



カルシニューリン欠損を相補する新規RNA結合蛋白質の単離と機能解析

前川, 勝英
喜多, 綾子
伊藤, 優美
杉浦, 麗子

(Citation)

神戸大学医学部紀要, 62(1/2):11-16

(Issue Date)

2001-12

(Resource Type)

departmental bulletin paper

(Version)

Version of Record

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/00097793>



カルシニューリン欠損を相補する 新規 RNA 結合蛋白質の単離と機能解析

前 川 勝 英, 喜 多 綾 子, 伊 藤 優 美, 杉 浦 麗 子

神戸大学医学部薬理学教室
(指導：久野高義教授)

連絡先：神戸市中央区楠町 7-5-1
神戸大学医学部薬理学教室
TEL 078-382-5441

(平成13年3月7日受付)

【要 約】

カルシニューリン (CN) は高度に保存された Ca^{2+} /カルモデュリン依存性脱リン酸化酵素であり、免疫抑制薬FK506/シクロスポリンの標的分子でもある。分裂酵母において、CN遺伝子を破壊しても致死ではないが、細胞質分裂・ Cl^- ホメオスタシスの異常を示す。我々は、CN遺伝子破壊株の Cl^- 超感受性を指標にしたスクリーニングを行い、過剰発現することにより、CN欠損を相補することの出来る遺伝子 (多コピー抑圧遺伝子) を単離した。既に報告された pmp1^+ , pek1^+ 以外に、RNA結合蛋白質をコードする新規遺伝子 msc1^+ (multicopy suppressor of calcineurin deletion) を取得した。 msc1^+ 遺伝子はRNA結合領域であるKHドメインを3個有し、ヒトから酵母まで高度に保存されていた。

msc1^+ 遺伝子を過剰発現するとCN破壊株の示す Cl^- 超感受性が部分的に抑圧される。 msc1^+ 遺伝子を破壊しても通常の増殖に影響は認めないが、 msc1^+ 遺伝子とCN遺伝子を同時に破壊するとCN破壊株の示す Cl^- 超感受性と細胞質分裂異常が増悪する。以上の結果から、Msc1蛋白質はCNと協同的に機能する分子を標的とし、mRNAの安定性を高めることにより、CN欠損を抑圧している可能性が示唆された。

【緒 言】

カルシニューリン (CN) は Ca^{2+} /カルモデュリン依

存性に活性化される蛋白質脱リン酸化酵素であり、ヒトから酵母に至る真核生物全てに高度に保存されている^{1) 2)}。免疫抑制薬であるシクロスポリンAおよびタクロリムス (FK506) はイムノフィリンと結合し、さらにCNと複合体を形成し、CNの酵素活性を阻害することにより免疫抑制効果を発揮する³⁾。FK506の副作用として、腎障害、高脂血症、高血圧などが高頻度に生じることが知られているが、これらの現象も生体内のCNとその標的分子の機能を介して生じていることが推測される。しかしこのような標的分子の同定・機能解析は、従来の生化学的手法、高等生物の系のみを用いたのでは困難である。

我々は、遺伝学的手法を駆使でき、しかも哺乳動物に最も近い情報伝達経路をもつモデル生物である分裂酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) を用いてCNの機能解析を行ってきた。分裂酵母には1コピーのCN遺伝子 (ppb1^+) が存在し、CN遺伝子を破壊しても通常の培地での細胞増殖に影響はないが、細胞質分裂の異常⁴⁾ と、 Cl^- ホメオスタシスの異常を示す^{5) 6)}。我々はCN遺伝子破壊株の示す Cl^- 超感受性に着目し、過剰発現によりCN欠損を抑圧することの出来る遺伝子群 msc (multicopy suppressor of calcineurin deletion) を取得した。既に報告されている pmp1^+ 遺伝子⁵⁾ と pek1^+ 遺伝子⁶⁾ 以外に、新規遺伝子としてRNA結合蛋白質をコードする遺伝子 msc1^+ を単離した。ここでは、RNA結合蛋白質Msc1とCNシグナル伝達経路との遺伝学的関係についての解析結果を報告する。

