

26S プロテアソームの分子多様性とその意義

川原 裕之

Structures and Functions of the 26S Proteasome Rpn10 Family

Hiroyuki KAWAHARA

Department of Biochemistry, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University,
Kita-12 Nishi-6, Kita-ku, Sapporo 060-0812, Japan

(Received June 3, 2002)

The ubiquitin-dependent proteolytic pathway is thought to be one of the vital systems for cellular regulations, including control of the cell cycle, differentiation and apoptosis. In this pathway, poly-ubiquitinated proteins are selectively degraded by the 26S proteasome, a multisubunit proteolytic machinery. Recognition of the poly-ubiquitin chain by the 26S proteasome should be a key step leading to the selective degradation of target proteins, and the Rpn10 subunit of the 26S proteasome has been shown to preferentially bind the poly-ubiquitin chain *in vitro*. We previously reported that the mouse Rpn10 mRNA family is generated from a single gene by developmentally regulated, alternative splicing. To determine whether such alternative splicing mechanisms occur in organisms other than the mouse, we searched for Rpn10 isoforms in various species. Here we summarize the gene organization of the Rpn10 in lower species and provide evidence that the competence for generating all distinct forms of Rpn10 alternative splicing has expanded through evolution. Some of the Rpn10 family genes were found to be expressed in distinct developmental stages, suggesting that they have distinct functions during embryogenesis. For example, Rpn10c and Rpn10e were exclusively expressed at specific developmental stages and in specific tissues, while Rpn10a was expressed constitutively. Our experimental results indicate that the respective Rpn10 proteins possess distinct roles in the progression of development. Furthermore, some of the Rpn10 variants specifically interacted with important developmental regulators.

Key words—ubiquitin; proteasome; Rpn10; alternative splicing

はじめに

細胞内蛋白質の多くは短寿命であり、その機能は合成と分解の量的調節の上に成立している。プロテアソームは、主としてユビキチン化された標的タンパク質を選択的に分解する ATP 依存性プロテアーゼであり、真核生物におけるエネルギー依存的なタンパク質分解システムの主役を演じている。最近、ユビキチン経路による時間、空間特異的な蛋白質分解が細胞増殖や細胞死、分化などの生命現象に密接に関与していることが報告されつつあり、ユビキチン依存性の翻訳後調節は細胞機能制御の新しいパラダイムを確立しつつある。本稿ではプロテアソーム

を中心、最近の知見を紹介したい。

ユビキチンシステム

ユビキチンは、一群の活性化酵素カスケード（ユビキチンシステム）の作用によって、標的タンパク質の特定のリジン残基の ϵ -アミノ基にイソペプチド結合する。このユビキチン分子の 48 番リジン残基に別のユビキチンが C 末端グリシンを介してイソペプチド結合し、さらに、この過程が繰り返されて枝状のマルチユビキチン鎖が形成される。生じたマルチユビキチン鎖は分解シグナルとなって 26S プロテアソームに捕捉され、分解反応が進行する。¹⁾

ユビキチンは基質タンパク質に結合する前に ATP のエネルギーを使って活性化されなければならない。この過程を触媒するユビキチン活性化酵素 E1 は、ユビキチンと高エネルギー性チオエステル結合を介して結合した後、活性化状態のユビキチンをユビキチン結合酵素 E2 に転移する。E2 はファ

北海道大学大学院薬学研究科・生体分子薬学専攻・細胞分子薬学講座・生化学分野 (〒060-0812 札幌市北区北 12 条西 6 丁目)

e-mail: kawahara@pharm.hokudai.ac.jp

*本総説は、平成 13 年度日本薬学会北海道支部学術奨励賞の受賞を記念して記述したものである。

ミリーを形成しており，出芽酵母では少なくとも13個の遺伝子が，高等動物ではさらに多くの分子種が存在すると推測されている.¹⁾ E2の多くは多種類のユビキチンリガーゼ E3 (次項参照) と様々の組合せで相互作用する．結果として，基質認識レベルでの高度な特異性がユビキチン化反応において発揮される．

ユビキチンは熱ショックタンパク質の1つであり，ストレス時に多量に合成される．これはストレス時などに生じる異常タンパク質 (正常な折りたたみや分子集合がうまくいかなかったもの) を急速に除去するための生体の合理的な反応の1つと考えられている．さらに，ユビキチンは小胞体や細胞質におけるタンパク質の品質管理機構にも関与している．このように，ユビキチンシステムは，ストレスや変異により生じた異常タンパク質，あるいは正常な短寿命タンパク質の特異的分解において，破壊されるべき基質タンパク質を選択的に認識・提示する役割を担っていると考えられ，細胞の恒常性維持に中心的な役割を果たしている．

ユビキチンリガーゼ E3

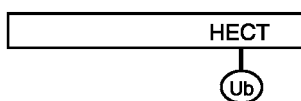
ユビキチンリガーゼ E3 は，E1, E2 カスケードと基質タンパク質とを仲介し，基質選別を含むユビキチン付加の最終段階に関与する分子と定義できる．

現在，E3の分子多様性が注目されているが，それらを，ユビキチンと共有結合を介して結合できるか，あるいは，できないかによって，大きく2種類 (HECT型とRING型) に分類できる (Fig. 1)．

HECT型ユビキチンリガーゼ (Fig. 1A) は，E2から受け取ったユビキチンをチオエステル結合を介して結合し，基質タンパク質に直接ユビキチンを転移する．その例として，癌抑制遺伝子産物 p53 のユビキチン化にかかわる E6-AP が初めて見いだされた.²⁾ E6-AP ではユビキチンとチオエステル結合する活性システイン残基が C 末端領域に存在するが，この C 末端領域は，他のタンパク質にも保存されていることから，HECT (homologous to E6-AP carboxyl terminus) ドメインと命名された．HECT ドメインを有する E3 として，E6-AP の他に，Rsp5, Nedd4, Tom1, Smurf1 などがあげられる．

