

博士（薬 学） 佐 伯 泰

学 位 論 文 題 名

Analysis of 26S proteasome-mediated protein degradation in *Saccharomyces cerevisiae*

（出芽酵母ユビキチン-プロテアソームシステムによる
タンパク質分解機構に関する研究）

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

ユビキチン-プロテアソームシステムは、細胞周期、シグナル伝達、タンパク質品質管理などの多様な生命現象を制御する。このシステムはATP依存的なタンパク質分解機構で、酵母からヒトに至るまで真核生物において高度に保存されている。このシステムでは、最初に、ユビキチンが標的となる基質タンパク質にLys残基を介して共有結合し、ポリユビキチン鎖が形成される。このユビキチン化反応はE1（ユビキチン活性化酵素）、E2（ユビキチン結合酵素）およびE3（ユビキチナリガーゼ）によって触媒され、基質タンパク質の識別は多様なユビキチナリガーゼE3によって行われる。次に、26Sプロテアソームが、形成されたポリユビキチン鎖を分解シグナルとして認識し、基質タンパク質をATP依存的に分解する。

本研究では、ユビキチン-プロテアソームシステムの機構解明を目指して、出芽酵母を用いて、26Sプロテアソームの簡易精製法の確立、26Sプロテアソーム構築機構の解析、および、ユビキチンシステムと26Sプロテアソームをつなぐ分子の同定を行い、このシステムによるタンパク質分解機構に関する新知見を得た。

1. 出芽酵母 26S プロテアソームの簡易精製法の確立

26Sプロテアソームは、活性中心を有するCPと、その活性を制御するRPから構成される。Glickmanらは、*rpn10*欠損株から26Sプロテアソームを精製し、RPはさらに8つのRpnから構成される蓋部(lid)、6つのRptと2つのRpnからなる基底部(base)の2つのサブ複合体からなること、Rpn10がlidとbaseの間に位置してRPを安定化させることを明らかにした。一方、本研究では、抗CP抗体を用いたアフィニティクロマトグラフィーを考案し、野生株からの26SプロテアソームやRPの簡易精製法を確立し、野生株でもRPがlidとbaseに解離できることを明らかにした。

2. 26S プロテアソーム構築機構の解析

*rpn12-1*変異は細胞周期のG2/M停止をもたらす変異として分離され、のちに、*RPN12*遺伝子が26SプロテアソームのRPサブユニットをコードすることが明らかにされた。この*rpn12-1*変異を多コピー抑圧する遺伝子として*RPN10*および*RPN3*が得られ、これらもRPサブユニットをコードすることが明らかにされた。*RPN12*の遺伝子破壊($\Delta rpn12$)は致死であるが、*RPN10*はこれを相補できることから、*RPN12*と*RPN10*は同じ機能を有すると考えられる。そして、Rpn10はユビキチン鎖結合能を有することが報告され、Rpn10が26Sプロテアソームのユビキチンレセプターであると期待されたが、*RPN10*遺伝子破壊株は生育可能で増殖にも影響しなかった。このことは、26SプロテアソームにRpn10以外のユビキチンレセプターが存在することを示唆している。そこで、Rpn12がユビキチンレセプターではないかと考え、ユビキチン鎖との結合を解析したが、検出されなかった。次に、*rpn12-1*変異株の温度感受性を抑圧するために必要な*RPN10*のドメイン解析を行ったところ、*RPN10*のN末端200アミノ酸(C末端領域のユビキチン鎖結合モチーフUIMを含まない)で十分であった。Rpn10のN末端領域はRPの安定化に寄与すると示唆されているので、Rpn12はユビキチン鎖結合サブユニットではなく、*rpn12-1*変異が26Sプロテアソームの会合に影響している可能性が考えられた。そこで、細

胞粗抽出液を用いて活性染色法を行い、*rpn12-1* 変異が 26S プロテアソーム構築を阻害していること、また、その構築阻害が *RPN10* の過剰発現により若干回復することを明らかにした。一方、酵母 2-hybrid 法により、*Rpn12* と相互作用するプロテアソームサブユニットを解析したところ、*Rpn3* が検出され、また、この *Rpn3* との相互作用は *rpn12-1* 遺伝子産物では検出されなかった。この結果から、*rpn12-1* 変異による 26S プロテアソーム構築阻害は、*Rpn12* と *Rpn3* とのサブユニット間相互作用の不全によると考えられる。次に、26S プロテアソームの会合様式を解析するために、野生株と *rpn12-1* 変異株で、*PRE1* (CP サブユニット)、*RPN1* (base サブユニット) および *RPN11* (lid サブユニット) の各遺伝子にエピトープタグを融合した株を作成した。それらの株を用いたゲルシフト解析から、*rpn12-1* 変異株において、不完全ながら 26S プロテアソームがわずかに形成していること、また、アフィニティー精製による解析から、*rpn12-1* 変異は lid、base 各サブ複合体の会合に影響を与えないが、lid-base 間の結合が不安定になっていることが明らかになった。

以上の結果から、*RPN12* と *RPN10* の遺伝学的相互作用は、*rpn12-1* 変異により、lid-base 間相互作用が不安定になり、わずかに形成される不安定な 26S プロテアソームを *Rpn10* が安定化させることによりポリユビキチン化タンパク質の代謝が進行すると説明できる。

3. ユビキチン様タンパク質 Rad23、Dsk2 の機能解析

26S プロテアソームのユビキチンレセプターを同定するために、いくつかのプロテアソームサブユニットをリコンビナントタンパク質として調製してユビキチン鎖との結合を解析したが、いずれもネガティブであった。一方、DNA 修復関連タンパク質 Rad23 が 26S プロテアソームと結合すること、*RAD23* と *RPN10* に遺伝学的相互作用があることが報告された。そこで、Rad23 のようなプロテアソーム結合タンパク質がユビキチンレセプターとして機能する可能性を考え、Rad23 とその関連タンパク質 Dsk2 のユビキチーノプロテアソームシステムにおける機能について解析を行った。Rad23/Dsk2 はプロテアソームとの相互作用に関与するユビキチン様ドメイン(UbL)と、UBA ドメインの 2 つの特徴的なドメインをもつ。はじめに、Rad23/Dsk2 リコンビナントタンパク質を用いた GST-pull down を行い、ユビキチン鎖との直接の結合が検出された。次に、Rad23/Dsk2 を Flag 融合タンパク質として酵母に発現させて免疫沈降実験を行ったところ、ユビキチン化タンパク質と 26S プロテアソームとの結合が検出され、*in vivo* における相互作用が明らかになった。また、UBA ドメインがユビキチン鎖との結合に必要であることも明らかになった。以上の結果から、Rad23/Dsk2 はユビキチン鎖結合タンパク質であり、ユビキチンシステムと 26S プロテアソームをつなぐ分子であると考えられる。次に、Rad23/Dsk2 のタンパク質分解における生理的役割を明らかにするために、*RAD23*、*DSK2* および *RPN10* の各遺伝子の破壊株を作成し、増殖とポリユビキチン化タンパク質の蓄積を調べた。その結果、*Δdsk2Δrad23* 二重変異株は温度感受性を示し、非許容温度下においてポリユビキチン化タンパク質の蓄積が検出され、さらに *Δrpn10Δdsk2Δrad23* 三重変異株は成長速度が著しく遅く、許容温度下においてもユビキチン化タンパク質が蓄積することが明らかとなった。また、UbL と UBA の各ドメインを欠いた *RAD23* や *DSK2* は三重変異株の温度感受性を抑圧できないことから、Rad23 や Dsk2 の機能発現に UbL と UBA の両ドメインが必要であることが明らかになった。以上の結果から、Rad23/Dsk2 は、ユビキチン・プロテアソームシステムにおけるユビキチン化タンパク質の分解に対して促進的に働く分子であり、ポリユビキチン化タンパク質を 26S プロテアソームへリクルートする機能を有すると考えられる。

次に、Rad23/Dsk2 が結合するプロテアソームサブユニットの同定を行ったところ、base の non-ATPase サブユニット *Rpn1* と *Rpn2* が検出された。この結果は、UbL ドメインと 26S プロテアソームとの相互作用が ATP 非依存的であることと矛盾しない。以上の結果から、細胞内のユビキチン化タンパク質は Rad23/Dsk2 と結合し、26S プロテアソームの base サブユニットにリクルートされると考えられる。

Rad23/Dsk2 がポリユビキチン化タンパク質を結合できることが明らかになったが、ポリユビキチン化された各種タンパク質を特異的に認識しているのかについて不明である。そこで、Dsk2 結合タンパク質を同定するために、Flag-Dsk2 を bait とした免疫沈降物を PMF (peptide mass fingerprint) 法により解析した。その結果、Dsk2 結合タンパク質として、ユビキチン、Ufd2、Cdc48、26S プロテアソームなどが同定された。次に、Ufd2 について同様に解析したところ、Ufd2 結合タンパク質として、Cdc48、Ufd1、Npl4 などが同定された。Ufd2 は U-box を持つユビキチン鎖伸長活性を有する E4 として報告されたが、生理的な基質は不明である。Cdc48 (哺乳類では VCP) は細胞可溶性画分に存在する AAA-ATPase で、アダプタータンパク質 Ufd1、Npl4 または

Shp1と複合体を形成する。最近、Cdc48-Ufd1-Npl4 複合体は ERAD (ER-associated degradation、小胞体関連タンパク質分解)において、ポリユビキチン化タンパク質を小胞体から細胞質側へ引きずり出す分子であると報告された。そこで、Rad23、Dsk2 および Ufd2 が ERAD に関与するかを明らかにするために、これらの各変異株を作成し、小胞体ストレスであるツニカマイシンに対する感受性を解析した結果、*ufd2ΔUΔdsk2Δrad23* 三重変異株のみがツニカマイシン感受性を示した。この結果は、Rad23、Dsk2 および Ufd2 が ERAD に関与していることを示唆している。今後、これらのタンパク質の ERAD への関与に関する詳細な研究が必要である。

【まとめ】

1. 出芽酵母野生株からの 19S 制御サブユニット複合体 RP の簡易精製法を確立した。
2. 26S プロテアソーム構築におけるプロテアソームサブユニット Rpn12 と Rpn10 の役割を明らかにするとともに、26S プロテアソームの再構成系を構築し、26S プロテアソームの構築機構を明らかにした。
3. Rad23 と Dsk2 が、ポリユビキチン化タンパク質の結合タンパク質として働き、ポリユビキチン化タンパク質の 26S プロテアソームへのリクルートに関与することを明らかにした。

学位論文審査の要旨

主査 教授 横沢 英良
副査 教授 有賀 寛芳
副査 助教授 平 敬宏
副査 助教授 川原 裕之

学位論文題名

Analysis of 26S proteasome-mediated protein degradation in *Saccharomyces cerevisiae*

(出芽酵母ユビキチン-プロテアソームシステムによる
タンパク質分解機構に関する研究)

ユビキチン-プロテアソームシステムは、細胞周期、シグナル伝達、タンパク質品質管理などの多様な生命現象を制御する。このシステムは酵母からヒトに至るまで真核生物において高度に保存されている。このシステムでは、最初に、ユビキチンが標的となる基質タンパク質にリシン残基を介して共有結合し、ポリユビキチン鎖が形成される。次に、26S プロテアソームが、形成されたポリユビキチン鎖を分解シグナルとして認識し、基質タンパク質を ATP 依存的に分解する。分解マシンである 26S プロテアソームは、活性中心を有する CP とその活性を制御する RP (lid と base のサブ複合体からなる) から構成される。

本論文提出者は、出芽酵母を用いて、26S プロテアソームの構築機構や 26S プロテアソームへのポリユビキチン化タンパク質のリクルート機構に関する一連の研究を展開し、以下の成果をおさめた。

(1) 抗 CP 抗体を用いたアフィニティークロマトグラフィーを考案し、野生株からの 26S プロテアソームや RP の簡易精製法を確立し、かつ、RP が lid サブ複合体と base サブ複合体に解離できることを明らかにした。

(2) 26S プロテアソームの RP サブユニットをコードする *RPN12* 遺伝子と *RPN10* 遺伝子の遺伝学的相互作用を解析し、*rpn12-1* 変異株の温度感受性を抑圧するために *RPN10* の N 末端 200 アミノ酸で十分であることを明らかにした。また、*rpn12-1* 変異が 26S プロテアソームの構築を阻害すること、その構築阻害が *RPN10* の過剰発現により回復することを明らかにした。さらに、酵母 two-hybrid 法により、Rpn12 と相互作用するプロテアソームサブユニットとして Rpn3 を同定し、*rpn12-1* 遺伝子産物と Rpn3 との相互作用が検出されないことを明らかにし、*rpn12-1* 変異による 26S

プロテアソームの構築阻害は、Rpn12 と Rpn3 とのサブユニット間相互作用の不全によると提案した。次に、26S プロテアソームの会合様式を解析するために、野生株と *rpn12-1* 変異株で、*PRE1* (CP サブユニット)、*RPN1* (base サブユニット) および *RPN11* (lid サブユニット) の各遺伝子にエピトープタグを融合した株を作成し、それらの株を用いて、*rpn12-1* 変異によって lid と base のサブ複合体間の結合が不安定になっていることを明らかにし、Rpn10 が不安定な 26S プロテアソームを安定化すると提案した。

(3) ユビキチン様タンパク質 Rad23 と Dsk2 が、in vitro および in vivo において、ユビキチン様ドメイン(UbL)を介して 26S プロテアソームと結合し、UBA ドメインを介してユビキチン鎖と結合することを明らかにした。次に、*RAD23*、*DSK2* および *RPN10* の各遺伝子の欠失株を作成し、*RAD23* と *DSK2* の二重欠失変異株が温度感受性を示し、非許容温度下においてポリユビキチン化タンパク質を蓄積すること、そして、*RAD23*、*DSK2* および *RPN10* の三重欠失変異株の成長速度が著しく遅く、許容温度下においてポリユビキチン化タンパク質を蓄積することを明らかにした。また、UbL と UBA の各ドメインを欠いた *RAD23* や *DSK2* は三重変異株の温度感受性を抑圧できないことを明らかにし、Rad23 や Dsk2 の機能発現に UbL と UBA の両ドメインが必要であると提案した。さらに、Rad23/Dsk2 が結合するプロテアソームサブユニットとして、base サブユニット Rpn1 と Rpn2 を同定した。以上の結果から、Rad23/Dsk2 は、ポリユビキチン化タンパク質を 26S プロテアソームヘリクルートする役割をはたすと提案した。

(4) PMF (peptide mass fingerprint) 法により、Dsk2 結合タンパク質として、ユビキチン、Ufd2、Cdc48 および 26S プロテアソームを同定した。また、同様の方法により、Ufd2 結合タンパク質として、Cdc48、Ufd1 および Npl4 を同定した。さらに、Rad23、Dsk2 および Ufd2 の三重欠失変異株が小胞体ストレスであるツニカマイシン感受性を示すことを明らかにし、Rad23、Dsk2 および Ufd2 が小胞体関連タンパク質分解 (ERAD) に関与すると提案した。

以上の新知見およびそれらを得るために用いた新研究方法は、26S プロテアソームの構築原理や 26S プロテアソームによるポリユビキチン化タンパク質認識機構の理解にとどまらず、ユビキチン・プロテアソームシステムによる細胞機能の制御機構を理解する上で重要な寄与をなすものである。

審査委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。