

研究題目 プロテアソームによる基質選別機構とその生理的意義の解明

研究組織

研究代表者：村田茂穂（東京大学大学院薬学系研究科）

共同研究者：小迫英尊（徳島大学先端酵素学研究所）

【1】研究の概要

[1-1]本研究の目的・概要

プロテアソームはタンパク質の選択的分解に働く真核生物に必須の複合体型プロテアーゼである。プロテアソームによる基質選別には、ユビキチン化タンパク質をプロテアソームに運搬するシャトル因子(HHR23A/B, ubiquilin1-4)、プロテアソームのユビキチン鎖受容体 (Rpn1, Rpn10, Rpn13)、プロテアソーム活性化因子(PA28, PI31, PA200)などが関与している。Rpn13ががん細胞で高発現し増殖促進に働くこと、ubiquilin 2が筋萎縮性側索硬化症の原因遺伝子であることなど、プロテアソーム分解時の基質選別が様々な生理・疾患病態に深く関与することが示唆されているが、各因子がどのような基質を選別しているのか未解明である。

上記を明らかにする目的で、培養細胞および各種遺伝子欠損マウスを用いて定量的プロテオーム解析を実施する。また、プロテアソーム機能低下による細胞・個体老化促進のメカニズムをプロテオーム解析から迫る研究を新たに実施する。加齢に伴い臓器にユビキチン化タンパク質が増加することが知られている。プロテアソーム機能低下により老化細胞においてどのようなタンパク質が選択的に蓄積するのかをプロテオーム解析により同定

し、細胞・個体老化とプロテアソームの基質選択性との関係およびその病態生理的意義を明らかにする。

[1-2]研究の方法・経過

- ① 機能未知であるプロテアソーム活性化因子PI31欠損マウスを作成し、表現型に異常が生じている臓器について野生型マウスと遺伝子欠損マウスの臓器抽出液について、TMTラベルにより比較定量プロテオーム解析を行った。
- ② 出芽酵母を用いた遺伝学的解析の結果から、プロテアソーム機能低下時に何らかのタンパク質のリン酸化が細胞増殖抑制に重要であることを強く示唆する結果が得られたので、様々な遺伝子型の酵母株を用いて、リン酸化プロテオーム解析を実施した。
- ③ プロテアソーム機能低下時に何らかのタンパク質のO-GlcNAc修飾が細胞生存に重要な働きをすることを見いだしたので、培養細胞をビオチン化O-GlcNAcによりラベルした後、O-GlcNAc化タンパク質を精製し、O-GlcNAc化タンパク質の網羅的同定を試みた。

【2】研究成果

[2-1] 本共同研究で明らかになった研究成果

本共同利用により、以下の重要な発見を行うことが出来た。

- ① 雄性不妊を示すPI31欠損マウスの精子のプロテオーム解析を実施し、PI31が精子成熟に必要な因子の選択的分解を担っている可能性が示唆された（投稿準備中）。
- ② プロテアソーム機能低下時の細胞増殖抑制に特定のリン酸化タンパク質の蓄積が関与することを出芽酵母の遺伝学的解析により突き止め、リン酸化プロテオーム解析により当該因子の候補を絞り込むことに成功した。この情報に基づき現在遺伝学的検証を進めている。
- ③ プロテアソーム機能低下時にO-GlcNAc化が細胞保護的に働くことを突き止め、O-GlcNAc化プロテオーム解析を実施した。その結果、特定の分子のO-GlcNAc化がプロテアソーム機能低下時の細胞保護に重要であることを突き止め、現在成果を論文として投稿中である。

[2-2] 本共同研究による波及効果及び今後の発展性

従来の生化学的手法、すなわち既知タンパク質に対するwestern blotや共免疫沈降実験による相互作用タンパク質の同定では、基質選別機構の解明に至ることは困難であり、細胞内に存在する数千～1万にも及ぶタンパク質の中から特異的

な基質を同定するためには、高感度かつ網羅的・定量的な質量分析手法が不可欠である。本共同利用ではこのアプローチが極めて有効に働き、重要な発見を複数挙げる事が出来た。いずれの成果も細胞機能維持におけるタンパク質恒常性の維持のメカニズムの一端に迫るものであり、タンパク質恒常性の破綻による様々な疾患治療に将来貢献しうる知見を与えると考えている。

【3】主な発表論文等

[3-1] 論文発表

なし

[3-2] 学会発表

なし

[3-3] 成果資料等

なし

【4】今後の課題等

今後の課題、その他等

本研究成果を速やかに論文として公表すべく、投稿中あるいは投稿準備中である。PI31以外のプロテアソーム活性化因子やユビキチン受容体による基質選別機構の解析については、本年度は細胞やマウスの準備に終始したが、次年度以降本格的に解析可能な状況になりつつあり、本課題をさらに推進したい。