

プロテアソームの活性化因子 PA28 ファミリーの分子的性質と γ -インターフェロンによる調節機構

棚橋 伸行

徳島大学酵素科学研究センター・酵素病理部門 (主任: 福井 清 教授)

(平成8年11月25日受付)

Molecular properties of the proteasome activator PA28 family proteins and γ -interferon regulation

Nobuyuki Tanahashi

Institute for Enzyme Research, The University of Tokushima, Tokushima

(Director : Prof. Kiyoshi Fukui)

SUMMARY

The proteasome is a large multicatalytic protease complex with an apparent sedimentation coefficient of 20S. It exists as a latent form in cells, being activated fully by the novel identified endogenous protein, named proteasome activator PA28. The native PA28 is approximately 200 kDa protein, which binds directly to both ends of the cylindrical 20S proteasome to form a football-like complex. By recent cDNA cloning for two homologous PA28 proteins, called PA28 α and PA28 β , Ki antigen found previously as a nuclear protein detected with autoantibodies in human sera was identified as a structurally related third protein, but a relationship between Ki antigen and two PA28 proteins or the 20S proteasome is unknown. In the present study, we showed that Ki antigen belongs to a new member of the PA28 family proteins, because it was co-purified and co-sedimented with PA28 α and PA28 β , and because it was associated reversibly with the 20S proteasome, and thus Ki antigen was renamed as PA28 γ . Moreover, anti-PA28 γ antibody did not precipitate immunologically with PA28 α and PA28 β , although the latter two proteins were co-immunoprecipitated by respective antibodies, suggesting that the complex containing PA28 γ differs from that consisting of PA28 α and PA28 β . Recombinant PA28 α expressed in *E. coli* activated greatly on the proteasomal peptidase activity solely, but PA28 β and PA28 γ did not reveal notable effects, although PA28 β enhanced the PA28 α -dependent activation observed only at the low concentration of PA28 α without affecting the maximal activity. Intriguingly, a major immunomodulatory cytokine γ -interferon (γ -IFN) induced almost complete loss of the PA28 γ protein without affecting the mRNA level in cells, whereas the messages and proteins of both PA28 α and PA28 β were coordinately up-regulated by γ -IFN. Thus, γ -IFN inducible PA28 α and PA28 β are assumed to play an important role for processing of endogenous antigens. Moreover, PA28 γ may be involved in distinct biological processes from other two PA28 proteins, judging from their reciprocal expression in response to γ -IFN.

(received November 25, 1996)

Key words : Proteasome, PA28, γ -interferon, antigen processing, Ki antigen

プロテアソームは沈降係数 20S の巨大な多成分複合体として発見された細胞内プロテアーゼである (Rivett, 1993; Coux ら, 1996). 本酵素は真核生物にのみ広く存在すると言われていたが, 最近古細胞や真性細胞にも存在することが明らかになった (Tamura ら, 1995). 真核生物のプロテアソームは α リングと β リング (各々7個の相同性の高い蛋白質から構成されている) が $\alpha\beta\alpha$ の順に会合した分子量約70万のシリンダー型粒子である (Lupas ら, 1993).

プロテアソームは細胞周期, 遺伝子の転写そして代謝調節などの様々な生体反応を制御する調節蛋白質の代謝的安定性の決定に関与しているほかに (Ciechanover, 1994; Hochstrasser, 1995), このような本来の短寿命蛋白質の異化作用に関与するのみならず, 様々なストレスや遺伝的変異によって生じる異常蛋白質の選択的な分解をも触媒すると考えられる (Hilt, Wolf, 1995). また, プロテアソームはMHC (major histocompatibility complex: 主要組織適合性複合体) クラス I 分子に提示される内在性抗原ペプチドの生成にも関与することが最近明らかになった (Monaco, Nandi, 1995; Heemels, Ploegh, 1995; York, Rock, 1996).

プロテアソームは細胞内蛋白質の約1-3%を占め, 主に細胞質や核に局在するが通常は不活性型として存在し, これまでの研究から特異的な複数の調節蛋白質によって活性化されることが判明している. そのような調節蛋白質の一つであるPA700/19S複合体 (DeMartino, Slaughter, 1993) はプロテアソームとエネルギー依存的に会合し, 分子量約200万の巨大なATP依存性プロテアーゼ (26Sプロテアソームと命名) を形成すると考えられている (Yoshimura ら, 1993; Peters, 1994). Fig. 1 (下部のパネル) に示すように26Sプロテアソームは触媒機能を有するシリンダー型の20Sプロテアソームの両端に分子量25-112 kDaの複数のサブユニットから構成されたV字型のPA700が会合したダンベル型粒子である (Lupas ら, 1993; Peters, 1994). 26Sプロテアソームによる蛋白質の分解はATP依存的なメカニズムで起こり (Rechsteiner ら, 1993), その標的蛋白質はポリユビキチン化されることによって分解シグナルを獲得する (Hershko, Ciechanover, 1992; Hochstrasser, 1995).

しかし, ポリアミン合成の代謝律速酵素で短寿命のオルニチン脱炭酸酵素 (ODC) は意外にもユビキチン非依存的に26Sプロテアソームによって分解される (Murakami ら, 1992). 一方, 最近不活性型の20Sプロテアソーム (本論文では以後, 単にプロテアソームと記載し, 26Sプロテアソームと区別して記述する必要がある場合のみ20Sプロテアソームと記載する) を活性化する新たな因子の存在が判明している. この分子はサブユニットの分子量が28 kDa であることから proteasome activator 28 (PA28) と名付けられた (Ma ら, 1992) が, 天然型分子は比較的大きな複合体を形成し11Sレギュレーターとも呼ばれている (Dubiel ら, 1992). Fig. 1 (上部のパネル) に示すようにPA28はATP非依存的にプロテアソームに会合し, フットボール型粒子を形成する (Gray ら, 1994). PA28はプロテアソームのペプチダーゼ活性を非常に強く促進するが, 変性蛋白質やユビキチン化の有無にかかわらず未変性の天然蛋白質には全く作用しない (Ma ら, 1992; Coux ら, 1996). 最初にPA28が精製されたとき, 単一成分の複合体として存在すると考えられていたが (Ma ら, 1992), 蛋白質化学的解析から相同性の高い二成分から構成されていることが判明した (Dubiel ら, 1992; Mott ら, 1994). 最近, 我々はこれらのPA28をコードする二種のcDNAをクローニングし一次構造を決定した結果, それらが約50%の高い相同性を持つことが判明したので, 各々をPA28 α およびPA28 β と名付けた (Ahn ら, 1995). さらにホモロジー検索の結果, 驚いたことにPA28と約40%の相同性を持つ分子, Ki抗原の存在が判明した (Ahn ら, 1995). Ki抗原は自己免疫疾患として知られている全身性エリテマトーデスの自己抗体に反応する抗原として同定された分子である (Nikaido ら, 1990). そこで, 本研究ではプロテアソームとKi抗原の関係を解析し, Ki抗原がPA28 α およびPA28 β と同じ方法で精製されること, さらに*in vitro*でプロテアソームと会合することを明らかにした. この結果, Ki抗原が新しいPA28ファミリーの一つであることが強く示唆されたのでKi抗原をPA28 γ と再命名した.

他方, PA28 α とPA28 β をコードするmRNAが免疫インターフェロンとも呼ばれている γ -Interferon

(γ -IFN) の処理によって強く誘導されることが判明した (Honoré ら, 1993 ; Realini ら, 1994 ; Ahn ら, 1995). そして PA28 α を細胞内に強制的に高発現させると特異的な細胞障害性 T 細胞が誘導されること, 即ち PA28 α が内在性抗原のプロセッシング反応を促進することが示唆された (Groettrup ら, 1996). さらにごく最近, PA28 が MHC クラス I 分子に提示されるべ

プチドの生成に必須な役割を担っていることが判明した (Dick ら, 1996). γ -IFN は MHC クラス I 拘束性の抗原プロセッシングに重要であり, 実際プロテアソームを構成する三種のサブユニットの発現を特異的に誘導することが判明している (Monaco, Nandi, 1995). 一方我々はこれらの γ -IFN で誘導されるサブユニット LMP2, LMP7, MECL1 と高い相同性を有し, その

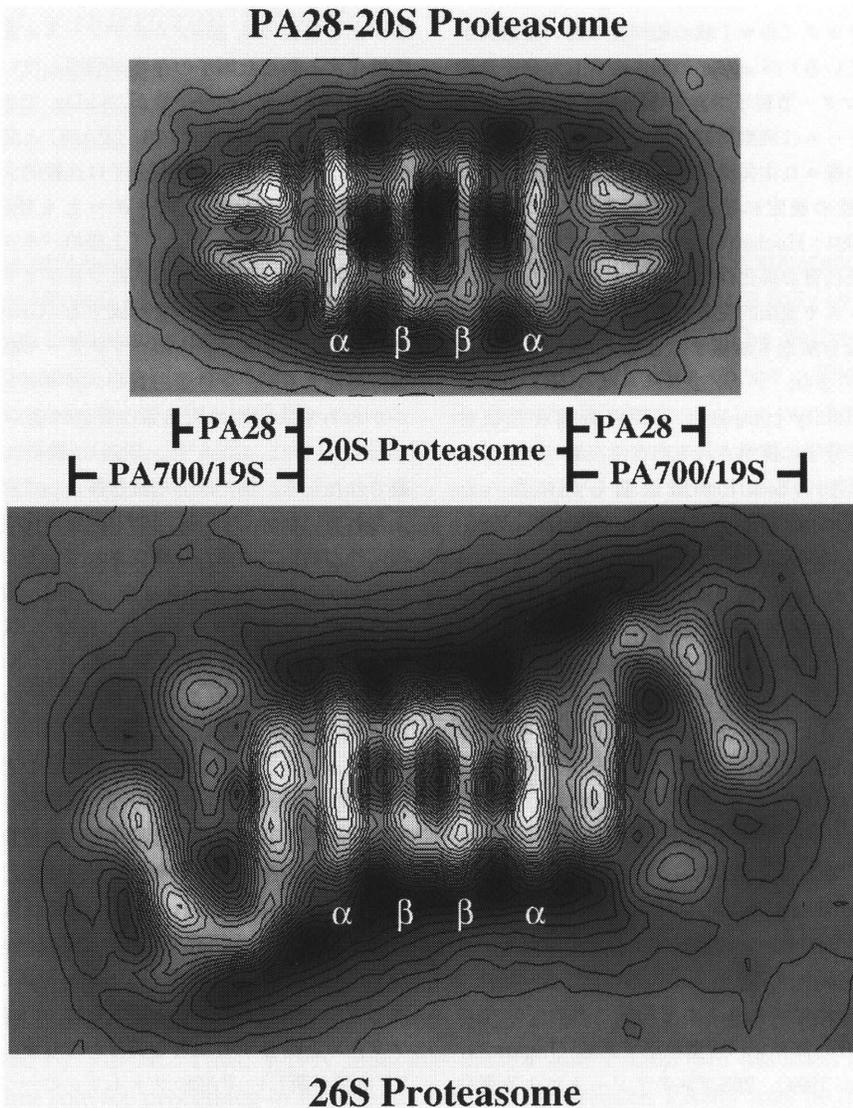


Fig. 1 Averaged image, based on electron micrographs, of the PA288 (11S) activator-20S proteasome complex (Upper panel) and of the 26S proteasome (lower panel) from rat liver. The α - and β -rings of the 20S proteasome are indicated. Photographs were taken by collaboration with W. Baumeister.