キーワード：カルシニューリン, 免疫抑制薬, 分裂酵母, RNA結合蛋白質

【方 法】

1. 使用した株, 培養条件および試薬

本研究で用いた分裂酵母株を以下に示す。HM123 (h^+leu1 , 野生株), KP119 (h^+leu1 $ppb1::ura4^+$, カルシニューリン破壊株), 酵母細胞の培養にはYPD培地 (1% yeast extract, 2% polypeptone, 2% dextrose) およびEMM培地を用いた。分裂酵母の遺伝学的操作はMorenoら⁷⁾の方法に従って行った。分裂酵母の形質転換は酢酸リチウム法⁸⁾によって行った。FK506は藤沢薬品工業より供与された。分子生物学的操作についてはSambrookらの方法⁹⁾に従って行った。

2. $msc1^+$ 遺伝子クローニング

酢酸リチウム法によりカルシニューリン (CN) 破壊株を形質転換し, 多コピーでCN破壊株の表現型を抑圧するプラスミドを得た。詳細な方法は既に報告した論文に記されている⁵⁾。さらに, 既知の $ppb1^+$ 遺伝子, $pmp1^+$ 遺伝子, $pek1^+$ 遺伝子とは異なる制限酵素地図を示すプラスミドとして $msc1^+$ 遺伝子を取得した。ダイデオキシ法により遺伝子の塩基配列を決定した。

3. $msc1^+$ 遺伝子破壊

$msc1^+$ 遺伝子のORFを含む約2000bpのPstI/NsiI断片をpGEM7zfのPstI siteにサブクローニングを行い, $msc1^+$ 遺伝子の中央に位置するHindIII siteにUra4断片を挿入した構築を作成した (pKB1738)。pKB1738のプラスミドDNA 1 μ gをSalI/PstIで制限酵素処理を行い, uracil要求性の野生株 (KP456) に形質転換を行った。 $msc1^+$ 遺伝子破壊の確認はコロニーPCR法およびgenomic DNAを抽出し, Southern blotting により行った。

【結 果】

1. $msc1^+$ 遺伝子のクローニング

野生型の酵母は培地に0.5Mの $MgCl_2$ が存在しても生育可能であるが, カルシニューリン (CN) 遺伝子を破壊すると0.12Mの $MgCl_2$ 存在下で生育不能となる。CNを介するシグナル伝達経路において機能する分子の取得を目的として, 過剰発現することによりCN欠損を抑圧することの出来る遺伝子 (多コピー抑圧遺伝子) の取得を試みた。CN欠損株を宿主として, 分裂酵母多コピーゲノムライブラリーによる形質転換を行い, 約20万のLeu⁺形質転換体から, 0.12Mの $MgCl_2$ 存在下で生育可能となるクローンをスクリーニングした。YPD+0.12M $MgCl_2$ プレートで生育

可能なクローンを30個得た。制限酵素パターンおよびサザンハイブリダイゼーションの結果から, 12個が $ppb1^+$ 遺伝子, 10個が $pmp1^+$ 遺伝子⁵⁾, 7個が $pek1^+$ 遺伝子⁶⁾であった。これら既知の遺伝子のいずれとも異なるプラスミドとしてpKB1158を取得し, これを $msc1^+$ (multicopy suppressor of calcineurin deletion 1) と命名した, カルシニューリン破壊株は (vector) 0.12 M $MgCl_2$ 存在下で生育不能であるが, $msc1^+$ を過剰発現することで, 野生株 ($ppb1^+$) と同様に生育可能となる (図1, $msc1^+$)。しかし, $msc1^+$ を過剰発現させても, 野生株が生育可能な0.3M $MgCl_2$ 存在下では生育不能であったことから, $msc1^+$ によるCN欠損の抑圧は部分的であることが示された (図1)。カルシニューリン欠損を相補する最少断片の塩基配列を決定した結果, $msc1^+$ 遺伝子は分裂酵母の第III染色体に存在するSPACC757.09をコードしていることが明らかとなった。

