

タンパク質の核内品質管理の分子機構

片山 諭

目 的

生体内でタンパク質は外部環境ストレスのない状況でも翻訳段階のエラー等により恒常的に変質、失活していることが近年分かってきた。そのうち修復可能なものは修復され、そうでないものは分解へと導かれる。ここで、前者の反応は主にヒートショックシャペロン等により、また、後者はユビキチン-プロテアソーム系により触媒される。変性・失活後のタンパク質のユビキチン化においては今までのところ細胞質で働くものが多く報告され、遺伝情報発現の場である細胞核内の報告は今まで数例しかなく、いずれも生物種としてはパン酵母のものしかない (Gardner *et al.* 2005)。

今回、我々は分裂酵母を用いて、核内において、一種類のタンパク質が正常タンパク質と変質タンパク質とが混在した状況下で、両者を見極め、変質タンパク質のみを峻別し、分解へと導くユビキチンリガーゼ (タンパク質ユビキチン化酵素) の存在をサポートする予備的な結果を得た。本酵素が働くことによって、失活したタンパク質のみが速やかに分解され、正常で未変性のタンパク質が残る結果としてタンパク質の適正な品質が維持される (図1)。本課題はこの分子経路を解き明かすことにより、核内タンパク質の品質の維持・管理に関する分子機構の解明を目的とする。

方 法

細胞の核内でヒストン結合タンパク質の一つとして働く Asf1 は安定なタンパク質で生体内での寿命の目安となる半減期も8時間以上である。我々が Asf1 タンパク質の機能を探るために、PCR ランダム変異導入法を用いて構築した変異型の Asf1-30 タンパク質は細胞内で急速に分解され、その半減期は30分以下と非常に短い。本研究では頻繁に生化学的にタンパク質の細胞内寿命を測定するために、従来の煩雑なタンパク質抽出法を簡素化し、酵母細胞を 0.3M NaOH で10分間前処理したものをペレット化し、それを直接、SDS サンプルバッファー (4% SDS 含む) 中で煮沸したものを、SDS-PAGE ゲルに泳動するという簡便な方法を開発し (Matsuo *et al.* 2006)、それを主に用いて細胞内半減期の測定を行った。細胞内 (*in vivo*) におけるタンパク質ユビキチン化の検出は 6His-Ubiquitin 遺伝子をプラスミド上 (pREP41-6His-Ubi) で発

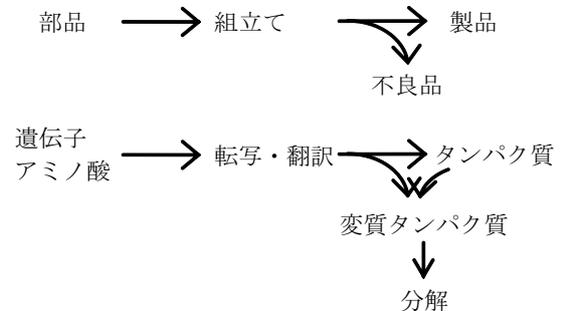


図1 タンパク質の品質管理

現させ、6M 塩酸グアニジンの変性条件化において Ni-NTA ビーズで精製したサンプルをウエスタンブロット法にて検出し、判定した。

細胞内におけるタンパク質局在の観察は、GFP 遺伝子タグもしくは 13myc, 3HA タグを用いた間接蛍光抗体法により行った。各遺伝子の破壊株の作成は PCR 法を駆使したダイレクト遺伝子破壊法により行った。

結果と考察

本申請課題では、核内タンパク質の品質管理の分子機構の解明に取り組んでいる。まず、培養温度での Asf1-30 変異型のタンパク質の細胞内半減期を野生型タンパク質のそれとを比較したところ、26度では半減期低下はそれほど顕著でもなかったが、36度では著しい半減期低下が見られた。この結果は、asf1-30 遺伝子がゲノム遺伝子上に1コピーしか存在しない状態でも、プラスミド上にクローン化したものを野生株に発現させた状態でも変わらなかった。これらの結果、とりわけ後者は野生型と変異型の Asf1 タンパク質が混在している状況でも変異型のみを識別し、分解する仕組みが存在していることを示唆している。

さらに変異型と野生型の Asf1 タンパク質の細胞内局在を間接蛍光抗体法、GFP タグ等を用いて調べたところ、野生型では殆どが核内に集中しているのに対し、変異型では核内にも存在が認められるものの、大部分は細胞質側に存在していることが明らかとなった。本結果は、変異型タンパク質が核内に運ばれるものの、そこで迅速に分解されているか、もしくは核内への移行が何らかの形で阻害されそこで分解されている可能性を示すものである。

本課題では核内のタンパク質の品質管理に係わるユビキチンリガーゼの単離を目指している。分裂酵母ではすでにゲノムプロジェクトが完了しており、ユビキチンリガーゼ遺伝子の総数は百以上と推定されているが、その大半は未解明である。定法どおりに（正）遺伝学的にリガーゼ遺伝子をスクリーニングする方法と、逆遺伝学的に予想される遺伝子の中から幾つかの候補を選び、その遺伝子を破壊してから検証することで目的とするリガーゼ遺伝子かどうかを判定する方法の二種類の手法によりリガーゼ遺伝子の取得を目指した。

ここまでのところ、（正）遺伝学的なスクリーニングにおいてはリガーゼ遺伝子の候補はまだ取得できていない。逆遺伝学的手法ではユビキチンリガーゼ遺伝子であると考えられる候補の遺伝子を破壊して、その細胞内でも Asf1 変異型のタンパク質の分解が起こるか否か、または、*in vivo* ユビキチン化が起こるかどうかで調べた。今までに核内ユビキチンリガーゼとして報告されている遺伝子 Ubr1, Ubr11 と Rhp18 の関与を調べたが、変異型 Asf1 の分解ならびにユビキチン化が観察された。さらに、核内と細胞質で多様な分解経路で機能すると考えられているユビキチンリガーゼ SCF 複合体についても調べたが、その活性が消失した細胞内でも Asf1 タンパク質の速やかな分解が観察されたことより、SCF も同様に関係ないことが明らかとなった。次に、Hrd1 と Doa10 遺伝子の関与について調べた。両者は当初 ER 付随の品質管理リガーゼ

（ERAD）として報告されていたが、最近、核内タンパク質の品質管理への関与も報告された。その結果、両者の遺伝子破壊細胞内においても、野生株と同様に変異型 Asf1 タンパク質の分解ならびにユビキチン化が観察された。

現在、以上とは異なる結果を示した遺伝子（#SPBC2A9.04c）について解析を進めている。予備的な結果ではあるが、本遺伝子の破壊細胞内では、変異型 Asf1 タンパク質の分解速度が顕著に低下していた（安定化していた）。さらには *in vivo* のユビキチン化アッセイにおいてもユビキチン化は認められていない。今後、本遺伝子が我々が探索している核内の品質管理リガーゼか否かを検証するために、種々の実験の実施が必要となるが、本遺伝子が分裂酵母の品質管理リガーゼである可能性は高く、パン酵母で得られた結果と統合させることにより、非常に意義深い分子機構に到達できる可能性がある課題であると考えられる。

引用文献

- Gardner, R.G., Nelson, Z.W., and Gottschling, D.E. (2005) Degradation-mediated protein quality control in the nucleus. *Cell*, 120: 803-815.
- Matsuo, Y., Asakawa, K., Toda, T. and Katayama, S. (2006) A rapid method for protein extraction from fission yeast. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 70: 1992-1994.