

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月28日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790060

研究課題名（和文） プロテアソームの形成機構の解析

研究課題名（英文） Studies on the assembly of the proteasome

研究代表者

金子 岳海（KANEKO TAKEUMI）

東京大学・大学院薬学系研究科・助教

研究者番号：80508153

研究成果の概要（和文）：26S プロテアソームはタンパク質分解を実行する 20S プロテアソームの両端に、調節ユニットである 19S 制御因子が会合した約 2.5MDa の巨大な複合体であり、総数 70 余りのサブユニットが集合して構成される。このように巨大な複合体がどのように形成されているのかを明らかにするために、これまで解析されて来なかった lid サブユニットの分子集合機構を解析した。その結果、lid は秩序だった形成過程を経て形成され、Rpn12 が最後に組み込まれて完成することが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：The 26S proteasome is an about 2.5 MDa large protein complex consisting of a catalytic 20S proteasome and one or two 19S regulatory particles. More than 70 subunits are gathered to form the 26S proteasome. To reveal how such a large complex is constructed, we focused on the assembly mechanism of the lid subcomplex, which has not yet been examined precisely. Our research revealed that the lid is assembled in a well-ordered way, and the assembly of the lid is completed by the integration of Rpn12.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：プロテアソーム、ユビキチン、タンパク質分解、分子集合

1. 研究開始当初の背景

26S プロテアソームはユビキチン化されたタンパク質を分解することにより、すべての真核生物で必須の役割を果たしており、70種類以上ものサブユニットが集合することにより形成され（図1）、様々な生命現象（神経、免疫、癌、老化）に関わっていることが知られている。我々はこれまでに 20S プロテ

アソームの形成を促進する新しい分子 PAC (Proteasome Assembling Chaperone)1, PAC2, PAC3 や 20S プロテアソームと結合しユビキチン化タンパク質の分解に必須な 19S 複合体のサブコンプレックスである基底部の形成に関わる新しいシャペロン分子群と形成過程を明らかにしてきた。しかし、19S 複合体のもう片方のサブコンプレックスで

ある蓋部の形成に関しては不明なままであり、19S 複合体全体、さらに 19S 複合体と 20S プロテアソームとからなる 26S プロテアソーム形成機構に関しては未だ不明な点が多い。

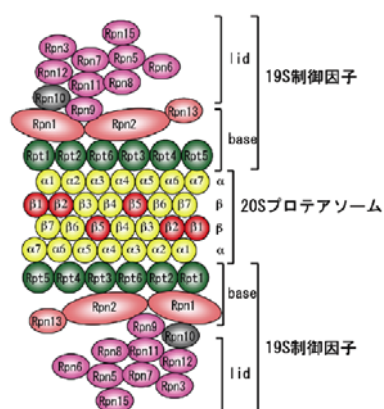


図1. プロテアソームの構造

2. 研究の目的

プロテアソームの形成機構を明らかにするために、特に 19S 調節因子の形成機構に焦点を当て、以下の 4 項目を課題とする。

(1) lid の形成機構の解明

19S 調節因子は lid と base が会合して形成されるが、非常に複雑な構造を取っている lid 自体の分子集合機構を明らかにするために、分子生物学的手法および生化学的手法を用い、特に形成途上の lid に着目し解析を行う。またプロテオミクス的手法及び生化学的手法を用い lid 形成に関与する分子の探索も行う。

(2) *in vivo* における base の形成機構の解析

申請者は base 形成を支援する新奇シャペロン分子群を同定したが、*in vivo* におけるシャペロン分子群の役割を詳細に検討するためにシャペロン分子のノックアウトマウスおよびトランスジェニックマウスを作成および解析を行う。これらのマウスではプロテアソーム総量が増減していると予想されるので、プロテアソームに関わる様々な高次生命現象（癌・神経・老化・免疫）の解析を行う。

(3) 19S 調節因子の形成機構の解明

base と lid は独立して形成されるが、これらがどのような機構で会合しているのか明らかにする。特に分子生物学的手法および生化学的手法を駆使しアプローチする。

(4) 26S プロテアソームの形成機構の解明

1., 2. および 3. から得られた知見を元に、20S プロテアソームと 19S 調節因子の会合機構を生化学的・分子生物学的手法を中心に解析する。

3. 研究の方法

(1) lid 形成機構の解明

申請者は既に哺乳類細胞における 19S 調節因子の base の分子集合機構を明らかとしている。同様の手法を用いて、より複雑な構造をとる lid の分子集合機構の解明が可能である。具体的には以下 2 点に焦点を絞る。

① lid サブユニットの分子集合機構の解析

培養細胞において lid サブユニットをノックダウンすると、形成途上の lid が検出されることが既に申請者によって確認されている。全ての lid サブユニットを各々ノックダウンすることにより蓄積する形成途上の lid を解析することにより、その形成機構を明らかにできると考えられる。具体的にはノックダウンした細胞から形成途上の lid を分画および免疫沈降後、形成途上の lid に含まれるサブユニットをイムノブロットにより同定する。同時に免疫沈降物を nano-LC で分離後、タンデム質量分析により網羅的に複合体を解析する。また、*in vitro* においてリコンビナントタンパク質を用いたサブユニット間の直接相互作用を確認することにより、lid の各々のサブユニットの位置を推測でき、lid 形成を有機的に理解できると予想される。

② lid 形成時に結合する因子の探索

base や 20S プロテアソームには様々なシャペロン分子が一時的に結合し、その形成を支援していることが明らかとなっているが、lid にも形成過程に結合してその形成を支援する分子が存在する可能性がある。これらの分子は完成したプロテアソームには結合せず、形成途上のプロテアソームにのみ結合するので通常的手法では同定が困難である。申請者は既に形成途上の lid の精製法を確立しているため、精製された形成途上の lid を nano-LC で分離後、タンデム質量分析により網羅的に解析することにより形成途上の lid に含まれる未知分子の同定を行う。

(2) *in vivo* における base 形成機構の解析

申請者は base 形成を支援する新奇シャペロン分子群、p28、S5b、p27、Rpn14 を同定し、base 形成機構及び 19S 形成機構の一端を明らかにした。これらのシャペロン分子群は癌細胞で高発現しており、特に p28 は肝細胞癌で高発現しているタンパク質としても同定されていることから、癌細胞維持に必要なプロテアソーム量を確保していることが伺える。そこで哺乳類個体における p28 の役割を明らかにする目的で、p28 の条件付きトランスジェニックマウス、および条件付きノックアウトマウスを作製する。哺乳類細胞を用いた解析から p28 の減少はプロテアソーム形成に支障を来すことから、条件付きノックアウトマウスを用いて個体でも同様の結果が期待でき、プロテアソーム形成異常が引き起こす様々な現象を観察することが可能である。また p28 は肝細胞癌で高発現していることから、

p28 の条件付きトランスジェニックマウスを用い p28 を高発現させた肝臓を含め各種臓器においてプロテアソームを観察する。

4. 研究成果

HEK293 細胞において lid サブユニットをノックダウンし、細胞抽出液をグリセロール密度勾配遠心により分離し、得られた分画において抗 lid サブユニット抗体を用いてウエスタンブロットを行ったところ、形成過程の lid が蓄積していることが明らかとなった。この蓄積物を免疫沈降し、沈降物を nano-LC を用いて分画し、質量分析機により内容物を同定したところ、これらは特定の lid サブユニットが蓄積したものであった。これらの結果を併せると、lid サブユニットは秩序だった形成機構が存在することが明らかとなった。また、各サブユニットをノックダウンすることにより生じる中間体の内容物を決することにより、lid サブユニットの立体的な位置を予測することができた。

形成過程に関してはフリーの lid には Rpn12 が含まれず、Rpn12 以外のサブユニットが集合してフリーの lid を形成し、最後に Rpn12 が組み込まれて 19S が完成することを明らかとした (図 2)。

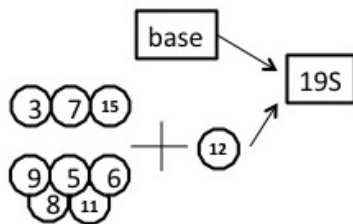


図 2 : 19S 複合体の形成過程

数字は Rpn サブユニットの番号を示す。Lid は Rpn3, 7, 15 と Rpn5, 6, 8, 9, 11 からなる中間体を経て、最後に Rpn12 が組み込まれて完成する。

また、形成過程の lid を免疫沈降し沈降物を nano-LC で分離後、タンデム質量分析機で結合分子を探索したが、特異的に結合する分子を同定することは出来なかった。このことは lid の形成が 20S プロテアソームや base とは異なりシャペロンを介さずに行われている可能性を示唆している。

p28 の条件付きトランスジェニックマウス、ノックアウトマウスの作製に関しては、ターゲットベクターの作製を終え、現在、組換え ES 細胞の取得を目指している。

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) Kaneko T, Murata S.

Using siRNA techniques to dissect proteasome assembly pathways in mammalian cells. *Methods Mol Biol.* 2012;832:433-42. 査読有り

2) 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.

Proteasome assembly defect due to a proteasome subunit beta type 8 (PSMB8) mutation causes the autoinflammatory disorder, Nakajo-Nishimura syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011 108(36):14914-9. 査読有り

[学会発表] (計 1 件)

1) 金子岳海、村田茂穂 The assembly pathway of the mammalian proteasome lid subcomplex PPDUP 2010, バンクーバー、カナダ

[図書] (計 0 件)

[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◇件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

<http://www.f.u-tokyo.ac.jp/~tanpaku/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金子岳海 (KANEKO TAKEUMI)

東京大学・大学院薬学系研究科・助教

研究者番号：80508153

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

(4) 研究協力者

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