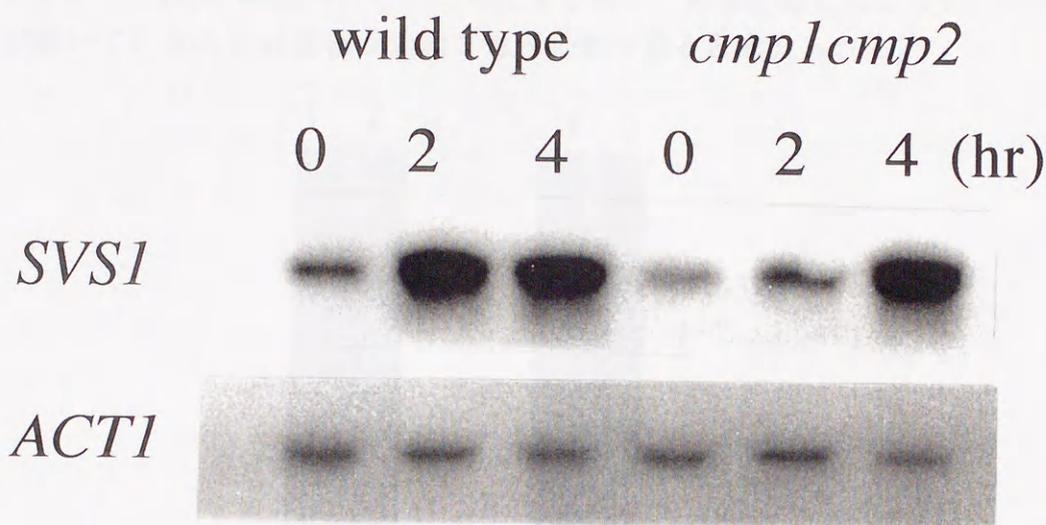


図22 SVS1mRNAはバナジン酸によって転写誘導される。  
(wild type: RAY3A, *cmp1cmp2*: YLL34)

### 第10節 SVS1遺伝子産物の解析

#### 10-1 はじめに

9章でも述べたようにSvs1pは分泌シグナルと思われる配列を持ち、その生化学的特徴には非常に興味を持たれる。そこで抗体を用いた生化学的解析を行った。

#### 10-2 抗Svs1抗体の作製

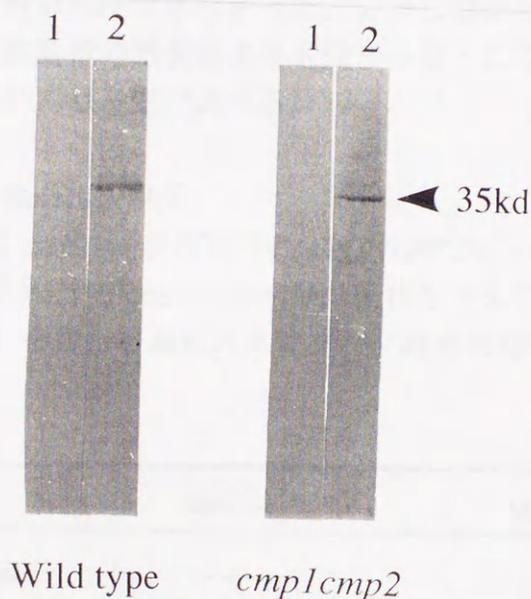
SVS1遺伝子産物の解析を行うために抗Svs1抗体の作製を試みた。まず常法に従い、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST)とSvs1の融合タンパク質を大腸菌内で生産し、それをマウスに免疫して抗血清を取得したが、この抗体は大腸菌内で生産したSvs1pは認識できるが酵母内で発現させたSvs1pは認識できなかった(73)。そこでこの方法はあきらめ、インフルエンザウイルスのヘマグルチニン (HA)に含まれる9個のアミノ酸 (YPYDVPDYA)を特異的に認識する抗体 (HA抗体) を用いることにした。8-3-11に示す方法でSVS1遺伝子のC末端にこのエピトープが読まれるように合成したオリゴヌクレオ

チドを挿入した(SVSI-HA)。SVSI-HAは単コピーでsvs1株のバナジン酸感受性を完全に抑圧したことからこの遺伝子は通常のSVSIと同じように働くことが明らかになった。よってこの抗体を用いてSvs1pの解析を行うことにした。

### 10-3 SVSI遺伝子産物の解析

Svs1pはその予想アミノ酸配列から分泌タンパクとして働く可能性が示唆された。そこでまずSvs1pがどこに局在するかをウエスタン法によって調べた。Svs1-HAをもつ株の細胞Total画分と、その培養液を取得した。その結果、図23に示すようにSvs1pは細胞外に分泌されず、細胞内で働くことがわかった。

しかしながらSvs1pが細胞内のどこに局在するのか。あるいはどのようにこの分泌シグナルが働いているのかは厳密な分画を行う必要があると考えられる。



1,extracellular protein    2,intracellular protein

図23 Svs1は細胞内に局在するタンパク質である。

## 第11節 Svs1とCNの遺伝学的関係

### 11-1 はじめに

SVSI遺伝子はCN欠損株の形質を多コピーで相補する遺伝子であるから、CNの下流で働く可能性が考えられる。本節はCNとSVSIとの関係を遺伝学的に解析する。

### 11-2 CNはSVSIの転写を制御するか

SVSIがCNの下流で働いているならば、CNによってその転写が制御されている可能性が考えられる。この可能性を調べるために野生株とCN欠損株との間でSVSIの転写量の差を調べた。図22に示すようにCN欠損株においてもSVSI mRNAはバナジン酸によって

誘導され、添加4時間後の転写量には両株の間でほとんど差がなかった。2時間後CN欠損株の転写が若干少ないように見えるのはCN欠損株はこの濃度ではバナジン酸に対して感受性を示すためであると思われる。よってCNはSVS1の転写を制御してないことが明らかになった。

1 1-3 Svs1はCNと同じ情報伝達系で働くか。またその位置関係はどうか。

11-2でCNはSVS1の転写を制御しないことが明らかになったが、Svs1の翻訳後調節を行っていることも十分考えられる。そこでこの2つのタンパクの関係を遺伝学的に調べた。Svs1がCNの下流で働くならばsvs1株のバナジン酸感受性はCNの高発現によっては抑圧されないはずである。このことを確かめるためにsvs1株にCMP1+CNB1, CMP2+CNB1を多コピーで導入した。表1に示したようにCNを高発現させてもsvs1破壊株のバナジン酸感受性は抑圧できなかった。しかしながらcmp1cmp2svs1三重変異株はcmp1cmp2, svs1単独変異株の感受性よりも強まった。この結果は高発現の結果と矛盾するがその可能性については考察で述べる。

表1 CNとSvs1のEpistatic解析

wild type (RAY3A), cmp1cmp2 (YLL34), svs1 (TNP20), cmp1cmp2svs1 (TNP59)

MIC (minimum inhibitory concentration)は、菌体をさまざまな濃度のバナジン酸 (4.8~6.4mM, 0.2mMごと) を含む培地にスタンプし、増殖可能なもっとも高い濃度として定義した。

strain	plasmid	MIC (mM)
wild type	—	6.0
cmp1cmp2	—	5.2
svs1	—	5.6
cmp1cmp2svs1	—	4.8
svs1	YEp24	5.6
svs1	YEpCMP1CNB1	5.6
svs1	YEpCMP2CNB1	5.6
svs1	YEpSVS1	6.4

## 第12節 考察

CNの細胞内での役割を調べるためにはその周辺で働く遺伝子を取得し、その解析を行うことも重要である。CN欠損株はNa<sup>+</sup>感受性の他にバナジン酸に感受性になることが明らかになった。バナジン酸は形質膜ATPaseの他にチロシンホスファターゼの阻害剤としても知られ細胞内でさまざまな重要なイベントに関わっている可能性が考えられる。そこでCN欠損株のバナジン酸感受性を多コピーで抑圧できる遺伝子SVS1が取得された<sup>(62)(69)</sup>。SVS1はCN欠損株のバナジン酸感受性以外の形質(Na<sup>+</sup>, Li<sup>+</sup>感受性、 $\alpha$ -factorによるG1期停止からの復帰ができない。)は抑圧できなかった。またNa<sup>+</sup>感受性を多コピーで抑圧する遺伝子も取得されているが、いずれもバナジン酸感受性を抑圧することはできなかった。このことからCNは複数の独立した系に関係していること、及びSvs1の関わる系とNa<sup>+</sup>濃度調節系は直接関係していないことが強く示唆された。

SVS1の塩基配列を決定した結果、新規な遺伝子であった。また予想タンパクも既知タンパクと部分的全体的に高い相同性は見いだせなかった。しかしながらSvs1pは分泌シグナルを持ったセリン、スレオニンに富むタンパク質であった。

SVS1欠損株は予想通りバナジン酸に対して感受性を示した。またSVS1mRNAはバナジン酸に転写誘導されたことから、このタンパク質はバナジン酸ストレスに対してタンパク量を増加することによって対応しているものと思われる。

Svs1pは分泌タンパク質である可能性がその配列から予想されたが抗体を用いたウエスタン法より細胞内に局在していることがわかった。タンパク量もバナジン酸によって増加することもわかった(データ不示)。

SVS1を高発現したときCN欠損株のバナジン酸感受性を相補したこと、CNを高発現してもSVS1欠損株のバナジン酸感受性を相補できなかったことから、Svs1はCNによって調節されている可能性が考えられた。しかしながら次の理由でSvs1はCNとは別々の経路でバナジン酸感受性に関わると考えられる。①SVS1の転写はCNによっては制御されていないこと②Svs1を高発現すると野生株のバナジン酸耐性も強めること、すなわちCN欠損株の抑圧は見かけの上だけである可能性がある。一方CNを高発現させても野生株、svs1株いずれにおいてもバナジン酸耐性は強めない③Svs1欠損とCN欠損を重ね合わせるとそれぞれの単独欠損よりもバナジン酸感受性が強まること

酵母がバナジン酸ストレスに対応する機構は少なくとも2つあり、1つはCNを介するもの、もう1つはSVS1の転写を上昇させることにより対応するものである。Svs1は残念ながら直接CNとの関連性はないがこの遺伝子の転写機構の解明はバナジン酸耐性機構を明らかにする上で非常に重要であると考えられる。



はじめに

CN欠損株は正常に増殖したが、これまでの解析の結果①Na<sup>+</sup>, Li<sup>+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Ba<sup>2+</sup>, β-mercaptoethanol, バナジン酸に対しては感受性<sup>(40)(41)(46)(59)</sup> ②Ca<sup>2+</sup>に対しては耐性<sup>(41)</sup> ③α-factorによるG1期停止からの復帰ができない<sup>(11)(39)</sup> などの形質が知られている。CNは多くの遺伝子とともに細胞内のプロセスに関わっていると考えられる。「CNの周辺で働く遺伝子に変異が入るとその変異株はCN欠損株に類似した形質を示すであろう」という仮定を元にCN欠損株に類似した形質、すなわち上に述べた形質を示すような変異株の取得及びその解析を試みた。

### 第13節 材料と方法

#### 13-1 使用菌株

酵母 *Saccharomyces cerevisiae*

W303	(MATa/MATα ade2-1/ade2-1 his3-11,15/his3-11,15 leu2-3,112/leu2-3,112 trp1-1/trp1-1 ura3-1/ura3-1 can1-100/can1-100)
W303-1A	(Mata 他はW303に同じ)
TNC1	(crv1-1 他はW303-1Aに同じ)
TNC3	(crv2-2 他はW303-1Aに同じ)
TNC33	(crv3-1 他はW303-1Aに同じ)
TNC40	(crv4-1 他はW303-1Aに同じ)
TNP36	(cnb1::HIS3 crv3-1 他はW303-1Aに同じ)
TNP44	(bck1::HIS3 他はW303-1Aに同じ)
TNP46	(mpk1::HIS3 他はW303-1Aに同じ)
TNP54	(cnb1::HIS3 crv2-2 他はW303-1Aに同じ)
DHT14	(cnb1::HIS3 他はW303-1Aに同じ)

