

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590075

研究課題名(和文)新規会合因子PI31によるプロテアソーム機能調節因子の解明

研究課題名(英文)Analysis of the mechanism of the regulation of proteasome by novel modifier PI31

研究代表者

濱崎 純 (Hamazaki, Jun)

東京大学・薬学研究科(研究院)・助教

研究者番号：80533588

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：プロテアソームは真核細胞に必須のタンパク質分解酵素複合体である。我々はプロテアソーム機能調節因子の探索から、新規プロテアソーム会合因子としてPI31を同定した。部位特異的なPI31発現抑制ハエ系統を作製すると様々な表現型を示し、PI31は発生のみならず組織の機能維持にも重要である事が明らかとなった。プロテアソーム機能への関与に着目しつつPI31の生化学的解析を推進し、哺乳類細胞なども用いた細胞生物学的解析も行なった。哺乳類PI31の生理学的意義を明らかにするためにコンディショナルノックアウトマウスの作製を行い、現在までに幾つかの臓器特異的ノックアウトマウスを作成し解析を行っている。

研究成果の概要(英文)：Proteasome is an essential protease complex that is conserved in eukaryotes. Recently, we identified PI31 as a novel proteasome function modifier. We observed PI31 knockdown fly shows significant defect in development and cell homeostasis. We conducted the biochemical study about PI31 and generated the PI31 conditional knockout mice.

研究分野：タンパク質分解

キーワード：プロテアソーム タンパク質分解

### 1. 研究開始当初の背景

プロテアソームは真核細胞において、ユビキチン化されたタンパク質を選択的に分解する事で、多様な生命現象を円滑に進行させる酵素複合体である。26S プロテアソームは活性部位の20Sプロテアソームとその両端に結合する19S調節因子から構成されており、基質の選択性などには19Sもしくはプロテアソーム会合因子が関与していると考えられている。プロテアソームのサブユニットは多くが進化的に高度に保存されているが、19Sや会合因子は進化に伴いアミノ酸配列が変化しているものもあることから、高等生物におけるプロテアソームの多様な役割は、これら構成因子の多様化や複雑化が深く関与していると考えられている。また、最近の質量分析解析の発展に伴い、新規会合因子が数多く報告され、これらがプロテアソームの機能調節に実際に働いている事も次々と明らかになっている。しかしながら、プロテアソームサブユニット・会合因子の中には未だ機能未知の分子も多く、特に高等生物プロテアソームの機能調節機構は実はほとんど明らかになっていない。

プロテアソームの機能異常が様々な疾患に関係する事が明らかとなってきたが、どのようにプロテアソームが機能調節をしているかは明らかでなかった。また、これまでプロテアソーム研究の主流であった酵母により得られた知見がそのまま高等動物プロテアソームに当てはまる訳ではないという事も知られてきたことから、高等動物を用いたプロテアソームの機能制御に関する研究は重要性を増している。実際に、プロテアソームの活性低下による寿命の短縮や神経変性疾患の発症、活性亢進により寿命の延長などが線虫やハエを用いた研究で明らかにされている。さらに、がん細胞においてプロテアソームの発現が亢進していることも報告されていることから、生理的条件下でのプロテアソームの厳密な活性調節が重要であることが理解されてきている。そのなかで、プロテアソームの基本的な性質の解明はいまだ発展途上と言わざるを得ない状況にあり、新規の解析手法や因子の同定を通じた新概念の創出が必要不可欠であった。

申請者らはプロテアソーム会合因子の探索からPI31を新規会合因子として同定し、出芽酵母、ショウジョウバエ、ヒト培養細胞を用いて様々な角度から機能解析を行なった。実はPI31は以前にプロテアソーム阻害因子として同定されていたが、活性化因子としても報告され、その実体は全くの未知であった。我々の解析の結果、酵母PI31は20Sプロテアソームに会合し、プロテアソームの活性を正に制御することを見出した。また、PI31欠損株は顕著な表現型を示さないものの、20S形成シャペロンPba3(PAC3)と合成致死となる事を見出し

