

論文の内容の要旨

論文題目 哺乳類プロテアソームの細胞内局在を制御する新規因子の探索と 動作機構の解明

氏 名 大手 友貴

【序論】

プロテアソームは酵母からヒトまで保存されたタンパク質分解酵素複合体である。分解活性を担う CP (core particle) にユビキチン化タンパク質の捕捉等を行う RP (regulatory particle) が結合した 26S プロテアソームは、ユビキチン化タンパク質の分解を通して細胞周期や転写、ストレス応答など多くの生命現象を制御する。しかしながらプロテアソーム自体の制御機構に関しては不明な点が多く、特に哺乳類プロテアソームの細胞内局在制御はほとんど明らかになってない。33種のサブユニットから構成されるプロテアソームの分子集合は細胞質で進行し、完成後に核と細胞質に分布することが知られている。静止期の細胞では細胞質に分布する一方、がん細胞などの増殖期の細胞では核に集積するなど、細胞状態に応じたプロテアソームの局在変化が観察されていることから、プロテアソームの核局在ががんなどの病態に関与する可能性が考えられ、プロテアソームの核局在の制御は新しいコンセプトのプロテアソーム機能制御として、創薬のターゲットとなりうる。しかしながら、哺乳類プロテアソームの局在を正確に観察する実験系の確立が困難であり、分子機構や生理的意義はこれまで不明であった。

そこで本研究では哺乳類プロテアソームの正確な局在を観察可能とする哺乳類培養細胞を樹立し、この細胞を用いたゲノムワイド siRNA スクリーニングにより哺乳類プロテアソームの核局在制御因子の網羅的探索を行い、哺乳類プロテアソームの新規局在制御機構とその生理的意義の解明を目指した。

【結果と考察】

1. プロテアソーム局在可視化細胞の樹立

プロテアソームは各サブユニットの秩序立った会合により構築され、いくつかのサブユニットは完成したプロテアソームとは別に形成中間体としても存在する。そこで完成したプロテアソームの正確な局在を観察するために、完成したプロテアソームに専ら含まれるサブユニットを全サブユニットから探索・同定した結果、目的に合致するサブユニットとして $\alpha 1$ (CP) および Rpn11 (RP) を同定し、CRISPR-Cas 法による蛍光タンパク質融合型サブユニットのノックインを試みた。サブユニットによってはタグタンパク質の付加がプロテアソームの分子集合の阻害をもたらすことが知られているため、ノックイン細胞においてプロテアソームが正常に形成され、機能するかを検証するために、分子集合の異常およびユビキチン化タンパク質の蓄積の有無を確認した。CRISPR-Cas 法により、 $\alpha 1$ 、Rpn11 の

C 末端に蛍光タンパク質 2×Venus をそれぞれノックインした HeLa 細胞および HEK293T 細胞を樹立した。これらの細胞抽出液をグリセロール密度勾配遠心法により分画し、 $\alpha 1$ -2×Venus、Rpn11-2×Venus とともに完成したプロテアソームに専ら含まれ、分子集合の異常やユビキチン化タンパク質の蓄積がないことを確認した。これらのことから樹立した細胞において正常にプロテアソームが形成され、その蛍光はプロテアソームの局在を正確に反映することが示唆された。

2. ゲノムワイド siRNA スクリーニングによるプロテアソーム核局在制御因子の探索

上述細胞とハイコンテントイメージアナライザーを用いて、核染色を基準に核領域 (circle)、細胞質領域 (ring) を規定し、Venus の蛍光強度の核/細胞質比を算出することで、プロテアソームの核局在の定量系を確立した。

この評価系を用いて、1 次スクリーニングでは各遺伝子に対して 4 種の siRNA がプールされたゲノムワイド (約 18,000 遺伝子) siRNA ライブラリーを用いて、プロテアソーム核局在制御因子の網羅的探索を行った。26S プロテアソームの核局在を細胞種非特異的に制御するものを得るために、 $\alpha 1$ -2×Venus ノックイン HeLa 細胞および Rpn11-2×Venus ノックイン HEK293T 細胞に共通して核/細胞質比が減少したもの (B-score<-2) を候補遺伝子とした。プロテアソームサブユニットのノックダウンは、通常細胞質で起こるプロテアソームの分子集合を阻害し、プロテアソームの核移行を阻害すると考えられる。実際に半数以上のプロテアソームサブユニット遺伝子群に関して、B-score<-2 であったことから、スクリーニングの妥当性が示唆される。プロテアソームサブユニット遺伝子群と組織特異的に発現する遺伝子を除いた 122 遺伝子を 1 次スクリーニングによる候補遺伝子とした。siRNA のオフターゲット効果による偽陽性を排除するために、1 次スクリーニングで使用した 4 種の各 siRNA を個別に解析する 2 次スクリーニングを経て、最終的に 6 遺伝子を得た。

3. COPI 経路阻害によりプロテアソームは核外移行する

6 遺伝子の内、3 遺伝子はゴルジ体から ER (endoplasmic reticulum) へのタンパク質の逆行輸送を担う COPI (coat protein complex I) 小胞を構成するサブユニットをコードする遺伝子であり、他の候補と比較して強くプロテアソームの核局在を阻害したことから COPI 経路に着目した。実際に内在性のプロテアソームの細胞内局在が COPI 経路阻害により変化するか否かを確認するために、HeLa 細胞を CP サブユニット ($\alpha 6$) および RP サブユニット (Rpn13) に対する抗体で共免疫染色した。すると COPI 小胞の形成を阻害する brefeldin A (BFA) 処理により、CP および RP いずれのサブユニットの核局在も阻害された。このことから COPI 経路阻害が実際にプロテアソームの核局在を阻害することが示唆された。

そこで COPI 経路阻害時にプロテアソームがどのような細胞内局在の変化をしたかを細胞分画により検証した。すると COPI 経路阻害時には CP と RP の両サブユニットが核で減少し、サイトゾルで増加していた。この局在変化の分子機構としてプロテアソームが核外移行を受けた可能性を考え、COPI

経路阻害時に核外移行阻害剤 leptomycin B (LMB) 処理を行ったところ、プロテアソームの核局在が回復した。このことから COPI 経路阻害時にプロテアソームが核外移行することが示唆された。

4. ER ストレスはプロテアソームの核外移行を誘導する

COPI 経路阻害により、ER からゴルジ体へのタンパク質の順行輸送を担う COPII やオートファジーの阻害に起因する ER ストレスの誘導が報告されている。そこで ER ストレスがプロテアソームの核外移行を誘導した可能性を検証したところ、ER ストレス誘導剤 thapsigargin (Tg) 処理により、CP および RP いずれのサブユニットの核局在も阻害され、LMB 処理によりプロテアソームの核局在が回復した。このことから ER ストレスによりプロテアソームが核外移行することが示唆された。

5. mTOR 阻害によりプロテアソームは核外移行する

しかしながら、ER ストレスの強さとプロテアソームの核局在の阻害の程度の間に関連性がなかったことから、COPI 経路阻害時には ER ストレス以外にもプロテアソームの核局在の阻害を引き起こす別の機構が存在することが示唆される。BFA 処理によりプロテインキナーゼ mTOR の活性が低下することが報告されている。mTOR は栄養シグナルに応答して活性化し、下流の基質をリン酸化することで細胞成長やタンパク質の生合成を促進することが知られている。そこで mTOR がプロテアソームの局在を制御する可能性を検証した。血清濃度を上昇させることで栄養シグナルを細胞に加えると、プロテアソームの核局在が増強したが、mTOR 阻害剤である rapamycin 存在下ではこの増強は確認されなかった。このことから栄養シグナルがプロテアソームの核局在を mTOR 依存的に制御することが示唆された。また mTOR 阻害時にプロテアソームの核局在が阻害され、LMB 処理により核局在が回復した。このことから mTOR 阻害時にプロテアソームは核外移行を受けることが示唆された。

最後に ER ストレスと mTOR、それぞれによるプロテアソームの局在制御機構間の関係性を検証したところ、Tg 処理による ER ストレス条件下では栄養シグナルによるプロテアソームの核局在の増強は生じなかった。Tg 処理は mTOR の基質のリン酸化レベルに影響を与えなかったことから、ER ストレスは mTOR の下流のシグナルを阻害することでプロテアソームの核外移行を誘導する可能性が示唆された。

【まとめ】

私は本研究においてプロテアソームの局在を観察可能とする培養細胞を樹立し、プロテアソームが ER ストレス条件下および mTOR 阻害時に核外移行することを明らかにした。哺乳類プロテアソームが細胞状態に応じて核外移行を受けるという報告は過去になく、新たな知見である。

本研究から、通常状態では栄養シグナルにより活性化された mTOR が制御する因子 X を介してプロテアソームの核外移行が阻害され、核にプロテアソームが集積する一方で、ER ストレス条件下では X が阻害され、プロテアソームの核外移行が促進し、細胞質にプロテアソームが集積するモデルが考え

られる（モデル図参照）。

細胞質では完成したプロテアソームとは別に形成中間体も存在するが、その一方で核には専ら完成したプロテアソームが存在する。本研究は核から細胞質へ完成したプロテアソームを効率的に供給する新しいストレス応答の存在を示唆する。

モデル図

