

## 酵母のカルシニューリン情報伝達

## —— 増殖過程の多岐にわたる制御 ——

平田 大・中村太郎・宮川都吉

すべての真核生物細胞に普遍的に存在するカルシニューリン ( $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  依存性プロテインホスファターゼ) の T 細胞活性化における役割は見事に解明されたが、それ以外の生理機能は依然不明である。出芽酵母の研究からカルシニューリンの重要な機能が明らかになってきた。最初は特殊なストレス下の生育にだけ必要と考えられていたが、通常の増殖においてもイオンホメオスタシスおよび細胞壁合成の制御を通して、MAP キナーゼ経路などと連携しながら、カルシニューリンは多岐にわたって重要な働きをしていることが明らかになった。筆者らの研究を中心に、研究の現状を整理し、問題点を提起する。

**Key words** 【カルシニューリン】 【イオンホメオスタシス】 【細胞壁合成】  
【MAP キナーゼ】

**はじめに** 細胞内カルシウムイオン ( $\text{Ca}^{2+}$ ) は細胞周期、分化をはじめとするさまざまな機構に重要な役割をもつ。通常は  $2\sim 4 \times 10^{-7}\text{M}$  ときわめて低く維持されている細胞内遊離  $\text{Ca}^{2+}$  は、細胞内外の状況の変化により一時的に上昇する<sup>1)</sup>。 $\text{Ca}^{2+}$  濃度の上昇は、細胞外からの流入や細胞内プールからの動員によってもたらされるが、このことが引き金となり、 $\text{Ca}^{2+}$  情報伝達系が活性化され、一連の応答機構が作動する。 $\text{Ca}^{2+}$  情報伝達の重要な媒体の1つであるカルモジュリン (CaM) は、標的蛋白質への  $\text{Ca}^{2+}$  依存的結合によって調節機能を発揮する。

最初、哺乳動物の脳から発見されたカルシニューリン ( $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  依存性プロテインホスファターゼ; CN)<sup>2,3)</sup> は、その後酵母に至るすべての真核生物細胞に普遍的に存在することが明らかになった。分子量 61K の触媒サブユニット (A) と 19K の調節サブユニット (B)

からなるヘテロダイマー構造をとる<sup>4)</sup>。触媒サブユニットには  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  が結合する。筆者らは出芽酵母の CaM 結合蛋白質として、CN の触媒サブユニットをコードする 2 種の遺伝子 (*CMP1/CNA1* および *CMP2/CNA2*)<sup>5,6)</sup> のクローン化に成功し、また調節サブユニットをコードする遺伝子 (*CNBI*)<sup>7,8)</sup> も取得した。予想されるアミノ酸配列はいずれのサブユニットとも哺乳動物のものと同じ相同性を示した。生化学的な解析結果もあわせ<sup>9)</sup>、CN は構造的にも機能的にも非常に保存性の高い酵素であることが明らかになった。セリン/スレオニンプロテインホスファターゼは基質特異性と調節様式によって 4 種類に分類されるが、 $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  により活性化されるホスファターゼは唯一 CN だけである。

CN は動物の脳における NMDA チャネルの調節<sup>10)</sup>、腎尿細管細胞における  $\alpha$ -アドレナリンによる  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase の活性化<sup>11)</sup>、また植物では  $\text{K}^+$  チャネルの調節

Dai Hirata, Taro Nakamura, Tokichi Miyakawa, 広島大学工学部発酵工学講座 (〒739 東広島市鏡山 1-4-1) [Department of Fermentation Technology, Faculty of Engineering, Hiroshima University, Kagamiyama, Higashi-Hiroshima, Hiroshima 739, Japan]

*Calcineurin-Mediated Signalling Important for Growth Regulation in Yeast*

を通し、葉の気孔開閉に関与しているといわれる<sup>12)</sup>。特に免疫系においては、最近のめざましい研究により、T細胞レセプターを介してインターロイキン-2 (IL-2) の発現誘導に至るシグナル伝達のキーになるステップに、CN による脱リン酸化が関係していることが明らかにされた<sup>13)</sup>。さらにこの系において、免疫抑制剤 FK506 およびシクロスポリン A は、細胞内結合蛋白質 (それぞれ FKBP12 およびシクロフィリン) を介して CN を阻害し、そのことが免疫抑制の機構であることが明らかにされた<sup>14,15)</sup>。しかし、これ以外には CN 作用機構は明らかになっていない。

筆者らは CN の生理機能を解明する目的で、出芽酵母における CN 欠損株の表現型を詳細に解析してきた。この研究から CN がイオンホメオスタシス、細胞壁合成の制御を通し、また MAP キナーゼ経路などの他の情報伝達系とも密接に連携しながら、ストレス適応と細胞増殖過程に深く関与していることを示唆する結果が得られた。本稿では出芽酵母の系を中心にこれまでの知見を整理し、CN の機能について概説する。

## I. カルシニューリン欠損の表現型

出芽酵母は CN の触媒サブユニットをコードする 2 つの相同遺伝子 (*CMP1/CNA1* および *CMP2/CNA2*)<sup>5,6)</sup> と調節サブユニットをコードする遺伝子 (*CNB1*)<sup>7,8)</sup> をもつ。生理機能を解析する目的で、CN 欠損株 (*cmp1 cmp2* 二重破壊株および *cnb1* 単独破壊株) を構築し、表現型を調べた。CN は通常の生育には必須ではなかったが、欠損株は  $\text{Na}^+$ 、 $\text{Li}^+$ 、 $\text{Mn}^{2+}$ 、高 pH ( $\text{OH}^-$ )、バナジン酸に高感受性を示し<sup>16,17)</sup>、逆に  $\text{Ca}^{2+}$  には耐性を示した<sup>18,19)</sup>。さらに、性接合因子による G1 期停止からの復帰は不能となった<sup>6,8)</sup>。ほかにも表現型を調べたが、これら以外には見いだされなかった。

