

論文の内容の要旨

論文題目 26S プロテアソームの分子集合機構の解析

指導教官 中村卓郎

東京大学大学院医学系研究科

平成14年4月入学

医学博士課程

病因・病理学専攻

金子 岳海

序論

細胞内のタンパク質は絶えず分解され、アミノ酸に帰し、再び新たなタンパク質として合成される。しかし、タンパク質の分解は無秩序に行われているのではなく、高い選択性と厳密な制御の元に分解されている。真核生物では大半のタンパク質が76アミノ酸から成るユビキチンが鎖状に付加され、これを分解の目印としてプロテアソームとよばれる巨大な分解酵素複体により短いペプチド断片までに消化される。このユビキチンとプロテアソームの連携によりタンパク質分解経路は、真核生物において細胞周期の調節、DNA修復、アポトーシス、シグナル伝達、タンパク質の品質管理などあらゆる局面において必須のはたらきをしており、近年の生物学においてその重要度は増すばかりである。

真核生物においてユビキチン化タンパク質を分解するプロテアソームは、約30種のサブユニットが約60分子集合した分子量2.5MDaの26Sプロテアソームであり、プロテ

アーゼ活性を有したタンパク質分解を実行する複合体である 20S プロテアソームに、調節因子である 19S 複合体が両端または片端に結合した 26S プロテアソームとなりその機能を発揮する。

20S プロテアソームは 14 種類、計 28 個のサブユニットにより構成され、7 つのサブユニットがそれぞれリングを形成し、そのリングが 4 つ重なった中空樽状の構造を取っており、2 つの外側のリングはタンパク質分解能をもたない〈1-〈7 の 7 つのサブユニットから構成され (α リング)、2 つの内側のリングは β 1- β 7 から構成され (β リング)、 β 1、 β 2、 β 5 はペプチダーゼ活性を有している。

19S 複合体は 26S プロテアソームの制御因子であり、ユビキチン鎖の認識、ユビキチン鎖の除去、基質のアンフォールディング、20S のゲートの開閉制御を担う。19S 複合体は生化学的に base と lid の 2 つのサブコンプレックスに分類でき機能的にも区別される。base は 6 つの AAA+ATPase サブユニット (Rpt1-6) からなるリングと 2 つの non-ATPase サブユニット (Rpn1、2) から構成され、20S のゲートの開閉と基質のアンフォールディングを ATP 依存的に行う。一方、lid は 9 つのサブユニット (Rpn3、5-9、11、12、15) から構成されており、ユビキチン化されたタンパク質を分解する際のユビキチン鎖の除去に必須である。Rpn10 はユビキチン鎖の認識だけではなく、lid と base を繋ぐ役割を担っていると考えられている。

多種多数にわたるサブユニットから構成されるこの巨大な複合体のサブユニット集合機構は大きな謎であったが、プロテオミクス的手法の発展により 20S プロテアソームの分子集合機構の解明は進展し、現在ではほぼその全容が明らかとなったが、19S 複合体の集合機構に関しては知見が乏しく、20S プロテアソームのようなシャペロン様の働

きをする分子の存在すら不明であった。

私は 19S 複合体の base に注目し、base サブユニット結合分子である機能未知タンパク質 p28、S5b、p27 の機能解析を行った結果、これらの分子が base 形成にシャペロンとして機能することを明らかとした。

結果

1. p28、S5b、p27 は base サブユニットと複合体を形成する

p28、S5b、p27 はプロテアソームに結合する分子として知られているが、その機能は明らかではない。細胞内での p28、S5b、p27 の挙動を検討するために、HEK293T 細胞の lysate を 8-32%グリセロール密度勾配遠心により分画し、画分を SDS-PAGE で展開後、p28、S5b、p27 とプロテアソームサブユニットについてウェスタンブロットを行った。その結果、p28、S5b、p27 は 26S プロテアソーム画分には検出されず、26S プロテアソームよりも低分子量画分に検出された (図 1 A)。p28、S5b、p27 が低分子量画分でプロテアソームサブユニットと結合しているか検討するために、Flag タグを付加した p28、S5b、p27 を安定発現する HEK293T 細胞を、4-24%グリセロール密度勾配遠心により分画し、低分子量画分であるフラクション 4 から 16 を抗 Flag 抗体で免疫沈降し p28、S5b、p27 とプロテアソームサブユニットについてウェスタンブロットを行った。その結果、p28 は Rpt3、Rpt6、Rpn14 とフラクション 8 から 12 で共沈降し、p28 がこれらの分子と複合体を形成していることが明らかとなった (p28 複合体、図 1 B)。同様に、S5b ではフラクション 12 から 16 で Rpt1、Rpt2、Rpn1 と特異的に結合し (S5b 複合体、図 1 C)、p27 はフラクション 8 をピークに Rpt4 と Rpt5 と複合体を形成して

