

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570221

研究課題名(和文)プロテアソーム活性化因子の機能的相互作用の解析

研究課題名(英文)Functional analysis of proteasome activators

研究代表者

千葉 智樹(CHIBA, Tomoki)

筑波大学・生命環境系・教授

研究者番号：00311423

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：生体を構成する細胞は、適切な時期にタンパク質を合成し、分解する必要がある。このタンパク質の分解は厳密に制御されており、その制御の破綻は様々な疾患(免疫疾患、神経変性疾患、メタボリックシンドロームなど)の原因となる。細胞内のタンパク質を選択的に分解するプロテアソームは、進化的に保存された複数の活性化因子によって制御されている。しかし、各活性化因子の生理的役割や機能分担は明らかではない。そこで本研究は、プロテアソームの多彩な機能を担うと考えられる活性化因子群の遺伝子欠損マウスを作製し、その表現型解析を行うことを目的とした。

研究成果の概要(英文)：Intracellular protein degradation is highly regulated by the Ubiquitin and Proteasome system (UPS), which plays critical roles in many biological processes such as cell cycle progression, stress response, signal transduction, and so on. The impairment of the UPS is associated with diverse array of diseases such as neurodegenerative diseases, and immune diseases. Proteasome is a barrel-shaped multisubunit protease complex that consists of latent 20S core particle (CP) and regulatory particles (RPs). The function of CP is regulated by evolutionarily conserved multiple RPs in the cells. However the function and physiological roles of each RPs are not well understood. To reveal the specific function of each RPs, we generated knockout mice of one of the proteasome-associated protein whose function has not yet been elucidated in mammal.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：タンパク質分解 翻訳後修飾 ストレス応答 遺伝子改変動物

1. 研究開始当初の背景

ユビキチン・プロテアソームによる選択的タンパク質分解は細胞周期進行やシグナル伝達など、多くの生命現象の制御に必須である。ユビキチンは分解されるべきタンパク質を修飾する小分子であり、プロテアソームはユビキチン修飾されたタンパク質を選択的に分解する分解酵素である。プロテアソームは多数のサブユニットから構成される複合体であり、その活性は多様なプロテアソーム活性化因子群によって制御されている。プロテアソーム活性化因子には、進化的に保存された PA700 複合体や PA200, PA28 などが存在する。また、上記以外にもプロテアソームと相互作用し、プロテアソーム機能を制御するタンパク質の存在することが明らかとなっている。Ecm29 は、その一つであり、その機能は未解明である。

2. 研究の目的

哺乳動物における Ecm29 の生理的役割を明らかにする目的で、Ecm29 の遺伝子欠損マウスを作製し、その表現型とプロテアソーム機能を解析する。また Ecm29 欠損細胞のストレスに対する脆弱性を解析し、プロテアソームのストレス応答性と Ecm29 の役割を解明する。

3. 研究の方法

Ecm29 欠損マウスの作製：Ecm29 遺伝子の第 2 エキソンを標的としたターゲティングベクター(図 1)を作製し、常法により ES 細胞への導入、相同組換え ES 細胞の選択、キメラマウスの作製を行う。ES 細胞のジャームライントランスミッションによって得られる Ecm29^{+/-}マウスを交配し、Ecm29^{-/-}マウスを得る。

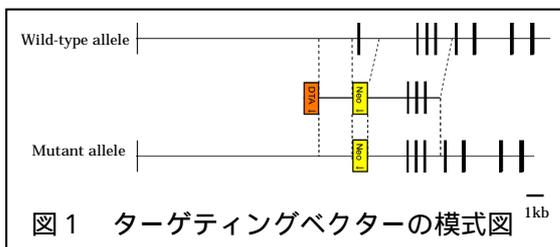


図 1 ターゲティングベクターの模式図 1kb

表現型解析：常法に従い野生型と Ecm29^{-/-}マウスの血液生化学検査と組織検査を行う。異常の認められた臓器・組織があった場合には、

その臓器・組織に応じた機能解析を行う。

プロテアソーム機能解析：主要臓器のタンパク質粗抽出液を密度勾配遠心によって分画し、プロテアソームのペプチダーゼ活性を測定する。またプロテアソーム構成因子の発現を解析する。

