

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 17 日現在

機関番号：82609  
研究種目：特別推進研究  
研究期間：2014～2019  
課題番号：26000014  
研究課題名(和文) プロテアソーム：動作原理の解明と生理病態学研究  
研究課題名(英文) The Proteasome: Mechanistic Actions and In-depth Physiopathological Analyses  
研究代表者  
田中 啓二 (TANAKA, Keiji)  
公益財団法人東京都医学総合研究所・生体分子先端研究分野・理事長  
研究者番号：10108871  
交付決定額(研究期間全体)(直接経費)：319,700,000円

**研究成果の概要(和文)：**プロテアソームは巨大で複雑なタンパク質分解装置である。本研究では、プロテアソームやそのパートナーであるユビキチンに関する基礎から生理病態学に関する研究を包括的に推進した。とくにプロテアソームが液滴を形成してタンパク質分解センターとなること、胸腺プロテアソームによるキラーT細胞レパトア形成機構、ユビキチンコード(多彩な情報)の解析、そしてPINK1とParkinによるミトファジー(不良ミトコンドリアのオートファジーによる選択的除去機構)の解明などにおいて画期的な成果が得られた。

**研究成果の学術的意義や社会的意義**

プロテアソームの液-液相分離による動作原理の解明やユビキチン修飾の構造・機能の多様性の解析は、世界を先導する独創的な成果であり、細胞内タンパク質分解の研究領域に新基軸を拓いた。またPINK1(プロテインキナーゼ)とParkin(ユビキチンリガーゼ)によるミトファジーの研究はパーキンソン病の発症機構の核心に迫るものであり、他の神経変性疾患などの研究に対する波及効果も大きく社会的インパクトは比類のないものとなった。

**研究成果の概要(英文)：** The proteasome is a supramolecular proteolytic apparatus. In this study, we challenged comprehensive analyses of the proteasome and its partner “ubiquitin” from action mechanisms to physiopathological roles. Especially, elucidations regarding the formation of proteasome liquid droplets by liquid-liquid phase separation to serve as a proteolytic center, the mechanism of killer T cell repertoire formation by the thymoproteasome, the ubiquitin code, and a selective autophagic elimination pathway of defective mitochondria (mitophagy) by PINK1 and Parkin were breakthrough achievements.

研究分野：生物学

キーワード：タンパク質分解 ユビキチン プロテアソーム オートファジー  
ミトファジー バイオテクノロジー 脳神経疾患 免疫学

## 1. 研究開始当初の背景

プロテアソーム研究は発見以来約30年が経過しているが、現在、そのパートナーであるユビキチン研究あるいは連携関係にあるオートファジー研究の爆発的な発展と連動しつつあり、これらの研究領域は拡大の一途を辿っている。但し世界的に急拡大しつつあるユビキチンやオートファジーの領域とは異なり、国内ではプロテアソーム阻害剤を利用した研究を除くと、本酵素自体を目標にした研究は、研究代表者ら及びその共同研究者以外には皆無の状況である。一方、欧米等国外ではプロテアソーム研究はPROTAC (Proteolysis Targeting Chimera: 細胞内の不要なタンパク質をユビキチン化してプロテアソームで選択的に破壊するツール) など多彩に展開しており、多くのテーマにおいて凌ぎを削った競合の渦中にある。

## 2. 研究の目的

本研究では、研究代表者のライフワーク研究の集大成としてプロテアソームの動作原理の解明から生理病態学への統合を目指す。具体的には、下記の3課題に対して分子から個体レベルの研究を多面的に幅広く展開していく。

### (1) プロテアソームに関する包括的基盤研究

長年の課題であるプロテアソームの形成機構については、我々が発見した多数の分子集合シヤペロンを中心に現在なお世界的に拡大の一步を辿っている。他方、プロテアソームのパートナーであるユビキチン・システムについては、膨大な多様性を内包しており、とくにユビキチン鎖の種類や長さに刻印された「ユビキチンコード」とも言われている膨大な情報は、大きな謎となっているが、それらの個々の機能については、殆ど分かっていない。そこで最先端の高性能質量分析計を駆使してユビキチン鎖の構造について網羅的な解析手法を開発し、このユビキチン鎖の多彩な機能の解明に挑戦する。さらに本研究では、依然として未解明なプロテアソームが触媒するタンパク質分解のパスウェイの解明という基本的な命題の解明にも挑む。加えて研究代表者らが最近開拓しつつあるプロテアソームと環境ストレス応答についてもトピクス研究として推進する。