発現が逆に抑制されるサブユニット X, Y, Z を同定しそれらの分子クローニングに成功した (Akiyama ら, 1995; Hisamatsu ら, 1996). さらに我々はこれらの三種のベアサブユニットは γ -IFN 依存的に分子内置換することを示唆し, この γ -IFN で誘導されたプロテアソームが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示唆した. そしてこの γ -IFN 誘導型プロテアソームが免疫応答に特異的に作用することを強調するために“免疫プロテアソーム”と命名した (Tanaka ら, 1997). 本研究では γ -IFN 遺伝子を組み込んだトランスジェニックマウスを用いて PA28 ファミリー蛋白質と γ -IFN の関係についても解析した.

実験材料と方法

1. 実験材料

Suc-LLVY-MCA: Succinyl-Leu-Leu-Val-Tyr-4-methylcoumaryl-7-amide; Boc-LRR-MCA: t-butylloxycarbonyl-Leu-Arg-Arg-4-methylcoumaryl-7-amide; Cbz-LLE- β NA: carbobenzoxy-Leu-Leu-Glu- β -naphthylamide (ペプチド研究所); ATP (オリエンタル酵母); immobilon PVDF 膜 (Millipore); Bio-Gel A-1.5 m, Hydroxylapatite, Prestained SDS-PAGE Standards Maker (low Range) (BIO RAD); ダイアフロメンブレン (PM-30) (Amicon); Block-Ace (大日本製薬); Q-Sepharose Heparin-Sepharose CL-4B, Protein-A-Sepharose 4FF, Resource-Q, 低分子量マーカー蛋白質 (Pharmacia); ECL ウェスタンブロッティング検出システム; Hybond-N⁺ (Amersham); multiprime DNA labelling kit (TAKARA); マルチゲル 10-20% SDS-PAGE (第1化学); NTB: Nitro blue tetrazolium; BCIP: 5-Bromo-Chloro-3-indolylphosphate (Promega); pET16b (Novagen); γ -IFN 遺伝子を肝特異的な血清アミロイド P 成分のプロモーターを用いて肝細胞で発現させるようにしたトランスジェニックマウスは熊本大学の豊長哲至先生 (熊本大学代謝内科教室) より供与された.

2. 合成蛍光基質を用いたペプチターゼ活性の測定法

2.1. プロテアソームの活性測定

Suc-LLVY-MCA などの蛍光ペプチドを基質として遊離した MCA を蛍光光度計で測定した (Kanayama ら, 1992). 不活性型プロテアソームの試験管内での活性化は 0.05% SDS を添加して行った.

全量 100 μ l の反応系に酵素と基質を加え 37°C 10 分インキュベート後, 10% SDS を 100 μ l 加えて反応を停止させ, さらに 0.1 M Tris-HCl (pH 9.0) を 2 ml 加えてから蛍光強度 (励起波長 380 nm, 蛍光波長 460 nm) を測定した. プロテアソーム活性の 1 単位を 1 分間に 1 nmol の Suc-LLVY-MCA 分解する量と定義する.

2.2. PA28 の活性測定

PA28 標品を不活性型プロテアソーム (0.5 μ g) と共に 100 mM Tris-HCl (pH 8.0) 緩衝液の溶液で 4°C, 15 分ブレインキューバーとした後, 0.1 mM Suc-LLVY-MCA を加えプロテアソームの活性を 2.1 で述べたように測定した. PA28 活性の 1 単性を 0.5 μ g の 20S プロテアソームを 1 分間に 1 nmol の Suc-LLVY-MCA を分解する量と定義する.

3. 不活性 20S プロテアソームの精製

不活性型 20S プロテアソームは Q-Sepharose, Bio-Gel A-1.5 m, Hydroxylapatite, Heparin-Sepharose CL-4B 等の各種クロマトグラフィーを用いて単一まで精製し実験に用いた (Tanaka ら, 1986).

4. PA28 の精製方法

雄ウイスター系ラットの肝臓に 3 倍重量の 10 mM 2-メルカプトエタノール, 1 mM Phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF), 20 μ g/ml E64, 0.25 M ショ糖を含む 25 mM Tris-HCl (pH 7.5) 緩衝液を加え, Potter-Elvehjem 型ホモジナイザーでホモジナイズ後, 8,000 xg, 30 分遠心し, さらにその上精を 70,500 xg, 60 分遠心した. 得られた上精分画を粗抽出液として使用した. 粗抽出液を 25 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM 2-メルカプトエタノール, 20% グリセロール (standard buffer) で平衡した Q-Sepharose と混和した後, カラムにつめ, standard buffer で洗浄した. 吸着した蛋白質を 0-0.8 M NaCl の直線勾配で溶出し, 得られた各分画のプロテアソームと PA28 の活性を測定した. 20S プロテアソームと 26S プロテアソームは 0.4 M NaCl 近辺の分画に, PA28 は 0.3 M NaCl の分画に溶出された. PA28 が溶出された分画を集めて standard buffer で透析した後, standard buffer で平衡化した Heparin-Sepharose CL-4B にかけた. PA28 は非吸着分画に回収されたので, その分画を 10 mM potassium phosphate (pH 6.8), 10 mM 2-メルカプトエタノール, 20% グリセロールにて平衡化した Hydroxylapatite に向け, 洗浄後 10-300 mM の phosphate buffer (pH 6.8) の濃度勾配で溶出させた. PA28 は 75 mM phosphate 近辺に溶出されたのでその分画を回収しアミコン PM-30 膜を用いた限外濾過

で 2 mg/ml まで濃縮した。次にプロテアソームと PA28 の複合体を形成させるために、この試料 (1 mg) と精製したプロテアソーム (0.5 mg) を 4°C で 30 分 インキュベートし、10–30% のグリセロール密度勾配 溶液 (約 30 ml) に上層してから、Hitachi, SRP28SA1 にて 81,000 xg, 22 時間、4°C で遠心した後遠心チューブの下から 1 ml 毎に分画した。プロテアソームと PA28 の複合体は分画番号 14–18 範囲に回収された。この複合体から PA28 を解離させるために、陰イオン交換体である Resource-Q に結させ、吸着した蛋白質を 0–0.8 M NaCl で溶出させた。溶出された PA28 の分画を最終標品として standard buffer で透析した後、実験に用いた。

5. 免疫学的解析

PA28 α (²²CTKENLLGSYFDKKI³⁷), PA28 β (³KPCGVRLSGEARKQVE¹⁸), PA28 γ (⁷¹CLLTNSH DGLDGPTYK⁸⁵) のペプチドを合成し、ヘモシアニンに結合させてから、ウサギに免疫し抗ペプチド抗体を作製した (大海ら, 1994)。SDS-PAGE は市販の 10–20% ポリアクリルアミド・グラジエント・ゲルを用いて、Laemmli の方法 (1970) に従って行った。イムノブロット分析は Towbin らの方法 (1979) で行った。電気泳動後、ウエット式のゲルメンブラン転写装置を用いて immobilon PVDF 膜へトランスファーした。その膜を Block-ace でブロッキングし各々の一次抗体で反応させた後、二次抗体として alkaline phosphatase が結合したウサギ IgG 抗体もしくは horseradish peroxidase が結合したウサギ IgG 抗体で処理した後、NTB と BCIP を基質とし発色するか、ECL を用いた化学発光で検出した。

免疫沈澱法は Song ら (1996) の方法をもとに行なった。抗 PA28 α , β , γ 抗体と Protein-A-Sepharose 4FF を 4°C 1 時間反応させ、低速遠心で回収したゲルを 0.1% の Tween 20 を含む TBS (washing buffer) で 4–5 回洗浄した。その後、精製した PA28 (5 μ g) と 200 μ l BSA (0.25 mg/ml) をその抗体結合ゲルと 1 時間 4°C で混和させた後、遠心で上精を除いた沈澱物を washing buffer で 4–5 回洗浄した。SDS-PAGE 用の sample buffer を加えて boiling した後の上精をイムノブロット分析に用いた。対照としては pre-immune IgG を用いて同様に行なった。

6. リコンビナント PA28 の調製と不溶化 PA28 の再生

PA28 α , β , γ の全長鎖 cDNA を各々 *Nco* I と *Bam* HI, *Xba* I と *Xho* I, *Nco* I と *Bam* HI 部位でカット

してインサートを切り出してから T7 polymerase-dependent vector pET16b にライゲーションし、BL21 (DE3) のコンピテントセルにトランスフォームした。本法では N 末端に His-tag の付加した融合蛋白質として合成される。その菌を LB プレートに播き 37°C で培養後、増えてきたコロニーをさらに IPTG の有無で LB 培地中で 37°C で 3 時間培養した。予備実験から発現させた PA28 α , β , γ はほとんどが不溶性沈澱となることが判明したの変性状態で精製した後、*in vitro* で再生した。すなわち、回収した細胞を 6 mM Imidazole, 8M 尿素を含む 25 mM Tris-HCl (pH 7.5) (buffer A) にて破壊し、35,000 xg, 1 時間遠心後、その上精を Ni²⁺-アガロースに結合させた。1 M NaCl を含む buffer A で洗浄後、吸着した蛋白質を 350 mM Imidazole を含む buffer A にて溶出した。尿素と Imidazole を除くため、0.1 mM EDTA (pH 8.0), 1 mM Dithiothreitol (DTT), 20% グリセロールを含む 25 mM Tris-HCl (pH 7.5) で透析した。この方法により精製された全蛋白質の約 50% が可溶性蛋白質として回収された。

