博士論文（要約）

論文題目　　プロテアソームの基礎的発現制御機構の解明

氏　名　　本杉　良

【序論】

プロテアソームは真核生物の主要な細胞内タンパク質分解酵素であり、主としてユビキチン化タンパク質を分解することで様々な生命活動を制御している。26S プロテアソームは計 33 種類のサブユニットが協調して転写・生合成された後、アセンブリシャペロンの助けを借り秩序正しく分子集合することで初めて機能する。近年の研究により、がん、神経変性疾患、代謝異常、幹細胞維持、老化などのヒトの多様な疾患や生理作用におけるプロテアソームの発現量変動や活性異常の関与が明らかになってきた。例えば、悪性腫瘍（がん）組織ではプロテアソームの高発現が認められ（図 1）、タンパク質の代謝回転を速めることで腫瘍細胞の生存性を高めると考えられている。

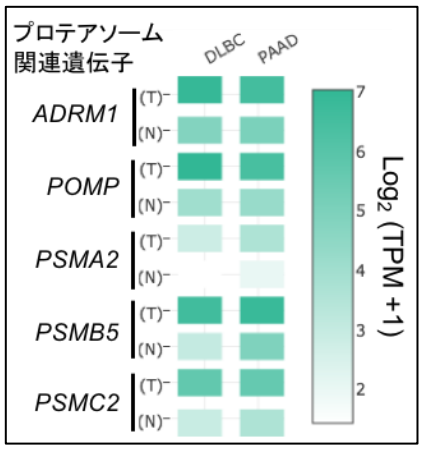

図 1 プロテアソーム関連遺伝子は腫瘍細胞で高発現する
DLBC（びまん性大細胞性 B 細胞リンパ腫）、PAAD（膵臓腺がん）患者における (T):腫瘍組織、(N):正常組織の各遺伝子の発現量。TPM: transcripts per million。データは GEPIA (Z. Tang, *et al.*, *Nucleic Acids. Res.* 2017; http://gepia.cancer-pku.cn/index.html) より改変。

出芽酵母ではプロテアソームサブユニットの一括した転写制御に平常時、ストレス応答時ともに転写因子 Rpn4 が担うことが分かっている。一方で哺乳類細胞では転写因子 Nrf1 がプロテアソーム阻害時にプロテアソームの発現を代償的に亢進することが知られるが、平常時におけるプロテアソームの基礎的発現制御機構は解明されていない。そこで本研究では、生命現象の根幹の理解と広範な疾患の治療アプローチの創出に直結する重要な課題であるプロテアソームの基礎的発現を制御する具体的な分子機構の解明を試みた。

【方法・結果】

1. <u>ゲノムワイド siRNA スクリーニングによるプロテアソーム基礎的発現制御因子の同定</u>

プロテアソームの発現制御因子を探索するため、プロテアソーム遺伝子のルシフェラーゼレポーター細胞によるゲノムワイド siRNA スクリーニングを行った。Nrf1 による代償的発現亢進を抑制するため Nrf1 活性化因子 DDI2 ノックアウトした HCT116 細胞を作製した、その細胞に対して、内部標準用に EF1 プロモーター誘導性ホタルルシフェラーゼ (Fluc)を導入するとともに、プロテアソームサブユニットをコードする *ADRM1*（Rpn13）、*POMP*（Ump1）、*PSMC2*（Rpt1）の遺伝子座に NanoLuc (Nluc) をノックインした 3 種類のレポーター細胞を作製した。Rpn13、Ump1、Rpt1 の各モニター細胞において、ノックダウンにより Nluc/Fluc 発光量比が 15%以上減少した遺伝子を選抜した。続いて、EF1 プロモーター誘導性 Nluc 発現細胞によるカウンタースクリーニングを行い、Nluc/Fluc 発光量比を減少させた遺伝子を非特異的因子として除外した。その結果、Rpn13、Ump1、Rpt1 の 3 種類の細胞のうち少なくとも 2 種類以上でヒットとなった遺伝子として 720 遺伝子を得た（図 2）。二次スクリーニングではオフターゲット効果を低減させた siRNA を用いて同様にアッセイを行い、3 種類の細胞のうち少なくとも 2 種類以上でヒットとなった遺

伝子として 113 遺伝子を得た。三次スクリーニングでは 1 遺伝子あたり 4 本の siRNA を個別にアッセイし、3 種類の細胞のうち少なくとも 2 種類以上の細胞において siRNA4 本中 2 本以上で効果があった遺伝子として 57 遺伝子を同定した。

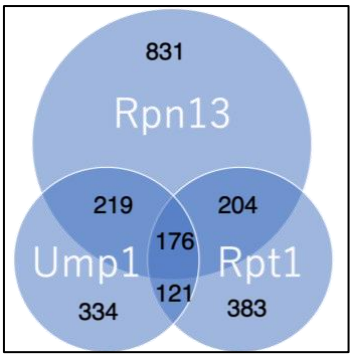

図 2 siRNA スクリーニングにより 720 遺伝子を選抜した
ベン図内の数字は一次スクリーニングの各細胞において同定された遺伝子数。Rpn13、Ump1、Rpt1 のうち少なくとも 2 細胞以上で同定された 720 遺伝子を選抜した。

2. Strawberry notch homolog 1 (SBNO1) は新規のプロテアソーム機能制御因子である

ルシフェラーゼアッセイを用いたスクリーニングにより同定した遺伝子から、実際にプロテアソーム機能に影響を与える遺伝子を絞り込むため、これまで当研究室で実施された 3 つのプロテアソーム活性制御因子探索のための siRNA スクリーニングの結果を参照した。1 つ目はプロテアソーム分解基質である ZsGreen-mODC 分解を、2 つ目はプロテアソーム阻害剤処理時の細胞生存率を、3 つ目は変異 Tau タンパク質の蓄積を指標としたスクリーニングである。その結果、今回のスクリーニングを含めて全てのスクリーニングで共通するヒットとして、ras-related nuclear protein (RAN)、small nuclear ribonucleoprotein D3 polypeptide (SNRPD3)、strawberry notch homolog 1 (SBNO1)の 3 遺伝子が同定された（図 3）。

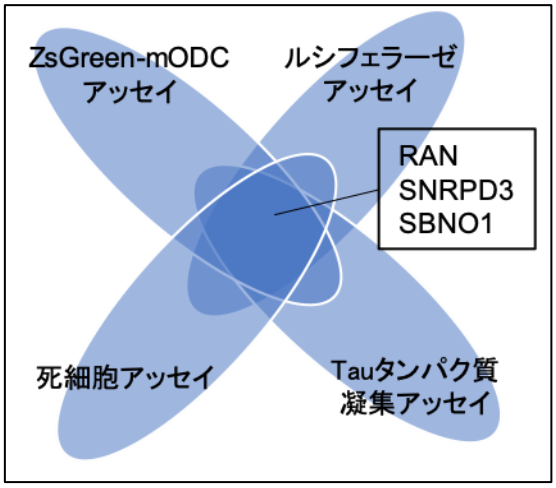

図 3 RAN、SNRPD3、SBNO1 は 4 種類の siRNA スクリーニングで共通して同定されたプロテアソーム活性制御因子である

RAN は GTP 結合タンパク質であり、RNA やタンパク質の核膜孔を介した核細胞質間輸送に必須であることが知られ、SNRPD3 はスプライソソームの基本的構成因子として pre-mRNA のスプライシングに機能していることが知られている。一方で、SBNO1 はマウスやゼブラフィッシュの正常な発生に必要であることが知られている以外に、その詳細な分子機能は知られていない。RAN、SNRPD3、SBNO1 の 3 遺伝子がプロテアソームの発現を制御している可能性が示唆されたことから、その機能がプロテアソーム特異的か、遺伝子発現を広く制御しているのかを区別するため、Click-iT HPG システムを用いて新生タンパク質合成量を定量したところ、RAN、SNRPD3 のノックダウンで新生タンパク質合成量が大きく減少した一方で、SBNO1 ノックダウンでは新生タンパク質合成量は変化しなかった。したがって、RAN、SNRPD3 は細胞の遺伝子発現に広く関与し、SBNO1 はプロテアソーム遺伝子特異的な発現制御を介してプロテアソームの活性維持に寄与していることが示唆された。

3. SBNO1 はプロテアソーム遺伝子発現に寄与する

SBNO1 は AAA ATPase ドメインと helicase ドメインを持つ核タンパク質と推測されているが、その実際の分子機能は不明である。SBNO1 とドメイン構造を共有する SBNO2 は NF-κB による転写を阻害す

