

学 位 論 文 題 名

ユビキチン・プロテアソームシステムによる蛋白分解の機構と

生理的役割に関する研究

学位論文内容の要旨

1. はじめに

細胞周期の制御や細胞増殖・癌化にかかわる短寿命蛋白質(サイクリン、Myc、p53など)、あるいは、誤翻訳、放射線やUV照射、熱ショックなどにより生成する異常蛋白質は、ユビキチン(Ub)・プロテアソームシステムにより特異的かつ迅速に分解されると考えられている。この分解システムでは、最初に、E1、E2、E3 からなるマルチUb 化酵素群が基質蛋白質にUb 分子を鎖状に付加する。次に、26S プロテアソームが、生成したマルチUb 鎖を認識し、マルチUb 化された基質蛋白質をATP 依存的に分解する。マルチUb 鎖を有する蛋白質を認識し分解する26S プロテアソームは、20S プロテアソーム(高分子量多機能プロテアーゼ複合体)を中央に持ち、その両端に20S プロテアソームの活性を制御する制御サブユニット複合体が会合した巨大分子複合体である。今まで、26S プロテアソームの特異的基質であるマルチUb 化基質蛋白質の調製が確立されていなかったため、26S プロテアソーム特異的な活性の測定は困難であった。また、本分解システムが発見されて以来、マルチUb 化される基質蛋白質を同定あるいは特異的に測定するためのツールが求められてきた。さらに、26S プロテアソームに含まれる制御サブユニット群はどの様にマルチUb 化蛋白質分解活性を制御するかについても不明であった。そこで本研究では、それらの問題を解決するために、以下の実験を行った。

2. マルチUb 鎖を認識するモノクローナル抗体の作成

ウサギ網状赤血球から、Ub アフィニティクロマトグラフィーなどを行なうことにより、高い比活性を有するUb 化酵素群の精製法を確立した。このUb 化酵素群は基質蛋白質を効率よくマルチUb 化し、生成したマルチUb 化基質蛋白質は、ブタ心筋26S プロテアソーム標品によりATP 依存的に分解された。調製した、マルチUb 化リゾチームを免疫原とし、遊離のUb とは反応せず、マルチUb 鎖のみを特異的に認識するモノクローナル抗体を作成した。

3-1、HeLa細胞を用いた熱ショック時における細胞内ユビキチン化蛋白質の解析

Ub は、熱処理によって、発現が誘導されることから、熱ショック蛋白質の一つに数えられる。さらに、ユビキチンが熱ショックで誘導される理由は、ストレスにより細胞内に生じる変性蛋白質を即座に分解し、排除するためだと考えられている。そこで、熱ショックにより生じる変性蛋白質がマルチUb 化されて分解されるかを明らかにするために、作成したマルチUb 鎖特異的抗体を用いて、熱ショックの温度の変化とマルチUb 化蛋白質の生成との関連を解析した。その結果、43℃以上の熱ショックではマルチUb 化蛋白質は一過的に細胞質に増加したが、37℃に戻して培養すると、マルチUb 化蛋白質はもとの値にもどった。一方、分子量23KのUb 化蛋白質が熱ショック直後に消失し、37℃に戻して培養すると再び出現した。しかも、熱ショッ

ク温度が43℃では2時間、44℃では4時間、45℃では8時間以内に再び出現した。23KのUb化蛋白質を同定するために、その部分アミノ酸配列を決定したところ、23K蛋白質はUb化されたヒストンH2Aであることが明らかとなった。

3-2、NIH3T3細胞での変異Ubの発現が熱ショック応答におよぼす影響

熱ショック時に誘導されるUbの役割とマルチユビキチン鎖のユビキチン分子同士の結合部位を明らかにするために、マルチUb構造を形成できない変異Ub(48番と63番のLysをArgに置換)過剰発現させた細胞に熱ショックを与え、その影響を解析した。各クローンを変異Ub誘導後、24時間培養し、41~47℃で30分間熱ショックに曝した後、さらに37℃で5時間培養した。41℃の熱ショックでは各クローンに差は見られなかったが、43℃以上の熱ショックでは、正常型Ubや63番のLysをArgに置換した変異Ubを過剰発現したクローンに比べ、48番のLysをArgに置換した変異Ubを過剰発現したクローンで生存率が約80%以下に低下した。これは、48番の変異によりUb分子同士の結合(Ub48番のLysとUbC末端の結合)が阻害され、蛋白分解のマーカーとしてのマルチUb鎖が形成されないためと考えられる。

