

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 24 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25440097

研究課題名(和文) 哺乳類細胞核内におけるタンパク質品質管理機構

研究課題名(英文) Molecular mechanism of mammalian nuclear protein quality control

研究代表者

水野 武 (Mizuno, Takeshi)

国立研究開発法人理化学研究所・今本細胞核機能研究室・専任研究員

研究者番号：30281629

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)：マウスの温度感受性変異体由来のDNAポリメラーゼ、p180を制限温度下で変性させると核内でHSP90に依存して分解されることを見いだした。そこで、HSP90に相互作用する因子の中でE3ユビキチンリガーゼとして最もよく知られているCHIPに着目した。マウスのCHIPの細胞内局在を免疫蛍光抗体染色法により観察した。CHIPは、主に細胞質に局在していた。一方、種々のストレス存在下でCHIPが核内にも検出された。さらにCHIPとHSP90の核内での相互作用をPLA法により検出した。哺乳類細胞の核内タンパク質品質管理はCHIP-HSP90により変性タンパク質が認識され、分解されると示唆された。

研究成果の概要(英文)：Due to a single point mutation in the DNA Polymerase alpha subunit p180, the temperature-sensitive cell cycle mouse cell line tsFT20 reveals a rapid de novo synthesis of p180tsFT20 in the cytoplasm and a proteasome-dependent degradation of nuclear localized protein. To further analyze the mechanism of nuclear degradation of aberrant Pol-alpha, we have searched chemicals those inhibit degradation of nuclear aberrant p180. We found that novobiocin, an HSP90 inhibitor, inhibits degradation of p180tsFT20 at non-permissive temperature in nucleus. To identify molecule participate in nuclear protein quality control, we carried out co-immunoprecipitation analysis, and found that Chip (C terminus of Hsc-70 interacting protein) associated with HSP90 and colocalized in the nucleolus in the presence of novobiocin. Taken together, we have a working hypothesis that nuclear protein quality control mechanism involves nuclear HSP90.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：タンパク質品質管理 哺乳類細胞品質管理 DNAポリメラーゼ 温度感受性変異体細胞 Novobiocin  
HSP90 タンパク質分解 哺乳類細胞核

## 1. 研究開始当初の背景

細胞の中ではタンパク質の機能は正しく発現していなくてはならない。機能が不全なタンパク質は 1) 遺伝的疾患や 2) 発ガンの過程, 3) 活性酸素や heat shock 等のストレスにより 4) 新生タンパク質合成の際の折りたたみの失敗等から生じると考えられている。機能不全なタンパク質は細胞にとって害をもたらす毒となる。そこで、異常なタンパク質を排除する分子機構が存在することが示されて来た。この分子機構はタンパク質品質管理機構と呼ばれ、特に小胞体中の分解系は ERAD (endoplasmic reticulum-associated degradation) として最も解析が進められている。他の細胞内小器官ではミトコンドリアやペルオキシソーム等における品質管理機構は研究されて来た。

一方、細胞内の小器官として最も大きいオルガネラが細胞核である。核は遺伝子を内包し、生命の司令塔である。核は遺伝子が複製され、転写される場所であり、タンパク質を合成するという義務から免除されている。タンパク質の合成、折りたたみという品質管理機構が必要ないことから、核内の品質管理機構は他のオルガネラや細胞質の品質管理機構とは異なっていると推測される。細胞核内の品質管理機構に関しては特に哺乳類細胞の核の品質管理機構はほとんど研究されてはいない。

核内タンパク質品質管理の先行例としては出芽酵母の SAN1 タンパク質がユビキチンリガーゼ E3 として報告されている (Gardner RG et al, 2005 Cell, 120, 803-815)。出芽酵母の温度感受性変異体の解析から核内の異常な複製因子を特異的に分解する E3 として San1 が同定された。タンパク質分解が関与するゲノムの恒常性の維持機構の存在が示唆された。しかし多細胞生物において類似した核内 E3 が存在するかどうかは全く不明である。実際, San1 のホモログはサッカロミ

セス属の間では保存されているが、分裂酵母の機能的ホモログですら不明である。多細胞生物の解析はほとんど行なわれていない (Rosenbaum, JC, et al., 2011, Mol. Cell, 7, 93-106)。

私は哺乳類細胞のゲノムの恒常性維持機構の解明を目指し、これまで一貫して DNA ポリメラーゼ に着目してきた。なかでも、マウス温度感受性変異体細胞 (tsFT20) 由来の DNA ポリメラーゼ の制限温度下で生じる核内動態を徹底的に解析した。その結果、「DNA ポリメラーゼ の品質は厳格に管理されており、核移行阻害と既に核内に存在しているタンパク質の核内での分解という二つの異なるメカニズムにより異常タンパク質を核内から排除する機構が存在する」という核内因子の品質管理機構という概念を提唱した (Eichinger CS et al., *J. Biol. Chem.*, 284, 30604-30614. 2009)。この核内タンパク質品質管理機構の分子メカニズムのさらなる解明を目指した。即ち、どのように異常タンパク質は核内で認識され、どのように分解されるのかを検討した。マウス NIH3T3 細胞へ tsFT20 由来の変異を持つポリメラーゼ 触媒サブユニット p180 を一過性過剰発現させた後に制限温度にシフトアップする際に種々の阻害剤を加え、分解を阻害する物質を探索した。その結果、HSP90 の C 末領域の ATP 結合部位への結合拮抗阻害剤である novobiocin が p180 の核内分解を抑制することを見出した (投稿準備中)。さらに novobiocin 存在下で、核内の内在性 HSP90 とプロテアソーム活性化因子 PA28 が核小体に共局在することを見出した。従って、核内では構造異常を来たしたタンパク質は HSP90 によって認識され、refold された後、核内プロテアソームへ引き渡され、分解されるのではないかと考えられた。

以上から、哺乳類細胞の核内には小胞体、細胞質、ミトコンドリア等とは異なるタンパク

質の認識・分解系が存在することが示唆された。

## 2. 研究の目的

私はこれまでの解析から核内の品質管理機構が HSP90 を含むシャペロンと細胞核内のプロテアソームによるタンパク質分解系であるという作業仮説と提示するに至ったが、まだ完全には証明出来ていなかった。証明する上で困難な問題点は 1) 細胞内の分解を局在部位と完全にリンクさせて観察する実験系が確立されていない。2) 分解系の関与を示唆するデータが阻害剤を用いた間接的データしかないこと 3) 基質として tsFT20 由来の DNA ポリメラーゼ に特異的な分解系を見ている可能性があり、一般化できるのかどうかなどがあげられる。そこで、これらの問題を克服する為に 1) 核内での分解を直接モニターする為に光刺激型 GFP を応用した生細胞観察系の実験系を構築する。2) その実験系を駆使し siRNA により HSP90 等のシャペロンの関与と核内プロテアソームの関与を証明し、3) このメカニズムで働く E3 を変異 p180 の制限温度下においてのみ結合する因子として同定する。4) 核内タンパク質品質管理で制御される他の基質を同定する。

## 3. 研究の方法

哺乳類細胞の核の中のタンパク質分解を直接観察する為に光刺激型 GFP (hmKikume) と DNA ポリメラーゼ との融合タンパク質を過剰発現させた細胞株 (NIH3T3 細胞、HeLa 細胞) を構築し、siRNA や阻害剤添加の実験と組み合わせてタンパク質分解の分子メカニズムを検証する。

哺乳類細胞の核内タンパク質分解系を直接観察する為の生細胞観察系の構築を行なう。tsFT20 由来の p180 を hmKikume (ヒト型単量体 Kikume : 光刺激変換型 GFP 誘導

体) と融合させた組換え体を安定発現させた NIH3T3 細胞を樹立し、WU 励起により WIY フィルターで追跡出来る系を作る。この NIH3T3 細胞で HSP90 を siRNA により、ノックダウンさせる他、種々の阻害剤を添加し、タンパク質の分解を追跡する。光刺激型 PAGFP(photo-activatable GFP)-p180 の観察は一過性過剰発現系により、観察に成功している。しかし、p180 の一過性発現の効率 10%以下であり、BV フィルターでの PAGFP の励起には 10 秒以上照射が必要であった p180 の NIH3T3 細胞での細胞過剰発現細胞株の樹立には成功していない。困難が予想される。そこで、tsFT20 由来の p180 の安定発現株を作る際に 39.5 度で細胞を選択し、過剰発現させた p180 は 39.5 度では分解されている状態で puromycin で薬剤選択をする。puromycin 耐性株を 33 度に下げて、p180 を発現させてから光刺激を行い、温度をシフトアップさせる。このような実験は試行錯誤が不可欠であるが、生細胞観察系の確立を第一に目指した。NIH3T3 が困難な場合は安定株の作製の効率のよい HeLa 細胞で試みる。

