

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19790221

研究課題名（和文）ダウン症候群関連因子DSCR1の発現量調節機構の解明

研究課題名（英文）Regulation of Down syndrome critical region 1 (DSCR1) protein level by oxidative stress

研究代表者

浅田 幸江 (ASADA SACHIE)

独立行政法人理化学研究所・神経遺伝研究チーム・研究員

研究者番号：60415065

研究成果の概要：過酸化水素水刺激による酸化ストレスは、HEK293T細胞においてDSCR1のタンパク質量を減少させるとともにユビキチン化修飾を誘導した。DSCR1のユビキチン化修飾を触媒する酵素を調べるとSCF<sup>β-TrCP</sup>である事が示された。さらに神経細胞について検討を行うと、過酸化水素水はcalpain経路とユビキチン経路の二つの経路を介してDSCR1の分解を誘導する事が示された。これらの結果から、酸化ストレス下におけるDSCR1の発現量は少なくとも二つの分解系により調節され、ユビキチン経路によるDSCR1の分解にはSCF<sup>β-TrCP</sup>が介在する事が示された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,700,000	0	2,700,000
2008年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	180,000	3,480,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医科学一般

キーワード：DSCR1, SCF<sup>β-TrCP</sup>, 酸化ストレス, ユビキチン化, 神経細胞死

## 1. 研究開始当初の背景

(1) ダウン症候群の発症にDSCR1が関与する事が報告された。ダウン症候群は神経系疾患を発症する事から、中枢神経系におけるDSCR1の重要性が示唆された。

(2) 血球系細胞株において酸化ストレスがDSCR1のタンパク質量を減少させる事が報告されたが、その詳細な分解機序は解明されていなかった。

(3) DSCR1の標的分子であるcalcineurinは神経系の生理機能に関与するだけでなく、神経系疾患の発症にも関与する事が報告されていた。

## 2. 研究の目的

DSCR1の分解機構を解明し、神経変性疾患発症機序の解明につながる新たな知見を提示する。

### 3. 研究の方法

(1) HEK293T 細胞に外来性 DSCR1 を発現させ、酸化ストレスによる DSCR1 の分解がユビキチン化を介するか調べた。内在性 DSCR1 に対する抗体を作製し、外来性タンパク質が内在性タンパク質の状態を反映しているか確認した。

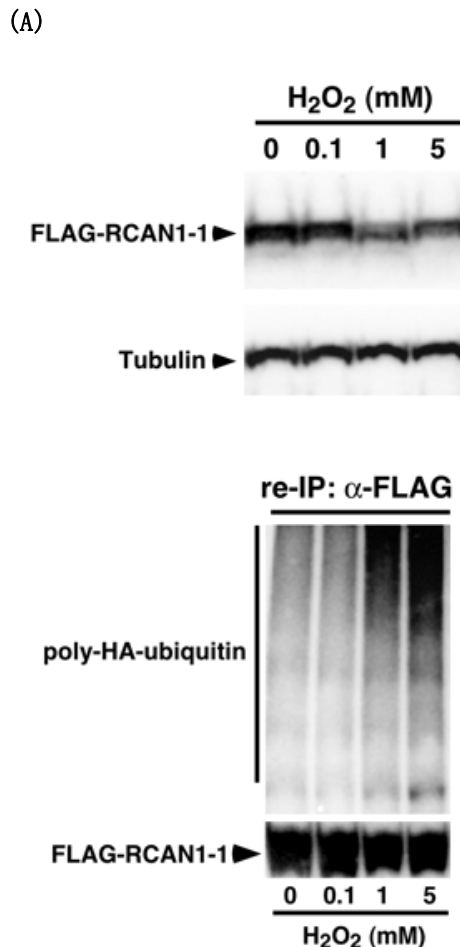
(2) DSCR1 のユビキチン化修飾を触媒するユビキチン E3 ligase の同定を *in vitro* 実験系において行なった。同定した E3 ligase に対する siRNA を用いて、内在性 DSCR1 の分解が同定した E3 ligase を介するか確認した。

(3) 初代培養神経細胞において、酸化ストレスがユビキチン化を介した DSCR1 の分解を誘導するか検討した。

### 4. 研究成果

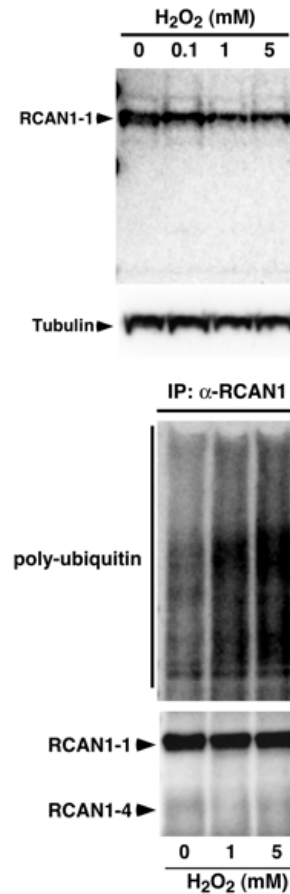
HEK293T 細胞に外来性 DSCR1 (RCAN1-1) を発現させ、過酸化水素水を用いた酸化ストレス処理を行なうと、外来性 DSCR1 のタンパク質量が減少し (図 1A 上段)、DSCR1 のユビキチン化が誘導された (図 1A 下段)。また内在性 DSCR1 (RCAN1-1, 1-4) においても同様の結果を得た (図 1B)。

図 1. western blot による DSCR1 の定量と re-IP によるユビキチン化の検出



### (B)

DSCR1 のユビキチン化を触媒する酵素を同定する為、DSCR1 と結合する E3 ligase について



て検討を行った。DSCR1 は SCF 型 E3 ligase の基質認識サブユニットの一つである FBW4 と結合したが過酸化水素水刺激非依存的な結合であった。一方、別の基質認識サブユニットである β-TRCP とは過酸化水素水刺激依存的な結合を示した (図 2)。さらに *in vitro* において、β-TRCP を含む SCF<sup>β-TRCP</sup> E3 ligase は過酸化水素水刺激依存的な DSCR1 のユビキチン化を誘導した (図 3)。

図 2. 免疫沈降法による DSCR1 に結合する E3 ligase の検討

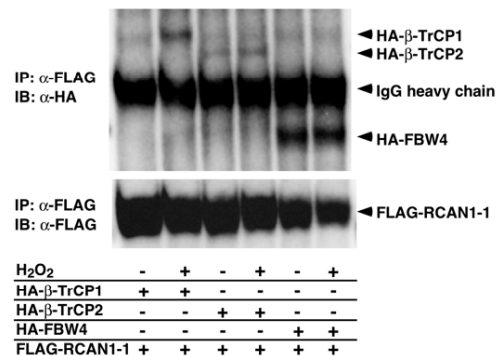
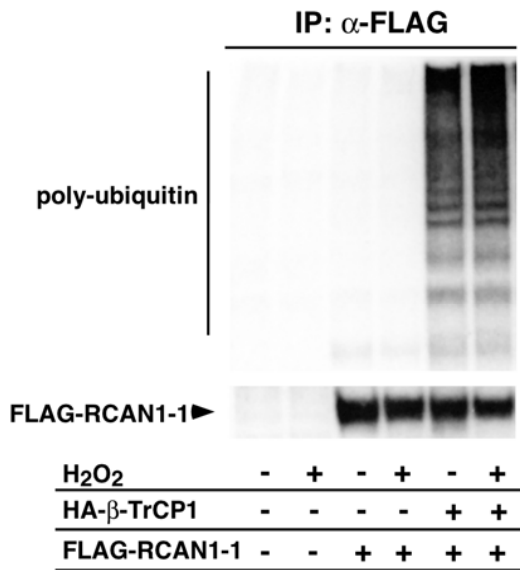
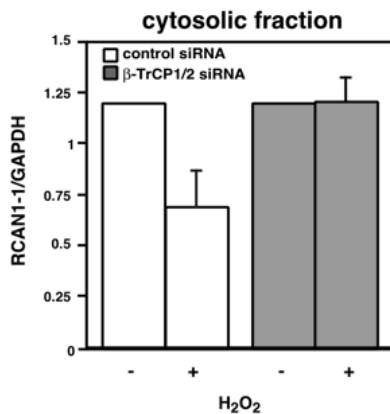


図3. *in vitro* ユビキチン化アッセイによる E3 ligase の検討



そこで、HEK293T細胞での過酸化水素水刺激によるDSCR1 タンパク質量の減少が、SCF <sup>$\beta$ -TrCP</sup> E3 ligaseを介するかsiRNAを用いて検証した。その結果、 $\beta$ -TrCPのノックダウンにより、過酸化水素水刺激によるDSCR1 タンパク質量の減少が抑制された (図4)。

