

令和 6 年 5 月 25 日現在

機関番号：82609

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20H03214

研究課題名(和文) プロテアソーム結合ユビキチンリガーゼによるタンパク質分解制御

研究課題名(英文) Regulation of protein degradation by proteasome-interacting ubiquitin ligases

研究代表者

土屋 光 (TSUCHIYA, Hikaru)

公益財団法人東京都医学総合研究所・基礎医科学研究分野・主任研究員

研究者番号：90760132

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：従来、ユビキチン化された基質タンパク質はプロテアソームに直接認識され分解されると信じられてきたが、プロテアソームと一過的かつ極微量に相互作用する様々な相互作用タンパク質群がプロテアソームの活性を制御することがわかってきた。我々はプロテアソームと相互作用するタンパク質群の解析によりユビキチンリガーゼE6APがプロテアソームと相互作用することを見出した。さらに、E6APがRpn10(ユビキチン受容体)の機能未知ドメインに相互作用し、新生不良タンパク質の分解に関与することを明らかとした。さらに、ユビキチンリガーゼUBE3BもRpn10の新規結合ドメインと相互作用することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

E6APの変異がアンジェルマン症候群(重度の発育・精神遅滞疾患)の原因遺伝子として30年以上解析されているが、その機能に関しては殆どわかっていない。本研究はプロテアソームとの相互作用の観点から疾患性のユビキチンリガーゼの機能を解析するものであり新たな治療薬開発の分子基盤になることが期待される。また、これまでプロテアソームが直接ユビキチン化基質を認識するという従来のモデルに対し、「ユビキチンリガーゼによりプロテアソーム上で基質の分解活性が制御される」というユビキチン・プロテアソーム系の基本的な作動機構について新規に提案している点で学術的意義が高い。

研究成果の概要(英文)：The ubiquitin-proteasome system regulates various biological phenomena by performing selective proteolysis. Ubiquitinated substrates are directly recognized and degraded by the proteasome directly. However, it is gradually becoming clear that various interacting proteins that interact with the proteasome in a transient and sub-stoichiometric manner can positively or negatively regulate the proteasomal degradation cycle. We found that several disease-related ubiquitin ligases, such as the ubiquitin ligase E6AP (responsible for Angelman syndrome, autism, and cervical cancer), interact with the proteasome through comprehensive analysis of proteins interacting with the proteasome. They found that E6AP interacts with a domain of unknown function of Rpn10 (ubiquitin receptor) and is involved in the degradation of abnormal proteins. Furthermore, we found that the ubiquitin ligase UBE3B also interacts with the novel binding domain of Rpn10.

研究分野：タンパク質分解

キーワード：タンパク質分解 ユビキチン

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

プロテアソームはユビキチン化されたタンパク質を選択的に分解することにより、細胞周期の進行やシグナル伝達、タンパク質品質管理など広範な生命現象において必須の役割を果たすことが明らかとなっている。従来、プロテアソームは3つのユビキチン受容体(Rpn1、Rpn10、Rpn13)を介してユビキチン化された基質タンパク質を直接認識し分解へ導くと考えられてきた。しかし、近年ではプロテアソームと相互作用するタンパク質群(PIPs: Proteasome interacting proteins)が同定され、基質タンパク質の分解を厳密に制御することがわかってきた。我々は、これまでにPIPsによるプロテアソーム制御機構に関する研究を行ってきた。まず、質量分析計を用いたユビキチン結合分子の網羅的解析により、出芽酵母ではプロテアソーム基質の約90%がプロテアソームに直接認識されるのではなく、シャトル分子RAD23、UBQLNを用いた「シャトル経路」により運搬されていることを明らかとした(Tsuchiya et al, *Mol Cell*, 2017)。さらに、哺乳類細胞においてストレス依存的に液-液相分離により生じるプロテアソーム核内 foci (核内のタンパク質品質管理に関与)の形成にRAD23Bが必須の役割を果たすことを明らかにした。プロテアソームに運ばれた後も、脱ユビキチン化酵素によるユビキチン鎖の除去や、ユビキチンリガーゼによるユビキチン鎖の伸長など、基質タンパク質の分解がプロテアソーム上で厳密に制御されていることが想定されている。しかしながら、プロテアソームとの結合が一過的かつ微量であるため、PIPsを介したプロテアソーム機能制御の全容は不明である。また、シャトル経路はプロテアソーム分解の大部分を仲介することから、シャトル分子による基質運搬とPIPsによるプロテアソーム分解制御は共役していることが予想されるが、PIPsの使い分けや機能連携についての分子機構は不明であった。

2. 研究の目的

本研究では、

(1) ユビキチンリガーゼ E6AP のプロテアソーム上での機能を明らかにする。特にストレスにより生じたユビキチン化タンパク質のクリアランスに及ぼす影響を検討する。

(2) プロテアソームのユビキチン受容体と相互作用する新規ユビキチンリガーゼの同定を試みる。またその結合領域の特定を試みる。

3. 研究の方法

ストレスにより生じるユビキチン化タンパク質の分解に与える影響を細胞分画法を用いて解析する。

ユビキチン受容体のリコンビナントタンパク質を作製し、細胞抽出液と混合し、直接結合するユビキチンリガーゼ群を高分解能質量分析計により網羅的に探索する。

4. 研究成果

まず、E6APの有無によるプロテアソーム上でのユビキチン鎖の蓄積を検討した。コントロールまたはE6APノックダウン細胞からプロテアソームを免疫沈降し、共沈降するユビキチン化基質及び主要なPIPsの量を検討した。同時にプロテアソーム阻害剤

Bortezomib 処理も実施し、プロテアソーム阻害剤処理による変動も検討した。その結果、プロテアソーム上のユビキチン化基質や PIPs の変動には特に変化が見られなかった。

通常状態ではプロテアソームの活性に変化が見られなかったことから、ストレス刺激による変動の解析を試みた。コントロール及び E6AP ノックダウン細胞をタンパク質毒性ストレス刺激後回収し、界面活性剤可溶性画分と不溶性画分に分離した。

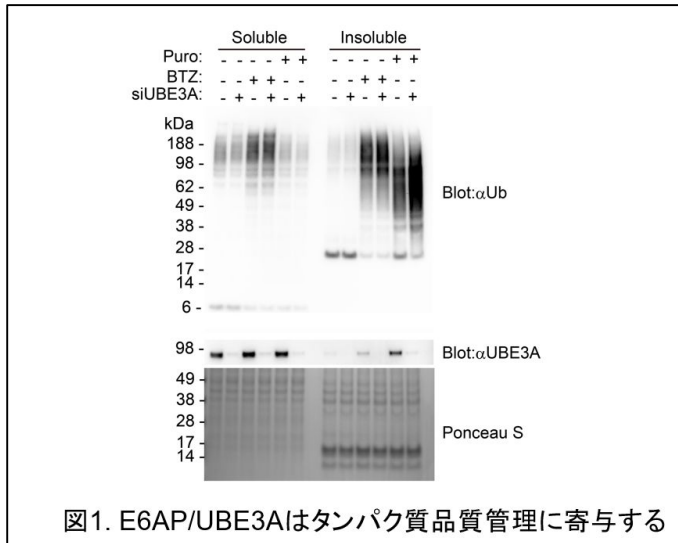


図1. E6AP/UBE3Aはタンパク質品質管理に寄与する

それぞれの画分に含まれるユビキチン化タンパク質の量をウェスタンブロット解析によりした。この結果、E6AP ノックダウンによりストレス依存的に界面活性剤不溶性画分にユビキチン化タンパク質が蓄積することが明らかとなった (図 1)。

ストレス依存的なタンパク質分解機構の解析のためプロテアソーム及び PIPs の局在解析を実施した。その結果、タンパク質毒性ストレスによりプロテアソームが顆粒構造を形成することを見出した。この顆粒構造は刺激を除くと解消されることから可逆的かつ一過的な構造体であることが明らかとなった。よって、この構造体はほぼ球状の形状をもち、液 - 液相分離により生じたドロップレット (液滴) であることが推察された。また、免疫染色の結果、この構造体はユビキチンおよび E6AP 陽性であることが明らかとなった。

プロテアソームのユビキチン受容体 (RPN10, RPN13, RPN1) と共役する新規ユビキチンリガーゼを同定するためユビキチンリガーゼと直接結合するユビキチンリガーゼの探索を試みた。ALFA タグ融合ユビキチン受容体のリコンビナントタンパク質を精製し、細胞抽出液と混合し相互作用するタンパク質群を質量分析計による同定を行った。この結果、既知の E6AP、UBE3C の他に UBE3B がプロテアソームのユビキチン受容体が相互作用することが示唆された。試験管内の結合実験により UBE3B は E6AP と同様に RPN10 の C 末端

領域特異的に結合することが明らかとなった (図 2)。よって UBE3B は RPN10 によるユビキチン鎖の認識と協調してプロテアソームによるタンパク質分解を制御することが示唆された。

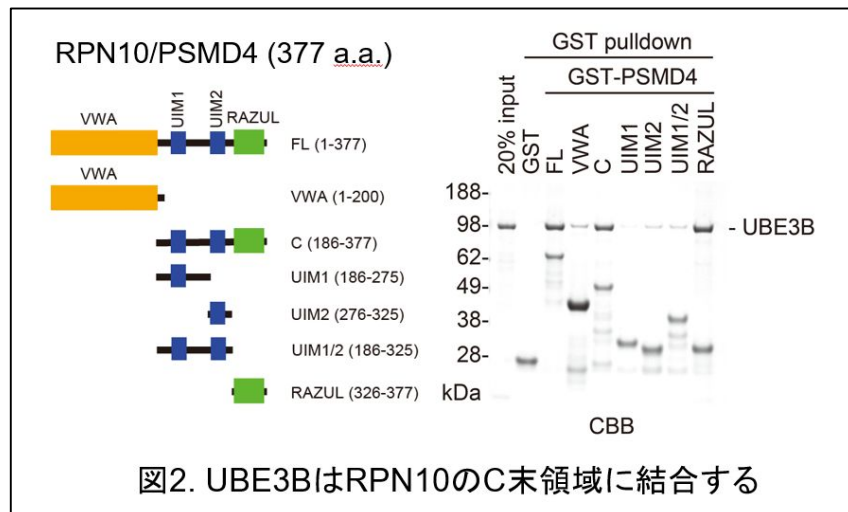


図2. UBE3BはRPN10のC末領域に結合する

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

| |
|------------------------------------|
| 1. 発表者名 土屋光、佐伯泰 |
| 2. 発表標題 プロテアソーム液滴基質のプロテオーム解析 |
| 3. 学会等名 日本プロテオーム学会2021年大会（招待講演） |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Tsuchiya Hikaru, Kei Okatsu, Fukai Shuya, Yasushi Saeki |
| 2. 発表標題 The ubiquitin ligase UBE3A negatively regulates the 26S proteasome by ubiquitylation of PSMD4 |
| 3. 学会等名 第43回 日本分子生物学会年会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 土屋光、佐伯泰 |
| 2. 発表標題 Ubiquitylation-dependent phase separation of the proteasome |
| 3. 学会等名 第64回日本神経病理学会総会学術研究会、第66回日本神経化学会大会合同大会（招待講演） |
| 4. 発表年 2023年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

蛋白質代謝研究室ホームページ
<https://www.igakuken.or.jp/pro-meta/>

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|