大腸菌 *Escherichia coli*

DH5α	(supE44 ΔlacU169 (φ 80 LacZ ΔM15) hsdR17 recA1 endA1 gryA96 thi-1 relA1)
JM109	(recA1 endA1 gryA96 thi-1 hsdR17 supE44 Δ(lac-proAB) [F' traD36 proAB lacI ZΔM15], λ -

#### 13-2 使用培地

YEPD培地	(1-1-2 参照)
2×YT培地	(1-1-2 参照)
MM培地	(文献 <sup>(63)</sup> 、薬剤、イオン等は培地をオートクレーブ後、55℃に冷ましてから加えた。)

### 13-3 DNA操作

#### 8-3 参照

#### 13-3-1 *bck1*, *mpk1*破壊株の作製

MPK1破壊用プラスミドはMPK1のEcoRI-SaII断片(2.3kb)をpUC19の同部位に接続した。BaIIで切断後、両端を平滑化したHIS3遺伝子を挿入した。BCK1破壊用プラスミドはBCK1のEcoRI-EcoRI断片(2.5kb)をHindIII部位をつぶしたpUC19のEcoRI部位に接続した。HindIII切断し平滑化した後、両端を平滑化したHIS3遺伝子を挿入した。遺伝子破壊の際にはともにPvuIIで線状にして酵母に形質転換した。またFKS1, FKS2破壊用プラスミドは日本ロシユ研究所抗真菌部よりいただいた(74)。いずれの場合も破壊の確認はサザン法によって行った。

#### 13-3-2 プラスミドの作製

YE<sub>p</sub>MPK1及びpTNM1はMPK1遺伝子のEcoRI-SaII断片をそれぞれYE<sub>p</sub>24のSaII-SmaI部位、pYES2 (Invitrogen)の同部位に接続して作製した。YE<sub>p</sub>CNB1は次のように作製した。ゲノムDNA由来のCNB1を含むEcoRV-EcoRV約1.5kbをpUC19のHincII部位につなぎ、そのSaII-SphI断片をYE<sub>p</sub>24の同部位につないだ。どちらの場合も粘着末端の接続できない部位はfill in (1-3-3)により平滑化して接続した。YE<sub>p</sub>CMP2CNB1は8-3-12に示した。YE<sub>p</sub>BCK1(75), YC<sub>p</sub>BCK1-20(76)は、名古屋大学の松本先生よりいただいた。

#### 13-3-3 $\alpha$ -factorによるG1期停止からの復帰の検定

Cardenasの方法(77)を一部改変して行った。対数増殖期の細胞を最終濃度が $3 \times 10^5$  cells/mlになるように55°Cに保温したtop agar (YEPD培地+0.7% Agar あらかじめ煮とかしておく)に懸濁し、55°Cに保温したYEPDプレートにひろげた。top agarが固まったことを確認した後、15 $\mu$ gの $\alpha$ -factor (ペプチド研究所)を含むろ紙(直径6mmの円形)を培地の上にのせた。プレートの底を下にして28°Cで丸1日おいた後、プレートの向きを逆にして3~4日静置し、形成されたHaloの境界面をみてリカバリーしているかどうかを検定した。

#### 13-3-4 感受性の測定

- ①液体培地：対数増殖期の細胞を最終濃度が $1 \times 10^5$  cells/mlになるように目的の濃度のCaCl<sub>2</sub>またはバナジン酸を含むYEPD植菌し、30°Cで目的の時間振とうして、OD<sub>600</sub>を測定した。
- ②固体培地：Wellの穴に100 $\mu$ lの滅菌水をいれ、目的の細胞を $2 \times 10^7$  cells/mlになるように懸濁した。目的の薬剤またはイオンを含むYEPD固体培地にイノキュレーターを使ってスタンプし、30°Cで目的の時間培養した。
- ③MIC (Minimum Inhibitory Concentration)の測定

MICはつぎのように定義した。様々な濃度の、目的のイオンや薬剤を含む培地を用意し、菌体を上記②に示す方法で固体培地にスタンプし、2から4日(マテリアルに

よって異なる) 30℃で培養した。菌が増殖できない最低の濃度をMICとした。

#### 13-3-5 CN高発現による *mpk1* (*bck1*) 株の形質の抑圧の検定

プラスミドを持った細胞を1M ソルビトールを含むMM-URA培地で対数増殖期まで30℃で培養し、最終濃度が $1 \times 10^5$  cells/mlになるように新しいYEPD培地に懸濁、目的の時間培養し、OD<sub>600</sub>を測定した。また細胞形態の変化はYEPDに植菌後、13時間後のサンプルを調べた。

#### 13-3-6 *FKS1*, *FKS2*の転写量の測定

野生株、*mpk1*, *bck1*株いずれの場合もYEPD培地で培養し、Schmittらの方法<sup>(67)</sup>でmRNAを回収してノーザン法により行った<sup>(68)</sup>。またプローブは*FKS1*はN末領域約500bp、*FKS2*は*ScaI*-*PstI*約600bpを用いた。

### 第14節 *crv*変異株の取得

#### 14-1 はじめに

「CNの周辺で働く遺伝子に変異が入るとその変異株はCN欠損株に類似した形質を示すであろう」という仮定を元にCN欠損株に類似した形質の取得を試みた。ここで特に注目すべき形質はCa<sup>2+</sup>耐性である。なぜなら「耐性」という形質はポジティブなセレクションが可能となり目的の変異株を容易に取得することができる。ここでは1stスクリーニングとしてはこのCa<sup>2+</sup>耐性、2ndスクリーニングとしてはその他の形質すなわちNa<sup>+</sup>, Li<sup>+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, バナジン酸感受性の形質を用いた。

#### 14-2 *crv*変異株の取得

約10<sup>9</sup>個の酵母野生株細胞を野生株の増殖することができない0.7M CaCl<sub>2</sub>を含むYEPD培地に撒き、増殖可能な株すなわちspontaneousなCa<sup>2+</sup>変異株を約3200個取得した。これら株を90mM LiCl, 1.0M NaCl, 6.0mM MnCl<sub>2</sub>, 5.6mM バナジン酸を含む培地にスタンプリ、そのいずれかで増殖できない変異株103個を取得した。これらの株はいずれもバナジン酸に対して感受性を示したことから*crv* (Calcium Resistant and Vanadate sensitive)と命名した。相補性試験の結果*crv*変異株は4つの相補性グループに分かれ、そのうち*crv1*はCN調節サブユニットをコードする*CNB1*遺伝子由来のものであった(表2)。この中で特に*crv2*, *crv3*はCa<sup>2+</sup>耐性の他にNa<sup>+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, バナジン酸感受性、 $\alpha$ -factorによるG1期停止からの復帰ができない。などCN欠損株に非常に類似した形質を持っていた(図24)。これらのことから*Crv2*, *Crv3*はCNと強く関わっている可能性が高いと考え、この2つの変異株の解析を行うことにした。

表2 *crv*変異株の形質

詳しくは13-3-4に示した。培養時間は NaCl (4days), MnCl<sub>2</sub> (2.5days), MgCl<sub>2</sub> (2.5days), Cyc (cycloheximide (2.5days)), FK506 (2.5days)である。MIC測定に用いた菌株は*crv1* (TNC1), *crv2* (TNC3), *crv3* (TNC33), *crv4* (TNC40)である。

strain	number of alleles	MIC				
		NaCl (M)	MnCl <sub>2</sub> (mM)	MgCl <sub>2</sub> (M)	FK506 (μg/ml)	cyc (μg/ml)
W303-1A	-	1.6	8.5	1.2	>50	0.05
<i>crv1/cnb1</i>	62	0.7	3.5	1.2	>50	0.05
<i>crv2</i>	33	1.2	5.5	0.4	1.0	0.015
<i>crv3</i>	7	1.3	5.5	0.4	1.0	0.015
<i>crv4</i>	1	1.6	8.5	1.2	>50	0.05

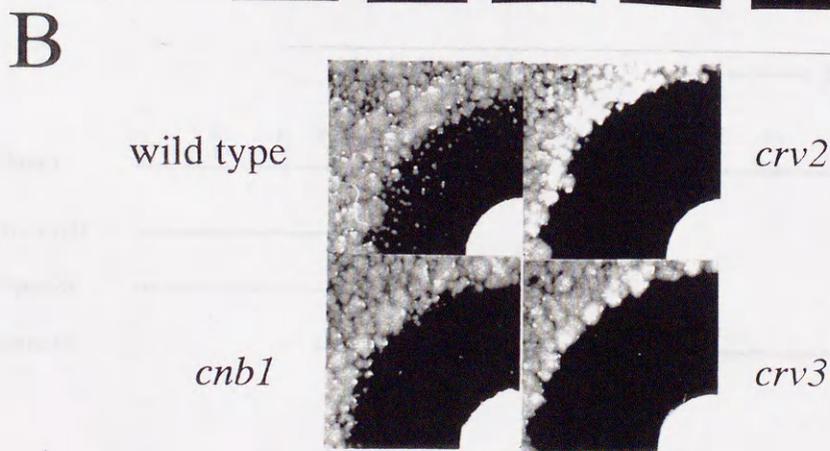
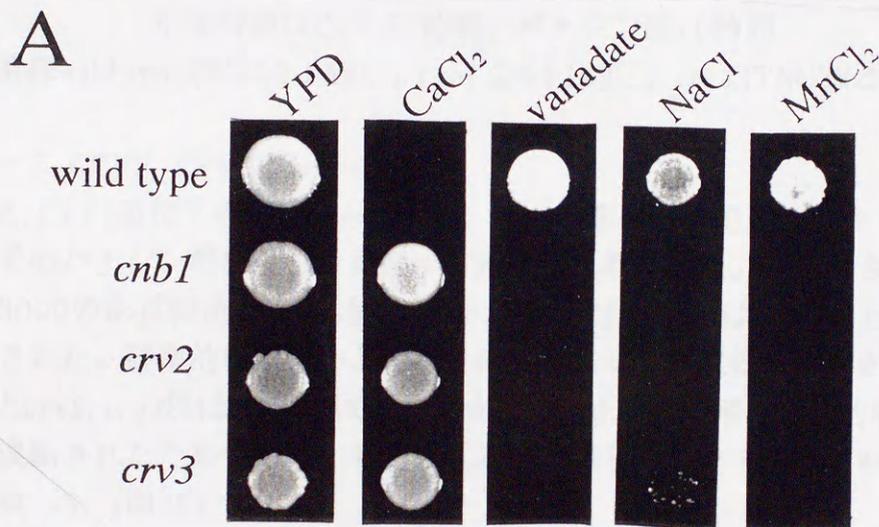


図24 *crv*変異株の特性

(A) YEPD培地に以下の濃度を加えた。CaCl<sub>2</sub> (0.75M, 4days), vanadate (5.2mM, 2.5days), NaCl (1.2M, 4days), MnCl<sub>2</sub> (6.0mM, 2.5days),  
 (B) α-factorによるG1期停止からの復帰について