た。そして、ハエPI31におけるUAS-GAL4システムを用いた器官特異的PI31ノック

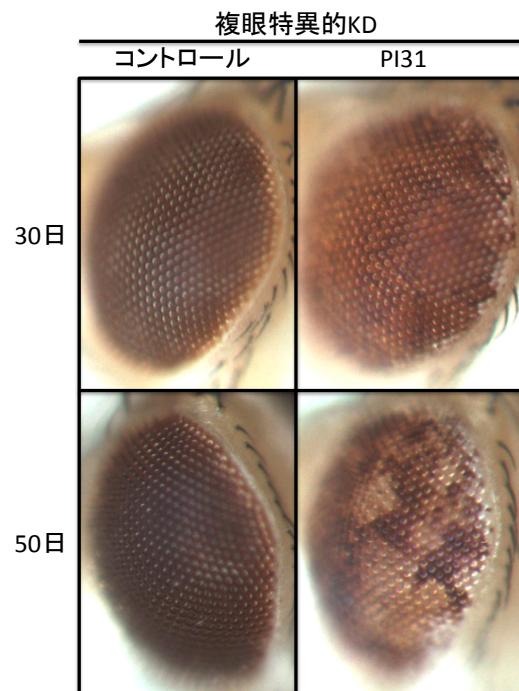


図1: 複眼特異的PI31KDハエの加齢依存的な色素脱落。複眼の形態形成は正常であるが、50日経過後の老齢個体(右下)では、PI31KD個体は顕著な色素脱落を生じる。

ダウン(KD)系統において、羽の形成不全や複眼の加齢依存的な色素の脱落といった特徴的な表現型を示したことから、PI31の器官形成、細胞機能維持における役割の重要性が示された(図1)。さらに、ヒト培養細胞での解析より、申請者らはPI31がC末端に持つHbYXモチーフによりプロテアソームと会合し、既に結合が報告されていたFboxタンパク質であるFbxo7とPI31における内在性の結合を確認するとともに、PI31KD細胞でユビキチン化タンパク質が蓄積すること、PI31とFbxo7のダブルKD細胞において26Sプロテアソームが増加することを見出した。さらに興味深いことに、PI31KD細胞において酸化ストレス応答が惹起されていることを見出した。

### 2. 研究の目的

高等動物プロテアソーム機能を調節する新奇因子PI31の機能を解明する事で、プロテアソームの機能調節機構及び新たな生物学的機能を明らかにする。PI31の解析によるプロテアソームの活性制御機構を解明し、プロテアソーム調節異常による病態発症機構への理解を目的とする。また、これらの知見から新たな創薬に関する分子基盤を提供する。

### 3. 研究の方法

本研究計画ではPI31によるプロテアソ-

ムの機能制御機構及びその生物学的意義を明らかにするために以下の観点から計画を実施する。

計画 1: PI31 についてプロテアソーム活性制御、会合調節機構について酵母、ヒト培養細胞を用いて生化学的に解析する。また、プロテアソームと PI31 の機能を結びつける新規分子の探索のために、酵母およびハエ PI31 について欠損体の表現型を増悪・回復する遺伝学的相互作用分子を探索し、PI31 とプロテアソーム制御を結びつける分子を同定し、生物学的意義を明らかにする。

計画 2: PI31 ノックアウトマウスの作製および解析から、PI31 のプロテアソーム機能制御における分子機構を明らかにしどのように病態に関与するかを検証する。

#### 4. 研究成果

計画 1: dsRNA 系統およびゲノム領域欠損系統との交配による PI31 発現抑制ハエの表現型を抑制・増悪化する修飾因子を探索するスクリーニングを行っている途中で、候補遺伝子の同定を順次行っている。今後、候補遺伝子の詳細な解析により実際に PI31 やプロテアソームに相互作用するか遺伝学的・生化学的に検証する。また、遺伝子過剰発現系統との交配によるスクリーニングも予定しており、様々なアプローチで PI31 の機能就職因子の探索を進めている。当初の予定で主要な PI31 相互作用因子であった Fbxo7 については、研究期間中に新規性の高い結果が得られていないことから、優先順位を途中から下げて解析を行った。

