

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：82609

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670153

研究課題名(和文)超長寿ネズミのタンパク質品質管理機構の解析

研究課題名(英文)Molecular analysis of protein quality control system of the extraordinarily long-lived rodent

研究代表者

原 孝彦(HARA, Takahiko)

公益財団法人東京都医学総合研究所・生体分子先端研究分野・プロジェクトリーダー(参事研究員)

研究者番号：80280949

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：ハダカデバネズミは超長寿のげっ歯類である。加齢マウスの肝臓ではユビキチン化タンパク質が増加するのに対して、ハダカデバネズミではこの現象は観察されない。そこで、両種の皮膚線維芽細胞を用いてプロテアソーム系の活性と発現を比較した。まず、26Sプロテアソームを精製してキモトリプシン活性を測定したところ、ハダカデバネズミ細胞の方が約2.5倍活性が高かった。数あるプロテアソームサブユニットの中で、免疫プロテアソームを構成する 1iタンパク質だけがハダカデバネズミ細胞で顕著に高発現していた。この結果は、ハダカデバネズミにはタンパク質品質管理能が増強された特殊なプロテアソーム系が存在することを示唆している。

研究成果の概要(英文)：Naked mole rat (NMR) is an extraordinarily long-lived rodent. It was previously shown that age-dependent increase of ubiquitinated proteins in the liver does not occur in NMRs. We hypothesized that the ubiquitin-proteasome system of NMRs is different from that of mice. To test that possibility, we isolated 26S proteasome complex from NMR-derived dermal fibroblasts and mouse dermal fibroblasts and compared their proteasome activities. We found that chymotrypsin-like activity of NMR-fibroblasts was 2.5 times higher than that of mouse fibroblasts. Quantitative comparison of major proteasome subunits between two species by qRT-PCR and western blotting revealed that 1i, one of the immunoproteasome components, is abundantly expressed in NMR fibroblasts. We also confirmed the incorporation of 1i protein in the 26S proteasome of NMR fibroblasts. These results collectively indicate the presence of NMR-specific proteasome complex with a higher degradation capacity of ubiquitinated proteins.

研究分野：分子生物学

キーワード：プロテアソーム ハダカデバネズミ 老化

1. 研究開始当初の背景

ハダカデバネズミ [Naked mole rat, *Heterocephalus glaber*] (以下、デバネズミと略す) は、アフリカの地中で大規模な群れを形成して生活している体長 9cm ほどのげっ歯類である。ラットやマウスが3年までしか生きられないのに対して、デバネズミの寿命は30年を超える。驚くべきことに、デバネズミは地中で活発に活動しているにもかかわらず、癌や心臓病にほとんど罹らない。近年、デバネズミの超長寿と密接に関連する表現型として、活性酸素による血管の障害が起こりにくいこと (Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol., 291: H2698-2704, 2006)、そして老化に伴うユビキチン化タンパク質の蓄積が観察されないこと (PNAS, 106: 3059-3064, 2009)、が報告された。2011年にデバネズミの全ゲノム DNA 塩基配列が決定されて分子生物学的なアプローチが可能となったが、この特殊なげっ歯類が保有する驚異的な長寿命の分子基盤は未だ解明されていない。

正常な立体構造をとっていない、いわば不良タンパク質は細胞内でユビキチン化され、26S プロテアソーム複合体によって分解される。26S プロテアソームとは、活性中心をもつ 20S プロテアソームと、それを制御する 19S プロテアソームとから成る巨大複合体のことを指す (図1)。20S プロテアソームは7つの α サブユニット ($\alpha 1 \sim 7$) と7つの β サブユニット ($\beta 1 \sim 7$) で構成される。19S プロテアソームの方は、ATP 依存的に働くサブユニット (Rpt1~6) と ATP 非依存的に働くサブユニット (Rpn1~3, 5~13, 15) から成る。20S プロテアソームに含まれる $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 5$ の3つのサブユニットは、それぞれカスパーゼ様活性、トリプシン様活性、キモトリプシン様活性を有し、ユビキチン化タンパク質を迅速に分解する。感染症などの炎症反応がおこった際には、 $IFN\gamma$ によって別のセットの β サブユニット ($\beta 1i$, $\beta 2i$, $\beta 5i$) が発現誘導され、20S プロテアソームの $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 5$ と入れ替わることで免疫プロテアソームが形成される。免疫プロテアソームは、MHC クラス I 上に提示する抗原ペプチドを生み出す重要な役割を担っており、脾臓やリンパ節のような組織では高レベルに発現している。

