

## 研究題目 プロテアソームによる基質選別機構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。プロテアソームによる基質選別には、ユビキチン化タンパク質をプロテアソームに運搬するシャトル因子(HHR23A/B, ubiquilin1-4)、プロテアソームのユビキチン鎖受容体 (Rpn1, Rpn10, Rpn13)、プロテアソーム活性化因子 (PA28, PI31, PA200)などが関与している。Rpn13ががん細胞で高発現し増殖促進に働くこと、ubiquilin 2が筋萎縮性側索硬化症の原因遺伝子であることなど、プロテアソーム分解時の基質選別が様々な生理・疾患病態に深く関与することが示唆されているが、各因子がどのような基質を選別しているのか未解明である。

上記を明らかにする目的で、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。また、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をプロテオーム解析から迫る研究を新たに実施する。加齢に伴い臓器にユビキチン化タンパク質が増加することが知られている。プロテアソーム機能低下により老化細胞においてどのようなタンパク質が選択的に蓄積するのかをプロテオーム解析により同定し、細胞・個体老化とプロテアソームの基質選択性との関係およびその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 プロテアソームは細胞老化において重要な役割を果たしていることが知られている。ヒト初代培養線維芽細胞を用いて、老化細胞においてプロテアソーム依存的に分解される基質を同定することを試みた。
- ③ 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。
- ④ 近年、その有用性が注目されている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 (manuscript in revision)。
- ② 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。
- ③ Otu2がリボソームの特定のサブユニットの脱ユビキチン化を行うことにより、翻訳

機能を正に制御していることを明らかにした (manuscript submitted)。

- 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プロテアソーム近傍タンパク質として複数同定された。また、研究室から2名の学生と特任研究員を小迫先生の研究室に1週間滞在させ、技術を習得した。

#### [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、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の項目については、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の項目については、老化細胞におけるプロテアソームの基質の有力候補を絞りこむことが出来たので、現在個々の因子について、細胞老化への影響の観点から分解されることの意義を解析中である。③は脱ユビキチン化酵素によるリボソーム機能の制御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。④はプロテアソームの新しいバイオロジーを切り拓く可能性のある手法であり、今後一層の活用と解析が期待される。いずれの成果も細胞機能維持におけるタンパク質恒常性の維持のメカニズムの一端に迫るものであり、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ている。

#### 【3】主な発表論文等

##### [3-1]論文発表

なし

##### [3-2]学会発表

1. 福島聡真、入木朋洋、宮東昭彦、太田浩、齋藤通紀、小迫英尊、濱崎純、村田茂穂.精子形成過程におけるプロテアソーム相互作用因子 PI31 の機能解析.第9 2回日本生化学会大会,パシフィコ横浜, 2019年9月18日
2. Shota Okuno, Eiichi Hashimoto, Shoshiro

Hirayama, Hidetaka Kosako, Jun Hamazaki, and Shigeo Murata. Ring finger ubiquitin ligase plays a pivotal role in the O-GlcNAcylation-mediated cytoprotection under proteasome impairment in cancer cells. 第9 2回日本生化学会大会,パシフィコ横浜, 2019年9月19日

3. 福島聡真、入木朋洋、宮東昭彦、太田浩、齋藤通紀、小迫英尊、濱崎純、村田茂穂.精子形成過程におけるプロテアソーム相互作用因子 PI31 の機能解析.第4 2回日本分子生物学会年会, マリンメッセ福岡, 2019年12月5日
4. 竹原由香、松尾芳隆、小迫英尊、稲田利文、八代田英樹、村田茂穂.リボソームタンパク質の脱ユビキチン化による翻訳制御機構の解明新学術領域研究「ケモユビキチン」第3回 領域班会議ホテル&リゾート 南房総 (千葉県南房総市.) 2019年12月17日
5. Jun Hamazaki, Eiichi Hashimoto, Shota Okuno, Shoshiro Hirayama, Hidetaka Kosako, Shigeo Murata. Ring finger ubiquitin ligase plays a pivotal role in O-GlcNAcylation-mediated cytoprotection under the proteasome impairment in cancer cells. 3<sup>rd</sup> EMBO conference on the ubiquitin system. Cavtat, Croatia. Sep 14, 2019

##### [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、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。分子細胞生物学的な検討に鋭意務めるとともに、さらに工夫を凝らした質量分析を行うことにより、効率的に研究を推進していきたい。