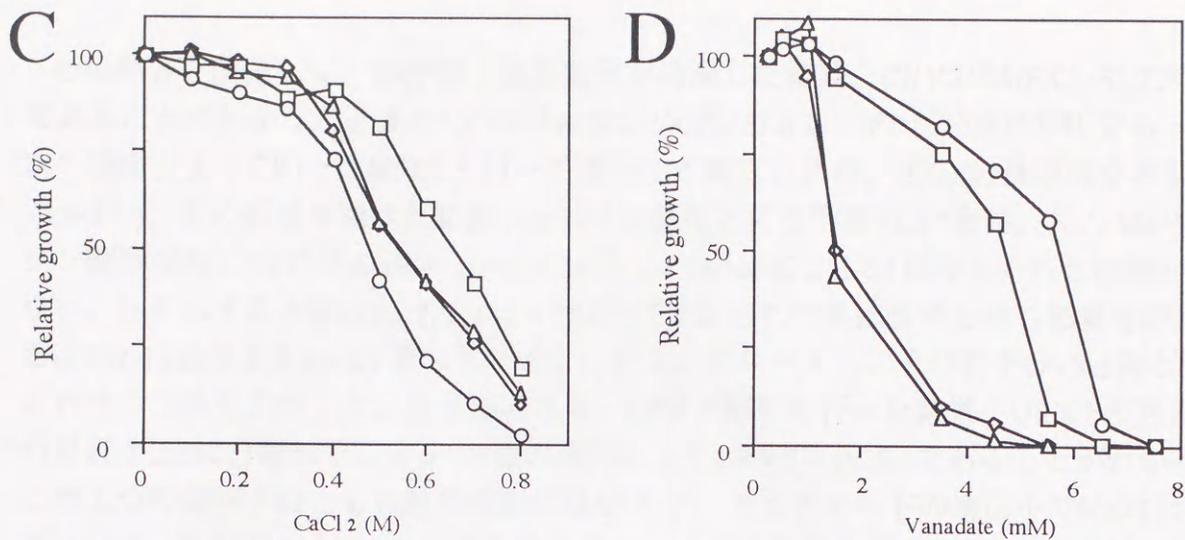


図24 続き *crv*変異株のCa<sup>2+</sup>耐性 (C)、バナジウム酸感受性 (D)

培養時間はCa<sup>2+</sup> 52時間、バナジウム酸16時間

使用菌株wild type (W303-1A)(○), *cnb1* (DHT14)(□), *crv2* (TNC3)(△), *crv3* (TNC33)(◇)

#### 1 4 - 3 CRV2, CRV3遺伝子の取得

CRV2, CRV3遺伝子の取得は*crv2*-2株、*crv3*-1株にYCp50ゲノムライブラリーを形質転換しそのバナジウム酸感受性を相補する遺伝子を取得した。このとき*crv2*-2を相補するものは3000の形質転換体から5個、*crv3*-1を相補するものは8000の形質転換体から46個取得された。確率的にはずいぶん多くのプラスミドが取得されたがこの理由としてはもともと*crv2*, *crv3*株はMM培地での増殖が悪く、正常に増殖する目的のプラスミドを持った株が濃縮されたためであると考えられる。取得したプラスミドを利用して制限酵素地図を作製した (図25)。

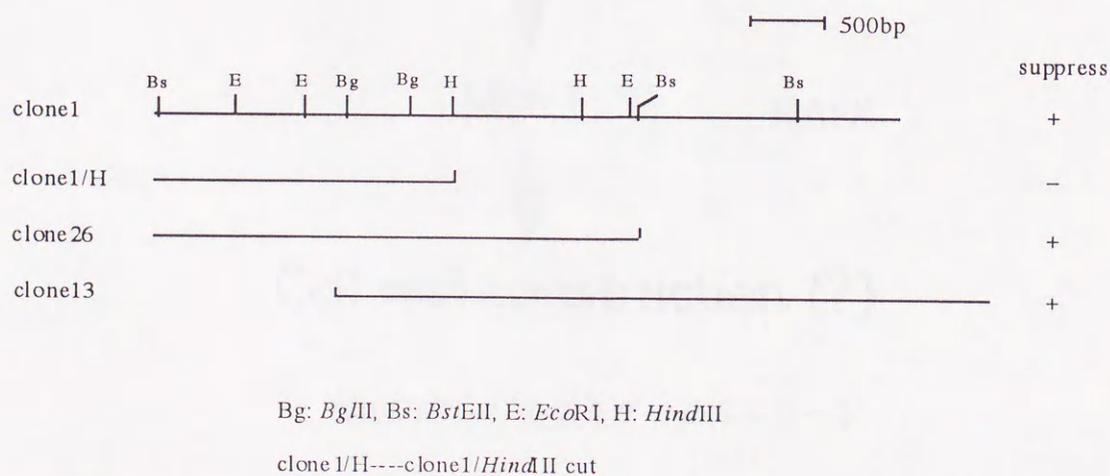


図25 CRV3の必須領域の検定

suppressionは変異株のバナジウム酸感受性についてである。

必須部分を決定して、部分的に塩基配列を決定した結果、*CRV3*は*MPK1/SLT2*<sup>(77)(78)</sup>であることがわかった。また*CRV2*は*BCK1/SKC1/SLK1/SSP31*<sup>(76)(79)(80)(81)</sup>であった。次の理由により*CRV3*は*MPK1*と同一の遺伝子と確認された。①*mpk1*破壊株を作製し(13-3-1)、その形質を調べた結果、*crv3-1*変異株と同じ形質( $\text{Ca}^{2+}$ 耐性、 $\text{Na}^+$ 、 $\text{Mn}^{2+}$ 、バナジウム感受性、 $30^\circ\text{C}$ でのslow growth, ts性、 $\alpha$ -factorによるG1期停止からの復帰ができない。)を示すこと②*crv3-1/mpk1 $\Delta$*  2倍体はそれぞれの単独変異と同じ形質を示したこと③*URA3*遺伝子を*MPK1*遺伝子の近くにインテグレートし、その株を*crv3-1*株と掛け合わせ、二倍体をつくり、孢子形成させ、四分子解析を行った結果、*URA+*の形質と*crv3-1*の形質が2:2に分離したこと。同様の理由により*CRV2*は*BCK1*であることがわかった。この2つの遺伝子はともに動物細胞のMAPキナーゼカスケードの遺伝子でMpk1はMAPキナーゼ、Bck1はMAPキナーゼキナーゼキナーゼのホモログである<sup>(76)(77)</sup>。酵母においてこの2つの遺伝子はプロテインキナーゼCホモログPkc1の下流で細胞壁の構築に関係していると考えられている<sup>(75)(76)(77)(79)(82)</sup> (図26)。よって以後、*CRV2*は*BCK1*、*CRV3*は*MPK1*とする。

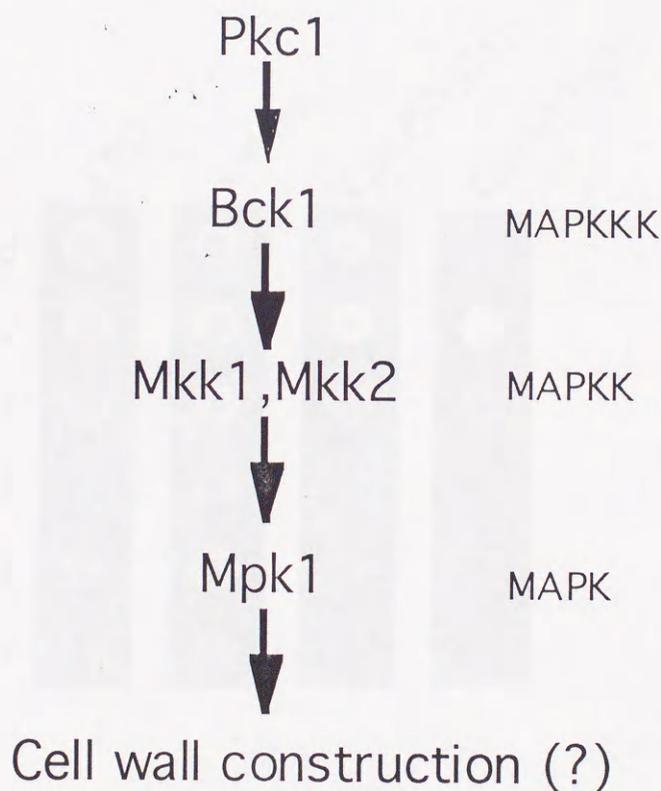


図26 酵母のMAPキナーゼカスケード

第15節 CNとMAPキナーゼカスケードの遺伝学的解析

15-1 CN, MAPキナーゼカスケード二重欠損株の解析 (I)

14-3の結果からCNはMAPキナーゼカスケードと関わっている可能性が示唆されたのでその可能性について調べてみた。まず、CNとMAPキナーゼカスケード欠損との二重変異株の作製を試みた。CN欠損株と *mpk1* 株の2倍体をつくり、胞子形成させ、1M ソルビトールを含むYEPD培地上で四分子分離後の胞子を増殖させた。図27に示すように、CNを欠損させても通常の増殖は野生株とほとんど変わらない。また *mpk1* 株は30℃ではややslow growthではあるが十分増殖する。ところがこの2つの変異を合わせ持った株はこの条件で非常に強く増殖が阻害された。この形質は培地中に1M ソルビトールを添加することによりほぼ完全に抑圧された。ここで興味深いのは50mM CaCl<sub>2</sub>の添加によって、*mpk1*の30℃のslow growth及びts性は抑圧されたが(データ不示)、この二重変異株の形質は全く抑圧されなかった点である。この理由について考察で述べる。同様の結果は*cnb1*変異の代わりに*cmp1cmp2*、*mpk1*の代わりに*bck1*を用いても得られた。また *mpk1*, *bck1*破壊は*crv*変異と同じ結果が得られた。

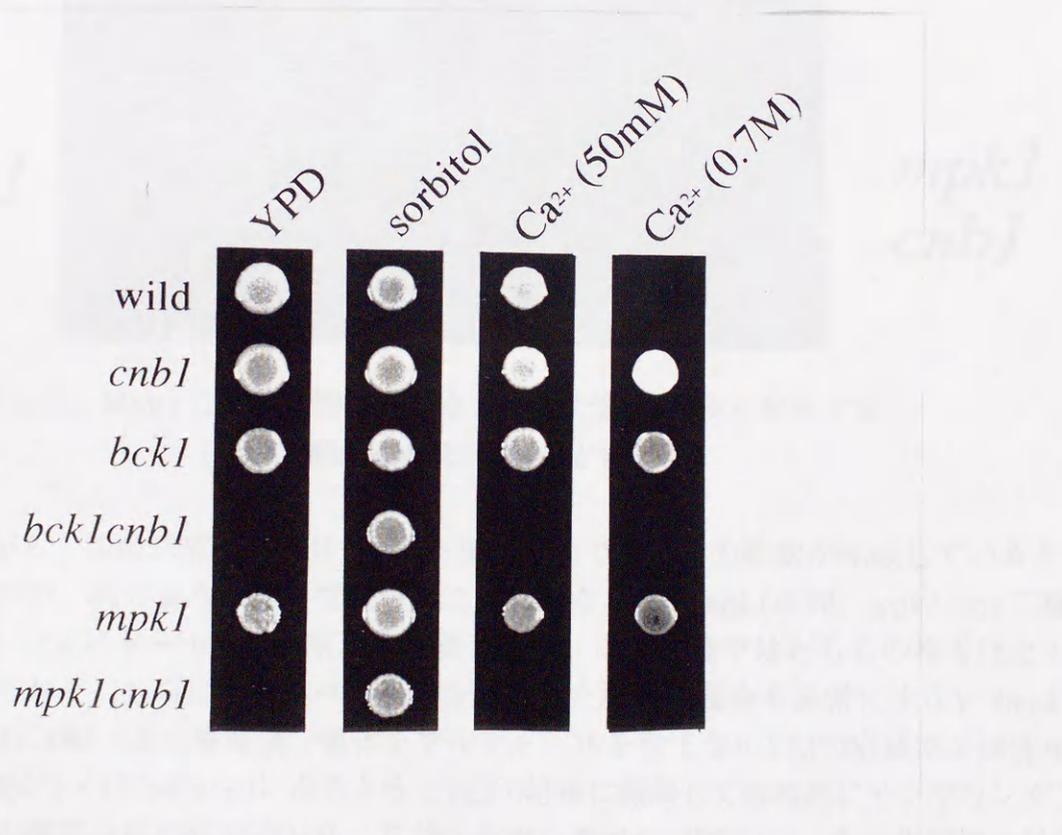


図27 CN情報伝達系、MAPキナーゼカスケードを同時に欠失した細胞は強い増殖阻害を起こす。(Wild (W303-1A), *cnb1* (DHT14), *bck1* (TNC3), *bck1cnb1* (TNP54), *mpk1* (TNC33), *mpk1cnb1* (TNP36), sorbitol (1M ソルビトールを含むYEPD培地)、培養時間(YEPD, 50mM CaCl<sub>2</sub> (2days), sorbitol (3days), 0.7M CaCl<sub>2</sub> (4days))

