

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 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：24570208

研究課題名(和文) 真核生物でプロテアソームが増殖に必須な理由

研究課題名(英文) Why is the 26S proteasome essential for eukaryotic cell viability?

研究代表者

八代田 英樹 (Yashiroda, Hideki)

東京大学・薬学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：20311425

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：26Sプロテアソームは真核生物のタンパク質分解酵素複合体で出芽酵母からヒトにまで高度に保存されている。真核生物において26Sプロテアソームは増殖に必須であるが、その理由は詳しくわかっていない。この理由を知るために1)原核生物のプロテアソームには存在せず、真核生物のプロテアソームにのみ存在するペプチダーゼ活性の解析、2)真核生物細胞に存在するミトコンドリアとの機能的関連、3)機能未知の26Sプロテアソームサブユニットの解析を行った。

研究成果の概要(英文)：The 26S proteasome is a eukaryotic protease complex conserved from yeast to human. In eukaryotes, the 26S proteasome is essential for growth, but where this essentiality comes from remains unknown. To address this issue, I examined two peptidase activities, which reside only in eukaryotic proteasomes, the functional relationship between the 26S proteasome and mitochondria, which are the essential eukaryotic organelles, and some proteasome subunits, whose functions have not been clarified yet.

研究分野：分子遺伝学

キーワード：プロテアソーム タンパク質分解 出芽酵母

1. 研究開始当初の背景

26S プロテアソームは真核生物に保存された総サブユニット数が60を超える巨大なタンパク質分解酵素複合体で、ユビキチンシステムと協調して選択的なタンパク質分解を行っている。26S プロテアソームはペプチダーゼ活性を持つ20S core particle (CP)とCPを活性化し、ユビキチン化タンパク質を捕捉し基質タンパク質の構造を解きほぐす19S regulatory particle (RP)がCPの両端、もしくは片方に結合して形成されている。これまで26S プロテアソームサブユニットの同定や立体構造の解明などがなされてきた一方で26S プロテアソームが何故真核生物の増殖に必須なのかという根本的な問いに関しては不明なままである。一方、原核生物である古細菌にも20S CPに相当するプロテアソームが保存されているが、古細菌のプロテアソームは増殖に必須ではないことがわかっている。

真核生物において26S プロテアソームが増殖に必須となった理由を知るための手がかりが得られると思われる解析可能な事象の一つとして真核生物のプロテアソームは原核生物のプロテアソームより活性の種類が2種類増えているという点がある。真核細胞の20S CPはお互いに相同な7つのサブユニットと7つのサブユニットがそれぞれリング、リングを形成しそれらのリングがと4つ重なって形成されている。一方、古細菌のプロテアソームではサブユニット、サブユニットはそれぞれ1種類しかない。ペプチダーゼ活性はサブユニットが担い、古細菌においてはキモトリプシン様活性しか持っていない一方で真核生物ではキモトリプシン様(B5)、カスパーゼ様(B1)、トリプシン様(B2)の3つのプロテアーゼ活性を持っている。出芽酵母ではキモトリプシン様活性のみが増殖に必須であることが分かっているが残り2つの活性も真核生物において酵母からヒトまで保存されており、現時点では3つの活性を揃えて持たない真核生物は見つかっていない。このことから真核生物として生存するためには3つの活性全てが何らかの形で必要とされていると予想される。しかし、その必要性がなぜ生じているのかということに関しては全く不明である。高等動物になるとβサブユニットはさらに免疫プロテアソームで機能するβ1i、β2i、β5i、胸腺プロテアソームに組み込まれるβ5tと増えており、進化の過程でプロテアソームのサブユニットの種類はさらに増える方向にあると考えられる。

次の事象は細胞内小器官とプロテアソームとの連携である。真核細胞となり複雑さを増した細胞内小器官が恒常性を保ち機能するために26S プロテアソームが必須となった可能性がある。例えば、小胞体内で生成された変性タンパク質は小胞体内から引き出されプロテアソームで分解される。この小胞

体関連分解(ERAD)と呼ばれる仕組みを阻害するとミトコンドリアを介したアポトーシスが誘導される。また、ミトコンドリアが生み出す活性酸素(ROS)の毒性を軽減させるためにもプロテアソームが必要であることが知られている。しかし、申請者らは出芽酵母においてミトコンドリアの呼吸欠損によると思われる増殖遅延がプロテアソームの機能を減弱させる事によって抑圧されるという先に述べた事柄と一見矛盾する非常に興味深い事象を見いだしている。この事象はプロテアソームと細胞内小器官の関係は一方的にどちらかがどちらかを必要としているのではなく相互に持ちつ持たれつの発達によって形成されてきた可能性を示しており、その様な中で26S プロテアソームが真核生物において必須となった可能性がある。

プロテアソームが増殖に必須となった理由を探る手がかりの最後として、真核生物には20Sプロテアソームを制御する19S RPが存在するという事象がある。19S RPは少なくとも19種類のサブユニットからなるが、このうち3つのサブユニット(Rpn10, Rpn13, Sem1)を除き全て増殖に必須である。ほとんどのサブユニットが必須なのは、各サブユニットの欠損で19S RP全体の構築や構造に異常が生じるためと予想することもできる。しかし、各サブユニットが構造維持のためだけに働いているとは思えず、それぞれのサブユニットにおいて、増殖に必須である理由を説明できる固有の機能が隠されていないかどうか検証する必要がある。現時点では19S複合体の基底部に含まれるATPaseの6量体が基質の巻き戻しと20Sへの送り込み蓋部に含まれるRpn11が脱ユビキチン化タンパク質であるという程度しか明らかになっていない。いまだ明らかとなっていない19S RPの機能により26Sプロテアソームが増殖に必須となった可能性がある。

2. 研究の目的

以下の3点に注目しユビキチンシステムと連携して選択的なタンパク質分解を行う26Sプロテアソームが真核生物において増殖に必須となった理由を知ることを目的とする。

1) 真核生物の26Sプロテアソームのみが持つカスパーゼ様とトリプシン様ペプチダーゼ活性の意義

2) 真核細胞の小器官であるミトコンドリアが正常に機能するために必要とされる26Sプロテアソーム機能

3) 真核生物にのみ存在する19S RP複合体のサブユニットの機能解析

3. 研究の方法

(1) 原核生物にはなく真核生物になってから保存されている20Sプロテアソームのト

リブシン様活性、カスパーゼ様活性が出芽酵母の増殖に必須となるような条件(合成致死変異、もしくはあるタンパク質の過剰発現による増殖抑制)を探索する。

(2) プロテアソームの変異で増殖が回復したミトコンドリア変異株を遺伝学的、生化学的に解析し、増殖が回復した仕組みを調べる。

(3) 19S 複合体を形成する様々な必須サブユニット遺伝子欠損株から変異原処理などにより増殖可能となった偽復帰変異株を単離する。得られた偽復帰変異体から各サブユニットが増殖に必須な理由と各サブユニット固有の機能を知る。

4. 研究成果

(1) カスパーゼ様活性を担う 1 サブユニットとトリブシン様活性を担う 2 サブユニットを共にキモトリブシン様の活性を持つよう 5 型に改変した出芽酵母を作製した。このプロテアソーム改変酵母は通常培養条件下では生育に支障は見られなかった。次にこの変異株内で出芽酵母の各遺伝子を過剰発現させ変異株の増殖を悪くするような遺伝子を探索した。このようにして得られた遺伝子産物は本来 1 2 サブユニットに依存して分解されているが、1 2 変異株内では効率よく分解されなくなり増殖に悪影響を起している可能性が考えられる。出芽酵母のほぼ全遺伝子に関して調べ、その結果 4 つ選択した。現在、これらの遺伝子産物が実際に 1 2 に依存して分解されているのか過剰発現ではない状況で検証中である。

(2) ミトコンドリアリボソームサブユニット Mrp135 の欠損変異株やミトコンドリア融合に関係する Fzo1 の欠損変異株の増殖遅延はプロテアソーム非必須サブユニット Pre9 や Sem1 の欠損変異などで抑圧されるという表現型がどのような分子メカニズムにより引き起こされているか解析を行った。その結果、プロテアソーム変異株においてあるタンパク質が増え、その結果、ミトコンドリアの膜電位がある程度回復していることが分かった。今後は逆にミトコンドリア機能が異常亢進した場合などに 26S プロテアソームが必要である場合がないかなどさらに 26S プロテアソームとミトコンドリアとの関連を調べていく予定である。

(3) 機能未知である 19S RP サブユニットである Rpn8, Rpn3 に関して解析を行い Rpn8 は別の 19S RP サブユニットで脱ユビキチン化活性を持つ Rpn11 と結合して機能するタンパク質であることが分かった。Rpn8 と Rpn11 は結合してお互いに安定化するらしい。Rpn3 に関しては温度感受性変異株を単離し、温度感受性を抑圧するような多コピー抑圧遺伝子の単離を行った。また(2)の課題から新たに

得られたミトコンドリア変異株の増殖を回復させる変異の中で Rpn2 が抑圧遺伝子として働く変異を同定した。26S プロテアソームと協調して働く遺伝子に変異が入っている可能性がある。

その他、プロテアソーム結合タンパク質 PI31 が増殖に必須となる条件やプロテアソーム遺伝子発現に関わる転写因子 Rpn4 がプロテアソーム以外にどのような遺伝子発現に関わっているか、プロテアソームが効率よく形成されるための条件などを調べた。

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 7 件)

Shirozu R, Yashiroda H, Murata S. Identification of minimum Rpn4-responsive elements in genes related to proteasome functions. FEBS Lett. 2015 589(8):933-40. doi: 10.1016/j.febslet.2015.02.025. 査読有

Yashiroda H, Toda Y, Otsu S, Takagi K, Mizushima T, Murata S. N-terminal $\alpha 7$ deletion of the proteasome 20S core particle substitutes for yeast PI31 function. Mol. Cell. Biol. 2015 35(1) 141-52. doi: 10.1128/MCB.00582-14. 査読有

Bai M, Zhao X, Sahara K, Ohte Y, Hirano Y, Kaneko T, Yashiroda H, Murata S. Assembly mechanism of specialized core particles of the proteasome. Biomolecules. 2014 4(3): 662-77. doi: 10.3390/biom4030662. 査読有

Takagi K, Saeki Y, Yashiroda H, Yagi H, Kaiho A, Murata S, Yamane T, Tanaka K, Mizushima T, Kato K. Pba3-Pba4 heterodimer acts as a molecular matchmaker in proteasome α -ring formation. Biochem Biophys Res Commun. 2014 450(2): 1110-4. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.06.119 査読有

Sahara K, Kogleck L, Yashiroda H, Murata S. The mechanism for molecular assembly of the proteasome. Adv Biol Regul. 2014 54:51-8. doi: 10.1016/j.jbior.2013.09.010. 査読有

Akahane T, Sahara K, Yashiroda H, Tanaka K, Murata S. Involvement of Bag6 and the TRC pathway in proteasome assembly. Nat Commun. 2013;4:2234 doi: 10.1038/ncomms3234. 査読有

八代田英樹、村田茂穂

酵母からヒトまでのプロテアソームの構造と機能、生化学、Vol. 84, No. 6 (2012) 409-415
<http://www.jbsoc.or.jp/seika/wp-content/uploads/2013/05/84-06-03.pdf> 査読無

〔学会発表〕(計 6件)

藤田太一、白水亮平、八代田英樹、村田茂穂、出芽酵母を用いた新奇プロテアソーム関連因子の遺伝学的探索、第 37 回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜 (横浜市)、2014.11.25

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年会、パシフィコ横浜 (横浜市)、2014.11.25

白水亮平、八代田英樹、村田茂穂、ミトコンドリア損傷時における出芽酵母の増殖遅延が 26S プロテアソーム活性の低下によって回復する仕組み、第 87 回日本生化学会大会、国立京都国際会館 (京都市)、2014.10.15

佐原一貴、八代田英樹、村田茂穂、プロテアソーム形成における小胞体膜タンパク質輸送経路と Bag6 の役割、第 36 回日本分子生物学会年会 (神戸) 2013.12.5

平工明里、白水亮平、Ong Ken、八代田英樹、村田茂穂、出芽酵母遺伝学を用いた新規手法によるプロテアソームの制御因子の探索、第 36 回日本分子生物学会年会 (神戸) 2013.12.5

八代田英樹、神垣あかね、村田茂穂: "26S プロテアソーム蓋部サブユニット Rpn8 と Rpn11 の相互作用" 酵母遺伝学フォーラム. 京都大学宇治キャンパス 2012.9.4.

〔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

八代田英樹 (YASHIRODA Hideki)

東京大学・大学院薬学系研究科・准教授

研究者番号: 20311425