

審査の結果の要旨

氏名 松崎 哲郎

本論文は、これまでほとんど解析されていない細胞内プロテアソーム活性上昇時の表現型を調べることを目的として、出芽酵母新規タンパク質発現系を用いて細胞内プロテアソーム活性を上昇させ、細胞内プロテアソーム活性上昇時の表現型を調べたものである。26S プロテアソームは分解されるべき基質を捕捉する 19S regulatory particle (RP)と、ペプチダーゼ活性を有する 20S core particle (CP)からなるが、本研究により過剰な CP が変性タンパク質ストレス耐性を弱めることを見出している。

26S プロテアソームはユビキチン修飾を受けたタンパク質の分解を実行する 33 種のサブユニットからなる巨大な酵素複合体である。遺伝学的に、あるいは薬剤によってプロテアソーム活性を低下させたときの表現型は様々な生物で解析されている。一方、プロテアソーム活性を上昇させたときの表現型を解析した研究は少ない。しかし、このような研究は高いプロテアソーム活性を示すがん細胞の病態理解やプロテアソーム活性上昇で寿命が延びるメカニズムの解明など様々な未解決の問題の解明につながると期待される。細胞内のプロテアソーム活性を上昇させる方法として、(1)全サブユニット共通の転写因子の過剰発現、(2)特定の単一サブユニットの過剰発現、が報告されている。しかし、(1)ではプロテアソームと関連のない遺伝子の発現も誘導される、(2)では全サブユニットの転写が促進されることによって生じる生理的なプロテアソーム活性上昇を反映していない、といった問題点がそれぞれある。

これらの問題点を踏まえ、出芽酵母において全 33 種類のサブユニットを同時に過剰発現させることを最終目標とし、本研究では CP サブユニット 全 14 種類または RP サブユニット 全 19 種類の同時過剰発現細胞を樹立し、細胞内プロテアソーム活性上昇時の表現型を調べた。

前項の通り CP と RP はそれぞれ 14、19 種類のサブユニットで構成されるため、19 種類のタンパク質を共発現できる実験系を構築すれば全 CP または全 RP サブユニットの同時発現が実現できる。しかし、出芽酵母で 19 種類ものタンパク質を同時発現させた例は過去にない。本研究では 2 つのタンパク質を同時発現できるプラスミドを 10 種類作製し、出芽酵母に保持させることで 19 種類のタンパク質の同時発現を実現する。これには①プラスミドを保持させるための 10 種類の栄養要求性を持つ株 ($\Delta 10$ と呼称)の樹立、② $\Delta 10$ の栄養要求性に対応し、2 つの発現用クローニングサイトを持つプラスミド 10 種類が必要である。まず①を実現するために野生型株の栄養素合成酵素 10 種類を欠損させ 10 種類の栄養要求性を持つ株 $\Delta 10$ を樹立した。

続いて②を実現するために、ガラクトースで発現誘導可能な pESC プラスミドシリーズの既存のもの 4 種に加え、これを改変した pESC-ADE、pESC-MET、pESC-LYS、pESC-THR、pESC-ARG、pESC-TYR の 6 種類を新たに構築して合計 10 種類とした。これら 10 種類のプラスミドを $\Delta 10$ へ導入し、10 種類の栄養素を欠損させた培地で培養したところ、これら全てを保持できることを確認した。1 つのプラスミドで 2 種類のタンパク質を発現できることから、10 種のプラスミドを保持した株では最大 20 種類のタンパク質の同時発現が可能となる。これにより出芽酵母で最大 20 種類のタンパク質を発現できる実験系が樹立された。

全 10 種類のプラスミドへ CP あるいは RP サブユニットを全てクローニング後 $\Delta 10$ へ導入した (それぞれ CP 過剰発現株、RP 過剰発現株と呼称)。ガラクトース含有培地でサブユニットの発現を誘導したところ、CP 過剰発現株、RP 過剰発現株ではそれぞれ細胞内 CP、26S プロテアソームのペプチダーゼ活性増加が見られた。また細胞破碎液を native-PAGE で展開しウエスタン

ブロット法で CP、26S プロテアソームの量を調べたところ、活性に比例し CP 過剰発現株では CP、RP 過剰発現株では 26S プロテアソームの量がそれぞれ増加していた。

