

博士論文（要約）

論文題目 プロテアソーム発現制御転写因子Nrf1の活性化機構

氏名 小泉 峻

【序論】

ユビキチン・プロテアソーム系は真核生物における主要なタンパク質分解経路であり、細胞内タンパク質の分解の制御を通じて、多彩な生命現象の進行に必須の役割を担う。分解の実行因子である 26S 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複合体であり、基質であるユビキチン化タンパク質の認識、脱ユビキチン化、ペプチド鎖の解きほぐし、そしてペプチダーゼといった機能を持つサブユニットが協調して働くことで、選択的なタンパク質分解を行う。プロテアソームの機能異常は種々の疾患との関連が見出されており、がんや神経変性疾患においてプロテアソームの異常活性が確認されている。しかし、哺乳類プロテアソームの活性制御機構は未だ十分解明されていない。近年、プロテアソームサブユニットをコードする全 33 遺伝子の発現亢進に転写因子 Nuclear factor erythroid 2-related factor 1 (Nrf1)が必要であることが報告された。Nrf1 は小胞体膜局在タンパク質であり、プロテアソーム活性低下時に活性化して核移行する。しかし、細胞内局在変化を伴う Nrf1 転写活性化の分子機構はこれまで十分明らかとなっていなかった。そこで本研究では、Nrf1 細胞内局在を指標としたゲノムワイドスクリーニングにより、Nrf1 の転写活性を制御する新規因子の同定を行い、未知のプロテアソーム活性制御機構を解明することを目指した。

【結果・考察】

1. Nrf1 細胞内局在変化を指標としたハイスループットスクリーニング系の構築

Nrf1 は恒常的にプロテアソームにより分解されるタンパク質であるが、プロテアソーム活性が低下した際には AAA-ATPase である p97 依存的に小胞体膜外に引き出されたのち、切断を受けて活性化し、核移行する。そこで Nrf1 の細胞内局在制御因子を探索することで、Nrf1 の活性化機構を明らかにしようと考えた。

Nrf1 を蛍光免疫染色して細胞内局在を観察すると、プロテアソーム阻害剤 bortezomib 処理時に Nrf1 は主に核内に確認された。一方で、既知の Nrf1 活性化因子である p97 をノックダウンすると、Nrf1 は主に小胞体と思われる核外の領域に確認された。このことから、Nrf1 の細胞内局在は Nrf1 の転写活性を反映するものであることが確認された (Fig. 1A)。そこで、自動画像解析装置を用いて、核染色を基準に核領域と核外領域を規定し、Nrf1 の蛍光シグナルの核/核外比を算出することで、Nrf1 の活性化を定量評価する解析系を構築した (Fig. 1B)。本解析系は十分な精度 (Z' factor > 0.5) で Nrf1 の核局在抑制を検出可能であり、網羅的スクリーニングに適応可能であることを確認した。

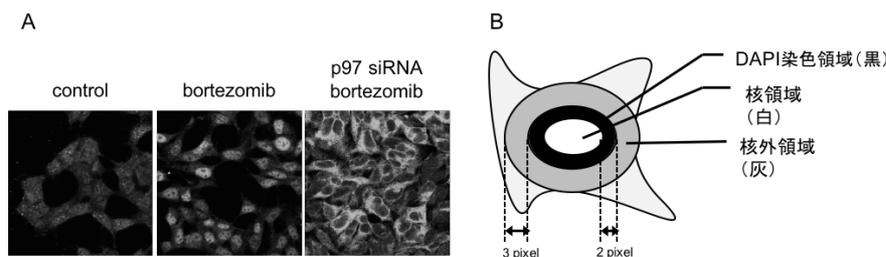


Fig. 1 Nrf1 細胞内局在を指標としたスクリーニング系の構築

(A) HEK293A 細胞を p97 siRNA および bortezomib 処理し、Nrf1 の蛍光免疫染色を行った。
(B)取得画像において DAPI 染色領域より 2 pixel 内側を核領域、DAPI 領域外縁より 3 pixel 幅を核外領域と規定した。

2. Nrf1 活性化候補因子として 14 遺伝子を同定した

上記の解析系を用いてゲノムワイド siRNA スクリーニングを実施した。1 次スクリーニングでは、ヒト約 18,000 遺伝子に対し各 4 種の siRNA がプールされた siRNA ライブラリーを用いて、HEK293A 細胞における Nrf1 の核移行に必要な遺伝子の探索を行い、127 の候補遺伝子を得た。続いて 2 次スクリーニングでは、siRNA オフターゲットによる偽陽性を排除するため、2 種の細胞株 (HEK293A および HT1080) において 1 次スクリーニングで用いた 4 種の siRNA を個別に解析した。複数の siRNA において Nrf1 の核局在が抑制されたものを陽性とし、17 の候補遺伝子を得た。さらに 3 次スクリーニングにおいて、プロテアソーム遺伝子発現量を抑制する siRNA を real-time PCR により探索し、14 遺伝子を Nrf1 活性化に関与する最終候補遺伝子として同定した (Fig. 2)。

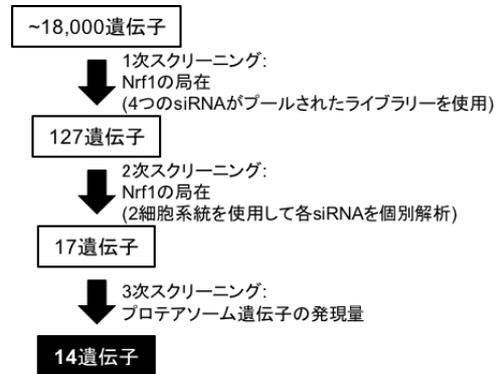


Fig. 2 スクリーニングの概略
多段階の解析を経て候補遺伝子の絞り込みを行い、最終的に 14 遺伝子を同定した。

3. アスパラギン酸プロテアーゼ DDI2 のプロテアーゼ活性は Nrf1 の切断に必要である

Nrf1 活性化時には、N 末に存在する膜貫通ドメインが切断されて、転写活性ドメインを持つ C 末側の領域が小胞体膜から遊離することが知られるが、その具体的な実行因子は明らかとなっていなかった。そこで同定した 14 遺伝子のうち、アミノ酸配列上唯一プロテアーゼ活性を持つと予測される因子 DDI2 に着目し、Nrf1 切断への関与を想定して解析を進めることとした。DDI2 は N 末にユビキチン様 (ubiquitin-like; UBL) ドメイン、中央部にアスパラギン酸プロテアーゼ活性を有すると予測される retroviral-like protease (RVP) ドメインを持つタンパク質である (Fig. 3A)。

まず、DDI2 ノックダウン細胞において Nrf1 を免疫染色したところ、Nrf1 の核移行が部分的に抑制されていた。またイムノブロットによる解析の結果、bortezomib 処理したコントロール細胞では主に活性化した切断型 Nrf1 が蓄積しているのに対し、DDI2 ノックダウン細胞においては、切断型 Nrf1 量が減少し、切断を受けていない全長型 Nrf1 が蓄積していた (Fig. 3B lane 1-3)。Nrf1 の切断は野生型 DDI2 の発現により回復した一方で、プロテアーゼ活性部位と予測される 252 番目のアスパラギン酸残基に変異を持つ D252N 変異体の発現では回復しなかった。また、UBL ドメイン欠損変異体 (Δ UBL) の発現は部分的に Nrf1 切断を回復した (Fig. 3B lane 4-6)。以上の結果から、DDI2 プロテアーゼ活性が Nrf1 切断に必要なであ

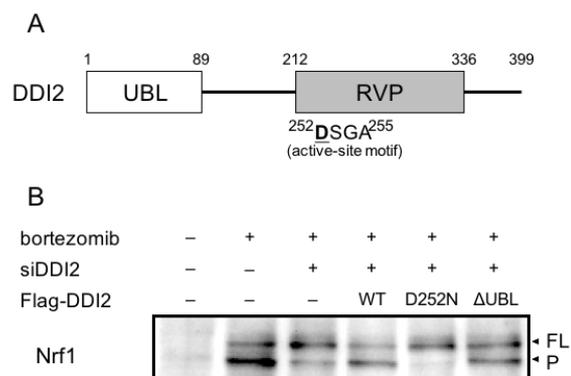


Fig. 3 DDI2 のプロテアーゼ活性が Nrf1 切断に必要なである
(A) DDI2 のドメイン構造の模式図。
(B) HEK293A 細胞において DDI2 ノックダウン、各 DDI2 変異体の過剰発現、および bortezomib 処理を実施した。細胞抽出液を Nrf1 抗体でイムノブロットした。FL: 全長型 Nrf1、P: 切断型 Nrf1

ることが示された。また、DDI2 の UBL ドメインは
何らかの機構を介して、Nrf1 の切断に寄与するこ
が示唆された。

4. DDI2 プロテアーゼ機能欠損によりプロテアソーム発現誘導が抑制される

プロテアソーム活性制御における DDI2 機能の役
割を明らかにするため、CRISPR-Cas9 システムを用
いて DDI2 ノックアウト (KO) 細胞、DDI2 野生型
(WT) ノックイン (KI) 細胞、DDI2 D252N 変異型
KI 細胞を樹立した。DDI2 WT KI 細胞では bortezomib
処理時に切断型 Nrf1 が蓄積する一方で、DDI2 KO 細
胞および DDI2 D252N KI 細胞では全長型 Nrf1 が蓄
積していた。

続いて、これらの細胞を用いてプロテアソーム発
現量を検討した。DDI2 WT KI 細胞においては、
bortezomib 処理時に Nrf1 依存的なプロテアソーム遺
伝子の発現上昇が確認される一方で、DDI2 KO 細胞
および DDI2 D252N KI 細胞においてはプロテアソ
ーム遺伝子発現上昇が認められなかった (Fig. 4A)。

さらに、DDI2 KO 細胞および DDI2 D252N KI 細胞においては、プロテアソームのペプチダーゼ活性が
低下していた (Fig. 4B)。以上より、プロテアソーム機能維持に DDI2 のプロテアーゼ活性が必要であ
ることが示された。

5. Nrf1 活性化にはユビキチン化反応が必要である

DDI2 は細胞内で Nrf1 切断を担うものの、*in vitro* にお
いてプロテアーゼ活性を示さなかった。そこで細胞内の
DDI2 活性化条件を明らかにするべく、より詳細な機能解
析を実施した。まず DDI2 ΔUBL が十分な Nrf1 切断活性
を持たないことに着目し (Fig. 3B)、UBL ドメインの機
能解析を行った。酵母における DDI2 オルソログの DDI1
の UBL ドメインはユビキチンに結合することが知られ
るため、ヒト DDI2 も同様のユビキチン結合能を持つか
検討した。HEK293A 細胞に Flag-DDI2 を過剰発現して

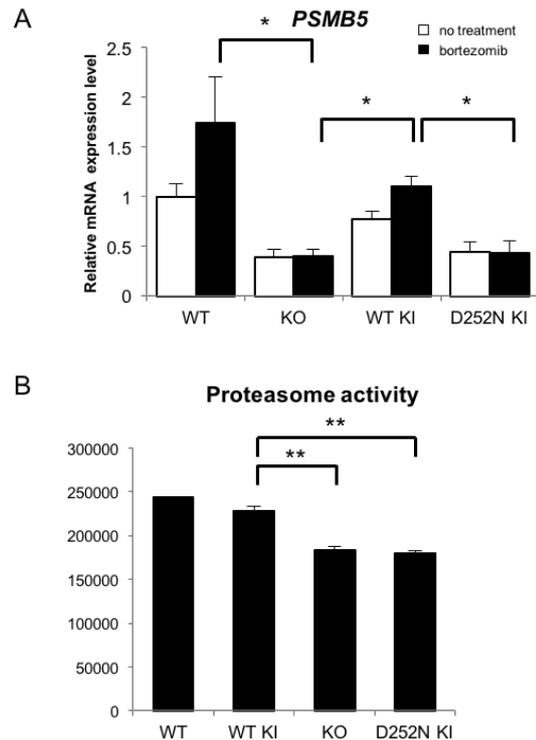


Fig. 4 DDI2 プロテアーゼ活性はプロテアソーム機能維持に必要である

(A) 野生型 HCT116 細胞 (WT)、DDI2 KO 細胞、DDI2 WT KI 細胞、DDI2 D252N KI 細胞をそれぞれ bortezomib 処理し、プロテアソーム遺伝子 PSMB5 の mRNA 量を測定した。
(B) 上記の細胞の抽出液を用いて Suc-LLVY-AMC 分解活性を測定した。mean ± SEM, n=3, *P<0.05, **P<0.01

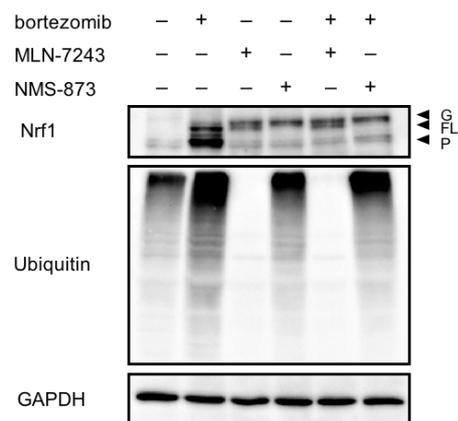


Fig. 5 Nrf1 切断にはユビキチン化反応が必要である

HEK293A 細胞を bortezomib、MLN-7243 (E1 阻害剤)、NMS-873 (p97 阻害剤) 処理し表記の抗体でイムノブロットを行った。

G: 糖鎖型 Nrf1, FL: 全長型 Nrf1, P: 切断型 Nrf1

免疫沈降を行ったところ、DDI2 WTはユビキチン化タンパク質と共沈降したのに対し、DDI2 ΔUBLはユビキチン化と共沈降しなかった。このことから、ヒト DDI2 の UBL ドメインもユビキチン化タンパク質との結合にすることが示唆された。そこで、DDI2 UBL ドメインの結合するユビキチン鎖の形成を阻害した場合に、DDI2 依存的な Nrf1 切断が影響を受けるか検討した。HEK293A 細胞をユビキチン活性化酵素 (E1) 阻害剤 MLN-7243 処理したところ、bortezomib で同時処理した場合であっても切断型 Nrf1 の蓄積が認められず、全長型 Nrf1 が蓄積していた。このことから、Nrf1 切断にはユビキチン化システムが必要であることが示された (Fig. 5)。

6. DDI2 はプロテアソーム活性低下時に小胞体へ局在する

さらに詳細な分子機構を明らかにするため、DDI2 の細胞内局在について解析を進めた。HCT116 細胞を用いて細胞分画を行ったところ、DDI2 は小胞体を多く含むマイクロソーム画分に通常時はほとんど存在しないのに対し、bortezomib 処理時にはマイクロソーム画分に顕著に蓄積することを見出した (Fig. 6)。Nrf1 の切断は小胞体膜上で生じることから、DDI2 の局在変化は効率的な Nrf1 切断に寄与していると想定される。また、bortezomib 処理時の DDI2 のマイクロソーム画分への蓄積は、E1 阻害剤 MLN-7243 処理により抑制されたことから、DDI2 の局在変化にユビキチン化システムが必要であることが示唆された。

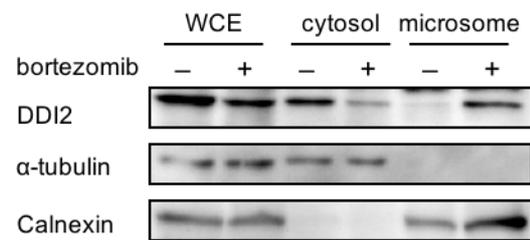


Fig. 6 DDI2 は bortezomib 処理時に小胞体画分に蓄積する

HCT116 細胞を bortezomib 処理した後、細胞分画を行い、表記の抗体でイムノブロットを行った。
WCE: 全細胞抽出液、cytosol: 細胞質画分、microsome: ミクロソーム画分

【総括】

本研究で私は、Nrf1 局在制御因子の網羅的探索により、DDI2 を新規 Nrf1 活性化因子として同定した。またその後の解析により、DDI2 によるプロテアソーム転写制御という新しいプロテアソーム活性制御機構を提示した。近年、プロテアソーム阻害剤が多発性骨髄腫の治療薬として目覚ましい効果をあげている一方で、薬剤耐性の獲得が問題となっている。Nrf1 依存的なプロテアソーム発現亢進は耐性獲得の一因と考えられていることから、今回同定した DDI2 は新しい腫瘍治療薬の標的としても期待される。