

26S プロテアソームによるユビキチン化タンパク質 認識・分解機構

濱崎 純, 村田 茂穂

プロテアソームはユビキチン化タンパク質の迅速かつ選択的な分解を行うことにより、真核生物において必須の役割を担う。従来、プロテアソームはK48鎖ユビキチン化タンパク質の分解処理を行うと単純に認識されていたが、近年の解析技術の進歩により、ユビキチン修飾の多様性が明らかになるとともに、その読み取り・編集を行うユビキチン鎖受容体サブユニットの多様性、プロテアソーム会合脱ユビキチン化酵素、ユビキチン化タンパク質をプロテアソームへ運搬する複数の経路など、さまざまな要素がタンパク質分解に寄与していることがわかってきた。本稿ではプロテアソームにおけるユビキチン化タンパク質の認識・分解機構の最新の理解について紹介する。

1. はじめに

細胞内タンパク質の1~2%を占めるといわれるプロテアソームは、出芽酵母（以下酵母）から哺乳類に至るすべての真核生物において高度に保存された構造を持つタンパク質分解酵素複合体であり、ユビキチン化タンパク質をATP依存的に分解することにより細胞内の多彩な生命活動の円滑な進行や恒常性維持に働く¹⁾。プロテアソーム阻害によりK63鎖以外のさまざまなユビキチン鎖（K6, K11, K27, K29, K33, K48）が細胞内に蓄積することが知られている²⁻⁴⁾。その中でも細胞内に最も多く存在するK48鎖はプロテアソームに認識される主要なユビキチン鎖であり、プロテアソームに直接認識される以外にも、ユビキチンと会合するUBA（ubiquitin-associated）ドメインとプロテアソームと会合するUBL（ubiquitin-like）ドメインの両方を

持つシャトル因子によってプロテアソームに運搬されることが知られる。プロテアソームにおけるユビキチン認識機構は古くから重要なテーマとして注目されてきたが、最近、新たなユビキチン会合ドメイン（ubiquitin-binding domain：UBD）の同定や立体構造解析・質量分析技術の進展により、従来よりも緻密なユビキチン認識機構が明らかになってきており、目覚ましい進展を見せている。

2. 26S プロテアソームの構造と機能

26Sプロテアソームは33種類66個のサブユニットからなる約2.5MDaの超分子複合体であり、プロテアーゼ活性を持つ20Sコア粒子（core particle：CP）と、その両端に会合しユビキチン化タンパク質の分解を助ける19S制御粒子（regulatory particle：RP）からなる^{5,6)}（図1）。CPは α 1~7の α サブユニットからなる α リング、 β 1~7の β サブユニットからなる β リングが $\alpha\beta\beta\alpha$ の順に重なった中空円筒構造を持ち、 β 1, β 2, β 5が持つ活性中心は円筒構造の内腔に配向するため、細胞内のタンパク質と空間的に隔離されている。RPはATPaseサブユニットを含む基底部（base）と蓋部（lid）から構成され、baseは6種のATPaseサブユニット（Rpt1~6）と4種のnon-ATPaseサブユニット（Rpn1, Rpn2, Rpn10, Rpn13）、lidは9種のnon-ATPaseサブユニット（Rpn3, Rpn5~9, Rpn11, Rpn12, Rpn15）からなる。RPはユビキチン鎖の捕捉と除去、基質タンパク質の解きほぐしとCP内腔への送り込みに働く。 α リングの中央はCP内腔へ

東京大学大学院薬学系研究科蛋白質代謝学教室（〒113-0033 東京都文京区本郷7-3-1 東京大学薬学部総合研究棟7階）

Recognition and degradation of ubiquitinated proteins by the 26S proteasome

Jun Hamazaki and Shigeo Murata (Laboratory of Protein Metabolism, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan)

本論文の図版はモノクロ（冊子版）およびカラー（電子版）で掲載。

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2020.920048

© 2020 公益社団法人日本生化学会

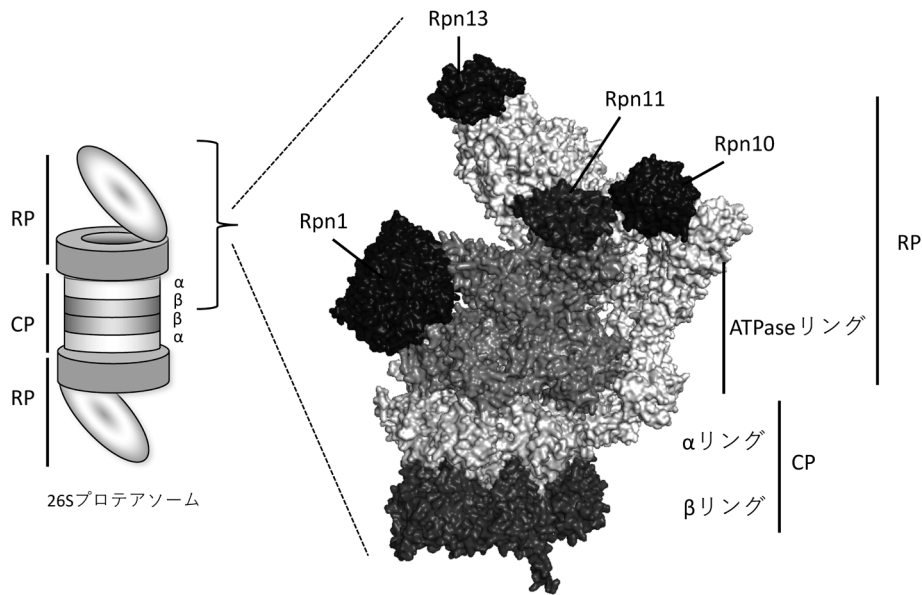


図1 26S プロテアソームのユビキチン鎖受容体

(左)26S プロテアソームはCPの両端にRPが会合した構造を持つ。(右)プロテアソームのユビキチン鎖受容体サブユニット Rpn1, Rpn10, Rpn13はRP表面に, Rpn11はATPaseリングの上方に配置する。最近の構造解析により, ユビキチン化基質の会合から分解の過程でRPの構造がダイナミックに変化することが明らかになった (PDB ID: 4CR2)。

の基質タンパク質の入り口(ゲート)となるが, RPが会合しない状態では α サブユニットのN末端により塞がれており, タンパク質の無差別な侵入を防いでいる。RPがCPへ会合するとRpt2, Rpt3, Rpt5のC末端HbYX(疎水性アミノ酸-Tyr-任意アミノ酸)配列がCPの α リング間のポケットに刺さることでゲートが開き, 立体構造が解きほぐされた基質タンパク質が α リングチャンネルの直径13Åの狭いゲートを通過して, CP内腔に送り込まれることが可能となる。基質はCPで3~12アミノ酸長にまで切断され, プロテアソーム外に放出される。

3. プロテアソームの内在性ユビキチン鎖受容体

26Sプロテアソームにおけるユビキチン鎖受容体としては, それぞれ異なるUBDを持つRpn1, Rpn10, Rpn13が知られ, 4分子以上のユビキチンが連結したK48鎖がプロテアソームによる分解標識として主に認識される^{7,8)}。一般に, 細胞内のさまざまなUBDはユビキチンのLeu8, Ile44, Val70による疎水性パッチを認識するが, 認識する周囲の残基の違いから生じるアフィニティーの差異により, *in vitro*ではRpn1, Rpn10, Rpn13は会合するユビキチン鎖の選択性が異なる^{9,10)}。なお, Rpt5やRpn15もユビキチンとの会合が報告されているが, 実際にプロテアソームにおいてユビキチン鎖受容体として働くか明らかとなっていない。

1) Rpn10

Rpn10は最初に同定されたユビキチン鎖受容体であり, N末端側のVWA (von Willebrand factor A) ドメインによりプロテアソームと会合し, C末端側のUIM (ubiquitin-

interacting motif) でユビキチン鎖やUBLドメインと会合する。UIMはヘリックス構造でK48ユビキチン鎖を認識する(図2A)。酵母Rpn10はUIMを一つだけ持つ一方, 哺乳類Rpn10は二つのUIMを持ち, ユビキチン2分子を認識することで1本のユビキチン鎖に対する会合を強めており, K48およびK63鎖と会合する¹⁰⁾。酵母ではRpn10欠損はユビキチン鎖の蓄積がほとんどみられず非必須遺伝子であるが, Rpn10欠損マウスはユビキチン鎖蓄積を生じて胎生致死であることから, 進化によりその生理的重要性が変化したと考えられる¹¹⁾。

2) Rpn13

酵母において機能未知のサブユニットとして同定されたRpn13は, 一次配列上の保存性が高い分子がヒトには見つからず, 進化的に保存されていないと考えられ注目されずにいた。その後, ヒトプロテアソーム会合因子として同定されたADRM1がRpn13と局所的な配列相同性を持つオルソログとして発見されると, 第二のユビキチン鎖受容体としての機能も明らかになり一気に注目を集めた。Rpn13はN末端側に新規のUBDであるPru (pleckstrin-like receptor for ubiquitin) ドメインを持ち, 3本のループ構造でユビキチンを認識する(図2B)。ヒトRpn13はPruドメインによるユビキチンとの接触面が広いことや, 酵母に保存されていないアミノ酸の寄与によりモノユビキチンにも比較的強く会合し, K48, K63鎖いずれとも強く会合する¹²⁾。また, ジユビキチンとの会合ではRpn13は基質側ユビキチンを認識することも示されている。酵母ではRpn13は非必須遺伝子であるが, Rpn13欠損マウスは新生仔致死となる。しかし, Rpn10欠損マウスに比し, Rpn13欠損マウス

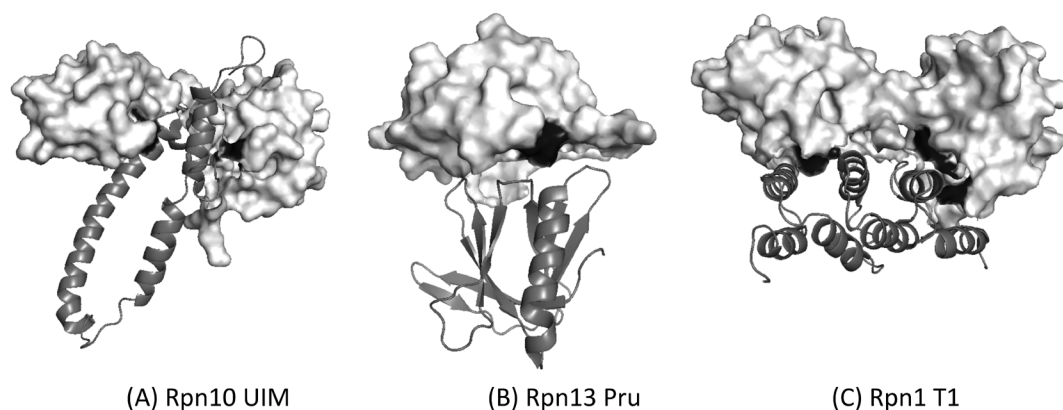


図2 プロテアソームユビキチン鎖受容体によるユビキチン認識機構

(A) ヒト Rpn10 UIM と K48 ジユビキチンの会合 (PDB ID: 2kde). (B) マウス Rpn13 Pru とユビキチンの会合 (PDB ID: 2z59). (C) 酵母 Rpn1 T1 と K48 ジユビキチンの会合 (PDB ID: 2n3v). ユビキチンを白色で示し、疎水性パッチ (Leu8, Ile44, Val70) を灰色で示した. ユビキチン鎖受容体はリボンモデルで示した.

はユビキチン蓄積も軽度であり、発生はほぼ正常であることから、哺乳類におけるユビキチン鎖受容体としての重要性は Rpn10 の方が高いと考えられる。哺乳類 Rpn10, Rpn13 二重欠損はユビキチンの顕著な蓄積を誘発することから、Rpn10 と Rpn13 はプロテアソームユビキチン鎖受容体として協調的に働くと考えられる¹³⁾。実際に、Rpn10 と Rpn13 はまさに両腕を広げてユビキチンを迎え入れようとするように RP 表面の両端に位置し、Rpn10 UIM と Rpn13 Pru の距離はユビキチン 4 分子分程度の約 90 Å であることから、一つのユビキチン鎖を両者が同時に捕捉する可能性も示唆されている¹⁴⁾。

3) Rpn1

Rpn1 は後述のシャトル因子の受容体であることが報告されていたが、最近になり直接ユビキチン鎖を認識することが報告された¹⁵⁾。N 末端側にある 30~40 アミノ酸からなるリピート配列によるヘアピン構造で形成されたロッド状のトロイドドメインでユビキチン鎖を認識する (図 2C)。トロイドドメイン上の T1 ドメインの 3 本のヘリックスでシャトル因子の UBL ドメインやユビキチンと会合し、T2 ドメインで脱ユビキチン化酵素 (deubiquitinating enzyme: DUB) Ubp6 (ヒトでは Usp14) の UBL ドメインと会合する。Rpn1 は K6, K48 ユビキチンを認識する。Rpn1 は RP の構築に必須のため欠損体を作製できないが、立体構造解析による情報を基にした点変異解析でユビキチン認識メカニズムの理解が進んだ。

