

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03208

研究課題名(和文) ユビキチン依存性タンパク質分解により制御される生命現象の解明

研究課題名(英文) Elucidation of biological phenomena regulated by ubiquitin-dependent proteolysis

研究代表者

嘉村 巧 (Kamura, Takumi)

名古屋大学・理学研究科・教授

研究者番号：40333455

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：ユビキチン・プロテアソーム系を介したタンパク質分解が様々な生命現象に重要な働きをしていることが明らかになり、注目を集めている。生体内に多くのE3ユビキチン修飾酵素が存在し、基質特異性を決める役割を果たしている。この分野の課題は、これらE3の標的タンパク質を同定しその生理的意義を明らかにすることである。本研究では、出芽酵母短寿命タンパク質Mmr1に対するE3 Dma1/Dma2を同定し解析を行った。その結果、細胞内小器官のミトコンドリアが新しい細胞に遺伝する際の仕組みを解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ユビキチン・プロテアソーム系を介したタンパク質分解は、多岐にわたる生命現象に重要な働きを果たしていることが明らかになっている。現在までの精力的な研究により生体内に非常に多くのE3が存在し、重要な役割を担っていることが予想されている。今回のわれわれの発見は、タンパク質を積極的に分解する「プロテオリシス」の新しい役割として注目すべきものであり、学術的意義は高いものである。また、ミトコンドリアをはじめとした細胞小器官の輸送や分布の異常に伴う疾病の原因解明や創薬が進むこと期待される。

研究成果の概要(英文)：Protein degradation via the ubiquitin-proteasome system has attracted much attention because of its important roles in various biological phenomena. Many E3 ubiquitin-modifying enzymes exist in vivo and play a role in determining substrate specificity. The challenge in this field is to identify these E3 target proteins and clarify their physiological significance. In this study, we identified and analyzed E3 Dma1/Dma2 for the budding yeast short-lived protein Mmr1. As a result, we elucidated the mechanism by which mitochondria, an intracellular organelle, are inherited by new cells.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：タンパク質分解

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、細胞周期進行・シグナル伝達・DNA複製・代謝・免疫応答など多岐にわたる生命現象において、ユビキチン・プロテアソーム系を介したタンパク質分解が重要な役割を果たしていることが明らかになり大変注目を集めてきている。ユビキチンシステムの発見者であるHershko博士、Ciechanover博士とRose博士の3氏に2004年ノーベル化学賞が授与されたことは記憶に新しい。タンパク質へのユビキチン化反応にはユビキチン活性化酵素 (E1)、ユビキチン結合酵素 (E2)、ユビキチンリガーゼ (E3) の3種類の触媒酵素群が関与しているが、この中でE3は特異的に基質を認識し分解に導くという重要な役割を担っている。ユビキチン化される標的タンパク質は非常に多く、それを特異的に認識するE3も非常に多数存在することが明らかになっている。

E3は大きく分けて、HECT型、U-box型、RING-finger型に分類される。特にRING-finger型E3は数が多く、様々な生命現象に重要な役割を果たすものが含まれている。RING-finger型E3には単量体型と複合体型があり、後者の中にCullin型E3という複合体を形成する一群がある。

データベース検索により、出芽酵母には約100種類のE3が存在することが明らかになっており、さらには個々のE3が複数の基質を認識しユビキチン化することより、多彩な生命現象を制御していると考えられているが、これらE3の機能はほとんど解明されていないのが現状である。そこでこの分野の課題はこれらE3の機能を明らかにすることである。

2. 研究の目的

ユビキチン・プロテアソーム系を介したタンパク質分解は、多岐にわたる生命現象に重要な働きを果たしていることが明らかになっている。そして現在までの精力的な研究により生体内に非常に多くのE3が存在し、基質特異性を決める役割を果たしていることが明らかになっている。しかしながら、技術的困難さのため、酵素-基質の対応関係が明らかになっているのはごく僅かである。そこで本研究では、出芽酵母E3の機能解析を行ない、最終的にはユビキチン依存性タンパク質分解という観点から様々な生命現象を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

出芽酵母E3により分解を制御される基質の同定

ハーバード大学のO'sheaらは、内在レベルで発現するタンパク質の半減期を網羅的に報告した【Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 103:13004 (2006)】。我々はこのリストから半減期が30分以内で、SGDの翻訳後修飾データベースでユビキチン修飾が報告され、過去の文献から機能的に重要であると予想され、短寿命の意義が未解明なタンパク質を抽出している。これら遺伝子の染色体上のORF下流に、3xHAタグ配列を挿入し、発現をウエスタンブロッティングによって確認したのち、プロテアソーム阻害剤(MG132)を使ったシクロヘキシミドチェイスによって、ユビキチン-プロテアソーム依存的に分解される基質候補タンパク質を選別する。続いてこれらのタンパク質の分解にどのE3が関与しているかを出芽酵母欠失株ライブラリーを用いて検討する。または、質量分析法を用いて、これらのタンパク質と相互作用するE3を探索する。

新規基質候補タンパク質とE3の結合の検討

新規基質とE3の結合を過剰発現系で調べ、結合が検出できたら、次に内在性タンパク質レベルでの結合を検討する。

新規基質に対する細胞内分解の検討

基質とE3を出芽酵母に発現させ、基質に対する抗体を用いて免疫沈降する。SDS-PAGEで展開した後、抗ユビキチン抗体でウエスタンブロットを行い、基質のユビキチン化を確認する。また、シクロヘキシミドチェイス法により基質の半減期を測定する。

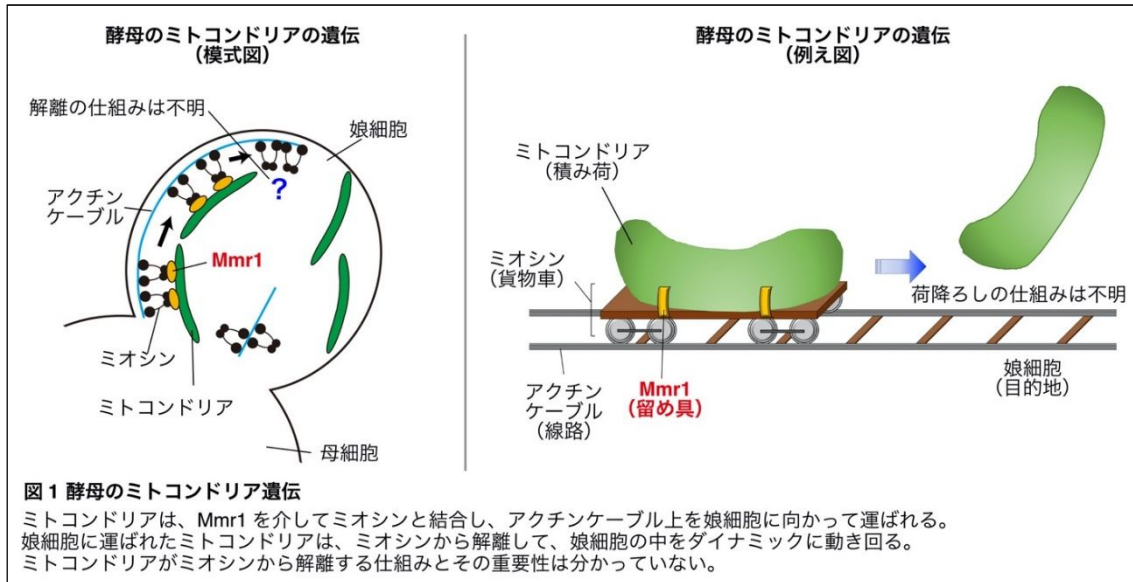
E3による新規基質分解の細胞生物学的意義の検討

E3による新規基質分解の生理的意義を細胞生物学的手法を用いて調べる。

4. 研究成果

ミトコンドリアは、エネルギー物質であるATPや脂質などを作り出す重要な細胞内小器官である。新しい細胞が生まれる際には、ミトコンドリアをはじめとする細胞小器官はきちんと新しい細胞に分配されて遺伝する必要がある。酵母は出芽という様式によって増殖する。出芽過程で

は、もとの細胞（母細胞）から新しい空間である芽が出現・生長し、そこに細胞小器官などが送り込まれて最終的に娘細胞として独立する。ミトコンドリアは、アクチンケーブル（線路に相当）という細胞骨格上をミオシンというモータータンパク質（貨物車に相当）によって娘細胞に向かって運ばれる（図1）。その際にミトコンドリアとミオシンは、Mmr1という留め具タンパク質によって結びつけられている。ミトコンドリアは、娘細胞の先端に到達した後にミオシンから外れて（荷降ろしされて）娘細胞内をダイナミックに動き回る。この荷降ろしの仕組みや重要性は全く明らかになっていなかった。



留め具タンパク質 Mmr1 の分解によってミトコンドリアが荷降ろしされる

我々は、留め具タンパク質である Mmr1 に注目して、ミトコンドリアがミオシンから荷降ろし

される仕組みを調べた。すると、Mmr1 はユビキチン・プロテアソームシステムによって迅速に分解されていることが明らかになった。ユビキチン・プロテアソームシステムでは、分解されるタンパク質（基質）にユビキチンというタンパク質が目印として付加される。このユビキチン

化が基質の運命を決める重要なプロセスである。Mmr1 に結合するタンパク質を質量分析によって調べたところ、Dma1 と Dma2 というユビキチンリガーゼ（基質を捕まえてユビキチンを基質に付加する酵素）が検出された。Dma1 と Dma2 のコード遺伝子を両方とも欠損すると Mmr1 の分解が抑制された（図2）。

DMA1 DMA2 の二重欠損株でミトコンドリアの挙動を観察したところ、娘細胞の先端までに運ばれた後にミオシンから解離できずに（荷降ろしされずに）複雑に絡み合って堆積した（図3）。これらのことから、酵母は娘細胞で留め具タンパク質 Mmr1 をユビキチン・プロテアソームシステムによって分解することで、ミトコンドリアをミオシンから荷降ろしていることが明らかになった。

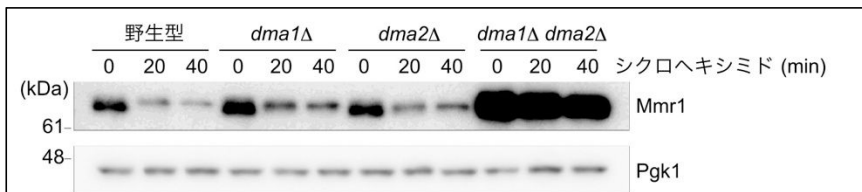


図2 Dma1/2 が Mmr1 の迅速な分解に関わる

タンパク質の新たな合成を阻害するシクロヘキシミドを添加すると、それまでに細胞内に存在していたタンパク質が分解されて減っていく様子、つまりそのタンパク質の寿命が分かる。Mmr1 は 20 分後には半分以下にまで分解される短寿命なタンパク質であった。しかし、重複した働きを持つ Dma1 と Dma2 という二つのユビキチンリガーゼの遺伝子を両方とも欠損すると (*dma1Δ dma2Δ*)、Mmr1 の分解が抑制されて寿命が延び、もともとの存在量も多くなった。Pgk1 は比較的長寿命であることが知られており、各レーンで等しい量の総タンパク質量を電気泳動したことを示すために検出した。

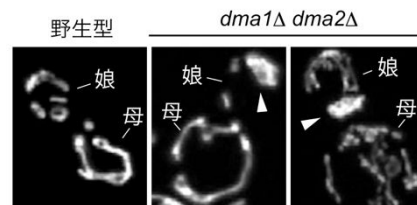
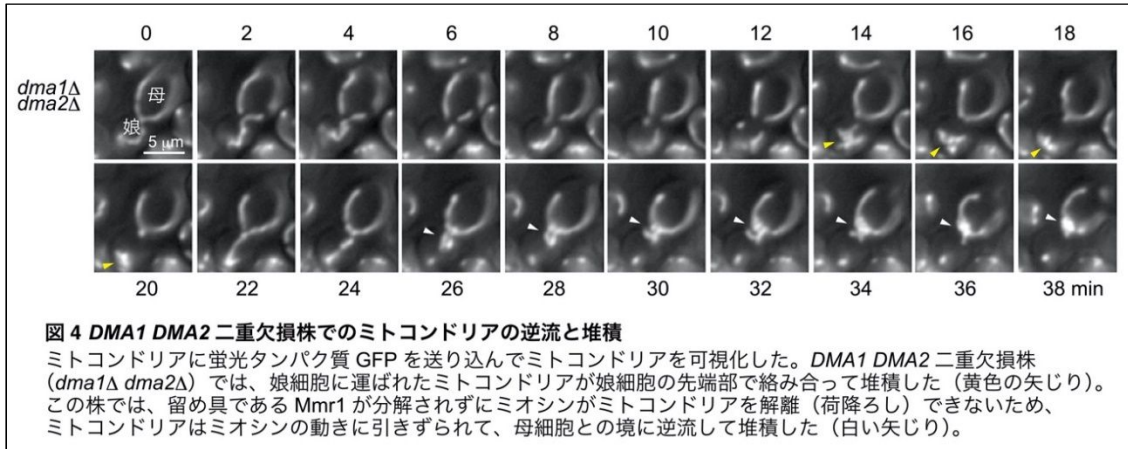