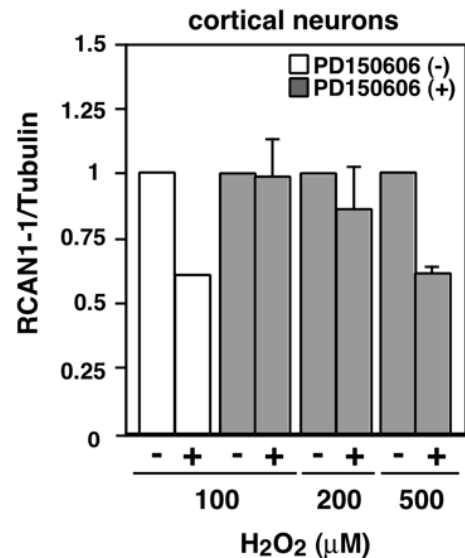
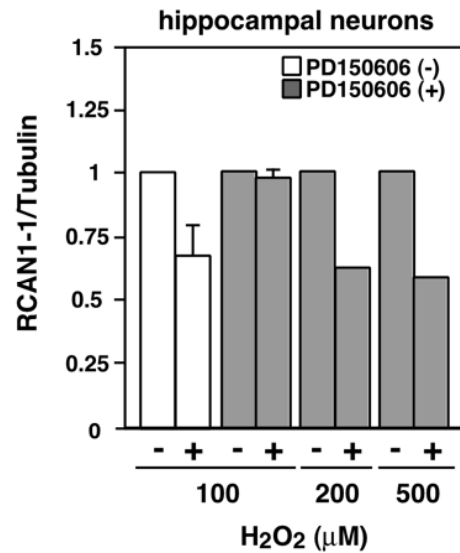
図4. siRNA 処理による DSCR1 タンパク質量の変化



これらの結果から、過酸化水素水によるDSCR1 の減少はSCF <sup>$\beta$ -TrCP</sup> E3 ligaseによるユビキチン化を介した現象であることが示された。本研究開始後、神経細胞において過酸化水素水刺激はcalpain経路を介してDSCR1 の分解を誘導する事が報告された。そこで、HEK293T細胞と同様に神経細胞においても酸化ストレスによるユビキチン化を介したDSCR1 の分解が起こるか検討を行った。calpain抑制剤 (PD150606) を処理した大脳海馬および皮質神経細胞に100-500  $\mu$ Mの過酸

化水素水を用いて刺激を行ないDSCR1 タンパク質量の変化を検討した。その結果、低濃度の過酸化水素水刺激によるDSCR1 の減少はcalpain抑制剤により抑制されたが、高濃度の過酸化水素水刺激ではcalpain抑制剤による抑制効果は示されなかった (図5 上段: 海馬神経細胞、下段: 皮質神経細胞)。

図5. calpain 抑制剤の DSCR1 タンパク質量への影響



また、高濃度の過酸化水素水刺激はDSCR1 のユビキチン化を誘導する事が示された (図6)。

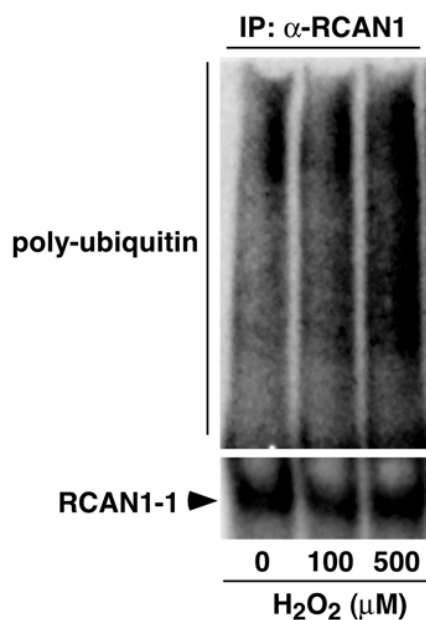
これらの結果から、神経細胞では酸化ストレスの強さにより calpain 経路とユビキチン経路の二つの経路により DSCR1 の分解が誘導される事が示唆された。

今回得られた結果から、酸化ストレスの強さによる DSCR1 の分解経路の違いがその後の神経細胞のストレス応答に異なる変化を誘導する可能性が推察された。

一ム・研究員

研究者番号：60415065

図 6. 神経細胞における DSCR1 のユビキチン化の検討



#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

浅田幸江、池田明美、長尾里奈、濱裕、須藤龍彦、深水昭吉、粕谷善俊、岸努、"Oxidative stress-induced ubiquitination of RCAN1 mediated by SCF<sup>β-TrCP</sup> ubiquitin ligase", Int. J. Mol. Med., 22, 95-104, 2008, 査読有

[学会発表] (計 1 件)

浅田幸江、酸化ストレスによる DSCR1 のユビキチン化機構の解析、第 30 回日本分子生物学会年会、第 80 回日本生化学会大会合同大会 (BMB2007)、12月14日、横浜

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

浅田 幸江 (ASADA SACHIE)

独立行政法人理化学研究所・神経遺伝研究チ