

# Roles of Sem1/DSS1 in Ubiquitin-dependent Proteolysis

(ユビキチン依存的タンパク質分解における Sem1/DSS1の役割)

## 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、DNA 修復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 (ユビキチンリガーゼ) によって触媒され、分解マシンである 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。

26S プロテアソームは、活性中心を有する 20S プロテアソーム(CP)と、その活性を制御する 19S 複合体 (RP) から構成される。RP は、8 つの Rpn サブユニットから構成される蓋部 (lid) と、6 つの Rpt サブユニットと 2 つの Rpn サブユニットから構成される基底部 (base)の、2 つのサブ複合体から成る。

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、出芽酵母を用いて、lid サブ複合体の新規サブユニット (Sem1) の同定、Sem1 の機能解析、および、ヒト Sem1 ホモログ (DSS1) の機能解析を行い、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 プロテアソームの新規サブユニットの同定<sup>1)</sup>

26S プロテアソームの新規サブユニットを同定するために、*PRE1* (CP)、*RPN1* (base) および *RPN11* (lid) の各遺伝子に 3×Flag タグを融合した株を作成した。それらの株を用いて、抗 Flag 抗体ビーズによるアフィニティー精製を行い、26S プロテアソーム、base および lid サブ複合体、CP を得た。SDS-PAGE の結果より、26S プロテアソームと lid サブ複合体の場合に、未知のタンパク質が検出された。そこで、そのバンドをゲル内で V8 プロテアーゼにより消化後、得られたペプチドを HPLC により分別・分取し、アミノ酸配列を決定した。その結果、未知タンパク質は Sem1 であることが明らかになった。

Sem1 が 26S プロテアソームの新規サブユニットであることを確認するために、抗 Flag 抗体ビーズを用いた免疫沈降実験を行ったところ、Sem1 が他のプロテアソームサブユニット (Rpn9、Rpt5) と共沈することが明らかになった。さらに、GST-Sem1 融合タンパク質を用いて pull-down 実験を行ったところ、GST-Sem1 が、*SEM1* 遺伝子破壊 ( $\Delta sem1$ ) 株から精製した 26S プロテアソームのみに結合することが明らかになった。

### 2. Sem1 の機能解析<sup>1)</sup>

*SEM1* 遺伝子はエキソサイトーシスに関与する遺伝子変異体の抑制遺伝子として同定され、 $\Delta sem1$  株は温度感受性を示す。そこで、 $\Delta sem1$  変異が 26S プロテアソームの機能に及ぼす影響を調べたところ、 $\Delta sem1$  株において非許容温度下でポリユビキチン化タンパク質の蓄積が観察された。さらに、Sem1 の機能を解析するために、野生株と  $\Delta sem1$  株からアフィニティー精製した 26S

プロテアソームを用いて、ポリユビキチン化 Sic1<sup>PY</sup> の分解を調べた。その結果、前者（野生株）の場合に比べて、後者（ $\Delta sem1$  株）の場合にポリユビキチン化 Sic1<sup>PY</sup> の分解速度が遅いことが明らかになった。なお、いずれの場合もポリユビキチン化 Cdc34 と結合できるので、Sem1 は、ポリユビキチン化 Sic1 が 26S プロテアソームに結合した後の分解過程に関与していると考えられる。

### 3. SEM1 遺伝子変異体の解析

Sem1 は、Phe および Trp 残基が種間で保存されている酸性タンパク質である。Sem1 のタンパク質分解における役割を調べるために、種間で保存されているアミノ酸残基を置換した 22 種類の *sem1* 変異株を作成した。それらの中で、60 および 64 番目の Trp 残基を Ala に置換した変異体 (*sem1-17*) と、二つの酸性アミノ酸領域で置換を行ってほぼ中性のタンパク質に変えた変異体 (*sem1-27*) は、 $\Delta sem1$  株と同様に、温度感受性を示した。しかし、*sem1-17* 株では、野生株の場合と同様に、非許容温度下においてもポリユビキチン化タンパク質が蓄積しなかった。*sem1-17* 株が温度感受性を示すのは特定のタンパク質の分解が遅延しているためではないかと考え、Sem1 と結合できるが Sem1-17 とは結合できないタンパク質の探索を行った。LC-MS/MS 解析により、Sem1 結合タンパク質として Gal80、Sps19 及び Ste23 を得た。これらのタンパク質が *sem1-17* 株の表現型にどのように影響を及ぼしているかについて検討することが今後の課題である。

