

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—

宮川都志¹⁾・中村太郎²⁾・平田 大¹⁾

カルシニューリンは、酵母の通常の増殖には必須でなかったが、細胞内イオンのホメオスタシスに関与し、ある種のイオンが関係するストレス条件下の増殖には必要であった。高NaClを含む培地では、細胞内Na⁺が上昇しK⁺が低下するが、これに抗してイオン濃度を正常化するのにカルシニューリンが必要であった。興味深いことに、この系はT細胞活性化のプロセス同様、免疫抑制剤FK506感受性で、阻害にはFK506結合蛋白質FKBPが必要であった。カルシニューリンを介するシグナル伝達系のFK506による阻害機構は、酵母から高等動物まで非常に保存性が高いと考えられる。

はじめに 細胞内のカルシウムイオン (Ca²⁺) は細胞周期、ホルモン分泌、筋収縮、グリコーゲン代謝、受精、イオン輸送など真核細胞におけるさまざまなプロセスの調節に重要な役割を果たしている。細胞内のCa²⁺濃度は通常2~4×10⁻⁷Mときわめて低く維持されているが、細胞外からの流入あるいは細胞内プールからの動員により、細胞内の遊離Ca²⁺濃度が一時的に急上昇することが一連の応答の引き金になっていると考えられている¹⁾。Ca²⁺シグナル伝達の媒体として重要な蛋白質にカルモジュリン(CaM)がある。CaMは分子量約17Kの酸性蛋白質で、真核生物に普遍的に存在する保存

性の高いCa²⁺結合蛋白質である。動物細胞には数多くのCa²⁺/CaM依存性の活性が知られており、Ca²⁺/CaMはこれらの標的蛋白質との相互作用を通じて細胞機能調節にかかわっていると考えられている^{2,3)}。これらの蛋白質の生理機能はまだほとんど明らかになっていない。酵母の細胞内Ca²⁺濃度も動物細胞と同程度の濃度に維持されており、*Saccharomyces cerevisiae*と*Schizosaccharomyces pombe*では、CaMが増殖

に必須なことが明らかにされている⁵⁻⁷⁾。CaMがCaM結合蛋白質の機能調節を通じて細胞機能をどのように制御しているかは大変興味深い。酵母のCa²⁺/CaM結合蛋白質の機能を解析することにより、Ca²⁺/CaMによるシグナル伝達系が明らかになると期待される。酵母にも多種のCaM結合蛋白質が存在する⁸⁾。そこで、CaM結合蛋白質をコードする酵母遺伝子のクローニングとその解析を行なった。

I. CaM結合蛋白質遺伝子のクローニング⁹⁾

CaMにより活性化される各種酵素の解析から、CaMは約20個のアミノ酸からなる両親媒性αヘリックスCa²⁺依存時に結合することが明らかにされている。この機能を利用したCaM結合蛋白質遺伝子のスクリーニング法を開発し、クローニングを行なった。スクリーニングとして、Ca²⁺依存的に¹²⁵I標識CaMを結合剤を選択した。この方法により、CaM結合

Tokichi Miyakawa, Taro Nakamura, Dai Hirata, 広島大学工学部 (〒724 東広島市鏡山1-4-1) [Department of Fermentation Technology, Hiroshima University, Higashi-Hiroshima 724, Japan]

Calcineurin-Mediated Adaptation to Salt Stress in Yeast

Key words 【カルシニューリン】【イオンホメオスタシス】【免疫抑制剤】【*Saccharomyces cerevisiae*】

する結合蛋白質が検出できる。得られたファージを大腸菌に感染させて熱誘導により生産される融合蛋白質が、実際に CaM を結合することが SDS ゲル電気泳動により確認された。得られた 2 種クローンについて塩基配列の決定を行なったところ、いずれも CaM 結合領域と予想される配列を含んでいたので *CMPI* および *CAP2* と名づけた。1,162 bp の ORF を含む *CAP1* は分子量 63 K の、また 1,812 bp の ORF を含む *CAP2* は分子量 69 K のの蛋白質をコードしていた。予想されるアミノ酸配列は、おのおの 23 個のアミノ酸からなる CaM 結合領域と推定される両親媒性 α ヘリックスの特徴的なモチーフが存在した。*CAP1* および *CAP2* 遺伝子産物間のアミノ酸の同一性は 65% で、いずれも全長にわたり哺乳類のカルシニューリン (2B 型プロテインホスファターゼ; PP2B) (図 1) の触媒サブユニットと高い

よび Cmp2p との融合蛋白質により、ウサギを免疫して抗 Cmp1p および抗 Cmp2p 抗体を作製した。この抗体を利用した酵母蛋白質のウェスタンブロッティングにより、62 K および 64 K の蛋白質が検出された(図 3)。また、¹²⁵I 標識 CaM によるゲルオーバーレイ法によって、これらの蛋白質が実際に CaM 結合蛋白質であることを確認した (図 4)。

PP2B はとくに脳神経系の組織に多く含まれ、カルシニューリンともよばれている¹³⁾。カルシニューリンは図 1 に示すように、触媒サブユニット (A) と調節サブユニット (B) からなる。B サブユニットもまた Ca²⁺ 結合蛋白質であるので、触媒サブユニットは 2 種類の Ca²⁺ 結合蛋白質により活性の調節を受けると予想されるが、2 段階の調節の生理的意義などは明らかでない。また A 鎖の C 末端付近もとくに保存性が高く、内性の

阻害領域と予想されている。酵母では、ほかの型のプロテインホスファターゼが強いために Ca²⁺ 依存性プロテインホスファターゼの活性測定は困難で、酵母に PP2B が存在するかが明らかでなかった。そこで、細胞抽出液に DEAE セルロースカラムクロマトグラフィー、CM-Cellulose クロマトグラフィーおよびペリオド硫酸スクロマトグラフィーにより分画し (抽出)、ホスファターゼ活性を測定した。活性化したカゼインから遊離する ³²P により測定した結果、Ca²⁺/CaM により約 10 倍活性化されるホスファターゼが検出された (図 5)。この活性は酵母由来のホスファターゼ (PP1 および PP2A) が感ずる 0.1 μ M のオカダ酸ではほとんど阻害されない性質は、動物由来の PP2B が PP1 および PP2A すべてオカダ酸に対する感受性がはるかに低くよく一致している。

大腸菌に生産させた β -ガラクトシダーゼと Cmp1p お

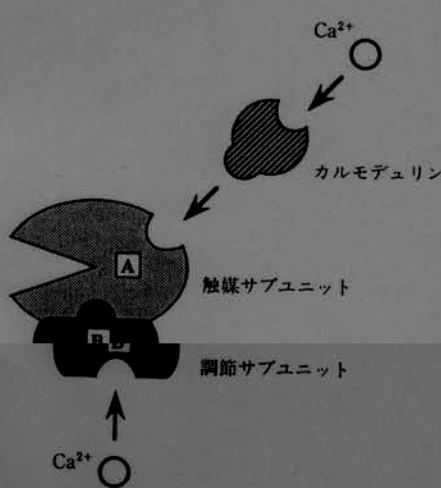


図 1. 哺乳動物の PP2B(カルシニューリン)のサブユニット構造

II. PP2B の生理機能の解析^{9,14,15)}

PP2B の生理機能を理解するために、A 鎖 (触媒サブユニット) をコードする遺伝子の破壊株、*Δcnp2*, *Δcnp1* *Δcnp2*) を構築し、変異の影響を調べた。酵母の PP2B は、高等動物と構造的および機能的に非常に類似している。Ca²⁺ が関与する細胞の基本機能にかかわることが期待され、遺伝子破壊は通常の生育に重大な影響を与えるものと予想した。しかし、*Δcnp1* *Δcnp2* 二重

