

# 細胞分化・老化におけるプロテアソームの機能に関する研究

研究代表者 新井 大祐  
(理工学術院総合研究所 次席研究員 (研究院講師))

## 1. 研究課題

プロテアソームは分子量 250 万という巨大かつ極めて精緻な酵素複合体である。その役割はユビキチン化タンパク質の分解、すなわち単なる「ゴミ箱」だと見なされてきた。しかし最近では、プロテアソーム自身が能動的な制御系であり、状況に応じてサブユニットやアクセサリ分子を使い分けることでタンパク質分解をコントロールしているという新たな考えが生まれつつある。ES 細胞や iPS 細胞はプロテアソーム活性が高いレベルで保たれており、分化に伴い低下することから、各分化段階における重要な役割が予想されるが、具体的な知見はほとんど得られていない。また、プロテアソームは加齢に伴う変性タンパク質の蓄積を防いでおり、プロテアソームの機能低下は神経変性疾患の発症を促すことがわかっている。よって、たとえばプロテアソームを活性化させる食品成分はアンチエイジング作用をもたらすことが期待されている。

本研究はプロテアソームの幹細胞における挙動や機能の解明、またプロテアソームの活性制御成分を探索するための評価系構築を目的とする。

## 2. 主な研究成果

### 2.1 プロテアソーム可視化・精製のためのノックイン ES 細胞の開発

プロテアソームに恒常的に含まれている必須サブユニットタンパク質の一つを選び、C 末端に可視化用の EGFP タグと精製用の FLAG タグを導入することを試みた。CRISPR-Cas9 技術を利用し、マウス ES 細胞のゲノム上にあるサブユニットの遺伝子にタグをコードする塩基配列をノックインで導入した。得られた細胞の EGFP 局在を共焦点顕微鏡で観察したところ、プロテアソームと同様の局在が認められた。ウェスタンブロッティング解析の結果より、この細胞が発現する全てのプロテアソームに EGFP-FLAG タグが導入されており、プロテアソームをバイアスなく精製できると考えられた。

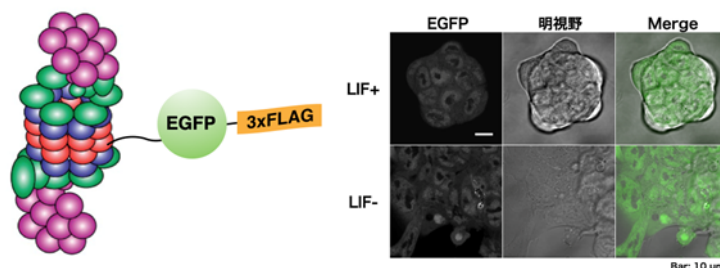


Fig.1 EGFP-FLAG プロテアソーム発現 ES 細胞

## 2.2 プロテアソーム活性亢進物質を探索するための評価系構築

蛍光タンパク質にプロテアソームの標的となる分解ドメインを融合したセンサータンパク質は、細胞内でプロテアソーム活性に依存して速やかに分解されるため、センサーが発する蛍光強度を観察することにより生細胞中のプロテアソーム活性をモニターできる。汎用されている分解ドメイン配列を EGFP に融合したセンサータンパク質をマウス ES 細胞に発現させたところ、予想に反し蛍光がほとんど検出されなかった。これはプロテアソームによる分解が早すぎるために、細胞内に検出可能な量のセンサータンパク質が蓄積していないことが原因だと考えられた。そこで分解ドメイン配列に種々の変異を導入して比較したところ、従来型よりもプロテアソームによる分解の速度が遅いセンサータンパク質が得られた。この改良型センサータンパク質を恒常的に発現するマウス ES 細胞を樹立したところ、未処理の状態でも検出可能なレベルの EGFP 蛍光を発していた。この細胞を用いることで、EGFP 蛍光の減少、すなわち生細胞中におけるプロテアソーム活性の亢進を捉えることが可能になった。

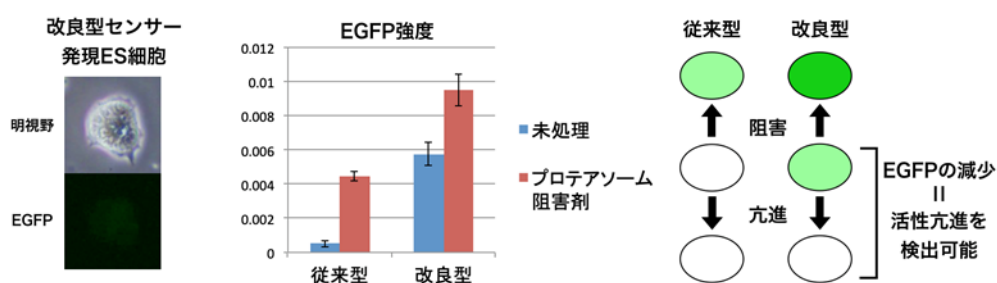


Fig.2 改良型プロテアソーム活性センサー細胞

## 3. 共同研究者

中尾 洋一 (先進理工学部・化学・生命化学科・教授)

## 4. 研究業績

### 4.1 学術論文

Machida, K., Arai D., Katsumata, R., Otsuka, S., Yamashita, JK., Ye, T., Tang, S., Fusetani, N., Nakao, Y. (2018) Sameuramide A, a new cyclic depsipeptide isolated from an ascidian of the family Didemnidae. *Bioorg. Med. Chem.* 26, 3852-3857.

Nakamura, F., Maejima, H., Kawamura, M., Arai D., Okino, T., Zhao, M., Ye, T., Lee, J., Chang, YT., Fusetani, N., Nakao, Y. (2018) Kakeromamide A, a new cyclic pentapeptide inducing astrocyte differentiation isolated from the marine cyanobacterium *Moorea bouillonii*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 28, 2206-2209.

### 4.2 総説・著書

### 4.3 招待講演

“Search and mechanism study of food ingredients affecting histone modifications” Health Promotion through Food Science, Chrono-nutrition and Sports Science-From basic to

applied research-, Singapore, Oct 2018.

#### 4.4 受賞・表彰

#### 4.5 学会および社会的活動

### 5. 研究活動の課題と展望

分化研究、老化研究のそれぞれに必要な細胞株の作製が完了したので、今後はこれらを用いて研究を展開していく。異なる分化段階の細胞よりプロテアソームを精製し、プロテオミクス解析により構成因子を決定、特異的なサブユニットやアクセサリ分子について機能解析を行う。また、センサー発現細胞を用いてスクリーニングを行い、プロテアソーム活性亢進物質を探索する。