ストレス応答の解析：野生型または Ecm29 欠損マウスの胎児線維芽細胞を採取し、様々なストレスを負荷して、そのストレス応答性を解析する。またストレス応答時におけるプロテアソーム機能を解析する。

4. 研究成果

Ecm29^{+/-}マウス同士を交配した結果、約 1/4 の頻度で Ecm29^{-/-}マウスは生まれ、顕著な発生異常は認められなかった。また Ecm29^{-/-}マウスはオスメスとも不妊ではなく繁殖可能であった。主要臓器における Ecm29 タンパク質の発現を調べたところ、Ecm29^{-/-}マウスでは Ecm29 は全く発現していなかったため、第 2 エキシソンの欠失はヌル変異となること、Ecm29 はマウスの発生および成長に必須ではないことが判明した。また Ecm29^{-/-}マウス主要臓器組織の HE 染色では形態的に異常な組織像は観察されず(図 2)、血清の生化学検査でも野生型と有意な差は認められなかった。

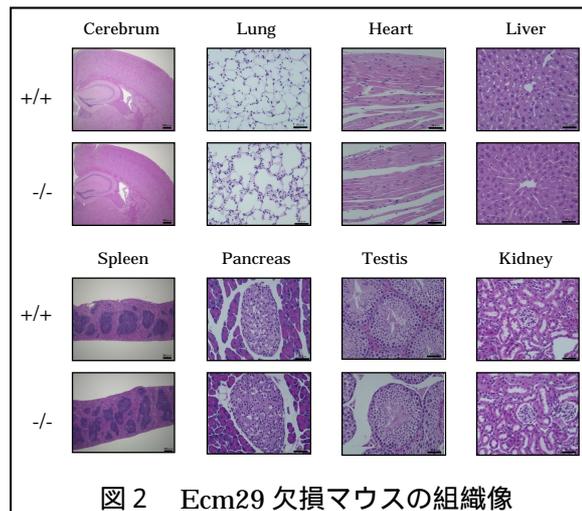
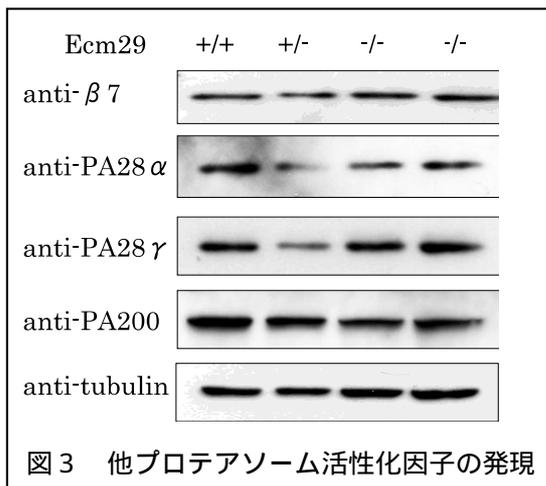


図 2 Ecm29 欠損マウスの組織像

主要臓器におけるプロテアソームのペプチダーゼ活性を測定したところ、その活性は野生型と同等であり、またプロテアソーム構成因子も正常と差はなかった。さらにユビキチン化タンパク質の発現や細胞内局在をウエスタンブロットおよび免疫組織化学で解

析したが、いずれの臓器でもユビキチン化タンパク質が異常に蓄積した像は観察されなかった。すなわち Ecm29 はプロテアソームのペプチダーゼ活性、分子集合に必須ではなく、その欠損によってユビキチン化タンパク質が分解できずに蓄積することもなかった。なお他のプロテアソーム活性化因子が代償的に発現上昇して、Ecm29 欠損を機能相補していないか、その他のプロテアソーム活性化因子 PA28 と PA200 の発現を調べたが、その発現に変化は見られなかった(図 3)。



次いで、野生型と Ecm29^{-/-}マウスの胎児線維芽細胞を採取し、様々なストレスを負荷した。細胞に過酸化水素による酸化ストレスを負荷した結果、野生型細胞ではプロテアソーム活性の低下とプロテアソーム構成因子の解離が観察された。一方、Ecm29 欠損細胞では、プロテアソーム活性の顕著な低下が観察されず、プロテアソーム構成因子の一部がプロテアソーム複合体から解離せずに維持されていることが判明した。以上の結果から、Ecm29 はストレス応答によるプロテアソームの解離に関わる可能性が考えられた。今後、その分子機序を解明することが重要である。