## 4. 研究成果

細胞核内の品質管理機構としては核内の温度感受性変異体が豊富に解析されている出芽酵母においてのみ SAN1 という E3 ユビキチンリガーゼが同定されている。しかし SAN1 のホモログはサッカロミセス族以外には見つかっていない。一方、私達はマウス体細胞由来の温度感受性変異株 tsFT20 の DNA ポリメラーゼ の触媒サブユニットである p180 が、核内で hsp90 と関連して分解される可能性を見出した。そこで、Hsp90 に相互作用する因子の中で E3 ユビキチンリガーゼとして最もよく知られている CHIP(Carboxy terminus of Hsp70-Interacting Protein) に着目した。CHIP と Hsp90 が、ストレス応答等

により細胞核に局在するかどうか、どのようなメカニズムで核内へ移行するのか、また核内でどのような機能を有するかを明らかにすることを旨とした。マウスの CHIP の cDNA をクローニングし、NIH3T3 細胞中で一過性過剰発現させ、低酸素応答誘発剤や HSP 阻害剤添加時の細胞内局在を免疫蛍光抗体法により観察した。さらに CHIP と HSP90 の核内での相互作用を検出するために、Duolink in situ による PLA 法を用いた。内在性のタンパク質と同様に一過性過剰発現させた場合も、Hsp90、CHIP とともに核よりも細胞質に多く局在していた。一方、興味深いことに塩化コバルトを添加した細胞では、核内へ集積している細胞の割合が増えることを見出した。Novobiocin についても同様の結果が得られ、CHIP 及び Hsp90 はある種のストレスや環境に反応して核内へ移行することが示唆された。さらに、PLA 法において、細胞内で相互作用した Hsp90 と CHIP の数がストレス応答により核内で増大する可能性が示唆された。

ここまでの研究の困難であった点は、変性した p180 と相互作用する因子を探索するために、p180 の N 末領域を抗原として作成した抗体を利用して、免疫沈降を行ってきたが、N 末領域は分子間相互作用の窓口であり、相互作用する因子との結合を抗体が拮抗阻害するという結果に気づいた（未発表）。C 末にタグを付加することで解決する可能性を見出している。これらの解決すべき課題を全て克服するために、CRIPR CAS9 によるゲノム編集により pol. a の温度感受性変異を NIH3T3 細胞もしくは heLa 細胞に導入し、さらに GFP タグを C 末に挿入することで、内在性レベルのタンパク質の分解を追跡すると同時に GFP-trap 法 (Chromotek, Inc) により、相互作用因子の同定を試みたが、残念ながら現時点はゲノムの編集には成功せず、使用したプラスミドベースの編集方法は適していない可能性が考えられた。GFP としては、光刺激型 GFP とし

て、初期に開発された photoactivatable GFP より 100 倍以上高感度な kikume GR (MBL) を利用することを試みた。しかし、残念ながら kikume-p180 発現プラスミドの導入効率が低く、生細胞観察することができなかった。ゲノム編集し、ゲノムに kikume GFP を導入すれば克服できると予想し、ゲノム編集を最優先し、NIH3T3 細胞の X 染色体の遺伝子座に kikume GFP の挿入を試みた。残念ながらマウスの X 染色体にゲノム編集することは成功しなかった。novobiocin の存在下もしくは非存在下で変性した pol. a に結合する因子を質量分析により同定するか、もしくは候補因子のウエスタンブロット法で絞り込む。E3 を同定したのちに、どのような環境で E3 と HSP90 が核に集積するかを解析する。出芽酵母の San1 に相当する機能的ホモログが HSP90-E3 複合体であるのではないかと推測している。

