説

哺乳類におけるプロテアソームの多様性と意義

村 田 茂 穂

プロテアソームは真核生物においてユビキチン化タンパク質を分解する巨大な複合体型 のプロテアーゼである.従来,プロテアソームはユビキチンシステムによる指令を忠実に 実行するだけの存在と思われがちであったが,多様な因子と会合することにより分解を調 節したり,その触媒活性を変換させることにより獲得免疫など高等動物特有のシステムを 制御していることが近年の研究成果で明らかになってきた.特に,最近我々が発見した胸 腺特異的プロテアソームは,サブユニットを一つだけ入れ替えて1種類の触媒活性を変換 することにより,T細胞のレパートリー形成という適応免疫システムの根幹を制御するこ とが明らかとなった.プロテアソームとがん,神経変性疾患,心疾患などのひとの主要な 疾病との関わりも知られるようになり,今後一層の哺乳類プロテアソームの多様性と活性 制御機構の解明が必要とされている.

はじめに

細胞内のタンパク質は絶えず分解され、アミノ酸に帰 し、再び新たなタンパク質として合成される.しかし、タ ンパク質の分解は無秩序に起こっているのではなく、高い 選択性と厳密な制御のもとに分解されている.真核生物で は細胞内で役割を終えたタンパク質や不良品タンパク質の 大半が、分解の目印としてユビキチンを付加されたのち、 プロテアソームと呼ばれる巨大な分解酵素複合体により短 いペプチド断片にまで消化される.このユビキチンとプロ テアソームの連携によるタンパク質分解経路、すなわちユ ビキチン・プロテアソームシステムは真核生物において細 胞周期、遺伝子発現、シグナル伝達をはじめとしたあらゆ る局面において必須の働きをしており、近年の生物学にお いてその重要度は増すばかりである.

プロテアソームは酵母から哺乳類に至るすべての真核生

東京大学大学院薬学系研究科蛋白質代謝学教室(〒113-0033 東京都文京区本郷 7-3-1)

物において高度に保存された構造をもつプロテアーゼ複合 体である.何をいつ分解すべきかという基質の選択は,基 質自身への翻訳後修飾およびそれを認識するユビキチンリ ガーゼ(E3)の多様性により厳格に制御されていること が明らかになっているのに対して,プロテアソームによる 分解のステップでの制御はあまり知られていない.しか し,高等動物(正確にいえば有顎脊椎動物)においては, サイトカインに応答してプロテアソーム自体が機能変換を 行うことにより"分解の質"に影響を及ぼしていることが 明らかになってきた.すなわち,免疫プロテアソームとプ ロテアソーム活性化因子 PA28の出現である.これに加え てごく最近我々は胸腺特異的プロテアソームを発見した. 本稿では,プロテアソームの基本構成と機能を概説した 後,これら高等動物特異的なプロテアソーム形成の意義と 役割について解説する.

I. プロテアソームの構造と機能

1. プロテアソームの構成成分

ユビキチン化タンパク質を分解するプロテアソームは、 プロテアーゼ活性を有する複合体である 20S プロテア ソームの両端または片側に 19S 複合体 (PA700 とも呼ば れる) が会合した 26S プロテアソームである^{1,2} (図1). 26 S プロテアソームは長さ 44nm,最大/最小直径 20nm/12 nm にも及ぶ恐らく細胞内で最大の酵素である³. 20S プロ

Diversity of proteasomes in mammals and its biological significance

Shigeo Murata (Laboratory of Protein Metabolism, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, the University of Tokyo, 7–3–1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113–0033, Japan) 本総説は 2007 年度奨励賞を受賞した.



図1 プロテアソームの構造

a. 26S プロテアソームの電子顕微鏡像(Baumeister 博士(独マックスプランク研究所)より供与)
 20S プロテアソームの両端に 19S 複合体が会合する. 19S 複合体はさらに基底部(base)と蓋部(lid)
 のサブコンプレックスに分類される.
 b. 26S プロテアソームのサブユニット構成

20S プロテアソームは7種類のαサブユニット (α1-7) と7種類のβサブユニット (β1-7) が2セット集合した複合体である. 19S 複合体は base (Rpt1-6, Rpn1, 2, 13) と lid (Rpn3, 5-12, 15) より 構成される.

テアソームは 14 種類,計 28 個のサブユニットにより構成 される長さ 15 nm,直径 11.5 nm の中空樽状の複合体であ り,19S 複合体は 6 個の ATPase 活性を有するサブユニッ トよりなる ATPase リングに 10 種類以上の non-ATPase サ ブユニットが会合した複合体であり,さらに base (基底 部)と lid (蓋部) に区分される⁴ (図 1,**表 1**).

プロテアソーム研究に残された大きな謎の一つに、どの ようにしてこの複雑な構造体が正確に形作られるのかとい うことが挙げられる.プロテオミクス的手法の発展も手伝 い、20S プロテアソームの形成を支援するシャペロン分子 PAC (proteasome assembling chaperone) 1-4, Ump1/POMP の発見と機能解析が我々のグループを中心に行われた結 果,20S プロテアソームの分子集合機構の解明はこの数年 でめざましく進展し、現在ではほぼその全容が解明された といってもよい^{5~11)}. 目下の最大の焦点は 19S 複合体の形 成機構,および19S複合体と20Sプロテアソームの解 離・会合機構であろう. 20S プロテアソームの結晶構造解 析が、20Sプロテアソームの機能および分子集合機構の理 解に大きな役割を果たしたことから^{12,13)}, 19S 複合体ある いは 26S プロテアソームの構造学的解析が待望される. しかし、26S プロテアソームは 20S プロテアソームほど安 定した複合体ではないことや、プロテアソームと一時的に 会合してプロテアソーム機能を修飾する PIPs (proteasome interacting proteins)(表 1)の多様性やその結合の安定性 の問題から均一な集団として精製するのが困難であるなど の理由で,現在まで成功したグループはない.26Sプロテ アソームの構造解析は,なぜ多様なサブユニット群により この酵素が構成される必然性があるのか,なぜ複雑な形態 をとる必要があるのかなどその機能の理解においてプロテ アソーム研究上極めて重要な課題である.

プロテアソームによるユビキチン化 タンパク質分解機構

プロテアソームによるタンパク質分解は多段階的に行われることがこれまでの研究から明らかにされ、構造の複雑性を要する要因と考えられる(図2).以下プロテアソームによるユビキチン化タンパク質分解のプロセスを追いながら解説する.

a) ポリユビキチン化タンパク質の捕捉

プロテアソームのサブユニットの中でポリユビキチン鎖 を結合すると報告されているのは Rpn10 と Rpt5 である が,後者に関してはまだ評価が定まっていないのが現状で ある^{14,15)}. Rpn10 を欠失させた酵母はタンパク質分解に大 きな支障を来さないことから,代替経路の存在が示唆され ていた.その後の研究により,いわゆる Ubl (ubiquitin-

			統一名称	HGNC	ヒト別称	出芽酵母 ホモログ(別称)	アミノ酸長 (ヒト)	モチーフ	特異的機能
20S 構成因子	αタイプ		α1	PSMA6	iota	SCL1, YC7	246	NLS	
	サブユニット		α2	PSMA2	HC3	PRE8, Y7	233	NLS	
			α3	PSMA4	HC9	PRE9, Y13	261	NLS	
			α4	PSMA7	C6	PRE6	248	NLS	
			α5	PSMA5	zeta	PUP2, DOA5	241		
			α6	PSMAI	HC2	PRE5	263		
			α7	PSMA3	HC8	PRE10, YC1	254		
	βタイブ		β1	PSMB6	Y, delta	PRE3	(34) 205	Ntn	カスパーゼ様活性
	サブユニット	litte - Do weat	β2	PSMB7	Z	PUP1	(43) 234	Ntn	トリブシン様活性
		構成型	β3	PSMB3	HC10	PUP3	205		
			β4 05	PSMB2	HC7	PREI DOAR	(50) 201	N	ナエレリマンン接近州
			po oc	PSMB5	X, MB1	PREZ, DOA3	(59) 204	Nth	イモトリノシン様活性
			ро 07	PSMB1	HC5 UN2	PRE/	(28) 213		
			p/	PSMB4	HN3	PKE4	(45) 219		hand the second se
		在市町	β11 00:	PSMB9	LMP2, RING12	_	(20) 199	Ntn	キモトリプシン様活性
		兄没型	β21 05:	PSMB10	MECLI, LMP10	_	(39) 234	Ntn	トリフンン様活性
		nt ust and	β 51	PSMB8	LMP7, RING10	_	(72) 204	Ntn	キモトリブシン様活性
		胸腺型	β5t	PSMB11			(49) 251	Ntn	?
19S 構成因子	ATPase		Rpt1	PSMC2	S7, Mss1	YTA3, CIM5	433	AAA	ATPase
	サブユニット		Rpt2	PSMC1	S4, p56	YTA5	440	AAA	ATPase
			Rpt3	PSMC4	S6, Tbp7, P48	YTA2	418	AAA	ATPase
			Rpt4	PSMC6	S10b, p42	SUG2	389	AAA	ATPase
			Rpt5	PSMC3	S6', Tbp1	YTA1	439	AAA	ATPase
			Rpt6	PSMC5	S8, p45, Trip1	SUG1, CIM3	406	AAA	ATPase
	non-ATPase		Rpn1	PSMD2	S2, p97	HRD2, NAS1	908	PC	PIPs scaffold
	サブユニット		Rpn2	PSMD1	S1, p112	SEN3	953	PC, NLS	PIPs scaffold
			Rpn3	PSMD3	S3, p58	SUN2	534	PCI, PAM	
			Rpn5	PSMD12	p55	NAS5	456	PCI	
			Rpn6	PSMD11	S9, p44.5	NAS4	422	PCI, PAM	
			Rpn7	PSMD6	S10a, P44	RPN7	389	PCI	
			Rpn8	PSMD7	S12, p40, MOV34	NAS3	324	MPN	
			Rpn9	PSMD13	S11, p40.5	NAS7	376	PCI	コンドナイン加好人
			Rpn10	PSMD4	S5a, Mbp1	SUNI, MCBI	377	UIM, VWA	ユヒキナン頭祜信
			Rpn11	PSMD14	S13, Poh1	MPRI	310	MPN	脱ユヒキナン
			Rpn12	PSMD8	S14, p31	NINI DAGI	257	PCI	1101197 11 年月 1 年秋 4
			Rpn15 Ren15	ADRM1	ADKM1 DSS1_SHEM1	DAQ1 SEM1	407		UCH37 リクルート・活性化
			крита	SHEWI	D331, 3ПГМ1	SEMI	10		
フロテアソーム			Rpn4	-		SON1, UFD5		Zn finger	フロティソーム遺伝于耕転与
(DID-) (DID-)			Rpn14	PAAFI	FLJ11848, WDR71	YGL004C	392 E04	WD40	フロディソーム機能阻害
(PIPS)				PSMD5	550, p50. 5	 NA 69	204	AKM	
				PSMD9	p27	NA52 NASE	223	PDZ	
				PSMD10 DSME1	p26, gankyrin	NA50	220	AINK Decline rich	プロテアソート機能阻害
				F3MF1 KIAA0368	FI 122036 ECM29	Ecm29	1/1	heat repeat	10S-20S 会会の安定化
				LIBE3C	KIA A 10	Hul5	1083	HECT	105 205 ムロジダル化 フビキチンリガーゼ
				USP14	Usn14	Ubn6	494	LIM DUB	脱ユビキチン
				UCHI 5	UCH37		329	DUB	脱ユビキチン
				RAD23A/B	HHR23A/B	Rad23	363/409	Ubl UBA	ユビキチン化タンパク質運搬
プロテアソーム				PSMF1	PA28a REGa		210		プロテアソーム活性化
活性化因子				PSME2	PA286 REGB	_	239		プロテアソーム活性化
				PSME3	PA28y REGy Ki	_	253		プロテアソーム活性化
				PSME4	PA200, TEMO	BLM10	1843	heat repeat	プロテアソーム活性化 (?)
分子集合田子				POMP	hUmp1	IIMP1	1010	pour	
71米口四1				PSMG1	PAC1 DSCR9	Phal Pocl	141		
				PSMG2	PAC2 HCCA3	Pha2 Poc2 Add66	200 264		
				PSMG3	PAC3 MGC10911	Pha3 Poc3 Dmp2	123		
				PSMG4	PAC4, C6orf86	Pba4, Poc4, Dmp1	123		
					,	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	120		

表1 プロテアソーム構成因子

PSMG4 PAC4, Coorts6 一は対応するものが存在しないことを示す. 空欄は名称など未定のものを示す. アミノ酸長の())内はプロペプチドを表す. HGNC: Human genome organization (HUGO) Gene Nomenclature Committee による名称 Nn : N-terminal nucleopihle hydrolase AAA : ATPase associated with diverse cellular activities PC : proteasome/cyclosome repeat PAM : PCI associated module PCI : proteasome/cyclosome repeat PAM : PCI associated module PCI : proteasome/cyclosome repeat PAM : PCI associated module PCI : proteasome/cyclosome repeat PAC4, Coorts6 Hydrolase AAA : ATPase associated with diverse cellular activities PC : proteasome/cyclosome repeat PAC4, Coorts6 Hydrolase AAA : ATPase associated module PCI : proteasome/cyclosome repeat PAC4, Coorts6 Hydrolase AAA : ATPase associated module PCI : proteasome/cyclosome repeat PAC4, Coorts6 Hydrolase AAA : ATPase associated module PCI : proteasome/cyclosome repeat PAC4, Coorts6 Hydrolase AAA : ATPase associated module PCI : proteasome/cyclosome repeat PAC4, Coorts6 Hydrolase AAA : ATPase associated module PCI : proteasome/cyclosome repeat PAC4, Coorts6 Hydrolase AAA : ATPase associated module PCI : proteasome/cyclosome repeat PAC4, Coorts6 Hydrolase AAA : ATPase associated module PCI : proteasome/cyclosome repeat PAC4, Coorts6 Hydrolase AAA : ATPase associated module PCI : proteasome/cyclosome repeat PAC4, Coorts6 Hydrolase AAA : ATPase associated module PCI : PSD-95/DLG/ZO-1 ANK : ankyrin repeats

ANK

ARM Ubl DUB

UBA

PSD-95/DLG/ZO-1
ankyrin repeats
Armadillo repeats
ubiquitin-like
deubiquitination
ubiquitin associated
Nuclear localization signal NLS



図2 プロテアソームによるユビキチン化タンパク質分解サイクル Ub 受容体(Rpn10 または Ubl-UBA タンパク質)により捕捉されたポリユビキチン化タンパク質は,ATPase リングにより解きほぐされるとともに,Rpn11 によりポリユビキチン鎖が切り離される.処理を受けた基質 タンパク質は 20S プロテアソームの内腔に送り込まれ,分解される.3-30 アミノ酸長のペプチド断片にま で分解を受けると,プロテアソームから排出される.

