

令和 5 年 5 月 30 日現在

機関番号：82609

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06568

研究課題名(和文) ユビキチン非依存的プロテアソーム分解機構の解析

研究課題名(英文) Ubiquitin independent proteasomal degradation

研究代表者

遠藤 彬則 (ENDO, Akinori)

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：50796844

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)：本研究課題では、質量分析によりユビキチン非依存性プロテアソーム基質(Ubiquitin Independent Substrate: UIS)を複数同定した。その中で、UIS1について、生化学的な解析を進め、試験管再構築系でユビキチン非依存的にプロテアソームにより分解されること、26Sプロテアソームよりも20Sプロテアソームに効率的に分解されることを見出した。また、本課題で改良を進めたプロテオーム解析系を応用し、標的タンパク質分解誘導剤PROTAC (proteolysis-targeting chimera)などの分子機構解析や新型コロナウイルス研究などに大きく貢献した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

プロテアソームは、細胞内の異常タンパク質や不必要なタンパク質を選択的に分解することにより広範な生命現象を制御している。一般的に、プロテアソームはユビキチン化されたタンパク質を選別し分解すると考えられており、ユビキチン化を介さないプロテアソーム分解の分子機構や生物学的な重要性は未だに不明瞭であった。本研究では、それら基質を網羅的に同定し、生化学的な解析を行った。今後はその生物学的の解明など、さらなる発展が期待される。

さらに、本研究課題で改良したプロテオーム解析法は、新たな創薬として注目を浴びているPROTACなどの分子機構解析に非常に有用であることが示された。

研究成果の概要(英文)：In this research project, we identified several ubiquitin-independent proteasome substrates (UIS) by proteomic screening. Among them, we found that UIS1 is ubiquitin-independently degraded by proteasomes in vitro and is more efficiently degraded by 20S proteasomes than 26S proteasomes.

In addition, the proteome analysis improved by this project has contributed to many research, such as the molecular mechanism analysis of PROTAC (proteolysis-targeting chimera) and analysis of COVID-19.

研究分野：細胞生物学

キーワード：プロテアソーム ユビキチン 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

ユビキチン・プロテアソーム系は、オートファジー・リソソーム系と並ぶ細胞内の二大タンパク質分解システムである。プロテアソームによる選択的タンパク質分解制御は、広範な生命現象を制御しており、その破綻は神経変性疾患やがんなどの様々な疾患を引き起こすことがわかってきた。

ユビキチン化と共役したプロテアソーム依存的タンパク質分解の分子機構については、この20年余の間に爆発的に研究が進展し、ユビキチンリガーゼによる標的タンパク質のユビキチン化や、プロテアソームによるユビキチン化基質の補足と分解など、その全体像が明らかにされつつある。一方で、ユビキチン化を介さずプロテアソームにより直接分解されるタンパク質 (Ubiquitin Independent Substrate : UIS) の存在が以前より示唆されている。例えば、酸化により損傷を受けたタンパク質やポリアミン生合成を制御する ODC (オルニチン脱炭酸酵素) は、ユビキチン化されずにプロテアソームにより分解されることが報告されている。しかし、いずれも試験管内のみの解析であり、細胞内で実際に直接分解が起こっているのかは依然として不明である。そして、もしプロテアソームによる直接分解機構が存在するとなると、その規模はどの程度なのか？プロテアソームによる分解の選択性と時期特異性はどのように制御されているのか？など未解明のままであった。

2. 研究の目的

本研究は、UISの網羅的同定、個々の分解基質の機能解析を通じて、これまで見過ごされてきた「ユビキチン非依存的プロテアソーム分解機構」の分子メカニズムを解明することを目的とした。特に以下の点に焦点を当てた。

(1) 直接分解の規模：UISの網羅的同定を試み、プロテアソーム基質の何%がユビキチン非依存的に分解されるのかを明確にする。

(2) 直接分解の分子メカニズム・生理的意義：同定した新規分解基質のデグロン領域あるいは結合タンパク質を決定することで、ユビキチン非依存的プロテアソーム分解の分子メカニズムを解明する。次いで、それら基質のデグロン配列変異体などを用いてユビキチン非依存的プロテアソーム分解の生理的意義の一端を解明する。

以上の解析を通じて、どの程度のタンパク質がユビキチン化を介さずにプロテアソームで分解されるのか、それらの基質は共通の認識機構によりプロテアソームで分解されるのか、ユビキチン非依存的プロテアソーム分解の普遍性あるいは特殊性を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) UISの網羅的な同定

タンパク質の比較定量解析法 (TMT 10-plex) を確立し、通常培養条件下におけるUISを網羅的に同定する。本方法のさらなる高深度化により未知の分解基質をより網羅的に同定できることが期待されるため、前分画やイオン導入部装置の最適化など技術的な改良によりタンパク質同定数の向上を目指す。

UISは、プロテアソーム阻害でタンパク質量が増加する一方、ユビキチン化反応阻害で変化しない。また、タンパク質合成阻害下で減少する基質の発現量は、プロテアソーム阻害で回復する一方、ユビキチン化反応阻害に影響を受けない。そこで、プロテアソーム阻害剤あるいはユビキチン化酵素 E1 阻害剤をタンパク質合成阻害剤と同時に処理し、それらのプロテアソーム解析からこのような挙動を示すタンパク質群を探索する。

(2) ユビキチン非依存的プロテアソーム分解機構の解明

既に同定済みで解析準備ができている UIS1 は、天然変性領域と helix-loop-helix 構造を持つ。部分欠失変異体あるいは点変異体の解析により、UIS1 のユビキチン非依存的デグロン領域を決定する。次に、質量分析 (IP-MS) で UIS1 の結合因子を同定、その分解に関与する可能性のあるタンパク質を探索し、それらの機能解析を行う。また、プロテアソームが直接結合で UIS1 を認識、分解する可能性が高いため、再構築系でのプロテアソーム結合および分解アッセイを行う。さらに、2 価数のクロスリンカーを用いた質量分析 (クロスリンク MS) で UIS1 とプロテアソームの直接結合サイトをマッピングし、高次構造情報を得る。(1) で新規分解基質の同定に成功した場合、UIS1 と同様に解析し、その普遍性などを評価する。以上の解析から、ユビキチン非依存的プロテアソーム分解機構の解明を目指す。

(3) ユビキチン非依存的プロテアソーム分解の生物学的意義の探求

UIS1 は、helix-loop-helix 構造を介して複数種の転写因子とヘテロ二量体を形成し、広義の共役転写因子として筋分化を抑制することなどが報告されている。そこで、筋分

化誘導に適した細胞種に野生型および非分解性 UIS1 変異体を発現させ、UIS1 のユビキチン非依存的プロテアソーム分解が細胞の筋分化誘導に關与するかを解析する。(1)で、新規分解基質の同定に成功した場合、UIS1 と同様に非分解性変異体を適した細胞種に発現させ、個々の基質が制御する細胞機能へ及ぼす影響を解析する。以上の解析から、ユビキチン非依存的プロテアソーム分解の生物学的意義を探る。

4. 研究成果

本研究課題では、質量分析により UIS を複数同定した。通常培養条件下では、同定した約 9,000 種のタンパク質の中で、UIS1 を含めて数種類のみがユビキチン非依存的にプロテアソームで分解されており、非常に限定的であることが示された。UIS1 について、生化学的な解析を進め、試験管再構築系でユビキチン非依存的にプロテアソームにより直接分解されること、26S プロテアソームよりも 20S プロテアソームに効率的に分解されることを見出した。

また、本課題で改良を進めたプロテオーム解析系を応用し、標的タンパク質分解誘導剤 PROTAC (proteolysis-targeting chimera) などの分子機構解析や新型コロナウイルス研究などに大きく貢献した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Akizuki Yoshino, Morita Mai, Mori Yuki, Kaiho-Soma Ai, Dixit Shivani, Endo Akinori, Shimogawa Marie, Hayashi Gosuke, Naito Mikihiro, Okamoto Akimitsu, Tanaka Keiji, Saeki Yasushi, Ohtake Fumiaki	4. 巻 19
2. 論文標題 cIAP1-based degraders induce degradation via branched ubiquitin architectures	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Chemical Biology	6. 最初と最後の頁 311 ~ 322
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41589-022-01178-1	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 -

1. 著者名 Ishigaki Hirohito, Yasui Fumihiko, Nakayama Misako, Endo Akinori, ..., Kohara Michinori	4. 巻 13
2. 論文標題 An attenuated vaccinia vaccine encoding the severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 spike protein elicits broad and durable immune responses, and protects cynomolgus macaques and human angiotensin-converting enzyme 2 transgenic mice from severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 and its variants	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	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) 10.3389/fmicb.2022.967019	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 Yokoo Hidetomo, Shibata Norihito, Endo Akinori, Ito Takahito, Yanase Yuta, Murakami Yuki, Fujii Kiyonaga, Hamamura Kengo, Saeki Yasushi, Naito Mikihiro, Aritake Kosuke, Demizu Yosuke	4. 巻 64
2. 論文標題 Discovery of a Highly Potent and Selective Degradator Targeting Hematopoietic Prostaglandin D Synthase via In Silico Design	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Medicinal Chemistry	6. 最初と最後の頁 15868 ~ 15882
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jmedchem.1c01206	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6件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Akinori Endo
2. 発表標題 Phase transition of ubiquitylated proteins triggered by ATP depletion
3. 学会等名 The 23rd TMIMS International Symposium "New Frontiers in Ubiquitin Proteasome System" (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Akinori Endo
2. 発表標題 Phase transition of ubiquitylated proteins triggered by ATP depletion
3. 学会等名 "Ubiquitin New Frontier from Neo-biology to Targeted Protein Degradation" (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 遠藤 彬則、田中 啓二、佐伯 泰
2. 発表標題 細胞内ATPレベル低下によるユビキチン・プロテアソーム液滴の形成機構
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐久間 海帆、遠藤 彬則、千葉 和義、田中 啓二、佐伯 泰
2. 発表標題 ユビキチン非依存性プロテアソーム基質の解析
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 遠藤 彬則
2. 発表標題 RAD23B drives polyubiquitin chain-dependent phase separation of the proteasome
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐久間 海帆、遠藤 彬則、千葉 和義、田中 啓二、佐伯 泰
2. 発表標題 ユビキチン非依存性プロテアソーム基質の解析
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

公益財団法人 東京都医学総合研究所 蛋白質代謝研究室 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
---------	---------