Ecm29 欠損マウスのプロテアソーム機能がほぼ正常であったことから、Ecm29 欠損を機能相補するタンパク質が存在する可能性が考えられ、他のプロテアソーム活性化因子が関わっていないか、そして新規制御因子がプロテアソームと相互作用していないか、解析する必要がある。

PA28 および PA200 は Ecm29 欠損によって代償的に発現上昇していなかったが、機能的に相補している可能性は否定できない。そ

のため、PA28 や PA200 欠損マウス等との多重欠損マウスを作出している。Ecm29 と一次構造的に類似性の高い PA200 とのダブル欠損マウスでは、それぞれの単独欠損では観察されない表現型を示しているため、今後その表現型を詳細に解析していきたい。また新規制御因子が存在しないか、精製したプロテアソームの構成因子を解析することを予定している。

さらに Ecm29 は免疫サイトカインであるインターフェロンの刺激によって発現が上昇することから、Ecm29 欠損細胞のインターフェロン 応答性の解析を開始している。

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 3 件)

1. Ebina M, Tsuruta F, Katoh MC, Kigoshi Y, Someya A, Chiba T. Myeloma overexpressed 2 (Myeov2) regulates L11 subnuclear localization through Nedd8 modification. **PLoS ONE** 2013, 8:e65285. DOI:10.1371/journal.pone.0065285(査読有り)
2. Qian MX, Pang Y, Liu CH, Haratake K, Du BY, Ji DY, Wang GF, Zhu QQ, Song W, Yu Y, Zhang XX, Huang HT, Miao S, Chen LB, Zhang ZH, Liang YN, Liu S, Cha H, Yang D, Zhai Y, Komatsu T, Tsuruta F, Li H, Cao C, Li Wei, Li GH, Cheng Y, Chiba T, Wang L, Goldberg AL, Shen Y, Qui XB. Acetylation-Mediated Proteasomal Degradation of Core Histones during DNA Repair and Spermatogenesis. **Cell** 2013, 153, 1012-1024. (査読有り)
3. Takashima O, Tsuruta F, Kigoshi Y, Nakamura S, Kim J, Katoh MC, Fukuda T, Irie K, Chiba T. Brap2 regulates temporal control of NF-κB localization mediated by inflammatory response. **PLoS ONE** 2013, 8:e58911. DOI:10.1371/journal.pone.0058911(査読有り)

[学会発表](計 7 件)

1. Kigoshi Y., Chiba T. Analysis of a New Binding Partner of KLHL7, a Retinitis Pigmentosa Causative Gene Product. 2013 年日本分子生物学会年会, 2013/12/03-06, 神戸
2. Fukuda T., Kigoshi Y., Chiba T. A Cullin Related Protein is Involved in CRL Assembly Cycle. 2013 年日本分子生物学

- 会年会, 2013/12/03-06, 神戸
3. Endo T., Kigoshi Y., Chiba T. The Screening for the Ubiquitination Targets of KLHL7, a Retinitis Pigmentosa Causative Gene Product. 2013年日本分子生物学会年会, 2013/12/03-06, 神戸
 4. Kigoshi Y., Fukuda T., Endo T., Tsuruta F., Chiba T. The Regulation of Nrf2-Keap1 Antioxidant Response by a Novel Cullin Associated Protein. 2013年度日本細胞生物学会, 2013/06/20, 名古屋
 5. Kigoshi Y., Fukuda T., Endo T., Tsuruta F., Chiba T. The Regulation of Nrf2-Keap1 Antioxidant Response by a Novel Cullin-like Protein. “The Ubiquitin Meeting”, 2013/05/14-18, Cold Spring Harbor, New York.
 6. Haratake K., Tsuruta F., Chiba T. ストレス条件化における哺乳類 Ecm29 の機能解析. 2012年日本分子生物学会年会, 2012/12/11-14, 福岡
 7. Haratake K., Uda S., Tsuruta F., Sato A., Uono H., Chiba T. The analysis of proteasome-associated protein, Ecm29. 2011年度日本分子生物学会年会, 2011/12/13-16, 横浜

〔その他〕

ホームページ等

<http://tchibalab.org>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

千葉 智樹 (CHIBA, Tomoki)

筑波大学・生命環境系・教授

研究者番号：00311423