like)-UBA (ubiquitin-associated) タンパク質がポリユビキ チン化タンパク質をプロテアソームへ運搬するシャトル分 子として働くことが明らかとなっている。酵母では Dsk2. Rad23, ヒトでは hPlic-1, hPlic-2, hHR23A, hHR23B など が知られる¹⁶⁾. 実際, 酵母において Rpn10, Rad23, Dsk2 各々の単独欠失では表現系が乏しいが、二重または三重欠 失によりユビキチン化タンパク質の著しい蓄積を来す. こ のことは、これら分子がユビキチン化タンパク質捕捉に相 補的に働いていることを示唆するが,その一方これら"ユ ビキチン鎖受容体"により基質の選別が行われているとい う報告もある. 最近, Rad23 は Ufd2 と Cdc48 の協調によ り形成されたポリユビキチン化タンパク質の分解に選択的 に関わっていることを示す結果や¹⁷⁾, Rpn10 と Rad23 によ り基質の選別が行われていることを示唆する結果が示され ている18~20). これらが実際にどのような役割分担を担って いるか統一的な理解を導くにはさらなる解析が必要であろ う.

b) 基質タンパク質の解きほぐし

20S プロテアソームへタンパク質を送り込むためには, 直径 2 nm の狭い通路を通す必要があり,従って解きほぐ された (unfolded) タンパク質のみ分解することが可能で ある.その働きをするのが 19S 複合体の六つの ATPase サ ブユニット Rpt1-6 が形成する ATPase リングである.し かし単離した 19S 複合体には解きほぐし活性はなく,逆 に ATP 依存的に巻き戻し (refold) 活性を示す²¹⁾.実際は 26S として強力な ATP 依存的 unfoldase 活性を有すること が示されており,正しく 26S プロテアソームが構成され て初めてその正しい機能を発揮するようである.

c) ポリユビキチン鎖の除去

分解に先立ってポリユビキチン鎖が基質タンパク質から 除かれる必要がある.この脱ユビキチン化反応を担うのが lid のサブユニットの一つ Rpn11 である^{22,23)}. Rpn11 はポリ ユビキチン鎖を根元から,つまり基質タンパク質に直接結 合しているユビキチンと基質の間の結合を切る. Rpn11の 活性中心は"古典的"脱ユビキチン化酵素とは全く異なり, Zn²⁺メタロプロテアーゼ活性部位である.

ユビキチンをはずす理由の一つはユビキチンのリサイク ルによりその枯渇を防ぐことにある.もう一つは,ユビキ チンは非常に安定な構造をしているためユビキチンを分解 するための解きほぐしに大量の ATP を消費してしまうこ とにあると考えられている.

この脱ユビキチン化反応は基質タンパク質の解きほぐし とカップルして起こる必要があることが示されている.こ れは基質タンパク質が十分にプロテアソーム内に引き込ま れる前にユビキチン鎖がはずれるとプロテアソームから遊 離してしまうからと考えられる.実際に26Sプロテア ソームにおける Rpn11による脱ユビキチン化は ATP 依存 的であり(Zn²⁺メタロプロテアーゼ自体は ATP 非依存的), ATPase の働き,つまり基質タンパク質の解きほぐしや送 り込みと同時に起こっていることが示唆される.このメカ ニズムは不明であるが,ATPase により基質タンパク質が 解きほぐされ捕捉されることによってポリユビキチン鎖が Rpn11による切断に適した位置に来るのかもしれない. Rpn11のメタロプロテアーゼ活性中心の変異は酵母におい て致死であり,この脱ユビキチン化活性はタンパク質分解 に必須である.

d) 基質タンパク質の送り込みとαリングの開口

プロテアソームの酵素活性は、20S プロテアソームと呼 ばれる,相同性の高い七つのサブユニットから構成された α リングと β リングが αββα の順に会合した約 700 kDa の 円筒形粒子により発揮される(図1).X線結晶構造解析 の結果から、真核細胞 20S プロテアソームの α リングの 中心は閉鎖しており、またスレオニン残基を活性中心とす る触媒部位はβリングの内表面に存在することがわかっ た^{12,13)}.このことは、基質タンパク質がこの酵素により分 解を受けるためには調節ユニットが 20S プロテアソーム に会合して α リングを開放することが必須であることを 示しており、この仕組みは非特異的なタンパク質の分解を 防ぐために重要であると考えられている. 19S 複合体が ATP 依存的に α リングに結合し、19S 複合体の ATPase サ ブユニットのうち Rpt2 と Rpt5 のC 末端の3アミノ酸が 隣り合うαサブユニットの間のポケットにはまることに より α リングが開くことが示唆されている²⁴⁾.しかし、七 つのサブユニットからなる α リングに六つのサブユニッ トからなる ATPase リングがどのようにフィットするの か,興味深い問題点が依然残されている.

e) 20S プロテアソームによる分解

20S プロテアソームのサブユニットのうち, 触媒活性を 有するのは β1, β2, β5 のみである. 20S プロテアソーム はその内壁に β1, β2, β5 が 2 セットの計 6 箇所の触媒活 性部位を有している. 20S プロテアソーム内の空洞の大き さは前室 (α リングと β リングで形成される空洞)が59 nm³,活性化部位 (二つの β リングで形成される空洞)が 84 nm³と,相当量のペプチドあるいは分解途中産物を保持 することが可能であり,反芻動物のように行ったり来たり を繰り返しているのかもしれない.

f) 分解産物の排出

分解されたペプチド(3-30 アミノ酸長)はαリングを 通して 20S プロテアソームから外へ出ると考えられてい る. αリングが開きっぱなしの酵母の変異体ではプロテア ソームの分解産物のアミノ酸長が大きいこともこれを裏付 ける²⁵⁾. 26S プロテアソームにおいて分解産物の排出が, 基質が入るのと逆のルートなのかそれとも全く別の機構な のかは明らかではない. 19S 複合体とは別に, PA28 も 20 S プロテアソームのαリングに結合し,αリングを開口さ せることがわかっている²⁶⁾. PA28 の存在によりタンパク 質分解速度が速くなることから, PA28 が分解産物の排出 を促している可能性も想定される²⁷⁾.

プロテアソームの多様性による 適応免疫システムの制御

1. MHC クラス I 抗原プロセシング酵素としてのプロテ アソーム

身体のほとんどすべての細胞は恒常的に主要組織適合抗 原 (major histocompatibility complex, MHC) クラス I を細 胞表面に発現している. MHC クラス I は自己のタンパク 質や細胞内に侵入したウイルスなどの"内在性抗原"の断 片(エピトープ)をその溝に結合させ、細胞傷害性Tリ ンパ球 (cytotoxic T lymphocyte, CTL) に提示する分子で ある. 通常 MHC クラス I 分子はハウスキーピングタンパ ク質由来の 8-10 アミノ酸残基の長さのペプチドをペプチ ド収容溝に保持しているが、これらの自己抗原に対しては 胸腺や末梢における教育により CTL は反応しないように なっている.MHC クラス I システムは異種タンパク質を 発現する細胞を認識するために発達してきたものであり、 ウイルスなどの感染性生物や腫瘍抗原を排除するための機 構である. 1990年代はじめに E1 (ユビキチン活性化酵素) の温度感受性変異株やプロテアソーム阻害剤で処理した細 胞において内在性抗原のプロセシングが抑制されることか ら、ユビキチン・プロテアソームシステムが MHC クラス Iの抗原提示に必須であることが示された^{28,29)}.その後, in vitro で CTL エプトープを含むペプチドを 20S プロテア ソームに作用させると正確にエピトープのC末端を切り 出すことから、プロテアソームが MHC クラス I 結合ペプ チド切り出しの責任酵素であることが確立した³⁰⁾.ただ し,MHCをもたない昆虫や古細菌のプロテアソームでも



図3 MHC クラスIへの抗原提示経路 ユビキチン化タンパク質を分解する酵素であるプロテアソームは内在性タンパク質を分解す る.プロテアソームの分解産物であるペプチドの一部が TAP トランスポーターを介して小胞 体内へ輸送され,MHC クラスIのペプチド収容溝に結合し、細胞表面へと運ばれる.MHC クラスIは CD8⁺T 細胞に認識される.MHC クラスIは身体の全ての細胞に発現している.

