

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K06595

研究課題名（和文）プロテアソームによる分解のための基質蛋白質内包性分解シグナルの解明

研究課題名（英文）Endogenous degradation signals in proteasome substrate

研究代表者

伊野部 智由（Inobe, Tomonao）

富山大学・学術研究部工学系・准教授

研究者番号：50568855

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：ユビキチン-プロテアソーム系（UPS）は真核生物における最も重要なタンパク質分解システムである。UPSの標的タンパク質選択はこれまで、ユビキチン化システムだけにより行われ、ユビキチン化されたタンパク質がプロテアソームにより認識され分解されると信じられてきた。しかしながら基質タンパク質自体の性質も、プロテアソームの基質認識において重要であることを示唆する報告が相次いでいる。本研究において我々は、基質タンパク質自身の電荷とUnstructured領域のアミノ酸配列がプロテアソームによる分解に大きな影響を与えることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

プロテアソームの分解ターゲット蛋白質のUnstructured領域や電荷が分解に大きな影響を与えることを示した本研究の成果は、プロテアソームによる分解は今まで考えられていた以上に高度かつ多段階に制御されていることを示唆しており、プロテアソームによる分解と関与する様々な生命現象の理解に一石を投じるだろう。さらにはUnstructured領域や電荷に注目した分解制御方法の開発が可能になり、基礎研究のみならず、人の疾病とその治療法への応用が期待される。

研究成果の概要（英文）：The ubiquitin-proteasome system (UPS) is the most important proteolytic system in eukaryotes, and it has been believed that the selection of target proteins for the UPS-mediated degradation is performed solely by the ubiquitination system and that ubiquitinated proteins are recognized and degraded by the proteasome. However, a number of reports have suggested that the properties of the substrate proteins themselves are also important for substrate recognition by the proteasome. In this study, we found that the charge of the substrate protein and the amino acid sequence of the unstructured region have a significant effect on its degradation by the proteasome.

研究分野：タンパク質科学

キーワード：プロテアソーム 細胞内タンパク質分解 Unstructured領域 ユビキチン-プロテアソーム系 ユビキチン タンパク質工学

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、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

ユビキチン-プロテアソームシステム(UPS)によるタンパク質の分解は、細胞内の様々なプロセスの中心的な役割を果たす。UPSの標的タンパク質選択はこれまで、ユビキチン化システムだけにより行われていると信じられてきた。しかしながら我々の研究により、ポリユビキチン鎖をシグナルとするプロテアソームへの運び込みだけでは不十分で、基質タンパク質自身にアンフォールド・分解の起点となる構造を取らない Unstructured 領域が必要であることが明らかとなった。このことは、よく研究されたポリユビキチン鎖だけでなく、Unstructured 領域を含めたターゲットタンパク質そのものの性質も、プロテアソームのターゲットタンパク質認識に寄与していることを示唆している。

実際、ポリユビキチン鎖と Unstructured 領域の2つの分解シグナルを持っていても、分解されないタンパク質がある。一方でポリユビキチン鎖がないにもかかわらず Unstructured 領域だけで効率的に分解されるタンパク質もある。このような「例外」タンパク質の物理化学的特性をバイオインフォマティクスの方法で調べたところ、次のようなことが分かってきた。

- Unstructured 領域のアミノ酸配列が複雑であれば、その Unstructured 領域は分解を誘導する。
- 2つの分解シグナルをもつにもかかわらず分解されないタンパク質の多くが、中性 pH 条件下で正の電荷をもつ塩基性タンパク質である。一方でユビキチン非依存的に効率的に分解されるタンパク質の多くは負の電荷を持っている。

以上より、ターゲットタンパク質の Unstructured 領域の特定アミノ酸配列と、ターゲットタンパク質の負電荷が、第二、第三のプロテアソーム分解シグナルとして働くのではないかと考えた。

## 2. 研究の目的

以上のような背景に基づき、我々は以下のような仮説をたてた(図1)。ある特定のアミノ酸配列を持った Unstructured 領域が分解を誘導する。

タンパク質の電荷が分解効率に影響する。

本研究では、以上の仮説の証明を通して、プロテアソームによる分解に求められる、ターゲットタンパク質の Unstructured 領域と電荷の物理化学的性質を明らかにし、プロテアソームの基質認識機構の完全解明を目指した。

以下に仮説証明のための具体的な目標を記す。

### 1. プロテアソームによる分解を誘導・阻害する Unstructured 領域のアミノ酸配列の検索とその分解誘導・阻害メカニズムの解明

分解を引き起こすアミノ酸配列と起こさない配列、および、それらの特性を明らかにする。そのためにまず分解誘導・阻害配列検索のための遺伝学的スクリーニング系を確立する。確立したスクリーニング系を用いて、ランダムな配列をもつ数千万種類の Unstructured 領域の分解誘導・阻害能力を調べる。その結果をもとに、分解誘導・阻害能力とアミノ酸配列の物理化学的特性の関係を明らかにする。

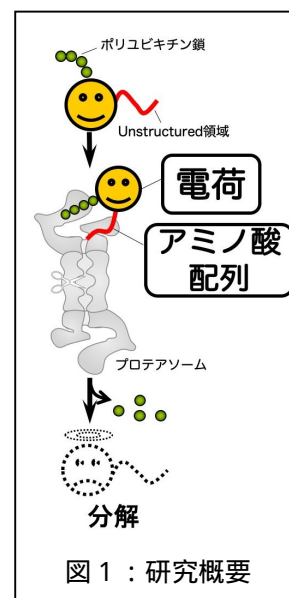
### 2. プロテアソームターゲットタンパク質の電荷特性とその認識機構の解明

基質タンパク質の電荷が、第三の分解シグナルとして、プロテアソームによる分解に影響することを示すために、電荷の異なる様々なモデル基質タンパク質の、プロテアソームによる分解のされやすさを調べる。明らかになった分解の電荷依存性は、プロテアソームと基質間の静電的相互作用に起因すると考えられるので、緩衝液の塩によるイオン遮蔽効果による分解効率の変化を明らかにする。

## 3. 研究の方法

### 1. プロテアソームによる分解を誘導する Unstructured 領域のアミノ酸配列の検索

モデル基質タンパク質として His3p を用いた出芽酵母の遺伝学的スクリーニング系を確立した。His3p は出芽酵母のヒスチジンの生合成に関与する酵素である。HIS3 遺伝子欠損出芽酵母株において、His3p を持つ酵母細胞はヒスチジン無添加培地で生育できるが、His3p が分解された酵母細胞は死滅する。本研究では His3p にユビキチン様ドメイン(UbL)と様々な配列の Unstructured 領域を融合した基質を、出芽酵母 YYS1246 株(MATa Δpdr5::KanMX4 Δlys2::LEU2 ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1)に発現させ、ヒスチジン添加培地(+His 培地)と 3AT を添加したヒスチジン無添加培地(-His+3AT 培地)それぞれで培養した。そしてその生育度を



指標に His3p の分解率を評価した。

分解誘導・阻害配列の検索の起点として、すでに分解誘導配列をもつことが知られているオルニチン脱炭酸酵素 (ODC) の C 末端 40 残基 (cODC) を用いた。pYES ベクター上のこの配列遺伝子に対して、QuikChange 法 (DpnI 法) を用いて様々な変異を加えた。このベクターを形質転換導入した酵母の +His 培地および -His+3AT 培地上での生育度を指標にした分解効率から、配列の分解誘導・阻害能力を見積もった。cODC のランダム変異からの分解阻害配列のスクリーニングにおいては、-His+3AT 培地で生育した酵母の抽出液から変異導入部位を PCR 法で増幅し、DNA シークエンス解析により分解阻害配列を明らかにした。

## 2. プロテアソームによるタンパク質分解の効率に与える基質タンパク質の電荷の影響

プロテアソームの分解基質には Ribonuclease Sa (RNase Sa) の Wild Type (WT) と 3 個又は 5 個の酸性アミノ酸残基をリジン残基に置き換えた等電点変異体を用意した。それらは、中性条件下で負の電荷、無電荷、正の電荷も持っている。また、RNase Sa の WT 及び緑色蛍光タンパク質の変異体である sfGFP の N 末端側か C 末端側又はその両方に荷電性アミノ酸残基を挿入した電荷変異体も製作した。なお、本実験で使用した基質タンパク質全てにおいて、C 末端に cODC を融合している。

分解実験の方法としては、基質タンパク質と精製した酵母由来プロテアソームを、中性緩衝液中 (50 mM Tris-HCl (pH7.5), 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM ATP, 5% glycerol, 10 mM Creatine phosphate, 0.1 mg/mL Creatine phosphate kinase) で混合し、分解反応を開始した。経過時間ごとに SDS を含む溶液を加えて反応を止め、SDS-PAGE を行った。その後、ウェスタンブロットによって分解の様子を確認した。また、緩衝液中のイオン強度を変化させた条件での分解実験も行った。

