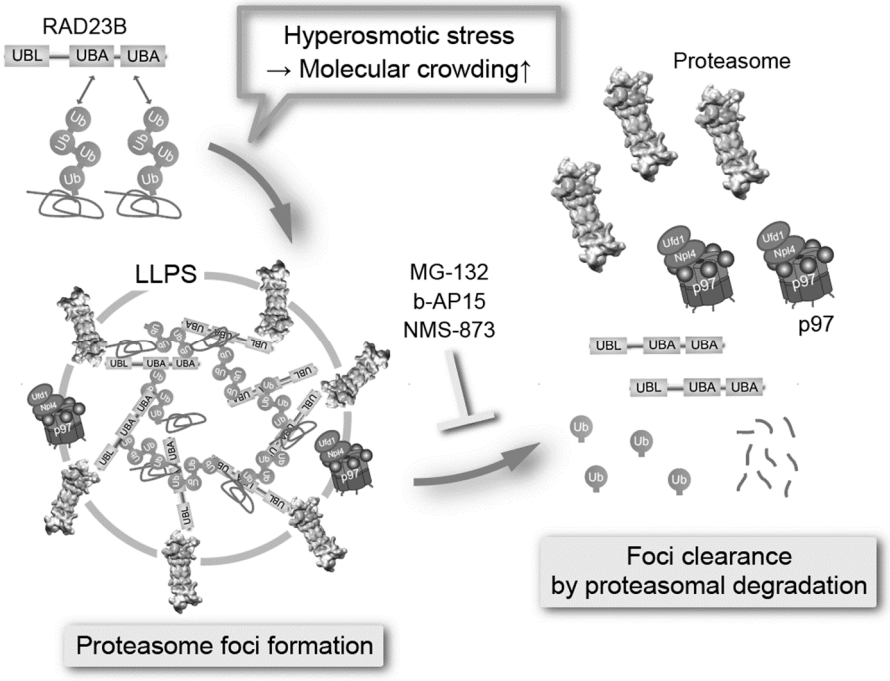
44　プロテアソーム分解ネットワークの解明	佐伯　泰

【目的】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で、様々な細胞機能の制御に必須の役割を果たしている。従来、プロテアソーム基質はユビキチン化されれば一義的に分解されると考えられてきたが、最近はプロテアソームと相互作用する様々なアクセサリータンパク質が同定され、基質タンパク質の運搬・認識・分解の各ステップを厳密に調節していることが明らかになってきた。本研究は、我々が見出したプロテアソーム核内 foci を材料に、アクセサリー分子の機能連携と階層性を明らかにすることを目的とする。

【方法】プロテアソームの生細胞イメージング解析のため、プロテアソームサブユニット遺伝子に蛍光タンパク質をノックインしたプロテアソーム可視化ヒト培養細胞を作製した。次いで、様々なストレス存在下でプロテアソームの局在変化を解析するとともに、プロテアソームと相互作用するアクセサリー分子を質量分析により解析した。同定されたアクセサリー分子の siRNA のノックダウンまたは遺伝子破壊、あるいは特異的阻害剤を用いてプロテアソーム依存的タンパク質分解に与える影響を解析した。

【結果】生細胞イメージングに適したプロテアソーム可視化細胞の作出に成功した。さまざまなストレス下でプロテアソーム局在変化を解析したところ、高浸透圧ストレス刺激によりプロテアソームがユビキチン化基質とともに核質で foci を形成することを見出した。この foci は一過的な構造体であり数時間後には消失するが、プロテアソーム阻害剤処理により安定化したため、核内のタンパク質分解の場を可視化していることが示唆された。質量分析解析の結果、このプロテアソーム foci に局在化するアクセサリー分子としてユビキチン選択的シャペロン p97、シャトル分子 RAD23B、ユビキチンリガーゼ UBE3A を同定した。RAD23B と UBE3A はプロテアソーム foci の形成に、p97 はプロテアソーム foci のクリアランスに寄与することがわかった。興味深いことにプロテアソーム foci は液滴様の性質をもち、まず RAD23B がユビキチン鎖と液 - 液相分離することで液滴を形成し、プロテアソームを集積させることがわかった。本研究により、核内のタンパク質品質管理経路とアクセサリー分子による分解ネットワークの存在が明らかとなった。

