

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：34506

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25440093

研究課題名(和文) プロテアソームの空間制御を司る分子基盤と制御機構の探求

研究課題名(英文) Studies on molecular bases that control intracellular localization of the proteasome

研究代表者

武田 鋼二郎 (Takeda, Kojiro)

甲南大学・理工学部・講師

研究者番号：90426578

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は主要タンパク質分解系の一つである26S プロテアソームの細胞内局在制御機構を、分裂酵母をモデル生物として明らかにすることを目的とする。分裂酵母ではプロテアソーム局在の主要制御因子はCut8タンパク質であり、Cut8と物理的に相互作用し協同して機能する可能性のある因子、あるいは、Cut8機能の制御因子候補に関する解析を行った。Cut8と協同してプロテアソーム局在を制御する有力な因子の同定には至らなかったが、真核生物で保存されたGreatwall-endosulfine経路とCut8、あるいはタンパク質分解制御との機能的連関について興味深い知見を得ることができた。

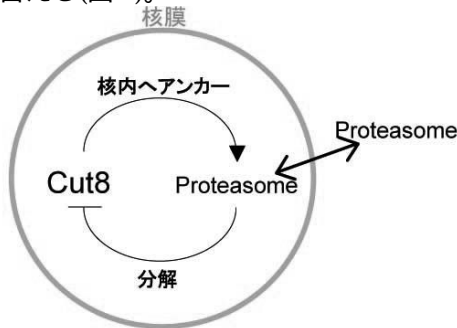
研究成果の概要(英文)：The aim of this research is to elucidate the molecular mechanisms that control intracellular localization of the 26S proteasome, using the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* as a model. In *S. pombe*, the main regulator of the localization of the proteasome is Cut8 protein and therefore we tried to find factors interacting with or regulating Cut8. Although we have not identified novel factors regulating the proteasome localization cooperating with Cut8, we could obtain several interesting results about the relationship between evolutionally conserved Greatwall-endosulfine pathway and Cut8 functions.

研究分野：細胞生物学

キーワード：タンパク質分解 シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

ユビキチン/プロテアソーム経路の活性制御は、主に E3 酵素の活性、基質の認識等の段階によってなされることが、これまでに解明されて来たが、タンパク質分解を担う 26S プロテアソーム自体の制御、特に細胞内の空間的な配置に関する制御に関しては理解が発展途上であると言える。真核生物の良いモデル生物である分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* は、プロテアソームの細胞内局在制御の理解がよく進んでいる。活発に細胞分裂を繰り返す増殖期にある分裂酵母細胞では、プロテアソームは核内に集積しており、このプロテアソーム核局在には Cut8 という分子量約 30 万のタンパク質が必要である事が以前の研究から明らかとなっていた¹。分裂酵母が属する真菌類では、一般的に、細胞周期 M 期においても核膜が崩壊せず、細胞周期を通じて核内と細胞質が核膜で隔てられている (closed mitosis と呼ばれる)。M 期においてプロテアソームによって分解される必要がある細胞周期制御タンパク質、M 期サイクリン/Cdc13 や Cut2/セキュリン、は核内タンパク質であるため、これらの迅速な分解にとってプロテアソームを予め核内に集積しておく事は合目的であると言える(図 1)。

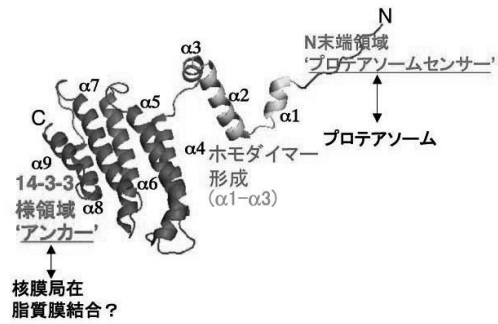


(図1) プロテアソーム核局在を制御する 'Sensor & Anchor' Cut8

実際、Cut8 の高温感受性の機能欠損変異株では、制限温度においてプロテアソームの核局在の異常を引き起こし、サイクリン/Cdc13 や Cut2/セキュリンの分解遅延を伴って致死となる。Cut8 がユニークであるのは、それ自体がプロテアソームの基質である半減期の短いタンパク質であるという点である。この性質によって、Cut8 は核内のプロテアソーム量を敏感に感知し、核内のプロテアソーム量を自律的に一定に保つことが示唆されている²⁻⁴。