7. ノーザンブロット分析

チオシアン酸グアニジン法により精製した poly (A)+RNA 10 μ g をホルムアルデヒドを含むアガロースで電気泳動をした後、Hybond-N⁺ にトランスファーし、³²P で標識したプローブとハイブリダイゼーションした。PA28 α / β / γ , LMP2, LMP7, MECL-1 などのヒト 20S プロテアソームのサブユニット (Akiyama ら, 1995; Hisamatsu ら 1996), EF1 α , β -actin, glycerol-3-phosphate dehydrogenase (G3PDH) の cDNA の標識は multiprime DNA labeling kit で行った。ハイブリダイゼーション後、メンブランを洗浄し、Kodak XAR-5 film を用いて -70°C でオートラジオグラフィにより現像した。

8. トランスジェニックマウスの作成方法

γ -IFN 遺伝子を肝特異的な血清アミロド P 成分のプロモーターを用いて肝細胞で発現させるようにしたトランスジェニックマウス (SAP- γ -IFN) (C57BL/6+DBA/2) を実験に用いた (Toyonaga ら, 1994)。対照としては negative littermates (同腹正常マウス) を実験に用いた。

実験に供した 7 週令のトランスジェニックマウスの血清中 γ -IFN の濃度は 3533 pg/ml であり、これは約 30–40 U/ml に相当する。

9. その他の方法

蛋白質の定量

蛋白質濃度は、牛血清アルブミン (BSA) を標準蛋白質をして Bradford の方法 (1976) によって測定した。

結 果

I. 新しい PA28 ファミリーのメンバーとしての Ki 抗原の免疫学的同定

プロテアソームに対する Ki 抗原と二種の PA28 の関係を解明するため、各々三種の蛋白質に対するペプチド抗体を作製すると同時にこれらをコードする cDNA を pET の発現ベクターに組み込み大腸菌に導入してリコンビナント蛋白質を調整した (Fig. 2A)。

ウサギに免疫して作製した抗体の特異性を調べるために、リコンビナント蛋白質との反応性をイムノブロット法で検討した。Fig. 2. B, C に示すように作製した三種の抗体は各々免疫した蛋白質に特異的に反応し、交差はわずかであった。興味深いことに Ki 抗原に対する抗体は精製した PA28 標品にも強く反応し、そのバンドは PA28 α/β より少し分子量が大きい位置で検出され、これは cDNA 構造から推定した分子量と一致した。この結果は精製した PA28 標品中に Ki 抗原が含まれていることを示しており、従って Ki 抗原が第三の PA28 のメンバーであることが強く示唆された。そこで Ki 抗原を PA28 γ と再命名した。

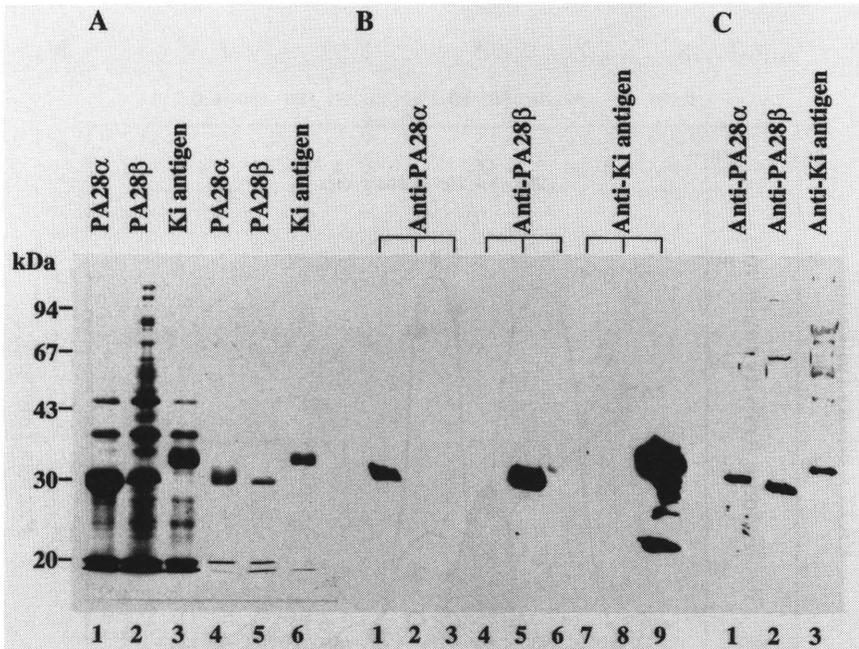


Fig. 2 Expression of the PA28 α , PA28 β and Ki antigen in *E. coli* and immunoblot analysis. A: The full-length cDNAs for the PA28 α , PA28 β and Ki antigen were subcloned in pET-16b plasmid inframe with the 10X-His tag and expressed as described under "Experimental procedures". Whole proteins (30 μ g) of *E. coli* cells expressed the PA28 α (lane 1), PA28 β (lane 2) and Ki antigen (lane 3) were loaded in the 12.5% SDS-PAGE gel. Puri- fied μ g of the Ni²⁺ sepharose 6B purified protein of the PA28 α (lane 4), PA28 β (lane 5) and Ki antigen (lane 6) were loaded in the gel. B: Immunoblot analysis with anti-PA28 α , anti-PA28 β and Ki antigen antibodies as indicated against 30 μ g of recombinant PA28 α (lanes 1, 4 and 7), PA28 β (lanes 2, 5 and 8) and Ki antigen (lane 3, 6 and 9). C: Immunoblot analysis with anti-PA28 α (lane 1), anti-PA28 β (lane 2) and anti-Ki antigen (lane 3) antibodies as indicated against 5 μ g of the PA28 purified from rat liver. The arrows indicate the position of the molecular marker proteins.

次に PA28 α , PA28 β , PA28 γ の動態をクロマトグラフィーで検討した。粗抽出液を Q-Sepharose に吸着させ蛋白質を 0-0.8 M NaCl にて溶出させて得た各分画のプロテアソーム活性を Suc-LLVY-MCA を基質として測定した。以前に報告したように (Kanayama ら, 1992), 20S プロテアソームと 26S プロテアソーム (これらは 0.05% SDS の有無で検出可能) は等電点が 5.0 と類似しているためとも 0.45 M NaCl の塩濃度で溶出された (Fig. 3)。次に PA28 を検出する

ため、各分画と不活性型プロテアソームとを 4°C でブレインキュベートした後基質を加えペプチダーゼ活性を測定した。プロテアソームを活性化する PA28 の分画は約 0.3 M NaCl に単一ピークとして検出された (Fig. 3)。この Q-Sepharose クロマトグラフィーにおける PA28 α , PA28 β , PA28 γ の蛋白質の動態を検討するため各々の特異抗体を用いてイムノプロットと分析を行った。Fig. 3 (上パネル) に示すように、PA28 α および PA28 β はペプチダーゼ活性に一致した分画に回

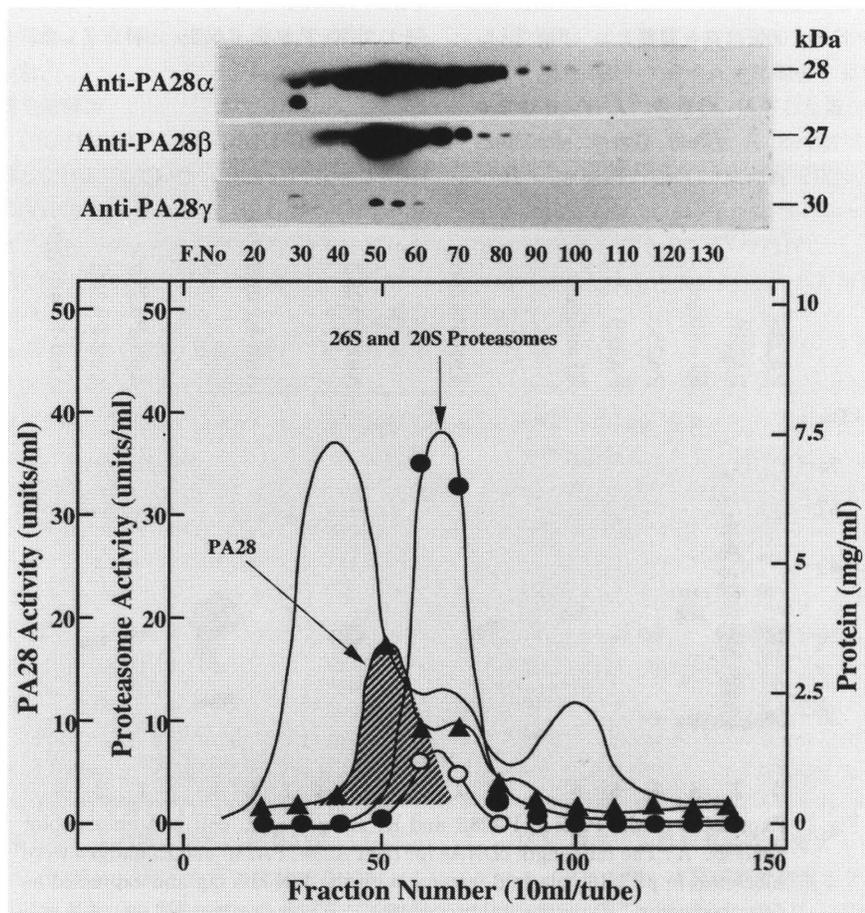


Fig. 3 Q-Sepharose chromatography of rat liver extracts. The crude extract of rat liver was loaded to a Q-Sepharose column, and the adsorbed materials were eluted with 0-0.8 M NaCl in the 25 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM 2-mercaptoethanol and 20% glycerol. Lower panels Suc-LLVY-MCA hydrolysis of the 20S and 26S proteasomes was assayed with (●) or without (○) 0.05% SDS, respectively. The PA28 activity was assayed by measuring Suc-LLVY-MCA hydrolysis, as described in Experimental procedures (▲, shaded). Protein (—) were measured. Upper panels: Immunoblot analysis with anti-PA28 α , anti-PA28 β and anti-PA28 γ antibodies. Numbers at the bottom of the upper panels correspond to fraction numbers in the lower panel.