図3 Dma1/2 はミトコンドリアの正常な分布に必要である

ミトコンドリアに蛍光タンパク質 GFP を送り込み、ミトコンドリアを可視化した。野生型では娘細胞に運ばれた後にミトコンドリアは、娘細胞中に広く分布していた。DMA1 DMA2 二重欠損株 (*dma1Δ dma2Δ*) では娘細胞の先端や母細胞とのくびれ部分（共に矢じり）に複雑に絡み合って堆積した。

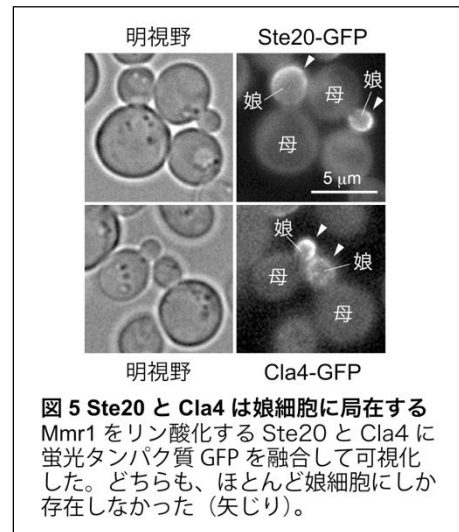
ミトコンドリアの荷降ろしはミトコンドリアの正常な動態と形態に必要である

DMA1 DMA2 二重欠損株の娘細胞先端で、荷降ろしされずに堆積したミトコンドリアをさらに追跡したところ、ミオシンが次の仕事をするために母細胞と娘細胞の境界部に移動するのに引き



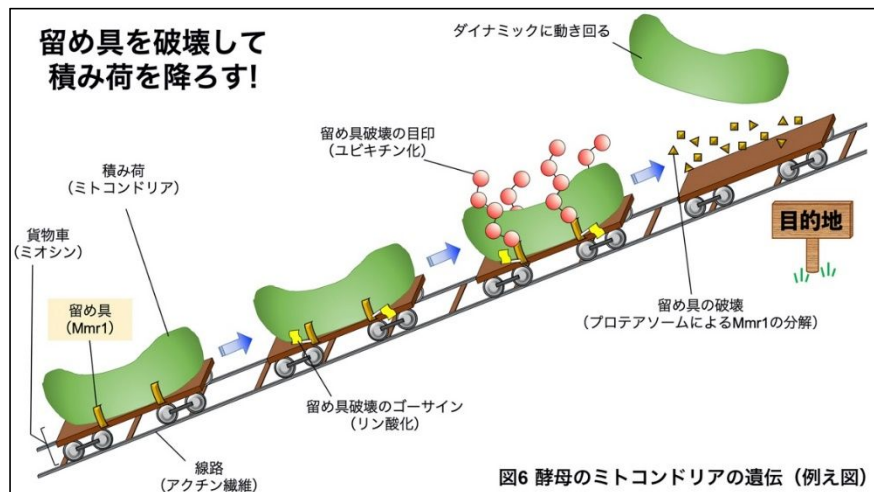
ずられて逆流してそこで再び複雑に絡み合って堆積した (図4)。*DMA1 DMA2* 二重欠損株で堆積したミトコンドリアを電子顕微鏡で詳しく観察したところ、異常に肥大したり変形したりしていた。これらのことから、留め具タンパク質 Mmr1 をユビキチン・プロテアソームシステムで分解してミトコンドリアをミオシンから荷降ろしすることは、ミトコンドリアの正常な動態や形態の維持に欠かせないことが判明した。

