

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年6月10日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23657083

研究課題名（和文） プロテアソームによる分解産物の生理機能の解明

研究課題名（英文） Roles of degradation products generated by the proteasome

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）：プロテアソームは細胞内の主要なタンパク質分解酵素であり、タンパク質の機能を不可逆的に不活性化する。我々は、プロテアソームによる分解の結果として生じる短鎖ペプチドが生理的意義を有するという可能性を検討するために、細胞質および核に存在するペプチドをC18カラムにより精製した。質量分析により同定を行い、いくつかのペプチド配列の同定に成功した。また切り出すペプチドの質を変換する細胞およびマウスの作出に取りかかった。

研究成果の概要（英文）：The proteasome is the major proteolytic enzyme and irreversibly inactivate protein functions in cells. We assumed that short peptides generated by proteasomal degradation of cellular proteins have some physiological functions. To examine this hypothesis, we purified cytosolic and nuclear short peptides with C18-column. By using mass spectrometry, we succeeded in identifying sequences of these peptides. We also started to generate cell lines and mice in which peptide cleavage by the proteasome is altered.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

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：細胞内タンパク質分解

1. 研究開始当初の背景

プロテアソームは酵母からヒトに至るすべての真核生物において、生存に必須の働きをする細胞内タンパク質分解酵素複合体である。その作用は、ユビキチン化されたタンパク質を選択的に分解することにある。この“ユビキチン・プロテアソームシステム”は細胞周期、シグナル伝達をはじめ、細胞内のあら

ゆる機能を円滑に進行させるために不可欠なシステムである。

プロテアソーム作用の主たる生物学的意義は、タンパク質を分解することによりその機能を不可逆的に不活性化することにあるとされ、その分解産物の行方や意義については解析の対象とされることは殆どなかった。しかし、最近になり、プロテアソームの多様な

触媒活性により作り出されるプロテアソームの分解産物が、生理的に重要な役割を果たしていることを示唆する結果が得られ始めている。つまり、プロテアソームは 66 個のサブユニットからなる複合体であるが、そのうち $\beta 1$ 、 $\beta 2$ 、 $\beta 5$ と呼ばれる3つのサブユニットがそれぞれカスパーゼ様活性(酸性アミノ酸の後)のペプチド結合を切断する活性)、トリプシン様活性(塩基性アミノ酸の後)、キモトリプシン様活性(疎水性アミノ酸の後)という異なる触媒活性を持つ。なぜプロテアソームがこのような多様な触媒活性を持っているのか、その理由は現在まで不明である。しかし、NF- κ B p50サブユニットや転写因子 YB-1 は、前駆体タンパク質から、それぞれプロテアソームのキモトリプシン様活性、カスパーゼ様活性により限定分解を受けることにより、活性型に転換されることが知られる。またプロテアソームにより産生される短いペプチド断片に関して、キモトリプシン様活性が低下した特殊なサブユニット $\beta 5t$ を $\beta 5$ の代わりに組み込んだプロテアソームが産生するペプチドが、胸腺においてT細胞の分化を制御していることを、我々は明らかにしてきた。

以上のように、プロテアソームの分解産物が重要な生理機能を持つ少数の例が知られ、それがプロテアソームの有する多様な触媒活性により実現されていることが推測される。プロテアソームが基質とするタンパク質の種類豊富さ(細胞内の大半のタンパク質はプロテアソームにより分解されると推測されている)を考慮すると、プロテアソーム分解により生理機能を獲得するという機構は、より普遍的なものである可能性が考えられる。

2. 研究の目的

プロテアソームにより短いペプチドにまで断片化された産物が、主要組織適合抗原複合体(MHC)クラス I 分子に提示され自己と非自己識別のための旗印として免疫系に利用されることや、不活性化型として合成された後に、プロテアソームによる部分的な分解(限定分解)を受けることによりはじめて活性を獲得する分子が存在することから、プロテアソームによる分解が、その分子の生理的機能の終焉であるとの考え方だけでは、生命現象の理解には不十分である。

本研究は、プロテオミクス/ペプチドミクスとプロテアソーム活性変換モデル生物を用いた解析を軸として、プロテアソームの分解産物が獲得する生理機能の存在を明らかにし、新しい学問領域の創造を目指す。すなわち、プロテアソームによるタンパク質分解=タンパ

ク質の機能喪失、という固定概念を覆し、生命科学領域に新しい分野を切り開くとともに、プロテアソームによるタンパク質分解亢進あるいは分解不全が癌、炎症、神経変性をはじめとした数多くのヒト疾患に関与していることを鑑みると、新しい創薬標的や、リード分子となり得るペプチドの同定などが期待される。

3. 研究の方法

プロテアソームの多様な触媒活性、機能性タンパク質のデフォルト分解、および分解産物であるペプチドの核内動態が、分解産物に新たな生理的機能を付与する鍵であるとの想定の下、触媒活性変換酵母をもちいた遺伝学的解析、触媒活性変換マウスの作製による表現型の観察、それらのモデル生物を用いたプロテオミクスおよび核ペプチドミクスを組み合わせることにより、プロテアソームによるタンパク質分解産物が生理機能を獲得している可能性を探求し、さらに分解により機能を獲得する分子・ペプチドの同定を目指す。(1) プロテアソームの多様な触媒活性はなぜ必要か?