エピトープを切り出すことが可能なことから,MHCが進 化する途上でプロテアソームによるタンパク質分解の副産 物を巧みに利用して,自己非自己を区別する適応免疫機構 を獲得したと考えられる^{31,32} (図 3).

さらに巧妙なことに、免疫システムは DRiPs(defective ribosomal products)と呼ばれる、タンパク質生合成過程の 不良品の分解産物をクラス I 結合ペプチドの主たる供給源 として利用した³³⁾. すなわち、細胞内のリボソームで新規 に合成されるタンパク質のおよそ 30% が構造不良のため、 合成されるとともにユビキチンプロテアソームシステムに より分解されるが、これを利用することによりタンパク質 の半減期の長短にかかわらず MHC クラス I に抗原エピ トープを提示可能となり、ウイルスが増殖する前に CTL ヘウイルスの進入を知らせることができる.

一方, MHCの出現とともにプロテアソーム自体も抗原 プロセシングにより適したかたちに進化した. すなわち免 疫プロテアソームとプロテアソーム活性化因子 PA28の出 現である.これらはインターフェロン (IFN) γに応答し て巧妙に調節され, 抗原プロセシング能力を高めている.

2. 構成型プロテアソームと免疫プロテアソーム

20S プロテアソームは,主にキモトリプシン様活性(中 性疎水性アミノ酸のC末端側を切断する活性),トリプシ

ン様活性(塩基性アミノ酸のC末端側を切断する活性), カスパーゼ様活性 (PGPH (peptidylglutamyl-peptide hydrolyzing)活性とも呼ばれる;酸性アミノ酸のC末端側を切断 する活性)を有し, β5, β2, β1の三つのサブユニットが それぞれの活性を担当することがわかっている. このタイ プのプロテアソームは酵母から哺乳類に至る全ての真核生 物で保存されており、構成型プロテアソームとも呼ばれ る. しかし 20S プロテアソームを構成する β サブユニッ トの遺伝子は酵母では7種類存在するが、MHCを有する 脊椎動物では 10 種類の遺伝子が単離され,そのうち触媒 活性を有するβ5,β2,β1の三つの構成型サブユニットの それぞれに高い相同性をもった β5i, β2i, β1i が IFNy で強 く誘導されることがわかった.しかも, β5i と β1i の遺伝 子は MHC 遺伝子領域に存在し, MHC クラス I 抗原ペプ チドを細胞質から小胞体 (ER) 内へ輸送するトランスポー ターをコードする TAP1, TAP2 遺伝子に隣接して存在し ており、これら三つの IFNy 誘導性サブユニット(免疫サ ブユニット)が免疫制御に大きく関わっている可能性が示 唆された. β5i, β2i, β1i は IFNγ 刺激により構成型サブユ ニットより優先的にプロテアソームに組み込まれ、触媒作 用担当サブユニットがそっくり入れ替わった"免疫プロテ アソーム"を構成する (図4). この際, β1iの組み込みに は β5i が必要で, β2i の組み込みには β1i を必要とするな



図4 プロテアソームの多様な形態

脊椎動物では触媒活性を担う 20S プロテアソーム自体が IFNγの誘導により構成型プロテアソームから活性サブ ユニットをそっくり置換した免疫プロテアソームを形成する.この変換により,MHC クラス I 抗原提示に有利 なペプチドをより効率よく産生できるようになる.しかし、20S プロテアソームが活性化されるためには 19S 複合体または PA28 が結合する必要がある.両端に ATP 依存的に結合すると 26S プロテアソームとなるが,特 に IFNγにより PA28 が誘導された際は 20S の両端に PA28 が結合したフットボールプロテアソームや,片側に 19S,反対側に PA28 が結合したハイブリッドプロテアソームの形成が亢進する.

どの組み込みのヒエラルキーが存在し,結果的に均一な免 疫プロテアソームが造成されることを保証している³⁴⁾. 但 し,β5i は他の二つの免疫サブユニットと無関係にプロテ アソームに組み込まれうるので,構成型サブユニット (β2,β1) と混合で組み込まれたプロテアソームが存在す る可能性はある.

構成型プロテアソームと免疫プロテアソームの役割の 違い

免疫プロテアソームは、構成型プロテアソームとは異な る基質特異性を有する.すなわち、中性疎水性および塩基 性アミノ酸のC末端側を切断する活性が上昇している一 方、酸性アミノ酸からの切断活性が低下している.MHC クラスI結合ペプチドはそのC末端がアンカーとなるが、 それらの大部分が中性疎水性、一部が塩基性アミノ酸であ り、酸性アミノ酸がアンカーとなることはない.このこと から免疫プロテアソームは MHC クラス I 結合に有利なペ プチドの産生を促進していると考えられる³⁵⁾.ウシ肝臓の 構成型プロテアソームの X 線結晶構造解析から免疫プロ テアソームの立体構造モデルを構築したところ,β1 の基 質認識部位の電荷が変化し,カスパーゼ様活性からキモト リプシン様活性になることが判明し,免疫プロテアソーム の機能変換が構造学的にも裏付けられた¹³⁾.

免疫サブユニット欠損マウスの解析から,免疫プロテア ソームが MHC クラス I 抗原提示において果たす役割が生 体内においても確認された.β5i 欠損マウスは細胞表面の MHC クラス I 発現量が 50% 減少し,CTL に対する抗原提 示能も障害されていた³⁶⁾.β1i 欠損マウスは MHC クラス I 発現量は変わらないものの,CD8 陽性 T 細胞が減少し, ウイルスに対する CTL 応答も減弱する³⁷⁾.β2i 欠損マウス では T 細胞レパートリーに変化を来すことが報告されて いる³⁸⁾.従って,免疫プロテアソームは抗原のプロセシン グの質を変換し、末梢における抗原提示や胸腺内のT細胞の選択において重要な機能をもつことが明らかとなった.その一方、これらの欠損マウスでも野生型と同等に提示されるエピトープも多数存在することから、抗原提示全般に必須なのではなく、免疫プロテアソーム依存性のエピトープとそうでないものが存在すると考えられる.実際、多くの抗原について免疫プロテアソームがCTLエピトープの生成を促進するが、RU1やMelan-A 腫瘍拒絶抗原のように構成型プロテアソームでのみ切り出される例も知られている³⁹⁾.

4. プロテアソーム活性化因子 PA28 の機能

a) PA28 の役割

多細胞生物では 19S 複合体以外に PA28 というプロテア ソーム活性化因子複合体が存在する. PA28 は 19S 複合体 とは異なり ATP 非依存性に 20S プロテアソームを活性化 する. PA28 は分子量約 200 kDa の円錐形をした構造で 20S プロテアソームの両側または片側に結合する(図4).20S の両端に PA28 が結合した"フットボールプロテアソーム" は通常タンパク質を分解する能力はなく、その役割は不明 であるが、20S プロテアソームの両端に PA28 と 19S 複合 体が各々結合したハイブリッド型プロテアソームが知ら れ,ATP 依存性にタンパク質を分解することができ、そ の役割が注目されている400.プロテアソーム活性化因子 PA28 は in vitro でプロテアソームのペプチダーゼ活性を 促進する因子として同定された分子であるが、20S プロテ アソームと会合することにより、αリングを開けることが 結晶構造解析から判明している (図 5)⁴¹. PA28 は本来の 発見経緯である分解促進作用というよりも、ペプチド排出 促進作用によりプロテアソームの利用効率を高めていると も考えられる.

PA28 は PA28αと PA28β サブユニットから構成される ヘテロ七量体である.また,自己免疫疾患で出現する自己 抗体に対する核内自己抗原として知られていた Ki 抗原は, この PA28 ファミリー遺伝子と高い相同性を示し,現在 PA28γと呼ばれる.PA28αβ は脊椎動物にのみ存在し,PA 28γはダニや線虫など無脊椎動物にも存在するため PA28α と PA28β は PA28γを起源として出現したと推定される. PA28α は単独でホモ七量体を形成し,プロテアソームの 各ペプチダーゼ活性を促進する.一方,PA28β はホモ七 量体を形成できずまたプロテアソームを活性化できない が,PA28α とヘテロ複合体を形成すると PA28α 単独に比 べ顕著に高いプロテアソーム活性化能を示す.また生体内 では常に PA28αβ 複合体として存在する.一方,PA28γ は プロテアソームのトリプシン様活性のみを活性化し,その 程度は PA28α 単独よりも低い⁴².

b) PA28 と抗原プロセシング

PA28αB 複合体は IFNy 刺激によって免疫プロテアソー ムとともに協調的に誘導され、そのペプチダーゼ活性を促 進することから、抗原提示に積極的に関与することが考え られていた. PA28αβは in vitro においてエピトープ前駆 体ペプチドからエピトープの切り出しを促進すること、標 的細胞に過剰発現させることによりウイルス抗原の CTL への提示が亢進することが知られている43,44).結晶構造解 析の結果からは、PA28が七量体を形成すると中央にチャ ンネルの開いたドーナツ状の構造をとり、さらに 20S プ ロテアソームに結合することにより 20S プロテアソーム の α リングを開口させ、触媒活性部位までチャンネルを 通じさせることが判明した^{26,45)} (図 5). そのため, in vitro のアッセイではペプチド基質の分解を亢進させると考えら れる.しかし in vivo での機能を考えると、従来推測され ていたような断片化されたペプチドを再びプロテアソーム に入れてさらに切断しているというモデルは考えにくく, 逆にプロテアソームにより分解されたペプチドの排出を促 し、抗原エピトープが必要以上に断片化されることを防ぐ 役割を果たしていると推測される. ハイブリッドプロテア ソームはこの機構をうまく説明しうる構造体である.

我々は *in vivo* での PA28αβの機能解明のために, PA28 αβ二重欠損マウスを作製した. そして, 抗原プロセシン グに PA28αβ依存性経路と非依存性経路が存在することを 明らかにした²⁷⁾. すなわち, メラノーマ由来のがん抗原 TRP2 は PA28αβ依存性経路によってプロセシングされる のに対し, オブアルブミンは双方の経路でプロセシングさ れたのである. このことは PA28αβ ががん免疫において必 須な役割を担う可能性も示唆している.

c) PA28 の抗原提示以外の働き

IFNγ刺激はハイブリッドプロテアソームを増産し、タ ンパク質分解活性を上昇させるが⁴⁰⁾, PA28αβ 欠損細胞で は IFNy 刺激依存性のタンパク質分解活性の上昇は認めら れなかった27). このハイブリッドプロテアソームの機能が IFNyのシグナル伝達に重要である事例が示された. 高柳 らは RANKL (receptor activator of nuclear factor (NF)-кВ ligand)による破骨細胞の分化誘導が IFNy によって阻害さ れることを示し、さらにその阻害は RANK(RANKL 受容 体) に連結したシグナル伝達因子 TRAF6 (tumor necrosis factor receptor associated factor 6) が IFNy 刺激依存性にユ ビキチン・プロテアソーム系で分解されるためであると結 論した⁴⁶⁾. PA28αβ 欠損マウスではこの IFNγ刺激による TRAF6の分解が抑制され、その結果として破骨細胞への 分化が阻害できなかったのである.果たしてハイブリッド プロテアソームが TRAF6 を直接分解するかは不明である が、PA28αβ欠損マウスでは明らかに TRAF6 がユビキチ



図5 プロテアソームの結晶構造

A. ウシ 20S プロテアソーム結晶構造. αリング側より見た像. 真核生物の 20S プロテ アソームの αリングの入り口は α サブユニットの N 末端側で覆われることにより,通 常不活性型として存在する.

B. ウシ 20S プロテアソーム結晶構造側面像. 七つのサブユニットからなるリング構造 が, αββα の順に積み重なり, 20S プロテアソームが形成される.

C. ヒト PA28α ホモ七量体結晶構造を円錐の頂上から見た像.通路ができていることがわかる.

D. 酵母 20S とトリパノソーマ PA26 (PA28 のホモログ) 複合体の結晶構造縦断像. PA 26 の結合により 20Sα サブユニットのN 末端が起立し (点線丸囲み), α リングの入り 口が開口する.

Protein Data Bank ID (http://www.rcsb.org/pdb/): 1IRU (A, B), 1AVO (C), 1FNT (D)

ン化された状態で蓄積していた.このように, PA28は IFNγ刺激時のプロテアソーム依存的タンパク質分解の鍵 を握る分子となっている可能性がある.

一方, PA28のプロトタイプである PA28γの欠損マウス は免疫異常を呈さないものの個体成長の遅延を示し,より 基本的な細胞機能に働いていることが示唆されていた⁴⁷. 最近になりステロイド受容体コアクチベーター SRC-3 を ATP 非依存的かつユビキチン非依存的に 20S プロテア ソームにより分解させる働きを有することが報告された り⁴⁸⁾,その他に HCV のコア抗原の分解や HCV 感染による 肝病変の進行に関与していることが知られるようになり49~51), "PA28 依存的タンパク質分解"の世界が広がる様相を見せ始めており、今後注目の領域である.

5. 適応免疫を制御する新しいプロテアソーム

a) 胸腺プロテアソームの発見

ごく最近我々は、脊椎動物のゲノム中にプロテアソーム のサブユニットと高い相同性をもつ新規の遺伝子を発見し た⁵²⁾.興味深いことに、この遺伝子は胸腺、そのなかでも 胸腺皮質上皮細胞(cTEC; cortical thymic epithelial cell)に 特異的に発現していた.この遺伝子がコードする新しいプ ロテアソームのサブユニットは構成型および免疫プロテア ソームのキモトリプシン様活性を担うサブユニットβ5, β5iと高い相同性を有し,実際に cTEC 内でこれらの代わ りにプロテアソームに組み込まれることがわかった.この ことから,この新しいサブユニットをβ5t (t:thymus), β5tの組み込まれた特殊なプロテアソームを胸腺プロテア ソーム (thymoproteasome) と名付けた (図 6). cTEC のほ とんどのプロテアソームは胸腺プロテアソームで占められ ている.またβ5tも免疫プロテアソームと同様に脊椎動物 にしか見られないことから,MHC とともに進化の過程で 出現したと考えられる.

b) cTEC 細胞は未熟 T 細胞の正の選択を行う

T細胞集団はほぼどんな非自己抗原に対しても特異的免 疫応答を起こすことができる. 個々のT細胞はただ一つ の特異性しかもたないが, それぞれの T 細胞の特異性は 異なっているため全体として体内には何百万という抗原に 対する抗原レセプターすなわち TCR (T cell receptor)の 多様性を有するT細胞が存在することになる. これをT 細胞レパートリーという. このような膨大なレパートリー は、ゲノム上にコードされている何十もの部品をランダム に組み合わせて遺伝子再編成を行うことにより可能となっ ている.しかし、 ランダムに作りだされた TCR をもつ T 細胞のすべてが役に立つわけではなく、なかには自己反応 性の TCR も多数混じっている. このなかから有用な T 細 胞を選り分け、さらに有害なT細胞を排除するのが胸腺 の役割である. すなわち胸腺内で分化途上の CD4⁺CD8⁺ダ ブルポジティブ細胞が胸腺ストローマと総称される細胞群 によって提示される MHC と自己タンパク質断片複合体 (MHC/自己ペプチド)と相互作用し、T細胞の運命が決 定される.

MHC/自己ペプチドと"適度"に反応する TCR をもつ 細胞は生存のシグナルを与えられる.この際,MHC クラ ス I/自己ペプチドに反応した細胞は CD8⁺シングルポジ ティブ(SP)細胞へ分化し,MHC クラス II/自己ペプチ ドに反応した細胞は CD4 SP 細胞へ分化する.この過程は 「正の選択(positive selection)」とよばれ,胸腺の皮質領域 に局在している cTEC によって行われる.この段階でまっ たく反応しない細胞は死滅する〔無の選択(null selection)〕. つまり正の選択により将来働く見込みのある細胞だけが選 別されることになる.

正の選択を受けて SP 細胞へ分化した細胞は胸腺の髄質 へと移動し, 胸腺髄質上皮細胞 (medullary thymic epithelial cell; mTEC) や樹状細胞 (dendritic cell; DC) に提示された MHC/自己ペプチドと強く反応する TCR をもつ細胞は死 滅し除かれる. この過程は「負の選択 (negative selection)」 とよばれ、自己反応性のT細胞の出現を防ぐ役割をもつ. これらのシステムによって、ランダムに作られたT細胞 のうちわずか1%程度が生体に有用なT細胞レパート リーとして残され、末梢組織で異物の監視にあたるのであ る.

既述の通り,胸腺プロテアソームは cTEC に発現する一 方で,mTEC や DC では免疫プロテアソームが発現してい ることが知られている.なぜ異なる細胞で異なるプロテア ソームが発現する必要があるのであろうか?

c) 胸腺プロテアソームと他のプロテアソームの決定的な 違い

胸腺プロテアソームは構成型および免疫プロテアソーム と比べてどのような特徴をもち,なぜ cTEC にのみ発現し ているのだろうか? β5t はβ5,β5i と高い相同性をもつ が,S1 ポケットとよばれる基質特異性を決定する構造を 構成するアミノ酸が β5t とβ5,β5i の間で決定的に異なっ ていた(図7).β5,β5i のS1 ポケットは疎水性アミノ酸 で構成され,疎水性相互作用で疎水性アミノ酸をS1 ポ ケットに結合させることによってキモトリプシン様活性を 発揮する.それに対して,β5t のS1 ポケットは親水性ア ミノ酸で構成されており,キモトリプシン様活性を失って いることが予想された(図7).

β5t を過剰発現させた細胞でプロテアソームの活性を調 べてみると、実際にプロテアソームの他の活性(トリプシ ン様、カスパーゼ様活性)に影響を与えることなく、キモ トリプシン様活性を特異的に低下させた(図7).このこ とから cTEC で産生されるプロテアソーム分解産物は、末 梢や mTEC で産生されるものとは大きく異なり、MHC ク ラス I に結合しない、あるいは低い親和性で結合すること が予想された.それではこの胸腺プロテアソームの酵素学 的特徴は cTEC の特殊機能である正の選択に関与している のだろうか?

d) 胸腺プロテアソームは CD8 T 細胞の分化に必須であ る

β5t 欠損マウスを作製し, 胸腺における T 細胞分化を観 察したところ, β5t 欠損マウスは健康に生まれ, 胸腺の大 きさや胸腺の皮質・髄質構造は正常であった. このことか ら β5t は cTEC の分化・生存には必須ではなく, β5t 欠損 cTEC では β5 や β5i が代わりに組み込まれて, プロテア ソームの機能(細胞維持)を果たしているものと考えられ る.しかし, β5t 欠損マウスでは CD8 SP 細胞が著明に減 少していた(図 8).これは cTEC 上の MHC クラス I/自己 ペプチドと TCR との相互作用による正の選択が特異的に 障害されていることを強く示唆する.

胸腺プロテアソームが CD8 SP 細胞への分化を司る何ら



- 図6 胸腺皮質上皮細胞(cTEC)特異的に発現するプロテアソームサブユニットβ5t
- A. 胸腺における T 細胞分化. 未熟 T 細胞は CD4⁺CD8⁺ダブルポジティブ(DP) 細胞のときに皮質で cTEC による正の選択を受けることにより CD4 または CD8 の片方のみを発現するシングルポジティブ(SP) 細胞となり, 髄質へ移行する. 胸腺髄質上皮 細胞(mTEC) により提示された自己抗原に反応するクローンは排除される(負の選択). B. 脊椎動物の三つのタイプのプロテアソーム. β5t を組み込んだ胸腺プロテアソームを新たに発見した. C. β5t は胸腺のみに発現する(ウエスタンブロット).

- β5t は cTEC に特異的に発現する. Ly51: cTEC マーカー. UEA-I: mTEC マーカー (胸腺免疫染色). D.





A. β5 ファミリーの S1 ポケットを構成するアミノ酸. プロテアソームはキモトリプシン様,トリプシン様,カスパーゼ様の3種類 の活性を有し,それぞれ疎水性,塩基性,酸性アミノ酸の後ろのペプチド結合を切断する.これらの基質特異性は各サブユニットの S1 ポケットと呼ばれる構造を構成するアミノ酸の性質により規定される.構成型および免疫プロテアソームのサブユニットβ5,β5i の S1 ポケットが主に疎水性アミノ酸(白抜き文字)により構成されているのに対し,β5tでは反対に親水性アミノ酸(黒字)により 構成されている.このことからβ5tを組み込んだプロテアソームではキモトリプシン様活性が低下していることが予想される. B. β5,β5tのポケットの構造モデル.β5tのS1 ポケット表面がβ5 に比べてより親水性が高いことがわかる.(名古屋市立大学水恒 裕博士によるモデリング.) C. 胸腺プロテアソームは MHC クラスI 結合ペプチド産生に重要な活性であるキモトリプシン様活性が特異的に低下している.



図8 胸腺プロテアソームは胸腺における CD8 陽性 T 細胞の分化に必須である 胸腺細胞の FACS 解析. β5t 欠損マウスでは CD8SP 細胞への分化が著しく障害されている.

かの分子を特異的に分解することによって分化を制御して いるという考え方も完全には否定できないが、20S プロテ アソームが分解基質を選択している可能性はこれまでの研 究から考え難く、cTEC において胸腺プロテアソームに よって産生され MHC クラス I に提示されるペプチドレ パートリーこそが CD8⁺ T 細胞の正の選択のために必須で あると考えることがもっとも可能性として高い.

e) 正の選択モデル再考

正の選択も負の選択も同じ TCR と MHC との相互作用 によってもたらされるにもかかわらず,正反対の結果とな る理由は未だ不明である.従来,正負の選択は TCR と MHC/自己ペプチドの親和性の総和(アビディティー)の 強さの程度に応じて引き起こされるというアビディティー モデルが一般に受け入れられてきた.このアビディティー の差が TCR を介した T 細胞内のシグナル伝達に違いを引 き起こし,T 細胞の運命も振り分けられていると考えられ ている.

野生型マウスとβ5t 欠損マウスの cTEC の H-2K⁶ (MHC クラスIの一種)の発現量はほぼ同等であった.このこと は胸腺プロテアソームも MHC クラスIに結合し安定化さ せるペプチドを産生していることを示唆すると同時に, MHC クラスIの発現レベルではなく cTEC の MHC 上に提 示されているペプチドレパートリーの特殊性こそが正の選 択に重要であることを示唆する.

