

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：82609

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24657097

研究課題名(和文)プロテアソーム顆粒の形成機構と生理的意義

研究課題名(英文)Formation mechanism of proteasome granules

研究代表者

佐伯 泰 (SAEKI, Yasushi)

公益財団法人東京都医学総合研究所・生体分子先端研究分野・副参事研究員

研究者番号：80462779

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：プロテアソームはATP依存性の巨大タンパク質分解酵素であり、ユビキチン化されたタンパク質を分解することで様々な生命現象を制御している。我々は、プロテアソームの細胞内動態に影響を与える因子を探索したところ、ミトコンドリア機能欠損株においてプロテアソームが細胞質に顆粒構造を形成することを見出した。プロテアソーム顆粒は、ATPレベルの低下により形成が誘導され、野生株でも老化した細胞において観察された。また、プロテアソームの顆粒形成はヒト培養細胞にも保存されていた。興味深いことにATP除去による顆粒形成は試験管内でも再構築可能であり、プロテアソーム自身がATPセンサーとして機能することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The proteasome is an ATP-dependent protease complex responsible for targeted proteolysis in eukaryotic cells. To identify factors that affect the proteasome dynamics, we screened a yeast mutant library and found that the proteasome formed a large cytoplasmic granule in almost all the mitochondrial mutants. We found that lowered cellular ATP levels induce the granule formation of the proteasome even in the wild-type cells. Importantly, the granule formation of the proteasome is conserved in yeast and humans. Furthermore, the purified proteasomes formed fibrous aggregated structures by ATP depletion. Taken together, these results suggest that the proteasome itself senses cellular ATP levels and autonomously forms reversible granule structure in responding to cellular environments.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：機能生物化学

キーワード：細胞内タンパク質分解 ユビキチン プロテアソーム 酵母

1. 研究開始当初の背景

プロテアソームは ATP 依存性の巨大タンパク質分解酵素であり、ユビキチン化されたタンパク質を分解することで様々な生命現象を制御している。プロテアソームの構造や分子集合機構に関する研究は大きく進展したが、細胞内動態に関する研究は世界的にも大きく立ち遅れている。

2. 研究の目的

プロテアソームの細胞内動態に影響を与える因子を、出芽酵母変異体ライブラリーを用いて探索したところ、ミトコンドリア機能欠損株においてプロテアソームが細胞質に顆粒構造を形成することを見出し、このプロテアソーム顆粒がどのような機構で形成されるのか、どのような生理的意義があるのか明らかにする。

3. 研究の方法

プロテアソームサブユニットに GFP をノックインした酵母細胞、ヒト培養細胞をそれぞれ作製し、遺伝学的スクリーニングや細胞生物学的的手法によりプロテアソーム顆粒の形成機構と生理的意義を明らかにする。また、試験管内においてプロテアソーム顆粒形成の再構築を試みる。

4. 研究成果

酵母遺伝子破壊株ライブラリーを用いたプロテアソーム局在制御因子のスクリーニング

出芽酵母の変異体ライブラリー(非必須遺伝子については遺伝子破壊株ライブラリー、必須遺伝子についてはその発現を減弱させた Damp ライブラリーを用いた)約 6000 株について、プロテアソームサブユニットに GFP を融合したライブラリーを作製した。次いで、

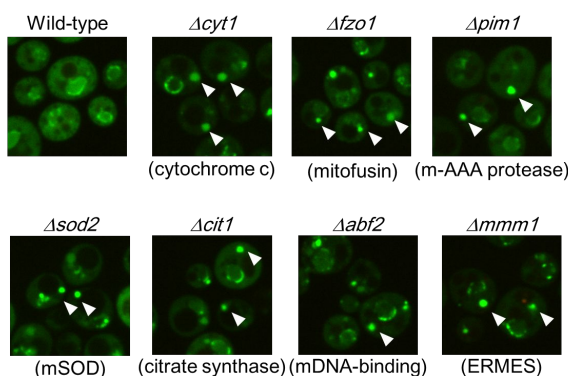


図1. プロテアソームはミトコンドリア変異体において顆粒構造を形成する

共焦点顕微鏡によりプロテアソーム局在に異常を示す変異体のスクリーニングを行った。その結果、ミトコンドリア呼吸欠損変異株においてプロテアソームが細胞質に顆粒構造を形成することを見出した(図1)。

プロテアソーム顆粒と既知の細胞内構造物との関連性

既知の顆粒構造体やオルガネラ、ユビキチン

関連因子との共局在を解析したところ、ユビキチンと Sec13 がプロテアソーム顆粒と共局在した。Sec13 は COPII ベシクルや核膜孔などの構成因子であるが、COPII や核膜孔の他の構成因子とは共局在しなかったため、プロテアソーム顆粒内の Sec13 は単独で存在することがわかった。一方、ユビキチン欠失細胞において、プロテアソーム顆粒は断片化したため、ユビキチンは微小なプロテアソーム凝集物を顆粒構造に集積させる機能をもつことがわかった。