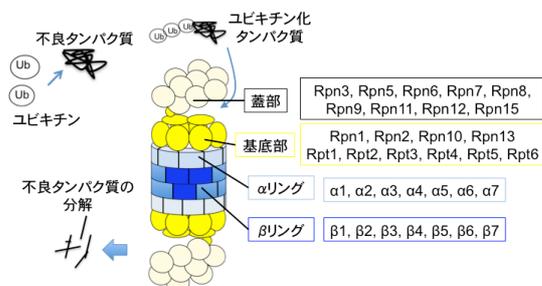


図1. 哺乳類プロテアソームの構造と構成タンパク質
 β リングを形成するサブユニットの内で、 $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 5$ がタンパク質分解酵素活性を持つ。

最近、ヒト ES 細胞が高いプロテアソーム

活性を保持していること、そしてそれを神経前駆細胞とニューロンへ順次分化誘導すると、26S プロテアソームサブユニット *PSMD11* (Rpn6) の発現レベルが低下して、ユビキチン化タンパク質が段階的に増えていくことが報告された (Nature, 489: 304-308, 2012)。16種類ある 26S プロテアソームサブユニット遺伝子の中で、*PSMD11* のみがヒト ES 細胞の分化に伴って発現低下し、その転写は核内因子 FoxO4 によって制御されていた。興味深いことに、線虫の長寿ミュータントでは、*PSMD11* オルソログの発現レベルが Insulin/IGF/FoxO シグナル伝達系に依存して高進していた。したがって、デバネズミにおいても、*PSMD11* が長寿に関係している可能性が推察されていた。これが、デバネズミの超長寿命とユビキチン-プロテアソーム系によるタンパク質品質管理機構との関係を探ろうと決めた理由である。

2. 研究目的

先に述べたように、老化したマウスの肝臓ではユビキチン化タンパク質が増加していくのに対し、デバネズミの肝臓ではこの現象は観察されなかった。この事実は、デバネズミの肝臓には特別なタンパク質品質管理機構が備っており、不良タンパク質を迅速に分解除去していることを示唆している。これと関連して、デバネズミの肝臓ではプロテアソーム活性が増強されている、という論文が発表された (PLoS ONE, 7: e35890, 2012)。したがって、プロテアソーム-ユビキチン系による不良タンパク質の分解活性が、個体の老化と密接に関わっている可能性が高い。デバネズミに驚異的な長寿命をもたらす分子メカニズムを解明できれば、哺乳類のアンチエイジング研究にとって大きなブレイクスルーとなる。また、タンパク質の凝集や不溶化が原因でおこるアルツハイマー病などの神経難病に対する治療法開発にも有用な情報をもたらすと期待される。そこで本研究では、デバネズミ由来培養細胞を用いたプロテアソームサブユニットの発現解析を通じて、デバネズミの強力なタンパク質品質管理能を支える責任分子を同定することを目指した。

3. 研究方法

デバネズミの皮膚線維芽細胞は、慶応大学医学部 (現、北海道大学遺伝子病研究所) の三浦恭子博士より分与していただき、15% fetal bovine serum (FBS) (Invitrogen), 200 mM L-glutamine (Sigma), Non-Essential amino acids (Invitrogen), Penicillin/Streptomycin (Sigma) を添加した Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) を用いて、32°C, 5%酸素条件下で培養した。マウスの皮膚線維芽細胞の調製は以下のように行った。12~18 週齢の C57BL/6 雌マウスの皮膚をはがし、0.25% Trypsin 溶液 (Sigma) にて 4°C で 1 日処理した

後、よく切り刻んだ。その後、0.1% collagenase I (Sigma)を含む DMEM にて 37°Cで 4 時間処理後、Cell strainer (40µ pore, BD Biosciences)を通した後、10% FBS, 200 mM L-glutamine, Non-Essential amino acids, Penicillin/Streptomycin を含む DMEM を用いて 37°C, 20%酸素条件下で培養した。