収された。興味深いことに PA28 γ も PA28 α および PA28 β の溶出分画に回収されたが、その免疫学的反応性は PA28 α および PA28 β と比較すると非常に弱いことが分かった。この結果は用いた三種の抗体の力価がほぼ同じ程度であることを考えると (Fig. 2), ラット肝臓の可溶性分画に含まれる PA28 γ の量が少ないことを示唆している。

最近, PA28 α と PA28 β がプロテアソームと *in vitro* で会合することが報告されているので (Song ら, 1996; Kuehn, Dahlmann, 1996), PA28 γ もプロテアソームに会合するか否かについて検討した。Experi-

mental procedures の項で述べたように精製した PA28 を不活性型プロテアソームの有無でプレインキュベートした後, グリセロール密度勾配遠心法で分画し Suc-LLVY-MCA の分解活性を測定した。Fig. 4A に示すように, PA28 は分画番号 25-30 に回収された。一方, プロテアソームと結合した PA28 は 15-18 の分画に回収された (Fig. 4B)。この PA28-プロテアソーム複合体の沈降する速度は精製したプロテアソームが単独で沈降する速度 (分画 20 前後) より早いことが分かった (未発表)。また各分画に精製したプロテアソームを加えて Suc-LLVY-MCA の分解活性を測定する

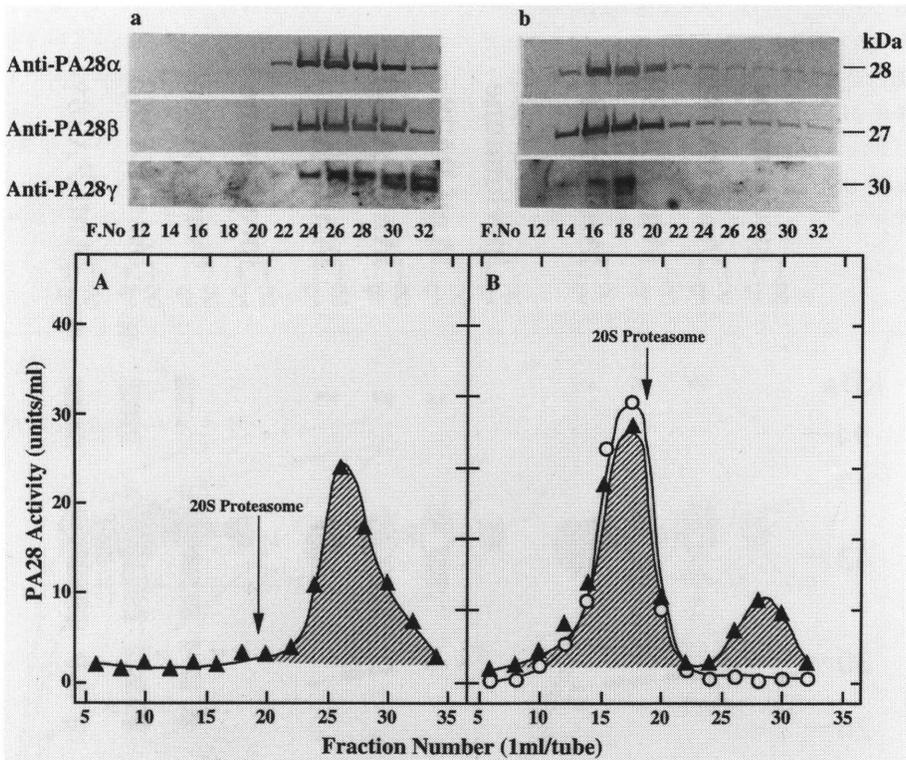


Fig. 4 Association of the PA28 α , PA28 β and PA28 γ with the 20S latent proteasome, leading to the dramatic activation. A: Samples (1 mg) of the PA28 were analyzed glycerol density-gradient centrifugation. B: Samples (1 mg) of the PA28 were preincubated with the purified 20S proteasome (0.5 mg) for 30 min at 4 °C and then were analyzed as for A. Fractions of 1 ml were collected from the bottom of the centrifuge tubes. Sample of the fractions were assayed for Suc-LLVY-MCA hydrolysis in the absence (○) or presence (▲) of the purified rat proteasome. a, b: Immunoblot analysis were performed using anti-peptide antibodies against PA28 α , PA28 β and PA28 γ . Protein in 150 μ l each fraction were precipitated with acetone and subjected to immunoblot analysis. Numbers at the bottom of the upper panels, a and b, correspond to fraction numbers in the lower panel of A and B, respectively.

と、プロテアソームに結合しない PA28 が Fig. 4A と同じ分画 (25-30) に検出されたがその活性のピークは非常に小さくなっていた。そこで次にイムノブロット分析により PA28 α , PA28 β , PA28 γ の動態を調べた。予想されたように PA28-プロテアソーム複合体が回収された分画には PA28 α と PA28 β の両方が検出された (Fig. 4a, b)。そして、PA28 γ も PA28-プロテアソーム複合体の回収分画に検出され、PA28 γ が PA28 α と PA28 β と同様にプロテアソームに会合していることが判明した。この結果は PA28 γ が PA28

蛋白質の新しいファミリーに属することを強く示唆している。

II. PA28 γ は PA28 α と PA28 β からなるヘテロポリマー複合体とは異なる複合体を形成する。

最近、PA28 α と PA28 β が PA28($\alpha\beta$)₃ の分子構成を有したヘテロポリマー複合体として分子集合することが示唆されている (Kuehn, Dahlmann, 1996; Songら, 1996)。そこで、PA28 γ が α と β サブユニットから構成される異型六量体に会合するか否かを検討した。PA28 γ と PA28 α/β との相互作用を解析するため、

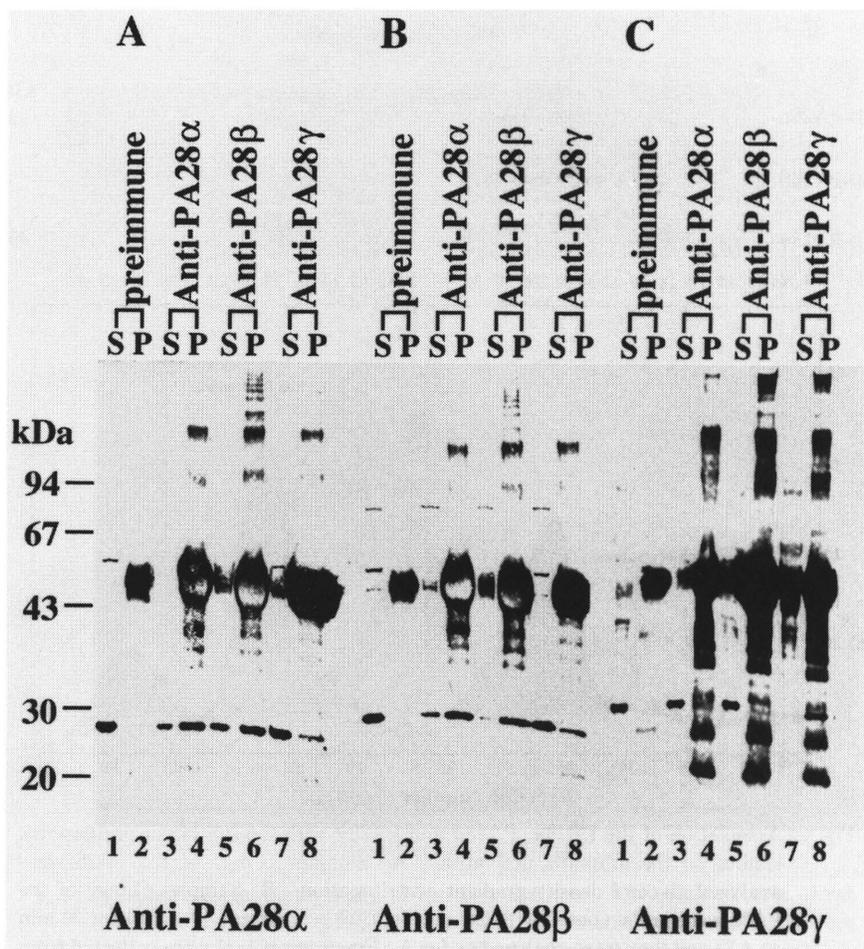


Fig. 5 Immunoprecipitation analysis of the purified PA28 by anti-PA28 α , anti-PA28 β and anti-PA28 γ antibodies. For details, see Experimental procedures. A20 μ l of three anti-PA28 α , anti-PA28 β and anti-PA28 γ antibodies, and preimmune sera that had been bound to Protein A-Sepharose were incubated with the purified PA28. After low speed centrifugation, the soluble (S) and insoluble (P) were used for immunoblot analysis using anti-PA28 α (A), anti-PA28 β (B) and anti-PA28 γ (C) antibodies.

各々の抗体を用いた免疫沈澱実験を行った。Fig. 5A, B に示すように抗 PA28 α 抗体および抗 PA28 β 抗体は共に単独で PA28 α と PA28 β の両方を免疫沈澱させたが PA28 γ は全く沈澱させなかった。これらの結果とは逆に、抗 PA28 γ 抗体は PA28 α と PA28 β を沈澱させることなく、PA28 γ のみを特異的に沈澱させた (Fig. 5C)。これらの免疫沈澱反応は pre-immune IgG で全く観察されなかった。これらの結果から、PA28 γ の複合体には PA28 α と PA28 β が含まれていないことが判明した。そしてグリセロール密度勾配遠心法により、PA28 γ -プロテアソーム複合体が PA28 ($\alpha\beta$)₃-プロテアソーム複合体と同じ分画に沈降してくることから、PA28 γ は PA28 α と PA28 β から構成されるヘテロポリマー複合体とほぼ同じサイズを有していることが考えられた。従って PA28 γ は PA28(γ)₆ のホモポリマー複合体を形成すると推定された。

III. プロテアソームに対する PA28 α , β および PA28 γ の効果

Realini ら (1994) は大腸菌で発現させた PA28 α が単独でプロテアソームを活性化することを示した。ま

た PA28 α をコードする cDNA を発現ベクターに組み込んで抗原提示細胞にトランスフェクションすると特異的にキラーT細胞が誘導されることが判明している (Groettrup ら, 1996)。しかし、他の PA28分子、 β と γ 、のプロテアソームに対する効果は明らかにされていない。これら三種の PA28 分子のプロテアソームに対する影響を大腸菌で発現させたリコンビナント蛋白質を用いて検討した。pET システムで発現させた三種の PA28 はいずれもそれらのほとんどが不溶性になるため 8M 尿素を含む緩衝液で溶解し、Ni²⁺ を固定したアフィニティークロマトグラフィーで精製した。このように変性状態で分離した PA28 を透析により徐々に尿素を除いて再生処理するとそれらの約 50% が可溶性蛋白質となって回収されたのでこれらを用いてプロテアソームに対する効果を調べた。Fig. 6 に示すように、PA28 α は単独で加えると蛋白濃度依存的にプロテアソームのペプチド分解反応を顕著に活性化した。本実験ではN末端に His-tag の結合したリコンビナント PA28 を使用したので、Factor Xa で処理して tag 部分を除去して同様に行ってもプロテアソーム

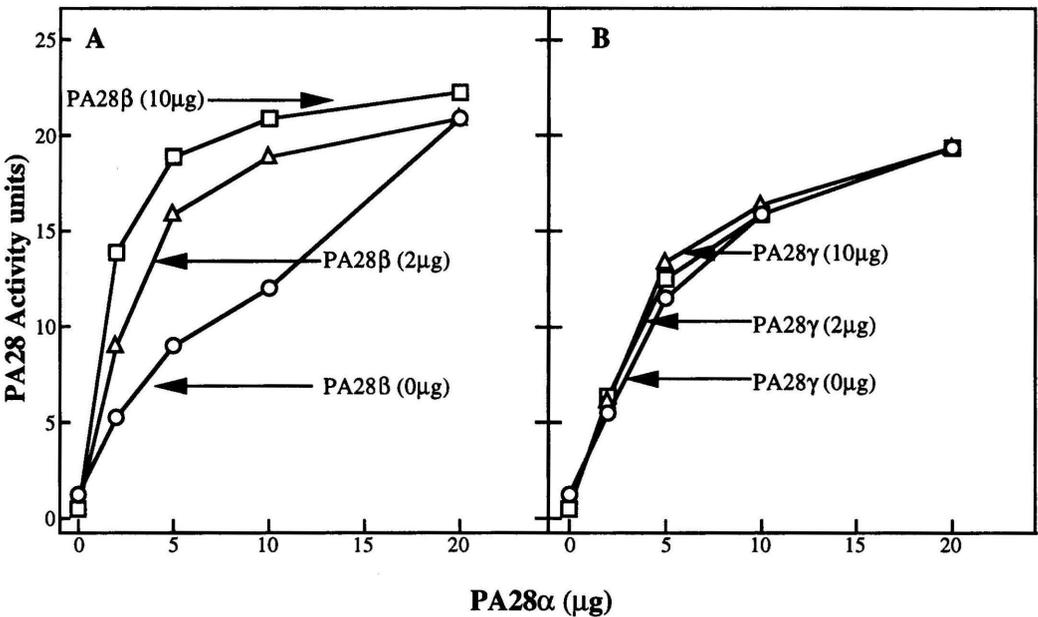


Fig. 6 The effect of recombinant PA28 proteins on the Suc-LLVY-MCA degrading activity of the purified 20S latent proteasome. Recombinant PA28 α was added with various concentration as indicated in the absence (0 μ g) or presence of (2 μ g) of (10 μ g) of PA28 β (A) or PA28 γ (B) prior to measure Suc-LLVY-MCA degradation.

の活性化にする効果には全く影響しなかった。この結果は、PA28 がそのC末端を介しプロテアソームに会合するという以前の報告と一致した (Ma ら, 1992)。一方、PA28 β 単独ではプロテアソーム活性化に全く影響しなかった。しかし、PA28 α が低濃度存在した場合には PA28 β を加えると著しい活性化の増強が観察されたが、PA28 α が過剰に存在する場合には PA28 β の添加効果は全く認められなかった。PA28 γ は PA28 α もしくは PA28 β の有無にかかわらず Suc-LLVY-MCA を基質としたプロテアソームのペプチド活性には全く影響しなかった。

IV. 3種の PA28 をコードする mRNA のヒトにおける組織分布

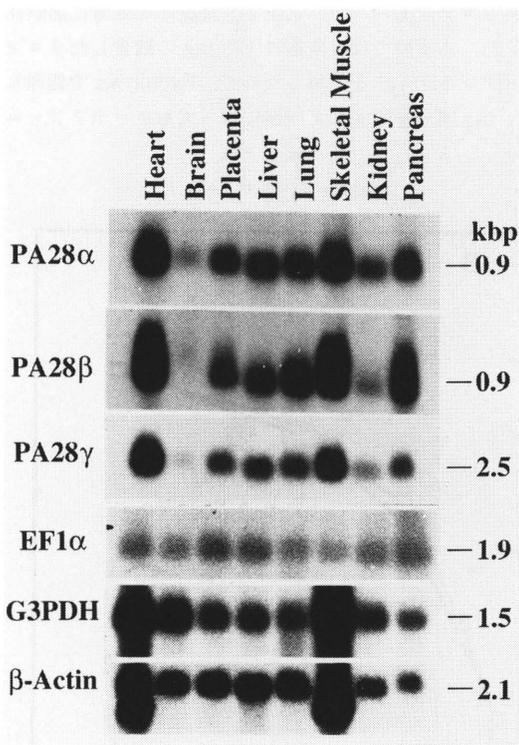


Fig. 7 RNA blot hybridization of human PA28 cDNAs with poly (A)+RNAs from various human tissues. Amounts of mRNA encoding PA28 α , PA28 β and PA28 γ were analyzed by RNA blot hybridization (Aki et al., 1994). The positions of RNA size markers are shown (in kilobases) on the right.

様々なヒトの組織における PA28 α と PA28 β そして PA28 γ をコードする mRNA の発現レベルをノーザンブロット法で比較した (Fig. 7)。三種の mRNA は調べた全ての組織で検出されたが特に心臓と骨格筋で高く発現していることが分かった。これら PA28 の発現は 20Sプロテアソームや 26Sプロテアソームを構成する調節サブユニットの mRNA の動態と一致した (Tsurumi ら 1995, 1996)。興味深いことは、PA28 α と PA28 β の mRNA のサイズが約 0.9 kbp であるにもかかわらず、PA28 γ は 2.5 kbp と非常に大きいことである。これは PA28 γ をコードする cDNA の 3' 側に長い非翻訳領域が存在することに起因すると思われる (Nikaido ら, 1993)。対照として EF α , G3PDH, そ

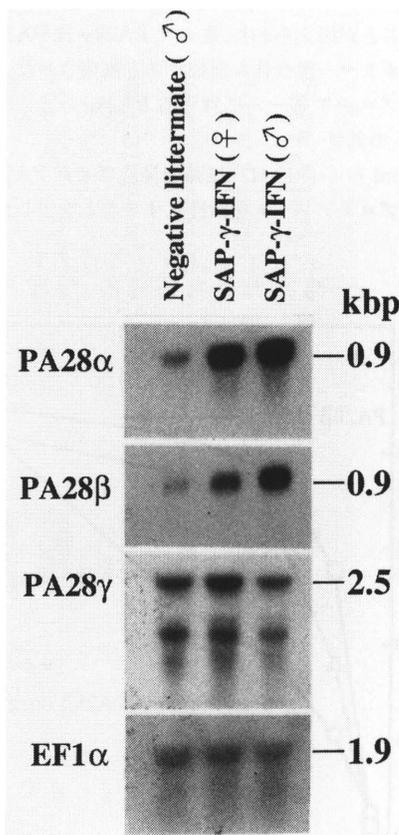


Fig. 8 The mRNA levels encoding three proteasomal activator proteins in the liver of transgenic mice carrying SAP- γ -IFN gene. The liver from each negative littermate (σ) and transgenic mice (σ , ♀) expressing γ -IFN gene (IAP- γ -IFN) were analyzed by RNA blot hybridization for the levels of mRNA encoding PA28 α , PA28 β and PA28 γ .

して β -actin の mRNA のレベルを検討したところ、EF1 α はヒトの調べた全ての組織において比較的均一に発現していたが G3PDH と β -actin の mRNA レベルは PA28 と同様に筋組織で高く検出された。

V. PA28 ファミリー蛋白質の γ -IFN による調節

Ahn ら (1995) はヒトの培養細胞を γ -IFN で処理すると PA28 α と PA28 β の mRNA レベルが12時間以内に顕著に増加するが、PA28 γ の mRNA レベルは γ -IFN に大きく影響しないことを報告した。そこで本実験では、 γ -IFN 遺伝子を肝特異的な血清アミロイド P 成分のプロモーターを用いて肝細胞で発現させるようにしたトランジェニックマウス (SAP- γ -IFN) の肝臓 (Toyonaga ら, 1994) を用いて三種の PA28 の蛋白質の発現レベルの変動を調べた。Fig. 8 に示すように、PA28 α と PA28 β の mRNA は SPA- γ -IFN では雄、雌ともに対照マウス (Negative littermate) に比較して著しく増加しているが、PA28 γ の mRNA はほとんど変動しないことが分かった。このとき、PA28 γ の

cDNA をハイブリダイゼーションすると二つのバンドが検出されたが、これらが同一の PA28 γ をコードしているか否かは不明である。

次にこれらのトランスジェニックマウスの肝臓から調整した粗抽出液を用いて三種の PA28 蛋白質レベルの変動をイムノプロット法で検討した。Fig. 9A に示すように、PA28 α と PA28 β は SAP- γ -IFN で明確に増加していた。一方、驚いたことに PA28 γ は二種の PA28 蛋白質と異なり完全に消失することが分かった。そこでさらに培養細胞を用いて γ -IFN の影響を同様にイムノプロット法で検討した。Fig. 9B に示すように PA28 α と PA28 β の蛋白質レベルは共に γ -IFN の処理に反応して増加したが、逆に PA28 γ は時間依存在に減少した。これらの結果から、 γ -IFN が PA28 α /PA28 β と PA28 γ の発現を転写レベル及び転写後のレベルを介して相反的に調節していることが示唆された。

