氏名	JEAN-RENE QUASSI ACQUAH
学位の種類	博　士（理学）
学位記番号	博　甲　第　7734　号
学位授与年月日	平成　28年　3月　25日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当
審査研究科	生命環境科学研究科
学位論文題目	Characterization of Proteasome Associated Proteins (プロテアソーム相互作用タンパク質の解析)
主査	筑波大学教授　博士（医学）　千葉　智樹
副査	筑波大学准教授　博士（理学）　桑山　秀一
副査	筑波大学准教授　理学博士　坂本　和一
副査	筑波大学准教授　博士（理学）　廣田　充

論　文　の　要　旨

様々な生命現象は選択的なタンパク質分解によって制御されている。この選択的タンパク質分解を担うのはプロテアソームと呼ばれる巨大な複合体型プロテアーゼである。プロテアソームは、タンパク質を分解する触媒ユニット（20S core particle）と、その活性を制御する制御ユニットからなり、触媒ユニットの両端に制御ユニットが結合することで活性を制御する。制御ユニットには、真核生物に広く保存されたPA700やPA200のほか、進化の過程で出現したPA28などが存在する。PA700はユビキチン化タンパク質を捕捉し、捕捉した基質をATP依存性にアンフォールディングする活性を持つ。PA200はDNA損傷剤によって誘導され、DNA損傷修復に機能することが報告されている。PA28αβヘテロ７量体は免疫刺激によって誘導され、MHCクラスIに抗原提示される抗原のプロセシングを促進する。このようにプロテアソームは、細胞の状況に応じて様々な制御ユニットがダイナミックに活性を制御している。これまでにPA28やPA200の各遺伝子欠損マウスが作製され、その生理機能が解析されてきたが、当初の予想に反していずれも重篤な異常を示さないことから、お互いに機能補償している可能性、さらには細胞の状況に応じて相互作用する未同定のプロテアソーム制御因子が存在する可能性が指摘されている。そこで、本研究では、既知のプロテアソーム制御因子の各遺伝子欠損マウスを用い、新たなプロテアソーム制御因子を同定することを目的とした。

プロテアソームを精製する従来の方法では、複数のカラムクロマトグラフィーを用いるため、その過程で幾つかの制御因子が解離してしまうことが判明している。そのため、出芽酵母を用いた解析では、プロテアソームサブユニットの一つであるRpn11にHTBTタグを融合させ、このタグをもとにプロテアソームをアフィニティ精製する手法が開発された。そこで本研究は上記アフィニティ精製法をマウスに応用し、マウスRpn11サブユニットにHTBTタグを融合した遺伝子を

発現するトランスジェニックマウスを用いた。このRpn11- HTBTトランスジェニックマウスを様々なプロテアソーム制御因子（PA28α、PA28β、PA28γ、PA200、Ecm29）の遺伝子欠損マウスと交配し、その各臓器からプロテアソームをアフィニティ精製した。精製量および比活性が最も高かったのは肝臓由来のプロテアソームであった。そのプロテアソームには、従来の条件では解離する制御因子も存在することが確認された。ついで様々なプロテアソーム活性化因子欠損肝から精製されたプロテアソームを比較した。その結果、異なる含有量を示すタンパク質バンドが複数観察された。それらを質量分析により解析した結果、その一つはタンパク質のフォールディングに関わる分子シャペロンHsp90であった。Hsp90は、野生型マウスに比べてEcm29欠損マウスから単離されたプロテアソームに、より多く結合しており、Ecm29の機能欠損を代償している可能性が考えられた。そこでプロテアソームに対するHsp90の機能を明らかにする目的でHsp90阻害剤GAの効果を野生型とEcm29欠損のプロテアソームで比較した。その結果、GA処理によって野生型マウス由来プロテアソームに変化は認められなかったが、Ecm29欠損肝由来プロテアソームでは部分的に解離することが判明した。すなわち、Hsp90はEcm29の代替としてプロテアソームの構造維持に関わることが明らかとなった。

GA処理は、細胞内タンパク質のフォールディング阻害、活性酸素種の発生などを誘導して細胞死を引き起こす。そこでEcm29欠損細胞のGA感受性を検討したところ、野生型に比べて耐性であることが判明した。最近、酸化ストレス条件下ではPA700と20S core particleの結合は解離することが明らかとなり、PA200やPA28がPA700の代償として異常タンパク質の分解に与ると考えられている。すなわちEcm29欠損細胞がGA処理に対して耐性であったのは、プロテアソーム制御因子の置換がより効率良かったためであると考えられる。

以上、本研究はプロテアソームの制御にHsp90が関わることを明らかにした。また本研究によって作出された遺伝子改変マウスは新たなプロテアソーム制御因子のさらなる発見と機能解析に有用である。

審　査　の　要　旨

本研究はプロテアソーム活性化因子の遺伝子改変マウスを用いて、新たなプロテアソーム制御因子を同定しようとしたものである。ACQUAH 氏は HTBT タグ精製によるプロテアソーム精製を哺乳動物個体で実施し、プロテアソーム相互作用因子を多数同定した。さらに相互作用タンパク質の一つである分子シャペロン Hsp90 が Ecm29 と協調的にプロテアソームの構造維持に機能することを見出した。これらの成果はサブユニットをダイナミックに変換する高等動物プロテアソームの分子機序を明らかにするものであり、その学術的価値は高い。また本研究によって作出された遺伝子改変マウスは高等動物プロテアソーム制御機構のさらなる全容解明に資するものである。

平成 28 年 2 月 1 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもとに論文の審査及び最終試験を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判定された。

よって、著者は博士（理学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものとして認める。