

令和元年5月12日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08228

研究課題名(和文)新規ユビキチン結合タンパク質によるタンパク質凝集体形成・細胞毒性抑制機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of the mechanism of the degradation of aggregation prone proteins by a novel ubiquitin binding protein CG5445

研究代表者

濱崎 純 (Hamazaki, Jun)

東京大学・大学院薬学系研究科(薬学部)・助教

研究者番号：80533588

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：ユビキチン・プロテアソームシステム(UPS)は多様な生命現象の進行に必須な細胞内タンパク質分解系であり、神経変性疾患ではユビキチン陽性の封入体や凝集体が観察され、UPSの破綻が細胞の恒常性維持や病態発症に深く関与すると考えられている。申請者らは本課題により新規ユビキチン結合タンパク質CG5445を同定し、CG5445は易凝集性タンパク質の可溶化を促進しUPSによる分解を促進し細胞毒性を抑制していることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体内における不要タンパク質除去に働く分解系のうち、ユビキチン-プロテアソーム系が凝集性タンパク質の分解にどのように働くかについては長い間様々な仮説が提唱されているものの、実態は不明であった。本課題において易凝集性タンパク質分解においてプロテアソーム機能を促進する分子としてCG5445を同定したことにより、プロテアソームが神経変性疾患をはじめとする病態発症に関与する分子機構の解明に大きな進歩をもたらすと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Ubiquitin-proteasome system (UPS) plays essential role in eukaryotes. Since ubiquitin including aggregates are observed in neurodegenerative diseases, disruption of UPS are considered to participate in pathogenic mechanism. We identified CG5445 as a novel ubiquitin binding protein. We clarify CG5445 plays a role in degradation of ubiquitinated aggregation-prone proteins to decrease their cytotoxicity until they are degraded.

研究分野：タンパク質分解

キーワード：プロテアソーム ユビキチン タンパク質分解

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ユビキチン-プロテアソームシステム(UPS)は真核細胞内の主要なタンパク質分解系として広く知られ、これまでにユビキチン化機構に関する研究の著しい発展によりその理解が飛躍的に進んだ。また、UPSの厳密な制御が生理的な恒常性維持に重要であることがこれまで様々な知見から得られている。また、がん細胞ではプロテアソーム発現の亢進が観察される一方、神経変性疾患などの病態発症の原因のひとつにプロテアソーム機能の減弱が指摘されていることからUPS機能制御の理解が病態予防・改善に効果的であると期待される。従来、UPS研究の主流は酵母による遺伝学・生化学を駆使したものであったが、最近では哺乳類が持つ、酵母に比べ多様かつ複雑なUPS制御機構が高次生命機能の発揮に必須であることが明らかとなっている。しかしながら、UPSの多様な構成因子や、プロテアソームと物理的に会合し機能を修飾する機能修飾因子それぞれの役割について明瞭に理解されたとはいいがたく、哺乳類UPSの本質的な分子機構の理解が急がれる。

申請者らはプロテアソーム機能調節因子の遺伝学的探索から新規ユビキチン結合因子としてCG5445を同定した。これまでの検証から、CG5445はUPSの働きをジェネラルに亢進させるわけではなく、特定のタンパク質、特に易凝集性タンパク質をUPSに向かわせる調節を行うと想定した。

ミスフォールドタンパク質やストレスなどにより変性したタンパク質は分子シャペロンやUPS、オートファジーによってリフォールディングや分解されることが知られている。しかしながら、細胞内易凝集性タンパク質の凝集体形成・可溶化、ユビキチン化、分解の詳細な分子機構は未だ十分には明らかにされていない。そこで本研究では、HUIPによる易凝集性タンパク質の分解調節機構の生理的意義を明確にし、病態に深く関与する基質の分解機構について新たな概念を提供することを目的とし、この新たな概念により細胞内恒常性維持機構のより深い理解を目指した。

2. 研究の目的

本研究計画では、CG5445の生理的役割と分子機構を解明することで病態に深く関与する易凝集性タンパク質分解調節機構について新たな概念を提供することを目的とし、具体的には以下の観点から研究を実施した。

- (1)HUIPによるユビキチン化タンパク質の凝集体形成・分解調節機構の解明
- (2)HUIPによる細胞毒性抑制効果の個体による検証

3. 研究の方法

本研究計画では易凝集性タンパク質の凝集体形成および細胞傷害性をHUIPが抑制する分子機構を解明するために、以下の観点から計画を実施した。

培養細胞によってHUIPの機能ドメインおよび相互作用因子会合領域を明らかにする。ショウジョウバエ病態モデルを用いてHUIPの病態抑制効果を検証するとともに、HUIP及び易凝集性タンパク質分解に協調して働く遺伝学的相互作用因子の探索も併せて行った。また、HUIP KO、TGマウスの解析より、細胞およびショウジョウバエで確認された分子機構が哺乳類個体でも当てはまるのか検証した。

4. 研究成果

(a)CG5445によるユビキチン化タンパク質の凝集体形成・分解調節機構の解明

CG5445 とユビキチン化タンパク質の会合を確認し、CG5445 が易凝集性タンパク質の可溶性を上げる事でプロテアソームによる分解を促進することを明らかにした。

(b)CG5445 による細胞毒性抑制効果の個体による検証

CG5445 過剰発現ハエでは易凝集性タンパク質発現による病態を抑制する効果が観察され、CG5445 ノックダウンハエでは病態増悪化が観察され、分子機構から推測される病態への効果をハエ個体において明確に検証した。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 8 件)

- (1) Otsubo R, Mimura H, Ashida H, **Hamazaki J**, Murata S, Sasakawa C. (2018) Shigella effector IpaH4.5 targets 19S regulatory subunit RPN13 in the 26S proteasome to dampen cytotoxic T lymphocyte activation. *Cell Microbiol.* e12974.
- (2) Tomita T, Hirayama S, Sakurai Y, Ohte Y, Yoshihara H, Saeki Y, **Hamazaki J**, Murata S. (2018) Specific modification of aged proteasomes revealed by tag-exchangeable knock-in mice. **Mol Cell Biol.** 39 (1). e00426-18.
- (3) Wu W, Sahara K, Hirayama S, Zhao X, Watanabe A, **Hamazaki J**, Yashiroda H, Murata S. (2018) PAC1-PAC2 proteasome assembly chaperone retains the core 4- 7 assembly intermediates in the cytoplasm. **Genes Cells.** 23 (10): 839-848.
- (4) Uechi H, Kuranaga E, Iriki T, Takano K, Hirayama S, Miura M, **Hamazaki J**, Murata S. (2018) Ubiquitin-binding protein CG5445 suppresses aggregation and cytotoxicity of amyotrophic lateral sclerosis-linked TDP-43 in drosophila. **Mol Cell Biol.** 38 (3). e00195-17.
- (5) Jiang RT, Yemelyanova A, Xing D, Anchoori RK, **Hamazaki J**, Murata S, Seidman JD, Wang TL, Roden RBS. (2017) Early and consistent overexpression of ADRM1 in ovarian high-grade serous carcinoma. **J Ovarian Res,** 10 (1) 53.
- (6) Lu X, Nowicka U, Sridharan V, Liu F, Rndles L, Hymel D, Dyba M, Tarasov SG, Tarasova NI, Zhao XZ, **Hamazaki J**, Murata S, Burke TR Jr, Walters KJ. (2017) Structure of the Rpn13-Rpn2 complex provides insights for Rpn13 and Uch37 as anticancer targets. **Nat Commun.** 8: 15540.
- (7) Uddin MM, Ohigashi I, Motosugi R, Nakayama T, Sakata M, **Hamazaki J**, Nishito Y, Rode I, Tanaka K, Takemoto T, Murata S, Takahama Y. (2017) Foxn1-β5t transcriptional axis controls CD8+ T-cell production in the thymus. **Nat Commun.** 8: 14419.
- (8) Koizumi S, Irie T, Hirayama S, Sakurai Y, Yashiroda H, Naguro I, Ichijo H, **Hamazaki J**, Murata S. (2016) The aspartyl protease DDI2 activates Nrf1 to compensate for proteasome dysfunction. **Elife.** Aug 16; 5. e18357.

〔学会発表〕(計 19 件)

- (1) Tomohiro Iriki, Hidetaka Kosako, Jun Hamazaki, Shigeo Murata
In vivo analysis of the proteasome inhibitor protein PI31
The Proteasome hub: Fine-tuning of proteolysis according to cellular needs
Hohenkammer (Germany). 2018年2月12日

- (2)董瑶加、馬籠耕平、橋本永一、濱崎純、村田茂穂
ヒト全ゲノムスクリーニングによる哺乳類プロテアソーム機能制御因子の同定
第 41 回日本分子生物学会年会
パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)。2018 年 11 月 29 日
- (3)松浦昌太郎、濱崎純、平山尚志郎、村田茂穂
哺乳類プロテアソームの細胞内局在は mTOR 経路により制御される
第 41 回日本分子生物学会年会
パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)。2018 年 11 月 29 日
- (4)橋本永一、濱崎純、村田茂穂
The Glycolytic pathway is required for cell survival under modest proteasome impairment
第 17 回東京大学生命科学シンポジウム
安田講堂 (東京都文京区)。2017 年 4 月 15 日
- (5)Tomohiro Iriki, Eiichi Hasimoto, Shoshiro Hirayama, Jun Hamazaki, Shigeo Murata
The mechanism of cellular senescence induced by proteasome dysfunction
CIMR-UTokyo Symposium 2017
Cambridge (UK)。2017 年 9 月 18 日
- (6)Tomohiro Iriki, Eiichi Hasimoto, Shoshiro Hirayama, Jun Hamazaki, Shigeo Murata
The mechanism of cellular senescence induced by proteasome dysfunction
Graduate Programme in Leaders in Life Innovation Joint Symposium with University of Tokyo,
Edinburgh (UK)。2017 年 9 月 20 日
- (7)Tomohiro Iriki, Eiichi Hasimoto, Shoshiro Hirayama, Jun Hamazaki, Shigeo Murata
The mechanism of cellular senescence induced by proteasome dysfunction
Stockholm-Tokyo University Partnership, Living longer and healthier in an ageing world
Stockholm (Sweden)。2017 年 9 月 22 日
- (8)Tomohiro Iriki, Eiichi Hasimoto, Shoshiro Hirayama, Jun Hamazaki, Shigeo Murata
The mechanism of cellular senescence induced by proteasome dysfunction
KCL-Institute of Psychiatry, Psychology & Neuroscience - UT-GIPLLI Joint Symposium
London (UK)。2017 年 9 月 25 日
- (9)小泉峻、濱崎純、村田茂穂
プロテアソーム発現制御転写因子 Nrf1 の活性化機構
2017 年度生命科学系学会合同年次大会
神戸国際会議場 (兵庫県神戸市)。2017 年 12 月 7 日
- (10)高野滉平、小泉峻、濱崎純、村田茂穂
プロテアソーム転写因子 Nrf1 活性化に働く新規プロテアーゼ DDI2 阻害剤探索
2017 年度生命科学系学会合同年次大会
神戸国際会議場 (兵庫県神戸市)。2017 年 12 月 7 日
- (11)入木朋洋、橋本永一、平山尚志郎、濱崎純、村田茂穂
プロテアソーム機能低下による細胞老化誘導機構の解明
2017 年度生命科学系学会合同年次大会
神戸国際会議場 (兵庫県神戸市)。2017 年 12 月 6 日
- (12)濱崎純、上地浩之、平山尚志郎、倉永英里奈、三浦正幸、村田茂穂
新規コピキチン結合タンパク質によるタンパク質凝集体形成・細胞毒性抑制機構の解明
酸素生物学・ダイニングコード合同若手会議
一宮シーサイドオーツカ (千葉県長生郡)。2016 年 1 月 28 日
- (13)小泉 峻、入江 太郎、濱崎 純、村田 茂穂
Identification of the mechanism for Nrf1 activation in response to proteasome inhibition
第 16 回東京大学生命科学シンポジウム
東京大学駒場キャンパス 21 Komcee (東京都目黒区)。2016 年 4 月 23 日
- (14) Shun Koizumi, Jun Hamazaki, Shigeo Murata
Identification of the mechanism for Nrf1 activation in response to proteasome inhibition
3rd PROTEOSTASIS Action Meeting

Proteostasis and its Biological Implications

Lisbon (Portugal). 2016 年 11 月 3 日

(15) Eiichi Hashimoto, Jun Hamazaki, Shigeo Murata
Uncovering the mechanism for maintaining cellular homeostasis under proteasome inhibition

3rd PROTEOSTASIS Action Meeting

Lisbon (Portugal). 2016 年 11 月 3 日

(16) 本杉良、濱崎純、西籐泰昌、高浜洋介、村田茂穂
胸腺皮質特異的プロテアソームサブユニット 5t の転写因子の同定
第 39 回日本分子生物学会年会
横浜国際平和会議場（神奈川県横浜市）. 2016 年 12 月 2 日

(17) 入木朋洋、上地浩之、濱崎純、村田茂穂
In vivo analysis of the proteasome inhibitor protein PI31
第 39 回日本分子生物学会年会
横浜国際平和会議場（神奈川県横浜市）. 2016 年 12 月 1 日

(18) 小泉峻、濱崎純、村田茂穂
プロテアソーム活性低下時に生じる転写因子 Nrf1 の活性化機構の解明
第 39 回日本分子生物学会年会
横浜国際平和会議場（神奈川県横浜市）. 2016 年 12 月 1 日

(19) 馬籠耕平、橋本永一、濱崎純、村田茂穂
ヒト全ゲノムスクリーニングによるプロテアソーム機能制御因子の同定
第 39 回日本分子生物学会年会
横浜国際平和会議場（神奈川県横浜市）. 2016 年 12 月 1 日

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者
研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

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。