

令和元年5月21日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07342

研究課題名(和文) リボソーム生合成因子がプロテアソーム形成を制御する機構を解明する

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism for the proteasome assembly regulated by

研究代表者

八代田 英樹 (Yashiroda, Hideki)

東京大学・大学院薬学系研究科(薬学部)・准教授

研究者番号：20311425

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：プロテアソームに関連する新しい遺伝子として出芽酵母TIF6を単離した。Tif6はリボソーム合成に関わる遺伝子である。TIF6の変異体は1)アミノ酸アナログ感受性、2)プロテアソームによって分解されるモデル基質の分解遅延、3)プロテアソーム変異との二重変異による合成増殖遅延を示す。Tif6は保存性の高いタンパク質でヒトのオルソログはeIF6である(70%以上同一)。そこでeIF6とプロテアソームとの関係を調べてみると、eIF6のノックダウンによりプロテアソーム形成が阻害されることがわかった。またeIF6とプロテアソームサブユニットのいくつかは酵母ツーハイブリッド法で結合することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞内における選択的なタンパク質分解のためのマシナリーであるプロテアソームとタンパク質合成のためのマシナリーであるリボソームとがTif6/eIF6を介して関連している可能性を示唆した。Tif6/eIF6は60Sリボソームの形成に関わるシャペロンであると同時に、80Sリボソーム形成においてチェックポイント機能を果たす分子でもあることが知られていた。Tif6/eIF6の発現減弱細胞はさらにプロテアソーム形成にも異常を示し、またプロテアソームサブユニットとも相互作用することが今回明らかとなり、タンパク質合成とタンパク質分解が協調している可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：TIF6 was isolated as a gene related to the ubiquitin-proteasome system (UPS) in *S. cerevisiae*. TIF6 (translation initiation factor 6) is an essential gene, and encodes one of the chaperone proteins involved in the biogenesis of the 60S ribosome. DAmP (decreased abundance by mRNA perturbation) mutant cells of Tif6 showed three phenotypes, all of which indicate the relation between Tif6 and the UPS. 1) *tif6*-DAmP cells are sensitive to the amino acid analogs. 2) The model substrates of the 26S proteasome are not efficiently degraded in the *tif6*-DAmP mutant. 3) Double mutations of TIF6 and the proteasome genes cause synthetic growth defects. Tif6 is a highly conserved among eukaryotes, and its human ortholog is eIF6 (>70% identity). Thus, we next investigated the relation between eIF6 and the UPS. Knockdown of eIF6 led to retardation of the assembly of proteasomes, and yeast two-hybrid assays indicated that eIF6 interacts with some proteasome subunits.

研究分野：分子遺伝学

キーワード：プロテアソーム リボソーム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ユビキチン化されたタンパク質を特異的に認識し分解する 26S プロテアソームは、真核生物に高度に保存され細胞内での選択的なタンパク質分解を担う細胞増殖に必須なプロテアーゼ複合体である。26S プロテアソーム複合体は触媒活性を持つ 20S core particle (CP)と CP を制御する 19S regulatory particle (RP)のサブコンプレックスからなり、それぞれ CP が 14 種、RP が 19 種ものサブユニットから形成されている (図 1)。26S プロテアソームの形成過程に関しては申請者らのグループによって解析が進み、プロテアソーム形成シャペロンと呼ばれる一連のタンパク質が見つかった (Yashiroda, H. et al., Nat Struct Mol Biol 2008, Murata, S. et al., Nat Rev Mol Cell Biol 2009) (図 1)。

しかしながら、プロテアソーム活性の必要量は細胞の状態によって異なると思われるにもかかわらずこれまで明らかにしてきたプロテアソーム形成過程が細胞内の環境に応じてどのように促進されたり抑制されたりしているのかということに関しては全く分かっていなかった。