デバネズミ皮膚線維芽細胞とマウス皮膚線維芽細胞の total RNA を、RNeasy mini kit (Qiagen)を用いて抽出した後、SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen) と Oligo(dT)を用いて cDNA へと変換した。THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (Toyobo)を用いて、LightCycler480 II (Roche)上で定量的 RT-PCR 反応を行った。

次に、タンパク質を解析する目的で、培養細胞を氷冷した Phosphate buffered saline (PBS)で 2 回洗浄した後、RIPA buffer [50 mM Tris (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.5% Deoxycholate (Sigma), 0.1% SDS, 1 mM EDTA, Complete Protease Inhibitor Cocktail (Roche)]を加え氷上で 10 分間置き、Cell scraper を用いて細胞溶解液を回収した。4°Cで 15 分間 15,000 rpm で遠心した後の上清をタンパク質抽出物として用いた。タンパク質濃度は、BCA Assay (Pierce)を用いて決定した。

ウエスタンブロッティングは以下のように行った。タンパク質ライセート 20µg に Sample Buffer を加え 90°Cで 5 分間熱変成させた後、10-20% SDS-PAGE にかけた。ゲルを転写した PVDF メンブレンを 5% skim milk/PBS で 45 分間ブロッキングした後、0.1% TritonX-100/5% skim milk/PBS で希釈した 1 次抗体と、室温で 90 分間、あるいは 4°Cで 1 晩反応させた。次に、メンブレンを 0.05% Tween 20/PBS で 5 分間 3 回洗浄し、HRP 標識された 2 次抗体と室温で 60 分間反応させた。0.05% tween 20/PBS で 5 分間 4 回洗浄した後、ECL prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare)で処理し、ルミノイメージアナライザー LAS-3000 (Fujifilm)を用いてシグナルを検出した。

4. 研究成果

デバネズミ線維芽細胞を用いた Induced hepatocyte-like cell (iHep)の分化誘導

研究の出発材料としては、タンパク質代謝が最も盛んな肝臓を用いるべきであるが、そのためには大量のデバネズミ個体が必要となる。しかし、デバネズミコロニーの繁殖率の低さから個体を実験に用いることは困難であった。そこで、デバネズミの皮膚線維芽細胞から iHep を作出できれば、肝臓の代わりに使えるのではないかと考えた。iHep は、FOXA3 と HNF4α という 2 つの転写因子によるダイレクトリプログラミングによって誘導される肝細胞様の細胞であり、アルブミンの分泌、尿素の産生、薬物代謝など、成熟し

た肝細胞特有の性質を備えている。

まず初めに、レトロウイルスベクターを用いて FOXA3 と HNF4α をマウス皮膚線維芽細胞に導入し、5 日後から HGF, EGF を培地に添加し培養することで iHep を誘導できることを確認した。一方、デバネズミ皮膚線維芽細胞ではレトロウイルスベクターによる遺伝子導入が成功しなかったため、レンチウイルスベクターを実験に用いた。レンチウイルスベクター (LV-FOXA3, LV-HNF4α) を 293T 細胞に感染させて、正しいサイズのタンパク質がつくられることをウエスタンブロッティングにより確認した後、遺伝子導入実験を行った。しかし、遺伝子導入後 24 日目まで培養を続けたが、iHep 様細胞は出現しなかった。

デバネズミ線維芽細胞におけるユビキチン化タンパク質の総量

未開拓の動物では、予期せぬ事態が起こりうる。最初の壁を打破すべく、デバネズミ皮膚線維芽細胞とマウス皮膚線維芽細胞そのものを用いて、ユビキチン-プロテアソーム系の分子解析を行うことに方針転換した。

最初に、ユビキチン化タンパク質の総量をウエスタンブロッティングにより比較した。デバネズミ肝臓での報告と合致して、デバネズミ皮膚線維芽細胞では、マウス皮膚線維芽細胞と比較してユビキチン化タンパク質の総量が減少していた (図 2)。