### 4. ヒト Sem1 ホモログ (DSS1) の機能解析

DSS1 は、発生期の末端形成異常を示す遺伝病に関わる候補遺伝子産物として同定された。その後、がん抑制タンパク質 BRCA2 と結合すると報告された。本研究により、酵母 Sem1 がプロテアソームサブユニットであることが明らかになったので、DSS1 もヒト 26S プロテアソームの構成サブユニットであると考えられる。そこで、HEK293T 細胞で DSS1-Flag を過剰発現して免疫沈降実験を行ったところ、DSS1 は 26S プロテアソームと結合していることが明らかになった<sup>1)</sup>。従って、ヒトの場合も、DSS1 がプロテアソームサブユニットであると考えられる。なお最近、DSS1 もヒト 26S プロテアソームの構成タンパク質であることが報告された。次に、26S プロテアソームと BRCA2 との関係性を調べるために、RPN11-Flag を安定に発現する HeLa 細胞株を樹立した。抗 Flag 抗体ビーズを用いたアフィニティー精製によりヒト 26S プロテアソームを精製したところ、プロテアソームが BRCA2 と結合していることが明らかになった。そこで、Sem1-17 と同様の変異を導入した DSS1-W39/43A を作成し、BRCA2 の C 末端フラグメントと共に HeLa 細胞に発現させ免疫沈降を行った。その結果、DSS1-W39/43A は、野生型 DSS1 と比べて、BRCA2 の C 末端フラグメントとの結合が弱いことが明らかになった。

上記の結果から、DSS1 は 26S プロテアソームのサブユニットとして BRCA2 と結合し、DSS1 と BRCA2 との結合には Trp 残基が関与していることが示唆された。今後、DSS1 を介してプロテアソームが BRCA2 と相互作用する意義を検討することが必要である。BRCA2 はプロテアソームと結合した状態で存在し、DSS1 がプロテアソームと BRCA2 との相互作用の足場となっている可能性が考えられる。

#### 【まとめ】

1. Sem1 は酵母 26S プロテアソームの新規サブユニットである。
2. Sem1 はユビキチン依存的タンパク質分解に関与している。
3. ヒト DSS1 を介して 26S プロテアソームは BRCA2 と結合し、DSS1 の Trp39/43 残基が BRCA2 との結合に関与している。

#### 【参考文献】

1. Sone, T., Saeki, Y., Toh-e, A., and Yokosawa, H. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 28807-28816

# 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 准教授 川 原 裕 之  
副査 准教授 松 本 健 一

学位論文題名

## Roles of Sem1/DSS1 in Ubiquitin-dependent Proteolysis

(ユビキチン依存的タンパク質分解における Sem1/DSS1の役割)

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、DNA 修復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 20S プロテアソームと、その活性を制御する 19S 複合体から構成され、後者の 19S 複合体はさらに、蓋部 (lid) サブ複合体と基底部 (base) サブ複合体から成る。

本論文提出者は、出芽酵母およびヒトの 19S 複合体の構築機構と新規サブユニットの機能に関する一連の研究を展開し、以下の成果をおさめた。

(1) プロテアソームサブユニット遺伝子に Flag タグを融合した出芽酵母株を用いて、base および lid サブ複合体を単離して解析し、lid サブ複合体の新規サブユニットを発見し、それが Sem1 であることを明らかにした。そして、GST-Sem1 融合タンパク質を用いて pull-down 実験を行い、GST-Sem1 が、*SEM1* 遺伝子破壊株から精製した 26S プロテアソームのみに結合することを明らかにした。

(2) 出芽酵母の *SEM1* 遺伝子破壊株は温度感受性を示し、非許容温度下でポリユビキチン化タンパク質が蓄積すること、そして、*SEM1* 遺伝子破壊株から精製した 26S プロテアソームは、野生株から精製した 26S プロテアソームに比較して、ポリユビキチン化 Sic1 タンパク質の分解が遅いことを明らかにし、Sem1 がユビキチン依存的タンパク質分解において重要な役割を果たしていることと結論した。

(3) Sem1 において種間で保存されているアミノ酸残基を置換した 22 種類の出芽酵母変異株を作成して解析し、60 および 64 番トリプトファン残基をアラニンに置換した変異体 (*sem1-17*) と、二つの酸性アミノ酸領域におけるアスパラギン酸残基とグルタミン酸残基をそれぞれアスパラギンとグルタミンに置換した変異体 (*sem1-27*) が、*SEM1* 遺伝子破壊株の場合と同様に、温度感受性を示すことを明らかにした。また、前者の *sem1-17* 株の場合では、野生株の場合と同様に、非許容温度下においてもポリユビキチン化タンパク質が蓄積しないことを明らかにした。この場合に温度感受性を示す理由は、特定のタンパク質の分解が遅延しているためと考え、Sem1 と結合できるが *sem1-17* とは結合できないタンパク質の探索を行い、Gal80、Sps19 および Ste23 を Sem1 結合タンパク質として同定し、これらのタンパク質が変異株の表現型に影響を及ぼしていると提案した。

(4) ヒト Sem1 ホモログである DSS1 がヒト 26S プロテアソームと結合することを明らかにし、DSS1 がプロテアソームサブユニットであると提案した。また、DSS1 ががん抑制タンパク質 BRCA2 と結合すると報告されているので、種間で保存されている 2 つのトリプトファン残基をアラニンに置換した DSS1 変異体を作成して BRCA2 の C 末端フラグメントとの結合を解析し、野生型 DSS1 の場合と比較して、BRCA2 の C 末端フラグメントとの結合が弱いことを明らかにした。さらに、精製したヒト 26S プロテアソームと BRCA2 との結合を解析し、両者が結合することを明らかにした。以上の結果から、DSS1 は 26S プロテアソームサブユニットとして BRCA2 と結合し、その BRCA2 との結合には 2 つのトリプトファン残基が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機構やユビキチン依存的タンパク質分解の分子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。