

Ca²⁺情報伝達経路による細胞増殖および細胞周期制御機構の解析

水沼 正樹 (広島大学大学院先端物質科学研究科)

mmizu@hiroshima-u.ac.jp

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、受精や分泌を始めとする広範な細胞機能の調節に関わっている。私達は、酵母の Ca²⁺シグナルがカルシニューリン (Ca²⁺依存性プロテインホスファターゼ; CN) や Mpk1 MAP キナーゼ経路の活性化を介し、細胞周期 G₂ 期停止及び芽の極性成長を誘導することを発見し、機構の概容を明らかにした。さらに細胞周期関連分子の遺伝子発現・タンパク質制御機構も明らかにした。

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動させ生命維持をはかっている。この一連の生命維持機構を解明することは、生物学の重要な課題である。酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) は、生命の仕組みが最も詳しく理解されている生物で、酵母研究から得られる情報が生命科学に及ぼすインパクトは大きい。私達は、増殖制御に関わる機能分子を発見し、制御機構を解明し、さらにその生理的役割を明らかにする研究を行っている。

Ca²⁺情報伝達経路(カルシニューリンと Mpk1 MAP キナーゼ経路)による細胞周期制御機構の発見

Ca²⁺は、真核生物細胞におけるシグナルメディエーターとして、広範な細胞機能の調節に関わっている。しかし、Ca²⁺の細胞増殖および細胞周期への関与については不明な点が多かった。私達は、Ca²⁺情報伝達経路による細胞周期制御を分子レベルで明らかにした。この機構は、二つの Ca²⁺シグナル伝達経路カルシニューリンおよび Mpk1 MAP キナーゼが協調的に、Swe1 キナーゼ (細胞周期エンジンの阻害分子) の活性化を通して有糸分裂開始を阻害する事がわかった。さらに、細胞膜緊張などに応答してこの経路が作動し、G₂ 期遅延を引き起こすことを見いだした。このことから、Ca²⁺情報伝達経路が細胞膜生理変化 (形態形成過程) をモニターし、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¹⁻⁴⁾ (図 1)。

さらに、Ca²⁺シグナル経路の活性化が細胞の増殖停止を引き起こすので、この特徴を利用した応用展開を試みた。

細胞周期停止に至る Ca²⁺シグナル伝達経路の活性化を阻害する物質を Ca²⁺による増殖阻害を解除する活性を指標として、活性物質を“正の選抜”により取得する方法を開発した。本法により、CN 阻害剤 (免疫抑制) MAP キナーゼカスケード阻害剤 (抗腫瘍) などの新規物質の取得が予想され、医薬の分野にも貢献できる⁵⁻⁷⁾。



図 1. カルシウム情報伝達経路による細胞周期制御モデル

Ca²⁺シグナル応答に欠損をもつ変異株 (*scz* 変異)の取得

Ca²⁺シグナルによる細胞増殖あるいは細胞周期制御に關与する新たな分子を見出すため、Ca²⁺シグナルに応答出来なくなった変異株の取得を行った⁸⁾。Ca²⁺シグナルに応答欠損株のスクリーニングは、出芽酵母 *zds1* 破壊株を用いた。*zds1* 破壊株は、Ca²⁺特異的に感受性を示し、細胞の異常極性成長および G₂ 期遅延を示す。さらに *zds1* 破壊株が示す Ca²⁺シグナルによるこれらの異常は、カルシニューリンおよび Mpk1 MAP キナーゼ経路が主因子であることを突き止めた¹⁻⁴⁾。実際、*zds1* 破壊株にさらにカルシニューリンあるいは Mpk1 遺伝子を破壊すると Ca²⁺による異常はすべて解消された。そこで、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の効果、即ち、*zds1* 遺伝子欠損株の示す Ca²⁺感受性を抑圧する変異株 (*scz* 変異)を多数取得した。遺伝学的解析の結果、*scz* 変異は 20 相補グループに分類された(表 1)。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、未解明遺伝子の解析を順次進めた。

表 1 相補性グループの結果

Loci	Number of mutants	Allelic to
<i>scz1</i>	187	<i>SWE1</i>
2	70	<i>MPK1</i>
3	58	<i>BCK1</i>
4	6	<i>CNB1</i>
5	6	
6	1	
7	1	<i>SAH1</i>
8	1	
9	1	
10	1	<i>MCK1</i>
11	1	
12	1	
13	1	
⋮	⋮	
20	1	