いた (p27 複合体、図 1 D)。これらのことから、base サブユニットは特定のパートナーと 2 量体または 3 量体を形成し p28、S5b、p27 と結合していることが明らかとなった。

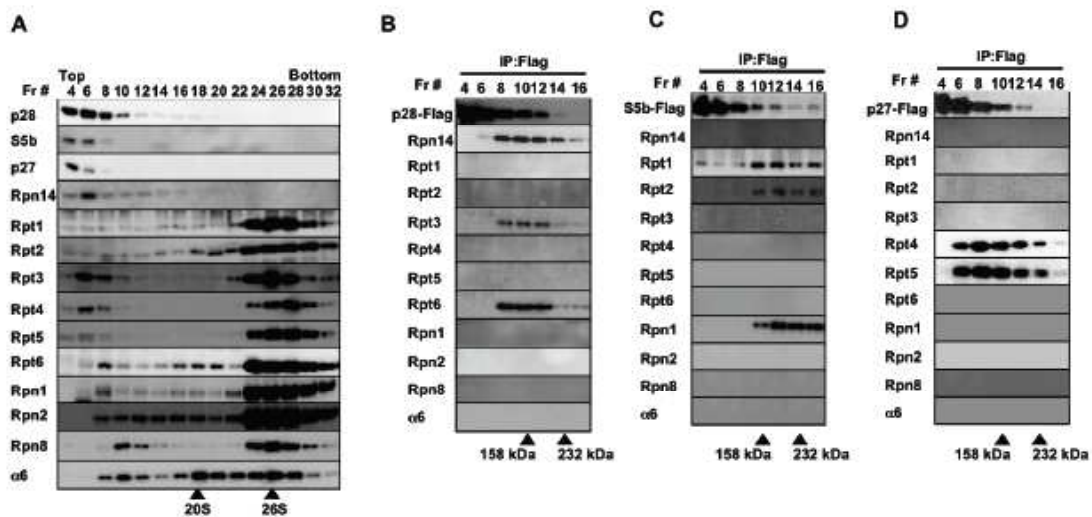


図 1 p28、S5b、p27 は低分子量画分で特異的な ATPase サブユニットと結合する

HEK293T 細胞の lysate を 8-32%グリセロール密度勾配遠心により分画し、画分を SDS-PAGE で展開後、p28、S5b、p27 とプロテアソームサブユニットについてウェスタンブロットを行った (A)。

Flag タグを付加した p28、S5b、p27 を安定発現する HEK293T 細胞を、4-24%グリセロール密度勾配遠心により分画し、低分子量画分であるフラクション 4 から 16 を抗 Flag 抗体で免疫沈降し p28、S5b、p27 とプロテアソームサブユニットについてウェスタンブロットを行った (B-D)。

2. Base の形成機構

Base がどのように形成されているか検討するために、base サブユニットを結合する組み合わせでノックダウンした細胞を 4-24%グリセロール密度勾配遠心で分画し、ウェスタンブロットで解析を行った。Rpt1/2 ノックダウン細胞ではフラクション 12 から 16 で p28 複合体と p27 複合体が会合した複合体が観察される一方、p28 複合体と p27 複合体が

