

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008-2011

課題番号：20570010

研究課題名(和文)

カルシニューリン・シグナリングにおけるユビキチン化依存的蛋白質分解の役割

研究課題名(英文)

The SCF ubiquitin ligase regulates calcineurin signaling through degradation of RCAN1, an inhibitor of calcineurin.

研究代表者 岸 努 (KISHI TSUTOMU)

東京工業大学・大学院生命理工学研究科・グローバルCOE 研究員

研究者番号：80260024

研究成果の概要(和文)：

ユビキチンリガーゼ SCF<sup>Cdc4</sup> によるユビキチン化の基質蛋白質をスクリーニングする手法を開発し、新規基質の一つとして、カルシニューリンのフィードバック・インヒビター (RCAN1) を出芽酵母より同定した。RCAN1 の分解の持つ生理的意味を解析した。その結果、カルシニューリンシグナリングの新しい制御機構を提唱した。すなわち、カルシニューリンの活性が、RCAN1 の合成とユビキチン化に依存した分解のバランスの制御によって厳密に調節されていることを明らかにした。この制御が、酵母とヒトで保存されていることも明らかにした。

研究成果の概要(英文)：

The highly conserved RCAN family of proteins regulates the serine/threonine protein phosphatase calcineurin, which is required for the expression of genes involved in Ca<sup>2+</sup>-dependent processes such as the control of memory, apoptosis, T cell activation, cell cycle and cardiac muscle growth and differentiation. However, RCANs regulate calcineurin through two paradoxical actions: they act as feedback inhibitors of calcineurin, whereas their phosphorylation stimulates calcineurin. Here we showed that phosphorylation of RCAN triggers degradation through the SCF ubiquitin ligase complex in yeast and in human. Degradation of phosphorylated RCAN is required to mitigate inhibition of calcineurin by RCAN and results in activation of calcineurin in response to changes in Ca<sup>2+</sup> concentration. Such phosphorylation was counteracted by dephosphorylation of RCAN, which was promoted by Ca<sup>2+</sup>-stimulated calcineurin. These results provide insight into the mechanism involved in maintaining proper responses to Ca<sup>2+</sup> signals.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：

科研費の分科・細目：生物学・基礎生物科学

キーワード：シグナル伝達、蛋白質分解、カルシウム、ユビキチン

## 1. 研究開始当初の背景

カルシウムシグナリングの一つであるカルシニューリンは、T細胞の活性化、発生・分化、学習・記憶、細胞周期などの制御に関わる。カルシニューリンは、カルシウムによって活性化され、自身のフィードバックインヒビターにより不活性化される。カルシニューリンのフィードバックインヒビターである RCAN は酵母からヒトまで広く保存されている。ヒトではダウン症の患者で高発現化しており、神経疾患の原因となっていることがわかっている。

2003 年になって、RCAN1/DSCR1 にはカルシニューリンを不活性化因子として機能するだけでなく、活性化因子としても機能することが示唆された。すなわち、RCAN1/DSCR1 はリン酸化されるとカルシニューリンを活性化することが明らかになった。しかしリン酸化によって、RCAN1 が阻害因子から活性化因子に変換される機構は全くわかっていなかった。

## 2. 研究の目的

カルシニューリンの活性制御機構を解明するために、RCAN がリン酸化により阻害因子から活性化因子に変換される機構を明らかにする。

問題解決のための着眼点は、並行する研究において申請者は、酵母ユビキチンリガーゼ SCF<sup>Cdc4</sup> によるユビキチン化の基質を系統的にスクリーニングする実験手法の開発を行い、SCF<sup>Cdc4</sup> の新規基質として出芽酵母 RCAN である Rcn1 を同定したことである。SCF<sup>Cdc4</sup> によるユビキチン化では、基質のリン酸化がユビキチン化の引き金となることが一般的である。そこで、リン酸化された Rcn1 は SCF<sup>Cdc4</sup> により分解され、その結果、カルシニューリンが活性化される、という作業仮説を立てた。

