

## 学位論文題名

## Prefoldin サブユニット間発現量調節機構の解明

## 学位論文内容の要旨

## 【序論】

分子シャペロンは新規合成されたタンパク質の立体構造形成を促す機能や、変性されたタンパク質を再生する機能を有するが、その中で Prefoldin (PFD) は選択的にアクチンやチューブリンの立体構造形成に関与し、基質となるこれらの新生ポリペプチド鎖を捕捉し、分子シャペロニン TRiC/CCT まで運搬する機能を有する。メタン細菌 Prefoldin の結晶構造解析等から、Prefoldin は 6 つのサブユニットがクラゲ状に組み合わさった構造を取ると考えられているが、古細菌の Prefoldin は  $\alpha$ ,  $\beta$  という 2 種類のサブユニットが  $\alpha_2\beta_4$  の割合で結合し、真核生物では 2 つの  $\alpha$  サブユニット (PFD3, PFD5) と 4 つの  $\beta$  サブユニット (PFD1, PFD2, PFD4, PFD6) が結合している。

一方で、真核生物の PFD サブユニットの多くは、転写調節因子や他のタンパク質複合体の構成因子としても同定されている。我々は MM-1 $\alpha$ /PFD5 を c-Myc の N 末に存在する Myc box II 領域に結合するタンパク質として同定し、TIF1 $\beta$  や HDAC 複合体と協調的に c-Myc の *c-fms* 遺伝子発現促進を抑制すること等を報告してきた。また、PFD3 は von Hippel-Lindau gene product (pVHL) の結合タンパク質 VBP-1 として同定され、B 型肝炎ウイルスの X protein と協調的に NF $\kappa$ B の転写活性を増強させる。PFD2 は PFD サブユニットと相同性の高い PFD4r, STAP1 や、RNA polymerase の構成因子である RPB5, ATPase である TIP48, TIP49 等と 1 MDa 程の巨大複合体を形成し、栄養素関連の遺伝子発現の制御をしている。

このように、タンパク質複合体の構成因子が複合体とは異なる機能を有する例は 80s リボソームにおいても見られ、その構成因子 L5, L11, L23 はリボソーム形成の阻害によって複合体から解離し、MDM2 と結合することで、その p53 ユビキチン化活性を抑制する。そこで PFD サブユニットの複合体以外の機能活性は、複合体量によって規定されるのではないかと考え、RNAi によるサブユニットの発現抑制を行ったところ、標的サブユニットの減少に加え、それ以外のサブユニットの発現量減少も確認された。本研究ではこの知見を足がかりに、PFD サブユニット間には発現量調節があることを見出した。

## 【結果と考察】

Prefoldin の 6 つのサブユニットの発現量は調節されている

MM-1 $\alpha$ /PFD5 (以下、MM-1 $\alpha$ ) は核内において転写調節因子として働く機能と、細胞質において分子シャペロン Prefoldin の構成因子として働く機能を有する。そこで Prefoldin に含

まれない MM-1 $\alpha$  の挙動を確認するために、ヒトの HeLa, H1299, HepG2 とマウスの MEF, Neuro-2a, NIH3T3 細胞株に PFD2 を標的とする siRNA (siPFD2) を導入したところ、ネガティブコントロールとして用いた *Luc* 遺伝子を標的とした siRNA を導入したものに比べ、siPFD2 の導入では PFD2 が 7-52%, MM-1 $\alpha$  が 22-57% に減少していた。また、MM-1 $\alpha$  を標的とする siRNA (siMM-1 $\alpha$ ) の導入では、MM-1 $\alpha$  が 7-38 %, PFD2 が 16-71 % に減少していた。次に H1299 細胞に Prefoldin の 6 つのサブユニットを標的とする siRNA を導入し、各サブユニットの発現量を確認したところ、1 種の siRNA の導入により 6 つのサブユニット全てが減少していた。次に H1299 細胞に各サブユニットの発現ベクターを単独で導入したものと、6 つを共導入したものとでそれぞれの発現量を比較したところ、全てのサブユニットにおいて共導入時に発現量が増大しており、Prefoldin の 6 つのサブユニットの細胞内発現量は未知の機構により調節されていることが示された。

### PFD サブユニット間の発現量調節はユビキチン・プロテアソーム経路を介する分解に因る

内在性、強制発現系を問わず Prefoldin のサブユニットが発現量の調節を受けたため、この調節は転写レベルではなく、タンパク質の分解によるものである可能性が高い。そこで、細胞内の主たるタンパク質分解経路であるユビキチン・プロテアソーム経路(UPS) に着目した。まず HEK293T 細胞に FLAG-MM-1 $\alpha$  を過剰発現させ、UPS の阻害剤 MG132 を作用させたところ、FLAG-MM-1 $\alpha$  は MG132 依存的に有意に増大した。一方、過剰発現無しの細胞では、MG132 を長時間処理させても内在性 MM-1 $\alpha$  の量に変化がなかった。そこで、グリセロール密度勾配遠心を行いこれらの分子量分画を行ったところ、内在性 MM-1 $\alpha$  の 90 % 以上が Prefoldin を形成しているのに対し、過剰発現した FLAG-MM-1 $\alpha$  は 25 % 以上が単量体として存在しており、MG132 によって増大したのはこの単量体のものであった。

次に MM-1 $\alpha$  以外のサブユニットも同様に UPS による分解を受けるのか検討した。HEK293T 細胞に各 PFD サブユニットを強制発現させた後に MG132 を処理し、発現量の変化を確認したところ、PFD1, PFD3, PFD4, MM-1 $\alpha$  は 2-6 倍程度有意に増加したが、PFD2, PFD6 はわずかな増加しか示さなかった。そこで、タンパク質合成阻害剤 Cycloheximide を用いて、強制発現した各サブユニットの半減期を測定したところ、PFD1 : 7 hrs, PFD2 : 24 hrs, PFD3 : 3.5 hrs, PFD4 : 3 hrs, MM-1 $\alpha$  : 5 hrs, PFD6 : 21.5 hrs となり、PFD2 と PFD6 は他のサブユニットに比べ分解を受けにくいことが示された。

### PFD サブユニットは特定のサブユニットとの共導入によって安定化する

2004 年に Simons 等は *in vitro* の実験系によって、各サブユニットが PFD1-PFD2-PFD3-PFD4-PFD6-MM-1 $\alpha$  の順で並んで Prefoldin を形成していると報告している。そこで、特定のサブユニットとの相互作用が UPS による分解を抑制しているかを調べるため、H1299 細胞に 2 種類のサブユニットを網羅的に共導入し、安定化を引き起こす組み合わせを探ったところ、PFD1 は PFD2 により、PFD2 は PFD3 と MM-1 $\alpha$  により、PFD3 は PFD2 により、MM-1 $\alpha$  は PFD2 と PFD6 により、PFD6 は MM-1 $\alpha$  により安定化していた。この MM-1 $\alpha$ -PFD2 間を除く安定化は、Simons 等が提案する並びの近隣するサブユニット間で起こっており、ヒト細胞中においてもこの並びで Prefoldin が形成されている可能性が示された。

## 【まとめ】

1. Prefoldin サブユニット間には発現量を調節する機構が働くことを示した
2. 単量体のサブユニットが UPS によって分解されることを示した
3. 共導入により安定化するサブユニットの組み合わせを示した
4. 上記知見を基にヒト細胞における Prefoldin の形成モデルを提案した

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 有 賀 寛 芳  
副 査 教 授 木 原 章 雄  
副 査 講 師 米 田 宏  
副 査 講 師 佐 々 貴 之

## 学位論文題名

# Prefoldin サブユニット間発現量調節機構の解明

Prefoldin (PFD) はアクチンやチュープリンの立体構造形成に関与し、基質となるこれらの新生ポリペプチド鎖を捕捉し、分子シャペロニン TRiC/CCT まで運搬する機能を有する。Prefoldin は 6 つのサブユニットがクラゲ状に組み合わさった構造を取ると考えられているが、真核生物では 2 つの $\alpha$ サブユニット (PFD3, PFD5) と 4 つの $\beta$  サブユニット (PFD1, PFD2, PFD4, PFD6) が結合している。一方で、真核生物の PFD サブユニットの多くは、転写調節因子や他のタンパク質複合体の構成因子としても同定されている。我々は MM-1 $\alpha$ /PFD5 を c-Myc の N 末に存在する Myc box II 領域に結合するタンパク質として同定し、TIF1 $\beta$  や HDAC 複合体と協動的に c-Myc の *c-fms* 遺伝子発現促進を抑制すること等を報告してきた。また、PFD3 は von Hippel-Lindau gene product (pVHL) の結合タンパク質 VBP-1、PFD2 は RNA polymerase の構成因子である RPB5, ATPase である TIP48, TIP49 等と複合体を形成し、栄養素関連の遺伝子発現の制御をしている。そこで PFD サブユニットの複合体以外の機能活性は、複合体量によって規定されるのではないかと考え、RNAi によるサブユニットの発現抑制を行ったところ、標的サブユニットの減少に加え、それ以外のサブユニットの発現量減少も確認された。本研究ではこの知見を足がかりに、PFD サブユニット間には発現量調節があることを見出した。