フラクション 6 から 8 で増加していたことから、S5b 複合体非存在下では、p28 複合体と p27 複合体が効率よく結合しないことを示唆する(図2B)。Rpt3/6 ノックダウン細胞ではフラクション 14 から 16 で S5b 複合体と p27 複合体が会合した複合体が観察され、S5b 複合体と p27 複合体が観察された(図2C)。Rpt1/2 または Rpt3/6 ノックダウン細胞と比較して、Rpt4/5 ノックダウン細胞では S5b 複合体と p28 複合体の蓄積は少なく、フラクション 14 から 20 に p28 複合体と S5b 複合体が会合した複合体が観察された(図 2D)。これらのことから、p28 複合体と S5b 複合体は安定した複合体を形成することが示唆された。

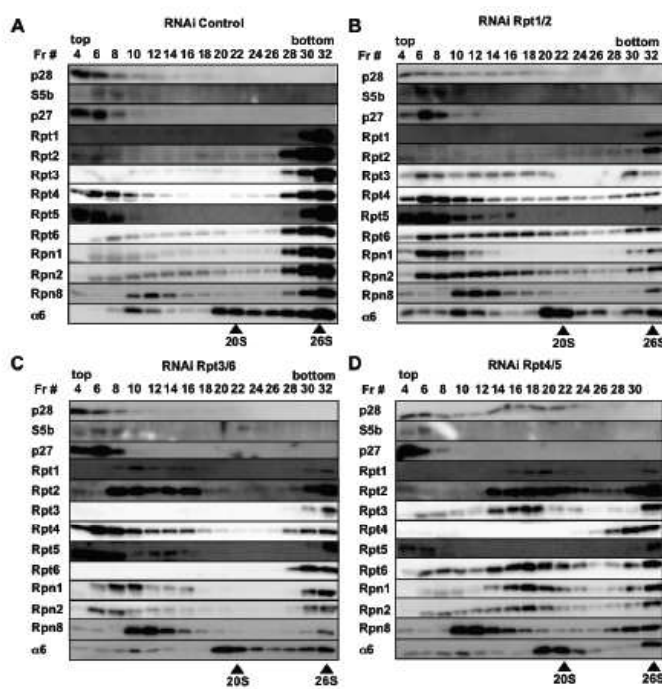


図2 base サブユニットのノックダウン

細胞におけるグリセロール密度

勾配遠心解析

base サブユニットをノックダウンした

細胞を 4-24%グリセロール密度勾

配遠心で分画し、ウェスタンブロット

で解析を行った(A-D)。

3. base 形成時における p28、S5b、p27 役割

図2で示した通り、p28 複合体と S5b 複合体の結合が base 形成の初期段階であることが強く示唆されていることから、この会合における p28 と S5b の役割を検討するために、Rpt4/5 ノックダウン細胞に p28 と S5b をさらにノックダウンして、4-24%グリセロール密度

勾配遠心により分画し、ウェスタブロットにより解析を行った。Rpt4/5 ノックダウン細胞ではフラクション 18 に p28 複合体と S5b 複合体の蓄積が観察されるが、さらに p28、S5b をノックダウンするとこの複合体が消失したことから、p28 と S5b は Rpt1、Rpt2、Rpt3、Rpt6、Rpn1 から成る複合体形成に寄与していることが明らかとなった(図3A)。同様に p28、S5b、p27 が複合体間の会合に与える影響を、いくつかの組み合わせでノックダウンした細胞を 4-24%グリセロール密度勾配遠心で分画しウェスタブロットを行った(図3B-C)。Rpt1/2 または Rpt3/6 ノックダウン細胞では、さらに p27 をノックダウンすることにより、Rpt4/5 が p28 複合体または S5b 複合体への結合を増すことから、p27 は Rpt4 と Rpt5 が p28 複合体または S5b 複合体に取り込まれる際に阻害的に働いていると考えられる。同様の実験を p28 に対して行った結果、Rpt1/2 ノックダウン細胞で観察される複合体は、さらに p28 をノックダウンすることにより減少することから、p28 は p28 複合体と p27 複合体の結合にも関与することが示唆される。S5b ではこのような促進的または阻害的な効果は観察されなかった。

