

論文の内容の要旨

論文題目 プロテアソーム α リングの形成機構の解明

氏名 佐原 一貴

【序論】

26S プロテアソームは、真核細胞においてポリユビキチン化されたタンパク質を選択的に分解する巨大酵素複合体であり、単に不要なタンパク質を分解するだけではなく、細胞周期の制御、DNA 修復、アポトーシス、シグナル伝達、免疫応答、発生、タンパク質の品質管理など広範な生命活動に関わることが知られている。26S プロテアソームはプロテアーゼ活性を有する 20S core particle (CP)とその片側もしくは両側に会合して機能を調節する因子である 19S regulatory particle (RP)から構築される。CPは α 1- α 7のサブユニットからなる α リングと β 1- β 7の β サブユニットからなる β リングが $\alpha\beta\alpha$ の順に並んだ構造を持っている。CPの形成は α リングの形成から始まり、形成シャペロンである PAC1-PAC2 ヘテロ

二量体、PAC3-PAC4 ヘテロ二量体 UMP1 の制御を受けながら β サブユニットが順次組み込まれることにより half-proteasome ($-\beta$ 7)が形成され、最後に β 7の組み込みとカップルして half-proteasome が二量体化することで完成する(図1)。これまでの研究により、CP 形成の後半部分の β リングの形成について詳細を明らかにしてきたが、 α リング

の形成機構、特に形成シャペロンの PAC1-4 の CP の形成への関与についての理解は不十分であった。そこで本研究では、 α リングの組み込み過程に注目して、siRNA を用いた各サブユニットのノックダウンによりプロテアソーム α リングの形成機構について解析を行った。

【方法・結果】

1. α サブユニットの規則的な組み込みによる α リン

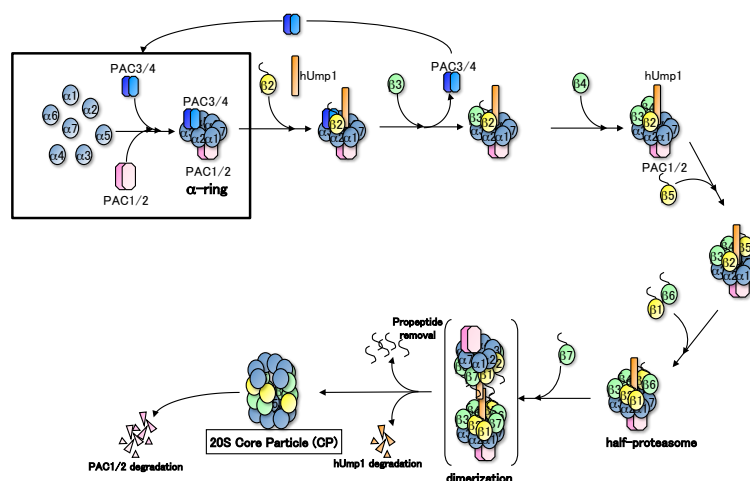


図1 プロテアソームCPの形成機構

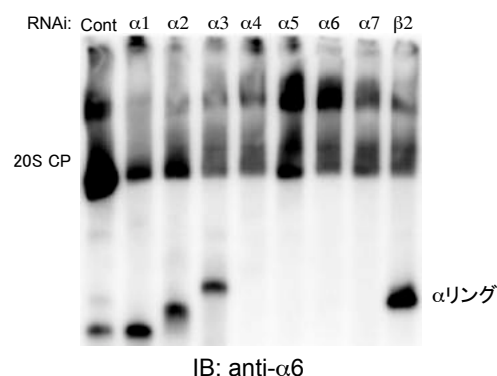


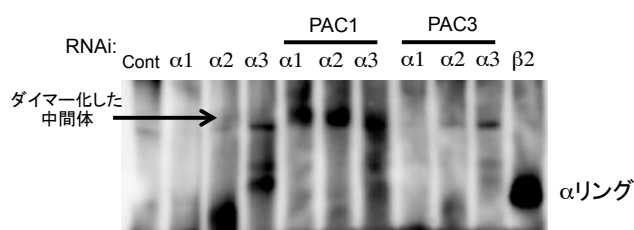
図2 α リングの形成機序
 α 6は α 1、 α 2、 α 3のノックダウンでは中間体に存在するが、 α 4、 α 5、 α 6、 α 7のノックダウンでは中間体が消えている。

αリングの形成

αリングがどのような過程を経て形成されるかを明らかにするため、各αサブユニットを siRNA によってノックダウンし、細胞抽出液を native PAGE により分離後、ノックダウンした際に生じる中間体にどのサブユニットが含まれているかをイムノブロットにより解析した。α4、α5、α6、α7 をノックダウンした細胞では中間体が確認できなかった(図2)。一方でα1、α2、α3 をノックダウンした細胞では中間体が観察され、α1 ノックダウン、α2 ノックダウン、α3 ノックダウンの順番に中間体のサイズが大きくなることが明らかになった(図2)。これらのことから、αリングはまず、α4、α5、α6、α7 が集まってコア中間体を形成し、そこにα1、α2、α3 が順番に組み込まれていくことで形成されることが示唆された。

2. PAC1-2 複合体はαリングの異常な二量体化を抑制し、PAC3-4 複合体はαリングのコア形成において重要な役割を果たす

次に PAC1-2、PAC3-4 のαリング形成における役割を明らかにするため、PAC1 または PAC3 とαサブユニットのダブルノックダウンを行った。PAC3 とα1-3 をダブルノックダウンしたところ、α1-3 各サブユニット単独のノックダウンでは蓄積していた中間体が消失した(図3)。このことから PAC3-4



