

審査の結果の要旨

氏名 王妍

本論文は、プロテアソームを制御する新規分子機構とその意義の解明を目的としたものである。siRNA ノックダウンスクリーニングおよび CRISPR/Cas9 ノックアウトアウトスクリーニングをヒト培養細胞でゲノムワイドに実施することにより、ジストニア原因遺伝子である転写因子 DYT6/THAP1 がプロテアソーム $\beta 5$ サブユニットの転写制御因子であることを見出し、THAP1 による $\beta 5$ の遺伝子発現が平常時におけるプロテアソーム活性の維持に必須であることを解明するに至った。

真核生物において広く保存された細胞内タンパク質分解機構であるユビキチン・プロテアソームシステムは細胞周期、DNA 修復、免疫応答、シグナル伝達など様々な生理機能に必須の役割を果たす。ユビキチン化タンパク質分解を実行する 26S プロテアソームは 33 種類のサブユニットからなり、ペプチダーゼ活性を持つ 20S core particle (CP) とユビキチン鎖認識などの分解制御機能をもつ 19S regulatory particle (RP) により構成される巨大な酵素複合体である。がん細胞ではプロテアソームが高発現しタンパク質代謝回転を早めることが生存・増殖に重要である。一方、プロテアソームサブユニットの遺伝子変異がヒト自己炎症性症候群を引き起こしたり、プロテアソーム活性低下が神経変性疾患と密接に関連するなど、プロテアソーム機能不全が多様な病態を引き起こすことが示されている。このように、プロテアソーム活性の変化が疾患の病態生理に大きな影響を与えることを示す報告が増えているが、プロテアソームの機能制御機構については未解明の点が多い。そこで本研究では、恒常的にプロテアソームに分解されるモデル基質を発現するヒト培養細胞株を樹立し、siRNA ノックダウンスクリーニングおよび CRISPR/Cas9 ノックアウトアウトスクリーニングをゲノムワイドに実施することで、プロテアソームを制御する新規分子機構とその意義の解明を目指した。

プロテアソーム制御因子を網羅的に探索するため、恒常的にプロテアソームに分解されるデグロンを付加した蛍光タンパク質 ZsGreen-mODC を発現する U2OS 細胞を樹立し、細胞内プロテアソーム活性の低下を蛍光タンパク質の蓄積によって定量評価できる系を構築した。樹立した細胞を用いて siRNA によるノックダウンスクリーニングおよび CRISPR/Cas9 によるノックアウトスクリーニングをゲノムワイドに実施し、蛍光タンパク質の蓄積を引き起こした遺伝子をヒット因子とした。二つのスクリーニングでの重複したヒット因子には、ほぼすべてのプロテアソームサブユニットおよび既知のプロテアソーム制御因子が含まれたことから、この絞り込みは妥当と考えられ、残りの 31 の重複ヒット因子を新規プロテアソーム機能制御因子候補とした。その中で、ノックアウト細胞において ZsGreen-mODC の顕著な蓄積が確認され、遺伝性ジストニア DYT6 の原因遺伝子であることが知られる転写因子 THAP1 (THAP domain-containing apoptosis-associated protein 1) に着目し解析を進めた。

THAP1 によるプロテアソーム機能への影響を検証するため、CRISPR/Cas9 システムにより THAP1 をノックアウトしたところプロテアソーム活性の低下およびユビキチン化タンパク質の蓄積が確認された。そこで、プロテアソームサブユニットの発現を確認したところ、THAP1 ノックアウト細胞では 20S CP を構成するいくつかの α サブユニット、及び全ての β サブユニットについて発現量の減少が確認された。また、未完成の 20S CP の特徴である $\beta 1$ 、 $\beta 2$ サブユニットの前駆体およびプロテアソーム形成シャペロン PAC2 および Ump1 の蓄積が観察されたことから、20S CP の形成不全が生じていると考えられた。

20S CP は $\alpha 1$ - $\alpha 7$ サブユニットからなる α リングと $\beta 1$ - $\beta 7$ サブユニットからなる β リングが $\alpha\beta\alpha$ と積み重なった構造をとる。 β リング形成過程において β サブユニットは $\beta 2$ 、 $\beta 3$ 、 $\beta 4$ 、 $\beta 5$ 、 $\beta 6$ 、 $\beta 1$ 、 $\beta 7$ の順番で組み込まれ、20S CP 完成とともに $\beta 1$ 、 $\beta 2$ 、 $\beta 5$ 、 $\beta 6$ 、 $\beta 7$ サブユニットの前駆体がプロセシングされるとともに、形成シャペロン Ump1 が分解され、成熟体になる。THAP1 ノックアウトによる 20S CP 形成不全の詳細を調べるため、細胞抽出液をグリセロール密度勾配遠心により分画した。THAP1 ノックアウトにより 20S CP 画分における全ての β サブユニットの減少と、20S CP 形成不全により生じる 20S CP 形成中間体が確認された。この時、 $\beta 2$ サブユニット前駆体、 $\beta 3$ 、 $\beta 4$ サブユニットが形成中間体に組み込まれた状態で蓄積したのに対し、 $\beta 1$ サブユニット前駆体は遊離状態で蓄積したこと、また $\beta 5$ 、 $\beta 6$ 、 $\beta 7$ サブユニットについては前駆体および形成中間体の蓄積を伴わずに減少したことから、 $\beta 5$ サブユニットの組み込み前のステップで 20S CP 形成が停止していることが示唆された。

THAP1 ノックアウトによる 20S CP 形成不全の原因を調べるため、転写因子である THAP1 がプロテアソーム遺伝子群の遺伝子発現に関与している可能性について検証した。THAP1 ノックアウト細胞におけるプロテアソーム遺伝子群の発現変化を qPCR により網羅的に調べたところ、 $\beta 5$ サブユニット遺伝子のみ発現低下が確認された。すなわち、THAP1 は定常時にプロテアソーム関連因子の中でも $\beta 5$ サブユニット特異的な転写制御を担うことが示唆された。

$\beta 5$ サブユニットプロモーター領域への THAP1 の会合を確認するため、ChIP-Atlas データベースにおけるヒト K562 細胞での THAP1 の ChIP-seq データから $\beta 5$ サブユニットプロモーター領域において THAP1 の会合が想定されるコンセンサス配列をマッピングした。この領域を標的として野生型 Flag-THAP1、病態点変異 Flag-THAP1 C54Y の過剰発現細胞による ChIP-PCR を行ったところ、野生型 Flag-THAP1 の $\beta 5$ サブユニットプロモーターへの会合が見られた。また、THAP1 の病態点変異により $\beta 5$ サブユニットのプロモーター領域との会合が消失したことから、THAP1 が $\beta 5$ サブユニットのプロモーター領域と会合することによってその転写を制御する可能性が示唆された。

以上の研究から、王妍は以下の成果を示した。まず、siRNA ノックダウンスクリーニングおよび CRISPR/Cas9 ノックアウトアウトスクリーニングをヒト培養細胞でゲノムワイドに実施することにより、新規プロテアソーム機能制御因子として転写因子 THAP1 を同定した。THAP1 ノックアウト細胞ではプロテアソーム形成の異常や活性の低下および $\beta 5$ サブユニット遺伝子発現の低下が生じることを示し、THAP1 が $\beta 5$ サブユニットの転写制御を担うことで平常時におけるプロテアソーム活性の維持に必須の役割を持つことを明らかにした。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関連遺伝子群の発現を代償的・網羅的に亢進することが知られているが、平常時におけるプロテアソームの基礎的発現制御機構については不明点が多く、平常時のプロテアソーム発現制御の一端を明らかにしたという点でも本研究の意義は大きい。

これまでジストニア DYT6 の発症は神経発達不全に起因すると考えられており、THAP1 機能喪失型変異の優性遺伝によりジストニアが引き起こされることから、分子機構は不明ながらも神経における THAP1 の重要性が示唆されていた。本研究の結果から、これまで不明であった THAP1 変異によるジストニア発症の原因がプロテアソーム機能低下に起因する可能性が示唆された。今後、神経やマウス個体における THAP1 のプロテアソーム機能への影響を解析することにより、プロテアソーム機能低下とジストニア発症および病態との関連が明らかになると期待される。ジストニア発症の原因がプロテアソーム機能低下であった場合、THAP1 によるプロテアソーム機能制御機構がジストニア DYT6 の新規治療標的となる可能性がある。

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。