

審査の結果の要旨

氏名 大東 宣貴

本論文は、真核生物において必須の生命現象を制御するタンパク質分解酵素複合体であるプロテアソームが、増殖期から静止期への移行に伴って核から細胞質へと局在変化するメカニズムの解明を目的とし、ユビキチンリガーゼである Hul5 がプロテアソームの核内輸送因子である Sts1 の局在制御を介してプロテアソームの局在を制御する機構の解明に至ったものである。

プロテアソームは真核生物に広く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分解を通じて細胞周期や転写制御、免疫応答など、生体に必須の多様な生命現象を制御する。プロテアソームの細胞内局在は、増殖期と静止期で異なることが知られている。静止期とは、栄養飢餓によって誘導される可逆的な増殖停止状態のことを指し、G₀期とも呼ばれる。メラノーマや白血病細胞など、増殖状態にある細胞ではプロテアソームは核に局在する一方で、静止期にあるラット個体中の神経細胞においてプロテアソームが細胞質に局在することが報告されている。このようにプロテアソームは細胞の増殖状態に応じた局在制御を受けると考えられる。また、固形癌由来培養細胞におけるプロテアソームの核局在は抗がん剤耐性に寄与することや、パーキンソン病患者のニューロンにおいてプロテアソームの強い核局在が見られることが報告されており、プロテアソームの局在異常と疾患との関連が示唆されている。

プロテアソームの局在研究はこれまでに発芽酵母において盛んに行われてきた。発芽酵母では、長時間の培養によって培地中のグルコースが枯渇すると細胞は増殖を停止し静止期に移行する。発芽酵母においても、哺乳類細胞同様、プロテアソームは増殖期には核に局在し、グルコースの枯渇した静止期には細胞質へと移行し、**proteasome storage granule (PSG)**とよばれるドット状の構造体を形成する。増殖期におけるプロテアソームの核局在は、Sts1 によって担われており、Sts1 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するアダプターとして機能することでプロテアソームの核内輸送を促進することが知られる。しかしながら、静止期における Sts1 の機能は不明であった。また、これまでの研究により、静止期においてプロテアソームの局在制御因子がいくつか同定されている。例えば、静止期におけるプロテアソームの細胞質移行に必要な因子として N-アセチル化酵素複合体が、PSG の形成に必要な因子としてユビキチンやキナーゼなどを含む複数のタンパク質が同定されている。しかしながら、先行研究で同定されたこれらの因子が静止期におけるプロテアソームの細胞質移行を制御するメカニズムや、プロテアソームが細胞質に移行する生理的意義はよくわかっていなかった。

本研究では、発芽酵母において、ユビキチンリガーゼ (E3)である Hul5 が静止期におけるプロテアソームの細胞質移行に必要であることを見出した。Hul5 はヒートショック時に変性したタンパク質をユビキチン化し分解に導くことの知られる E3 である。Hul5 欠損株では、プロテアソームは静止期においても核に蓄積したままであったことから、Hul5 が静止期におけるプロテアソームの細胞質移行に必要であることがわかった。続いて、Hul5 の E3 活性がプロテアソームの細胞質移行に必要であるかどうか検証するため、ユビキチン化活性喪失変異体 C878A を作製した。Hul5 欠損株に対し、野生型 Hul5 を発現させた株では Hul5 欠損株で見られたプロテアソームの局在異常が回復したのに対して、活性喪失型 Hul5C878A を発現させた株においてはこのような回復は認められなかった。このことから、静止期におけるプロテアソームの細胞質移行には、Hul5 の E3 活性が必要であることが示された。

Hul5 によるユビキチン化がプロテアソームの細胞質移行を起こすメカニズムとして、「Sts1 に

よるプロテアソームの核内輸送が静止期になると Hul5 によるユビキチン化を介して停止する」という可能性を検討した。Hul5 欠損株に対して、Sts1 の安定性を低下させタンパク質発現量を減らすことの知られている変異 C194Y を導入したところ、Hul5 欠損株で見られた静止期におけるプロテアソームの核への蓄積が解消された。このことから、Hul5 欠損株では静止期に Sts1 によるプロテアソームの核内輸送が維持されたままになっているためにプロテアソームが核に蓄積すると考えられ、Hul5 は静止期に Sts1 によるプロテアソームの核内輸送を停止させるように機能することが示唆された。

Hul5 がどのようにして Sts1 の機能を制御するのかについて考慮する上で、Sts1 の細胞内局在に着目した。野生型株において、Sts1 は増殖期には核に局在したが、静止期には細胞質で粒状の構造体を形成した。Hul5 欠損株においては、増殖期には Sts1 は核に局在したが、静止期には Sts1 の粒状構造体の形成は見られなかった。さらに、静止期における Sts1 の粒状構造体形成は Hul5 の活性喪失変異体 C878A では見られなかった。これらの結果から、Sts1 は静止期に Hul5 によるユビキチン化を介して粒状構造体を形成することが明らかとなった。この Sts1 の粒状構造体は、液胞膜のマーカータンパク質である Vph1 と共局在を示したことから液胞であることが明らかとなった。以上から、Sts1 は静止期に Hul5 によるユビキチン化を介して液胞に局在することがわかった。

Sts1 の液胞への局在をより詳細に解析した結果、Sts1 は液胞膜に局在したり、液胞内腔に局在したりする様子が観察された。さらに、液胞内に存在する Sts1 は小胞様の形態をとることが見て取れた。これらの観察結果から、Sts1 は膜陥入によって液胞膜表面から内腔へ取り込まれることが示唆された。液胞プロテアーゼの欠損株 *pep4Δprb1Δ* では静止期に Sts1 の蓄積が見られたことから、液胞内に取り込まれた Sts1 はプロテアーゼによって分解されると考えられた。

続いてプロテアソームの細胞質移行の生理的意義を調べるため、Sts1 を過剰発現することで静止期にプロテアソームを核に蓄積させた株の表現型を解析した。ユビキチン抗体を用いた免疫染色法により、Sts1 の過剰発現では静止期にユビキチン化タンパク質の凝集体の蓄積が細胞質に見られたことから、プロテアソームの細胞質移行は細胞質におけるユビキチン化タンパク質の分解に必要であると考えられた。また、Sts1 過剰発現株では静止期において膜電位依存的にミトコンドリアを染色する Rhodamine 123 の染色が減弱していたことから、プロテアソームの細胞質移行はミトコンドリア膜電位の維持にも重要であることが示唆された。さらに、静止期からの再増殖能を評価するアッセイを行なった結果、Sts1 過剰発現株はタンパク質毒性ストレス条件下で静止期から増殖期への復帰の遅延を示したことから、プロテアソームの細胞質局在は静止期において再増殖能の維持に寄与することが示唆された。

以上の結果から、大東宣貴は以下の成果を示した。ユビキチンリガーゼ Hul5 がユビキチン化を介して静止期に Sts1 を液胞に局在させることを示した。この結果から、従来不明であった静止期におけるプロテアソームの細胞質移行の機構に関して、「Hul5 が静止期にユビキチン化を介して Sts1 を液胞内へと局在化させ、細胞質から隔離することでプロテアソームの核内輸送を抑制し、プロテアソームを細胞質に局在させる」という機構を提唱するに至った。また、静止期におけるプロテアソームの細胞質移行は、凝集タンパク質の除去やミトコンドリアの品質管理、タンパク質毒性ストレス条件下での再増殖能の維持に重要であることを示唆する結果を得た。本研究は新たなプロテアソームの局在制御機構の一端を解明したものであり、プロテアソーム局在が関係する疾患の病態の理解に貢献す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。