### Prefoldin の 6 つのサブユニットの発現量は調節されている

MM-1 $\alpha$ /PFD5 (以下、MM-1 $\alpha$ ) は核内において転写調節因子として働く機能と、細胞質において分子シャペロン Prefoldin の構成因子として働く機能を有する。そこで Prefoldin に含まれない MM-1 $\alpha$  の挙動を確認するために、ヒトの HeLa, H1299, HepG2 とマウスの MEF, Neuro-2a, NIH3T3 細胞株に PFD2 を標的とする siRNA (siPFD2) を導入したところ、ネガティブコントロールとして用いた *Luc* 遺伝子を標的とした siRNA を導入したものに比べ、siPFD2 の導入では PFD2 が 7-52%, MM-1 $\alpha$  が 22-57% に減少していた。また、MM-1 $\alpha$  を標的とする siRNA (siMM-1 $\alpha$ ) の導入では、MM-1 $\alpha$  が 7-38%, PFD2 が 16-71% に減少していた。次に H1299 細胞に Prefoldin の 6 つのサブユニットを標的とする siRNA を導入し、各サブユニットの発現量を確認したところ、1 種の siRNA の導入により 6 つのサブユニット全てが減少していた。次に H1299 細胞に各サブユニットの発現ベクターを単独で導入したものと、6 つを共導入したものとでそれぞれの発現量を比較したところ、全てのサブユニットにおいて共導入時に発現量が増大しており、Prefoldin の 6 つのサブユニットの細胞内発現量は未知の機構により調節されていることが示された。

### PFD サブユニット間の発現量調節はユビキチン・プロテアソーム経路を介する分解に因る

内在性、強制発現系を問わず Prefoldin のサブユニットが発現量の調節を受けたため、この調節は転写レベルではなく、タンパク質の分解によるものである可能性が高い。そこで、細胞内の主たるタンパク質分解経路であるユビキチン・プロテアソーム経路(UPS) に着目した。まず HEK293T 細胞に FLAG-MM-1 $\alpha$  を過剰発現させ、UPS の阻害剤 MG132

を作用させたところ、FLAG-MM-1 $\alpha$  は MG132 依存的に有意に増大した。一方、過剰発現無しの細胞では、MG132 を長時間処理させても内在性 MM-1 $\alpha$  の量に変化がなかった。そこで、グリセロール密度勾配遠心を行いこれらの分子量分画を行ったところ、内在性 MM-1 $\alpha$  の 90% 以上が Prefoldin を形成しているのに対し、過剰発現した FLAG-MM-1 $\alpha$  は 25% 以上が単量体として存在しており、MG132 によって増大したのはこの単量体のものであった。

次に MM-1 $\alpha$  以外のサブユニットも同様に UPS による分解を受けるのか検討した。HEK293T 細胞に各 PFD サブユニットを強制発現させた後に MG132 を処理し、発現量の変化を確認したところ、PFD1, PFD3, PFD4, MM-1 $\alpha$  は 2-6 倍程度有意に増加したが、PFD2, PFD6 はわずかな増加しか示さなかった。そこで、タンパク質合成阻害剤 Cycloheximide を用いて、強制発現した各サブユニットの半減期を測定したところ、PFD1 : 7 hrs, PFD2 : 24 hrs, PFD3 : 3.5 hrs, PFD4 : 3 hrs, MM-1 $\alpha$  : 5 hrs, PFD6 : 21.5 hrs となり、PFD2 と PFD6 は他のサブユニットに比べ分解を受けにくいことが示された。

### PFD サブユニットは特定のサブユニットとの共導入によって安定化する

2004 年に Simons 等は *in vitro* の実験系によって、各サブユニットが PFD1-PFD2-PFD3-PFD4-PFD6-MM-1 $\alpha$  の順で並んで Prefoldin を形成していると報告している。そこで、特定のサブユニットとの相互作用が UPS による分解を抑制しているかを調べるため、H1299 細胞に 2 種類のサブユニットを網羅的に共導入し、安定化を引き起こす組み合わせを探ったところ、PFD1 は PFD2 により、PFD2 は PFD3 と MM-1 $\alpha$  により、PFD3 は PFD2 により、MM-1 $\alpha$  は PFD2 と PFD6 により、PFD6 は MM-1 $\alpha$  により安定化していた。この MM-1 $\alpha$ -PFD2 間を除く安定化は、Simons 等が提案する並びの隣接するサブユニット間で起こっており、ヒト細胞中においてもこの並びで Prefoldin が形成されている可能性が示された。

これらの知見は、タンパク質の quality control 機能解析に対し大きく貢献するところ大なるものがある。

よって著者は、北海道大学博士（生命科学）の学位を授与される資格あるものと認める。