

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06656

研究課題名(和文) ユビキチン化タンパク質の核外排出制御機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the nuclear export mechanism of ubiquitinated proteins

研究代表者

平山 尚志郎 (Hirayama, Shoshiro)

東京大学・大学院薬学系研究科(薬学部)・助教

研究者番号：80548280

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)：細胞外からのストレスや、遺伝子変異によって生じる構造異常タンパク質は、細胞内でユビキチン化を受け分解される。分解されきらなかったユビキチン化タンパク質は、細胞核ではなく細胞質の特定の場所に輸送され、隔離されることがわかっていたが分子メカニズムに不明な点があった。申請者は、ユビキチン化タンパク質の核外搬出に関わる新規因子を同定し、輸送基質となっている候補タンパク質を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、ユビキチン化タンパク質を核外に搬出するための新たな経路と新たな分子メカニズムが明らかとなった。構造異常タンパク質の発現、ユビキチン化タンパク質の細胞質での蓄積は、がん細胞、老化細胞、神経変性疾患における神経細胞において観察される。このことから申請者の研究成果は、がん、神経変性疾患や老化の理解の手がかりの一つとなり、将来的には新たな治療戦略につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)： In addition to genetic mutation, other environmental stresses such as oxidative stress are able to change the structure of a protein and induce protein misfolding. The misfolded proteins are ubiquitinated and subsequently degraded in the cells. It is known that the ubiquitinated proteins which escape the degradation are transported and sequestered in specific inclusion body in the cytosol but not in the nucleus. However, these molecular mechanisms were unclear. We have identified a novel factor C6orf106 involved in the nuclear export of ubiquitinated proteins and a candidate protein which is exported from the nucleus by C6orf106.

研究分野：細胞生物学

キーワード：タンパク質品質管理 ユビキチン プロテアソーム 細胞内輸送

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

環境ストレスや遺伝子変異によって生じる構造異常タンパク質は、細胞内でユビキチンリガーゼによるユビキチン化を受ける。ユビキチン化された構造異常タンパク質は、プロテアソームにより適切に分解される。しかし、様々なストレスや加齢などによりプロテアソーム量と機能の低下が引き起こされると、構造異常タンパク質は効率よく分解されなくなり、細胞内でユビキチン陽性の凝集体を形成する。ユビキチン化をうけた異常タンパク質の蓄積、凝集体隔離の場として、aggresome、ALIS (aggresome-like induced structures) が知られているが、これらは核内ではなく、細胞質に観察される。特に aggresome については、中心体周辺に観察されること、その形成には微小管、モータータンパク質ダイニン、ユビキチン捕捉因子 HDAC6 と特定のタンパク質が機能していることが報告されており、制御された防御的な機構であると考えられてきた。しかしこれまで、ユビキチン陽性のタンパク質凝集体が、どうして細胞核ではなく細胞質の特定の位置にできるのか、その現象、分子メカニズムと生理的な意義について注目されてこなかった。

近年の研究から、出芽酵母においては核内が構造異常タンパク質の分解の場であるという報告があった。ところが申請者は、ヒト、マウス培養細胞をプロテアソーム阻害剤で処理し免疫染色を行った時に、ユビキチン化タンパク質は核ではなく細胞質に蓄積することに気づいた。核内にもユビキチン、ユビキチンリガーゼ、プロテアソームは存在する。しかしプロテアソームが機能不全に陥った場合に、ユビキチン化タンパク質が蓄積する場所は核ではなく細胞質であった。

タンパク質の核-細胞質間の輸送は、importin と exportin によって担われている。このうち核から細胞質へのタンパク質の輸送に機能する主要な因子は exportin である。そこで、ユビキチン化タンパク質が exportin によって核から細胞質に運び出されている可能性を考え、プロテアソーム阻害と同時に exportin の阻害剤で処理を行った。すると、共阻害によってユビキチンのシグナルは核内にユビキチン陽性凝集体と共に観察された。これらの結果から、ユビキチン化された核内タンパク質は、核内で速やかに分解されなかった場合に、なんらかの新規メカニズムによって、核から細胞質に exportin と Ran GTPase 依存的に運び出されるという着想を得ていた。申請者は本研究開始直前に、genome-wide siRNA screening を実施し、核内でユビキチン化タンパク質を捕捉し exportin によって核外に運び出す因子として、C6orf106 の同定に成功していた。