一方，RING型ユビキチンリガーゼ (Fig. 1B) は，ユビキチンとは直接結合せず，ユビキチンを結合した特異的な E2 をリクルートし，かつ，ユビキチン化されるべき基質タンパク質を特異的に結合する．SCF (Skp1-CUL1 (Cdc53)-F-box protein) 複合体，APC/C (anaphase promoting complex/cyclosome)，VCB-CUL2 複合体 (von Hippel-Lindau 病の原因遺伝子産物 VHL，エロンガン C/B, CUL2

(A) HECT-type ubiquitin ligase



(B) RING-type ubiquitin ligase

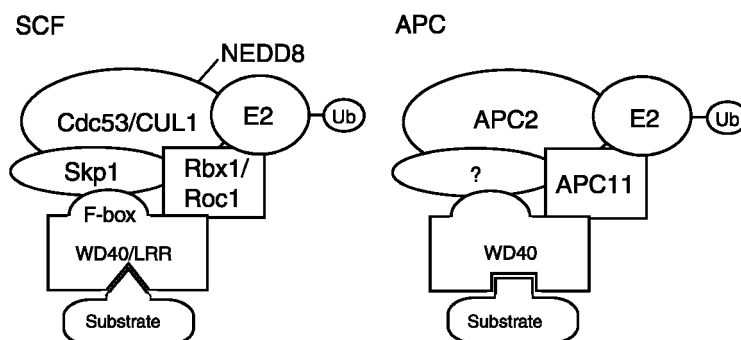


Fig. 1. E3 Ubiquitin Ligase

(A) HECT-type ubiquitin ligase, (B) RING-type ubiquitin ligase (SCF, APC). Ub: Ubiquitin.

を含む複合体), 及び Cbl が代表例である.

SCF の場合, Cdc53/CUL1 (あるいは Rbx1/Roc1; 下記参照) が E2 と結合することでユビキチンをリクルートし, F-box を有するサブユニットはリン酸化された基質タンパク質を認識することで SCF の基質特異性を決定する.³⁾ 基質タンパク質の識別にかかわる F-box タンパク質には数百にのぼる分子種が存在することから, それぞれ基質特異性が異なる多種類の SCF 複合体が機能していると考えられる. すなわち, SCF は, 基質タンパク質に対応して自在に F-box タンパク質を換え, 基質識別の多様性を獲得している. 一方, 10 種類以上のサブユニットからなる APC/C は, M 期の進行を司る多数の制御因子群の安定性を規定する E3 として知られており, 染色体分離チェックポイントに中心的な役割を果たす.⁴⁾ APC/C では, 細胞周期の時期特異的なアダプター因子の可逆的結合やリン酸化—脱リン酸化を介して, 基質特異性やユビキチン化活性が調節されている.

独立に見い出された SCF と APC のサブユニット構成には共通点が認められ, かつ, 前者の Cdc53/CUL1 と後者の APC2, 及び前者の Rbx1/Roc1 と後者の APC11 とにそれぞれ相同性が見い出された.⁵⁾ そして, Rbx1/Roc1 と APC11 の分子内には RING-フィンガーと名づけられた共通のドメイン構造が存在する. このドメイン構造を有するパーキン (パーキンソン病の原因遺伝子産物), Mdm2 (p53 のユビキチン化に関与), Siah-1 (眼形成に関与), BRCA1 (乳癌の原因遺伝子産物), あるいは c-Cbl (レセプターチロシンキナーゼのユビキチン化に関与) も E3 であることが最近明らかにされた.⁶⁾ すなわち, RING-フィンガー含有サブユニットを共通に有する SCF 型, APC 型, さらに構成の非常に類似した VCB-CUL2 型や, 複合体を形成しないと考えられている Cbl 型をまとめて, RING 型ユビキチンリガーゼと提唱されている. 最近, RING-フィンガーに類似した U-Box を有する一群の蛋白質が見い出された. U-Box 蛋白質の多くには tetratricopeptide repeat (TPR) ドメインという分子シャペロンとの相互作用に使われるモチーフが存在し, 実際, これらは hsp70 などの熱ショック蛋白質と共同して細胞内の異常蛋白質をユビキチン化する. すなわち, U-Box 蛋白質は新しいタイプ

の E3 ファミリーと考えることができる.^{7,8)}

26S プロテアソームシステム

26S プロテアソームは, ポリユビキチン化された基質タンパク質の分解を担う巨大プロテアーゼ複合体であり, 20S プロテアソームの両端 (あるいは片側) に制御サブユニット複合体 (PA700) が会合した特徴的な分子構造を持つ (Fig. 2).⁹⁻¹³⁾ 26S プロテアソームは総数 30 種類をこえるサブユニット群から構成されているが, そのサブユニットの多くは酵母からヒトまで構造, 機能両面で良く保存されており, 真核生物の細胞機能に普遍的な役割を有しているものと推定される.

プロテアーゼとしての触媒活性部位を有する 20S プロテアソームに対して,¹⁴⁾ PA700 複合体は 6 種の ATPase サブユニットなどからなる Base 複合体と, non-ATPase サブユニット群からなる Lid 複合体の 2 つのサブコンプレックスから構成されている (Fig. 2).¹⁵⁾ ATPase サブユニット群は, 26S 複合体のアッセムブリ, 基質タンパク質を分解する際のエネルギー供給, 基質立体構造の巻き戻し, 基質認識などの過程などに関与するものと推測され, 6 種すべてが酵母の生存, 増殖に必須であることが明らか

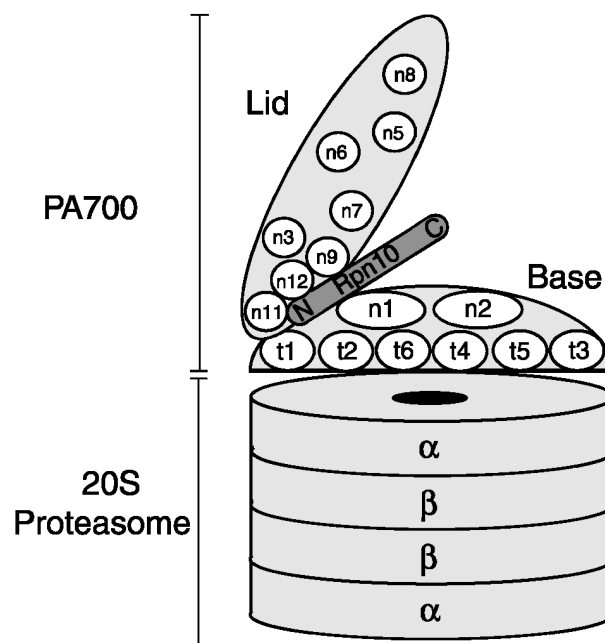


Fig. 2. Structural Model of 26S Proteasome

26S proteasome consists of catalytic 20S proteasome and PA700 regulatory complexes. PA700 can be further sub-divided to Base and Lid components. Base contains six ATPases and two non-ATPase subunits, while Lid is made up from numerous non-ATPase subunits. Base and Lid are thought to be linked by N terminus region of Rpn10 subunit.

にされているが、各々の機能的分担は不明である。Non-ATPase サブユニットも現在その多くは機能不明であるが、ポリユビキチン鎖を特異的に認識するサブユニット（詳細は後述）などいくつかの興味深い機能がこれらのサブユニットには見つまっている。最近、種々のユビキチン結合酵素群、脱ユビキチン化酵素、ユビキチン様蛋白質、転写、細胞周期関連蛋白質などが、Base, Lid 両複合体を構成するプロテアソームサブユニットに直接会合することを示す報告が相次いでおり、これらとプロテアソームとの適切なカップリングが基質分解の過程で極めて重要である可能性が指摘されている。

受精卵細胞分裂の進行とプロテアソーム

多くの卵細胞は、受精あるいはカルシウムイオンフォア刺激によって停止していた減数分裂を再開し、分裂中期から分裂後期へと移行する。筆者らは、海産無脊椎動物ホヤの減数分裂過程をM期脱出のモデル系と考え、プロテアソームの挙動の生化学的解析を行った結果、プロテアソームの局在とキモトリプシン様活性は減数分裂再開と前後して一過的に変動することを明らかにした。¹⁶⁻¹⁸⁾ このことは染色体分離に前後してプロテアソームの活性変動が起きていることをも意味している。この過程においては細胞内の全プロテアソーム量には全く変化がないことから、この活性変化は細胞内プロテアソームの質的变化を伴っていると考えられ、また、ウエスタンブロット解析の結果からプロテアソームの活性変動は主に 20S プロテアソームと PA700 との複合体形成のレベルで調節されている可能性が示された。

プロテアソームの活性変動は、受精卵の活性化時のみならず、卵成熟（減数分裂）の進行などの過程においても認められる。^{19,20)} 最近、千葉らは単一細胞内のプロテアソームの活性を直接測定する方法を開発し、²¹⁾ この方法を用いてヒトデ卵の卵成熟、あるいはウニ卵の受精の過程でのプロテアソーム活性を調べた結果、減数分裂の再開に伴ってプロテアソームの活性が3倍から10倍もの大きな変動を示すことを報告した。さらに沢田らも 26S プロテアソームの活性と分子状態がホルモンによるヒトデ卵減数分裂の過程で大きく変動することを見出した。²²⁾ これらの結果は、プロテアソームの活性は細胞内で実際にモデュレーションされ得ることを示し

ている。

プロテアソームと細胞分裂 M 期の開始

ユビキチン-プロテアソームを介した経路が、B型サイクリンや染色体対合に関するタンパク質の分解を始めとする M 期終了の過程で重要な役割を果たしていることは今日良く知られている。また、G1 期から S 期への移行にも種々の G1 サイクリンや CDK インヒビターの分解が必須であることも明らかになってきた。一方、G2 期から M 期への移行にプロテオリシスが必要であるか否かに関しては、従来非常に不明確であった。

筆者らは、ウニ、あるいはホヤ受精卵の卵割周期において 26S プロテアソームの活性が核膜崩壊直前に一過的に上昇することを見出し、プロテアソームが分裂期からの脱出の過程のみでなく、分裂期の開始にも関与しているのではないかと提案した。²³⁾ このことを実証するために、筆者らはプロテアソーム阻害剤を用いてプロテアソーム活性を阻害した場合の M 期開始に対する影響をウニ卵を用いて解析した。その結果、強力なプロテアソーム阻害剤である MG115 (Z-Leu-Leu-nVal-H) は M 期開始を濃度依存的に阻害したが、弱い阻害作用しか示さない MG101 (Ac-Leu-Leu-nLeu-H) では高濃度においてもごくわずかな遅れが観察されるのみであり、プロテアソームに対して阻害作用を示さない Ac-Leu-Leu-Met-H (LLM) や Ac-Leu-Leu-Arg-H (LLR) ではいずれの濃度でも阻害作用を示さなかった。²⁴⁾ 以上の結果は、プロテアソームが M 期の開始に重要な役割をしていることを示唆している。

