

平成 21 年 3 月 10 日現在

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2006～2008

課題番号：18370002

研究課題名 (和文) 出芽酵母 26S プロテアソームの形成と機能に関する時空制御

研究課題名 (英文) Spatio-temporal regulation of the formation and function of the yeast 26S proteasome

研究代表者

東江 昭夫 (TOUE AKIO)

財団法人 東京都医学研究機構・東京都臨床医学総合研究所・研究員

研究者番号：90029249

研究成果の概要：酵母の 26S プロテアソームの調節因子 (RP) はリッドとベースという二つの複合体からなる。これまで、我々は、これらの複合体を構成するサブユニット遺伝子に関する温度感受性変異体を分離・集積してきた。今回、リッド、および、ベースの変異体を生化学的および細胞生物学的な方法で解析し、これらの複合体が互いに独立に形成され核内に移送され、RP が形成されることを明らかにした。

26S プロテアソーム研究の新奇材料として、高温で飼育可能なカビ *Aspergillus fumigatus* の 26S プロテアソームの精製法を確立し、サブユニット構成を明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	7,600,000	2,280,000	9,880,000
2007年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
2008年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
年度			
年度			
総計	15,000,000	4,500,000	19,500,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学、遺伝・ゲノム動態

キーワード：プロテアソーム, 出芽酵母, 分子集合, リッド, ベース

1. 研究開始当初の背景

26S プロテアソームは分子量約 2000KD の巨大な蛋白質複合体で、ユビキチン化されて分解されるように運命付けられた蛋白質の最終分解マシンとして、多くの細胞内蛋白質の安定性に関わる。1998 年に Glickman らにより、26S プロテアソームの基本的なサブユニット構成が明らかにされ、園結果を基に 26S プロテアソームの形成、機能制御の研究が行われるようになった。26S プロテアソームは 20SCP (触媒サブユニット) と 19SP (調節サブユニット) の二つの複合体からなり、RP はさらにリッドとベースのサブコンプレック

スから成る。我々は各サブユニット遺伝子に温度感受性変異を導入し、26S プロテアソームの分子集合の機構の解明にチャレンジしていた。これまで、リッドの形成に注目し、温度感受性の変異体を用いて、rpn7-3 や rpn6-1 変異体では制限温度下でリッドを構成するサブユニットの一部から成る複合体が蓄積、その構成が Rpn5, Rpn8, Rpn9, Rpn11 であることを明らかにした。

2. 研究の目的

- (1) 26S プロテアソームのサブコンプレックスであるリッドの集合機構を解明する。

(2) 26S プロテアソーム構造解析に供する新しい材料の探索。

3. 研究の方法

(1) リッドの遺伝子の内、これまでに突然変異体の報告が無い遺伝子について、温度感受性変異を導入する。RPN6, RPN7 の変異体の分離と解析は既に発表したの、今回は RPN5 と RPN8 に変異を導入した。いずれもリッド形成のコアとサブユニットをコードする遺伝子である。PCR 法で変異をランダムに導入した変異遺伝子プールから我々が開発した Integration/replacement/disruption 法により温度感受性変異体をスクリーニングした。

(2) 26S プロテアソームは多数のサブユニットから構成されていることから、完全な分子の構造を保存し、結晶化させることは困難で、これまで誰も成功していない。我々は、構造的に安定な 26S プロテアソームの供給源を探索してきたが、高温で生育する材料からの 26S プロテアソームがわれわれの目的に合うのではないかと考え、高温でも増殖可能なカビ *Aspergillus fumigatus* から 26S プロテアソームを精製し、その酵素的な性質を調べた。

4. 研究成果

(1) ① rpn5-1 変異体の作出と 26S プロテアソームの構造解析

温度感受性 rpn5-1 を PCR による変異導入法により得た。DNA 塩基配列決定により変異部位は 3 カ所にあったが、変異体の表現型の原因となる変異は W415STOP であることが分かった。Rpn5-1 変異体を 37°C で 6 時間処理した後抽出液を調製しゲルろ過すると、プロテアソームのピークは 20SCP の位置と、26S よりわずかに遅く溶出される場所にピークを現れる。

