

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 29 日現在

機関番号：32309

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06966

研究課題名（和文）N-ミリスチル化によるプロテアソームの核局在化と癌細胞の微小環境ストレス応答

研究課題名（英文）N-myristoylation-induced nuclear localization of proteasome and stress response in tumor microenvironment

研究代表者

木村 鮎子（Kimura, Ayuko）

群馬パース大学・保健科学部・講師

研究者番号：50553616

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：代表者はこれまでの研究から、酵母では、N-ミリスチル化修飾がプロテアソームを核内に係留し、様々な核タンパク質の分解を促すことで、ストレス環境下での生育を増加させることを明らかにしてきた。微小環境ストレス下の癌でプロテアソームの核への蓄積と抗癌剤耐性の亢進が認められること、多くの癌でN-ミリスチル化酵素の発現が亢進していることから、本研究では、がんにおける本修飾の生理的意義に着目した。修飾部位変異細胞株および癌細胞株を用いたユビキチン化プロテオームの解析等を行った結果、本修飾がヒトにおいても、がんのストレス応答に関わる様々なタンパク質の制御に関わることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

プロテアソームには多数の翻訳後修飾部位が存在するが、ヒトにおける生理機能についてはほとんど情報がなかった。本研究により、プロテアソームサブユニット中唯一の脂質修飾として知られるN-ミリスチル化が、微小環境ストレスを含むがんのストレス応答に関わる様々なタンパク質の分解に関わる可能性が初めて示唆された。本研究で得られた知見は将来的に、多発性骨髄腫の治療薬であり悪性度の高い臓器癌などの新規治療薬としても期待される、プロテアソーム阻害剤の作用機序の解明や適用疾患・薬効予測法の探索研究にもつながっていくものと期待される。

研究成果の概要（英文）： In previous study, authors indicated that N-myristoylation anchors proteasome within the nucleus and enhances the degradation of various nuclear proteins, resulting in the increased proliferation of budding yeast under various stress conditions such as heat. In addition, the fact that accumulation of nuclear proteasomes was observed with antitumor drug resistance in some cancers under microenvironment stress, and overexpression of N-myristoyl transferase is frequently detected in many cancers prompted us to analyze the biological significance of N-myristoylation in human cancer. Current analysis on the subcellular localization of proteasome and ubiquitin proteome, which use strain carrying mutation in N-myristoylation site of proteasome and some cancer cell lines with high or low expression levels of N-myristoyltransferase, indicated that N-myristoylation controls degradation of various stress response-related proteins via regulation of intracellular localization of proteasomes.

研究分野：病態医科学

キーワード：プロテアソーム N-ミリスチル化 ユビキチン化 ストレス応答 プロテオミクス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

癌組織では、癌細胞の無秩序な増殖や血管形成不全のために、外界から遮断された特殊な微小環境が生じている。微小環境内での低栄養・低酸素などのストレスは、癌細胞において様々な耐性因子の発現を誘導する。結果として、ストレスや薬剤への耐性能・転移能などがより高い細胞が選択され、優勢になることで、癌細胞はさらに悪性度を高めていく。癌の進展・悪性化の温床となる微小環境ストレス応答を標的とする、新たな治療戦略の創出を目指した分子機序の解明が望まれている。そこで代表者は、微小環境ストレス応答との関わりが予想される、癌細胞における N-ミリスチル転移酵素 (N-Myristoyl Transferase: NMT) の異常な発現亢進とプロテアソームの核内への蓄積に着目した。

プロテアソームは、ユビキチン鎖による標識を目印とした限定的なタンパク質分解を介して、細胞内の適切な部位・時期でのタンパク質の機能制御により、細胞周期・ストレス応答の制御や、タンパク質の品質管理を行うタンパク質複合体である。代表者らはこのうち、唯一の脂質修飾である N-ミリスチル化修飾部位のグリシンを置換・欠失させた変異体酵母において、野生株酵母では主に核に局在するプロテアソームが核外に流出し、細胞質内凝集体を形成すること (Biochemistry 2012, Kimura A ら)、さらにユビキチン化タンパク質の核内への蓄積と、高温条件やアルギニン類似体添加によるタンパク質毒性ストレスへの耐性が減少することを明らかにした (J. Proteomics 2015, Kimura A ら)。一方、野生株酵母では、培地中のグルコースの枯渇により、生育フェーズが対数期から定常期・休止期へと移行して細胞中の NMT 活性が低下するにつれ、プロテアソームの核外流出が見られた。これらの結果は、酵母において、生育フェーズの進行に伴う N-ミリスチル化修飾の ON/OFF がプロテアソームの細胞内での局在変化を介して一連の核タンパク質の分解を制御し、ストレス耐性を誘起することを示唆している。