プロテアソーム foci は核内タンパク質品質管理の場である



44. プロテアソーム分解ネットワークの解明

佐伯　泰

東京都医学総合研究所 生体分子先端研究分野 蛋白質代謝研究室

Key words : プロテアソーム，ユビキチン，タンパク質分解，質量分析計，定量イメージング

緒　言

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で、様々な細胞機能（転写、翻訳、タンパク質品質管理、免疫システムなど）の制御に必須の役割を果たしている。そのため、プロテアソーム機能の低下は、細胞老化や神経変性疾患、免疫疾患など様々な疾患を引き起こすことがわかってきた。逆に、がん細胞ではプロテアソーム活性が異常亢進しており、プロテアソーム阻害剤が血液がんの治療に用いられている。このように、プロテアソームは基礎研究だけでなく臨床研究からも大きく注目される分子となっているが、プロテアソームによるタンパク質分解がどのように制御されているかについては不明な点が多い［1］。

従来、プロテアソーム基質はユビキチン化されれば一義的に分解されると考えられてきたが、最近はプロテアソームと相互作用する様々なアクセサリータンパク質が同定され、基質タンパク質の運搬・認識・分解の各ステップを厳密に調節していることが明らかになってきた［2］。実際、我々は質量分析計を用いたユビキチン結合分子の網羅的解析より、酵母ではプロテアソーム基質の 90%以上がユビキチン選択的シャペロン p97 とシャトル分子（RAD23、UBQLN）により選別されプロテアソームに運ばれることを見出している［3］。また、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伸長など、基質タンパク質の分解がプロテアソーム上で正負に制御されることが明らかとなっている。

本研究は、高浸透圧ストレス下でプロテアソームが核内で foci を形成すること、核内のプロテアソーム依存的タンパク質分解の場となることを見出した。さらに、この foci には様々なアクセサリータンパク質が集積することを見出し、これらの分子のネットワークと階層性の一端を明らかにしたので報告する。

方法および結果

1. プロテアソームおよびユビキチン可視化細胞の作出

我々は、出芽酵母プロテアソームサブユニット EGFP ノックイン株の定量イメージング解析より、細胞内濃度を決定するとともに（細胞質では 200 nM、核質では 1 μM）、約半数の分子が非常に速い動態をもつことを報告してきた［4］。しかし、哺乳動物細胞におけるプロテアソーム動態は未だ手つかずであったため、大腸がん由来のヒト培養細胞 HCT116 においてゲノム編集によりプロテアソームサブユニット遺伝子 PSMB2 あるいは PSMD6 に蛍光タンパク質（EGFP あるいは FusionRed）をノックインした細胞株を作製した（PSMB2-EGFP$^{KI/KI}$、PSMB2-FusionRed$^{KI/KI}$ など）。HCT116 細胞の核型はほぼ 2 倍体（pseudo diploid）であり、標的遺伝子 PSMB2 あるいは PSMD6 の両アリルともに蛍光タンパク質遺伝子が正確に挿入されていることを、ゲノミック PCR、ゲノミック DNA シーケンス、ウェスタンブロッティングにより確認した。また、各ノックイン細胞の抽出液のユビキチン化基質のウェスタンブロッティング、蛍光 Native-PAGE より、プロテアソーム活性が十分保持されていること、プロテアソーム複合体の形成も野生型と同等であることを確認した。これらの結果より、今回作出した HCT116 PSMB2-EGFP$^{KI/KI}$ 細胞、HCT116 PSMB2-FusionRed$^{KI/KI}$ 細胞、および HCT116 PSMD6-EGFP$^{KI/KI}$ 細胞は、細胞内のプロテアソーム動態を解析する優れたツールとなることがわかった。また、生細胞でユビキチンを可視化するため HCT116 PSMB2-FusionRed$^{KI/KI}$ 細胞の AAVS1 領域に EGFP タグつきユビキチン遺伝子をノックインした細胞（HCT116 PSMB2-FusionRed$^{KI/KI}$ EGFP-

