

平成 22 年 5 月 15 日現在

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2007～2009

課題番号：19687009

研究課題名（和文） 胸腺特異的プロテアソームによる免疫制御機構の解析

研究課題名（英文） Regulation of acquired immunity by thymus-specific proteasomes

研究代表者

村田 茂穂 (MURATA SHIGEO)

東京大学・大学院薬学系研究科・教授

研究者番号：20344070

研究成果の概要（和文）：あらゆる病原体に対応可能な獲得免疫システムは、胸腺において未熟 T 細胞が適切に選別されることにより形成される。我々は胸腺において「正の選択」と呼ばれる有用な T 細胞を選別する細胞である胸腺皮質上皮細胞に特異的に発現する新しいタンパク質分解酵素“胸腺プロテアソーム”を発見した。胸腺プロテアソームは胸腺において特殊なペプチドレパトアを産生し、発達途上の T 細胞に提示することにより正の選択を制御していることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：The acquired immune system, which can defend against all sorts of pathogens, is established by adequate selection of immature T cells in the thymus. We have discovered a new protease complex that we named “thymoproteasome” that is expressed exclusively in the cortical thymic epithelial cells, which mediate “positive selection,” a process where useful T cells are selected and survive. We have demonstrated that the thymoproteasome regulate the positive selection by producing a unique peptide repertoire and presenting it to developing T cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	8,200,000	2,460,000	10,660,000
2008 年度	6,300,000	1,890,000	8,190,000
2009 年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
年度			
年度			
総計	19,500,000	5,850,000	25,350,000

研究分野：生物学

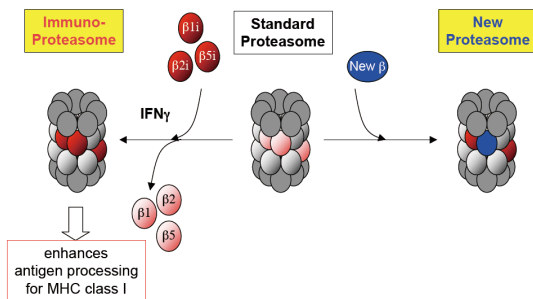
科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：免疫、胸腺、プロテアソーム、ペプチド、正の選択

1. 研究開始当初の背景

プロテアソームは分解の目印であるユビキチン鎖が連結したタンパク質を分解する細胞内プロテアーゼであり、酵母からヒトに至るすべての真核生物において生存に必須の役割を果たしている。主要組織適合性複合体 (MHC) を有する脊椎動物では、プロテアソームにより分解された産物が MHC クラス I に提示される抗原として利用される。

我々はプロテアソームの触媒ユニットの新しいサブユニットを発見した。このサブユニットは通常型のプロテアソームの $\beta 5$ サブユニットと入れ替わりにプロテアソームへ組み込まれ、新しい触媒活性をもたらすとともに、胸腺皮質上皮細胞(cTEC)にのみ発現するという特徴を持つ。これらの特徴から、我々はこの新しいサブユニットを $\beta 5t$ (t:thymus)、そして $\beta 5t$ が組み込まれたプロテアソームを胸腺プロテアソーム (Thymoproteasome) と名付けた (図 1)。胸腺は骨髄で産生された前駆 T 細胞が自己と非自己の識別のための教育を受ける器官であり、とりわけ cTEC は有用な T 細胞を選別する「正の選択」に関与する細胞集団であることが知られている。



2. 研究の目的

“胸腺プロテアソーム”が胸腺における T 細胞選択、特にポジティブセレクションに果たす役割、および cTEC 細胞の機能的特異性の

分子基盤をマウスの遺伝学的手法を主とした解析により解明することが目的である。

またなぜ $\beta 5t$ が cTEC 特異的に発現し、どのようにして胸腺プロテアソームが形成されるのかその機構は不明であり、生化学的解析を中心に明らかにする。

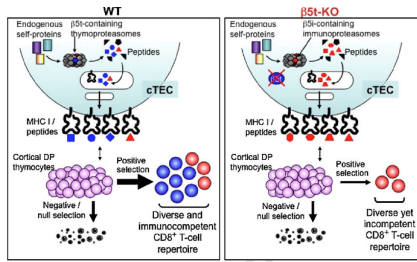
3. 研究の方法

免疫系の解析にはモデル動物を作製、利用することが有用であり、 $\beta 5t$ 欠損マウスを作製をはじめに行い、その後このマウスを利用して解析を行った。

4. 研究成果

(1) $\beta 5t$ 欠損マウスの作製による胸腺における T 細胞選択機能の解析

$\beta 5t$ の哺乳類個体における生理機能を明らかにするため、 $\beta 5t$ 遺伝子欠損マウスを作製した。この際、 $\beta 5t$ の発現が明瞭に同定できるように $\beta 5t$ の coding region を蛍光タンパク質 Venus の cDNA に置換した。 $\beta 5t$ は正常に発育し、胸腺の大きさも正常であり、胸腺の構築そのものには $\beta 5t$ の有無は影響しないことが明らかになった。しかし胸腺における T 細胞の分化を観察したところ、CD8 陽性 T 細胞の分化が著しく障害されていた。正の選択モデルである様々な MHC クラス I 拘束性 T 細胞受容体 (HY, OT-I, P14-TCR) トランスジェニックマウスと交配した結果、この分化障害は正の選択の障害に寄ることが明らかとなり、 $\beta 5t$ が胸腺における MHC クラス I 拘束性 T 細胞の正の選択に極めて重要な働きをしていることが明らかとなった (図 2)。



(2) 正の選択をもたらす MHC クラス I 提示ペプチドの解析

胸腺プロテアソームが正の選択を可能にする特殊なペプチドレパトアを cTEC において産生し MHC クラス I 上に提示している可能性が最も考えられることから、胸腺プロテアソーム特異的に産生される MHC クラス I エピトープの同定を試みた。しかしペプチド同定に必要な cTEC 細胞数をマウス個体から揃えることは困難であるため、胸腺プロテアソームを発現する細胞株を樹立し、その細胞に発現する MHC クラス I よりペプチドを精製し同定を行った。この結果、胸腺プロテアソームは確かに特殊なペプチドレパトアを産生し、MHC に提示していることが明らかとなった (投稿準備中)。

(3) プロテアソームの形成機構の解析

多数のサブユニットからどのようにして正確にプロテアソームが形成されるのか、なぜ胸腺プロテアソームが cTEC 特異的に形成されるのか不明であり、その解析を行った。その結果、プロテアソーム形成に必要な特異的シャペロン分子を複数同定し、それらの機能解明に成功した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 23 件) (すべて査読有り)

1. Chou B, Hiromatsu K, Hisaeda H, Duan X, Imai T, Murata S, Tanaka K, Himeno K: Genetic immunization based on the

ubiquitin-fusion degradation pathway against *Trypanosoma cruzi*. *Biochem Biophys Res Commun* 2010, 392:277-282.

2. Nitta T, Murata S, Sasaki K, Fujii H, Ripen AM, Ishimaru N, Koyasu S, Tanaka K, Takahama Y: Thymoproteasome shapes immunocompetent repertoire of CD8+ T cells. *Immunity* 2010, 32:29-40.
3. Tu L, Moriya C, Imai T, Ishida H, Tetsutani K, Duan X, Murata S, Tanaka K, Shimokawa C, Hisaeda H, et al.: Critical role for the immunoproteasome subunit LMP7 in the resistance of mice to *Toxoplasma gondii* infection. *Eur J Immunol* 2009.
4. Nishio K, Kim SW, Kawai K, Mizushima T, Yamane T, Hamazaki J, Murata S, Tanaka K, Morimoto Y: Crystal structure of the de-ubiquitinating enzyme UCH37 (human UCH-L5) catalytic domain. *Biochem Biophys Res Commun* 2009, 390:855-860.
5. Hendil KB, Kriegenburg F, Tanaka K, Murata S, Lauridsen AM, Johnsen AH, Hartmann-Petersen R: The 20S proteasome as an assembly platform for the 19S regulatory complex. *J Mol Biol* 2009, 394:320-328.
6. Kaneko T, Hamazaki J, Iemura S, Sasaki K, Furuyama K, Natsume T, Tanaka K, Murata S: Assembly pathway of the Mammalian proteasome base subcomplex is mediated by multiple specific chaperones. *Cell* 2009, 137:914-925.
7. Kimura Y, Yashiroda H, Kudo T,