### 15-2 CN, MAPキナーゼカスケード二重欠損株の解析 (II)

先にも述べたように *cnb1mpk1*, *cnb1bck1* 二重変異株は非常に強く増殖が阻害されることがわかったが、このときの細胞形態について調べてみた。図28に示すように *mpk1* 株は通常の温度において一定の割合で野生株と明らかに異なる以上に小さい形の細胞を生ずることが知られている<sup>(81)</sup>。 *mpk1cnb1* 株ではこのような細胞が劇的に増加することがわかった。

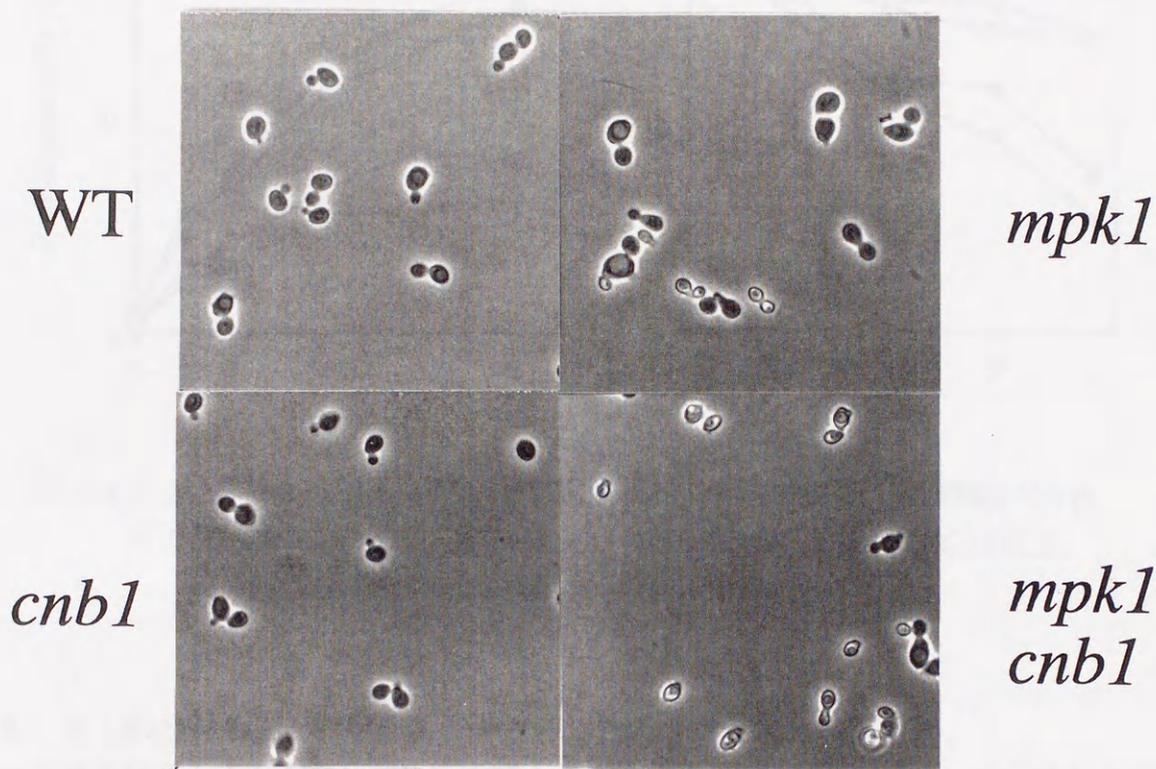


図28: CN, *Mpk1* 二重変異株は異常な形をした細胞が多く発生する。  
(用いた細胞は図27のものと同じ)

しかしながら、この二重変異株は通常のYEPD培地では多くの細胞が死滅していると考えられるので、次のような条件で調べることにした。まず *mpk1* 単独、 *mpk1cnb1* 二重変異株を1M ソルビトールを含む培地で増殖させる。この培地ではどちらの株もほとんどが生存しており、さらに上に述べた異常な形をした細胞の割合も非常に少ない (*mpk1* 1%, *mpk1cnb1* 4%)。遠心集菌後、菌体をソルビトールを含まないYEPD培地で2回洗浄後、最終濃度が  $1 \times 10^7$  cells/ml になるようにYEPD培地に懸濁して経時的にサンプリング、サンプル中の異常な形の細胞の割合、及び生存率を調べた (図29)。なお生存率の検定はメチレンブルーを用いた<sup>(63)</sup>。YEPD培地にシフト後、異常な形の細胞は増加し、生存率は逆に低下した。シフト30分後、 *mpk1cnb1* 株の生存率は *mpk1* 株とほとんど変わらないが、異常な形の細胞は約2倍になっている。シフト2時間後、異常な形の細胞の約半分は死滅していた。異常な形の細胞にしめる死滅した細胞の割合はその後上昇し、また正常な形の細胞において死滅した細胞はほとんど見られなかったことから、変異株はまず異常な形の細胞になり、それから死に至ると考えられる。以上のことから、 *mpk1* 株

の形態異常はCNによって強められることがわかった。同様の結果は $mpk1$ 株の代わりに $bck1$ 株を用いても得られた。また野生株と $cnb1$ 株で同様な実験を行ってもこのような形態異常及び生存率の低下は見られなかった。

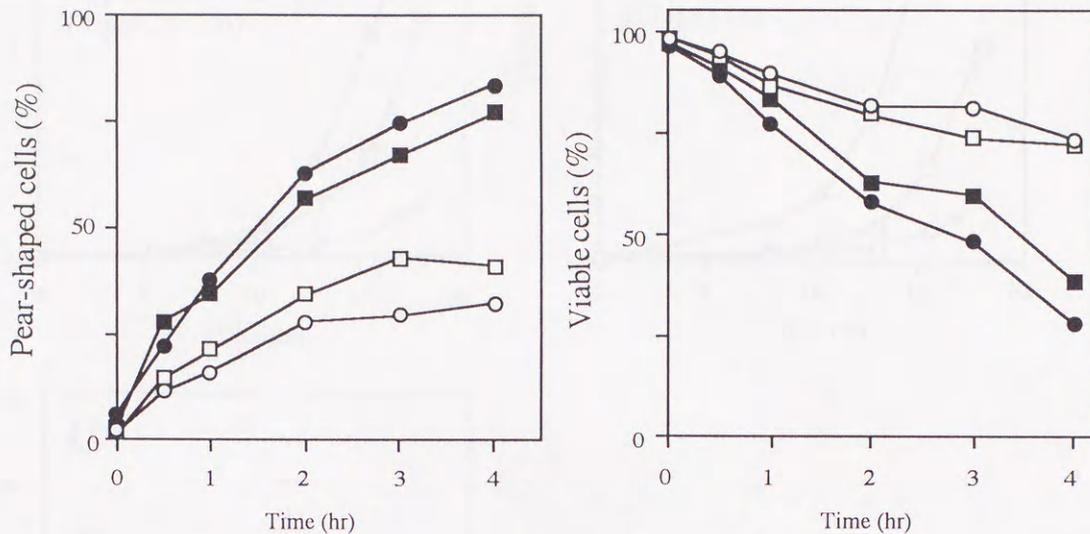
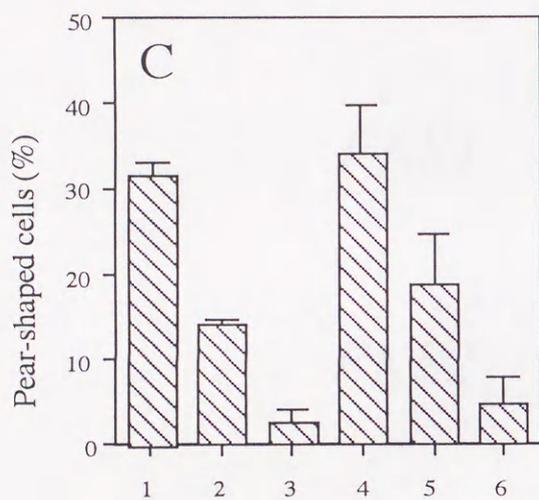
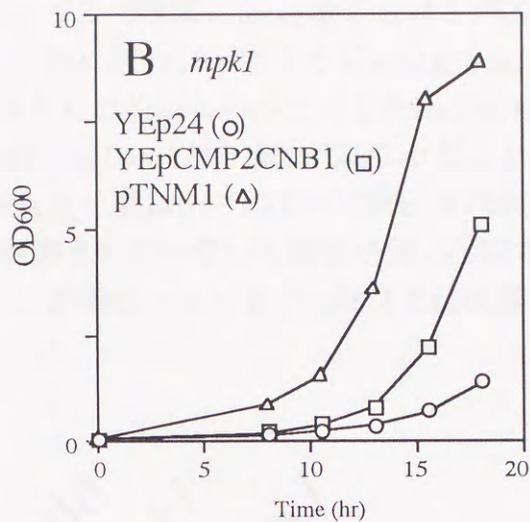
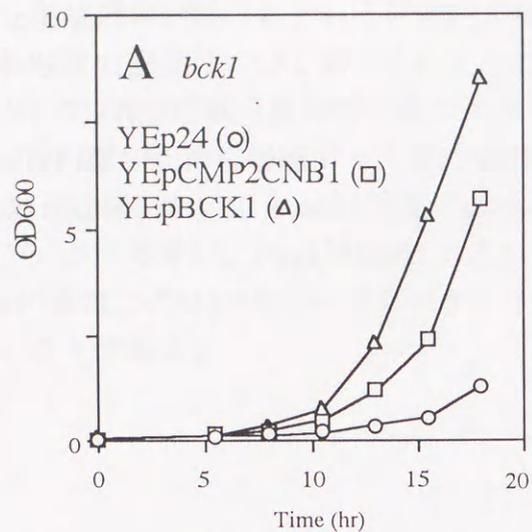


図29 CN, MAPキナーゼカスケード二重変異株の異常な形をした細胞の割合  
使用菌株 $bck1$  (TNC3)(○),  $bck1cnb1$  (TNP54)(●),  $mpk1$  (TNC33)(□),  
 $mpk1cnb1$  (TNP36)(■)

15-3 CNはMAPキナーゼカスケードと共通のプロセスに関わるか。

これまでの結果からCNがMAPキナーゼカスケードと同じ細胞内プロセスに関わる可能性が示唆された。もしそうであるならばどちらかの系路を活性化したときにもう一方の経路の欠損による形質を抑圧するはずである。実際にそれについて調べてみた。CNとMpk1の二重変異株は強い増殖阻害を起こしたので、この2つの経路は通常の増殖に必要なプロセスに関わっている可能性が考えられる。しかしながらCNを欠損させても通常の増殖に対して大きな表現形は得られないので、 $mpk1$ 株について調べてみた。図30Bに示すようにCNを高発現すると $mpk1$ 株の30°Cでのslow growthを部分的に抑圧することがわかった。同様の結果は $mpk1$ 株の代わりに $bck1$ 株を用いても得られた(図30A)。またこのとき先に述べた $mpk1$ 株にみられる異常な形をした細胞の割合がCNの高発現によって減少することもわかった(図30C)。以上の結果からCNとMAPキナーゼカスケードは細胞の増殖に必要な共通のプロセスに関わっていることが明らかになった。



*bck1* with YEp24 (1)  
 YEpCMP2CNB1 (2)  
 YEpBCK1 (3)

*mpk1* with YEp24 (4)  
 YEpCMP2CNB1 (5)  
 pTNM1 (6)

図30 CNの高発現により *mpk1*株 (*bck1*株) の形質は抑圧される。

(A:30°Cにおけるslow growth, B: 異常な形をした細胞の割合、詳しくは13-3-5に示した。使用菌株*bck1* (TNC3), *mpk1* (TNC33))