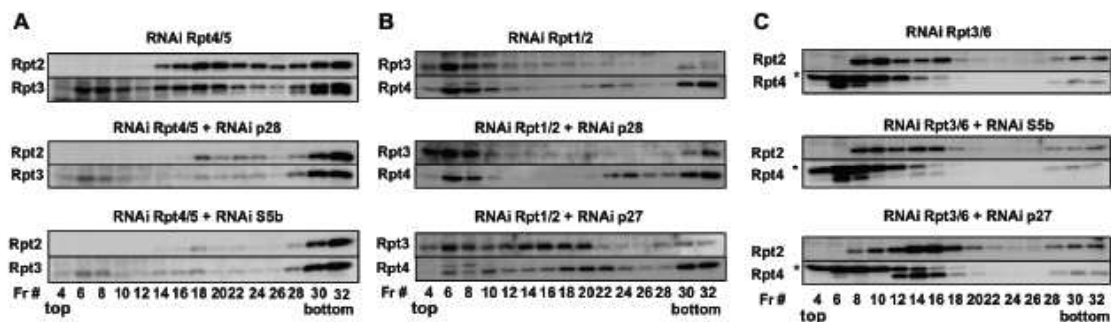


図3 ATPase サブユニットとシャペロンのノックダウン細胞の解析

図に示す組み合わせのノックダウン細胞を 4-24%グリセロール密度勾配遠心で分画し、ウェスタブロットで解析を行った(A-C)。

考察

実験結果から図4に示す base の 19S 複合体形成時におけるサブコンプレックスによる集合機構が考えられる。Rpn2 を除く base サブユニットが単体として存在せず、シャペロン分子と複合体として存在し、これらが集合することにより base が形成される。p28 と S5b は Rpt3-Rpt6 と Rpt1-Rpt2-Rpn1 の結合を促進し、p27 はこれらの複合体と Rpt4-Rpt5 の結合を抑制するので、base 形成の初期段階では p28 複合体と S5b 複合体が結合する。この複合体に p27 複合体が結合し、Rpn2 も加わり base が形成されると考えられる。その後 Rpn10 と lid が結合することにより 19S が形成され、20S と結合し 26S プロテアソームとなり、その機能を発揮する。

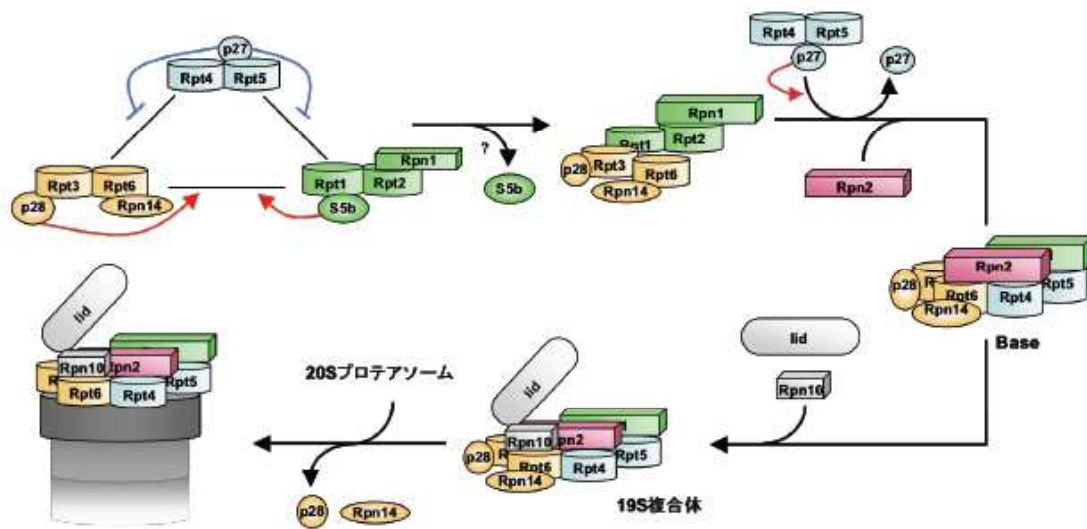


図4 19S 形成のモデル図

p28 は肝癌細胞で高発現しているタンパク質としても同定されており、20S プロテアソームの集合因子である PAC2 も同様に肝癌で高発現している分子として同定されており、PAC1 などの 20S プロテアソーム集合因子も増殖が盛んな細胞での高発現が認められている。これらのことから迅速にプロテアソームを形成させる必要がある癌細胞などでは、このようなシャペロン分子の援助が必須になると考えられる。