

## 酸化ストレスに対するプロテアソーム制御因子の応答

濱野直樹 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 千葉智樹 (筑波大学 生命環境系)

## ◆目的・背景◆

タンパク質は自身の役目を終えたり変性したりすると細胞にとって不要となり、その多くがプロテアソームによって分解される。プロテアソームは巨大な酵素複合体であり、特に 26S プロテアソームはユビキチン化されたタンパク質を ATP 依存的に分解していることが知られている。この 26S プロテアソームとは 20S プロテアソームと 19S 制御因子によって構成されており、プロテアーゼ活性を持つ 20S プロテアソームの片端または両端にユビキチン鎖を認識する 19S 制御因子が会合している。

プロテアソームには 19S 制御因子以外にも PA28 $\alpha$   $\beta$  ヘテロ複合体や PA28 $\gamma$  ホモ複合体、PA200 などのプロテアソーム制御因子が存在し、それらも 20S プロテアソームと結合することができる。20S プロテアソームと結合したそれぞれの制御因子には特異的な働きが報告されている。

細胞質に存在する PA28 $\alpha$   $\beta$  ヘテロ複合体はサイトカイン IFN $\gamma$  に応答し、20S プロテアソームとの結合が誘導されることが報告されている。また 20S プロテアソームのペプチダーゼ活性を促進することも知られている。細胞の核内に存在する PA28 $\gamma$  ホモ複合体については p53 の制御を行っていること、そして酸化ストレス下において発現が増加することなどが報告されている。PA200 についても 20S プロテアソームのペプチダーゼ活性を促進させるという研究報告がある。

プロテアソーム制御因子は細胞内で 20S プロテアソームと結合、乖離を繰り返している。しかしその現象の誘導や抑制が何によって引き起こされているのか、及びそれぞれのプロテアソーム制御因子が細胞にどのような影響を与えているのかに関してはいまだ不明瞭な点が残っている。

マウス胎児線維芽細胞 (MEF 細胞) に H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 処理を行うと、細胞内の 26S プロテアソームが 19S 制御因子と 20S プロテアソームに乖離するという現象が先行研究で確認された。また、プロテアソームのペプチダーゼ活性が半分ほどにまで落ちることも報告されている。

酸化ストレス下では 26S プロテアソームが乖離するにも関わらず、ペプチダーゼ活性は完全に失われていない。その原因として、26S プロテアソーム以外のプロテアソームの形成が誘導されているという可能性が考えられる。

本研究では酸化ストレス下において PA200、PA28 $\alpha$   $\beta$  ヘテロ複合体、PA28 $\gamma$  ホモ複合体がどのようにプロテアソームの活性に関わってくるのかを解明することを目的とし、野生型のマウスやプロテアソーム制御因子をノックアウトしたマウスから作製した MEF 細胞に H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 処理を行い、プロテアソーム機能を解析した。

## ◆方法・材料◆

## ●酸化ストレス応答とタンパク質抽出

野生型及びプロテアソーム制御因子ノックアウト MEF 細胞を使用した。MEF 細胞を D-MEM High Glucose で 1 日間培養し、その後 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 200  $\mu$ M を含む培地で 20 分間培養した。コントロールには H<sub>2</sub>O を用いた。その後細胞をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で洗浄し、細胞溶解バッファー (50 mM Tris-HCl, 0.5% NP-40, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 2 mM ATP) で 45 分間溶解した。細胞溶解液を 15,000 rpm で 20 分間遠心し、その上清を細胞粗抽出液とした。細胞粗抽出液のタンパク質濃度測定は Bradford Assay により行った。

## ●グリセロール密度勾配遠心

タンパク質量 1 mg の細胞粗抽出液を 10%–40% グリセロール密度勾配 (25 mM Tris-HCl, 10%–40% グリセロール, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM ATP, 1 mM DTT) を用いて 25,000 rpm で 22 時間遠心し分画した。分画後のサンプルはフラクションコレクターによって回収した。

## ●Western Blotting

各分画 10  $\mu$ l または細胞粗抽出液 5  $\mu$ g を SDS-Sample buffer と混ぜボイルしたのち、SDS ポリアクリルアミド電気泳動した。ゲルをメンブレンに転写した後、5% スキムミルクでブロッキングした。メンブレンを 5% BSA-TBST/一次抗体に晒し一晩 4°C で振盪後 TBS-T で洗浄した。一次抗体は anti-Rpt1 (19S プロテアソームのサブユニット)、anti- $\beta$ 5 (20S プロテアソームのサブユニット)、anti-PA28 $\alpha$ 、anti-PA28 $\gamma$ 、anti-PA200 を用いた。2.5% スキムミルク/Horseradish Peroxidase 標識二次抗体に一時間晒した後、ECL Reagent を用いて発光させ X 線フィルムで現像を行った。

## ●ペプチダーゼ活性測定

Suc-LLVY-AMC を蛍光基質としてペプチダーゼの活性を測定した。サンプルはフラクションコレクターによって分画したものを 10  $\mu$ l のサンプルを終濃度 (100 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.5  $\mu$ M Suc-LLVY) の反応溶液 100  $\mu$ l で 37 度、50 分間と 90 分間反応させた。蛍光を励起波長 355 nm、蛍光波長 460 nm で測定し酵素の反応速度を求めた。

## ◆結果・考察◆

現在解析中