

## 論文の内容の要旨

論文題目 ユビキチンリガーゼ Hul5 による静止期のプロテアソームの局在制御機構の解明

氏 名 大東 宣貴

### 【序論】

プロテアソームは真核生物に保存されたタンパク質分解酵素複合体であり、ユビキチン化タンパク質の時空間選択的な分解を通じて、細胞周期を始めとした多様な生命現象を制御する。出芽酵母では、プロテアソームは炭素源であるグルコースが豊富に存在する増殖期には核に局在するが、長時間の培養によりグルコースが枯渇し静止期になると細胞質へ移行し、proteasome storage granule (PSG)とよばれるドット状の構造を形成する(図 1)。同様の現象は哺乳類細胞においてもみられ、当研究室では哺乳類培養細胞を血清不含培地で培養し静止期を誘導することで、プロテアソームが核から細胞質に局在変化することを見出している。このように、静止期におけるプロテアソームの核から細胞質への局在変化は真核生物において保存された現象であると考えられるが、そのメカニズムについては不明である。

プロテアソームはがんや神経変性疾患、自己免疫疾患など、様々な疾患に関与する。特に、プロテアソームの細胞内局在との関連としては、ヒト結腸癌細胞やヒト卵巣癌細胞といった固形癌由来の培養細胞において、グルコース飢餓や低酸素ストレス時にプロテアソームが強く核局在し、それが抗がん剤への耐性に寄与するという報告や、パーキンソン病患者の黒質ニューロンにおいては健康人よりもプロテアソームの核への蓄積がみられるという報告がなされている。したがって、プロテアソームの局在制御機構の解明は臨床上も重要な課題であると考えられる。

そこで本研究では、静止期を維持したままの培養が簡便であり、プロテアソーム局在についての研究が比較的進んでいる出芽酵母を用いて、静止期におけるプロテアソームの細胞質移行のメカニズムと生理的意義の解明を目指した。

### 【結果・考察】

#### 1. 静止期におけるプロテアソームの細胞質移行にはユビキチンリガーゼ Hul5 が必要である

私はプロテアソーム結合タンパク質として知られる Hul5 の機能解析を行う過程で、Hul5 が静止期のプロテアソームの細胞質移行に必要なことを発見した。Hul5 はユビキチンリガーゼ (E3)であり、ヒートショックによって生じた構造異常タンパク質をユビキチン化し分解に導くことが報告されている。Hul5 欠損株において、プロテアソームは静止期に細胞質に移行せず、核に蓄積したままであった(図 2 左)。また、野生型 Hul5 の発現により Hul5 欠損株におけるプロテアソームの核への蓄積が解消された一方で(図 2 中

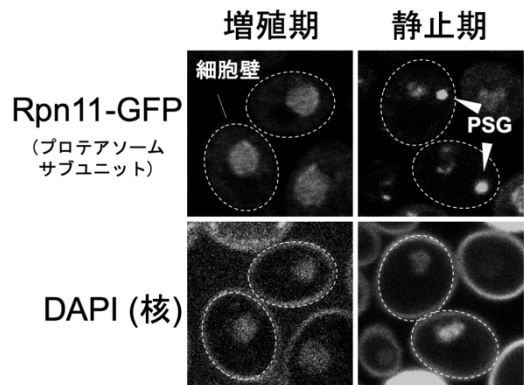


図1. プロテアソームは静止期に核から細胞質へ移行する

央)、E3 活性に必須なシステインに変異を導入した活性喪失型 Hul5 (C878A)の発現は、それを解消させなかった (図 2 右)。以上から、プロテアソームの細胞質移行には、Hul5 のユビキチン化活性が必要であることが示された。

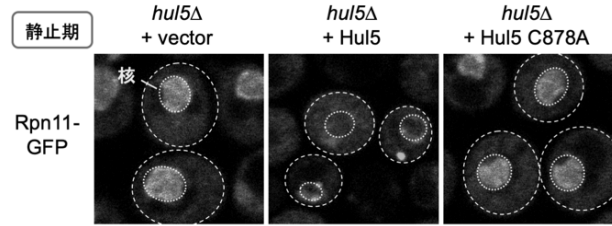


図2. プロテアソームの細胞質移行には Hul5のユビキチン化活性が必要である

## 2. Hul5 は Sts1 を介して静止期にプロテアソームを細胞質に局在させる

Hul5 によるユビキチン化のターゲットとして、プロテアソームの局在制御への関与が既に報告されている Sts1 に着目し、Sts1 が Hul5 によって機能制御される可能性を検証した。Sts1 は増殖期にはプロテアソームとインポーチンを橋渡しするように結合し、プロテアソームの核内輸送を促進することが知られている。Hul5 欠損株における静止期のプロテアソームの核への蓄積は、Sts1 を不安定化しタンパク質発現量を減らす変異

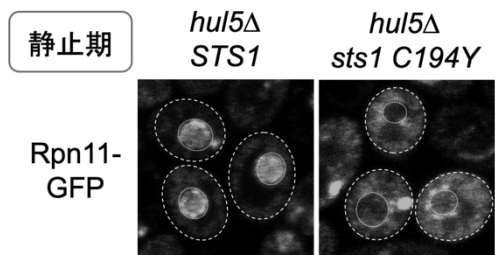


図3. Hul5欠損による静止期のプロテアソームの核への蓄積は、Sts1の不安定化によって解消する

C194Y の導入により解消した(図 3)。このことから、Hul5 欠損株におけるプロテアソームの核への蓄積は、Sts1 の機能に依存しており、Hul5 欠損株では静止期に Sts1 が蓄積している可能性や、静止期では停止すべき Sts1 のプロテアソーム輸送能が維持されたままになっている可能性が考えられた。

## 3. Hul5 は静止期に Sts1 を液胞に局在させる

Hul5 が Sts1 の機能を制御する方策として、量的制御以外に細胞内局在にも着目した。Sts1 は増殖期には核に局在したが(図 4A 左)、静止期には Hul5 依存的に細胞質で粒状の構造体を形成した(図 4A 右)。この Sts1 の粒状構造体は液胞膜のマーカである Vph1 と共局在を示したことから(図 4B)、Sts1 は静止期に液胞に局在することが示された。以上から、静止期において Hul5 は Sts1 を細胞質の液胞へ局在化させることによって、プロテアソームの核内輸送を抑制することが示唆された。

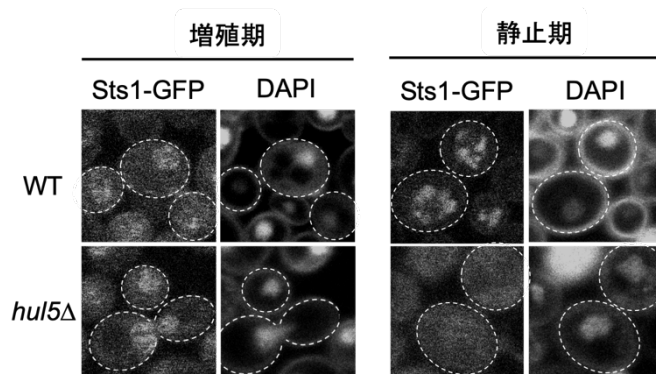


図4A. Sts1は静止期にHul5依存的に粒状構造体を形成する

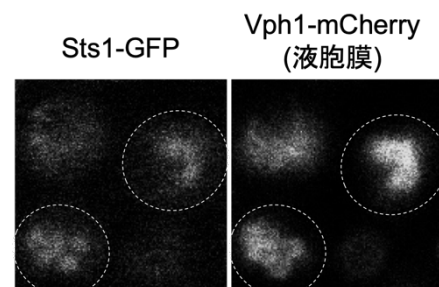


図4B. Sts1は静止期に液胞に局在する

#### 4. 静止期にプロテアソームが核に留まるとアミノ酸アナログ感受性となる

静止期にプロテアソームが細胞質移行する生理的意義を探るため、タンパク質合成の際に新生鎖に取り込まれ、その構造異常を起こすプロリンアナログであるアゼチジン-2-カルボン酸(AZC)に対する感受性を評価した。Sts1 の過剰発現により静止期にプロテアソームを核に蓄積させた細胞に対して AZC を処理したのち、完全栄養培地に播種したところ、静止期からの再増殖の遅延が認められた(図 5A 最下段)。Sts1 の過剰発現株では、静止期に AZC を処理することにより、細胞質におけるユビキチン化タンパク質の凝集体の蓄積や(図 5B 左 2 列)、ミトコンドリア膜電位の消失がみられた(図 5B 右列)。以上から、静止期におけるプロテアソームの細胞質局在は、細胞質でユビキチン化タンパク質の蓄積を抑制したり、ミトコンドリア膜電位を維持したりすることで、栄養再添加時の再増殖に必要な細胞内環境を整えるために重要であることが示唆された。