#### 15-4 グルカン合成系との関わり

メルクのParentらはFK506に超感受性になる変異株として*fks1*を取得している(84)。解析の結果、FKS1は細胞壁の主成分であるグルカンを合成する酵素 $\beta$ -1,3グルカンシターゼをコードしていることがわかった(74)(84)(85)(86)。またこの遺伝子と非常に相同性の高い同じ酵素をコードする遺伝子FKS2も取得された(74)(87)。このFKS2の転写がCNによって調節されていることも示している(87)。彼らはFKS1の欠損がFK506に感受性になることを次のように説明している。FKS1とFKS2の欠損は合成致死となる。FKS2の転写はCNに大きく依存しておりCN欠損株ではFKS2はほとんど転写されない。細胞にFK506を作用させるとCNが働かなくなり、*fks1*株では $\beta$ -1,3グルカンが全く合成されなくなり、死に至る。

Mpk1は細胞壁の構築に関わっていることが知られているので、ここで強く考えられるのは、Mpk1がFKS1の転写、あるいは活性調節をしており、それによりCN欠損と合成

的な増殖阻害が起こるといいう可能性である。そこで実際に *mpk1* 株における *FKS1*, *FKS2* の転写量の変化について調べてみることにした。図31に示すように *mpk1*, *bck1*, *cnb1* 株において *FKS1* の転写量が野生株に比べてほとんど差がなかった。また *fks2mpk1*, *fks2bck1* 株が正常に増殖すること、*fks1mpk1*, *fks1bck1* が合成致死になったこと、及び、*mpk1fks2* 株においても *mpk1* 由来の slow growth, ts 性は  $Ca^{2+}$  によって抑圧されることから (データ不示)、Fks1 は Mpk1 によって制御されていない可能性が強く示唆される。Fks の系はこの MAP キナーゼカスケードと CN が関わっているプロセスとは直接には関係ないようである。

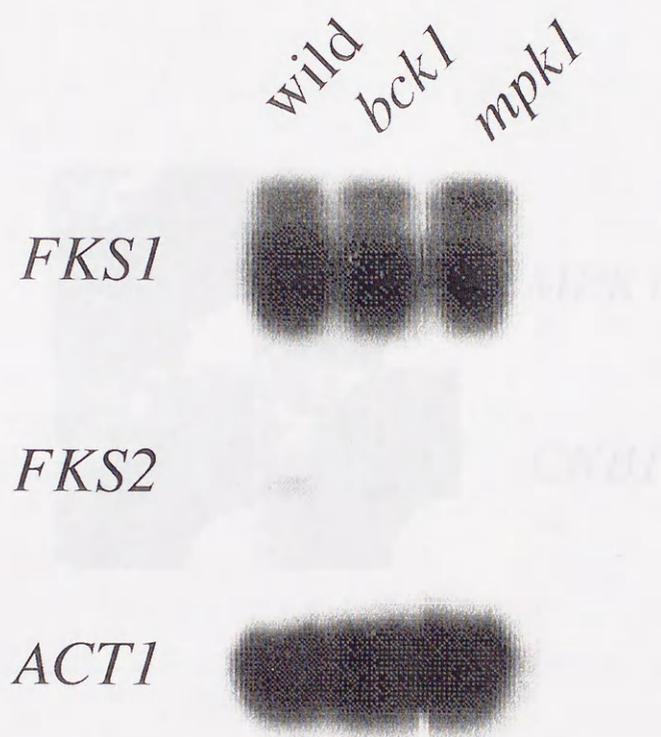


図31 *mpk1* 株においても *FKS1*, *FKS2* の転写量は変化しない。  
(用いた細胞は図27のものと同じ)

15-5  $\alpha$ -factorによる停止からの復帰における両情報伝達系の関係

先にも述べたように、*crv2*, *crv3*変異株は $\alpha$ -factorに対して強いdefectを示し、G1期停止からの復帰（以後リカバリーと略す）ができなかった。よってリカバリーに関しても両情報伝達系が関与している可能性が考えられる。その可能性について調べてみた。図33に示すようにMPK1を高発現するとCN欠損株のリカバリーできない形質を抑圧できることがわかった。これによりこのプロセスに関してもこの2つの情報伝達系が関与していることがわかった。しかしながらBCK1の高発現、BCK1の優性活性化型変異BCK1-20<sup>(76)</sup>を導入してもこの形質の抑圧はみられなかった。この原因については考察でふれる。

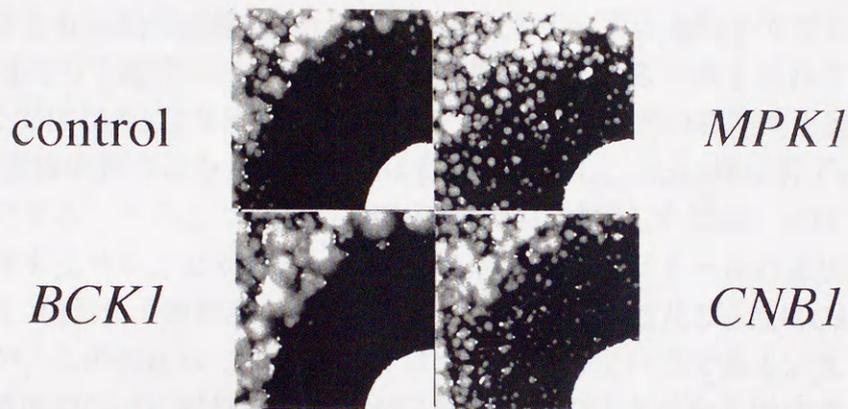


図33 MPK1を高発現するとCNのリカバリーできない形質を抑圧できる  
(用いた細胞は図27のものと同じ)

## 第16節 考察

CNは多くの遺伝子とともに細胞のプロセスに関与しているものと思われる。「CNの周辺で働く遺伝子に変異が入るとその変異株はCN欠損株に類似した形質をもつであろう。」という仮定を元にCN欠損株と類似した形質をもつ変異株の取得を試みた。1stスクリーニングはポジティブセレクションの可能なCa<sup>2+</sup>耐性を用いた。そのような株の中から同時にNa<sup>+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, バナジン酸感受性などを示す変異株を取得した。このような変異株は103個得られたが、すべてバナジン酸感受性になったため、*crv* (Calcium Resistant and Vanadate sensitive)と命名した。*crv*変異株は4つの相補性グループに分かれたが、*crv1*はCN調節サブユニット遺伝子*CNB1*由来であった。*crv2*, *crv3*はバナジン酸の他にNa<sup>+</sup>, Mn<sup>2+</sup>にも感受性を示し、また $\alpha$ -factorによるG1期停止からの復帰ができなかったことなどCN欠損株の形質を多く持つことから(図24, 表2)、*CRV2*, *CRV3*はCNと深く関わっている可能性が示唆されたのでこの遺伝子の取得を試みた。遺伝子を取得し、塩基配列を決定した結果、*CRV2*は*BCK1*、*CRV3*は*MPK1*をコードしていることがわかった。これらはともに動物細胞のMAPキナーゼカスケードの遺伝子でプロテインキナーゼCホモログPkc1の下流で主に細胞壁の構築に関与していると考えられている<sup>(76)(78)</sup>。

そこではじめにCNとこのMAPキナーゼカスケードの関連性を遺伝学的に調べてみた。CN欠損株単独ではなんら増殖には影響はないし、*mpk1*株は若干slow growthながら十分増殖できる。この2つの系の遺伝子を同時に破壊した場合、30°Cで細胞は非常に強い増殖阻害を受けることがわかった。この形質はソルビトールの添加によりほぼ完全に抑圧された(図27)。興味深いのは*mpk1*株のslow growth及びts性はCa<sup>2+</sup>の添加により抑圧されるが、この抑圧は二重変異株では全く起こらない点である。またCN欠損株、*mpk1*株は高濃度のCa<sup>2+</sup>に耐性になったが二重変異株では逆に全く増殖できなかった。また*mpk1*株は30°Cにおいて一定の割合で異常な形をした細胞が現れることが知られているが、このとき二重変異株はこのような細胞が劇的に増加していることがわかった(図28, 29)。この形質もソルビトールの添加によって抑圧された。また、CNを高発現すると*mpk1*株のslow growthを一部抑圧できることがわかった(図30)。このような結果から、CNはMAPキナーゼカスケードとともに通常の増殖及び細胞形態の維持に必要な共通のプロセスに関わっていることが示唆された(図34)。

この系においては二重変異株において形質が合成的であったのでこの2つの経路はパラレルに働き、MAPキナーゼカスケードはメジャーな系路、CNはそれに補助的に働くマイナーな系路であると考えられる。またCNは培地中にCa<sup>2+</sup>を添加することによって活性化されるが<sup>(88)(89)</sup>、*mpk1*株の形質の一部(slow growth, ts)がCa<sup>2+</sup>の添加によって抑圧されるのはCNの系が活性化されるためではないかと考えられる。二重変異株の形質がCa<sup>2+</sup>の添加により抑圧されないのはそのためではないかと考えられる。それではこの「通常の増殖に重要なプロセス」とはいったい何であろうか。Mpk1はPkc1の下流で細胞壁の構築に関わる考えられている。これまで細胞壁の構築に対してMpk1で知られている役割は細胞壁の主要成分のキチンの局在に関わっていることである。細胞壁は細胞内の浸透圧を調節するのに重要な働きをしているので、壁の欠損は培地中に浸透圧保護剤(ソルビトール)を添加することによって補うことができる。*mpk1*株のslow growth,

ts性、二重変異株のgrowth defect及び細胞形態の異常はソルビトールの添加によって補えること、CNの欠損はmpk1株の形質を強める方向に働いていることからこのプロセスは細胞壁の構築ではないかと考えられる。

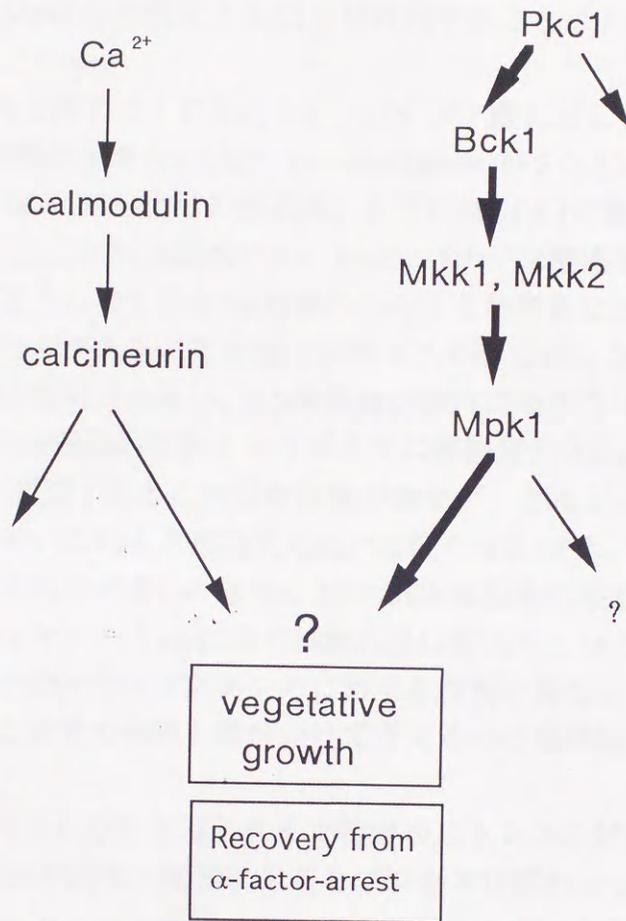


図34 CNとMAPキナーゼカスケードの関係予想図

メルクのParentらはFK506に超感受性になる変異株として*fks1*を取得している。解析の結果、*FKS1*は細胞壁の主成分であるグルカン合成する酵素β-1,3グルカンシターゼをコードしていることがわかった<sup>(74)(85)(86)</sup>。Mpk1が*Fks1*の機能を制御していると考えれば、先に述べた2つの経路の関わる「共通のプロセス」が明らかになるが、①*mpk1*株で*FKS1*の転写量は野生株と比べて変化しないこと ②*fks2mpk1*は正常に増殖すること ③*fks1mpk1*は合成致死になること このような結果から*Fks1*はMpk1によっては制御されていない可能性が高いと考えられる。さらにMPK1は細胞壁のβ-1,6グルカンシターゼをコードする*KRE6*とも合成致死になることが知られており<sup>(90)</sup>、この系がこれら細胞壁の構築には関係しているがそれがβ-1,3グルカンの合成系ではないことが示唆される。