Mck1(GSK-3 ファミリープロテインキナーゼ)による Hsl1 不安定化による細胞周期遅延誘導

まず *scz10* 変異株の解析を行った。*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。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、Swe1 の阻害制御因子 Hsl1 を負に調節していることが明らかになった。Ca²⁺シグナルの活性化により Hsl1 タンパク質の分解が促進され、Swe1 を安定化すると考えられる。Hsl1 の不安定化には、Mck1 およびカルシニューリンの両経路依存的であった。Hsl1 は自己リン酸化により活性化することが知られるが、活性型 Hsl1 はカルシニューリンにより脱リン酸化反応を受ける。引き続き、Mck1 によりリン酸化を受けることにより、これが Hsl1 の分解シグナルになるものと考えられた。以上の結果から、Hsl1 は Ca²⁺シグナル伝達経路により不活化およびユビキチン化を受け、最終的に SCF^{Cdc4} 経路により分解される。Mck1 の細胞周期制御機構に関する役割を明らかにしたのはこれが初めてである⁸⁾(図 1)。

S-アデノシルメチオニンによる細胞周期制御の発見

次に *scz7* 変異株の解析を行った。*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 *scz7* 変異を *sah1-1* と呼ぶ、図 2)。この変異株は、細胞内に AdoHcy の蓄積と共に S-アデノシルメチオニン(AdoMet)を野生株の 37 倍量も高蓄積することが明らかになった。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ので、AdoHcy 加水分解酵素の変異により AdoHcy が細胞内蓄積し、これが細胞増殖に有害なため、大量の AdoMet を蓄積してこの増殖阻害を回避した結果と考えられる。実際、*sah1-1* 変異株に AdoHcy を培地に加えると *sah1-1* 変異株は増殖停止し、AdoMet を加えると増殖回復が観察されたことから、AdoMet は AdoHcy の毒性を緩和することがわかった。AdoMet (図 3)は、あらゆる生物において、たんぱく質や DNA のメチル化反応のメチル基供与体として、細胞の育成に必須の役割を果たしている。そこで、AdoMet による

細胞周期制御に対する影響を調べたところ、Ca²⁺による細胞周期 G₂ 期進行の阻害を解除する働きがあることを発見した。AdoMet の作用は、細胞周期進行に必須な G₁ サイクリン遺伝子である *CLN2* 遺伝子の発現を減少させることが分かった。さらに AdoMet は、細胞周期 G₁ 期進行を一時的に阻害することを見出した⁹⁾。AdoMet による細胞周期制御が明らかになったのはこれが最初である。AdoMet は、ヒトでは肝臓疾患（肝硬変）、うつ病、骨関節症、アルツハイマー病さらにはガン治療等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を研究することにより、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がある。今後、AdoMet 高生産株を用い、種々の疾患の病因解明やその治療薬の開発、治療改善に役立てていきたい。

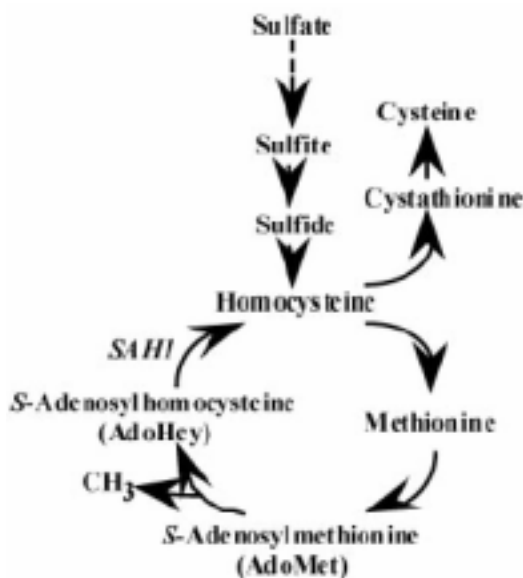
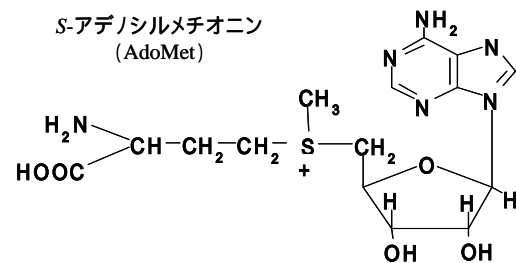