### (2) 生理病態学1：分子病態研究

プロテアソームとオートファジーの破綻による神経変性疾患の研究については、国内外での重要性が注目されている。また近年、家族性パーキンソン病の原因遺伝子として発見されたPINK1 (プロテインキナーゼ) とParkin (ユビキチンリガーゼ) によるミトコンドリアの品質管理機構とパーキンソン病に関する研究は、国内外で大躍進を遂げているが、PINK1とParkinの活性制御機構については、まだ不明なことが多くその解明に挑む。

### (3) 生理病態学2：分子免疫研究

研究代表者らは、二種の免疫型プロテアソーム (Immunoproteasome とThymoproteasome) を発見し、プロテアソームの免疫研究分野では、世界の頂点に君臨している。免疫プロテアソームによる内在性抗原のプロセッシング提示経路等の研究に加えて、胸腺プロテアソームによる胸腺におけるCD8+ (キラー) Tリンパ球の正の選択によるレパトア形成に関する研究は、国内外を問わず研究代表者ら及び共同研究者以外に殆ど存在せず、世界の研究者たちの耳目を集めている。しかし胸腺プロテアソームには、未解決の大きな謎が残っている。それは「正の選択」を誘導するMHC-class I結合ペプチドの同定とその作用メカニズムの解明である。本課題では、この「正の選択」誘導ペプチドを同定してバーネットが提唱したクローン選択説の核心に迫る。

## 3. 研究の方法

(1) 本研究は生化学、細胞生物学、分子生物学、構造生物学、タンパク質化学、分子遺伝学、免疫学を基盤とした最先端技術を多面的に使用した。

(2) プロテアソームの動態解析：CRISPR/Cas9 法を駆使した各種蛍光タグノックインヒト培養細胞株を作製した。また Cre-loxP システムを導入して条件的プロテアソーム機能減弱マウスを作出した。さらにプロテアソームの発現レベルや局在を細胞内で可視化・定量可能な蛍光標識プロ

テアソーム遺伝子のノックイン (KI) マウスや、生細胞でプロテアソーム活性を直接モニターできるように設計した外来の「蛍光標識基質遺伝子」導入トランスジェニック (Tg) マウスを作成した。

(3) ユビキチンコードとデコードの定量プロテオミクス解析: AQUA (Stable isotope labeling control peptide) ユビキチンペプチドを作製、超高感度質量分析装置 (LC-MS/MS) により、ユビキチン鎖の種類 (8 種類) や分岐鎖 (K48-K63 鎖) を微量で検出定量する方法「Parallel Reaction Monitoring PMR 法」を開発して活用した。またポリユビキチン鎖の新規高親和性プローブ「TR-Tube」を作製し、細胞内のユビキチン化基質の網羅的解析法を開発した。さらに「TR-Tube」と定量的な高分解能質量分析計解析と組み合わせた分析からポリユビキチン鎖の長さを測定する方法「Ub-ProT 法」を開発した。

#### 4. 研究成果

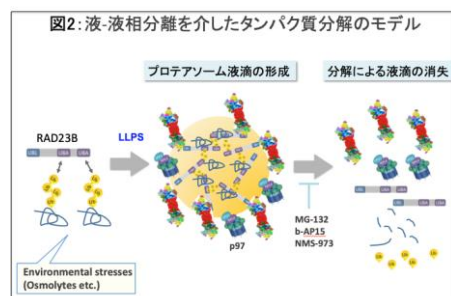
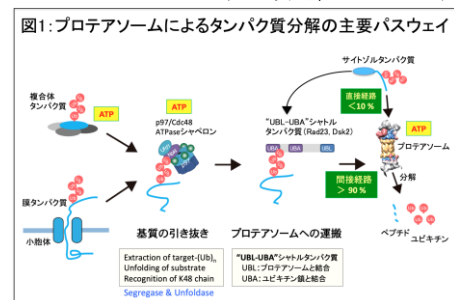
##### (1) プロテアソームに関する包括的基盤研究

26S プロテアソームにはユビキチンを識別して捕捉するリセプターが三種 (Rpn1・Rpn10・Rpn13) 存在する。これらの役割を解明する目的で、酵母の大部分 (14 種) のユビキチンシグナルのデコーダー分子である UBDs (ユビキチン相互作用タンパク質) に結合したユビキチン鎖を、超高感度質量分析装置 (LC-MS/MS) により、網羅的に解析した。その結果、90%以上のユビキチン化タンパク質が Rad23 や Dsk2 などの UBL (プロテアソームと結合) - UBA (ユビキチン鎖と結合) シャトル分子によって、プロテアソームに運搬されること、さらにその上流に CDC48/p97 ATPase シャペロンが存在し、その cofactor である Npl4 によって K48 ユビキチン鎖の分解選択性が規定されているという新規分解パスウェイ (図 1 参照) の存在を明らかにした (Mol. Cell 2017)。細胞内には大量に存在するユビキチン K48 鎖や K63 鎖以外に K48-K63 分岐鎖がかなりの量で存在し、枝分かれした (K48-K63 分岐型) ユビキチン鎖が、NF- $\kappa$ B のシグナル伝達を正に制御していること (Mol. Cell 2016)、そして K48-K63 分岐型ユビキチン鎖が、プロテアソーム依存性のタンパク質分解に関与しているという予想外の作用を発見した