X 線結晶構造解析と細胞生物学的解析から、Cut8 は、リン酸化アダプタータンパク質 14-3-3 と類似した構造を持つこと、ホモダイマーを形成すること、N 末端領域でプロテアソームと相互作用する事が示されている⁵。さらに、14-3-3 領域が Cut8 の核膜へのエンリッチとプロテアソームの核局在に重要で

あるという結果も示されている(図 2)。



(図2) 分裂酵母 Cut8 の結晶構造 (Takeda et al., PNAS 2011より)

以上のように、分裂酵母プロテアソームの核局在化機構は、Cut8 の構造的な理解を中心として研究が進んで来たが、本研究の開始当初では、さらに知見を深めるために、(1) Cut8 と協同して機能するタンパク質因子の機能解析、(2) Cut8 自体の制御機構の理解、が必要な状況にあった。Cut8 それ自体は菌類では保存されているものの、脊椎動物ではオルソログと言える分子は報告されていないことから、協同して機能する因子や、Cut8 を制御する可能性のある因子の中で、脊椎動物にもオルソログが存在する因子の研究が進捗すれば、高等動物におけるプロテアソームの空間制御の理解に貢献出来る可能性があると考えられた。特に、(2)の Cut8 の制御因子に関しては、これまでの遺伝学的な相互作用の研究から、リン酸化シグナル伝達因子である TOR 複合体 (Target of rapamycin)、PKA (cAMP dependent kinase)、Cek1/Ppk18¹ (動物の Greatwall kinase に類似。後述) の関与が予想されていた(図 3)。これらの因子はいずれも高等動物において保存されており、かつ、分裂酵母においては細胞外の栄養環境に応答する事が報告されている。窒素源枯渇によって誘導される分裂酵母の G0 期には、Cut8 量の劇的な減少を伴ってプロテアソームが核から細胞質へ移行すること、G0 期においては細胞質に存在するミトコンドリアの機能維持にプロテアソームが関与する事が示唆される等、

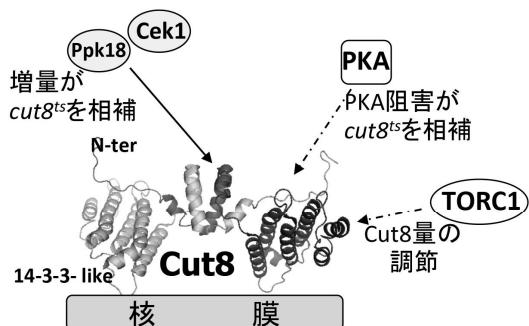


図3 Cut8と関係する可能性のあるリン酸化シグナル因子たち

これまでの研究から栄養状態とプロテアソームとの間になんらかのつながりが存在することが予想されるため、これらのシグナル伝達因子の機能解析が重要であると考えられた⁴。

2. 研究の目的

「1. 研究開始当初の背景」で述べた通り、本研究課題は大きく分けて以下の二つの目的を持つ。

(1) Cut8 と物理的に相互作用する因子の機能的な研究

(2) Cut8 機能を制御する可能性のあるリン酸化シグナル伝達ネットワークの研究

3. 研究の方法

Cut8 と物理的に相互作用する因子の機能的な研究に関しては、当初、Cut8 に FLAG などのエピトープタグを付加した融合タンパク質を発現する分裂酵母株を構築し、その細胞抽出液から免疫沈降法によって Cut8 を精製し、共沈してくるタンパク質を質量分析の手法を利用して同定することを計画していた。しかし、Cut8 タンパク質の可溶性が低く改善が難しかったことなどの技術的な問題と、研究期間中に研究代表者の所属変更があり質量分析機を計画通りには活用できない状況になったこと等から、代替手段として酵母 Two-hybrid 法 (Y2H 法) を利用して、Cut8 と物理的に相互作用する因子の研究をおこなった。