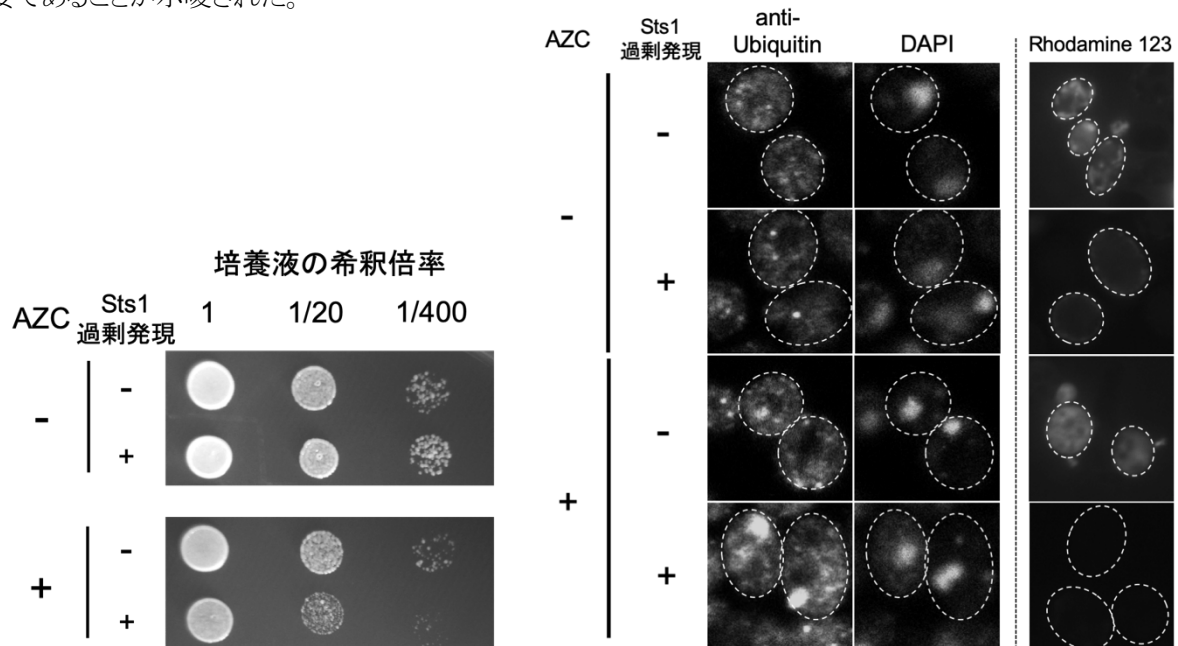


図5A. Sts1過剰発現株では、AZC処理によって静止期からの再増殖が遅延する

静止期においた細胞に対してAZC処理を4日間行い、その後培養液を希釈し、完全栄養培地にスポットした。

図5B. Sts1の過剰発現株では、静止期にAZC処理によってユビキチン化タンパク質の凝集体の蓄積や、ミトコンドリア膜電位の消失がみられる

Rhodamine 123: 膜電位依存的にミトコンドリアを染色する蛍光色素

#### 【総括】

本研究の結果、増殖期にはプロテアソームと結合し、プロテアソームを核内に輸送する Sts1 を静止期には Hul5 がユビキチン化を介して液胞へ局在化させ、不活性化することでプロテアソームを細胞質に蓄積させるというモデルが考えられた。また静止期にプロテアソームが細胞質に存在することで栄養増殖への再エントリーがスムーズに開始できることがわかった。今後は Hul5 によってユビキチン化されるターゲットの同定や、Hul5 による Sts1 の液胞への局在化のメカニズムについて検討していきたい。