4. シャトル因子

酵母のシャトル因子として知られる Rad23 (ヒトでは hHR23a, b), Dsk2 (UBQLN1~4), Ddi1 (DDI1, 2) は UBA を介してモノユビキチンを認識するが、ユビキチン鎖とより強く会合する^{16, 17)} (図 3)。シャトル因子もユビキチン鎖選択性を示すことが主に *in vitro* で示され、UBA を

二つ持つ Rad23 は UBA1 で K63 鎖と強く会合し、UBA2 で K48 鎖と会合する一方、UBQLN1 UBA はモノユビキチンや K48, K63 鎖を認識する¹⁸⁾。しかしながら、酵母 Rad23, Dsk2 はどちらも K48 鎖および K29 鎖との会合が *in vivo* で確認されている¹⁹⁾。最近、酵母において K48 鎖ユビキチン化タンパク質の大部分は AAA⁺ ATPase である Cdc48 (酵母)/p97 (ヒト) 複合体によって捕捉されたのち、シャトル因子を介してプロテアソームに運ばれることが明らかにされた¹⁹⁾。UBL と UBA をつなぐのはフレキシブルな 50~100 アミノ酸からなるリンカー配列で、プロテアソームへの基質タンパク質の運搬効率を高めている。なお、シャトル因子は基質とともに分解されるわけではなく、分解を免れて再利用されるが、その主な理由は分子内相互作用により分解開始に必要な分子内の非構造領域を覆い隠すためと推測されている。酵母においてプロテアソーム分解に関与する既知のユビキチン鎖受容体すべて (Rpn1, Rpn10, Rpn13, Rad23, Dsk2, Ddi1) を機能不全にした株が生存可能であることから、さらなるユビキチン鎖受容体の存在が示唆されている。

シャトル因子の適切な機能発揮は生理的に重要である。酵母やショウジョウバエでは Dsk2 の過剰発現はユビキチン化タンパク質分解阻害による細胞毒性を来し^{20, 21)}、哺乳類 UBQLN2, 4 の遺伝子変異では、ユビキチン化タンパク質の増加がタンパク質凝集体形成をもたらす、筋萎縮性側索硬化症などの神経変性疾患を引き起こす²²⁾。シャトル因子の特異的な機能も知られつつあり、UBQLN は細胞質に放出された膜タンパク質や易凝集性タンパク質をプロテアソームへリクルートすることや、核内ユビキチン化タンパク質を細胞質に運び出すことが示された^{23, 24)}。UBQLN2 はストレス顆粒に局在することや液-液相分離を引き起こすことも最近示されている^{25, 26)}。一方で、酵母 Ddi1 のシャトル因子としての機能は不明な点が多く、UBL でユビキチンと会合することも報告されている²⁷⁾。哺乳類 DDI2 はプロテアソーム転写因子 Nrf1 の活性化に必要なブ