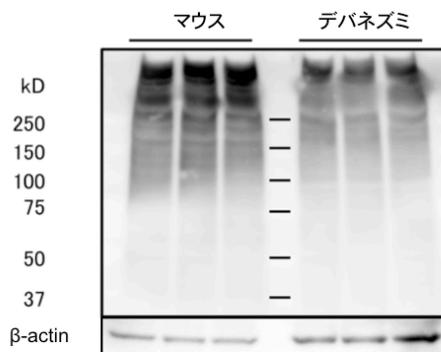


図2. ユビキチン化タンパク質の総量比較

ハダカデバネズミ皮膚線維芽細胞とマウス皮膚線維芽細胞におけるユビキチン化タンパク質の総量を、抗ユビキチン抗体ウエスタンブロッティングによって解析した。

デバネズミ線維芽細胞におけるプロテアソームサブユニットの発現量

次に、デバネズミ皮膚線維芽細胞におけるプロテアソームサブユニットの mRNA 発現レベルを qRT-PCR によって定量し、マウス皮膚線維芽細胞での値と比較した。Gapdh 遺伝子の発現量に種差はないと考え、これを内部標準とした。19S プロテアソームを構成するサブユニット遺伝子のうち 5 種類 (Psmc4, Psmc6, Psmc10, Psmc11, Psmc14)、および 20S プロテアソームに含まれる β サブユニット遺伝子のうち 5 種類 (Psmb5, Psmb6, Psmb7, Psmb8, Psmb9, Psmb10, Psmb11)の mRNA 発現

レベルを定量比較した。その結果、マウス皮膚線維芽細胞と比較してデバネズミ皮膚線維芽細胞では免疫プロテアソームのサブユニットである *Psmb9* ($\beta 1i$) 遺伝子の発現レベルが 13 倍以上亢進していることが判明した (図 3)。他の免疫プロテアソームサブユニット *Psmb10* ($\beta 2i$) や *Psmb8* ($\beta 5i$) 遺伝子の発現には大きな変動は検出されなかった。なお、研究開始時に注目していた *Psm11* 遺伝子の発現レベルにも差は検出されなかった。

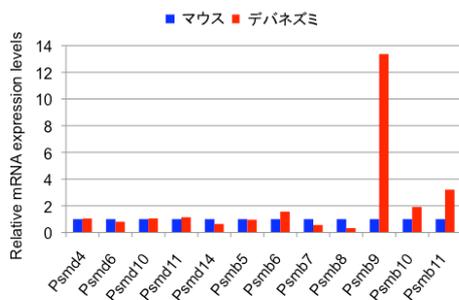


図3. プロテアソームサブユニット遺伝子の発現レベル比較
ハダカデバネズミ皮膚線維芽細胞とマウス皮膚線維芽細胞を用いて、表記のプロテアソームサブユニット遺伝子の発現レベルを定量的 RT-PCRによって比較解析した。*Psm9*は $\beta 1i$ をコードする遺伝子。

次に、プロテアソームサブユニットのタンパク質発現レベルをウエスタンブロッティングによって解析した。この実験においてもマウス皮膚線維芽細胞を比較対象として、19S プロテアソームを構成するサブユニット (Rpn7, Rpt6)、20S プロテアソームの α サブユニット ($\alpha 1$)、 β サブユニット ($\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 5$, $\beta 1i$, $\beta 2i$, $\beta 5i$)、について解析を行った。通常型プロテアソームのコントロールとして 293T 細胞を、免疫プロテアソームのコントロールとしてマウス脾臓組織をそれぞれ用いた。実験の結果、マウス皮膚線維芽細胞では発現が認められなかった $\beta 1i$ タンパク質が、デバネズミ皮膚線維芽細胞では顕著に増加していることが明らかになった (図 4)。 $\beta 2i$ や $\beta 5i$ タンパク質については、どちらの種の皮膚線維芽細胞でも検出されなかった。

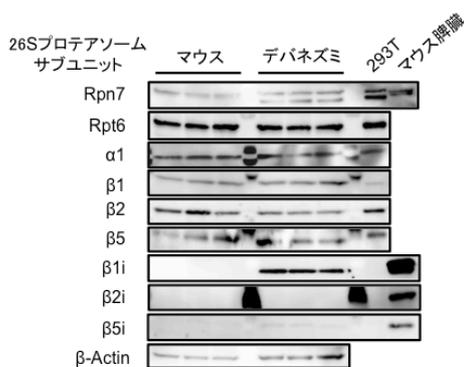


図4. プロテアソームサブユニットタンパク質の発現量比較
ハダカデバネズミ皮膚線維芽細胞とマウス皮膚線維芽細胞を用いて、表記のプロテアソームサブユニットタンパク質の発現レベルをウエスタンブロッティングによって比較解析した。