細胞老化とプロテアソーム顆粒形成の関連性

出芽酵母の定常期には若い娘細胞由来の Q 細胞と古い母細胞由来の NQ 細胞が混在しているが、プロテアソーム顆粒は NQ 細胞において定常期の早い時期から観察された。NQ 細胞ではミトコンドリア活性が低下しており、実際、ミトコンドリアの膜電位が低い細胞においてプロテアソーム顆粒が観察された。

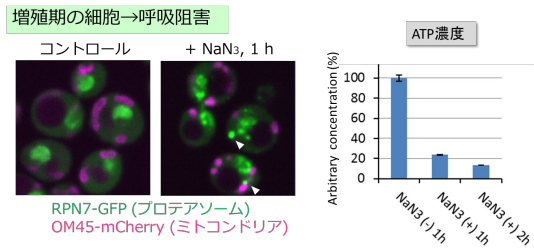


図2. 細胞内ATPレベルの低下がプロテアソームの顆粒形成を誘導する

プロテアソーム顆粒形成の機構

ミトコンドリア機能の低下は酸化ストレスの蓄積、ATP レベルの低下、脂質代謝異常などを引き起こすが、各種変異体や薬剤を用いて検討したところ、ATP レベルの低下がプロテアソーム顆粒形成を促進することがわかった(図2)。

ヒト培養細胞を用いたプロテアソーム顆粒の解析

ニットに GFP をノックインしたヒト培養細胞株を作製した。次いで、薬剤により ATP レベルを低下させたところ、細胞質にプロテアソーム顆粒が観察された(図3)。また、酵母と同様にユビキチンが共局在することを見出した。現在、蛍光相関分光法により、ATP レベルの低下に伴い、プロテアソーム動態が

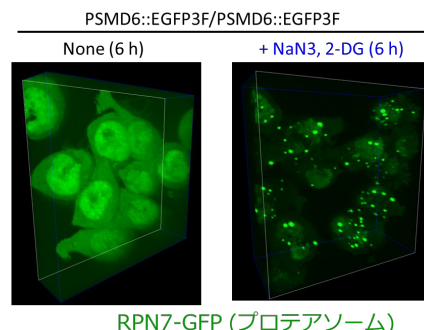


図3. ヒト培養細胞におけるプロテアソーム顆粒形成

どのように変動するか解析を行っている。

試験管内におけるプロテアソーム顆粒の再構築

GFP 融合プロテアソームを精製し、ATP 濃度などバッファの組成を変化させることで顆粒形成が起こるか蛍光顕微鏡を用いて解析したところ、透析により緩衝液中の ATP を除くことで、プロテアソームがファイバー状に凝集することを見出した。現在、電子顕微鏡や高速 AFM により、凝集したプロテアソームがどのような構造をもつのか解析中である。

以上の解析によりプロテアソーム自身が ATP センサーとして機能し、細胞の外的環境にตอบสนองして存在様式を変えることが示唆された (図 4、投稿準備中)。

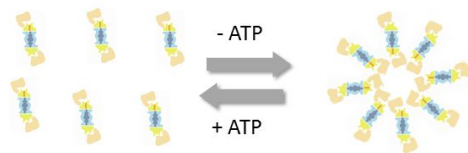


図 4. プロテアソーム顆粒の形成機構

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)

【英文原著論文 (全て査読有り)】

- (1) Satoh, T., Saeki, Y., Hiromoto, T., Wang, Y., Uekusa, Y., Yagi, H., Yoshihara, H., Yagi-Utsumi, M., Mizushima, T., Tanaka, K. and Kato, K. Structural basis of proteasome formation controlled by an assembly chaperone Nas2, **Structure** 22, 731-743 (2014). doi: 10.1016/j.str.2014.02.014
- (2) Pack, CG, Yukii, H., Toh-e, A., Kudo, T., Tsuchiya, H., Kaiho, A., Sakata, E., Murata, S., Sako, Y., Baumeister, W., Tanaka, K., and Saeki, Y. Quantitative live-cell imaging reveals spatio-temporal dynamics and cytoplasmic assembly of the 26S proteasome, **Nature Commun.** 5, 3396 (2014). doi: 10.1038/ncomms4396
- (3) Tsuchiya, H., Arai, N., Tanaka, K., and Saeki, Y. Cytoplasmic proteasomes are not indispensable for cell growth in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 436, 372-376 (2013). doi: 10.1016/j.bbrc.2013.05.080.
- (4) Takagi, K., Kim, S., Yukii, H., Ueno, M., Morishita, R., Endo, Y., Kato, K., Tanaka, K., Saeki, Y.*, and Mizushima, T*. Structural basis for specific recognition of Rpt1p, an ATPase subunit of 26 S proteasome, by proteasome-dedicated chaperone Hsm3p. **J. Biol.**

Chem. 287, 12172-12182 (2012).

(*correspondences) doi:

10.1074/jbc.M112.345876.

- (5) Kono, K., Saeki, Y., Yoshida, S., Tanaka, K., and Pellman, D. Proteasomal degradation resolves competition between cell polarization and cellular wound healing. **Cell** 150, 151-164 (2012). 10.1016/j.cell.2012.05.030
- (6) Sakata, E., Bohn, S., Mihalache, O., Kiss, P., Beck, B., Nagy, I., Nickell, S., Tanaka, K., Saeki, Y., Förster, F., and Baumeister, W. Localization of the proteasomal ubiquitin receptors Rpn10 and Rpn13 by electron cryomicroscopy. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 109, 1479-1484 (2012). doi: 10.1073/pnas.1119394109.

【英文総説論文 (全て査読有り)】

- (1) Tanaka, K., Mizushima, T., and Saeki, Y. (2012) The proteasome: molecular machinery and pathophysiological roles. **Biol Chem** 393, 217-234.
- (2) Saeki, Y. and Tanaka, K. (2012) Assembly and function of the proteasome. **Methods Mol Biol** 832, 315-337.

【学会発表】(計 12 件)

- (1) 佐伯 泰: 細胞内タンパク質分解装置プロテアソーム研究の最前線, 金沢大学バイオ AFM 先端研究センターセミナー, 2014.1.8, 金沢
- (2) Yasushi Saeki, Chan-Gi Pack, Haruka Yukii, and Keiji Tanaka: Quantitative Live-Cell Imaging Reveals Spatio-Temporal Dynamics and Cytoplasmic Assembly of the 26S Proteasome, EMBO Conference on Ubiquitin and ubiquitin-like proteins "From structure to function", 2013, 10.1-5, Italy
- (3) 佐伯 泰: ユビキチンコード解析法とプロテアソーム研究の最前線, 東京工業大学フロンティア研究機構セミナー, 2013, 8, 30, 横浜
- (4) Yasushi Saeki, Haruka Yukii, Naoko Arai, Ai Kaiho, and Keiji Tanaka: The formation mechanism of the proteasome granules, The 35th Natio Conference "The Ubiquitin-Proteasome System: From Basic Mechanisms to Pathophysiological Roles", 2013, 7, 9-12, Sapporo
- (5) 佐伯 泰, 雪井 悠, 田中啓二: プロテアソームは細胞内 ATP レベルの低下を感知して顆粒を形成する, 第 65 回 日本細胞生物学会大会シンポジウム「細胞の中の生々流転—「もの」の動態に基づく機能制御—», 2013, 6. 19~21, 名古屋.
- (6) 佐伯 泰: プロテアソームダイナミクス, 理化学研究所シンポジウム「プロテアソームダイナミクスの理解を目指して」, 2013, 1.17, 東京
- (7) Yasushi Saeki: Structure and dynamics of the 26S proteasome. 熊本大学発生医学研究所リエゾンラボ研究会, 2012, 12.19, 熊本
- (8) 雪井 悠, 新井直子, 田中啓二, 佐伯 泰:

出芽酵母の休止期において形成されるプロテアソーム顆粒の解析, 第 35 回分子生物学会, 2012, 12.14, 博多

(9) 佐伯 泰, 雪井 悠, 土屋 光, 田中啓二: プロテアソーム可塑性: 分子集合から顆粒形成まで. 第 85 回日本生化学会大会シンポジウム, 2012, 12.14, 博多

(10) 雪井 悠, 新井直子, 田中啓二, 佐伯泰: 出芽酵母の休止期において形成されるプロテアソームストレージ顆粒の解析. 酵母遺伝学フォーラム第 45 回研究報告会, 2012,9.5, 宇治

(11) 佐伯 泰, 坂田絵理, 雪井 悠, 水島恒祐, W. Baumeister, 田中 啓二: 細胞内タンパク質分解装置プロテアソームの分子集合と作動機構. 酵母遺伝学フォーラム第 45 回研究報告会, 2012,9.5, 宇治

(12) 佐伯 泰, 坂田絵理, 白 燦基, 佐甲靖志, W. Baumeister, 田中啓二: 細胞内タンパク質分解装置プロテアソームの分子集合と作動機構. 第 12 回日本蛋白質科学会年会, 2012, 6.21, 名古屋

〔図書〕(計 3 件)

(1) 佐伯 泰, 水島恒裕: プロテアソームの作動機構とダイナミクス「構造生命科学で何がわかるのか何ができるのか」実験医学・増刊号 32 巻 (10 号) 1617-1622, 羊土社, 2014.

(2) 河野恵子, 佐伯 泰, 吉田知史, 田中啓二, David Pellman: 細胞膜修復機構におけるプロテアソームの役割. 細胞工学 31 巻, 1152 - 1153. 秀潤社, 2012.

(3) 佐伯 泰: 巨大で複雑な蛋白分解装置の立体構造と活性調節機構. 「特集 / 蛋白構造 - 機能関連解析と治療薬開発への応用」内分泌・糖尿病・代謝内科, 第 35 巻 12 月号 523-532, 科学評論社, 2012.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.igakuken.or.jp/pro-meta/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐伯 泰 (SAEKI, Yasushi)

公益財団法人東京都医学総合研究所・生体分子先端研究分野・副参事研究員

研究者番号: 80462779

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし