

カルシニューリンの新たな制御機構と医療・創薬への応用 —RNA顆粒によるカルシニューリンの空間的制御—

佐藤 亮介, 萩原 加奈子, 喜多 綾子, 杉浦 麗子

Ca²⁺/カルモジュリン依存性に活性化されるタンパク質脱リン酸化酵素であるカルシニューリンは、免疫抑制薬FK506の標的分子として臨床的にもきわめて重要なホスファターゼである。カルシニューリンは、免疫、心肥大、血管新生、記憶など多様な生命現象や、その異常が引き起こす各種病態に関わることから、カルシニューリンシグナルの制御機構の解明、さらにはカルシニューリンシグナルを制御できる薬物の創製は、疾患治療という観点からもきわめて重要である。本稿では、我々の酵母遺伝学とケミカルゲノミクス研究から明らかになった“RNA顆粒”を介するカルシニューリンの空間的制御メカニズムを紹介する。RNA顆粒は、従来考えられていたような「RNAの運命決定装置」としての役割に加え、「ストレス応答やシグナル制御の拠点」としての機能や神経変性疾患やがんなどの病態への関わりが注目を集めている。本稿では、RNA顆粒とカルシニューリンシグナル制御の関わり、その疾患治療への応用の可能性について紹介する。

1. はじめに

すべての真核生物に高度に保存されているカルシニューリンは、Ca²⁺/カルモジュリン依存性に活性化されるSer/Thrホスファターゼであり、カルシウム (Ca²⁺) シグナル伝達のキープレーヤーである¹⁾。1991年に、免疫抑制薬タクロリムス (FK506)/シクロスポリンAが、それぞれのイムノフィリンと結合し、カルシニューリンの酵素活性を阻害することによりその免疫抑制効果を発揮することが発見されて以来、カルシニューリンは、臓器移植に不可欠な免疫抑制薬の標的として、またCa²⁺シグナルを仲介する重要なシグナル伝達分子として脚光を集めてきた^{2,3)}。最も詳細にカルシニューリンシグナルが解析されているT細胞において、カルシニューリンは転写因子NFAT (nucle-

ar factor of activated T cells) を脱リン酸化し、NFATの核内移行を引き起こすことでIL-2などのサイトカインの発現を誘導することが明らかとなった⁴⁾。

このような、「Ca²⁺-カルシニューリン-転写因子-遺伝子発現制御」という“シグナル伝達カセット”，ならびに“カルシニューリンによる転写因子の核内移行制御”というメカニズムは酵母から高等生物まで進化的に高度に保存されている (図1)。特に、心筋細胞において、FK506投与により心筋肥大が抑制されるという報告がなされて以来、カルシニューリンシグナルの制御は心肥大治療薬という新たな疾患治療のターゲットとしても注目されるようになった^{5,6)}。また、カルシニューリンの特異的阻害薬であるFK506は、臓器移植に伴う拒絶反応の予防に不可欠であるが、近年アトピー性皮膚炎を始めとする湿疹治療においても著効を発揮するなど、その医療的用途は拡大している。

一方、免疫抑制薬であるFK506を投与されたときに、腎障害、高脂血症、多毛、高血圧などが副作用として高頻度で生じることが報告されているが、これらも生体内でカルシニューリンの酵素活性が抑制された結果生じると考えられることから、カルシニューリンはさまざまな分子との機能的相互作用を介して、その生理機能を発揮していると推測される。しかしながらこのようなカルシニューリンの生理的な役割、あるいはカルシニューリンの作用経路を分

近畿大学大学院薬学研究科分子医療・ゲノム創薬学研究室
(〒577-8502 大阪府東大阪市小若江3-4-1)

Spatial regulation of calcineurin by RNA granules

Ryosuke Satoh, Kanako Hagihara, Ayako Kita and Reiko Sugiura
(Laboratory of Molecular Pharmacogenomics, School of Pharmaceutical Sciences, Kinki University, 3-4-1 Kowakae, Higashiosaka City, Osaka 577-8502, Japan)

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2015.870517

© 2015 公益社団法人日本生化学会

子レベルで明らかにすることは容易ではない。

我々は、遺伝学的手法が駆使でき、高等生物にきわめて近い細胞内シグナル伝達経路を有する分裂酵母をモデル生物としてカルシニューリン研究を行ってきた⁷⁾。特に、カルシニューリンとMAPK経路の機能的相互作用の発見に立脚した遺伝学的戦略を展開することにより、カルシニューリンとクロストークするさまざまなシグナル伝達経路を解明してきた⁸⁻¹²⁾。さらに、分裂酵母においてもカルシニューリンがFK506の標的分子であることに着目した「ケミカルゲノミクス」を駆使して免疫抑制薬感受性遺伝子群を同定し、カルシニューリンの新たな細胞機能を次々と明らかにした¹³⁻²¹⁾。

一方、前述のとおり、カルシニューリンによる標的転写因子の細胞内局在・遺伝子発現の制御機構に関しては、さまざまな細胞や生物種で詳細な研究がなされているにも関わらず、カルシニューリン自身の細胞内局在がどのような機構で調節されているのかということはほとんど解明されていなかった。我々は、ストレス刺激に応答したカルシニューリンの細胞内局在を解析した結果、カルシニューリンがストレス依存的に劇的な局在の変化を示し、「RNA顆粒」と呼ばれる細胞質内の構造体に移行することを見いだした²²⁾。RNA顆粒は、RNAとその代謝などに関わる分子を中心に形成されることから、当初「RNAを介する遺伝子発現制御」という役割のみが注目を集めていた。しかしながら、近年TOR (target of Rapamycin) をはじめとしたさまざまなシグナル分子がRNA顆粒にリクルートされること、さらに、がんやアルツハイマー病、パーキンソン病、ウイルス感染などの疾患や病態との密接な関わりが

明らかになったことから、RNA顆粒は「シグナル伝達の拠点」として、また「疾患治療の標的」としても新たな注目を集めている²³⁾。本稿では、我々の研究から浮かび上がってきたカルシニューリンの新たな空間的制御メカニズムと、RNA顆粒形成の疾患治療への応用の可能性について紹介する。