哺乳類細胞の体細胞変異株は樹立と解析が難しく、しっかり解析が進められている例はごく限られている。この tsFT20 の性質を有する NIH3T3 をゲノム編集して作成することで様々なハードルをクリアできると考えられた一方、近年、核内の変性タンパク質は細胞質に輸送されたのちにプロテアソームにより細胞質において分解されるという説や、オートファジーにより分解されるという説が報告されていることなどにより、注意深い観察と考察が必要になっている。核内品質管理と核ファジーの接点はあるかという基礎細胞生物学的に未解明な研究分野の概要に迫ろうとしている本研究結果は世界に先行するものとなり、神経変性疾患や VHL 症候群などの遺伝病の分子機構の解明につながることを予測した。

哺乳類細胞核内のタンパク質品質管理機構の解明を目指し、DNA ポリメラーゼ の温度感受性変異体を研究材料とした。タンパク質分解系のモデル基質として解析を行ってきた。一方で、DNA ポリメラーゼ の温度感受性変異体である tsFT20 細胞を半許容温度で数週

間培養するとテロメアの一本鎖領域と二本鎖領域が共に伸長することを見出した ( MCB, Nakamura, M., et al., 2005, 25, 11073-11088 )。テロメア領域のラギング鎖合成が滞ることによりテロメアが不安定化されることが示された。ゲノムの恒常性維持のメカニズムを理解する上で重要な現象であると考えられた。そこで、核内タンパク質品質管理機構の生理的意義を理解するための良いモデルとして利用するために、テロメア領域のラギング鎖合成の分子機構の解析を行った。その結果ラギング鎖を合成する DNA ポリメラーゼ はテロメア領域に結合するシェルタリン複合体中の唯一の一本鎖 DNA 結合タンパク質である Pot1 と直接相互作用することを見出した。Pot1 は DNA ポリメラーゼ の触媒サブユニットの p180 の N 末領域と直接結合することを酵母 two-hybrid 法、免疫共沈降反応、GST-pull down 法により検出した。マウスとラットの POT1 には 80% 以上のアミノ酸の相同性を有する pot1B というホモログが存在し、pot1A と pot1B は同様に p180 の N 末に結合し、テロメアに局在することを FISH 法、proximity ligation assay 法により検出した。p180 との相互作用は pot1A より pot1B の方が強いという結果もえられ、pot1A, pot1B のノックアウトマウスの表現系の違いを理解する手がかりになると考察された。テロメアのラギング鎖合成の維持に働く重要な分子間相互作用の詳細を明らかにできたと考えられた。核内で異常をきたした DNA ポリメラーゼ がどのように検知され、テロメアの不安定化を引き起こすのかを理解することで、細胞老化、ガン化、ゲノムの恒常性維持機構の理解へとつながると期待できる。

#### 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 0 件 )

[ 学会発表 ] ( 計 3 件 )

1. Takeshi Mizuno, Yurika Kobayashi, Kenta Shoji, Sae Miyazawa, Fumio Hanaoka, Naoko Imamoto, Hidetaka Torigoe, Interaction between mouse telomere binding protein Pot1a and Pot1b and DNA polymerase alpha-primase

10<sup>th</sup> 3R International Symposium 2016, Nov.13-17, 松江ニューアーバンホテル、島根県 松江市

2. 水野 武, 花岡文雄、今本尚子、CHIP の核内局在解析による哺乳類細胞核内のタンパク質品質管理機構の解明、第 38 回日本分子生物学会年会 2015 年 12 月 1 日-4 日 神戸ポートアイランド、兵庫県、神戸市

3. 水野 武, 石田竜次, 下仲基之、花岡文雄、今本尚子、哺乳類細胞核内のタンパク質品質管理機構の解明、第 67 回日本細胞生物学会大会 2015 年 6 月 30 日-7 月 2 日タワーホール船堀、東京都、江戸川区

[ 図書 ] ( 計 0 件 )

[ 産業財産権 ]

出願状況 ( 計 0 件 )

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

取得状況 ( 計 0 件 )

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

水野 武 (MIZUNO Takeshi)

国立研究開発法人理化学研究所・今本細胞核  
機能研究室・専任研究員

研究者番号：30281629：

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

### (4) 研究協力者

( )