る転写共役因子であることが示唆されている（K. C. El Kasmi et al., 2007）ことから、SBNO1 もプロテアソーム遺伝子の転写に寄与することが考えられた。SBNO1 ノックダウンにおけるプロテアソーム遺伝子発現量を qPCR 法により定量したところ、20S core particle （CP）、及び 19S regulatory particle （RP）サブユニットの mRNA 発現量が減少していた（図 4A）。一方で LC3B や NQO1 などプロテアソーム以外の遺伝子の発現量を調べたところ、多くの遺伝子で SBNO1 ノックダウンによる発現量低下が確認できなかった（図 4B）。このことから、SBNO1 がプロテアソーム遺伝子群の転写を特異的に制御している可能性が示唆された。また、プロテアソームサブユニットの発現量低下はウェスタンブロットにおいても確認された。プロテアソームの活性を測定すると、SBNO1 ノックダウンにより 20S core particle、26S プロテアソームの双方の活性の低下が確認された。これらのことから、SBNO1 はプロテアソーム活性維持のためにプロテアソーム遺伝子群の転写を選択的に亢進していることが示唆された。

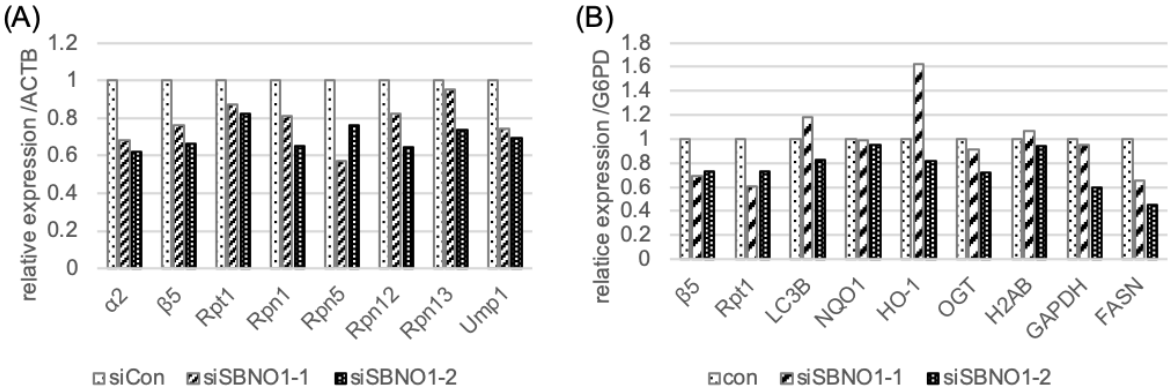

図 4 SBNO1 ノックダウンによってプロテアソームサブユニットの発現量が特異的に減少した。 (A) α2、β5：CP サブユニット；Rpt1、Rpn1、Rpn5、Rpn12、Rpn13：RP サブユニット；Ump1：CP 形成シャペロン。（B） β5、Rpt1：プロテアソームサブユニット；LC3B：オートファジー関連因子；NQO1：NHDH 加水分解酵素；HO-1：酸化ストレス関連因子；OGT：O-GlcNAc 転移酵素；H2AB：ヒストン；GAPDH：解糖系因子；FASN：脂質合成因子

【まとめ・考察】

本研究ではプロテアソームの基礎的発現制御因子を同定するべく、プロテアソーム遺伝子（Rpn13、Ump1、Rpt1）にルシフェラーゼをノックインしたプロテアソーム発現量評価系を構築し、ゲノムワイド siRNA スクリーニングを実施した。その結果 57 個のプロテアソーム発現制御候補因子を同定した。さらに 3 つのプロテアソーム機能を評価した siRNA スクリーニングの結果から共通して同定された因子として RAN、SNRPD3、SBNO1 が得られた。SBNO1 はノックダウンによってプロテアソーム遺伝子の発現量が特異的に減少しプロテアソーム活性も低下したことから、SBNO1 はプロテアソームの発現制御を介してプロテアソーム活性の維持に寄与していることが示唆された。SBNO1 は DNA 結合ドメインを持たないことから、他の転写因子と共役して転写促進にはたらくと考えられる。ATPase ドメインやヘリカーゼドメインの役割など SBNO1 の転写促進機構の詳細な分子機構の解明にはさらなる研究が必要である。