## 4. 研究成果

### 1. ターゲットタンパク質の Unstructured 領域アミノ酸配列特性とその認識機構の解明

プロテアソームによる分解を誘導する Unstructured 領域のアミノ酸配列の検索に先立ち、酵母を用いた遺伝学的スクリーニング系を確立した。このスクリーニング系では、モデル基質タンパク質としてヒスチジン合成酵素である His3p を使用した。はじめに、分解を誘導する Unstructured 領域と基質を安定させる Unstructured 領域を結合させた基質を出芽酵母に発現させ、+His 培地と -His+3AT 培地にそれぞれ培養し、生育度を比較した。その結果、分解を誘導する Unstructured 領域を持つ基質を発現した酵母は、-His+3AT 培地上で死滅したが、基質を安定させる Unstructured 領域を持つ基質を発現した酵母は生育した。この結果から His3p の分解率を -His+3AT 培地における酵母の生育度で評価出来ることを確認した。

次に分解誘導配列を含む cODC 配列から、分解に関与する配列部位の特定を行った。そのためにまず cODC 配列を 6 個の領域に分け (領域 1~6、図 2A)、それぞれの領域を構成する 6~7 残基をグリシンに変異させた。-His+3AT 培地上での生育度を指標にした分解効率の比較により、cODC を構成する配列のうち、中央付近の 6 残基 Ala Gln Glu Ser Gly Met と C 末端 6 残基 Ala Ser Ala Arg Ile Asn Val の二つの領域が分解に大きく寄与している可能性があることが判明した (図 2B)。これらの領域の位置が分解に重要である可能性や、アミノ酸配列そのものが分解を誘導している可能性が考えられた。

最後にプロテアソームからの分解を回避する Unstructured 領域の配列スクリーニングを行った。cODC の中央部に NNK 配列によりランダムな変異を加えたプラスミドライブラリーを、酵母に導入した後、-His+3AT 培地上で培養し、生育した酵母の DNA を解析することで、基質を安定させるアミノ酸配列のスクリーニングを行った。解析した DNA 配列の多くに終止コドンが含まれていたが、基質を安定させる可能性がある配列として (i) Met Val Met Ile (ii) Glu Asn Ser Arg の 2 種類が見つかった。終止コドンの検知率が高く、統計的な評価には至らなかったが、(i) は全て疎水性残基、(ii) は全て親水性残基であるため、極性の偏りが重要である可能性が考えられた。現在、このスクリーニング系を用い、次世代シーケンサーを用いた網羅的な Unstructured の配列解析を行っている。

またモデル基質タンパク質としてヒスチジン合成酵素である Ura3p を使用した。このスクリーニング系を用いて、分解を誘導することが既に分かっている ODC の C 末端 Unstructured 領域を元に、分解の誘導に必須なアミノ酸や配列の解析を試みている。

### 2. ターゲットタンパク質の電荷特性とその認識機構の解明

構造や安定性は保ったまま等電点 pI のみ異なった RNaseSa の変異体や GFP の変異体を用い、

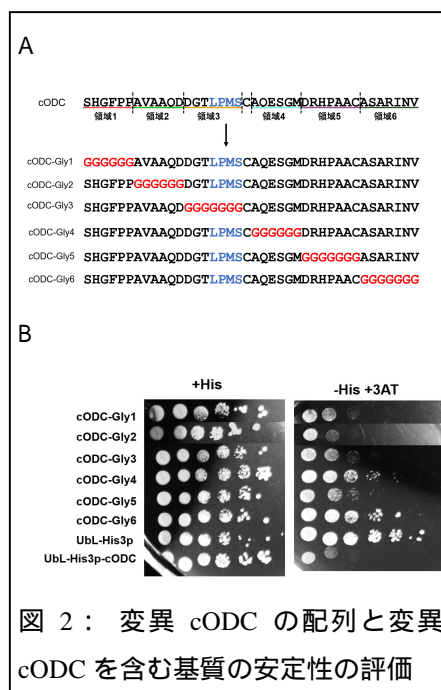


図 2: 変異 cODC の配列と変異 cODC を含む基質の安定性の評価

分解に及ぼす基質タンパク質の電荷の効果を調べた。

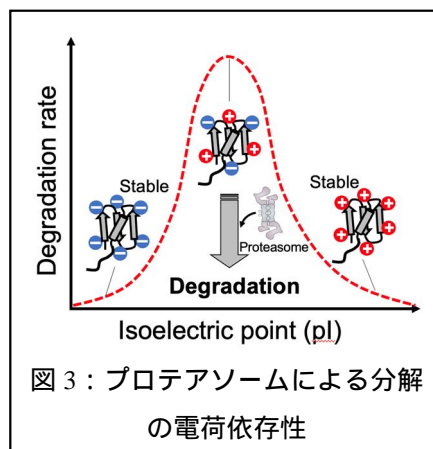
まず表面電荷の異なる RNase Sa の等電点変異体をプロテアソームに分解させたところ、タンパク質の電荷によって分解される速さが異なっていた。野生型と比較して、正の電荷を加えた変異体ほど分解効率が悪くなった。また N 末端または、C 末端に無電化(4 x GG)、弱い正の電荷(4 x GR)、強い正の電荷(4 x KR)をもつアミノ酸配列を付加した RNase Sa において、N 末端、C 末端のどちらも強い正の電荷を加えた基質があまり分解されず、無電荷と弱い正の電荷を加えた基質は同程度に分解された。以上より、負の電荷をもつ RNase Sa 野生型基質は分解されやすいといえる。

上記の結果が RNase Sa 特異的ではないことの確認と、網羅的に電荷の影響を確認するために、sfGFP の N 末端と C 末端に電荷を持つようにアミノ酸配列を加えた電荷変異体を用いて実験を行った。その結果、電荷と分解にある程度関係性があり、等電点(pI)が中性付近の基質は分解されやすく、pI が 9 以上の正の電荷と 6 以下の負の電荷を持つ基質は分解されにくい結果となった。

RNase Sa と sfGFP では分解の電荷依存性が異なることがわかったが、いずれの基質においても分解の電荷依存性は、高濃度の塩存在下では弱くなることがわかった。このことは、いずれの基質においても、静電力的な相互作用がプロテアソームによる認識に大きくしているが、その寄与は基質ごとに異なることを示している。

他の多くの細胞内のタンパク質でも電荷と分解されやすさに相関がある可能性がある。そこで、過去に調べられたマウスの 5 千個のタンパク質半減期データとそのタンパク質の等電点を計算することで、電荷と分解のされやすさを解析した。その結果、pI が 4 以下と 10.5 以上のタンパク質群は半減期の平均が 70 時間を超え、他と比べ半減期が 30 時間以上長いことが分かった。このことから、大きく偏った電荷はタンパク質の寿命を延ばしていることが示唆された。

以上より、電荷に強い偏りのあるタンパク質はプロテアソームに認識されず分解されないが、電荷分布のバランスがほどよくとれたタンパク質はプロテアソームによって効率的に分解されやすいと考えられる。分解のためのほどよい電荷バランスは、最適等電点 (pI) によって定義することができ、その分解最適 pI は基質の種類によって異なるのだろう (図 3)。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0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 伊野部 智由	4. 巻 54
2. 論文標題 Unstructured領域から始まるプロテアソームによる蛋白質分解	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本応用酵素協会誌	6. 最初と最後の頁 19-24
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 伊野部智由、澤田大輔
2. 発表標題 リン酸化によるタンパク質分解制御
3. 学会等名 第21回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 原理華、土居信英、伊野部智由
2. 発表標題 抗体を用いた前立腺がん抑制因子NKX3.1分解阻害
3. 学会等名 第21回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 坂口瑠菜、伊野部智由
2. 発表標題 FRB-FKBP融合タンパク質によるラパマイシン依存的多量体形成システムの開発
3. 学会等名 第21回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山本 啓暉, 伊野部 智由
2. 発表標題 GFPを用いた26Sプロテアソームのハイスループットアクセスシステムの開発
3. 学会等名 第19回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大沼 幸平, 伊野部 智由
2. 発表標題 プロテアソームの分解は基質タンパク質の電荷の違いに依存する
3. 学会等名 第19回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 柳澤 厚樹, 伊野部 智由
2. 発表標題 遺伝子つなひき法による異常翻訳停滞タンパク質の毒性評価
3. 学会等名 第22回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 坂口 瑠菜, 伊野部 智由
2. 発表標題 FRB-FKBP融合蛋白質のラパマイシン誘導型多量体の構造解析
3. 学会等名 第22回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------