

論文の内容の要旨

論文題目

Systematic analysis of Ca^{2+} -regulatory mechanisms based on chemical-genetic interaction profiles of *Saccharomyces cerevisiae*

(化合物 - 遺伝子間相互作用プロファイルによる出芽酵母 Ca^{2+} 制御機構の網羅的な解析)

氏 名 吉田 光範

【序論】

カルシウムイオン (Ca^{2+}) は細胞内の多様な機構を制御するうえで重要な役割を果たしていると同時に細胞にとって有害にもなりえる。したがって細胞は Ca^{2+} を効率的に細胞内に取り込み、貯蔵する機能と同時に、細胞内 Ca^{2+} 量を一定の範囲内に保つ機能を有している。高濃度 Ca^{2+} 添加培地で生育できない Ca^{2+} 感受性 (*cls*; calcium sensitive) 変異株は当研究室において 62 単離されており (Ohya et al., 1986; Ohnuki et al., 2007)、細胞内における Ca^{2+} 恒常性維持や Ca^{2+} によって制御される細胞機能を解明する重要な手掛かりになってきた。しかしながら、個々の *CLS* 遺伝子がどのように Ca^{2+} 恒常性維持や Ca^{2+} によって制御される細胞機能に関与しているか全てわかっているわけではなく、またそれらの遺伝子機能の相互関係といった、高濃度 Ca^{2+} に対する応答の生命現象をシステムとして理解するための包括的な知見は得られていない。

高濃度 Ca^{2+} で処理した野生型酵母は、その増殖に影響がなくても細胞形態は多様に変化する (Ohnuki et al., 2007)。一方で、*cls* 変異株それぞれは高濃度 Ca^{2+} 存在下で固有の形態変化を示すことが知られ、*cls* 変異株では、変異によって Ca^{2+} に対する応答の一部が変化し、その結果が形態表現型に現れていると考えられてきた。*cls* 変異により変化した Ca^{2+} に対する応答は、*cls* 変異と高濃度 Ca^{2+} の間に固有に見られる関係であることから、 Ca^{2+} と *CLS* 遺伝子間の相互作用として定義できる。本研究では、 Ca^{2+} と *CLS* 遺伝子間の相互作用を、増殖だけでなく形態表現型の面から多次的に捉えることにした。具体的には、*cls* 変異株について通常および高濃度 Ca^{2+} 条件下の細胞形態を画像解析プログラム CalMorph (Ohtani et al., 2004; Ohya et al., 2005) により高次元形態表現型として定量化し、一般化線形モデルを応用することで、正または負の Ca^{2+} -*cls* 変異間相互作用を定量的に評価した。それをもとに、高次元 Ca^{2+} -*cls* 変異間相互作用プロファイルが持つ性質を明らかにするとともに、 Ca^{2+} 応答をベースにした *CLS* 遺伝子の機能分類をおこない、出芽酵母

の高濃度 Ca^{2+} に対する応答の全体像に迫った。さらに、高濃度 Ca^{2+} 応答に必要なタンパク質複合体を構成する個々の因子について、その変異株の Ca^{2+} -*cls* 変異間相互作用を検出することが可能となり、機能未知であった *CLS5* 遺伝子の機能ネットワーク解析からその機能を明らかにした。

