

審査の結果の要旨

氏名 富田 拓哉

本論文は、真核生物が有する主要な細胞内タンパク質分解酵素の一つであるプロテアソームのターンオーバー機構を追求することを目的とし、培養細胞を用いた生化学実験および大規模スクリーニングを実施することによって、“古い”プロテアソームの生化学的特徴を見出すとともに、そのターンオーバーを制御する遺伝子を同定するに至ったものである。

プロテアソームは主にユビキチン化タンパク質を分解する酵素複合体である。この巨大な複合体は 20S コア粒子の片側または両端に 19S 調節因子が結合した構造をとる。20S コア粒子は基質タンパク質の加水分解を行い、19S 調節因子は基質タンパク質の認識・捕捉を担っている。20S コア粒子及び 19S 調節因子は計 33 種類のサブユニットにより構成されているが、これらに加えて、プロテアソーム結合タンパク質と呼ばれる様々な分子により活性制御を受けていることも知られている。しかし、プロテアソーム結合タンパク質は機能が不明な分子も多く、プロテアソームの活性制御機構を理解するためには更なる解析が必要となっている。

プロテアソームによるタンパク質分解は、細胞周期、転写、そして免疫応答などといった細胞内のあらゆる生命現象において重要な役割を果たしている。また、これまでも、癌や神経変性疾患をはじめとした多くの疾患において、プロテアソームの異常な活性との関連が報告されている。従って、プロテアソームの活性を制御することは、生体機構の解明、疾患治療の両面において重要な課題であると考えられる。事実、プロテアソーム活性制御に関する研究は様々な角度から行われてきた。すなわち、発現調節、複合体形成機構の解明、活性化剤/阻害剤の探索などといった戦略である。

本研究は、プロテアソームそのもののターンオーバー機構もその活性制御に一定の役割を果たしている可能性を提唱した。プロテアソームは数多くの翻訳後修飾によっても活性調節を受けているが、酸化ストレスなどによりダメージを受けたプロテアソームの機能は低下していると報告されている。またプロテアソームは 3 種の活性触媒サブユニットを有しているが、これらは細胞が IFN γ 等の炎症性刺激に曝された際に免疫プロテアソームのサブユニットへ置換されることが知られている。このように、損傷を受けた、あるいは不必要となったプロテアソームのターンオーバーを制御することは、細胞の恒常性を保つ上でも重要であると予想される。一度形成されたプロテアソーム複合体のその後の動態を追った研究例はなく、本研究ではプロテアソームのターンオーバーを、特にプロテアソームの生化学的経時変化及び分解に焦点を当て解析し、新たな観点からプロテアソームの制御機構を追求することを目指した。

この研究課題を遂行するにあたり、大きく分けて二つの研究方針が立てられた。まずは生化学的手法により、“古くなった”プロテアソームの特性評価が行われた。“古い”プロテアソームを精製するために、19S 調節因子のサブユニットの一つである Rpn11 にタグを付加した Rpn11-Flag/EGFP tag exchangeable ノックインマウスの系が用いられた。このノックインアレルは Rpn11 を C 末端に Flag-tag を付加した形で発現しているが、Cre-recombinase の発現により EGFP-tag を付加した Rpn11 に発現を切り替えることができる。よって、Cre-recombinase が発現してから一定期間が経つと、Rpn11-Flag は“古い”プロテアソーム、一方で Rpn11-EGFP は“新しい”プロテアソームの指標とすることができる。このノックインマウスから取得されたマウス胎仔線維芽細胞 (MEF) に Cre-recombinase を発現させ、3 日後に Flag エピトープにより“古い”プロテアソームを選択的にアフィニティ精製した。この実験系により、“古い”プロ