本修飾は多数の真核生物で保存され、上記機能がヒトでも共通している可能性は高い。このことから代表者は、癌におけるプロテアソームの N-ミリスチル化に着目した本研究を計画した。

2. 研究の目的

ヒトプロテアソームにおける N-ミリスチル化の生理機能を明らかにするとともに、本修飾とがん細胞の微小環境ストレス応答との関連性を検証することを大きな目的とする。

3. 研究の方法

1) プロテアソームサブユニット N-ミリスチル化部位変異細胞株 (PSMC1-WT, G2A) の構築

かずさ DNA 研究所より、ミリスチル化修飾を受けることが知られる 19S プロテアソームサブユニット PSMC1 の ORF を含むプラスミドクローン (pFN21AB3424) を入手した (PSMC1-WT)。さらにこのプラスミドを鋳型として、QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technology) を用いて、ミリスチル化部位のグリシンを、修飾を受けないアラニンに置換した変異配列をもつ、PSMC1-G2A 変異体プラスミドを構築した。これらのインサート配列を pIRES2-DsRed ベクター (Clontech) に組み換えて、それぞれ HEK293T 細胞に形質転換し、G418 による形質転換細胞の選択と限界希釈法による細胞クローン化を行った。

2) N-ミリスチル化酵素高発現・低発現癌細胞株および PSMC1-WT・G2A 細胞株を用いたプロテアソームの細胞内局在と複合体構成因子の解析

5 種類の癌細胞株を用いたウエスタンブロット解析により、癌における 2 種類の N-ミリスチル化酵素 (NMT-1・2) の発現量比較を行った。さらにこれらの細胞株と上記変異株から核・細胞質を分画し、各画分でのプロテアソームの存在量比較を行った。また、プロテアソームのミリスチル化状態の違いによるプロテアソームのサブユニット構成や結合因子の変化の有無を検証するために、抗 PSMC1 抗体を用いてプロテアソーム複合体の免疫沈降精製を行って SDS-PAGE によって分離し、検出された各バンドの切り出しと質量分析による同定を行った。

3) 上記細胞株を用いたユビキチン化プロテオーム解析 (ユビキトーム解析)

PSMC1-WT・G2A 変異体および N-ミリスチル化酵素の高発現癌細胞株 (MiaPaca-2・KMS-11)、低発現癌細胞株 (Panc-1、RPMI8226) を用いて、プロテアソームによる分解標的となるユビキチン化ペプチドの濃縮と質量分析によるユビキトーム解析を行った。各細胞株を培養して調製したタンパク質 1mg をトリプシンで消化し、PTMScan® Ubiquitin Remnant Motif (K- -GG) Kit (Cell Signaling Technology) を用いて、タンパク質ユビキチン化の痕跡をもつ K- -GG ペプチドを濃縮して、LTQ-Orbitrap Velos 質量分析計 (ThermoFisher Scientific) で分析を行った。得られたペプチドピークを用いて、MaxQuant ソフトウェア (マックスプランク研究所) によるペプチド・タンパク質の同定と定量を行った。全細胞株の結果を併せて、重複を除く 751 種類のユビキチン化タンパク質を同定し、さらに各群で特徴的にみられるユビキチン化タンパク質の探索とアノテーションを行った。

4. 研究成果

1) プロテアソームサブユニット N-ミリスチル化

部位変異細胞株 (PSMC1-WT, G2A)の構築

DsRed の赤色蛍光で導入遺伝子の発現が確認されたクローン化変異細胞株を選別した。PSMC1-WT・G2A 株間では、通常培養条件下での細胞増殖能に有意差は見られなかった。また、蛍光標識を用いた免疫組織染色では、両株とも核と細胞質の両方にプロテアソームのシグナルが確認された。

