

本論文は、真核細胞において必須のタンパク質分解酵素であるプロテアソーム遺伝子群の発現に関与する因子、特に発現を正に制御する転写因子を同定することを目的とし、ゲノムワイドなヒト siRNA ライブラリーを用いたスクリーニングを実施し、プロテアソームの恒常的な発現に関与する有力な候補転写因子の同定に至ったものである。

ユビキチン化タンパク質を選択的に分解する 26S プロテアソームは、タンパク質分解を実行するコア粒子である 20S プロテアソームと、ユビキチン鎖の捕捉・ATPase による基質の巻き戻し・20S プロテアソーム内への送り込み・基質からのユビキチン鎖の切り離しなどタンパク質分解のための前処理を行う 19S 複合体から形成されている。このような複雑な工程を一つの構造体で実施するために、プロテアソーム自体が極めて複雑精緻な構造を有している。

20S プロテアソームは7種の $\alpha$ サブユニット $\alpha 1$ - $\alpha 7$ および7種の $\beta$ サブユニット $\beta 1$ - $\beta 7$ がそれぞれリング状構造を形成し、それが $\alpha \beta \beta \alpha$ と4層に重なった樽状構造を持つ。触媒活性を持つのは $\beta 1$ 、 $\beta 2$ 、 $\beta 5$ サブユニットでそれぞれカスパーゼ様、トリプシン様、キモトリプシン様の活性を示す。一方、19S 複合体は Rpt1-Rpt6, Rpn1-Rpn15(但し、Rpn4, Rpn14 を除く)の計 19 種類のサブユニットから形成されている複合体である。

19S 複合体はさらに蓋部と基底部に分けられる。基底部は 6 種の相同な ATPase を含み、先に述べたように基質の巻き戻しや 20S プロテアソーム内への基質の送り込みを担っていると考えられている。一方、蓋部には脱ユビキチン化酵素である Rpn11 を除き、配列から各サブユニットの機能を類推出来るようなものはなく、何故このように大きな複合体を形成する必要があるのか、未だに不明である。

このような複雑なサブユニット構成を有するプロテアソームが正しく形成されるためには、それぞれサブユニットの発現量が厳密に制御されている必要がある。プロテアソームタンパク質の発現量の制御に関わるプロテアソームの転写調節に関する研究は、酵母についてなされており、Rpn4 タンパク質がプロテアソームの基底状態の発現、およびストレス時における発現誘導に関わっていることがこれまで明らかになっている。しかし、哺乳類細胞においては Rpn4 のホモログが存在しておらず、Nrf1、Nrf2 がストレス時における発現誘導に関わっていることがわかっているが、体細胞における基底状態のプロテアソーム遺伝子発現制御がどのような転写因子によって担われているかはこれまでわかっていない。

これまでの研究から老化にしたがってプロテアソームの活性の低下や発現量の低下が見られること、胚細胞においてはプロテアソームの発現量と活性が上昇し多能性の維持に重要であること、また癌細胞においてはプロテアソームタンパク質の発現量が顕著に上昇していることがわかっている。すなわち、プロテアソーム複合体の発現調節、活性の制御の理解は、胚発生、老化の過程や癌化の過程の理解にもつながる重要な研究課題であった。

このプロテアソームサブユニットの発現制御を研究するために、まずレポーターベクターの作製と評価を行った。プロテアソーム遺伝子 *PSMB5*、*PSMB1*、*PSMC5* および *PSMD3* のプロモーター領域を firefly luciferase につなぎ、各遺伝子の発現を観察するレポーターベクターを構築した。これらレポーターベクターを安定的に保持した HEK293 細胞を作製し、基底状態の転写活性、ストレスによる発現誘導を luciferase の発光により観察できるか評価した。種々の予備実験の結果から、*PSMB5* のプロモーター領域を用いたレポーターが、基底状態およびストレ

ス時の発現誘導を感受性よく検出することが明らかになった。*PSMB5*は 20S プロテアソームの  $\beta 5$  サブユニットをコードする遺伝子である。

この *PSMB5* レポーターベクター安定保持 HEK293 細胞を用いて、siRNA ライブラリ (Thermo 社) による網羅的なノックダウンと、その結果変化する  $\beta 5$  プロモーターの活性を綿密に調べることにした。プロテアソーム発現調節に影響を与える遺伝子の大規模なノックダウンによるスクリーニング実験は前例のないことであり、挑戦的かつ意義深い研究である。

18,236 遺伝子についてノックダウンを行い  $\beta 5$  プロモーターの活性変化をルシフェラーゼレポーターにより観察した結果、169 遺伝子のノックダウンが  $\beta 5$  プロモーターの活性を低下させ、333 遺伝子のノックダウンが  $\beta 5$  プロモーターの活性を増加させることが観察された。この研究は *PSMB5* 遺伝子の発現を正に制御する転写因子の同定を目的としていることから、 $\beta 5$  プロモーターの活性を低下させた 169 遺伝子について 2 次スクリーニング実験を行った。2 次スクリーニングでは独立した 3 回の実験を行い、統計学的に意味のある変化が認められた 133 遺伝子に絞り込んだ。133 遺伝子の siRNA 中には細胞毒性を発揮し、実験時に細胞数が減少することから擬陽性を示すものが疑われた。そこで、3 次スクリーニングでは細胞数をカウントし、レポーターアッセイの結果を細胞数で補正し解析し直した。3 次スクリーニングの結果、*PSMB5* 遺伝子の発現を正に制御する遺伝子として 48 遺伝子に絞り込むことができた。さらにこれら 48 遺伝子について過去の報告をしらべ、DNA 結合ドメインがないかなど転写産物のドメイン解析をした結果、23 遺伝子が転写制御に関わる遺伝子の候補として絞り込むことに成功した。

これら 23 遺伝子が、*PSMB5* レポーターだけではなく内在性のプロテアソーム遺伝子の転写に関わっているか確かめる必要がある。また siRNA によるノックダウンは時に off-target 効果が問題となる。そこで、使用する siRNA の製品を ambion 社のものに変更し、HEK293 細胞を用いた定量的 RT-PCR 実験を行い、20S および 19S 複合体サブユニットの mRNA 量を調べた。この RT-PCR 実験の結果から、唯一 GPBP1L1 遺伝子のノックダウンが、*PSMB5* のみならず 20S プロテアソームの *PSMB2*、19S 複合体の *PSMC6* および *PSMD11* の転写活性を顕著に低下させることがわかった。すなわち GPBP1L1 がプロテアソームサブユニット転写の正の制御因子であることが新たに明らかになった。GPBP1L1 のノックダウンは、HEK293 細胞だけでなく HeLa 細胞を用いた場合もプロテアソームサブユニットの発現量を低下させることから、細胞特異的な結果ではないこともわかった。

mRNA 量の変化は顕著なタンパク質の発現量変化や活性の変化に関連しないことがある。そこで、GPBP1L1 のノックダウンがプロテアソームサブユニットの発現量の低下や、プロテアソームの活性の低下に影響を及ぼすか HEK293 細胞を用いて生化学的実験により調べた。興味深いことに GPBP1L1 のノックダウンは、複合体に取り込まれるまえの未成熟型の  $\beta 5$  サブユニットの発現量を顕著に低下させた。未成熟型の  $\beta 5$  サブユニットは新規に合成された  $\beta 5$  サブユニット量を反映していると考えられ、この結果は GPBP1L1 がプロテアソームサブユニットの基底状態の発現量を正に制御することを強く示唆した。さらに、GPBP1L1 のノックダウンは、プロテアソーム活性の低下を引き起こすことも新たに明らかになった。

以上の研究により、多数のサブユニットから構成されるプロテアソーム複合体がどのように発現制御をうけているのか、その仕組みについて丹念に得た結果から、転写に関わる因子の同定に成功した。これらの理解は、真核生物、特にヒトにおいてもつ重要な生物学的意義、すなわち、胚や iPS 細胞の多能性維持、癌化のメカニズム、個体の寿命についてさらなる理解の進展に資するところが大きい。よってこれを行ったコグレク ラリッサは博士 (薬学) の学位を得るにふさわしいと判断した。