図 2. 細胞内 S-アデノシルメチオニンの生合成経路の概略



AdoMetによる治療が期待されるヒトにおける各種疾患例

- ・アルコール性肝臓疾患
- ・うつ病
- ・骨関節症
- ・アルツハイマー病
- ・ガン

図 3. AdoMet の構造式と治療が期待される疾患

酵母全遺伝子破壊ライブラリーを用いた Ca²⁺シグナル伝達に重要な遺伝子の同定

現在、ポストゲノム時代を迎え、出芽酵母では全遺伝子(約、6,000)が解読されたが、多くの遺伝子は機能未知である。そこで、出芽酵母全遺伝子(非必須遺伝子について)破壊ライブラリーセットを用いることにより、非必須遺伝子について Ca²⁺シグナル伝達に应答欠損を示す遺伝子を網羅的に同定した。方法は、まず野生株よりも強く Ca²⁺耐性を示す破壊株をスクリーニングした。その結果、約、300 個の破壊株が Ca²⁺耐性を示した。この中には取得が予想された *swel* やカルシニューリン(*cnb1*)破壊株が含まれていたため、系としての有効性も示された。さらに取得された遺伝子は、1) Ca²⁺の取り込み 2)極性成長 3)シグナル伝達 4)細胞周期などさまざまな機能に分類される遺伝子が含まれていたことが分かった。このことから、多くの遺伝子が Ca²⁺シグナル伝達に関与することが示唆された。今後は、取得した遺伝子の Ca²⁺シグナル伝達における役割(細胞内 Ca²⁺濃度調節系、細胞形態形成および細胞周期制御機構)を明らかにする。今後、Ca²⁺シグナルの発生から細胞周期制御に至るシグナル伝達機構の解明つまり経路の全貌の解明、本制御系の生理的意義の解明を行う。

謝辞

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細胞システム機能学研究室で行われました。終始格別のご指導とご高配を承りました広島大学大学院先端物質科学研究科、宮川都吉 教授、平田 大 教授に心から感謝致します。また、このプロジェクトに携わった卒業生、在校生、共同研究者の皆様に深く感謝致します。本農学進歩賞にご推薦くださいました社団法人 日本農芸化学会会長、熊谷英彦 先生ならびに学会の諸先生方に深く感謝致します。

引用文献

- 1) Masaki Mizunuma, Dai Hirata, Kohji Miyahara, Eiko Tsuchiya and Tokichi Miyakawa (1998)
Role of calcineurin and Mpk1 in regulating the onset of mitosis in budding yeast.
Nature 392, 303-306.
- 2) 平田 大、水沼 正樹、宮川 都吉(1999)
「新規の細胞周期チェックポイント制御とMAPキナーゼ」 MAPキナーゼ: シグナル伝達の鍵分子、羊土社 実験医学、17, 2, 124-129ページ
- 3) 水沼 正樹、平田 大、宮川 都吉 (2000)
「Ca²⁺シグナルによる細胞周期制御機構」細胞周期研究のフロンティア、羊土社 実験医学、18, 7, 10-15ページ
- 4) 下向 敦範、水沼 正樹、平田 大、宮川 都吉(2003)
ストレス応答のシグナル伝達
清酒酵母・麹研究会、39-46ページ
- 5) Atsunori Shitamukai, Masaki Mizunuma, Dai Hirata, Hidetoshi Takahashi and Tokichi Miyakawa (2000) A positive screening for drugs that specifically inhibit the Ca²⁺-signaling activity on the basis of the growth-promoting effect on a yeast mutant with a peculiar phenotype.
Biosci. Biotech. Biochem. 64, 1942-1946.
- 6) 平田 大、下向 敦範、水沼 正樹、宮川 都吉(2001)
酵母を使った生理活性物質の新規スクリーニング
生物工学会誌、79, 3, 79 ページ
- 7) 下向 敦範、水沼 正樹、平田 大、高橋 英俊、宮川 都吉(2002)
酵母の特殊な変異形質を利用する Ca²⁺シグナル伝達に作用する薬剤のポジティブスクリーニング
日本農芸化学会誌、76, 38-39 ページ
- 8) Masaki Mizunuma, Dai Hirata, Rie Miyaoka and Tokichi Miyakawa (2001)
GSK-3 kinase Mck1 and calcineurin coordinately mediate Hsl1 down-regulation by Ca²⁺ in budding yeast.
EMBO J. 20, 1074-1085.
- 9) Masaki Mizunuma, Kazunori Miyamura, Dai Hirata, Hiroshi Yokoyama, and Tokichi Miyakawa (2004) Involvement of S-adenosylmethionine in G₁ cell-cycle regulation in *Saccharomyces cerevisiae*.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101, 6086-6091.

Analysis of the regulation of cell growth and cell-cycle mediated by Ca²⁺-signaling pathways

Masaki Mizunuma (Hiroshima University, Graduate School of Advanced Sciences of Matter)

mmizu@hiroshima-u.ac.jp