

## 論文の内容の要旨

論文題目 アクチンによる 20S プロテアソームと 26S プロテアソームの量的制御機構の解析

氏名 池浦 隆真

### 【序論】

プロテアソームは真核生物に広く保存された巨大なタンパク質分解酵素複合体であり、タンパク質分解活性を持つ 20S core particle (CP) と、その調節因子である 19S regulatory particle (RP) によって構成されている。26S プロテアソームは、CP の両端または片側に RP が会合したものを指し、RP によりポリユビキチン化されたタンパク質を選択的に捕捉し、これを CP により分解することで生体に必須な役割を果たしている。一方、細胞内には RP が会合していない CP 単独の複合体も存在し、これを 20S プロテアソームと呼ぶが、その生理的基質や存在意義は不明である。プロテアソームの機能制御に関わる新規遺伝子の取得を目指し、出芽酵母を用いた遺伝学的スクリーニングを実施したところ、細胞骨格形成因子であるアクチンの変異が、26S プロテアソームと 20S プロテアソームの量的制御に異常をもたらすことを見出した。本研究では、アクチン変異が 26S プロテアソーム (以下 26S) と 20S プロテアソーム (以下 20S) との量的制御に異常をもたらすメカニズムの探索を通して、プロテアソームの新たな制御機構の解明を目指した。

### 【方法・結果】

#### 1. アクチン変異体では、26S が減少し、20S が増加する

アクチン温度感受性変異株 *act1-119* を制限温度で 3 時間培養した後、細胞抽出液をグリセロール密度勾配遠心によって分画し、そのプロテアソーム活性を測定して野生型株と比較した。その結果、アクチン変異体においては、野生型株に比べて 26S の活性が減少し、20S の活性が増加していることが確認された (図 1)。

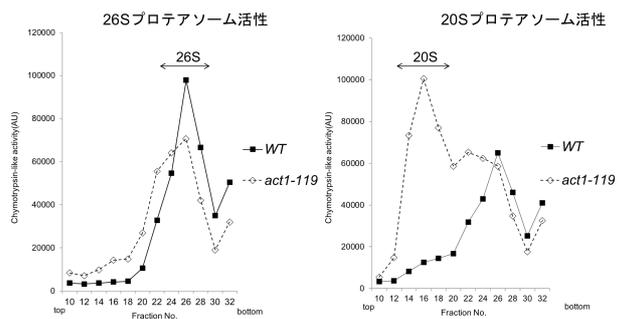


図1. アクチン変異体*act1-119*では、26Sプロテアソームが減少し、20Sプロテアソームが著増している野生型株 (WT) 及びアクチン変異体*act1-119*をYPADで27°Cで対数増殖期まで培養し、遠心して培地を除いた後、YPADで再懸濁し、37°Cで培養した。その後細胞を回収し、細胞破砕液を調整して細胞破砕液を調整し、8-32%のグリセロール密度勾配遠心によって分離した。分離したフラクションのうち、10から32までの偶数フラクションのキモトリプシン様ペプチダーゼ活性を測定した。

#### 2. アクチン変異体における 26S と 20S の量比の異常は、培養液中のグルコース濃度を高めることで解消される

出芽酵母においては、栄養が豊富に存在する対数増殖期では 26S が優位であるが、栄養枯渇により増殖が停止した静止期には 26S が減少し、20S が増加することが報告されていた。そこで、

アクチン変異による 26S と 20S との量比異常に、このような増殖相の相違をもたらす栄養条件が関連するか調べた。出芽酵母の増殖を制御する栄養因子には、窒素源 (アミノ酸) と炭素源 (グルコース) の量が挙げられる。そこで、培養液中の窒素源や炭素源の濃度を高めることで、アクチン変異体における 26S と 20S との量比変化が解消されるかどうか検証した。一般的な増殖培地である YPAD (2% グルコース) に対して、アミノ酸を過剰に添加してもアクチン変異体における 26S/20S 量比は変化しなかったが、炭素源としてグルコースを終濃度 12% 添加すると、26S 活性が野生型と同程度まで回復し、20S の活性も大きく減少することが判明した (図 2)。一方、アクチン変異体におけるアクチン細胞骨格の異常は、グルコース添加では解消されなかった。これらの結果から、アクチン変異体における 26S と 20S との量比異常の原因は、細胞内のグルコース枯渇であると推測され、CP と RP の解離・会合による 26S と 20S の形成は、グルコース濃度に応じて制御されていることが示唆された。

