

学位論文題名

Scythe/BAG6のユビキチン依存的
タンパク質分解における新規機能の解明

学位論文内容の要旨

Scythe/BAG6はN末端にユビキチンと相同性の高い領域、UBL (ubiquitin-like)ドメインを有するユビキチン様タンパク質であり、またC末端にBAGドメインを有するBAGファミリータンパク質である。本研究を開始した当初、Scythe/BAG6の機能については、アポトーシス誘導因子Reaperとの関係、Hsc70のシャペロン活性の調節が明らかとなっているのみであった。近年ようやくp53のアセチル化制御、小胞体ストレス誘導性アポトーシス制御、分泌によるNK細胞の活性化など、種々の機能が明らかとなり始めた。しかし、ユビキチン様タンパク質であるにも関わらず、ユビキチン-プロテアソームシステム(以下UPS)における機能はこれまで明らかとなっていない。そこで私は、UPSとの関連という観点から一連のScythe/BAG6の機能解析を展開した。なおScytheはアフリカツメガエル*Xenopus*における名称、BAG6はその哺乳類ホモログである。本論文は3章で構成されており、第1章では*Xenopus*胚を用いたScytheの機能解析の結果について、第2章ではBAG6のUPSにおける機能解析の結果について、第3章ではBAG6のユビキチン陽性凝集体(主にポリグルタミンタンパク質による凝集体)形成における機能解析の結果について報告する。

第1章 *Xenopus*におけるScytheの機能解析

Scytheはほとんど機能未知であったため、手掛かりを得るべくまずMALDI-TOF MSを用いて結合タンパク質の探索を行った。その結果、8種の新規Scythe/BAG6結合タンパク質を同定した。同定したScythe/BAG6結合タンパク質のうち、アポトーシスとの関係が報告されていたXEF1AOという分子に着目しScytheとの機能的関連を解析した。その結果、XEF1AOは*Xenopus*胚にてcaspase3/7の活性化と発生異常を引き起こし、これらcaspase3/7活性化と発生異常は共にScythe共発現により抑制されることを見出した。さらにScythe共発現により抑制される分子機構として、ScytheがXEF1AOのユビキチン化を促進すること、またXEF1AOのUPSによる分解にはScytheが必要であることを見出した。これらの結果は、*Xenopus*胚において、ScytheがXEF1AOのUPS依存的分解を制御することを示唆している。そこでScytheのUPSにおける機能を、より普遍的な系で理解を深めるべく、以下、哺乳類培養細胞を用いてBAG6の機能解析を行った。

第2章 UPSにおけるBAG6の機能解析

HeLa細胞をプロテアソーム阻害剤MG132処理した際、その抽出液中で、BAG6はプロテアソー

ム、ユビキチン化タンパク質と効率よく相互作用していることを見出した。また BAG6 自身はユビキチン化修飾を受けず、さらに、BAG6 と相互作用したユビキチン化タンパク質は、MG132 を除去することで消失することを明らかにした。酵母ユビキチン様タンパク質 Rad23 や Dsk2 は、プロテアソームとユビキチン化基質と相互作用し、基質をプロテアソームヘリクルートする因子として機能すると報告されている。ここまでの結果より私は、BAG6 も同様にリクルート機能を有しているのではないかと考えた。そうであるならば、免疫共沈させた BAG6・ユビキチン化タンパク質・プロテアソームの 3 者複合体形成がユビキチン化タンパク質の分解をサポートするはずであり、この可能性を検証すべく、UPS のモデル基質である EGFP-CL1 を用いて、*in vitro* 分解システムを構築し実験を行った。その結果、3 者複合体の検出と共に EGFP-CL1 の分解が検出されたため、BAG6 がユビキチン化タンパク質をプロテアソームヘリクルートする機能を持つことが示唆された。

Rad23 や Dsk2 と異なり、BAG6 は直接ユビキチン鎖を認識しない。そこで BAG6 とユビキチン化タンパク質の間に介在するタンパク質、BAG6 とユビキチン鎖両方に直接結合するタンパク質が存在するのではないかと考え、探索を行った。種々のタンパク質について検討したところ、BAG6 は ubiquilin (UBQLN)1, 2, 4 と直接結合することが明らかとなった。UBQLN1, 2, 4 はユビキチン鎖と直接結合するため、BAG6 がこれら UBQLN・ユビキチン鎖と 3 者複合体を形成し得るか検討したところ、UBQLN1 について複合体を形成し得ることが明らかとなった。これらの結果より、BAG6 は UBQLN1 を介してユビキチン化タンパク質と相互作用し得ることが明らかとなった。

次に BAG6 がリクルートするターゲットの探索を行っていたところ、BAG6 と相互作用するユビキチン化タンパク質が、翻訳阻害剤であるシクロヘキシミド処理によって著しく減少することを見出した。このことより BAG6 の主なターゲットは UPS で分解されるもののうち、翻訳後速やかに分解されるものであることが示唆される。これらは特に RDP (Rapidly degraded polypeptides) と呼ばれ、その分解ペプチドは MHC class I と複合体を形成し細胞表面に提示される。RDP 産生を増加させる翻訳阻害剤の puromycin を用いた実験の結果、BAG6 が RDP と相互作用すること、及び BAG6 が RDP の代謝に関与することを見出した。また BAG6 ノックダウンにより細胞表面 MHC class I 量が減少したことから、BAG6 がリクルートするターゲットの一つが RDP であることが示唆された。さらに BAG6 は、免疫プロテアソームと相互作用した。免疫プロテアソームは、効率よく抗原ペプチドを産生するタイプのプロテアソームであり、ウイルス感染時等に産生される IFN γ 刺激により誘導される。ウイルスタンパク質は長寿命なものが多く、ウイルス抗原の迅速な提示には RDP が不可欠である。以上の結果より、BAG6 が、ウイルス感染時にウイルスタンパク質 RDP を免疫プロテアソームヘリクルートすることで、免疫応答に関与していることが考えられる。

第 3 章 ユビキチン陽性凝集体形成における BAG6 の機能解析 (主にポリグルタミンタンパク質による凝集体形成について)

ユビキチン陽性の凝集体は、神経変性疾患など種々の病態とも直結する重要な表現系である。私は本研究で、BAG6 がアグリソーム、ALIS、ポリグルタミンタンパク質による凝集体 (以下 polyQ 凝集体) など種々のユビキチン陽性凝集体と共局在することを見出した。このうち polyQ 凝集体形成における BAG6 の機能を解析したところ、BAG6 が polyQ 凝集体形成及び polyQ 凝集体による細胞死を抑制することを見出した。またこの polyQ 凝集体形成抑制作用には BAG6 の BAG ドメイン

が必要であることを見出した。より詳細な解析を行った結果、第 1 章で新規に同定した Scythe/BAG6 結合タンパク質のうち、Gdx という分子が BAG ドメインに直接結合すること、さらに Gdx が polyQ 凝集体形成を抑制することを明らかにした。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 木 原 章 雄
副 査 教 授 鈴 木 利 治
副 査 准教授 山 本 融
副 査 教 授 川 原 裕 之

学位論文題名

Scythe/BAG6のユビキチン依存的 タンパク質分解における新規機能の解明

Scythe/BAG6 は N 末端にユビキチンと相同性の高い領域、UBL (ubiquitin-like)ドメインを有するユビキチン様タンパク質であり、また C 末端に BAG ドメインを有する BAG ファミリータンパク質である。申請者が本研究を開始した当初、Scythe/BAG6 の機能については、Reaper タンパク質が誘導するアポトーシスの制御、及び Hsc70 のシャペロン活性の調節が明らかとなっているのみであった。昨年来ようやく小胞体ストレス誘導性アポトーシスの制御や、分泌による NK 細胞の活性化など、種々の機能が明らかとなり始めた。しかしユビキチン様タンパク質であるにも関わらず、ユビキチン-プロテアソームシステム (以下 UPS) における機能はこれまで明らかとなっていない。そこで申請者は、UPS との関連という観点から一連の Scythe/BAG6 の機能解析を展開した。なお Scythe はアフリカツメガエル *Xenopus* における名称、BAG6 はその哺乳類ホモログである。

Scythe はほとんど機能未知であったため、手掛かりを得るべくまず MALDI-TOF MS を用いて結合タンパク質の探索を行い、8 種の新規 Scythe/BAG6 結合タンパク質を同定することに成功した。同定した Scythe/BAG6 結合タンパク質のうち、アポトーシスとの関係が報告されていた XEF1AO という分子に申請者は着目し Scythe との機能的関連を解析した。その結果 Scythe が、XEF1AO 過剰発現によるアポトーシス及び発生異常を抑制することを見出した。さらにその分子機構として、Scythe が XEF1AO の UPS による分解を制御することを見出した。この解析により、Scythe が UPS において機能していることが初めて明らかになった。そこで Scythe の UPS における機能をより普遍的な系で理解を深めるべく、以下、哺乳類培養細胞を用いて BAG6 の機能解析を行った。

HeLa 細胞をプロテアソーム阻害剤 MG132 で処理した際、その抽出液中で BAG6 はプロテアソーム、ユビキチン化タンパク質と効率よく相互作用していることを見出した。また BAG6 自身はユビキチン化修飾を受けず、BAG6 と相互作用したユビキチン化タンパク質は MG132 を除去することで消失することを明らかにした。これらの結果から、BAG6 が基質をプロテアソームへリクルートする因子として機能している可能性が示唆された。そこでこの仮説を検証すべく申請者は *semi vitro degradation assay* を独自に開発し、BAG6 がリクルートタンパク質であることを示した。さらに、BAG6 と相互作用するユビキチン化タンパク質が、翻訳阻害剤であるシクロヘキシミド処理によって著しく減少することを見出した。この結果より BAG6 の主なターゲットは、UPS で分解されるもののうち翻訳後速やかに分解される RDP (Rapidly degraded polypeptides) であることが示唆された。そこで RDP 産生を増加させる翻訳阻害剤 puromycin を用いた実験を行った結果、BAG6 が RDP と相互作用すること、及び BAG6 が RDP の代謝に関与することを見出した。これらの結果より、BAG6 がリクルートするターゲットの一つが RDP であることが明らかとなった。

ユビキチン陽性凝集体は、神経変性疾患など種々の病態とも直結する重要な表現系である。申請者は BAG6 が、アグリソーム、ALIS、ポリグルタミンタンパク質による凝集体 (以下 polyQ 凝集体) など種々のユビキチン陽性凝集体と共局在することを見出した。これらのうち polyQ 凝集体形成における BAG6 の機能を解析したところ、BAG6 が polyQ 凝集体形成及び polyQ 凝集体による細胞死を抑制することを見出した。またこの polyQ 凝集体形成抑制作用には BAG6 の BAG ドメインが必要であることを見出した。さらに詳細な解析を行った結果、新規に同定した Scythe/BAG6 結合タンパク質のうち、Gdx という分子が BAG ドメインに直接結合すること、また Gdx が polyQ 凝集体形成を抑制することを明らかにした。これらの結果より、BAG6 の生理学的機能の一端が、その分子メカニズムと共に示された。

以上、本論文はほとんど機能未知であった Scythe/BAG6 というタンパク質が、ユビキチン依存的タンパク質分解に関与していることを様々な手法を用いて詳細に解析し、分子レベルで明らかにしている点で優れている。また、BAG6 は病態と関連する polyQ 凝集体形成に抑制作用があることを見出し、今後の医薬応用の可能性も示した。よって、申請者は博士 (薬学) の学位を受領するのに十分な資質を有するものであることを認めた。