

《農芸化学奨励賞》



Ca²⁺ 信号伝達経路による細胞周期制御の発見及びその分子機構に関する研究

広島大学大学院先端物質科学研究科分子生命機能科学専攻 助手 水 沼 正 樹

はじめに

生物は、外界の多様な変化（ストレス）を感知し、その克服に必要な機構を作用させ生命維持を図っている。セカンドメッセンジャーは、ストレス応答におけるシグナル分子として極めて重要な役割を果たすことはよく知られている。特に、カルシウムイオン (Ca²⁺) は真核生物細胞の普遍的なシグナル媒体として、真核生物の増殖制御に重要な機能をもつと考えられているが、その作用機構の詳細は不明な点が多かった。そこで、本研究では「真核微生物」である酵母をヒトなどの真核生物のモデルと位置づけ、Ca²⁺ 信号伝達経路による細胞周期・増殖制御の解析を行った。Ca²⁺ 信号伝達の主要なメディエーターであるカルシニューリン (Ca²⁺ 依存性プロテインホスファターゼ) および Mpk1 MAP キナーゼ経路の活性化は、細胞周期 G₂ 期停止および芽の極性成長を誘導することを発見し、さらに本増殖制御にかかわる機能分子を同定、その制御機構を解明し、さらにその生理的役割を明らかにした。これにより本経路にかかわる因子の高等生物における基本的分子基盤の提示を目指した。以下にその概要を述べる。

1. Ca²⁺ 情報伝達経路による細胞周期制御機構の発見

われわれは、*zds1* 破壊株に高濃度 Ca²⁺ を作用させると、Ca²⁺ 感受性、細胞の芽の異常伸長ならびに細胞周期 G₂ 期遅延が引き起こされる現象を見いだしていた (図 1)。一方、酵母 ZDS1 は、Grunstein のグループにより細胞周期 G₂ 期における SWE1 (Cdc28/Clb 細胞周期エンジンの阻害分子、Wee1 キナーゼのホモログ) の転写抑制因子として同定された。これらの結果は、Ca²⁺ 信号伝達経路は SWE1 を介した細胞周期に関与することを示唆するものであった。実際、二つの Ca²⁺ シグ

ナル伝達の鍵分子であるカルシニューリンまたは Mpk1 キナーゼを欠損させることにより *zds1* 破壊株の異常はすべて解消され、詳細な解析の結果、カルシニューリンと Mpk1 が協調的にかかわり、Swe1 キナーゼの活性化を通して有糸分裂開始を阻害する機構であることがわかった (図 2)。さらに、この経路は低浸透圧ストレスや細胞膜のストレッチを引き起こさせる薬剤にさらすと作動し、G₂ 期遅延を引き起こすことを見いだした。以上の結果から、Ca²⁺ 情報伝達経路が細胞膜生理変化 (形態形成過程) を監視し、Swe1 キナーゼの活性調節を通し、細胞増殖を制御するチェックポイント機構であると提唱した。

2. Ca²⁺ 信号応答に欠損をもつ変異株 (*scz* 変異) の取得と解析

Ca²⁺ シグナルによる細胞増殖・細胞周期制御に関与する新たな分子を見いだすため、Ca²⁺ シグナルに応答できなくなった変異株の取得とその解析を行った。変異株のスクリーニングは、カルシニューリンおよび Mpk1 MAP キナーゼ経路の欠損と同様な表現型すなわち、*zds1* 株に Ca²⁺ 耐性を付与する変異株を多数取得した。変異を *scz* と命名し、*scz* 変異は 17 の相補性グループに分類された。取得が予想された遺伝子がすべてこの中に含まれていたことから、このスクリーニングはうまく機能したと判断し、順次解析を進めた。

1) GSK-3 ファミリープロテインキナーゼ Mck1 による細胞周期 G₂ 期遅延誘導

scz10 変異は、*zds1* 破壊株が示す Ca²⁺ の影響をすべて抑圧した。遺伝子クローニングの結果、*scz10* は、GSK3 ファミリーのプロテインキナーゼの一つをコードする Mck1 であった。GSK3 ファミリープロテインキナーゼは、高等生物では初期発生における細胞の運命決定に重要な因子である。遺伝学・生化学的解析から、Mck1 は Mpk1 MAP キナーゼ経路の下流で機能し、Hsl1 (Swe1 の阻害制御因子) をカルシニューリンと協調してユビキチン・プロテアソーム系に導き、タンパク質分解

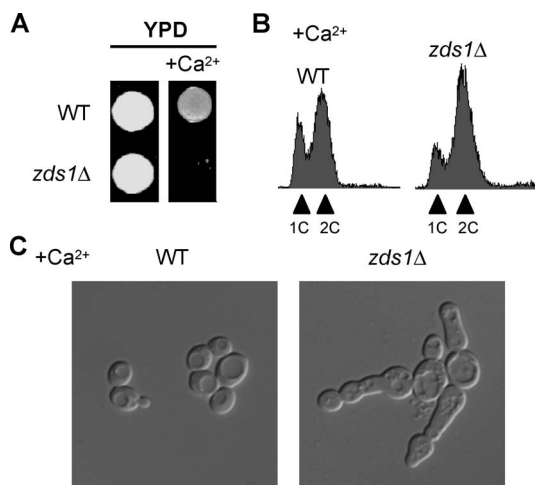


図 1 *zds1Δ* 株は Ca²⁺ によりさまざまな異常を示す。
A: Ca²⁺ 培地における細胞増殖。WT, 野生株。
B: Ca²⁺ 存在下における FACS による DNA 含量解析。
C: Ca²⁺ 存在下における細胞形態。

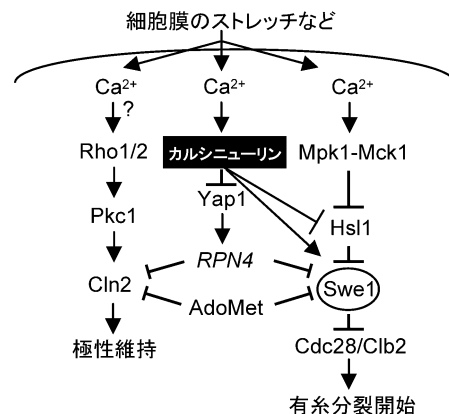


図 2 Ca²⁺ 信号伝達経路が関与する細胞周期・増殖制御機構

を促進することを見いだした (図 2)。

2) S-アデノシルメチオニンによる細胞周期制御の発見

scz7 変異は、S-アデノシルホモシステイン (AdoHcy) 加水分解酵素の遺伝子 *SAH1* における変異であった (以後 *sah1-1* 変異と呼ぶ)。興味深いことに、*sah1-1* 変異株は、細胞内に AdoHcy の蓄積とともに S-アデノシルメチオニン (AdoMet) を高蓄積することが明らかになった。AdoMet は、あらゆる生物において、タンパク質や DNA メチル化反応のメチル基供与体として、細胞の成育に必須の役割を果たしている。一方、AdoHcy は AdoMet によるメチル化反応を阻害する構造アナログであることが知られる。*sah1-1* 変異株では、AdoHcy が蓄積し、これが細胞増殖に有害なため、AdoMet を高蓄積させることによりこの増殖阻害を回避したと考えられる。実際、*sah1-1* 変異株は培地に AdoMet を加えると増殖回復が観察された。AdoMet による細胞周期制御に対する影響を調べたところ、*SWE1* 遺伝子の転写を抑制することにより、 Ca^{2+} による細胞周期 G_2 期進行の阻害を解除する働きがあることがわかった (図 2)。AdoMet は、ヒトでは肝臓疾患 (肝硬変)、うつ病などの各種疾患への効果が示されている。*sah1-1* 変異株は AdoMet を高蓄積することから、大量生産にも有用と考えられる。また酵母を利用して AdoMet による遺伝子発現制御および細胞周期制御機構の研究を通し、これら重要な疾患の病因解明の手がかりが得られる可能性もある。

