

科学研究費助成事業（基盤研究（S））公表用資料
〔平成28年度研究進捗評価用〕

平成25年度採択分
平成28年3月16日現在

プロテアソームの動態と機能制御機構の解明

Dynamics and function of the proteasome

課題番号：25221102

村田 茂穂 (MURATA SHIGEO)

東京大学・大学院薬学系研究科・教授



研究の概要：プロテアソームは、生命活動の中心的な構成要素であるタンパク質の代謝回転を制御する真核生物のタンパク質分解酵素である。近年、がん、老化、神経変性、自己炎症などの疾患において、プロテアソームの発現、活性、細胞内動態、形成の異常とタンパク質恒常性の破綻が観察されている。本課題では、プロテアソームの動態と機能を制御する機構の解明を通じて、プロテアソーム機能の破綻により病態に至るメカニズムの理解を目指す。

研究分野：生物科学、機能生物科学

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、転写制御

1. 研究開始当初の背景

プロテアソームは、生命活動の中心的な構成要素であるタンパク質の代謝回転を制御するタンパク質分解酵素であり、主にユビキチン化されたタンパク質を分解することにより、多様な生体反応を迅速に進める手段として不可欠な役割を果たしている。近年、ヒトの主要な病態において、プロテアソーム量や活性の上昇あるいは低下が関与していることが明らかになってきた。悪性腫瘍（がん）組織ではプロテアソームが高発現しており、多発性骨髄腫治療におけるプロテアソーム活性阻害剤 **bortezomib** の成功以来、有望な分子標的として注目を浴びている。一方、プロテアソームの発現量と活性の低下は、加齢に伴う神経変性や自己炎症症候群などタンパク質恒常性の破綻に起因する病態の主要因となる。しかし、プロテアソームの発現や活性がどのように制御され、これらの病態とプロテアソーム機能の増減がどのように関連しているのか、その具体的な分子機構はほとんど未解明である。

2. 研究の目的

本研究は、研究代表者がこの15年間一貫して行ってきたプロテアソームの分子集合機構、分子多様性についての先端的な研究をさらに発展させる形で、プロテアソームを制御するメカニズム、およびプロテアソーム機能の破綻により病態に至るメカニズムの解明を目指す。

3. 研究の方法

①プロテアソームサブユニットの転写を制御する機構の解明②プロテアソームの分子集合機構とその病態生理的意義の理解③プロテアソームの

細胞内動態の解析④プロテアソーム機能低下により惹起される病態生理の解析、の4項目について、哺乳類細胞を用いたゲノムワイド **siRNA** スクリーニング、出芽酵母を用いた遺伝学によるスクリーニング、線虫・ショウジョウバエ・マウスなど多彩なモデル生物を用いた個体解析、生化学的・分子生物学・細胞生物学的手法、先端的質量分析やイメージング技術を駆使した。

4. これまでの成果

①転写を制御する機構の解明

a. 出芽酵母プロテアソーム転写因子 **Rpn4** の新たな認識コンセンサス配列の同定に成功した⁽⁵⁾。

b. **siRNA** スクリーニングにより哺乳類細胞における **Nrf1** 活性化に働くプロセシング酵素の同定に成功した（投稿中）。

②分子集合機構とその病態生理的意義の理解
a. **TRC/GET** 経路がプロテアソーム形成に関与することを解明し、細胞内環境がプロテアソーム形成に関与することを初めて示した⁽⁹⁾。

b. マウス初期胚特異的なプロテアソーム形成シヤペロン **ZPAC** を発見し、母性-胚性転移の時期特異的にプロテアソームの急激な増産を助けることにより母性タンパク質分解を促進することを明らかにした⁽¹⁰⁾。

c. 特殊型プロテアソーム（免疫プロテアソーム・胸腺プロテアソーム）の形成は、構成型の発現を抑制することなく、優先的分子集合機構により達成されていることを明らかにした⁽⁷⁾。

d. 精巣特異的プロテアソームサブユニット **α4s** を発見し、減数分裂前期以降の生細胞に特異的に発現し、構成型 **α4** のかわりにプロテアソーム

ムに組み込まれることを明らかにした⁽⁸⁾。

e. 胸腺プロテアソームは他のプロテアソームには作り出せないユニークな特徴を持つペプチド断片を切り出して MHC クラス I 上に提示させることにより、T 細胞の正の選択に働くことを明らかにした⁽⁴⁾。