CMP1 MSKDLNSSRRIKIKPNDSYIKVDRKKDL 28
 CMP2 MSSDAIRNTEQINAAIKIIENKTERPQSSSTTPIDSKASTYAAANS-TATETSRL 54

 CNAa MSEPKAIDPKLSTTDRYVKAVPFPPSHRLTAKEVFD-NDGKPRVDILKHALMKEGRLEES 29
 CMP1 TKYELENGKVLSTKDRPLASVPAITGKIFSDVEEVD₁SKTGLPNIISFLREHFII₂EGRLSKE 88
 CMP2 ₁DAWTL₂LSL₃

CMP1 VDRGAFSFECLITYLSLKLNNLGHFVLLRGNHECKHLTSYFTPKNEMLHKYDMENYDAGC 203
 CMP2 VDRGAFSFECLITYLSLKLNDV₁FLLRGNHECKHLTSYFTPKNEMLRKY₂MLD₃IV₄ENCC 233

 CNAa DSFDCLPLAALMNGQVLCVHGGISPELNSLIDIRKLDRFKPEPPAYT₁PMCDL₂LV₃DPLEDF 239
 CMP1 DSEKYLPLAALMNGQVLCVHGGISPELNSYEDV₁HN₂HR₃PREIPSRGL₄NCDLLVADIV₅ENY 268
 CMP2 ₁ES₂PH₃IC₄FAALMNGQYLCVHGGISPELNSL₅Q₆Q₇INN₈LHR₉PREIP₁₀SH₁₁GL₁₂NCDLLVAD₁₃IV₁₄EEY 293

 CNAa GREK-----TQHFTHNIVRGCSYFYSYPAVCGDFLQHN₁NL 2
 CMP1 D₁AR---D₂GS₃E₄FD₅Q-----SEDEFVPSLRGCSFA₁FT₂ER₃AS₄CG₅FL₆K₇ANGL 3
 CMP2 ₁INF₂V₃L₄Q₅Q₆DI₇TE₈FD₉LV₁₀NS₁₁K₁₂IN₁₃W₁₄Y₁₅PR₁₆R₁₇G₁₈K₁₉W₂₀PS₂₁RD₂₂PF₂₃V₂₄PS₂₅Y₂₆RG₂₇CS₂₈Y₂₉AT₃₀Y₃₁RR₃₂AC₃₃PL₃₄Q₃₅E₃₆IGL 4

CNAa LSI₁IRAEAAQDAGYRMY₂RS₃Q₄TTG₅PPSLIT₆IFSAPNYLDV₇YNNKAAVLYENVMNIRQF 334
 CMP1 LSI₁IRAEAAQDAGYRMYK₂NR₃K₄V₅TG₆PPSLIT₇IFSAPNYLD₈TY₉NNKAAVLYE₁₀ENVMNIRQF 370
 CMP2 LSI₁IRAEAAQDAGYRMYK₂NT₃LG₄PPSLIT₅IFSAPNYLD₆TY₇NNKAA₈IL₉KYENVMNIRQF 412

