

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：13201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26870216

研究課題名(和文) ユビキチン-プロテアソーム蛋白質分解系を利用した革新的蛋白質濃度調整法の開発

研究課題名(英文) Development of innovative methods for regulating protein concentration using the ubiquitin-proteasome system

研究代表者

伊野部 智由 (INOBE, Tomonao)

富山大学・先端ライフサイエンス拠点・特命助教

研究者番号：50568855

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：プロテアソームによる効率的な蛋白質分解にはポリユビキチン化だけでは不十分で、基質蛋白質自身に構造をとらないUnstructured領域が必要である。本研究ではUnstructured領域のプロテアソームへのアクセスを制御し、ターゲット特異的な分解の制御を可能とする以下二つの研究を行った。(1) Unstructured領域への分子の結合や修飾により、Unstructured領域の性質が変わり、分解が阻害されることを示した。(2) ポリグルタミン異常伸長ハンチンチンをプロテアソームに運び込むアダプター蛋白質の開発を行い、その分解促進作用を示した。

研究成果の概要(英文)：Effective proteolysis of a folded protein by the proteasome requires the presence of an unstructured region in the substrate in addition to a polyubiquitin chain. Here, we propose two methods of regulating substrate-specific proteasome-mediated protein degradation by regulating the unstructured region of the protein. First, we show that degradation rates can be regulated by modulating the unstructured initiation region by the binding of modifier molecules, in vitro and in vivo. These results suggest that artificial modulation of proteasome initiation is a versatile method for conditionally inhibiting the proteasomal degradation of specific proteins. Second, we develop adapter proteins that deliver specific proteins containing effective unstructured initiation sites to the proteasome. Using this method, we succeed in inducing degradation of the mutant huntingtin protein, which contains an abnormally expanded polyglutamine tract.

研究分野：生物学

キーワード：細胞内タンパク質分解 プロテアソーム

1. 研究開始当初の背景

生命活動は TPO に合わせた蛋白質濃度調整によって支えられている。そのため細胞内の人工的な蛋白質濃度調整法は基礎研究から臨床応用にまで必要とされる大変重要な技術である。この方法として現在主流なのは、蛋白質生成過程の制御法である。蛋白質分解も濃度調整の手法として高いポテンシャルを秘めており、蛋白質分解からの濃度調整も可能になれば、より迅速でより厳密な濃度調整が可能になるはずである。しかしながら基質特異性の低さから、蛋白質分解の制御はまだ実用段階ではない。そこで本申請では細胞内で最も厳密な選択的分解が可能なユビキチン-プロテアソームシステム (UPS) を利用した、全く新しい蛋白質濃度制御方法の開発を目指す。

UPS は分解すべき蛋白質のみを厳密に選択し分解する。UPS の基質選択はこれまで、ユビキチン化システムだけにより行われ、ユビキチン化システムが分解制御を担っていると信じられてきた。しかし、最近申請者らは、UPS による蛋白質分解には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、基質蛋白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を証明した (Inobe *et al.* *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2008)。プロテアソームに運び込まれたポリユビキチン化蛋白質の Unstructured 領域は、プロテアソームの ATPase リングに引っ張られ、アンフォールドされ、分解へと導かれる。申請者は有効な Unstructured 領域をもつ標的蛋白質は、プロテアソームに運び込まれさえすれば、ポリユビキチン鎖を必要とせず分解されることを明らかにし、効率的な分解を引き起こす Unstructured 領域の特性を次々に決めていく (Prakash, Inobe *et al.* *Nat. Chem. Biol.* 2009) (Inobe *et al.* *Nat. Chem. Biol.* 2011)。これらの結果は、Unstructured 領域が最終的な蛋白質の運命を決めており、Unstructured 領域のプロテアソームへのアクセスを制御すれば分解の制御が可能であることを示している。

2. 研究の目的

このような背景から申請者は Unstructured 領域に着目した制御で、プロテアソームによる分解調整を行えるのではないかと考えた。そこで次の分解制御方法の開発を本申請の目標にする。

- Unstructured 領域をターゲットにした分解抑制方法の開発
- 人工アダプター蛋白質による分解誘導方法の開発

以上の分解の抑制と誘導方法を用いて、最終的には細胞内の自在な蛋白質濃度の調整を可能にしたい。以下に目標の詳細を記す。

(1) Unstructured 領域をターゲットにした分解抑制方法の開発

申請者は第二のプロテアソーム分解シグナルとして働く Unstructured 領域の特徴について調べ上げ、効率的な分解を引き起こす Unstructured 領域の特徴を明らかにした (Inobe *et al.* *Nat. Chem. Biol.* 2011)。このような Unstructured 領域の性質をリガンドの結合や翻訳後修飾により変化させれば、分解を抑制できると期待される。以下の研究目標で、Unstructured 領域認識蛋白質や小分子の結合、翻訳後修飾が分解効率にどのような影響があるかをまず調べ、この知見をもとに人工的に Unstructured 領域の性質を改変する方法を開発し、疾患において分解の異常亢進が見られる病因蛋白質の分解抑制を試みる。

1-1. Unstructured 領域への結合・修飾による分解抑制の分子機構

1-2. Unstructured 領域の人工改変による分解抑制法の開発

(2) 人工アダプター蛋白質による分解誘導方法の開発

任意の蛋白質をプロテアソームに運び込むアダプター蛋白質の存在が明らかになってきた (Prakash, Inobe *et al.* *Nat. Chem. Biol.* 2009)。アダプター蛋白質はプロテアソームと基質蛋白質に同時に結合することができるため、基質をプロテアソームに運び込むことができる。そして運び込まれた蛋白質のうち、Unstructured 領域を持ったものだけが分解されていく。しかしながらその詳細な分子機構は明らかにされていない。そこでアダプター蛋白質の分解誘導機構を明らかにし、細胞内での異常蓄積が問題となるポリグルタミン病の原因蛋白質などの分解を誘導する人工アダプター分子の開発を目指す。

2-1. モデル蛋白質を用いたアダプター蛋白質の作用機構の解明

2-2. 人工アダプター蛋白質の開発

3. 研究の方法

(1) Unstructured 領域をターゲットにした分解抑制方法の開発

Unstructured 領域をターゲットにした分解抑制が可能であるか検証した後、Unstructured 領域をターゲットにする分子を開発し、病因蛋白質の分解抑制を試みる。

1-1. Unstructured 領域への結合・修飾による分解抑制の分子機構

プロテアソームに効率的に認識される

Unstructured 領域の特性を、Unstructured 領域への蛋白質や小分子の結合、翻訳後修飾により変化させれば、分解を制御できるはずである。そこで小分子の結合により誘導的に構造形成が起こるスタフィロコッカスヌクレアーゼ変異体を Unstructured 領域として用いたモデル基質蛋白質や、蛍光色素 FlAsH/ReAsH と特異的に結合するテトラシステイン(Cys₄)モチーフを Unstructured 領域として持つモデル蛋白質を構築する。そしてこれらモデル基質蛋白質のプロテアソームによる分解が、小分子により抑制されるか検証する。すでに精製プロテアソームを用いた予備実験で Cys₄モチーフを含む Unstructured 領域への ReAsH の結合により、効率的分解が阻害されることを確認している。さらに ReAsH による分解阻害が培養細胞や酵母細胞内でも可能か調べる。また Unstructured 領域のリン酸化などの翻訳後修飾による性質変化が、分解効率にどのような影響を与えるかもモデル基質蛋白質を用いて検証する。

1-2. Unstructured 領域の人工改変による分解抑制方法の開発

プロテアソームによる分解の制御を目指して、Unstructured 領域をターゲットにした薬剤の開発を行う。ここでは Unstructured 領域が分解シグナルとなり、疾患において分解異常がみられる病因蛋白質の分解抑制を目指す。特に癌において分解が亢進する癌抑制蛋白質 p53 の人工的な分解抑制を第一のターゲットとする。まずは高速抗体作成法やファージディスプレイ法で、Unstructured 領域に結合する抗体やペプチドを迅速に作成し、分解抑制分子として用いる。また p53 の Unstructured 領域は様々なパートナー蛋白質と相互作用し、多くの修飾も受ける。そのためパートナー蛋白質に結合する小分子によっても、p53 の分解を制御出来ると考えられる。そこで Unstructured 領域だけでなく、パートナー蛋白質も対象にして、小分子化合物ライブラリから、結合小分子をスクリーニングする。このようにして得られた分子の分解抑制効果を *in vitro* や培養細胞系で検証する。分解抑制が確認できた分子は、よりよい分解抑制のためのリード分子とする。

(2) 人工アダプター蛋白質による分解誘導方法の開発

目的蛋白質を効果的にプロテアソームに運ぶアダプター蛋白質の特徴を明らかにし、任意の蛋白質の分解を誘導する人工アダプター分子を創り出す。

2-1. モデル蛋白質を用いたアダプター蛋白質の作用機構の解明

モデル蛋白質を用いた実験において、ユビキチン化されていない蛋白質がアダプター蛋白質を介してプロテアソームに運び込まれ分解されることがわかった (Prakash, Inobe *et al.* Nat. Chem. Biol. 2009)。現在までにアダプター蛋白質はプロテアソームと基質蛋白質

質に同時に結合可能でなければならないと分かっているが、それだけでは効率的な分解を誘導しない。そこでどのようなアダプター蛋白質が、どのような基質蛋白質を、効率的にプロテアソームに運び込み分解を誘導するのか調べる。アダプター・基質のモデル蛋白質として、複合体形成が容易で物性研究の進んでいる FRB-FKBP-Rapamycin 系を利用し、蛋白質工学的に様々な特性 (Unstructured 領域の長さや位置、アミノ酸配列など) を持つアダプターと基質を作成する。全てのアダプター・基質の組み合わせに対して、基質の分解効率を調べ上げ、効率的なアダプターの条件を明らかにする。

さらにこの知見を基に、癌抑制蛋白質 Rb のアダプター蛋白質だと言われるパピロマウィルスの E7 蛋白質などの細胞内でアダプター機能を持つと考えられる蛋白質の、詳細なアダプター機能分子メカニズムを明らかにする。特に上記で明らかになった条件に注目して、この適合条件を乱すことにより、アダプター機能が失われるか確認する。

2-2. 人工アダプター蛋白質の開発

任意の蛋白質をプロテアソームに運び込み、分解を誘導するアダプター蛋白質を開発する。アダプター蛋白質はターゲット蛋白質結合部位とプロテアソーム結合標識が必要である。ターゲット結合部位としてはリガンドや抗体、ファージディスプレイ法より得たペプチドなどが候補となる。プロテアソーム結合標識はポリユビキチンや UbL などが使用出来る。さらに 2-1 の成果をもとに改良しつつ、効率的な分解を誘導するアダプター蛋白質を作成する。

本申請では、その蓄積がハンチントン病などの神経変性疾患を引き起こす、ポリグルタミン (PolyQ) 異常伸長蛋白質をターゲット蛋白質として用いる。異常伸長 PolyQ に結合するペプチド QBP1 とプロテアソーム結合標識を融合したアダプターは、PolyQ 蛋白質をプロテアソームに運び込み、その分解を促進するはずである。すでに予備実験により、このようなアダプター蛋白質がポリグルタミン蛋白質の分解を誘導し、凝集体形成を抑えることがわかっている。さらに将来の臨床応用を見越して、高効率で小型・安定なアダプターに改良する。

4. 研究成果

1. Unstructured 領域をターゲットにした分解抑制方法の開発

Unstructured 領域のアミノ酸配列に注目し、分解を引き起こす配列の特徴を調べた。その結果、Unstructured 領域の多くの物理化学的性質 (電荷や疎水性など) は分解の受けやすさと相関はなかったが、複雑度 (SEG アルゴリズムにより計算) は分解の受けやすさと相関があった。つまり複雑なアミノ酸配列から構成される Unstructured 領域をもつ蛋白質だけがプロテアソームによって分解されるこ