Ubiquitin$^{AAVS1/AAVS1}$ 細胞）をさらに作製した。

2. 高浸透圧ストレス刺激によるプロテアソームの動態解析

プロテアソームは膜に係留されておらず細胞内では自由に拡散できるため、プロテアソームはプロテオスタシス異常を速やかに感知してその局在を変化させる可能性がある。そこで、HCT116 PSMB2-EGFP$^{KI/KI}$ 細胞をさまざまなストレスで刺激し、局在変化をタイムラプスイメージングにより解析した。その結果、高浸透圧ストレス刺激により核内のプロテアソームが速やかに foci を形成することを見出した（図 1a）。このプロテアソーム foci は刺激後数秒から生じ、5 分後には数・サイズともに最大となる（平均 30 個、直径 500 nm 程度）。そして、3 時間ほどかけて徐々に消失する様子が観察された。また、野生型 HCT116 細胞においても内在性抗体の免疫染色により、プロテアソームが浸透圧刺激で foci を形成することを確認した（図 1b）。次いで、各種阻害剤を用いてプロテアソーム foci の動態を解析したところ、プロテアソーム阻害剤 MG-132 処理によりプロテアソーム foci の消失は遅延し、ユビキチン活性化酵素 E1 の阻害剤 MLN-7243 存在下では foci は形成しなかったため、foci 形成はユビキチン化基質の量に依存しており、そのクリアランスにはプロテアソーム依存的な分解が必要であることが示唆された。実際、プロテアソーム foci にはユビキチン（特にリジン 48 結合型ユビキチン鎖）が局在化していた（図 1c）。よって、プロテアソーム foci は核内のタンパク質品質管理の場を可視化していることがわかった。興味深いことに、プロテアソーム foci はほぼ球形であり融合して肥大化することから、ユビキチンとプロテアソームを含む新規の細胞内液滴であることがわかった（図 1d）。

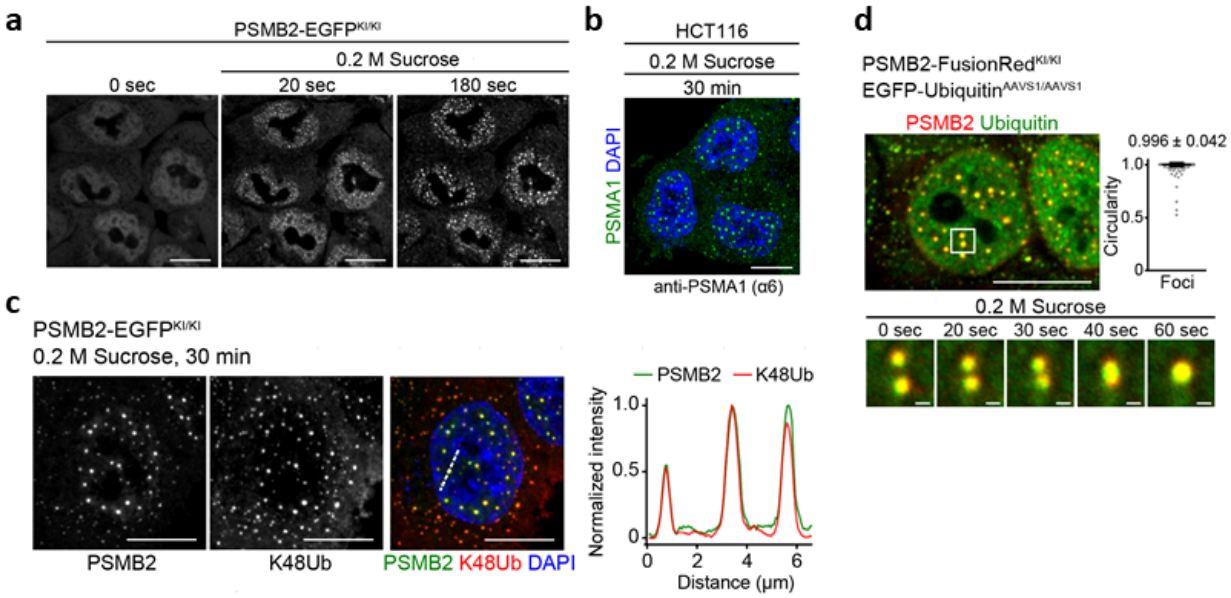


図 1. 高浸透圧ストレス刺激によるプロテアソーム核内 foci 形成

a） 0.2 M スクロース刺激時の PSMB2-EGFP$^{KI/KI}$ 細胞のタイムラプス解析。

b） 抗 PSMA1 抗体による内在性プロテアソーム foci の検出。

c） Lys48 連結型ユビキチン鎖（K48Ub）とプロテアソーム foci の共局在解析。右図はラインプロット。

d） 0.2 M スクロース刺激時の PSMB2-FusionRed$^{KI/KI}$ EGFP-Ubiquitin$^{AAVS1/AAVS1}$ 細胞のタイムラプス解析。グラフはプロテアソーム foci の円形度を示してある。スケールバーは d 下図のみ 500 nm、他は 10 μm。

3. プロテアソーム核内 foci の構成因子の同定

プロテアソーム核内 foci の構成因子を同定するため、高浸透圧ストレス下でプロテアソームと相互作用する分子を質量分析計で解析した。プロテアソームの相互作用分子は免疫沈降中に解離しやすいため、細胞を低ホルマリン固定し、架橋下でプロテアソームを免疫沈降後、質量分析解析に供した（図 2a）。その結果、ユビキチン選択的シャペロン p97、シャトル分子 RAD23B、ユビキチンリガーゼ UBE3A を含む約 30 種類の分子が同定された。内在性抗体を用いた間接免疫染色法により p97、RAD23B、UBE3A が高浸透圧ストレス下でプロテアソーム foci に局在化することが明らかとなった（図 2b）。

