

「生体防御のメカニズム」  
平成8年度採択研究代表者

田中 啓二

((財) 東京都臨床医学総合研究所 部長)

## 「超分子システムによる免疫識別の分子機構解明」

### 1. 研究実施の概要

自己と非自己を峻別する免疫識別は生体防御戦略の要であり、その分子的基礎は主要組織適合性複合体 (MHC) と結合するMHCリガンド (抗原ペプチド) の生成機構である。プロテアソームは200万の巨大な多成分複合体酵素であり、生化学史上他に例を見ない超分子システムを構成している。我々は世界に先駆けてプロテアソームの蛋白質構造と遺伝子構造を解明すると共に、ガンマ型インターフェロン等のサイトカインが触媒サブユニット群の分子内置換を誘導して“免疫プロテアソーム”を造成し、内在性抗原のプロセッシング酵素として作用することを発見した。本研究ではプロテアソームの高次構造や分子集合機序の解析を通して免疫識別の分子機構を解明し、この超分子システムの免疫始動制御における役割の解明を目指す。とくに免疫における「標的」選別のメカニズムを解明し病原体を任意に特定できる「再構成抗原提示システム」を確立すると共に宿主の免疫システムを正常に作動・調節・強化する生体防御システムを構築する。これは“免疫学的非自己”を科学的に解明することである。本プロジェクトは免疫識別の破綻に基づく免疫病の克服や新しい細胞性免疫の確立に寄与することが期待される。さらに、生命科学史上最も複雑で巨大な蛋白質超分子複合体であるプロテアソームの構造と機能の解明は、最近急速に増加しつつある様々な生体超分子システムの構造-機能研究に大きく影響し、医学生物学領域を含めた生命科学研究全般への波及効果は極めて大きいと予想される。

### 2. 研究実施内容

本研究プロジェクトは(1)プロテアソームの構造解析と機能解明に関する研究(2)プロテアソームによる内在性抗原のプロセッシング機構解析(3)免疫識別評価と抗原提示担当遺伝子群の分子進化研究に大別して研究チームを組織している。

#### (1) プロテアソームの構造・機能解析グループの研究実施内容。

プロテアソームはユビキチンをパートナーとする真核生物のATP依存性プロテアーゼであり、近年癌や免疫に深く関係することが判明し国内外で注目されてい

る。研究代表者のグループは、過去十数年に亘り分子量200万、総サブユニット数50個の巨大な多成分複合体であるプロテアソーム（触媒ユニットと調節ユニットPA700から構成）の遺伝子単離計画を継続して進め、これまでの研究活動により、この酵素複合体のcDNAクローニングによる一次構造解析研究はほぼ完了した。現在、高等動物での遺伝学的機能解析を行うために主に調節因子群のサブユニットをコードする遺伝子群を欠失させたノックアウトマウスを多数作製中である。具体的には標的識別に関与するユビキチン受容体、PA28プロテアソーム活性化因子 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 及びリッド蓋とベイス台座から構成された調節ユニットのリッド部分の主要高分子量サブユニットS1とS2等の遺伝子群を欠失させている。最近我々はユビキチン化された標的蛋白質の選択的な識別に拘わるユビキチン受容体が複数種存在することを発見し、その遺伝子構造を明らかにすると共にこれらのアイソフォーム群の機能の多様性を生化学的および細胞生物学的手法を駆使して解明しつつある。この研究は、非自己抗原の細胞内識別の機構解明に大きく貢献すると予想している。また、我々が分子クローニングに成功したプロテアソーム活性化因子PA28が触媒ユニットの両端に結合するのみならず、PA700とも触媒ユニットを挟んで会合することを見出した。このPA700とPA28の二種の調節ユニットを共有した酵素複合体を“ハイブリッド型プロテアソーム”と命名するとともに、ごく最近このハイブリッド型プロテアソームがサイトカインで強く誘導されることを見出し、抗原プロセッシング酵素として重要な役割を演じていることが示唆された。これらの研究は、プロテアソームの活性制御機構の解明に大きく貢献すると共に免疫識別制御を人為的に操作する戦略の開拓にも連なることが期待される。一方、プロテアソームの関連研究としてユビキチン化システムの研究も本格的に進めている。とくに、標的基質にプロテアソームが認識するための分解シグナルとして作用するユビキチン修飾の是非を決定するユビキチンリガーゼの同定と機構解明やユビキチン化に類似した新しい翻訳後修飾機構であるNEDD8/RUB (related ubiquitin modifier) システムの研究、そしてユビキチン化修飾の可逆性を支配する脱ユビキチン化酵素群の分子細胞生物学的研究についても積極的に推進している。