【結果と考察】

1. Ca^{2+} -*cls* 変異間相互作用プロファイルに基づく *CLS* 遺伝子の網羅的な解析

1-1. Ca^{2+} -*cls* 変異間相互作用の定量化

Ca^{2+} -*cls* 変異間相互作用を定量化するために、 Ca^{2+} 処理濃度を変数にして形態パラメータ値を説明するモデル式を構築した(図1A)。モデル式には係数として、 β_0 に切片、 x_i に Ca^{2+} 処理濃度、 β_1 に Ca^{2+} 処理の影響、 β_2 に *cls* 変異の影響、 β_3 に Ca^{2+} -*cls* 変異間相互作用の影響、 γ_i は交絡因子の影響、 ε_i に測定誤差をそれぞれ設定した。野生型株および 62 *cls* 変異株の通常条件および高濃度 Ca^{2+} 条件下における細胞形態データを用いて、各 *cls* 変異株の各形態パラメータについてモデル式の係数を最尤法により推定した。 Ca^{2+} -*cls* 変異間相互作用を仮定したモデルと仮定していないモデルの間の尤度比検定から、209 の形態パラメータにおいて 62 *cls* 変異株のいずれかで有意な相互作用が検出されることがわかった($P < 0.05$)。次に、209 パラメータそれぞれにおいて、野生型を Ca^{2+} 処理したときのパラメータ値の変化の程度を表す Z 値の符号と、各 *cls* 変異株の Ca^{2+} -*cls* 変異間相互作用の程度を表す Z 値の符号の関係から、正(表現型を回復させる)および負(表現型を悪化させる)の Ca^{2+} -*cls* 変異間相互作用を定義した(図 1B)。この定義に基づき、62 *cls* 変異株それぞれで 209 次元の正または負の Ca^{2+} -*cls* 変異間相互作用の組み合わせからなるプロファイルを作成した。

1-2. 高次元 Ca^{2+} -*cls* 変異間相互作用プロファイルに基づく 62 *cls* 変異株のクラスタリング解析

はじめに、62 *cls* 変異株において、 Ca^{2+} -*cls* 変異間相互作用プロファイル間の相関係数に基づく階層クラスタリングを行ったところ、62 中 49 (79%) の *cls* 変異株 が 9 つのクラスに分かれた(図 2)。そのうち 6 クラスでは、既知の機能的に関連する遺伝子の変異株が集まっていた。放射性同位体 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ を用いて細胞内 Ca^{2+} 含有量を調べた結果、クラス I の *cls* 変異株は *vma22* 変異株を除く 16 株で野生型に比べて減少し、逆にクラス II では全 5 株で増加していた。クラス I は液胞に局在するプロトン輸送性 ATPase (V-ATPase) のサブユニットで構成され、変異株では液胞の酸性化が阻害され、液胞内に Ca^{2+} を貯蔵できなくなった結果として Ca^{2+} 含有量の低下を示すと考えられた。また、クラス II の変異株には共通して液胞の断片化が見られ、クラス II の Ca^{2+} 恒常性異常は液胞の形態形成異常によるものと考えられた。各 *cls* 変異株において有意に検出される Ca^{2+} -*cls* 変異間相互作用数は、クラス I、II および IV の *cls* 変異株で多く、逆にクラス VIII の *cls* 変異株で少なかった。クラス I、II および IV の *cls* 変異は高濃度 Ca^{2+} 存在下における細胞形態に大きな影響を与えることから、それらの遺伝子機能は高濃度 Ca^{2+} に対する応答において重要な役割をもつと考えられた。その他にも、各クラスは機能に関連する特徴でまとまっていたことから、クラスタリング解析によって細胞内 Ca^{2+} 恒常性維持や Ca^{2+} によって制御される機構の機能ユニットが 9 つ同定でき、また同時に Ca^{2+} -*cls* 変異間相互作用プロファイルの特徴に各ユニットの機能に関する情報が現れていることが示唆された。

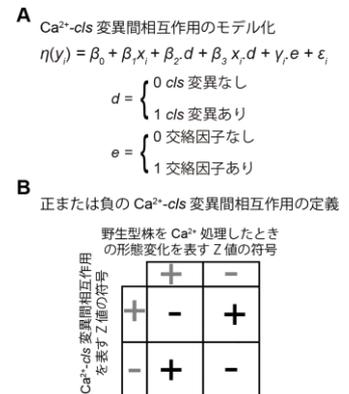


図 1. Ca^{2+} -*cls* 相互作用のモデル化。A. Ca^{2+} -*cls* 変異間相互作用を定量化するための重回帰式。B. 正または負の Ca^{2+} -*cls* 変異間相互作用の定義。

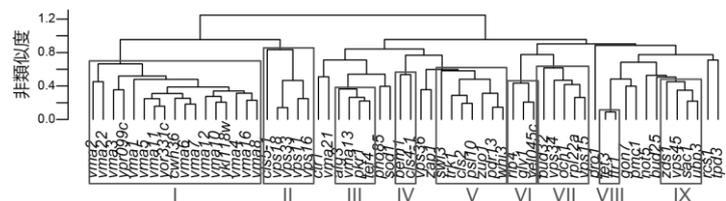


図 2. Ca^{2+} -*cls* 変異間相互作用プロファイルの類似度に基づくクラスター解析。クラス I から IX は、マルチブートストラップ法により 3000 回試行したうち 95% 以上再現した ($AU P > 0.95$)

