

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 8日現在

機関番号：13201

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22770137

研究課題名（和文） プロテアソーム阻害における Unstructured 領域の役割

研究課題名（英文） The role of an unstructured region in the proteasome inhibition

研究代表者

伊野部 智由（INOBE TOMONAO）

富山大学・先端ライフサイエンス拠点・特命助教

研究者番号：50568855

研究成果の概要（和文）：神経変性疾患を引き起こすミスフォールド蛋白質が、如何にしてプロテアソームの蛋白質分解活性を阻害するのか調べた。その結果、ミスフォールド蛋白質の特徴である構造をとらない Unstructured 領域がプロテアソームと相互作用し、本来のプロテアソーム基質の分解を競合的に阻害し、さらに19Sプロテアソームの複合体構造を乱していることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）： We have investigated how the misfolded proteins in various neurodegenerative diseases inhibit the protein degradation by the proteasome. We found that an unstructured region of the misfolded protein directly interacts with the proteasome, which causes the competitive inhibition of the degradation of natural proteasome substrates and the disassembly of the 19S proteasome complex.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：細胞内タンパク質分解、プロテアソーム

1. 研究開始当初の背景

ユビキチン-プロテアソームシステム(UPS)は真核細胞で最も重要な蛋白質分解装置の一つであり、単に不要な蛋白質を分解するだけでなく、数百に上る細胞内の蛋白質の濃度を調整し、細胞周期・転写・シグナル伝達などの制御に関わる (Inobe & Matouschek, Curr. Opin. Struct. 2008)。そのためその機能破綻は

重篤な病気につながる。現在、神経変性疾患を引き起こす凝集性蛋白質などのミスフォールド蛋白質が、プロテアソームの分解活性を大きく低下させると言われている (Jana et al, Hum. Mol. Genet. 2001)。しかしながらミスフォールド蛋白質によるプロテアソーム阻害は無いという報告もあり、さらなる研究が望まれている。おそらくこれら相反する報告

は、すべてのミスフォールド蛋白質がプロテアソームを阻害するわけでは無いことを意味している。そこで申請者は「どのようなミスフォールド蛋白質が、如何にしてプロテアソームを阻害するのか？」を解き明かす必要があると思に至った。

申請者はフォールドした蛋白質に構造をとらないフラフラとした 40 残基ほどの配列 (Unstructured 領域) を取り付けるだけで、その蛋白質がプロテアソームを阻害するようになることを見いだした (Inobe, 未発表、後述)。またユビキチン化蛋白質のプロテアソームによる分解において、Unstructured 領域が必須であることがわかっている (Prakash, Inobe et al. Nat. Chem. Biol, 2009)。一方プロテアソーム阻害モデルとして、プロテアソームに認識されるが分解されない蛋白質は、プロテアソームを詰まらせてしまうという Choking モデルが提唱されている (Bennett et al. Mol. Cell, 2005)。このような状況を鑑みて、本申請では特にプロテアソーム阻害における Unstructured 領域の役割とミスフォールド蛋白質の安定性に注目する。

2. 研究の目的

ミスフォールド蛋白質によるプロテアソーム阻害の分子メカニズムを解き明かすため、以下のような仮説を立て、それを証明するための研究を行う。

➤ミスフォールド蛋白質の外部に露出した Unstructured 領域がプロテアソームを阻害する。

➤ミスフォールド蛋白質がプロテアソームに分解されにくい場合、阻害効果を増強する。

(1) ミスフォールド蛋白質の外部に露出した Unstructured 領域によるプロテアソームの阻害

既に知られているプロテアソームを阻害するミスフォールド蛋白質は、外部に Unstructured 領域を露出していると推測される。一方本来のプロテアソーム基質であるユビキチン化蛋白質の分解には Unstructured 領域が、分解開始サイトとして必要である。そこでユビキチン化蛋白質の Unstructured 領域と、ミスフォールド蛋白質の Unstructured 領域がプロテアソーム上で競合するのではないかと考えた。既にモデル蛋白質を用いた予備実験で、プロテアソームの阻害が起こることを確認している。この予備実験を踏まえ、以下の疑問に答えたい。

①ミスフォールド蛋白質の Unstructured 領域の配列に、プロテアソーム阻害作用はあるのか？

②どのような性質の Unstructured 領域がプロテアソームを阻害するのか？

(2) ミスフォールド蛋白質の安定性と阻害の強さの関係

Choking モデルでは、プロテアソームが、分解されにくい蛋白質であっても、分解しようとは度々試みるために、本来の基質が分解されず、プロテアソーム活性が落ちたように見えると提案している。しかしながらその具体的な証拠は報告されていない。たとえ強い阻害能力の Unstructured 領域を持っていても、簡単に分解されてしまうのであれば、その阻害の強さは弱いと推測される。そこで強い阻害効果をもつミスフォールド蛋白質は、強い阻害能力の Unstructured 領域を持つことに加え、プロテアソームに分解されにくいと申請者は考え、以下の疑問に答える。

①プロテアソームを強く阻害するミスフォールド蛋白質は、分解を受けないのか？

②ミスフォールド蛋白質はプロテアソームに対して安定であるほど、強く阻害するのか？

(3) プロテアソームを強く阻害する蛋白質の設計、およびその生物学的効果

上記 (1)、(2) の研究により得られた知見により、プロテアソームを阻害する蛋白質の設計が可能である。そしてこのような人工蛋白質が実際に培養細胞やマウスにおいてプロテアソームを阻害するかどうかを調べる。このことにより上記の仮説の正しさが確認される。具体的には以下の研究を行う。

①人工プロテアソーム阻害蛋白質は培養細胞において細胞毒性を示すか？

②プロテアソーム阻害蛋白質はマウスにおいて神経変性疾患様の症状を引き起こすのか？

以上の研究により Unstructured 領域を外部に露出し、安定なミスフォールド蛋白質がプロテアソームの分解活性を強く阻害するという仮説を証明することができる。

3. 研究の方法

(1) Unstructured 領域によるプロテアソームの阻害

申請者の予備実験から、既にいくつかの Unstructured 領域が、プロテアソームによる蛋白質の分解を阻害することがわかっている。申請者は安定な蛋白質 (DHFR) に Unstructured 領域を取り付け、これをミスフォールド蛋白質のモデルとして用いた。このモデルミスフォールド蛋白質を、精製したプロテアソームとユビキチン化蛋白質からなる分解モデルシステムに加えたところ、ユビキチン化蛋白質の分解阻害が観測された。Unstructured 領域のない DHFR を加えた場合

にはこのような阻害効果がみられなかった。この結果は申請者の仮説を強く支持するものである。

本実験ではさらにミスフォールド蛋白質の露出した **Unstructured** 領域が、プロテアソームを阻害することを証明するために、2つの方法で実験を行う。第一の方法は、既に知られているプロテアソーム阻害ミスフォールド蛋白質の表面に露出している **Unstructured** 領域を見つけ出し、それらのプロテアソーム阻害能力を調べる方法である。第二の方法はすべての取り得るアミノ酸配列から、プロテアソームを阻害する配列を見つけ出す網羅的な方法である。以上の実験の結果より、**Unstructured** 領域の阻害の強さと、そのアミノ酸配列の物理化学的性質の関係がわかるはずである。

①ミスフォールド蛋白質の **Unstructured** 領域はプロテアソームを阻害するか？

まずプロテアソームを阻害するミスフォールド蛋白質や、細胞毒性をしめす蛋白質 (**Huntingtin** や **α -synuclein** など) の凝集中間体の表面に露出している **Unstructured** 領域を特定する。プロテアーゼによる分解や、水素-重水素(**H-D**)交換の受けやすさを指標として、質量分析装置などを利用することにより同定できる。そこで得られた **Unstructured** 領域をモデル蛋白質 (**DHFR** など) の末端に融合し、予備実験のような実験を行い、プロテアソーム阻害の強さを調べる。多くの **Unstructured** 領域が得られた場合、下記②の実験で示したスクリーニング法を用いる。

②どのような **Unstructured** 領域のアミノ酸配列がプロテアソームを阻害するか？

Unstructured ポリペプチド鎖によるプロテアソーム蛋白質分解阻害効果を、すべての取り得るアミノ酸配列を対象に網羅的に調べるために、培養細胞とフローサイトメトリー (**FACS**)を用いたスクリーニングを行う。代替法として酵母を用いた遺伝学的スクリーニングも可能である。これらの方法によりプロテアソームを阻害し、強い細胞毒性をしめす **Unstructured** 領域のアミノ酸配列の物理化学的特徴を明らかにできる。

(2) ミスフォールド蛋白質の安定性とプロテアソーム阻害の関係

通常プロテアソームに結合し **Unstructured** 領域を持つ蛋白質は速やかに分解される。しかしながら結合した蛋白質がプロテアソームによる解きほぐし作用に対してアンフォールドしないほど安定であるならば分解されない。本実験では、**Choking** モデルを基に、特に強い阻害作用を持つ蛋白質凝集中間体などのミスフォールド蛋白質も、プロテアソ

ームに対して安定であることを示し、さらに安定なミスフォールド蛋白質ほど強くプロテアソームを阻害することを定量的に示す。

①プロテアソームを強く阻害するミスフォールド蛋白質は、分解を受けないのか？

まず強くプロテアソームを阻害するミスフォールド蛋白質や凝集中間体が、それ自体プロテアソームに分解されず安定かどうかを *in vitro* の実験系で確かめる。さらに上記 1-1 の実験と同じように、プロテアーゼ抵抗性や **H-D** 交換速度を測定し、そのミスフォールド蛋白質の構造の安定性を調べる。必要ならばプロテアソーム分解実験後に生成されたフラグメントの解析を行う。また構造の安定性は二次構造の含量に起因すると予測される。そこで各種スペクトル法を用いて、二次構造含量も調べる。

この実験は手法の類似性から、(1) ①の実験と同時に進行することが可能である。

②ミスフォールド蛋白質はプロテアソームに対して安定であるほど、強く阻害するか？

ミスフォールド蛋白質の安定性とプロテアソーム阻害の強さの相関を調べる。特に蛋白質の構造的・熱力学的安定性に焦点をあてるため、上記 1 の実験で明らかとなった強い阻害能力をもつ **Unstructured** 領域に、ジヒドロ葉酸還元酵素 (**DHFR**)を融合した蛋白質を、ミスフォールド蛋白質のモデルとして用い、その分解阻害活性を調べる。**DHFR** は安定性の異なる変異体がいくつも知られ、リガンドの有無により安定性を調整することができるので、安定性と阻害効果の相関を調べるのに便利である。またプロテアソームに対する安定性は、原子間力顕微鏡 (**AFM**) によるフォースカーブ測定で見積もることができるので、必要であれば **AFM** の実験も行う。

(3) 神経変性疾患を引き起こす蛋白質を設計とその生物学的機能

上記 (1), (2) の研究により得られた知見を基に、プロテアソームを阻害する蛋白質を設計することが可能になる。このような蛋白質が実際に細胞内、マウス個体内においてプロテアソームを阻害し、さらに神経変性疾患に似た症状を引き起こすかどうかを調べる。

①人工プロテアソーム阻害蛋白質は培養細胞において細胞毒性を示すか？

上記の実験結果を基に設計した人工プロテアソーム阻害蛋白質を、培養神経細胞 (**Neuro2a**)内でトランスフェクションにより大量発現させる。このときの細胞の致死率に加え、プロテアソームの活性を細胞内のユビ

キチン化蛋白質の蓄積量を指標に見積もる。また精製したプロテアソーム阻害蛋白質を直接培地に加え、同様の実験を行うことも可能である。

②人工プロテアソーム阻害蛋白質は神経変性疾患様の症状を引き起こすのか？

上記の人工プロテアソーム阻害蛋白質を発現する遺伝子を導入したトランスジェニックマウスを作成する。このマウスの脳のユビキチン化蛋白質の蓄積を始め、病変や寿命、体重等を記録し人工プロテアソーム阻害蛋白質の毒性を見積もる。

この実験は実験の性格上、本申請の研究期間中の完了は不可能であるが、終了後も継続して行う。

4. 研究成果

本研究は、凝集性蛋白質の Unstructured 領域によるプロテアソームの阻害の分子メカニズムを明らかにすることを目的とした。そのためまず Unstructured 領域とプロテアソームの相互作用を研究した。またこの相互作用によるプロテアソームの阻害効果や Unstructured 領域をもつ凝集性蛋白質の限定分解、プロテアソーム複合体の解離についても研究した。そして以下の成果が得られた。

(1) プロテアソームと相互作用する Unstructured 領域の長さのアミノ酸配列を調べた。そのために様々な長さの Unstructured 領域を持つモデル蛋白質と、様々なアミノ酸配列の Unstructured 領域を持つモデル蛋白質を用意し、そのプロテアソームによる分解のされやすさを指標にして相互作用の強さを見積もった。その結果、Unstructured 領域が概ね30残基以上の長さを持ち、複雑なアミノ酸配列から構成される場合、プロテアソームと相互作用することがわかった。また逆に Unstructured 領域が20残基以下で単純なアミノ酸配列をもつ場合、プロテアソームと結合しないことがわかった。

(2) Unstructured 領域が十分な長さを持ち、複雑な配列からなる場合、そのプロテアソームとのアフィニティは1-10 μ Mほどであることがわかった。この程度のアフィニティは細胞内のプロテアソームや Unstructured 領域をもつ蛋白質の濃度から考えると、十分な強さであるとは言えない。凝集性の蛋白質の多くが細胞内でユビキチン化されていることから、Unstructured 領域とプロテアソームの相互作用はポリユビキチン鎖の介助を受けていると考えられる。そこで Unstructured 領域をもつモデル蛋白質に更にポリユビキチン鎖を取り付け、Unstructured 領域とプロテアソームの相互作用を調べた。その結果、この

ような場合でも常にプロテアソームと Unstructured 領域が相互するのではなく、Unstructured 領域がユビキチン鎖から適度な距離にあるときにのみ、相互作用することがわかった。

(3) 上記のようにプロテアソームと相互作用する Unstructured 領域は、プロテアソーム基質蛋白質の分解を競合的に阻害することが明らかとなった。しかしながら Unstructured 領域をもつ蛋白質自身も効率的に分解される。そこで Unstructured 領域をもつ蛋白質の安定性を変化させ、分解阻害効果を調べる予備的な実験を行った。

(4) 凝集性蛋白質の代表格でありハンチントン病の原因蛋白質のポリグルタミンが異常伸長したハンチンチンエクソン I (HTT) 領域と、プロテアソームの関係を調べる実験を行った。他の蛋白質と同様、HTT によるプロテアソームの阻害効果が観測された。またプロテアソームにより HTT の凝集体形成が抑制されることもわかった。さらにプロテアソームは HTT を限定分解して、性質の異なる凝集体形成を促進することを明らかにした。この限定分解産物は細胞にとってより毒性が強いという予備実験の結果が得られている。

(5) 高濃度の HTT はプロテアソームのサブユニット構造を乱し、サブユニットの解離を促進することがわかった。HTT は coiled-coil を形成しそれらの相互作用によりより大きな凝集体が形成されていくと報告されている。一方プロテアソームも coiled-coil より形成される突出構造を持っており、基質認識やサブユニット構造の維持において重要な役割を担っていると考えられる。そこで凝集性蛋白質のオリゴマー凝集中間体の Coiled-coil がプロテアソームの分解活性を阻害するという仮説を立て、この仮説を証明する予備実験を行った。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計6件)

1. Kraut, DA., Israeli, E., Schrader, E., Patil, A., Nakai, K., Nanavati, D., Inobe, T. and Matouschek, A. (2012) Sequence- and Species-Dependence of Proteasomal Processivity. ACS Chem. Biol. (in press) [査読有り]
2. 伊野部智由(2011) 変性領域を介したプロテアソームの基質認識機構、生物物理,

- 51, 276-277. [査読有り]
3. 伊野部智由(2011) プロテアソームによるタンパク質分解に必要な分解シグナルの配置、実験医学, 29, 2135-2138. [査読無し]
 4. Chen, J., Makabe, K., Nakamura, T., Inobe, T. and Kuwajima, K. (2011) Dissecting a biomolecular process of MgATP2- binding to the chaperonin GroEL. J. Mol. Biol. 410, 343-356. [査読有り]
 5. Inobe, T., Fishbain, S., Prakash, S. and Matouschek, A. (2011) Defining the Geometry of the Two-component Proteasome Degron. Nature Chem. Biol. 7, 161-167. [査読有り]
 6. 伊野部智由、貫名信行 (2010) 蛋白質分解系活性化による神経変性疾患治療、実験医学, 28, 788-794. [査読無し]

[学会発表] (計4件)

1. Inobe, T. and Takahashi, K. (2012) Fluctuation-mediated substrate recognition by the proteasome. The 5th International Symposium on Molecular Science of Fluctuations toward Biological Functions (Nara, Japan, Jan. 7-8)
2. 伊野部智由 (2011) プロテアソームによる蛋白質アンフォールディングと分解: その初期過程、日本物理学会2011年秋季大会(富山大学、9月21日~24日)
3. Inobe, T., Fishbain, S., Prakash, S., and Matouschek, A. (2010) Defining the geometry of the two-component proteasome degron. 48th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan (Sendai, Japan, Sept. 20)
4. Inobe, T., Fishbain, S., Prakash, S. and Matouschek, A. (2010) Molecular mechanism of protein unfolding in the cell. The 10th Annual Meeting of The Protein Science Society of Japan (Sapporo, Japan, June. 16-18)

[その他]

ホームページ等

<http://inobelab.wordpress.com/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊野部 智由 (INOBE TOMONAO)

富山大学・先端ライフサイエンス拠点・特命助教

研究者番号: 50568855