

平成 21 年 6 月 5 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19770156

研究課題名 (和文) プロテアソーム形成過程の解析

研究課題名 (英文) Analysis of the proteasome assembly pathway

研究代表者

八代田 英樹 (YASHIRODA HIDEKI)

東京大学・大学院薬学系研究科・准教授

研究者番号：20311425

研究成果の概要：出芽酵母を用いた遺伝学的解析により、プロテアソームによるタンパク質分解に異常を来す変異株を取得し、責任遺伝子を同定し *DMP1*, *DMP2* (degradation of misfolded protein) と命名した。Dmp1 と Dmp2 はヘテロ二量体を形成し、形成途上のプロテアソームの 20S 複合体と一時的に会合することを明らかにした。*DMP1*, *DMP2* 欠損株では 20S 複合体の形成が障害され、特に異常な リングの形成が生じることから、正しい リングの形成を支援することによりプロテアソームの形成を助けるシャペロン分子であることを明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	0	1,800,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	390,000	3,490,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・分子生物学

キーワード：生体高分子構造・機能、プロテアソーム

1. 研究開始当初の背景

プロテアソームは真核細胞内で選択的なタンパク質分解を行う複合体型プロテアーゼである。プロテアソームは 20S 複合体と、その両端に会合する 19S 複合体が会合した 26S プロテアソームが活性型であり、ユビキチン化されたタンパク質を捕捉し、分解する。20S 複合体は 14 種類のサブユニット、19S 複合体は 19 種類のサブユニットが正確に分子集合することにより形成される複雑な構造体である。しかし、これまでどのようにしてプロテアソームが正しく形成されるのか、その機構は不明であった。最近、哺乳類において 20S

複合体の形成を助ける因子 PAC1-4 が同定された。しかしこれに相当する分子は酵母では見つかっていなかった。我々はアミノ酸アナログであるカナバニンに感受性を示す変異株を単離し、その責任遺伝子を同定したところ、これまで全く機能未知の遺伝子二つにたどり着き、*DMP1*, *DMP2* (degradation of misfolded protein) と命名した。Dmp1 と Dmp2 は複合体を形成し、形成途上の 20S 複合体に会合することがわかった。

2. 研究の目的

本研究では、プロテアソームの 20S 複合体の形成に Dmp1 と Dmp2 がどのように関わっているのか明らかにすることを目的として、研究を開始した。

3. 研究の方法

(1) dmp1/2 破壊株の遺伝学的・生化学的手法による詳細な表現型解析: dmp1/2 破壊株においてプロテアソーム形成のどの過程が障害されるのかを、グリセロール密度勾配遠心、ネイティブ PAGE、免疫沈降法を用いて明らかにした。さらに、Dmp1/2 が直接相互作用するプロテアソームのサブユニットを精製タンパク質によるプルダウン法を用いて同定した。また dmp1/2 と合成致死になる遺伝子の同定を遺伝学的解析により行った。

(2) Dmp1/2 がどのようにして、プロテアソーム形成に影響を及ぼしているか、その詳細なメカニズムを明らかにするために、Dmp1/2 と直接相互作用するサブユニット 5 の複合体の X 線結晶構造解析を行った。

4. 研究成果

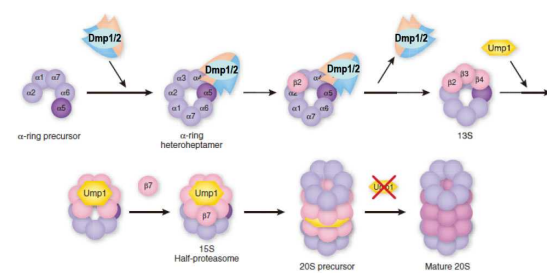
(1) 生化学的解析による Dmp1/2 のプロテアソーム形成シャペロン因子としての役割の解明:

dmp1/2 破壊株はカナバニンに感受性を示すとともに、細胞内にユビキチン化タンパク質が蓄積することから、プロテアソームに異常を来していることが強く推測された。そこで、dmp1/2 破壊株とプロテアソーム関連因子とを同時に欠損する株を作製したところ、rpn10 (ユビキチン化タンパク質捕捉サブユニット) との同時欠損で合成致死となることが判明し、Dmp1/2 がプロテアソームに深く関わる因子であることがさらに明らかとなった。

そこで、Dmp1/2 がどのようにプロテアソームと会合しているのかを明らかにする目的で、Dmp1/2 で免疫沈降を行ったところ、形成途上の 20S 複合体と会合し、完成した 20S 複合体や 26S プロテアソームとは全く会合しないことが判明し、プロテアソームの形成に関わっていることが強く示唆された。

dmp1/2 破壊株をグリセロール密度勾配遠心で分画し、プロテアソームの挙動を詳細に観察したところ、20S 複合体が消失していた。dmp1/2 欠損株で蓄積する形成途上の中間体の内容をネイティブ PAGE で解析したところ、7つのサブユニット(1-7)が環状に連なってリングを形成するところが、4だけが抜けた異常なリングを形成してしまうことが明らかとなり、Dmp1/2 は正しいリングの形成を助けることにより、プロテア

