

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月18日現在

機関番号：82609

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22657037

研究課題名（和文） 巨大分子 26S プロテアソームの核細胞質間輸送の解析

研究課題名（英文） Mechanism of the proteasome nuclear localization

研究代表者

佐伯 泰 (SAEKI YASUSHI)

財団東京都医学総合研究所・生体分子先端研究分野・主席研究員

研究者番号：80462779

研究成果の概要（和文）：

26S プロテアソームはユビキチン依存的タンパク質分解系の最終段階を担う 2.5 MDa の巨大なタンパク質分解酵素複合体である。酵母やある種のがん細胞において、プロテアソームは主に核に局在することが知られている。プロテアソームは 66 個のサブユニットから形成されるため、分子集合のどこかのタイミングで核に移行しなくてはならない。従来、プロテアソームの核移行について分子集合の中間体で核に移行するというモデルが提唱されてきたが、その詳細は不明である。本研究では、プロテアソームサブユニットに蛍光タンパク質を融合した出芽酵母プロテアソーム蛍光タグ融合株を作製し、生細胞イメージング手法の一つ蛍光相互相関分光法によりプロテアソーム動態を解析した。その結果、細胞質および核のどちらにおいてもプロテアソームサブユニットはほぼ全てプロテアソーム複合体に取り込まれ安定に存在することが明らかとなった。また、プロテアソームの核移行に欠損を示すインポーチン α 変異体においても同様の結果が得られた。よって、26S プロテアソームは細胞質で完成し、ホロ酵素として核膜孔を通過し核局在することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

The 26S proteasome is a highly organized protease complex that is responsible for targeted protein degradation in both the cytosolic and nuclear compartment. In budding yeast and several cancer cells, it is known that the 26S proteasome is mainly localized in the nucleus. Although several studies have described the mechanism of the nuclear translocation, it is still unclear when the proteasomes enter the nucleus upon their assembly process. Using dual color fluorescence cross correlation spectrometry (FCCS), we determined local concentration and dynamics of the 26S proteasome in living yeast cells. Surprisingly, almost all the proteasome subunits were incorporated into the 26S proteasome in both the cytosol and nucleus. Importantly, the proteasome dynamics was not changed in the importin α (srp1-49) mutant cells in which the 26S proteasome retains the cytosol. These results suggest that the 26S proteasome is fully assembled in the cytoplasm prior to the nuclear translocation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	0	1,600,000
2011 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	420,000	3,420,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：細胞内タンパク質分解

1. 研究開始当初の背景

プロテアソームはユビキチン依存性タンパク質分解系において最終段階を担う巨大で複雑な細胞内タンパク質分解装置である。酵母や癌細胞ではプロテアソームは主に核に存在し機能しているが、プロテアソームがどのような機構で核に輸送されるかはほとんどわかっていない。また、プロテアソームは約 70 個のサブユニットから形成されるが分子集合のどのタイミングで核に移行するのか未解決である。

2. 研究の目的

遺伝学的手法・細胞生物学的手法を駆使して、プロテアソームの形成の場と核細胞質間輸送の機構を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

生細胞でプロテアソーム動態を解析するために、プロテアソームサブユニットに蛍光タンパク質タグ融合した出芽酵母プロテアソーム蛍光タンパク質融合株を作製し、生化学的手法と細胞生物学的手法によりプロテアソームの核移行に注目して解析を行う。

4. 研究成果

① プロテアソーム蛍光タグ融合株の作出

生細胞イメージングのために GFP や RFP などの蛍光タンパク質タグの融合が有効な手段である。しかし、プロテアソームのような複合体においてはタグの融合により複合体形成欠損や機能欠損などのアーティファクトを生じる可能性がある。そこで、プロテアソームサブユニット 20 種類について蛍光タグタンパク質融合を検討したところ、17 種類のサブユニットについてタグ融合に成功した。細胞増殖能やプロテアソームの分子集合を解析した結果、プロテアソームの 19S 複合体のサブユニット Rpn7 および酵素活性を持つ 20S 複合体の $\alpha 4$ サブユニットがタグ融合に最適なサブユニットであることがわかった。そこで、Rpn7 に緑色蛍光タンパク質 GFP、 $\alpha 4$ に赤色蛍光タンパク質 mCherry を付加した二重蛍光タグ融合株を作出した。

② インポート変異株を用いたプロテアソームの分子集合の解析

細胞質核輸送担体インポート α 変異体のうち、プロテアソームサブユニットの核移行に欠損を示す *srp1-49* 株が報告された。そこで、*srp1-49* 変体のバックグラウンドで