CN 欠損株が各種イオンに感受性を示すことから、細胞内イオンホメオスタシスの制御への関与が示唆された。細胞内カチオン濃度の測定により、酵母細胞内も通常は高等真核細胞同様に低  $\text{Na}^+$ 、高  $\text{K}^+$  に維持されているが、高塩培地に移すとただちに細胞内  $\text{Na}^+$  は上昇し、逆に  $\text{K}^+$  は低下することがわかった。CN 欠損株は、野生株に比べこの変化が特に著しかった(図 1)<sup>16)</sup>。培地に KCl を添加すると欠損株の  $\text{Na}^+$  感受性は抑圧されるが、これにより細胞内  $\text{K}^+$  は上昇し、 $\text{Na}^+$  は野生

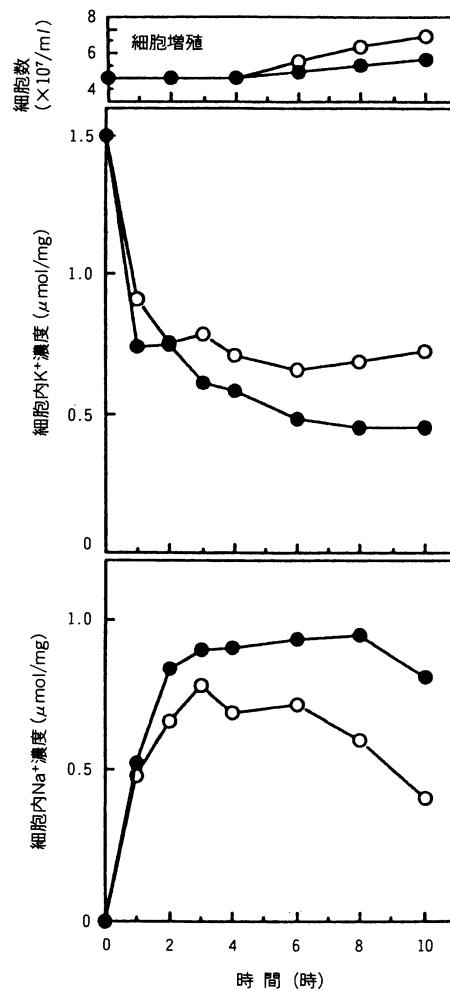


図 1 高濃度の NaCl (0.85 M) を含む培地に移した野生株 (○) および *cmp1 cmp2* 二重破壊株 (●) の増殖ならびに細胞内  $\text{Na}^+$  および  $\text{K}^+$  濃度の変動

株レベルに低下した。さらに NaCl 存在下で培養して細胞内  $\text{Na}^+$  を高めた細胞を NaCl を含まない培地に移して培養し、細胞内  $\text{Na}^+$  を測定すると、欠損株は野生株に比べ  $\text{Na}^+$  排出速度が遅かった。以上のことから、CN は高塩条件下の  $\text{Na}^+$  排出系の活性化と  $\text{K}^+$  レベルの維持に重要なことが示された。

CN 欠損株は  $\text{Mn}^{2+}$  に対しても高感受性を示したが、 $\text{Na}^+$  の場合とはまったく性質の異なる機構の欠陥に起因することが明らかになった<sup>17)</sup>。微量必須重金属マンガンは、培地に存在する濃度がきわめて低いいため、通常は能動的輸送により取り込むことが必要である。しかし細胞内の遊離  $\text{Mn}^{2+}$  があるレベル以上に達すると細胞

にとってきわめて有毒となる。高濃度の  $Mn^{2+}$  を含む培地では、欠損株の細胞内  $Mn^{2+}$  のレベルは上昇し続けたが、野生株では低く一定に保たれていた。欠損株は  $Mn^{2+}$  排出能に異常はなかったが、取り込み系の制御に欠陥があることが明らかになった<sup>17)</sup>(図2)。すなわち、酵母には高濃度の  $Mn^{2+}$  が培地に存在すると  $Mn^{2+}$  取り込み系を不活性化させる機構が存在し、これに CN が関わっていると考えられる。

免疫抑制剤 FK506 が存在すると、野生株も CN 欠損株の表現型と同様な性質を示し、その効果は FK506 結合蛋白質 (Fkb1) 依存的であったことから<sup>16,17,20)</sup>、酵母においても CN が免疫抑制剤の分子標的であり、CN 周辺の機構が酵母から T 細胞に至るまで高度に保存されていることが明らかになった。

分裂酵母においても、CN 触媒サブユニットをコードする遺伝子 *ppb1+* が取得、解析されている<sup>21)</sup>。*ppb1* 欠損株の表現型は、出芽酵母とは少し異なり、細胞質分裂が著しく遅延し、多重隔壁形成や枝分かれした糸状形態などを示したことから、CN は正常な増殖に必要なことが示唆されている。

## II. カルシニューリンによるイオンホメオスタシスの制御

### 1. カルシニューリンと A キナーゼの拮抗作用による $Na^+$ 排出ポンプの発現制御

CN 欠損株は  $Na^+$  や  $Li^+$  に対して感受性を示した<sup>16)</sup>。 $Li^+$  は  $Na^+$  のアナログとして、両カチオンは輸送系を共有していると考えられている。筆者らは CN が関与する  $Na^+$ ,  $Li^+$  ホメオスタシス制御機構に関与する分子種を同定する目的で、欠損株の  $Li^+$  感受性を指標に多コピー抑圧遺伝子の取得を行なった。その結果、*ENA1/PMR2*, *PDE1* などの既知遺伝子<sup>22)</sup> を取得した。

*ENA1/PMR2* は  $Na^+$ ,  $Li^+$  排出ポンプと予想される P 型 ATPase をコードしており、 $Na^+$  や  $Li^+$  存在下あるいは高 pH での生育に必要である<sup>23-27)</sup>。一方、低親和性 cAMP ホスホジエステラーゼをコードする *PDE1* は、cAMP 濃度の調節に重要である<sup>28)</sup>。*PDE1* の高発現により  $Li^+$  感受性が抑圧されたことから、細胞内 cAMP 濃度の減少が高塩耐性に重要で、cAMP がこの系で負の制御因子として機能していることが示唆された<sup>22)</sup>。このことをさらに確かめるために、*bcy1* 欠損株の  $Li^+$  および  $Na^+$  感受性を調べた。*bcy1* 欠損株は

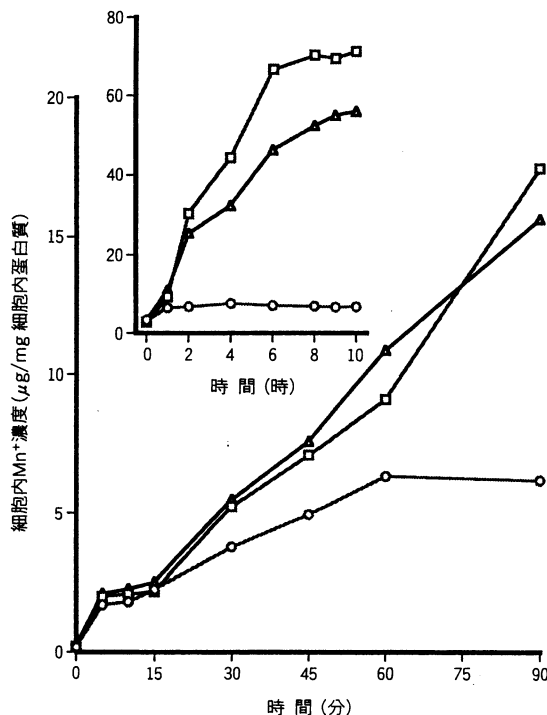


図2 高濃度の  $MnCl_2$  (3 mM) を含む培地に移した野生株 (○) および CN 破壊株 (□: *cmp1 cmp2*, Δ: *cnb1*) における細胞内マンガン濃度の変動

cAMP 非依存的に A キナーゼが活性化されるため、cAMP レベルが高いときと同様な表現型を示す。もし cAMP が A キナーゼを介して機能しているのであれば、*bcy1* 欠損株は  $Li^+$  や  $Na^+$  に感受性を示すはずである。予想どおり *bcy1* 欠損株は  $Li^+$  と  $Na^+$  に感受性を示した。この感受性は、CN 欠損株の場合と同様、培地に  $K^+$  を添加することで抑圧されたことから、A キナーゼにより制御される高塩耐性機構が CN に制御されるものと同じ性質であることが示唆された。

*ENA1/PMR2* は CN 依存的に  $Li^+$  または  $Na^+$  によって転写誘導される<sup>27)</sup>。このことは CN が *ENA1/PMR2* 転写誘導の正の制御因子であることを示している。遺伝学的解析から、CN と A キナーゼは高塩耐性機構に拮抗的に作用していることが示唆された。もし、両者が共通の機構を調節しているとするれば、A キナーゼが *ENA1/PMR2* 転写誘導の負の制御因子であると予想される。この可能性を調べるために、*bcy1* 欠損株および *PDE1* 高発現株で  $Na^+$  による *ENA1/PMR2* の転写誘導を調べた(図3)。*bcy1* 欠損株では  $Na^+$  による

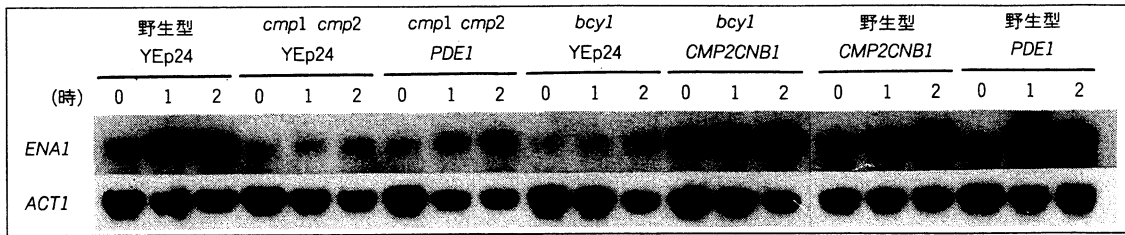


図 3 NaCl による *ENA1/PMR2* の転写誘導  
 上段は宿主株を、また下段はプラスミド (YEpl 型) を示す。数字は NaCl 添加後の時間 (時) を示す。*ACT1* はアクチン遺伝子の転写量を示すコントロール。

転写誘導がほとんど起こらず、反対に *PDE1* 高発現株では野生株に比べ迅速かつ強く転写誘導された。この結果は A キナーゼが *ENA1/PMR2* 転写誘導の負の制御因子であることを示唆している。つぎに CN と A キナーゼの *ENA1/PMR2* 転写レベルにおける拮抗作用を確かめるために、CN 欠損株での *PDE1* 高発現および *bcy1* 欠損株における CN 高発現の効果を調べた。CN 欠損株ではほとんどみられない転写誘導が *PDE1* を高発現することによって弱いながらも認められ、また、*bcy1* 欠損株でみられない転写誘導も、CN 高発現によって野生株レベルまで認められるようになった。さらに野生株で CN を高発現させることにより *ENA1/PMR2* の転写誘導は強まり、同様に *PDE1* の高発現によって迅速かつ強く転写誘導が起こった。以上のことから、Na<sup>+</sup> による *ENA1/PMR2* の転写誘導に CN と A キナーゼが拮抗的に作用し、A キナーゼがこの調節系で律速になっていることが示唆された。

この結果をもとに、次に述べる最も単純なモデルを考えた(図 4)。*ENA1/PMR2* の発現に必要な転写因子が CN による脱リン酸化で活性化型に、逆に A キナーゼ (PKA : cAMP 依存性プロテインキナーゼ) によるリン酸化で不活性化型へと可逆的に変化する。このモデルによれば、高塩ストレスによって細胞内 Ca<sup>2+</sup> 濃度は上昇し、逆に cAMP 濃度は減少すると予想され、これらの変化によって転写因子が不活性化型から活性化型に素速く変換する。CN が *ENA1/PMR2* の転写を正に制御していることが明らかになった。T 細胞で明らかになった、CN による NF-AT 活性化を介する IL-2 の転写活性化機構との関連に興味もたれる。これまでに明らかになっている CN と A キナーゼに共通する作用点は *ENA1/PMR2* の転写調節だけであるが、それ

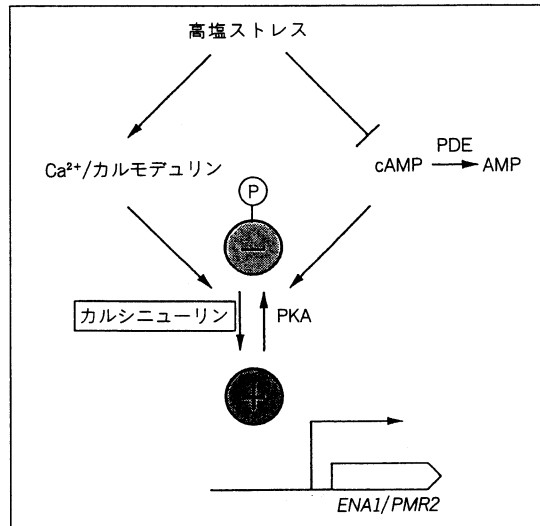


図 4 CN と PKA の拮抗的作用による高塩ストレス条件下における *ENA1/PMR2* の発現調節のモデル  
 PDE : cAMP ホスホジエステラーゼ, PKA : cAMP 依存性プロテインキナーゼ。

以外の機構でも両者が拮抗的に作用している可能性は残っている。

出芽酵母の高塩条件への適応が cAMP による負の制御を受けていることが明らかになったが、ストレス関連遺伝子の発現が cAMP により抑制されている例が *CTT1* (細胞質カタラーゼ T) などほかにもいくつか報告されている<sup>29)</sup>。環境条件が増殖に適している間は、酵母は盛んに出芽増殖をくり返して個体数を増やし、この間必要性の低いストレス関連遺伝子の発現は cAMP により抑制されている。しかしいったんストレスにあうと、cAMP 濃度が低下し増殖を停止するとともに、ストレス関連遺伝子を発現させて抵抗を強めることが予

想される。このように cAMP は増殖からストレス適応への切替えを制御するうえでも重要な位置を占めていると考えられる。ストレスのなかでも、特に高塩条件への適応は、cAMP と  $\text{Ca}^{2+}$  の 2 つの主要な細胞内シグナルのクロストークにより制御されていると考えられる。

## 2. $\text{Ca}^{2+}$ および $\text{H}^+$ ホメオスタシスとカルシニューリン

### A. *PMCI*

形質膜 P 型  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (PMCA) に種をこえて高度に保存されているリン酸化部位と ATP 結合領域のアミノ酸配列をもとに、PCR により取得された酵母 *PMCI* がコードする蛋白質は、哺乳類 PMCA と 40% の相同性を示し、液胞膜に局在する<sup>30)</sup>。酵母では細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  の約 95% は液胞に隔離された状態で貯蔵され<sup>31)</sup>、これが主要な  $\text{Ca}^{2+}$  プールと考えられている。細胞内全  $\text{Ca}^{2+}$  のうち、非可動型 (nonexchangeable) の大部分はこれで説明される<sup>32)</sup>。*PMCI* は通常の生育には必須ではないが、*pmc1* 欠損株は  $\text{Ca}^{2+}$  感受性を示し、細胞内非可動型  $\text{Ca}^{2+}$  量は野生株の 20% に減少していた。これより、*Pmc1* は液胞膜に存在する PMCA であることが明らかになった。*pmc1* 欠損株は、培地に高濃度  $\text{Ca}^{2+}$  が存在すると細胞形態の異常を示した。*pmc1* 欠損株の  $\text{Ca}^{2+}$  感受性と形態異常は、液胞への  $\text{Ca}^{2+}$  輸送の欠陥による細胞質遊離  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の調節異常に起因すると予想される。

一方、 $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 様蛋白質をコードするもう 1 つの遺伝子 *PMR1* の産物はゴルジ体膜に存在する<sup>23,33)</sup>。*PMR1* 高発現は *pmc1* 欠損株の  $\text{Ca}^{2+}$  感受性を抑圧し、また *pmr1 pmc1* 二重欠損は致死になるため、両者は機能的に重複しつつ細胞質の  $\text{Ca}^{2+}$  ホメオスタシス制御に重要な役割を果たしていることが示唆された。*pmc1* 欠損株の  $\text{Ca}^{2+}$  感受性を抑圧する変異 *crm1* が分離され、*CRM1* は CN の調節サブユニットをコードする *CNBI* 遺伝子座の変異であることが明らかになった<sup>30)</sup>。同様に、*pmr1* 欠損株の  $\text{Ca}^{2+}$  感受性、*pmc1 pmr1* 二重欠損株の致死性も CN 欠損によって抑圧された。これらの結果から、各種欠損株における細胞質内遊離  $\text{Ca}^{2+}$  の上昇による生育障害は CN の活性化を介しており、その異常な活性化が細胞増殖に有害な作用を及ぼす可能性が示唆された。

### B. *VMA*

液胞は主要な細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  プールで、細胞質から液胞への  $\text{Ca}^{2+}$  の輸送は液胞膜  $\text{H}^+$ -ATPase (*Vma*) により形成された  $\text{H}^+$  濃度勾配を利用する  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$  アンチポーター<sup>34)</sup> と *Pmc1*<sup>29)</sup> などによって行なわれる。多数の *Vma* サブユニットの変異が同定されている<sup>35,36)</sup>。 $\text{Ca}^{2+}$  感受性を示す *vma* 変異株では、細胞質の遊離  $\text{Ca}^{2+}$  濃度が野生株の 5~6 倍と高い<sup>35)</sup>。*pmc1* 欠損株の  $\text{Ca}^{2+}$  感受性が CN 欠損によって抑圧されることから、*vma* 欠損株でも、CN 欠損による  $\text{Ca}^{2+}$  感受性の抑圧が検討されたが、予想外にも二重欠損は致死であった<sup>18)</sup>。CN 依存的に生育可能となる変異として取得された *cev1* 変異も *Vma* サブユニットをコードする *VPH6* 遺伝子座の変異であった<sup>37)</sup>。*vma* 変異株の細胞質内遊離  $\text{Ca}^{2+}$  濃度は FK506 存在下に顕著に減少し、非可動型  $\text{Ca}^{2+}$  量は上昇した。以上のことから CN は細胞質内の遊離  $\text{Ca}^{2+}$  をあるコンパートメント (オルガネラ) へ輸送する系に対して抑制的に機能していることが示唆された。CN 欠損株が示す  $\text{Ca}^{2+}$  耐性は、この抑制機構の欠陥により細胞質遊離  $\text{Ca}^{2+}$  の輸送が構造的に行なわれるようになり、細胞質内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度を低く保つためと理解された。しかし、*VMA* と CN 二重欠損株がなぜ致死となるのか、つまり両者に共通な生理機能は何かについては、 $\text{Ca}^{2+}$  ホメオスタシス<sup>18)</sup> や細胞外への  $\text{H}^+$  輸送 (細胞外酸性化機構, acidification) が関係した  $\text{H}^+$  ホメオスタシス<sup>37)</sup> の制御などいくつかの可能性が推察されているが、機構は不明である。

## III. カルシニューリンと MAP キナーゼ経路の機能的関連

CN を介する情報伝達経路に機能的に関連する分子種を同定する目的で、CN 欠損株と類似な表現型を示す変異株の分離を行なった<sup>19)</sup>。1 次スクリーニングでは、正の選択が可能な  $\text{Ca}^{2+}$  耐性を示す株 3200 株を選抜し、さらに、その他の形質 ( $\text{Li}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ , パナジン酸感受性のいずれか) を示す株を 2 次スクリーニングで選択した (103 株)。これらはすべてがパナジン酸感受性を示したことから、変異に *crv* (calcium resistant and vanadate sensitive) と命名した。*crv* 変異は 4 つの遺伝子座 (*crv1*~*crv4*) からなっていた。*crv1* は予想どおり、CN 調節サブユニットをコードする *CNBI* 遺伝子座の変異であった。*crv2* および *crv3* 変異株は CN

欠損株と同様、性接合因子による G1 期停止からの復帰不能な形質も示した。遺伝子クローニングの結果、*CRV2* および *CRV3* はそれぞれ MAP キナーゼ経路の遺伝子 *BCK1* および *MPK1* であることが明らかになった。

CN と MAP キナーゼ経路の機能関連を調べた<sup>19)</sup>。CN と *mpk1*、あるいは CN と *bck1* の二重欠損株はほぼ合成致死となり、致死性は浸透圧保護剤 (ソルビトール) の添加によって完全に抑圧された。*mpk1* 欠損株は洋ナシ型の細胞形態異常を示した。ソルビトール存在下で生育させた細胞をソルビトール非存在下に移し経時的に細胞形態を観察すると、二重欠損株では *mpk1* 単独欠損株に比べて異常形態を示す細胞が顕著に増加した。このとき、細胞の死滅に先立ち細胞形態に異常が現われた (図 5)。また、*mpk1* あるいは *bck1* 欠損株の許容温度における遅い生育と高温感受性は CN 高発現によって抑圧され、形態異常の出現頻度も部分的に抑圧された (図 6)。さらに、CN 欠損株の性接合因子により誘導される G1 期停止からの復帰不能の形質も *MPK1* 高発現によって抑圧された。以上の結果より、細胞増殖および細胞形態の維持機構において、CN と MAP キナーゼ経路は重複しつつ必要な役割を担うことが示唆された。また、興味深いことに、*mpk1* 欠損株の許容温度における遅い生育および高温感受性は  $Ca^{2+}$  によって抑圧されたが、CN との二重欠損株の致死性は抑圧されなかった。この抑圧現象には  $Ca^{2+}$  により CN 経路が活性化されることが必要と考えられる。両経路は通常の増殖のみならず、性接合因子による G1 期停止からの復帰にもかかわっている。両経路が関与する共通の生理機能の解明が必須である。

#### IV. CN による細胞壁合成制御

CN と合成致死になる変異株 *cnd1* が分離されている<sup>38)</sup>。*cnd1* 変異は、細胞壁  $\beta$ -グルカン合成酵素をコードする *FKS1* 遺伝子座の変異であった。細胞壁合成は細胞の増殖に必須である。これにより CN が細胞壁  $\beta$ -グルカン合成機構に関与していることが示唆された。実際 *Fks1* にはアイソザイム *Fks2* が存在し、*fks1 fks2* 二重欠損株は致死となる<sup>39)</sup>。この *FKS2* の発現は  $Ca^{2+}$  や性接合因子にตอบสนองして転写誘導されるが、この系は CN 依存的であった。*FKS2* はグルコース枯渇によっても

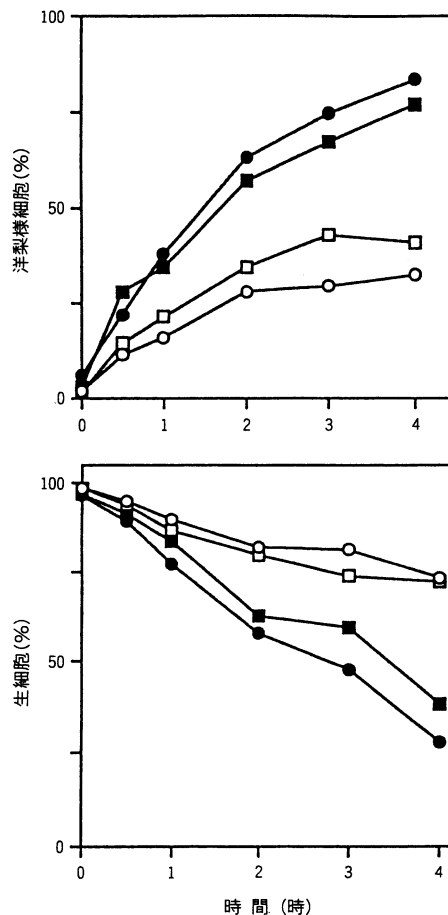


図 5 *bck1* (○), *bck1cnb1* (●), *mpk1* (□) および *mpk1cnb1* (■) の各株をソルビトールを含む培地からソルビトールを含まない通常の培地 (YPD) にシフト後の異常形態 (洋ナシ型) 細胞 (上) と生細胞数 (下) の変動

転写誘導されるが、これは CN 非依存的であった。また *fks2* 単独欠損株は孢子形成不能となった。一方、*FKS1* は細胞周期に依存して発現誘導され、*FKS2* とは異なる発現調節を受ける。以上より *FKS2* は性接合や孢子形成過程における細胞壁の再構築に重要で、CN は  $Ca^{2+}$  や性接合因子にตอบสนองして *FKS2* を転写調節することにより細胞壁合成にも関与していることが示唆された。

#### V. 今後の課題

CN について、現在までに得られている知見を紹介してきた。CN と合成致死性を示す、つまり重複しつつ増

殖に必須な役割をもつ遺伝子が同定された。それらは、液胞膜 H<sup>+</sup>-ATPase サブユニットをコードする *VMA*, 細胞壁 β-グルカン合成酵素をコードする *FKS1* および MAP キナーゼ経路 *BCK1*, *MPK1* などである。これにより, CN は通常の増殖過程においても, イオンホメオスタシス, 細胞壁合成, 栄養増殖, 形態維持などに重要なことが示唆された(図7)。今後, 解決されなければならない課題を列挙してみる。

### 1. カルシニューリンの活性化機構

CN の活性化には, 細胞内外のシグナルに呼応した細胞質内遊離 Ca<sup>2+</sup> 濃度の上昇が必要である。各々のシグナルから, Ca<sup>2+</sup> シグナルへの変換機構はまったく不明である。

CN 活性化に至る細胞外からの Ca<sup>2+</sup> 流入や細胞内 Ca<sup>2+</sup> プールからの放出がいかに制御されているのか, CN 情報伝達経路の上流活性化機構に興味もたれる。

### 2. MAP キナーゼ経路とカルシニューリン経路に共通な生理機能

MAP キナーゼ経路の変異株では, 細胞壁(および細胞膜)の強度が低下していることから, この経路は細胞壁合成に重要な機能をもつことが示唆された。CN は β-グルカン合成酵素 *FKS2* の発現調節を通して細胞壁合成に重要な機能をもつことが示された。CN と MAP キナーゼ経路の共通の生理機能として, ひとつは細胞壁合成系の調節が考えられる。二重欠損株では, 単独欠損株に比べ, 形態異常を示す細胞の出現頻度が顕著に増加した。この結果は, 両経路が形態形成機構に参与する可能性を示唆する。CN または MAP キナーゼの欠損株も接合因子により誘導される G1 期停止からの復帰不能の表現型を示した。復帰不能がどのような機構