- Koitabashi S, Murata S, Kakizuka A, Tanaka K: An inhibitor of a deubiquitinating enzyme regulates ubiquitin homeostasis. *Cell* 2009, 137:549-559.
8. Tomaru U, Ishizu A, Murata S, Miyatake Y, Suzuki S, Takahashi S, Kazamaki T, Ohara J, Baba T, Iwasaki S, et al.: Exclusive expression of proteasome subunit $\beta 5t$ in the human thymic cortex. *Blood* 2009, 113:5186-5191.
9. Murata S, Yashiroda H, Tanaka K: Molecular mechanisms of proteasome assembly. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009, 10:104-115.
10. Tokunaga F, Sakata S, Saeki Y, Satomi Y, Kirisako T, Kamei K, Nakagawa T, Kato M, Murata S, Yamaoka S, et al.: Involvement of linear polyubiquitylation of NEMO in NF- κ B activation. *Nat Cell Biol* 2009, 11:123-132.
11. Nitta T, Murata S, Ueno T, Tanaka K, Takahama Y: Thymic microenvironments for T-cell repertoire formation. *Adv Immunol* 2008, 99:59-94.
12. Tonoki A, Kuranaga E, Tomioka T, Hamazaki J, Murata S, Tanaka K, Miura M: Genetic evidence linking age-dependent attenuation of the 26S proteasome with the aging process. *Mol Cell Biol* 2009, 29:1095-1106.
13. Tokui K, Adachi H, Waza M, Katsuno M, Minamiyama M, Doi H, Tanaka K, Hamazaki J, Murata S, Tanaka F, et al.: 17-DMAG ameliorates polyglutamine-mediated motor neuron degeneration through well-preserved proteasome function in an SBMA model mouse. *Hum Mol Genet* 2009, 18:898-910.
14. Yamano T, Mizukami S, Murata S, Chiba T, Tanaka K, Udono H: Hsp90-mediated assembly of the 26 S proteasome is involved in major histocompatibility complex class I antigen processing. *J Biol Chem* 2008, 283:28060-28065.
15. Hirano Y, Kaneko T, Okamoto K, Bai M, Yashiroda H, Furuyama K, Kato K, Tanaka K, Murata S: Dissecting beta-ring assembly pathway of the mammalian 20S proteasome. *EMBO J* 2008, 27:2204-2213.
16. Yamano T, Sugahara H, Mizukami S, Murata S, Chiba T, Tanaka K, Yui K, Udono H: Allele-selective effect of PA28 in MHC class I antigen processing. *J Immunol* 2008, 181:1655-1664.
17. Takahama Y, Tanaka K, Murata S: Modest cortex and promiscuous medulla for thymic repertoire formation. *Trends Immunol* 2008, 29:251-255.
18. Murata S, Takahama Y, Tanaka K: Thymoproteasome: probable role in generating positively selecting peptides. *Curr Opin Immunol* 2008, 20:192-196.
19. Chou B, Hisaeda H, Shen J, Duan X, Imai T, Tu L, Murata S, Tanaka K, Himeno K: Critical contribution of immunoproteasomes in the induction of protective immunity against *Trypanosoma cruzi* in mice vaccinated with a plasmid encoding a CTL epitope fused to green fluorescence protein. *Microbes Infect* 2008, 10:241-250.

20. Yashiroda H, Mizushima T, Okamoto K, Kameyama T, Hayashi H, Kishimoto T, Niwa S, Kasahara M, Kurimoto E, Sakata E, et al.: Crystal structure of a chaperone complex that contributes to the assembly of yeast 20S proteasomes. *Nat Struct Mol Biol* 2008, 15:228-236.
21. Komatsu M, Waguri S, Koike M, Sou YS, Ueno T, Hara T, Mizushima N, Iwata J, Ezaki J, Murata S, et al.: Homeostatic levels of p62 control cytoplasmic inclusion body formation in autophagy-deficient mice. *Cell* 2007, 131:1149-1163.
22. Hamazaki J, Sasaki K, Kawahara H, Hisanaga S, Tanaka K, Murata S: Rpn10-mediated degradation of ubiquitinated proteins is essential for mouse development. *Mol Cell Biol* 2007, 27:6629-6638.
23. Murata S, Sasaki K, Kishimoto T, Niwa S, Hayashi H, Takahama Y, Tanaka K: Regulation of CD8+ T cell development by thymus-specific proteasomes. *Science* 2007, 316:1349-1353.

[学会発表] (計 10 件)

1. The 32nd Annual Meeting of MBSJ (2009 年 12 月 9-12 日, Yokohama) Dissecting the assembly pathway of the proteasome. Shigeo Murata
2. 日本生化学会年会 (2009 年 10 月 21-24 日、神戸) シャペロン依存的プロテアソーム形成機構と病態。村田茂穂
3. EMBO Ubiquitin Meeting (2009 年 9 月 23 日 イタリア) Proteasome assembly in mammals. Shigeo Murata
4. The 66th KSBMB Annual Meeting (2009 年 5 月 12-13 日 ソウル、韓国) Mechanism of proteasome assembly in mammalian cells. Shigeo Murata
5. 第 28 回日本胸腺研究会 (2009 年 2 月 14 日、福岡) 胸腺特異的プロテアソームによる T 細胞の選別。村田茂穂
6. The 2nd international symposium of WPI-IFReC (2009 年 2 月 12 日、大阪) Production of positively selecting peptides by thymus-specific proteasomes. Shigeo Murata
7. Takeda Symposium (2008 年 12 月 3 日、東京) Production of positively selecting peptides by thymus-specific proteasomes. Shigeo Murata
8. BMB2008 (2008 年 12 月 12 日、神戸) プロテアソームの形成機構と病態。村田茂穂
9. 高遠シンポジウム (2009 年 8 月 22 日、長野) プロテアソームの多様性による生命活動の制御とその分子基盤。村田茂穂
10. FASEB summer research conferences (2008 年 6 月 17 日、アメリカ) Thymoproteasome regulate CD8+ T cell selection. Shigeo Murata

[その他]

ホームページ

<http://www.f.u-tokyo.ac.jp/~tanpaku/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村田 茂穂 (MURATA SHIGEO)

東京大学・大学院薬学系研究科・教授

研究者番号：20344070