(2) プロテアソームは機能性ペプチドを産生するか?

の二つの観点から、研究を推進した。

4. 研究成果

(1) 多様な触媒活性はなぜ必要か?

①酵母遺伝学を用いた解析

プロテアソームの3種類の触媒活性のうち、キモトリプシン様活性はタンパク質分解に重要な働きを担うことが知られているが、その生理的意義が不明であるカスパーゼ様活性およびトリプシン様活性の機能を明らかにする目的で、遺伝学的改変が容易な出芽酵母を用いて、両活性を喪失する株の作出を試みた。

ストラテジーとしては、カスパーゼ様活性を担う $\beta 1$ サブユニットの基質特異性を決定する構造 (S1 ポケットと呼ばれる) およびトリプシン様活性を担う $\beta 2$ サブユニットの S1 ポケットを構成するアミノ酸残基をキモトリプシン様活性を担う $\beta 5$ と同様の配列に置換することとした (図 1)。

野生型サブユニットS1ポケット構成アミノ酸

	20	31	35	45	49	53	
$\beta 1$ (caspase-like)	T	T	T	R	A	Q	中性・親水性
$\beta 2$ (trypsin-like)	S	C	H	G	A	E	塩基性・親水性
$\beta 5$ (chymotrypsin-like)	A	V	I	M	A	Q	疎水性
変異型サブユニットS1ポケット構成アミノ酸							酸性
$\beta 1$ mut (chymotrypsin-like)	T	V	I	M	A	Q	
$\beta 2$ mut (chymotrypsin-like)	S	C	I	G	A	Q	

図1 プロテアソームのカスパーゼ様活性とトリプシン様活性欠失出芽酵母の作出

これらの株のプロテアソームの3種類の基

質分解活性を調べたところ、意図したとおりにカスパーゼ様活性とトリプシン様活性を消失し、キモトリプシン様活性が保たれていることが明らかとなり、このストラテジーによる遺伝子改変が本研究目的を遂行するために理想的であることがわかった (図2)。

酵母におけるカスパーゼ様活性とトリプシン様活性の生理的意義を明らかにする目的で、この二重変異株を用いてSGA(synthetic genetic array)と呼ばれる、網羅的遺伝学的相互作用解析を実施した。その結果、遺伝学的相互作用を示す遺伝子を複数個同定することに成功した。今後これを手がかりに、この2種類の活性が生理的どのような場面で機能を果たしているのかを明らかにしていく予定である。

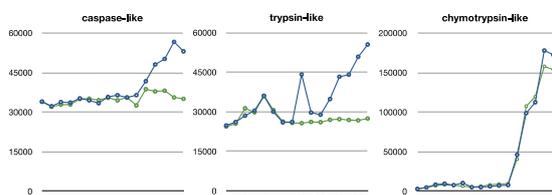


図2 プロテアソームのカスパーゼ様活性とトリプシン様活性欠失した出芽酵母の活性のグリセロール密度勾配選心分画による確認 (青線: 野生型、緑線: 変異株)

②哺乳類培養細胞およびマウスへの上記変異を導入

最終的にはヒトの身体においてどのような機能を果たしているのかを明らかにすることが目標であるので、①と同様の変異を人の培養細胞へ導入することとした。まず、カスパーゼ様活性のみに変異を入れた $\beta 2$ mutant を過剰発現する細胞株を作製した。この変異 $\beta 2$ サブユニットは効率的にプロテアソームに組み込まれた。活性を①と同様に計測すると、カスパーゼ様活性のみが特異的に著減していることが明らかとなった。この細胞におけるタンパク質分解の影響を検討したが、ユビキチン化タンパク質の蓄積は見られず、*in vitro* でも基質分解にも野生型細胞との間に差異は認められなかったことから、カスパーゼ様活性はタンパク質分解全般には必須ではないことが示唆された。

さらに、同様の変異、すなわちプロテアソームのカスパーゼ様活性を失った哺乳類個体を作成するため、ES細胞に上記の変異を持つ $\beta 2$ サブユニットのノックインを試みた。その結果、変異アレルのノックインに成功したES細胞クローンを1個取得することに成功した。現在このES細胞を用いて、キメラマウスを作成中である (図3)。

