

氏 名	たかすぎ としゆき 高 杉 俊之
所 属	理工学研究科 生命科学専攻
学 位 の 種 類	博士（理学）
学 位 記 番 号	理工博 第 239 号
学位授与の日付	平成 29 年 9 月 30 日
課程・論文の別	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題名	Degradation mechanisms of Cdk5 activator p35 by proteasome Cdk5 活性化サブユニット p35 のプロテアソームによる分解機構の 解析（英文）
論文審査委員	主査 教 授 久永 眞市 委員 教 授 加藤 潤一 委員 教 授 川原 裕之 委員 准教授 安藤 香奈絵

【論文の内容の要旨】

Cdk5 は主に神経細胞で発現する Ser/Thr キナーゼである。脳の層構造形成やシナプス活動など多様な神経機能を制御しており、その適切な活性調節は神経活動の維持に必須である。Cdk5 は単独の状態では不活性型であり、p35 との結合により活性化されることが知られる。つまり、p35 の発現量によって細胞内の Cdk5 活性は調節されている。p35 は半減期が短く、主に分解によって発現量の調節が行われている。p35 の分解はユビキチンプロテアソーム系が担うことが示されている。しかし、p35 分解の調節機構が不明であるため、分解が誘導されるときにどのような仕組みで誘導されるのか不明である。本研究では、p35 の分解制御機構の解明を目的とした。Cdk5 の活性調節機構の解明は、神経活動や神経の発達と維持のメカニズム解析にも役立つのではないかと考えられる。ユビキチンプロテアソーム系では、基質特異的な E3 リガーゼが特定の基質のプロテアソーム分解を規定している。E3 リガーゼが分解されるべき基質に結合し K48 結合型ポリユビキチン鎖が付加される。したがって、p35 の分解制御機構の解明には、p35 を基質として認識する E3 リガーゼの同定が必要と考えた。ユビキチン化は基質のリジン残基に結合する。p35 のリジン欠損変異体(23R)を作成したが p3523R もプロテアソームで分解されることがわかった。Cdk5 を共発現させたとき、p35 23R は WT と同程度の分解速度を示した。一方で、p35 を単独で強制発現させた場合、p35 23R は WT よりも長い半減期を示した。このことから、Cdk5 と結合した p35 はユビキチン非依存的にプロテアソームで分解され、単独の p35 はユビキチン依存的にプロテアソーム分解が促進されるのではないかと考えた。神経細胞の生理的条件下では、p35 よりも

Cdk5 の発現量が高いため、多くの p35 が Cdk5 と結合した状態で存在していると考えられている。よって、p35 タンパク質の代謝にはユビキチン非依存的経路が主たる役割を果たしているのではないかと考えた。そこで私は、ユビキチン非依存的分解に着目して、その分解制御機構の解明を目指した。また、ユビキチン化非依存的分解は、報告が多くない為、本研究により新たな分解機構が明らかになるのではないかと考えた。腫瘍抑制因子である Nkx3.1 がユビキチン非依存的にプロテアソームで分解されること、そのアミノ酸配列中にユビキチン非依存的分解配列(デグロン)が存在することが示されている。p35 と Nkx3.1 のアミノ酸配列を比較したところ p35 内にデグロン様配列が存在することをみつけた。p35 のデグロン様配列に失活変異を導入したところ p35 の分解は抑制された。よって、p35 のユビキチン非依存的分解にもデグロン配列が必要であることが示された。このデグロン配列は p35 のアミノ酸配列中で定形の立体構造を持つ部分に存在する。このため、デグロン配列の立体構造を認識して第3の因子が結合することでプロテアソーム分解を誘導するのではないかと考えられた。そこで、この配列の具体的な役割を明らかにする為、この配列に結合するタンパク質を免疫沈降と LC-MS 解析により探索した。その結果、PA28 が候補にあがった。PA28 には α , β , γ という3つのアイソフォームが存在している。これら全てが p35 の結合タンパク質候補となった。PA28 α , β はヘテロ 7 量体を、 γ は単独でホモ 7 量体を形成し、プロテアソームの 11S 調節因子として機能することが知られる。PA28 $\alpha\beta$ 型 11S プロテアソーム調節因子が抗原呈示に関与するという報告がある一方、それ以外の詳しい役割や調節メカニズムは明らかになっていない。そこで PA28 が p35 の安定性に与える影響について検討した。p35 と PA28 を共発現させると p35 の分解速度が上昇した。また、その傾向は p35 23R で特に顕著であった。これらのことから p35 のユビキチン非依存的分解は PA28 によって制御されている可能性が示された。p35 と PA28 の直接的な結合性の確認を行っている。p35 は小胞体ストレス条件下等でプロテアソーム分解が誘導されることが知られている。これらの p35 分解誘導がユビキチン依存的な経路、非依存的な経路のいずれを活性化しているのかにも興味がある。これは今後の研究課題として取り組んでいきたいと考えている。