審 査 の 結 果 の 要 旨

氏 名 本杉 良

本論文は、真核生物において必須のタンパク質分解酵素複合体であるプロテアソームの基礎的発現制御機構の解明を目指したものである。ゲノムワイド siRNA スクリーニングによりプロテアソームの基礎的発現量制御に寄与する因子を網羅的に探索した結果、機能未知の核タンパク質 strawberry notch homolog 1 (SBNO1)がプロテアソーム遺伝子発現とプロテアソーム活性の維持の寄与にはたらく新規因子として同定するに至った。

プロテアソームは 33 種類のサブユニットから構成される巨大なタンパク質分解複合体であり、基質となるユビキチン化タンパク質の分解を介して、細胞周期、免疫応答、細胞情報伝達、タンパク質品質管理機構など多様な生命現象に関与している。プロテアソームはプロテアーゼ活性を持ったサブユニットを含み、基質の分解を担う core particle（CP）と、ユビキチン化基質の捕捉、脱ユビキチン化、そして基質の解きほぐしを行う regulatory particle（RP）に大別され、それぞれユニークな機能を持ったサブユニットが協調的に発現し、組み立てられることで初めて機能的なタンパク質分解機構としての役割を果たす。それゆえにプロテアソームの発現機構は緻密で画一的な制御を受けていることが予想されており、この機構が破綻した場合、プロテアソーム活性異常が引き起こされ、がんや神経変性疾患などの重篤かつ広範な疾患を誘起することが考えられる。したがって、細胞内のプロテアソーム活性が低下した際には、転写因子 NF-E2-related factor 1 (Nrf1)が活性化して 33 種類のプロテアソームサブユニットの発現を促進することで、代償的にプロテアソーム活性上昇を誘導することが知られている。このプロテアソームの代償発現機構は哺乳類だけでなくハエや線虫といった広範な生命に共通しており、プロテアソームの活性維持が生命における根幹的かつ極めて重要な現象であると理解されている。ところが、平常時におけるプロテアソーム発現機構、すなわち基礎的発現機構に関しては、具体的な分子や機構はこれまで十分に明らかとされていなかった。

本研究では、プロテアソームの基礎的発現制御因子を網羅的に同定するため、プロテアソーム遺伝子領域にルシフェラーゼ遺伝子をノックインし、ルシフェラーゼ活性を指標としたゲノムワイド siRNA スクリーニングを実施した。ノックインの標的遺伝子として RP サブユニットでユビキチン化基質の認識を担う Rpn13、CP の組み立てに必須なシャペロン Ump1、基質の解きほぐしを行う RP サブユニットの Rpt1 の 3 つを選定し個別にスクリーニングを行い、各スクリーニングで共通して取得された 57 遺伝子をプロテアソーム基礎的発現制御因子として同定した。続いて蛍光タンパク質 ZsGreen-mODC の蓄積、プロテアソーム阻害剤処理時における細胞死の増加、Tau タンパク質の凝集形成それぞれを指標とした 3 つの個別の siRNA スクリーニングにおいて取得されたプロテアソーム活性制御因子と、上記の通り同定した 57 個のプロテアソーム発現制御因子で共通していた遺伝子として ras-related nuclear protein (RAN)、small nuclear ribonucleoprotein D3 (SNRPD3)、SBNO1 の 3 つが同定された。RAN は核膜孔を介したタンパク質や RNA の輸送を制御し、SNRPD3 はスプライソソームとして pre-mRNA のスプライシングにはたらいていることから、これら 3 遺伝子が一般的な遺伝子発現に寄与しているのか、プロテアソーム遺伝子限定的なのか判別するために、これら 3 遺伝子のノックダウンによる新生タンパク質合成量を比較したところ、SBNO1 のみが遺伝子発現全般に寄与しないことが確認されたことから、SBNO1 はプロテアソーム遺伝子など特定の遺伝子発現に関与していることが示された。

