

平成 30 年 5 月 24 日現在

機関番号：82609

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26293018

研究課題名(和文) プロテアソーム核内スペckルの形成機構と生理的意義

研究課題名(英文) Formation mechanism and physiological significance of proteasome speckle

研究代表者

佐伯 泰 (SAEKI, Yasushi)

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・副参事研究員

研究者番号：80462779

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,000,000円

研究成果の概要(和文)：プロテアソームは選択的タンパク質分解によりタンパク質恒常性の維持に中心的な役割を果たしているが、核内のタンパク質品質管理機構は不明である。我々はプロテアソームが高浸透圧ストレスによりわずか数秒で核内にfociを形成することを見出した。このfociはK48結合ユビキチン化タンパク質、p97、および複数のプロテアソーム結合タンパク質を含む可逆性の新規構造体であり、そのクリアランスにはプロテアソーム活性、p97およびRAD23Bが必要であった。基質を探索したところリボソームタンパク質が同定されたことから、リボソームの組み立てプロセスが高浸透圧ストレスに対して脆弱であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The proteasome is the primary proteolytic machinery in cells and thus is a central regulator of the proteostasis network, but protein quality control (PQC) in the nucleus is largely unknown. Using EGFP knock-in cell lines of the proteasome subunit, we find that hyperosmotic stress induces rapid formation of nuclear foci of proteasomes within a few seconds. The foci are reversible structure that contains K48-linked ubiquitylated proteins, p97, and multiple proteasome-interacting proteins. The foci formation is dependent on ubiquitylation and their clearance requires active proteasomes, p97, and RAD23B, suggesting that this structure is a novel nuclear proteolytic center for adapting to nuclear stress. We identified ribosomal proteins as major ubiquitylated substrates that degraded in the foci, suggesting that the assembly process of the ribosome is vulnerable to hyperosmotic stress. Collectively, we identified the p97-RAD23B axis and the proteasome as a nuclear PQC pathway.

研究分野：生化学

キーワード：プロテアソーム ユビキチン タンパク質分解 リボソーム タンパク質品質管理

1. 研究開始当初の背景

プロテアソームは、ユビキチン化された不要タンパク質を選択的に分解することで、タンパク質恒常性の維持に中心的な役割を果たしている。この10年ほどでプロテアソームの構造解析と作動機構、形成機構に関して研究が大きく進展したが、プロテアソームの細胞内動態とその機能に関する研究は世界的に大きく立ち遅れている。また、細胞質のタンパク質品質管理やオルガネラ分解の機構は次々と明らかになってきたが、核内のタンパク質分解については不明な点が多い。

2. 研究の目的

我々はプロテアソーム可視化細胞を用いた動態解析の過程で、高浸透圧ストレス刺激によりプロテアソームが核内に小さな foci (プロテアソームスペックルと命名) を形成することを発見した。スペックル形成は可逆的であり、ストレスが解消されるとプロテアソームは再び核内に分散する。本研究では新規の核内構造体であるプロテアソームスペックルの形成機構とその生理的意義を解析することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) プロテアソームスペックルの細胞生物学的解析：プロテアソームサブユニット EGFP-3xFLAG タグノックイン細胞を用いて高浸透圧ストレス刺激時の動態や性状を生細胞タイムラプスイメージングや電子顕微鏡により解析する。次いで、プロテアソーム阻害剤等の各種阻害剤を用いてプロテアソームスペックル動態の変動を解析する。

(2) プロテアソームスペックル構成因子の同定・機能解析：プロテアソームサブユニット EGFP-3xFLAG タグノックイン細胞を用いて高浸透圧ストレス刺激時と未刺激時のプロテアソーム結合タンパク質を質量分析計 (MS) により相対定量解析する。候補分子の局在解析と siRNA ノックダウンあるいはノックアウトにより、プロテアソームスペックル形成における機能解析を実施する。

(3) プロテアソームスペックルに集積するユビキチン化基質の同定：ユビキチン鎖の高親和性プローブ TR-TUBE と抗ユビキチン化ペプチド抗体を用いて高浸透圧ストレス刺激により変動するユビキチン化基質を質量分析により網羅的に同定する。

上記の解析により、プロテアソームスペックルの形成機構と形成の生理的意義を明らかにする。

4. 研究成果

(1) プロテアソームスペックルの細胞生物学的解析

プロテアソームは通常、核質と細胞質に存

在するが、我々は 0.2 M スクロースや 50 mM NaCl による高浸透圧刺激によりプロテアソームが数秒で核内に多数の foci を形成することを見出した。なお、この foci はプロテアソームサブユニット EGFP ノックイン細胞だけではなく内在性のプロテアソーム抗体による免疫染色でも観察された (図 1)。

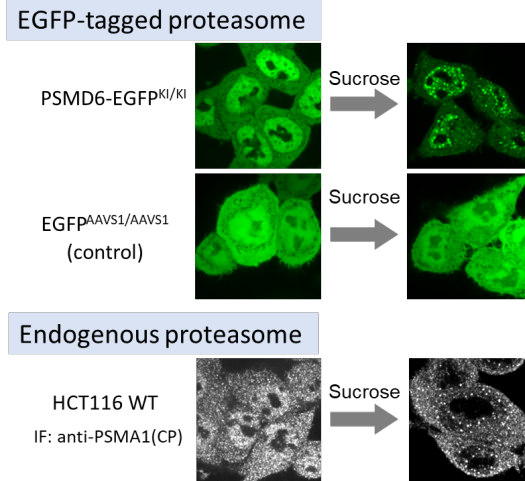


図 1 高浸透圧刺激によるプロテアソームスペックル形成

このプロテアソーム foci はユークロマチン領域に形成し、PML ボディーや Cajal ボディーなどの既知の核内ボディーとは共局在しないが、ユビキチン (特に K48 結合ユビキチン鎖) を含有する新規の核内構造体である (図 2)。

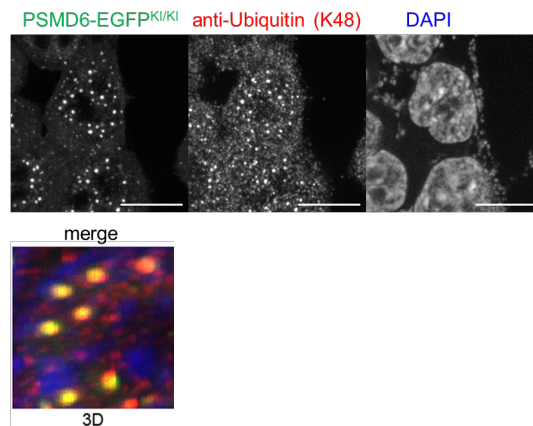


図 2 プロテアソームスペックルはユビキチン化基質を含有する

プロテアソーム foci は可逆的な構造体であり、高浸透圧刺激後数秒で形成し、5 分後まで数が増加した後、3 時間ほどで消失する。このプロテアソーム foci はユビキチン活性化酵素 E1 の阻害剤存在下では形成しないため、ユビキチン化基質がまず凝集し、プロテアソームが集積することが示唆された。また、foci のクリアランスにはプロテアソーム阻害またはユビキチン選択的シャペロン p97 の阻害により遅延したため、p97 による抽出とプロテアソーム依存的分解が必要であり、核内におけるユビキチン化タンパク質の分解の場