その他の形質についてであるが、リカバリーの系に関しても両伝達系が関わっている

ことが明らかになった。この系が先に述べた通常の増殖の系と同様なものであるかどうかはわからないがリカバリーの際に必要な劇的な細胞壁の変化の際にCNが必要であると考えれば同様のメカニズムであるといっても説明できる。また先に示したようにMpk1の高発現によりCN欠損株のリカバリーできない形質を抑圧できたが、Bck1の高発現や優性活性化型変異であるBck1-20では抑圧できなかった。これについてはMpk1を高発現することによるMpk1の活性化とBck1を活性化することによるMpk1の活性化では意味が違うものと考えている。

*mpk1*株はCN欠損株と同じように $\text{Na}^+$ 、 $\text{Mn}^{2+}$ 、バナジン酸に対して感受性を示したが、このほかにもCN欠損株が示さない $\text{Mg}^{2+}$ 、cycloheximide、TFPなどに対しても同様に感受性となる(表2)。またMPK1やBCK1の高発現、あるいはBCK1の優性活性化型変異であるBCK1-20などを導入してもCN欠損株の $\text{Na}^+$ 、 $\text{Mn}^{2+}$ 、バナジン酸感受性を抑圧することができなかった。このようなことから*mpk1*株のこのような形質は細胞壁の欠損などによって透過性が上昇したためであることが強く示唆される。しかしながらこの理由であれば両欠損株の $\text{Ca}^{2+}$ 耐性は説明できない。CN欠損株が耐性になるのは次のような理由が考えられている<sup>(91)</sup>。CNは細胞内のあるオルガネラに細胞質から $\text{Ca}^{2+}$ を能動輸送する系を抑制している。CNが欠損するとこの抑制機構が働かず、どんどん $\text{Ca}^{2+}$ がこのコンパートメントに輸送される。このとき細胞質の $\text{Ca}^{2+}$ は低くなるので、 $\text{Ca}^{2+}$ 耐性になる。preliminaryな結果ではあるが高 $\text{Ca}^{2+}$ 培地におけるCN欠損株の細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 含量は野生株に比べてかなり大きかった。一方*mpk1*株の細胞内量は野生株とほとんど差がなかった。これにより両伝達系の $\text{Ca}^{2+}$ ホメオスタシスに対する役割は異なっていると考えられる。 $\text{Ca}^{2+}$ ホメオスタシスと通常の増殖を結びつけて考えるのは現段階ではかなり困難であると考えられる。

しかしながら今回得られた結果はこれまで特定のストレスに対応するときのみ必要であると思われていたCNが通常の増殖に必要なプロセスに関わっていること、その際にMAPキナーゼカスケードという動物細胞に高く保存されている非常に重要な系とクロストークしているという非常に重要な知見が得られた。具体的に両伝達系がどのようなプロセスに関与しているのかを明らかにするためには、ターゲット遺伝子の取得が重要であろう。

## 総括

1つの発見がその研究を大きく発展させることはしばしば見られる。1989年Liuらは免疫抑制剤FK506の結合タンパクFKBPにインターラクトするタンパク質の精製を行いそのタンパク質がCNであることを示した<sup>(17)</sup>。この発見により免疫の情報伝達 (T-cell Receptorからリンホカインの発現を制御する情報伝達系)、免疫抑制機構を解明する上で非常に重要な知見が得られた。またCN自身の研究から考えると間接的ではあるが低分子の活性阻害剤が発見されたことから特に生理学的研究が大きく発展するようになった。

CNが最初に発見されたのは今から約15年前のことである<sup>(92)</sup>。それから他のPPaseと同じように代謝系を中心に研究が行われていた。これらの研究の中でCNは、 $Ca^{2+}/CaM$ によってその活性が制御されていること、脳神経系に多く含まれていること、他のPPaseに比べて基質特異性が高いこと、などがわかってきた<sup>(14)</sup>。しかしながらPPaseの研究はその基質特異性が低く、基質を同定することが困難であり生化学的研究が発展しなかったことや、華やかなPKase (protein kinase)の研究の陰に隠れて、同じリン酸化に関わる酵素でありながらその注目度は今一つであった。PPaseのcDNAがクローニングされその分子が得られたこと<sup>(93)</sup>、PPaseの阻害剤 (1型、2A型) オカダ酸が発見され<sup>(94)</sup> 生理学的解析が進んだこと、分裂酵母においてPPaseが細胞周期で非常に重要な働きをしていることがわかったこと<sup>(95)(96)</sup>などからPPaseの存在は一気に注目されるようになった。

出芽酵母においてもその後多くのPPase遺伝子が取得されその解析が行われた。その結果動物細胞において報告されたPPaseのほとんどのタイプが酵母に存在すること<sup>(37)(97)(98)(99)(100)</sup>、それぞれのサブタイプの遺伝子を破壊すると細胞は致死になることなどがわかった<sup>(97)(98)(99)</sup>。さまざまな研究から細胞内で重要な働きを果たしていることが明らかにされてきた。しかしながら2B型のPPase (カルシニューリン: CN) 遺伝子 *CMP1*, *CMP2*は破壊しても重大な形質はみられなかった<sup>(9)(11)(39)</sup>。この結果から予想されることは①酵母CNは細胞にとって重要ではない。② *CMP1*, *CMP2*以外のCN遺伝子が存在し、その遺伝子が *CMP1*, *CMP2*の役割を補っている。などが考えられる。

本研究はこれを明らかにすることから始まった。まず②の可能性について調べるため、細胞からCNを部分精製し、その活性を調べたところ動物細胞のものと同じように  $Ca^{2+}/CaM$ によって活性化され、オカダ酸非感受性のCN活性が見いだされた。*CMP1*, *CMP2*破壊株ではこの活性が見いだされなかったことから生化学的には酵母においてCNをコードする遺伝子は *CMP1*, *CMP2*のみであることがわかった。よってCNは細胞の生育には重要ではないことがわかった (第1章)。しかしながら直接生育には関係なくても細胞にとって重要なイベントも存在するのでCN欠損株の形質について細かく調べてみたところ、この株は  $Na^+$ に対して感受性を示すことが明らかにされた<sup>(40)</sup>。細胞内のイオン濃度を測定した結果、CNは細胞内で排出系の制御を中心として  $Na^+$ の恒常性維持に関わっていることが明らかになった。このときFK506を作用させると野生株はCN欠損株と同じような兆候を示したことからこの系に関してもFK506がCNに作用することが明らかになった (第2章)。それでは具体的にCNはどのようにこの系に関わっているのでしょうか? 最近、Mendozaらは  $Na^+$ 感受性変異株の一つとして *cnb1*変異株を取得し、

その解析を行ったところ、 $\text{Na}^+$ -ATPaseとして働くと思われる *ENA1/PMR2* の転写が CN によって行われていることを示した<sup>(56)</sup>。当研究室においてもこの遺伝子は CN 欠損株の  $\text{Na}^+$  感受性を多コピーで相補する遺伝子として取得され、その発現が CN と cAMP 系によって制御されることが示された<sup>(41)(52)(101)</sup>。第2章でも示したように CN はこの遺伝子の他にもターゲットを持っている。CN は複数のタンパク質を同時に制御することにより、 $\text{Na}^+$  ホメオスタシスに関わっているものと考えられる。

多コピーサプレッサーによりある遺伝子の下流で働く遺伝子を取得する方法にはいくつかの欠点がある。たとえば複数のサブユニットからなり、さらにそのサブユニットがすべてそろわないと活性をもたないようなタンパクの場合、1プラスミドに1遺伝子しかのっていない多コピーライブラリーからは取得できない。またある遺伝子が下流遺伝子の活性を100%近く制御しているような場合、多コピープラスミドによって量的に増やしても「ある遺伝子」が存在しないと活性化されないのでこの手法では取得ができない。

(この場合、「ある遺伝子」の活性が部分的にでも残っている必要がある。)

$\text{Na}^+/\text{Li}^+$  感受性の時も<sup>(41)(52)</sup>、バナジン酸感受性の時もターゲット遺伝子すべてが取得できなかったのはその可能性が高いと考えられる。

そのような欠点を補うためには CN 欠損株と類似した形質をもつ変異株を取得し、その解析を行うのも1つの方法である。第4章で示した実験はそのような経緯で行った。CN 欠損株に類似した形質を示した *crv* 変異株のうち、*crv2*, *crv3* は MAP キナーゼカスケード由来のものであった。この経路はこれまで細胞壁の構築に関わっていると考えられており高温で細胞が溶解するなどの形質を持っている。今回、この経路の欠損によりイオン等に感受性になることなど新しい形質が見いだされた。しかしながら MAP キナーゼカスケードがイオンのホメオスタシスに関わっているかどうかは疑問である。なぜならこの経路に欠損により  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  だけでなく  $\text{Mg}^{2+}$  など CN 欠損株が感受性にならないイオン、また cycloheximide をはじめとするさまざまな薬剤に対しても感受性を示すからである。*mpk1* 株は細胞壁の構造が野生株に比べて弱いので、薬剤やイオンの透過性が野生株に比べて高くなり、感受性になると考えた方が良さそうである。しかしながら CN が特殊なストレスに対してのみ働いているのではなく、補助的にはあるが通常の増殖に必要なプロセスに関わっているという知見は非常に重要である。さらに最近 CN と合成致死となる遺伝子として *VMA3* (液胞  $\text{H}^+$  ATPase) も報告され CN が通常の増殖に対しても様々な系で働いている可能性が示唆された<sup>(91)(102)</sup>。また動物細胞においても IL-2 の転写においてホルボールエステル (PKase C を活性化) する系と CN によって制御する系が関わっていることが最近明らかになった<sup>(103)</sup>。今回の結果により酵母においてもこの2つの重要な系が関わっていることが明らかになった。

酵母において CN の細胞内の機能は次のように予想される。CN はこれまで  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  などのイオンのホメオスタシス、バナジン酸耐性、通常の増殖、 $\alpha$ -factor による停止からのリカバリーなどの関わっていることが明らかになっている。これまで当研究室で得られたそれぞれの形質の多コピーサプレッサーがその他の形質を抑圧できなかったことや、*crv* 変異の中に CN の基質と思われる遺伝子が含まれなかったことから、CN が関わるプロセスは少なくとも CN の下流では別々の経路ではたらし、CN は多くの別の系で

働く基質をもつと考えられる。PPaseの数は同じリン酸化反応に関わるPKaseに比べて非常に種類が少ない。PPaseの基質特異性がPKaseに比べて甘いことからPPaseは複数のPKaseの基質を脱リン酸化していると思われる。CNの場合も例外に漏れず多くの基質を持っていると考えられる。先に示した多くのプロセスに対して働く専任のPKaseが存在し、その逆反応行うことによりその系の制御に関わっていると考えられる (図35)。