そこで、まず遺伝学的手法を駆使できる出芽酵母を用いてこの仮説を検証し、次に、同様な機構がヒトでも保存されているか調べる。

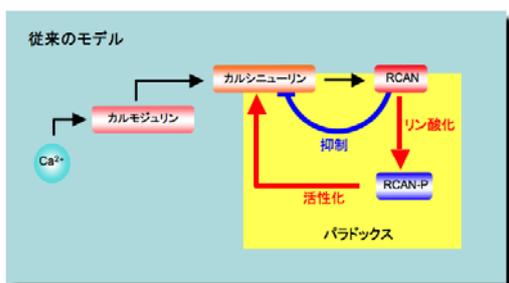


図1. 従来のカルシニューリン活性制御機構

## 3. 研究の方法

### (1) RCAN1 のユビキチン化機構の解明

カルシウム刺激や酸化ストレスを与えたときに、RCAN1 がユビキチン化に依存して分解されるか検証する。刺激に応じて RCAN1 が不安定化するかについて、プロモーターシャットオフ実験により調べる。この時、この分解がユビキチン化に依存しているか検証する。

次に、RCAN1 のユビキチン化がリン酸化に依存しているか調べる。この目的のために、RCAN1 が刺激に応じてリン酸化されていることを確認する。リン酸化部位を決定し、この部位をリン酸化を受けないアラニン残基に置換した変異型 RCAN1 が SCF によるユビキチン化・分解を受けないことを確かめる。

### (2) RCAN1 のユビキチン化・分解の持つ生理的意味の解明

(1) で作製した変異型 RCAN1 (以下、安定化型 RCAN1 と記す) を発現する細胞を作製し、カルシウムや酸化ストレスによる刺激を与えたとき、カルシニューリンの活性がどのように変化するか調べる。

## 4. 研究成果

### (1) RCAN1 のユビキチン化機構の解明

出芽酵母の RCAN である Rcn1 がカルシウム刺激に依存して不安定化されることを明らかにした。すなわち、Rcn1 を強制発現した後に蛋白質合成の阻害剤であるシクロヘキシミドを加え、Rcn1 の蛋白質量の変化を調べるプロモーターシャットオフ実験を行うと、カルシウム刺激を行わない条件下では安定であったが、カルシウム刺激に依存して不安定化した。SCF の変異株ではカルシウム刺激を加えても Rcn1 は安定化状態を維持した。同様にプロテアソームの変異株でも Rcn1 は安定化した。以上のことから、Rcn1 はカルシウムでは、カルシウム刺激に応じて、SCF とプロテアソームに依存して分解されることが判明した。

次に Rcn1 のユビキチン化がユビキチン化されること、そしてこのユビキチン化が、カルシウム刺激に依存することを明らかにした。すなわち、Rcn1 を強制発現した細胞にカルシウム刺激を与え、次にプロテアソームの阻害剤である MG132 を加え、Rcn1 がユビキチン化されるか調べた。その結果、MG132 に依存して Rcn1 がユビキチン化されることを見いだした。このユビキチン化は、カルシウム刺激を加えない細胞では検出されなかった。

また SCF の変異株とプロテアソームの変異株でも、Rcn1 のユビキチン化を検出することができなかった。

Rcn1 のユビキチン化・分解が、Rcn1 のリン酸化に依存するか検討した。まず Rcn1 がカルシウム刺激に依存してリン酸化されることを明らかにした。Rcn1 を強制発現した後、カルシウム刺激を与えると、Rcn1 のリン酸化を検出した。すでに Rcn1 は、113S と 117S がリン酸化されることが知られている。これらの部位をアラニンに置換した変異型 Rcn1 (Rcn1-S113A, Rcn1-S117A, Rcn1-S113/117A) を作製したところ、これらの部位がカルシウム刺激に応じてリン酸化されること、S117 のリン酸化に依存して S113 がリン酸化されることを見いだした。

Rcn1 をリン酸化するキナーゼを同定した。Gsk3 ファミリーのリン酸化酵素である Mck1 の変異株では S113 のリン酸化が阻害された。このことからカルシウムに依存した S113 のリン酸化は Mck1 によることが判明した。