## (2) プロセッシング機構解析グループの研究実施内容

プロテアソームが内在性抗原のプロセッシング酵素であることは、種々の構造学的・細胞学的・遺伝学的解析から強く示唆されてきたが、本酵素が抗原エピトープを生成する分子機構については全く解明されていない。言い換えれば、適応（細胞性）免疫システムが、非自己の提示原理としてプロテアソームの反応産物を利用した機構の解明が全く謎であるということである。この謎を解明するためには、(1)抗原エピトープ領域がプロテアソームによって選別されるメカニズムおよび

(2)抗原エピトープ領域がプロテアソームによってランダムに破壊されない仕組み、(3)さらにこの抗原プロセッシング反応の調節機構を明らかにすること等が不可欠である。我々は白血病腫瘍拒絶抗原のCTL（細胞障害性Tリンパ球）エピトープをモデル系として利用し、その前駆体ポリペプチドからのプロテアソームによるエピトープ生成機構の解明を行った。その結果、プロテアソームは抗原エピトープのC-端及びN-端側の両フランキング領域をアンカーとして標的基質を補足すること（フランキングアンカー仮説）、また抗原エピトープ内に存在するプロリン残基がプロテアソームによるランダムな分解から免れていること（プロリンルール）が判明した。また、プロテアソームの新規活性化因子PA28が抗原エピトープの両端を効果的に二重カットして抗原プロセッシング反応を著しく促進させることを証明した。これらの結果から、プロテアソームが標的基質の長さや配列を認識して、抗原エピトープを正確に造成すると言う仮説を提唱した。これらの結果はプロテアソームによる抗原プロセッシング機構の分子機構解明に大きく寄与すると考えられる。現在、PA28のノックアウトマウスの解析や、前述の免疫プロテアソーム及びハイブリッド型プロテアソームの免疫生物学的意義の解明に取り組んでいる。

### (3) 免疫識別評価グループの研究実施内容

本プロジェクトは抗原提示担当遺伝子群の分子進化研究から、免疫システムが構築されてきた原理を解明し、将来における免疫識別評価に備えることを最大の目標としている。これまでの研究から、免疫プロテアソームとプロテアソームの活性化因子PA28ファミリー蛋白質の分子進化についての解析を行った。とくにPA28 $\alpha$ 、PA28 $\beta$ およびPA28 $\gamma$ の3種のファミリーのマウスにおける遺伝子構造を解明するとともに進化的にはPA28 $\gamma$ が祖先遺伝子であり、PA28 $\alpha$ とPA28 $\beta$ は免疫プロテアソームを構成する遺伝子群やTAP（抗原ペプチド輸送トランスポーター）/MHC（主要組織適合性遺伝子複合体）遺伝子群とほぼ同時期に造成された可能性を示唆した。これらの結果から、これら抗原提示担当遺伝子群が太古の染色体重複によって成立したとする仮説を提唱し、これはMHCの起源に関する唯一の仮説として、国内外で高い評価を得ている。

### 3. 主な研究成果の発表（論文発表）

○Okada, K., Wangpoengtrakul, C., Osawa, T., Toyokuni, S., Tanaka, K., and Uchida, K. (1999) 4-Hydroxy-2-nonenal-mediated impairment of intracellular proteolysis during oxidative stress in vivo. Identification of the proteasome as a target molecule. *J. Biol. Chem.* 274, 23787-23793.