そこで、そのような仕組みを明らかにすることを目的に出芽酵母必須遺伝子変異株ライブラリーからユビキチン・プロテアソームシステムによるタンパク質分解に欠損を示す株として 1) アミノ酸アナログ感受性、2) 26S プロテアソームによって分解されるモデル基質の分解遅延、3) 既知の 26S プロテアソーム変異との二重変異による合成増殖阻害、の 3 つの条件を満たす Tif6 の変異株を新たに単離した。

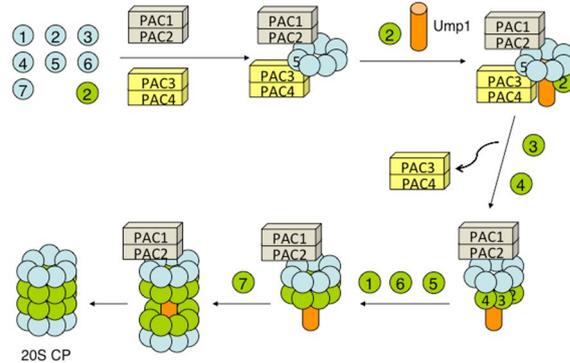


図 1: 20S CP の形成過程

PAC1-4, Ump1 は CP 形成シャペロン。最初に リングが形成された後、サブユニットが 2,3,4,5,6,1,7 の順に組み込まれていく。

2. 研究の目的

Tif6 はリボソームの 60S サブユニット形成に関わると同時に 40S サブユニットと会合して 80S リボソームを形成しても良いかどうかのチェックポイント機能も果たす分子として報告されている。リボソームの生合成過程は 26S プロテアソーム以上に複雑で、60S サブユニットと 40S サブユニットからなる 80S リボソームは 79 種のタンパク質から構成され、その形成には約 200 個の会合因子が関わっているとされている。Tif6 はこの 200 個の会合因子のうちの一つである。また Tif6 はその機能から類推されるように保存性の高いタンパク質で、哺乳類におけるオーソログとして eIF6 が存在する。Tif6/eIF6 の欠損によってタンパク質分解異常が生じるわけを調べることで真核生物に保存された新しいプロテアソーム活性制御機構とさらにはタンパク質合成とタンパク質分解という細胞内での 2 大イベントをつなぐような仕組みを明らかにすることが本申請課題の目的である。

3. 研究の方法

1. Tif6/eIF6 欠損が引き起こすプロテアソーム形成異常の詳細な表現型解析

eIF6 ノックダウン細胞でプロテアソーム (20S CP) の形成遅延が観察されている (図 2)。しかし、形成過程のどの段階で障害が起きているのかは不明なままである。これを明らかにするためにまず eIF6 ノックダウン細胞から形成不全を起こして蓄積したプロテアソーム形成中間体を Native-PAGE、もしくはグリセロール密度勾配遠心法により分離し、それをさらにアフィニティー精製することで単離精製する。そして得られた形成中間体の構成成分を質量分析法によって明らかにするという実験を予定している。形成中間体に含まれているものを同定することで eIF6 の欠損で 20S CP 形成過程のどこに支障が生じているのかを知ることができる。

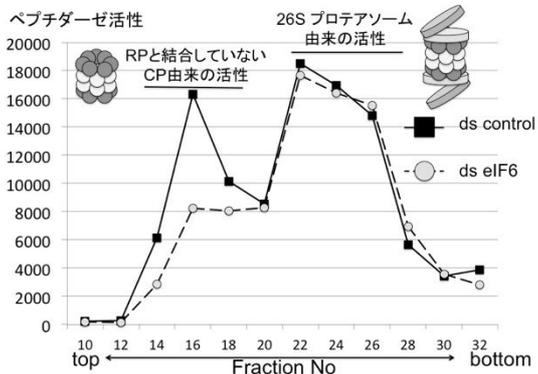


図 2: eIF6 ノックダウンによる CP の減少

細胞抽出液をグリセロール密度勾配遠心によって分画し各フラクションのペプチダーゼ活性を測定した。

2、Tif6/eIF6 とプロテアソームサブユニットの結合に関する解析

酵母ツーハイブリッド法により eIF6 は幾つかの 20S CP サブユニットとの結合が検出されている。これは eIF6 のプロテアソーム機能への関与を補強する興味深い結果であるが、細胞内で実際に結合しているのかどうかはまだ不明である。そこで定法に従い eIF6 を免疫沈降して、プロテアソームサブユニットが共沈してくるかどうか調べる。その際同時に eIF6 と結合しているプロテアソームサブユニットは完成体のプロテアソーム内にあるものなのか、それとも形成途中のプロテアソーム内にあるものなのかも調べる。形成途中のプロテアソームサブユニットにのみ特異的に結合しているのなら前項 1、の実験結果と合わせて eIF6 がある特定のサブユニットと直接結合し、その直接結合するサブユニットをプロテアソーム形成中間体へ組み込むために eIF6 が働いているという作業仮説を検証する。

また、eIF6 遺伝子に対して error-prone PCR でランダムに変異を導入し、酵母ツーハイブリッド法で観察されていたプロテアソームサブユニットとの結合が失われる変異を今度は酵母ツーハイブリッド法でネガティブスクリーニングを行うことで単離する。

3、Tif6/eIF6 以外のリボソーム生合成因子がプロテアソーム活性に与える影響の解析

Tif6/eIF6 の変異によってプロテアソーム形成に異常が生じているのは確かであるが、その異常は Tif6/eIF6 の変異特異的に生じているのか、もしくは Tif6/eIF6 変異による 60S サブユニットの形成不全や 80S リボソーム形成制御異常の二次的な影響によるものなのか確認する必要がある。リボソーム 60S サブユニット形成において Tif6/eIF6 と同じ段階で機能する他のリボソーム生合成因子の出芽酵母変異株、もしくは動物細胞でのノックアウト細胞のプロテアソーム形成における表現型を観察し、Tif6/eIF6 変異体と同様もしくは形成促進という反対の異常を示さないかどうか調べる。

4．研究成果

1、Tif6/eIF6 欠損が引き起こすプロテアソーム形成異常の詳細な表現型解析

eIF6 のノックダウンによって 20S CP の形成遅延がどのステップで起きているのか明確にするために、eIF6 をノックダウン後の 20S CP の状態を Native-PAGE を用いて観察した。その際に 20S CP の構成因子である β サブユニットも個別にノックダウンし、それぞれのノックダウンで形成される 20S CP 形成中間体との大きさを比較した。その結果、eIF6 のノックダウンで観察されるようになった 20S CP 形成中間体の大きさは $\beta 5$ をノックダウンした時に形成される 20S CP 形成中間体の大きさとほぼ同じであることがわかった。

2、Tif6/eIF6 とプロテアソームサブユニットの結合に関する解析

eIF6 がどのようにして 20S CP 形成に関わっているのか知る手がかりを得るために、酵母ツーハイブリッド法で eIF6 と 14 種類の全 20S CP サブユニット $\alpha 1$ —7、 $\beta 1$ —7、さらに 5 つの 20S CP 形成シャペロン PAC1—4、UMP1 とが結合可能かどうか調べた。空ベクターとの組み合わせで陽性となってしまう $\alpha 5$ 、 $\beta 1$ 、UMP1 を判定不能として除いた結果、eIF6 は $\alpha 6$ 、 $\beta 5$ 、 $\beta 6$ 、 $\beta 7$ と結合する可能性があることがわかった (図 3)。

この結合が実際の細胞内で起きているかどうか eIF6 の N 末端に myc タグ、C 末端に Flag タグをつけて抗 Flag 抗体を用いて免疫沈降実験を行なった。その結果、 $\beta 1$ 、 $\beta 5$ 、 $\beta 6$ 、 $\beta 7$ との結合が確認された。

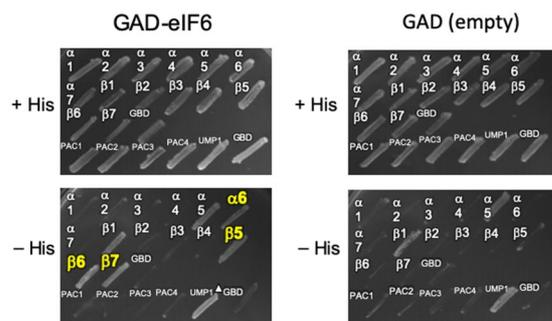


図 3: eIF6 と結合する 20S CP サブユニット

全 20S CP サブユニットと形成シャペロンとの結合能を酵母ツーハイブリッド法で調べた。

3、Tif6/eIF6 以外のリボソーム生合成因子がプロテアソーム活性に与える影響の解析

Tif6/eIF6 の変異によるプロテアソーム形成効率の低下はリボソームの生合成不全を介して起きているのかどうか Tif6 変異株と Tif6 以外のリボソーム生合成因子の変異株との表現型を比較した。26S プロテアソームで効率よく分解されることが知られているモデル基質 (Arg-β ガラクトシダーゼ) の蓄積度合いを β-ガラクトシダーゼの活性を指標にして調べた。その結果、Tif6 の変異株でのみ野生型株よりも強い活性が測定され、Arg-β ガラクトシダーゼの分解が遅延していることが予想された。このことから Tif6/eIF6 はリボソーム生合成とは独立に 20S CP 形成に参与している可能性が示唆された (図 4)。

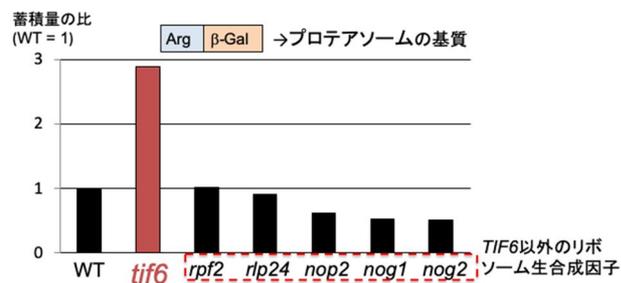


図 4：プロテアソームで分解される基質の蓄積度合い

各変異株内での Arg-β-Gal の蓄積度合いを β-Gal の活性を指標にして調べた。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

1. Wu W, Sahara K, Hirayama S, Zhao X, Watanabe A, Hamazaki J, Yashiroda H, Murata S*. PAC1-PAC2 proteasome assembly chaperone retains the core α4-α7 assembly intermediates in the cytoplasm. **Genes Cells**. 10:839-848. 2018
2. Koizumi S, Irie T, Hirayama S, Sakurai Y, Yashiroda H, Naguro I, Ichijo H, Hamazaki J, Murata S*. The aspartyl protease DDI2 activates Nrf1 to compensate for proteasome dysfunction. **Elife**. Aug 16;5. pii: e18357. doi: 10.7554/eLife.18357. 2016

〔学会発表〕(計 17 件)

1. 竹原由香、八代田英樹、村田茂穂、リボソームタンパク質の脱ユビキチン化による翻訳制御機構の解明、「ケモユビキチン」第 1 回班会議・第 2 回ユビキチン研究会、東京大学 武田先端知ビル (東京都文京区) 2019.1.15
2. 石原慧、松崎哲郎、八代田英樹、村田茂穂、出芽酵母を用いた哺乳類のプロテアソーム 20S core particle 再構成、第 41 回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)2018.11.30
3. Yan Wang, Noritaka Ohigashi, Hideki Yashiroda, Shigeo Murata Functional analysis of UBL-UBA domain containing yeast protease Ddi1 and its human ortholog DDI2、第 41 回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)2018.11.30
4. 竹原由香、八代田英樹、村田茂穂、リボソーム結合型脱ユビキチン化酵素 Otu2 の機能解析、第 1 回ユビキチン研究会、薬学部総合研究棟 (東京都文京区)、2018.1.18
5. 平山尚志郎、大東宣貴、八代田英樹、村田茂穂、ユビキチン化を介した構造異常タンパク質の核外排出機構の解析、2017 年度生命科学系学会合同年次大会、神戸国際会議場 (兵庫県神戸市) 2017.12.9
6. 池浦隆真、八代田英樹、村田茂穂、26S プロテアソームと 20S core particle との量比は、グルコース濃度によって制御される。2017 年度生命科学系学会合同年次大会、神戸国際会議場 (兵庫県神戸市) 2017.12.7
7. 蔡曉晨、松崎哲郎、平山尚志郎、八代田英樹、村田茂穂、アミロイド形成タンパク質が細胞内で毒性を生む要因の探求、2017 年度生命科学系学会合同年次大会、神戸国際会議場 (兵庫県神戸市) 2017.12.7
8. 竹原由香、八代田英樹、村田茂穂、出芽酵母脱ユビキチン化酵素 Otu2 と Ubp3 のリボソームに対する重複した機能の可能性、2017 年度生命科学系学会合同年次大会、神戸国際会議場 (兵庫県神戸市) 2017.12.6

9. 大東宣貴、平山尚志郎、八代田英樹、村田茂穂、HECT 型ユビキチンリガーゼ Hul5 は変異型 SOD1 の核外排出に関与する、酵母遺伝学フォーラム、東京大学弥生講堂（東京都文京区）、2017.9.11
10. 八代田英樹、松崎哲郎、村田茂穂、翻訳開始因子 eIF6/Tif6 のプロテアソーム形成への関与、第 191 回酵母細胞研究会例会、キリンビール（株）横浜工場総合棟ホール（神奈川県横浜市）2016.11.11
11. 竹原由香、八代田英樹、村田茂穂、出芽酵母の脱ユビキチン化酵素 Otu2 とリボソームとの関連、第 39 回日本分子生物学会年会、横浜国際平和会議場（神奈川県横浜市）2016.12.1
12. 池浦隆真、八代田英樹、村田茂穂、細胞骨格構成因子アクチンとモータータンパク質ミオシンは 26S プロテソーム形成に関与する、第 39 回日本分子生物学会年会、横浜国際平和会議場（神奈川県横浜市）2016.12.1
13. 大東宣貴、平山尚志郎、八代田英樹、村田茂穂、HECT ドメイン E3 ユビキチンリガーゼ Hul5 は変性タンパク質の核外排出に関与する、第 39 回日本分子生物学会年会、横浜国際平和会議場（神奈川県横浜市）2016.12.1
14. 八代田英樹、蔡 曉晨、松崎哲郎、村田茂穂、出芽酵母を用いたアミロイド形成タンパク質が毒性を発揮する仕組みの解明、第 89 回日本生化学会大会、仙台国際センター/東北大学川内北キャンパス（宮城県仙台市）2016.9.26
15. Tetsuo Matsuzaki, Hideki Yahiroda, Shigeo Murata, Eukaryotic initiation factor 6 (eIF6) is involved in the assembly of the proteasome core particle, 第 16 回東京大学生命科学シンポジウム、東京大学駒場キャンパス 21 Komcee (東京都目黒区)、2016.4.23
16. Xiaochen Cai, Tetsuo Matsuzaki, Hideki Yashiroda, Shigeo Murata, Exploring Modulators of the Toxicity by Amyloidogenic Proteins, Cold Spring Harbor Asia Symposium "Ubiquitin Family, Autophagy & Diseases", Suzhou (China) 2016.4.19
17. Tetsuo Matsuzaki, Hideki Yahiroda, Shigeo Murata, Eukaryotic initiation factor 6 (eIF6) is involved in the assembly of the proteasome core particle, Cold Spring Harbor Asia Symposium "Ubiquitin Family, Autophagy & Diseases", Suzhou (China) 2016.4.19

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年：
 国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 取得年：
 国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。