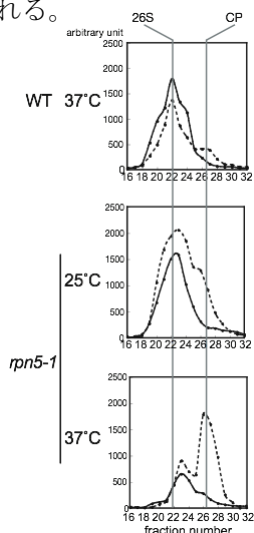


図 1 Rpn5-1 エキストラクトの Superose 6 でのゲルろ過

上のゲルろ過のフラクションをリッドのサブユニットに対する抗体で解析した所、rpn7-3、あるいは、rpn6-1 変異体で見られたリッドのサブコンプレックスは形成されていなかった。一方、この条件下で、ベースは完全にできていた。

一方、温度感受性 rpn2 変異体を制限温度に置くと、ベースは形成されなかったが、リッドは完成されていた。この結果、リッドとベースは互いに独立に形成されると言える。

リッドあるいはベースのサブユニットと GFP の融合蛋白質の細胞内局在を調べたところ、ベースのサブユニットは核に局在したが、リッドのサブユニットは細胞質に蓄積した。この結果はリッドのサブユニットは単独で核移行できないことを示しており、リッドの形成される場所が細胞質中で、ベースと複合体を形成した後に核へ移行する可能性が高い。

図 2 にこれまでの結果を説明するモデルを示す。

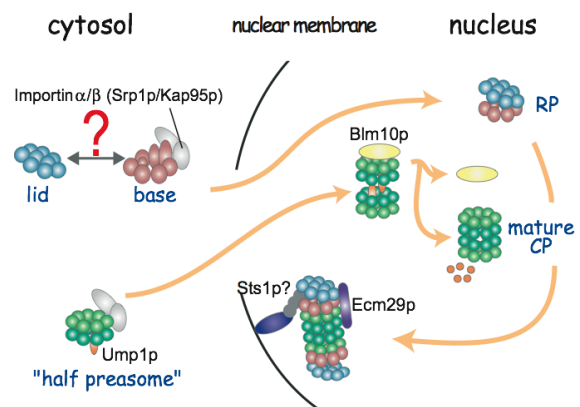


図 2 26S プロテアソームの構築経路のモデル

② rpn8 変異体の分離

rpn8 変異体も rpn5-1 分離と同様の方法で試みたが、成功しなかった。Rpn8 と Rpn11 は MPN ドメインを持つことから、このドメイン内で特に高度に保存されているアミノ酸の置換を試みた。Rpn8G35D が温度感受性を示すことがわかった。今後この変異体を用いてリッドの集合過程を調べる予定である。

③ リッドサブユニットの大腸菌内集合

リッドのコアを形成するサブユニットを大腸菌で発現させ大腸菌内で複合体を形成することができるかを検討するために、各サブユニットの発現系を構築した。Rpn11 の N 末側に 6xHis のタグを付け、Nickel-NTR カラ