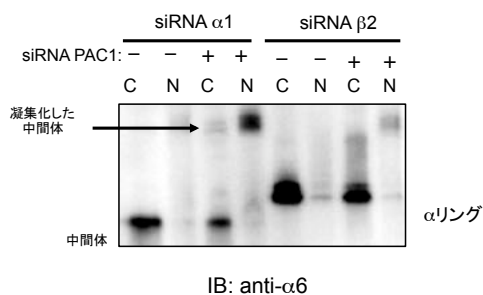
IB: anti-α4

図3 αリング形成におけるPAC1-2とPAC3-4の役割
PAC1をノックダウンした細胞ではα4-7からなる中間体のダイマー化がみられた一方で、PAC3ノックダウン細胞では中間体が消失した。

はα4、α5、α6、α7 からなるコア中間体の形成を制御していることが示唆された。一方で、PAC1 とαサブユニットのダブルノックダウンでは中間体がαリングよりも高い位置に存在していた。この中間体にはα4、α5、α6、α7、PAC3-4 が含まれていたことから、PAC1-2 はコア中間体がαリング形成の途中でダイマー化するのを抑制する働きを持っていることが示唆された。

3. PAC1-2 複合体は形成途中のαリングを細胞質内に留めておく機能も有する

過去の研究により、プロテアソームの形成は細胞質で行われることが明らかになっている。一方で完成したプロテアソームは主に核内に局在することも知られ、実際にαサブユニットのうち、α1、α2、α3、α4 は核移行シグナル(NLS)を持つことが知られている。つまり、プロテアソームは核に集まる性質を持っている一方で、形成過程では細胞質内に留まるメカニズムが存在することが示唆される。実際にα1 やβ2 をノックダウンした細胞について細胞分画を行うと、中間体



IB: anti-α6

図4 PAC1は中間体を細胞質に留める機能を持つ
HeLa細胞において細胞分画を行い、図に示した抗体でイムノブロットした。C:細胞質分画、N:核分画

や α リングは細胞質内に局在することが分かる(図4)。また、PAC1はロイシンリッチなタンパク質であり、一般にロイシンリッチなタンパク質は核外以降シグナル(NES)を有していることが多いため、PAC1による α リング中間体の細胞内局在が制御の可能性が考えられた。そこで、PAC1と $\alpha 1$ または $\beta 2$ をダブルノックダウンするとダイマー化した中間体が核に局在していた(図2)。このことからPAC1-2は α リングの形成において、中間体のダイマー化を抑制するだけではなく、中間体を細胞質にとどめておく役割も有することが明らかになった。

さらに α リング中間体の細胞内局在を明らかにするため、HaloTag融合タンパク質を用いた蛍光イメージングを行なった。CRISPR/Cas9 systemによりプロテアソームサブユニットの一つである $\alpha 4$ のC末端にHaloTagを融合したHEK293T細胞に樹立した。この細胞において $\alpha 1$ 及びPAC1とのダブルノックダウンを行い、すでに発現済みの $\alpha 4$ -Haloを蛍光標識されていないリガンド(Succinimigyl Ester (O4))によりブロックし、一定時間後、赤色リガンド(TMR ligand)を処理することで新規に合成された $\alpha 4$ -Haloのみを特異的に染色することができた(図5A)。 $\alpha 1$ ノックダウン細胞では細胞質でシグナルが検出されたのに対して、PAC1と $\alpha 1$ をダブルノックダウンした細胞では、核内のシグナルが強くなっていた(図5B)。この実験からPAC1が α リングの中間体を細胞質に局在させるために重要な役割を果たしていることが明らかになった。

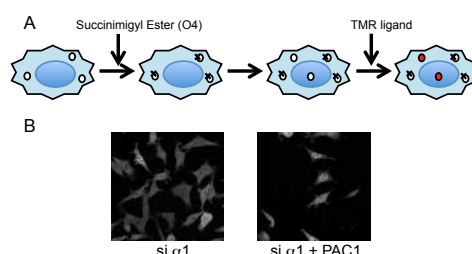


図5 PAC1による α リングの細胞内局在制御
 A. HaloTagによる新規合成タンパク質検出法の概略。
 B. $\alpha 1$ ノックダウン細胞では細胞質にシグナルが検出された一方で、 $\alpha 1$ とPAC1をダブルノックダウンした細胞では、核内のシグナル強まった。

【考察】

私は本研究において、プロテアソームCPの分子集合の最初のステップを明らかにした。 α リングの形成は、最初に $\alpha 4$ 、 $\alpha 5$ 、 $\alpha 6$ 、および $\alpha 7$ がコア中間体を形成し、そこに $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 $\alpha 3$ サブユニットが順次組み込まれていくことに進む。また、シャペロンタンパク質のPAC1-2は中間体の異常なダイマー化の抑制、PAC3-4はコア中間体の形成というそれぞれ異なる役割により、 α リングの形成を制御している。さらにPAC1は中間体が核に移行するのを抑制する働きも有していた。以前の研究により、PAC1は β リング形成の際にも中間体に結合し続け、20S CPが完成する際に分解を受けることが知られている。そのため、プロテアソームはPAC1のNESによって、中間体を細胞質に留め、正常なアセンブリが行われるようにしていると考えられる。20S CP活性の阻害剤であるボルテゾミブは現在、多発性骨髄腫の治療のための第一選択薬として使用されており、プロテアソームは、臨床的に適切な癌治療の標的であることが証明されている。 α リングの分子集合経路を明確にすることにより、プロテアソームの形成についての新たな洞察が得られ、また従来のプロテアソーム機能阻害剤よりも高い特異性と低い副作用を有するプロテアソームアセンブリ阻害剤の開発につながることを期待される。