Rpn7 に緑色蛍光タンパク質 GFP、 $\alpha 4$ に赤色蛍光タンパク質 mCherry を付加した 2 重蛍光タグ融合株を作出した。

まず、Native 電気泳動と蛍光イメージングよりプロテアソームの分子集合を解析したところ、野生株および *srp1-49* 株で全く差はみられなかった。つまり、核移行と分子集合は関係しない可能性が示唆された。

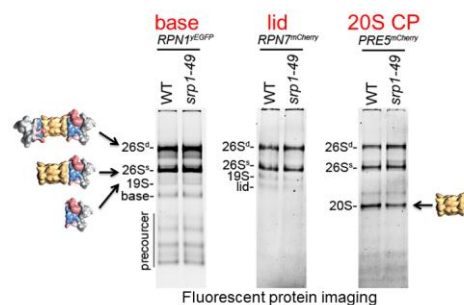


図1 インポート変異体におけるプロテアソームの分子集合の解析

しかしながら、Native 電気泳動などの生化学的手法は細胞抽出液の調製などでアーティファクトが含まれる可能性がある。そこで、生細胞におけるプロテアソーム動態を以下解析した。

生細胞イメージング手法の一つ蛍光相互相関分光法 (FCCS: fluorescence cross correlation spectrometry) は蛍光タンパク質の微小空間におけるゆらぎより、標的タンパク質の濃度、分子量、複合体形成率を決定することができる。独立行政法人理化学研究所白 燦基博士との共同で FCCS を用いたプロテアソーム動態計測を行った。その結果、プロテアソームサブユニットはほぼ全てプロテアソーム複合体中に取り込まれ安定に存在することが明らかとなった。また、細胞質および核のどちらのコンパートメントにおいてもフリーのサブユニットや中間体は検出限界以下であり、ほぼ 100% 26S プロテアソームとして存在することが明らかとなった。次に、インポート α 変異体を用い同様の解析を行ったところ、プロテアソームサブユニットは 26S プロテアソームの分子集合に影響を与えなかった。これらの結果より 26S プロテアソームは細胞質で完成し、ホロ酵素として核膜孔を通過し核局在することが示唆された (論文投稿中)。

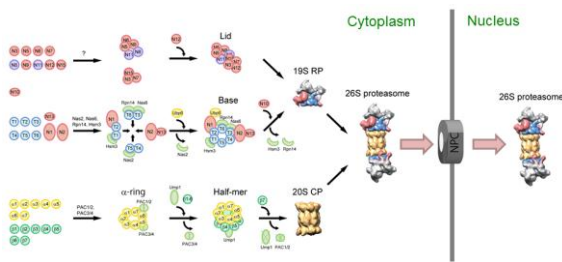


図2 酵母プロテアソームの分子集合と核移行

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 11 件)

【英文原著論文 (全て査読有り)】

- (1) Kono, K., Saeki, Y., Yoshida, S., Tanaka, K., and Pellman, D. (2012) Proteasomal degradation resolves competition between cell polarization and cellular wound healing. **Cell** in press.
- (2) Takagi, K., Kim, S., Yukii, H., Ueno, M., Morishita, R., Endo, Y., Kato, K., Tanaka, K., Saeki, Y.*, and Mizushima, Y. * (2012) Structural basis for specific recognition of Rpt1p, an ATPase subunit of the 26S proteasome, by the proteasome-dedicated chaperone Hsm3p. **J Biol Chem** 287, 12172-12182. (*correspondences)
- (3) Sakata, E., Bohn, S., Mihalache, O., Kiss, P., Beck, F., Nagy, I., Nickell, S., Tanaka, K., Saeki, Y., Förster, F., and Baumeister, W. (2012) Localization of the proteasomal ubiquitin receptors Rpn10 and Rpn13 by electron cryomicroscopy. **Proc Natl Acad Sci USA** 109, 1479-1484.
- (4) Sakata, E., Stengel, F., Fukunaga, K., Zhou, M., Saeki, Y., Förster, F., Baumeister, W. *, Tanaka, K. *, and Robinson, CV. * (2011) The catalytic activity of Ubp6 enhances maturation of the proteasomal regulatory particle. **Mol Cell** 42, 637-649. (*correspondences)
- (5) Tokunaga, F., Nakagawa, T., Nakahara, M., Saeki, Y., Taniguchi, M., Sakata, S., Tanaka, K., Nakano, H., and Iwai, I. (2011) Sharpin is a component of the NF- κ B activating linear ubiquitin chain assembly complex. **Nature** 471, 633-636.
- (6) Sakata, E., Stengel, F., Fukunaga, K., Zhou, M., Saeki, Y., Förster, F., Baumeister, W. *, Tanaka, K. *, and Robinson, CV. * (2011) The catalytic activity of Ubp6 enhances maturation of the proteasomal regulatory particle. **Mol Cell** 42, 637-649. (*correspondences)
- (7) *Kim, S., *Saeki, Y., Fukunaga, K., Suzuki, A., Takagi, K., Yamane, T., Tanaka, K., Mizushima, T., and Kato, K. (2010) Crystal structure of yeast Rpn14, a chaperone of the 19S regulatory particles of the proteasome. *equally contributed **J Biol Chem** 285, 15159-151566.
- (8) Fukunaga, K., Kudo, T., Toh-e, A., Tanaka, K.,

and Saeki, Y. (2010) Dissection of the assembly pathway of the proteasome lid in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochem Biophys Res Commun** 396, 1048-1053.

(9) Arimoto, K. I., Funami, K., Saeki, Y., Tanaka, K., Okawa, K., Takeuchi, O., Akira, S., Murakami, Y., and Shimotohno, K. (2010) Polyubiquitin conjugation to NEMO by tripartite motif protein 23 (TRIM23) is critical in antiviral defense. **Proc Natl Acad Sci USA** 107, 15856-15861.

【英文総説論文 (全て査読有り)】

- (1) Tanaka, K., Mizushima, T., and Saeki, Y. (2012) The proteasome: molecular machinery and pathophysiological roles. **Biol Chem** 393, 217-234.
- (2) Saeki, Y. and Tanaka, K. (2012) Assembly and function of the proteasome. **Methods Mol Biol** 832, 315-337.

〔学会発表〕(計 10 件)

- (1) 佐伯 泰、白 燦基、東江昭夫、田中啓二：出芽酵母 26S プロテアソームは細胞質で完成する。第 44 回日本分子生物学会，2011.12.15，横浜。
- (2) 佐伯 泰、東京大学大学院農学生命科学科第 7 回応用動物科学セミナー「プロテアソーム研究の最前線」2011, 10.25, 東京。
- (3) 佐伯 泰、福永圭佑、坂田絵里、Florian Stengel、Carol V. Robinson、Wolfgang Baumeister、田中啓二：Rad23 と Ubp6 は 26S プロテアソームの分子集合に参与する。第 84 回日本生化学会大会、2011.9.24, 京都。
- (4) Haruka Yukii, Yasushi Saeki, Changi Pack, Keisuke Fukunaga, Eri Sakata, Yasushi Sako, Akio Toh-e, Wolfgang Baumeister, Keiji Tanaka : The 26S proteasome completes its assembly process in the cytoplasm prior to the nuclear translocation. EMBO Conference, Ubiquitin and ubiquitin-like modifiers, 2011, 9.21-25, Cavtat, Croatia.
- (5) 佐伯 泰、白 燦基、東江昭夫、田中啓二：出芽酵母 26S プロテアソームは細胞質で完成する。酵母遺伝学フォーラム第 44 回研究報告会、2011.9.7, 博多。
- (6) 佐伯 泰、福永圭佑、工藤 泰、川村ひとみ、田中啓二：26S プロテアソームの分子集合機構。平成 22 年度ターゲットタンパク質研究プログラム成果発表会、2011, 3.11, 東京。
- (7) Yasushi Saeki: Assembly, structure, and function of the 26S proteasome. Korea-Japan Symposium on Protein Metabolism, 2011, 1.27-29, Seoul, Korea.
- (8) 佐伯 泰、白 燦基、川村ひとみ、東江昭夫、佐甲靖志、田中啓二：26S プロテアソームはどこで完成するか？ BMB2010 (第 33 回分子生物学会、第 83 回日本生化学会合同年会) ,

2010.12.7-10, 神戸.

(9) 佐伯 泰, 福永圭佑, 田中啓二: プロテアソーム 19S 制御因子複合体の分子集合機構. 平成 22 年度ターゲットタンパク研究プログラム成果発表会, 2010, 10.18-20, 東京.

(10) 佐伯 泰: 26S プロテアソームの分子集合と作動原理. 第 19 回酵母合同シンポジウム, 2010, 6.24-25, 東京.

〔図書〕 (計 2 件)

(1) 佐伯 泰, 福永圭佑: みえてきた 26S プロテアソームの形成機構の全貌, 「細胞内分解系によるリノベーションの分子機構に迫る」 実験医学・増刊号 29 巻 (12 号) 1868-1874, 羊土社, 2011.

(2) 佐伯 泰, 田中啓二: 脱ユビキチン化酵素 Ubp6 はプロテアソームの分子集合を制御する. ライフサイエンス「新着論文レビュー」 (<http://first.lifesciencedb.jp/archives/3121>), 2011.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.igakuken.or.jp/pro-meta/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐伯 泰 (SAEKI YASUSHI)

財団法人東京都医学総合研究所・生体分子

先端研究分野・主席研究員

研究者番号: 80462779

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし