

論文内容の要旨

論文題目

Study of the biogenesis of the 26S proteasome in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* (出芽酵母 26S プロテアソームのバイオジェネシスの研究)

氏名 磯野 江利香

ユビキチン-プロテアソーム系は真核生物において酵母からヒトまで広く高度に保存されたタンパク質分解系で、細胞内の転写因子を始めとした種々の短寿命タンパク質の分解を担っている。また、正常に機能し得ないミスフォールドタンパク質の除去にも働き、タンパク質の発現、機能制御と協調して細胞周期の正常な進行や細胞内の恒常性の維持に不可欠である。近年、ヒトの神経性疾患との関わりも指摘され、広い分野において注目されている (総説: Hershko and Ciechanover 1998)。

出芽酵母 26S プロテアソームは活性中心を内包するコア・サブユニット(CP)と、その一端または両端に結合する制御サブユニット(RP)からなる (図 2)。RP はさらに AAA ATPase のリングを含む base と全て非 ATPase の構成因子からなる lid に分けられる。発見以来、プロテアソーム研究はその機能面に主眼を置いた研究が精力的に進められてきた。しかしながら、その構成因子の全容が明らかになるまでには、1970 代に遡るプロテアソームの発見から 20 年以上の時間を要した (Glickman *et al.* 1998)。酵素機能についてさまざまな知見が得られた今、30 個を超える因子から成るこの巨大な

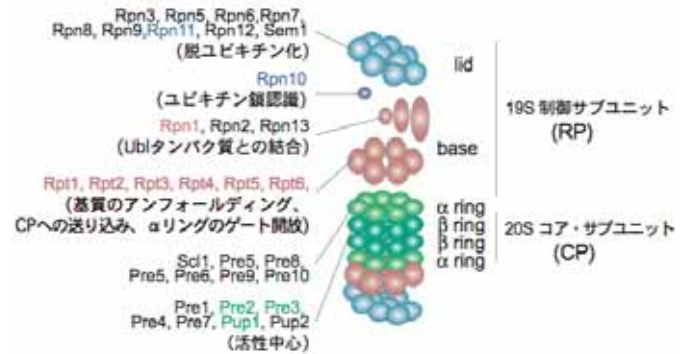


図 1: 出芽酵母 26S プロテアソームの構造と構成因子

26S プロテアソームは Core particle(CP)と Regulatory Particle (RP) から成っている。細胞内では CP の一端、または両端に RP が結合した R1C, R2C の二つの型が存在する。RP は生化学的に lid と base に分けられる。ポリユビキチン化された基質は RP で認識、脱ユビキチン化されて CP へと送り込まれる。活性中心は CP の内側にあり α リングの中心部分 (ゲート) が閉じているため、CP 単独では活性を持たないが、RP が結合することによってゲートが開き活性を有するようになる

図 2)。

酵素複合体が、細胞内のどこで、どのように会合し、機能するに至るのかというバイオジェネシスの過程を解くこともまた意義ある課題である。

活性中心を擁し、原核生物でも保存されている CP については研究が進んでおり、その形成と核移行の時空間的な過程が解明されつつある。それに対し RP の会合には未知の部分が多く、欠失変異体の解析や構成因子間の two-hybrid マップは作成されているものの、変異体を用いた詳細な解析はほとんど行われていない。本研究では、26S プロテアソームのサブユニットのうち、COP9/シグナロソームや eIF3 と起源を同じくすると推測されている lid に着目し、9 つの構成因子の位置関係、また lid の形成と base ならびに CP の形成過程との関連を明らかにすることによって、26S プロテアソームの形成機構の解明を目指した。

lid 構成因子のほとんどが必須遺伝子であるため、解析を行うに当たって温度感受性変異株を作成した。PCR による ORF へのランダムな変異導入を行い、相同組み換えによって染色体上の遺伝子と変異遺伝子を置換した。得られた形質転換体に対して 37°C での生育欠損を指標にスクリーニングを行った。変異株のうち *rpn7-3* については修士課程に続いて解析を行った。博士課程においては新たに *rpn6-1*, *rpn6-2*, *rpn5-1* 変異体を単離し、解析を行った(図 2)。

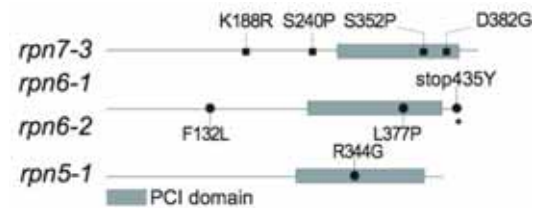
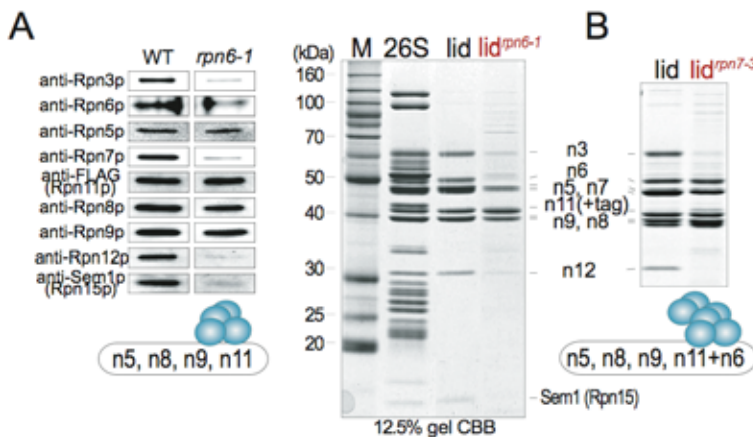


図 2: 本研究において作成した lid 構成因子の温度感受性変異株とその変異部位
解析を行った *rpn7-3*, *rpn6-1*, *rpn6-2*, *rpn5-1* 株のアミノ酸置換を伴う変異を示す。灰色: PCI 領域

いずれの lid 変異株も *in vivo* でユビキチン-プロテアソーム系のモデル基質の分解に欠損を示したことからこれらの変異株ではプロテアソームの活性低下が生じていることが示唆される。基質分解活性の低下が制限温度下での酵素の失活という直接的な影響なのかどうかを調べるため、野生型と lid 変異体(*rpn6* について示す)から許容温度下でプロテアソームを精製し、*in vitro* でのユビキチン化基質の分解をみた。3xFLAG タグを lid の構成因子 Rpn11p に融合した株から抗 FLAG 抗体ビーズを用いて 26S プロテアソームが精製できる。許容温度下で生育した細胞から精製した 26S プロテアソームの CBB 染色によるプロファイルには野生型、変異体で大きな差はなく、許容温度下での会合は正常に行われていることが分かる。これらの精製プロテアソームを用いて分解アッセイを行ったところ、lid 変異プロテアソームはユビキチン化基質の分解活性を持ち、さらにその活性は反応温度を制限温度以上の 38°C でも失われなかった。すなわち、本研究で単離した lid 変異体の温度感受性致死の原因は許容温度下で会合した 26S プロテアソームの高温における失活ではなく、別の要因、たとえば制限温度下での会合欠損である可能性が示唆された。

■ lid 変異体におけるプロテアソームの構造



事実、すべての変異体で制限温度下の細胞粗抽出液のゲル濾過展開のパターンに大きな変化が見られ、制限温

図 3: 3 x FLAG タグを用いた 26S プロテアソームの精製

A, 許容温度で培養した細胞をガラスビーズ破砕し、Rpn11p に付加した 3xFLAG タグを用いてプロテアソームの抗 FLAG 抗体ビーズでアフィニティ精製を行った。SDS-PAGE 後、CBB で染色した。B, 野生型、lid 変異体 (*rpn6*) から精製した許容温度でのプロテアソームを比較した。*rpn6-1* では C 末伸長によるバンドシフトが見られる。

度下では 26S プロテアソームの会合に欠損があることが明らかとなった。またストップコドンの変異である *rpn6-1* 変異以外の lid 変異は既知の two-hybrid 相互作用を喪失させることも分かった。これらの結果より、構成因子レベルでの相互作用の変化が lid 内のみならず、複合体全体の安定性に影響を与えていると考えられる。

また、本研究では *rpn7* 変異体では 9 つの lid 構成因子のうち 5 つのみ、*rpn6* 変異体では 4 つのみが安定な複合体を形成していることを初めて見いだした (図 3, Isono *et al.* 2004, 2005)。これらの結果と既存の変異体解析の結果より、これまで two-hybrid 相互作用でしか議論されなかった lid の構成因子の位置関係を推測することができる (図 4)。また、*lid^{rpn7-3}* と base は安定に結合していないことから、Rpn7p は lid の会合のみならず、lid と base との結合にも必要であることが分かる。

なお、*rpn5-1* 変異体では lid 副次構造体が検出されないことから、Rpn5p は Rpn8p, Rpn9p, Rpn11p とともに lid のコアを形成していると考えられる。また、lid 変異体では制限温度下でも base と CP は正常に形成されており、それぞれのサブユニットレベルでの会合と base-CP 結合は lid の形成に依存しないことが示唆される。base の構成因子に付加したタグを用いたアフィニティ精製では安定な base-CP 複合体は検出されなかったことから、lid は精製に耐えうる安定な base-CP 間の結合に必要である可能性も考えられる。

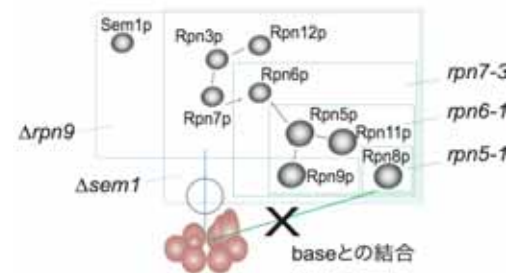
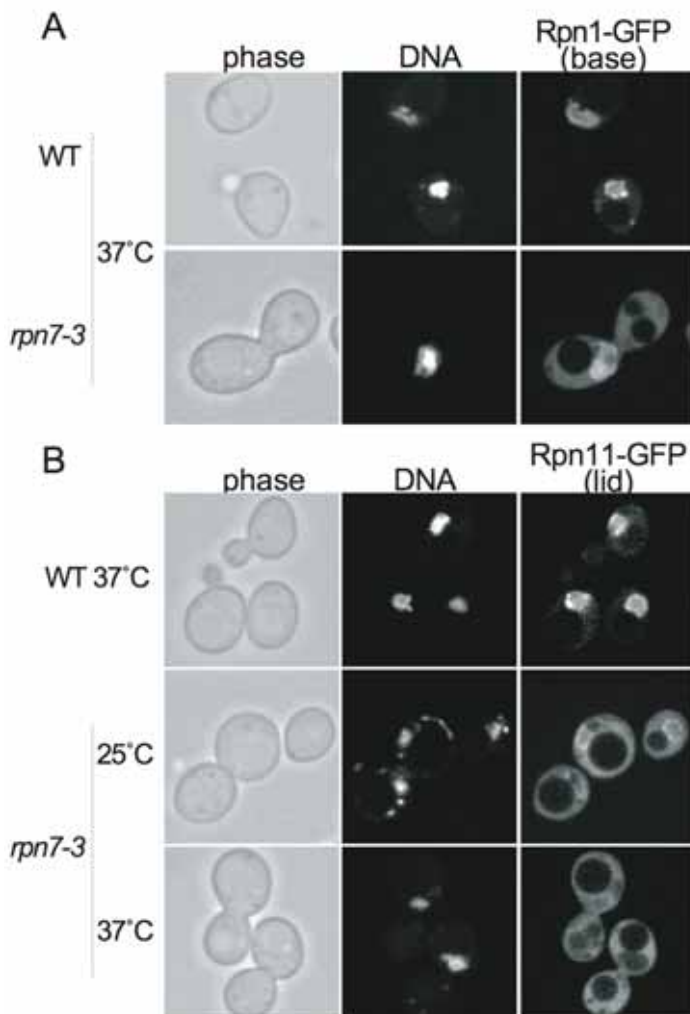


図 4: lid 構成因子の位置関係

現在までの two-hybrid 解析、変異体の解析と *rpn7-3*, *rpn6-1*, *rpn5-1* の解析結果から 9 つの lid 構成因子の位置関係を推測する。 $\Delta rpn9$, $\Delta sem1$ 株では lid, 26S プロテアソーム全体の大きな構造変化は見られず、base とともに結合が見られる。Rpn5p, Rpn8p, Rpn11p が lid のコアを形成する構成因子であると推測される。



26S プロテアソームは核、特に核膜に多く局在する。CP は会合の中間体で核移行し、核内で成熟型 CP へと会合するというモデルが提唱されているが、RP の核移行が会合のどの段階で起こるイベントなのかは明らかとなっていない。本研究で単離した変異体では制限温度下で互いに結合していない base と CP、また構成因子のうちの一部のみからなる lid 副次構造体が存在するため、CP と結合していない RP サブユニットの局在を観察するために有用である。GFP 融合タンパク質を用いた観察で、lid 変異体では CP, base は細胞質にも拡散するものの、核局在は失われていなかった (図 5 A)。しかし、5 つの lid 構成因子のみが会合している lid^{rpn7-3} は制限温度下で核局在しなかった (図 5 B)。

base, CP の核局在は制限温度下でのフ

図 5: 制限温度下で base は核局在するが lid^{rpn7-3} は核に局在しない

対数増殖期の野生型と *rpn7-3* 株をそれぞれ 25°C あるいは 37°C で 6 時間培養後、PBS で培地を除去した。その後 Hoechst 33342 により DNA を染色し、共焦点顕微鏡による観察を行った。

オートブリーチ後にも観察されたので、図 5 の GFP 蛍光は許容温度下での残存タンパク質由来ではないと考えられる。これらの結果から CP だけでなく、base の核移行も lid の核移行とは独立に起こることが明らかとなった。さらに、lid 構成因子のうち少なくとも lid^{pm7-3} を構成する Rpn5p, Rpn6p, Rpn8p, Rpn9p, Rpn11p には機能的な核移行シグナルが存在しないことが示唆され、実際に lid 構成因子のアミノ酸配列上の NLS 類似配列に GFP を融合したものでも核移行するものは見つけれなかった。

CP の会合過程には複数の外部因子が関わっているとの報告がある。αリングとβリングが一つずつ結合したハーフプロテアソーム(α7β7)は NLS を持ち、Importin α/β 依存的に核内に移行後、制御因子の働きで α7β7β7α7 の形に会合して成熟型 CP となる。base も NLS を有し、単独でも核移行できると考えられる。しかし、lid は Far Western 法では Importin との結合が見られないという報告があること、また、本研究において核移行できない lid^{pm7-3} に結合するプロテアソーム外の因子が見つからなかったことから、おそらく正常な lid でも単独では核移行できないと考えられる。lid^{pm7-3} に結合する付加的な因子がなかったことから、lid は base と核外で結合して RP を形成してから核移行し、

成熟型 CP と結合して 26S プロテアソームへと会合するというモデルが考えられる (図 6)。

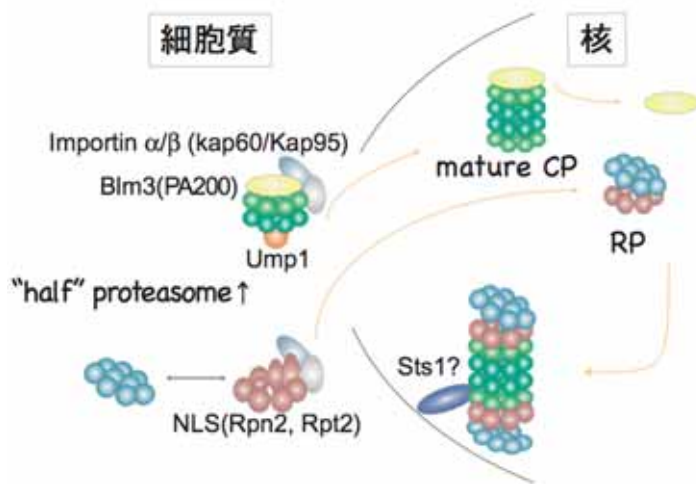


図 6: プロテアソームのバイोजェネシス

CP は細胞質でハーフプロテアソームまで会合し、核内で成熟型 CP が完成する。一方、RP のうち base は機能的な NLS を有することが知られているが、lid との会合が細胞質で起こるのか、核内で CP の上に積み上がっていくのかは明らかとなっていない。本研究の結果より左図のようなモデルを提唱する。
[Ump1: ハーフプロテアソームに結合し、成熟型 CP への会合を促進する。Blm3: PA200 ホモログ、ハーフプロテアソーム、あるいは CP に結合し、時期尚早な活性の取得を抑制していると考えられている。Sts1: SpCut8 (プロテアソームを核膜につなぎ止めると考えられている因子) のホモログ]

まとめ

1. 複数の lid 構成因子の変異体の詳細な解析、会合状態の比較を行い、two-hybrid 解析でしか知られていなかった位置関係について初めてのまとまった知見を提示した。
2. いずれの lid 変異体でも base, CP の会合は正常に行われることから、これらのサブユニットの会合は lid 会合とは独立に起こりうることを明らかにした。また、lid 変異体では安定な base-CP 複合体が見いだされなため、lid の結合が base-CP の結合の安定化に寄与している可能性も示した。
3. lid^{pm7-3} が核移行しないこと、また base, CP の核移行は lid との結合とは独立に起こりうることを示し、lid は base、もしくはプロテアソーム外の因子によって核内へ輸送されることを示唆した。