CNAa NCSPRPYWL₁PF₂NDVFTWSL₃PFVGEKVTENLV₄NYL₅LNICSD₆DELGSE₇EDGFDGATAA--- 391
 CMP1 ₁HW₂SY₃TY₄W₅L₆Y₇W₈Y₉W₁₀Y₁₁W₁₂Y₁₃W₁₄Y₁₅W₁₆Y₁₇W₁₈Y₁₉W₂₀Y₂₁W₂₂Y₂₃W₂₄Y₂₅W₂₆Y₂₇W₂₈Y₂₉W₃₀Y₃₁W₃₂Y₃₃W₃₄Y₃₅W₃₆Y₃₇W₃₈Y₃₉W₄₀Y₄₁W₄₂Y₄₃W₄₄Y₄₅W₄₆Y₄₇W₄₈Y₄₉W₅₀Y₅₁W₅₂Y₅₃W₅₄Y₅₅W₅₆Y₅₇W₅₈Y₅₉W₆₀Y₆₁W₆₂Y₆₃W₆₄Y₆₅W₆₆Y₆₇W₆₈Y₆₉W₇₀Y₇₁W₇₂Y₇₃W₇₄Y₇₅W₇₆Y₇₇W₇₈Y₇₉W₈₀Y₈₁W₈₂Y₈₃W₈₄Y₈₅W₈₆Y₈₇W₈₈Y₈₉W₉₀Y₉₁W₉₂Y₉₃W₉₄Y₉₅W₉₆Y₉₇W₉₈Y₉₉W₁₀₀Y₁₀₁W₁₀₂Y₁₀₃W₁₀₄Y₁₀₅W₁₀₆Y₁₀₇W₁₀₈Y₁₀₉W₁₁₀Y₁₁₁W₁₁₂Y₁₁₃W₁₁₄Y₁₁₅W₁₁₆Y₁₁₇W₁₁₈Y₁₁₉W₁₂₀Y₁₂₁W₁₂₂Y₁₂₃W₁₂₄Y₁₂₅W₁₂₆Y₁₂₇W₁₂₈Y₁₂₉W₁₃₀Y₁₃₁W₁₃₂Y₁₃₃W₁₃₄Y₁₃₅W₁₃₆Y₁₃₇W₁₃₈Y₁₃₉W₁₄₀Y₁₄₁W₁₄₂Y₁₄₃W₁₄₄Y₁₄₅W₁₄₆Y₁₄₇W₁₄₈Y₁₄₉W₁₅₀Y₁₅₁W₁₅₂Y₁₅₃W₁₅₄Y₁₅₅W₁₅₆Y₁₅₇W₁₅₈Y₁₅₉W₁₆₀Y₁₆₁W₁₆₂Y₁₆₃W₁₆₄Y₁₆₅W₁₆₆Y₁₆₇W₁₆₈Y₁₆₉W₁₇₀Y₁₇₁W₁₇₂Y₁₇₃W₁₇₄Y₁₇₅W₁₇₆Y₁₇₇W₁₇₈Y₁₇₉W₁₈₀Y₁₈₁W₁₈₂Y₁₈₃W₁₈₄Y₁₈₅W₁₈₆Y₁₈₇W₁₈₈Y₁₈₉W₁₉₀Y₁₉₁W₁₉₂Y₁₉₃W₁₉₄Y₁₉₅W₁₉₆Y₁₉₇W₁₉₈Y₁₉₉W₂₀₀Y₂₀₁W₂₀₂Y₂₀₃W₂₀₄Y₂₀₅W₂₀₆Y₂₀₇W₂₀₈Y₂₀₉W₂₁₀Y₂₁₁W₂₁₂Y₂₁₃W₂₁₄Y₂₁₅W₂₁₆Y₂₁₇W₂₁₈Y₂₁₉W₂₂₀Y₂₂₁W₂₂₂Y₂₂₃W₂₂₄Y₂₂₅W₂₂₆Y₂₂₇W₂₂₈Y₂₂₉W₂₃₀Y₂₃₁W₂₃₂Y₂₃₃W₂₃₄Y₂₃₅W₂₃₆Y₂₃₇W₂₃₈Y₂₃₉W₂₄₀Y₂₄₁W₂₄₂Y₂₄₃W₂₄₄Y₂₄₅W₂₄₆Y₂₄₇W₂₄₈Y₂₄₉W₂₅₀Y₂₅₁W₂₅₂Y₂₅₃W₂₅₄Y₂₅₅W₂₅₆Y₂₅₇W₂₅₈Y₂₅₉W₂₆₀Y₂₆₁W₂₆₂Y₂₆₃W₂₆₄Y₂₆₅W₂₆₆Y₂₆₇W₂₆₈Y₂₆₉W₂₇₀Y₂₇₁W₂₇₂Y₂₇₃W₂₇₄Y₂₇₅W₂₇₆Y₂₇₇W₂₇₈Y₂₇₉W₂₈₀Y₂₈₁W₂₈₂Y₂₈₃W₂₈₄Y₂₈₅W₂₈₆Y₂₈₇W₂₈₈Y₂₈₉W₂₉₀Y₂₉₁W₂₉₂Y₂₉₃W₂₉₄Y₂₉₅W₂₉₆Y₂₉₇W₂₉₈Y₂₉₉W₃₀₀Y₃₀₁W₃₀₂Y₃₀₃W₃₀₄Y₃₀₅W₃₀₆Y₃₀₇W₃₀₈Y₃₀₉W₃₁₀Y₃₁₁W₃₁₂Y₃₁₃W₃₁₄Y₃₁₅W₃₁₆Y₃₁₇W₃₁₈Y₃₁₉W₃₂₀Y₃₂₁W₃₂₂Y₃₂₃W₃₂₄Y₃₂₅W₃₂₆Y₃₂₇W₃₂₈Y₃₂₉W₃₃₀Y₃₃₁W₃₃₂Y₃₃₃W₃₃₄Y₃₃₅W₃₃₆Y₃₃₇W₃₃₈Y₃₃₉W₃₄₀Y₃₄₁W₃₄₂Y₃₄₃W₃₄₄Y₃₄₅W₃₄₆Y₃₄₇W₃₄₈Y₃₄₉W₃₅₀Y₃₅₁W₃₅₂Y₃₅₃W₃₅₄Y₃₅₅W₃₅₆Y₃₅₇W₃₅₈Y₃₅₉W₃₆₀Y₃₆₁W₃₆₂Y₃₆₃W₃₆₄Y₃₆₅W₃₆₆Y₃₆₇W₃₆₈Y₃₆₉W₃₇₀Y₃₇₁W₃₇₂Y₃₇₃W₃₇₄Y₃₇₅W₃₇₆Y₃₇₇W₃₇₈Y₃₇₉W₃₈₀Y₃₈₁W₃₈₂Y₃₈₃W₃₈₄Y₃₈₅W₃₈₆Y₃₈₇W₃₈₈Y₃₈₉W₃₉₀Y₃₉₁W₃₉₂Y₃₉₃W₃₉₄Y₃₉₅W₃₉₆Y₃₉₇W₃₉₈Y₃₉₉W₄₀₀Y₄₀₁W₄₀₂Y₄₀₃W₄₀₄Y₄₀₅W₄₀₆Y₄₀₇W₄₀₈Y₄₀₉W₄₁₀Y₄₁₁W₄₁₂Y₄₁₃W₄₁₄Y₄₁₅W₄₁₆Y₄₁₇W₄₁₈Y₄₁₉W₄₂₀Y₄₂₁W₄₂₂Y₄₂₃W₄₂₄Y₄₂₅W₄₂₆Y₄₂₇W₄₂₈Y₄₂₉W₄₃₀Y₄₃₁W₄₃₂Y₄₃₃W₄₃₄Y₄₃₅W₄₃₆Y₄₃₇W₄₃₈Y₄₃₉W₄₄₀Y₄₄₁W₄₄₂Y₄₄₃W₄₄₄Y₄₄₅W₄₄₆Y₄₄₇W₄₄₈Y₄₄₉W₄₅₀Y₄₅₁W₄₅₂Y₄₅₃W₄₅₄Y₄₅₅W₄₅₆Y₄₅₇W₄₅₈Y₄₅₉W₄₆₀Y₄₆₁W₄₆₂Y₄₆₃W₄₆₄Y₄₆₅W₄₆₆Y₄₆₇W₄₆₈Y₄₆₉W₄₇₀Y₄₇₁W₄₇₂Y₄₇₃W₄₇₄Y₄₇₅W₄₇₆Y₄₇₇W₄₇₈Y₄₇₉W₄₈₀Y₄₈₁W₄₈₂Y₄₈₃W₄₈₄Y₄₈₅W₄₈₆Y₄₈₇W₄₈₈Y₄₈₉W₄₉₀Y₄₉₁W₄₉₂Y₄₉₃W₄₉₄Y₄₉₅W₄₉₆Y₄₉₇W₄₉₈Y₄₉₉W₅₀₀Y₅₀₁W₅₀₂Y₅₀₃W₅₀₄Y₅₀₅W₅₀₆Y₅₀₇W₅₀₈Y₅₀₉W₅₁₀Y₅₁₁W₅₁₂Y₅₁₃W₅₁₄Y₅₁₅W₅₁₆Y₅₁₇W₅₁₈Y₅₁₉W₅₂₀Y₅₂₁W₅₂₂Y₅₂₃W₅₂₄Y₅₂₅W₅₂₆Y₅₂₇W₅₂₈Y₅₂₉W₅₃₀Y₅₃₁W₅₃₂Y₅₃₃W₅₃₄Y₅₃₅W₅₃₆Y₅₃₇W₅₃₈Y₅₃₉W₅₄₀Y₅₄₁W₅₄₂Y₅₄₃W₅₄₄Y₅₄₅W₅₄₆Y₅₄₇W₅₄₈Y₅₄₉W₅₅₀Y₅₅₁W₅