○Kawakami, T., Suzuki, T., Baek, S. H., Chung, C. H., Ichiyama, A., Hirano, H.,

- Omata, M., Tanaka, K. (1999) Isolation and characterization of cytosolic and membrane-bound deubiquitinating enzymes from bovine brain. *J. Biochem* 126, 612-623.
- Murakami, Y., Matsufuji, S., Hayashi, S., Tanahashi, N., and Tanaka, K. (1999) ATP-dependent sequestration of ornithine decarboxylase by the 26S proteasome, a process coupled to unfolding, is a prerequisite for the degradation. *Mol. Cell. Biol.* 19, 7216-7227.
- Hiyama, H., Yokoi, M., Matsutani, C., Sugasawa, K., Maekawa, T., Tanaka, K., Hoeijmakers, J.H.J., and Hanaoka, F. (1999) Interaction of hHR23 with S5a: The ubiquitin-like domain of hHR23 mediates interaction with S5a subunit of the 26S proteasome. *J. Biol. Chem.* 28019-28025.
- Suzuki, T., Ichiyama, A., Saitoh, H., Kawakami, T., Omata, M., Chung, C. H., Kimura, M., Shimbara, N., and Tanaka, K. (1999) A new 30 kDa ubiquitin-related SUMO-1 hydrolase from bovine brain. *J. Biol. Chem.* 274, 31131-31134.
- Suzuki, H., Kobayashi, M., Takeuchi, M., Furuichi, K., Chiba, T., and Tanaka, T. (1999) Identification of a novel 300-kDa factor termed I $\kappa$ B $\alpha$ E3-F1 that is required for ubiquitinylation of I $\kappa$ B $\alpha$ . *FEBS Lett.* 458, 3430348.
- Takeuchi, J., Fujimuro, M., Yokosawa, H., Tanaka, K., and Toh-e, A. (1999) Rpn9 is required for efficient assembly of the yeast 26S proteasome. *Mol. Cell. Biol.* 19, 6575-6584.
- Shimbara, N., Ogawa, K., Nakajima, H., Yamasaki, N., Hidaka, Y., Niwa, S., Tanahashi, N., and Tanaka, K. (1998) Contribution of proline residue for efficient production of MHC class I ligands by proteasomes. *J. Biol. Chem.*, 273, 23062-23071
- Osaka, F., Kawasaki, H., Aida, N., Saeki, M., Chiba, T., Kawashima, S., Tanaka, K., and Kato, S. (1998) A new NEDD8-ligating system for cullin-4A. *Genes & Dev.*, 12, 2263-2268
- Hendil, K.B., Khan, S., and Tanaka, K. (1998) Simultaneous binding of PA28 and PA700 activators to proteasomes. *Biochem. J.*, 332, 749-754
- Oikawa, T., Sasaki, T., Nakamura, M., Shimamura, M., Tanahashi, N., Omura, S., and Tanaka, K. (1998) The proteasome is involved in angiogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 246, 243-248
- Watanabe, T.K., Saito, A., Suzuki, M., Fujiwara, T., Takahashi, E., Slaughter, C.A., DeMartino, G.N., Hendil, K.B., Chung, C.H., Tanahashi, N., and Tanaka,

- K. (1998) cDNA cloning and characterization of a human proteasomal modulator subunit p27 (PSMD9). *Genomics* 50, 241-250
- Tanahashi, N., Fujiwara, T., Takahashi, E., Shimbara, N., Chung, C.H., and Tanaka, K. (1998) Chromosomal localization and immunological analysis of a family of human 26S proteasomal ATPases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 243, 229-232
- Chang, Y.-C., Lee, Y.-S., Tejima, T., Tanaka, K., Omura, S., Heintz, N.H., Mitsui, Y., and Magae, J. (1998) Mdm-2 and bax, downstream mediators of the p53 responsive, are degraded by the ubiquitin-proteasome pathway. *Cell Growth Differ.*, 9, 79-84
- Fujimuro, M., Tanaka, K., Yokosawa, H., and Toh-e, A. (1998) Son1 is a component of the 26S proteasome of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.*, 423, 149-154
- Kohda, K., Ishibashi, T., Shimbara, N., Tanaka, K., Matsuda, Y., and Kasahara, M. (1998) Characterization of the mouse PA28 activator complex gene family: Complete organizations of three member genes, and a physical map of the -150-kb region containing the  $\alpha$ - and  $\beta$ -subunits genes. *J. Immunol.*, 160, 4923-4935
- Yanagawa, Y., Ueda, T., Yamamoto, K., Sasaki, T., Tanaka, K., Hashimoto, J., Sato, T., and Nakagawa, H. (1998) Cloning and Sequencing of cDNA encoding a non-ATPase subunit homolog of *Arabidopsis thaliana* MBP1 from the *Oryza sativa* 26S proteasome. *Plant Biotech.*, 15, 147-150
- Baek, S.U., Park, K.C., Kim, K.I., Yoo, Y.J., Tanaka, K., Baker, R.T., and Chung, C.H. (1998) A novel family of ubiquitin-specific protease in chick skeletal muscle with distinct amino- and carboxyl-terminal extensions. *Biochem. J.*, 334, 677-684
- Yoo, S.J., Kim, H.H., Shin, D.H., Lee, C.S., Seong, I.S., Seol, J. H., Shimbara, N., Tanaka, K., and Chung, C.H. (1998) Effects of the Cys mutations on structure and function of the ATP-dependent HslVU protease in *Escherichia coli* : The Cys287 to Val mutation in HslU uncouples the ATP-dependent proteolysis by HslVU from ATP hydrolysis. *J. Biol. Chem.*, 273, 22929-22935
- Taya, S., Yamamoto, T., Kano, K., Kawano, Y., Iwamatsu, A., Tsuchiya, T., Tanaka, K., Kanai, M., Wood, S.A., and Kaibuchi, K. (1998) The Ras target AF-6 is a physiological substrate of the Fam deubiquitinating enzyme. *J. Cell Biol.*, 142, 1053-1062