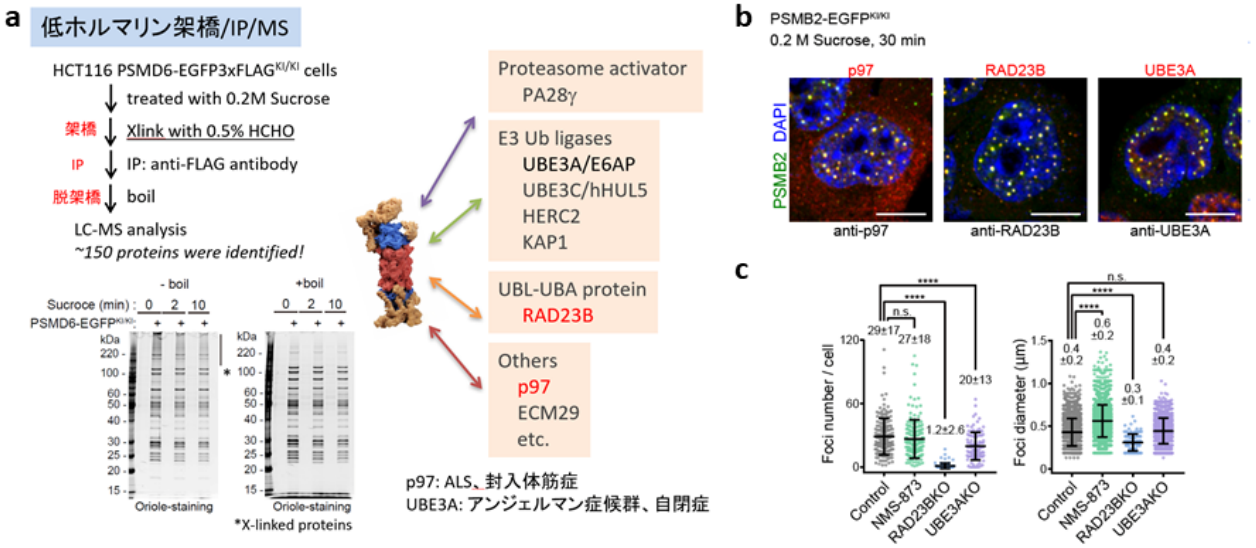


図 2. プロテアソーム核内 foci に集積するアクセサリー分子の同定と機能

a）低ホルマリン架橋/免疫沈降/質量分析解析によるプロテアソーム相互作用分子の同定。

b）p97、RAD23B、UBE3A はプロテアソーム foci に局在化する。スケールバーは 10 μm。

c）p97 阻害剤 NMS-873 処理および RAD23B ノックアウト（KO）細胞、UBE3AKO 細胞におけるプロテアソーム foci の数とサイズ。エラーバーは平均値と標準偏差を示す。

4. プロテアソーム核内 foci の形成機構と分解ネットワークの解析

同定したプロテアソーム foci 構成因子の siRNA ノックダウン、遺伝子破壊、あるいは特異的阻害剤処理によりプロテアソーム foci の形成やクリアランスが変動するか解析した。その結果、シャトル分子 RAD23B の siRNA ノックダウンあるいは遺伝子破壊ではプロテアソーム foci が全く形成しないこと、p97 阻害剤 NMS-873 処理によりプロテアソーム foci が肥大化しクリアランスが著しく遅延することを見出した（図 2c）。よって、RAD23B はユビキチン化基質のコンパートメント化を、p97 は foci に集積したユビキチン化基質の分解を促進させることがわかった。一方、ユビキチンリガーゼ UBE3A の siRNA ノックダウンあるいは遺伝子破壊により、プロテアソーム foci 数が減少したことから、UBE3A は核内タンパク質の品質管理に関与するユビキチンリガーゼであることが示唆された。

考　察

1. プロテアソーム foci は核内タンパク質品質管理の場である

本研究では、ストレスとユビキチン化に依存して形成する核内のプロテアソーム含有構造体を見出し、複数のプロテアソーム相互作用分子（p97、RAD23B、UBE3A）がこの新規構造体に集積することを見出した。このプロテアソーム foci は液滴様の性質をもち、核内のユビキチン化基質が RAD23B とともに相分離することで生じる（後述）。細胞内液滴は、特定の分子を濃縮させることで生化学反応を促進させる機能が想定されており、プロテアソーム foci 形成の生理的意義としてプロテアソームの集積によるタンパク質分解の促進が強く示唆される。また、我々は、このプロテアソーム核内 foci で分解されるユビキチン化基質としてリボソームタンパク質を複数同定している（データ未提示）。リボソームはヒト培養細胞では 1 分あたり 1,000 分子が生合成されているが、高浸透圧ストレスが核小体ストレスを伴うことを考慮すると、複合体にとりこまれなかったリボソームのオーファンタンパク質がプロテアソーム foci の主要な基質である可能性が高い。

2. 核内タンパク質分解経路のアクセサリー分子ネットワーク

プロテアソーム foci の構成成分としてユビキチン選択的シャペロン p97、シャトル分子 RAD23B、ユビキチンリガーゼ UBE3A を見出し、これらの分子が連携することで核内のタンパク質品質管理を実行していることを明らかにした。RAD23B はユビキチン化基質を捕捉しプロテアソームに運搬するというモデルが一般的であるが、意外なことに RAD23B ノックアウト細胞ではプロテアソームだけではなくユビキチン化基質の foci も形成しなかった。試験管内の解析では 4 つ以上の長さのポリユビキチン鎖と RAD23B の 2 つの UBA ドメイン（ユビキチン結合ドメイン）が液滴形成に必要であったことから、マルチバレント相互作用による相分離である（データ未提示）。つまり、RAD23B はユビキチン化基質とともに液 - 液相分離することで液滴を形成し、プロテアソームが集積し foci を形成するというモデルが考えられる。p97 は AAA+ATPase であり、クロマチンやタンパク質複合体からユビキチン化基質を引き抜くセグリガーゼ活性がしられていたが、最近、基質タンパク質を解きほぐすアンフォールディング活性も報告されている（REF）。p97 阻害剤処理によりプロテアソーム foci が肥大化しユビキチン化基質のクリアランスが著しく遅延したことから、液滴内においてもこれらの活性によりプロテアソーム分解を補助していることが示唆された。一方、UBE3A ノックアウト細胞においてプロテアソーム foci の数が減少したため、核内タンパク質のユビキチン化に関与すると考えられるが、UBE3A はプロテアソームと相互作用するユビキチンリガーゼであり液滴内に存在することから、プロテアソームが捕捉したユビキチン化基質のユビキチン鎖伸長反応（E4 活性）により分解を促進させる可能性もある。最近、我々は UBE3A のプロテアソーム結合ドメインを見出しており、今後、UBE3A とプロテアソームの相互作用の意義についても検討したい。また、ストレス顆粒などの液滴が相転移によりタンパク質凝集体を形成すること、p97、RAD23B、UBE3A はそれぞれタンパク質凝集体形成に関与することが報告されおり、本研究で見出されたプロテアソーム foci（液滴）と核内封入体との関連に興味がもたれる。

共同研究者・謝辞

本研究の成果は、東京都医学総合研究所（田中啓二先生、安田さや香先生、土屋光先生、大竹史明先生）、東北大学（稲田利文先生、池内健先生）、東京大学（村田茂穂）先生をはじめ多くの先生のご協力により実施されました。本研究では、多くの共同研究者からのご助言とご協力をいただき感謝申し上げます。

文　献

1） Tanaka K, Mizushima T, Saeki Y. The proteasome: molecular machinery and pathophysiological roles. Biological Chemistry. 2012;393(4):217-34. Epub 2012/10/03. doi: 10.1515/hsz-2011-0285. PubMed PMID: 23029643.

2） Saeki Y. Ubiquitin recognition by the proteasome. J Biochem. 2017;161(2):113-24. doi: 10.1093/jb/mvw091. PubMed PMID: 28069863.

3） Tsuchiya H, Ohtake F, Arai N, Kaiho A, Yasuda S, Tanaka K, et al. In Vivo Ubiquitin Linkage-type Analysis Reveals that the Cdc48-Rad23/Dsk2 Axis Contributes to K48-Linked Chain Specificity of the Proteasome. Molecular Cell. 2017;66(4):488-502 e7. Epub 2017/05/20. doi: 10.1016/j.molcel.2017.04.024. PubMed PMID: 28525741.

4） Pack CG, Yukii H, Toh-e A, Kudo T, Tsuchiya H, Kaiho A, et al. Quantitative live-cell imaging reveals spatio-temporal dynamics and cytoplasmic assembly of the 26S proteasome. Nature Communications. 2014;5:3396. Epub 2014/03/07. doi: 10.1038/ncomms4396. PubMed PMID: 24598877.