2. カルシニューリンとMAPキナーゼ経路の拮抗的なクロストークを利用したMAPキナーゼシグナル伝達経路の制御因子群の同定

カルシニューリン (図2, CN) は触媒サブユニット (CnA) とCa²⁺結合制御サブユニット (CnB) から構成されるヘテロ二量体であり、細胞内Ca²⁺濃度が上昇するとCa²⁺結合タンパク質であるカルモジュリン (図2, CaM) がカルシニューリンに結合することで活性化される (図2)。免疫抑制薬であるFK506はFKBP12、シクロスポリンAはシクロフィリン (CyP) というそれぞれのイムノフィリンと複合体を作り、カルシニューリンの活性を阻害する (図2)。

分裂酵母では、触媒サブユニットであるPpb1も制御サブユニットであるCnb1も1種類の遺伝子にコードされており、どちらの遺伝子をノックアウトしても同じ表現型を示す。また、Ppb1とCnb1を同時にノックアウトしても単独ノックアウト細胞と表現型は同じであり、触媒サブユニットを過剰発現しても制御サブユニットがなければ機能を発揮できない²⁴⁾。我々は、遺伝学とケミカルゲノミクスを駆使でき、かつ最もシンプルなカルシニューリン研究のモデル生物として分裂酵母を用いて研究を行ってきた。特にカルシニューリンノックアウト、あるいはFK506処理によるカルシニューリン酵素活性阻害に伴う表現型である「Cl⁻感受性」を利用することにより、高等生物のERK MAPK (extracellular signal-regulated MAP kinase) のホモログであるPmk1 MAPK経路の制御因子群を網羅的に同定する手法を確立した (詳細は他の我々の総説²⁵⁾ あるいはHenry Stewart Talks Onlineを参照されたい)。

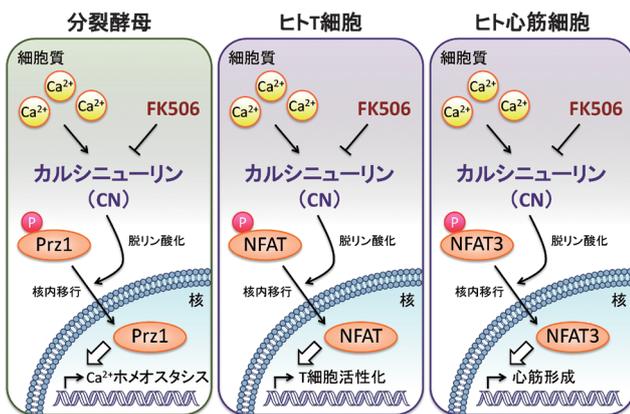


図1 カルシニューリンシグナルは高度に保存されている。左から、分裂酵母、ヒトT細胞、ヒト心筋細胞におけるカルシニューリン (CN) による転写調節機構を示している。Ca²⁺-カルモジュリン依存的に活性化されるCNは、転写因子を脱リン酸化することにより核内移行を促進し、転写を誘導する。分裂酵母、ヒトT細胞、ヒト心筋細胞において、CNはそれぞれ転写因子Prz1, NFAT, NFAT3を脱リン酸化し、Ca²⁺ホメオスタシス、T細胞活性化、心筋形成を制御している。免疫抑制薬FK506は、CNを抑制することで、CN依存的な転写を抑制することができる。Sugiura, R., et al. (2006) *Mol. Biol. Cell*, 17(11), 4790-4800およびSugiura, R., et al. (2003) *J. Biol. Chem.*, 278(20), 18078-18084より。

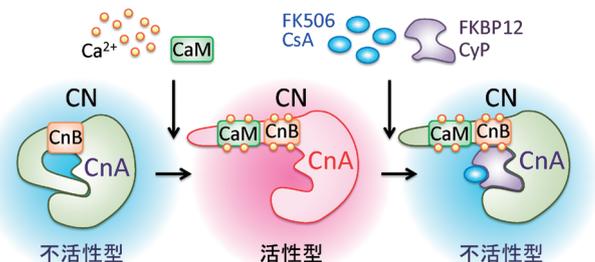


図2 カルシニューリンは免疫抑制薬FK506の標的分子であるタンパク質脱リン酸化酵素であるカルシニューリン (CN) は、触媒サブユニット (CnA) とCa²⁺結合制御サブユニット (CnB) から構成される。Ca²⁺-カルモジュリン (CaM) によって活性化される。免疫抑制薬タクロリムス (FK506) やシクロスポリンA (CsA) は、それぞれFKBP12, CyPといったイムノフィリンと複合体を形成し、CNを不活性化させる。

