

研究課題別評価

1 研究課題名:

ユビキチンと分子シャペロンの連携による細胞機能制御機構の解明

2 研究者氏名:

村田 茂穂

3 研究のねらい:

細胞内で異常となったタンパク質は分子シャペロンの助けにより正常に復帰するか、ユビキチン化された後プロテアソームにより分解されるかの運命をたどることにより、細胞内への異常タンパク質の蓄積が防がれている。異常タンパク質のクリアランスのためにシャペロンシステムとユビキチン・プロテアソームシステムが協調して働くことが必要であることが知られていたが、この二つのシステムを連携させる分子機構は長らく不明であった。本研究は、シャペロンとユビキチン・プロテアソームシステムの橋渡しをする機構の解明により、神経変性疾患をはじめとした異常タンパク質蓄積に基づく疾患の新たな理解を目指して開始された。

4 研究成果:

研究開始当初、異常タンパク質を特異的に認識してユビキチン化するユビキチンリガーゼの網羅的同定を目指して、マイクロアレイ解析やモデル基質のユビキチン化を指標とした生化学的精製を試みたが、同定まで至らなかった。そこで、構造上アンフォールドしたタンパク質はユビキチン化されなくてもプロテアソームにより分解されうることに着目し、プロテアソーム側に異常タンパク質を認識する機構が存在することを想定し、プロテアソームに会合する因子を LC-MS/MS 解析により探索した。同定された中に、これまで機能が全く未知な分子が存在し、これらに着目して解析を進めた結果、以下の成果が得られた。

1) 20S プロテアソームの分子集合を促進するシャペロン分子 PAC1, PAC2 の発見と機能解析¹⁾

プロテアソームはあらゆる真核生物に存在し、その機能と構造は酵母からヒトに至るまで高度に保存された必須のタンパク質分解酵素複合体である。通常プロテアソームと呼ばれるものは 26S プロテアソームのことであり、タンパク質分解実行ユニットである 20S プロテアソームの両端に、それを制御する 19S 複合体が会合した分子量 250 万の巨大複合体である。20S プロテアソームは各々7種類のサブユニットがリング状に集まった α リングと β リングが $\alpha \beta \beta \alpha$ の順で会合した 750kDa の円筒型粒子であり、酸性、塩基性、疎水性アミノ酸のいずれからも切断できる活性を有する多機能性のプロテアーゼ複合体である。このように 14 種類、計 28 個もの互いに類似した α と β のサブユニットが一個ずつ正確に並んで 20S プロテアソームを形成する仕組みは、プロテアソームが発見されて以来大きな謎であり、自立的に形成されるものと漠然と考えられてきた。

Flag タグを付加した 20S プロテアソームのサブユニットの一つ ($\beta 1i$) を HEK293 細胞に発現させ、Flag による免疫沈降産物を LC-MS/MS システムにより解析したところ、26S プロテアソームのサブユニットとともに機能未知の分子 DSCR2 (Down Syndrome Critical Region 2) 及び HCCA3 (Hepatocellular Carcinoma Associated gene 3) 由来のペプチドが多数検出されたことから、プロテアソームとこれらの分子の関連の解析を開始した。その結果、この二つの分子はヘテロ二量体を形成し、形成途上の 20S プロテアソームに選択的に会合することが分かった。さらにこれらの分子を RNA 干渉法によりノックダウンすると、前駆体プロテアソームが凝集してしまうことから、この新しいヘテロ二量体は形成途上の不安定なプロテアソーム前駆体が "off-pathway" へ向かうことを防ぐ役割を持った、分子集合のためのシャペロン分子であることが明らかとなった。DSCR2、HCCA3 をそれぞれ PAC1 (Proteasome Assembling Chaperone 1)、PAC2 と再命名し、新しいプロテアソーム分子集合のメカニズムを提唱した。

