

論文内容の要旨

論文題目

プロテアソーム分子集合因子 PAC1 の遺伝学的解析

氏名 佐々木 克博

[序論]

プロテアソームは現在知られているタンパク質分解酵素の中で最も巨大で複雑な機能性酵素複合体である。細胞内で自らの役割を果たし、不要とされたタンパク質の大部分は分解シグナル（具体的にはプロテアソームへの輸送シグナル）として選択的なユビキチン修飾をうけ、プロテアソームに認識され分解される。このプロセスはユビキチン-プロテアソームシステムと称され、大規模なタンパク質分解を担う重要な細胞内メカニズムであることが知られている。

ユビキチン修飾タンパク質を分解する活性型プロテアソーム（26S プロテアソーム）は 20S プロテアソーム（プロテアーゼ触媒活性をもつ複合体）と 19S 調節因子複合体（ATP 依存的に 20S プロテアソームへと基質を誘導する複合体）から構成された巨大で複雑な細胞内装置である。酵母から哺乳類に至る真核生物に存在する 20S プロテアソームは比較的相同性の高いアミノ酸配列を有する 7 種類の異なる α , β サブユニット（計 14 種類）から構成さ

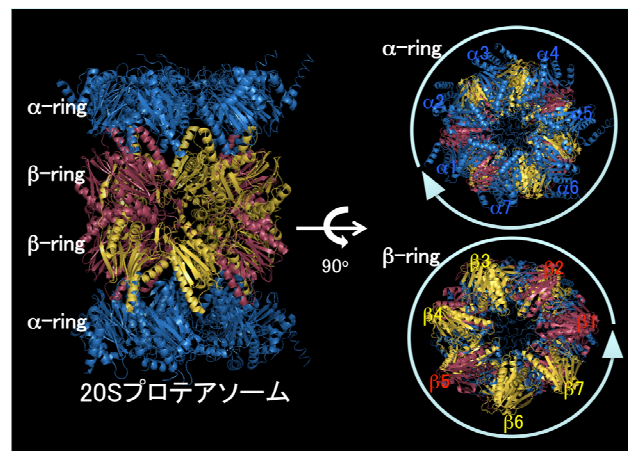


図 1. 20S プロテアソームの結晶構造

れている。 α , β サブユニット夫々がリングの形をとり、さらに $\alpha\beta\alpha$ の順に積み重なることで円筒

形の構造を形成している (図 1)。これらのサブユニット群はプロテアソームに専門的な外来性の分子集合因子 (PAC1、PAC2、PAC3、PAC4、Ump1) と分子内シャペロンの支援 (共同作用) によって 20S プロテアソーム内の決まった位置に組み込まれることが可能となる。

本研究のターゲットである Proteasome Assembling Chaperone 1 (PAC1) は、PAC2 と会合し二量体として α サブユニットと相互作用することによって異常構造 (α リングのダイマー) 形成を阻止しつつ、 α リングの形成を促進させる。つまり、プロテアソーム形成プロセスの初期段階である正常な α リングの形成のために必要な分子シャペロンとして機能している。

[PAC1 をターゲットとしたコンディショナルプロテアソーム欠損マウスの作製]

本研究では Cre/loxP システムを利用したコンディショナルノックアウトマウスを作製し、組織特異的に PAC1 遺伝子を欠損させ解析を行った。まず、PAC1 遺伝子が欠損した生殖細胞を持つヘテロ欠損体同士を掛け合わせて PAC1 の全身欠損体を作出すると、これらのマウスは胎仔期 E6.5 で致死となり、着床後早期の増殖が著しく阻害されていることが分かった。この結果は PAC1 依存性のプロテアソーム形成が胎仔期における個体発生 (胎仔の増殖) に必須であることを示唆している。

[中枢神経におけるプロテアソームの役割]

プロテアソームの欠損が中枢神経系に及ぼす役割を解析するために、神経幹細胞マーカータンパク質である Nestin のプロモーター制御下で Cre リコンビナーゼが発現しているトランスジェニックマウスを用いた。Nestin 陽性細胞では胎仔期 9.0 日目頃から PAC1 が欠損されるため、胎仔期の発生に大きく影響を受けると思われた。しかし、胎生致死とはならず、生後において発育障害、平衡感覚の低下・四肢の運動失調による歩行障害が起こり、約三週齢で死に至ることが観察された。この結果、脳は生後においても増殖し分化するが、この時期の神経細胞の機能制御にプロテアソームが必須であることが判明した。