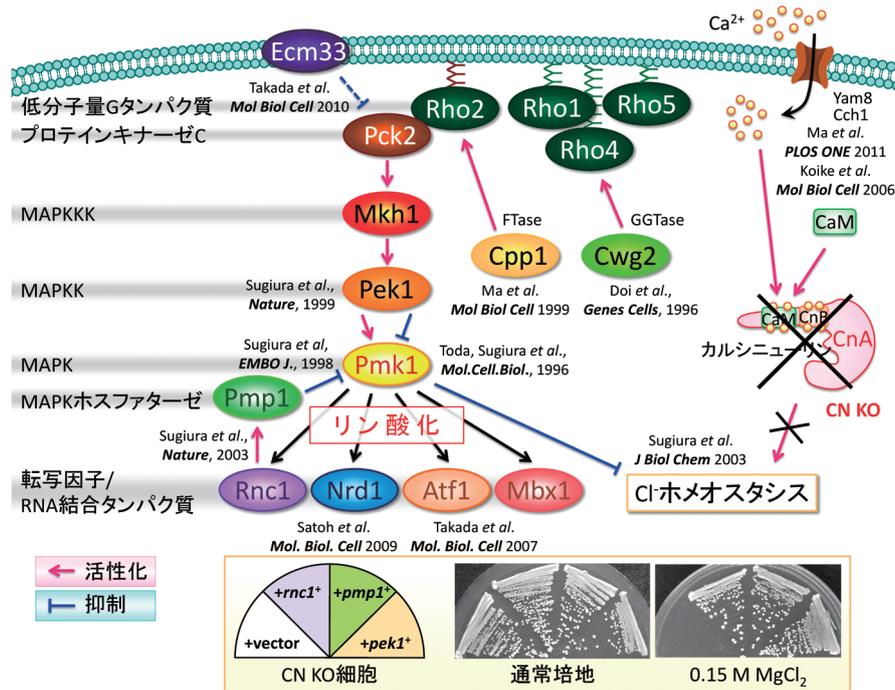


図3 分裂酵母のケミカルゲノミクスを利用したFK506感受性遺伝子群のスクリーニング

我々の研究室において、分裂酵母のケミカルゲノミクスを駆使することで取得した、Pmk1 MAPKシグナルの制御因子の一部を示す。分裂酵母のPmk1 MAPKシグナルとカルシニューリン (CN) シグナルは、Cl⁻ホメオスタシスにおいて拮抗的に働いている (上図)。したがって、カルシニューリンをノックアウト (KO) した細胞は、Cl⁻ホメオスタシスが崩れ、高濃度MgCl₂培地で生育することができない (下図)。しかし、MAPKシグナルを抑制する因子を過剰発現させると、カルシニューリンKO細胞におけるCl⁻ホメオスタシスのバランスが戻り、MgCl₂感受性を回復することができる (下図)。

このようなカルシニューリンとMAPKの拮抗的な機能的関係を利用した遺伝学的スクリーニングの結果、Pmk1 MAPK経路の抑制制御因子群として、MAPKを脱リン酸化し、負に制御する二重特異性MAPKホスファターゼPmp1、プロテインホスファターゼ2C Ptc1, Ptc3、さらにPmp1 mRNAを安定化するKH型RNA結合タンパク質Rnc1あるいは細胞表面膜タンパク質であるEcm33などを同定した (図3)^{8, 10, 26, 27}。

また、同様の遺伝学的スクリーニングによって、MAPKの活性化因子であるMAP kinase kinase Pek1, MAP kinase kinase kinase Mkh1、ファルネシルトランスフェラーゼCwp1, ゲラニルゲラニルトランスフェラーゼCwg2、低分子量Gタンパク質Rho2などを同定した (図3)^{9, 11, 12}。

これらの制御因子は種を超えて高度に保存されていると同時に、MAPKシグナルの活性化制御に関わり、ヒトにおける発がんのメカニズムに直結することからも、きわめて魅力的な創薬の標的分子でもある。実際に我々はこの表現型を活用した創薬探索研究を行い、抗がん薬シーズの同定に成功している^{25, 28}。

3. ケミカルゲノミクスを利用した合成致死スクリーニングとmRNA結合タンパク質Nrd1の同定

我々の用いたもう一つの遺伝学的戦略は、“FK506を用

いたケミカルゲノミクス”である。このスクリーニングを通して、mRNA結合タンパク質Nrd1を同定したが、結果的にNrd1はPmk1 MAPKの標的因子であると同時に、後述するRNA顆粒の重要な制御因子であることが判明した^{29, 30}。

我々の行ったケミカルゲノミクススクリーニングは、FK506が分裂酵母のカルシニューリンを臨床用量で阻害することに着目した「FK506感受性原因遺伝子群の同定」である。このスクリーニングのロジックを示す。分裂酵母の正常細胞に対してFK506を添加しても (あるいはカルシニューリン遺伝子をノックアウトしても)、細胞増殖に影響はない。しかしながら、もしもカルシニューリンと、増殖に必要な生命現象をシェアするような遺伝子Xに突然変異が入った変異体が存在した場合には、この変異体XはFK506に感受性を示すと予想される。すなわち、変異体Xの増殖にはカルシニューリンの正常な機能が不可欠である。これは、「合成致死 (synthetic lethal)」と呼ばれ、遺伝子XとY (この場合カルシニューリン) が生命現象に必要な機能をシェアしていることを示唆する遺伝学的な解析手法である。したがって、FK506感受性遺伝子群を網羅的に同定することにより、カルシニューリンに関わる新たな生命現象やカルシニューリンと機能的に関連する遺伝子群を明らかにできる。我々は、FK506感受性原因遺伝子として、表1に示すような遺伝子群を同定し、細胞質分裂、細

表1 FK506感受性原因遺伝子群とその細胞内機能

遺伝子名	遺伝子産物	細胞内機能	参考文献
<i>its1⁺/apl2⁺</i>	β -アダプチン	細胞内小胞輸送	Ma, Sugiura <i>et al.</i> , <i>Genes Cells</i> 2009
<i>its3⁺</i>	PI4P5 キナーゼ	脂質代謝 細胞内小胞輸送	Zhang, Sugiura <i>et al.</i> , <i>J. Biol. Chem.</i> 2000
<i>its4⁺/sip1⁺</i>	AP-1 付属タンパク質	細胞内小胞輸送	Yu, Sugiura <i>et al.</i> , <i>PLoS ONE</i> 2012
<i>its5⁺/ypt3⁺</i>	Rabファミリー低分子量Gタンパク質	細胞内小胞輸送	Cheng, Sugiura <i>et al.</i> , <i>Mol. Biol. Cell</i> 2002
<i>its6⁺/ryh1⁺</i>	Rabファミリー低分子量Gタンパク質	細胞内小胞輸送	He, Sugiura <i>et al.</i> , <i>Genes Cells</i> 2006
<i>its7⁺/cdc4⁺</i>	ミオシンII必須軽鎖	細胞質分裂 細胞骨格	Fujita, Sugiura <i>et al.</i> , <i>Genetics</i> 2002 Satoh, Sugiura <i>et al.</i> , <i>Mol. Biol. Cell</i> 2009
<i>its8⁺</i>	ヒトPig-nホモログ	GPIアンカー合成	Yada, Sugiura <i>et al.</i> , <i>J. Biol. Chem.</i> 2001
<i>its9⁺</i>	クラスリン重鎖	細胞内小胞輸送	
<i>its10⁺/cdc7⁺</i>	タンパク質リン酸化酵素	細胞質分裂	Lu, Sugiura <i>et al.</i> , <i>Genes Cells</i> 2002
<i>its11⁺/gdi1⁺</i>	Rab-GDP解離抑制因子 (GDI)	細胞内小胞輸送	Ma, Sugiura <i>et al.</i> , <i>Genetics</i> 2006
<i>vas1⁺/vps45⁺</i>	Vps45ホモログ	細胞内小胞輸送	Miyatake, Sugiura <i>et al.</i> , <i>Genetics</i> 2007
<i>vas2⁺/aps1⁺</i>	σ -アダプチン	細胞内小胞輸送	Ma, Sugiura <i>et al.</i> , <i>Genes Cells</i> 2009
<i>cis1⁺/amp1⁺</i>	μ -アダプチン	細胞内小胞輸送	Kita, Sugiura <i>et al.</i> , <i>Mol. Biol. Cell</i> 2004
<i>cis2⁺/mvp2⁺</i>	ミオシンII重鎖	細胞質分裂 細胞骨格	Fujita, Sugiura <i>et al.</i> , <i>Genetics</i> 2002
<i>cis3⁺/imp2⁺</i>	PSTPIPホモログ	細胞骨格 細胞内小胞輸送	Kita, Sugiura <i>et al.</i> , <i>Biochem. Biophys. Res. Commun.</i> 2014

