

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20998

研究課題名(和文) 構造異常タンパク質の核外排出機構の解明

研究課題名(英文) Nuclear export mechanism of misfolded proteins

研究代表者

平山 尚志郎 (Hirayama, Shoshiro)

東京大学・大学院薬学系研究科(薬学部)・助教

研究者番号：80548280

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ほ乳類細胞において、ユビキチン化タンパク質の蓄積の場としてaggresome、ALISが知られているが、いずれも核内ではなく細胞質に生じる構造体であり、細胞にとって防御的な制御された機構であると考えられている。しかし、なぜユビキチン化タンパク質が核ではなく主に細胞質において蓄積するのか、そのメカニズムは不明であった。本研究において申請者は、ユビキチン化タンパク質が核から細胞質に運び出されていること、ユビキチン認識タンパク質UBINとその共役因子POSTが、exportinとともに、ユビキチン化タンパク質を核から細胞質に運び出していることを見出した。

研究成果の概要(英文)：In mammalian cells, it is known that the misfolded or the ubiquitinated proteins are sequestered into specific deposition sites in the cytoplasm not in the nucleus such as aggresome and ALIS. Formation of these cytoplasmic aggregates is considered to be cytoprotective. However, it is unknown why aggresome and ALIS form in the cytosol but not in the nucleus. In this study, we found that the ubiquitinated proteins were exported from the nucleus and cytosol. Furthermore, we also showed that ubiquitin binding protein UBIN and its cofactor POST cooperatively export the ubiquitinated proteins in an exportin dependent manner.

研究分野：細胞生物学

キーワード：ユビキチン プロテアソーム タンパク質品質管理 細胞内輸送

1. 研究開始当初の背景

ユビキチン化タンパク質や構造異常タンパク質の凝集体形成の場として Aggresome、Aggresome-like induced structures (ALIS) が知られているが、いずれも核内ではなく細胞質に生じる構造体であり、細胞にとって防御的な、制御された機構である事がわかってきた。また、多くの神経変性疾患において構造異常タンパク質が細胞質にユビキチン陽性の凝集体を形成することが観察される。しかし、なぜこれらユビキチン化をうけたタンパク質や構造異常をきたしたタンパク質が核ではなく細胞質において凝集体を形成するのか、そのメカニズムと生理的意義は不明であった。

さらに申請者は、プロテアソーム結合ドメインとユビキチン結合ドメインを持つ UBIN が、核と細胞質と同様に局在するものの、核と細胞質を行き来するタンパク質であることを見出していた。UBIN を含むプロテアソーム結合ドメインとユビキチン結合ドメインを持つ因子は、ユビキチン化タンパク質を捕捉し、プロテアソームにつれていく輸送因子の役割を担うことが知られていた。

2. 研究の目的

本研究では、プロテアソーム阻害時の細胞質におけるユビキチン化タンパク質凝集体形成に関して、ユビキチン化タンパク質はそもそも核から細胞質に運び出されているのか明らかにすることを目的とした。

またユビキチン化タンパク質核外輸送の分子実態について、ユビキチン化タンパク質の輸送因子である UBIN がどのように核と細胞質を行き来するのか、UBIN がユビキチン化タンパク質の核から細胞質への運び出しに関与しているのか明らかにすることを研究目的とした。

3. 研究の方法

3.1.

UBIN と結合する因子の質量分析器による同定

申請者は UBIN が核と細胞質を行き来する因子であることを明らかにしていた。核から細胞質へのタンパク質の輸送には、exportin が核外移行シグナルと呼ばれるアミノ酸配列と直接結合し、核外移行シグナルを持つタンパク質を核から細胞質に運び出すことが知られている。しかし UBIN には核外移行シグナルがみられなかった。そこで、UBIN と exportin の間をつなぐ、核外移行シグナルを持つ因子が存在するのではないかと考え、UBIN 結合因子の探索を、質量分析器を用いて行った。

3.2.

UBIN が POST によって核から細胞質に運び出されているのか細胞染色法により明らかにする

3.1. の項目で同定した POST タンパク質は核外移行シグナルを持つタンパク質であった。そこで UBIN とともに POST を細胞に発現させ UBIN の細胞内局在に影響を与えるのか細胞染色により評価した。

また、POST の核外移行シグナル変異体を作製し、変異 POST が UBIN の細胞内局在に影響を与えるのかどうか細胞染色法により評価した。

3.3. プロテアソーム阻害時にユビキチン化タンパク質は核から運び出されているのか細胞染色法により明らかにする

プロテアソーム阻害時にユビキチン化タンパク質は細胞質において凝集体を形成することは知られていたが、核から運び出されていることは知られていなかった。そこで、プロテアソーム阻害時、核外輸送に関わる exportin の共阻害時に、ユビキチン化タンパク質が細胞内のどこに蓄積するのか抗ユビキチン抗体を用いた細胞染色法により評価し、ユビキチン化タンパク質が核から細胞質に運び出されているのか明らかにすることを試みた。

3.4.