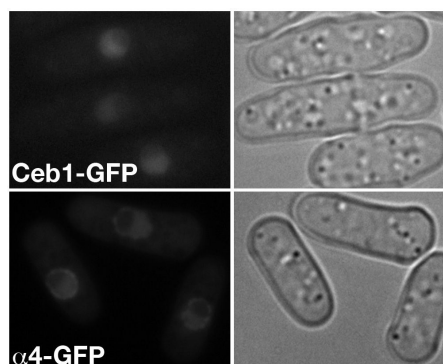
Cut8 機能を制御する可能性のあるリン酸化シグナル伝達因子の機能解析に関しては、真核生物で保存された Ser/Thr キナーゼ Cek1 に注目して研究を進めた (後述)。分裂酵母の各種高温感受性変異株、遺伝子破壊株を構築し、それらを用いた分子遺伝学・細胞生物学的解析に加え、精製キナーゼによる *in vitro* リン酸化反応やホスファターゼアッセイなどの生化学的解析を行い、Cek1 と、Cek1 に類似したキナーゼ Ppk18 の機能解析や Cut8 との機能的関連を研究した。必要に応じて、精製 *Xenopus* Greatwall キナーゼによる *in vitro* の Mug134 リン酸化反応も行い、ホスファターゼアッセイに用いた。

4. 研究成果

(1) Cut8 と物理的に相互作用する因子の機能的な研究

前述の通り、Y2H 法によって Cut8 と物理的に強く相互作用することが示唆される因子について研究をおこなった。そのうち、Ceb1 (Cut eight bindig) はヒトでも保存されたタンパク質であり、興味を持って研究をおこなったところ、C 末端に GFP を付加した融合タンパク質は核に局在した (図 4: $\alpha 4$ -GFP はプロテアソームの局在を示す)。しかしながら、Ceb1 を欠失した遺伝子破壊株を作成し、

プロテアソームの局在を解析した結果、野生株とほぼ同様の核局在を示し、Ceb1 がプロテアソーム局在に関与するという結果は得られなかった。*ceb1* と *cut8* の二重遺伝子破壊株では、DNA 二重鎖切断を引き起こすフレオマイシンに対して高い感受性を示した。*cut8* 遺伝子破壊株が genotoxin に対して高い感受性を示すことは研究代表者や他のグループによっても報告されている。また、プロテアソームが DNA 損傷経路に関与することも報告されていることから、Ceb1 は期待したようなプロテアソーム局在に関わる因子ではなかったにせよ、何らかのかたちでプロテアソームに関わる可能性は残っており、解析が完了していない他の Cut8 と物理的に相互作用する可能性のある因子とともに今後も研究を継続したい。



(図 4)

(2) Cut8 機能を制御する可能性のあるリン酸化シグナル伝達ネットワークの研究

Cut8 に高温感受性変異の *cut8-563* 変異では 201 番目のセリンがプロリンに置換しており、変異株は制限温度でプロテアソームを核内に局在させることが出来ず致死となる。*cut8-563* 変異の dosage suppressor として Cek1 キナーゼが既に報告されている¹。Cek1 は、動物の Greatwall キナーゼ (Gwl)、出芽酵母の Rim15 キナーゼに配列上の相同性を示すため、類似した機能を担っていることが予想される。Gwl は基質 Ensa のリン酸化を介して PP2A^{B55} を阻害し、細胞周期制御の根幹に関与することがアフリカツメガエルなどを用いた研究で示されている⁶。分裂酵母においては、Ensa と高い相同性をしめす Mug134 が存在するが、実際に動物と同じような Gwl \rightarrow Ensa \rightarrow PP2A 経路が存在するかどうかは検証されていなかった。Cut8 と Cek1 との遺伝学的相互作用の分子機構を理解し、Cut8 の制御機構に関して知見を得る目的で、本研究では、分裂酵母における Gwl 経路に着目して研究をおこなった。結果、分裂酵母においては、Cek1 ともう一つの類似キナーゼ Ppk18 が Gwl に相当し、Ensa オルソログの Mug134 をリン酸化すること、リン酸化 Mug134 は PP2A^{B55/Pab1} のホスファターゼ活性を阻害すること、を明らかとした (図

5)

