

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：82609

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14958

研究課題名(和文)プロテアソームの核外輸送機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the mechanism for nuclear export of the proteasome

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) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：プロテアソームはユビキチン化タンパク質を選択的に分解することで様々な生命現象を制御している。プロテアソームは増殖中の細胞では主に核に局在化するが、定常期の酵母やカルシウムイオンフォアで刺激したヒト培養細胞では細胞質に移動する。この核外輸送はレプトマイシンBで阻害されないため、プロテアソームには専用の核外輸送担体が存在する可能性がある。本研究では、プロテアソームの細胞内局在を人為的に制御可能な細胞を作出し、半定量プロテオミクス解析すると共に遺伝学的な解析を試みた。その結果、核外輸送に伴い変動するプロテアソーム結合分子を多数同定することに成功し、核外輸送に欠損を示す変異体の取得に成功した。

研究成果の概要(英文)：The proteasome mainly localizes in the nucleus in proliferating cells, but it moves to the cytoplasm in human cultured cells stimulated with calcium ionophore and in yeast at stationary phase. Because this nuclear export was not inhibited by leptomycin B, unidentified dedicated exportin for the proteasome might exist in these cells. In this study, we first generated yeast cells that capable of artificially controlling intracellular localization of the proteasome. Then, using the above phenomenon and cells, proteasome interacting proteins were analyzed by a quantitative mass spectrometry. As a result, we identified a number of known and novel proteasome interacting proteins that change upon nuclear export of the proteasome. In addition, we obtained six mutants that are defective in nuclear export of the proteasome. Further analysis of these factors will uncover the molecular mechanism of nucleocytoplasmic transport of the proteasome.

研究分野：生化学

キーワード：細胞内タンパク質分解 プロテアソーム ユビキチン 細胞質核間輸送 質量分析計

### 1. 研究開始当初の背景

プロテアソームは、ユビキチンが付加された標的タンパク質を選択的に分解することで、不要タンパク質のクリアランス、細胞周期の進行、シグナル伝達など、細胞内における様々な生命現象の制御に中心的な役割を果たしている。近年、プロテアソームの作動機構、形成機構に関する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。そこで、我々は酵母およびヒト培養細胞をモデル系として、プロテアソームの細胞内動態を分子細胞生物学的に解析してきた。その結果、プロテアソームは極めて動的な分子であり、細胞質核間を複合体として行き来していること、種々のストレスに応じて細胞質性の顆粒構造や核内 foci を形成することなどがわかってきた。しかしながら、プロテアソームの細胞質核間輸送の機構、特に核外輸送機構については全く不明である。

### 2. 研究の目的

プロテアソームは増殖中の細胞では主に核に局在化し、核内のプロテアソーム活性は細胞の増殖に必須である。出芽酵母では培地中の炭素源が枯渇すると、プロテアソームは細胞質に移動し顆粒を形成することが知られている。我々は、ヒト培養細胞をカルシウムイオノフォアで刺激するとプロテアソームが迅速に核外に輸送されることを見出した(未発表)。いずれもレプトマイシン B 処理により阻害されないため、プロテアソームにはリボソームのように専用の核外輸送担体が存在する可能性がある(未発表)。そこで本研究は、上記の現象を利用してプロテアソームの核外輸送の分子機構を明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

本研究ではプロテアソームの核外輸送機構を解明すべく以下の解析を実施する。ヒト培養細胞および酵母を用いてプロテアソーム結合タンパク質の定量プロテオミクス解析を行うと共に、酵母を用いた各種遺伝学スクリーニングにより、プロテアソーム専用エクスポーティンを探索する。次いで、動物培養細胞および酵母においてエクスポーティン候補分子の変異体を作製し、プロテアソーム局在に影響を与えるか解析する。

- (1) 定量プロテオミクス解析によるプロテアソーム専用エクスポーティンの探索
- (2) 酵母遺伝学スクリーニングによるプロテアソーム核外輸送関連因子の探索
- (3) プロテアソーム専用エクスポーティン候補分子のノックアウト細胞の作製と表現型解析