2) もう一つの 20S プロテアソームの分子集合促進シャペロン PAC3 の発見と機能解析⁵⁾

PAC1, PAC2 を含むプロテアソーム前駆体を生化学的に精製したところ、PAC1, PAC2 およびプロテアソームのサブユニットの他に、ほぼ等モルで染色される分子を見いだした。この分子もプロテ

アソーム前駆体特異的に結合する。ノックダウンでは、 α リングの形成が阻害され、さらに PAC1,PAC2 との3者のノックダウンでは α リングの形成阻害とともに、特定のサブユニットを欠落した異常なプロテアソーム前駆体が形成された。この分子を PAC3 と命名し、PAC1,PAC2,PAC3 および 10 年前に他グループにより同定されていた別のシャペロン分子 Ump1 との4種類のプロテアソーム特異的シャペロン分子の協調的な働きによりプロテアソームが正確に形成されるメカニズムを解明した。

3) プロテアソームの脱ユビキチン化活性に必須な分子 ADRM1(hRpn13)の発見と機能解析⁴⁾

さらにプロテアソームと会合する新規分子の同定を試みたところ、従来 ADRM1(Adhesion regulating molecule 1)として知られていた分子が、プロテアソームと会合することが分かった。詳細な解析から、ADRM1 はプロテアソームの準サブユニットであること、哺乳類におけるプロテアソーム内の主要な脱ユビキチン化活性を担う UCH37(ubiquitin C-terminus hydrolase)の活性発揮に必須であることが明らかとなった。

4) 恒常的オートファジーによるユビキチン化タンパク質蓄積の抑制²⁾

順天堂大学のグループとの共同研究により、細胞内のもう一つの大規模タンパク質分解系であるオートファジーがユビキチン化蛋白質の除去に重要な役割を果たしていることがわかった。すなわちオートファジーを神経細胞特異的に欠如させると、神経細胞内にユビキチン化タンパク質が凝集体を形成して蓄積し、神経細胞死に至る。このことから、異常タンパク質の蓄積防止に、ユビキチン・プロテアソーム系のみならずオートファジー系が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

5) 新しいタイプのユビキチン鎖を形成するユビキチンリガーゼの発見³⁾

さきがけ研究開始当初、研究者が異常タンパク質ユビキチン化のユビキチンリガーゼの候補の一つとして解析していた分子(HOIP)が、別のユビキチンリガーゼ(HOIL-1)と複合体を作り、さらに従来とは全く異なるタイプのポリユビキチン鎖を形成することを明らかにした。すなわち、通常はユビキチン分子内のリジン残基へのユビキチン C 末端の共有結合が繰り返されることによりポリユビキチン鎖が形成され、プロテアソームによる認識のシグナルになったり、シグナル伝達を仲介したりする役割を果たすのだが、HOIP/HOIL-1 複合体リガーゼはユビキチンの C 末端へのユビキチン N 末端の共有結合が繰り返された、“直鎖状”のポリユビキチン鎖を形成する。このようなタイプのポリユビキチン鎖は初めての発見であり、生体内での機能解析が今後重要となる。

5 自己評価:

さきがけ開始当初は、異常タンパク質分解のためのユビキチンシステムの解明に重点をおいて研究を進めていたが、プロテアソームに着眼して解析を進めたところ、当初の研究の狙いとは異なる展開となったが、最終的には「プロテアソームの分子集合」というプロテアソーム研究に残された大きな命題の一つをほぼ解明することが出来た^{1,5)}。近年、癌をはじめ、神経変性疾患や免疫異常などプロテアソームとヒトの病気との関連が注目されており、プロテアソーム研究はヒトの病気の理解に大きく貢献できると考えられる。とくに今回の研究成果は、「プロテアソームの合成過程」という全く新しい作用点を標的にした副作用のない新しい抗癌剤の開発の端緒となるものであり、実際、現在共同研究で PAC1-3 の機能を阻害する化合物のスクリーニングを行うところまで発展している。今後も哺乳類のプロテアソームの基本原則を解明することにより、プロテアソームが関連する病態の理解と治療戦略の開発に貢献できるような研究を行っていきたい。

