

氏名 大手 友貴

本論文は、真核生物に保存された主要な細胞内タンパク質分解酵素であるプロテアソームの細胞内局在制御を哺乳類において明らかにすることを目的とし、樹立したプロテアソーム局在可視化培養細胞を用いてゲノムワイドスクリーニングを実施することにより、プロテアソームの核局在を制御する新規因子を同定するとともに、プロテアソーム細胞内局在制御機構の解明に至ったものである。

分解活性を担うサブコンプレックスであるコア粒子 (CP ; core particle) に、ユビキチン化タンパク質の捕捉、解きほぐしなどを行うサブコンプレックスである制御粒子 (RP ; regulatory particle) が会合した 26S 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ことにより、細胞周期、転写、ストレス応答、免疫応答といった様々な生命現象を制御し、生体の恒常性維持に必須の役割を担う。これまでにがんをはじめとする様々な疾患においてプロテアソームによるタンパク質分解の異常が確認されており、プロテアソームによるタンパク質分解の制御機構の解明は生体制御機構や病態の理解につながると考えられる。

しかしながら、プロテアソーム自身の制御機構に関しては未だに不明な点が多く、特に哺乳類プロテアソームの細胞内局在制御に関してはほとんど明らかになっていない。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、完成後に細胞質と核に分布する。また静止期の細胞ではプロテアソームは細胞質に集積する一方で、がん細胞などの増殖期の細胞では核に局在することが観察されており、プロテアソームの細胞内局在が病態に関与する可能性も考えられている。プロテアソームの細胞内局在に関する研究はこれまで主に酵母を用いて行われてきた。しかし、酵母プロテアソームの局在を制御する因子の中には哺乳類に保存されていないものもあり、哺乳類プロテアソームの局在制御機構の解明が期待されていたものの、その正確な局在を観察する実験系の確立が困難であったことから研究は進まなかった。そこで本研究では哺乳類プロテアソームの正確な局在の観察を可能とする培養細胞の樹立を行い、その局在を変化させる因子をゲノムワイド siRNA スクリーニングにより網羅的に探索し、得られた因子の解析を行うことで研究課題の遂行を目指した。

プロテアソームは各サブユニットの秩序だった会合により構築される。タグタンパク質融合型サブユニットの過剰発現や特定のサブユニットへのタグタンパク質の付加はプロテアソームの分子集合を阻害することが知られている。またいくつかのサブユニットは完成したプロテアソーム以外に形成中間体としても存在する。本研究では、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の中から探索し、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行い、樹立した細胞におけるプロテアソームの機能を評価することで、分解活性を有する完成したプロテアソームの局在の観察を試みた。目的に合致するサブユニットとして $\alpha 1$ (CP サブユニット) と Rpn11 (RP サブユニット) を同定し、 $\alpha 1$ -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すると $\alpha 1$ -2×Venus および Rpn11-2×Venus は専ら完成したプロテアソームに含まれ、また分子集合の異常やプロテアソームによる分解の基質であるユビキチン化タンパク質の蓄積は見られなかった。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、その蛍光は分解活性を有する完成した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。

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、プロテアソームの核局在を定量する系を樹立した。この評価系により 18,000 遺伝子の中から上述 2 細胞に共通してロックダウンによりプロテアソームの核局在を阻害する因子を探索したところ、最終的に 6 遺伝子を得た。この 6 遺伝子のうち、3 遺伝子はゴルジ体から小胞体 (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った。この 3 遺伝子は $\alpha 1-2 \times$ Venus ノックイン HeLa 細胞においては他の最終候補遺伝子よりも強くプロテアソームの核局在を阻害していたことから COPI に着目した。実際に COPI 形成を阻害する brefeldin A (BFA) 処理を行った際にプロテアソームの核局在が阻害されることをプロテアソームサブユニットに対する抗体を用いた免疫染色および細胞分画の実験から確認した。このことから COPI 経路阻害がプロテアソームの核局在を阻害することが明らかとなった。また、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した可能性を考え、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 経路阻害時にはプロテアソームが核外移行することが示唆された。

COPI 経路阻害により ER ストレスが誘導されることが過去に報告されている。そこで COPI 経路阻害時に誘導される ER ストレスが、プロテアソームの核外移行を引き起こした実態である可能性を考えた。ER ストレス誘導剤 thapsigargin (Tg) や tunicamycin の処理によりプロテアソームの核局在は阻害され、このとき LMB 処理を行うことでプロテアソームの核局在が回復したことから、ER ストレスがプロテアソームの核外移行を誘導することが示唆された。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見られなかったことから、COPI 経路阻害時には ER ストレス以外にも別の経路がプロテアソームの核局在の阻害を引き起こしていることが考えられた。

BFA 処理によりプロテインカイネース mTOR の活性が阻害されることが報告されている。mTOR は栄養シグナルを感知して活性化し、基質をリン酸化することでタンパク質合成、細胞成長等を促進することが知られている。そこで栄養シグナルが mTOR を介してプロテアソームの核局在を促進しており、BFA 処理時には mTOR が阻害されることでプロテアソームの核局在の阻害が生じている可能性を考えた。血清濃度を上昇させることで栄養シグナルを増加させると、プロテアソームの核局在は増強し、この増強は mTOR の阻害剤である rapamycin (Rap) 処理により見られなくなった。これらのことから栄養シグナルが mTOR を介してプロテアソームの核局在を増強していることが示唆された。また Rap 処理時のプロテアソームの核局在の阻害は LMB 処理により見られなくなったことから、mTOR 阻害時にもプロテアソームが核外移行することが示唆された。最後に ER ストレスと mTOR によるプロテアソームの局在制御の両機構間の関係性を検証した。Tg 処理を行うことで細胞に ER ストレスを誘導した条件下では、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。またこのとき Tg 処理は mTOR の活性の変動を生じなかった。これらのことから、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している可能性が示唆された。

以上の研究から、大手友貴は以下の成果を示した。まず、これまで困難であった哺乳類プロテアソームの正確な局在の観察を可能とする培養細胞を樹立し、その核局在の定量系を確立した。この実験系を用いたゲノムワイド siRNA スクリーニングにより、プロテアソームの核局在制御因子を同定した。さらに同定した因子の解析から、「通常時には、栄養シグナルにより活性化される mTOR の下流の基質によりプロテアソームの核外移行は阻害されており、mTOR 阻害時や ER ストレス時にはこの基質の働きが阻害されることで、プロテアソームが核外移行する」というモデルを提唱するに至った。本研究はプロテアソームが細胞外からの刺激に応答して核外移行をするという新しいストレス応答機構を示すものであるとともに、プロテアソームによるタンパク質分解が関係する病態の理解や新たな治療戦略につながることで期待される。

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。