- Wojcik, C., Paweletz, N., Tanaka, K., and Wilk, S. (1998) The functional relationship of proteasome activator (PA28) subunits,  $\alpha$ ,  $\beta$ , and  $\gamma$  (K1 antigen) in NT2 neuronal precursor cells and HeLa S3 cells. *Eur. J. Cell Biol.*, 77, 151-160.
- Hori, T., Kato, S., Saeki, M., DeMartino, G.N., Slaughter, C. A., Takeuchi, J., Toh-e, A., and Tanaka, K. (1998) cDNA cloning and functional analysis of p28 (Nas6p) and p40.5 (Nas7p), two novel regulatory subunits, of the 26S proteasome. *Gene*, 216, 113-122.
- Ueda, Y., Wang, M., Ou, B.R., Huang, J., Tanaka, K., Ichihara, A., and Forsberg, N.E. (1998) Evidence for the participation of the proteasome and calpain in early phases of muscle cell differentiation. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 30, 679-694.
- Fujiwara, T., Saito, A., Suzuki, M., Shinomiya, H., Suzuki, T., Takahashi, E., Tanigami, A., Ichiyama, A., Chung, C. H., Tanaka, K. (1998) Identification and chromosomal assignment of USP1, a novel gene encoding a human ubiquitin-specific protease. *Genomics*, 4, 155-158.
- Fujimuro, M., Takada, H., Saeki, Y., Toh-e, A., Tanaka, K., and Yokosawa, H. (1998) Growth-dependent regulation of the 26S proteasome assembly in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 251, 818-823.
- Suzuki, H., Chiba, T., Kobayashi, M., Takeuchi, M., Furuichi, K., and Tanaka, K. (1999) In vivo and in vitro recruitment of an I $\kappa$ B $\alpha$ -ubiquitin ligase to I $\kappa$ B $\alpha$  phosphorylated by IKK, leading to ubiquitination. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 256, 121-126.
- Suzuki, H., Chiba, T., Kobayashi, M., Takeuchi, M., Suzuki, Ichiyama, A., Ikenoue, T., Omata, M., Furuichi, K., and Tanaka, K. (1999) I $\kappa$ B $\alpha$  ubiquitination is catalyzed by an SCF-like complex containing Skp1, cullin-1, and two F-box/WD40-repeat proteins  $\beta$  TrCP1 and  $\beta$  TrCP2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 256, 127-132.
- Furukawa, H., Murata, S., Yabe, T., Shimbara, N., Naoto, K., Kashiwase, K., Watanabe, K., Ishikawa, Y., Akaza, T., Tadokoro, K., Tohma, S., Inoue, T., Tokunaga, K., Yamamoto, K., Tanaka, K., and Juji, T. (1999) Splice acceptor site mutation of the TAP1 gene in HLA class I deficiency. *J. Clin. Inv.*, 103, 755-758.
- Mugita, N., Honda, Y., Nakamura, H., Fujiwara, T., Tanaka, K., Omura, S.,

