

# 博士論文審査報告書

論文題目：Studies on structure and function of the 20S proteasome

「20S プロテアソームの構造と機能に関する研究」

申請者：矢 部 公 彦

## 1. 論文内容の要旨

20S プロテアソーム (20S) は単独で機能すると同時に、26S プロテアソームはじめ、すべてのプロテアソームに共通して存在し、触媒機能を担う細胞内プロテアーゼ複合体である。20S は単独では立体構造を保持したタンパク質に対しては十分な分解活性を持たないと言われている。しかし、native 構造のまま、20S によって非常によく分解を受けるタンパク性の基質として SKLP (*Streptomyces* killer toxin-like protein, Mr9,000) が申請者の所属する生体物質化学 II 分野で見出されていた。一方、20S のインヒビターとしては、微生物由来の低分子化合物や合成トリペプチドのものが知られているが、タンパク性インヒビターは知られていない。そこで、様々な低分子量 (Mr1,400 – 7,850) のタンパク性インヒビターの 20S に対する阻害能を調べた結果、BPTI (Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor, Mr6,500) がよく阻害することを見出した。*in vitro* では、20S 1 モル当たり約 6 モルの BPTI が筒状構造の 20S の内部にある活性中心と結合して、20S の有する 3 種類のアミダーゼ活性をすべて強力に阻害することを明らかにした。また、BPTI によるプロテアソームの阻害は HEK293 細胞と BHK 細胞を用いた実験でも確認された。すなわち、 $\alpha_1$ -アンチトリプシンの null Hong Kong 型変異体 (以下 NHK) の ERAD (小胞体関連分解) が、NHK と共発現させた BPTI によって抑制された。これらの結果から、BPTI のようなタンパク性のプロテアーゼインヒビターが巨大な 20S 分子の小さな入り口から内部に入り込んで、その活性を阻害できることが明らかとなった。

次に、細胞内のプロテアソーム機能が 20S 分子のリン酸化/脱リン酸化によって制御されていることを新たに示した。20S の翻訳後修飾として、多くのサブユニットの N 末端アセチル化とセリン/トレオニン残基のリン酸化が知られている。リン酸化については、これまでに多数の報告があるが、プロテアソームの機能との関連性において詳細に研究した例はほとんどない。そこで、20S を脱リン酸化酵素阻害剤下で精製することで、最終の Poros-HQ クロマトグラフィーにおいて、リン酸化の程度の違いによる 3 種類のフォーム (20S-1, 20S-2, 20S-3 と命名) の純化 20S を得、これらの酵素化学的、タンパク質化学的な解析を行った。3 種類の合成ペプチド基質を用いて、これらの酵素活性を比較したところ、いずれの基質に対しても、より多くリン酸化された 20S-3 の活性が最も高いことが明らかとなった。さらに、20S-3 のサブユニットを HPLC で完全分離し、 $\alpha 4, \alpha 6, \alpha 7, \beta 2$  および  $\beta 3$  サブユニットについて、合計 13 箇所のリン酸化部位を同定した。このうち 11 箇所が新規のリン酸化部位であり、さらに、 $\beta 2$  サブユニット中の 3 箇所のチロシンリン酸化は、プロテアソームでは初めて同定されたものであった。また、20S の細胞内での機能とリン酸化について検討し

た結果、HEK293 細胞での NHK の 20S による ERAD が、チロシンプロテインキナーゼインヒビターによって濃度依存的に抑制されことから、細胞内での 20S の活性が、チロシンリン酸化によって調節されていることが示唆された。

## 2. 論文審査結果

本論文は、細胞内の多機能性プロテアーゼとして重要な役割を果たすプロテアソーム複合体に共通して存在し、その触媒機能を担う 20S プロテアソームの構造と機能に関して、主として、次の 2 点について明らかにしたものである。

まず、その特殊な立体構造のために、これまで全く知られていなかったタンパク性のプロテアソームインヒビターを探索し、セリンプロテアーゼインヒビターである BPTI がトレオニンプロテアーゼである 20S プロテアソームを阻害することを見出し、その阻害様式を詳細に解析した点である。もう一点は、本論文で新規の高リン酸化 20S プロテアソーム (20S-3) が精製され、その存在が明らかにされたことによって、これまでに精製され、研究されてきた 20S プロテアソームが精製過程で大半のサブユニットの多くのリン酸化部位が脱リン酸化された誘導体であることを示した点である。同時に、プロテアーゼとしての活性も、最もリン酸化の進んだフォームの 20S-3 が最も強いことを示し、さらに、培養細胞を用いた実験によって、細胞内プロテアソームの活性がチロシンキナーゼインヒビターによって抑制されることを示すことで、プロテアソーム機能におけるリン酸化の重要性を明らかにした。これらの 20S プロテアソームに関する新しい知見は、今後の本プロテアーゼの機能制御に関する研究の発展に大いに貢献するものであると考えられる。

よって、本論文は博士（理学）の学位論文として価値のあるものと認める。

また、平成 21 年 1 月 29 日、論文内容およびこれに関連する事項について試問を行った結果、合格と判定した。

主査：小 出 武 比 古 印

副査：樋 口 芳 樹 印

：阪 口 雅 郎 印

：小 谷 昌 司 印 （新潟大学理学部、教授）