1-3. *cls* 変異株に対するカルシニューリン阻害剤 FK506 の効果

細胞質 Ca^{2+} の主要な標的であるカルモジュリンは、細胞質 Ca^{2+} と結合し、タンパク質フォスファターゼの一つであるカルシニューリンの活性化を通して様々な応答を引き起こす。カルシニューリン経路が高濃度 Ca^{2+} に対する細胞の応答にどのように関与するかを調べるために、カルシニューリン特異的な阻害剤である FK506 存在下で 62 *cls* 変異株の Ca^{2+} 感受性を調べた。62 中 40 の *cls* 変異株では FK506 存在下で Ca^{2+} 感受性が強められ、逆に 13 の *cls* 変異株では FK506 存在下で Ca^{2+} 感受性が弱められた (図 3A に例示)。各 *cls* 変異株の Ca^{2+} 含有量から、細胞内 Ca^{2+} 恒常性を保つことができない *cls* 変異株は FK506 存在下で Ca^{2+} 感受性が強められる傾向にあることがわかった。また、クラス I、II、III の *cls* 変異株はすべて FK506 存在下で Ca^{2+} 感受性が強められ、逆にクラス IV、VI、VIII の *cls* 変異体はすべて Ca^{2+} 感受性が弱められた。さらに、 Ca^{2+} -*cls* 変異間相互作用プロファイルの主成分分析から、FK506 の効果の違いが第一主成分および第二主成分の相関の高い Ca^{2+} -*cls* 変異間相互作用に現れていた (図 3B)。これらの結果から、カルシウム恒常性維持、カルシニューリンの効果、および機能ユニットの 3 者には関係性があり、各機能ユニットに対するカルシニューリンの効果の違いは、機能ユニットの細胞内における役割の違いを反映していると考えられた。

1-4. 出芽酵母の細胞内 Ca^{2+} 制御ネットワークの全体像

クラスタリング解析により同定された機能ユニット間に見られる相互関係を理解するために、 Ca^{2+} -*cls* 変異間相互作用プロファイルの類似度に基づくネットワークを構築した。ネットワークには、本研究で明らかになった各機能ユニットに対する FK506 の効果の違い、各 *CLS* 遺伝子の高濃度 Ca^{2+} 応答における重要度に見立てた Ca^{2+} -*cls* 変異間相互作用数、および出芽酵母のデータベース SGD から得られるタンパク質の局在情報を反映させた。クラス III から IX の Ca^{2+} -*cls* 変異間相互作用プロファイルの間には正の相関が見られる傾向にあり、クラス I および II のプロファイルは他の機能ユニットのプロファイルとの間に負の相関が見られる傾向にあった。この結果から、クラス I (V-ATPase) および II (C-VPS) は高濃度 Ca^{2+} に対する応答における他の機能ユニットにはない機能を有していることが予想された。

2. 出芽酵母プロフィリンの機能ネットワーク解析

2-1. Ca^{2+} 感受性を示すプロフィリン関連遺伝子の同定

全 62 *cls* 変異株のクラスタリング解析から、*cls5* 変異株はクラス II に分類され (図 2)、 Ca^{2+} 含有量の測定からクラス II は Ca^{2+} 恒常性維持に関与していることが示唆された。しかしながら、*cls5* 変異株の高濃度 Ca^{2+} 条件下における特徴的な形態変化は、クラス II を構成する 5 つの *cls* 変異株で完全に一致しているわけではなく、*cls5* 変異株の恒常性異常と高濃度 Ca^{2+} 存在下における特徴的な形態変化の関係は不明であった。*cls5* 変異株は、 Ca^{2+} 特異的に感受性を示し (Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} および浸透圧ストレスには感受性を示さない)、

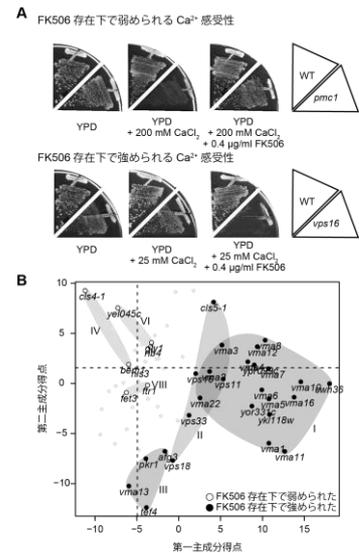


図 3. 各機能ユニットに対する FK506 の効果の違い. A. *cls* 変異株における FK506 存在下で強められた、または弱められた Ca^{2+} 感受性の例. B. Ca^{2+} -*cls* 変異間相互作用プロファイルの主成分分析. 第一および第二主成分の主成分得点で表される各 *cls* 変異株に FK506 の効果の違いをマッピングした.

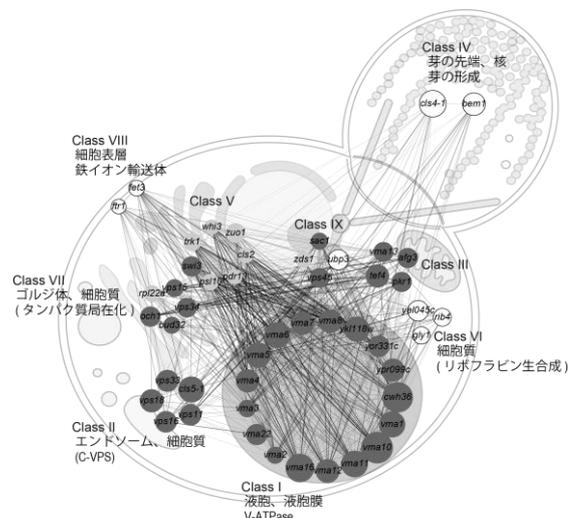


図 4. 細胞内 Ca^{2+} 制御ネットワークの全体像. 各ノードは *cls* 変異株を表す. 62 *cls* 変異株のすべての組み合わせで Ca^{2+} -*cls* 変異間相互作用プロファイルの類似度を、ピアソンの相関係数により計算した. 濃灰色のノードは FK506 存在下で Ca^{2+} 感受性が強められ、白抜き色のノードは FK506 存在下で Ca^{2+} 感受性が弱められ、薄灰色のノードは FK506 存在下で Ca^{2+} 感受性が変化しなかった *cls* 変異株をそれぞれ表す. ノードの大きさは検出された Ca^{2+} -*cls* 変異間相互作用数に比例している. Ca^{2+} -*cls* 変異間相互作用プロファイルの相関係数の絶対値が 0.2 以上の変異株を線で結び、薄灰および黒色の線は正および負の相関をそれぞれ表す.

細胞内 Ca^{2+} 含有量が野生型に比べて高いことに加えて、高濃度 Ca^{2+} 条件下で細胞が大きくなるという特徴的な表現型を示す。遺伝学的な解析から、*cls5* 変異株は *PFY1* 遺伝子に点変異をもち、アクチン結合タンパク質の一つであるプロフィリン(Pfy1p)は出芽酵母の生育に必須であることが示されている。出芽酵母 Pfy1p が関与する Ca^{2+} によって制御される機構は明らかになっておらず、*cls5* 変異株の解析によって Ca^{2+} 制御機構に関する新たな知見が得られることが期待された。

出芽酵母 Pfy1p は細胞内でさまざまなリガンドと結合することが知られている。それらの中でのタンパク質との結合が *cls5* 変異株の Ca^{2+} 感受性に関係しているか調べるために、出芽酵母のデータベース SGD で Pfy1p と物理的相互作用 (Pfy1p と直接または二次の物理的相互作用) が報告されているタンパク質の遺伝子変異株 114 種類について高濃度 Ca^{2+} 添加固体培地上の生育を調べた。Pfy1p と直接結合するタンパク質では Bni1p および Bem1p、また Bni1p および Bem1p と結合するタンパク質では、Rho1p、Cla4p および Cdc24p の変異株 (*bni1*、*bem1*、*rho1-2*、*cla4*、および *cls4* 変異株)で *cls5* 変異株と同様に Ca^{2+} に特異的に感受性を示した。これらの結果から、Pfy1p が関与する Ca^{2+} によって制御される機構では、Bni1p、Bem1p、Rho1p、Cla4p、および Cdc24p も協調して機能していることが示唆された。

2-2. 細胞内 Ca^{2+} 含有量と高濃度 Ca^{2+} 条件下における特徴的な細胞形態に着目したプロフィリンの機能ネットワーク解析

cls5 変異株の特徴的な表現型の一つは、 Ca^{2+} 恒常性異常であったことから、Pfy1p と物理的相互作用を持つ 5 つのタンパク質が Ca^{2+} 恒常性の維持に関与しているかどうかを調べた。それらの遺伝子の変異株について細胞内 Ca^{2+} 含有量を測定したところ、*bni1*、*bem1*、*rho1-2* および *cla4* 変異株において野生型株と比較して上昇していたが、*cls4* 変異株においては野生型株と差が見られなかった。これらの結果から、Pfy1p に加えて Bem1p、Bni1p、Rho1p、Cla4p は Ca^{2+} 恒常性の維持に関与しているが、Cdc24p は関与していないことが示唆された。

次に、野生型株および 6 つの変異株において、通常条件および高濃度 Ca^{2+} 条件下における細胞形態情報を、CalMorph を用いて新たに取得し、1-1.と同様の方法で各 *cls* 変異株の Ca^{2+} -*cls* 変異間相互作用を定量化した。Pfy1p 関連遺伝子の変異株のなかでは、*cls5* 変異株の Ca^{2+} -*cls* 変異間相互作用プロファイルは、他の変異株よりも *bem1* および *cls4* 変異株のプロファイルに類似しており(図 5)、3 者に共通して、高濃度 Ca^{2+} 存在下において細胞サイズの増大、アクチンの脱局在および出芽率の低下が見られた。これらの結果から Pfy1p、Bem1p および Cdc24p は高濃度 Ca^{2+} 条件下における細胞極性の形成および出芽に関与していると考えられた。*cls4* 変異株では細胞内 Ca^{2+} 含有量の上昇が見られないことから、Pfy1p は Ca^{2+} 恒常性維持と高濃度 Ca^{2+} 条件下における細胞極性形成・出芽の 2 つの独立した細胞機能に関わっていると考えられ、それぞれで Pfy1p と共に働くタンパク質が明らかになった(図 6)。

【結論】

本研究では、 Ca^{2+} -*cls* 変異間相互作用を高次元形態表現型から検出し、*cls* 変異株の Ca^{2+} 応答をベースにした解析から以下の結果を得た。(1) 相互作用プロファイルのクラスタリング解析から 9 つの Ca^{2+} 制御ネットワークの機能ユニットの同定、(2)各機能ユニットに対するカルシニューリンの異なる機能、(3) システムレベルでの細胞内 Ca^{2+} 制御ネットワークの全体像、(4)出芽酵母の生育に必須なプロフィリンの Ca^{2+} 恒常性維持および細胞極性形成・出芽への関与。

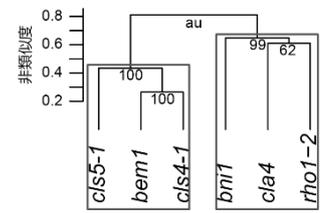


図 5. Ca^{2+} -*cls* 変異間相互作用プロファイルの類似度に基づくクラスタリング解析. マルチブートストラップ法 (AU $P > 0.95$)

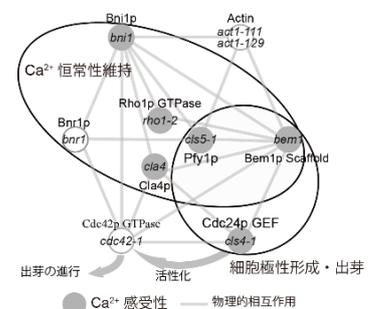


図 6. プロフィリンと物理的相互作用を持つタンパク質のネットワーク. タンパク質間をつなぐ線は物理的相互作用を示す。濃灰色の円に対応する遺伝子の変異株は Ca^{2+} 感受性を示した。