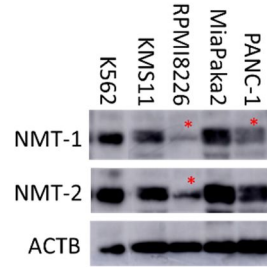


図1. N-ミリスチル化酵素の発現量比較

2) N-ミリスチル化酵素高発現・低発現癌細胞株および PSMC1-WT・G2A 細胞株を用いたプロテアソームの細胞内局在と複合体構成因子の解析

調べた癌細胞株のうち、RPMI8226 および Panc-1 では、他の細胞株と比べて N-ミリスチル化酵素(NMT-1, 2)の発現量が顕著に低いことが分かった (図 1)。さらに、核・細胞質内の PSMC1 および 20S プロテアソームサブユニット 2 の検出を行った所、WT 株では核内に、G2A 株では細胞質内にプロテアソームが多く局在していたのに対し、N-ミリスチル化酵素低発現細胞株の RPMI8226 では、明瞭な差ではないものの、他の細胞株と比べ核内のプロテアソーム量がやや少ない傾向が見られた (図 2)。

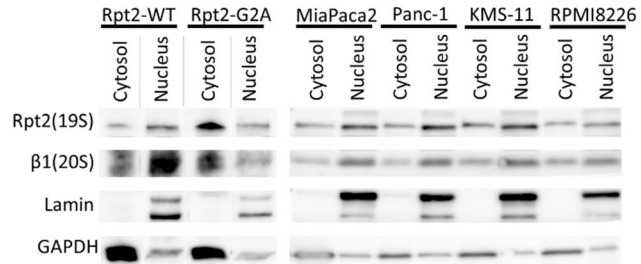


図2. 核・細胞質内でのプロテアソーム発現量の比較

さらに、N-ミリスチル化がプロテアソームの複合体形成や他の因子との相互作用に関係するか調べるために、KMS-11・RPMI8226 細胞株からプロテアソームを精製し、SDS-PAGE によるバンドパターンの比較と各バンドの切り出し・質量分析を行った所、両者で複合体構成成分に大きな違いは見られなかった。一方で KMS-11 細胞株では、中間径フィラメントを構成するビメンチン・ラミン A の共沈が確認された。これらのタンパク質は、いずれも細胞内高発現タンパク質であることから非特異的反応である可能性も否定できないものの、それぞれ核の外膜と内膜を裏打ちしてタンパク質の輸送に関わっている。このことから、細胞骨格を構成するこれらの繊維状タンパク質が、プロテアソームに結合した N-ミリスチル基との疎水性相互作用により、プロテアソームの局在を制御する可能性も考えられる。

3) 上記細胞株を用いたユビキチン解析

PSMC1-WT・G2A 株で特異的に検出されたユビキチン化タンパク質(それぞれ 82 個、191 個)のリストを遺伝子機能アノテーションの横断検索サイト(Functional Annotation Tool DAVID: <https://david.ncifcrf.gov/summary.jsp>)で解析し、各群に特徴的に含まれる遺伝子オントロジー(GO)を検索した。結果として、G2A 株ではリボソーム複合体 ($p=7.3E^{-5}$)・転写 ($p=1.4E^{-4}$) などリボソームに関連した GO や、マクロオートファジー ($p=0.016$)、フォスファチジルイノシトール (PI) のリン酸化 ($p=0.013$)、細胞間接着 ($p=2.7E^{-5}$) などの GO が特徴的にヒットした。対して WT 株では、タンパク質や tRNA の核輸送 ($p=3.2E^{-5}$)、核膜や核膜孔・核クロマチンなどの核関連の GO ($p=7E^{-6}$) や、核膜消失・G1/S 転換などの有糸分裂関連の GO ($p=3.5E^{-7}$) が多くヒットした。

上記の結果を基に、さらに検出されたタンパク質群を詳細に見ると、G2A 株やミリスチル化酵素低発現細胞株では、10~16 種のリボソームサブユニットのユビキチン化が検出されたのに対し、WT 株・高発現細胞株では 3~4 種のサブユニットしか検出されず、定量解析結果からも同様の傾向が認められた。アミノ酸欠乏状態でアミノアシル tRNA が不足すると、タンパク質合成が失速してリボソームがユビキチン化され、リボソームの解離・分解や活性調節に加えて、合成中の新生ポリペプチド鎖の分解やストレス応答反応が誘起されることが報告されている。詳細な機構は不明であるが、上記の結果は、プロテアソームの N-ミリスチル化が、リボソームのユビキチン化を介したリボソーム品質管理機構に関与する可能性を示している。