2. 研究の目的

本来分解すべきユビキチン化タンパク質が、なぜ核と細胞質をシャトルし、分解を免れた場合にどうしてユビキチン化シグナルによって核外搬出されるのか生理的意義を明らかにすることを研究目的とした。具体的には、C6orf106 がどのように exportin と協同してユビキチン化タンパク質を核外搬出するのかメカニズムを明らかにすること、どのようなタンパク質がユビキチン化と C6orf106 依存的に核外搬出を受け、どのような局面で必要となるのか生理的意義の解明に注力した。

3. 研究の方法

本研究では、申請者が新たに見いだした核内ユビキチン化タンパク質の細胞質搬出分子 C6orf106 の細胞レベルの解析を通じて、ユビキチン化タンパク質の細胞内動態の制御機構とその病態生理的役割の理解を目指した。

核内ユビキチン化タンパク質が細胞質に運び出される分子メカニズムとその生理的意義の解明

C6orf106 が核と細胞質をシャトルするメカニズムの解明

C6orf106 は核と細胞質をシャトルすることで、プロテアソーム機能低下時に核からユビキチン化タンパク質を細胞質に排出していることが考えられた。そこでどのような因子に依存して核と細胞質を行き来しているのか、結合タンパク質や阻害剤、変異体解析で明らかにすることとした。

C6orf106 と結合するタンパク質の同定

C6orf106 の基質や機能についてあらゆることが不明であった。そこで、細胞内で C6orf106 と結合するタンパク質を免疫沈降後の質量分析解析で同定を試みることにした。結果、多くの翻訳関連因子が、C6orf106 結合因子として同定された。

翻訳阻害時のユビキチン化タンパク質の局在観察

で、多くの翻訳関連因子が同定されたことから、C6orf106 が核外搬出するタンパク質は新規合成タンパク質が共翻訳的にユビキチン化されたタンパク質ではないかと考えた。そこで、翻訳阻害剤シクロヘキシミド処理することで、ユビキチン化タンパク質の細胞内動態の変化を追うことにした。

C6orf106 が運び出す核内ユビキチン化タンパク質の同定

核内にユビキチン化タンパク質が細胞質に運び出されるという現象は世界に先駆けて申請者らが報告したものであり、どのようなタンパク質がユビキチン化を受けた後に核から細胞質に運び出されているのかわかっていなかった。そこで、C6orf106 発現細胞と C6orf106 ノックアウト細胞において核に蓄積するユビキチン化ペプチドの違いをユビキチン化ペプチド特異的抗体によって濃縮した後、質量分析器で同定、半定量解析することで、C6orf106 依存的に核から細胞質に運び出されているユビキチン化タンパク質を同定することとした。

C6orf106 が必要となる局面の同定

様々ながん由来培養細胞とテロメア伸長酵素によって不死化した非がん細胞由来 hTERT-RPE1 細胞について、プロテアソーム阻害剤有無条件で、C6orf106 をノックダウンもしくはノックアウトし、細胞増殖もしくは細胞死に影響があるのか観察することで、C6orf106 が必要となる局面の探索を行なった。

4 . 研究成果

核内ユビキチン化タンパク質が細胞質に運び出される分子メカニズムとその生理的意義の解明

Venus-C6orf106 を細胞に発現させ、C6orf106 の細胞内局在を観察したところ、その細胞内局在は専ら細胞質であった。C6orf106 が核から細胞質にユビキチン化タンパク質を運び出すためには一度核に入り、細胞質に搬出される必要がある。核から細胞質へのタンパク質の輸送で最も重要な受容体は exportin が知られている。実際に C6orf106 と結合するタンパク質を免疫沈降後の質量分析解析で同定したところ、C6orf106 結合タンパク質のひとつに exportin が確認できた。そこで、Venus- C6orf106 発現細胞に対して exportin の阻害剤である Leptomycin B で処理したところ、処理 15 分後には Venus-C6orf106 が核にも局在するようになった。このことから Venus-C6orf106 は、一度核に入った後 exportin によって 15 分以内に素早く核外搬出されていることが明らかになった。exportin は核外搬出シグナルという法則性のあるアミノ酸配列を認識することが知ら