- Shimbara N., Ogawa, M., Saya, H., and Nako, M. (1999) The involvement of proteasome in miogeneic differentiation of murine myocytes and human rhabdomyosarcoma cells. *Int. J. Mol. Med.* 3, 127-137.
- Urano, T., Yashiroda, H., Muraoka, M., Tanaka, K., Hosoi, T., Inoue, S., Ouchi, Y., Tanaka, K., and Toyoshima, T. (1999) p57Kip2 is degraded through the proteasome in osteoblasts stimulated to proliferation by transforming growth factor b1. *J. Biol. Chem.* 274, 12197-12200.
- Suzuki, M., Fujiwara, T., Tanigami, A., Ikenoue, T., Omata, M., Chiba, T., and Tanaka, K. (1999) The TCP1 gene encoding a human F-box/WD40 repeat protein map to chromosome 10q24-q25 by fluorescence in situ hybridization. *Genomics* 58, 104-105.
- Combaret, L., Ralliere, C., Taillandier, D., Tanaka, K., and Attaix, D. (1999) Manipulation of the ubiquitin-proteasome pathway in cachexia: pentoxifylline suppresses the activation of 20S and 26S proteasomes in muscles from tumor-bearing rats. *Mol. Biol. Rep.* 26, 95-101.
- Katagiri, K., Yokosawa, H., Kinashi, T., Kawashima, S., Irie, S., Tanaka, K., and Katagiri, T. (1998) Ubiquitin-proteasome system is involved in the induction of LEF-1/ICAM-1-dependent adhesion of HL-60 cells. *J. Leucocyte Biol.* 65, 778-785.
- Finley, D., Tanaka, K., Mann, C., Feldmann, H., Hochstrasser, M., Vierstra, R., Johnston, S., Hampton, R., Haber, J., Mccusker, J., Silver, P., Frontali, L., Thorsness, P., Varshavsky, A., Byers, B., Madura, K., Reed, S.I., Wolf, D., Jentsch, S., Sommer, T., Baumeister, W., Goldberg, A., Fried, V., Rubin, D.M., and Toh-e, A. (1998) Unified nomenclature for subunits of the *Saccharomyces cerevisiae* proteasome regulatory particles. *Trend Biochem. Sci.* 23: 244-245.
- Tanaka, K. (1998) Proteasomes: structure and biology. *J. Biochem.* 123, 195-204.
- Tanaka, K., and Kasahara, M. (1998) The MHC class I ligand generating system: Roles of immunoproteasomes and INF- $\gamma$  inducible PA28. *Immunol. Rev.* 163, 161-176.
- Tanaka, K. (1998) Molecular biology of proteasomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 247, 537-541.
- Tanaka, K., and Tanahashi, N. (1998) The 20S proteasome: subunits and functions. *Adv. Mol. Cell. Biol.* 127, 105-128.

- Tanaka, K. and Chiba, T. (1998) The proteasome: a protein-destroying machine. *Genes Cells*, 3, 485-498.
- Tanaka, K., Suzuki, T., and Chiba, T. (1998) The ligation systems for ubiquitin and ubiquitin-like proteins. *Mol. Cells*, 8, 503-512.
- Tanahashi, N., Kawahara, H., Murakami, Y., and Tanaka, K. (1999) The proteasome-dependent proteolytic system. *Mol. Biol. Rep.* 26, 3-9.
- 田中啓二 (1998) プロテアソームと免疫識別の制御. *化学と生物*, 36, 142-143.
- 田中啓二 (1998) ユビキチンとプロテアソーム：発見から現在までの軌跡、現代化学, 9, 27-33.
- 田中啓二 (1998) 巨大タンパク分解酵素 (プロテアソーム). *Medical Tecnology*. 27, 17-19.
- 笠原正典、村田茂穂、田中啓二 (1999) 抗原プロセッシングと遺伝子. *遺伝子医学*, 3, 136-143.
- 田中啓二 (1999) 生命活動を解く鍵ユビキチン-プロテアソームシステム. *細胞工学*, 18, 610-621 (1999).
- 田中啓二 (1999) ユビキチンライゲーションシステム：発見から現在までの軌跡. *蛋白質核酸酵素*, 44, 737-743 (1999).
- 川原裕之、田中啓二 (1999) ユビキチンとプロテアソーム. *医学のための基礎分子細胞生物学：第2版* (平賀紘一、山本博、伊達幸保、野口民夫 編), 28-29, 南山堂
- 新原直樹、田中啓二：腫瘍拒絶抗原エピトープ生成とプロテアソーム.「*Annu. Rev. 免疫* 1998」 226-235 中外医学社 (1998)
- 田中啓二：プロテアソーム、ユビキチン、ユビキチン化「*生化学事典*」第3版 p1226/p1442 岩波書店 (1998)
- 田中啓二：PEST配列「*BioScience用語ライブラリー-細胞内シグナル伝達*」第2版 pp90-91, 羊土社 (1999)

他18件