また G2A 株では、オートファジーによるタンパク質分解に関わる 2 種の小胞体タンパク質や、DNA 障害時のユビキチン化を介した遺伝子修復機構に関わる 2 種の核タンパク質、酸化ストレス応答等に関わる PI4 キナーゼの 2 つのサブユニットのユビキチン化ペプチドが特異的に検出されたことから、PSMC1 のミリスチル化が、ユビキチン化を介してこれらのストレス関連タンパク質を制御することが考えられる。一方で WT 株では、G2A 株では同定されなかった熱ストレスや遺伝子毒性ストレスによって制御される 4 種の有糸分裂関連タンパク質のユビキチン化ペプチドが検出されたことから、ミリスチル化が有糸分裂の制御に関わることも考えられる。

一方で、WT 株では 3 種の E3 ユビキチンリガーゼとユビキチン様タンパク質 SUMO2、G2A 株では E2 ユビキチンリガーゼとプロテアソームサブユニット Rpt5 のユビキチン化ペプチドがそれぞれ特異的に検出されたことから、本修飾がユビキチン-プロテアソーム系によるタンパク質毒性ストレス応答の調節にも関わることが示唆された。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

これらの結果から、プロテアソームの N-ミリスチル化は核内外での様々なストレス関連タンパク質のユビキチン化・分解を介して、がん細胞における栄養飢餓などの微小環境ストレスを含む様々なストレスへの応答に関与することが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 平野 久、木村 鮎子、佐藤 夏美、長田 誠、木下 英司、藤田 清貴	4. 巻 1
2. 論文標題 Phos-tag対角線電気泳動により明らかになったプロテアソームサブユニットのリン酸化状態	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 育種学研究 22 (別1)	6. 最初と最後の頁 204-204
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 田胡 裕章、長田 誠、古田島 伸雄、木村 鮎子、藤田 清貴	4. 巻 38
2. 論文標題 健康人におけるCell-free DNAの特性：ヒストン結合部位の推定	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本染色体遺伝子検査	6. 最初と最後の頁 44-50
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ohira Takashi, Ino Yoko, Nakai Yusuke, Morita Hironobu, Kimura Ayuko, Kurata Yoichi, Kagawa Hiroyuki, Kimura Mitsuo, Egashira Kenji, Moriya Shunsuke, Hiramatsu Kyoko, Kawakita Masao, Kimura Yayoi, Hirano Hisashi	4. 巻 217
2. 論文標題 Proteomic analysis revealed different responses to hypergravity of soleus and extensor digitorum longus muscles in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Proteomics	6. 最初と最後の頁 103686-103686
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jprot.2020.103686	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Aladeokin Aderemi Caleb, Akiyama Tomoko, Kimura Ayuko, Kimura Yayoi, Takahashi-Jitsuki Aoi, Nakamura Haruko, Makihara Hiroko, Masukawa Daiki, Nakabayashi Jun, Hirano Hisashi, Nakamura Fumio, Saito Takashi, Saido Takaomi, Goshima Yoshio	4. 巻 132
2. 論文標題 Network-guided analysis of hippocampal proteome identifies novel proteins that colocalize with A β in a mice model of early-stage Alzheimer's disease	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neurobiology of Disease	6. 最初と最後の頁 104603-104603
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.nbd.2019.104603	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中居 佑介・木村 鮎子・森山 佳谷乃・香川 裕之・井野 洋子・熊谷 研・齋藤 知行・木村 弥生・平野 久
2. 発表標題 定量プロテオーム解析による骨粗鬆症の血清バイオマーカー探索
3. 学会等名 日本プロテオーム学会2019年大会 / 第70回日本電気泳動学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川田 悠貴, 宮野 ゆかり, 木村 鮎子, 古田島 伸雄, 長田 誠, 平野 久, 藤田 清貴
2. 発表標題 質量分析計によるmonoclonal IgA-アルブミン複合体の構造解析
3. 学会等名 第59回日本臨床化学学会年次学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 木村 鮎子
2. 発表標題 プロテオミクスによる病態解析
3. 学会等名 第26回 日本臨床化学学会 関東支部総会（招待講演）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 木村 鮎子	4. 発行年 2018年
2. 出版社 技術情報協会	5. 総ページ数 540
3. 書名 In silico創薬におけるスクリーニングの高速化・効率化技術	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------