

研究題目

細胞老化・個体老化におけるプロテアソームの分解作用とその生理的意義
の解明

研究組織

研究代表者：村田 茂穂（東京大学大学院薬学系研究科）

共同研究者：小迫英尊（徳島大学先端酵素学研究所）

【1】研究の概要

[1-1]本研究の目的・概要

プロテアソームはタンパク質の選択的分解に働く真核生物に必須の複合体型プロテアーゼである。プロテアソーム機能の亢進ががん細胞の増殖促進に働くことが知られる一方、加齢に伴うプロテアソーム機能の低下が細胞老化・個体老化に重要な役割を果たしていることが明らかになってきたが、プロテアソーム機能低下が老化と関連する具体的な分子機構は不明である。

上記を明らかにする目的で、プロテアソーム機能低下時における細胞応答を網羅的に探索するためのプロテオーム解析を実施する。老化モデルとして出芽酵母、哺乳類培養細胞および各種遺伝子欠損マウスを用いて定量的プロテオーム解析を実施することで、老化に伴うプロテオームの変動を明らかにする。さらに、老化細胞においてプロテアソームが核内fociを形成することから、fociにおける選択的な基質の分解が老化に深く関与すると考え、foci構成因子の同定を行う。上記のプロテオーム解析研究での具体的な因子の同定により、プロテアソーム機能低下による細胞・個体老化促進のメカニズムについて病態生理的意義を明らかにする。

[1-2]研究の方法・経過

- ① プロテアソーム機能低下時に何らかのタンパク質の O-GlcNAc 修飾が細胞生存に重要な働きをすることを見いだしたので、培

養細胞をビオチン化 O-GlcNAc によりラベルした後、O-GlcNAc 化タンパク質を精製し、O-GlcNAc 化タンパク質の網羅的同定を試みた。

- ② 脱ユビキチン化酵素 Otu2 がリボソームの機能制御に働くことを見いだしていたが、その具体的な基質が不明であり、その同定を試みた。
- ③ 加齢に伴い蓄積するユビキチン化タンパク質の同定とプロテオーム変動の解析のため、若齢マウスと加齢マウスにおけるプロテオームを定量比較した。
- ④ 老化細胞特異的 proteasome foci の観察とその組織学的特徴の解析のため、近接タンパク質ビオチン標識法 TurboID を用いて、プロテアソーム近傍タンパク質の網羅的同定を試みた。

【2】研究成果

[2-1]本共同研究で明らかになった研究成果
本共同利用により、以下の重要な発見を行うことが出来た。

- ① プロテアソーム機能低下時にO-GlcNAc化が細胞保護的に働くことを突き止め、O-GlcNAc化プロテオーム解析を実施した。その結果、特定の分子のO-GlcNAc化がプロテアソーム機能低下時の細胞保護に重要であることを突き止めた (Hashimoto *et al*, iScience)。

- ② Otu23が40SリボソームeS7サブユニットにおける83番目のリジン残基に付加されたユビキチンを脱ユビキチン化することを明らかにした。eS7に対するユビキチン化と脱ユビキチン化のサイクルが翻訳サイクルの進行に重要であることを明らかにした(Takehara *et al*, iScience)。
- ③ 老化細胞において、プロテアソーム阻害剤の有無、およびタンパク質合成阻害剤の有無におけるプロテオーム解析の結果、老化細胞においてプロテアソームにより積極的に分解されている基質を絞り込むことが出来た。
- ④ 従来の免疫沈降産物の解析から得られなかった新規の分子がproteasome foci近傍タンパク質として複数同定された。

[2-2]本共同研究による波及効果及び今後の発展性

従来の生化学的手法、すなわち既知タンパク質に対する western blot や共免疫沈降実験による相互作用タンパク質の同定では、基質選別機構の解明に至ることは困難であり、細胞内に存在する数千~1万にも及ぶタンパク質の中から特異的な基質を同定するためには、高感度かつ網羅的・定量的な質量分析手法が不可欠である。本共同利用ではこのアプローチが極めて有効に働き、重要な発見を複数挙げる事が出来た。①については、プロテアソーム機能低下時に働く O-GlcNAc 化タンパク質の有力候補について、現在詳細に解析中である。②はリボソームサブユニットのユビキチン化と脱ユビキチン化がタンパク質翻訳サイクルの進行を制御するという新しいバイオロジーを展開する重要な発見である。③の項目については、老化細胞におけるプロテアソーム基質の有力候補を絞りこむことが出来た。現在個々の因子について、細胞老化に伴い分解されることの意義を解析中である。④は老化に伴うこれまで全く知られていない表現型を観察しており、同定した proteasome foci 近傍のタンパク質の解析から老化細胞におけるプロテアソームの新機能解明が期待される。いずれの成果も老化時などさまざまな状況における細胞機能維持のためのタンパク質恒常性維持に働くメカニズムの解明に迫るものであり、タンパク質恒常性の破綻による様々な疾患治療に将来貢献しうる知見を与えると考えている。

【3】主な発表論文等

[3-1]論文発表

1. Hashimoto E, Okuno S, Hirayama S, Arata Y, Goto T, Kosako H, Hamazaki J, Murata S. Enhanced O-GlcNAcylation mediates cytoprotection under proteasome impairment by promoting proteasome turnover in cancer cells. *iScience*. 23 (7): 101299. 2020.
2. Takehara Y, Yashiroda H, Matsuo Y, Zhao X, Kamigaki A, Matsuzaki T, Kosako H, Inada T, Murata S. The ubiquitin-deubiquitination cycle on the ribosomal protein eS7A is crucial for efficient translation. *iScience*. 24 (3): 102145. 2021.

[3-2]学会発表

1. 安田 柊、入木 朋洋、増田 竣、平山 尚志郎、濱崎 純、村田 茂穂. 細胞老化依存的に生じるプロテアソーム foci の機能解析. 第43回日本分子生物学会年会, オンライン, 2020年12月3日
2. Shota Okuno, Eiichi Hashimoto, Shoshiro Hirayama, Hidetaka Kosako, Jun Hamazaki, and Shigeo Murata. The ubiquitin ligase RNF181 plays a pivotal role in sustaining the mammalian proteasome activity under proteasome impairment. 第43回日本分子生物学会年会, オンライン, 2020年12月3日

[3-3]成果資料等

なし

【4】今後の課題等

今後の課題、その他等

本共同利用の過程で、従来のアプローチでは不可能であった数多くの興味深いタンパク質を同定することが出来た。この中からいかにして病態生理的に重要な因子を絞り込むかが現在律速段階になっている。検証実験として実施する western blot よりも質量分析による感度が優っている場面も散見されるようになり、実験デザインそのものをアップデートして再構築していく必要がある。さらに分子細胞生物学的な検討に鋭意務めるとともに、より工夫を凝らした質量分析を行うことにより、得られたデータの有効活用を念頭に効率的に研究を推進していきたい。