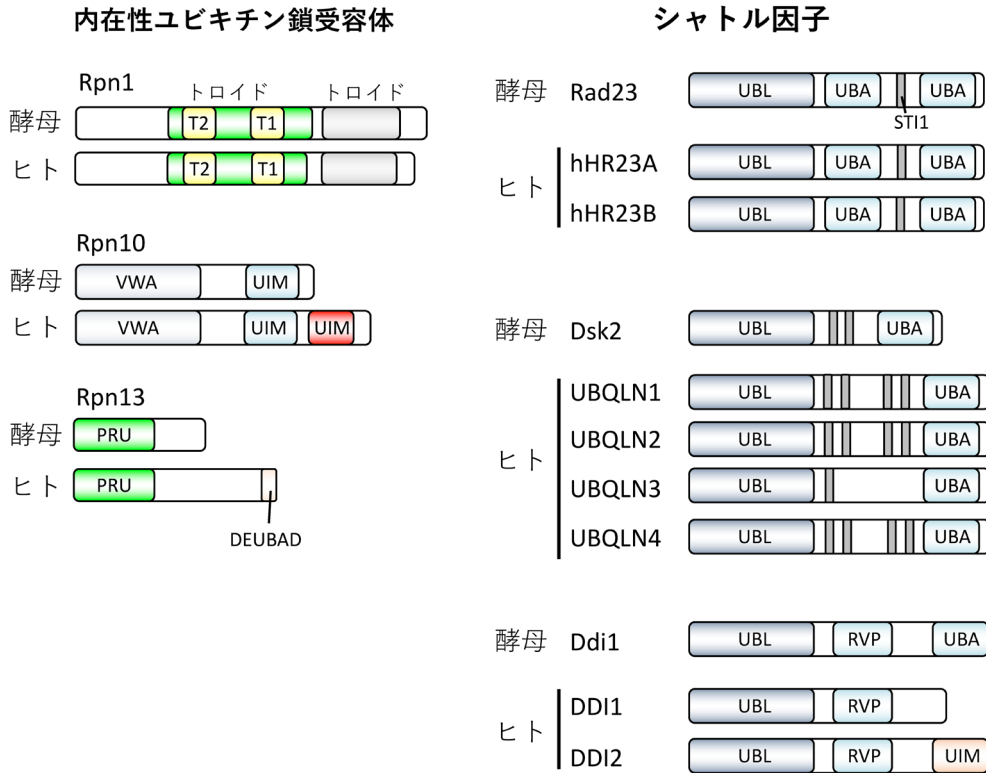


図3 プロテアソームユビキチン鎖受容体とシャトル因子のドメイン構造
酵母に比べヒトではシャトル分子のパラログが増加しているが、それらの機能的差異が徐々に明らかになりつつある。VWA：von Willebrand factor A, UIM：ubiquitin-interacting motif, PRU：pleckstrin-like receptor for ubiquitin, DEUBAD：deubiquitinase adaptor, UBL：ubiquitin-like, UBA：ubiquitin-associated, RVP：retroviral aspartyl protease, STI1：heat-shock chaperone-binding motif.

ロセシングを担うアスパラギン酸プロテアーゼとして働くことが知られており、生理的役割の多様性についても今後の解析が待たれる²⁸⁾。

5. プロテアソーム会合脱ユビキチン化酵素

26SプロテアソームにはRpn1に会合するUsp14（ヒト）/Ubp6（出芽酵母）とRpn13に会合するUCH37（出芽酵母）には存在しない）の二つの“準サブユニット”ともいべきDUBが存在している²⁹⁾。Ubp6はK1, K63, K48ユビキチン鎖を切断すること、UCH37はK6, K11, K48ユビキチン鎖を切断することが*in vitro*で確認されている^{30, 31)}。両者はプロテアソームとの会合により活性化し、ユビキチン鎖末端側からトリミングすることでユビキチン鎖を短くすると考えられていたが、Usp14はマルチプルユビキチン化基質のユビキチン鎖を根元から切断することも報告された³¹⁾。Usp14およびUCH37は必ずしもE3によるユビキチン化反応と拮抗して働くわけではなく、分解に促進的にも抑制的にも働くと考えられている²⁹⁾。

Usp14は運動失調症マウスの原因遺伝子であるが、マウスおよび酵母においてUsp14欠損により細胞内モノユビキチンが枯渇することから、Usp14はフリーのユビキチンプールの維持に重要であることが知られている³²⁾。しかし、ユビキチン鎖を形成しているのは細胞内ユビキチンの

10～20%程度であることや、基質のユビキチン鎖はRpn11により根元から切り離されること、およびフリーのユビキチン鎖を切断するDUB（isopeptidase T）が知られることを考慮すると、ユビキチンプール維持にUsp14が支配的な役割を持つメカニズムは明確ではない。また、プロテアソーム機能が低下した際のプロテアソームへのUsp14会合の亢進や、Ubp6欠損プロテアソームでの非ユビキチン化タンパク質の分解活性の上昇も知られることから、Usp14はDUB活性非依存的にRPのアロステリックな構造変化を起こすことでプロテアソーム機能制御に働く可能性が示唆されている³³⁾。UCH37はプロテアソームと会合すると活性化し、クロマチンリモデリング因子であるINO80複合体と会合すると不活性化することが知られるが、その生理的意義やスイッチ機構は明らかでない^{34, 35)}。

6. プロテアソームによるさまざまなユビキチン修飾の認識

従来はK48ユビキチン鎖が分解シグナルと一義的に考えられてきたが、ユビキチン鎖の多様性が知られるにつれ、プロテアソームが認識するユビキチン鎖も多様であることが明らかになりつつある（図4）。K11鎖も分解標識としての役割を担うと考えられているが、単独で分解標識として機能するかはまだ明確ではない。APC複合体は、K11