3) C キナーゼ Pkc1 新規機能の発見

scz6 変異は、プロテインキナーゼ C *PKC1* の変異であった (以後 *pkc1-834* 変異と呼ぶ)。酵母 Pkc1 は Mpk1 の上流で機能し、細胞壁構築に重要な役割をもつことはよく知られていた。興味深いことに、*pkc1-834* 変異は細胞壁構築における欠損は弱いことがわかった。そこで、*pkc1-834* 変異株を詳細に解析した結果、Pkc1 は Mpk1 経路を介さず、 G_1 サイクリン Cln2 タンパク質量の発現に関与し、F-アクチンの芽への局在維持機構に重要であることがわかった。さらにこの機構に低分子量 GTPase である Rho1 も関与することが明らかになった (図 2)。

3. Ca^{2+} 信号伝達を抑制する多コピーサプレッサーの取得と解析

scz 変異の解析とは異なるアプローチにより、 Ca^{2+} シグナル伝達を阻害する因子を同定するため、*zds1* 破壊株に Ca^{2+} 耐性を付与する多コピーサプレッサーの取得を行った。その結果、Mih1 ホスファターゼ (Cdc28/Clnb 活性化因子) や ER やゴルジ体への Ca^{2+} 輸送を通し、 Ca^{2+} ホメオスタシスに関与するトランスポーターなど、予想された分子が取得された。また、カルシニューリン活性を阻害する Rcn1 や Mpk1 活性を阻害す

る Msg5 ホスファターゼも取得され、スクリーニング系がうまく機能したと考えられた。興味深いことに、酸化ストレス応答に重要な機能をもつ AP-1 様転写因子をコードする Yap1 が取得された。そこで、 Ca^{2+} シグナル伝達における Yap1 の機能を調べたところ、Yap1 はカルシニューリンによる脱リン酸化を経て分解され、Yap1 の制御を受けるユビキチン・プロテアソーム活性が低下し、Swe1 や Cln2 の安定化を誘導することを見いだした (図 2)。

おわりに

以上、 Ca^{2+} 信号伝達経路による細胞周期制御機構の研究から、その制御にかかわる因子の同定およびその分子機構の一端を明らかにできた。これは、酵母突然変異体を用いた解析からシグナル伝達経路の上流・下流を同定し、生化学的に実証する「分子遺伝学的解析」を実践したことが、本経路の解明に有効であったと考えている。本解析から取得された因子は、いずれも高等生物においても高く保存された機能分子で、高等生物における細胞周期制御の分子基盤を提示した。本制御系は、 Ca^{2+} 信号伝達が監視するさまざまなストレスに応答した細胞周期の停止あるいは遅延により対応する“細胞周期チェックポイント”機構と考えている。チェックポイントの異常は、ヒトにおける癌化とも密接に関連があり全体像解明の意義は大きい。さらに、ここで紹介できなかった他の *scz* 変異株の解析から、 Ca^{2+} 信号伝達経路は、当初予想した以上に多様な細胞機能に関与し、新展開をみせようとしている。今後、他のシグナル伝達経路との連携制御および本制御系の生理的意義の解明が重要と考える。

本研究は、広島大学大学院先端物質科学研究科分子生命機能科学専攻 (旧 工学部発酵工学講座) 細胞システム機能学研究室で行われたものです。研究者としての基礎を教わり、終始格別のご指導とご高配を賜り、また恩師でもあります広島大学大学院先端物質科学研究科教授 宮川都吉先生には厚く感謝いたします。また広島大学大学院先端物質科学研究科教授 平田 大先生には終始的確なご助言と暖かい励ましをいただきましたこと、ここに心から感謝いたします。広島大学大学院先端物質科学研究科教授 土屋英子先生、広島大学大学院生物圏科学研究科教授 水田啓子先生にも多数の貴重なご助言を賜りました、御礼申し上げます。また、このプロジェクトに携わった多くの卒業生、在校生、共同研究者の皆様に深く感謝いたします。最後に、本奨励賞にご推薦くださいました日本農芸化学会中四国支部長 海老原 清先生ならびに学会の諸先生方に厚く感謝申し上げます。