

氏名 佐原 一貴

本研究は真核生物における主要な細胞内分解酵素の一つであるプロテアソームの形成機構の解析を目的として、siRNAによるノックダウンと native PAGE を組み合わせたプロテアソームの形成中間体の解析を行い、その結果プロテアソーム α リングの形成の詳細なメカニズムを明らかにしたものである。

26S プロテアソームは、真核生物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、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 $\alpha 1-7$ の α リングと $\alpha 1-7$ からなる α リングが重なった構造を取る。これまでの研究により、CP の形成には複数の形成シャペロンが関与していることが明らかになっている。CP はまず α リングが PAC1-2 複合体、PAC3-4 複合体の助けを受けて組み立てられるところから始まる。形成された α リングを足場にして、 $\beta 2$ と形成シャペロンの UMP1 が続いて組み込まれ、さらに $\beta 3$ 、 $\beta 4$ 、 $\beta 5$ 、 $\beta 6$ 、 $\beta 1$ 、 $\beta 7$ が順番に組み込まれていく。 $\beta 7$ が組み込まれると中間体がダイマー化し CP が完成する。このように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が明らかになりつつある。一方で、 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。

α リングの形成において各サブユニットがどのような順序で中間体に組み込まれるかを明らかにするため、native PAGE による解析を行った。native PAGE はタンパク質を変性させずに電気泳動するため、タンパク質の高次構造を保持したまま分離することで、イムノブロットとの組み合わせにより複合体の大きさと複合体中に含まれているサブユニットを知ることができる。Native PAGE による解析の結果、 α リングは $\alpha 4$ 、 $\alpha 5$ 、 $\alpha 6$ 、 $\alpha 7$ と形成シャペロンである PAC1-2 複合体及び PAC3-4 複合体が最初に会合してコアを形成し、コアに $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 $\alpha 3$ が順番に組み込まれることによって完成することを明らかにした。

次に α リング形成における PAC1-2 複合体および、PAC3-4 複合体の具体的な役割について解析した。PAC1-2 複合体と PAC3-4 複合体が共にコア中間体の形成時に組み込まれることから、これらの形成シャペロン複合体はコア中間体の形成に重要な役割を有していると考えられた。PAC1-2 複合体、PAC3-4 複合体のコア中間体形成における役割を明らかにするため、 $\alpha 1-3$ をノックダウンすることでコア中間体を蓄積させ、さらに PAC1 または PAC3 とのダブルノックダウンを行った。PAC1 と α サブユニットをダブルノックダウンした細胞ではコア中間体よりも大きな複合体が蓄積していたことから、PAC1-2 複合体はコア中間体の異常な集合を抑制していることが示唆された。一方で PAC3 と α サブユニットをノックダウンした細胞ではコア中間体が消失していたことから、PAC3-4 複合体はコア中間体の形成に必須の分子であることが示唆された。

さらに本研究ではプロテアソーム形成の局在制御についても検討した。まず、培養細胞において完成したプロテアソームは主に核に局在するが、形成途中のプロテアソームは細胞質に局在す

ることを示した。次に、形成途中のプロテアソームを細胞質に局在させる機構について検討するために、CP 形成に関与する因子のアミノ酸配列を確認した結果、PAC1 がロイシンリッチタンパク質であることを見出した。一般にロイシンリッチな配列は NES として機能しうることが知られており実際に PAC1 のロイシンリッチ配列[185-273]を Venus タンパク質に結合し、細胞内で発現させると、Venus の細胞質局在が観察された。このことから、PAC1 によって形成途中の α リングの細胞質局在が制御されていることが示唆された。この可能性について本研究では 2 つの実験系を用いて検討がなされた。第一に、HeLa 細胞において $\alpha 1$ 、 $\beta 2$ のシングルノックダウンまたは、PAC1 とのダブルノックダウンを行い、核と細胞質を分画したのちに native PAGE により解析した。 $\alpha 1$ または $\beta 2$ をノックダウンした細胞では、中間体は細胞質に局在していた一方で、PAC1 とのダブルノックダウンをした細胞では、分子量の大きな複合体が核に局在していた。これらの結果から PAC1 は α リングの中間体を細胞質に留める機能を有していることが明らかとなった。

また、PAC1 による形成途中の α リングの局在制御をより詳しく見るため、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。この実験を遂行するにあたり、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 細胞を新たに樹立した。この細胞において $\alpha 1$ 、 $\beta 2$ の単独または PAC1 とのダブルノックダウンを行い、ノックダウン後にすでに発現している $\alpha 4$ -Halo を無蛍光リガンドによってブロックした。一定時間後に赤色リガンドで標識することでブロックしてから期間に新規合成された $\alpha 4$ -Halo のみを特異的に検出しその局在を観察した。コントロール細胞では細胞質と核の両方に $\alpha 4$ -Halo のシグナルが検出され、 $\alpha 4$ -Halo が完成した CP と中間体の両方に組み込まれていることが示唆された。一方で $\alpha 1$ または $\beta 2$ をノックダウンした細胞では細胞質でシグナルが検出されており、CP の形成が進まなくなり、中間体が細胞質に蓄積していることが示唆された。 $\alpha 1$ 、 $\beta 2$ と PAC1 をダブルノックダウンした細胞では、核内のシグナルが強くなっていた。よってこの実験からも 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確かめられた。

以上の研究から、佐原一貴は以下の成果を示した。第一に、プロテアソーム α リングの形成機構を明らかにした。プロテアソーム α リングは最初に $\alpha 4-7$ と PAC1-2 複合体および PAC3-4 複合体が会合してコア中間体を形成し、コア中間体に $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 $\alpha 3$ が順番に組み込まれることによって形成される。また、コア中間体の形成において PAC1-2 複合体と PAC3-4 複合体はそれぞれ異なる役割を有していることが明らかにした。第二に、形成シャペロンである PAC1-2 複合体は α リングの形成を制御するだけではなく、形成途中の α リングを細胞質に留めておくという別の役割を持っていることを明らかにした。プロテアソーム活性阻害剤であるボルテゾミブは多発性骨髄腫の治療薬として臨床の場で用いられている。しかしながらプロテアソームは正常な細胞においても必須の分子であることから、様々な副作用が問題となっている。そこで新たな切り口からのプロテアソームの機能制御が創薬ターゲットとして期待されている。がん細胞においてはプロテアソームの合成も盛んに行われているため、プロテアソームの形成を阻害することで活性を阻害するよりも特異性が高く副作用の小さい治療を行うことができると考えられ、本研究により明らかになるメカニズムはガンに対する新たな分子標的薬のターゲットとして有力なものになることが期待される。以上、本研究は未だに課題が多く存在するプロテアソーム形成機構の研究に重要な貢献を成すだけでなく、新たな作用メカニズムによるプロテアソーム阻害剤開発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。