この PAC1 欠損マウスは胎仔期後期より 20S プロテアソームが既に減少しており、出生の前後から 26S プロテアソームも減り始める。生後三週間で 26S プロテアソームは野生型の約 30%にまで減少していた (図 2)。26S プロテアソームの減少は細胞内でユビキチン修飾タンパク質が蓄積していることから裏付けられた (図 2)。この結果、神経細胞内におけるほぼ大部分のプロテアソームは PAC1 が介在したシャペロン依存的なプロテアソーム形成機構によってその存在量を維持していることが明らかとなった。

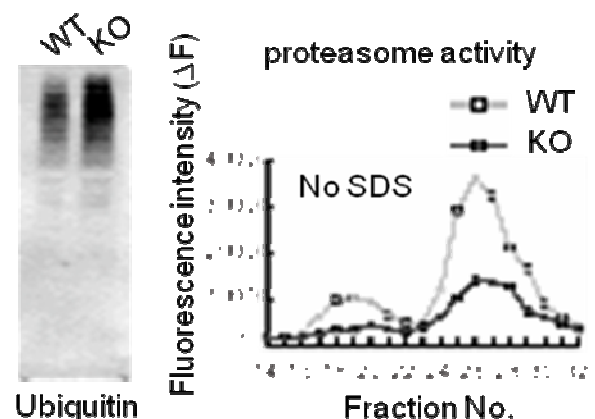


図 2. 中枢神経特異的 PAC1 欠損マウス (生後 3 週齢) のプロテアソーム活性の低下及びユビキチン修飾タンパク質の細胞内蓄積

次に、組織形態学的手法を用いてこの **PAC1** 欠損マウスの表現型を観察した結果、特に小脳に著しい発達障害が見られた。小脳は脳の構成部位の中で最も遅れて発生する組織である。小脳皮質の表層では出生後約三週間かけて顆粒前駆細胞の爆発的増殖と分化・移動が行われ、小脳に特徴的な小脳葉の形成と異なる細胞種からなる層構造が形成されるが、**PAC1** 欠損マウスの小脳では、これら構造形成の消失に伴う形態異常が顕著に観察された。さらに細胞増殖をモニターするために **BrdU** を取り込ませ、胎仔期後期以降の顆粒前駆細胞を標識し観察したところ、野生型と比べて **PAC1** 欠損マウスの小脳では **BrdU** 陽性細胞の数が著しく少ないことが分かった。さらに、成熟神経細胞のマーカーである **NeuN** 陽性細胞の数も **PAC1** 欠損マウスの小脳にほとんど存在しないことから、このマウスにおける小脳の激しい発生障害は小脳顆粒前駆細胞の増殖が阻害されたことによるものであることが明らかとなった。以上の結果はプロテアソーム依存的に神経前駆細胞の分裂が実行されていることを強く示唆する結果となったが、プロテアソーム活性が低下した小脳以外の神経細胞においてユビキチンや不溶性タンパク質を含む封入体の蓄積や神経細胞の変性、脱落等が全く観察されなかったのは意外な結果であった。これは、おそらく細胞の増殖度の相違を反映していると思われるが、正確に考察するためには、今後の詳細な解析が必要である。

[肝臓におけるプロテアソームの役割]

次に、肝臓におけるプロテアソームの役割を解析するために **Albumin** 発現細胞 (肝細胞) において **PAC1** 遺伝子を欠損させた。生後における肝細胞の増殖は、脳と比較すると比較的遅く進行しており、寧ろ大部分が非分裂細胞と考えられる。

作出した肝臓特異的 **PAC1** 欠損マウスのヘテロ、ホモ欠損体はともに外見上野生型と変わらず、生後一年以上経過しても致死に至ることはなかったが、ホモ欠損体のプロテアソーム活性を測定してみたところ、やはり生後二週間以内にすでに **20S** プロテアソームが完全に消失していることが示された。しかし驚くべきことに **20S** プロテアソームが消失してから半年以上経過しても **26S** プロテアソームが正常レベルの活性を保ち続けていることを発見した。細胞内の **20S** プロテアソームのプールが枯渇しているのにも関わらず **26S** プロテアソームが半年以上も存在するという結果は驚くべき現象であった。**26S** プロテアソームの形成に **PAC1** 非依存的な経路が存在する可能性や **26S** プロテアソームの超安定性などがその理由として考えられるが現段階では明らかになっていない。