さきがけ開始当初の目標「異常タンパク質分解のためのユビキチンシステムの解明」に関しては、決定的なものを捕まえることが出来なかったが、世界的に見てもこの3年間に大きな進歩はなく、今後も積極的に推進していけばイニシアチブを取ることが可能と考えている。一方、順天堂大学のグループとの共同研究により、細胞内のもう一つの大規模タンパク質分解系であるオートファジーがユビキチン化蛋白質の除去に重要な役割を果たしていることがわかり²⁾、今後はユビキチンシステムとオートファジーの連携機構も念頭に置いて、異常タンパク質除去機構の理解のための研究を推進していきたい。

6 研究総括の見解:

本さがけ研究の開始時目指していた方向とは異なる局面で研究が展開されたことは、人知の及ばない自然の謎に直面した結果であり、したがって、得られた成果も際立ったものになったと考える。さがけ研究の醍醐味といえる。多数の構成ユニットを集めて巨大なプロテアソームを形成するときに分子集合を司るシャペロン分子 PAC1, PAC2 さらには PAC3 を発見し、Nature 誌で研究結果の発信をしたことは誇るべき成果である。当初目指した方向も考えたとおりに行かず壁にぶち当たったことは、真の自然に直面したことの証と考えられるので、もがいてブレークスルーが得られれば大きな発見につながると考えられる。PAC ワールドの更なる広がりを期待する。

7 主な論文等:

原著論文

1. Hirano, Y., Hendil, K., 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** 2005, 437: 1381–1385.
2. Komatsu, M., Waguri, S., Chiba, T., Murata, S., Iwata, J., Tanida, I., Ueno, T., Koike, M., Uchiyama, Y., Kominami, E., and Tanaka, K. Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. **Nature** 2006, 441: 880–884.
3. Kirisako, T., Kamei, K., Murata, S., Kato, M., Fukumoto, H., Kanie, M., Sano, S., Tokunaga, F., Tanaka, K., and Iwai, K. A ubiquitin ligase complex assembles linear polyubiquitin chains. **EMBO J** 2006, 25: 4877–4887
4. Hamazaki, J., Iemura, S., Natsume, T., Yashiroda, H., Tanaka, K., and Murata, S. A novel proteasome interacting protein recruits UCH37 to 26S proteasomes. **EMBO J** 2006, 25: 4524–4536.
5. Hirano, Y., Hayashi, H., Iemura, S., Hendil, KB., Niwa, S., Kishimoto, T., Kasahara, M., Natsume, T., Tanaka, K., and Murata, S. Cooperation of multiple chaperones required for the assembly of mammalian 20S proteasomes. **Mol Cell** 2006, *in press*.

他に論文 4 件(国際)、総説 23 件(国際 5 件、国内 18 件)、口頭発表 3 件(国際)

特許出願:なし

受賞

第 4 回日本分子生物学会三菱化学奨励賞;平成 18 年度

招待講演

1. Shigeo Murata, Yuko Hirano, Hideki Yashiroda, Shun-ichiro Iemura, Tohru Natsume, Keiji Tanaka; Novel proteasome-interacting molecules that facilitate the formation of the precursor complex of the mammalian 20S proteasome; 第 77 回日本生化学会大会; 2004 年 10 月 15 日
2. Shigeo Murata, Yuko Hirano, Shun-ichiro Iemura, Tohru Natsume, Keiji Tanaka; New mechanism for assembly of mammalian 20S proteasomes; 第 78 回日本生化学会大会; 2005 年 10 月 20 日
3. Shigeo Murata, Yuko Hirano, Klavs B. Hendil, Shun-ichiro Iemura, Tohru Natsume, Keiji Tanaka; Molecular assembly of mammalian 20S proteasomes; 20th IUBMB; 2006 年 6 月 23 日