

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

ユビキチン-プロテアソーム系(UPS)は、ユビキチン化されたタンパク質の選択的分解により細胞内のタンパク質恒常性維持に働く真核生物の生存に必須の機構である。プロテアソーム機能の亢進や、ユビキチンリガーゼ (E3 リガーゼ) の機能異常が、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・個体老化や神経変性疾患の発症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。しかし、UPS の機能低下や破綻が、老化、がん、および神経変性疾患などの加齢性疾患と関連する具体的な分子機構について未だ不明なことが多い。

プロテアソーム機能低下時に、プロテアソームサブユニット遺伝子群は、転写因子 Nrf1 により代償的に転写誘導をうける。我々は Nrf1 活性化因子として DDI2 を発見していた。さらに、プロテアソーム機能不全により蓄積したユビキチン化タンパク質の分解に DDI2 が働くことを発見していたものの、具体的にどのようなタンパク質の安定性に DDI2 が関与しているかについては全く不明であった。

上記を明らかにする目的で、プロテアソーム阻害時の定量プロテオーム解析を行い、DDI2 の分解基質の同定を試みた。

神経変性疾患の発症には、凝集したタンパク質の蓄積が関わることが知られ、これら凝集タンパク質の分解には UPS が働く。しかし、どの

ような分子群が、凝集タンパク質の UPS 分解に関与しているか全貌は不明であった。そこで、我々は、アルツハイマー病の発症に関わる tau 凝集の UPS 分解に関与する因子の同定を Genome-wide CRISPR screening より試みた。この screening から、これまでリソソーム分解に関わることが知られていた複合体 A が tau 凝集の UPS 分解に関与することが明らかとなった。しかし、この複合体 A がどのような細胞内タンパク質のプロテアソーム分解に関わるのか不明であった。

このことを明らかにする目的で、複合体 A を発現低下させた時の定量プロテオーム解析を行い、複合体 A-プロテアソーム系によって分解されるタンパク質の同定を試みた。

一般的にユビキチン化タンパク質は、E3 リガーゼにより直接認識され、ユビキチン化を受ける。しかし、細胞内には、ユビキチン部分を認識しさらにユビキチンを付加する E3 リガーゼが存在する。このような E3 リガーゼとして Huwe1 と TRIP12 が知られていたが、この二つ以外にも同様の E3 リガーゼが存在するのか、それら E3 リガーゼがどのようなタンパク質の分解に関わるのか、このような E3 リガーゼが存在する生理的意義は不明であった。そこで我々は、ユビキチン融合タンパク質分解を指標に、ユビキチンを認識する E3 リガーゼの探索を Genome-wide CRISPR screening より試みた。この screening からユビキチン融合タンパク質のユビキチン化には、Huwe1 と TRIP12 に加え

てE3 リガーゼ Bが必要であることを発見した。この研究の過程で、Huwel と TRIP12に加えてE3 リガーゼ Bをノックダウンすると、がん細胞の増殖が顕著に抑制することを発見した。しかし、どのようなタンパク質分解の異常が、がん細胞の増殖抑制を引き起こすのか不明であった。

このことを明らかにする目的で、Huwel と TRIP12に加えてE3 リガーゼ Bを発現低下させた時の定量プロテオーム解析を行い、ユビキチン認識 E3 リガーゼ群によってユビキチン化と分解を受けるタンパク質の同定を試みた。

[1-2]研究の方法・経過

- ① プロテアソーム阻害時に蓄積するユビキチン化タンパク質のうち、DDI2により分解されるタンパク質を同定するため、野生型細胞と DDI2 過剰発現細胞にプロテアソーム阻害薬を処理し、定量プロテオーム解析を試みた。
- ② 複合体 A の発現を低下させた時に、細胞内に蓄積するタンパク質を同定するため、定量プロテオーム解析を試みた。
- ③ Huwel, TRIP12 および E3 リガーゼ B の発現低下させた時に、細胞内に蓄積するタンパク質を同定するため、定量プロテオーム解析を試みた。

【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 DDI2過剰発現時にプロテアソーム阻害時の蓄積が減少する可能性のあるタンパク質として数種類の候補タンパク質を同定した。
- ② 複合体Aを介してプロテアソームで分解される可能性のあるタンパク質として数種類の候補タンパク質を同定した。
- ③ Huwel, TRIP12およびE3リガーゼBによって分解される可能性のあるタンパク質として数種類の候補タンパク質を同定した。

[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、未知の基質の同定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、重要な発見を挙げることが出来た。①～③について、それぞれの経路の関与する新規基質候補として数種類のタンパク質を同定した。現在、同定した新規基質候補タンパク質が実際に①～③の経路により分解されるか、その生理的意義に関して詳細に解析中である。

【3】主な発表論文等

[3-1]論文発表
なし

[3-2]学会発表

1. 増田峻, 入木朋洋, 安田柊, 小迫英尊, 平山尚志郎, 大竹史明, 佐伯泰, 濱崎純, 村田茂穂 Senescence-associated nuclear proteasome foci degrade p21 and suppress mitochondrial activation 第44回日本分子生物学会年会
2. Yusen Men, Shinpei Ao, Yasuyuki Sakurai, Shoshiro Hirayama, Shigeo Murata Identification of factors modulating the clearance of aggregate-prone tau by genome-wide CRISPR screening 第43回日本分子生物学会年会
3. 西澤晏理, 平山尚志郎, 村田茂穂 核のUFD経路の生理的意義の解明 第44回日本分子生物学会年会

[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 と質量分析による結果が異なる場面も散見されるようになり、それぞれの解析結果の定量的な評価や検証プロセスを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。