③プロテアソームの細胞内動態の解析

a. プロテアソームの 2 つのユビキチン鎖受容サブユニット Rpn10 と Rpn13 の単独および二重欠損マウスの解析により、両者が主に縮重的に働いているが、一部タンパク質については各受容体特異的に分解されており、各々マウスの発生に必須であることを明らかにした⁽²⁾。

b. プロテアソーム新規会合因子として Sirt1 を同定し、タンパク質品質管理に働いていることを明らかにした⁽³⁾。

c. プロテアソーム会合因子 Proteasome Inhibitor 31-kDa (PI31)が in vivo ではプロテアソームによるタンパク質分解を正に制御することを明らかにした⁽⁶⁾。

④プロテアソーム機能低下時の病態生理解析

a. ミトコンドリア機能異常による増殖遅延がプロテアソーム機能低下により回復すること、分解を免れ蓄積した Mia40 の作用によりミトコンドリアの融合と膜電位が改善する分子機構を明らかにした⁽¹⁾。

5. 今後の計画

①転写を制御する機構の解明

新規に同定した Nrf1 プロセシング酵素が Nrf1 特異的にプロテアソーム機能低下時にのみ働く分子メカニズムを明らかにする。また、プロテアソーム基質 ZsGreen-ODC の蛍光強度を指標とした siRNA スクリーニングおよび酵母ワンハイブリッド法によるスクリーニングにより有力転写因子を同定済みであり、分子機構、生理的意義を明らかにする。

②分子集合機構とその病態生理的意義の理解

ZsGreen-ODC の蛍光を指標とした siRNA スクリーニングヒット中にさらなる分子集合因子が存在する可能性があり探索を進める。また ES 細胞では特殊な分子集合経路が存在することが示唆されていることから、ES 細胞を用いた siRNA スクリーニングを模索する。出芽酵母内に 20 遺伝子を同時に発現させる系を樹立できたので、プロテアソームの再構成を試みる。

③プロテアソームの細胞内動態の解析

蛍光タグ付加プロテアソームサブユニットノックイン細胞を用いた siRNA スクリーニングが完了し、核局在を制御する有力分子の同定に成功したところであり、分子機構および生理的意義の解明を進めていく。

④プロテアソーム機能低下時の病態生理解析

プロテアソーム機能低下時に細胞の生存を回復または悪化させることを指標とした siRNA スクリーニングを実施済みであり、プロテアソーム機能低下を代償する分子機構、プロテアソーム機能低下時に細胞死に至らしめる分子機構につ

いての解明を目指す。

6. これまでの発表論文等(受賞等も含む)

【欧文原著論文 20 件、以下主要論文】

- (1) Shirozu R, Yashiroda H, Murata S. Proteasome Impairment Induces Recovery of Mitochondrial Membrane Potential and an Alternative Pathway of Mitochondrial Fusion. *Mol Cell Biol*. 36(2):347-62. (2015)
- (2) Hamazaki J, Hirayama S, Murata S. Redundant Roles of Rpn10 and Rpn13 in Recognition of Ubiquitinated Proteins and Cellular Homeostasis. *PLoS Genet*. 11(7):e1005401. (2015)
- (3) Tomita T, Hamazaki J, Hirayama S, McBurney MW, Yashiroda H, Murata S. Sirt1-deficiency causes defective protein quality control. *Sci Rep*. 5:12613. (2015)
- (4) Sasaki K, Takada K, Ohte Y, Kondo H, Sorimachi H, Tanaka K, Takahama Y, Murata S. Thymoproteasomes produce unique peptide motifs for positive selection of CD8(+) T cells. *Nat Commun*. 6:7484. (2015)
- (5) Shirozu R, Yashiroda H, Murata S. Identification of minimum Rpn4-responsive elements in genes related to proteasome functions. *FEBS Lett*. 589(8):933-40. (2015)
- (6) 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*. 35(1):141-52. (2015)
- (7) Bai M, Zhao X, Sahara K, Ohte Y, Hirano Y, Kaneko T, Yashiroda H, Murata S. Assembly mechanisms of specialized core particles of the proteasome. *Biomolecules*. 4(3):662-77. (2014)
- (8) Uechi H, Hamazaki J, Murata S. Characterization of the testis-specific proteasome subunit $\alpha 4s$ in mammals. *J Biol Chem*. 289(18):12365-74. (2014)
- (9) Akahane T, Sahara K, Yashiroda H, Tanaka K, Murata S. Involvement of Bag6 and the TRC pathway in proteasome assembly. *Nat Commun*. 4:2234. (2013)
- (10) Shin SW, Shimizu N, Tokoro M, Nishikawa S, Hatanaka Y, Anzai M, Hamazaki J, Kishigami S, Saeki K, Hosoi Y, Iritani A, Murata S, Matsumoto K. Mouse zygote-specific proteasome assembly chaperone important for maternal-to-zygotic transition. *Biol Open*. 2(2):170-82. (2013)

ホームページ等

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