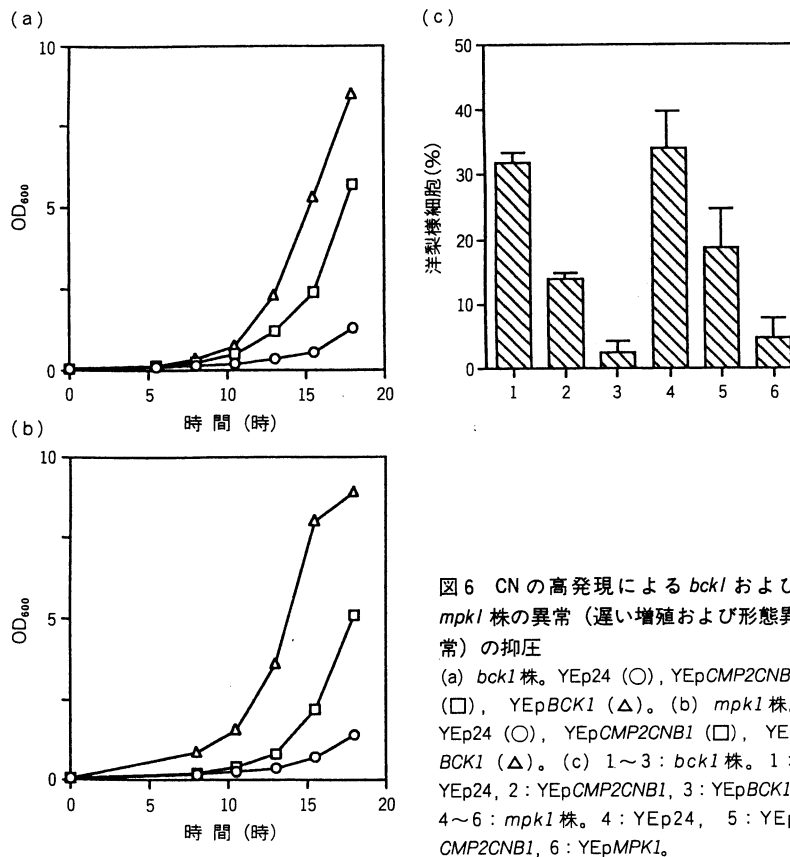


図6 CN の高発現による *bck1* および *mpk1* 株の異常(遅い増殖および形態異常)の抑圧  
(a) *bck1* 株. YEp24 (○), YEpCMP2CNB1 (□), YEpBCK1 (Δ). (b) *mpk1* 株. YEp24 (○), YEpCMP2CNB1 (□), YEpBCK1 (Δ). (c) 1~3: *bck1* 株. 1: YEp24, 2: YEpCMP2CNB1, 3: YEpBCK1. 4~6: *mpk1* 株. 4: YEp24, 5: YEpCMP2CNB1, 6: YEpMPK1.

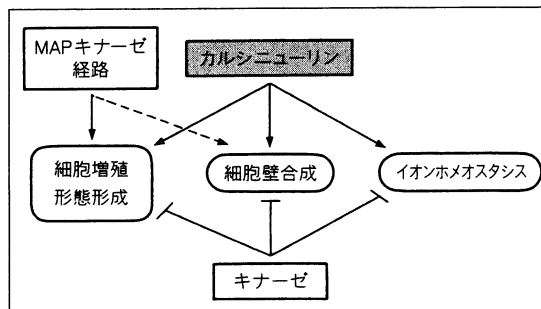


図7 カルシニューリンの制御を受ける細胞増殖過程のイベント  
MAP キナーゼ経路との機能的関連, および各イベントにおける未知のプロテインキナーゼとの拮抗作用を図示した。

によっているかはまったく不明である。両経路に制御される増殖必須機能は, CN 情報伝達経路を理解するために必須である。

### 3. カルシニューリンに拮抗するプロテインキナーゼ

CN が関与するそれぞれの系には、逆反応のプロテインキナーゼが存在するはずである。高塩ストレスへの適応においては、A キナーゼと CN が *ENA1/PMR2* の発現を拮抗的に制御することから、転写因子の特定部位におけるリン酸化・脱リン酸化制御が関係している可能性が示唆された。両経路に共通の標的分子種は不明である。逆反応キナーゼの同定は、その系の生理機能の理解に重要である。

**おわりに** 欠損株の表現型から、最初に出芽酵母 CN は特殊なストレス条件下においてのみ必要と考えてきた。ところが、遺伝学的解析から、CN は通常の増殖過程においてもイオンホメオスタシス、細胞壁合成、形態維持に MAP キナーゼ経路などの他の情報伝達経路とも密接に連携しながら重要な役割を担っていることが明らかになった。特に MAP キナーゼ経路との機能関連の発見から、CN の研究は新たな局面に入ったと考えられる。

MAP キナーゼ経路は、多種多様な分子と機能的に関連していることが知られるが、特に *cdc28* 変異と *slt2/mpk1* が合成致死になる事実から、細胞周期過程においても中心的役割を担うと考えられる<sup>40)</sup>。Cdc28 キナーゼは G1 期の START において、出芽過程、SPB (spindle pole body) の複製、DNA 合成に必須な役割を担う。*slt2/mpk1* 変異はアクチンを含む細胞骨格系の変異同様、出芽の際の極性成長に異常を示し、さらに *slt2/mpk1* は *act1* や *myo2* 変異と合成致死になることから、出芽過程にも重要なことが示された。これらの結果から、Slt2/Mpk1 は出芽過程で Cdc28 の下流、あるいは非依存式的であるが協調的に機能していることが示唆された。実際 *mpk1* 変異株の形態異常と生育が遅い形質は、CN 欠損によってさらに強められ、CN 高発現によって部分的ではあるが抑圧された<sup>19)</sup>。この事実は細胞周期と連動した極性成長過程で CN が重要であることを示唆する。CN の機能は細胞周期過程のなかでも厳密に調節されている可能性がある。また性接合の分化過程においても、CN の機能は重要で、接合因子により誘導される G1 期停止からの復帰に必要である。現在のところ、分化過程における CN の機能の一部が、*FKS2* の発現調節を介する細胞壁合成制御であることが明らか

になったが、*fk2* 欠損株でも G1 期停止から正常に復帰できることから<sup>39)</sup>、分化過程における CN の機能はまだ不明である。細胞周期および分化過程における CN 活性化機構、すなわち  $Ca^{2+}$  ホメオスタシスの制御機構に興味もたれる。

CN の脳神経系での機能は不明であるが、酵母で明らかになった CN の働きから、CN がニューロン神経軸索の突端成長やイオンチャネルの制御を介するカチオンホメオスタシスの制御に関与していることも予想される。酵母 CN の研究が高等生物における CN 機能解明の突破口として、CN の細胞周期、分化過程における機能、さらに生物学の最後のフロンティアといわれる脳神経系における機能解明の重要な手がかりになることを期待したい。