ミトコンドリアが確実に娘細胞に遺伝するには、目的地 (娘細胞) に到達した後に荷降ろしされる必要がある。私たちは、Mmr1 が Ste20 や Cla4 というリン酸化酵素によってリン酸化を受けるコンセンサス配列を有していることから、これらのリン酸化酵素に注目した。これらのリン酸化酵素の活性を失わせてみたところ、ミトコンドリアの荷降ろしが滞った。また、これらのリン酸化酵素による Mmr1 のリン酸化が Dma1 と Dma2 による Mmr1 のユビキチン化に必要であることも見出した。さらに、Mmr1 のリン酸化部位に変異を導入してリン酸化を受けない様に改変すると、ミトコンドリアの荷降ろしが滞ることも明らかになった。興味深いことに、Ste20 と Cla4 はどちらも主に娘細胞に局在し、母細胞にはほとんど存在しなかった (図5)。Ste20 と Cla4 が娘細胞のみに存在することで、ミトコンドリアが確実に娘細胞に運ばれた後に Mmr1 のリン酸化が起こり、それが引き金となって Mmr1 のユビキチン化と分解が引き起こされていたのである。酵母はこの仕組みによって、目的地に到着する前にミトコンドリアがミオシンから荷降ろしされてしまうのを防いでいることが明らかになった。



ミトコンドリアの荷降ろしはミトコンドリアの正常な機能の維持に必要である

DMA1 DMA2 二重欠損株でミトコンドリアの機能を調べたところ、呼吸活性が異常に亢進していた。呼吸活性が亢進しすぎると、細胞にとって有害な活性酸素が多く産出される。実際に、*DMA1 DMA2* 二重欠損株では活性酸素が多く産出されていた。また、それに伴って *DMA1 DMA2* 二重欠損株は活性酸素に対して脆弱になっていた。この様に、ミトコンドリアの正常な荷降ろし (図6)