₅₂Y₅₅₃W₅₅₄Y₅₅₅W₅₅₆Y₅₅₇W₅₅₈Y₅₅₉W₅₆₀Y₅₆₁W₅₆₂Y₅₆₃W₅₆₄Y₅₆₅W₅₆₆Y₅₆₇W₅₆₈Y₅₆₉W₅₇₀Y₅₇₁W₅₇₂Y₅₇₃W₅₇₄Y₅₇₅W₅₇₆Y₅₇₇W₅₇₈Y₅₇₉W₅₈₀Y₅₈₁W₅₈₂Y₅₈₃W₅₈₄Y₅₈₅W₅₈₆Y₅₈₇W₅₈₈Y₅₈₉W₅₉₀Y₅₉₁W₅₉₂Y₅₉₃W₅₉₄Y₅₉₅W₅₉₆Y₅₉₇W₅₉₈Y₅₉₉W₆₀₀Y₆₀₁W₆₀₂Y₆₀₃W₆₀₄Y₆₀₅W₆₀₆Y₆₀₇W₆₀₈Y₆₀₉W₆₁₀Y₆₁₁W₆₁₂Y₆₁₃W₆₁₄Y₆₁₅W₆₁₆Y₆₁₇W₆₁₈Y₆₁₉W₆₂₀Y₆₂₁W₆₂₂Y₆₂₃W₆₂₄Y₆₂₅W₆₂₆Y₆₂₇W₆₂₈Y₆₂₉W₆₃₀Y₆₃₁W₆₃₂Y₆₃₃W₆₃₄Y₆₃₅W₆₃₆Y₆₃₇W₆₃₈Y₆₃₉W₆₄₀Y₆₄₁W₆₄₂Y₆₄₃W₆₄₄Y₆₄₅W₆₄₆Y₆₄₇W₆₄₈Y₆₄₉W₆₅₀Y₆₅₁W₆₅₂Y₆₅₃W₆₅₄Y₆₅₅W₆₅₆Y₆₅₇W₆₅₈Y₆₅₉W₆₆₀Y₆₆₁W₆₆₂Y₆₆₃W₆₆₄Y₆₆₅W₆₆₆Y₆₆₇W₆₆₈Y₆₆₉W₆₇₀Y₆₇₁W₆₇₂Y₆₇₃W₆₇₄Y₆₇₅W₆₇₆Y₆₇₇W₆₇₈Y₆₇₉W₆₈₀Y₆₈₁W₆₈₂Y₆₈₃W₆₈₄Y₆₈₅W₆₈₆Y₆₈₇W₆₈₈Y₆₈₉W₆₉₀Y₆₉₁W₆₉₂Y₆₉₃W₆₉₄Y₆₉₅W₆₉₆Y₆₉₇W₆₉₈Y₆₉₉W₇₀₀Y₇₀₁W₇₀₂Y₇₀₃W₇₀₄Y₇₀₅W₇₀₆Y₇₀₇W₇₀₈Y₇₀₉W₇₁₀Y₇₁₁W₇₁₂Y₇₁₃W₇₁₄Y₇₁₅W₇₁₆Y₇₁₇W₇₁₈Y₇₁₉W₇₂₀Y₇₂₁W₇₂₂Y₇₂₃W₇₂₄Y₇₂₅W₇₂₆Y₇₂₇W₇₂₈Y₇₂₉W₇₃₀Y₇₃₁W₇₃₂Y₇₃₃W₇₃₄Y₇₃₅W₇₃₆Y₇₃₇W₇₃₈Y₇₃₉W₇₄₀Y₇₄₁W₇₄₂Y₇₄₃W₇₄₄Y₇₄₅W₇₄₆Y₇₄₇W₇₄₈Y₇₄₉W₇₅₀Y₇₅₁W₇₅₂Y₇₅₃W₇₅₄Y₇₅₅W₇₅₆Y₇₅₇W₇₅₈Y₇₅₉W₇₆₀Y₇₆₁W₇₆₂Y₇₆₃W₇₆₄Y₇₆₅W₇₆₆Y₇₆₇W₇₆₈Y₇₆₉W₇₇₀Y₇₇₁W₇₇₂Y₇₇₃W₇₇₄Y₇₇₅W₇₇₆Y₇₇₇W₇₇₈Y₇₇₉W₇₈₀Y₇₈₁W₇₈₂Y₇₈₃W₇₈₄Y₇₈₅W₇₈₆Y₇₈₇W₇₈₈Y₇₈₉W₇₉₀Y₇₉₁W₇₉₂Y₇₉₃W₇₉₄Y₇₉₅W₇₉₆Y₇₉₇W₇₉₈Y₇₉₉W₈₀₀Y₈₀₁W₈₀₂Y₈₀₃W₈₀₄Y₈₀₅W₈₀₆Y₈₀₇W₈₀₈Y₈₀₉W₈₁₀Y₈₁₁W₈₁₂Y₈₁₃W₈₁₄Y₈₁₅W₈₁₆Y₈₁₇W₈₁₈Y₈₁₉W₈₂₀Y₈₂₁W₈₂₂Y₈₂₃W₈₂₄Y₈₂₅W₈₂₆Y₈₂₇W₈₂₈Y₈₂₉W₈₃₀Y₈₃₁W₈₃₂Y₈₃₃W₈₃₄Y₈₃₅W₈₃₆Y₈₃₇W₈₃₈Y₈₃₉W₈₄₀Y₈₄₁W₈₄₂Y₈₄₃W₈₄₄Y₈₄₅W₈₄₆Y₈₄₇W₈₄₈Y₈₄₉W₈₅₀Y₈₅₁W₈₅₂Y₈₅₃W₈₅₄Y₈₅₅W₈₅₆Y₈₅₇W₈₅₈Y₈₅₉W₈₆₀Y₈₆₁W₈₆₂Y₈₆₃W₈₆₄Y₈₆₅W₈₆₆Y₈₆₇W₈₆₈Y₈₆₉W₈₇₀Y₈₇₁W₈₇₂Y₈₇₃W₈₇₄Y₈₇₅W₈₇₆Y₈₇₇W₈₇₈Y₈₇₉W₈₈₀Y₈₈₁W₈₈₂Y₈₈₃W₈₈₄Y₈₈₅W₈₈₆Y₈₈₇W₈₈₈Y₈₈₉W₈₉₀Y₈₉₁W₈₉₂Y₈₉₃W₈₉₄Y₈₉₅W₈₉₆Y₈₉₇W₈₉₈Y₈₉₉W₉₀₀Y₉₀₁W₉₀₂Y₉₀₃W₉₀₄Y₉₀₅W₉₀₆Y₉₀₇W₉₀₈Y₉₀₉W₉₁₀Y₉₁₁W₉₁₂Y₉₁₃W₉₁₄Y₉₁₅W₉₁₆Y₉₁₇W₉₁₈Y₉₁₉W₉₂₀Y₉₂₁W₉₂₂Y₉₂₃W₉₂₄Y₉₂₅W₉₂₆Y₉₂₇W₉₂₈Y₉₂₉W₉₃₀Y₉₃₁W₉₃₂Y₉₃₃W₉₃₄Y₉₃₅W₉₃₆Y₉₃₇W₉₃₈Y₉₃₉W₉₄₀Y₉₄₁W₉₄₂Y₉₄₃W₉₄₄Y₉₄₅W₉₄₆Y₉₄₇W₉₄₈Y₉₄₉W₉₅₀Y₉₅₁W₉₅₂Y₉₅₃W₉₅₄Y₉₅₅W₉₅₆Y₉₅₇W₉₅₈Y₉₅₉W₉₆₀Y₉₆₁W₉₆₂Y₉₆₃W₉₆₄Y₉₆₅W₉₆₆Y₉₆₇W₉₆₈Y₉₆₉W₉₇₀Y₉₇₁W₉₇₂Y₉₇₃W₉₇₄Y₉₇₅W₉₇₆Y₉₇₇W₉₇₈Y₉₇₉W₉₈₀Y₉₈₁W₉₈₂Y₉₈₃W₉₈₄Y₉₈₅W₉₈₆Y₉₈₇W₉₈₈Y₉₈₉W₉₉₀Y₉₉₁W₉₉₂Y₉₉₃W₉₉₄Y₉₉₅W₉₉₆Y₉₉₇W₉₉₈Y₉₉₉W₁₀₀₀Y₁₀₀₁W₁₀₀₂Y₁₀₀₃W₁₀₀₄Y₁₀₀₅W₁₀₀₆Y₁₀₀₇W₁₀₀₈Y₁₀₀₉W₁₀₁₀Y₁₀₁₁W₁₀₁₂Y₁₀₁₃W₁₀₁₄Y₁₀₁₅W₁₀₁₆Y₁₀₁₇W₁₀₁₈Y₁₀₁₉W₁₀₂₀Y₁₀₂₁W₁₀₂₂Y₁₀₂₃W₁₀₂₄Y₁₀₂₅W₁₀₂₆Y₁₀₂₇W₁₀₂₈Y₁₀₂₉W₁₀₃₀Y₁₀₃₁W₁₀₃₂Y₁₀₃₃W₁₀₃₄Y₁₀₃₅W₁₀₃₆Y₁₀₃₇W₁₀₃₈Y₁₀₃₉W₁₀₄₀Y₁₀₄₁W₁₀₄₂Y₁₀₄₃W₁₀₄₄Y₁₀₄₅W₁₀₄₆Y₁₀₄₇W₁₀₄₈Y₁₀₄₉W₁₀₅₀Y₁₀₅₁W₁₀₅₂Y₁₀₅₃W₁₀₅₄Y₁₀₅₅W₁₀₅₆Y₁₀₅₇W₁₀₅₈Y₁₀₅₉W₁₀₆₀Y₁₀₆₁W₁₀₆₂Y₁₀₆₃W₁₀₆₄Y₁₀₆₅W₁₀₆₆Y₁₀₆₇W₁₀₆₈Y₁₀₆₉W₁₀₇₀Y₁₀₇₁W₁₀₇₂Y₁₀₇₃W₁₀₇₄Y₁₀₇₅W₁₀₇₆Y₁₀₇₇W

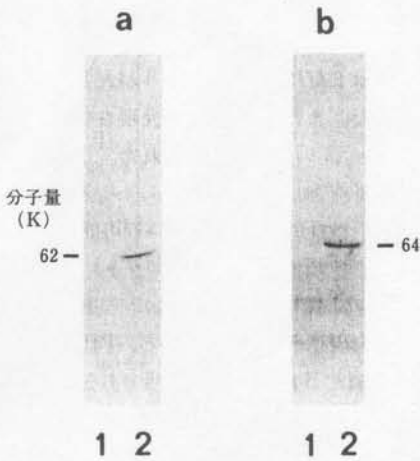


図 3. 酵母細胞抽出液中の *CMP1* および *CMP2* 遺伝子産物のウェスタンブロットングによる同定
a および b はそれぞれ抗 Cmp1p 抗体または抗 Cmp2p 抗体により検出した。1 および 2 は、それぞれ $\Delta cmp1$ $\Delta cmp2$ 二重破壊株および *CMP1* *CMP2* (野生株) から調製した。

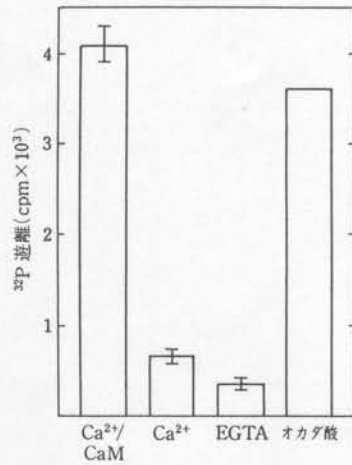


図 5. 酵母の Ca²⁺ 依存性プロテインホスファターゼ部分精製標品(ヘパリンセファロースカラム後の P1 画分; 図 7)を ³²P 標識カゼインを基質としてホスファターゼ活性を測定した。

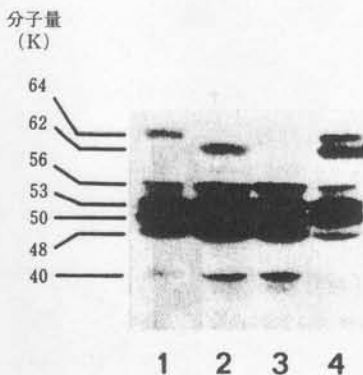


図 4. ¹²⁵I 標識カルモデュリンを利用したゲルオーバーレイ法により検出した各種遺伝子破壊株のカルモデュリン結合蛋白質
1: *Acvth1*, *CMP2*, 2: *CMP1*, *Acvth2*, 3: *Acvth1*, *Acvth2*, 4: *CMP1* *CMP2*。

とが示された。このことをさらに生化学的に確認するために、 $\Delta cmp1$ $\Delta cmp2$ 二重破壊株から、前述の方法に従い精製した画分のホスファターゼ活性を調べたが、PP2B 活性は検出されなかった(図 7)。図 7 の P3 画分には弱い活性がみられるが、この活性は Ca²⁺ 非依存性でオクタ酸に感受性であったことから、PP2B とは異なるホスファターゼによるものと考えられる。以上の解析から、*CMP1* および *CMP2* は実際に PP2B サブユニットをコードしており、また酵母の通常の増殖には PP2B は必須ではないと結論した¹⁴⁾。

それでは、酵母 PP2B はいかなる生理機能をもっているのか? 筆者らは、さらに $\Delta cmp1$ $\Delta cmp2$ 二重破壊株について、種々のストレスに対する感受性を調べた。その結果、二重破壊株は、1.2 M NaCl, 140 mM LiCl による 50% 以上の増殖抑制に感受性を示した(図 8)。pH 8.0 以上のアルカリ条件下で著しく生育が抑えられることがわかった(図 9)¹⁵⁾。高濃度の CaCl₂, MgCl₂, KCl ならびに糖による高浸透圧に対するトレランスにはまったく影響がみられなかった。また、0.2 M KCl の添加によって、破壊株の NaCl および LiCl 感受性は抑圧されたが(図 8)、パナジン酸感受性およびアルカリ条件下での生育抑制は抑圧されなかった。一方、A 鎖蛋白質をコードする 2 つの遺伝子 *CMP1* または *CMP2* のいずれか一方を破壊した株では、*CMP2* の破壊株がやや弱いながらも二重破壊株と同様の表現型を示すこ

解析を行なったが *CMP1*, *CMP2* 以外の類似遺伝子は検出されなかった。また各型のプロテインホスファターゼ (PP1, PP2A および PP2B) に種を越えて完全に保存されている配列と、各種生物の PP2B すべてに特異的に保存されている配列をもとにデザインした合成プライマーを用いて PCR 法により検索を試みた(図 6)。しかし、この方法によっても新規な相同遺伝子は得られなかったため、酵母には PP2B 触媒サブユニットをコードする遺伝子はこれら 2 つ以外には存在しないこ

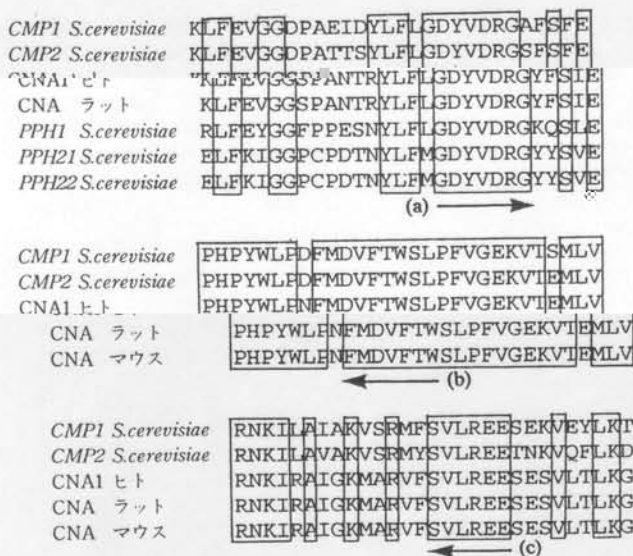


図 6. PCR 法による *CMP1* および *CMP2* 相同遺伝子の検索
 センス鎖プライマー (a) は、3 種類のセリン/スレオニン型プロテイン
 ホスファターゼ (PP1, PP2A および PP2B) のすべてに種を越えて完全
 に保存されているアミノ酸配列を利用して、またアンチセンスプライ
 マー (b および c) は、各種生物の PP2B の調節領域に完全に保存されて
 いるアミノ酸配列を利用して作製した。保存されているアミノ酸は枠で
 囲って示した。

