

審査の結果の要旨

氏名 入木 朋洋

本論文は、プロテアソーム機能低下による細胞老化の誘導機構と、細胞老化に伴うプロテアソーム機能変化の解明を目指したものである。RNA シークエンシング (RNA-Seq) 解析や質量分析による網羅的な発現解析や、免疫染色などの細胞生物学的手法により老化細胞の形質を解析することで、プロテアソーム機能低下による細胞老化の誘導機構と、老化細胞におけるプロテアソームの新規機能変化の解明に至った。

細胞老化は DNA 損傷、テロメア短縮などのストレスにさらされた細胞が不可逆的に増殖を停止する現象である。細胞老化した細胞 (老化細胞) は **senescence-associated secretory phenotype (SASP)** と呼ばれる炎症性サイトカインなどの分泌を介して周囲の組織の慢性炎症を引き起こし、がんや動脈硬化などの様々な加齢性疾患の原因となることが示唆されている。そのため、細胞老化は治療の標的として注目されており、老化細胞の形質の解析が進められている。

プロテアソームは細胞内でユビキチン化タンパク質を選択的に分解するタンパク質分解酵素複合体である。プロテアソームは基質の分解を介してストレス応答やタンパク質品質管理などの多様な生命現象を制御し、細胞の生存に不可欠な役割を果たす。近年、プロテアソームの阻害が細胞老化を誘導すること、老化細胞でプロテアソームの発現量や活性が低下すること、プロテアソームサブユニットの過剰発現により細胞老化が抑制されることが報告されており、プロテアソームと細胞老化の密接な関連が示唆されている。しかし、プロテアソームの機能低下と細胞老化の関係には不明点が多い。そこで本研究では、RNA-Seq 解析と質量分析による網羅的な発現変動解析や、免疫染色などの細胞生物学的手法により、細胞老化によりプロテアソーム機能が低下する機構と、プロテアソーム機能低下による細胞老化誘導機構の解明を目指した。

プロテアソーム阻害により誘導される細胞老化の特徴を調べるため、主要な細胞老化マーカーの検出と、RNA-Seq 解析と質量分析による mRNA・タンパク質の網羅的な発現解析を行った。その結果、プロテアソーム阻害により細胞老化を誘導した際に、細胞老化マーカーである **senescence-associated β -galactosidase (SA- β -gal)** 活性の亢進や SASP 因子の発現誘導などが認められた。また、RNA-seq 解析と質量分析の結果に対して **Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG)** パスウェイ解析や **gene ontology (GO)** 解析を行ったところ、DNA 損傷や継代培養により誘導される典型的な細胞老化と、プロテアソーム阻害により誘導される細胞老化は類似したパスウェイ・GO 変動を示した。これらの結果から、プロテアソーム阻害により誘導される細胞老化は典型的な細胞老化と類似した形質を示すことが明らかとなった。

次に、プロテアソーム阻害による細胞老化の誘導機構の解明に取り組んだ。プロテアソーム機能低下は細胞老化誘導刺激の一つである酸化ストレスを引き起こすことが知られている。そこで、プロテアソーム阻害時に誘導される細胞老化が酸化ストレス依存的か調べるため、抗酸化剤である **n-acetyl cysteine** 処理を行ったところ、細胞増殖の停止が抑制されたことから、プロテアソーム阻害は酸化ストレスを介して細胞老化を引き起こすことが明らかとなった。

続いて、老化細胞でプロテアソーム機能が低下する機構の解明に取り組んだ。上述の質量分析では、老化細胞においてほぼ全てのプロテアソームサブユニットの減少が認められた。また、一部のプロテアソーム形成シャペロンはプロテアソームサブユニットと比べて大きく減少していた。ユビキチン化基質の分解を担う 26S プロテアソームは 33 種のサブユニットから構成される。プロテアソーム形成シャペロンの働きにより、分解活性を持つ **core particle (CP)** とユビキチン化基質の捕捉などを行う **regulatory particle (RP)** が形成され、CP と RP の会合により 26S プロ