は、ミトコンドリアの活性の調節や細胞の活性酸素耐性に欠かせないことが明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Bessho-Uehara Kanako, Masuda Kengo, Wang Diane R., Angeles-Shim Rosalyn B., Obara Keisuke, Nagai Keisuke, Murase Riri, Aoki Shin-ichiro, Furuta Tomoyuki, Miura Kotaro, Wu Jianzhong, Yamagata Yoshiyuki, Yasui Hideshi, Kantar Michael B., Yoshimura Atsushi, Kamura Takumi, McCouch Susan R., Ashikari Motoyuki	4. 巻 120
2. 論文標題 Regulator of Awn Elongation 3, an E3 ubiquitin ligase, is responsible for loss of awns during African rice domestication	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2207105120	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 Nakatsukasa Kunio, Wigge Sylvia, Takano Yuki, Kawarasaki Tomoyuki, Kamura Takumi, Brodsky Jeffrey L.	4. 巻 68
2. 論文標題 A positive genetic selection for transmembrane domain mutations in HRD1 underscores the importance of Hrd1 complex integrity during ERAD	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Current Genetics	6. 最初と最後の頁 227 ~ 242
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00294-022-01227-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Nakatsukasa Kunio, Fujisawa Munetaka, Yang Xiaotan, Kawarasaki Tomoyuki, Okumura Fumihiko, Kamura Takumi	4. 巻 626
2. 論文標題 Triacylglycerol lipase Tgl4 is a stable protein and its dephosphorylation is regulated in a cell cycle-dependent manner in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 85 ~ 91
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2022.08.022	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Obara Keisuke, Yoshikawa Taku, Yamaguchi Ryu, Kuwata Keiko, Nakatsukasa Kunio, Nishimura Kohei, Kamura Takumi	4. 巻 13
2. 論文標題 Proteolysis of adaptor protein Mmr1 during budding is necessary for mitochondrial homeostasis in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-022-29704-8	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 Okumura Fumihiko, Oki Nodoka, Fujiki Yuha, Ikuta Rio, Osaki Kana, Hamada Shun, Nakatsukasa Kunio, Hisamoto Naoki, Hara Taichi, Kamura Takumi	4. 巻 11
2. 論文標題 ZSWIM8 is a myogenic protein that partly prevents C2C12 differentiation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-00306-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakatsukasa Kunio, Wigge Sylvia, Takano Yuki, Kawarasaki Tomoyuki, Kamura Takumi, Brodsky Jeffrey L.	4. 巻 68
2. 論文標題 A positive genetic selection for transmembrane domain mutations in HRD1 underscores the importance of Hrd1 complex integrity during ERAD	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Current Genetics	6. 最初と最後の頁 227 ~ 242
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00294-022-01227-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Kusama Kino, Suzuki Yuta, Kurita Ena, Kawarasaki Tomoyuki, Obara Keisuke, Okumura Fumihiko, Kamura Takumi, Nakatsukasa Kunio	4. 巻 25
2. 論文標題 Dot6/Tod6 degradation fine-tunes the repression of ribosome biogenesis under nutrient-limited conditions	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 103986 ~ 103986
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2022.103986	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Obara Keisuke, Higuchi Mai, Ogura Yuki, Nishimura Kohei, Kamura Takumi	4. 巻 25
2. 論文標題 Rapid turnover of transcription factor Rim101 confirms a flexible adaptation mechanism against environmental stress in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 651 ~ 662
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12801	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nishimura Kohei, Yamada Ryotaro, Hagihara Shinya, Iwasaki Rie, Uchida Naoyuki, Kamura Takumi, Takahashi Koji, Torii Keiko U, Fukagawa Tatsuo	4. 巻 48
2. 論文標題 A super-sensitive auxin-inducible degron system with an engineered auxin-TIR1 pair	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Research	6. 最初と最後の頁 e108 ~ e108
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/nar/gkaa748	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計11件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 野中一輝、小原圭介、西村浩平、嘉村巧
2. 発表標題 出芽酵母短寿命タンパク質Nih1によるグルコース飢餓応答遺伝子の発現調節
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 永本愛奈、酒井洋二、西村浩平、小原圭介、嘉村巧
2. 発表標題 HECT型E3リガーゼMtn1によるリボソーム生合成の調節機構の解析
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小川佳孝、小原圭介、西村浩平、嘉村巧
2. 発表標題 迅速かつ低毒性に標的タンパク質を分解するTPB-ssAIDシステムの開発
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 福原佳乃、西村浩平、小原圭介、嘉村巧
2. 発表標題 ヒト培養細胞におけるピルビン酸キナーゼの活性制御機構の解明
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 深瀬文奈子、佐々木怜菜、小原圭介、西村浩平、嘉村巧
2. 発表標題 出芽酵母Tsk1はSnf1依存的低グルコース応答シグナルの負の制御因子である
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大喜多葵、熊崎健太、岡田啓希、久保佳蓮、西村浩平、小原圭介、大矢禎一、嘉村巧
2. 発表標題 最後の機能未知必須遺伝子PBR1の機能解析
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小倉佑季、小原圭介、小林恵里花、西村浩平、吉田知史、嘉村巧
2. 発表標題 娘細胞特異的因子Dse3はRho1-GAPの調節を通して細胞壁合成を正に制御する
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松本佳紘, 渡辺祥太郎, 西村浩平, 小原圭介, 嘉村巧
2. 発表標題 出芽酵母Tmc1の亜ヒ酸応答に関する機能解明
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉川 拓、小原 圭介、西村 浩平、嘉村 巧
2. 発表標題 アダプタータンパク質Mmr1の選択的分解によるミトコンドリアの局在と機能の制御
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小倉 佑季、小原 圭介、西村 浩平、嘉村 巧
2. 発表標題 出芽酵母Dse3は極性成長時の細胞壁合成を促進する
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小原 圭介、小林 恵里花、西村 浩平、嘉村 巧
2. 発表標題 娘細胞特異的因子Dse3は出芽酵母の極性成長時の細胞壁合成を促進する
3. 学会等名 第72回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<https://sites.google.com/view/kamura-lab/%E3%83%9B%E3%83%BC%E3%83%A0>
嘉村研へようこそ
<https://sites.google.com/view/kamura-lab/%E3%83%9B%E3%83%BC%E3%83%A0>

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			
米国	Cornell University	University of Hawai'i	University of Pittsburgh	
米国	University of Pittsburgh			
米国	The University of Texas			