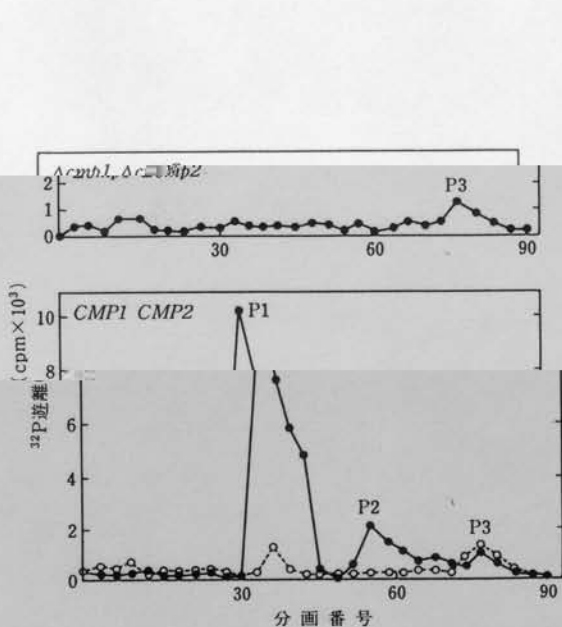


図 7. $\Delta cmp1 \Delta cmp2$ 二重破壊株の PP2B 活性
 明株および $\Delta cmp1 \Delta cmp2$ 二重破壊株から調製した酵素標品の
 のヘパリンセファロースカラムクロマトグラフィー後の各分画
 のホスファターゼ活性をカルモジュリンと Ca^{2+} (●) および EGTA
 (○) 存在下に測定した。

と、 $\Delta cmp1$ 株は有意な表現型を示さないこと
 から、NaCl および LiCl に対するトレランス
 には *CMP2* の寄与のほうが大きいことがわか
 った。また *CMP1* を高発現させることにより
 $\Delta cmp2$ の形質は相補された。これから、両遺
 伝子産物は部分的にオーバーラップしながら
 も、機能的に分化している可能性が示唆され
 た。B 鎖 (調節サブユニット) をコードする
 $\Delta cnb1$ 株は $\Delta cmp1 \Delta cmp2$ 二重破壊株と同様
 の表現型を示したことから、PP2B の機能には
 A 鎖と B 鎖の両方が必要であると考えられる。
 以上に述べた実験の結果から、酵母の PP2B
 は細胞内イオンのホメオスタシスに関与して
 おり、細胞内イオンに影響を及ぼすストレス
 条件下の生育には必須の機能を果たしている
 ことが明らかになった。

$\Delta cmp1 \Delta cmp2$ 二重破壊株は NaCl およ
 LiCl に対して感受性を示した。この表現型は
 破壊株の Na^+ 輸送系の欠陥により細胞内の
 Na^+ 濃度が異常に高くなったことによる可能
 性が考えられる。Li⁺ は Na^+ のアナログであ
 り、同じ輸送系を通り移動すると考えられて

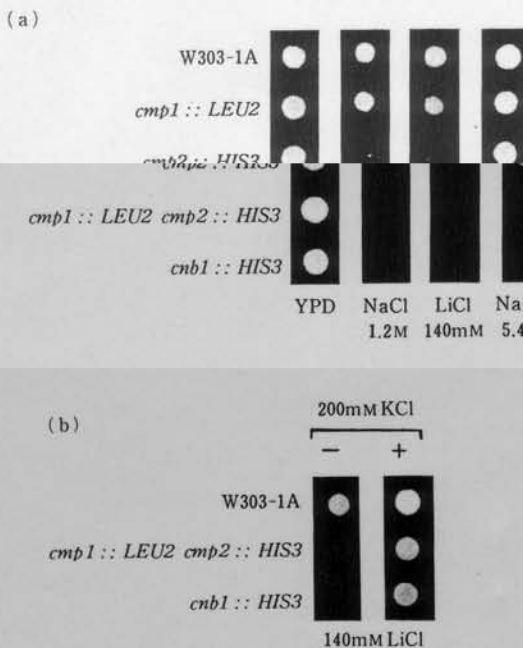


図 8. PP2B に関する各種破壊株の増殖。
 (a) 1.2 M NaCl, 140 mM LiCl または 5.4 mM $NaVO_4$
 含む寒天プレート上での生育。(b) LiCl による増殖阻害
 による回復。

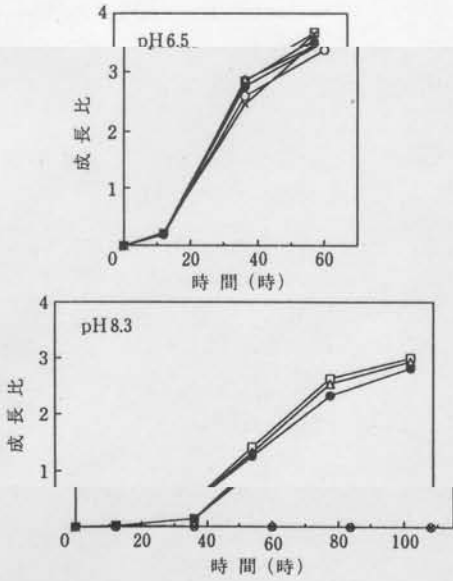


図 9. PP2B サブユニットに関する各種破壊株の高 pH における増殖
pH 6.5 および pH 8.3 における野生株 (●), $\Delta cnp1$ 株 (□), $\Delta cnp2$ 株 (△), $\Delta cnp1 \Delta cnp2$ 二重破壊株 (○), $\Delta cnp1$ 株 (×) の増殖を比較した。

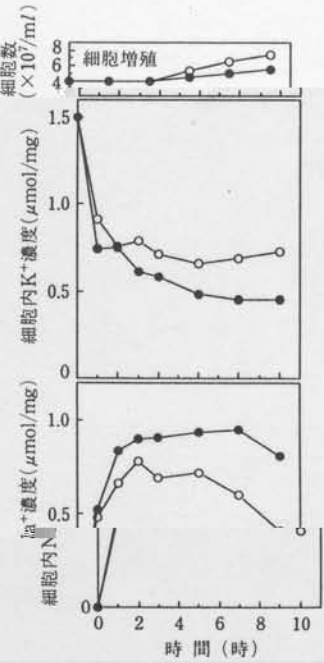


図 10. 高 NaCl (0.85 M) を含む培地に移した野生株 (○) および $\Delta cnp1 \Delta cnp2$ 二重破壊株 (●) の増殖ならびに細胞内 Na^+ および K^+ 濃度の変動

いる。対数増殖期の細胞に最終濃度 0.85 M (破壊株でも弱いながら生育可能な濃度) になるように NaCl を添加した培地で増殖する細胞から経時的に抽出液を調節し、 Na^+ および K^+ 濃度を測定した (図 10)。測定は複数のイオンを同時にしかも定量的に測定可能な等速電気泳動法により行なった。野生株でも細胞内 Na^+ 濃度は、NaCl 添加後の初期に破壊株と同様に急激に上昇したが、3 時間後に野生株の細胞内 Na^+ 濃度が低下しはじめたのに対し、破壊株の低下はこれより遅れ、また低下の速度も遅かった。細胞内の Na^+ 濃度が低下してはじめて細胞の増殖が開始したことから、高レベルの細胞内 Na^+ は細胞の増殖にとり毒であり、PP2B は高 NaCl 培地で増殖する際に細胞内の Na^+ 濃度を低下させるのに必須の役割を果たしていると考えられる。破壊株においても細胞内の Na^+ 濃度の低下がみられたことから、酵母には PP2B 依存性の細胞内 Na^+ 濃度調節機構以外に非依存性の機構も存在すると考えられる。

一方、細胞内 K^+ 濃度は野生株、破壊株ともに最初は急速に低下するが、その後、野生株では一定レベルに保たれるのに対し、破壊株ではその後も低下しつづける。10 時間後には野生株の約半分のレベルになった。野生