それではプロテアソーム阻害剤はどのような機構で核膜崩壊を抑制しているのだろうか？ M 期への移行におけるキーエンザイムは M 期促進因子 MPF (cdc2 キナーゼとサイクリン B との複合体) であり、その活性の制御が M 期開始を決定している。用いたペプチド性阻害剤の中で、MG115 のみが cdc2 キナーゼの活性化を抑制し、MG101, LLM, LLR ではコントロールに比べて有意な阻害効果が認められない。また、cdc2 キナーゼのチロシンリン酸化状態を解析した結果、コントロールでは受精後 80 分での核膜崩壊に伴って急速な脱リン酸化が観察されるのに対して、MG115 処理卵では cdc2 キナーゼの脱リン酸化は認められず、cdc2 キナーゼは不活性化状態に保たれていることが明らかになっ

た. このことは, プロテアソームは *cdc2* キナーゼの脱リン酸化の過程に重要な役割を有していることを示唆しており, M 期開始時において *cdc2* キナーゼの活性調節に重要な役割を果たしていること, また何らかの *cdc2* 活性化阻害因子が M 期に入る前にプロテアソームにより分解される必要があることが筆者らの研究から明らかになった.²⁴⁾

ポリユビキチン鎖認識サブユニット Rpn10

一般に 26S プロテアソームはモノユビキチン化蛋白質は分解せず, ポリユビキチン (テトラマー以上のポリユビキチン鎖) が付加された基質蛋白質を選択的に認識して分解する. Deveraux らはアイソトープラベルしたポリユビキチン化蛋白質をプローブに, PA700 サブユニットをファーウエスタン法により結合解析した結果, Rpn10 (別名 S5a, Sun1, Mcb1, Mbp1) をポリユビキチン結合サブユニットとして見い出した.²⁵⁾ Rpn10 は N 端側, C 端側にそれぞれ種間で高度に保存された配列を有するが, N 端側保存領域は Base と Lid 両複合体を結び付ける役割を果たすと考えられており, Rpn10 の欠失変異酵母では Base と Lid が容易に解離する.¹⁵⁾ 一方, C 端側には *in vitro* でポリユビキチン鎖を特異的に認識し結合するポリユビキチン結合領域が存在している (次項).

Young ら²⁶⁾ は, Rpn10 サブユニットの欠失変異株を作成してポリユビキチン鎖結合ドメインについて詳細に解析した結果, C 端側にあるアミノ酸 196–241 番の α -ヘリックス領域が特異的結合に最も重要であるとの結論に達し, この領域を PUBS1 (UIM1) と命名した (Fig. 3B). なかでも疎水性の大きな側鎖を持つアミノ酸 (Leu, Met, Ile, Tyr) と

小さな側鎖のアミノ酸 (Ala) が交互に表れる部位 (LALAL 配列) が最も重要であり, ここをアスパラギンなどに置換すると直ちにポリユビキチン鎖結合能は失われる. PUBS1 (UIM1) 領域は酵母, 植物, ショウジョウバエ, ヒトなどで高度に保存されており, 種間で保存性の高いユビキチンの認識という役割と良く対応している. 一方, 多細胞生物 Rpn10 にはその C 端側に第 2 のポリユビキチン鎖結合領域 PUBS2 (UIM2) (Fig. 3) が存在し, LALAL 配列と類似のコア配列 (IAYAM) が種間で高度に保存している. UIM1, UIM2 はいずれもそれぞれ 4mer 以上の長さのポリユビキチン鎖と強いアフィニティーを有するが, これはテトラマーユビキチンの分子表面に形成される疎水性アミノ酸クラスターと UIM1, 2 が相互作用するためであると考えられている. UIM1 と UIM2 とは基質に対して協調的に作用し, 両者が共存した場合に相乗的な基質親和性を獲得すると報告されている.²⁶⁾ また, UIM2 にはポリユビキチン鎖のみならずユビキチン様蛋白質 hHR23 蛋白質が (この場合はモノマーでも) 結合することが知られている.²⁷⁾

出芽酵母において, 小南らは細胞周期に欠損を示すプロテアソーム変異 Rpn12 (Nin1) をマルチコピーで抑圧する遺伝子として Rpn10 を同定した.²⁸⁾ 酵母 Rpn10 は多細胞生物のそれに比較して分子量が小さく UIM2 を含む C 末端側約 1/3 が欠失しているが, UIM1 は高度に保存されており, この領域の機能の重要さが伺われる. 一方, ポリユビキチン鎖の認識という最も重要な役割を果たすはずの酵母 Rpn10 は細胞の生存及びユビキチン依存的蛋白分解に必須ではない.²⁹⁾ このことはポリユビキチン鎖

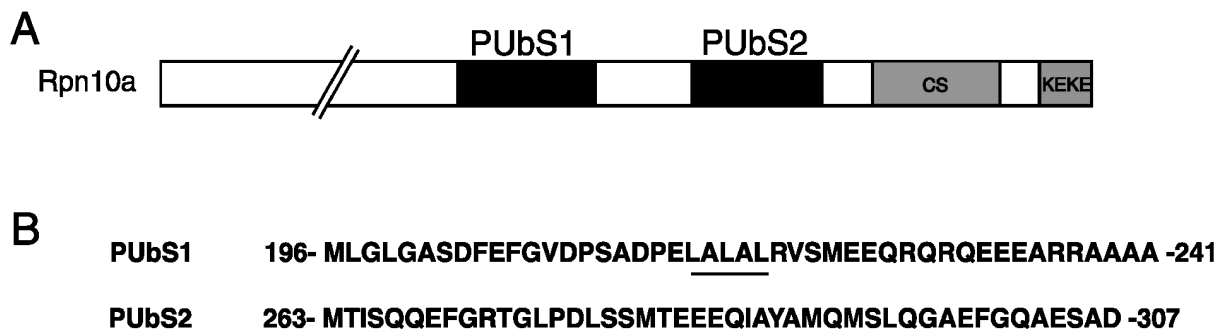


Fig. 3. Schematic Representation of Rpn10 Protein Structures

(A) Structure of Rpn10 protein. The polyubiquitin-binding domains PUBS1 (UIM1) and PUBS2 (UIM2) are boxed as indicated by filled designs. C-terminal highly conserved sequence (CS) and the KEKE domain are indicated. (B) Amino acids sequences of PUBS1 (UIM1) and PUBS2 (UIM2).

を認識する何らかの代替メカニズムがプロテアソームには存在している可能性を示唆している。最近、酵母 Rpn10 遺伝子変異とシンセティックな効果を示す興味深い遺伝子がいくつか報告されている。例えば、プロテアソームと物理的に結合することが知られている DNA 修復因子 Rad23,³⁰⁾あるいはポリユビキチン鎖の伸長に参与する E4 (Ufd2)³¹⁾などは、それ単独の変異では増殖に大きな影響を及ぼさないが、Rpn10 との多重変異により深刻な異常を示す。一方、多細胞生物としてはコケ科の *P. patens* の Rpn10 遺伝子破壊が行われており、³²⁾やはり酵母と同様に細胞増殖には影響ないのだが、細胞の分化、特に孢子形成に至る分化経路に大きな欠損を示し、これはオーキシン処理で部分的に回復することが示されている。これらの結果は、Rpn10 がこれまで考えられてきたように単純な非必須産物ではなく、ある局面の細胞においては非常に重要な役割を有するプロテアソームサブユニットであることを示している。

Rpn10 サブユニットの多様性

これまでに同定された総計 30 種を越えるプロテアソームサブユニットは、 γ -interferon で誘導される「免疫プロテアソーム」サブユニットを唯一の例外として、すべて組織普遍的に発現している。³³⁾筆者らは、細胞の発生分化に伴ってプロテアソームサブユニット群の構造に変化が生じるものがないかということを検討するために、種々の cDNA ソースについて PCR による Differential screening を行っ

た結果、マウス胚性幹細胞に特徴的に現れる Rpn10 ホモログである Rpn10c と、胎児脳 cDNA ライブラリに特異的に現れる Rpn10e を新たに同定した。³⁴⁾ Figure 4 にこれまでに筆者らがクローニングした計 5 種類のマウス Rpn10 ファミリーの構造模式を示す。これらはすべて共通の N 端側構造を有する一方で、それぞれにユニークな C 端側構造を有しており、単一遺伝子から alternative splicing により生じる。構成的な発現を示す Rpn10a を除いて各々の Rpn10 の発現は発生段階に特異的であり、Rpn10c は胚盤胞から 8.5 日胚にかけて、Rpn10e は発生が進むにつれて発現が増大し 17 日胚で最高となる。ユビキチン結合ドメインを含む C 端側というのは基質を含む種々の蛋白質と相互作用するのに必要な領域と考えられ、ここでの構造多様性はそれぞれの発生ステージでプロテアソームと基質との相互作用を調節する重要な役割を果たしている可能性が推測される。

Rpn10a と Rpn10e とで基質に対する選択性の相違があれば、過剰量の Rpn10 蛋白質によって拮抗的に分解阻害される蛋白質集団の構成にその違いが反映され、ひいてはそれを発現する細胞の形質として顕在化される可能性が考えられる。筆者らは Rpn10 分子種に特徴的な機能を探索する目的で種々の Rpn10 をツメガエル卵に過剰発現させた結果、Rpn10e 過剰発現胚で特徴的に細胞分裂の進行が大きく阻害され分裂面が攪乱されることを見出した(川原ら、未発表)。分裂停止した Rpn10e 注入卵の

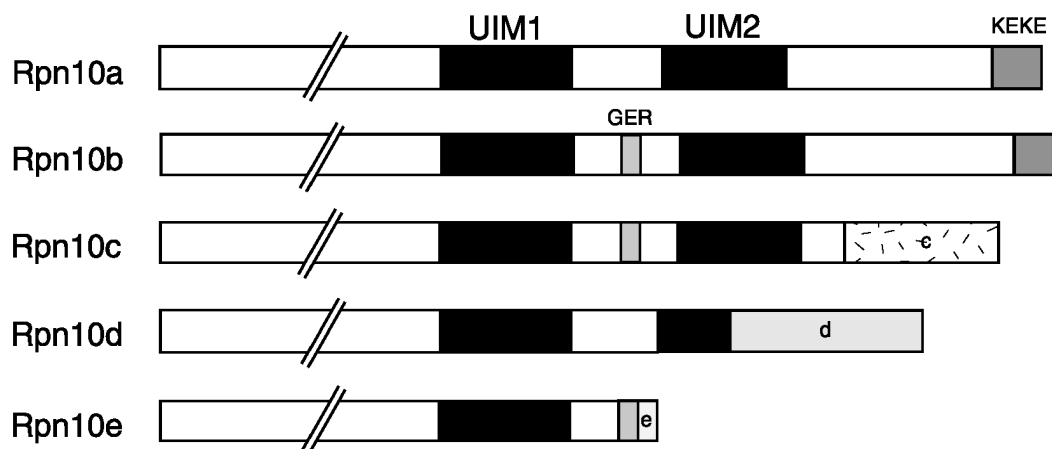


Fig. 4. A Family of Mouse Rpn10 Proteins

Schematic representation of the C-terminal half structures of multiple Rpn10 proteins. The poly-Ub-binding domains (UIM1 and UIM2), the Gly-Glu-Arg (GER) sequence, the KEKE domain, and the specific C-terminal sequences in Rpn10c, Rpn10d, Rpn10e are indicated by filled box.

核はポリプロイドの形質を示し、染色体の分配を含む核分裂に異常が生じている。Rpn10e 過剰発現による分裂阻害には UIM1 領域が必須であり、なんらかのユビキチン代謝に異常が生じた結果引き起こされた現象であると考えられる。さらに、ツメガエル卵無細胞系での過剰発現では、M 期開始及び脱出の各過程に対して Rpn10 の型に応じてそれぞれ与える影響が大きく異なることを見出しつつある。これらの結果から筆者らは、ユビキチン化基質とプロテアソームとのインターアクションは、アダプターとなる Rpn10 群や個々の PA700 サブユニットとの相互作用により、基質ごとに複雑に規定されている可能性があるのではないかと仮説を立て、ユビキチン化された細胞周期調節タンパク質群とプロテアソームとの相互作用の特異性に注目して解析を進めている。Figure 5 に現在の筆者らの作業仮説モデルを示した。今後、複数の細胞内基質を峻別するプロテアソームの基質認識の分子機構を明らかにして、細胞周期、さらには細胞分化の新しい制御機構を明らかにしたいと考えている。

Rpn10 サブユニットファミリーの分子進化

さて、26S プロテアソームはその構造、性質において真核生物間で極めて高く保存され、進化的に極めて良く保存された酵素であるということが出来る。一方、Rpn10 はその中で異例のサブユニットといえる。すなわち、Rpn10 遺伝子は、単細胞生物から多細胞生物へ進化する過程での C 末端配列

の獲得、そして脊椎動物に至る過程での選択的スプライシングによる分子多様性の獲得と、進化の過程で逐次その複雑さを増していつている。筆者らはこのような状況の中、多細胞生物における Rpn10 の基本的な機能について改めて立ち返って検討しようと考え、Rpn10 が非必須である酵母と必須であるマウスの中にある多細胞生物、線虫 *C. elegans* を用いて、その機能の網羅的解析を試みつつある。Rpn10 cDNA の N 端側のヌクレオチド配列が各クローンで共通であることから、これらが Alternative splicing で生成する可能性を考え、マウス Rpn10 ゲノム遺伝子の塩基配列の決定を行った。Figure 6 に全配列決定したマウス Rpn10 ゲノム遺伝子の構造模式を示す。マウス Rpn10 遺伝子は黒く記した 10 個のエクソンから構成されるが、Fig. 6 に示したとおり、第 7 エクソン以降でのスプライシングの多様性により、種々の cDNA を生ずることが明らかになった。例えば、第 7 エクソンの直後に複数存在するスプライスドナー、アクセプターの選択により、Rpn10a, b あるいは Rpn10e いずれが生成するかが決定される。酵母 Rpn10 にはイントロンはなく、またユビキチン結合ドメイン 1 番以降の C 端側半分が欠失している。2 番目のユビキチン結合ドメインや KEKE 配列などは、線虫ですでにその原形が認められ、昆虫ではほぼ哺乳類と等しいドメイン構造を有している。しかしこれら無脊椎動物ではこの領域に選択的スプライシングを生じうる

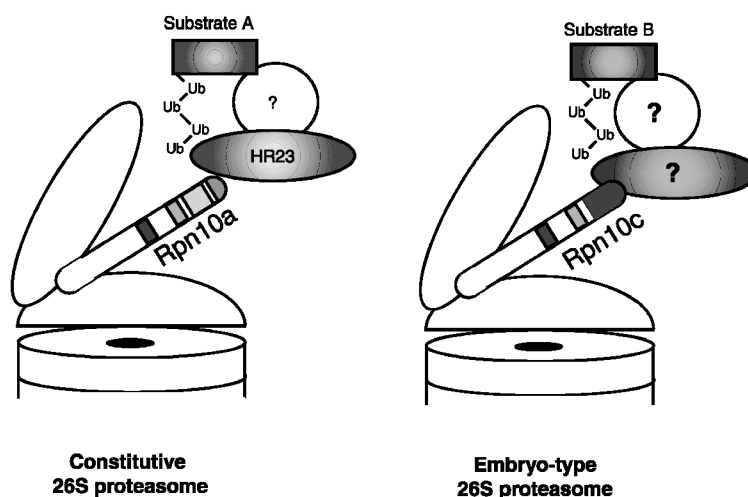


Fig. 5. Possible Mechanisms of Substrate Discrimination by Rpn10 Family Subunits

Rpn10a is a constitutively expressed subunit of 26S proteasome, while Rpn10c is a tissue- and developmental stage-specific component. We hypothesize that the difference of Rpn10 species determine the specific interacting partner of 26S proteasome.

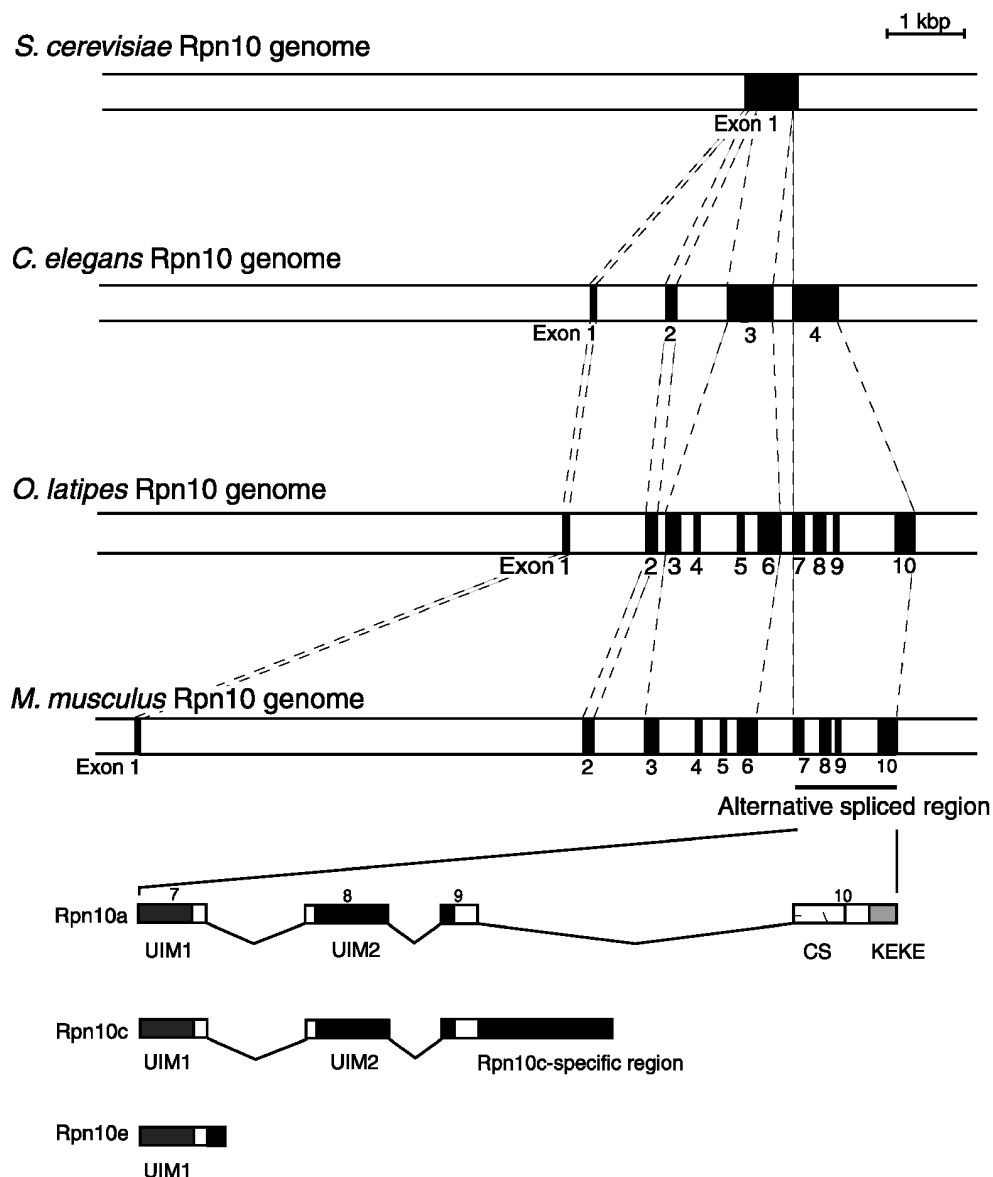


Fig. 6. Physical Maps of Genomic Organization of Yeast, Nematode, Fish and Mouse Rpn10 Genes

The scale shows the length of 1 kbp. Exons are indicated by solid boxes and numbered from 1 to 10. The structures of the mouse multiple Rpn10 transcripts generated by alternative splicing are shown schematically at the bottom of the figure. Protein-encoding regions are represented by *boxes* and introns by *lines*. Solid boxes: UIM1, UIM2 or Rpn10c-specific regions, as specifically indicated. Open boxes: less-conserved regions.

イントロン構造は存在していない。マウスで得られた結果と相同な、保存された位置でのイントロンの挿入は、ヒトを含む広くほ乳類一般、そして両生類、魚類など脊椎動物系統のみにおいて共通に認められることが筆者らの検討から最近、明らかになった³⁵⁾ (Fig. 6)。このように Rpn10 遺伝子は、単細胞生物から多細胞生物へ進化する過程での C 末端配列の獲得、脊椎動物系統における保存された位置でのイントロンの挿入、そして哺乳類に至る過程での選択的スプライシングによる分子多様性の獲得

と、進化の過程で逐次その複雑さを増していっていることが判る。

進化的に非常に保存されていることが多いプロテアソームサブユニット遺伝子のなかで、このことは例外的なことであり、プロテアソーム機能のモジュレーションという意味で興味深く思われる。今後、細胞内における基質選別にこれらの多様性がどのような意義を持っているのか、そしてそれが細胞の分化と増殖、細胞死にとっていかなる役割を果たしているのかについて明らかにしていくことが重要では

ないかと考えている。

おわりに

成体反応制御におけるユビキチン化のステップの重要性は疑うべくもなく、特異的かつ極めて多様性に富んだ E2, E3 タンパク質群の存在により基質選択性が確保されている。一方で、高度に組織化されたプロテアソームサブユニットの間にはサブユニットごとに分担された特異的な役割が存在するものと考えられ、ユビキチン-プロテアソーム系はその活性、基質認識の両面において巨大な超分子システムを形成することにより、細胞内代謝制御における多岐に渡る局面に対応しているものと考えられる。ユビキチン化基質とプロテアソームとのインターアクションは、アダプターとなるポリユビキチンレセプターサブユニット群や個々の PA700 サブユニットの多様性により、基質ごとに複雑に規定されている可能性がある。このようにユビキチン-プロテアソーム系はその活性、基質認識の両面において巨大な超分子システムを形成することにより、細胞周期制御における多岐に渡るタンパク質代謝に極めて重要な役割を果たしているものと考えられる。今後、ユビキチン化とプロテアソームの協調がどのように分解に到る基質認識に関与しているかを明らかにしていくことが極めて重要な課題になってくるものと思われる。

謝辞 本研究を行うにあたり、大学院生の頃から現在にいたるまで一貫したご指導を賜りました北海道大学薬学研究科の横沢英良教授に厚くお礼を申し上げます。本研究を進めるにあたり、有益な御意見と温かいご支援を頂きました東京都臨床医学総合研究所の田中啓二部長、東京都老人総合研究所の鈴木紘一所長、東京工業大学生命理工学部の岸本健雄教授に心より感謝申し上げます。本稿で紹介させて頂いた筆者らの研究は研究室の方々との共同研究によるものであり、皆様のご協力に対してこの場をお借りして深謝致します。本研究は文部科学省科学研究費の援助により行われたものであり、ここにお礼申し上げます。

REFERENCES

1) Hershko A., Ciechanover A., *Annu. Rev. Biochem.*, **67**, 425-479 (1998).

2) Scheffner M., Huibregtse J. M., Vierstra R. D., Howley R. D., *Cell*, **75**, 495-505 (1993).

3) Patton E. E., Willems A. R., Tyers M., *Trends Genet.*, **14**, 236-243 (1998).

4) Zacharie W., Nasmyth K., *Genes Dev.*, **13**, 2039-2058 (1999).

5) Ohta T., Michel J. J., Schottelius A. J., Xiong, Y., *Mol. Cell*, **3**, 535-541 (1999).

6) Tyers M., Willems A. R., *Science*, **284**, 601 (1999).

7) Hatakeyama S., Yada M., Matsumoto M., Ishida N., Nakayama K. I., *J. Biol. Chem.*, **276**, 33111-33120 (2001).

8) Murata S., Minami Y., Minami M., Chiba T., Tanaka K., *EMBO Rep.*, **2**, 1133-1138 (2001).

9) Rechsteiner M., "Ubiquitin and the Biology of the Cell," ed. by Peters J. M., Harris J. R., Finley D., Plenum Press, New York, 1998, pp. 147-189.

10) Coux O., Tanaka K., Goldberg, A. L., *Annu. Rev. Biochem.*, **65**, 801-847, (1996).

11) Tanaka K., *J. Biochem.*, **123**, 195-204 (1998).

12) Ferrell K., Wilkinson C. R., Dubiel W., Gordon C., *TIBS*, **25**, 83-88 (2000).

13) Kawahara H., Tanpakushitsu, Kakusan, Koso. pp. 2154-2164 (1997).

14) Saitoh Y., Kawahara H., Miyamatsu H., Yokosawa, H., *Comp. Biochem. Physiol.*, **99B**, 71-76 (1991).

15) Glickman M. H., Rubin D. M., Coux O., Wefes I., Pfeifer G., Cjeka Z., Baumeister W., Fried V. A., Finley D., *Cell*, **94**, 615-623 (1998).

16) Kawahara H., Yokosawa H., *Dev. Biol.*, **151**, 27-33 (1992).

17) Kawahara H., Yokosawa H., *Dev. Biol.*, **166**, 623-633 (1994).

18) Aizawa H., Kawahara H., Tanaka K., Yokosawa H., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **218**, 224-228 (1996).

19) Sawada H., Kawahara H., Saito Y., Yokosawa H., "Intracellular Protein Catabolism," ed. by Suzuki K., Bond J. S., *Adv. Exp. Med. Biol.*, **389**, 229-232 (1996).

20) Takahashi M., Tokumoto T., Ishikawa K., *Mol. Rep. Dev.*, **38**, 310-317 (1994).

21) Chiba K., Sato E., Hoshi M., *J. Biochem.*, **122**, 286-293 (1997).

- 22) Sawada M. T., Morinaga C., Izumi K., Sawada H., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **254**, 338–344 (1999).
- 23) Kawahara H., Sawada H., Yokosawa H., *FEBS Lett.*, **310**, 119–122 (1992).
- 24) Kawahara H., Philipova R., Yokosawa H., Patel R., Tanaka K., Whitaker M., *J. Cell Sci.*, **113**, 2659–2670 (2000).
- 25) Deveraux Q., Ustrell V., Pickart C., Rechsteiner M., *J. Biol. Chem.*, **269**, 7059–7061 (1994).
- 26) Young P., Deveraux Q., Beal R. E., Pickart C. M., Rechsteiner M., *J. Biol. Chem.*, **273**, 5461–5467 (1998).
- 27) Hiyama H., Yokoi M., Masutani C., Sugawara K., Maekawa T., Tanaka K., Hoeijmakers J. H., Hanaoka F., *J. Biol. Chem.*, **274**, 28019–28025 (1999).
- 28) Kominami K., Okura N., Kawamura M., DeMartino G. N., Slaughter C. A., Shimbara N., Chung C. H., Fujimuro M., Yokosawa H., Shimizu Y., Tanahashi N., Tanaka K., Toh-e A., *Mol. Biol. Cell.*, **8**, 171–187 (1997).
- 29) van Nocker S., Sadis S., Rubin D. M., Glickman M., Fu H., Coux O., Wefes I., Finley D., Vierstra R. D., *Mol. Cell. Biol.*, **16**, 6020–6028 (1996).
- 30) Lambertson D., Chen L., Madura K., *Genetics*, **153**, 69–79 (1999).
- 31) Koegl M., Hoppe T., Schlenker S., Ulrich H. D., Mayer T. U., Jentsch S., *Cell*, **96**, 635–644 (1999).
- 32) Girod P. A., Fu H., Zryd J. P., Vierstra R. D., *Plant Cell*, **11**, 1457–1472 (1999).
- 33) Murata S., Kawahara H., Tohma S., Yamamoto K., Kasahara M., Nabeshima Y., Tanaka K., Chiba T., *J. Biol. Chem.*, **274**, 38211–38215 (1999).
- 34) Kawahara H., Kasahara M., Nishiyama A., Ohsumi K., Goto T., Kishimoto T., Saeki Y., Yokosawa H., Shimbara N., Murata S., Chiba T., Suzuki K., Tanaka K., *EMBO J.*, **19**, 4144–4153 (2000).
- 35) Kikukawa Y., Shimada M., Suzuki N., Tanaka K., Yokosawa H., Kawahara H., *Biol. Chem.*, (in press).