

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25840039

研究課題名(和文)N-ミリスチル化により制御される核内ユビキチン-プロテアソーム系の機能解明

研究課題名(英文)Functions of the nuclear ubiquitin proteasome system regulated by N-myristoylation

## 研究代表者

木村 鮎子(Kimura, Ayuko)

横浜市立大学・生命医科学研究科・特任助教

研究者番号：50553616

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：N-ミリスチル化修飾は、プロテアソームの核-細胞質内での局在制御を介して、細胞内局所でのタンパク質分解の調節に関わると予想される。著者は、本機構を介して分解される基質タンパク質の全貌と本機構の生理機能の解明を目指し、修飾部位変異体酵母を用いたユビキチン化タンパク質のプロテオーム解析を行った。結果、変異体ではタンパク質の核輸送に関わる2つのヒートショックタンパク質や、核と細胞質の両方に局在すると予想されるストレス応答や代謝に関わるタンパク質群のユビキチン化レベルの亢進が認められた。これらの結果は、本修飾が一部の細胞質タンパク質の核内での分解を介して、ストレス応答等に関わる可能性を示している。

研究成果の概要(英文)：N-Myristoylation is expected to control the compartmentalized proteolysis within the cells via dynamic regulation of the nucleo-cytoplasmic localization of proteasome. To obtain the comprehensive view on the substrates and physiological functions of this control system, ubiquitin proteome analysis was performed using the yeast strains with or without mutation on the N-myristoylation site of proteasome subunit Rpt2. The ubiquitination levels of the two heat shock proteins involved in the nuclear transport of proteins as well as those of some possible nucleo-cytoplasmic proteins, which are involved in the stress response and metabolism, were significantly upregulated in the mutant strains. These results indicate that the N-myristoylation of proteasome is implicated in the stress response by controlled proteolysis of a part of cytoplasmic proteins within the nucleus.

研究分野：プロテオミクス、分子生物学

キーワード：ユビキチン ミリスチル化 プロテアソーム プロテオミクス Rpt2 翻訳後修飾 核 細胞内局在

### 1. 研究開始当初の背景

プロテアソームは、ポリユビキチン鎖の共有結合によって標識されたタンパク質を特異的に分解する、ユビキチン-プロテアソーム系 (ubiquitin-proteasome system: UPS) を介して、タンパク質の品質管理や機能発現調節を行う。プロテアソームの活性や細胞内局在は、約 60 の構成サブユニットにおいて生じる様々な翻訳後修飾により、ダイナミックな制御を受けると考えられている。このうち、Rpt2 サブユニットのみにみられる脂質修飾 (*N*-ミリスチル化)は、酵母からヒトに至るまで進化的に広く保存されており、重要な機能をもつことが予測されている。我々はこれまでに、出芽酵母 Rpt2 の *N*-ミリスチル化部位への変異導入が、プロテアソームの活性や複合体形成能そのものを変化させることなく、プロテアソームの細胞内局在部位を核から細胞質内へ変化させることを明らかにしてきた。またその結果として、UPS を介したポリユビキチン化タンパク質の分解能が低下し、ストレス条件下において酵母の生育が阻害されることも分かった。(Kimura A et al., *Biochemistry*, 51:8856-66, 2014)

### 2. 研究の目的

本研究では上記の結果を元に、*N*-ミリスチル化がプロテアソームの細胞内局在調節を介して、細胞内局所での UPS によるタンパク質分解を制御するとの仮説のもと、その基質タンパク質の網羅的な解析等を行って本機構の全貌と生理的意義を解明することを目指した。

### 3. 研究の方法

#### (1) ユビキチン化タンパク質と総タンパク質のプロテオーム解析

プロテアソームサブユニット Rpt2 の *N*末端ミリスチル化部位のグリシン残基をアラニンに置換 (Rpt2-G2A)、もしくは欠失 (Rpt2-G2Δ) させた変異体および正常細胞株を 2 日間、至適条件 (30°C, Sc-Leu 培地) 下で培養し、生育が定常期に達した酵母培養液を回収した ( $n = 3$ )。この一部を用いて、プロテアソームサブユニット Rpn11 に付加した GFP タグを検出する蛍光顕微鏡観察により、変異体酵母におけるプロテアソームの細胞内局在変化を確認した (図 1 左)。また、抗ユビキチン抗体を用いた免疫ブロット解析により、変異体におけるポリユビキチン化タンパク質蓄積量の増加を確認した (図 1 右)。質量分析用の試料調製では、培養液から集菌した酵母から脱ユビキチン化酵素阻害剤 PR-619 と 9M 尿素を含む緩衝液を用いてタンパク質を抽出し、このうちタンパク質 1.65 mg 分についてトリプシンによる酵素消化と脱塩を行った後、特異性抗体を用いてユビキチン化シグネチャーペプチドの濃縮と再度の脱塩を行った。精製したペプチドサンプルについて、C18 逆相カラムナノ LC システ

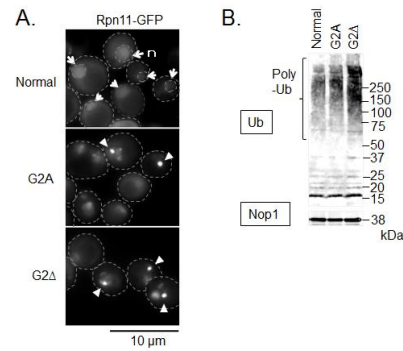


図 1. プロテアソーム細胞内局在とポリユビキチン化タンパク質の蓄積

ムによるペプチドの分離と、LTQ Orbitrap Velos 質量分析装置による MS/MS 測定を行った。得られたデータを用いて、Progenesis LC-MS ソフトウェアによるペプチドピーク強度比に基づく相対比較定量解析と、MASCOT ソフトウェアによるペプチドおよびユビキチン化修飾部位の同定を行った。また、総タンパク質量の比較のために、ユビキチン化ペプチド濃縮前のサンプルの一部を用いて、同様の解析を行った。

#### (2) ユビキチン化タンパク質の機能と細胞内局在の予測

(1) で同定されたユビキチン化タンパク質のうち、変異体で有意に量差が検出されたタンパク質 (ANOVA < 0.05) のリストについて、DAVID データベース (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) により、関連する機能と GO-term の検索を行うとともに、Uniprot データベース (<http://www.uniprot.org/>) の記載に基づき、細胞内局在情報の収集を行った。

#### (3) ユビキチン化タンパク質の発現量およびユビキチン化修飾レベルの検定

上記の解析で正常株/変異株間でのユビキチン化ペプチドの量差が顕著に認められたタンパク質のうち、Ssa について、酵母細胞抽出液を用いて特異性抗体による免疫ブロット解析を行った。さらに、同じ抗体を用いて酵母細胞抽出液から Ssa タンパク質の免疫沈降を行い、抗ユビキチン抗体を用いた免疫ブロット解析により、Ssa のユビキチン化レベルを解析した。

### 4. 研究成果

#### (1) ユビキチン化タンパク質と総タンパク質のプロテオーム解析

正常株・変異株酵母培養液 ( $n = 3$ ) から調製したサンプルの分析により、計 593 個のユビキチン化ペプチドを検出し、このうち比較定量が可能な MS ピークが検出された 510 個について定量解析を行った。結果、正常株と比較して Rpt2-G2A/G2Δ 細胞株で有意にユビキチン化ペプチドレベルが亢進もしくは減衰していたものは、それぞれ 42、8 個検出された (ANOVA < 0.05)。また、変異体においては、ユビキチン分子由来ペプチドの存在

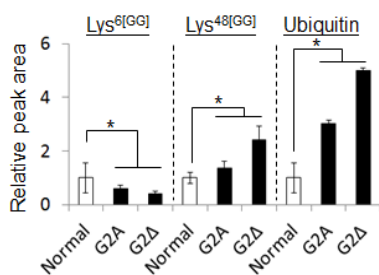


図 2. ユビキチン化ペプチドの存在量変化

量が亢進していたことに加えて、様々な生理機能をもつポリユビキチン化修飾のうち、タンパク質分解に関わる Lys48 結合型ポリユビキチン鎖由来のペプチドレベルの亢進と、シグナル伝達に関わる Lys6 結合型ポリユビキチン鎖由来のペプチドレベルの減衰が見られた(図 2)。