次に γ -IFN の処理で増加した PA28 α と PA28 β が

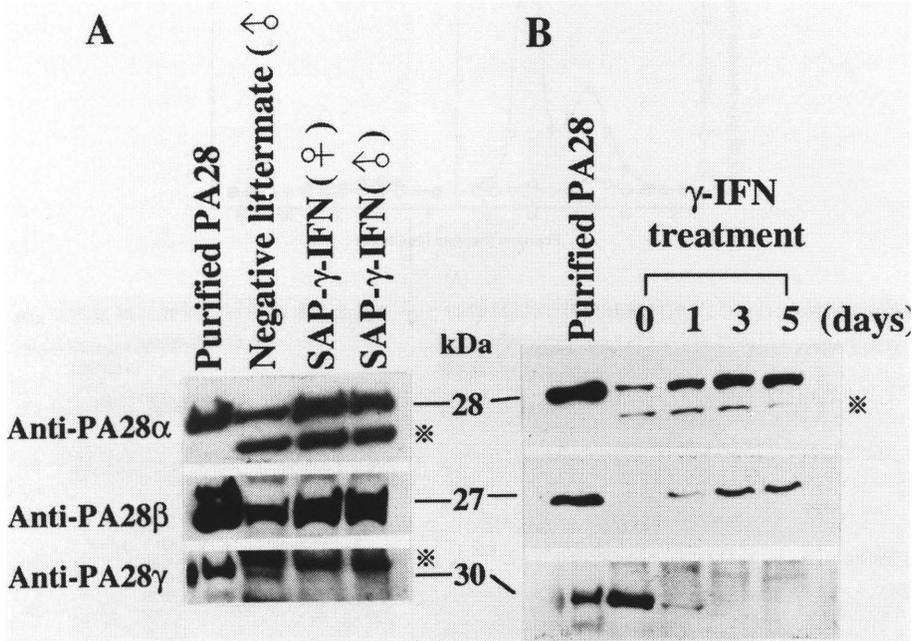
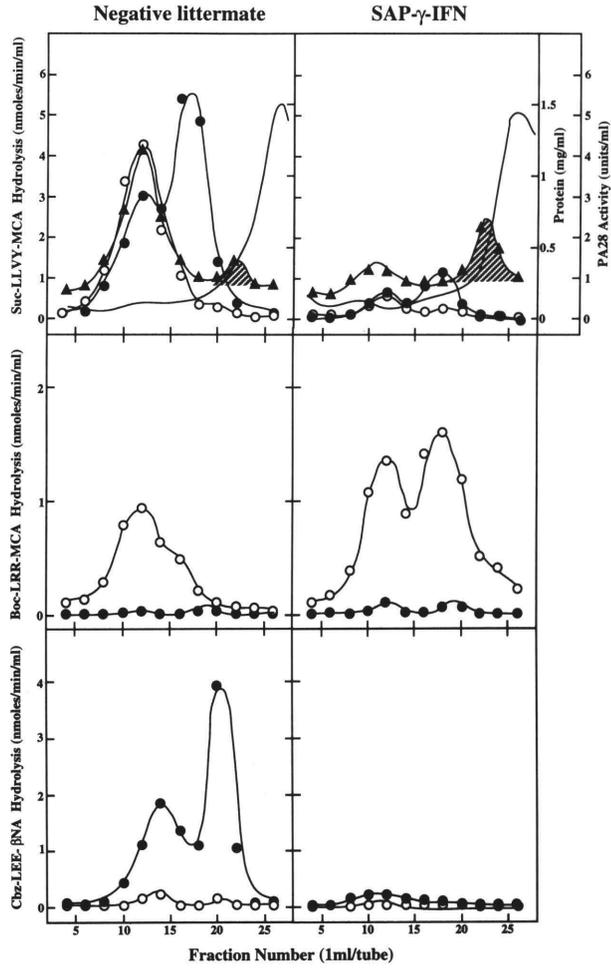
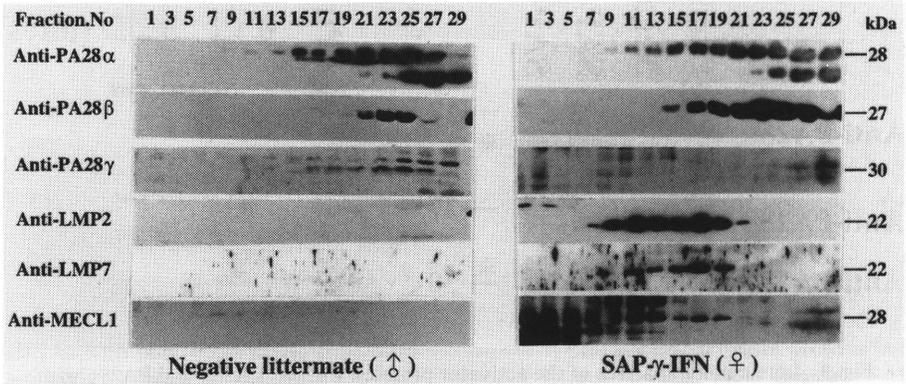


Fig. 9 Immunoblot analyses of the activator proteins, PA28 α , PA28 β and PA28 γ with the respective antibodies in the liver of transgenic mice carrying SAP- γ -IFN gene (A) and SW620 cells cultured with γ -IFN (B). A: Sample of purified PA28 (1 μ g) and crude extract (50 μ g) of liver from negative littermate (σ) and transgenic mice (σ , ϕ) were subjected to immunoblot analysis. B: The cell extract (50 μ g) of with or without γ -IFN treatment for various days as indicated were subjected to immunoblot analysis.



(A)



(B)

Fig. 10 The activities of 20S and 26S proteasomes and PA28 of liver from negative littermates and transgenic mice carrying carrying SAP- γ -IFN gene separated by glycerol density-gradient centrifugation (A). Samples (15 mg proteins) of crude of liver from negative littermates (left panels) and transgenic mice (right panels) were analyzed by glycerol density-gradient centrifugation. Fractions of 1 ml were collected from the bottom of the centrifuge tubes. Aliquots (10–20 μ l) of each fractions were used for measuring various peptidase activities. Top panels: protein concentration (–) and Suc-LLVY-MCA hydrolysis. Middle panels: Boc-LRR-MCA cydrolysis. Bottom panels: Cbz-LLE- β NA hydrolysis. The fluorogenic peptide degrading activities were assayed with (●) or without (○) 0.05% SDS. The PA28 activity was assayed with the purified 20S latent proteasome (▲, shaded). B: Immunoblot analysis of the activator proteins, PA28 α , PA28 β and PA28 γ , and γ -IFN-inducible proteasome subunits, LMP2, LMP7 and MECL-1, in the liver of negative littermate (left panels) transgenic mice carrying SAP- γ -IFN gene (right panels). Numbers are fraction numbers corresponding to those in A. Immunoblott analysis were performed using anti-peptide antibodies against the respective proteins. Protein in 150 μ l each fraction were precipitated with acetone and subjected to immunoblot analysis. Asterisks indicate artifact bands by anti-PA28 antibodies, because they were not detected in the purified 28 samples.

プロテアソームに会合し、プロテアソームの活性化に寄与しているか否かを検討した。このためマウスの肝臓の粗抽出液をグリセロール密度勾配遠法で分画した。本法により 26S プロテアソームと 20S プロテアソームが明確に分離できることが分かっているので (Aki, 1994), 最初にこれらの分布を調べた。このため、プロテアソームの三種のペプチド分解活性, すなわちキモトリプシン様活性である Suc-LLVY-MCA, トリプシン様活性である Boc-LRR-MCA そして V8 様プロテアーゼ様活性である Cbz-LLE- β NA を基質としてペプチダーゼ活性を測定した。Fig. 10A に示すように SAP- γ -IFN のマウス肝臓においては, 20S プロテアソームと 26S プロテアソームのキモトリプシン様, 酸性プロテアーゼ様活性はほぼ完全に減少したが逆にトリプシン様活性は大きく増加した。そこで PA28 活性を精製したプロテアソームを添加して測定した結果, プ

ロテアソームに結合していない PA28 複合体が回収される分画 (20–25) での増強が SAP- γ -IFN からの試料で観察された。しかしながら不思議なことに, PA28-20S プロテアソーム複合体の沈降分画 (15–18) にはペプチダーゼ活性, すなわち活性化したプロテアソームが認められなかった。そこで γ -IFN で誘導された PA28 α と PA28 β が実際にプロテアソームに会合しているか否かをイムノプロット法で検討した。Fig. 10B に示したように PA28 α と PA28 β の蛋白質の量は, 15–20 の分画で明確に増加し, γ -IFN で誘導された PA28 α と PA28 β が 20S プロテアソームに会合していることが判明した。一方 PA28 γ の蛋白質は完全に消失した。また免疫プロテアソームのサブユニットである LMP2, LMP7, MECL1 は以前報告されているように (Akiyama ら, 1994; Hisamatsu ら, 1996), 20S プロテアソームおよび 26S プロテアソームの分画

において増加していることが観察された。

考 察

本研究ではプロテアソーム活性化因子 PA28 が α , β , γ の少なくとも三種の相同性の高い蛋白質から構成されていることを明らかにした。そして密度勾配遠心法の実験から、PA28 α /PA28 β -プロテアソーム複合体と PA28 γ -プロテアソーム複合体が同じ分画に沈降してくること (Fig. 4), 及び免疫沈澱実験により PA28 γ が PA28 α と PA28 β から構成される複合体に含まれないこと (Fig. 5) から、PA28 γ は PA28 α と PA28 β のヘテロポリマー型複合体とは異なるホモポリマー型複合体を形成することが示唆された。それではなぜ細胞内に二種の、恐らく PA28($\alpha\beta$)₃ と PA28(γ)₆ の PA28 複合体が存在するのか? 三種の PA28 分子の機能は何か? ということが問題となってくる。そこで今回の研究結果について現在までの知見を合わせて考察する。