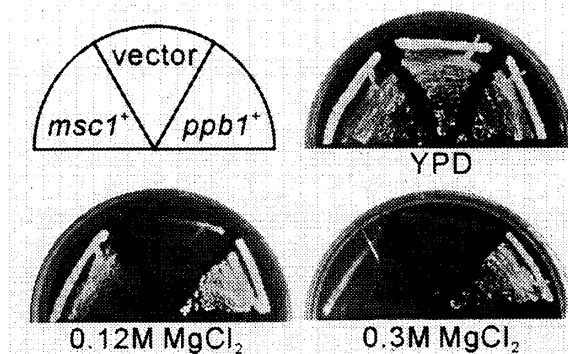


図1: カルシニューリン破壊株の表現型および多コピー抑圧遺伝子 $msc1^+$ の単離

カルシニューリン破壊株 (vector) は通常の培地YPDでは生育可能だが, 培地に0.12M $MgCl_2$ が存在すると生育不能となる。カルシニューリン破壊株に $msc1^+$ 遺伝子を過剰発現すると0.12M $MgCl_2$ 存在下で生育可能となった ($msc1^+$)。カルシニューリン破壊株にカルシニューリン遺伝子を導入すると ($ppb1^+$) 0.3 M $MgCl_2$ 存在下でも生育可能であるが, $msc1^+$ 遺伝子を導入した細胞は生育不能である。

2. $msc1^+$ 遺伝子はRNA結合蛋白質をコードする

$msc1^+$ 遺伝子は378アミノ酸残基からなる推定分子量約42KDaの蛋白質をコードしており, 構造上の特徴としてRNA結合ドメインとして機能すると推測されるKHモチーフを3個有することが明らかとなった (図2)。BLASTサーチの結果, $msc1^+$ 遺伝子はヒトから酵母まで高度に保存されており, ヒトのMCG10¹⁰⁾, マウスのalphaCP-4¹¹⁾とアミノ酸レベルで32%の相同性を有することが明らかとなった。 $msc1^+$ 遺伝子は, 同じくKHモチーフタイプの

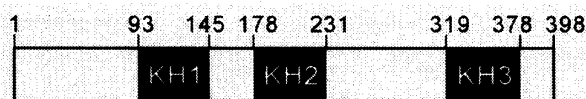


図2 : *msc1*⁺ はKHモチーフを有する新規RNA結合蛋白質をコードする

Msc1 蛋白質のドメイン構造を示した。*msc1*⁺ 遺伝子は398アミノ酸からなる蛋白質をコードしており、3個のKHドメイン(図中KH)を有する。

RNA結合ドメインを有するNOVA遺伝子とも高い相対性を示した¹²⁾。NOVA蛋白質は自己免疫疾患の抗原として神経変性・癌化等に深く関与していることが示唆されている¹³⁾。

3. *msc1*⁺ 遺伝子破壊およびその表現型

msc1⁺ 遺伝子の生理機能をより明らかにする目的で、遺伝子破壊株を作成した。*msc1*⁺ 遺伝子のORF内にマーカー遺伝子としてUra 4を挿入した構築を作成し、one-step fene disruption 法による遺伝子破壊を行った¹⁴⁾。遺伝子破壊の確認はPCR法およびgenomic DNAを抽出し、Southern blotting 法により行った。その結果、*msc1*⁺ 遺伝子を破壊しても通常の増殖に影響は認めないが、0.9M KClあるいは、0.3 M CaCl₂が存在すると生育できないことが明らかとなった(図3)。

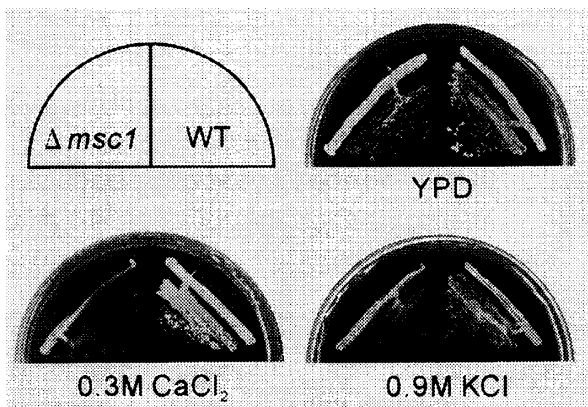


図3 : *msc1*⁺ 遺伝子破壊株の表現型

野生株(WT)と*msc1*⁺ 遺伝子破壊株 ($\Delta msc1$)をYPD, YPD+0.3M CaCl₂, YPD+0.9M KClプレートにストリーク死, 33度で3日間培養を行った。