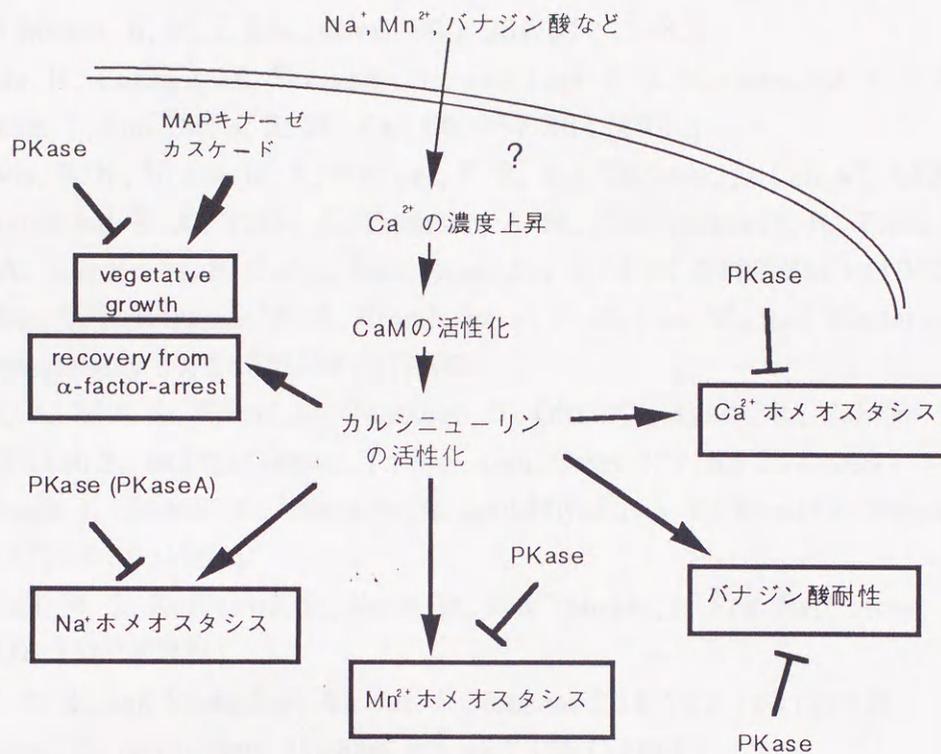


図35 酵母CNの細胞内機能予想図

しかしながらここで大きな疑問が浮かび上がる。それは「複数の細胞外情報に対してCNはどのように対応しているのか」というものである。Na<sup>+</sup>とMn<sup>2+</sup>の場合、CNの活性化に至るまでの経路は同じなのかあるいは異なるのか。複数の情報が一つのセカンドメッセンジャーや1つの酵素によって制御されている場合、それぞれの情報に対応するための系路のみをどのように起動させるのであろうか。動物細胞においてもいくつかのサイトカインがCa<sup>2+</sup>をセカンドメッセンジャーとしていることが知られているが、同じCa<sup>2+</sup>情報でそれぞれ異なる対応をするメカニズムの解明は未解決のままである。

現在、我々はNa<sup>+</sup>、Mn<sup>2+</sup>の2つの形質に絞って、それぞれの感受性変異株を取得している(89)(104)。それぞれの経路についてCNを中心に解析し、この2つのストレス対応のメカニズムにおいて、どこが重複し、またどこが異なるのかを明らかにすることができればこの疑問を解く大きな手がかりが得られることになるであろう。

参考論文

- 1, Berridge, M. J., and Irvine, R. F.: *Nature* 312, 315-321 (1984)
- 2, Munnjaal, R. P., Chandra, T., Woo, S. L., Dedman, J. R., and Means, A. R.  
*Pro. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 2330-2334 (1981)
- 3, Simmen, R. C. M., Tanaka, T., Ts' ui, K. F., Putkey, J. A., Scott, M. J., Lai, E. C.,  
and Means, A. R.: *J. Biol. Chem.* 260, 907-912 (1985)
- 4, Toda, H., Yazawa, M., Sakiyama, F., and Yagi, K.: *J. Biochem.* 98, 833-842 (1985)
- 5, Braam, J., and Davis, R. W.: *Cell* 60, 357-364 (1990)
- 6, Davis, T. N., Urdea, M. S., Masiarz, F. R., and Thorner, J.: *Cell* 47, 423-431 (1986)
- 7, Blumenthal, D. K., Takio, K., Edelman, A. M., Charobonneau, H., Titani, K., Walsh,  
K. A., and Krebs, E. G.: *Pro. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 3187-3191 (1985)
- 8, Lukas, T. J., Burgess, W. H., Prendergasst, F. G., Lau, W., and Watterson, D. M.:  
*Biochemistry* 25, 1458-1464 (1986)
- 9, Liu, Y., Ishii, S., Tokai, M., Tsutsumi, H., Ohki, O., Akada, R., Tanaka, K., Tsuchiya,  
E., Fukui, S., and Miyakawa, T.: *Mol. Gen. Genet* 227, 52-59 (1991)
- 10, Hiraga, K., Suzuki, K., Tsuchiya, E., and Miyakawa, T.: *Biochim. Biophys. Acta*  
1177, 25-30 (1993)
- 11, Cyert, M. S., Kunisawa, R., Kaim, D., and Thorner, J.: *Pro. Natl. Acad. Sci. USA* 88,  
7376-7380 (1991)
- 12, Ye, R. R., and Bretscher, A.: *Eur. J. Biochem.* 204, 713-723 (1992)
- 13, Cohen, P.: *Annu. Rev. Biochem.* 58, 453-508 (1989)
- 14, Klee, C. B., Draetta, G. F., and Hubbard, M. J.: *Adv. Enzymol.* 61, 149-200 (1988)
- 15, Matsui, H., Pallen, C. J., Wang, J. H., and Lam, P. H. Y.: *J. Biol. Chem.* 260, 4174  
(1985)
- 16, Ingebritsen, T. S., and Cohen, P.: *Eur. J. Biochem.* 132, 255 (1983)
- 17, Liu, J., Farmer, J. D., Jr., Lane, W. L., Friedman, J., Weissman, I., and  
Schreiber, S. L.: *Cell* 66, 807-815 (1991)
- 18, Liu, J.: *Immunol. Today* 14, 290-295 (1993)
- 19, Tanaka, K., Matsumoto, K., and Toh-e, A.: *Mol. Cell. Biol.* 9, 757-768 (1989)
- 20, Jones, E. W.
- 21, Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T.: *Molecular cloning: a laboratory  
manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New  
York (1989)
- 22, 野島博 遺伝子工学ハンドブック 48-51
- 23, Gopalakrishara, R., and Anderson, W. B.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 104,  
830-836 (1982)
- 24, 矢沢道生 生化学55, 370-383 (1983)
- 25, 村上茂 卒業論文 (1990)

- 26, Burnette, W. N.: *Anal. Biochem.* 112, 195-203 (1981)
- 27, Graf, E., Filoteo, A. G., and Penniston, J. T.: *Arch. Biochem. Biophys.* 203, 717-726 (1980)
- 28, Slaughter, G. R., and Means, A. R.: *Meth. in Enz.* 139, 433-444 (1987)
- 29, McCusker, J. H., Perlin, D. S., and Haber, J. E.: *Mol. Cell. Biol.* 11, 4082-4088 (1987)
- 30, 田原秀隆 卒業論文 (1990)
- 31, 平賀和三 博士論文 (1993)
- 32, Lowry, O. H., Rosebrough, N. T., Farr, A. L., and Randall, R. J.: *J. Biol. Chem.* 193, 265-273 (1951)
- 33, Cohen, P., Klumpper, S., and Schelling, D. L.: *FEBS Lett.* 250, 596-600 (1989)
- 34, Klee, C. B., Krinks, M. H., Manalan, A. S., Cohen, P., and Stewart, A. A.: *Meth. In. Enz.* 102, 227-244 (1983)
- 35, Stewart, A. A., Ingebriksen, T. T., and Cohen, P.: *Eur. J. Biochem.* 132, 289-295 (1983)
- 36, Yokoyama, N., and Wang, J. H.: *J. Biol. Chem.* 266, 14822-14829 (1991)
- 37, Cohen, P., Schelling, D. L., and Stark, J. R.: *FEBS Lett.* 250, 601-606 (1989)
- 38, Kuno, T., Tanaka, H., Mukai, H., Chang, C. D., Hiraga, K., Miyakawa, T., and Tanaka, C.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1159-1163 (1991)
- 39, Cyert, M. S., and Thorner, J.: *Mol. Cell. Biol.* 12, 3460-3469 (1992)
- 40, 渡海雅也 修士論文 (1991)
- 41, 難波宏光 修士論文 (1994)
- 42, Gaoxiola, R., Larrinoa, I. F., Villalba, J. M., and Serrano, R.: *EMBO J.* 11, 3157-3164 (1992)
- 43, 加藤和夫、宮崎浩 等速電気泳動法 講談社 (1980)
- 44, 田中善正 分析化学Ⅱ 南江堂 (1982)
- 45, Foor, F., Parent, S. A., Morin, N., Dahl, A. M., Ramadon, N., Chrebet, G., Bostian, K. A., and Nielsen, J. B.: *Nature* 360, 682-684 (1992)
- 46, 平田大 私信
- 47, Wiederrecht, G., Brizuela, L., Elliston, K., Sigal, N. H., and Siekierka, J. J.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 1029-1033 (1991)
- 48, Heitman, J., Movva, N. R., Hiestand, P. C., and Hall, M. N.: *Pro. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 1948-1952 (1991)
- 49, Koltin, Y., Faucette, L., Bergsma, D. J., Levy, M. A., Cafferkey, R., Koser, P. L., Johnson, R. K., and Livi, G. P.: *Mol. Cell. Biol.* 11, 1718-1723 (1991)
- 50, Rodriguez-Navarro, A., and Ortega, M. D.: *FEBS Lett.* 138, 205-208 (1982)
- 51, Jia, Z. P., McCullough, N., Martel, R., Hemmingsen., and Young, P. G.: *EMBO J.* 11, 1631-1640 (1992)
- 52, 原田伸一 修士論文 (1995)

- 53, Haro, R., Garcíadeblas, B., and Rodríguez-Navarro, A.: *FEBS Lett.* 291, 189-191 (1991)
- 54, Rudolph, H. K., Antebi, A., Fink, G. R., Buckley, C. M., Dorman, T. E., LeVitre, J., Davidow, L. S., Mao, J., and Moir, D. T.: *Cell* 58, 133-145 (1989)
- 55, Garcíadeblas, B., Rubio, F., Quintero, F. J., Banueios, M. A., Haro, R., and Rodríguez-Navarro, A.: *Mol. Gen. Genet.* 236, 363-368 (1993)
- 56, Mendoza, I., Rubio, F., Rodríguez-Navarro, A., Pardo, J. M.: *J. Biol. Chem.* 269, 8792-8796 (1994)
- 57, 原田伸一 私信
- 58, Ferrando, A., Kron, S. J., Rios, G., Fink, G. R., and Serrano, R.: submitted
- 59, 二見英揚 卒業論文 (1992)
- 60, Cantley, L. C., Jr., Cantley, L. C., and Josephson, L.: *J. Biol. Chem.* 253, 7361-7368 (1978)
- 61, Swarup, G., Cohen, S., and Garbers, D.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 107, 1104-1109 (1982)
- 62, 劉玉森 博士論文 (1991)
- 63, Sherman, F., Fink, G. R., and Hicks, J. B.: *Method in yeast genetics* (1986)
- 64, Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K., and Kimura, A.: *J. Bacteriol.* 153, 163-168 (1983)
- 65, 田口宣久 修士論文 (1991)
- 66, Southern, E. M.: *J. Mol. Biol.* 98, 503-517 (1975)
- 67, Schmitt, M. E., Brown, T. A., and Trumppower, B. L.: *Nucleic Acid Res.* 18, 3091-3092 (1990)
- 68, Maniatis, T., Fritsch, E. F., and Sambrook, J.: *Molecular cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1982)
- 69, 難波宏光 卒業論文 (1992)
- 70, Kramer, W., Kramer, B., Williamson, M. S., and Fogel, S.: *J. Bacteriol.* 171, 5339-5346 (1986)
- 71, Kyte, J., and Doolittle, R. F.: *J. Mol. Biol.* 157, 105-132 (1982)
- 72, Heijne, G.: *J. Mol. Biol.* 184, 99-105 (1985)
- 73, 大本朋良 研究論文 (1995)
- 74, Inoue, S. B., Takewaki, N., Takasuka, T., Mio, T., Adachi, M., Fujii, Y., Miyamoto, C., Arisawa, M., Furuichi, Y., and Watanabe, T.: *Eur. J. Biochem.* 231, 845-854 (1995)
- 75, Irie, K., Takase, M., Lee, K. S., Levin, D. E., Araki, H., Matsumoto, K., and Oshima, Y.: *Mol. Cell. Biol.* 13, 3076-3083 (1993)
- 76, Lee, K. S., and Levin, D. E.: *Mol. Cell. Biol.* 12, 172-182 (1992)
- 77, Cardenas, M. E., Hemenway, C., Muir, R. S., Ye, R., Fiorentino, D., and Heitman, J.: *EMBO J.* 13, 5944-5957 (1994)
- 78, Lee, K. S., Irie, K., Gotoh, Y., Watanabe, Y., Araki, H., Nishida, E., Matsumoto, K.,

