

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：32309

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06859

研究課題名(和文) 翻訳後修飾変化を介したプロテアソームの活性低下による細胞老化機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of cell aging mechanisms through posttranslational modification-induced downregulation of proteasome activity

研究代表者

木村 鮎子 (Kimura, Ayuko)

群馬パース大学・医療技術学部・講師

研究者番号：50553616

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、質量分析による翻訳後修飾解析手法等を用いたヒト老化モデル細胞株の解析により、細胞老化過程におけるプロテアソームサブユニットの翻訳後修飾変化とタンパク質分解系の変化を明らかにすることを試みた。結果として、老化モデル細胞株ではプロテアソームの活性低下とポリユビキチン化タンパク質の蓄積が見られ、その中にはアポトーシスに関わる膜タンパク質やタンパク質毒性ストレス応答に関わるユビキチン化関連酵素などが含まれていることが分かった。また、老化モデル細胞では、K63結合型ポリユビキチン化タンパク質の蓄積と共に、K48・K63結合型ユビキチンの細胞内局在が大きく変化していることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

プロテアソーム活性の増減が細胞の老化や寿命、がん化に関わることは以前から報告されていたが、本研究ではその生理的意義について、細胞内ユビキチン化タンパク質の比較プロテオーム解析手法を用いて初めて明らかにすることができた。今回の解析で、老化モデル細胞特異的な増加が見られる種々のユビキチン化タンパク質が明らかにされたことにより、老化や老化関連疾患の分子機構解明が進み、深刻化の懸念される超高齢社会に伴う医療問題の解決の糸口となることが期待される。

研究成果の概要(英文)： In current analysis, authors analyzed the posttranslational modifications on proteasome subunits and changes in ubiquitin proteome using model cell lines of cell aging to reveal the mechanisms underlying cell senescence and aging-related diseases. Western blot and in-gel activity assay of proteasome indicated the significant decrease of proteasome activity and increase of polyubiquitinated proteins in aged cell lines. Ubiquitin proteome analysis also revealed the upregulation of enzymes involved in protein ubiquitination, proteins involved in age-related disorder, and ubiquitination of membrane proteins involved in apoptosis in aged cell line. In addition, western blot and immunocytochemistry analyses showed the increase of K63-linked ubiquitin and altered intracellular localizations of K48- and K63-linked ubiquitins.

研究分野：プロテオミクス

キーワード：ユビキチン 細胞老化 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

プロテアソームは、ポリユビキチン鎖の共有結合による標識を目印としたタンパク質分解を介して、細胞内でのタンパク質の機能発現を制御しており、細胞周期・ストレス応答や、タンパク質の品質管理に関わるタンパク質複合体である。タンパク質品質管理機構の破綻による構造異常タンパク質の蓄積は、アミロイド沈着によるパーキンソン病やアルツハイマー病などの神経変性疾患を引き起こす。これらの神経変性疾患は加齢そのものが発症リスクとなり、それには老化に伴うプロテアソーム活性の低下が大きく関わると考えられている。マウスでは、加齢に伴うプロテアソーム活性の顕著な低下が報告されている一方で、プロテアソーム Rpn6 サブユニットの強制発現による細胞内プロテアソームの増加によって線虫の寿命が二倍になること、酵母やヒトのがん細胞など、増殖の盛んな「若い」細胞ではプロテアソームが過剰に活性化されていることも確認されており、プロテアソーム活性の増減が加齢に伴う表現型変化や寿命に関わることが示唆される。しかしながら、プロテアソームの活性化やそれに伴う老化に関わる分子機構については、ほとんど解明されていない。

出芽酵母を用いたこれまでの解析から、プロテアソームの活性は、66 の構成サブユニットで検出された 345 の修飾部位に生じる様々な翻訳後修飾により、ダイナミックに制御されることが明らかになりつつある。研究代表者らはその中でも、複合体中で唯一の脂質修飾であり真核細胞で広く保存されている N-ミリスチル化が、長期培養による酵母の老化に伴ってプロテアソームの細胞内局在やタンパク質分解系を大きく変化させることを明らかにしてきた。さらに、N-ミリスチル化酵素の発現量の異なる癌培養細胞株を用いたユビキチン化タンパク質のプロテオーム解析 (ユビキトーム解析) を行い、本修飾が様々なストレス関連タンパク質の分解に関わることも明らかにしてきた。

2. 研究の目的

上記の知見から研究代表者は、老化や加齢で発症リスクが高まる老化疾患において、プロテアソーム構成サブユニットにおける何らかの翻訳後修飾変化とタンパク質分解系の変化が生じているのではないかとこの着想に至り、プロテオーム解析技術と種々の生化学的解析手法を駆使して、その詳細な分子機構の解明を目的とする本研究を計画した。

3. 研究の方法

1) 研究材料

老化・若齢モデル細胞株として、集団倍価数 (PDL) の異なる 2 種類のヒト正常二倍体線維芽細胞 TIG1-20 (PDL=20:若齢細胞モデル) と TIG1-50 (PDL=50:老化細胞モデル、いずれも JCRB 細胞バンクより入手) を実験に用いた。細胞は、10% FBS を添加した DMEM 培地を用いて、37°C の 5% CO₂ インキュベーター内にて培養した。

2) ユビキチン化タンパク質のウエスタンブロット解析

TIG1-20 および TIG1-50 細胞株より、Protease Inhibitor Cocktail (EDTA free) (ナカライテスク社) および脱ユビキチン化酵素阻害剤 PR-619 (#SI9619, Life Sensors 社) を添加した細胞溶解バッファー (8M 尿素、20 mM HEPES pH8.0) を用いてタンパク質を抽出し ($n = 3$)、20 μ g 分のタンパク質抽出液を 5-20% グラジエントゲル (和光純薬) を用いた SDS-PAGE にて分画した。TransBrot Turbo 転写システムを用いてタンパク質を PVDF 膜に転写し、HRP 標識した抗ユビキチン抗体 (#sc-8017 HRP, Santa Cruz 社) を用いてユビキチンタンパク質のウエスタンブロットを行った。

3) 細胞抽出液を用いたプロテアソーム活性の測定

A. S. Yazgili らの方法 (STAR Protoc. 2021, 2(2):100526) を参考に、以下の方法でプロテアソームのカスパーゼ活性の測定を行った。TIG1-20 および TIG1-50 細胞株から OK Lysis バッファー (50 mM Tris-HCl pH7.5, 2 mM DTT, 5 mM MgCl₂, 10% (v/v) Glycerol, 2 mM ATP, 0.05% (v/v) Digitonin) を用いてタンパク質を抽出し、30 μ g のタンパク質を含む細胞抽出液に 1/4 量の 5x Native Gel Loading Buffer (250 mM Tris-HCl pH 7.5, 43.5% Glycerol, 0.05% (w/v) Bromophenol Blue) を加えて泳動用試料とした。3-8% グラジエントゲル (Novex 社) を用いて Native gel running buffer (1x TBE buffer, 413 μ M ATP, 2 mM MgCl₂, 0.5 mM DTT) 中で、150 V 定電圧、4°C、4 時間という条件で Native-PAGE を行った。泳動後のゲルに、カスパーゼの基質となる 48 μ M の Suc-LLVY-AMC を加えたプロテアソーム活性測定バッファー (50 mM 1M Tris-HCl pH7.5, 1 mM ATP, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT) を添加して 37°C で 30 分間、暗所でインキュベーションし、ImageQuant 800 Western blot imaging systems (Cytiva 社) を用いて、UV 照射下でゲル内のプロテアソームによるカスパーゼ活性の検出を行った。

4) プロテアソーム複合体の精製と質量分析

TIG1-20 および TIG1-50 細胞株をΦ150mm シャーレにそれぞれ 8 枚分ずつ培養して回収し、プールしたものを出発材料として Rapid 26S Proteasome Purification Kit (#J4320, UBP Bio 社)を用いて添付のマニュアル通りにプロテアソームの精製を行った。マニュアルからの変更点として、細胞抽出液を作成する際の細胞溶解バッファーに、Protease Inhibitor Cocktail (EDTA free) (ナカライテスク社)、Phosphatase inhibitor cocktail 2 and 3 (#P5726 and #0044, Merck 社)、脱ユビキチン化酵素阻害剤 PR-619 (#SI9619, Life Sensors 社)を添加した。

質量分析用サンプルとして、a) 精製したプロテアソーム原液 (1μg 分)、および b) a) の残りのサンプル全量を 5-20%グラジエントゲルを用いて SDS-PAGE で分画し、28 個のバンドに切り分けたもの (図 3)について、それぞれペプチド調製を行い、LTQ-Orbitrap Velo LC-MS (ThermoFisher Scientific 社)による分析を行った。

5) ユビキチン化プロテオーム解析

TIG1-20 および TIG1-50 細胞株から 2) と同様にタンパク質を抽出し ($n = 3$)、3 mg のタンパク質をトリプシン消化した後に、OASIS MCZ 6cc Extraction Cartridge (#186000256, Waters 社)を用いてペプチドを脱塩した。ここから PTM Scan HS K-ε-GG Remnant Magnetic Immunoaffinity Beads (#34608, Cell Signaling 社)を用いてユビキチン化痕跡ペプチド (K-ε-GG ペプチド)を濃縮し、C18-Stagetip を用いて再度脱塩を行ったものを用いて、LTQ-Orbitrap Velos LC-MS によるユビキチン化プロテオーム解析を行った。

6) K48, K63 結合型ユビキチン化タンパク質のウエスタンブロット解析および細胞免疫染色

TIG1-20 および TIG1-50 細胞株から 2) と同様にタンパク質を抽出し、30 μg 分のタンパク質を 5-20%グラジエントゲルを用いた SDS-PAGE で分離して PVDF 膜に転写した後、抗 K48 結合型ユビキチン特異的抗体 (#140601, Abcam 社)および抗 K63 結合型ユビキチン特異的抗体 (#179434, Abcam 社)を用いたウエスタンブロットを行った。

また、両細胞株を 8 ウェルチャンバースライドに播種して 4%パラホルムアルデヒドで固定した後、上記の抗体を用いて細胞免疫染色を行った。二次抗体には Alexa488 で標識した抗ウサギ IgG 抗体 (#A-11008, ThermoFisher Scientific 社)を用い、核を DAPI で染色して FITC・DPAI の蛍光フィルターを装着した蛍光顕微鏡にて検出を行った。

4. 研究成果

1) 老化・若齢モデル細胞株を用いたユビキチン化タンパク質のウエスタンブロット解析と細胞抽出液を用いたプロテアソーム活性の測定

ユビキチン化タンパク質のウエスタンブロットの結果、同じタンパク質量がロードされたブロットにおいて、TIG1-50 細胞株では TIG1-20 細胞株と比べてポリユビキチン化タンパク質のシグナルが増加している一方で、モノ・ジ・トリユビキチンの分子量に相当するシグナルの減少が確認された (図 1)。一方で、細胞抽出液を用いたプロテアソーム活性測定では、TIG1-20 細胞株と比べて TIG1-50 細胞株において活性型プロテアソーム (30S, 26S プロテアソーム)バンドの減少と、非活性型プロテアソーム (20S コアプロテアソーム)バンドの増加が見られた (図 2)。

これらの結果から、他のモデル生物と同様に、ヒトの老化モデル細胞においてもプロテアソームの活性低下とユビキチン化タンパク質の蓄積が生じていることが示唆された。

図1.

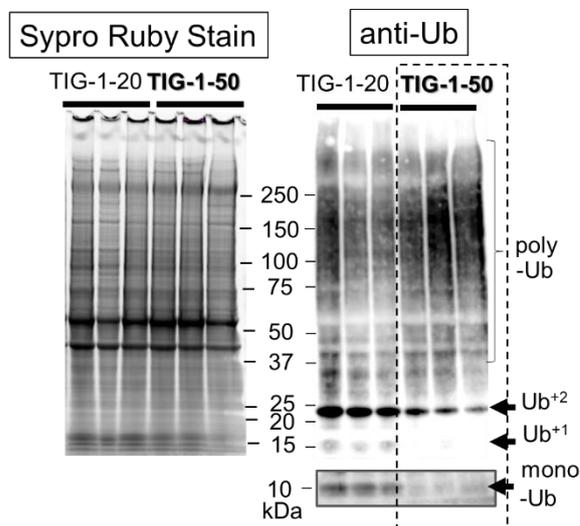
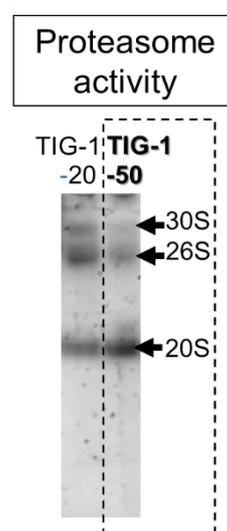


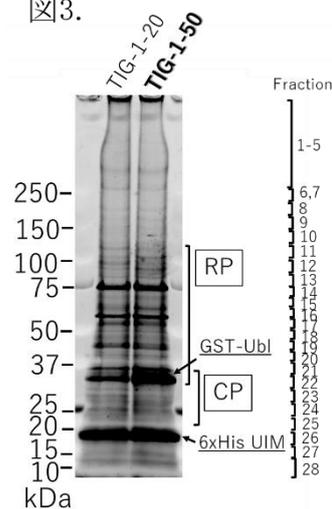
図2.



2) 老化・若齢モデル細胞株からのプロテアソームの精製と質量分析

図3のように、TIG1-20 および TIG1-50 細胞株からそれぞれプロテアソーム複合体を精製した。このうち 1 μ g 分についてそのままトリプシンで消化し、脱塩して質量分析を行った。さらに残りの全試料を SDS-PAGE 電気泳動で分画し、ゲルを 28 本のバンドに分けて切り出して、それぞれの試料についてプロテアソームサブユニットの検出と翻訳後修飾の探索を試みた。結果として、21 種類のプロテアソームサブユニットを同定し、酸化修飾を含むいくつかの翻訳後修飾が検出されたが、両細胞株間で差のある翻訳後修飾の同定には至らなかった。

図3.



3) 老化・若齢モデル細胞株を用いたユビキチン化プロテオーム解析

老化・若齢モデル細胞株を用いたユビキチン化プロテオーム解析 ($n = 3$)の結果、TIG1-20 細胞株から計 310 種類、TIG1-50 細胞株から計 399 種類のユビキチン化タンパク質が同定された。このうち、TIG1-50 細胞株でのみ 2 回以上検出された 24 種類のタンパク質について遺伝子オンロジー (GO) 解析を行った所、これらのうち 15 種類が膜タンパク質であることが分かった。TIG1-50 細胞株で 3 回とも検出された 4 つのタンパク質もまた、いずれも膜タンパク質であり、このうち 2 つはアポトーシスに関わる FAS 受容体およびプロスタグランジン E2 受容体であり、残り 2 つは、折り畳み不全タンパク質の分解に関わる小胞体膜タンパク質である LAP1 と、 β アミロイドの排出に関わる ABCC3 輸送体のタンパク質であった。また、TIG1-50 細胞株では、ポリユビキチンの分解によるユビキチンモノマーの再利用に関与する脱ユビキチン化酵素 USP5 や、老化した神経細胞でモノユビキチン化を受けて核に移行し、タンパク質毒性ストレス応答を引き起こす E3 ユビキチンリガーゼ Mgrn1 のユビキチン化ペプチドが増加していることも分かった。また、パーキンソン病やアルツハイマー病の発症に関わるいくつかのタンパク質についても、未修飾のペプチド量・ユビキチン化ペプチド量ともに、TIG1-50 サンプルで増加が確認された。加えて、TIG1-20 および TIG1-50 細胞株間では、K48, K11, K27/29 結合型ユビキチンの量に顕著な差異は認められなかったのに対し、K63 結合型ユビキチンについてのみ、TIG1-50 細胞株で増加が認められた。

これらの結果から、老化モデル細胞ではタンパク質分解系の変化に伴って、アポトーシスに関わる膜タンパク質や、折り畳み不全タンパク質の分解に関わるユビキチン化関連酵素そのもののユビキチン化が増加していることに加えて、非タンパク質分解系に関わる K63 結合型ポリユビキチン鎖も増加していることが明らかになった。

K63 結合型ポリユビキチン化は、DNA 修復やシグナル伝達などのプロテアソーム非依存性経路に関わると考えられるが、その詳細な機能については未解明な点が多く、老化との関連についてもこれまで全く情報がなかった。そこで、老化モデル細胞株における K48・K63 結合型ポリユビキチン化についてさらに検証するために、4) の実験を行った。

4) 老化・若齢モデル細胞株を用いた K48・K63 結合型ユビキチン化タンパク質のウェスタンブロット解析と細胞免疫染色による細胞内局在解析

K48・K63 結合型ユビキチンのウェスタンブロットの結果、上記の質量分析で得られた結果と一致して、TIG1-20・TIG1-50 細胞株間で K48 結合型ポリユビキチン鎖の量的差異は見られないのに対し、K63 結合型ポリユビキチン鎖については、TIG1-50 細胞株で若干の増加が見られた (図 4)。また、細胞免疫染色の結果、K48 結合型ユビキチンは TIG1-20, TIG1-50 細胞株のいずれにおいても主に核に局在していることに加えて、TIG1-50 細胞株では細胞膜上 (図 5, 矢印 m) と細胞質内にユビキチン化タンパク質の凝集によるものとみられるドット状のシグナル (図 5, 矢印 d) として検出された。一方、K63 結合型ユビキチンは、TIG1-20 細胞株では細胞質内に拡散したシグナルとして検出され、核内にはほとんどシグナルが見られなかったのに対し、TIG1-50 細胞株では細胞質内と核内の両方に同程度のシグナルが見られ、また、細胞質内にはドット状の強いシグナルが確認された (図 5)。

これらの結果から、老化モデル細胞ではタンパク質ユビキチン化システムの変化による K63 結合型ポリユビキチンの増加と、K48・K63 結合型ユビキチンの細胞内局在変化が生じていることが示唆された。老化モデル細胞の細胞膜上での K48 結合型ポリユビキチンの増加は、上記の質量分析において、老化モデル細胞で膜タンパク質のユビキチン化タンパク質が顕著に増加していた結果と合致している。また、老化モデル細胞の核内における K63 結合型ユビキチンの増加は、加齢に伴う DNA 変異の蓄積に伴い、既報の K63 鎖の生理機能の一つである DNA 損傷の修復が向上しているためとも予想され、いずれの局在パターン変化も、細胞老化と密接な関連があるものと考えられる。

図4.

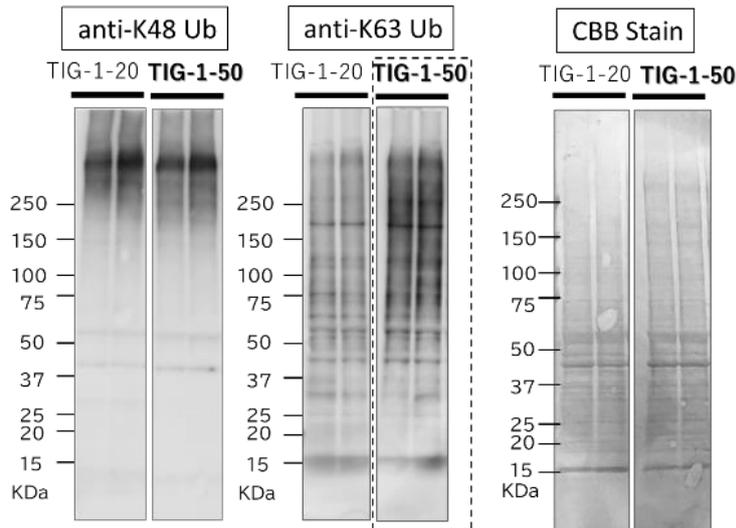
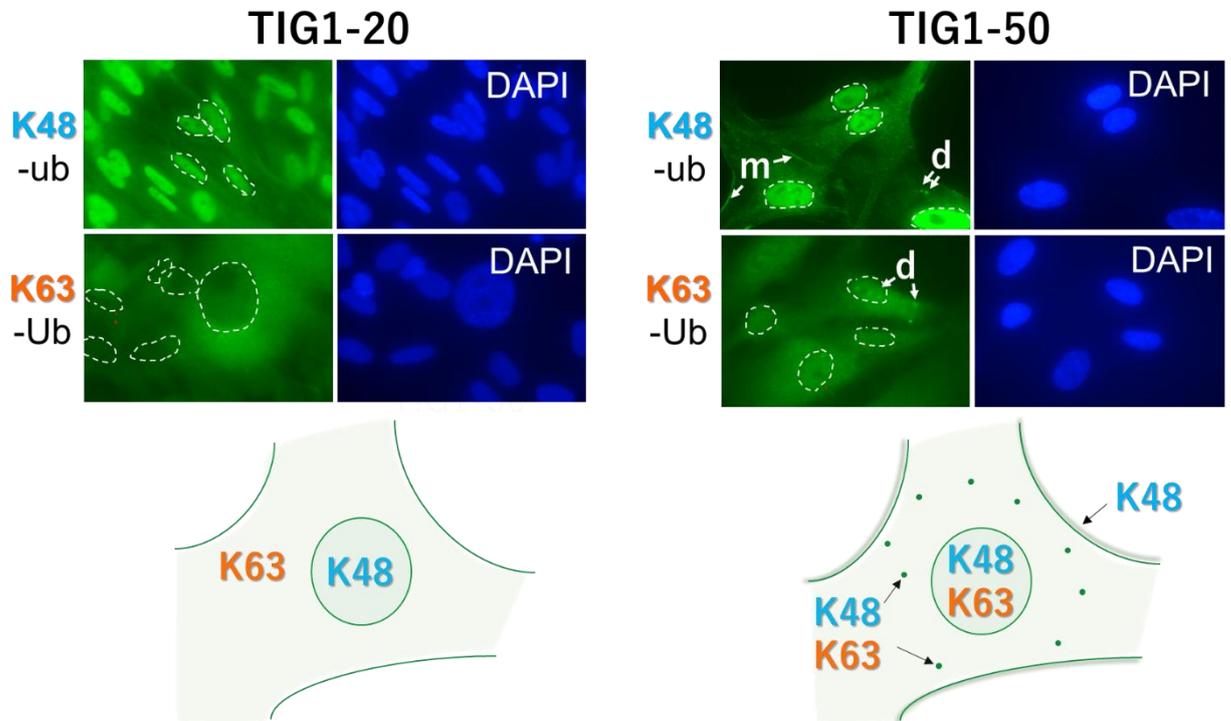


図5.



本研究の結果より、老化モデル細胞ではプロテアソームの活性低下とポリユビキチン化タンパク質の蓄積が生じており、その中にはアポトーシスやタンパク質毒性ストレス応答に関わる種々の膜タンパク質やユビキチン化関連酵素などが含まれることが分かった。当初の目的の一つであったプロテアソームの活性低下に関わる翻訳後修飾の特定には至らなかったが、老化モデル細胞では K63 結合型ポリユビキチンの増加と、K48・K63 結合型ユビキチンの局在変化が生じていることを初めて明らかにすることができた。今後は、DNA 損傷の修復やアポトーシス・膜輸送系に関わる非分解性ユビキチン化修飾である K63 結合型ユビキチン化と老化との関連について、さらに解明を進めていきたいと考えている。

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 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Hidetada Hirakawa, Ayuko Kimura, Ayako Takita, Sayaka Chihara, Koichi Tanimoto, Haruyoshi Tomita	4. 巻 Volume 3
2. 論文標題 Adsorption of extracellular proteases and pyocyanin produced by <i>Pseudomonas aeruginosa</i> using a macroporous magnesium oxide-templated carbon decreases cytotoxicity.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Current Research in Microbial Sciences	6. 最初と最後の頁 100160
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.crmicr.2022.100160	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 Ayuko Kimura, Noriaki Arakawa, Hiroyuki Kagawa, Yayoi Kimura, Hisashi Hirano	4. 巻 15
2. 論文標題 Phosphorylation of Ser1452 on BRG1 inhibits the function of the SWI/SNF complex in chromatin activation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Proteomics	6. 最初と最後の頁 1043
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jprot.2021.104319	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 Takashi Ohira, Yoko Ino, Yayoi Kimura, Yusuke Nakai, Ayuko Kimura, Yoichi Kurata, Hiroyuki Kagawa, Mitsuo Kimura, Kenji Egashira, Chie Matsuda, Yoshinobu Ohira, Satoshi Furukawa, Hisashi Hirano	4. 巻 7
2. 論文標題 Effects of microgravity exposure and fructo-oligosaccharide ingestion on the proteome of soleus and extensor digitorum longus muscles in developing mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 NPJ Microgravity	6. 最初と最後の頁 34
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41526-021-00164-6	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6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 高橋 佳佑、木村 鮎子、松下 誠、藤田 清貴
2. 発表標題 緑膿菌臨床分離株を用いたプロテオーム解析によるレボフロキサシン耐性関連因子の探索
3. 学会等名 日本臨床化学会第64回年次学術集会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 木村 鮎子, 岩野 かおり
2. 発表標題 ヒト正常繊維芽細胞株TIG-1を用いたコピキトーム解析による細胞老化機構の解析
3. 学会等名 日本プロテオーム2023年大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 木村 鮎子, 宮野 ゆかり, 富田 治芳, 平川 秀忠
2. 発表標題 Proteomic analysis for studying antibiotic resistance mechanisms of pseudomonas aeruginosa clinical isolates
3. 学会等名 Joint 11th AOHUPO and 7th AOAP0 Congress (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 林 由里子, 木村 鮎子, 岡山 香里, 長田 誠, 藤田 清貴
2. 発表標題 米国における臨床検査医学に関するオンライン講義の学習効果
3. 学会等名 第72回日本医学検査学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 平川秀忠、木村鮎子、滝田綾子、千原清加、谷本弘一、富田治芳
2. 発表標題 マクロ孔型多孔質炭素を利用した緑膿菌の細胞外病原性因子の吸着と弱毒化
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会/日本生物物理学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大川原佑季・木村 鮎子・林 由里子・平野 久・長田 誠
2. 発表標題 Phos-tag 対角線電気泳動を用いた血清中リン酸化タンパク質の解析法 の検討
3. 学会等名 第 72 回日本電気泳動学会総会
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
---------	---------