ソームの 20S 複合体の形成を助けていることがわかった(図1)



(2) X 線結晶構造解析による Dmp1/2 の動作メカニズムの解明:

どのような機構で Dmp1/2 がプロテアソーム 20S 複合体の形成を支援しているか、その動作機構を明らかにするために Dmp1/2 が直接相互作用するプロテアソームサブユニット 5 と Dmp1/2 の三者複合体を大量に精製し、X 線結晶構造解析を行った。

驚いたことに、哺乳類で見つかった 20S 複合体形成因子 PAC3 の構造と Dmp1/2 の構造は、一次配列にはほとんど相同性がないにもかかわらず酷似していた。このことはアミノ酸配列が大きく変わっても、立体構造が保存されていれば機能的にも保存されるといふ、進化的に興味深い観察である(図2)。

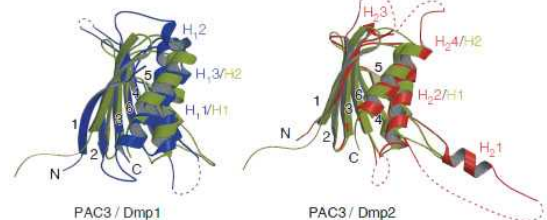
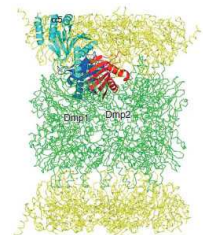


図2 酵母のプロテアソーム形成シャペロン Dmp1(青)、Dmp2(赤)と哺乳類のプロテアソーム形成シャペロン PAC3(緑)は、アミノ酸配列はほとんど保存されていないにもかかわらず、立体構造は極めて似ていることが判明した。

Dmp1-Dmp1-5 複合体を、既知の 20S 複合体の構造に挿入したところ、Dmp1/2 はリング上に会合してくるサブユニットと立体障害を起こす場所に位置することが分かり、Dmp1/2 が形成過程で 20S 複合体から解離することがリングに引き続いてリングが形成されるために必要であることがわかった(図3)。

図3 Dmp1-Dmp2-5 複合体の構造を 20S 複合体へスーパーインポーズしたものの



以上の研究成果は、プロテアソームの形成機構は酵母から哺乳類に至るまで高度に保存されていることを示すとともに、プロテアソームの形成がプロテアソームの活性を左右する、重要な制御点であることを明らかにするものである。

近年、プロテアソームが癌組織において高発現することが知られ、これを利用してプロテアソーム活性阻害剤 bortezomib が抗癌剤として臨床的に使われ始め、プロテアソームの活性を制御することが癌治療において非常に有用であることが示されている。しかしプロテアソーム活性阻害剤は致死的な副作用を来すことが多いことから、新しい作用機序のプロテアソーム阻害剤が求められている。我々の今回の研究成果に基づいて、「プロテアソーム形成阻害剤」を開発できれば、プロテアソームをほとんど形成しない非癌組織には傷害を与えず、プロテアソームを盛んに作り出すことによりはじめて生存可能となっている癌細胞を特異的に傷害する新しい抗癌剤となることが期待される。

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 5 件)

Molecular mechanisms of proteasome assembly. Murata S, Yashiroda H, Tanaka K.

Nat Rev Mol Cell Biol. 2009 Feb;10(2):104-15.
(査読有り)

Dissecting γ -ring assembly pathway of the mammalian 20S proteasome.

Hirano Y, Kaneko T, Okamoto K, Bai M, Yashiroda H, Furuyama K, Kato K, Tanaka K, Murata S.

EMBO J. 2008 Aug 20;27(16):2204-13.

(査読有り)

Crystal structure of a chaperone complex that contributes to the assembly of yeast 20S proteasomes.

Yashiroda H, Mizushima T, Okamoto K, Kameyama T, Hayashi H, Kishimoto T, Niwa S, Kasahara M, Kurimoto E, Sakata E, Takagi K, Suzuki A, Hirano Y, Murata S, Kato K, Yamane T, Tanaka K.

Nat Struct Mol Biol. 2008 Mar;15(3):228-36.

(査読有り)

出芽酵母 20S プロテアソーム形成に関わるシャペロン複合体 dmp1/Dmp2 の立体構造解析.

八代田英樹、水島恒裕

細胞工学、秀潤社 2008; 27: 474-475

(査読無し)

プロテアソームの分子集合機構

平野祐子、八代田英樹、佐伯泰

実験医学、羊土社 2008; 26(2): 102-109

(査読無し)

〔学会発表〕(計 3 件)

アミノ酸アナログによるストレス応答に必要なプロテアソーム会合支援複合体 Dmp1-Dmp2

八代田英樹

BMB2008, 2008年12月11日、神戸

The Dmp1-Dmp2 complex helps to assemble the yeast 20S proteasome.

Hideki Yashiroda

FASEB summer research conferences, 2008年6月15-20日、Vermont

出芽酵母 20S プロテアソーム形成に関わる新規シャペロン複合体

八代田英樹

BMB2007, 2007年12月14日、横浜

〔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

八代田 英樹 (YASHIRODA HIDEKI)

東京大学・大学院薬学系研究科・准教授

研究者番号: 20311425

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし