

プロテアソームによる蛋白質分解の分子機構

富山大学 先端ライフサイエンス拠点

伊野部 智由

1. 目的 背景

生体内では、新たに作り出される蛋白質と同じ量の蛋白質が分解されている。しかしながら一昔前の生物学では、蛋白質の合成やフォールディングなど、蛋白質の誕生についての研究が中心で、ネガティブな印象が付きまとう蛋白質の死についての研究はあまり注目されていなかった。近年、蛋白質分解は、単に“ダメ”になった蛋白質の処理のためだけでなく、多くの細胞・個体機能の制御に積極的に利用されていることがわかり、大きな研究の進展を見せている。

我々の研究しているユビキチンプロテアソーム系 (ubiquitin-proteasome system: UPS) は、真核生物における最も重要な蛋白質分解システムのひとつである。UPSは単に不要な蛋白質を分解するだけでなく、細胞機能に関わる制御蛋白質の濃度を分解により調整している。また分解された後のペプチド断片も細胞性免疫や抗原提示に利用されている。分解を担うプロテアソームは絶妙な仕組みで分解すべき蛋白質と分解しない蛋白質を見分けている。プロテアソームの基質蛋白質選別機構としてよく知られるのがユビキチン化機構である。この機構によりターゲット蛋白質に取り付けられた数珠状のポリユビキチン鎖を目印にプロテアソームに認識され、分解されると考えられていた。ところが、最近、プロテアソームによる効率的な蛋白質分解には、ポリユビキチン鎖のほかにも、フラフラと揺らいだ構造を取らないUnstructured領域が必要であることが明らかになった。このUnstructured領域は、基質となる蛋白質の分解の起点となると考えられている。プロテアソームに運び込まれたポリユビキチン化蛋白質のUnstructured領域は、プロテアソームのATPaseリングに引っ張られ、アンフォールドされ、分解へと導かれる。我々は有効なUnstructured領域をもつ標的蛋白質は、プロテアソームに運び込まれさえすれば、ポリユビキチン鎖を必要とせず分解されることを明らかにし、効率的な分解を引き起こすUnstructured領域の特性を次々に決めている (Prakash, Inobe *et al.* Nat. Chem. Biol. 2009) (Inobe *et al.* Nat. Chem. Biol. 2011)。これらの結果は、Unstructured領域が最終的な蛋白質の運命を決めており、Unstructured領域のプロテアソームへのアクセスを制御すれば分解の制御が可能であることを示している。

このような背景から我々はUnstructured領域に着目した制御で、プロテアソームによる分解調整を行えるのではないかと考えた。そこで次の分解制御方法の開発を本研究で行った。

- Unstructured領域をターゲットにした分解抑制方法の開発
- 人工アダプター蛋白質による分解誘導方法の開発

2. 方法

- Unstructured領域をターゲットにした分解抑制

私たちはこれまでに第二のプロテアソーム分解シグナルとして働くUnstructured領域の特徴について調べ上げ、効率的な分解を引き起こすUnstructured領域の特徴を明らかにしてきた。我々はこれらの研究成果を基に、分解を誘導するUnstructured領域の性質をリガンドの結合や翻訳後修飾により変化させれば、分解を抑制できると考えた。そこでこの仮説を証明するために、モデル基質蛋白質をまずデザインした。蛍光色素FIAsH/ReAsHと特異的に結合するテトラシステイン (Cys₄) モ

チーフをUnstructured領域として持つモデル蛋白質や、小分子の結合により誘導的に構造形成が起こるスタフィロコッカスヌクレアーゼ変異体をUnstructured領域として用いたモデル基質蛋白質の発現プラスミドを作成した。そしてこれらモデル基質蛋白質のプロテアソームによる分解が、小分子により抑制されるのか、*in vitro*の精製プロテアソームを用いた分解実験系や、酵母や培養細胞での実験系で検証した。*in vitro*の精製プロテアソームを用いた分解実験系では、FLAGタグを融合したRpn11を発現する酵母株から、Anti-FLAGゲルを用いて酵母プロテアソームを精製し、実験に用いた。この*in vitro*精製系の実験では、放射性同位体ラベルされた基質蛋白質を、無細胞蛋白質発現で発現し粗精製して用いた。出芽酵母や培養細胞HEK293Tを用いた分解実験では、FLAGタグなどを取り付けた基質蛋白質発現プラスミドを細胞内に導入し、基質蛋白質を発現させた。発現後、シクロヘキシミドによる蛋白質翻訳停止後の発現蛋白質の細胞内での減少を測定した。

● アダプター蛋白質による分解誘導

我々のこれまでの研究により、任意の蛋白質をプロテアソームに運び込むアダプター蛋白質の存在が明らかになってきた。アダプター蛋白質はプロテアソームと基質蛋白質に同時に結合することができるため、基質をプロテアソームに運び込むことができる。そして運び込まれた蛋白質のうち、Unstructured領域を持ったものだけが分解される。我々はこのメカニズムを応用し、Unstructured領域をもつ不要な蛋白質をプロテアソームに運び込み、分解を誘導するアダプター蛋白質を開発した。アダプター蛋白質はターゲット蛋白質結合部位とプロテアソーム結合標識が必要である。ターゲット結合部位としてはリガンドや抗体、ファージディスプレイ法より得たペプチドなどを用いることができる。プロテアソーム結合標識はテトラユビキチン鎖 (Ub₄) やユビキチン様ドメイン (UbL) などが使用出来る。