4、出芽酵母26Sプロテアソーム制御サブユニットの機能解析

最近、ヒト26Sプロテアソーム制御サブユニット遺伝子がクローン化され、ホモロジー解析の結果、プロテアーゼとは無関係な機能を持つと考えられていた酵母遺伝子と高い相同性を示すことが明らかになった。そこで、ヒト制御サブユニットのホモログである出芽酵母遺伝子*SUG1*(転写因子)、*SEN3*(tRNAのプロセッシングに関与)、*NIN1*(細胞周期制御)、*CIM5*(細胞周期制御)、*NAS1*(TNFシグナル関連蛋白質)、*SUN1*(*nin1*変異抑制)、*SUN2*(*nin1*変異抑制)の各遺伝子産物が、酵母26SプロテアソームのマルチUb化蛋白質の分解活性の発現にどのように関係するかを、それらの温度感受性変異株を用いて解析した。マルチUb鎖特異的FK1抗体を用いて、制御サブユニット変異株でのマルチUb化蛋白質の蓄積を解析した。その結果、*sen3*、*nin1*、*nas1*、*sun2*の温度感受性変異株でマルチUb化蛋白質の異常な蓄積がおきていることが明らかになり、これらの遺伝子産物が酵母26Sプロテアソームの制御サブユニットとしてマルチユビキチン化蛋白質分解活性発現に必須であることが明らかとなった。

次に、マルチUb化蛋白質の異常な蓄積が生じた*NIN1*と*SEN3*遺伝子に着目し、蛋白分解活性発現との関係をさらに解析するため、*nin1*と*sen3*の温度感受性変異株のN末端則を解析した。N末端則とは、Ub依存的蛋白分解システムによって分解される細胞内蛋白質の寿命はそれ自身のN末端アミノ酸の種類に規定されるという蛋白質の寿命決定の法則である。*nin1*と*sen3*の変異株に各種N末端アミノ酸を有するβ-galを発現させ、制限温度下でパルスチェイス実験を行い、各β-galの寿命を解析した。野生株では法則通りの結果であったが、変異株ではβ-galの寿命が延長された。以上の結果より、出芽酵母の*NIN1*、*SEN3*遺伝子産物は制御サブユニットとして26Sプロテアソームの蛋白分解活性発現に深く関わっていると結論できる。

一方、*nin1*変異のマルチコピーサプレッサーとして分離された*SUN1*はマルチUb鎖結合サブユニットと報告されているヒトS5aやシロイヌナズナMBP1と高いホモロジーを示した。そこで、*SUN1*遺伝子産物がマルチUb鎖結合活性を有するか否かを明らかにするために、*SUN1*遺伝子産物を大腸菌で発現させ、マルチUb化蛋白質によるファウエスタンブロット解析を行った。その結果、*SUN1*遺伝子産物がマルチUb鎖結合活性Ub鎖結合活性を有すること、*SUN1*遺伝子欠損変異体を用いた実験より、*SUN1*遺伝子産物C末端側147アミノ酸がマルチUb鎖結合部位であることが明らかになった。以上の結果より、*SUN1*遺伝子産物は26SプロテアソームのマルチUb鎖認識サブユニットとして機能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