4. CNと*msc1*の遺伝学的関係

msc1⁺ 遺伝子の過剰発現がCN破壊体の表現型を抑圧したので、次に、CN破壊体と*msc1*破壊体(*msc1*)の二重変異体($\Delta ppb1 \Delta msc1$)を作成した。表現型を解析した結果、CN破壊体あるいは*msc1*破壊体はそれぞれ0.08M MgCl₂プレートでは生育可能であるが、CNと*msc1*の二重破壊体は0.08

M MgCl₂プレート上で増殖できないことが明らかとなった(図4A)。

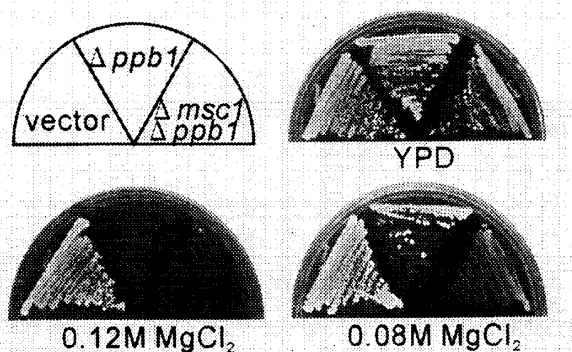
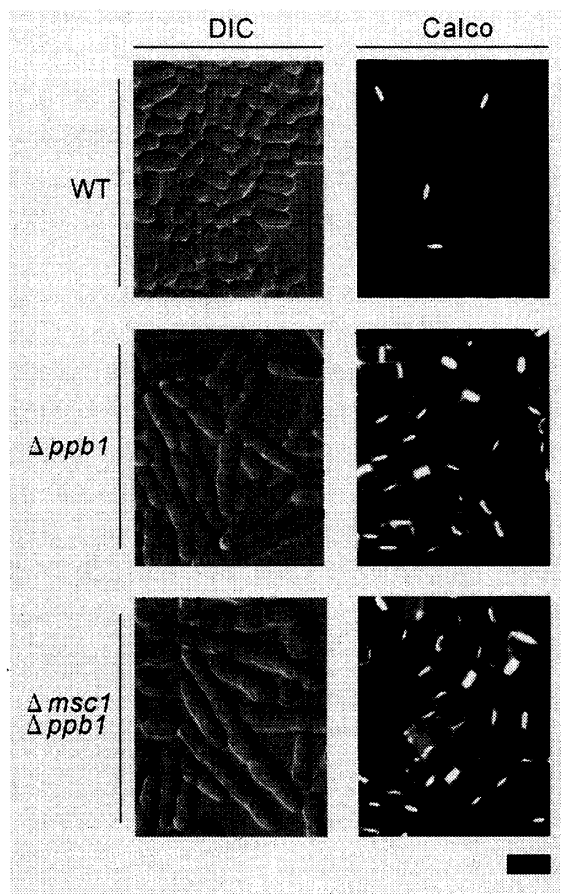


図4 : カルシニューリン遺伝子破壊株 ($\Delta ppb1$) および*msc1*⁺ カルシニューリン遺伝子二重破壊株 ($\Delta msc1 \Delta ppb1$) の表現型

A. 野生株, カルシニューリン遺伝子破壊株 ($\Delta ppb1$), *msc1*⁺ カルシニューリン二重遺伝子破壊株 ($\Delta msc1 \Delta ppb1$)をYPD, YPD+0.12M MgCl₂, YPD+0.08M MgCl₂プレートにストリークし, 33度で3日間培養した。



B. 野生株, カルシニューリン遺伝子破壊株($\Delta ppb1$), *msc1*⁺ カルシニューリン二重遺伝子破壊株 ($\Delta msc1 \Delta ppb1$)をYPD培地で液体培養しcalcofluor染色後, 蛍光顕微鏡による観察を行った。calcofluor: 細胞壁, 隔壁染色像, DIC: ノマルスキー微分干渉像

