

学位論文題名

細胞分裂周期の制御における
プロテアソームの機能に関する研究

学位論文内容の要旨

はじめに

細胞分裂の進行を制御する蛋白質の多くは短寿命であり、例えば、サイクリン、Mos、p53、Mycなどは分解のマーカ―としてポリユビキチン鎖の付加をうけ、ATP 依存的に分解されると報告されている。この時、ポリユビキチン化蛋白質を分解する細胞内プロテアーゼとして26Sプロテアソームが機能すると考えられているが、細胞周期の制御機構への関与についてはまだ明解な解答が得られていない。本論文では、細胞分裂周期の進行の制御におけるプロテアソームの機能を明らかにする目的で、細胞周期が極めて良く同調した受精卵が多く得られるマボヤ卵を実験材料に用いて、卵割期あるいは減数分裂期におけるプロテアソームの細胞内局在性とプロテアーゼ活性の変化を解析した。その結果、細胞分裂周期の進行に伴ってプロテアソームが局在性と活性を変化させること、そして、その変化は、細胞内情報伝達システムを介するプロテアソームの20S-26S変換に基づくことを明らかにした。細胞周期の進行とプロテアソームとの連関が本研究で初めて示された。

マボヤ胚におけるプロテアソームの細胞周期依存的な局在性の変化

最初に、卵割期の胚におけるプロテアソームの局在性を明らかにするために、マボヤ卵20Sプロテアソームに対するモノクローナル抗体を作成して免疫細胞化学を行なった。分裂直後の間期(interphase)の胚では、サイトソルに広く抗原の分布が認められる一方で、核にも強い特異蛍光が観察された。前期(pro-

phase)では核内の特異蛍光は消失した。前中期(prometaphase)では核膜が崩壊し、サイトソル中に均一に抗原の分布が観察されるのみであった。ところが、染色体が赤道面上に並び始める中期(metaphase)では、染色体の周辺に強い特異蛍光の局在化が観察された。その2分後においては、染色体周辺ばかりではなく分裂装置周辺にも特異蛍光が観察された。この時、抗プロテアソーム抗体と抗チューブリン抗体を用いて2重染色を行ってプロテアソームと分裂装置を構成する微小管との関係を調べたところ、プロテアソームは染色体領域に局在するとともに、分裂装置の紡錘体と星状体周辺にも分布していることが明らかになった。染色体が両極へ移動し始める後期(anaphase)では、染色体や分裂装置周辺に観察されていたプロテアソームの特異蛍光はほぼ消失した。ところが、核膜が再構築される終期(telophase)では、間期の場合と同様に新しくできた核内にプロテアソームの強い特異蛍光が再び認められた。以上の免疫細胞化学の結果より、プロテアソームはマボヤ卵割期の細胞分裂の進行に伴って各分裂ステージに特有な局在性を示すことが明らかになった。

マボヤ胚における26Sプロテアソームの細胞周期依存的な活性変化

次に、プロテアソームの活性がマボヤ胚の細胞周期に伴って変化するか否かについて検討した。第二卵割期において、同調的に分裂しているマボヤ胚を5分毎に採取して超遠心分離によりプロテアソームを含む高分子量蛋白質画分を得た。その画分を用いてプロテアーゼ活性を測定した。その結果、プロテアソームの活性は、一回の卵割周期の前期と中期において2回上昇すること、その活性変化はATPに依存的であることが明らかになった。

プロテアソーム活性の変化がプロテアソームの量的変化によるものか、あるいはプロテアソームが有する活性自身の変化によるものかを明らかにするために、ウェスタンブロッティングを行い、プロテアソームの量的変化を解析した。その結果、プロテアソームの蛋白質量は細胞分裂周期を通じて一定であることが明らかになった。この結果は、プロテアソームの活性化が量的変化の結果ではなく質的な変化によることを示唆している。

次に、プロテアソームの細胞周期依存的な活性変化が、20Sプロテアソーム

と26Sプロテアソームのどちらに由来するかを明らかにするために、活性化が検出される前期あるいは中期、および、プロテアソームの活性が低い前中期あるいは後期のそれぞれの胚から調製した高分子量蛋白質画分について、Superose 6によるゲルろ過を行い、20Sおよび26Sプロテアソームを相互に分離し、それぞれの画分のプロテアーゼ活性を測定した。その結果、26Sプロテアソームの分子量に相当する領域の活性が細胞周期の各ステージで大きく変化することを見いだした。即ち、これらの結果は、主に26Sプロテアソームの活性が細胞周期の進行に伴って変化していることを示している。

