

科学研究費助成事業（特別推進研究）公表用資料  
〔平成29年度研究進捗評価用〕

平成 26 年度採択分  
平成29年 5 月 19 日現在

研究課題名（和文） **プロテアソーム：動作原理の解明と  
生理病態学研究**  
研究課題名（英文） **The Proteasome: Mechanistic Actions and  
In-depth Physiopathological Analyses**

課題番号：26000014

研究代表者

**田中 啓二** (TANAKA, Keiji)

公益財団法人東京都医学総合研究所・分子先端研究分野・所長



**研究の概要**：真核生物のプロテアソームは、ユビキチンをパートナーとする巨大で複雑なタンパク質分解装置であり、細胞内タンパク質の選択的分解のほぼ全てを担うエネルギー依存性のタンパク質分解酵素である。本研究では、プロテアソームの動作原理や形成機構の解明から生理学・病態学への統合を目指す。

研究分野：生物系・生物学・生物化学・細胞生物学

キーワード：タンパク質分解、ユビキチン、プロテアソーム

### 1. 研究開始当初の背景

生体を構成する主要成分であり生命活動を支える機能素子であるタンパク質は、数分～数ヶ月と千差万別の寿命をもって不均一に代謝回転している。この動的な新陳代謝の研究においてタンパク質の分解は、合成研究に比して大幅に立ち遅れていたが、近年、ユビキチン (Ub)・プロテアソームシステム (UPS) やオートファジー遺伝子群の発見が端緒となり、未曾有の発展を遂げてきた。その結果、タンパク質分解系の生命科学における重要性が明確になってきた。

### 2. 研究の目的

プロテアソームは、分子量250万・総サブユニット数70個から構成された超分子複合体であり、触媒粒子 (CP, Core/Catalytic Particle) と調節粒子 (RP, Regulatory Particle) から構成されている (図1参照)。我々は四半世紀以上に亘って、本酵素の構造と機能の研究を包括的に推進してきたが、その動作原理や病態生理学に関しては依然として未解明な課題が山積しており、本研究ではその解明に挑む。

### 3. 研究の方法

生化学・細胞生物学・分子生物学・構造生物学・分子遺伝学的手法などの最先端技術を活用する。

### 4. これまでの成果

#### (1) プロテアソームの動作原理と形成機構解明

プロテアソームによるタンパク質の分解機序、即ち動作原理は、構造学的な解析は進んできたが、細胞内での作動機構は未解明であった。プ

ロテアソームには二個の Ub 受容体 (Rpn10, Rpn13) が存在するが、我々は両遺伝子欠失マウスを作成して、それらの個体レベルにおける役割について解析した (PLoS Genet 2015)。更に高分解能質量分析計を用い、デコーダー分子 (Ub 結合タンパク質 UBD) に結合した Ub 鎖の網羅的解析から、基質のプロテアソームへの運搬は、

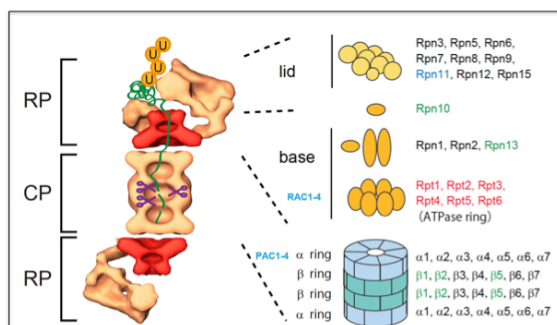


図1 プロテアソームの構成と分子集合シャペロンの働き

Rad23・Dsk2などのシャトル因子 (UBL-UBA タンパク質) の働きが大きいことを示した (Mol Cell 2017)。またその上流において p97ATPase (Cdc48) シャペロンがコファクターである Npl4-Ufd1 と連携して K48 リンクの Ub 鎖を持つタンパク質を選別していることを明らかにした。同時に Ub ポリ鎖の新規高親和性プローブ TR-Tube による Ub 化基質の効果的な同定方法の開発 (PNAS 2015) や、細胞内で最も主要な Ub 鎖である K48 鎖と K63 鎖が K48/K63 分岐鎖としても存在し、その分岐鎖が NF- $\kappa$ B シグナル伝達に関わることを (Mol Cell 2016) などを報告した。一方、我々はプロテアソームの形成を支援す

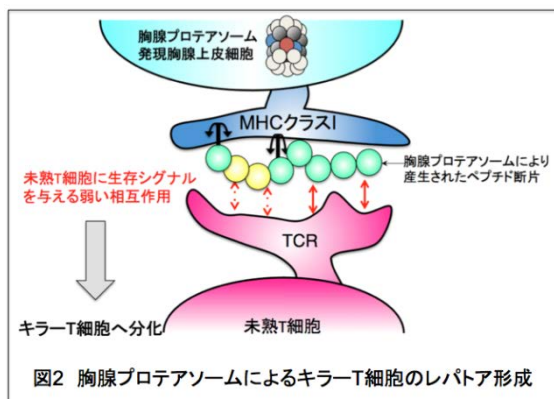
る専門的な分子集合シャペロンとして 4 種の CP シャペロン (PAC1-4) と 4 種の RP シャペロン (RAC1-4) を発見、これらの立体構造を原子レベルで決定し、分子集合機構を解明した (図 1)。また蛍光相関分光法による解析からプロテアソームが細胞質で分子集合してから核に輸送されることも明らかにした (Nat Commun 2014)。更にプロテアソームを量的に制御する仕組みとして、プロテアソーム機能低下時に 33 種類のプロテアソームサブユニット群を一斉に発現促進する転写因子 Nrf1 の活性化機構を解明した (eLife 2016)。

## (2) パーキンソン病 (PD) の発症機構解明

遺伝性劣性 PD の原因遺伝子産物である Pink1 (タンパク質リン酸化酵素) と Parkin (Ub 連結酵素) が膜電位の低下した不良ミトコンドリア (蓄積すると PD を発症) を除去する仕組みを解明した。即ち Pink1 が Parkin と Ub の両者を同時にリン酸化して Parkin を活性化する機構 (Nature 2014, JBC 2015) や “異常ミトコンドリア上のリン酸化 Ub 鎖” が活性型 Parkin の受容体であること (JCB 2015) などを明らかにした。これら一連の研究から「Pink1・Parkin・Ub の 3 者が協調して異常なミトコンドリアに (リン酸化) Ub を付加し、不良ミトコンドリアを細胞内から除去することで、PD の発症を抑制する」スキームの全体像が明らかになった。(EMBO Rep 2016 総説)。

## (3) 胸腺プロテアソームによるキラー T 細胞レパトアの形成機構解明

胸腺における T リンパ球の増殖と分化 (レパトア形成) は胸腺上皮細胞 (cTEC や mTEC) の MHC と T 細胞の TCR の相互作用で決定される。骨髄から胸腺に流入した未分化な DN T 細胞は、TCR の再構成を受けて多様な DP T 細胞に分化する。胸腺の皮質では、DP T 細胞は「正の選択」を経て SP 細胞に分化した後、髄質に移動し「負の選択」を受ける。標準プロテアソームの触媒サブユニットは  $\beta 1$ ,  $\beta 2$ ,  $\beta 5$  から構成されている (図 1) が、申請者らは免疫プロテアソーム (触媒サブユニットが  $\beta 1i$ ,  $\beta 2i$ ,  $\beta 5i$  に置換：



Science 1994) の発見に加えて、脊椎動物の胸腺皮質上皮細胞には  $\beta 5t$  という新規な触媒サブユニットが特異的に発現していることを見出

し、 $\beta 5t$  を含む酵素を胸腺プロテアソームと命名した (Science 2007)。上記の「正の選択」に必要な (MHC-ペプチドと TCR の相互作用の弱い) ペプチドを生成する主な酵素が “胸腺プロテアソーム” であり、負の選択に必要な (MHC-ペプチドと TCR の相互作用の強い) ペプチドを生成する主な酵素が “免疫プロテアソーム” である。そして最終的に  $10^{12} \sim 10^{16}$  (百兆個) 以上の多様性に富んだ T 細胞レパトアが誕生して、適応免疫が確立する。本研究で我々はさらに、胸腺プロテアソームが免疫プロテアソームとは異なった特徴を有するペプチドを産生することを明らかにし、「正の選択」における CTL エピトープ (抗原ペプチド) を切り出す仕組みなど (Nat Commun 2015, Nat Immunol 2016) を明らかにした (図 2)。また胸腺プロテアソームが単にレパトア形成のみならず T リンパ球の成熟における教育 (適切な抗原応答性の獲得) にも関与していること (Nat Immunol 2015) や転写因子 Foxn1 が胸腺における  $\beta 5t$  の特異的な発現に関わること (Nat Commun 2017) なども解明した。

## 5. 今後の計画

プロテアソーム機能低下による病態の発症機構の解明とプロテアソーム活性を正負に制御する技術を開発して創薬研究に発展させる。

## 6. これまでの発表論文等

(1) Tsuchiya, H., Ohtake, F., (3名略) Tanaka, K.,\* and Saeki, Y.\* (\*co-correspondences) In vivo ubiquitin linkage-type analysis reveals that the Cdc48-Rad23/Dsk2 axis contributes to K48-linked chain specificity of the proteasome. Mol Cell in press (2017)

(2) Ohtake, F., Saeki, Y., Ishido, S., Kanno, J., and Tanaka, K. The K48-K63 branched ubiquitin chain regulates NF- $\kappa$ B signaling. Mol Cell 64, 251-266 (2016)

(3) Sasaki, K., Takada, K., Ohte, Y., Kondo, H., Sorimachi, H., Tanaka, K., Takahama, Y., and Murata, M. Thymoproteasomes produce unique peptide motifs for positive selection of CD8<sup>+</sup> T cells. Nat Commun. 6, 7484 (2015)

(4) Pack, Chan-Gi., (9名略) Baumeister, W., Tanaka, K.,\* and Saeki, Y.\* (\*co-correspondences) Quantitative live-cell imaging reveals molecular dynamics and cytoplasmic assembly of the 26S proteasome. Nat Commun. 5, 3396 (2014)

(5) Koyano, F., (12名略) Saeki, Y., Tanaka, K.,\* and Matsuda, N.\* (\*co-correspondences) Ubiquitin is phosphorylated by PINK1 to activate parkin. Nature 510,162-166 (2014)

2014年「文化功労者」顕彰  
ホームページ等

<http://www.igakuken.or.jp/pro-meta/>