さらに、CN破壊体は多核・多隔壁という細胞質分裂の異常を示すが、 $\Delta ppb1$ $\Delta msc1$ 二重破壊体では、多核壁を有する細胞の数が増加し、細胞質分裂の異常も増悪していることが明等かとなった(図4B)。

【考 察】

我々は、カルシニューリン(CN)の生理機能をより明らかにする目的で、CN破壊体の形質を過剰発現することにより抑圧することの出来る遺伝子(多コピー抑圧遺伝子)の取得を行ってきた。現在までに、MAPキナーゼホスファターゼであるPmp1, MAPキナーゼキナーゼであるPek1を取得し、MAPキナーゼ経路とCNシグナルの拮抗的な関係を明らかにしてきた^{5) 6)}。本研究では新たな多コピー抑圧遺伝子として、 $msc1^+$ を取得したので、CNシグナルとの機能的連関について観察する。

$msc1^+$ 遺伝子は、KHモチーフ型のRNA結合ドメインを3個有する高度に保存されたRNA結合蛋白質をコードしていた。 $msc1^+$ 遺伝子は構造的にNOVA蛋白質と非常に類似している。NOVAはKHモチーフタイプのRNA結合ドメインを有するRNA結合蛋白質の一つであり、Paraneoplastic opsoclonus myoclonus ataxia (POMA)等の自己免疫疾患の抗原として神経変性、癌化等に深く関与していることが報告されている。

NOVAは標的RNAの3'-UTR(非翻訳領域)に結合し、その安定化に関与すると考えられていることから¹⁵⁾、Msc1蛋白質は標的分子のRNAの安定性を高めることによりCN欠損を相補している可能性が示唆された。RNA結合蛋白質はmRNAの輸送、局在化、あるいは翻訳調節といった転写後の調節因子として遺伝子の発現制御に重要な役割を果たしている。特にmRNAの安定性の調節は高度に保存された遺伝子発現制御のメカニズムの一つであり、細胞の増殖や癌化、分化に関与する。

$msc1^+$ 遺伝子の過剰発現はCN欠損を相補し、 $msc1$ 遺伝子とCN遺伝子を同時に破壊するとCN破壊株の表現型(C1感受性、細胞質分裂異常)が増悪する。このことから、 $msc1^+$ 遺伝子は、CNシグナル伝達経路と協同的に機能する分子を標的とし、そのmRNAの安定性を制御している可能性が高いと考えられる。

多くの初期応答遺伝子(c-fos, interleukin等)のmRNAは非常に不安定であり、これらのmRNAの3'-UTRにはAUUUAという不安定化配列が存在する¹⁶⁾。JNKやCNがIL-3のmRNAの安定性に関

与しているという報告がある¹⁷⁾。 $msc1^+$ 遺伝子の標的分子は現在のところ不明であるが、CNあるいはPmk1 MAPKとRNA結合蛋白質による遺伝子発現制御の機能的連関を示唆しており興味深い。

【謝 辞】

ご指導いただきました久野高義教授に謝意を表します。

【文 献】

- 1) Cyert, M. S., Kunisawa, R., Kaim, D., Thorner, J.: Yeast has homologs (CNA1 and CUA2 gene products) of mammalian calcineurin, a calmodulin-regulated phosphoprotein phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 7376-7380, 1991
- 2) Ito, A., Hashimoto, T., Hirai, M., Takeda, T., Shuntoh, H., Kuno, T., Tanaka, C.: The complete primary structure of calcineurin A, a calmodulin binding protein homologous with protein phosphatases 1 and 2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 163: 1492-1497, 1989.
- 3) Liu, J., Farmer, J. D., Lane, W. S., Friedman, J., Weissman, I., Schreiber, S. L.: Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell* 66: 807-815, 1991.
- 4) Yoshida, A. T., Toda, T., Yanagida, M.: A calcineurin-like gene *ppb1+* in fission yeast: mutant defects in cytokinesis, cell polarity, mating and spindle pole body positioning. *J. Cell Sci.* 107: 1725-1735, 1994.
- 5) Sugiura, R., Toda, T., Shuntoh, H., Yanagida, M., Kuno, T.: *pmp1+* a suppressor of calcineurin deficiency, encodes a novel MAP kinase phosphatase in fission yeast. *EMBO J.* 17: 140-148, 1998.
- 6) Sugiura, R., Toda, T., Dhut, S., Shuntoh, H., Kuno, T.: The MAPK kinase *Pek1* acts as a phosphorylation-dependent molecular switch. *Nature* 399: 479-483, 1999.

