

子が増加し、局在が変化している可能性も考えられる。今後はさらにアイソフォームによる翻訳後修飾の違いについても精査する必要がある。

#### 4. おわりに

イムノプロットでは、変性タンパク質が対象となるため抗原部位に抗体がアクセスしやすい状態にあるが、免疫組織化学では立体構造をとり、時には複合体を形成したタンパク質が対象となるため、抗原部位が隠されて抗体に認識されなくなる可能性もある。イムノプロットによりマウス脳の細胞分画を解析すると SNAP-25b はシナプス膜画分に多く確認されたが、免疫電子顕微鏡法により苔状繊維神経の軸索を観察すると SNAP-25b のほとんどのシグナルは軸索細胞内に認められ細胞膜では検出されなかった。この原因はまだ明らかではないが、結合していないフリーの SNAP-25 しか認識しないモノクローナル抗体も存在することから<sup>10)</sup>、本研究のアイソフォーム特異抗体も細胞膜上の SNARE 複合体に含まれる SNAP-25 には結合しない可能性も考えられる。今回わずかな違いでもエピトープを選ぶことで特異抗体を作製できることを示せたが、今後はこれらの特徴をうまく利用し各神経細胞でのアイソフォームの存在様式の違いを把握できる可能性がある。

SNAP-25 変異マウスでは多動や不安などの行動異常が認められ、症例対照研究においても SNAP-25 の発現低下や変異と注意欠陥多動性障害や統合失調症との関連性が報告されている<sup>11)</sup>。また SNAP-25 は抑制性シナプスや一部の興奮性のシナプスでは発現しないという報告もあり<sup>12)</sup>、SNAP-23 がその機能を担う可能性も考えられる。SNAP-25 の各アイソフォームの分子機構を明らかにしていくことは、これらの病態の解明にも貢献する可能性があると考えられる。

- 1) Sudhof, T.C. (2004) *Annu. Rev. Neurosci.*, 27, 509–547.
- 2) Bark, I.C. & Wilson, M.C. (1994) *Gene*, 139, 291–292.
- 3) Yamamori, S., Itakura, M., Sugaya, D., Katsumata, O., Sakagami, H., & Takahashi, M. (2011) *J. Comp. Neurol.*, 519, 916–932.
- 4) Boschert, U., O’Shaughnessy, C., Dickinson, R., Tessari, M., Bendotti, C., Catsicas, S., & Pich, E.M. (1996) *J. Comp. Neurol.*, 367, 177–193.
- 5) Sorensen, J.B., Nagy, G., Varoqueaux, F., Nehring, R.B., Brose, N., Wilson, M.C., & Neher, E. (2003) *Cell*, 114, 75–86.
- 6) Delgado-Martinez, I., Nehring, R.B., & Sorensen, J.B. (2007) *J. Neurosci.*, 27, 9380–9391.
- 7) Johansson, J.U., Ericsson, J., Janson, J., Beraki, S., Stanic, D.,

- Mandic, S.A., Wikström, M.A., Hökfelt, T., Ogren, S.O., Rozzell, B., Berggren, P.O., & Bark, C. (2008) *PLoS Genet.*, 4, e1000278.
- 8) Hess, D.T., Slater, T.M., Wilson, M.C., & Skene, J.H. (1992) *J. Neurosci.*, 12, 4634–4641.
- 9) Huang, K., Yanai, A., Kang, R., Arstikaitis, P., Singaraja, R.R., Metzler, M., Mullard, A., Haigh, B., Gauthier-Campbell, C., Gutekunst, C.A., Hayden, M.R., & El-Husseini, A. (2004) *Neuron*, 44, 977–986.
- 10) Xiao, J., Xia, Z., Pradhan, A., Zhou, Q., & Liu, Y. (2004) *J. Neurosci. Res.*, 75, 143–151.
- 11) Faraone, S.V., Perlis, R.H., Doyle, A.E., Smoller, J.W., Goralnick, J.J., Holmgren, M.A., & Sklar, P. (2005) *Biol. Psychiatry*, 57, 1313–1323.
- 12) Matteoli, M., Pozzi, D., Grumelli, C., Condliffe, S.B., Frassoni, C., Harkany, T., & Verderio, C. (2009) *Neuroscience*, 158, 223–230.

山森 早織, 板倉 誠  
(北里大学医学部生化学)

Differential expression and function of SNAP-25 family proteins in the mouse brain

Saori Yamamori and Makoto Itakura (Department of Biochemistry, Kitasato University School of Medicine, Sagami-hara, Kanagawa 228–8555, Japan)

## Unstructured 領域を介したプロテアソームのタンパク質分解

### 1. はじめに

ユビキチン・プロテアソーム系 (Ubiquitin-Proteasome System: UPS) は、不要なタンパク質を分解するだけでなく、シグナル伝達や細胞周期などに関わる制御タンパク質を分解して、その濃度を調整することによりさまざまな細胞機能を制御している。UPS において最終的にタンパク質分解を担っているのはプロテアソームであるが、その基質となるタンパク質の選別は、基質タンパク質のポリユビキチン化を行うユビキチン修飾系によって行われていると長らく信じられてきた。しかしながら、ポリユビキチン化だけではプロテアソームによる基質選別をすべて説明できない。

近年、プロテアソームによって基質タンパク質が分解されるためには、基質タンパク質の内部にフラフラと構造をとらない領域 (Unstructured 領域) が存在する必要があることが明らかになった。この Unstructured 領域はプロテア

ソームによる基質タンパク質の選別や、分解効率に多大な影響を与える。本稿では、プロテアソームの基質タンパク質選別機構を、基質タンパク質に内在する Unstructured 領域に注目して紹介する。

## 2. Unstructured 領域を介したプロテアソームの基質認識

プロテアソームの基質タンパク質の選別機構として最もよく知られているのが、ユビキチン修飾系による基質タンパク質のポリユビキチン化である。ユビキチン活性化酵素 (E1)、ユビキチン結合酵素 (E2)、ユビキチンリガーゼ (E3) から構成されるユビキチン修飾系は、基質タンパク質にポリユビキチン鎖を取りつける。特に細胞内に数百種類ある E3 ユビキチンリガーゼが各々の基質タンパク質を特異的に認識するため、厳密に制御されたポリユビキチン化が可能となる。このように取りつけられたポリユビキチン鎖の長さがユビキチン分子四つ以上になると、プロテアソームに認識されるようになる。ポリユビキチン化タンパク質が直接プロテアソームに結合する経路に加えて、Rad23 などの UbL-Uba アダプタータンパク質によって、プロテアソームに運び込まれるバイパス経路も存在する。UbL-Uba アダプタータンパク質は、ユビキチン結合 (Ubiquitin associated : Uba) ドメインを介してポリユビキチン鎖と、ユビキチン様 (Ubiquitin-Like : UbL) ドメインを介してプロテアソームと結合するため、ポリユビキチン化した基質タンパク質をプロテアソームに運び込んで分解

を誘導する<sup>1)</sup>。

このようにポリユビキチン鎖や UbL ドメインは、プロテアソーム結合標識として、プロテアソームの基質タンパク質認識において重要な役割を果たす。しかしながら、プロテアソーム結合標識だけで基質選別が行われているわけではない。UbL-Uba アダプタータンパク質 Rad23 などは、プロテアソーム結合標識を持っているのにも関わらず、細胞内で安定して存在できる。また、オルニチン脱炭酸酵素 (ODC) などはユビキチン化されずにプロテアソームにより分解される。このような例外を説明することのできるメカニズムが近年明らかになりつつある。

さまざまなモデル基質タンパク質を用いた実験により、プロテアソームにより効率的に分解される基質タンパク質の条件が明らかとなってきた。Matouschek らのグループは、プロテアソーム結合標識 (ポリユビキチン鎖や UbL ドメイン) を取りつけたジドロ葉酸還元酵素 (DHFR) は、プロテアソームにより分解されないものの、さらに Unstructured 領域を取りつけると分解が飛躍的に増大することを見いだした (図 1A, B)<sup>2)</sup>。このことは、プロテアソームによる効率的分解には、ポリユビキチン鎖などのプロテアソーム結合標識に加え、Unstructured 領域が必要であることを示している。

プロテアソームの基質タンパク質分解過程における Unstructured 領域の役割は、プロテアソームの構造的特徴を考慮することにより、明快に説明することができる。26S プロテアソームは、リングが積み重なった円筒状の 20S

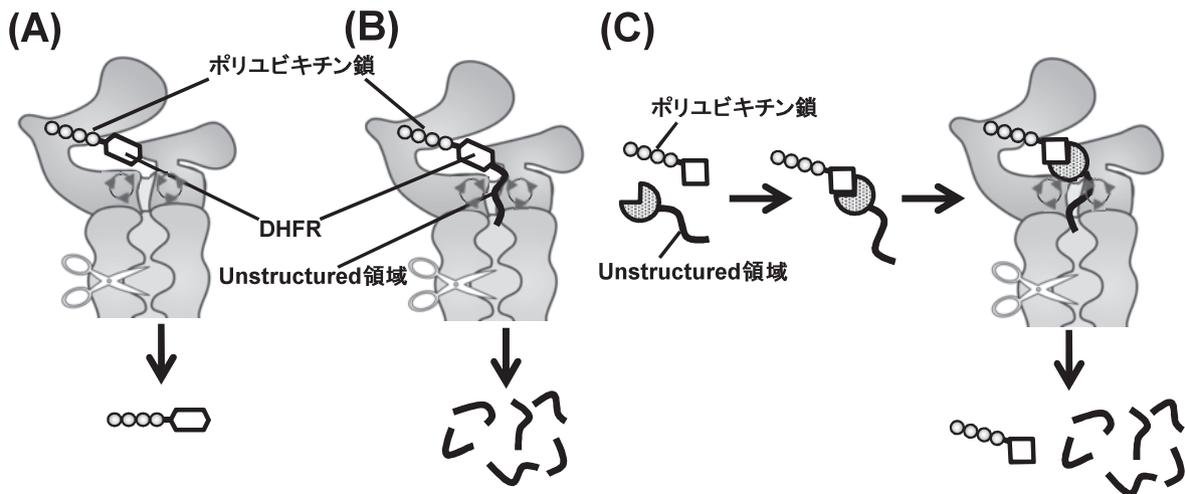


図1 基質タンパク質の Unstructured 領域とプロテアソームによる分解

(A) DHFR にポリユビキチン鎖のみを融合させた場合。(B) DHFR にプロテアソーム結合標識 (ポリユビキチン鎖) に加えて、Unstructured 領域を融合させた場合。(C) 複合体を形成する二つのタンパク質のうち、一方にポリユビキチン鎖を融合させ、他方に Unstructured 領域を融合させた場合。

複合体 (CP: Core Particle) の両側に二つの 19S 複合体 (RP: Regulatory Particle) が蓋をするような構造をとっている。20S 複合体の円筒の内部には分解活性部位があるが、円筒の入り口は非常に狭く、フォールドしたタンパク質は入り込めない。そのため基質タンパク質は 19S 複合体によりアンフォールドされなくてはならない。プロテアソーム結合標識を持つ基質タンパク質はまず 19S 複合体に認識される。そして、19S 複合体にある AAA ATPase サブユニットリング中心の狭いチャンネルにおいて、基質タンパク質は引っぱられ、アンフォールドが起こり 20S 複合体の円筒内部に送り込まれる。ATPase リングの狭いチャンネルに最初に入り込むことができるのは Unstructured 領域だけなので、Unstructured 領域がアンフォールディング反応の起点となる。このように、プロテアソーム結合標識によるタンパク質のプロテアソームへの運び込みの後にある、ATP リングによる Unstructured 領域の認識過程は、分解するか否かを決定する最終ステップとなる。

このような二段階の基質認識が行われていることから、プロテアソーム結合標識と Unstructured 領域の二つの分解シグナルは、複合体を形成する二つの別のサブユニットに分離することができる (図 1C)<sup>3)</sup>。一つのサブユニットにはプロテアソーム結合標識を、もう一つのサブユニットには Unstructured 領域を取りつけたモデルタンパク質複合体のプロテアソームによる分解を調べたところ、Unstructured 領域を持つサブユニットだけが特異的に分解されることが明らかとなった。実際のプロテアソームの基質の多くは複合体を形成しており、サブユニット特異的な分解により複合体の機能調整がなされていることが知られている。このようなサブユニット特異的な分解においては、プロテアソーム結合標識を持つサブユニットよりも、より有効な Unstructured 領域をサブユニットが、優先的に分解されるのである。

### 3. 分解を引き起こす Unstructured 領域の特徴

それではどのような特徴を持つ Unstructured 領域が分解シグナルとして有効に働くのであろうか？ 筆者らは、Unstructured 領域の性質が、その基質タンパク質のプロテアソームによる分解効率にどのように及ぼすのかをさまざまなモデル基質タンパク質を用いて詳細に調べた<sup>4,5)</sup>。

まず分解における Unstructured 領域の長さ依存性について調べるために、プロテアソーム結合標識 (テトラユビキチン鎖 (Ub<sub>4</sub>), Rad23 の UbL ドメイン) を融合した DHFR に、さまざまな長さの Unstructured 領域を取りつけ、それ

らの精製プロテアソームによる分解のされやすさを調べた (図 2A)。その結果、Unstructured 領域がタンパク質末端にある場合は、30~40 残基以上の長さの Unstructured 領域が効率的分解に必要であることがわかった。しかしながら Unstructured 領域が二つのドメインの間にある場合は、ほぼ 2 倍の長さが必要であった<sup>5)</sup>。Unstructured 領域を認識する 19S 複合体の ATPase チャンネルは狭いため、フォールドしたドメインは入り込めない。そのため Unstructured 領域の両端ドメインのブロック効果により Unstructured 領域はループ状に折れ曲がった状態で ATPase チャンネルに認識されていると考えられる。そのため 2 倍ほどの長さが必要なのであろう。

次にプロテアソーム結合標識と Unstructured 領域の距離と分解の関係を調べた。タイチン I27 ドメインの N 末端と C 末端は互いに離れているため、スペーサーとして利用できる。そこで、プロテアソーム結合標識を取りつけた DHFR と Unstructured 領域の間にタイチン I27 ドメインを次々に挿入し、両者間の距離をさまざまに変化させたモデル基質タンパク質を作製した (図 2A)。これらのプロテアソームによる分解効率と、プロテアソーム結合標識と Unstructured 領域の距離の関係を調べた結果、Ub<sub>4</sub> 基質の場合、I27 ドメインを 1 個でも挿入すると分解効率が大きく落ちることがわかった (図 2B, C)。これに対して、UbL 基質の場合、2 個の I27 ドメインを挿入したときに分解効率は最大となった。このように効率的な分解に必要な最適なスペーサーの長さが Ub<sub>4</sub> 基質と UbL 基質で異なっていた。

さらに、さまざまなスペーサー距離と Unstructured 領域の長さを組み合わせた基質タンパク質を作製し、その分解効率を調べたところ、スペーサー距離が最適でなくても、十分な長さの Unstructured 領域であれば、Unstructured 領域自体がスペーサーとして働き、効率的な分解を引き起こすことがわかった (図 2C, D)。このようにスペーサー距離と Unstructured 領域の長さ依存性は相補的に働く。

これらの結果はプロテアソーム結合標識と Unstructured 領域がそれぞれプロテアソーム上の別の場所で認識されることも示唆している。Unstructured 領域の認識部位は ATPase リングのチャンネルであると考えられる。そのためポリユビキチン鎖認識部位は ATPase リングのチャンネルに近い位置に、UbL ドメインの認識部位は ATPase チャンネルからある程度離れた位置にあると推測される。最近明らかとなった 19S プロテアソームの立体構造においても、UbL ドメイン認識サブユニットは ATPase チャンネルから

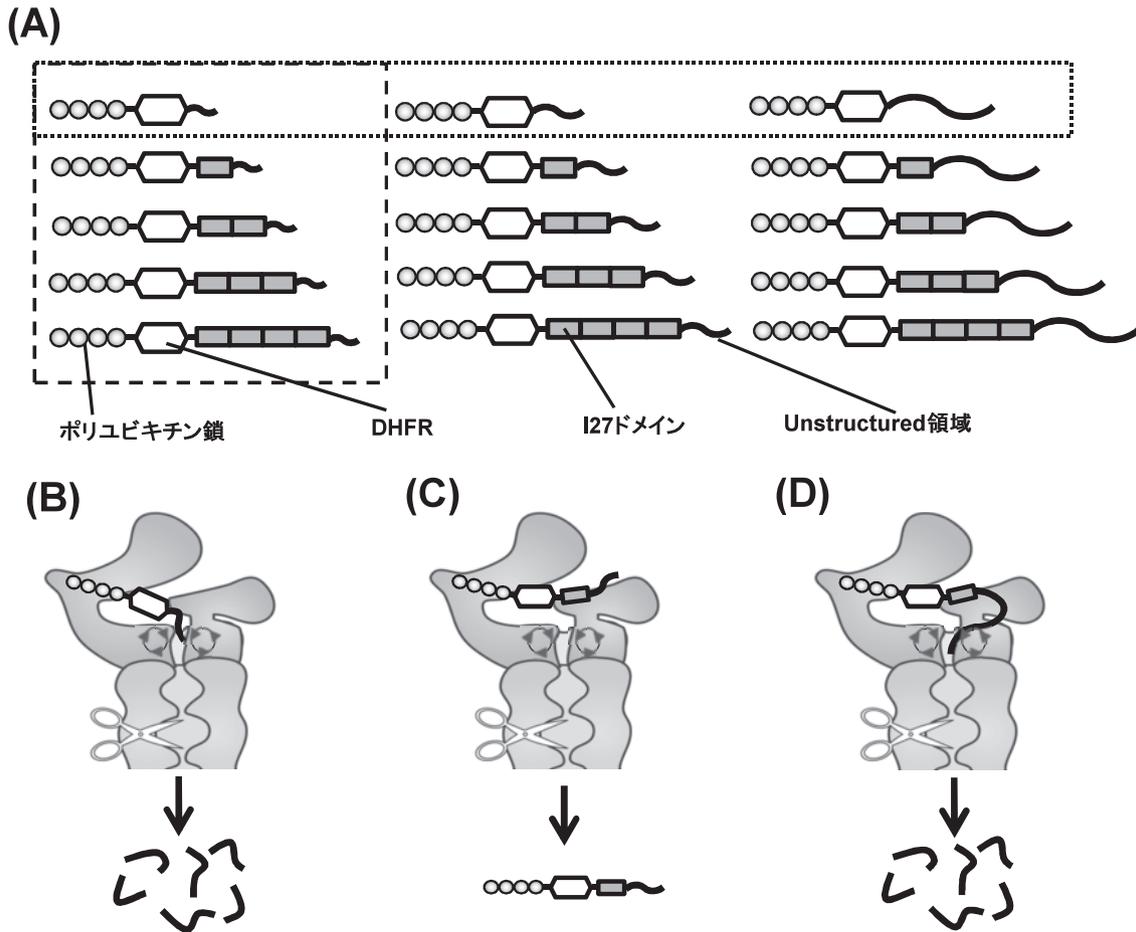


図2 プロテアソーム結合標識からの Unstructured 領域の距離と長さ

(A) さまざまな長さの Unstructured 領域とスペーサードメインを持つモデル基質タンパク質。(B) ポリユビキチン鎖と Unstructured 領域が近くにある場合。(C) ポリユビキチン鎖と Unstructured 領域が離れた場合。(D) ポリユビキチン鎖と Unstructured 領域が離れてはいるが、Unstructured 領域の長さが十分に長い場合。

数十Åほど離れていることが明らかになっており、この推測を支持している<sup>6)</sup>。

Unstructured 領域の長さや位置だけでなく、アミノ酸配列も分解開始には重要である。さまざまなアミノ酸配列の分解開始サイトとしての能力を調べたところ、分解効率は Unstructured 領域のさまざまな物理化学的性質（電荷、疎水性、二次構造系性能など）と明確な相関を持っていないものの、単純な繰り返し配列を持つ Unstructured 領域は分解を引き起こさなかった。

以上の研究から Unstructured 領域の位置や長さ、アミノ酸配列がプロテアソームの基質タンパク質の選別において、重要な役割を担っていることが明らかになった。

#### 4. Unstructured 領域を介した分解の生物学的意義

これらの Unstructured 領域の知見に基づき、多くの細胞内タンパク質の安定性を説明することができる。前述のようにタンパク質複合体のサブユニット特異的な分解において Unstructured 領域の性質は分解の決定要因になるが、サイクリン-サイクリン依存性キナーゼ (Cdk)-Cdk 阻害因子複合体の周期的な構成サブユニットの分解も Unstructured 領域の位置を考慮することにより説明できる。また UbL-Uba アダプタータンパク質の安定性も説明できる。アダプタータンパク質にもドメイン間に Unstructured 領域があるが、その位置や長さ、アミノ酸配列のいずれかが、以上で紹介した効率的な分解のための条件を満たしていない。そのため UbL-Uba アダプタータンパク質は分解を免れると考

えられる。他にもポリユビキチン化された Cdc34 など、その Unstructured 領域の性質に注目すれば、なぜ分解されないのか理解できる。

一方、ユビキチン非依存的にプロテアソームにより分解されるタンパク質 (ODC やチミジル酸合成酵素など) も、分解を引き起こす条件を備えた Unstructured 領域を持つ。実際この Unstructured 領域が分解シグナルであることがわかっている。おそらくユビキチン非依存的分解基質の Unstructured 領域は非常に強く ATPase リングのチャンネルに結合するため、ポリユビキチン鎖が不要なのであろう。このことから、プロテアソームによるタンパク質分解において、Unstructured 領域の性質はプロテアソーム結合標識以上に重要であることがうかがい知れる。

## 5. おわりに

以上でプロテアソームの基質認識における Unstructured 領域の重要性を紹介した。この重要性は Unstructured 領域をターゲットにした分解の制御が可能であることを示唆している。実際 Unstructured 領域へのタンパク質の結合などにより、分解が抑制される例が報告されており、さらに多くのタンパク質の分解制御が Unstructured 領域を介して行われると予測される<sup>7)</sup>。また、同様の制御を人工的に行うことも可能であるはずである。これまでユビキチンリガーゼをターゲットとした分解制御法が報告されているが、Unstructured 領域をターゲットにした分解制御により、より特異的に任意のタンパク質の分解を人工的に調整できるようになるかもしれない。

- 1) Inobe, T. & Matouschek, A. (2008) *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 18, 43–51.
- 2) Prakash, S., Tian, L., Ratliff, K.S., Lehotzky, R.E., & Matouschek, A. (2004) *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 11, 830–837.
- 3) Prakash, S., Inobe, T., Hatch, A.J., & Matouschek, A. (2009) *Nat. Chem. Biol.*, 5, 29–36.
- 4) Inobe, T., Fishbain, S., Prakash, S., & Matouschek, A. (2011) *Nat. Chem. Biol.*, 7, 161–167.
- 5) Fishbain, S., Prakash, S., Herrig, A., Elsasser, S., & Matouschek, A. (2011) *Nat. Commun.*, 2, 192.
- 6) Lander, G.C., Estrin, E., Matyskiela, M.E., Bashore, C., Nogales, E., & Martin, A. (2012) *Nature*, 482, 186–191.
- 7) Beekman, J.M., Vervoort, S.J., Dekkers, F., van Vessmen, M. E., Venelbosch, S., Brugulat-Panes, A., van Loosdregt, J., Braat, A.K., & Coffey, P.J. (2012) *Oncogene*, 31, 2668–2679.

高橋 一暢, 伊野部 智由  
(富山大学先端ライフサイエンス拠点)

Unstructured region required for proteasome-mediated degradation

Kazunobu Takahashi and Tomonao Inobe (Frontier Research Core for Life Sciences, University of Toyama, 3190 Gofuku, Toyama-shi, Toyama 930–8555, Japan)

## 原生物細胞性粘菌のポリケタイド生合成機構

### 1. はじめに

細胞性粘菌は土壤中に広く分布する真核微生物の一種で、通常は単細胞アメーバとして大腸菌等の細菌を餌として補食し分裂を繰り返す。しかし、餌がなくなると飢餓応答により集合体形成を開始し、ストレス耐性の胞子を分化させ栄養条件が回復するまで休眠する。このように細胞性粘菌の特徴はその生活史の中に単細胞と多細胞の二つの時期を持つという点にある。多細胞の集合体形成後は高等生物にみられるパターン形成、協調した細胞運動等の発生の諸過程を経て、大別すると柄と胞子のわずかに2種類の分化した細胞からなる子実体を形成する。そのため、細胞性粘菌は発生・分化のモデル生物として長い間研究が続けられてきた。しかし、2005年の細胞性粘菌 *Dictyostelium discoideum* の全ゲノムの読解終了によって、細胞性粘菌の研究に新たな局面がもたらされた<sup>1)</sup>。それはポリケタイドを中心とした二次代謝産物生合成に関する研究である。細胞性粘菌はこれまでに知られているどの生物よりも多くのポリケタイド合成酵素 (PKS) 遺伝子を持っていることが明らかになった。細胞性粘菌はそのゲノム 34 Mb のなかに45個もの *pks* 遺伝子を持っている。さらにその後公開された近縁種の *D. purpureum* では50個の *pks* 候補遺伝子が報告されている<sup>2)</sup>。この遺伝子の数の多さはたとえば二次代謝産物の宝庫として知られる放線菌 *Streptomyces avermitilis* のゲノムでは、二次代謝産物生合成の遺伝子クラスターは30個、*S. griseus* では34個であり、細胞性粘菌がいかに多くの生合成遺伝子を持っているかがわかる<sup>3,4)</sup>。

細胞性粘菌の持つ PKS は基本的にすべて反復型の I 型 PKS であった。反復型の I 型 PKS は巨大タンパク質でいくつかのドメインの組み合わせによって成り立っている。