

令和 2 年 6 月 18 日現在

機関番号：82609

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14913

研究課題名(和文) シャトル分子を介したプロテアソーム活性制御機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the proteasome activity by shuttle factors

研究代表者

土屋 光 (TSUCHIYA, Hikaru)

公益財団法人東京都医学総合研究所・生体分子先端研究分野・主任研究員

研究者番号：90760132

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)：ユビキチン・プロテアソーム系による選択的なタンパク質分解は様々な生命現象を制御している。従来、ユビキチン化された基質タンパク質はプロテアソームに直接認識され分解されると考えられてきた。これに対し、研究代表者らはこれまでに、定量プロテオミクス解析により、プロテアソーム基質の実に約90%がシャトル分子によって捕捉されてプロテアソームへと運搬される「シャトル経路」を介することを見出した。本研究では、シャトル分子の新たな機能としてユビキチン鎖と共に相分離し、核内のタンパク質品質管理に関与することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで、プロテアソームがユビキチン化基質を直接認識し分解すると考えられてきた。このためプロテアソーム自身の活性制御機構については十分に解析が進んでいない。よってシャトル分子制御によるプロテアソーム制御機構を解明する本研究はユビキチン・プロテアソーム系の基本的な作動機構について新規の提案をする研究であり学術的に新規性の高いものである。また、ユビキチン・プロテアソーム系の機能破綻はがんや自己免疫疾患、神経変性疾患など様々な疾患を引き起こすと考えられている。よって本研究によるシャトル分子を介したプロテアソーム依存的分解制御機構の解明は、将来の治療薬開発のための分子基盤となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：The proteasome is a major proteolytic machine that regulates cellular proteostasis through selective degradation of ubiquitylated proteins. Recently, we and other group showed that the ubiquitin-selective chaperone p97 and Ub-binding proteins RAD23 and UBQLNs play critical roles in the substrate-selection and sorting to the proteasome. In this study, we reveal that proteasome-containing nuclear foci form under acute hyperosmotic stress. The proteasome foci exhibited properties of liquid droplets. RAD23B, a substrate-shuttling factor for the proteasome, and ubiquitylated proteins were necessary for formation of proteasome foci.

研究分野：分子生物学

キーワード：タンパク質分解

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

プロテアソームはユビキチン化されたタンパク質を選択的に分解することにより、細胞周期の進行やシグナル伝達、品質管理など広範な生命現象において必須の役割を果たしている。従来、ユビキチン化された基質タンパク質は三つのユビキチン受容体 (Rpn10、Rpn13、Rpn1) を介してプロテアソームによって直接認識されて分解される静的な分子複合体であると考えられてきた。一方、補完的な経路として、RAD23 や UBQLN ファミリーなどの UBL (Ubiquitin-like) - UBA (Ubiquitin binding) ドメインをもつシャトルタンパク質がユビキチン化タンパク質をプロテアソームに運搬する間接的な経路も報告されていたが、これら分子がプロテアソーム分解にどの程度寄与しているのかは不明であった。これまでに申請者らは定量プロテオミクス解析を駆使し、ユビキチン結合タンパク質およびプロテアソームのユビキチン鎖選択性を網羅的に解析してきた。定量的な測定の結果、予想外なことに、プロテアソーム基質の実に約 90% が、プロテアソームに直接認識されるのではなく、シャトル分子 (Rad23、Dsk2) を介した「シャトル経路」で運搬されていることが明らかになった。この結果はユビキチン・プロテアソーム系の基本的な作動機構に関する従来の常識を覆すものである。同時に、シャトル経路の分子機構すなわち「シャトル分子はどのような機構で基質をプロテアソームに受け渡し、適切にプロテアソーム分解を制御するのか」という新たな課題が浮かび上がった。一見、非効率的に思える「シャトル経路」を細胞が主に用いる理由として、シャトル分子の結合がアロステリックにプロテアソーム活性を制御する可能性が考えられる。

2. 研究の目的

(1) 哺乳類細胞におけるプロテアソームの動態を解析し、ストレスによる挙動の変化を検討する。

(2) ストレスによるプロテアソームの局在変化の分子機構の詳細を明らかとする。またストレス依存的な局在変化の生物学的意義を検討する。

3. 研究の方法

プロテアソーム蛍光タグノックイン細胞を用いて、各種ストレスによるプロテアソームの局在変化を蛍光顕微鏡にて観察する。また、ストレス依存的なプロテアソーム結合分子やユビキチン化基質のプロテオミクス解析を行う。

4. 研究成果

増殖中の細胞ではプロテアソームは主に核に局在化している (図 1 左)。ヒト培養細胞を用いて様々なストレス存在下でのプロテアソームの動態解析実施した

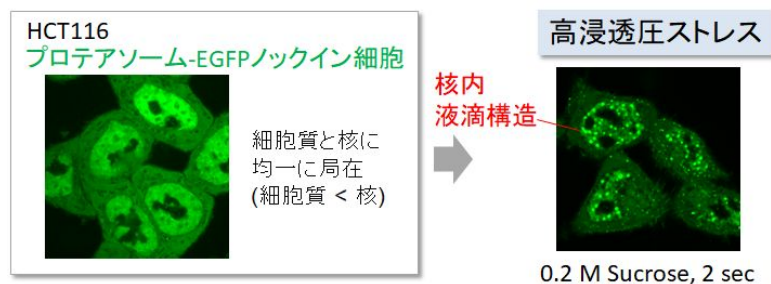


図1. 高浸透圧ストレス刺激応答性プロテアソーム液滴構造

ところ、高浸透圧刺激によりプロテアソームが核内に顆粒構造を形成することを発見した (図 1 右)。この顆粒構造は高浸透圧刺激後、わずか数秒で形成され可逆的かつ一過的な構造体であり、さらにユビキチン陽性、特にプロテアソームの分解に用いられるユビキチンの 48 番目のリジンで連結した Lys48 鎖を含んでいることが分かった。また、クライオ電子顕微鏡を用いたトモグラフィ解析により高浸透圧刺激において数十分子のプロテアソームが集積している様子が観察された。この集積の場にはタンパク質凝集体などの足場となる構造体が観察されなかったため、液 - 液相分離により生じたドロ

ップレット（液滴）であることが推察された。実際に、このプロテアソーム顆粒はほぼ球状の形状をもち、流動性がある、さらに弱い疎水結合を阻害する溶媒 1,6-ヘキサンジオールにより消失するという液滴の性質をもつことが明らかとなり、我々はこの液滴をプロテアソーム液滴と名付けた。PML 体やカハール体などのいくつかの核内液滴構造とプロテアソームとの関連が報告されているが、高浸透圧刺激依存的なプロテアソーム液滴とは共局在を示さなかった。よって、このプロテアソーム液滴は新規の核内液滴構造であることが示唆された。細胞内液滴は、膜のないオルガネラ（membrane-less organelles）や凝縮体（condensate）とも呼称され、液滴の機能としては、細胞内で特定の分子を一過的に濃縮させることで生体反応を促進させることが示唆されている。高浸透圧刺激によるプロテアソーム液滴はユビキチン化酵素 E1 を阻害するとプロテアソーム液滴の形成が阻害され、プロテアソームの機能を阻害すると液滴の解消が遅延することが分かった。つまり、プロテアソーム液滴はユビキチン化反応依存的であり、液滴の解消にはプロテアソームの活性が必要であることから、プロテアソーム液滴は核内のタンパク質分解場であることが示唆された。そこで、浸透圧刺激依存的なユビキチン化タンパク質の網羅的な同定を行ったところリボソームタンパク質が多数同定された。実際にいくつかのリボソームサブユニット（RPL15 や 29 など）はこのプロテアソーム液滴と共に局在していることが観察された。リボソームはヒト倍細胞において毎分約 75,000 分子合成されており、リボソームに取り込まれなかったリボソームタンパク質サブユニット（オーファンタンパク質）は核質で速やかにユビキチン・プロテアソーム系により分解されることが知られている。電子顕微鏡で高浸透圧刺激による変化を詳細な観察により、“核小体の中の構造“ 特に関与するリボソーム形成の場である DFC (dense fibrillar compartment)構造が高浸透圧ストレス刺激により消失するという現象が見られた。つまり高浸透圧刺激には核小体ストレスを誘導していることが推察された。また、高浸透圧刺激によりリボソーム RNA の転写抑制やプロセッシング異常も観察されたことから、高浸透圧ストレスは 核小体ストレスを引き起こし、リボソームの生合成を阻害することがわかった。よって高浸透圧刺激依存的なプロテアソーム液滴の基質の一部はオーファンタンパク質であることが明確となった。

プロテアソーム液滴はどのように制御されているのか、プロテアソームと結合する分子群のプロテオミクス解析を実施したところ、シャトル分子 RAD23B や p97、ユビキチンリガーゼ UBE3A（別名 E6AP）などがプロテアソーム液滴に含まれることが分かった。ノックダウンやノックアウト細胞を用いたイメージング解析により、RAD23B の機能欠損により、プロテアソーム液滴の形成が完全に阻害された。興味深いことに、この条件下ではユビキチン自身の液滴も形成されなかった。つまり、RAD23B 自身が「ユビキチン化基質を集める機能」、つまり、「ユビキチン化基質を相分離させる機能」をもつ可能性が浮上した。RAD23B は N 末端にプロテアソームと相互作用するユビキチン様(UBL: Ubiquitin-like)ドメインを、C 末端に 2 つのユビキチン結合 (UBA: Ubiquitin-Associated) ドメインをもつ。そこで蛍光標識した RAD23B とユビキチン鎖を試験管内で混合してみると、RAD23B とユビキチン鎖が共相分離することが明らかとなった。この共相分離には 4 つ以上のユビキチンが連結したポリユビキチン鎖が必要であり、マルチバレント型の相分離であることが分かった。これらのことから、ユビキチン化基質と RAD23B のマルチバレントな相互作用により相分離を誘導し、生じた液滴にプロテアソームや p97 を集積し核内の品質管理を行っていることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ohtake, F., Tsuchiya, H., Tanaka, K., and Saeki, Y.	4. 巻 618
2. 論文標題 Methods to measure ubiquitin chain length and linkage.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Methods Enzymol	6. 最初と最後の頁 105-133
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/bs.mie.2018.12.019.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yoshida, Y., Saeki, Y., Tsuchiya, H., and Tanaka, K.	4. 巻 618
2. 論文標題 Detection of ubiquitination activity and identification of ubiquitinated substrates using TR-TUBE	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Methods Enzymol	6. 最初と最後の頁 135-147
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/bs.mie.2018.12.032.	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 土屋 光、新井 直子、海保 愛、田中 啓二、佐伯 泰
2. 発表標題 ユビキチン鎖長決定法の開発
3. 学会等名 第91回 日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

東京都医学総合研究所HP
<http://www.igakuken.or.jp/>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----