

本論文は、真核細胞内で必須のタンパク質分解酵素であるプロテアソームについて、
①免疫プロテアソームと胸腺プロテアソームの形成過程
②26S プロテアソームの 19S 複合体蓋部の形成過程
を詳細に解析したものである。

ユビキチン化タンパク質を選択的に分解する 26S プロテアソームはタンパク質分解を実行するコア粒子である 20S プロテアソームと、タンパク質分解のための前処理、すなわちユビキチン鎖の捕捉、ATPase による基質の巻き戻しと 20S プロテアソーム内への送り込み、基質からのユビキチン鎖の切り離しなどを行う 19S 複合体から形成されている。

真核生物の 20S プロテアソームは 7 種の α サブユニットと 7 種の β サブユニットがそれぞれリング状構造を形成し、それが $\alpha \beta \beta \alpha$ と 4 層に重なった樽状構造を持つ。触媒活性を持つのは $\beta 1$ 、 $\beta 2$ 、 $\beta 5$ サブユニットでそれぞれカスパーゼ様、トリプシン様、キモトリプシン様の活性を示す。20S プロテアソームは古細菌にもあるが、古細菌の 20S プロテアソームは各一種類の α サブユニットと β サブユニットから形成され、キモトリプシン様の活性しか持たないことから、真核生物のプロテアソームになってペプチダーゼ活性を 3 種類に増やし、それが保存されていることは進化的に興味のあるところである。さらに、脊椎動物になると免疫プロテアソーム、胸腺プロテアソームという触媒サブユニットが標準型から組織特異的なサブユニットに置換された特殊なプロテアソームを持つことがわかっている。免疫プロテアソームでは $\beta 1$ 、 $\beta 2$ 、 $\beta 5$ が $\beta 1i$ 、 $\beta 2i$ 、 $\beta 5i$ に、胸腺プロテアソームでは免疫プロテアソーム型からさらに $\beta 5i$ が $\beta 5t$ に置換され $\beta 1i$ 、 $\beta 2i$ 、 $\beta 5t$ を持つ。

①については、酵母からヒトに至るまで保存されたタイプの 20S プロテアソームである標準プロテアソームと、脊椎動物に特異的に存在する二つのタイプの特殊型 20S プロテアソームの形成機構がどのように異なるのか、すなわち、免疫プロテアソームおよび胸腺プロテアソームが標準プロテアソームに対して優先的に形成される仕組みを明らかにしようとする研究である。個々のサブユニットの siRNA を用いたノックダウンと、その結果蓄積する中間体の性状を綿密に調べることにより、免疫および胸腺プロテアソームの触媒サブユニット $\beta 1i$ 、 $\beta 2i$ 、 $\beta 5i$ 、 $\beta 5t$ が、標準プロテアソームの相同触媒サブユニット $\beta 1$ 、 $\beta 2$ 、 $\beta 5$ よりもプロテアソーム形成時に優先的に早い時期に取り込まれることが分かった。また、 β サブユニットは 20S プロテアソームに組み込まれてから N 末端のプロペプチドが切断され成熟型となるが、このプロペプチドは β サブユニットが 20S プロテアソーム前駆体に取り込まれ 20S プロテアソームを形成する際に重要な働きを持つことがわかっている。本論文では、このプロペプチド配列にも注目し、標準型プロテアソームにおいて $\beta 5$ の組み込みは $\beta 4$ の後であるが、 $\beta 5t$ は $\beta 4$ に依存せずプロテアソームに組み込まれること、そしてこの $\beta 5t$ が標準型 $\beta 5$ より早く組み込まれることを可能にする $\beta 4$ 依存性の解除は $\beta 5t$ のプロペプチドに依ることを明らかにした。さらに、 $\beta 5t$ の取り込みは $\beta 1i$ 、 $\beta 2i$ の先行した取り込みに強く依存していることが明らかとなり、この仕組みにより胸腺上皮細胞において均一な胸腺プロテアソームの形成が保証されることを示した。この仕組みは、胸腺上皮細胞における CD8 T 細胞の正の選択を支える仕組みであり、免疫学的にも重要な発見である。

一方、19S 複合体は 20S プロテアソームの活性調節に働く、19 種類のサブユニットから形成されている複合体である。19S 複合体はさらに蓋部と基底部に分けられる。基底部は 6 種の相同な ATPase を含み、先に述べたように基質の巻き戻しや 20S プロテアソーム内への基質の送り込みを担っていると考えられている。一方、蓋部には脱ユビキチン化酵素である Rpn11 を除き、配列から各サブユニットの機能を類推出来るようなものはなく、何故このように大きな複合体を形成する必要があるのか、未だに不明である。また、基底部の形成は基底部形成のためのシャペロン分子が近年同定され、形成過程が明らかになってきたが、蓋部の形成過程に関しては全く不明であった。

そこで②については、9 個のサブユニットからなる 19S 蓋部の形成機構について、個々のサブユニットの siRNA によるノックダウンにより蓄積する中間体について、質量分析を駆使することによりその内容を明らかにした。その結果、蓋部がさらに Rpn3, Rpn7, Rpn15 と Rpn5, Rpn6, Rpn8, Rpn9 という二つのサブコンプレックスに分けられ、それぞれが独立して形成された後に会合して完成することを明らかにした。20S プロテアソームや 19S 複合体基底部においては、中間体特異的に結合するプロテアソーム形成シャペロンが同様な実験を行うことによって同定され、それらのシャペロン分子が形成に重要な働きを担っていることがわかっている。蓋部形成にも何らかのシャペロン分子が関わっている可能性を考え、中間体形成機構解明と同時にそのような分子の同定も同時に試みたが蓋部中間体にはそのようなシャペロン分子と思われる分子は同定されなかった。また、Rpn11 の蓋部への組み込みは Rpn5-Rpn6-Rpn8-Rpn9 から形成されるサブコンプレックスに依存していることも示した。蓋部はユビキチン化タンパク質からユビキチン鎖を外すという、タンパク質分解において必須の過程をになう複合体であり、実際にその触媒活性を担う Rpn11 サブユニットを確実に配置させるための形成機構となっていることが示唆された。さらに、Rpn12 は二つのサブコンプレックスが結合後に組み込まれ、Rpn12 の組み込みを持って蓋部の完成とみなすことが出来ることも判明した。

得られた結果からは、どのサブユニットが直接相互作用するかどうか推察することができ、構造的解析の面でも大きな知見を与える研究である。さらに、近年蓋部サブユニットの Rpn6 の発現が高いことが胚性幹細胞の多能性の維持や、線虫の寿命延長に重要であることが他のグループの研究により明らかとなっており、そのメカニズムを理解するための重要なプラットフォームとなる研究であり、今後さらに生物学的重要性の観点からも価値を増す研究となると考えられる。

以上の研究により、多数のサブユニットから構成されるプロテアソーム複合体がどのように秩序正しく形成されるのか、その仕組みについて丹念に得た結果から、緻密にモデルを組み立てることに成功した。これらの理解は、特殊型プロテアソームや蓋部が真核生物、特にヒトにおいても重要な生物学的意義、すなわち免疫システムの構築や胚や iPS 細胞の多能性維持、個体の寿命についてさらなる理解の進展に資するところが大きい。よってこれを行った白明慧は博士(薬学)の学位を得るにふさわしいと判断した。