これまでの研究から、PA28 は変性状態の基質蛋白質あるいはユビキチン化蛋白質の有無にかかわらず全く作用せず、蛍光ペプチド基質の分解活性を顕著に促進するということが報告されている (Ma ら, 1992; Dubiel ら, 1992)。そして精製した PA28, おそらく PA28 α と PA28 β の複合体がプロテアソームのペプチターゼ活性に対して Vmax の増加と Km の減少を導くという結果を示し、PA28 がアロステリック効果のように作用する可能性を示唆した。また大腸菌で発現させたリコンビナント PA28 α は単独でも不活性化型プロテアソームを十分に活性化できることが明らかになった (Fig. 6A; Realini ら, 1994)。しかし PA28 β と PA28 γ は各々単独ではプロテアソームの活性に全く影響しなかった、PA28 β は活性化に必要な PA28 α の濃度を見かけ上減少させる効果を示すことが判明した (Fig. 6)。この結果、PA28 α と PA28 β は機能的に相互作用していることが示唆された。実際、PA28 α と PA28 β が細胞内で PA28($\alpha\beta$)₃ の hetero-oligomeric 複合体を形成することが示唆されている (Ahn ら, 1996; Song ら, 1996)。Fig. 1 (上部のパネル) に示したように、電子顕微鏡による解析から精製した PA28 はディスク粒子であるがプロテアソームの両端に会合するとフットボール型粒子を形成することが判明している (Lupas ら, 1993; Gray ら, 1994)。従って PA28 は ATP 依存性プロテアーゼであるダブル型の 26S プロテアソームを形成するもう一つの調節複合体、PA700, と 20S プロテアソームの同じ部

位に競合して会合していると推定された (Fig. 1 の上下パネルを比較; Yoshimura ら, 1993; Peters, 1994)。

Ki 抗原は最初、自己免疫疾患として知られている全身性エリテマトーデスの患者血清に見つかった自己抗体に対する抗原として同定された (Nikaido ら, 1990)。その後 PA28 α と PA28 β の cDNA がクローニングされると、これら PA28 が Ki 抗原と高い相同性があることが判明した (Ahn ら, 1995) が、Ki 抗原が実際 PA28 を構成するサブユニットであるか否かは不明であった。本研究では Ki 抗原に特異的な抗体を精製した PA28 に明確に反応すること (Fig. 2), および Ki 抗原がプロテアソームに会合すること (Fig. 4) を証明し、Ki 抗原が新しい PA28 のメンバーに属することを提案した。これまでの報告では精製した PA28 が二種の蛋白質から構成されていることが判明しているが (Ma ら, 1992), なぜ PA28 γ が検出されなかったのかは不明である。一つの可能性としては赤血球から単離した PA28 標品には PA28 γ の含量がきわめて少ないことが考えられる。実際、抗 PA28 γ 抗体を用いたイムノブロット分析では赤血球の粗抽出液においては PA28 γ が検出できなかった (未発表)。さらに、Ki 抗原, すなわち PA28 γ が核内蛋白質として同定されたことから細胞質にはわずかしき含まれていないとも考えられる (Nikaido ら, 1990)。またイムノブロット解析よりヒトの癌細胞においては PA28 γ は正常細胞に比較して多く発現しているように観察された (未発表)。実際 PA28 γ の mRNA の発現レベルは細胞周期の S 期において増加することが示唆されている (Nikaido ら, 1990)。これらの結果から考えると、PA28 γ は PA28 α/β の機能とは異なり、細胞の増殖に関与している可能性が高いと思われる。また、PA28 γ はこれまで使用してきた蛍光ペプチド分解活性には明確な効果を示さなかったため、現在 PA28 γ の分子機能は不明であるが、適当な標的基質が見つければ PA28 γ のプロテアソームに対する作用が明らかになるかもしれない。

PA28 の生物化学的意義はまだ確立されていないが、最近 PA28 が免疫学的に重要であることが強く示唆されている。それは、PA28 α がケラチノサイト細胞において γ -IFN に最もよく応答する遺伝子として同定された IGUPI-5111 と同一分子であることが判明したことがきっかけとなった (Honoré ら, 1993)。次に Ahn ら (1995) は γ -IFN が PA28 α をコードする mRNA のみならず PA28 β も誘導させることを最近報告した。

さらに本研究では PA28 α と PA28 β の蛋白質レベルも γ -IFN に強く応答して増加するが、逆に PA28 γ は mRNA が変化しないにも関わらず蛋白質レベルが時間依存的に消失することを見出した (Fig. 9). 従って PA28 ファミリー蛋白質に対する γ -IFN による調節は多様であると考えられ、しかしながら、 γ -IFN は PA28 α/β の mRNA を上昇させるので、これらをコードする遺伝子の転写を促進させると推定されるが PA28 γ の mRNA レベルには影響しないので、 γ -IFN 処理による PA28 γ の消失の分子機構は転写後レベルであることが示唆された。

γ -IFN は免疫インターフェロンとも呼ばれ免疫制御に作用する最も重要なサイトカインであり、実際抗原提示に応答する TAP トランスポーターや MHC 分子の遺伝子発現を強く増強させる方向に導くことが知られている (Billiau, 1996). また我々 (Akiyama ら, 1994; Hisamatsu ら, 1996) や他のグループ (Belich ら, 1994; Fröh ら, 1994) の研究において、 γ -IFN は内性抗原のプロセッシングにより適しているプロテアソームのサブユニット, LMP2, LMP7 そして MECL1 を特異的に誘導してプロテアソームの分子構成を変換させる作用があることを証明している。そして我々はこの γ -IFN にて誘導されたプロテアソームを“免疫プロテアソーム”と命名することを提案した (Tanaka, 1997). 実際、 γ -IFN は塩基性あるいは疎水性アミノ酸の C 端側ペプチド結合を加水分解する活性を増加させるが逆に酸性アミノ酸の C 端側ペプチド分解活性は抑制させる (Gaczynska ら, 1993; Driscoll ら, 1993). 細胞表面の MHC クラス I 分子に結合している抗原ペプチドの C 末端には酸性アミノ酸がほとんど存在せず、疎水性あるいは塩基性アミノ酸を C 末端にもつペプチドが高頻度にクラス I 分子に結合していることから (Rammensee, 1995), γ -IFN 依存的なプロテアソームの基質特異性の変化は MHC クラス I 分子に提示されるペプチドの生成に適していると考えられる。一方逆に、 γ -IFN によるキモトリプシン様活性の減少が他のグループから報告された (Boes ら, 1994; Ustrell ら, 1995). 我々も培養細胞を一時的に γ -IFN で処理すると、キモトリプシン様活性が増加することが報告した (Aki ら, 1994) が、本研究で示すように (Fig. 10A), γ -IFN を持続的に長期間処理する条件ではキモトリプシン様活性は逆に減少することが判明した。このように、キモトリプシン様活性は様々な細胞の状態で容易に変化すると考えられる。他方、本研究により γ -IFN が 20S プロテアソームの分子構

成を変化させるのと同様に PA28 ファミリー蛋白質の分子構成をも変化させることが判明したが、その意義は不明である。しかし γ -IFN の作用から考えるとこのサイトカインで誘導される PA28 α と PA28 β は内性抗原のプロセッシング提示と関与することが予想される。実際、PA28 α の cDNA をトランスフェクションしてこの分子の発現を増強すると、特異的なキラー T 細胞を誘導させること (Groettrup ら, 1995), さらに PA28 が *in vitro* で MHC クラス I 分子のリガンドを効果的に産生させることが最近報告されている (Dick ら, 1996). 一方 PA28 γ は γ -IFN に応答して発現が減少するので PA28 α/β の作用とは異なり免疫応答には無関係であるのかもしれない。

ごく最近 Kasahara ら (1996) は免疫プロテアソームを構成するサブユニット群が MHC 遺伝子領域にコードされた遺伝子群と共に染色体重複によって造成され、これらの遺伝子群の起源が脊椎動物が抗原特異的な免疫システムを獲得する時期に一致することを提案し、従って γ -IFN に応答する PA28 遺伝子の分子進化は興味深く、これが PA28 の機能を解明する鍵になるかもしれない。実際、PA28 の活性が免疫システムを持たない酵母や植物などの粗抽出液には同定されないことを確認した (未発表). また PA28 に相当する遺伝子が酵母のゲノム上に見つからないことが判明した。これらの結果は PA28 の遺伝子が真核生物の進化の初期には存在せず、生物が多くの抗原提示を担当する遺伝子群と共に免疫システムを取得した段階で新たに獲得したという可能性が考えられる。今後は PA28 の構造と機能の関連性について分子レベルでの解析を進めると共に、三種の PA28 遺伝子を単独あるいは重複して破壊したノックアウトマウスを作製し、これらの生理機能を解析する必要があると考えている。

稿を終わるに臨み、御指導と御校閲を賜った徳島大学酵素科学研究所、酵素病理部門福井清教授、東京都臨床医学総合研究所、化学療法部門田中啓二部長に深く感謝します。また本研究を行うにあたり御協力頂いた徳島大学医学部泌尿器横田欣也助手、住友電工バイオマテリアル研究所の皆様方に深謝致します。

文 献

- 1 Ahn, J. Y., Tanahashi, N., Akiyama, K., Hisamatsu, H., Noda, C., Tanaka, K., Chung, C. H., Shimbara, N., Willy, P. J., Mott, J. D., Slaughter, C. A., and DeMartino, G. N. (1995): Primary structures of

