

研究題目 プロテアソームによるユビキチン化タンパク質分解の新規経路 の基質探索

研究組織

研究代表者：村田 茂穂（東京大学大学院薬学研究科）

共同研究者：小迫 英尊（徳島大学先端酵素学研究所）

研究分担者：Yusen Men, 平山 尚志郎（東京大学大学院薬学研究科）

【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。プロテアソームは、それ自体がユビキチンと結合することが出来るにも関わらず、hHR23 や Ubiquilin といったシャトルタンパク質が、ユビキチン化タンパク質をプロテアソームに輸送することが知られていた。

申請者らは、tau 凝集 (tau に蛍光タンパク質 Venus を付加) を恒常的に発現・形成する HEK293A 細胞株を樹立し、この細胞を用いて tau の蓄積を指標としたゲノムワイド CRISPR ノックアウト(KO)スクリーニング (KO により tau-Venus の蛍光が増強する遺伝子の同定) を実施した。その結果、ESCRT-I 複合体が、ユビキチン化された tau をプロテアソーム分解に誘導する新規シャトル因子として働く可能性を捉えた。

ESCRT 経路は、ユビキチン化タンパク質を ESCRT-0、-I、-II、-III 複合体により順次運ぶことにより多胞体へ積み込み、リソソームにより分解させる働きが知られる。しかし、tau-Venus を蓄積させる CRISPR KO スクリーニングとその検証により、ESCRT-I 複合体の構成因子である Tsg101 と UBAP1 のノックアウトが tau を蓄積させる一方、他の ESCRT 因子の KO は tau 蓄積に大きな影響を与えないことが明らかになった。さらに、ESCRT-I は他の ESCRT 因子とは独立してユビキチン化 tau のプロテアソーム分解に働く機能を持つことを明らかにした。

さらに、tau を発現させない細胞においても、ESCRT-I の KO によりプロテアソームの分解基質となる K48 ユビキチン鎖で修飾されたタンパク質が細胞内蓄積することから、ESCRT-I は凝集性 tau のみならず、多くのユビキチン化タンパク質をプロテアソーム分解に誘導していることが強く示唆された。

ユビキチン化タンパク質はリソソーム分解とプロテアソーム分解の2つの経路で分解されることはこれまでよく知られているが、その振り分け機構は不明であった。ESCRT-I がユビキチン化タンパク質をリソソーム分解またはプロテアソーム分解に振り分ける因子であることが強く示唆され、ESCRT-I 依存性にプロテアソームにより分解される基質を網羅的に同定し・検証することにより、その機構を解明する糸口とする。

[1-2]研究の方法・経過

ESCRT-I 欠損時に蓄積するタンパク質、プロテアソーム分解阻害時やリソソーム分解阻害時に蓄積するタンパク質を、定量プロテオーム解析により同定した。

【2】研究成果

[2-1]本共同研究で明らかになった研究成果

コレステロール生合成経路において律速酵素である SQLE および FDFT1 が、プロテアソーム分解とリソソーム分解の2つの経路で並行して分解されることを明らかにした。さらに、SQLE および FDFT1 が、ESCRT-I 依存的に上記の二種類の経路で分解されていることも捉えている。

[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、新規分解経路の未知の基質の同定に至ることは困難であった。そのため、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った。本共同利用ではこのアプローチが極めて有効に働き、ESCRT-I 依存的にプロテアソームとリソソームで分解される新規基質として SQLE と FDFT1 の同定に成功した。

SQLE と FDFT1 は、コレステロール生合成の最終過程において、連続して機能する酵素であり、律速酵素であることが知られている。SQLE と FDFT1 の発現量がプロテアソームとリソソームで厳密に制御されていることがわかったが、それらが両経路とも ESCRT-I によって制御をうけるメカニズムを明らかにすることで、細胞内のコレステロール代謝制御の生理的意義の解明につながると考えられる。

【3】主な発表論文等

[3-1]論文発表
なし

[3-2]学会発表

1. Shoshiro Hirayama, Yusen Men, Shinpei Ao, Yasuyuki Sakurai, Megan Lo, Hidetaka Kosako and Shigeo Murata The ESCRT-I complex mediates proteasomal degradation via PTPN23
新学術領域「マルチモードオートファジー」
第4回班会議

[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

ESCRT-I の機能阻害時に、コレステロール代謝酵素の mRNA の発現誘導が見られることは最近報告されている。今回新たに、ESCRT-I がコレステロール生合成酵素 SQLE, FDFT1 のタンパク質の安定性にも機能することを明らかにした。ESCRT-I の機能低下は、SQLE, FDFT1 のプロテアソーム分解、リソソーム分解共に低下

させることがわかったが、その結果蓄積した SQLE, FDFT1 が細胞内のコレステロール量に影響を与えるのか今後明らかにする予定である。また、ESCRT-I 阻害時に細胞内コレステロール量が増加するとしたら、それは細胞保護的に機能するのか否か検討する予定である。