解釈の仕方として、構成型や免疫プロテアソームが産生 するペプチドに比べて低親和性だが MHC クラス I を安定 化させるために必要十分な性質をもったペプチドを MHC クラス I に提示させることによって、適切な強さの TCR-MHC/自己ペプチド間の相互作用を与えて正の選択を行っ ているというアビディティーモデルに沿った考え方が可能 である.一方, cTEC は末梢や胸腺の髄質とは異なったペ プチドレパートリーを提示しているということが本質的で あり,ペプチドが低親和性か高親和性かにかかわらず正の 選択を行うことが可能で,cTEC の働きによって幅広い TCR レパートリーを確保した後,髄質で自己反応性のT 細胞を消去することで生体に有利なレパートリーを形成さ せているという考え方もできる.あるいは,胸腺プロテア ソームは正の選択を可能にする特別なペプチドを産生して いる可能性もある.直接的にcTEC の MHC 上のペプチド の性質を明らかにすることによって,より正確な正の選択 の機構が明らかになることが期待される.

おわりに

これまで存在するかどうかさえ不明であった正の選択の ための特別な分子機構が実際に存在し、それが MHC によ り提示されるペプチドの性質にもとづいていることが胸腺 プロテアソームの発見によって明らかになった.しかも活 性の特異性を1箇所変換するだけで,免疫の根幹に関わる 重要な現象が制御されている点が、プロテアソームの触媒 活性の基質特異性の重要性を示している. 20S プロテア ソームはユビキチンシステムのない古細菌にも存在する が, それらは単一の活性型βサブユニットを有しており, 従ってただ1種類の活性を 20S プロテアソーム内に14 個 有している.一方, 真核生物では上記の3種類の別々の触 媒活性をもつ異なった活性サブユニットを有するようにな り (表1), 20S プロテアソーム内の活性部位総数を6個 に減らした.この必然性はどこにあるのであろうか?こ れは酵母を用いた遺伝学でも未だ明らかになっていない. プロテアソームには限定分解作用, すなわちタンパク質全 長を分解せず固い折り畳み構造をもったドメインをインタ クトな状態で切り離す作用をもつことが知られる.例えば YB-1と呼ばれる転写因子はプロテアソームのカスパーゼ 様活性で機能的ドメインが切り離されることによりはじめ て転写因子として活性化されることが知られる.またプロ テアソームにより限定分解を受ける他の分子(eIF4F, eIF3, NF-κB p105)も 20S プロテアソームの特定の活性に依存 していることが示唆されている.このようなより制御され たタンパク質限定分解のために3種類の活性が必要とされ ることが推定されるが,より明快な解析,例えば遺伝学的 なアプローチでの解明が望まれる.

また近年、プロテアソームと疾患との関連が知られはじ めてきた. プロテアソームが臨床医学の分野で登場するの は、悪性腫瘍治療の標的としてである。当初 NF-kB 経路 を阻害する目的でプロテアソーム阻害剤 bortezomib が多 発性骨髄腫の治療に用いられ、有効性が確認されたのがは じまりであるが、現在では様々な作用機序で多発性骨髄腫 以外の悪性腫瘍にも効果を示すことが分かりはじめてき た. 以前よりプロテアソームの発現が悪性腫瘍で亢進して いることが知られていたが、プロテアソームの広範な働 き、ことに細胞増殖における働きを鑑みれば、通常非分裂 の正常細胞と盛んに増殖を繰り返す腫瘍細胞への毒性の差 により抗腫瘍効果を示すことは理解可能である. 日本にお けるbortezomibの臨床試験では重篤な副作用が問題と なったが、プロテアソームが魅力的な抗がん剤のターゲッ トであることは揺るぎなく、新しいプロテアソーム阻害剤 の臨床試験もアメリカを中心に施行されている.しかしそ もそも何故プロテアソームが悪性腫瘍で高発現するのか. その機構は不明である. 今後はプロテアソームの発現制御 や分子集合を標的にした新しいタイプのプロテアソーム阻 害剤も検討されるべきであろう.また最近,20Sプロテア ソームの α1 サブユニットの転写量を上げる一塩基多型が 心筋梗塞のリスクファクターであるという興味深い報告が なされたが、その機構は全く不明である.

プロテアソームには深い生理的な謎がまだまだ多く秘め られていると考えられ、その重要性は今後ますます増して くると思われる.

謝辞

本研究は筆者が東京都臨床医学総合研究所在籍の10年 間に,田中啓二博士(同研究所所長代行)のご指導をいた だきながら進めてきたものです.深く感謝申し上げます. 本研究は同研究所において平野祐子博士,濱崎純博士,千 葉智樹博士(筑波大学教授),川原裕之博士(首都大学東 京教授),古山香織さんをはじめ研究室の全ての方,そし て非常に有益な共同研究を行っていただいた高浜洋介博士 (徳島大学教授)からのサポートによりなしえたことであ り、ここに厚くお礼申し上げます.

献

文

- Baumeister, W., Walz, J., Zuhl, F., & Seemuller, E. (1998) *Cell*, 92, 367–380.
- Coux, O., Tanaka, K., & Goldberg, A.L. (1996) Annu. Rev. Biochem., 65, 801–847.
- Yoshimura, T., Kameyama, K., Takagi, T., Ikai, A., Tokunaga, F., Koide, T., Tanahashi, N., Tamura, T., Cejka, Z., Baumeister, W., et al. (1993) J. Struct. Biol., 111, 200–211.
- Glickman, M.H., Rubin, D.M., Coux, O., Wefes, I., Pfeifer, G., Cjeka, Z., Baumeister, W., Fried, V.A., & Finley, D. (1998) *Cell*, 94, 615–623.
- Hirano, Y., Hayashi, H., Iemura, S., Hendil, K.B., Niwa, S., Kishimoto, T., Kasahara, M., Natsume, T., Tanaka, K., & Murata, S. (2006) *Mol. Cell*, 24, 977–984.
- Hirano, Y., Hendil, K.B., Yashiroda, H., Iemura, S., Nagane, R., Hioki, Y., Natsume, T., Tanaka, K., & Murata, S. (2005) *Nature*, 437, 1381–1385.
- Kusmierczyk, A.R., Kunjappu, M.J., Funakoshi, M., & Hochstrasser, M. (2008) Nat. Struct. Mol. Biol., 15, 237–244.
- Le Tallec, B., Barrault, M.B., Courbeyrette, R., Guerois, R., Marsolier-Kergoat, M.C., & Peyroche, A. (2007) *Mol. Cell*, 27, 660–674.
- 9) Murata, S. (2006) *IUBMB Life*, 58, 344-348.
- Ramos, P.C., Hockendorff, J., Johnson, E.S., Varshavsky, A., & Dohmen, R.J. (1998) *Cell*, 92, 489–499.
- Yashiroda, H., Mizushima, T., Okamoto, K., Kameyama, T., Hayashi, H., Kishimoto, T., Niwa, S., Kasahara, M., Kurimoto, E., Sakata, E., Takagi, K., Suzuki, A., Hirano, Y., Murata, S., Kato, K., Yamane, T., & Tanaka, K. (2008) *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 15, 228–236.
- 12) Groll, M., Ditzel, L., Lowe, J., Stock, D., Bochtler, M., Bartunik, H.D., & Huber, R. (1997) *Nature*, 386, 463–471.
- 13) Unno, M., Mizushima, T., Morimoto, Y., Tomisugi, Y., Tanaka, K., Yasuoka, N., & Tsukihara, T. (2002) *Structure*, 10, 609–618.
- 14) Lam, Y.A., Lawson, T.G., Velayutham, M., Zweier, J.L., & Pickart, C.M. (2002) *Nature*, 416, 763–767.
- 15) Pickart, C.M. & Cohen, R.E. (2004) Nat. Rev. Mol. Cell. Biol., 5, 177–187.
- 16) Wolf, D.H., & Hilt, W. (2004) Biochim. Biophys. Acta, 1695, 19–31.
- 17) Richly, H., Rape, M., Braun, S., Rumpf, S., Hoege, C., & Jentsch, S. (2005) *Cell*, **120**, 73–84.
- 18) Verma, R., Oania, R., Graumann, J., & Deshaies, R.J. (2004) Cell, 118, 99–110.
- 19) Mayor, T., Lipford, J.R., Graumann, J., Smith, G.T., & Deshaies, R.J. (2005) *Mol. Cell. Proteomics*, 4, 741–751.
- 20) Mayor, T., Graumann, J., Bryan, J., MacCoss, M.J., & Deshaies, R.J. (2007) Mol. Cell. Proteomics, 6, 1885–1895.
- 21) Braun, B.C., Glickman, M., Kraft, R., Dahlmann, B., Kloetzel, P.M., Finley, D., & Schmidt, M. (1999) *Nat. Cell. Biol.*, 1, 221–226.
- 22) Verma, R., Aravind, L., Oania, R., McDonald, W.H., Yates, J. R., 3rd, Koonin, E.V., & Deshaies, R.J. (2002) *Science*, 298, 611–615.
- 23) Yao, T. & Cohen, R.E. (2002) Nature, 419, 403-407.
- 24) Smith, D.M., Chang, S.C., Park, S., Finley, D., Cheng, Y., & Goldberg, A.L. (2007) Mol. Cell., 27, 731–744.

- (25) Kohler, A., Cascio, P., Leggett, D.S., Woo, K.M., Goldberg, A. L., & Finley, D. (2001) Mol. Cell, 7, 1143–1152.
- 26) Whitby, F.G., Masters, E.I., Kramer, L., Knowlton, J.R., Yao, Y., Wang, C. C., & Hill, C.P. (2000) *Nature*, 408, 115–120.
- 27) Murata, S., Udono, H., Tanahashi, N., Hamada, N., Watanabe, K., Adachi, K., Yamano, T., Yui, K., Kobayashi, N., Kasahara, M., Tanaka, K., & Chiba, T. (2001) *EMBO J.*, 20, 5898– 5907.
- 28) Michalek, M.T., Grant, E.P., Gramm, C., Goldberg, A.L., & Rock, K.L. (1993) *Nature*, 363, 552–554.
- 29) Rock, K.L., Gramm, C., Rothstein, L., Clark, K., Stein, R., Dick, L., Hwang, D., & Goldberg, A.L. (1994) *Cell*, 78, 761– 771.
- 30) Rock, K.L., York, I.A., & Goldberg, A.L. (2004) Nat. Immunol., 5, 670–677.
- 31) Rock, K.L. & Goldberg, A.L. (1999) Annu. Rev. Immunol., 17, 739–779.
- 32) Kloetzel, P.M. (2001) Nat. Rev. Mol. Cell. Biol., 2, 179-187.
- 33) Schubert, U., Anton, L.C., Gibbs, J., Norbury, C.C., Yewdell, J.W., & Bennink, J.R. (2000) *Nature*, 404, 770–774.
- 34) Griffin, T.A., Nandi, D., Cruz, M., Fehling, H.J., Kaer, L.V., Monaco, J.J., & Colbert, R.A. (1998) J. Exp. Med., 187, 97– 104.
- 35) Tanaka, K. & Kasahara, M. (1998) Immunol. Rev., 163, 161– 176.
- 36) Fehling, H.J., Swat, W., Laplace, C., Kuhn, R., Rajewsky, K., Muller, U., & von Boehmer, H. (1994) *Science*, 265, 1234– 1237.
- 37) Van Kaer, L., Ashton-Rickardt, P.G., Eichelberger, M., Gaczynska, M., Nagashima, K., Rock, K.L., Goldberg, A.L., Doherty, P.C., & Tonegawa, S. (1994) *Immunity*, 1, 533–541.
- 38) Basler, M., Moebius, J., Elenich, L., Groettrup, M., & Monaco, J.J. (2006) J. Immunol., 176, 6665–6672.
- 39) Morel, S., Levy, F., Burlet-Schiltz, O., Brasseur, F., Probst-Kepper, M., Peitrequin, A.L., Monsarrat, B., Van Velthoven, R., Cerottini, J.C., Boon, T., Gairin, J.E., & Vanden Eynde, B. J. (2000) *Immunity*, 12, 107–117.
- 40) Tanahashi, N., Murakami, Y., Minami, Y., Shimbara, N.,

Hendil, K.B., & Tanaka, K. (2000) J. Biol. Chem., 275, 14336–14345.

- 41) Hill, C.P., Masters, E.I., & Whitby, F.G. (2002) Curr. Top. Microbiol. Immunol., 268, 73–89.
- 42) Rechsteiner, M., Realini, C., & Ustrell, V. (2000) Biochem. J., 345 Pt 1, 1–15.
- 43) Groettrup, M., Soza, A., Eggers, M., Kuehn, L., Dick, T.P., Schild, H., Rammensee, H.G., Koszinowski, U.H., & Kloetzel, P.M. (1996) *Nature*, 381, 166–168.
- 44) Dick, T.P., Ruppert, T., Groettrup, M., Kloetzel, P.M., Kuehn, L., Koszinowski, U.H., Stevanovic, S., Schild, H., & Rammensee, H.G. (1996) *Cell*, 86, 253–262.
- 45) Knowlton, J.R., Johnston, S.C., Whitby, F.G., Realini, C., Zhang, Z., Rechsteiner, M., & Hill, C.P. (1997) *Nature*, 390, 639–643.
- 46) Takayanagi, H., Ogasawara, K., Hida, S., Chiba, T., Murata, S., Sato, K., Takaoka, A., Yokochi, T., Oda, H., Tanaka, K., Nakamura, K., & Taniguchi, T. (2000) *Nature*, 408, 600–605.
- 47) Murata, S., Kawahara, H., Tohma, S., Yamamoto, K., Kasahara, M., Nabeshima, Y., Tanaka, K., & Chiba, T. (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 38211–38215.
- 48) Li, X., Lonard, D.M., Jung, S.Y., Malovannaya, A., Feng, Q., Qin, J., Tsai, S.Y., Tsai, M.J., & O'Malley, B.W. (2006) *Cell*, 124, 381–392.
- 49) Miyamoto, H., Moriishi, K., Moriya, K., Murata, S., Tanaka, K., Suzuki, T., Miyamura, T., Koike, K., & Matsuura, Y. (2007) J. Virol., 81, 1727–1735.
- 50) Moriishi, K., Okabayashi, T., Nakai, K., Moriya, K., Koike, K., Murata, S., Chiba, T., Tanaka, K., Suzuki, R., Suzuki, T., Miyamura, T., & Matsuura, Y. (2003) J. Virol., 77, 10237– 10249.
- 51) Moriishi, K., Mochizuki, R., Moriya, K., Miyamoto, H., Mori, Y., Abe, T., Murata, S., Tanaka, K., Miyamura, T., Suzuki, T., Koike, K., & Matsuura, Y. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104, 1661–1666.
- 52) Murata, S., Sasaki, K., Kishimoto, T., Niwa, S., Hayashi, H., Takahama, Y., & Tanaka, K. (2007) *Science*, 316, 1349–1353.