次に、この **PAC1** を欠損した肝臓の特異な状況を利用して **20S** プロテアソームの機能を調べることを考えた。生化学的解析から細胞内のユビキチン修飾タンパク質が蓄積していることを明らかとしたが、**20S** プロテアソームについては積極的にユビキチン修飾タンパク質の分解に寄与しているという事実はこれまでに存在しない。むしろ、既存の報告ではアンフォールディングタンパク質やストレスで蓄積する酸化タンパク質の分解を選択的に行っていることが示唆されており、ユビキチン修飾タンパク質の蓄積は **20S** プロテアソーム依存的な分解基質の蓄積とストレスの負

荷（特に酸化ストレス）に起因（残存する 26S プロテアソームで処理できずにユビキチン化されて累積）するものではないかと考えた。

予想通り、PAC1 ホモ欠損体の肝臓では一連の解毒酵素や抗酸化ストレスを示すタンパク質の遺伝子発現が上昇しており、また形態学的解析から肝細胞の肥大が観察された。さらに電子顕微鏡による観察からいくつか異常な核構造を持つ肝細胞が存在することを発見し、以前の報告からこれらが二年齢の老化マウスの核と同じ形態を呈していることが明らかとなった（図 3）。以上の

結果をもとにさらなる組織学的解析を行うことにより PAC1 のホモ欠損体では生後数ヶ月で肝細胞の老化が始まっていることを結論づけた。また、その際加齢に伴い 26S プロテアソームが核内に優先的に取り込まれること、核内でのプロテ

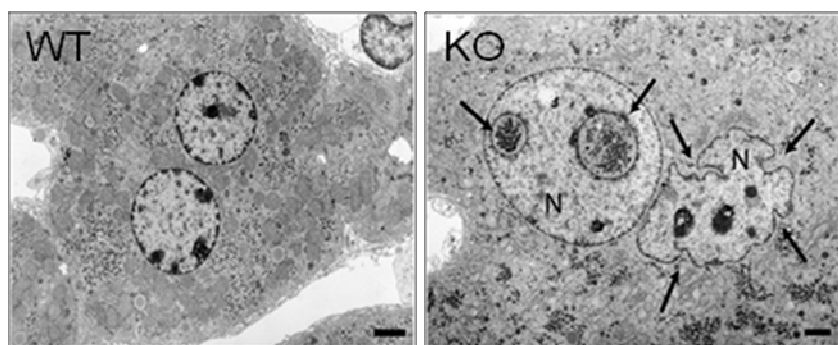


図 3. 肝臓特異的 PAC1 欠損マウス肝細胞における核膜の構造異常

アソームの活性が上昇していることを発見した。以上の結果は、今まで 26S プロテアソーム形成のための土台と考えられてきた 20S プロテアソームが、単独で生理学的に重要な役割を担っていることを強く示唆した。これは 20S プロテアソームが 19S 調節複合体より 2~3 倍、過剰に存在する知見と一致する。

【結論】

本研究によって個体においてもあらゆる組織でプロテアソーム分子集合因子がプロテアソームの形成に重要であることを証明した。しかしながら、PAC1 が欠損した肝臓において 26S プロテアソームの量が維持されているように、26S プロテアソームが既に存在している状態ではプロテアソーム分子集合因子非存在下で生存は可能であることも示された。この結果は PAC1 非依存的な 20S プロテアソームの分子集合経路を明らかにし、細胞内の 20S プロテアソームのプールが PAC1 依存的、非依存的（26S プロテアソームのプールの維持に最低限必要）な 2 つの経路によって成り立っていることを示している。さらに興味深いことに 20S プロテアソーム活性が単独で消失した状態で肝臓特異的 PAC1 欠損マウスが老化の表現型を示したことは、20S プロテアソームが生理的な機能を有していることを個体レベル（インビボ）で最初に明らかにしたことを意味している。本研究から PAC1 依存的プロテアソーム形成経路の存在意義かつ 20S プロテアソームの生理的な役割について詳細に考察することが可能となった。しかしながら、さらに解析が必要な点もまた明確であり、生理学的な立場からプロテアソームの解析を進めることが今後重要になることを確信した。