とが分かった。細胞内の 6000 個あまりの蛋白質の寿命を比較したところ、蛋白質末端に複雑なアミノ酸配列の Unstructured 領域をもつ蛋白質の寿命は、末端に Unstructured 領域を持たない蛋白質より平均 4 ~ 8 時間ほど短いことがわかった。一方末端に偏りのあるアミノ酸配列の Unstructured 領域を持つ蛋白質は、持たない蛋白質に比べ、ほとんど寿命の差は無いことが明らかとなった。このことから細胞内の多くの蛋白質のプロテアソームによる分解の受けやすさも、Unstructured 領域のアミノ酸配列の複雑さからも説明することができる (Fishbain, Inobe *et al.*, (2015) *Nature Struct. Mol. Biol.*)

上記の研究結果などから、蛋白質の最終的な運命を決めているのは、Unstructured 領域の性質であると推察される。そこで我々は Unstructured 領域への分子の結合や修飾により、Unstructured 領域の性質が変わり、分解効率も変わるのではないかと考えた。まず蛋白質の分解は Unstructured 領域に結合する小分子によって阻害されるかどうかを調べた。このために、Unstructured 領域内にテトラシステインモチーフ (CCPGCC) を含むモデル基質を構築した。テトラシステインモチーフは二砒素蛍光試薬である FAsH や ReAsH により認識される。このモデル基質は通常 Unstructured 領域がプロテアソームに認識され、分解されたのに対し、ReAsH の存在下では分解を逃れることができた。このことは ReAsH の結合した Unstructured 領域は分解を引き起こすことが出来ないことを示している。このような Unstructured 領域リガンドによる分解の阻害は、人工のテトラシステインモデル基質だけでなく、天然変性蛋白質 (IDP) においても観察された。IDP のモデル蛋白質である変異 Staphylococcal Nuclease (SNase) を含むモデル基質は、通常プロテアソームによって分解されるが、ジヌクレオチド阻害剤 prAp の変異 SNase への結合により、分解を免れることができた。この結果は、他の多くの IDP のプロテアソームによる分解も、その結合パートナーによって調節されていることを示している。さらに Unstructured 領域を認識する抗体によっても容易に分解阻害できる。Unstructured 領域にテトラヒスチジン (His₆) タグを持つモデル蛋白質のプロテアソームによる分解は、抗 His₆ タグ抗体により阻害されることを観測している (Takahashi, Matouschek, and Inobe (2015) *ACS Chemical Biology*)

現在、細胞内抗体を用いて細胞内ターゲット蛋白質の分解抑制を試みている。

2.人工アダプター蛋白質による分解誘導方法の開発

ユビキチン化されていない任意の蛋白質をプロテアソームに運び込むアダプター蛋白質の存在が最近明らかになってきた (Prakash, Inobe *et al.* *Nat. Chem. Biol.* 2009)

本研究では神経変性疾患を引き起こす凝集性の蛋白質 (ポリグルタミン蛋白質など) を対象としたアダプター蛋白質を設計し、その分解誘導効果を検証した。アダプター蛋白質はターゲット蛋白質結合部位とプロテアソーム結合標識が必要である。ターゲット結合部位としてはリガンドや抗体、ファージディスプレイ法より得たペプチドなどを用いた。プロテアソーム結合標識はポリユビキチンや UbL などを使用した。

まずその蓄積がハンチントン病を引き起こす、ポリグルタミン (PolyQ) 異常伸長ハンチンチンをターゲット蛋白質としてアダプター蛋白質の開発を行った。異常伸長ポリグルタミンに結合するペプチド Polyglutamine-binding peptide 1 (QBP1) とプロテアソーム結合標識 (ポリユビキチンやユビキチン様ドメイン) を融合したアダプター (Ub-QBP1) を設計し作成した。Ub-QBP1 アダプター蛋白質は設計通りプロテアソームと PolyQ 異常伸長ハンチンチン・エクソン 1 に結合することが出来た。このアダプターは *in vitro* の精製蛋白質を用いた系で、変異異常ハンチンチン・エクソン 1 をプロテアソームに運び込み、その分解を促進した。変異異常ハンチンチンを発現する培養細胞においても、QBP1 アダプター蛋白質は異常ハンチンチンの分解の促進し、凝集体の減少が確認された (投稿準備中)

また筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の原因蛋白質である変異 SOD1 に対するアダプターも作成し、現在その分解誘導効果を検証中である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

(雑誌論文)(計 10 件)

1. Yu, H., Singh Gautam AK., Wilmington, S., Wylie, D., Martinez-Fonts, K., Kago, G., Warburton, M., Chavali, S., Inobe, T., Finkelstein, I., Babu, MM., and Matouschek, A. (2016) Conserved sequence preferences contribute to substrate recognition by the proteasome. *J. Biol. Chem.*, in press.
2. Kurosawa, N., Wakata, Y., Inobe, T., Kitamura, H., Yoshioka, M., Matsuzawa, S., Kishi, Y., and Isobe, M. (2016) Novel method for the high-throughput production of phosphorylation site-specific monoclonal antibodies. *Scientific Reports*, 6, 25174.
3. Inobe, T.* and Nozaki, M. (2016) Proteasomal degradation of damaged polyubiquitin. *Biochem Biophys Res Commun*, 471, 34-40.
4. Inobe, T.* and Nukina, N. (2016) Rapamycin-induced oligomer formation system of FRB-FKBP fusion proteins. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 122,

- 40-46.
5. Inobe, T.* and Genmei, R. (2015) Inhibition of the 26S proteasome by peptide mimics of the coiled-coil region of its ATPase subunits. *Biochem Biophys Res Commun*, 468, 143-150.
 6. Inobe, T.*, Nozaki, M. and Nukina, N. (2015) Artificial regulation of p53 function by modulating its assembly. *Biochem Biophys Res Commun*, 467, 322-327.
 7. Takahashi, K., Matouschek, A. and Inobe, T.* (2015) Regulation of proteasomal degradation modulating an unstructured proteasomal initiation region of a substrate. *ACS Chem. Biol.* 10, 2537-2543.
 8. Inobe, T.* and Genmei, R. (2015) N-terminal coiled-coil structure of ATPase subunits of 26S proteasome is crucial for proteasome function. *PLoS ONE*, 10(7): e0134056.
 9. Fishbain, S., Inobe, T., Israeli, E., Chavali, S., Yu, H., Zokarkar, A., Babu, MM., and Matouschek, A. (2015) The sequence composition of disordered regions affects protein half-life by controlling the initiation step of proteasomal degradation. *Nature Struct. Mol. Biol.* 22, 214-221.
 10. Inobe, T. and Matouschek A. (2014) Paradigms of protein degradation by the proteasome. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 24, 156-164.

* Corresponding author

〔学会発表〕(計 4件)

1. Inobe, T. (2014) Regulation of the protein degradation by the proteasome. The 4th International Symposium of Life Sciences (University of Toyama, Dec. 11)
2. Takahashi, K., and Inobe, T. (2014) Inhibition of proteasome-mediated degradation through an unstructured initiation site of a targeted protein. FASEB Science Research Conference "Ubiquitin and Cellular Regulation" (Saxtons River, Vermont, June 15-20).
3. 伊野部智由(2014)プロテアソーム ATPase リング N 末端突起の蛋白質分解における役割、第14回日本蛋白質科学会年会(ワークピア横浜、横浜、6月25日～27日)
4. 高橋一暢、伊野部智由(2014)不規則領域をターゲットとしたプロテアソームによる蛋白質分解の制御、第14回日本蛋白質科学会年会(ワークピア横浜、横浜、6月25日～27日)

〔その他〕

ホームページ等

<http://inobelab.wordpress.com/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

伊野部 智由 (INOBE TOMONAO)