- and Levin, D. E.: *Mol. Cell. Biol.* 13, 3067-3075 (1993)
- 79, Torres, L., Martin, H., Garcia-Saez, M. I., Arroyo, J., Molina, M., Sanchez, M., and Nombela, C.: *Mol. Microbiol.* 5, 2845-2854 (1991)
- 80, Fields, F. O., and Thorner, J.: *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 56, 51-60 (1991)
- 81, Costigan, C., Gehrung, S., and Snyder, M.: *Mol. Cell. Biol.* 12, 1162-1178 (1992)
- 82, Irie, K., Araki, H., and Oshima, Y.: *Gene* 108, 139-144 (1991)
- 83, Levin, D. E., Fields, F. O., Kunisawa, R., Bishop, J. M., and Thorner, J.: *Cell* 62, 213-224 (1990)
- 84, Mazzoni, C., Zarzov, P., Rambourg, A., and Mann, C.: *J. Cell. Biol.* 123, 1821-1833 (1993)
- 85, Parent, S. A., Nielsen, J. B., Morin, N., Chrebet, G., Ramadan, N., Dahl, A. M., Hsu, H.-J., Bostian, K. A., and Foor, F.: *J. Gen. Microbiol.* 139, 2973-2984 (1993)
- 86, Douglas, C. M., Foor, F., Marrinan, J. A., Morin, N., Nielsen, J. B., Dahl, A. M., Mazur, P., Baginsky, W., Li, W., El-Sherbeini, M., Clemas, J. A., Mandala, S. M., Frommer, B. R., and Kurtz, M. B.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 12907-12911 (1994)
- 87, Eng, W.-K., Faucette, L., McLaughlin, Cafferkey, R., Koltin, Y., Morris, R. A., Young, P. R., Johnson, R. K., and Livi, G. P.: *Gene* 151, 61-71 (1994)
- 88, Mazur, P., Morin, N., Baginsky, W., El-Sherbeini, M., Clemas, J. A., Nielsen, J. B., and Foor, F.: *Mol. Cell. Biol.* 15, 5671-5681 (1995)
- 89, unpublished data
- 90, Roemer, T., Paravicini, G., Payton, M. A., and Bussey, H.: *J. Cell. Biol.* 127, 567-579 (1994)
- 91, Tanida, I., Hasegawa, A., Iida, H., Ohya, Y., and Anraku, Y.: *J. Biol. Chem.* 270, 10113-10119 (1995)
- 92, Wallace, R. W., Lynch, T. J., Tallant, E. A., and Cheung, W. Y.: *J. Biol. Chem.* 254, 377-382 (1978)
- 93, Cohen, P. T. W.: *FEBS Lett.* 232, 17-23 (1988)
- 94, Takai, A., Bialojan, C., Troschka, M., and Ruegg, J. C.: *FEBS Lett.* 217, 81-84 (1987)
- 95, Ohkura, H., Kinoshita, N., Miyatani, S., Toda, T., and Yanagida, M.: *Cell* 57, 997-1007 (1989)
- 96, Kinoshita, N., Ohkura, H., and Yanagida, M.: *Cell* 63, 405-415 (1990)
- 97, Feng, Z., Wilson, S. E., Peng, Z.-Y., Schlender, K. K., Reimann, E. M., and Trumbly, R. J.: *J. Biol. Chem.* 266, 23796-23801 (1991)
- 98, Sneddon, A. A., Cohen, P. T. W., and Stark, J. R.: *EMBO J.* 9, 4339-4346 (1990)
- 99, Ronne, H., Carlberg, M., Hu, G. Z., and Nehlin, J. O.: *Mol. Cell. Biol.* 11, 4876-4884 (1991)

- 100, Maeda, T., Tsai, A. Y. M., Saito, H.: *Mol. Cell. Biol.* 13, 5408-5417 (1993)
- 101, Hirata, D., Harada, S., Namba, H., and Miyakawa, T.: *Mol. Gen. Genet.* in press
- 102, Garrett-Engle, P., Moilanen, B., and Cyert, M. S.: *Mol. Cell. Biol.* 15, 4103-4114 (1995)
- 103, Frantz, B., Nordby, E. C., Bren, G., Steffan, N., Paya, C. V., Kincaid, R. L., Tocci, M. J., O'Neill, E. A.: *EMBO J.* 13, 861-870 (1994)
- 104, 水沼正樹 卒業論文 (1996)

## 謝辞

本研究は生物物理化学研究室のスタッフを始め多くのみなさんのご協力と指導のもとに行われました。

本研究を遂行するに当たり、終始親切かつ適切なご指導を賜りました生物物理化学研究室教授宮川都吉先生、助教授土屋英子先生、助手劉玉森先生、平田大先生、工業微生物学教授山田隆先生に深く感謝致します。

また第1章で動物実験を指導してくださいました生物生産学部の前田先生、CN精製のアドバイスをいただいた神戸大学医学部の久野高義先生、第2章で等速電気泳動装置をお貸しいただき、またご指導くださいました機器分析研究室の広川健先生、研究をご指導していただいた石井悟さん、渡海雅也さん、堤浩子さん、研究に協力してくださった大本朋良君、難波宏光君、原田伸一君、荻野剛君、Ileana Farcasanuさん、山口裕司君、水沼正樹君に感謝します。また第3章で抗HA抗体を供与してくださいました大阪大学医学部の田中一馬先生、第4章でYE<sub>p</sub>BCK1, YC<sub>p</sub>BCK1-20プラスミドを供与してくださいました名古屋大学理学部の松本邦宏先生、入江賢児先生、FKS1/GSC1, FKS2/GSC2の多コピー、及び破壊用プラスミドを供与してくださいました井上俊介さんをはじめ日本ロシユ抗真菌部のみなさんに感謝します。

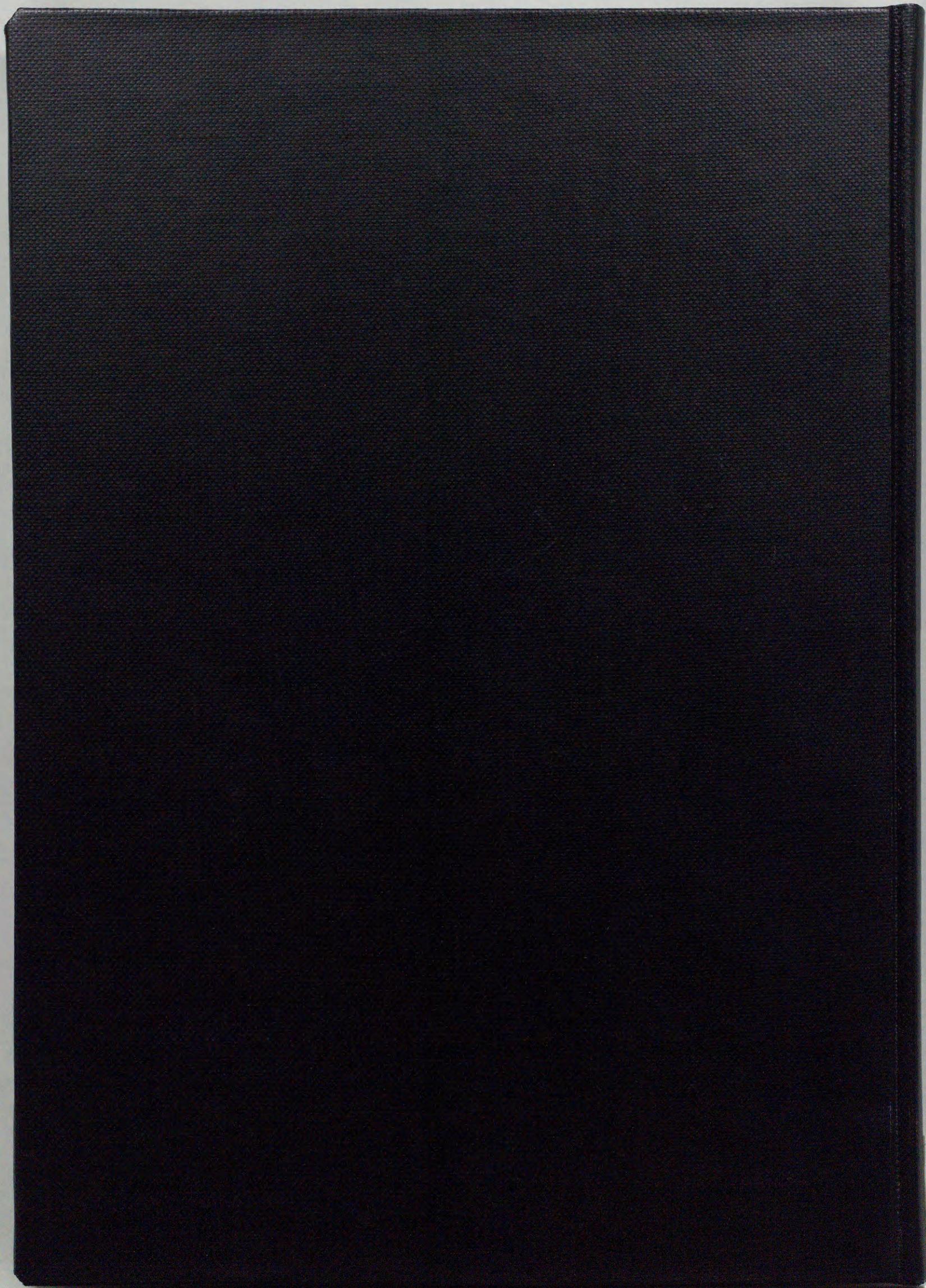
最後に学生生活を共にし、日夜研究に励んだ生物物理化学研究室の諸先輩方、同輩、後輩のみなさんに感謝します。

## 公表論文

1. Nakamura, T., Tsutsumi, H., Mukai, H., Kuno, T., and Miyakawa, T.  
Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-activated protein phosphatase (PP2B) of *Saccharomyces cerevisiae*.  
*FEBS Lett.* 309, 103-106 (1992)
2. Nakamura, T., Liu, Y., Hirata, D., Namba, H., Harada, S., Hirokawa, T., and Miyakawa, T.: Protein phosphatase type2B (calcineurin)-mediated, FK506-sensitive regulation of intracellular ions in yeast is an important determinant for adaptation to high salt stress conditions. *EMBO J.* 12, 4063-4071 (1993)
3. Nakamura, T., Namba, H., Ohmoto, T., Liu, Y., Hirata, D., and Miyakawa, T.  
Cloning and characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* gene *SVS1* which encodes a serine- and threonine-rich protein required for vanadate resistance. *Gene* 165, 25-29 (1995)
4. Nakamura, T., Ohmoto, T., Hirata, D., Tsuchiya, E., and Miyakawa, T.  
Genetic evidence for the redundant functions of the calcineurin-mediated and Mpk1-mediated signaling pathways in the regulation of cellular events important for growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* (1996) in press

## 参考論文

1. 中村太郎  
このごろのプロテインホスファターゼ  
醗酵工学会誌 3号 394 (1991)
2. 中村太郎、宮川都吉  
プロテインホスファターゼによる細胞機能の調節 酵母で明らかにされる生理  
化学と生物 31巻 292-299 (1993)
3. 宮川都吉、中村太郎、平田大  
酵母のストレス応答とカルシニューリン  
細胞内イオン濃度の調節による高NaClへの適応  
蛋白質核酸酵素 39巻 420-428 (1994)
4. 宮川都吉、中村太郎、平田大  
酵母のCa<sup>2+</sup>依存性プロテインホスファターゼ  
酵母とバイオ (財)バイオインダストリー協会編集 医学出版センター 28-42 (1994)



Inches 1 2 3 4 5 6 7 8  
cm 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

# Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM: Kodak

Blue	Cyan	Green	Yellow	Red	Magenta	White	3/Color	Black

# Kodak Gray Scale

© Kodak, 2007 TM: Kodak

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19