### (2) ユビキチン化タンパク質の機能、細胞内局在の予測

DAVID によるタンパク質の機能・パスウェイ解析の結果、変異体では、ヒートショック蛋白質 HSP70 ファミリーやリボソームサブユニットのタンパク質のユビキチン化が有意に亢進していることが分かった ( $p$ -value < 0.05)。また、変異体におけるユビキチン化ペプチドレベルの亢進が認められたタンパク質群 (図 3, □) と、有意な差異が認められなかったタンパク質群 (図 3, ■) とで、予測される細胞内局在部位の比較を行ったところ、変異体では細胞質と核に局在するタンパク質のユビキチン化が増加していることが分かった (図 3A, ▽)。さらに細胞質/核内での局在を細胞質のみ、細胞質と核、核のみの 3 つに分類すると、変異体でユビキチン化レベルの亢進が見られたタンパク質の中には、細胞質と核の両方に局在し、細胞質/核間を行き来すると考えられるタンパク質が 2 倍以上多く認められた (図 3B, ▽)。

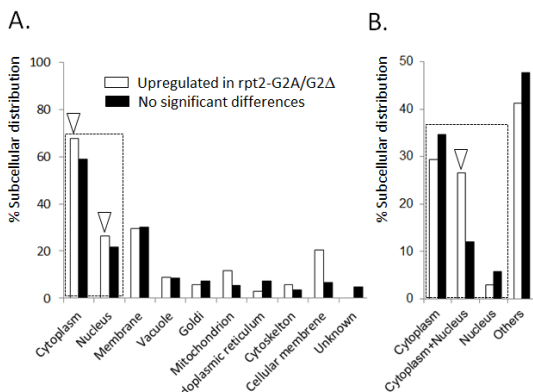


Fig. 3 ユビキチン化タンパク質の細胞内局在分類

また、正常株/変異株間でユビキチン化ペプチドレベルの顕著な差が見られた 3 つの HSP70 ファミリータンパク質のうち、変異株でのユビキチン化レベル亢進が認められ

た 2 つ (Ssa, Sse) は、細胞質内のポリユビキチン化タンパク質の核移行に、減衰が見られた 1 つ (Ssb) は、核内のユビキチン化タンパク質の細胞質への輸送に関わるインポーチンの働きを助けることが知られているものであった (図 4)。

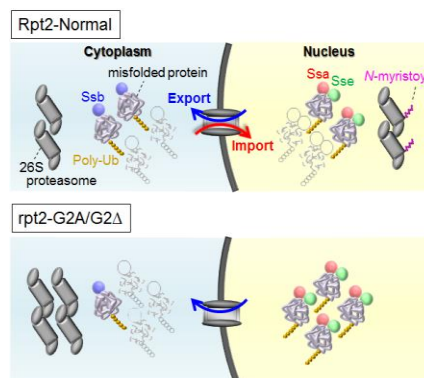


図 4 ユビキチン化タンパク質の核-細胞質間輸送に関わる 3 つのヒートショックタンパク質

また、核内のプロテアソームは、転写調節因子等、核内の短寿命タンパク質の分解に関わることが予測されているが、今回の解析で変異株でのユビキチン化レベルの亢進が検出された核タンパク質は、一種類 (Leu3) のみであった。この結果は、細胞抽出液中の核タンパク質の含有量が少ないことによるものとも考えられる。

### (3) ユビキチン化タンパク質の発現量およびユビキチン化修飾レベルの検証

上記の解析でユビキチン化ペプチドレベルの亢進が検出された Ssa を検出する特異性抗体を用いた免疫ブロット解析により、細胞抽出液中の Ssa レベルが変異体で亢進していることが分かった (図 5, 中段)。また、Ssa の免疫沈降サンプルを用いた抗ユビキチン抗体による免疫ブロット解析により、変異体ではポリユビキチン化修飾を受けた Ssa のレベルも亢進していることが分かった (図 5, 上段)。

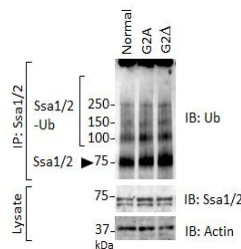


図 5 ユビキチン化タンパク質の免疫ブロット解析

### (4) プロテアソーム N-ミリストイル化の機能に関する考察

UPS に関する研究は、これまで小胞体内における合成中のタンパク質の品質管理機構

(ERAD)に関して特に重点的に進められてきた。一方で、細胞質・核・ミトコンドリア等、他の様々な細胞内小器官においても、独自のタンパク質品質管理機構の存在が報告されているが、その制御機構に関する情報はまだ少ないのが現状である。

本研究で検出された Ssa, Ssb, Sse は、それぞれ核-細胞質間でのユビキチン化タンパク質の輸送を担い、最終的には基質と共にユビキチン化を受け分解されることが知られている。変異体において、ユビキチン化タンパク質の核内への輸送に関わる Ssa, Sse のユビキチン化レベルが亢進し、逆に核外輸送に関わる Ssb のユビキチン化レベルが減衰していた今回の結果は、プロテアソームの N<sup>6</sup>ミリスチル化がプロテアソームを核内に係留することにより、細胞質から核内へ輸送されるポリユビキチン化タンパク質の分解を促すことを示している (図 4)。

今回の解析で同定された、プロテアソームの N<sup>6</sup>ミリスチル化によって分解が制御されると考えられるタンパク質の中には、リボソームタンパク質の他に、タンパク質のミスフォールディングや浸透圧変化等によって引き起こされるストレスへの応答に関わるものや、様々な代謝酵素群などが見られた。リボソームは、生合成過程において各構成サブユニットがいったん核小体内部に輸送され、40S、60S リボソームを形成する段階で大部分が UPS を介した分解を受け、一部のみが成熟型 80S リボソームとして再び核外へ輸送されることが報告されている (Johnson AW. *et al.*, Trends in biochem. Sci., 27:580-5, 2002)。このことは、プロテアソームの N<sup>6</sup>ミリスチル化が核内で一部の細胞質タンパク質の分解に関わるとの上記の予測を裏付けている。

## 5. 主な発表論文等 (研究代表者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

1. Kimura A, Arakawa N, Hirano H.  
Mass Spectrometric Analysis of the Phosphorylation Levels of the SWI/SNF Chromatin Remodeling/Tumor Suppressor Proteins ARID1A and Brg1 in Ovarian Clear Cell Adenocarcinoma Cell Lines.  
J Proteome Res. 2014; 13(11): 4959-69  
(査読有)

[学会発表] (計 5 件)

1. (ポスター発表)  
木村 鮎子, 荒川 憲昭, 平野 久  
卵巣明細胞腺癌細胞株特異的なクロマチン再構成因子 Brg1 のリン酸化レベル低下, 第 37 回 日本分子生物学会年会, パンフィコ横浜, 2014 年, 12 月

## 2. (ポスター発表)

木村 鮎子, 荒川 憲昭, 平野 久  
MRM 法による卵巣明細胞腺癌細胞株特異的な SWI/SNF クロマチン再構成複合体因子 Brg1 のリン酸化レベル低下の解析, 日本プロテオーム学会第 12 回大会, つくば国際会議場, 2014 年, 7 月

## 3. (ポスター発表)

Yoshida E, Shirakawa J, Kimura A, Hirano H, Terauchi H.  
Isolation of target genes of liraglutide, a glp-1 receptor agonist, in pancreatic islets by using nano-LC-MS/MS system, 50th EASD (European Association for the Study of Diabetes) Annual Meeting, Vienna, Austria, 2014 年, 9 月

## 4. (招待講演)

Kimura A, Kato Y, Kurata Y, Kimura Y, and Hirano H.  
Identification and characterization of the posttranslational modifications of yeast 26S proteasome.  
12th HUPPO annual world congress, Yokohama, Japan, 2013 年, 9 月

## 5. (ポスター発表)

Kimura A, Nomura A, Kawakami T, Arakawa N, and Hirano H.  
Quantitative variation of protein components and their phosphorylations in the SWI/SNF chromatin remodeling complex associated with high malignancy of ovarian clear cell adenocarcinoma.  
12th HUPPO annual world congress, Yokohama, Japan, 2013 年, 9 月

[図書] (計 2 件)

1. 木村 鮎子, 平野 久  
「9 章. 疾患研究における翻訳後修飾の解析」医学のあゆみ 251 巻, 10 号 疾患研究に应用されるプロテオーム解析, 医歯薬出版, 2014 年 12 月

2. 木村 鮎子 (他 101 名) プロテオミクス辞典 (日本プロテオーム学会編集), 講談社, p.52-1, p.90-8, p.96-3, -4., 2013 年 9 月

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

木村 鮎子 (KIMURA AYUKO)  
横浜市立大学 生命医科学研究科  
特任助教  
研究者番号: 50553616