ムによる精製が可能にしてある。発現する遺伝子の種々の組み合わせで複合体が形成されるかどうかを電気泳動によって調べた (図3)。

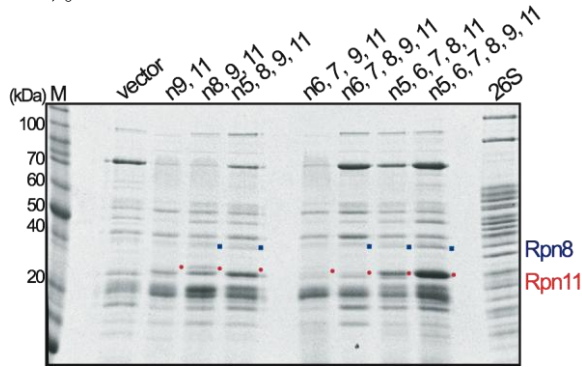


図3 リッドサブユニットの大腸菌内産生

IPTG で誘導後の大腸菌抽出液を SDS-PAGE で分離後、CCB で染色した。

大腸菌抽出液から 6xHis-Rpn11 を精製し、回収された蛋白質をウェスタンブロットでしらべると、Rpn11 とともに Rpn8 が共沈することがわかった (図4)。

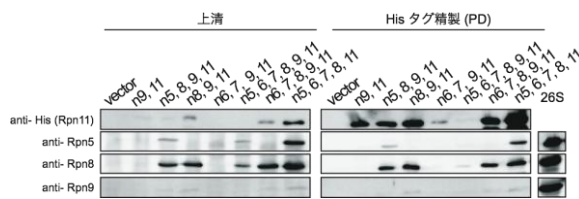


図4 大腸菌抽出液のウェスタンブロット解析

この結果は、Rpn11 と Rpn8 がリッドアセンブリーの最初の過程であることを示唆している。

今後、Rpn11-Rpn8 複合体の精製と構造解析を進める。

(2) 26S プロテアソームは多数のサブユニットから成る巨大な蛋白質複合体であるため、電子顕微鏡による構造解析は進められているが、X 線結晶構造解析は誰も成功していない。現在水面下で激しい競争が繰り広げられている。

我々は、サブユニット間の融合遺伝子を構築し、26S プロテアソーム精製と結晶化を試みているがまだ結晶化に成功していない。

今回、これまで 26S プロテアソーム研究には用いられてこなかったカビから 26S プロテアソームを精製する方法を確立した。Aspergillus fumigatus は真核生物には珍しく 50°C でも生育する。このカビは熱安定性の高い 26S プロテアソームを生産している可能

性があり、構造研究に役立つのではないかとこの本券課題の一部に取り入れた。A. fumigatus のもう一つの利点は全ゲノム塩基配列決定が終了していることである。アフィニティー精製に必要なタグの導入も、相同組み替えによる遺伝子置換により可能になっている。酵母では Rpn11 に 3xFLAG を付加してアフィニティー精製に供する方法が確立している。これに習って、先ず、カビの Rpn11 オルソログ RpnK に 3xFLAG を融合した菌株を作製した。この株を 37°C と 55°C で培養し菌糸を集め、凍結乾燥後粉末状にした。粉末をバッファーに懸濁して蛋白質を抽出した。この蛋白質溶液から Rpn11-FLAG 免疫沈降によって 26S プロテアソームを精製することができた。精製した 26S プロテアソームを SDS-PAGE でサブユニットに分離し、各ポリペプチドを MALDI/TOF マススペクトロスコピーによって同定したところ、全ての基本サブユニットが同定できた (図5)。

