

微生物におけるユビキチン様分子とプロテアソームによるタンパク質分解

1. はじめに

真核生物同様のプロテアソームをもつ放線菌にはプロテアソームとその制御因子 ATPase の存在は確認されていたが、真核生物で知られているユビキチンによる分解シグナルの翻訳後修飾とその分解システムは存在しないと思われていた。しかし最近、ユビキチン様分子による翻訳後修飾とその修飾タンパク質がプロテアソームを介して分解されていることを示す研究が報告された¹⁾。本レビューでは、微生物版ユビキチン-プロテアソームシステムの分解機構についてこれまでの研究の流れを含めて記述したい。

2. 微生物におけるプロテアソーム

高分子量複合体プロテアーゼであるプロテアソームは1980年代には既に真核生物と古細菌でその存在が確認されていたが、真正細菌では確認されていなかった。特に大腸菌で進んでいたプロテアーゼ研究においても生化学的実験ではプロテアソームは確認されず、真正細菌にプロテアソームが存在するのかという議論が交わされていた。1994年、*Mycobacterium leprae* のゲノム情報よりプロテアソーム様遺伝子が存在していることが報告され²⁾、翌1995年初めてロドコッカス属放線菌よりプロテアソームが精製されその存在が確認された³⁾。放線菌由来プロテアソームは、古細菌同様、組換えタンパク質としても発現精製が可能であることから、以来、真正細菌におけるプロテアソーム研究は放線菌を中心に展開され現在に至っている。

放線菌由来プロテアソームは、複合体の成分構成がより単純化されており、真核生物が α タイプ7種と β タイプ7種の計14種のサブユニットから構成されているのに対して α と β 各1種の2成分で構成されている。しかし、その四次構造は種を超えて保存されており、いずれにおいても触媒活性部位を複合体内部に局在させ、細胞内タンパク質の無秩序な分解を自身の構造特性によって防いでいる。このため、分解されるタンパク質は、複合体内部へと続くわずかなスペースからなる入り口をアンフォールドされた状態で送り込まれる必要がある。つまり、プロテアソームはタンパク質が送り込まれるとシュレッターのごとくタンパク質を分解するのである。このとき、タンパク質の送り

手となるのはプロテアソームに相互作用する制御因子であり、この制御因子は、ATP 依存的に基質をアンフォールドする ATPase 複合体である。ロドコッカス属放線菌由来 ATPase は、真核生物由来制御因子との相同性より ARC (AAA ATPase forming ring-like complex) と名付けられており、プロテアソーム遺伝子上流にコードされている。当初、ARC を組換えタンパク質として大腸菌で発現し試験管内での再構成実験が行われた。その結果、ARC の ATPase 活性は確認できたものの、プロテアソームと ARC による ATP 依存的なタンパク質分解を確認することはできなかった⁴⁾。それは C 末端に His タグをつけて発現・精製したためにプロテアソームとの相互作用に必須な C 末端領域のアミノ酸が機能しなかったことによると考えられる⁵⁾。現在では、ARC のホモログである Mpa (*Mycobacterium proteasomal ATPase*) がプロテアソームの制御因子として機能することが明らかになり、また Mpa-プロテアソーム依存的に分解される標的タンパク質が複数決定されている⁵⁾。

3. 結核菌プロテアソーム研究からの新たな展開

2003年、Darwinらは、結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) のプロテアソームは同菌体の一酸化炭素 (NO) 抵抗性に必須であることを発表した。マクロファージは、NO と他の反応性窒素中間体を産生し結核菌感染を防御するが、この防御は不完全であり感染が継続することが知られる。そこで、結核菌の反応性窒素中間体に対する抵抗性に関与する遺伝子をトランスポゾンライブラリーから探索し解析した結果、プロテアソームが酸化・窒素化ストレスへの防御として機能していると考えられた⁶⁾。このとき、単離された遺伝子が ARC ホモログをコードする *mpa* と、プロテアソーム遺伝子下流にコードされている *pafA* (proteasomal accessory factorA) であった (図 1A)。そして、それぞれの遺伝子を破壊した変異株ではプロテアソーム活性阻害剤を添加して不活化したときと同様、基質タンパク質の細胞内蓄積が観察された。更に、大腸菌を宿主としたツーハイブリッドシステムを利用して Mpa に対して相互作用するタンパク質を検索した結果、Pup (prokaryotic ubiquitin-like protein) と名付けられたタンパク質が同定された¹⁾。

話は遡ってロドコッカス属放線菌からプロテアソームが同定された頃、同酵素をコードする遺伝子構造にある疑問がもたれていた。プロテアソームをコードする 2 遺伝子 (*prcB-prcA*) に加えて、その上流の 64 アミノ酸からなるタンパク質をコードするオープンリーディングフレーム

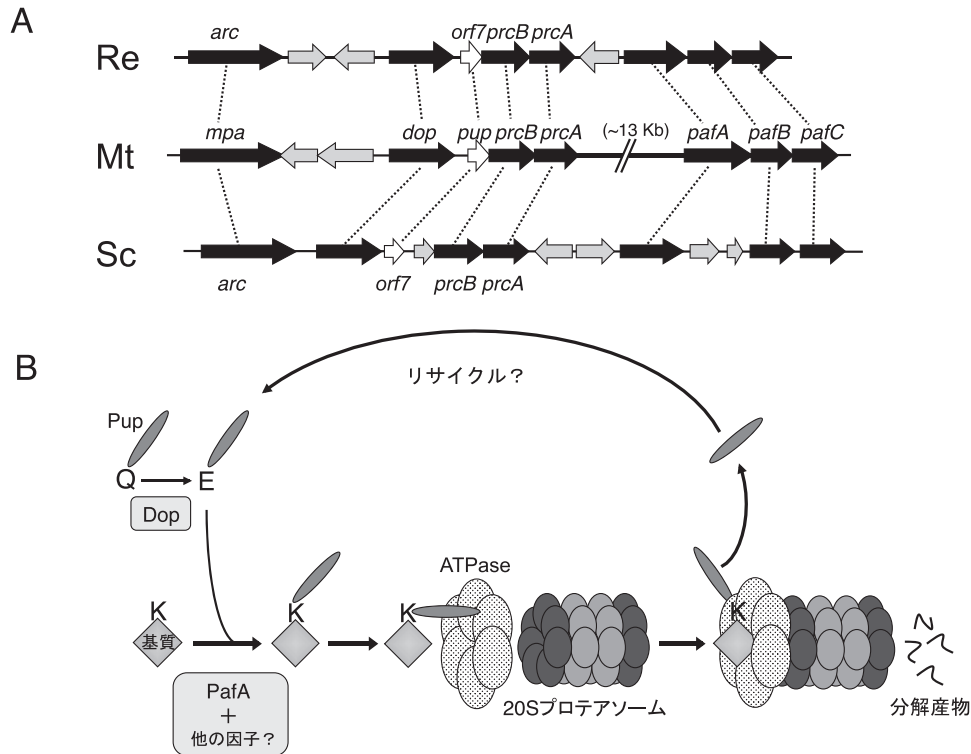


図1 ユビキチン様分子 (Pup) とプロテアソームによるタンパク質分解
 A. 放線菌におけるプロテアソーム遺伝子の構造比較, Re, *Rhodococcus erythropolis*; Mt, *Mycobacterium tuberculosis*; Sc, *Streptomyces coelicolor*.
 B. Pup-プロテアソーム分解システムの反応モデル (詳細は本文参照).

(ORF; 当時 ORF7 と呼ばれていた) までもがオペロンを形成していたことである (図 1A). この低分子とユビキチン分子には, 低いながらも部分的な相同性が認められたことに加え C 末端配列 (Gly-Gly-Gln-COOH) が似ていたことから, 微生物版ユビキチンかと研究者達は予想した. そこで, 我々も含め ORF7 遺伝子産物の機能・構造解析が試みられたが成果が得られなかった. 当時, ロドコッカス属細菌の汎用性の高い宿主-ベクター系がなかったことや, プロテアソームが必須遺伝子ではないため表現型での解析が困難であったことに加え, 組換えタンパク質としての ORF7 の発現・精製が容易でなかったことなどによると考えられる. この ORF7 の遺伝子産物が結核菌で同定された Pup 分子そのものであった.

4. Pup は分解シグナルとしてタンパク質に翻訳後修飾される (図 1B)

Pup が Mpa と相互作用することに加えて, 部分的ながらユビキチン様配列をもつことから, Pup が Mpa-プロテ

アソーム依存的なタンパク質分解に関与していると考えられ, マイコバクテリア属放線菌内に His タグを融合した Pup タンパク質を発現して, アフィニティークロマトグラフィーで精製することが試みられた. すると驚いたことに Pup 分子より高分子領域にバンドが多数確認され, 細胞内タンパク質が Pup によって修飾されたと考えられた^{1,7)}. 同様の現象は, プロテアソームの基質として同定された FabD (malonyl Co-A acyl carrier protein transacylase) や PanB (ketopantoate hydroxymethyltransferase) を用いた実験でも確認された¹⁾.

Pup 化タンパク質の Pup 修飾様式は, 質量分析で明らかにされ, Pup の C 末端残基のグルタミンが, グルタミン酸に変換され標的タンパク質上のリジン残基に結合していることが判明した^{1,7)}. Pup の C 末端は完全に保存されておらずグルタミン酸もしくはグルタミンである. 従って C 末端がグルタミンの場合, 脱アミド反応が起こりグルタミン酸へ変換された後, グルタミン酸の γ -カルボキシル基と標的タンパク質のリジン残基の ϵ -アミノ基との間でペプチ

ド結合が形成されると考えられる。ごく最近、脱アミノ反応を触媒するタンパク質として Dop (deamidase of Pup) と言うタンパク質が同定された⁸⁾。この遺伝子はプロテアソーム遺伝子上流にコードされており PafA に相同性を示すタンパク質である (図 1A)。Dop による脱アミド反応には ATP の加水分解を必要としないが、ATP は補因子として必須であることが明らかになった。プロテアソームの基質である FabD と PanB の Pup による修飾は 1 箇所・1 分子のみで分解シグナルとして機能することから、ユビキチン鎖のように Pup に対して更に Pup 化された poly-Pup 鎖の形成は必要ないかもしれない。

Pup 修飾されたタンパク質は、野生株に対しプロテアソーム欠損株でその消失速度が遅くなるほか、Pup 化される部位に変異を導入することで Pup 化の抑制とともに分解速度の遅延が起こる。上記ツーハイブリッド実験の結果から、Pup 化タンパク質は、Pup が分解シグナルとして Mpa に認識されその後プロテアソームにより分解を受けると考えられる。

次に、PafA 機能の欠損はプロテアソームの基質タンパク質を細胞内に蓄積させることから、Pup との関連性を調べると、*pafA* 破壊株では Pup 化反応が消失することが判明し、PafA が Pup 修飾反応に必須であることが明らかとなった⁹⁾。バイオインフォマティクス解析によると、PafA は酸-アンモニア・アミンリガーゼスーパーファミリーに属する酵素と推定される⁹⁾。このファミリーに属する酵素はアンモニアもしくはアミノ酸のアミノグループとカルボン酸を ATP 依存的に結合させる反応を触媒する。PafA の組換えタンパク質を用いた再構成実験において基質 FabD が C 末端のグルタミンをグルタミン酸に置換した Pup によって修飾されることから、PafA は単独で Pup を標的タンパク質に修飾する活性を持つことが示された⁹⁾。真核生物では、ユビキチンの活性化に始まり、基質認識とユビキチン修飾まで基本的に E1, E2, E3 の 3 種の酵素が必要となるが、真正細菌では、PafA 単独で全ての標的タンパク質の選別と Pup 修飾を行うのか、それとも状況に応じて他の因子と連携して Pup 修飾反応を起こすのか今後の検討が必要である。

5. プロテアソームによる Pup 化タンパク質の分解

Pup 化タンパク質のプロテアソームによる分解はどのように行われるのだろうか。Pup のアミノ酸配列の保存性は、真核生物で高度に保存されているユビキチンとは異なり C 末端の 20 数残基が高度に保存されているだけであ

る。これは、全長の約 1/3 に過ぎない。また、N 末端領域の保存性は C 末端に比べると著しく低く、長さも異なる。このことから、Mpa は、Pup のどのようなアミノ酸配列や構造を特異的に認識しているのか興味深い。この点に関して Liao らは、NMR を利用して Pup と Mpa の相互作用について、Pup の 30 から 59 残基の範囲における疎水表面が相互作用に重要であることを示唆している¹⁰⁾。また、ユビキチンは、ユビキチン化タンパク質の分解時にイソペプチダーゼの関与によりリサイクルされるが、Pup がリサイクルされるのかについてもまだ不明である (図 1B)。

さて、細胞内のタンパク質分解においてプロテアソームは Pup 化タンパク質だけを分解するのだろうか。我々は、ロドコッカス属放線菌のプロテアソームの β サブユニットをコードする遺伝子 (*prcB*) を単独破壊した菌株、あるいは *prcB* と *arc* 遺伝子の二重破壊株を構築しプロテアソームの機能解析を試みた。両破壊株に、触媒活性部位に変異を導入した不活性型プロテアソームを発現すると、同酵素が分解するタンパク質を複合体内部に取り込んだプロテアソーム-基質複合体が細胞内に蓄積する。野生株、並びに *prcB* 破壊株では、プロテアソームに基質を選別し送り込む ATPase は欠失していないので、プロテアソームと基質タンパク質を共精製し電気泳動で観察することができる。そして、*prcB* と *arc* の二重破壊株に不活性型プロテアソームを発現した場合、同酵素と共精製されるタンパク質が著しく減るかというよりは多くの細胞内タンパク質が共精製されてくるのである (未発表データ)。一方、宿主細胞に His タグ融合 Pup を過剰発現し、上記遺伝子破壊株と野生株から Pup 化タンパク質を精製して電気泳動で比較すると、タンパク質のバンドパターンに大きな違いは認められない。また、*prcB* 破壊株に対して *prcB* と *arc* の二重破壊株における Pup 化タンパク質の細胞内蓄積量が著しく増加するという印象もあまり受けない。

これらの結果は、細胞内のプロテアソーム依存的なタンパク質分解は、単純に Pup 化されたタンパク質を ARC とともに分解しているだけではなく Pup 化タンパク質以外の分解にも大きく寄与していることを強く示唆している。また、Pup 化タンパク質は、プロテアソーム以外のプロテアーゼによっても分解されるのかもしれない (未発表データ)。

酵母 26S プロテアソームの制御因子複合体のうち、ATPase である Rpt4 (regulatory particle triple-A protein) 単独、あるいは Rpt1/2 からなる組換え ATPase 複合体は、古細菌由来プロテアソームと作用して ATP 依存性タンバ

ク質分解活性を上昇させることが確認されている¹¹⁾。この時、プロテアソームとATPaseが結合した複合体は確認されず、両複合体の相互作用には安定な物理的相互作用は必要ないのかもしれない。従って、条件を整えば他のATPase複合体でもプロテアソームに基質を提供するパートナーとして機能するのかもしれない。

ロドコッカス属細菌や大腸菌を宿主とした組換えPupの精製が困難であることは、発現したPupの半減期が両宿主では非常に早いことを意味する。細胞内ATP依存性プロテアーゼは、高次構造を取らない状態に近いタンパク質についてはサイズや種類を問わずよく分解する。Pupはユビキチンとは異なり安定な構造を取っていないと考えられることから¹⁰⁾、他のATP依存性プロテアーゼにも認識され分解される可能性がある。

6. おわりに

これまで、微生物における選択的なタンパク質分解として、N末端アミノ酸の性質依存的にその半減期が決定されるN末端則¹²⁾や、終止コドンが欠失したmRNA上でタンパク質合成が滞ってしまったリボソームを解除するために分解シグナルと終止コドンを提供するtmRNA (transfer-messenger RNA) によるC末端への分解シグナル付加¹³⁾などが大腸菌を中心に研究されてきた。

今回紹介したPupタンパク質とその関連分子並びにプロテアソームは、放線菌のゲノムでは遺伝子クラスターとして一定の領域内にコードされていることが明らかになっているが(図1A)、近年の細菌のゲノム解析によって、放線菌以外のグラム陰性菌にも同様のクラスターが存在することが明らかになっており、Pupによる翻訳後修飾機構とPup化タンパク質の分解系が広く保存されていることが示唆されている¹⁴⁾。放線菌から端を発したPup依存性タンパク質分解系については、まだその系の一部が解明されたのみであり不明な点はまだまだ存在するが、今後の研究の進展に期待したい。

- 1) Pearce, M.J., Mintseris, J., Ferreyra, J., Gygi, S.P., & Darwin, K.H. (2008) *Science*, **322**, 1104–1107.
- 2) Lupas, A., Zwickl, P., & Baumeister, W. (1994) *Trends Biochem. Sci.*, **19**, 533–534.
- 3) Tamura, T., Nagy, I., Lupas, A., Lottspeich, F., Cejka, Z., Schoofs, G., Tanaka, K., De Mot, R., & Baumeister, W. (1995) *Curr. Biol.*, **5**, 766–774.
- 4) Wolf, S., Nagy, I., Lupas, A., Pfeifer, G., Cejka, Z., Muller, S. A., Engel, A., De Mot, R., & Baumeister, W. (1998) *J. Mol. Biol.*, **277**, 13–25.

- 5) Pearce, M.J., Arora, P., Festa, R.A., Butler-Wu, S.M., Gokhale, R.S., & Darwin, K.H. (2006) *EMBO J.*, **25**, 5423–5432.
- 6) Darwin, K.H., Ehrt, S., Gutierrez-Ramos, J.-C., Weich, N., & Nathan, C.F. (2003) *Science*, **302**, 1963–1966.
- 7) Burns, K.E., Liu, W.-T., Boshoff, H.I.M., Dorresteijn, P.C., & Barry 3rd, C.E. (2009) *J. Biol. Chem.*, **284**, 3069–3075.
- 8) Striebel, F., Imkamp, F., Sutter, M., Steiner, M., Mamedov, A., & Weber-Ban, E. (2009) *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **16**, 647–652.
- 9) Iyer, L.M., Burroughs, A.M., & Aravind, L. (2008) *Biol. Direct*, **3**: 45.
- 10) Liao, S., Shang, Q., Zhang, X., Zhang, J., Xu, C., & Tu, X. (2009) *Biochem. J.*, **422**, 207–215.
- 11) Takeuchi, J. & Tamura, T. (2004) *FEBS Lett.*, **565**, 39–42.
- 12) Tobias, J.W., Shrader, T.E., Rocap, G., & Varshavsky, A. (1991) *Science*, **254**, 1374–1377.
- 13) Keiler, K.C. (2008) *Annu. Rev. Microbiol.*, **62**, 133–151.
- 14) De Mot, R. (2007) *Trends Microbiol.*, **15**, 335–338.

田村 範子¹, 尹 恵娟², 田村 具博^{1,2}

(¹産業技術総合研究所ゲノムファクトリー研究部門)

(²北海道大学大学院農学院基礎環境微生物学分野)

Ubiquitin-like protein involved in the proteasomal protein degradation in bacteria

Noriko Tamura¹, Hea-Yeon, Yun², and Tomohiro Tamura^{1,2}

(¹Research Institute of Genome-based Biofactory, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST); ²Laboratory of Molecular Environmental Microbiology, Graduate School of Agriculture, Hokkaido University, 2-17-2-1 Tsukisamu-Higashi, Toyohira-ku, Sapporo 062-8517, Japan)

線虫 *C. elegans* の神経系における感覚-運動変換機構

はじめに

動物の持つ神経系の重要な働きのひとつは、環境中からもたらされる様々な感覚情報を適切に行動に反映させることである。sensory-motor transformation (感覚-運動変換) とは、このような感覚入力から行動出力への変換の過程をいう。感覚-運動変換の研究は、行動出力、あるいは神経細胞の電氣的応答などと、感覚入力との因果関係が明瞭であることから、いろいろな感覚系を対象に分子レベル、神経細胞レベル、少数の神経細胞からなる局所回路レベルなど、さまざまな階層で行われてきているが、きわめて複雑な回路構造を持つ高等動物の脳・神経系においては、その全体像を理解することは容易ではない。