デバネズミ線維芽細胞におけるプロテアソームの活性

デバネズミがマウスと異なるユビキチン-プロテアソーム系を有している可能性を考え、皮膚線維芽細胞を用いて両者のプロテアソーム組成とタンパク質分解活性を調べてみることにした。デバネズミ皮膚線維芽細胞とマウス皮膚線維芽細胞の 26S プロテアソームをグリセロール密度勾配遠心によってそれぞれ分画し、キモトリプシン活性を測定した。その結果、デバネズミの方が約 2.5 倍活性が高かった (図 5)。

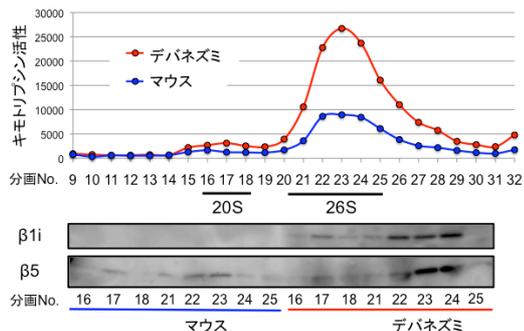


図5. プロテアソーム複合体の分離とタンパク質分解活性の比較
ハダカデバネズミ皮膚線維芽細胞とマウス皮膚線維芽細胞の細胞溶解液をグリセロール密度勾配遠心にかけて、プロテアソーム複合体を分離した。それぞれのタンパク質分解活性を、キモトリプシン用の基質を用いて測定した。

確認のため、デバネズミ皮膚線維芽細胞の 26S プロテアソーム分画に $\beta 1i$ タンパク質が確かに取り込まれていることを質量分析によって証明した。

次にマウス皮膚線維芽細胞にデバネズミの $\beta 1i$ cDNA を過剰発現させてみたところ、キモトリプシン活性が上昇した。デバネズミの $\beta 1i$ は N 末端プロセッシング配列がマウスの $\beta 1i$ と異なっており、これが効率的なプロテアソームへの取り込みに寄与している可能性がある。しかし、マウス皮膚線維芽細胞にデバネズミの $\beta 1i$ を過剰発現させても、ユビキチン化タンパク質の総量に大きな変化は観察されなかった。したがって、 $\beta 1i$ タンパク質の恒常的発現がデバネズミのタンパク質品質管理機構にどれだけ貢献しているかについては、まだ結論が出せない。現在、老化個体で起こっている慢性炎症状態を模倣するようなストレスを、デバネズミ皮膚線維芽細胞やデバネズミ $\beta 1i$ を発現させたマウス皮膚線維芽細胞細胞にかける実験を行っている。

本研究では、最初にレンチウイルスベクターを用いて皮膚線維芽細胞からの iHep 誘導を試みたが、成功しなかった。デバネズミの皮膚線維芽細胞は倍加時間が約 5 日と、かなり長く、至適培養温度や酸素濃度についてもマウス皮膚線維芽細胞と条件が異なる。iHep 誘導にもっと長い時間がかかる可能性を含めて、実験条件を洗い直す必要がある。

デバネズミ由来 iHep の調製が難航している中、デバネズミ皮膚線維芽細胞そのものを

使った発現解析から興味深い事実が明らかとなった。まず、デバネズミ皮膚線維芽細胞ではマウスの皮膚線維芽細胞と比べてユビキチン化タンパク質の総量が減少していた。より興味深いことに、プロテアソームサブユニットのうち $\beta 1i$ 遺伝子の発現だけが、デバネズミ皮膚線維芽細胞ではマウス皮膚線維芽細胞より顕著に亢進していた。この現象がタンパク質レベルでもおこっていることを証明した。さらに最近、複数のデバネズミ個体の脳と腎臓においても、 $\beta 1i$ タンパク質が高発現していることを見出している。 $\beta 1i$ は免疫プロテアソームを構成するサブユニットの1つであり、通常では $IFN\gamma$ のような炎症性刺激がない限り発現誘導されない。しかし、デバネズミ皮膚線維芽細胞では、何らかの仕組みによって $\beta 1i$ が恒常的に高発現していた。もし $IFN\gamma$ によって $\beta 1i$ が発現誘導されているならば、 $\beta 2i$ や $\beta 5i$ も同時に発現しているはずであるが、そうではなかった。

