

研究テーマ**ショウジョウバエ遺伝学を用いたユビキチンプロテアソームシステム制御因子の探索****1. 目的**

プロテアソームは、ユビキチン化されたタンパク質を選択的に分解することにより細胞周期、シグナル伝達、転写制御、DNA 修復など真核細胞内でおこるあらゆる生命現象を円滑に進行させるために必須のタンパク質分解酵素であり、その重要性は広く知られている。従来のプロテアソーム研究は遺伝学的解析の容易な出芽酵母を用いた解析が主流であった。しかし、近年哺乳類をはじめとした高等な生物ではプロテアソームが多様性を獲得し、高等生物特有の生命現象に重要な働きをしていることや、様々なヒトの疾患に関与していることが明らかになり始めた。例えばプロテアソームの発現量がヒト癌組織において異常亢進していること、構造異常蛋白質の蓄積を特徴とする一連の神経変性疾患においてプロテアソーム機能が低下していること、プロテアソームの特定のサブユニットの高い発現が心筋梗塞や癌転移のリスクファクターとして同定されているなど、ヒトにおける病態とプロテアソームの質的・量的異常の関連が明らかになりつつある。しかし高等動物において、どのような機構でプロテアソームの転写量・形成・存在量・多様性・活性が制御されているのかという問題については全く未解明であり、高等動物におけるプロテアソームの動作原理の解明が急務とされている。しかし酵母において判明しているプロテアソーム制御システムは必ずしも高等動物にはあてはまらず、加えて高等動物ではプロテアソーム構成因子の複雑性が増していることから、高等動物を用いてプロテアソーム機能を制御する因子を探索する必要がある。そこで我々は、高等動物として遺伝学的スクリーニングの系が確立されているショウジョウバエを用いてプロテアソーム機能関連因子の網羅的探索を行い、高等動物プロテアソームを質的・量的に制御する機構を明らかにすることを目的とし、以下の方法により研究を開始した。

2. 方法

本研究計画では、高等動物においてプロテアソームの転写量・合成・活性がどのように制御されているのかを包括的に解明するために、ショウジョウバエ遺伝学を用いて新規制御因子を同定することを目指す。プロテアソーム依存的に分解される基質として知られる degron-GFP (degron とは分解シグナルとなる配列) のトランスジェニック系統 (東京大学薬学系研究科三浦先生より供与) をレポーター系統として用い、GFP の蛍光強度の強弱を指標としてプロテアソーム機能の高低を判別可能なシステムを利用する。ショウジョウバエの様々な系統がストックセンターより入手可能であり、スクリーニングに最適なスターター系統の確立を行ったのちに、網羅的に RNAi 系統、EMS による突然変異誘起系統、トランスジェニック系統との交配を実施し、プロテアソーム機能を改善あるいは増悪させる系統を同定することにより、プロテアソーム機能を調節する機構の解明を目指す。

1. 単独 RNAi による表現型 (全身、複眼、背) の観察によるスターター系統の樹立

哺乳動物や酵母を用いた従来の我々の研究結果に基づき、中等度にプロテアソーム機能に異常を来すことが予想される遺伝子について UAS-GAL4 システムを利用した RNAi 系統をストックセンターより入手す

る。具体的には既知の

- プロテアソーム形成に関与する因子：PAC1, PAC2, PAC3, Ump1
- プロテアソームの活性化に関与する因子：p28, p27, PA28
- プロテアソームに結合して補助的な役割を果たす因子：Rpn13, Ubp6, UCH37

上記のRNAi系統とdegron-GFPレポーター系統とを交配し、UAS-Gal4システムにより器官特異的にRNAiを効かせることにより、中等度に形態異常およびプロテアソーム機能異常を示す系統を樹立し、次項以降のスクリーニングに最適な系統を決定する。

2. RNAi ライブラリー系統、EMS 突然変異誘起系統、トランスジェニック系統との交配によるプロテアソーム機能修飾因子のスクリーニング

プロテアソーム機能を中等度に低下した系統を上記 1. により樹立し、これとの網羅的交配によりプロテアソーム機能を改善あるいは悪化させる系統を、例えば複眼特異的ドライバーを用いて複眼の形態とGFP強度の観察を行うことにより同定する。EMS 系統を用いた場合は SNP マッピングにより遺伝子を同定する。

3. アミノ鎖アナログを用いたプロテアソーム機能異常を来す単独変異系統のスクリーニング

酵母および哺乳類細胞においては AZC や canavanine などのアミノ酸アナログを投与すると、異常蛋白質が細胞内で生じる結果、プロテアソームシステムに大きな負荷がかかることが知られる。これをハエに応用し、上記 2. で利用する RNAi 系統、EMS 系統、トランスジェニック系統を飼育する過程でアミノ酸アナログを混ぜた餌を投与することで表現型 (形態および GFP 強度) が増悪化する系統を樹立することによっても、プロテアソーム機能修飾因子を同定することが期待される。

3. 結果 研究成果

現在、プロテアソーム形成を補助するシャペロン分子PAC3、p27、PI31のRNAi系統をスターターとして樹立した。これらのRNAiはプロテアソーム機能が軽度に低下した表現型を示す。これらの系統を組織特異的ドライバーを用いて現在までにRNAiライブラリー約1000系統と交配し、感覚器前駆細胞数、剛毛数、複眼形成の表現型を観察することにより、プロテアソーム機能を回復させる系統、増悪化させる系統を各々数十系統の同定に成功した。今後、わらに異なるソースの同遺伝子のRNAi系統との交配、トランスジェニックハエとの交配により表現型がrescueされるかなどにより特異性を確認し、真の回復因子、増悪化因子を同定する。

4. 考察 まとめ

当初の研究計画通り順調に研究は遂行されており、スクリーニングの妥当性および遂行能力についての懸念は払拭されたと考えている。今後この解析を通じて、プロテアソーム機能の多寡が関連するヒトの疾患・生理的現象 (悪性腫瘍、神経変性疾患、免疫、老化など) においてプロテアソームがどのような制御を受けているかが解明され、プロテアソームを標的とした創薬に関する分子基盤を提供することが期待される。

5. 発表論文、参考文献

特になし