計画 2: PI31 発現抑制ハエの表現型解析より、PI31 は個体発生時および臓器における細胞恒常性維持に重要であることが明らかとなった。これは哺乳類培養細胞での我々の解析結果と異なり個体における PI31 の重要性を明確に示す重要な結果である。また、PI31 ノックアウトマウスの表現型マウスの解析により、ハエでの解析同様、PI31 はマウスの発生および細胞恒常性維持に重要であることを見出した。今後はより詳細な解析によりプロテアソームへの影響および病態発症機構を明らかにする。

#### 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 2 件)

1: Uechi H, Hamazaki J, Murata S. (2014) Characterization of the testis-specific proteasome subunit a4s in mammals. *J Biol Chem.* 289. 12365-74. DOI: 10.1074/jbc.M114.558866 (査読有)

2: Shin SW, Shimizu N, Tokoro M, Nishikawa S, Hatanaka Y, Anzai M, Hamazaki J, Kishigami S, Saeki K, Hosoi Y, Iritani A, Murata S, Matsumoto K. (2013) Mouse zygote-specific proteasome assembly chaperon important for maternall-to-zygotic transition. *Biol Open.* 2 (2) 170-82. DOI: 10.1242/bio.20123020 (査読有)

[学会発表] (計 6 件)

1: Jun Hamazaki, Shigeo Murata. Collaborative roles of proteasome ubiquitin receptors Rpn13 and Rpn10 are essential for hepatocyte homeostasis. FASEB Science Research Conferences 2014 Ubiquitin and Cellular Regulation. 2014年6月15日~20日. Saxton River, Vermont, USA.

2: 濱崎純、村田茂穂. 哺乳類プロテアソームにおけるユビキチン化タンパク質認識機構と脱ユビキチン化機構の遺伝学的解析 (招待講演). 第 87 回日本生化学会大会. 2014 年 10 月 15 日~18 日. 国立京都国際会館・グランドプリンスホテル京都 (京都) .

3: 治田義太郎、濱崎純、八代田英樹、村田茂穂. プロテアソーム相互作用因子 PI31 の機能解析. 第 37 回日本分子生物学会. 2014 年 11 月 25 日~27 日. パシフィコ横浜 (横浜) .

4: Hiroyuki Uechi, Jun Hamazaki, Erina Kuranaga, Masayuki Miura, and Shigeo Murata. A novel ubiquitin-interacting protein that counteracts aggregate formation of ubiquitinated proteins. 第 87 回日本生化学会大会. 2014 年 10 月 15 日~18 日. 国立京都国際会館・グランドプリンスホテル京都 (京都) .

5: Hiroyuki Uechi, Jun Hamazaki, Erina Kuranaga, Masayuki Miura, and Shigeo Murata. A heat shock proteins- and ubiquitin- interacting protein counteracts aggregate formation of ubiquitinated proteins for proteasome degradation. Symposium for young ubiquitin researchers in Japan "New Era in the Ubiquitin Research". 2014 年 11 月 11 日~12 日. 国際高等研究所 (京都) .

6: 濱崎純、村田茂穂. 哺乳類プロテアソームサブユニット Rpn10 と Rpn13 による強調したユビキチン認識はプロテアソーム機能に重要である. 第 37 回日本分子生物学会. 2014 年 11 月 25 日~27 日. パシフィコ横浜 (横浜)

〔図書〕（計 1 件）

濱崎純、村田茂穂. 医学のあゆみ「活性酸素・基礎から病態解明・制御まで」医歯薬出版. 2013

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

濱崎 純 (HAMAZAKI, Jun )  
東京大学大学院薬学系研究科・助教  
研究者番号：80533588

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：