(PNAS 2018)。また細胞内のユビキチン鎖の長さを測定する手法を開発し、Ub-ProT 法と命名した。本方法により、基質タンパク質に付加したユビキチン鎖の長さが、通常 2~7 重鎖であり、ユビキチン選択的シャペロンである p97 ATPase 複合体が細胞内のユビキチン鎖長制御に関与することを明らかにした (Nat. Commun. 2018)。

これまでの研究から、プロテアソームは出芽酵母の核と細胞質に各々 1  $\mu$ M と 100 nM の濃度で均一に拡散して存在することを見出した (Nat. Commun. 2014)。さらに最近研究代表者らは、プロテアソームが環境ストレスに応答して細胞質と核において急速に凝縮して、特異的な顆粒を形成することをヒト培養細胞で発見した。即ち、エネルギーが低下 (ATP 枯渇ストレス) すると、大部分のプロテアソームが、分~時間単位に細胞質で集積し、多数のサイトゾル顆粒 PSG (Proteasome Storage Granule) を、そしてアミノ酸

飢餓や高浸透圧ストレス下では、秒単位で多数の小さな (~500 nm) 核内顆粒 P-Foci (Proteasome Foci) を形成することを見出した。そしてプロテアソームのシャトル分子 RAD23B とポリユビキチン鎖が液-液相分離 (LLPS) を引き起こすこと、そしてその結果、形成されたプロテアソーム顆粒が液滴 (メンブレンレスオルガネラ) として、核内におけるタンパク質分解のセンターであることを明らかにした (Nature 2020)。これは既存の概念を覆す全く新規なプロテアソームの作動機構として世界に衝撃を与えた (図 2)。

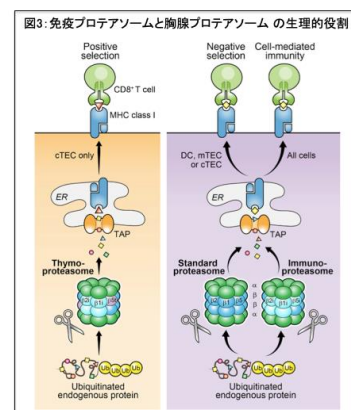


### (2) 生理病態学 1 : 分子病態研究 (パーキンソン病に関する研究)

常染色体劣性若年性遺伝性パーキンソン病の原因遺伝子産物である PINK1 (タンパク質リン酸化酵素) と Parkin (ユビキチン連結酵素) による不良ミトコンドリアのマイトファジーによる品質管理機構を解明、膜電位が低下した不良ミトコンドリアの累積が引き起こすパーキンソン病の発症機構解明にほぼ成功した。即ち、PINK1 が Parkin とユビキチンの両者をリン酸化するキナーゼであること、リン酸化ユビキチンが Parkin の活性化因子であること (Nature 2014)、活性化された Parkin の触媒・形成する“異常ミトコンドリア上のリン酸化ユビキチン鎖”が Parkin 受容体であること (J. Cell Biol. 2015) などを明らかにした。実際、Parkin の活性化機構をリン酸化ユビキチンの Site-specific interaction mapping 法で解明した (J. Biol. Chem. 2015)。これらの知見に基づき PINK1 と Parkin によるミトコンドリアのユビキチン修飾が positive-feedback cycle で急速に進行することを明らかにした (総説 EMBO J 2016)。さらに PINK1-Parkin 依存性のマイトファジー経路において Rab (GTP-GDP) サイクルが関係していることを見出した (Elife 2018)。加えて家族性パーキンソン病の責任遺伝子 PINK1 の X 線構造解析にも成功した (Sci. Rep. 2018)。またミトコンドリア外膜に局在する脱ユビキチン化酵素 Usp30 の構造解析に成功し、マイトファジーの可逆的な制御機構を分子レベルで解明した (Nat. Struct. Mol. Biol. 2017)。

### (3) 生理病態学 2 : 分子免疫研究 (免疫型プロテアソームの研究)

我々は、プロテアソームに分子多様性があり、標準 (構成型) 酵素以外に触媒サブユニットが変換した免疫プロテアソーム (Science 1994) と胸腺プロテアソーム (Science 2007) が存在することを世界に先駆けて発見した。その後、これらの機能変換した亜型酵素に関する膨大な研究から、前者は細胞性免疫の始動反応に、そして後者はキラー (細胞傷害性) T 細胞の「正の選択: Positive Selection: 有用な T 細胞の生存」によるレパトア形成に必須な役割を果たしていることを明らかにした (図 3 参照) (総説 Nat. Immunol. 2018)。実際、胸腺プロテアソームは皮質上皮細胞 cTEC の MHC I との相互作用によっては CD8+(キラー) T 細胞の正の選択を行うことができるが、殆どの免疫プロテアソームは関与しないことを明らかにした。プロテアソームは MHC クラス I 結合ペプチド産生の主要酵素であることから、両プロテアソームにより産生・提示される MHC I 結合ペプチドの性質の違いが正の選択の実態であると想定される。そこで免疫プロテアソームと胸腺プロテアソームのみを発現している細胞を作出、質量分析機を駆使して、それらの MHC I 結合ペプチドを網羅的に同定して胸腺プロテアソームが免疫プロテアソームとは異なる特徴を有するペプチドを産生することを明らかにした。そして既知の正の選択モデル (OT-I TCRTg) マウスを用いて、胸腺プロテアソーム産生ペプチドの特徴を導入した改変ペプチドの効果を検証した結果、胸腺プロテアソームは TCR (T 細胞受容体) と低親和性 MHC I ペプチドを産生することにより正の選択を促進することを示唆する結果を得た (Nat. Commun. 2015)。また胸腺プロテアソーム遺伝子 ( $\beta 5t$ ) と免疫プロテアソーム ( $\beta 1i$ ,  $\beta 2i$ ,  $\beta 5i$ ) の 4 遺伝子を同時欠損させた変異マウスの解析から、胸腺プロテアソームのみならず免疫プロテアソームもその一部が胸腺皮質における CD8+T 細胞のレパトア形成に関与していることを見出した (Nat Immunol 2016)。さらに胸腺プロテアソーム  $\beta 5t$  の胸腺特異的な発現機構について、転写因子 Foxn1 が  $\beta 5t$  の cTEC 特異的な発現に関与していること突き止めた (Nat. Commun. 2017)。加えて胸腺プロテアソームが、CD8+T 細胞の生存を決定しているのみならず、CD8+T 細胞の機能の獲得、いわゆる教育 (TCR 応答性) に関与していることも突き止めた (Nat Immunol 2016)。そして胸腺プロテアソームのヒト SNP 解析による Variation とキラー T 細胞のレパトア形成について解析した (JCI Insight 2017)。



## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 75 件 : 全て査読あり)

- ① Yamano, K., Kikuchi, R., Kojima, W., Hayashida, R., Koyano, F., Kawawaki, J., Shoda, T., Demizu, Y., Naito, M., Tanaka, K., and Matsuda, N. Critical role of mitochondrial ubiquitination and the OPTN-ATG9A axis in mitophagy. **J. Cell Biol.** in press.
- ② Yasuda, S.,\* Tsuchiya, S.,\* Kaiho, A.,\* Guo, Q., Ikeuchi, K., Endo, A., Arai, N., Ohtake, F., Murata, S., Inada, T., Baumeister, B., Fernandez-Busnadiego, R., Tanaka, K. \*\*, and Saeki, Y. \*\* (2020) Stress- and ubiquitylation-dependent phase separation of the proteasome. **Nature** 578, 296-300 (\*co-1<sup>st</sup> authors, \*\*Corresponding authors) doi: 10.1038/s41586-020-1982-9.
- ③ Murata, S., Takahama, Y., Kasahara, M., and Tanaka, K. (2018) The immunoproteasome and thymoproteasome: functions, evolution, and human disease. **Nature Immunology** 19, 923-931. doi: 10.1038/s41590-018-0186-z
- ④ Tsuchiya, H., Ohtake, F., Arai, N., Kaiho, A., Yasuda, S., Tanaka, K.\*, and Saeki, Y.\* (2017) *In vivo* ubiquitin linkage-type analysis reveals that the Cdc48-Rad23/Dsk2 axis contributes to K48-linked chain specificity of the proteasome. **Mol. Cell** 66, 488 - 502. (\*Corresponding authors) doi: 10.1016/j.molcel.2017.04.024.
- ⑤ Koyano, F., Okatsu, K., Kosako, H., Tamura, Y., Go, E., Kimura, M., Kimura, Y., Tsuchiya, H., Yoshihara, H., Hirokawa, T., Endo, T., Fon. E.A., Trempe, J. F., Saeki, Y., Tanaka, K.\*, and Matsuda, N.\* (2014) Ubiquitin is phosphorylated by PINK1 to activate parkin. **Nature** 510, 162 - 166. (\*Corresponding authors) doi: 10.1038/nature13392.

[学会発表] (計 64 件)

- ① Keiji Tanaka : The proteasome : Stress and phase separation. NIH-Japan-JSPS Symposium: Symposium Theme: Inflammation. Lipsett Amphitheater, Bethesda, Maryland, United States (October 28<sup>th</sup> ~ 29<sup>th</sup>, 2019)
- ② Keiji Tanaka : Thymoproteasome: The key player in positive selection of CD8+ T cells. The 7<sup>th</sup> Proteasome and Autophagy Workshop at Clermont-Ferrand, France (April 6 - 8, 2016)
- ③ Keiji Tanaka : Basic mechanisms and physiopathological roles of eukaryotic proteasomes. Karolinska Research Lecture at Nobel Forum, Stockholm, SWEDEN (September 18<sup>th</sup> 2014)

[図書] (計 6 件)

- ① 田中啓二、若槻壮市 (編集) 「構造生命科学からトランススケール・イメージングによる細胞動態学へ」 実験医学増刊号 38, 1-241, 2020 年 (240 頁) 羊土社 ; 「はじめに・構造生物学から構造生命科学、そして構造イメージング時代のトランススケール計測へ」 1-2 (田中啓二、若槻壮市)、おわりに・構造生命科学の発展と将来展望 236-241 (田中啓二)
- ② 田中啓二 (編集) : 「プロテアソームと疾病研究の動向」 Medical Science Digest 2019 年 4 月号 591, 5-39, 2019 (35 頁) ニューサイエンス社 ; 総論 「プロテアソームの基礎と病態生理」 19-20 (田中啓二)
- ③ 田中啓二 (編纂) : 「蛋白質代謝医学～構造・機能の研究から臨床応用まで」 医学の歩み (第 5 土曜特集) 267, 883-1179, 2018 : (35 頁) 医歯薬出版 ; 「序文」 883 (田中啓二)
- ④ 田中啓二、若槻壮市 (編集) 「構造生命科学で何がわかるか、何ができるか」 実験医学増刊 32, 1-230, 2014 年 (230 頁) 羊土社 ; 「総論 1 構造解析がもたらした生命科学の新しいインパクト : A New Impact of Structural Biology in Life Science」 1-10 (田中啓二)

[産業財産権]

- 出願状況 (計 1 件)

名称 : METHOD FOR IDENTIFYING POLYUBIQUITINATED SUBSTRATE

発明者 : Yukiko Yoshida Yasushi Saeki Hikaru Tsuchiya Arisa Murakami Keiji Tanaka

権利者：公益財団法人東京都医学総合研究所  
種類：特許  
番号：特許願 15/035357 号  
出願年：2014  
国内外の別：US（国外）

○ 取得状況（計 3 件）

名称：METHOD FOR DETERMINING UBIQUITIN CHAIN LENGTH  
発明者：Yasushi Saeki Hikaru Tsuchiya Ai Kaiho Keiji Tanaka  
権利者：公益財団法人東京都医学総合研究所  
種類：特許  
番号：9891229  
出願年：2014  
国内外の別：US（国外）

名称：METHOD FOR IDENTIFYING POLYUBIQUITINATED SUBSTRATE  
発明者：Yukiko Yoshida Yasushi Saeki Hikaru Tsuchiya Arisa Murakami Keiji Tanaka  
権利者：公益財団法人東京都医学総合研究所  
種類：特許  
番号：3070176  
出願年：2014  
国内外の別：英、仏、独（国外）

〔その他〕

<http://www.igakuken.or.jp/pro-meta/>  
<http://www.igakuken.or.jp/project/detail/ubiquitin.html>  
<http://www.f.u-tokyo.ac.jp/~tanpaku/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：村田 茂穂  
ローマ字氏名：(MURATA, shigeo)  
所属研究機関名：東京大学  
部局名：薬学研究科（研究院）  
職名：教授  
研究者番号（8桁）：20344070

### (2) 研究分担者

研究分担者氏名：棚橋 伸行  
ローマ字氏名：(TANAHASHI, nobuyuki)  
所属研究機関名：鈴鹿医療科学大学  
部局名：保健衛生学部  
職名：准教授  
研究者番号（8桁）：30511927

### (3) 研究協力者

研究協力者氏名：小松 雅明  
ローマ字氏名：(KOMATSU, masaaki)

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。