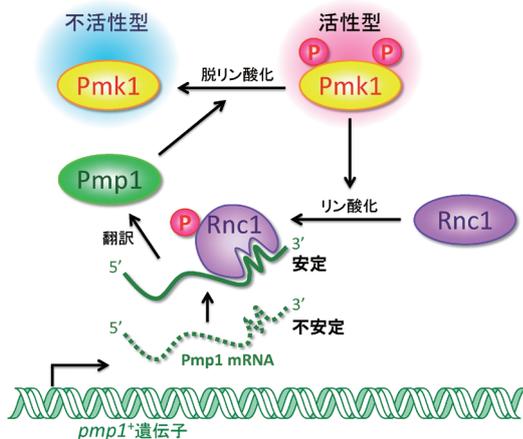


図4 RNA結合タンパク質Rnc1によるMAPKシグナルの負のフィードバック機構

MAPKホスファターゼであるPmp1のmRNAは、3'非翻訳領域(3'UTR)の配列上の特徴により分解を受けやすく不安定である。さまざまなシグナルによってPmk1 MAPKが活性化すると、Rnc1をリン酸化することでRnc1のRNA結合能を上昇させる。RNA結合能が上昇したRnc1は、より強くPmp1 mRNAと結合することで安定化し、Pmp1タンパク質の発現を上昇させる。このようにして、Pmk1 MAPKシグナルの活性化が、RNA結合タンパク質Rnc1を介してPmp1 MAPKホスファターゼの発現を誘導するという負のフィードバック機構を明らかにした。

胞内輸送、イノシトールリン脂質代謝といった生命機能の制御にカルシニューリンが密接に関わることを明らかにしてきた。その中の一種、*its7⁺/cdc4⁺*遺伝子は、ミオシン軽鎖をコードしており、細胞質分裂に必須の役割をする。我々は、*cdc4*変異体の示す細胞質分裂異常を回復できる遺伝子として、mRNA結合タンパク質Nrd1を同定し、Nrd1

がCdc4 mRNAと結合し、安定化することにより、細胞質分裂を制御することを明らかにした²⁹⁾。興味深いことに、Nrd1はPmk1 MAPKによってリン酸化されることにより、RNA結合活性が負に制御される。すなわち、Nrd1はMAPKの標的としてCdc4 mRNAを始めとする細胞質分裂に関わる遺伝子発現の鍵を握る²⁹⁾。このような「MAPK依存的なmRNA結合タンパク質の活性制御」というメカニズムは、前述のMAPKホスファターゼmRNAを標的とするRnc1に加え(図4)、高等生物においても数多くの報告がある³¹⁾。したがって「MAPKを介するシグナル伝達と遺伝子発現の担い手」としてmRNA結合タンパク質は、普遍的に重要な役割を果たしていることが明らかになった。

4. Nrd1はRNA顆粒の制御因子である

このようにして同定されたNrd1はRRM(RNA recognition motif)型のRNA結合タンパク質をコードしており、高等生物において相同性の高いRNA結合タンパク質として、TIA-1(T-cell internal antigen-1)/TIAR(TIA-1-related protein)が存在する。Nrd1とTIA-1/TIARは、アミノ酸レベルで相同性を示すのみならず、TIA-1/TIARが認識するRNAコンセンサス配列(UCUU)をNrd1も同様に認識することから、Nrd1がTIA-1の機能的オルソログではないかと推測した²⁹⁾。興味深いことに、TIA-1/TIARはRNA顆粒の一種であるストレス顆粒(stress granules: SG)の代表的なマーカータンパク質であり、高等生物におけるSG形成の中心的な役割を果たすことが知られている。

RNA顆粒は、さまざまなストレス刺激に応答してダイ

ナミックに形成される細胞内構造体であり、RNAの輸送や分解、翻訳などのRNA代謝を時空間的にリプログラミングする。RNA顆粒にはさまざまな種類が存在するが、代表的なものとして、ストレス時のRNA代謝制御に関わるSGと、主としてmRNA分解や翻訳抑制に関わるP-body (processing body) があり、その構成因子や制御機構は種を超えて高度に保存されている³²⁾。RNA顆粒は膜を持たない凝集体であり、その構成要素としてmRNA, RNA結合タンパク質, 40Sリボソーム, RNA分解酵素や翻訳装置などが含まれる。RNA顆粒はRNA cargoの局在, 安定性あるいは翻訳の調節を介して、遺伝子発現の転写後調節の鍵を握る構造であると認識されている。

中でもSGはさまざまなストレス刺激(熱ショック, ヒ素, 酸化ストレス, ウイルス感染, 低酸素等)依存的に誘導され, mRNA, RNA結合タンパク質, 40Sリボソームなどが構成要素として含まれる(図5)。SGの形成はきわめてダイナミックかつ可逆的であり, ストレスに応答して刻々とその構成要素が変化をとげる。このようなSGが形成される意義は, ストレスに応答した翻訳制御やストレスに対する適応機構と考えられているが, その詳細な分子機構や構成因子, 生理的役割のほとんどが謎である。

そこで我々は, Nrd1がTIA-1/TIAR同様にSGに局在する可能性について検証した。その結果, Nrd1の細胞内局在は熱ショックやヒ素などのストレス刺激に応答して細胞質内で凝集体を形成し, しかもその点状構造はSGのマーカーであるポリ(A)結合タンパク質(PABP)と共局在す