テアソームが形成される。そこで、老化細胞ではプロテアソームの形成に異常があると考え、細胞抽出液をグリセロール密度勾配法により分画し、プロテアソームペプチダーゼ活性の測定とイムノブロットを行ったところ、老化細胞で 26S プロテアソームの形成不全が認められた。このことから、老化細胞におけるプロテアソームの活性低下は、プロテアソームサブユニットと形成シャペロンの減少による 26S プロテアソームの形成不全が原因であることが明らかとなった。

プロテアソームの細胞内局在は栄養状態や細胞周期など、様々な刺激によって変化することが知られているが、細胞老化に伴うプロテアソーム局在変化は不明である。そこで、継代培養や DNA 損傷により老化した老化細胞におけるプロテアソームの細胞内局在を解析したところ、プロテアソームが老化細胞で核内 foci を形成していることが明らかとなった。このプロテアソームの核内 foci は細胞老化したマウス胚性線維芽細胞にも認められることから、細胞老化に伴うプロテアソームの核内 foci の形成はマウス・ヒトで保存されていることが明らかとなった。また、プロテアソームの核内 foci は PML body や DNA damage foci など、既知の核内構造体とは一致しないことから、プロテアソームの核内 foci は新規の核内構造であることが示唆された。

非膜性のオルガネラは分子の流動性などの物性と機能が関連している。そこで、fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) 解析や live cell imaging を行ったところ、プロテアソームの核内 foci は流動性を示した。また、細胞内の liquid droplet を不安定化する 1,6-hexanediol 処理でプロテアソームの核内 foci が消失した。このことから、プロテアソームの核内 foci は liquid droplet 様の性質を示し、核内 foci においてプロテアソームが何らかの機能を果たすことが示唆された。

プロテアソームが核内 foci で基質の分解を行うと考え、基質の分解に関与する因子がプロテアソームの核内 foci に存在するか調べた。共免疫染色の結果、分解のシグナルとなる K48 ポリユビキチン鎖、基質の運搬を担う RAD23B、基質の解きほぐしを担う p97/VCP、ユビキチンリガーの一種である UBE3A が、プロテアソームの核内 foci に共局在することが明らかとなった。また、基質のユビキチン化を阻害するユビキチン活性化酵素 (E1) 阻害剤、プロテアソーム阻害剤、RAD23B とパラログの RAD23A のノックダウンによりプロテアソームの核内 foci が消失することから、プロテアソームの核内 foci の形成にはユビキチン化基質、RAD23、活性を持ったプロテアソームが必要であることが示唆された。そこで、核内 foci に存在するプロテアソームがユビキチン化基質の分解を行う 26S プロテアソームであるか調べた。その結果、プロテアソームの CP サブユニットと RP サブユニットの共局在、開口したプロテアソームを染色するプロテアソーム活性プローブによる染色が認められたことから、プロテアソームの核内 foci には 26S プロテアソームが存在し、基質の分解を担うことが示唆された。

そこで、プロテアソームが核内 foci で分解する基質を同定するため、老化細胞においてプロテアソームが活発に分解する基質を同定した。老化細胞・若い細胞をプロテアソーム阻害剤または翻訳阻害剤で処理し、質量分析を行ったところ、老化細胞特異的にプロテアソームが活発に分解する核タンパク質として 9 タンパク質を同定した。この解析結果から、プロテアソームが老化細胞の核内 foci において、これらのタンパク質の分解を担っている可能性が示唆された。

以上の研究から、入木朋洋は以下の成果を示した。まず、質量分析や RNA-Seq 解析を含む多面的な解析から、プロテアソーム機能低下が酸化ストレスを介して細胞老化を誘導すること、プロテアソーム機能低下により誘導された細胞老化は典型的な細胞老化と類似した表現型を示すことを解明した。また、老化細胞ではプロテアソーム量と形成能が低下することで、プロテアソーム機能が低下することを示した。さらに、老化細胞ではプロテアソームが核内で新規構造を形成して基質の分解を行うことを発見し、老化細胞では機能低下以外のプロテアソーム機能変化が生じることを明らかにした。本研究はタンパク質恒常性の破綻が引き起こす細胞老化の誘導機構と、細胞老化に伴うタンパク質代謝系の変化を解明したものであり、細胞老化が関与するとされる加齢性疾患の病態の理解や治療に繋がることが期待される。よって本論文は博士 (薬科学) の学位請求論文として合格と認められる。