

博士論文（要約）

Title : Transcription factor THAP1 is a novel regulator of the proteasome

(転写因子 THAP1 による新規プロテアソーム制御機構の解明)

Name: Wang Yan

氏名：王妍

【序論】

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。本研究ではゲノムワイドなスクリーニングによるプロテアソーム新規機能制御因子の同定とその分子メカニズム解明を目的とした。

【方法・結果】

1、ゲノムワイド siRNA および CRISPR スクリーニングによる新規プロテアソーム制御因子 THAP1 の同定

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(図 1)。プロテアソーム制御因子を網羅的に探索するため、樹立した細胞を用いて siRNA による

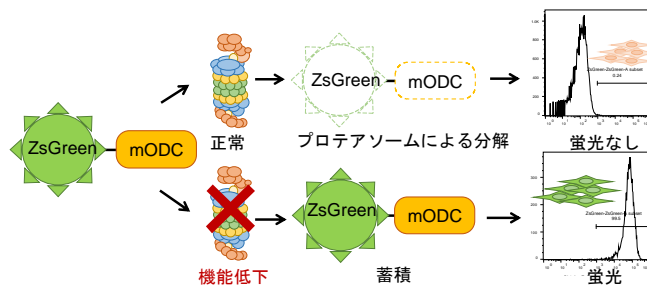


図 1 : ZsGreen-mODC を基質としたプロテアソーム活性低下を指標としたプロテアソーム制御因子の探索

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 (図 2)。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。

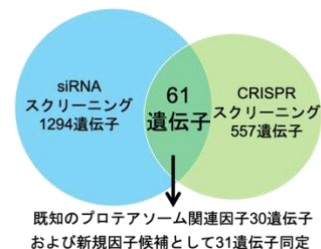


図 2 : ゲノムワイドスクリーニングによる THAP1 の同定

2、THAP1 ノックアウトによるプロテアソーム活性の低下

THAP1 が実際にプロテアソーム機能を制御するか確認するため、CRISPR/Cas9 システムにより THAP1 をノックアウトするとプロテアソーム活性の低下 (図 3A) およびユビキチン化タンパク質の蓄積 (図 3B) が確認された。次にプロテアソームサブユニットについて確認したところ、THAP1 ノックアウト細胞ではいくつかの 20S CP サブユニットの減少がみられ、全ての β サブユニットについて減少が確認された。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 (図 3B)。この時 $\beta 5$ サブユニットの前駆体が確認されなかったことから、 $\beta 5$ 組み込み前のステップで 20S CP 形成が停止している可能性が示唆された。

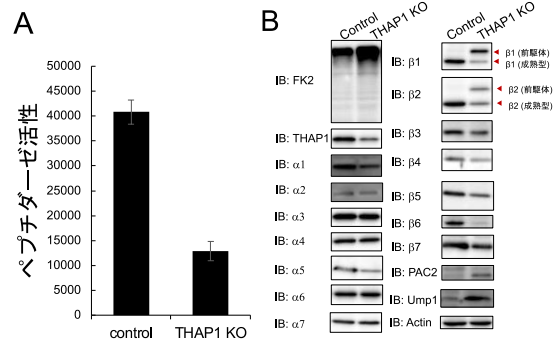


図 3 : THAP1 KOによるプロテアソーム活性低下

3、THAP1による $\beta 5$ サブユニット遺伝子発現は 20S CP 形成に必要なである

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 完成とともに前駆体がプロセッ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 (図 4)。THAP1

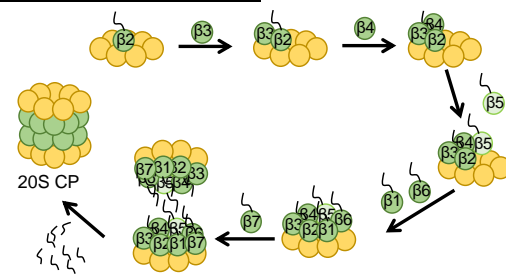


図 4 : 20S CP の形成過程
黄色は α サブユニットを、緑色は β サブユニットを示している

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、CP 形成不全により生じる 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から 20S CP 分子集合が途中で停止していることが予想された。この時、 $\beta 5$ サブユニットが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、THAP1 ノックアウトにより発現が低下した $\beta 5$ サブユニットの組み込み不全により 20S CP 形成が途中停止したことが示唆された (図 5)。

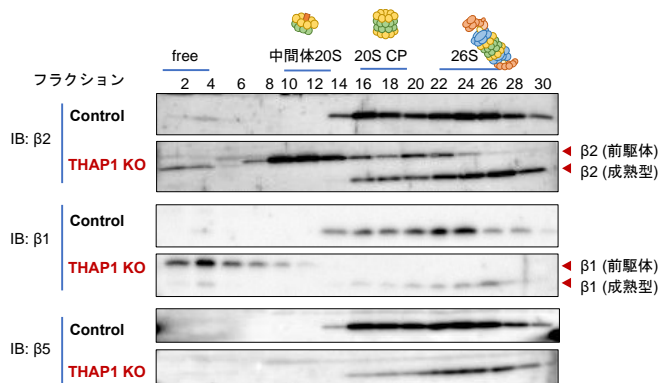


図 5 : THAP1KOによる β サブユニットの会合不全
 $\beta 2$ 、 $\beta 1$ はそれぞれ前駆体が蓄積する一方、 $\beta 5$ は前駆体がほとんど確認されない。

4、THAP1 は $\beta 5$ サブユニットの転写に働く

THAP1 ノックアウトによるプロテアソーム β サブユニット形成不全について原因を調べるため、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 (図 6)。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。

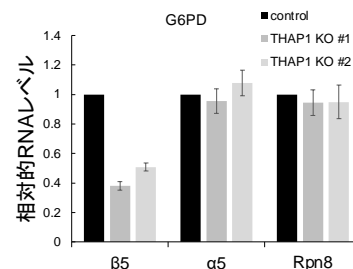


図 6 : THAP1 KO による $\beta 5$ 発現減少
THAP1 KO におけるプロテアソームサブユニット遺伝子の発現量 ($\alpha 5$: 20S CP, Rpn8: 19S RP 構成因子)

5、THAP1 は $\beta 5$ サブユニットのプロモーター領域に会合する

$\beta 5$ 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 Flag-THAP1 過剰発現細胞による ChIP-PCR を行ったところ、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 (図 7)。このことから、THAP1 が直接 $\beta 5$ サブユニットの転写を制御する可能性が示唆された。

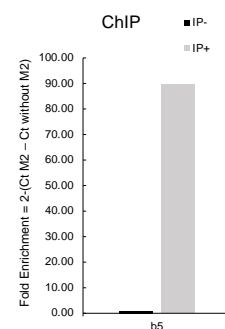


図 7 : THAP1 はプロテアソーム $\beta 5$ サブユニットのプロモーターと結合する

【まとめ・考察】

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これまで知られていたが、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未解明であった。本研究において私は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 ノックアウト細胞において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確認されたことから、THAP1 による $\beta 5$ サブユニット特異的な転写制御が、平常時におけるプロテアソーム活性の維持に重要であることが明らかとなった。

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。そのため、今後は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明らかにし、プロテアソーム機能低下がジストニアの発症と関与するかどうかの解明を目指す。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新規ジストニア DYT6 治療標的となる可能性が期待される。