テアソームは20S コア粒子及び19S 調節因子の基本的なサブユニット構成に異常はなかったが、いくつかのプロテアソーム結合タンパク質の相互作用は変化していたことが判明した。また“古い”プロテアソームには酸化修飾の亢進が観察された他、特定のサブユニットがリン酸化されていることも判明した。このリン酸化部位は質量分析により同定され、リン酸化状態を特異的に認識する抗体も作製された。ここで作製されたリン酸化部位特異的抗体は“古い”プロテアソームを特異的に検出したため、質量分析の結果が支持されたと同時に“古い”プロテアソームを解析するための手段が新たに確立された。

“古い”プロテアソームはタンパク質間相互作用及び翻訳後修飾における変化を示していたため、これらの修飾とプロテアソームの酵素活性との関連についても解析が行われた。数種類のモデル基質に対して“古い”プロテアソームの様々な活性を測定したところ、“古い”プロテアソームにおける修飾と酵素活性の変化は一貫していた。また、免疫染色と細胞分画の実験によりプロテアソームの局在は形成後の時間経過とともに変化することが示唆された。

このように“古い”プロテアソームは生化学的に特徴づけられたが、これらの実験結果からはプロテアソームのターンオーバー、特に分解に至る過程を明らかにすることはできなかった。そのため、本研究の二つ目の研究方針として、プロテアソームのターンオーバーの制御機構を知ることが目的としたヒト全遺伝子を対象とする siRNA ノックダウンによるスクリーニングが行われた。この実験では低分子リガンドと特異的な共有結合を形成するタグタンパク質である HaloTag が用いられた。HaloTag は細胞内で発現した後に蛍光リガンドでラベルすることができるため、HaloTag が不可したタンパク質の経時変化を蛍光観察で追跡することができる。スクリーニングに先立ちターンオーバー計測のための細胞の準備が必要だったため、CRISPR/Cas9 システムにより、先ほどと同じく Rpn11 の C 末端に Halo-tag をノックインした HeLa 細胞を用意した。これにより“古い”プロテアソームと“新しい”プロテアソームを別色の蛍光リガンドでラベルすることができる実験系が立ち上げられた。例えば、ある特定のタイミングで緑色蛍光リガンド Oregon Green でノックインされた Rpn11-Halo をラベルし、その後未反応の HaloTag をマスクするためにブロッキングを行う。そして一定期間後に、赤色蛍光リガンド TMR で新規合成された Rpn11-Halo をラベルすると、それぞれ Oregon Green が“古い”プロテアソーム、TMR が“新しい”プロテアソームの指標となる。siRNA ライブラリーのプレート上で以上のようなノックイン細胞のラベルを行い、引き続き細胞の固定、核染色が行われた。各ターゲットに対して細胞数のカウント、一細胞あたりの Oregon Green 及び TMR の蛍光強度が大規模画像解析装置によって測定された。

このスクリーニングにより、約 1 万 8 千のターゲットのうちノックダウンによってプロテアソームのターンオーバーを遅らせる影響力の強い遺伝子が最終的に 10 種類まで絞り込まれた。このうちいくつかの遺伝子に対して更なる個別解析を行ったところ、これらの遺伝子が一つ目の研究方針で観察されていた“古い”プロテアソームの特徴の翻訳後修飾に影響を与えることが判明した。従って、この翻訳後修飾が“古い”プロテアソームのターンオーバーの制御に関与していることが示唆された。

以上の研究から、富田拓哉は以下の成果を示した。第一に、プロテアソームのターンオーバーを評価し、“古い”プロテアソームを精製する系を立ち上げた。そしてこの実験系により、プロテアソームは一度形成された後、時間経過とともにタンパク質間の相互作用や局在を変えらるという、プロテアソームは“古くなる”という新しい概念を示した。さらに大規模スクリーニングにより、プロテアソームのターンオーバーに影響を与える遺伝子を絞り込み、特定の翻訳後修飾がターンオーバーの制御に関与していることを示唆した。本研究はプロテアソーム研究の新たな方向性を示したとともに、プロテアソームの異常な活性を示す多くの疾患における新たな治療戦略の一步となることが期待される。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。