UBIN-POST のユビキチン化タンパク質の局在に対する影響を細胞染色により明らかにする

UBIN は POST によって核から細胞質へ運び出されていることを、3.2. の項目で明らかにした。そこで UBIN と POST がユビキチン化タンパク質の核から細胞質への運び出しに関与するか明らかにすることを試みた。培養細胞において UBIN もしくは POST を過剰発現した場合、ユビキチン化タンパク質が細胞内のどこに蓄積するのか、抗ユビキチン抗体を用いた細胞染色法により評価した。

3.5.

UBIN-POST 系の機能不全は、核へのユビキチン化タンパク質の蓄積を引き起こすのか、個体への毒性を示すのか線虫を用いて評価する

GFP-ユビキチン発現線虫を用いて、MG132 処理によるプロテアソーム阻害時に、ユビキチン化タンパク質が細胞内のどこに蓄積するのか蛍光顕微鏡観察により評価した。さらに、RNAi 法により UBIN-POST 系をノックダウンした時に、ユビキチン化タンパク質が核に蓄積するのか蛍光顕微鏡観察により評価した。

UBIN-POST 系の機能を阻害した時の線虫への毒性の評価は、RNAi 法により UBIN-POST ノックダウンした時の、線虫の寿命を観察することにより評価した。

4. 研究成果

4.1.

UBIN 結合因子 POST の同定

HEK293 細胞に Flag-UBIN を発現させ抗 Flag タグ抗体コンジュゲートビーズで精製後 UBIN 結合タンパク質を、質量分析器により解析した。UBIN 結合タンパク質のほとんどがプロテアソームサブユニットであったが、その中で唯一 UBIN 結合新規因子として POST が同定された。UBIN と POST の結合は、免疫共沈降実験によっても確かめた。

POST のアミノ酸配列の解析と生化学実験により、POST が核外移行シグナルをもち、exportin によって認識されるタンパク質であることを同定した。

4.2.

UBIN は POST により核から細胞質に運び出されている

GFP-UBIN もしくは Flag-UBIN を培養細胞に発現させると細胞全体に局在していた。新たに同定した POST についても培養細胞における局在を確認したところ、細胞質にのみ局在していた。UBIN と POST は細胞内で結合が観察されるにも関わらず、細胞内局在は同一ではなかった。そこで、UBIN と同時に POST を発現させて細胞内局在を観察したところ、POST 共発現時に UBIN の核局在が観察されなくなり、細胞質にのみ観察されるようになった。POST が UBIN の局在を核から細胞質に変化させている可能性が考えられた。

4.1 の項目で POST が核外移行シグナルをもち、exportin によって認識されるタンパク質であることを明らかにしていた。そこで exportin の阻害剤で細胞を処理すると、POST は、核にも局在するようになった。また UBIN と POST を細胞に共発現させたときに細胞を exportin の阻害剤で処理した場合も、UBIN, POST 共に核に局在するように変化した。以上のことから UBIN は POST と exportin によって核から細胞質に運び出されることを明らかにした。

4.3

ユビキチン化タンパク質は核から細胞質に運び出されている

プロテアソーム阻害時にユビキチン化タンパク質が細胞内のどこに主に蓄積するのか細胞染色により観察した。ヒト、マウス培養細胞において、プロテアソーム阻害時 (EPX) にユビキチン化タンパク質は核ではな

く主に細胞質に蓄積した。(図 1)

このことからユビキチン化タンパク質は核から運び出され細胞質に蓄積している可能性を考えた。そこで、タンパク質を核から細胞質に運び出すことに機能する exportin の阻害剤 Leptomycin B とプロテアソーム阻害剤で細胞を共処理した場合のユビキチン化タンパク質の蓄積を観察したところ、exportin の阻害時にユビキチン化タンパク質は、核に蓄積し、核内にユビキチン陽性の凝集体が観察された。Exportin のノックダウン (siCrml-8, siCrml-9) も exportin 阻害剤と同様の結果であった。(図 1) 以上の結果からユビキチン化タンパク質はプロテアソーム機能の低下時に核から運び出され細胞質において蓄積することが見出された。

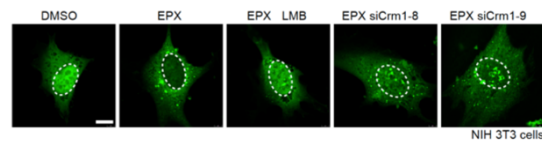


図 1. ユビキチン化タンパク質は核から細胞質に運び出されている (プロテアソーム阻害時、Crml 阻害時のユビキチン化タンパク質蓄積の様子、点線は核の輪郭を示す)

4.4.

UBIN-POST はユビキチン化タンパク質の局在を核から細胞質に変化させる

UBIN はユビキチン化タンパク質をプロテアソームに連れて行く輸送因子であることが知られている。またここまで UBIN は POST とともに核から細胞質に局在変化していること、ユビキチン化タンパク質はプロテアソーム阻害時に核から細胞質に局在が変化していることを明らかにした。そこで、UBIN-POST を細胞に過剰発現した場合に、ユビキチン化タンパク質の局在がどうなるか培養細胞を抗ユビキチン化抗体で染色することにより評価した。プロテアソーム阻害しない定常状態において、ユビキチン化タンパク質は細胞全体に局在したが、POST 過剰発現時にユビキチン化タンパク質は核ではなく主に細胞質に蓄積した。POST 過剰発現時に細胞を exportin 阻害剤で処理するとユビキチン化タンパク質の蓄積は再び核にも観察されるようになった。以上の結果から UBIN-POST はユビキチン化タンパク質を核から細胞質に輸送する機能を担っていることを新たに明らかにした。

4.5.

線虫における UBIN-POST 系の機能不全は、核へのユビキチン化タンパク質の蓄積を引き起こし、UBIN-POST ノックダウン線虫は短寿命化する

培養細胞においてプロテアソーム阻害時にユビキチン化タンパク質は細胞質に蓄積することを観察していた。そこで、動物個体ではどうなのか線虫を用いて実験を行なった。

GFP-ユビキチンを発現する線虫をプロテアソーム阻害剤の MG132 で処理すると、ユビキチン化タンパク質は核ではなく細胞質にその蓄積が観察された。線虫においてもユビキチン化タンパク質は核から細胞質に運び出されている可能性が考えられた。

そこで UBIN-POST 系を RNAi 法によりノックダウンした場合に、ユビキチン化タンパク質の核から細胞質への局在変化に異常がでるか GFP-ユビキチン発現線虫を用いて観察した。

線虫に GFP-ユビキチン化タンパク質を発現させると核内 (図 2, 破線で囲った部分) に局在が観察された。このときに UBIN もしくは POST をノックダウンすると、核内の核小体にユビキチン化タンパク質の凝集体 (図 2, 矢印) が観察された。この結果から UBIN と POST がユビキチン化タンパク質を核から細胞質に運び出しており、その機能を阻害するとユビキチン化タンパク質が核内に蓄積し凝集体を形成することが明らかになった。

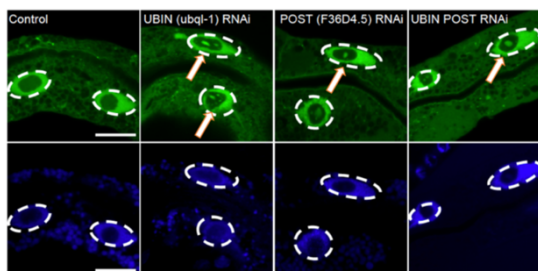


図 2. UBIN-POST の機能阻害は、ユビキチン化タンパク質の核への蓄積を引き起こす
緑:GFP-ubiquitin 青:DNA 染色 (核)

さらに UBIN-POST のノックダウンが線虫に対して毒性を発揮するか線虫の寿命を観察した。UBIN と POST 両方のタンパク質発現をノックダウンした時に線虫の短寿命化が観察された。以上の結果から、UBIN-POST 系はユビキチン化タンパク質の核から細胞質への運び出しを担っており、この経路を阻害すると核内にユビキチン化タンパク質が蓄積することで毒性を発揮するという新たな現象とメカニズムを明らかにすることができた。

5. 主な発表論文等 (研究代表者は下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

Koizumi S, Irie T, Hirayama S, Sakurai Y, Yashiroda H, Naguro I, Ichijo H, Hamazaki J, Murata S., The aspartyl protease DDI2 activates Nrfl to compensate for proteasome dysfunction., 査読有り, Elife. 2016 Aug 16;5. pii: e18357. doi:

10.7554/eLife.18357.

Ito S, Ogawa K, Takeuchi K, Takagi M, Yoshida M, Hirokawa T, Hirayama S, Shin-Ya K, Shimada I, Doi T, Goshima N, Natsume T, Nagata K., A small-molecule compound inhibits a collagen-specific molecular chaperone and could represent a potential remedy for fibrosis., 査読有り, J Biol Chem. 2017 Dec 8;292(49):20076-20085. doi: 10.1074/jbc.M117.815936.

Uechi H, Kuranaga E, Iriki T, Takano K, Hirayama S, Miura M, Hamazaki J, Murata S., Ubiquitin-Binding Protein CG5445 Suppresses Aggregation and Cytotoxicity of Amyotrophic Lateral Sclerosis-Linked TDP-43 in Drosophila., 査読有り, Mol Cell Biol. 2018 Jan 16;38(3). pii: e00195-17. doi: 10.1128/MCB.00195-17.

Hirayama S, Sugihara M, Morito D, Iemura SI, Natsume T, Murata S, Nagata K., Nuclear export of ubiquitinated proteins via the UBIN-POST system., 査読有り, Proc Natl Acad Sci USA. 2018 May 1;115(18):E4199-E4208. doi: 10.1073/pnas.1711017115.

[学会発表] (計 2 件)

Shoshiro Hirayama, Yasuyuki Sakurai, Kazuki Murata, Shigeo Murata, A comprehensive analysis of modulators regulating tau aggregation, EMBO Conference, 2017/5/14-19, [Sant Feliu de Guixols, ポスター]

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, 2017/12/6-9, [神戸, 口頭]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平山 尚志郎 (Hirayama Shoshiro)

東京大学・大学院薬学系研究科 (薬学部)・助教

研究者番号: 80548280