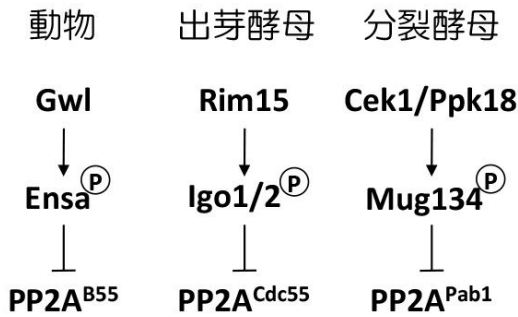


図5 Gwl/Ensa/PP2A経路の種間比較

分裂酵母の Gwl-Ensa 経路は通常の細胞増殖には必須ではないが、栄養源が低下した環境では重要性が増すことを示唆する結果が得られている。また、分裂酵母の Gwl-Ensa 経路と Cut8-プロテアソームとの関わりを遺伝学的に解析する過程で、Cek1 や Ppk18 と cut8 変異との遺伝学的相互作用には Mug134 の存在が必要であることを示唆する結果が得られた。以上の結果を、本研究期間中に学術雑誌に投稿したが、現時点では受理されておらず、近い将来の論文発表を目指す。

Cut8 やプロテアソームと Gwl-Ensa 経路がどのように関わるのか、すなわち、PP2A^{B55} 活性が直接的に関わるのか、あるいは、未知の Gwl の基質が関与するのか、また、どのような生理的な状況やイベントが Gwl-Ensa を介してタンパク質分解経路に関わって行くのか、などに多くの解決すべき課題が残っているため、今後も引き続き研究を継続してゆきたい。

1. Samejima and Yanagida. (1994) Mol Cell Biol.
2. Tatebe and Yanagida. (2000) Curr Biol.
3. Takeda and Yanagida. (2005) Cell
4. Takeda et al. (2009) Proc Natl Acad Sci.
5. Takeda et al. (2011) Proc Natl Acad Sci.
6. Mochida et al. (2012) Science

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 0 件)

〔学会発表〕(計 7 件)

- (1) 青野壮馬, 渡辺洋平, 持田悟, 武田鋼二郎
分裂酵母 Ppk18-Mug134 経路による PP2A-B55 の活性低下は G0 期への進入と維

持に必須である

BMB2015 (2015 年 12 月), 神戸ポートアイランド(兵庫県, 神戸)

(2) 鈴木奈津美, 岸本卓也, 武田鋼二郎
分裂酵母 20S プロテアソーム 5 サブユニットの高温感受性変異と遺伝学的相互作用する Ecl ファミリータンパク質
BMB2015 (2015 年 12 月), 神戸ポートアイランド(兵庫県, 神戸)

(3) 青野壮馬, 渡辺洋平, 持田悟, 武田鋼二郎
分裂酵母 Ppk18-Mug134 経路は G0 期への進入と維持に必須である
酵母遺伝学フォーラム第 48 回研究報告会 (2015 年 9 月), 広島大学(広島県, 東広島)

(4) 青野壮馬, 武田鋼二郎
分裂酵母 Greatwall キナーゼ/エンドサルフィン経路の機能解析
第 37 回分子生物学会年会 (2014 年 11 月), パシフィコ横浜(神奈川県, 横浜)

(5) 武田鋼二郎
分裂酵母 G0 期におけるタンパク質分解系の協調
酵母研究会 (2014 年 3 月), 京都テルサ(京都府, 京都)

(6) 武田鋼二郎
Greatwall キナーゼの分裂酵母ホモログの機能解析
第 36 回分子生物学会年会 (2013 年 12 月), 神戸ポートアイランド(兵庫県, 神戸)

(7) 武田鋼二郎
Greatwall キナーゼの分裂酵母ホモログの機能解析
酵母遺伝学フォーラム第 46 回研究報告会 (2013 年 9 月), 東北大学(宮城県, 仙台)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

〔その他〕
一般向けの研究紹介等

・2014 年度・春期甲南大学公開講座において、一般向けに研究活動を紹介

・2014 年度「ひらめきときめきサイエンス」(甲南大学 統合ニューロバイオロジー研究所主催)

・2015 年度「ひらめきときめきサイエンス」

(甲南大学 統合ニューロバイオロジー研究所主催)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

武田 鋼二郎 (Kojiro Takeda)

甲南大学・理工学部生物学科

講師

研究者番号：90426578

(2) 研究分担者

研究分担者はおかない。

(3) 連携研究者

連携研究者はおかない。

(4) 協力研究者

青野 壮馬 (Soma Aono)

鈴木 奈津実 (Natsumi Suzuki)

田中 築樹 (Kizuki Tanaka)

山下 大智 (Daichi Yamashita)