

科学研究費補助金（特別推進研究）公表用資料
〔研究進捗評価用〕

平成 17 年度採択分

平成 20 年 3 月 31 日現在

研究課題名（和文）プロテアソームの分子集合と多様性の解析

研究課題名（英文）Analyses of molecular assembly and diversity of proteasomes

研究代表者

田中啓二（Tanaka Keiji）

（財）東京都医学研究機構・東京都臨床医学総合研究所・所長代行



研究の概要:プロテアソームはユビキチンをパートナーとする細胞内の蛋白質分解装置であり、多様な生体反応を迅速に、順序よく、一過的にかつ一方に決定する合理的な手段として生命科学の様々な領域で中心的な役割を果たしている。我々はプロテアソームが生命活動の制御に果たす多彩な役割について分子から個体レベルに至る研究を四半世紀以上に亘り包括的に推進してきた。しかしその詳細はいまなお多くの謎に包まれている。本研究では生命科学史上他に類を見ない巨大で複雑な酵素複合体であるプロテアソームの分子集合機構とその多様性について解明すると同時に蛋白質分解が生命活動と病態発症に果たす役割についての解明も目指す。

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:プロテアソーム・多成分複合体・分子集合・分子多様性・ユビキチン

1. 研究開始当初の背景

プロテアソームは、ユビキチン（蛋白質に分解シグナルを付与する翻訳後修飾分子）が付加した蛋白質を ATP 依存的に分解する細胞内装置である。この酵素複合体は、細胞周期・代謝調節・免疫応答・情報伝達・転写制御・品質管理・ストレス応答・DNA 修復など多様な生体反応の制御において重要な役割を担っていることが相次いで判明している。しかし分子的側面を基軸に考えるとまだ未解明の課題が山積している。

2. 研究の目的

我々は多年に亘り継続的に我々自身が発見したプロテアソームという蛋白質分解装置の構造・機能・生理・病態に関する包括的研究を精力的に推進してきた。しかし現在なお、分子量 250 万・総サブユニット数約 100 個から構成された巨大で複雑な複合体の分子集合機構は不明であり、分子多様性が存在することの生物学的意義も謎である。これらはプロテアソーム研究に残された最大の課題であり、本研究ではこの難題の解明に挑むことを目標とする。

3. 研究の方法

生化学・細胞生物学・免疫学・分子生物学・構造生物学・分子遺伝学など現代の生命科学が開発してきたほとんど全ての最先端技術を駆使して詳細な研究を行ってきた。

4. これまでの成果

(1) プロテアソームの分子集合機構の解析

20S プロテアソームは 7 種類の α サブユニットから形成される α リングと 7 種類の β サブユニットから形成される β リングが $\alpha\beta\beta\alpha$ の順に重なった複合体であり、26S プロテアソームの触媒活性を担っている。我々はプロテアソームに会合する分子の探索から、20S プロテアソームの分子集合を促進する新規なシャペロン分子 PAC(Proteasome Assembling Chaperone)^{1,2,3,4} の同定および機能解析に成功した。即ち PAC1/2 と PAC3/4 が各々異型二量体として、20S プロテアソーム形成の最初のステップである α リングの形成に関与することを明らかにした。さらに酵母の PAC3/4 の機能的ホモログとして Dmp1/Dmp2 の分離に成功すると共に X 線結晶による立体構造解析にも成功した。その結果、アミノ酸の 1 次配列上の相同性はほとんどないにも関わらず Dmp1/Dmp2 の立体構造は同時に構造解析した動物細胞の PAC3 ホモダイマー（実際には PAC3 は PAC4 と二量体を形成）の立体構造と酷似していた。これらの結果と “Intramolecular Chaperone” の解析から β リングの形成機構とを併せて 20S プロテアソームの分子集合機構の解明に成功した。

(2) プロテアソームの分子多様性の解析

主要組織適合性遺伝子複合体 MHC を獲得した脊椎動物ではプロテアソームは MHC クラス I 結合ペプチド産生の必須酵素でもあり、

CD8⁺T 細胞を介した免疫応答に不可欠な役割を果たす。我々の以前の研究から脊椎動物のプロテアソームはこれまで“標準型プロテアソーム”と MHC クラス I 分子に高い親和性をもつ抗原ペプチドを産生することができる“免疫プロテアソーム”の二つのタイプが知られていた。本研究においてさらに我々は脊椎動物のゲノム中に、プロテアソームのサブユニットと高い相同性をもつ新規の遺伝子β5t を発見した。興味深いことにβ5t は胸腺、しかも正の選択を制御している胸腺皮質上皮細胞 cTEC に特異的に発現していた。そこでこのβ5t を含む第3の新規プロテアソームを“胸腺プロテアソーム”と命名した。この胸腺プロテアソームの役割を明らかにするためにβ5t 欠損マウスを作製し、胸腺における T 細胞分化を観察したところ、β5t 欠損マウスでは DN, DP, CD8⁺SP の細胞数は正常である一方、CD8⁺SP 細胞が著明に減少していた。この結果 cTEC において胸腺プロテアソームによって産生される MHC クラス I 分子に提示されるペプチドレパートリーこそが CD8⁺T 細胞の正の選択のために必須であることが初めて判明した。

(3) 哺乳類オートファジーの生理機能解析

オートファジー (Self-Eating : 自食作用) は、ダイナミックな膜形成を伴う真核生物に保存されたもう一つの主要な蛋白質分解系であり、酵母などの下等生物においては、オートファジーは飢餓に応答した生存戦略が唯一の働きと考えられてきた。しかしながら我々は条件的にオートファジーが不能となるマウスを世界で最初に作製し、中枢神経系特異的オートファジー欠損マウスが蛋白質の品質管理 (細胞内浄化) に破綻をきたして神経変性疾患が発症することを発見した。と同時に、オートファジー不能マウスが栄養飢餓時の蛋白質分解阻害のみならず定常状態においてもユビキチン陽性封入体や異常オルガネラの蓄積を引き起こすことを明らかにした。この結果に基づいて、ユビキチンがプロテアソームのみならずオートファジーによる選択的蛋白質分解のシグナルとしても機能し得るという予想外の仮説を提唱した。併せてオートファジーの欠損によって累積するユビキチン陽性の封入体が形成される機構の解明にも成功した。これらの結果は、神経変性疾患の新しい発症機構を提案することになり神経病理学の領域に衝撃を与えた。

5. 今後の計画

1) 新規分子集合シャペロンを同定して 26S プロテアソームの分子集合機構の解明を目指す。分子集合シャペロンの個体レベルでの生物学的機能を解明するために遺伝子改変動物を作出して生理機能解析を実施する。

2) 胸腺プロテアソームの胸腺特異的な発現調節機構と分子集合機構の解明を目指す。さらに胸腺プロテアソームによって形成される抗原ペプチド (β5t の野生型・欠損型マウスの cTEC に発現している T 細胞受容体結合ペプチド) レパートリーを明らかにする。本研究から免疫学の大きな謎であった胸腺における正の選択の分子機構解明に迫る。

3) マウス遺伝学を基盤にオートファジーの加齢や病態における役割の解明に迫る。

6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)
(研究代表者は太字、研究分担者には下線)

(1) Yashiroda, H., Mizushima, T., Okamoto, K., Kameyama, T., Hayashi, H., Kishimoto, T., Kasahara, M., Kurimoto, E., Sakata, E., Suzuki, A., Yuko Hirano, Y., Murata, S., Kato, K., Yamane, T., and **Tanaka, K.** (2008) Crystal structure of a chaperone complex that contributes to the assembly of yeast 20S proteasomes. *Nature Struct. Mol. Biol.* 15, 228 – 236

(2) Komatsu, M., Waguri, S., Koike, M., Sou, Y., Ueno, T., Hara, T., Mizushima, N., Iwata, J., Ezaki, J., Murata, S., Hamazaki, J., Nishito, Y., Iemura, S., Natsume, N., Yanagawa, T., Uwayama, J., Warabi, E., Yoshida, H., Ishii, T., Kobayashi, A., Yamamoto, M., Yue, Z., Uchiyama, Y., Kominami, E., and **Tanaka, K.** Homeostatic levels of p62 control cytoplasmic inclusion body formation in autophagy-deficient mice. *Cell* 131, 1149-1163, (2007)

(3) Murata, S., Sasaki, K., Kishimoto, T., Niwa, S., Hayashi, H., Takahama, Y., and **Tanaka, K.** Regulation of CD8⁺ T cell development by thymus-specific proteasomes. *Science* 316, 1349-1353, (2007)

(4) Komatsu, M., Waguri, S., Chiba, T., Murata, S., Iwata, J., Ueno, T., Koike, M., Uchiyama, Y., Kominami, E., and **Tanaka, K.** Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration. *Nature* 441, 880-884, (2006)

(5) Hirano, Y., Hendil, K.B., Yashiroda, H., Iemura, S., Nagane, R., Hioki, Y., Natsume, T., **Tanaka, K.**, and Murata, S. A heterodimeric complex that promotes the assembly of mammalian 20S proteasomes, *Nature* 437, 1381-1385, (2005).

1) 田中啓二 : 平成 19 年 東レ科学技術賞「プロテアソームの動態と作動機構に関する包括的研究」(東レ科学振興会)

2) 村田茂穂 : 平成 19 年科学技術分野の文部科学大臣表彰・若手科学者賞「生命科学分野における哺乳類プロテアソームの研究」(文部科学省)

3) 村田茂穂 : 平成 19 年日本生化学会奨励賞「プロテアソームによる適応免疫システム制御に関する研究」(日本生化学会)

4) 村田茂穂 : 平成 18 年日本分子生物学会三菱化学奨励賞「哺乳類プロテアソームの多様性と分子基盤の解析」(日本分子生物学会)

ホームページ : <http://www.rinshoken.or.jp/>