一方、Rcn1 のリン酸化はカルシニューリンの阻害剤である FK506 を添加すると促進することを見いだした。カルシニューリンは脱リン酸化酵素である。実際、Rcn1 のリン酸化がカルシニューリンによってカウンターラクトされた。以上のことから、Rcn1 の S113 はカルシウム刺激によってリン酸化され、カルシニューリンによって脱リン酸化されることがわかった。

Rcn1-S113A, Rcn1-S117A, Rcn1-S113/117A はいずれもユビキチン化を受けずに安定化することを見いだした。以上のことから、Rcn1 はカルシウム刺激により S113 がリン酸化され、このリン酸化に依存して SCF によってユビキチン化・分解されることがわかった。またこのユビキチン化は、カルシニューリンによる S113 の脱リン酸化によって阻害されることも明らかにした。すなわち、Rcn1 のユビキチン化・分解は、S113 のリン酸化と脱リン酸化によって制御されることを明らかにした。

## (2) RCAN1 のユビキチン化・分解の持つ生理的意味の解明

リン酸化された Rcn1 が分解されることの持つ生理的意義を解明するために、リン酸化部位をアラニンに置換した変異型 Rcn1 を発現する細胞で、カルシニューリンの活性を調べた。野生株では、カルシウム添加後、カルシニューリン活性は 15-30 分をピークとして上昇し、その後不活性化されるのに対して、リン酸化部位をアラニンに置換した変異型 Rcn1 を発現する細胞では、カルシニューリンは活性化されなかった。一方、SCF の変異株やリン酸化酵素 MCK1 の変異株では、カルシニューリンの活性化を検出することができ

なかった。したがって、リン酸化された Rcn1 は SCF に依存して分解され、その結果、カルシニューリンが活性化されることがわかった。

さらに Rcn1 の分解は、細胞が  $Ca^{2+}$  の濃度変化を検知したときに、カルシニューリンを再活性化するのに必要なことを明らかにした。細胞にカルシウム刺激を行って 30 分後、Rcn1 蛋白質量は過剰に存在していたが、この時に再びカルシウム刺激を与えても、カルシニューリンの再活性化を検出することができなかった。これに対して、カルシウム刺激を行って 120 分後、Rcn1 蛋白質量は分解され減少していたが、この時に再びカルシウム刺激を与えると、カルシニューリンが再活性化した。リン酸化部位をアラニンに置換した安定化型 Rcn1 を発現する細胞では、カルシニューリンは顕著な再活性化は見られなかった。同様に、SCF の変異株やリン酸化酵素 MCK1 の変異株では、カルシニューリンの顕著な再活性化を検出することができなかった。したがって、リン酸化された Rcn1 の分解は、細胞がカルシウムの濃度変化を感知してカルシニューリンを活性化するのに必要なことを示した。

## (3) RCAN1 のユビキチン化・分解によるカルシニューリン活性制御は高度に保存されている

RCAN1 は酵母からヒトまで高度に保存されている。ヒトではダウン症の患者で高発現化しており、ダウン症の患者にみられる神経疾患は RCAN1 の過剰発現によることがわかっている。

ヒト RCAN1 は、エキソンの異なる二つの分子種 (RCAN1-1 と RCAN1-4) が存在する RCAN1-1 と RCAN1-4 はいずれも酸化ストレスに依存してリン酸化され、ユビキチン化・分解されることを見いだした。このことから RCAN1 のユビキチン化・分解が生物種を通して保存されていることが示唆された。

RCAN1-4 のユビキチン化機構を解析した。RCAN1-4 と結合する F-box 蛋白質を検索したところ、 $\beta$ -TrCP と FBW4 を得た。RCAN1 と FBW4 の結合は、酸化ストレスに依存しなかったが、RCAN1 と  $\beta$ -TrCP の結合は、酸化ストレスに依存した。

そこで RCAN1 が siRNA を用いて  $\beta$ -TrCP をノックダウンした細胞では、酸化ストレスに依存した RCAN1 のユビキチン化は検出されなかった。逆に酸化ストレスに依存した RCAN1 のユビキチン化は、 $\beta$ -TrCP を過剰発現した細胞では亢進した。さらに酸化ストレスによる RCAN1 のユビキチン化を初代神経細胞においても検出した。以上のことから酸化ストレスに応じて RCAN1 が  $SCF^{\beta\text{-TrCP}}$  に依存してユビキチン化されることが判明した。