本研究では、その蓄積がハンチントン病などの神経変性疾患を引き起こす、ポリグルタミン (PolyQ) 異常伸長蛋白質や、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の原因蛋白質の一つである変異SOD1をターゲット蛋白質として用いた。これらの異常蛋白質の分解を誘導するアダプター分子が出来れば、ポリグルタミン病やALSの治療が可能になると期待される。異常伸長PolyQや、変異SOD1の遊離した単量体に特異的に結合するペプチドは、ファージディスプレイ法により開発した。PolyQに結合するペプチドとしてはQBP1を、変異SOD1の単量体に結合するペプチドとしては慶応大の古川良明准教授の開発したペプチドMP1を用いた。これらのペプチドとポリユビキチン鎖やUbLドメインと融合した蛋白質をアダプターとして用いた。

ポリグルタミン蛋白質の分解実験は上記と同じ*in vitro*精製プロテアソーム系と、ハンチントン病のモデル培養細胞を用いた。ターゲットはPolyQが異常伸張したハンチンチンのN末端断片 (tNHtt) を用いた。*in vivo*精製系の実験では放射性同位体ラベルしたtNHttを、培養細胞内では発現誘導が可能なGFP融合tNHttを用いた。アダプター蛋白質は*in vitro*精製実験系では大腸菌より精製し、培養細胞では細胞内で一過的に過剰発現させた。

3. 結果

● Unstructured領域をターゲットにした分解抑制

テトラスチンUnstructured領域を持つモデル基質は通常、*in vitro*精製系でも培養細胞を用いた系でも、効率的にプロテアソームにより分解されるが、ReAsHを添加すると、どちらの実験系でも、このような効率的な分解が阻害された。このような阻害は、ユビキチン非依存的にプロテア

ソームにより分解される基質においても、Unstructured領域を含む分解シグナルへのReAsHの結合により、観測されることから、確かにUnstructured領域へのReAsHの結合により、分解が抑制されていることを示している。さらにこのような分解の阻害は、テトラシステイン-ReAsHを用いた実験系だけでなく、天然変性蛋白質であるスタフィロコッカスヌクレアーゼ変異体への特異的ヌクレオチド阻害剤の結合によっても確認されている。このような分解阻害は細胞内の幾つかの天然変性蛋白質においても観察されており、同様の分解制御が細胞内で一般的に行われていると考えられる。さらにこの分解阻害方法は疾患において異常に分解が亢進する蛋白質のUnstructured領域をターゲットにして、この蛋白質の分解を抑え、疾患を治療することが出来るようになることが期待される。実際、酵母の不安定化必須蛋白質のUnstructured領域に結合する分子により、酵母の生育速度が改善されることを確認した。

● アダプター蛋白質による分解誘導

まずプロテアソーム結合タグ (UbLあるいはUb₄) とターゲットとなるポリグルタミン異常伸長tNHttや変異SOD1に特異的に結合するペプチド (QBP1やMP1) を融合した蛋白質が、プロテアソームおよびターゲット蛋白質に結合するか、プルダウン実験により確認を行い、確かにどちらにも結合することを確認した。通常ターゲットとするポリグルタミン異常伸長tNHttや変異SOD1は、ポリユビキチン化されることなしにはプロテアソームにより分解されることがない。しかしながら*in vitro*の精製系において、上記で作成したアダプター蛋白質 (Ubx-QBP1, Ubx-MP1) は、これらの蛋白質の分解を促進することが明らかとなった。さらにハンチントン病のモデル培養細胞にUbx-QBP1アダプター蛋白質を過剰発現させたところ、tNHttのプロテアソームによる分解を誘導し、細胞内でのtNHttのドット状凝集体の量を減少させた。今後、高効率で小型・安定なアダプターに改良していけば、臨床応用をも可能になると考えられる。

4. 考察

以上で開発に成功したUnstructured領域に注目した分解誘導と阻害の方法は、特定の蛋白質の細胞内濃度を選択的に制御するための有用な戦略である。今後これらの技術は基礎研究だけでなく、臨床研究においても利用できるようになることが期待される。

5. 参考文献

1. 高橋一暢、伊野部智由 (2013) Unstructured領域を介したプロテアソームのタンパク質分解、生化学、85(11), 25-29
2. (国際シンポジウム招待講演) Inobe, T. (2013) Protein unfolding for proteasome-mediated degradation. International Symposium on Protein Folding and its Biological Significance (Okazaki Conference Center, Okazaki, Japan, March 4-6).
3. (国際シンポジウム招待講演) Inobe, T., Takahashi, T. and Matouschek, A. (2012) Fluctuation-mediated regulation of the protein degradation by the proteasome. The 6th International Symposium on Molecular Science of Fluctuations toward Biological Functions (Kyoto, Japan, Dec. 5, 6)
4. Kraut, DA., Israeli, E., Schrader, E., Patil, A., Nakai, K., Nanavati, D., Inobe, T. and Matouschek, A. (2012) Sequence- and Species-Dependence of Proteasomal Processivity. ACS Chem. Biol. 7, 1444-1453.