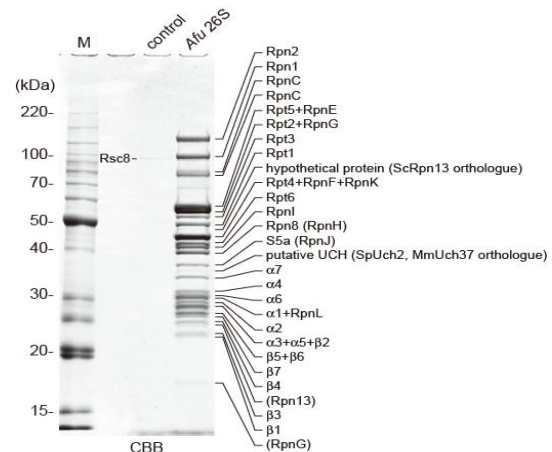


図5 カビの 26S プロテアソームのサブユニット構成

培養温度の違いによって 26S プロテアソームの構造ならびにサブユニット構成に差は見られなかった。

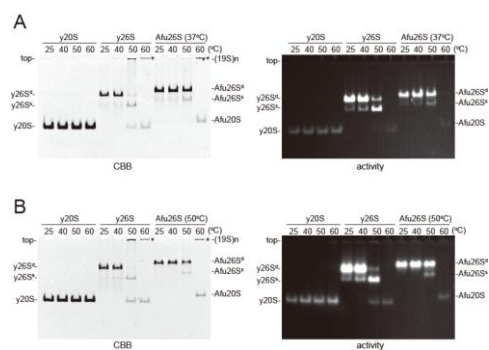


図6 熱処理による 20SCP と RP への解離

高温で生育できるカビから分離精製された 26S プロテアソームは酵母の酵素より熱に安定であろうか。この間に答えるために、それぞれのサンプルを指定された温度で 5 分間処理したのち、未変性 PAGE で解析した。カビの酵素は酵母のものより 20SCP と RP に解離し難いことがわかった (図 6)。

高温で 26S プロテアソームが解離して 20S CP とゲルのトップにトラップされた蛋白質が生じた (図 6)。この未知の蛋白質を 2-D ゲルで展開したところ 19SRP のバンドが出現したので、ゲルのトップに集積した蛋白質は 26S プロテアソームから解離した RP であることがわかった。

糸状菌の 26S プロテアソームとしてはそのサブユニット構成が明らかにされた最初の例である。

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 6 件)

①Saeki, Y., Kudo, T., Sone, T., Kikuchi, Y., Yokosawa, H., Toh-e, A., Tanaka, K. (2009) Lysine 63-linked polyubiquitin chain may serves the targeting signal for the 26S proteasome.

EMBO J 28: 359-371. (査読有)

②Kurepa J, Toh-e A, Smalle JA. (2008) 26S proteasome regulatory particle mutants have increased oxidative stress tolerance. (査読有)

Plant J. 2008 Jan;53(1):102-14. E

③Nishizawa, M., Komai, T., Morohashi, N. Shimizu, M. Toh-e, A. (2008)

Transcriptional repression by the Pho4 transcription factor controls the timing of *SNZ1* expression. Eukaryot Cell 7:

949-957. (査読有)

④Nishizawa M, Komai T, Katou Y, Shirahige K, Ito T, Toh-e A. (2008) Nutrient-regulated antisense and intragenic RNAs modulate a signal transduction pathway in yeast. PLoS Biol. 6:2817-30. (査読有)

⑤Isono E, Nishihara K, Saeki Y, Yashiroda H, Kamata N, Ge L, Ueda T, Kikuchi Y, Tanaka K, Nakano A, Toh-e A. (2007) The assembly pathway of the 19S regulatory particle of the yeast 26S proteasome. Mol Biol Cell. 18:569-80. (査読有)

⑥Zhao X, Chang AY, Toh-e A, Arvan P. (2007) A role for Ltelp (a low temperature essential protein involved in mitosis) in proprotein processing in the yeast secretory pathway. J Biol Chem. 282:1670-8. (査読有)

[学会発表] (計 1 件)

①Saeki, Y., Yokosawa, H., Toh-e, A., Tanaka, K. Lysine 63-linked polyubiquitin chain serves as a targeting signal for the 26S proteasome.

The 5th International Symposium on the COP9 signalosome, Proteasome, and eIF3: At the interface between signal and proteolysis

Nov. 11-14, 2008, RIKEN Yokohama, Japan

[図書] (計 1 件)

①Isono E, Toh-e A. (2006) Biogenesis of the 26S proteasome in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Tanpakushitsu Kakusan Koso. Suppl):1224-9. 共立出版株式会社.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

東江 昭夫 (TOUE AKIO)

財団法人 東京都医学研究機構・東京都臨床医学総合研究所・研究員
研究者番号: 90029249

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者