#### (4) 結論

これまでカルシウムで活性化したカルシニューリンは、自身のフィードバックインヒビターにより不活性化されると単純に考えられていた。本研究ではフィードバックインヒビターである RCAN1 がユビキチン化に依存して分解されることを見いだした。RCAN1 のユビキチン化・分解は GSK3 キナーゼによるリン酸化によって促進し、カルシニューリンによる脱リン酸化によって不活性化される。このようにカルシニューリンは、RCAN1 の発現を促進するだけでなく、カルシニューリンの活性に応じて RCAN1 の蛋白質量を調節することによって自身の活性を調節しているという新しいカルシニューリンの活性制御機構を発見した。

RCAN1 によるカルシニューリンの活性制御において、RCAN1 がカルシニューリンを不活性化するだけでなく、リン酸化されるとカルシニューリンを活性化するというパラドックスが指摘されている。このパラドックスは、上記の新しいカルシニューリンの活性制御機構をもとに解消することができる。すなわち、RCAN1 によるカルシニューリンの活性阻害は、リン酸化された RCAN1 が SCF によってユビキチン化・分解されることによって買われ、と説明することができる。

RCAN1 のユビキチン化・分解は、カルシウム刺激に応じたカルシニューリンの活性化に必要であるだけでなく、カルシニューリンを再活性化するためにも必要であることを明らかにした。

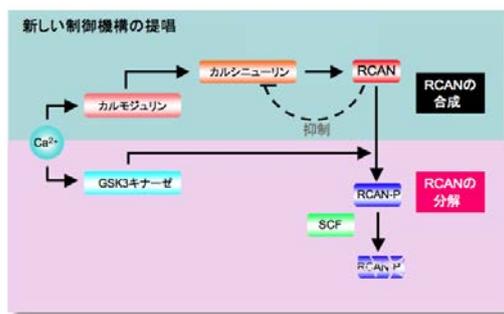


図2 本研究で提唱した新しいカルシニューリンの活性制御機構

#### 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 7 件)

(1) Satomu Mimura, Makiko Komata, Tsutomu Kishi, Katsuhiko Shirahige, Takumi Kamura: SCF<sup>Dia2</sup> regulates DNA replication forks during S-phase in budding yeast. EMBO Journal 28: 3693-3705 (2009)

(2) Yuan Liu, Satoru Mimura, Tsutomu Kishi, Takumi Kamura: A longevity protein, Lag2, interacts with SCF and regulates SCF function. EMBO Journal 28: 3693-3705 (2009)

(3) Sachie Asada, Akemi Ikeda, Rina Nagao, Horoshi Hama, Tatsuhiko Sudo, Akiyoshi Fukamizu, Yoshihito Kasuya, Tsutomu Kishi: Oxidative-stress induced ubiquitination of RCAN1 mediated by SCF<sup>b-TrCP</sup> ubiquitin ligase. International journal of molecular medicine 22: 95-104 (2008)

(4) Tsutomu Kishi, Akemi Ikeda, Noriko Koyama, Junji Fukada, Rina Nagao: A refined two-hybrid system reveals that SCF<sup>Cdc4</sup>-dependent degradation of Swi5 contributes to the regulatory mechanism of S phase entry. Proceedings of National Academy of Sciences (USA) 105: 14497-14502 (2008)

(5) Tsutomu Kishi, Akemi Ikeda, Rina Nagao, Noriko Koyama: The SCF<sup>Cdc4</sup> ubiquitin ligase regulates calcineurin signaling through degradation of Rcn1, an inhibitor of calcineurin. Proceedings of National Academy of Sciences (USA) 104: 17418-17423 (2007)

[図書] (計 1 件)

目的別で選べる核酸実験の原理とプロトコール 酵母からの核酸抽出法 145-151 実験医学別冊 平尾一郎、胡桃坂仁志編集 2011年6月発行

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

岸 努 (KISHI TSUTOMU)

東京工業大学・大学院生命理工学研究科・グローバルCOE研究員

研究者番号： 80260024