

氏名 小泉 峻

本論文は真核生物において必須のタンパク質分解酵素複合体であるプロテアソームの発現制御機構の解明を目的としたものである。プロテアソーム遺伝子群を転写制御する転写因子 Nrf1 の活性化因子の網羅的同定を試みた結果、アスパラギン酸プロテアーゼ DDI2 を新規 Nrf1 活性化因子として同定するに至った。

プロテアソームは 33 種類のサブユニットから構成される巨大なタンパク質分解酵素複合体である。複合体中にはタンパク質の分解を担うペプチダーゼ、基質となるユビキチン化タンパク質の捕捉を担うユビキチンレセプター、ユビキチン鎖の取り外しを担う脱ユビキチン化酵素など多様な機能を持つサブユニットが含まれており、これらが協調的に働くことで選択的な細胞内タンパク質分解を担っている。プロテアソームによるタンパク質分解は、細胞周期、免疫応答、タンパク質品質管理など実に多様な生命現象の調節に関わっており、細胞の生存に必須である。そのため、プロテアソームの活性は細胞内で厳密に制御されている。また、プロテアソーム活性異常はがんや神経変性疾患といった重篤な疾患の一因として考えられており、プロテアソーム活性制御機構の解明はこれら疾患の新規治療標的となりうる。プロテアソーム活性調節機構のひとつとして、プロテアソーム遺伝子群の発現制御機構が知られている。プロテアソーム活性が低下した際には、Nrf1 が活性化して 33 種類のプロテアソームサブユニットの発現を促進することで、代償的なプロテアソーム活性上昇を誘導する。Nrf1 は小胞体膜局在を示し、プロテアソームにより恒常的に分解される短寿命タンパク質である。プロテアソーム活性低下により分解が遅延して蓄積した Nrf1 は、何らかのプロテアーゼにより切断を受けることで小胞体膜から遊離して核へと移行し、プロテアソーム遺伝子群の発現上昇を引き起こす。しかしながら、Nrf1 活性化を担う具体的な分子およびその作動機構はこれまで十分に明らかとされていなかった。

本研究では、Nrf1 の活性化因子の網羅的探索を可能とするハイスループットスクリーニング系の構築を行った。Nrf1 が活性化に伴って小胞体から核に局在変化することに着目し、自動画像解析装置により取得した Nrf1 の細胞内局在を指標に、Nrf1 活性化因子の探索が可能であることを示した。また、構築したスクリーニング系を用いて実際にゲノムワイド siRNA スクリーニングを実施し、14 遺伝子を新規 Nrf1 活性化候補因子として同定することに成功した。この 14 遺伝子のうち DDI2 は唯一プロテアーゼ活性を持つことが予想される因子であった。Nrf1 活性化には何らかのプロテアーゼによる切断が必要であるため、DDI2 が Nrf1 の切断酵素である可能性を考慮して解析を進めた。

免疫染色により Nrf1 の細胞内局在を確認したところ、DDI2 ノックダウン細胞で Nrf1 の核移行が部分的に抑制されることが確認された。また、プロテアソーム阻害剤処理したコントロール細胞では、切断を受けて活性化した切断型 Nrf1 が蓄積する一方で、DDI2 ノックダウン細胞では切断前の全長型 Nrf1 が蓄積していたことから、DDI2 が Nrf1 の切断に必要な因子であることが確認された。

DDI2 はレトロウイルスのプロテアーゼ様構造を持つ RVP ドメインを有し、アスパラギン酸プロテアーゼ活性モチーフを有することから、アスパラギン酸プロテアーゼと予測された。また DDI2 は、ユビキチン様 (UBL) ドメインおよびユビキチン結合モチーフ (UIM) を有していた。そこで、これら各ドメインの Nrf1 切断への寄与を検討するため、RVP ドメイン内の活性部位にあたる 252 番目のアスパラギン酸残基をアスパラギンに変異させたプロテアーゼ活性欠損変異

体 (D252N)、UBL 欠損変異体 ( $\Delta$ UBL)、UIM 欠損変異体 ( $\Delta$ UIM) を作製した。DDI2 ノックダウン細胞に DDI2 野生型 (WT) を発現させたところ Nrf1 切断が回復した一方で、DDI2 D252N は Nrf1 切断を回復しなかったことから、DDI2 のプロテアーゼ活性が Nrf1 切断に必要であることが示された。また、DDI2  $\Delta$ UIM は DDI2 WT と同等に Nrf1 切断を回復したものの、DDI2  $\Delta$ UBL は Nrf1 切断を部分的にしか回復しなかったことから、UBL ドメインの機能も Nrf1 切断に必要であることが示唆された。

さらに DDI2 によるプロテアソーム発現制御機構を詳細に解析するため、CRISPR-Cas9 システムを用いて DDI2 欠損 (KO) 細胞、DDI2 WT ノックイン (KI) 細胞、DDI2 D252N KI 細胞を樹立した。コントロール細胞では、プロテアソーム阻害剤処理時に Nrf1 依存的にプロテアソーム遺伝子の発現上昇が認められる一方で、DDI2 KO 細胞ではこのプロテアソーム遺伝子の発現上昇が認められなかった。また、DDI2 WT KI 細胞ではコントロール細胞と同様のプロテアソーム遺伝子発現上昇が認められたものの、DDI2 D252N KI 細胞では発現上昇が認められなかったことから、DDI2 のプロテアーゼ機能が Nrf1 を介したプロテアソーム発現誘導に必須であることが示された。加えて、DDI2 KO 細胞および DDI2 D252N KI 細胞はコントロール細胞および DDI2 WT 細胞に比べてプロテアソーム活性が低下していることから、DDI2 のプロテアーゼ機能がプロテアソーム活性維持に重要な役割を果たすことが示された。

続いて DDI2 の機能制御機構の解析を行った。DDI2  $\Delta$ UBL が十分な Nrf1 切断機能をもたないことに着目し、DDI2 UBL ドメインの機能を解析したところ、UBL ドメインがユビキチン化タンパク質と結合能を持つことを示唆する結果を得た。また、ユビキチン化活性化酵素 (E1) 阻害剤処理またはユビキチン K48R 変異体の過剰発現により、ユビキチン鎖形成を阻害した場合に Nrf1 切断が抑制されたことから、DDI2 による Nrf1 切断にはユビキチン鎖の形成が必要であることが示唆された。さらに、DDI2 の局在を細胞分画法により検討したところ、プロテアソーム阻害剤処理時に DDI2 が小胞体を含むミクロソーム画分に顕著に蓄積することを見出した。このことから、DDI2 はプロテアソーム活性低下時に小胞体に局在する可能性が示唆された。一方で、DDI2  $\Delta$ UBL はプロテアソーム阻害剤処理時であってもミクロソーム画分への蓄積が認められなかったことから、DDI2 UBL ドメインがプロテアソーム活性低下時の局在変化に必要であることが示された。また、E1 阻害剤処理によっても DDI2 のミクロソーム画分への蓄積が抑制されることから、ユビキチン鎖の形成が DDI2 の局在変化に必要であることが示された。これらの結果から、DDI2 UBL ドメインはユビキチン鎖の認識および局在制御といった機能を介して、Nrf1 切断に寄与する可能性が提示された。

以上の結果から、小泉峻は以下の成果を示した。まず、Nrf1 の局在を指標とした独自のスクリーニング系を用いて、アスパラギン酸プロテアーゼ DDI2 を新規 Nrf1 活性化因子として同定した。そして DDI2 のプロテアーゼ活性が Nrf1 の切断に必須であることを証明し、従来不明であった Nrf1 活性化機構の実態を解明した。また、DDI2 UBL ドメインがユビキチン化タンパク質との結合、プロテアソーム活性低下時の小胞体局在に必要であることを示し、UBL ドメインを介した DDI2 機能制御機構の一端を明らかにした。本研究は、これまで未知であった Nrf1 活性化機構を明らかにするとともに、新規のプロテアソーム制御機構の概念をもたらしたといえる。また、Nrf1 を介したプロテアソーム発現上昇は多発性骨髄腫治療薬として用いられるプロテアソーム阻害剤への耐性機構の一因と考えられており、本機構はプロテアソーム阻害剤耐性を克服する新たな創薬標的としても期待される。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。