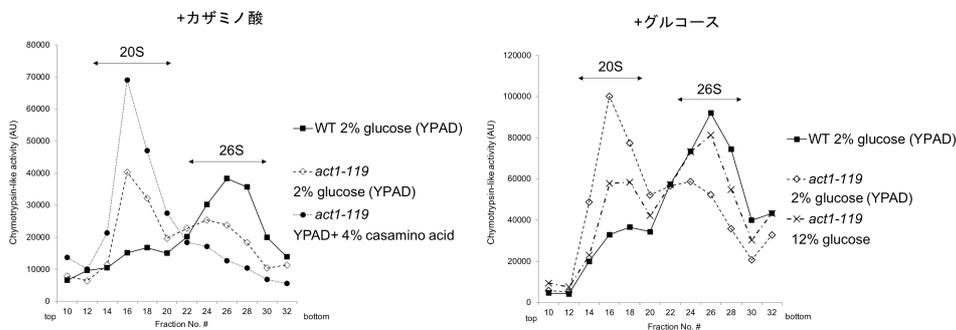


図2. アクチン変異体におけるプロテアソーム活性の異常は、培養液中のグルコース濃度を高めることで解消される野生型株 (WT) 及びアクチン変異体 *act1-119* を YPAD で 27 °C で対数増殖期まで培養し、遠心して培地を除いた後、*act1-119* をアミノ酸混合粉末終濃度 4% (w/v) になるように加えた培地 (YPAD+4% casamino acid)、ないしはグルコースを終濃度 12% (w/v) になるように加えた培地 (12% glucose) で再懸濁し、37 °C で培養した。その後細胞を回収し、細胞破砕液を調製して細胞破砕液を調整し、8 -32% のグリセロール密度勾配遠心によって分離した。分離したフラクションのうち、10 から 32 までの偶数フラクションのキモトリプシン様ペプチダーゼ活性を測定した。

### 3. 解糖系の障害は 26S と 20S の量比異常をもたらす

グルコースを代謝する主要な経路の一つに解糖系が挙げられることから、解糖系の障害によって、26S と 20S の量的制御に異常が引き起こされるか検証した。解糖系の障害剤である 2-deoxy-D-glucose (2-DG) を終濃度 0.2% になるように YPAD 培地に加えて野生型株を培養し、細胞抽出液におけるプロテアソーム活性を、native-PAGE 後にゲル内活性染色を行うことで調べた。その結果、2-DG 処理によって 26S 活性が減少し、20S の活性が増加した (図 3)。このことは、解糖系等のグルコース代謝経路が、26S と 20S との量的制御を担う機構の一つである可能性を示唆している。

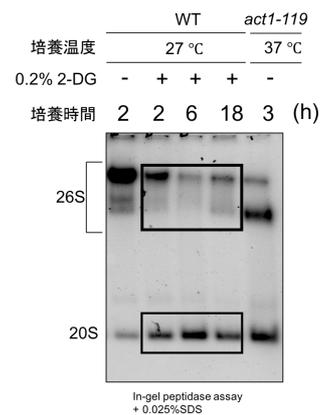


図3. 解糖系障害剤処理は、26S を減少させ、20S を増加させる野生型株 (WT) 及びアクチン変異体 *act1-119* を YPAD で対数増殖期まで 27 °C で培養した後、*act1-119* は 37 °C で 3 時間培養し、細胞を回収した。野生型株については、YPAD に終濃度 0.2% (w/v) になるように 2-DG を加え、記載した時間 27 °C で培養して回収した。各々の細胞破砕液を調製し、native-PAGE 後にゲル内での活性染色を行い、キモトリプシン様ペプチダーゼ活性 (Suc-LLVY-MCA hydrolyzing activity) を測定した。

#### 4. Nアセチル化酵素 B の変異は 26S プロテアソームを減少させ 20S プロテアソームを増加させる

次に、解糖系の下流で 26S/20S 比の制御を担う具体的な分子機構を探索した。野生型とアクチン変異体との間にタンパク質レベルで大きな組成の変化が見られなかったことから、そのような分子機構として、プロテアソームへの翻訳後修飾が関与する可能性を考えた。ここで着目したのは、Nアセチル化修飾である。Nアセチル化は、解糖系下流で産生される細胞内のアセチル CoA の多寡に比例してその反応が変動することが報告されており、認識する N 末端アミノ酸のコンセンサス配列の相違によって、出芽酵母には Nat A, Nat B, Nat C の三種類のサブタイプが存在する。その中でも Nat B はアクチン変異体との合成増殖遅延が報告されている他、グルコース飢餓時に細胞質に形成されるプロテアソームの顆粒構造 proteasome storage granule の形成にも必須であることが知られていたことから、最もアクチンの変異によるプロテアソーム量比の異常に関連が深いと推察された。

そこで Nat B の触媒サブユニット Nat 3 欠損株 (*nat3Δ*)、*act1-119* 株、及び野生型株を YPAD で対数増殖期まで増殖し、その後アクチン変異体の制限温度である 37 °C で 3 時間 YPAD にて培養して細胞を回収した。そしてこれらの細胞の細胞破碎液を調製し、native-PAGE 後にゲル内での活性染色を行うことでプロテアソーム活性を測定したところ、アクチン変異体同様、26S の減少と 20S の増加が見られた (図 4)。このことから、アクチン変異体での 26S/20S 比異常の原因は、アクチンの変異で細胞内のグルコースが枯渇し、Nat B の機能が減弱したことであると推測される。すなわち Nat B は、細胞内のグルコース濃度に応じて 26S と 20S の量的制御を担う分子であることが示唆された。

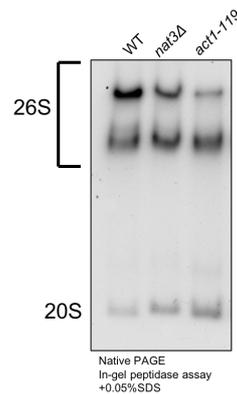


図4. Nat Bの変異は26Sを減少させ、20Sを増加させる野生型株(WT)、アクチン変異体 (*act1-119*)、Nat B変異体(*nat3Δ*)をYPAD培地で対数増殖期まで27°Cで培養した後、37°Cで3時間培養し、細胞を回収した。細胞破碎液を調製し、native-PAGE後にゲル内での活性染色を行い、キモトリプシン様ペプチダーゼ活性(Suc-LLVY-MCA hydrolyzing activity)を測定した。

#### 5. Nat B はプロテアソームサブユニット Rpt3 のアセチル化を通して RP の形成に寄与する

Nat B がプロテアソーム量比の制御に重要な分子であることが判明したため、次にその制御を担う Nat B の具体的な標的基質を探索した。Nat B がアセチル基を付加するのは N 末端が Met-Glu-で始まるタンパク質であるが、プロテアソームサブユニットの中でこのコンセンサス配列を持つものに、RP に属するサブユニット Rpt3 があった。そこで、Nat B による Rpt3 へのアセチル化が 26S プロテアソームと 20S プロテアソームの量比制御に重要なのかを検証した。先行研究において、Nat B のコンセンサス配列である Met-Glu-のグルタミン酸残基をプロリンに置換することに

よって、Nat B によるアセチル化を免れるとする報告があったため、点変異導入法によって Rpt3 の 2 番目のアミノ酸をプロリンに置換した変異体 (*rpt3 E2P*) を作製し、Nat3 欠損株 (*nat3Δ*)、*rpt3 E2P* 株、及び野生型株を YPAD で対数増殖期まで 3 時間培養して細胞を回収した。そしてこれらの細胞の細胞破碎液を調製し、native-PAGE 後にゲル内での活性染色を行うことでプロテアソーム活性を測定した。

その結果、*rpt3 M2P* 株において *nat3Δ* 株同様、26S の減少と 20S の増加が見られた(図 5A)。より詳細に表現型を理解するため、Nat B の変異体 (*nat3Δ, mdm20Δ*) の活性染色後のゲルを用い、RP のサブユニット Rpn10、Rpn11 に対する抗体を用いてウエスタンブロットに供したところ、26S のバンドの下に、RP の形成中間体に由来すると考えられるバンドが観察された (図 5B)。すなわち Nat B 変異体では Rpt3 への N アセチル化が不全に陥り、RP の形成が阻害された結果、相対的に 26S が減少し、20S が増加したものと考えられる。つまり Nat B は Rpt3 の N 末端アセチル化を通じ、RP の形成に寄与していることが示唆された。

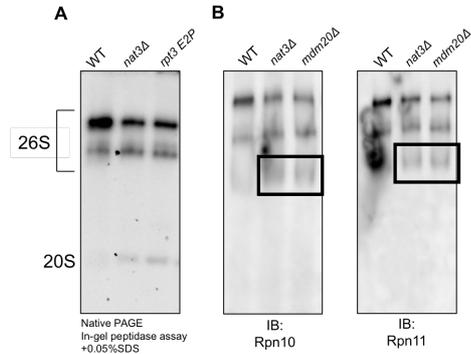


図5. Nアセチル化酵素BはRpt3のアセチル化を通してRPの形成に寄与する  
野生型株 (WT)、Nat B変異体(*nat3Δ, mdm20Δ*)、Rpt3のNアセチル化変異体 (*rpt3 E2P*)を YPAD培地で対数増殖期まで27°Cで3時間培養し、細胞を回収した。細胞破碎液を調製し、native-PAGE後にゲル内での活性染色を行い、キモトリプシン様ペプチダーゼ活性 (Suc-LLVY-MCA hydrolyzing activity) を測定した。Bについては、活性染色後のゲルを用いて、抗Rpn10抗体、及び抗Rpn11抗体によりウエスタンブロットを行った。

### 【まとめ・考察】

本研究では、アクチン変異体で26Sと20Sとの量比が異常になるメカニズムの解析を通して、26Sと20Sとの量比は細胞内のグルコース濃度に応じて制御されていることを示唆する結果を得た。さらにその分子機構の解析を通じ、Nアセチル化酵素複合体Nat BによってRpt3のN末端がアセチル化され、RPの形成が正しく進行することが、26Sと20Sの量比維持に重要であることを見出した。本研究は、グルコース環境に応じてRpt3のNアセチル化が変化し、26Sと20Sの形成が量的に制御されていることを示すもので、新規のプロテアソーム制御機構と考えられる。26S と 20S との量比が変化することには、グルコースの多寡に応じて生体の恒常性を維持するために何らかの意義があると推測されるが、その意味は依然明らかでない。今後は、本研究で得られた知見を更に展開し、グルコース代謝との関連から、26S と 20S の量的制御が担う生物学的意義を明確にしていきたい。