- two homologous subunits of PA28, a γ -interferon-inducible protein activator of the 20S proteasome. *FEBS Lett.*, 366, 37-42
- 2 Ahn, K., Erlander, M., Leturcq, D., Peterson, P. A., Fruh, K., and Yang, Y. (1996) : In vivo characterization of the proteasome regulator PA28. *J. Biol. Chem.*, 271, 18237-18242
 - 3 Aki, M., Shimbara, N., Takashina, M., Akiyama, K., Kagawa, S., Tamura, T., Tanahashi, N., Yoshimura, T., Tanaka, K., and Ichihara, A. (1994) : Interferon- γ induces different subunit organizations and functional diversity of proteasomes. *J. Biochem.*, 115, 257-269
 - 4 Akiyama, K., Yokota, K., Kagawa, S., Shimbara, N., Tamura, T., Akioka, A., Nothwang, H. G., Noda, C., Tanaka, K., and Ichihara, A. (1994) : cDNA cloning and interferon- γ down-regulation of proteasomal subunits X and Y. *Science*, 265, 1231-1234
 - 5 Belich, M. P., Glynne, R. J., Senger, G., Sheer, D., and Trowsdale, J. (1994) : Proteasome components with reciprocal expression to that of the MHC-encoded LMP proteins. *Curr. Biol.*, 4, 769-776
 - 6 Billiau, A. (1996) : Interferon- γ : biology and role in pathogenesis. *Adv. Immunol.*, 62, 61-130
 - 7 Boes, B., Hengel, H., Ruppert, T., Multhaup, G., Koszinowski, U.H., and Kloetzel, P. M. (1994) : Interferon- γ stimulation modulates the proteolytic activity and cleavage site preference of 20S proteasomes. *J. Exp. Med.*, 179, 901-909
 - 8 Bradford, M. M. (1976) : A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72, 248-254
 - 9 Ciechanover, A. (1994) : The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway. *Cell*, 79, 13-21
 - 10 Coux, O., Tanaka, K., and Goldberg, A. L. (1996) : Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Annu. Rev. Biochem.*, 65, 801-847
 - 11 DeMartino, G. N., and Slaughter, C. (1993) : Regulastory proteins of the proteasome. *Enzyme Protein*, 47, 314-324
 - 12 Dick, T. K., Ruppert, T., Groettrup, M., Kloetzel, P. M., Kuehn, L., Koszinowski, U., Strvanovic, S., Schild, H., and Rammensee, H. G. (1996) : Coordinated dual cleavages induced by the proteasome regulator PA28 lead to dominant MHC ligands. *Cell*, 86, 253-262
 - 13 Driscoll, J., Brown, M. G., Finley, D., and Monaco, J. J. (1993) : MHC-linked LMP gene products specifically alter peptidase activities of the proteasome. *Nature*, 365, 262-264
 - 14 Dubiel, W., Pratt, G., Ferrell, K., and Rechsteiner, M. (1992) : Purification of an 11S regulator of the multicatalytic protease. *J. Biol. Chem.*, 267, 22369-22377
 - 15 Früh, K., Gossen, M., Wang, K., Bujard, H., Peterson P. A., and Yang, Y. (1994) : Displacement of housekeeping proteasome subunits by MHC-encoded LMPs : a newly discovered mechanism for modulating the multicatalytic proteinase complex. *EMBO J.*, 13, 3236-3244
 - 16 Gaczynska, M., Rock, K. L., and Goldberg, A. L. (1993) : γ -interferon and expression of MHC genes regulate peptide hydrolysis by proteasomes. *Nature*, 365, 264-267
 - 17 Gray, C. W., Slaughter, C. A., and DeMartino, G. N. (1994) : PA28 activator protein forms regulatory caps on proteasome stacked rings. *J. Mol. Biol.*, 236, 7-15
 - 18 Groettrup, M., Soza, A., Eggers, M., Kuehn, L., Dick, T. P., Schild, H., Rammensee, H. G., Koszinowski U., and Kloetzel, P. M. (1996) : Arole of the proteasome PA28 α in antigen presentation. *Nature*, 381, 166-168
 - 19 Heemels, M. T., and Ploegh, H. (1995) : Generation, translocation, and presentation of MHC class I-restricted peptides. *Annu. Rev. Biochem.*, 64, 463-491
 - 20 Hershko, A., and Ciechanover, A. (1992) : The

- ubiquitin system for protein degradation. *Annu. Rev. Biochem.*, 61, 761-807
- 21 Hilt, W., and Wolf, D. H. (1995) : Proteasomes : destruction as a programme. *Trends Biochem. Sci.*, 21, 96-102
 - 22 Hisamatsu, H., Shimbara, N., Saito, Y., Kristensen, P., Hendil, K. B., Fujiwara, T., Takahashi, E., Tanahashi, N., Tamura, T., Ichihara, A., and Tanaka, K. (1996) : Newly identified pair of proteasomal subunits regulated reciprocally by interferon- γ . *J. Exp. Med.*, 183, 1807-1816
 - 23 Hochstrasser, M. (1995) : Ubiquitin, proteasomes, and the regulation of intracellular protein degradation. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 7, 215-223
 - 24 Honoré, B., Leffers, H., Madsen, P., and Cellis, J. E. (1993) : Interferon- γ up-regulates a unique set of protein in human keratinocytes. Molecular cloning and expression of cDNA encoding the RGD-sequence-containing protein IGUP I-5111. *Eur. J. Biochem.*, 218, 421-430
 - 25 Kanayama, H., Tamura, T., Ugai, S., Kagawa, S., Tanahashi, N., Yoshimura, T., Tanaka, K., and Ichihara, A. (1992) : Demonstration that a human 26S proteolytic complex consists of a proteasome and multiple associated protein components and hydrolyzes ATP and ubiquitin-ligated proteins by a closely linked mechanism. *Eur. J. Biochem.*, 206, 567-578
 - 26 Kasahara, M., Hayashi, M., Tanaka, K., Inoko, H., Sugaya, K., Ikemura, T., and Ishibashi, T. (1996) : Chromosomal localization of the proteasome Z gene reveals an ancient chromosomal duplication involving the major histocompatibility complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 9096-9101
 - 27 Kuehn, L., and Dahlmann, B. (1996) : Proteasome activator PA28 and its interaction with 20S proteasomes. *Arch. Biochem. Biophys.*, 329, 87-96
 - 28 Laemmli, U. K. (1970) : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685
 - 29 Lupas, A., Koster, A. J., and Baumeister, W. (1993) : Structural features of 26S and 20S proteasomes. *Enzyme Protein*, 47, 252-273
 - 30 Ma, C. P., Slaughter, C. A., and DeMartino, G. N. (1992) : Identification, purification, and characterization of a protein activator (PA28) of the 20S proteasome (macropain). *J. Biol. Chem.*, 267, 10515-10523
 - 31 Monaco, J. J., and Nandi, D. (1995) : The genetics of proteasomes and antigen processing. *Annul. Rev. Genetics*, 29, 729-754
 - 32 Mott, J. D., Pramanik, B. C., Moomaw, C. R., Afendis, S. J., DeMartino, G. N., and Slaughter, C. A. (1994) : PA28, an activator of the 20S proteasome, is composed of two nonidentical but homologous subunits. *J. Biol. Chem.*, 269, 31466-31471
 - 33 Murakami, Y., Matsufuji, S., Kameji, T., Hayaishi, S., Igarashi, K., Tamura, T., Tanaka, K., and Ichihara, A. (1992) : Ornithine decarboxylase is degraded by the 26S proteasome without ubiquitination. *Nature*, 360, 597-599
 - 34 Nikaido, T., Shimada, K., Shibata, M., Hata, M., Sakamoto, M., Takasaki, Y., Sato, C., Takahashi, T., and Nishida, Y. (1990) : Cloning and nucleotide sequence of cDNA for Ki antigen, a highly conserved unclear protein detected with sera from patients with systemic lupus erythematosus. *Clin. Exp. Immunol.*, 79, 209-214
 - 35 大海 忍, 辻村邦夫, 稲垣昌樹 (1994) : 細胞工学 (別冊). 48-54
 - 36 Peters, J. M. (1994) : Proteasomes : protein degradation machines of the cells. *Trends Biochem. Sci.*, 19, 377-382
 - 37 Rammensee, H. G., Friede, T., and Stefanovi, S. (1995) : MHC ligands and peptide motifs : first listing. *Immunogenetics*, 41, 178-228
 - 38 Realini, C., Dubiel, W., Pratt, G., Ferrell, K., and Rechsteiner, M. (1994) : Molecular cloning and expression of a γ -interferon-inducible activator of the multicatalytic

- protease. *J. Biol. Chem.*, 269, 20727-20732
- 39 Rechsteiner, M., Hoffman, L., and Duiel, W. (1993): The multicatalytic and 26S proteases. *J. Biol. Chem.*, 268, 6065-6068
- 40 Rivett, A. J. (1993): Proteasomes: multicatalytic proteinase complexes. *Biochem. J.*, 291, 1-10
- 41 Song, X., Mott, J. D. von Kampen, J., Pramanik, B., Tanaka, K., Slaughter, C. A., and DeMartino (1996): A model for the quaternary structure of the proteasome activator, PA28. *J. Biol. Chem.*, 271, 26410-26417
- 42 Tamura T., Nagy, I., Lupas, A., Lottspeich, F., Cejka, Z., Schoofs, G., Tanaka, K., Mot, R. D., and W. Baumeister (1995): The first characterization of a eubacterial proteasome: the 20S complex of *Rhodococcus* sp. strain NI86/21. *Curr. Biol.*, 5, 766-774
- 43 Tanaka, K., Ii, K., and Ichihara A. (1986): A high molecular weight protease in the cytosol of rat liver. *J. Biol. Chem.*, 261, 15197-15203
- 44 Tanaka K., Tanahashi, N., Tsurumi, C., and Shimbara, N. (1997): Proteasomes and antigen processing. *Adv. Immunol.*, (in press)
- 45 Toyoaga, T., Hino, O., Sugai, S., Wakasugi, S., Abe, K., Shichiri, M., and Yamamura, K. (1994): Chronic active hepatitis in transgenic mice expressing interferon- γ in the liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 614-618
- 46 Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76, 4350-4354
- 47 Tsurumi, C., DeMartino, G. N., Slaughter, C. A., Shimbara, N., and Tanaka, K. (1995): cDNA cloning of a regulatory subunit of the human 26S proteasome, a homolog of Mov-34 gene product. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 210, 600-608
- 48 Tsurumi, C., Shimizu, Y., Saeki, M., Sato, S., DeMartino, G. N., Slaughter, C. A., Fujimuro, M., Yokosawa, H., Yamasaki, M., Hendil, K. B., Toh-e, A., Tanahashi, N., and Tanaka, K. (1996): cDNA cloning and functional analysis of the p97 subunit of the 26S proteasome, a polypeptide identical to the type 1 TNF receptor binding protein TRAP-2/55. *Eur. J. Biochem.*, 239, 912-921
- 49 Ustrell, V., Pratt, G. and Rechsteiner, M. (1995): Effects of interferon gamma and major histocompatibility complex-encoded subunits on peptidase activities of human multicatalytic proteases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 584-588
- 50 York, I. A., and Rock, K. L. (1996): Antigen processing and presentation by the class I major histocompatibility complex. *Annu. Rev. Immunol.*, 14, 369-397
- 51 Yoshimura, T., Kameyama, K., Takagi, T., Ikai, A., Tokunaga, F., Koide, T., Tanahashi, N., Tamura, T., Cejka, Z., Baumeister, W., Tanaka, K., and Ichihara, A. (1993): Molecular characterization of the "26S" proteasome complex from rat liver. *J. Struct. Biol.*, 111, 200-211