れている。そこで、C6orf106 の核外搬出シグナルを公開されているプログラムを用いて予測したところ、3ヶ所核外搬出シグナルの候補が得られた。それぞれ変異を導入し解析したところ、2ヶ所が実際に核外搬出シグナルとして機能し、ユビキチン化タンパク質の核外搬出に重要であることがわかった。

C6orf106 は、ユビキチン結合ドメインを持つタンパク質であったため、このユビキチン結合ドメインが、ユビキチン化タンパク質の核外搬出に必要なのか、欠損変異体を用いて実験を行なった。結果、野生型 C6orf106 はユビキチン化タンパク質を核外搬出する能力を持つが、ユビキチン結合ドメイン欠損変異体は持たないことが明らかとなった。このことから、C6orf106 はユビキチン結合ドメインを介して核内のユビキチン化タンパク質を捕捉し、核外搬出シグナルが exportin による認識を受け、exportin を介して細胞質に搬出していることがわかった。

次に C6orf106 の生理機能を考えるため、質量分析器によって同定した C6orf106 結合タンパク質に共通の機能がないか解析した。すると、C6orf106 結合タンパク質の半数が翻訳伸長因子、mRNA 結合タンパク質、リボソームであった。ここで、新生タンパク質の 30%程が合成直後にユビキチン-プロテアソーム系によって分解をうけるという報告を思い出した(Schubert et al., Nature 2000)。これらのことから、プロテアソーム阻害時の C6orf106 の基質の大半は、新生タンパク質ではないかと考えられた。このことを確かめるため、プロテアソーム阻害や C6orf106 ノックダウン時に、タンパク質翻訳阻害剤シクロヘキシミド(CHX)処理をおこなった。すると、プロテアソーム阻害と同時に CHX 処理すると C6orf106 ノックダウン時に核に蓄積するユビキチン化タンパク質が観察されなくなった。以上のことから申請者は、プロテアソーム機能低下時に C6orf106 が核外搬出するユビキチン化タンパク質は、新規合成タンパク質由来であることを、新たに発見した。

ユビキチン化タンパク質が核から細胞質に運び出されるという現象は、我々のグループが独自に発見したものであり、どのようなユビキチン化タンパク質、新規合成タンパク質が核外搬出を受けているのかわかっていなかった。そこで、C6orf106 欠損細胞で核内に蓄積するユビキチン化タンパク質を、ユビキチン化ペプチド特異的抗体と質量分析器により同定した。TMT ラベル法により定量的に解析したところ、種々のユビキチン化ヒストンが C6orf106 欠損細胞で核内に蓄積することがわかった。新生ヒストンがプロテアソーム分解のターゲットとなっており、分解を免れた場合に核から細胞質に運び出されているかについては今後解析する課題である。

C6orf106 の欠損が細胞増殖に必要なさまざまながん由来培養細胞と、非がん細胞由来である hTERT RPE1 細胞を用いて実験を行なった。すると使用したすべてのがん細胞では C6ORF106 の欠損は細胞増殖に影響を与えなかったが、hTERT RPE1 細胞においては、細胞増殖の抑制が観察された。現在、核内にユビキチン化ヒストンが蓄積するために hTERT RPE1 細胞の増殖抑制がおきているのか解析を行い、ユビキチン化タンパク質核外搬出の生理的意義を明らかにしようとしているところである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 平山尚志郎、村田茂穂
2. 発表標題 ユビキチン化タンパク質を核外搬出する新奇制御因子の探索とその動作機構の解明
3. 学会等名 第71回日本細胞生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西澤晏理、平山尚志郎、村田茂穂
2. 発表標題 核のUFD経路の生理的意義の解明
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔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
---------	---------