(2) 細胞内ペプチドの網羅的同定

プロテアソームは常に細胞内においてユビキチン化されたタンパク質を分解してお

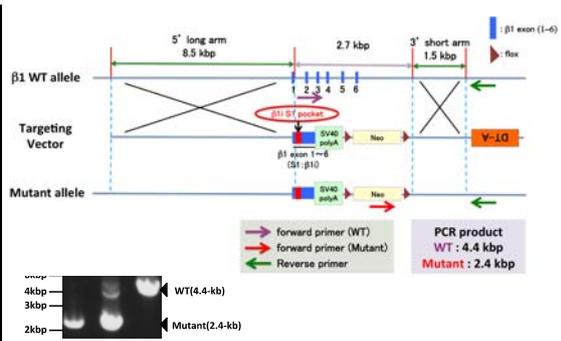


図3 プロテアソームのカスパーゼ様活性ノックアウトマウスの作製

り、従って3~30アミノ酸長の短いペプチド断片が大量に産生されていると考えられる。細胞質中には多数のアミノペプチダーゼが存在するためにこのような短いペプチドの寿命は長くないと考えられるが、一部のものはHsp70などのシャペロン分子で保護されることが報告されている。

このようなプロテアソームにより産生される短いペプチドは、単に分解副産物としてその後さらにアミノペプチダーゼにより分解されアミノ酸の供給源となるのみなのか、あるいは何らかの機能を発揮するのか、現時点では不明である。そこで、細胞内のこのようなペプチドを同定し、その機能解析を行うことを試みた。

哺乳類培養細胞細胞からペプチドを抽出する条件について、pH、界面活性剤、塩濃度を様々にけんとうした。最終的にはC18カラムに結合する

ペプチドを精製し、これをMALDI-TPF/TOF型質量分析装置により同定することとした。その結果、10本程度のペプチドを細胞質および核の分画から同定することに成功した。

続いて、これらのペプチドがプロテアソーム依存的に産生されているものかどうかを検討するために、プロテアソーム阻害剤によりこれらのペプチドが消失するかを測定したが、多くのペプチドはプロテアソーム阻害剤存在下でも検出された。従って、現時点においてはプロテアソーム依存的に産生される細胞内のペプチドを検出することには成功できていない。

今後さらに質量分析の感度や精製条件を検討することにより、効率よくプロテアソーム依存的に産生されるペプチドの同定を目指す。ペプチドの同定方法確立後は、(1)で樹立した酵母や哺乳類培養細胞を用いて、カスパーゼ様活性やトリプシン様活性特異的に産生されるペプチドの同定を目指す。

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 3 件)

(1) Decreased proteasomal activity causes age-related phenotypes and promotes the development of metabolic abnormalities. Tomaru U, Takahashi S, Ishizu A, Miyatake Y, Gohda A, Suzuki S, Ono A, Ohara J, Baba T, Murata S, Tanaka K, Kasahara M. *Am J Pathol.* (2012) 180(3):963-72. doi: 10.1016/j.ajpath.2011.11.012.

(2) A mutation in the immunoproteasome subunit PSMB8 causes autoinflammation and lipodystrophy in humans. Kitamura A, Maekawa Y, Uehara H, Izumi K, Kawachi I, Nishizawa M, Toyoshima Y, Takahashi H, Standley DM, Tanaka K, Hamazaki J, Murata S, Obara K, Toyoshima I, Yasutomo K. *J Clin Invest.* (2011) 121(10):4150-60. doi: 10.1172/JCI58414.

(3) Proteasome assembly defect due to a proteasome subunit beta type 8 (PSMB8) mutation causes the autoinflammatory disorder, Nakajo-Nishimura syndrome. Arima K, Kinoshita A, Mishima H, Kanazawa N, Kaneko T, Mizushima T, Ichinose K, Nakamura H, Tsujino A, Kawakami A, Matsunaka M, Kasagi S, Kawano S, Kumagai S, Ohmura K, Mimori T, Hirano M, Ueno S, Tanaka K, Tanaka M, Toyoshima I, Sugino H, Yamakawa A, Tanaka K, Niikawa N, Furukawa F, Murata S, Eguchi K, Ida H, Yoshiura K. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (2011) 108(36):14914-9. doi: 10.1073/pnas.1106015108.

[学会発表] (計 3 件)

① Naoyuki Mita, Jun Hamazaki, Shigeo Murata. Enzymatic purification and mass spectrometric identification of polyubiquitinated proteins. 第 35 回日本分子生物学会年会、2012 年 12 月 11~14 日、

福岡。

- ② Akihiko Fukuda, Jun Hamazaki, Shigeo Murata. Investigation of the biological meaning of β subunit diversity. 第 35 回日本分子生物学会年会、2012 年 12 月 11~14 日、福岡。
- ③ 白水亮平、八代田英樹、村田茂穂、プロテアソームとミトコンドリアの遺伝学的相互作用。第 84 回日本生化学会大会。2011 年 9 月 17 日、京都。

[図書] (計 1 件)

「タンパク質分解系による生体制御」(羊土社) 村田茂穂、反町洋之編。2011 年。総ページ数 242。

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)
○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<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