プロテアソームは変性タンパク質の除去にも働いている。従って、今回樹立した CP 過剰発現株、RP 過剰発現株は変性タンパク質によるストレスへの耐性が增強していると予想される。この可能性を検討するため、タンパク質変性を引き起こすアミノ酸アナログ azetidine-2-carboxylic acid (AZC)含有培地での各過剰発現株の増殖を調べた。その結果、26S プロテアソーム活性が増加する RP 過剰発現株は予想通り mock 株に比べ早く増殖し、変性タンパク質ストレスへの耐性が增強していることが示唆された。しかし、遊離 CP 活性のみが増加する CP 過剰発現株は予想に反して AZC 含有培地で増殖せず、変性タンパク質ストレス感受性を示した。

RP と結合していない CP はユビキチン非依存的な分解を実行するなど、26S プロテアソームに比べ非選択的なタンパク質分解を実行する性質がある。そこで、CP 過剰発現株では過剰な CP によってストレス応答に必須の役割を担うタンパク質がユビキチン非依存的に分解を受けていると考えた。AZC 存在下での CP 過剰発現株で発現が低下しているタンパク質を網羅的に調べるために、mock (\pm AZC)、CP 過剰発現株 (\pm AZC)の 4 サンプルに対し tandem mass tag (TMT)を利用したプロテオーム解析を行なった。得られた発現量のデータから AZC 処理時のタンパク質発現量の比 (AZC 処理時の CP all)/(AZC 処理時の mock)を算出した。さらに、定常時でも CP 過剰発現株で発現量が少ないタンパク質を除外するため、上記比率を定常時での発現量比 CP all/mock で除して補正した値 [(AZC 処理時の CP all)/(AZC 処理時の mock)]/(CP all/mock)を各タンパク質に対して算出した。この値が小さいもの上位 5%を選び、gene ontology (GO) term で分類すると、最も p 値が低い GO term は unfolded protein binding (10 タンパク質)であり、そのうち 8 タンパク質は変性タンパク質の形成抑制、および分解に関わるヒートショックタンパク質であった(Ydj1、Hsp82、Hsp104、Hsp26、Hsp42、Ssa1、Ssa2、Ssa4)。これらのタンパク質の発現量データを調べると、mock、CP 過剰発現株でも AZC 処理により発現量が増加していたが、その上昇率は CP 過剰発現株で低下していた。次に、この AZC による誘導不全が転写誘導の異常によるものか定量 PCR で調べたところ、CP 過剰発現株でも正常に転写が誘導されていた。従って、CP 過剰発現株での AZC によるヒートショックタンパク質誘導不全は転写レベルではなく、タンパク質レベルで生じていることが分かった。

以上の結果から、松崎哲郎は以下の成果を示した。第一に、出芽酵母で最大 20 種類のタンパク質同時発現を可能とする実験系を樹立した。本研究では出芽酵母内在性プロテアソームサブユニットの発現へ応用したが、本実験系は大腸菌と同様に組換えタンパク質発現実験にも応用可能である。従来、大腸菌では再構成が困難であったタンパク質複合体の本実験系による大量精製が今後期待される。第二に、出芽酵母における新規細胞内プロテアソーム活性化法を樹立した。出芽酵母では全プロテアソームサブユニット共通の転写因子 Rpn4 の過剰発現が細胞内プロテアソーム活性上昇法として主に用いられている。しかし、Rpn4 は酸化ストレス応答因子や DNA 修復酵素など様々な副次的遺伝子の転写も亢進してしまうという問題がある。このような副次的な遺伝子の転写がない本活性化法はプロテアソーム活性化時の表現型を直接調べられる有用な手法と言える。第三に、CP 過剰発現株は強い AZC 感受性を示すことを明らかにした。さらに CP 過剰発現株ではストレス依存的なヒートショックタンパク質の発現誘導が低下しており、これは転写誘導障害によるものではなかった。これらの結果から、CP 過剰発現株では過剰な CP によってヒートショックタンパク質が分解を受けており、その結果 AZC による細胞毒性が生じている、ということが示唆された。

本研究は出芽酵母の発現実験系を大きく発展させるのみならず、これまでほとんど解析されていないプロテアソーム活性化時の表現型解析に大きく貢献すると期待される。よって本論文は博士(薬学)の学位請求論文として合格と認められる。