デバネズミでは、 $\beta 1i$ サブユニットが 20S プロテアソームに組み込まれ、このデバネズミ特有の 26S プロテアソーム複合体がユビキチン化タンパク質の分解力を増強しているものと予想される。これが本研究によって導き出された仮説である (図6)。

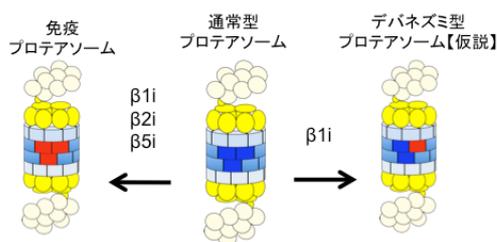


図6. ハダカデバネズミ型プロテアソーム複合体(仮説)
本研究結果に基づいて提唱される、ハダカデバネズミ型プロテアソームの構造を模式的に表した。

$\beta 1i$ だけが 20S プロテアソームに組み込まれるという報告はこれまでにないため、慎重な生化学的検証が必要である。以前、テキサス大学の Rodriguez らは、デバネズミの肝臓では $\alpha 4$, $\alpha 7$, $\beta 4$, Rpn10, $\beta 2i$, $\beta 5i$ の発現レベルがマウスの肝臓より亢進していることを報告した (PLoS ONE, 7: e35890, 2012)。さらに最近、ミシガン大学の Pickering らは長寿な動物 (霊長類とげっ歯類) ほどプロテアソーム活性が高く、 $\beta 5i$ の発現レベルと寿命とが正に相関している証拠を提出した (J. Clin. Invest., 125: 2059-2068, 2015)。しかし、我々の解析結果では、デバネズミの肝臓では $\beta 1i$ と $\beta 2i$ タンパク質がわずかに発現していたものの、 $\beta 5i$ タンパク質は全く検出されなかった。使用している抗体の特異性、あるいはデバネズミの飼育環境や個体差が、結果不一致の原因であろうと推察される。

$\beta 1i$ の異所的な高発現は長寿命の原因になっているだろうか？これは我々が最も知りたいところである。その目的で、デバネズミ

の $\beta 1i$ cDNA を過剰発現するトランスジェニックショウジョウバエ系統を、他との共同研究によって作出した。本研究期間中に結果を得るには至らなかったが、これらのショウジョウバエの寿命、そしてタンパク質品質管理能を詳細に調べることによって、デバネズミ型プロテアソームの生理的な役割を最終証明できるのではないかと期待している。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

- ① T. Suzuki, Y. Kazuki, M. Oshimura, and T. Hara. A novel system for simultaneous or sequential integration of multiple gene-loading vectors into a defined site of a human artificial chromosome. *PLoS ONE*, 9: e110404, 2014. doi:10.1371/journal.pone.0110404 (査読あり)

[学会発表] (計3件)

- ① 杉本貴彦, 鈴木輝彦, 三浦恭子, 蔭山俊, 吉原英人, 海保愛, 佐伯泰, 田中啓二, 原孝彦. ハダカデバネズミ線維芽細胞における 26S プロテアソーム活性の亢進. 第37回日本分子生物学会年会, 2014.11.25-27, パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市).
- ② T. Suzuki, M. Kawaguchi, M. Oshimura, and T. Hara. Development of a new method for the simultaneous integration of multiple vectors into human/mouse artificial chromosome. 第12回幹細胞シンポジウム, 2014.5.30-31, 九州大学医学部百年講堂 (福岡県・福岡市).
- ③ 鈴木輝彦, 押村光雄, 原孝彦. リコンビナーゼ/インテグラーゼを利用して、ヒト人工染色体に複数ベクターを同時導入する方法の開発. 第36回日本分子生物学会年会, 2013.12.3-6, 神戸ポートアイランド (兵庫県・神戸市).

[その他]

ホームページ等

<http://www.igakuken.or.jp/stem-cell/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

原 孝彦 (HARA, Takahiko)

公益財団法人東京都医学総合研究所・生体分子先端研究分野・幹細胞プロジェクトリーダー (参事研究員)

研究者番号: 80280949

(2) 研究分担者

鈴木 輝彦 (SUZUKI, Teruhiko)

公益財団法人東京都医学総合研究所・生体分子先端研究分野・主席研究員

研究者番号: 70621027