天平培地上で破壊株の NaCl 感受性は 0.2 M KCl の添加によって抑圧される。そこで、細胞内の Na^+ および K^+ の挙動に対する KCl 添加の効果について調べた。0.85 M NaCl 存在下で 6 時間培養後の細胞内イオンについて測定した (図 11)。KCl の添加によって破壊株の Na^+ 濃度は 46% に減少し、また K^+ 濃度は 2.3 倍に上昇し、NaCl 培地における野生株の細胞内イオンのレベルに近づいた。この効果は野生株においてもみられ、細胞内 Na^+ 濃度は低下し、 K^+ 濃度は上昇する。この結果は、NaCl を含む平板培地上での野生株の増殖が促進されることと一致する。

破壊株で NaCl 添加後の細胞内 Na^+ 濃度の低下しないことは、 Na^+ 排出系に異常が生じた可能性が考えられる。そこで、 Na^+ の排出能を比較した。0.85 M NaCl 存在下に 4 時間培養して細胞内 Na^+ の濃度を高め細胞を NaCl を含まない培地に移し、細胞内の Na^+ を経時的に測定した (図 12)。野生株では速やかに Na^+ を排出するのに対し、破壊株では減少が緩慢であった。したがって、 Na^+ の排出に欠陥があることが示唆された。0.85 M NaCl を添加することによって Na^+ 排出の低下は野生株の約半分のレベルまで回復した。

以上の実験から、PP2BはNa⁺排出機能の調節および細胞内K⁺レベルの維持と、ストレス条件下のイオンホメオスタシスに関与していることが示された。動物細胞の細胞内イオンの調節に重要なNa⁺、K⁺-ATPaseは酵母では報告されておらず(おそらく存在しない)、細胞内Na⁺およびK⁺濃度調節の分子機構の研究は、まだ緒についたばかりの段階なので、PP2Bを介するストレス応答の機構もまだまだ不明である。PP2Bによる脱リン酸化反応が遺伝子発現のレベルで作用しているのか、あるいはイオン輸送系蛋白質に直接作用しているのかを明らかにすることは重要な課題である。

III. 免疫抑制剤 FK506 による PP2B 機能の阻害¹⁵⁾

臓器移植の際の拒絶反応を抑えたり、自己免疫の治療などに使用される免疫抑制剤 FK506 は、活性化の初期段階に作用し、インターロイキン-2 のサイトカイン遺伝子の転写を阻害することによって強力な免疫抑制効果を発揮する。FK506 は、細胞内結合蛋白質(FKBP)と複合体(FK506-FKBP)を形成して、これがさらにPP2Bに結合するリホスファターゼ活性を阻害し、このことがその機序であることが示された¹⁶⁻¹⁸⁾。免疫抑制剤に対するPP2Bは、免疫抑制剤のターゲットと細胞機能におけるイベントと核におけるイベントを阻害する阻害剤として注目されている。報告によれば、免疫抑制剤は、酵母細胞内にyFKBP-12が存在するので¹⁹⁾、PP2Bが関与するストレス応答も免疫抑制剤による阻害を受ける可能性がある。免疫抑制剤の作用は、PP2Bの役割を果たしている現象を利用してはじめてになる。そこで、LiClトランスにはPP2Bを阻害していることを利用して、野生株のLiCl存在下およびFK506の影響について調べた(図11)。

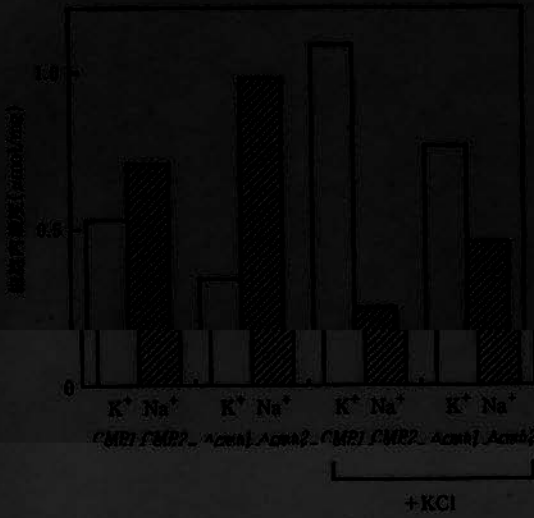


図 11. 野生株および *Δcnp1 Δcnp2* 二重破壊株の細胞中のNa⁺およびK⁺濃度に対するLiClの効果。



生理

免疫疾患
T細胞
2など

は、細胞
(FKBP)

とによ
免疫抑制
伝達系に
して、ま
ントをつ
図13)。

蛋白質質
する酵母
けるかど
必須な
検出可能
Bが関与し

下の増殖に
b)。培地に

増殖

CaM

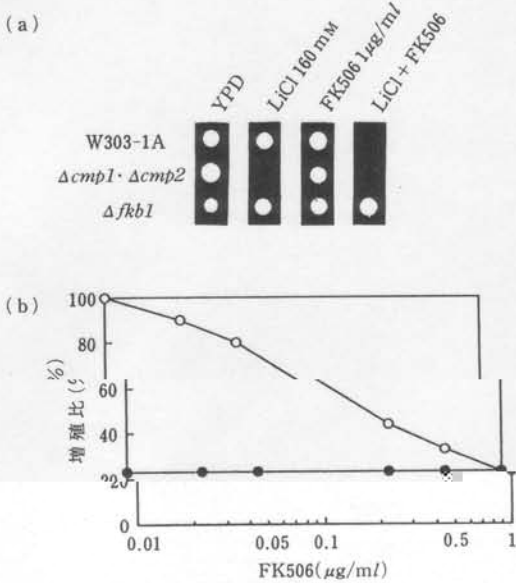


図 14. 高塩培地への適応に及ぼす免疫抑制剤 FK506 の効果

(a) LiCl を含む培地における野生株, $\Delta cmp1 \Delta cmp2$ 二重破壊株および $\Delta fkb1$ 株の増殖に及ぼす FK506 の効果。
 (b) 50 mM LiCl および各種濃度の FK506 を含む培地での野生株 (○) および $\Delta cmp1 \Delta cmp2$ 二重破壊株 (●) の増殖。

50 mM LiCl が存在すると $\Delta cmp1 \Delta cmp2$ 二重破壊株の増殖量は野生株の約 20% に抑えられる。ここに 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の FK506 を添加すると野生株の生育は破壊株と同じレベルまで阻害された。LiCl 存在下の FK506 による生育阻害 (野生株) は 0.025 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の低濃度からみられ (通常の YPD 培地で生育阻害が表われるのは 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の高濃度), $\Delta cmp1 \Delta cmp2$ 二重破壊株の LiCl を含む培地での増殖はそれ以上に FK506 による阻害を受けることはなかった。次に FK506 の阻害作用が $FKB1$ によりコードされる結合蛋白質を介して行なわれているかを検証するに、 $\Delta fkb1$ 株を構築して FK506 の生育阻害効果を調べた (図 14 a)。 $\Delta fkb1$ 株の LiCl 存在下の生育は FK506 による阻害を受けなかったことから、FK506 の作用は FKBP 依存的事であることが示された。0.85 M NaCl 存在下にも同様な FK506 の阻害効果が得られた。さらに、0.85 M NaCl 存在下での細胞内 Na^+ および K^+ 濃度に対する FK506 の効果について調べた (図 15)。 $\Delta fkb1$ 株では FK506 の効果が表われなかった。これらの結果は、平板培地上での増殖に対する影響と一致する。以上に述べた実験から、FK506 が

FKBP を介して PP2B を阻害することによって受ける生理機能の障害は、酵母から高等生物に至るまで真核生物によく保存された共通のメカニズムによっていることが示唆された。また最近、 α 因子による増殖停止からの復帰にも関与していることが報告されている²⁰⁾。

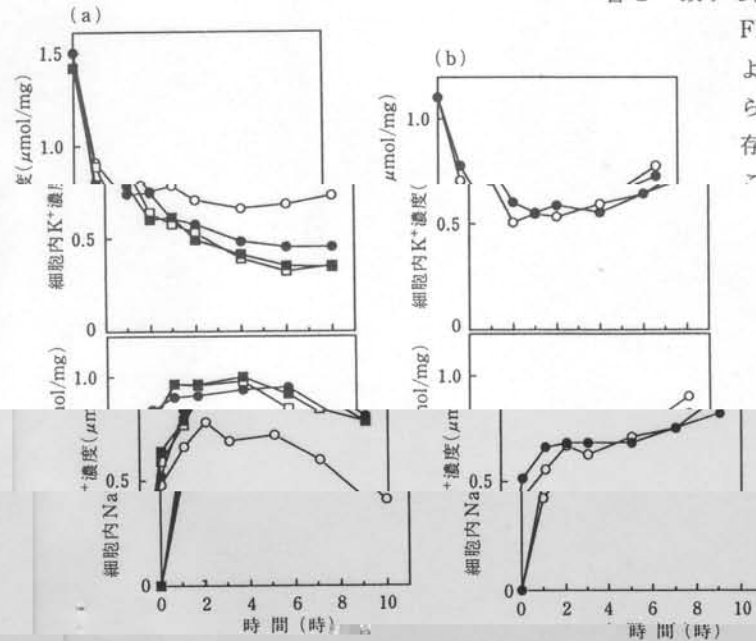


図 15. 細胞内の Na^+ および K^+ 濃度に及ぼす FK506 の効果
 (a) 野生株 (○, ●), $\Delta cmp1 \Delta cmp2$ 二重破壊株 (□, ■) を 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の FK506 を含む (●, ■) または含まない (○, □) NaCl 培地に移したときの細胞内 Na^+ および K^+ 濃度の変動。10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の高濃度の FK506 を含む (●) または含まない (○) 高 NaCl 培地における $\Delta fkb1$ 株の細胞内 Na^+ および K^+ 濃度の変動。

代わりに 筆者らは、細胞内 Ca^{2+} 情報伝達系を解明する目的で、遺伝学的に分析可能な出芽酵母を用いて、カルシニューリンに注目し、カルシニューリン結合蛋白質である PP2B をコードする遺伝子を得し解析を行ってきた。PP2B は最近動物において免疫情報伝達の鍵酵素として注目されている。しかしながら、学的解析が困難な動物においては、その経路が複雑にからみあっている性質を、関係にある分子を同定し、その関係を解明するには困難が予想

れゆえに、モデル系としての酵母の PP2B 情報伝達経路への期待は大きい。

今回筆者らは、酵母 PP2B がさまざまなストレス、とくに高 NaCl ストレスに適応するための細胞内イオン濃度の調節に重要な役割を担うこと、そして、この系が FKBP 依存的に FK506 によって阻害されることを明らかにした。酵母の PP2B が、イオンのホメオスタシスに関与するという今回の結果は、動物において PP2B が脳神経系に多く含まれ、そこにおける情報伝達に重要な役割を果たしているのではないかと予想される点からも、非常に興味ある知見である。酵母が α 因子による増殖の G₁ 停止から回復し、増殖を再開する際に PP2B が必要なことは、このプロセスが T 細胞活性化のメカニズムと似たものである可能性がある。また、酵母でも動物と同様の機構により FK506 が PP2B の生理機能を阻害するという事実は、酵母が免疫系のシグナル伝達のモデルになりうるのではないかと期待をいだかせる。酵母のストレス応答においても、もし PP2B が転写因子を制御しているのであれば、いっそうこの系の重要性は増すことになる。また FKBP は真核生物全般によく保存されていることから、この蛋白質が PP2B の活性制御を通して Ca²⁺ シグナルの伝達に重要な役割を果たしていることが予想されるが、その真の機能は不明である。FKBP の調節にかかわる内在性のリガンド (FK506 様機能をもつ物質) が存在するのにも興味深い。

現在、筆者らの研究室では PP2B の生理機能のうち、とくに重要と考えられる以下の点に焦点をあて解析を進めている：

- (1) PP2B 破壊株の表現型を抑制する遺伝子の解析による、PP2B より下流の機構
 - (2) FK506-FKBP 複合体による PP2B 活性阻害の機構
 - (3) ストレスシグナルによる PP2B 活性化の機構
- このような、酵母 PP2B の解析から得られる知見が、動物における PP2B を介する情報伝達系解明のブレークスルーになることを期待している。

文 献

- 1) Campbell, A.K. : Intracellular Calcium : Its Universal Role as Regulator, John Wiley&Sons, New York (1983)
- 2) Cheung, W.Y. : *Science*, **207**, 19-27 (1980)
- 3) Cobee, P., Klee, C.R. : *Molecular Aspects of Cellular Regulation*, Vol.5, Elsevier, New York (1988)
- 4) Iida, H., Yagawa, Y., Anraku, Y. : *J. Biol. Chem.*, **265**, 13391-13399 (1990)
- 5) Davis, T.D., Urdea, M.S., Masiarz, F.R., Thorner, J. : *Cell*, **47**, 423-431 (1990)
- 6) Takeda, T., Yamamoto, M. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 3580-3584 (1987)
- 7) Geiser, J.R., Tuinen, D., Brockerhoff, S.E., Neff, M.M., Davis, T.D. : *Cell*, **65**, 949-959 (1991)
- 8) Liu, Y., Yamashita, Y., Tsuchiya, E., Miyakawa T. : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **166**, 681-687 (1990)
- 9) 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)
- 10) Kuno, T., Takeda, T., Hirai, M., Ito, A., Mukai, H., Tanaka, C. : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **165**, 1352-1358 (1989)
- 11) Cyert, M.S., Kunisawa, R., Kaim, D., Thorner, J. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 7376-7380 (1991)
- 12) Cyert, M., Thorner, J. : *Mol. Cell. Biol.*, **12**, 3460-3469 (1992)
- 13) Klee, C., Draetta, G.F., Hubbard, M.J. : *Adv. Enzymol.*, **61**, 149-200 (1988)
- 14) Nakamura, T., Tsutsumi, H., Mukai, H., Kuno, T., Miyakawa, T. : *FEBS Lett.*, **309**, 103-106 (1992)
- 15) Nakamura, T., Liu, Y., Hirata, D., Namba, H., Hirokawa, T., Miyakawa, T. : *EMBO J.*, **12**, 4063-4071 (1993)
- 16) Liu, J., Farmer, Jr. J.D., Lane, W.L., Friedman, J., Weissman, J., Schreiber, S.L. : *Cell*, **66**, 807-815 (1991)
- 17) O'Keefe, S. J., Tamura, J., Kincaid, R. L., Tocci, M. J., O'Neil, E. A. : *Nature*, **301**, 620-624 (1992)
- 18) Clipstone, N.E., Crabtree, G.R. : *Nature*, **357**, 695-698 (1992)
- 19) Siekierka, J.J., Wiederrecht, G., Grulich, H., Boulton, D., Jung, S.H.Y., Cryan, P., Hodges, P.J., Sigal, N.H. : *J. Biol. Chem.*, **265**, 21011-21015 (1990)
- 20) Foor, F., Parent, S.A., Morin, N., Dahl, A.M., Ramadani, N., Chrebert, G., Bostian, K.A., Nielsen, J.B. : *Nature*, **360**, 682-684 (1992)