ユビキチン・プロテアソームシステムによる蛋白分解の機構と 生理的役割に関する研究

ユビキチン・プロテアソームシステムは、細胞内非リソソーム系のエネルギー依存性蛋白分解系であり、放射線やUVの照射、あるいは、熱ショックなどにより生成する変性蛋白質の分解、細胞周期の制御、免疫始動の制御、受精・発生・分化の制御、さらに、アルツハイマー病やパーキンソン病などの神経疾患やアポトーシスに関与すると考えられている。この分解システムでは、ユビキチン分子が鎖状に付加したマルチユビキチン化蛋白質を、26Sプロテアソームが認識し、分解する。現在までに、本システムの主要経路は解明されつつあるが、26Sプロテアソームの特異的基質であるマルチユビキチン化蛋白質の調製や、その基質蛋白質の特異的同定のためのツールの作成が求められてきた。また、26Sプロテアソームに含まれる制御サブユニット群が26Sプロテアソームのマルチユビキチン化蛋白質分解活性をどのように制御するかについても不明であった。

本論文提出者は、ユビキチン・プロテアソームシステムにおける分解シグナルであるマルチユビキチン鎖や、26Sプロテアソームの制御サブユニットの役割に関する一連の研究を展開し、以下の成果をおさめた。

(1) 26Sプロテアソームの特異的基質であるマルチユビキチン化蛋白質の大量調製法を開発し、26Sプロテアソームの特異的活性測定法を確立した。さらに、その基質蛋白質を免疫原として用いて、遊離のユビキチンとは反応せず、マルチユビキチン鎖のみを特異的に認識するモノクローナル抗体を作成し、マルチユビキチン化蛋白質の特異的同定法を確立した。

(2) マルチユビキチン鎖特異的抗体を用いて、熱ショックに伴うマルチユビキチン化蛋白質の変動を追跡し、高分子量マルチユビキチン化蛋白質が一過的に細胞質に蓄積すること、一方、核内に存在するユビキチン化ヒストンH2Aが一過的に脱ユビキチン化されることを明らかにし、

ヒストンH2Aに結合しているユビキチンが遊離して変性蛋白質分解のマーカーであるマルチュビキチン鎖を形成するという考えを提案した。

(3) マルチュビキチン鎖構造を形成できない変異ユビキチンを作成し、それを過剰発現させた細胞において、ユビキチンの48番のLysをArgに置換した変異ユビキチンを用いた場合に、熱ショックに伴う細胞の生存率が顕著に低下することを見い出し、ユビキチンの48番のLysを介するマルチュビキチン鎖の形成が熱ショック応答に必須であることを明らかにした。

(4) ヒト26Sプロテアソーム制御サブユニットのホモログである出芽酵母遺伝子*SUG1*(転写因子)、*SEN3*(tRNAプロセシングに関与)、*NIN1*(細胞周期制御)、*CIM5*(細胞周期制御)、*NAS1*(TNFシグナル関連蛋白質)、*SUN1*(*nin1*変異抑制)、*SUN2*(*nin1*変異抑制)の各温度感受性変異株における制限温度下でのマルチュビキチン化蛋白質の蓄積を、マルチュビキチン鎖特異的抗体を用いて解析し、*sen3*、*nin1*、*nas1*、*sun2*変異株でマルチュビキチン化蛋白質の異常な蓄積を見い出し、それらの遺伝子産物が26Sプロテアソームのマルチュビキチン化蛋白質分解活性の発現に必須であることを明らかにした。また、*NIN1*、*SEN3*遺伝子産物が、蛋白質の寿命決定の法則であるN末端則に従う蛋白分解活性発現に関与することを明らかにした。さらに、*nin1*変異のマルチコピーサブレッサーとして分離された*SUN1*遺伝子産物がマルチュビキチン鎖結合活性を有し、そのC末端側が活性発現に必須であることを見い出し、*SUN1*遺伝子産物が26Sプロテアソームのマルチュビキチン鎖認識サブユニットであることを明らかにした。

(5) マルチュビキチン鎖特異的抗体を用いて、アルツハイマー病脳神経原線維変化のPHF画分がマルチュビキチン化されていること、パーキンソン病のLewy小体にマルチュビキチン化蛋白質が存在することを見い出し、マルチュビキチン鎖特異的抗体が病態解析に応用できることを明らかにした。

以上の新知見およびそれを得るために用いた新研究技法は、ユビキチン・プロテアソームシステムの蛋白分解の機構や生理的役割の理解にとどまらず、広範な生理現象に深くかかわる蛋白分解の意義を理解する上で、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。