SBNO1 の機能の詳細を解明するために、まず SBNO1 ノックダウンが実際にプロテアソーム活性に影響するか調べたところ、20S CP 活性及び 26S プロテアソーム活性の双方が低下していたことから、実際に SBNO1 はプロテアソーム活性維持に必要な新規のプロテアソーム活性制御因子であることが示された。

次に定量 PCR 法により SBNO1 のノックダウンによりプロテアソーム遺伝子 α2 や Rpn1 などの発現量が減少したことを示した。続いてウェスタンブロット法で SBNO1 ノックダウンによりプロテアソーム遺伝子 α6 や β3 などのタンパク質量が減少したことを示した。その一方で、SBNO1 ノックダウンがオートファジー関連因子 Microtubule Associated Protein 1 Light Chain 3 Beta (MAP1LC3B) や酸化還元酵素 NAD(P)H Quinone Dehydrogenase 1 (NQO1) 、ヘム酸化酵素 Heme Oxygenase 1 (HMOX1) などのプロテアソーム系以外の遺伝子発現量を変化させなかったことから、SBNO1 がプロテアソーム遺伝子群を含む特定の遺伝子群特異的に発現を制御していることが示された。その一方で SBNO1 を過剰発現させてもプロテアソーム遺伝子 β5 の発現量は変化しなかったことから、SBNO1 はプロテアソーム遺伝子の発現維持に必須であるものの、単独で過剰に発現を誘導する機能はないことを明らかとした。

続いて、SBNO1 が遺伝子発現に与える影響を網羅的に解析すべく、SBNO1 ノックダウン細胞の RNA-seq 解析を実施した。その結果、SBNO1 ノックダウンにより発現量が減少した遺伝子群には、リボソームやプロテアソームが含まれており、SBNO1 が実際にプロテアソーム遺伝子群を含む特定の遺伝子発現を制御していることが明らかとなった。

ルシフェラーゼスクリーニングにより同定された 57 個のプロテアソーム発現制御因子には、リボソーム遺伝子が最も多く含まれていたこと、そして SBNO1 ノックダウンによりリボソーム遺伝子の多くが発現低下したことから、プロテアソーム遺伝子とリボソーム遺伝子の発現が協調的に制御されていること、そして SBNO1 がその協調的制御を担う転写制御因子である可能性が提示された。

また、SBNO1 の ChIP-qPCR 法による解析から SBNO1 がプロテアソーム遺伝子のプロモーター近辺に結合することを示した。先行研究によるタンパク質の網羅的相互作用解析から、SBNO1 がメディエーター複合体サブユニットである CDK8 との結合が示唆されていることから、SBNO1 はメディエーター複合体と相互作用して機能するか、CDK8 を含んだメディエーターリン酸化サブユニットによりリン酸化を受けて機能を発揮する可能性が示唆された。

以上の結果から、本杉良は以下の成果を示した。まず、プロテアソーム遺伝子にルシフェラーゼをノックインした細胞を作製し、ルシフェラーゼ発光量を指標としたプロテアソームの基礎的発現量を定量するスクリーニング系を構築した。このスクリーニングにより 57 個のプロテアソーム発現制御因子を新規に同定した。また、機能未知の核タンパク質 SBNO1 が新規プロテアソーム活性制御因子であることを示した上で、さらにプロテアソームサブユニットの発現維持に寄与することを明らかとし、その発現制御機構がメディエーター複合体及びそれによるリン酸化制御によるものである可能性を強く示唆した。そして、リボソーム遺伝子とプロテアソーム遺伝子の協調的発現の可能性を示し、SBNO1 がその発現制御機構を担う因子である可能性を示唆した。本研究は、これまで未知であったプロテアソームの基礎的発現機構に関わる因子を同定しただけでなく、プロテアソームとリボソームという細胞恒常性を担う 2 つの主要機関の協調的発現制御という全く新しい概念を提示したと言える。また、プロテアソームの発現上昇は多発性骨髄腫治療薬として用いられるプロテアソーム阻害剤への耐性機構の一因と考えられており、SBNO1 はプロテアソーム阻害剤耐性を克服する新たな創薬標的としても期待される。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。