

## ポイント

- 生物の重要な構成成分の一つであるタンパク質は正常な合成と分解のサイクルによってその品質を厳密に管理されている。しかし、核内におけるタンパク質の分解の仕組みについては、未解明の点が多く残されていた。
- 細胞内の選択的なタンパク質分解を担うユビキチン・プロテアソーム系において、ユビキチン結合タンパクとユビキチン鎖の相互作用によって液-液相分離が引き起こされ、そこにプロテアソームが動員されることで核内にプロテアソーム液滴が生じることを新たに発見した。
- 詳細な解析によってプロテアソーム液滴は核内に生じた異常タンパク質の分解の場として機能していることが明らかになった。
- 液-液相分離が駆動する新しいタンパク質分解の仕組みを発見した本研究成果は、タンパク質分解の異常が引き起こす細胞のがん化や神経変性疾患を抑えるための基盤となる知見になると期待されます。

## 研究の背景

現在、世界の生命科学分野で注目されているキーワードとして「液-液相分離」という現象があります。液-液相分離とは2つの液体が混ざり合わずに互いに排除しあうことで2相に分離する現象のことです。身近な例では、サラダドレッシングが水と油の2相に分かれる状態も液-液相分離で、自然界ではよくみられる現象といえます。最近の研究により、細胞内でも核酸やタンパク質が液-液相分離を起こして周囲とは異なる液相を形成し、水に浮かぶ油滴のように細胞内で液滴を形成することが分かってきました。細胞内には核やミトコンドリアなどの『膜で仕切られたオルガネラ(細胞小器官)』があることはよく知られていますが、タンパク質をはじめとする生体高分子の液滴は『膜のないオルガネラ』として、さまざまな役割を担っていることが明らかになりつつあります。

他方、生物の重要な構成成分の一つであるタンパク質は、生体内のシステムによりその品質を厳密に管理されており、正常な合成と分解のサイクルによって、恒常性が維持されています。細胞内タンパク質代謝における主要な担い手であるユビキチン・プロテアソーム系<sup>\*1)</sup>は、異常タンパク質や役目を終えた機能性のタンパク質を選択的に分解除去することで、タンパク質の恒常性の維持のみならず遺伝子発現、ストレス応答、シグナル伝達など、さまざまな細胞機能の制御に必須の役割を果たしています。近年、細胞質に存在するタンパク質やオルガネラの分解経路が次々と明らかになってきている一方、核内におけるタンパク質の分解機構は未だ解明されていない部分が多く残されています。

## **研究の概要**

本研究グループは、プロテアソーム<sup>2)</sup>の細胞内での振る舞いを調べるため、プロテアソームサブユニットに蛍光タンパク質を融合しノックインしたヒト培養細胞株を作製し、蛍光顕微鏡で観察したところ、プロテアソームが高浸透圧のストレスに応答して核内で粒状の構造体をつくることを見出しました。更にこの構造体を蛍光顕微鏡で詳細に調べたところ、細胞内で活発に動き回っていること、互いに融合し1つになること、ほぼ球状であることから、液-液相分離で形成された液滴であることが分かりました(図1)。一方、プロテアソーム液滴の構成分子を解析したところ、ユビキチン化されたタンパク質をプロテアソームに運ぶタンパク質 RAD23B<sup>3)</sup>が集積していることが分かりました。続いて、プロテアソームが液滴を形成する分子機構を明らかにするため、精製したユビキチン鎖<sup>4)</sup>とRAD23Bの挙動を試験管内で観察したところ、それぞれ単独では液滴が形成されなかったことから、液-液相分離にはユビキチン鎖とRAD23Bの結合が必要であることが分かりました。更にプロテアソームと結合できないRAD23B変異体では、液滴は形成するがプロテアソームは集積しなかったことから、ユビキチン鎖とRAD23Bの相互作用によって液-液相分離が起こり、そこへプロテアソームが動員されることでプロテアソーム液滴が生じることが明らかになりました(図2)。加えて、核内のプロテアソーム液滴においては、プロテアソームがユビキチンに選択的なシャペロンであるp97<sup>5)</sup>と協調して、ユビキチン化タンパク質の分解を誘導することがわかりました。つまり、プロテアソーム液滴は、細胞内の局所的なタンパク質分解を促進させるために形成すること、細胞が環境ストレスに適応するための、新たなタンパク質分解の仕組みの一つであることが明らかになりました。

## **社会的意義と今後の展望**

液-液相分離は新たな細胞内現象として近年高い注目を集めていますが、本研究により、これまで未解明であった核内タンパク質の品質管理機構とも関連していることが明らかになりました。これは、液-液相分離が細胞内における現象に広く関与していることを改めて示すものであり、液-液相分離の視点から細胞内のさまざまな現象の見直しが進むことが予想されます。また、凝集性のタンパク質の集積は、神経変性疾患の発症や進行に関係していると考えられています。従って、タンパク質の分解という品質管理の分子機構の一端を明らかにした本成果は、細胞のがん化や神経変性疾患を抑えるための知見の基盤になると期待されます。