- 7) Moreno, S., Klar, A., Nurse P. : Molecular genetic analysis of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Methods Enzymol.* 194 : 795 - 823, 1991.
- 8) Ito, H., Fukuda, Y., Murat, a K., Kimura, A. : Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J. Bacteriol.* 153 : 163 - 168, 1983.
- 9) Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. : *Molecular Cloning : A Laboratory Manual*, 2nd and Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, NY.
- 10) zHU, j., cHEN, x.:mcg10, a novel p53 target gene that encodes a KH domain RNA-binding protein, is capable of inducing apoptosis and cell cycle arrest in G (2)-M : *Mol Cell Biol.* 20 : 5602 - 5618, 2000.
- 11) Makeyev, A. V., Liebhaber, S.A. : Identification of two novel mammalian genes establishes a subfamily of KH-domain RNA-binding proteins : *Genomics* 67 : 301 - 316, 2000.
- 12) Buckanovich, R. J., Posner, J. B., Darnell R. B. : Nova, the paraneoplastic Ri antigen, is homologous to an RNA-binding protein and is specifically expressed in the developing motor system. *Neuron* 4 : 657 - 72, 1993.
- 12) Buckanovich, R. J., Yang, Y. Y. Darnell, R. B. : The onconeural antigen Nova - 1 is a neuron-specific RNA-binding protein the activity of which is inhibited by paraneoplastic antibodies : *J. Neurosci.* 16 : 1114 - 2212. 1996.
- 14) Rothstein, R. J. : One-step gene disruption in yeast : *Methods Enzymol.* 101 : 202 - 11. 1983.
- 15) Buckanovich, R. J., Darnell, R. B. : The neuronal RNA binding protein Nova - 1 recognizes specific RNA targets in vitro and in vivo : *Mol Cell Biol.* 17 : 3194 - 3201, 1997.
- 16) Shaw, G., Kamen. R. A conserved AU sequence from the 3' untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation : *Cell.* 46 : 659 - 667, 1986.
- 17) Chen, C. Y., Del, G. K. F., Wu, Z., Karin M : Stabilization of interleukin - 2 mRNA by the c-Jun NH2-terminal kinase pathway : *Science.* 280 : 1945 - 1949, 1998.

Isolation and characterization of multi copy suppressor of calcineurin deletion of fission yeast.

Katsuhide Maekawa, Ayako Kita, Yuumi Itoh, Reiko Sugiura

Department of Pharmacology, Kobe University School of Medicine

ABSTRACT

Calcineurin is a conserved Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein phosphatase that plays a critical role in Ca^{2+} -mediated signaling in eucaryotic cells. In fission yeast a calcineurin homologue (Ppb1) is required for cytokinesis and for chloride ion homeostasis but is not essential for cell viability. To identify genes the product of which interact calcineurin, we isolated multicopy plasmids that suppressed the Cl^- -sensitive growth defect of *ppb1*. We identified four genes, three of which are previously identified genes-*ppb1*⁺, *pmp1*⁺, and *pek1*⁺-with one novel gene, which has been designated *msc1*⁺ (multicopy suppressor of calcineurin deletion). The *msc1*⁺ gene contains an open reading frame (ORF), encoding a novel evolutionarily highly conserved protein with the RNA-interacting KH motif. We also found that Cl^- -sensitive growth defect of calcineurin deletion was exacerbated when combined with *msc1*⁺ gene deletion. Together, these results suggest that Msc1 is likely to have a role in RNA metabolism, thereby suppressing calcineurin deletion phenotypes.