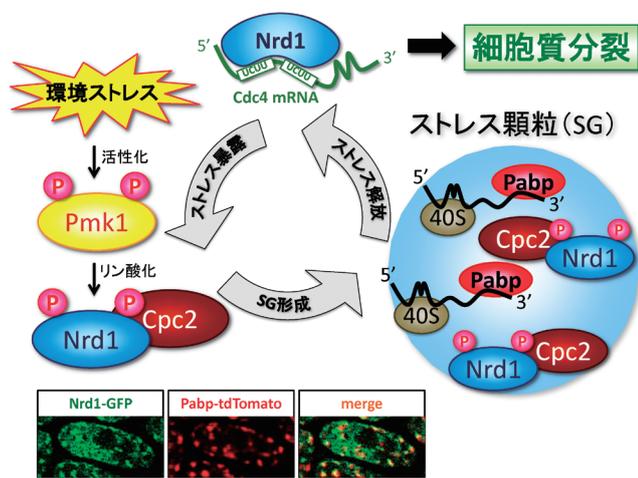


図5 RNA結合タンパク質Nrd1によるSG形成機構
RNA結合タンパク質Nrd1は、通常の培養条件において、ミオシン軽鎖であるCdc4のmRNAに結合し安定化することで、細胞質分裂を制御している。細胞が熱ストレスなどの環境ストレスに曝露されると、Pmk1 MAPKが活性化し、Nrd1がリン酸化される。リン酸化型のNrd1はCpc2と結合しやすくなり、ストレス顆粒(SG)のコアを形成することでストレス耐性に関わる。ひとたびストレスから解放されると、Nrd1はSGから離脱し、再び細胞質分裂を制御する(上図)。分裂酵母の染色体上に導入したNrd1とPABPの局在を示す蛍光顕微鏡写真(下図)。それぞれ蛍光タンパク質GFP, tdTomatoとの融合タンパク質として発現させた。写真下のバーは10 μ mを示す。

ることが明らかになった³⁰⁾(図5下の蛍光顕微鏡像)。さらに、SGを誘導する各種ストレス刺激はPmk1 MAPKを活性化することから、Nrd1のSGへの移行とMAPKの活性化に機能的連関があるのではないかと、この仮説を立てた。そして予想どおり、熱ショックやヒ素などのストレスは、Pmk1 MAPKの活性化と、それに引き続くNrd1のリン酸化とSGへの移行を引き起こすことがわかった³⁰⁾。MAPKによるNrd1のリン酸化レベルが高いほど、Nrd1のSG局在が顕著に誘導されることも明らかになった。

さらに興味深いことに、Nrd1を過剰発現すると、各種のストレス刺激が存在しない状況にも関わらずSGが形成され、しかもその効果は擬リン酸化型のNrd1^{DD}でより顕著であった³⁰⁾。高等生物のTIA-1/TIARにおいても、過剰発現に伴い自らが凝集体を形成し、SGの核(seeds)としてSG形成を誘導、制御することが報告されている³³⁾。一方、Nrd1をノックアウトした細胞ではSGの形成が遅延し、一過性のストレスに感受性を示すことがわかった³⁰⁾。すなわち、Nrd1はMAPKによるリン酸化依存的にSGを誘導し、SGの形成と、ストレス応答機構において重要な役割を担うと考えられる。

それでは、一体どのようなメカニズムでNrd1はリン酸化依存的にSG形成を誘導するのであろうか?そこで、我々はNrd1の結合パートナーであるCpc2(高等生物のRACKホモログ)がNrd1のSG移行の鍵となるのではないかと考えた。驚くべきことに、Nrd1はストレス依存的にCpc2と結合し、さらにCpc2ノックアウト細胞においてNrd1のヒ素刺激依存的かつ過剰発現依存的なSG移行/誘導が劇的に低下したことから、Nrd1とCpc2がストレス依存的に複合体を形成することによってSG形成のコアを形成するのではないかと、この仮説を考えている³⁰⁾(図5)。

5. カルシニューリンは熱ショック依存的に活性化し、SGに移行する

それでは、SGを解離する仕組みは存在するのだろうか?また、MAPKによるリン酸化依存的なNrd1のSG制御機構に対して拮抗するような、Nrd1ホスファターゼは存在するのであろうか?そこで我々は、前述のカルシニューリンとPmk1 MAPKの拮抗的な機能的関係を説明しうる分子基盤の一つとして、カルシニューリンがNrd1の脱リン酸化酵素としてSG形成やストレス応答に関わる可能性を検証した。はじめに、熱刺激に応答したカルシニューリンの細胞内局在を解析した結果、カルシニューリンの局在は熱ストレスに応答して劇的に変化し、細胞質からドット状の構造体に移行した³⁴⁾。しかもこのカルシニューリン陽性な凝集体はPABPと共局在し、シクロヘキシミド処理により消失したことから、カルシニューリンはSGの構成因子であると考えられた³⁴⁾。そこで次に、熱ショックがカルシニューリンシグナルの活性化にどのような影響を与えるのかを調べる目的で、熱刺激に対しても安

定したカルシニューリン活性測定を可能にするウミシイタケ (*Renilla*) ルシフェラーゼとカルシニューリン応答配列 (CDRE) を融合したレポーター構築を確立した³⁴⁾。その結果、熱ショックを与えることにより、カルシニューリン活性は刺激時間依存的に上昇することが明らかになった。Ca²⁺以外にも高温ストレスという普遍的なストレス刺激に応答してカルシニューリンが活性化し、かつSGに移行することはきわめて興味深い。次に我々は、カルシニューリンシグナルの活性とSG移行という現象にどのような機能的関係があるのかを探る目的で、恒常的活性化型のCNΔC (カルシニューリンのC末端に存在するカルモジュリン結合部位を欠損させることにより、Ca²⁺シグナル非依存的な活性を獲得する⁸⁾)を細胞内に発現させ、その局在を観察した。その結果、活性化型のCNΔCは野生型のカルシニューリンよりも顕著にSGに局在し、しかもそのSG局在はカルシニューリンの特異的阻害薬であるFK506処理により劇的に消失した³⁴⁾。これらの結果は、活性の高いカルシニューリンはSGに対する親和性が高く、かつカルシニューリンのSGへの移行にはホスファターゼ活性が必要であることを示唆している。

