

論文審査の結果の要旨

氏名 刀根 佳子

プロテアソームは分子量200万の巨大プロテアーゼであり、プロテアソームによるユビキチン化された標的蛋白質の特異的分解は細胞周期の進行や細胞の分化に必須である。26Sプロテアソームは活性中心である20S (CP)の両端に調節因子複合体である19S (RP)が会合した高次構造体である。19S (RP)中の多くのサブユニットがどのような機能を担っているかは明らかにされていない。本論文ではRpn12/Nin1と相互作用する因子として単離したNob1の生化学的解析を通して調節因子複合体のプロテアソームの機能調節機構の解析を試みた。

(1) Nob1の細胞内での挙動の解析

プロテアソームにNob1が含まれるかを解析する過程において定常期に移行した細胞からNob1が検出されなかったことから、より詳細に細胞増殖におけるNob1の検出を試みた。その結果Nob1は対数増殖期特異的に細胞内に存在し、細胞が定常期に移行するに従い、すみやかに細胞内から消失した。細胞内からのNob1の消失過程がプロテアソームに依存しているかを明らかにすることを目的として、プロテアソームの特異的阻害剤であるMG132添加時におけるNob1の挙動を解析した。対数増殖期から定常期に細胞が移行する際にMG132を添加した細胞ではNob1の分解遅延が観察され、この過程は液胞プロテアーゼの欠損株である*pep4*遺伝子破壊株では影響を受けなかった。これより対数増殖期から定常期への変換におけるNob1の分解はプロテアソームに依存していることが明らかになった。

Nob1の発現が転写レベルにおいて制御がなされているかを明らかにすることを目的として*NOB1*mRNAの検出を試みた。細胞を-N源培地で培養することにより、G0期に移行させ、YPD培地に加えることにより、増殖を開始させた。-N源培地中では*NOB1*mRNAは検出されず、細胞が増殖を開始してから最初のG2/M期が起こる4.5時間から検出された。*NOB1*プロモータの必須領域を同定することを目的として、様々な長さの*NOB1*プロモータ領域を*NOB1*ORFの上流に導入し、*nob1*遺伝子破壊株に形質転換し、*nob1*遺伝子破壊株の致死性を相補できるか解析した。*lacZ*の増殖期特異的発現に必須であった上流244塩基までが*NOB1*プロモータの活性に必須であった。*NOB1*mRNAが増殖期特異的に転写されることから*NOB1*のプロモータ領域の同定を試みた。様々な長さの*NOB1*プロモータの下流にレポーター遺伝子である*lacZ*を融合したプラスミドにより野生株を形質転換させ、細胞増殖における*lacZ*の活性を検出した。その結果、*NOB1*プロモータの上流244塩基が*lacZ*の増殖期特異的発現に必須であることを明らかにした。

(2) Nob1の機能解析

2-ハイブリッド法によりRpn12と結合する因子としてNob1を単離したことから、Nob1が26Sプロテアソームと結合しているかを明らかにすることを試みた。グリセロール密度勾配遠心法により、分画を行ったところ、Nob1はプロテアソームの調節因子とよく似た挙動を示した。His6-Rpt1を発現した株の細胞抽出液をグリセロール密度勾配遠心法により分画し、分画したフラクションをNi-NTA agaroseによりRpt1を沈降させ、Nob1を検出した。Nob1はRpn12、20S構成因子と共に26Sプロテアソームと結合していることを明らかにした。しかし、26Sプロテアソーム構成因子が主としてSuc-LLVY-MCA 分解活性ピークであるフラクション21に検出されたに対し、Nob1はフラクション19に主として検出された。Nob1がプロテアソーム

のどの分子種に含まれるかを明らかにすることを目的として、グリセロール密度勾配遠心法により分画したフラクションをさらに未変性ゲルにより分離した。Nob1は26Sプロテアソームに検出された。

野生株にN末52アミノ酸を欠失したNob1 Δ Nを高発現した株では顕著な増殖遅延を示した。このときさらにC末100アミノ酸のコードする領域を欠失させたところ、Nob1 Δ Nの増殖遅延効果を回避できた。次にNob1 Δ N高発現株におけるプロテアソームの挙動を解析した。グリセロール密度勾配遠心法により分画を行った結果、野生株においてフラクション21にみられる26Sプロテアソームの活性がNob1 Δ N高発現株において低下していることが観察された。さらにこのときプロテアソーム構成因子の挙動を解析した結果、Rpn12、Rpt1は26Sプロテアソームが検出されるフラクションに存在した。しかし、Nob1と20Sは軽いフラクション（フラクション番号11-21）に幅広く存在していた。このとき野生株とNob1 Δ N高発現株における26Sの量の差をフラクション番号21中におけるRpn12の量により確認した。この結果からNob1の26Sプロテアソームへの移行が26Sプロテアソームの活性に必須であることが示唆された。

(3) Nob1と共に働く因子の解析

Nob1をベイトにした2-ハイブリッド法によりNob1と結合する因子の単離を試みた。その結果、Nob1と結合する因子として3つの因子を単離した。このうち、YOR145c及びUFD1は増殖に必須であることがすでに報告されている。UFD1はユビキチン融合遺伝子分解に欠損を示す株の原因遺伝子として単離されていた。私は未知遺伝子であるYOR145cの解析を試みた。Yor145cは進化的に高度に保存されており、C末領域にRNAに結合する蛋白質に存在するKH-domainを持つ。Yor145cのC末領域にHAタグを導入し、グリセロール密度勾配遠心法による分画を行ったところ、Yor145cはプロテアソームの検出される分画中に存在するが、Nob1や他のプロテアソーム構成因子とは異なった挙動を示した。Nob1との結合を検出したところ、Yor145cはNob1と細胞内においても結合していた。Yor145cがプロテアソームと結合することを明らかにする目的として、His6-Rpt1とYor145c-HAの双方を持つ株を作成し、Ni-NTAアガロースによりRpt1を沈降させ、Yor145c-HAの検出を試みた。Yor145cはRpt1、20S構成因子と共に26Sプロテアソームと結合していることを明らかにした。Yor145cに特徴的なKH-domainのGをRに置換した株は温度感受性を示し、制限温度下においてプロテアソーム変異株におけるポリユビキチン化蛋白質の顕著な蓄積はYor145c温度感受性株において観察されなかった。Yor145cはNob1と結合し、プロテアソームとも結合することから、Nob1と共にプロテアソームの機能調節に関与している可能性が予想される。

以上のように、本研究では26Sプロテアソームと結合している因子として新たにNob1を同定した。Nob1はこれまでに明らかにされた26Sプロテアソームの調節因子とは異なり、対数増殖期特異的に細胞内に存在し、定常期に細胞が移行するとNob1はプロテアソーム依存的に分解される。これらの結果からNob1は増殖期特異的なプロテアソームの新奇の制御因子として働くことを提案している。以上の評価に基づき、本研究は博士（理学）の学位に十分値するものであることが、審査委員全員の一致により認められた。