### 文 献

- 1) Campbell, A. K. : Intracellular Calcium : Its Universal Role a Regulator, John Wiley and Sons, New York (1983)
- 2) Stewart, A. A., Ingebritsen, T. S., Manalan, A., Klee, C. B., Cohen, P. : *FEBS Lett.*, **137**, 80-84 (1983)
- 3) Stewart, A. A., Ingebritsen, T. S., Cohen, P. : *Eur. J. Biochem.*, **132**, 289-295 (1983)
- 4) Cohen, P. : *Annu. Rev. Biochem.*, **58**, 453-508 (1989)
- 5) Liu, Y., Ishii, S., Tokai, M., Tsutsumi, H., Ohki, O., Akada, R., Tanaka, K., Tsuchiya, E., Fukui, S., Miyakawa, T. : *Mol. Gen. Genet.*, **227**, 52-59 (1991)
- 6) Cyert, M. S., Kunisawa, R., Kaim, D., Thorner, J. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 7376-7380 (1991)
- 7) Kuno, T., Takeda, T., Hirai, M., Ito, A., Mukai, H., Tanaka, C. : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **165**, 1352-1358 (1989)
- 8) Cyert, M. S., Thorner, J. : *Mol. Cell. Biol.*, **12**, 3460-3496 (1992)
- 9) Nakamura, T., Tsutsumi, H., Mukai, H., Kuno, T., Miyakawa, T. : *FEBS Lett.*, **309**, 103-106 (1992)
- 10) Lieberman, D. N., Mody, I. : *Nature*, **369**, 235-239 (1994)
- 11) Aperia, A., Ibarra, F., Svensson, L.-B., Klee, C., Greengard, P. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 7394-7397 (1992)
- 12) Lusn, S., Li, W., Rusnak, F., Assmann, S. M.,



- Schreiber, S. L. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 2202-2206 (1993)
- 13) Clipstone, N. E., Crabtree, G. R. : *Nature*, **357**, 695-697 (1992)
- 14) O'Keefe, S. J., Tamura, J., Kincaid, R. L., Tocci, M. J., O'Neill, E. A. : *Nature*, **357**, 692-694 (1992)
- 15) Liu, J., Farmer, J. D. Jr., Lane, W. L., Friedman, J., Weissman, I., Schreiber, S. L. : *Cell*, **66**, 807-815 (1991)
- 16) Nakamura, T., Liu, Y., Hirata, D., Namba, H., Hirokawa, T., Miyakawa, T. : *EMBO J.*, **12**, 4063-4071 (1993)
- 17) Farcasanu, I. C., Hirata, D., Tsuchiya, E., Miyakawa, T. : *Eur. J. Biochem.*, **232**, 712-717 (1995)
- 18) Tanida, I., Hasegawa, A., Iida, H., Ohya, Y., Anraku, Y. : *J. Biol. Chem.*, **270**, 10113-10119 (1995)
- 19) Nakamura, T., Ohmoto, T., Hirata, D., Tsuchiya, E., Miyakawa, T. : *Mol. Gen. Genet.*, **251**, 211-219 (1996)
- 20) Foor, F., Parent, S. A., Morin, N., Dahl, A. M., Ramadan, N., Chrebet, G., Bostian, K. A., Nielsen, J. B. : *Nature*, **360**, 682-684 (1992)
- 21) Yoshida, T., Toda, T., Yanagida, M. : *J. Cell Sci.*, **107**, 1725-1735 (1994)
- 22) Hirata, D., Harada, S., Namba, H., Miyakawa, T. : *Mol. Gen. Genet.*, **249**, 257-264 (1995)
- 23) Rudolph, H. K., Antebi, A., Fink, G. R., Buckley, C. M., Dorman, T. E., LeVitre, J., Davidow, L. S., Mao, J. I., Moir, D. T. : *Cell*, **58**, 133-145 (1989)
- 24) Rudolph, H. K., Fink, G. R. : *Yeast*, **6**, S561 (1990)
- 25) Haro, R., Garciaeblas, B., Rodriguez-Navarro, A. : *FEBS Lett.*, **291**, 189-191 (1991)
- 26) Haro, R., Banuelos, M. A., Quintero, F. J., Rubio, F., Rodriguez-Navarro, A. : *Physiol. Plant*, **89**, 868-874 (1993)
- 27) Garciaeblas, B., Rubio, F., Quintero, F. J., Banuelos, M. A., Haro, R., Rodriguez-Nabarro, A. : *Mol. Gen. Genet.*, **236**, 363-368 (1993)
- 28) Nikawa, J., Sass, P., Wigler, M. : *Mol. Cell. Biol.*, **1**, 3629-3636 (1987)
- 29) Mager, H. W., De Kruijff, J. J. : *Microbiol. Rev.*, **59**, 506-531 (1995)
- 30) Cunningham, W. W., Fink, G. R. : *J. Cell Biol.*, **124**, 351-363 (1994)
- 31) Eilam, Y., Lavi, H., Grossowicz, N. : *J. Gen. Microbiol.*, **131**, 623-629 (1985)
- 32) Eilam, Y. : *Biochim. Biophys. Acta*, **687**, 8-16 (1982)
- 33) Antebi, A., Fink, G. R. : *Mol. Biol. Cell.*, **3**, 633-654 (1992)
- 34) Ohsumi, Y., Anraku, Y. : *J. Biol. Chem.*, **258**, 5614-5617 (1983)
- 35) Ohya, Y., Umemoto, N., Tanida, I., Ohta, A., Iida, H., Anraku, Y. : *J. Biol. Chem.*, **266**, 13971-13977 (1991)
- 36) Anraku, Y., Umemoto, N., Hirata, R., Ohya, Y. : *J. Bioenerg. Biomembr.*, **24**, 395-405 (1992)
- 37) Hemenway, C. S., Dolinski, K., Cardenas, M. E., Hiller, M. A., Jones, E. W., Heitman, J. : *Genetics*, **141**, 833-844 (1995)
- 38) Garrett-Engele, P., Moilanen, B., Cyert, M. S. : *Mol. Cell. Biol.*, **15**, 4103-4114 (1995)
- 39) Mazur, P., Morin, N., Baginsky, W., El-Sherbeini, M., Clemas, J. A., Nielsen, J. B., Foor, F. : *Mol. Cell. Biol.*, **15**, 5671-5681 (1995)
- 40) Mazzoni, C., Zarzov, P., Rambourg, A., Mann, C. : *J. Cell Biol.*, **123**, 1821-1833 (1993)