細胞内カルシウムイオン濃度の上昇に伴うプロテアソームの分子形態の変化

第一減数分裂中期で分裂を停止しているマボヤ未受精卵にカルシウムイオノフォア(A23187)を添加すると、卵が活性化されて中期から後期への移行が誘起される。この過程においても、26Sプロテアソームに由来する活性の変化が観察された。即ち、カルシウムイオノフォア添加直後に活性が上昇し、引き続き減少した。この26Sプロテアソームの活性の変化が26Sプロテアソームの量的変化によるものか否かを明らかにするために、抗プロテアソーム抗体によるウエスタンブロット解析を行なった。その結果、26Sプロテアソームの蛋白質量はカルシウムイオノフォア添加直後で増加し、その後減少すること、一方、20Sプロテアソームの場合は逆に添加後減少し、その後増加することが明らかになった。この26Sプロテアソームの量的変化のパターンはプロテアーゼ活性の変化のパターンとよく一致している。細胞内の20S型と26S型とを合わせたプロテアソームの全蛋白質量は細胞周期を通じて一定であるので、これらの結果は、分裂中期から後期への移行に伴ってプロテアソームが20S型から26S型へ、さらに26S型から20S型へと相互変換することを示している。さらに、減数分裂の再開を阻害する最小濃度のW-7(カルモデュリン阻害剤)で未受精卵を前処理すると、カルシウムイオノフォアの添加で誘起されるこのような変化が阻害されることが明らかになった。即ち、プロテアソームの2つの型の相互変換がカルシウム・カルモデュリン系を介して誘起される可能性が示された。26Sプロテアソームはユビキチン化された基質蛋白質を分解する本体であると考えられるの

で、26Sプロテアソームは細胞周期の特定の時期にカルシウムイオンの上昇という刺激を介して20Sプロテアソームから再構成され、ユビキチン化された蛋白質を分解していると考えられる。細胞周期の中期から後期への移行にはサイクリンBの分解が必須であるが、サイクリンBは分裂中期において染色体および分裂装置上に集積すると報告されている。また、サイクリンの分解はカルシウムシグナリングを介して誘起されると考えられているが、以上のようなサイクリンの挙動と、本研究で明らかになったプロテアソームの分裂中期での局在化や活性化のタイミングがよく一致していることから、プロテアソームは、その機能の一つとして、サイクリン分解を触媒することによって細胞周期を制御していると考えられる。

学位論文審査の要旨

主査 教授 横 沢 英 良
副査 教授 長 沢 滋 治
副査 助教授 高 橋 和 彦
副査 助教授 沢 田 均

学位論文題名

細胞分裂周期の制御における プロテアソームの機能に関する研究

細胞周期の進行には蛋白質の分解が必須である。例えば、M期促進因子の調節蛋白質サイクリンが分裂中期で分解されることは、細胞が次の分裂ステージに進むために必須の現象である。細胞分裂を調節する蛋白質の多くは短寿命であり、その機能は合成と分解の調節の上に規定されているが、それら蛋白質の分解は、多くのユビキチン分子によって付加（ポリユビキチン化）された後になされると考えられている。ポリユビキチン化蛋白質を分解する細胞内プロテアーゼとして、プロテアソームが有力な候補として考えられているが、その細胞内での生理機能の詳細、特に細胞周期の制御機構への関与については不明な点が多い。

本論文提出者は、細胞周期におけるプロテアソームの役割を解明し、その調節機構を明らかにする目的で、細胞内局在性、プロテアソーム活性、およびプロテアソームの分子状態の変化を指標にして、細胞周期の制御におけるプロテアソームの機能に関する一連の研究を展開し、以下の成果を納めた。

(1) マボヤ卵20Sプロテアソームに対するモノクローナル抗体を作成し、それを用いた免疫細胞化学的方法によりマボヤ卵の卵割（S期とM期からなる体細胞分裂）の過程でのプロテアソ-

ムの局在性を解析した。その結果、プロテアソームは細胞周期の進行に伴って核や分裂装置上に一過的に集積すること、特に分裂中期の染色体周辺に強い局在性を示すことを明らかにし、プロテアソームの細胞周期依存的な局在性の変化を初めて報告した。さらに、細胞周期依存的なプロテアソームの局在性の変化が、卵割期だけではなく、より発生の進んだ神経胚などの体細胞分裂においても同様に観察されることを明らかにした。

(2) プロテアソームを迅速かつ簡易に濃縮する超遠心分離法を用いて細胞内のプロテアソームの活性を容易に測定する方法を開発し、それを用いてマボヤ卵内におけるプロテアソームの特徴づけを行い、卵内に26Sプロテアソームが存在することを明らかにした。

(3) 卵割の進行に伴うプロテアソーム活性の変動を解析し、プロテアソームが一回の分裂周期で2回(分裂前期と分裂中期)活性化されることを明らかにした。また、活性の変動は細胞内のプロテアソーム(20Sプロテアソームと26Sプロテアソーム)の全蛋白質量の変化を伴わず、分子状態の変化、即ち、26Sプロテアソームの形成に伴う活性化によることを明らかにした。

(4) カルシウムイオノフォアで卵の減数分裂を再開させ、分裂周期を分裂中期から後期に移行させたときに、プロテアソームの活性と分子状態が大きく変化すること、その変化は20Sプロテアソーム-26Sプロテアソームの相互変換によることを明らかにした。さらに、そのプロテアソームの相互変換は、細胞内カルシウムイオン濃度の変化と密接に関係していることを初めて明らかにした。

これらの結果は、プロテアソームの活性制御が細胞周期の進行に密接に関係し、その細胞内局在性および活性が細胞内カルシウムシグナリングシステムによって厳密に制御されていることを示している。

以上の新知見およびそれを得るために用いた研究技法は、細胞周期におけるプロテアソームの活性制御機構の解析にとどまらず、

細胞の生理状態の変化に伴う広範な現象の解析に広く利用し得るものであり、細胞の生存と増殖に重要な機能を果たしている蛋白質分解系の役割を解明する上で重要な寄与をなすものである。審査員一同このことを高く評価し、本論文提出者が博士（薬学）の称号を受けるにふさわしいものと一致して判断した。