を可視化していることが示唆された (図 3)。

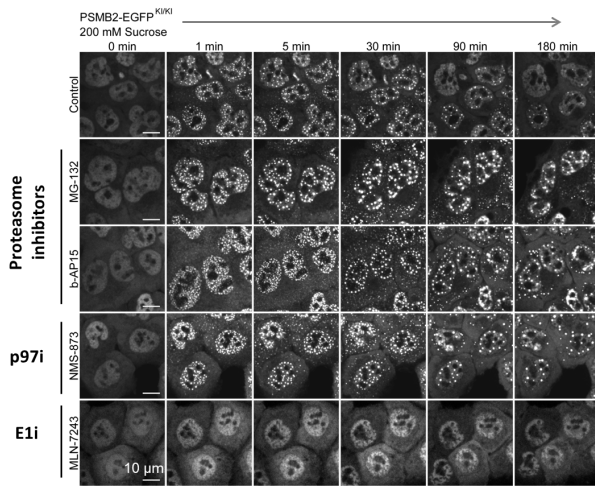


図 3 各阻害剤によるプロテアソームスペックル動態の変動

また、FRAP 解析により、プロテアソームおよびユビキチンはスペックル構造に比較的自由に出入りしていることが明らかとなった (データ未提示)。

(2) プロテアソームスペックル構成因子の同定・機能解析

プロテアソームスペックルの構成因子を同定するため、低ホルマリン架橋下でプロテアソームを免疫沈降し、質量分析解析を行った。その結果、ユビキチン化基質をプロテアソームに運搬する RAD23B やプロテアソームと結合するユビキチンリガーゼ UBE3A、ユビキチン選択的シャペロン p97 など多数の結合分子が同定された (図 4)。これらの分子は核質に多く存在し、浸透圧刺激によりプロテアソームスペックルに局在化することが明らかとなった (データ未提示)。

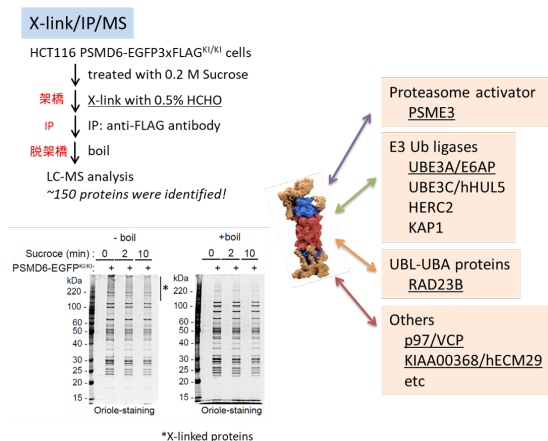


図 4 架橋/質量分析解析によるプロテアソームスペックルの構成因子の同定

次いで、siRNA ノックダウン解析を行ったところ、RAD23B または UBE3A ノックダウン細胞において、プロテアソームスペックルの形成が有意に阻害された (図 5)。このこと

から、プロテアソームスペックルはユビキチン化基質の凝集が先に起こり、シャトル分子である RAD23B を介してプロテアソームが集積することが明らかとなった。プロテアソーム結合型のユビキチンリガーゼ UBE3A の役割は不明であるが、プロテアソーム機能の制御あるいは凝集性タンパク質のさらなるユビキチン化が想定された。

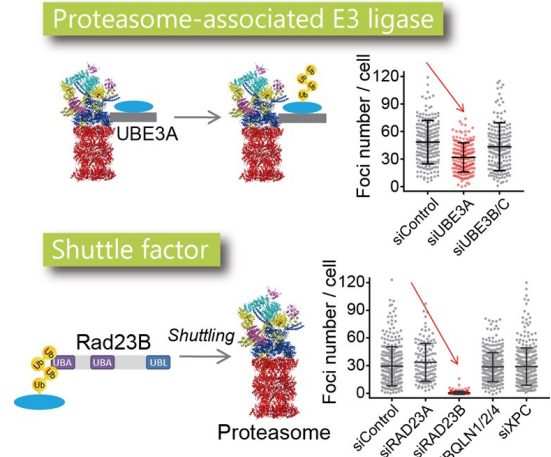


図 5 RAD23B と UBE3A はプロテアソームスペックルの形成に関与する

(3) プロテアソームスペックルに集積するユビキチン化基質の同定

高浸透圧刺激により変動するユビキチン化基質を質量分析計を用いて解析したところ、複数のリボソームタンパク質が同定された。そこで、電子顕微鏡により細胞を観察したところ、興味深いことにリボソーム形成の場である核小体内部の DFC 構造が高浸透圧刺激により消失し、核質に高密度凝集体が出現することが明らかとなった (図 6)。リボソームは核内で複雑な過程を経て組み立てられ、かつ膨大な量が合成されるため (毎分 1000 分子以上)、形成に失敗したリボソーム前駆体あるいは複合体取り込みに失敗したオーファンサブユニットが核内タンパク質分解の主要な基質であると考えられる。

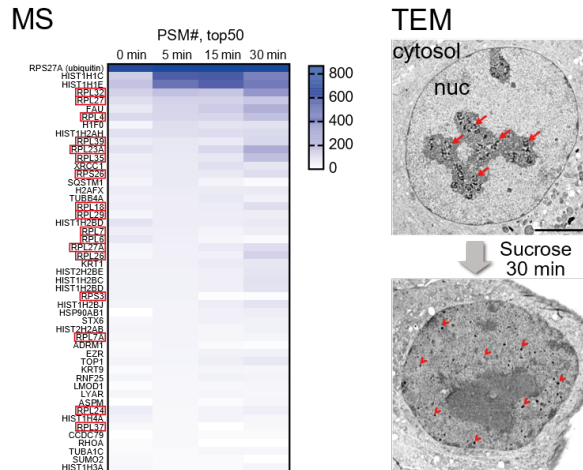


図 6 ユビキチン化基質の網羅的同定と電子顕微鏡解析

そこで、EGFP 融合リボソームサブユニット安定発現細胞を用いて生細胞タイムラプスイメージング解析を行ったところ、高浸透圧ストレスにより核質に凝集体を形成し、プロテアソームと共局在すること、プロテアソームスペックル内で分解されることが確認された (図 7)。

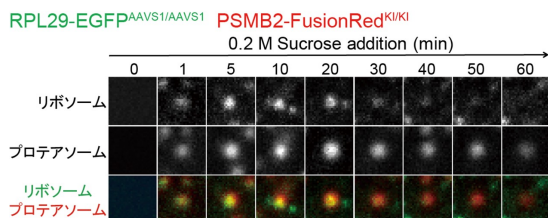


図7 プロテアソームスペックルにおけるリボソームサブユニットの分解

これらの結果より、プロテアソームスペックルは核内タンパク質分解の場であり、プロテアソームが p97 と RAD23B と連携して易凝集性タンパク質を分解除去するという機構が示唆された。そしてリボソームタンパク質が主要な基質であることを明らかにした。今後、本知見をもとに、核内タンパク質の品質管理を担うユビキチンリガーゼを探索すると共に、動物個体内でこのような現象が起こるか検討したい。

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 28 件)

- ① Tsuchiya, H., Burana, D., Ohtake, F., Arai, N., Kaiho, A., Komada, M., Tanaka, K., and Saeki, Y. Ub-ProT reveals global length and composition of protein ubiquitylation in cells. **Nature Commun.** 9, 524 (2018) 査読有
DOI: 10.1038/s41467-018-02869-x
- ② Saeki, Y. Ubiquitin recognition by the proteasome. **J. Biochem.** 161, 113-124 (2017) 査読有
DOI: 10.1093/jb/mvw091
- ③ Matsuo, Y., Ikeuchi, K., Saeki, Y., Iwasaki, S., Schmidt, C., Udagawa, T., Sato, F., Tsuchiya, H., Becker, T., Tanaka, K., Ingolia, N.T., Beckmann, R., and Inada, T. Ubiquitination of stalled ribosome triggers ribosome-associated quality control. **Nature Commun.** 8, 159 (2017) 査読有
DOI: 10.1038/s41467-017-00188-1
- ④ Tsuchiya, H., Ohtake, F., Arai, N., Kaiho, A., Yasuda, S., Tanaka, K., and Saeki, Y. 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 (2017) 査読有

DOI:10.1016/j.molcel.2017.04.024

- ⑤ Burana, D., Yoshihara, H., Tanno, H., Yamamoto, A., Saeki, Y., Tanaka, K., and Komada, M. Ankrd13 Family of Ubiquitin-interacting Motif-bearing Proteins Regulates VCP/p97-mediated Lysosomal Traffic of Caveolin-1. **J. Biol. Chem.** 291, 6218-6231 (2016) 査読有
DOI: 10.1074/jbc.M115.710707
- ⑥ Yoshida, Y., Saeki, Y., Murakami, A., Kawawaki, J., Tsuchiya, H., Yoshihara, H., Shindo, M., and Tanaka, K. A comprehensive method for detecting ubiquitinated substrates using TR-TUBE. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 112, 4630-4635 (2015) 査読有
DOI: 10.1073/pnas.1422313112

[学会発表] (計 14 件)

- ① 佐伯 泰 「p97 および RAD23 によるプロテアソーム分解制御」 ConBio2017 ワークショップ 2017 年
- ② 佐伯 泰, 土屋 光, 大竹史明, 田中啓二 「ユビキチン修飾の全容解明を目指して: Parallel Reaction Monitoring 法によるユビキチン鎖の超高感度絶対定量法の開発と応用」日本プロテオーム学会 2016 年大会 2016 年
- ③ 佐伯 泰 「Cdc48/p97-Rad23 軸がプロテアソーム分解の主要経路である」第 39 回日本分子生物学会年会シンポジウム 2016 年
- ④ 佐伯 泰 「ユビキチンネットワークの全容解明を目指して」日本生化学会関東支部例会 2015 年
- ⑤ Yasushi Saeki, Hikaru Tsuchiya, and Keiji Tanaka 「Ubiquitin chain selectivity of ubiquitin-binding proteins in yeast」EMBO conference 2015 年
- ⑥ 佐伯 泰 「ユビキチンコードの全容解明を目指して」日本農芸化学会 2015 大会シンポジウム 2015 年
- ⑦ 佐伯 泰 「プロテアソームの細胞内動態」第 19 回日本病態プロテアーゼ学会学術集会シンポジウム 2014 年
- ⑧ 佐伯 泰 「タンパク質分解装置プロテアソームの細胞内動態」第 21 回酵母合同シンポジウム 2014 年
- ⑨ 佐伯 泰 「プロテアソームの分子集合と動態に関する研究」日本生化学会 2014 年

[図書] (計 8 件)

- ① 佐伯 泰, 土屋光, 大竹史明, 田中啓二: 羊土社, 実験医学 2756-2763 (8 ページ) 2017 年
- ② 佐伯 泰: 科学評論社, 腎臓内科・泌尿器科 9 ページ 2016 年

- ③ 佐伯 泰：日本生化学会、生化学 18 ページ、2015 年

[その他]

ホームページ等

- ① 公益財団法人東京都医学総合研究所蛋白質代謝研究室ホームページ
<http://www.igakuken.or.jp/pro-meta/>
- ② ユビキチン鎖の長さを決定する方法を世界で初めて開発
<http://www.igakuken.or.jp/topics/2018/0206.html>
- ③ ユビキチン化基質がプロテアソームに運ばれる仕組み
<http://www.igakuken.or.jp/topics/2017/0519.html>
- ④ ライフサイエンス 新着論文レビュー
<http://first.lifesciencedb.jp/archives/16636>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐伯 泰 (SAEKI, Yasushi)
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・副参事研究員
研究者番号：80462779

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

安田さや香 (YASUDA, Sayaka)
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・研究員
研究者番号：80624353

海保 愛 (KAIHO, Ai)

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・研究補助員