### 4. 研究成果

- (1) プロテオミクス解析  
ヒト培養細胞ではカルシウムイオノフォ

ア刺激、酵母で培養条件によりプロテアソームの核外移行が観察される(図1)。そこで、プロテアソームサブユニットに EGFP と FLAG タグをノックインしたヒト培養細胞、出芽酵母を用いて、まずプロテアソーム相互作用因子の探索を行った。経時的に解析するため、細胞を低濃度ホルマリンにより固定し、それらよりプロテアソームを免疫沈降し、相互作用する分子を半定量プロテオミクス解析(X-link/IP/MS)により解析した。

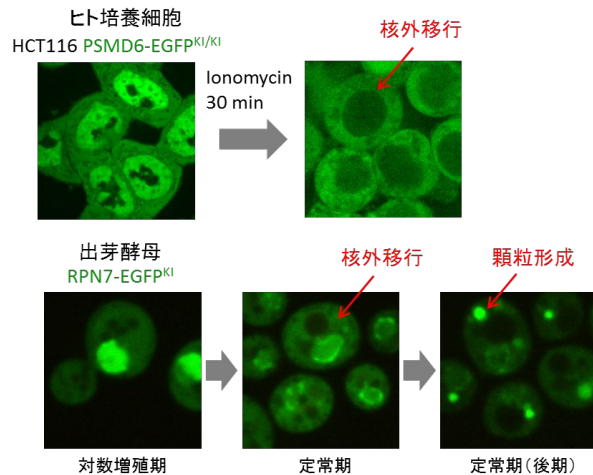


図1. プロテアソームの核外移行

その結果、プロテアソーム活性化因子 PA200 (酵母では BLM10) や安定化因子 ECM29 (Ecm29)、脱ユビキチン化酵素 USP14 (Ubp6)、ユビキチンリガーゼ UBE3C (Hul5) など既知のプロテアソーム結合分子が核外移行に伴い減少することがわかった。しかし、これらの分子はいずれも核に豊富に存在する分子であり、酵母や培養細胞で遺伝子破壊あるいは siRNA ノックダウンをし、プロテアソームの細胞内局在を解析したが、残念ながらプロテアソームの核外移行に影響しなかった。よって、これらの分子は単に核内プロテアソームの制御因子である可能性が示唆された。

#### (2) 酵母遺伝学的スクリーニング

出芽酵母遺伝子ノックアウトライブラリーを用いて休止期のプロテアソーム細胞質顆粒形成能が低下する株の探索を行ったところ、脂質代謝酵素、細胞壁合成、転写因子、cAMP 経路の制御因子など多岐にわたる 35 遺伝子が同定された。これらの遺伝子欠失株中ではプロテアソームの細胞質顆粒形成不全が再現性良く観察されるが、対数増殖期におけるプロテアソームの核局在には影響せず、また、経時的観察においても核外輸送遅延等は観察されなかった。

#### (3) 酵母アンカーアウェイ株を用いた遺伝学的スクリーニング

FKBP タグおよび FRB タグを用いて、ラマイシン依存的にプロテアソームを核から細胞質に輸送できるアンカーアウェイ株を

作製済みである。プロテアソームの核局在は細胞増殖に必須であるため、これを利用しEMS 処理によりラパマイシン存在下でも増殖できる突然変異復帰体の取得を試みた。約48 万クローンから、62 株の突然変異復帰体を取得し、蛍光顕微鏡を用いた2 次スクリーニングより最終的に6 株を得た( 図2 )。これらの突然変異復帰体ではラパマイシン依存的にプロテアソームが核膜内側に蓄積したため、プロテアソームの核外輸送に関与する遺伝子の変異が想定される。しかし、アンカーアウェイ株は戻し交配等が困難であったため、今後、全ゲノムシーケンスにより、変異遺伝子を直接同定する。

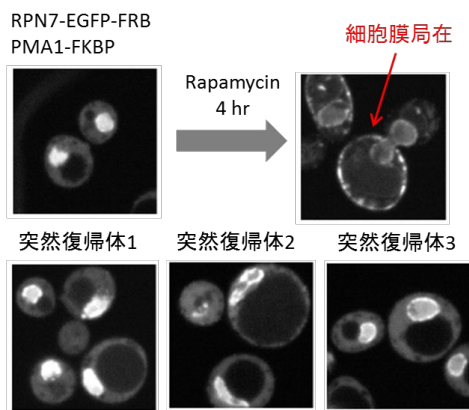


図 2. アンカーアウェイ株の突然変異復帰体の取得

#### (4) インポート結合タンパク質 Sts1 を用いた解析

酵母 Sts1 はインポート  $\alpha$  およびプロテアソームと直接相互作用し、プロテアソーム核移行のアダプター分子として機能する。STS1 遺伝子は必須遺伝子であるため、染色体上の STS1 遺伝子のプロモーターをガラクトースプロモーターに置き換えた株 ( GAL1pr-STS1 ) を新たに作製し、プロテアソーム局在を迅速に制御する系を作出した。Sts1 発現のオン・オフに伴い、2 時間以内にプロテアソーム局在を核、細胞質にそれぞれ変化させることが可能である。本株を用いて、X-link/IP/MS 法により、プロテアソームの相互作用分子をさらに探索した。なお、プロテアソームのサブ複合体 19S lid、base、20S CP の各サブユニットを bait としてそれぞれ解析した。その結果、全てのサブ複合体に共通して変動する分子として PA200 や ECM29 などが( 1 )と同様に同定された他、機能未知の新規結合タンパク質を同定した( 図3 )。データベースより、本タンパク質は cAMP-PKA シグナル伝達経路に関与していること、プロテアソームサブユニットと直接相互作用することが示唆されており、プロテアソーム制御因子である可能性が高い。今後、本分子に焦点を絞り解析する。

本研究で作出した様々なツール、確立した

種々の解析法は、プロテアソームの細胞質・核間輸送の解析に有用と考えられるため、引き続き解析を実施することで、プロテアソーム専用エクスポーティンの探索を試みる。

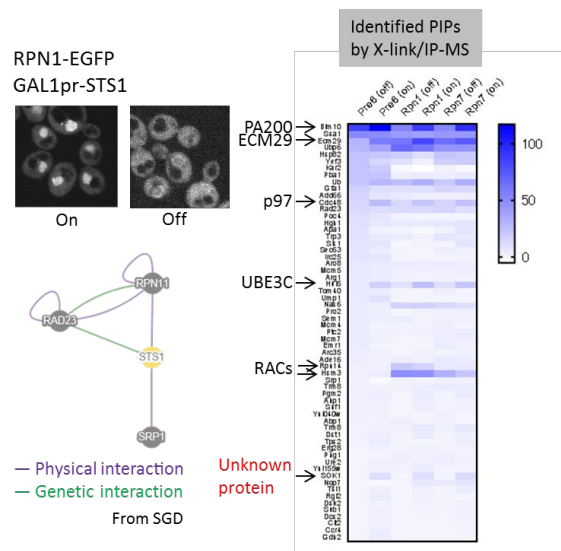


図 3. GAL1pr-STS1 株を用いた解析

#### 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 2 件 ) 全て査読あり

1. 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)  
doi:10.1016/j.molcel.2017.04.024
2. Saeki, Y. Ubiquitin recognition by the proteasome. *J. Biochem.* 161, 113-124 (2017)  
doi: 10.1093/jb/mvw091

[ 学会発表 ] ( 計 1 件 ) 招待講演のみ

1. 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シンポジウム、2016 年 12 月 1 日、パシフィコ横浜 ( 神奈川県横浜市 )

[ 図書 ] ( 計 1 件 )

1. 佐伯 泰 : 「プロテアソームの作動機構と細胞内動態」生化学 87 巻( 6 号 ) 705-722、2015

[ 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

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

## 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：24112008