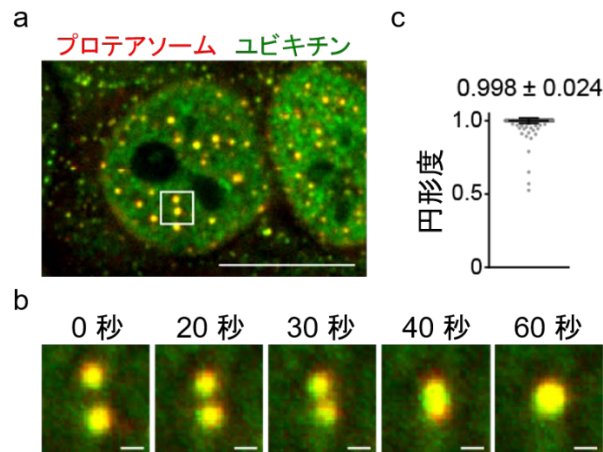


図 1. プロテアソーム液滴の観察

- (a) 赤色蛍光タンパク質をプロテアソームに、緑色蛍光タンパク質をユビキチンに融合し、ノックインした細胞。細胞に高浸透圧のストレスを与えると、核内で顕著に液滴が形成される。この液滴にはプロテアソームとユビキチンが存在するため、両者が重なって黄色に見える。共焦点蛍光顕微鏡で観察 (スケールバー: 10  $\mu\text{m}$ )。
- (b) 液滴が融合し大きくなる様子。(a) 内の白四角を拡大 (スケールバー: 0.5  $\mu\text{m}$ )。
- (c) 個々の液滴の円形度を算出してグラフに示した。値が 1 に近づくほど粒子は真円に近づく。数値は液滴 1,312 個の平均値  $\pm$  SD (標準偏差)。

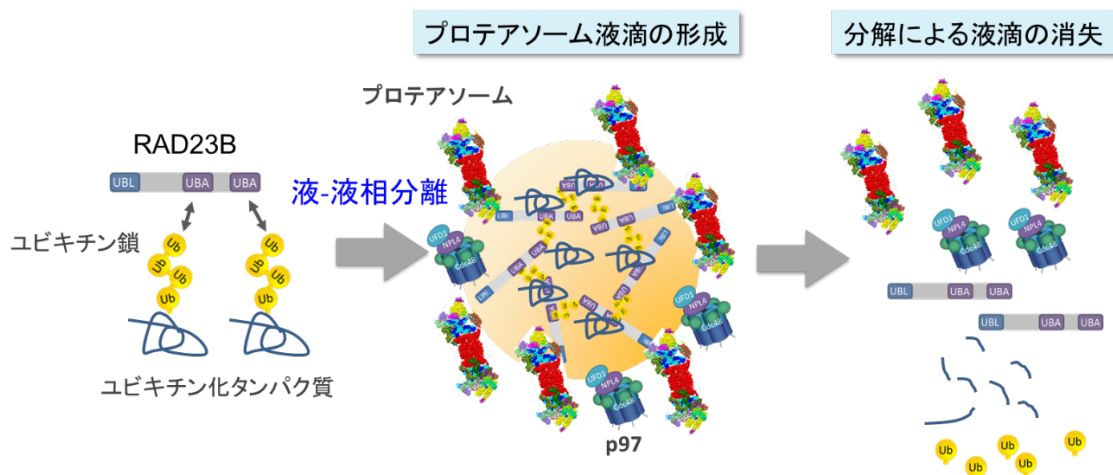


図 2. 液-液相分離を介したタンパク質分解のモデル

高浸透圧のストレスにより生じたユビキチン化基質(タンパク質)が RAD23B と液-液相分離し、更にプロテアソームを呼び込むことでプロテアソーム液滴が形成される。プロテアソームによるユビキチン化タンパク質の分解により液滴は消失する。

## 用語説明

- \*1) ユビキチン・プロテアソーム系:オートファジー・リソソーム系とならぶ細胞内の主要なタンパク質分解系であり、ユビキチン化されたタンパク質をプロテアソームが選択的に分解することで、細胞増殖やシグナル伝達、タンパク質の品質管理など、さまざまな細胞機能を制御する。
- \*2) プロテアソーム:ユビキチン鎖により標識されたタンパク質を選択的に認識して分解する ATP 依存性の巨大なタンパク質分解酵素複合体。33 種類 66 個の部品(サブユニット)から形成される。近年、プロテアソームに依存したタンパク質分解にシャトル分子の RAD23B やユビキチン選択的シャペロンの p97 が重要な役割を果たしていることが明らかとなってきた。
- \*3) RAD23B:プロテアソームが結合するドメインである UBL(ubiquitin-like)ドメインとユビキチン結合ドメインである UBAドメインを2つ持ち、ユビキチン化基質(タンパク質)をプロテアソームに運ぶシャトル分子として機能する。
- \*4) ユビキチン鎖:ユビキチンは、基本的に標的となるタンパク質の特定のリジン残基に共有結合を介して付加される。ユビキチン自身もユビキチン化されることで、ユビキチン同士が結合して数珠つなぎになったユビキチン鎖を形成する。
- \*5) p97:AAA+タイプの六量体リング構造を持った ATPase。様々な補因子とともにたつき、ATP の加水分解のエネルギーを利用して標的タンパク質をリング構造の穴に通すことで、標的タンパク質を解きほぐす機能を持つ。