そこで、カルシニューリンがSG形成にどのような役割を果たしているのかを調べる目的で、カルシニューリンノックアウト (KO) 細胞におけるSGの形成を解析した。そのため、前述のSGのマーカータンパク質であり、起点となるRNA結合タンパク質Nrd1を、内在性プロモーター下でGFP融合タンパク質として発現させ、正常細胞とカルシニューリンKO細胞における熱ショック後のNrd1のSGへの移行を解析した。すると、正常細胞においてはNrd1のSGへの移行がほとんど観察されない、きわめて短時間の熱刺激処理 (42°C, 5分) によって、カルシニューリンKO細胞ではNrd1がSGに移行することを確認した³⁴⁾。しかも、カルシニューリンKO細胞は、正常細胞よ

りも熱刺激に対して耐性を示すことが明らかとなった。この結果は、Nrd1 KO細胞が熱刺激に対して感受性を示し、かつSG形成が正常細胞に比べて遅延することと対照的である。これらの結果から、SGの形成は熱ショックを含めたストレスに生体が適応する上で重要な機構であること、さらにカルシニューリンはSG形成を負に制御する可能性が示唆された。

6. RNA顆粒の“シグナル伝達制御拠点”としての新たな役割

現在の仮説を図6に示す。通常の至的増殖環境ではカルシニューリンは細胞質あるいは細胞膜および中隔に局在し、Ca²⁺シグナルを速やかに細胞内に伝達する。すなわち、カルシニューリンは細胞質に局在する転写因子や細胞膜表面に局在するCa²⁺チャネルあるいは細胞質分裂のキーファクターなどの標的因子 (基質) を迅速に脱リン酸化するのに適切な局在に配置されている。

一方、熱刺激によってカルシニューリンはSGへと移行し、しかもこの移行はカルシニューリンの酵素活性に依存する。この現象から、あたかもカルシニューリン活性がSG形成を誘導する (正に制御する) という解釈が成り立つ。ところが、予想に反して、カルシニューリンKO細胞ではNrd1などのSGのコアとなるタンパク質が、正常細胞よりも迅速にSGに移行することから、カルシニューリンはSG形成においてNrd1と拮抗するような負の調節を行っていることを示唆する。カルシニューリンKO細胞の示すストレス抵抗性という表現型もSGの負の制御因子としての役割にフィットする。

この一見相矛盾した現象の解釈として、カルシニューリンは酵素活性依存的にSGに“受動的に”移行し、隔離され、しかもSG形成を負に制御するのではないかと考え

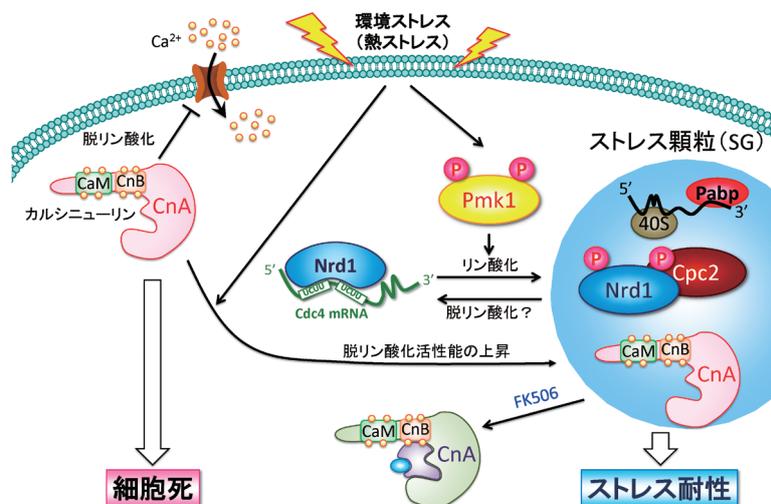


図6 シグナル拠点としてのRNA顆粒の役割

カルシニューリンの過剰発現は、カルシニューリンシグナルの過剰な活性化を引き起こし、細胞死を誘導する。熱ストレス条件下において形成されるSGは、活性化型のカルシニューリンを隔離することで、カルシニューリンシグナルを制御すると考えられる。

た。このように高い酵素活性を有するカルシニューリンがSG（あるいはその構成因子）に対して強い親和性を持つ生理的意義に関しては、SGが“シグナル伝達のハブ（制御拠点）”として機能し、ある閾値を超えて活性化したカルシニューリンを隔離することにより、過剰に活性化したCa²⁺/カルシニューリンシグナルの暴走を遮断し、細胞死などの望ましくない生体反応を回避するのではないかと推測される（図6）。実際にカルシニューリンを過剰発現すると、細胞増殖が顕著に阻害される。

このようなシグナル伝達制御拠点としてのSGの新たな概念と役割は、近年急速に注目を集めている。前述したように、RNA顆粒の主たる機能は主に「RNAの運命決定装置」として転写後の遺伝子発現調節の鍵を握ることである³²⁾。たとえばウイルスに感染したり異常タンパク質が蓄積したりすると、SGが形成され、非翻訳状態のmRNAを隔離することにより一時的にタンパク質合成が停止する。細胞がストレスから回復するとSGは消失し、翻訳が再開される。

一方、TakekawaらのグループよりSG形成とストレス応答MAPK経路制御の関わりが報告されて以来、翻訳制御、RNA代謝以外のSGの生理機能の解明に焦点が当てられた。Takekawaらは、ストレス応答MAP3KであるMTK1の結合分子としてRACK1を同定し、無刺激ではMTK1と細胞質で結合しているRACK1が、ヒ素などのストレス刺激に応答してMTK1と解離し、SGに移行することを発見した³⁵⁾。結果的に、活性化因子としてのRACK1を失ったストレス応答MAPK経路はその活性化が阻害されることとなる。このようなメカニズムは、SG形成によるストレス応答MAPK経路の活性化阻害とアポトーシス抑制機構として、きわめて興味深く、かつ種を超えて、TORやGSK3など重要なシグナル伝達分子がSGにおいて会合するという諸研究の端緒となった。

7. 「疾患治療戦略の標的」としてのSG制御機構

興味深いことに、SGは上記のようなシグナル伝達制御拠点としての役割に加えて、さまざまな疾患との関わりが浮かび上がりつつある。具体的には、がんやアルツハイマー病、筋萎縮性側索硬化症（ALS）などの神経変性疾患との関わりが注目を集めている。たとえば上述のように、SGはストレスによるDNA損傷や異常タンパク質の蓄積を防ぎ、細胞損傷を回避するための防御機構と考えられてきた。つまり、細胞のエネルギーを緊急事態としての細胞損傷の修復や回復に必須な翻訳に専念させる仕組みと考えられる。したがって適切にSGを形成あるいは崩壊することが、翻訳の制御/抑制において重要であり、ひいてはウイルス感染や酸化ストレスに対する細胞の防御機構にも不可欠であると考えられている。実際に、高等生物においてもSGの形成不全がストレスに対する脆弱性を惹起したり、TIA-1ノックアウトマウスが重症の関節炎を発症したりす

るなど、SGはストレスや炎症に対して細胞レベルでも、生体レベルでも防御的な役割を担うことが明らかとなりつつある。

一方、ALSやアルツハイマー病などの神経変性疾患において、“病的な”SGが“持続的に”形成されていることが、これらの疾患の病態と密接に関わるという報告がある。特に、アルツハイマー病のモデルマウスおよびアルツハイマー病患者の脳においては、病態の進行に伴い、より顕著にSGが観察されることが報告されている。初期の段階では、TIA-1がリン酸化タウタンパク質と凝集体を形成しているが、さらに病状が進むと、リン酸化タウはRNA結合タンパク質TTP (tristetraprolin) と結合すると報告されている。さらに興味深いことに、TIA-1を過剰発現することにより、リン酸化タウの凝集体が形成され、互いに重なり合った局在を示す。これらの結果は、このように病的なSGが持続的に形成されることがリン酸化タウに随伴した病態と密接に関連していることを示唆している。

さらに一歩進んで、SG形成を神経変性疾患の治療標的とした研究もすでに開始されている。ハエや酵母などのモデル生物を用いて、ALSに伴う病的SGを改善するような遺伝子や化合物の探索が行われ³⁶⁾、GSK3β阻害剤（Glaxo）が同定されている。驚くべきことに、この阻害剤を投与されたハエは筋力を回復し、さらにラット由来の細胞においてもSG形成の阻害に効果的であった³⁶⁾。これらの結果は、SG形成機構が種を超えて保存されていることを示すのみならず、SGの機能異常を修復することが病態の改善に直結する例としてきわめて魅力的なものである。

8. おわりに

冒頭にも述べたように、RNA顆粒形成の制御機構や生理機能はそのほとんどが謎に包まれている。今後さらに、RNA顆粒の構成因子や、その制御に関わるシグナル伝達機構の役割、さらにはRNA顆粒の“シグナルハブ”としての役割の解明が行われることにより、さまざまな疾患治療標的としてのRNA顆粒の重要性がますます注目を集めると考えられる。今回我々の発見したSGによるカルシニューリンの空間的制御機構が高等生物においても保存されているのであれば、アルツハイマー病や心疾患、ダウン症候群など、カルシニューリンシグナルの破綻に伴うさまざまな病態とRNA顆粒制御の関わりが明らかになることが期待される。RNA顆粒の制御機構あるいはその機能不全に伴う疾患の分子機構を明らかにする上で、酵母をはじめとしたモデル生物の貢献を願っている。

文 献

- 1) Stewart, A.-A., Ingebritsen, T.-S., Manalan, A., Klee, C.-B., & Cohen, P. (1982) *FEBS Lett.*, **137**, 80-84.
- 2) Liu, J., Farmer, J.-D. Jr., Lane, W.-S., Friedman, J., Weissman, I., & Schreiber, S.-L. (1991) *Cell*, **66**, 807-815.

- 3) Clipstone, N.-A. & Crabtree, G.-R. (1992) *Nature*, **357**, 695–697.
- 4) O'Keefe, S.-J., Tamura, J., Kincaid, R.-L., Tocci, M.-J., & O'Neill, E.-A. (1992) *Nature*, **357**, 692–694.
- 5) Crabtree, G.-R. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 2313–2316.
- 6) McCaffrey, P.-G., Perrino, B.-A., Soderling, T.-R., & Rao, A. (1993) *J. Biol. Chem.*, **268**, 3747–3752.
- 7) Sugiura, R., Sio, S.-O., Shuntoh, H., & Kuno, T. (2002) *Genes Cells*, **7**, 619–627.
- 8) Sugiura, R., Toda, T., Shuntoh, H., Yanagida, M., & Kuno, T. (1998) *EMBO J.*, **17**, 140–148.
- 9) Sugiura, R., Toda, T., Dhut, S., Shuntoh, H., & Kuno, T. (1999) *Nature*, **399**, 479–483.
- 10) Sugiura, R., Kita, A., Shimizu, Y., Shuntoh, H., Sio, S.-O., & Kuno, T. (2003) *Nature*, **424**, 961–965.
- 11) Ma, Y., Kuno, T., Kita, A., Asayama, Y., & Sugiura, R. (2006) *Mol. Biol. Cell*, **17**, 5028–5037.
- 12) Doi, A., Kita, A., Kanda, Y., Uno, T., Asami, K., Satoh, R., Nakano, K., & Sugiura, R. (2015) *Genes Cells*, **20**, 310–323.
- 13) Zhang, Y., Sugiura, R., Lu, Y., Asami, M., Maeda, T., Itoh, T., Takenawa, T., Shuntoh, H., & Kuno, T. (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 35600–35606.
- 14) Yada, T., Sugiura, R., Kita, A., Itoh, Y., Lu, Y., Hong, Y., Kinoshita, T., Shuntoh, H., & Kuno, T. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 13579–13586.
- 15) Fujita, M., Sugiura, R., Lu, Y., Xu, L., Xia, Y., Shuntoh, H., & Kuno, T. (2002) *Genetics*, **161**, 971–981.
- 16) Cheng, H., Sugiura, R., Wu, W., Fujita, M., Lu, Y., Sio, S.-O., Kawai, R., Takegawa, K., Shuntoh, H., & Kuno, T. (2002) *Mol. Biol. Cell*, **13**, 2963–2976.
- 17) Lu, Y., Sugiura, R., Yada, T., Cheng, H., Sio, S.-O., Shuntoh, H., & Kuno, T. (2002) *Genes Cells*, **7**, 1009–1019.
- 18) Kita, A., Sugiura, R., Shoji, H., He, Y., Deng, L., Lu, Y., Sio, S., Takegawa, K., Sakaue, M., Shuntoh, H., & Kuno, T. (2004) *Mol. Biol. Cell*, **15**, 2920–2931.
- 19) He, Y., Sugiura, R., Ma, Y., Kita, A., Deng, L., Takegawa, K., Matsuoka, K., Shuntoh, H., & Kuno, T. (2006) *Genes Cells*, **11**, 207–221.
- 20) Yu, Y., Kita, A., Udo, M., Katayama, Y., Shintani, M., Park, K., Hagihara, K., Umeda, N., & Sugiura, R. (2012) *PLoS ONE*, **7**, e45324.
- 21) Kita, A., Higa, M., Doi, A., Satoh, R., & Sugiura, R. (2015) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **457**, 273–279.
- 22) Higa, M., Kita, A., Hagihara, K., Kitai, Y., Doi, A., Nagasoko, R., Satoh, R., & Sugiura, R. (2015) *Genes Cells*, **20**, 95–107.
- 23) Takahara, T. & Maeda, T. (2012) *Mol. Cell*, **47**, 242–252.
- 24) Sio, S.-O., Suehiro, T., Sugiura, R., Takeuchi, M., Mukai, H., & Kuno, T. (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 12231–12238.
- 25) 久能樹, 杉浦麗子 (2013) 次世代がん戦略研究Updateがんに基盤生物学—革新的のシーズ育成に向けて—, pp.172–178, 南山堂.
- 26) Takada, H., Nishimura, M., Asayama, Y., Mannse, Y., Ishiwata, S., Kita, A., Doi, A., Nishida, A., Kai, N., Moriuchi, S., Tohda, H., Giga, H.-Y., Kuno, Y., & Sugiura, R. (2007) *Mol. Biol. Cell*, **18**, 4794–4802.
- 27) Takada, H., Nishida, A., Domae, M., Kita, A., Yamano, Y., Uchida, A., Ishiwata, S., Fang, Y., Zhou, X., Masuko, T., Kinoshita, M., Kakehi, K., & Sugiura, R. (2010) *Mol. Biol. Cell*, **21**, 674–685.
- 28) Ishiwata, S., Kuno, T., Takada, H., Koike, A., & Sugiura, R. (2008) Sourcebook of Models for Biomedical Research, pp.439–443, Humana Press Inc.
- 29) Satoh, R., Morita, T., Takada, H., Kita, A., Ishiwata, S., Doi, A., Hagihara, K., Taga, A., Matsumura, Y., Tohda, H., & Sugiura, R. (2009) *Mol. Biol. Cell*, **20**, 2473–2485.
- 30) Satoh, R., Tanaka, A., Kita, A., Morita, T., Matsumura, Y., Umeda, N., Takada, M., Hayashi, S., Tani, T., Shinmyozu, K., & Sugiura, R. (2012) *PLoS ONE*, **7**, e29683.
- 31) López de Silanes, I., Galbán, S., Martindale, J.-L., Yang, X., Mazan-Mamczarz, K., Indig, F.-E., Falco, G., Zhan, M., & Gorospe, M. (2005) *Mol. Cell Biol.*, **25**, 9520–9531.
- 32) Anderson, P. & Kedersha, N. (2006) *J. Cell Biol.*, **172**, 803–808.
- 33) Kedersha, N.-L., Gupta, M., Li, W., Miller, I., & Anderson, P. (1999) *J. Cell Biol.*, **147**, 1431–1442.
- 34) Higa, M., Kita, A., Hagihara, K., Kitai, Y., Doi, A., Nagasoko, R., Satoh, R., & Sugiura, R. (2015) *Genes Cells*, **20**, 95–107.
- 35) Arimoto, K., Fukuda, H., Imajoh, O.-S., Saito, H., & Takekawa, M. (2008) *Nat. Cell Biol.*, **10**, 1324–1332.
- 36) Kin, H.J., Raphael, A.R., Ladow, E.S., McGurk, L., Weber, R.A., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M.-Y., Finkbeiner, S., Gitler, A.D., & Bonini, N.M. (2014) *Nat. Genet.*, **46**, 152–160.

著者寸描

●佐藤 亮介 (さとう りょうすけ)



近畿大学薬学部創薬科学科助教。博士(薬学)。

■略歴 1984年大阪府に生る。2007年近畿大学薬学部卒業。09年同大学院薬学研究科博士前期課程修了。12年同研究科博士後期課程修了。14年4月～14年3月微生物化学研究所(BIKAKEN)博士研究員, 14年4月より現職。

■研究テーマと抱負 シグナル経路によって制御されるRNA結合タンパク質の機能解析を通して, RNA顆粒の未知なる生理機能を解明する。

■ウェブサイト <http://www.phar.kindai.ac.jp/genome>

■趣味 フィッシング(詐欺ではない), サッカー・フットサル, ドライブ, ピアノ, ボウリングなど多趣味。

●杉浦 麗子 (すぎうら れいこ)



近畿大学薬学部創薬科学科教授。学科長。博士(医学)。

■略歴 1992年神戸大学医学部卒業。精神科, 内科の臨床研修を経て94年より神戸大学大学院医学系研究科入学。神戸大学医学部薬理学研究室助手, 講師を経て2000年より同准教授。01年文部科学省在外研究員(英国王立癌研究所)。04年より近畿大学薬学部教授。12年より現職。

■研究テーマと抱負 酵母モデル生物を用いたシグナル伝達とRNA制御機構の解明とゲノム創薬・疾患治療への応用。酵母遺伝学で得られた独創的な成果や命題を創薬やヒト疾患治療に応用できるか, という課題に挑戦中。〈そんな馬鹿げたアイデアは無理に決まっている〉と言われると燃えます。

■ウェブサイト <http://www.phar.kindai.ac.jp/genome>

■趣味 読書, 音楽鑑賞, 酒(特に日本酒, ワイン)をたしなむこと, 筋トレ。