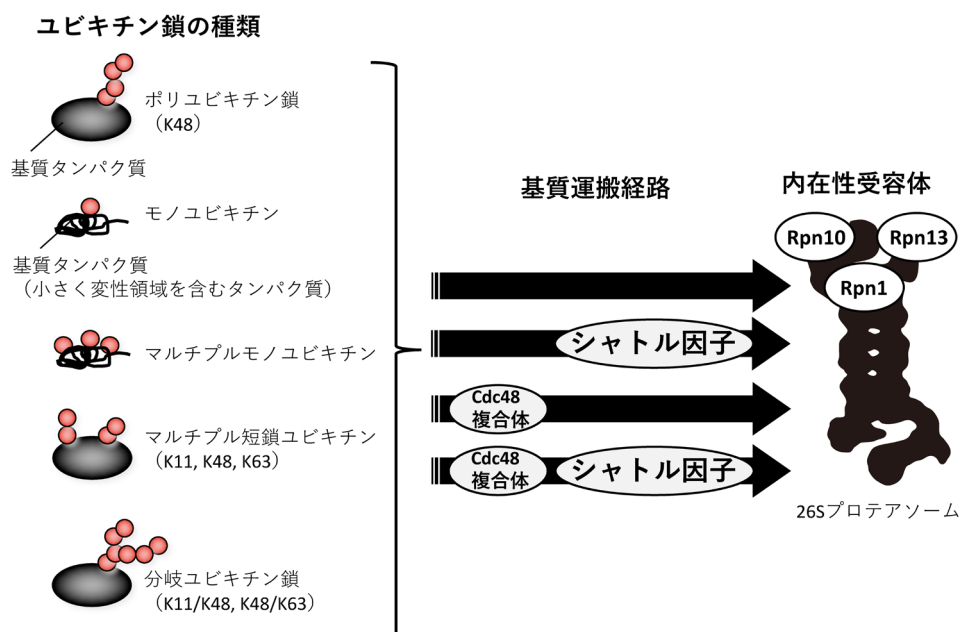


図4 ユビキチン化タンパク質がプロテアソームへ至る経路

K48ユビキチン鎖以外にも、多様なユビキチン修飾をプロテアソームは認識し分解する。プロテアソームが直接ユビキチン鎖を認識する場合の他、シャトル因子やCdc48複合体によるユビキチン鎖の認識を介して、プロテアソームに運搬される経路がある。

鎖およびK48/K11分岐鎖を付加することでさまざまな細胞周期制御因子を分解に導く^{36, 37)}。ところが、酵母においてはK11鎖は細胞内ユビキチン鎖の28%程度を占め、K48鎖と同程度の存在量がある一方、哺乳類細胞では2~5%しか占めないことから、K11鎖の役割は生物種により異なることが推測される⁴⁾。酵母においてユビキチン鎖の16%を占めるK63鎖は、プロテアソームによる分解ではなくエンドサイトーシス、DNA修復、免疫応答など多様な生体応答に働く^{3, 4)}。K63鎖は*in vivo*ではプロテアソームによる分解に寄与しないとされるが、*in vitro*ではプロテアソームによる分解シグナルとして働きうることが知られる。一方で、直鎖状ユビキチン鎖は*in vitro*ではプロテアソームによる分解に効果がないが、*in vivo*ではPKCやTRIM25の分解に働くことが知られる^{38, 39)}。また、K48鎖やK11鎖が必ずしも分解を導くわけではないことも示されており^{40, 41)}、ユビキチン鎖の種類はそれだけでは決定的な意味を持たず、ユビキチン化されているタンパク質自体に存在するUBDによるマスク、非構造領域の有無など、基質タンパク質の構造自体にも分解・非分解を制御する要因があると考えられている。

最近、基質タンパク質に付加したユビキチンの分子数に依存してプロテアソーム上での滞在時間が長くなることや、K48ジユビキチンを2か所に付加する方が1本のテトラK48ユビキチン鎖よりも効果的な分解標識として働くことが示されたことから、複数のユビキチン鎖受容体に認識されることがプロテアソームとの会合を強め、分解に寄与しやすいと考えられ始めている^{42, 43)}。同様にK11, K27, K63といったさまざまな種類の短いユビキチン鎖がプロテ

アソーム会合に寄与することが示され、マルチプルユビキチン化基質についてプロテアソームは鎖のタイプを識別しないことも示唆されている。また、モノユビキチン化は小胞輸送やエンドサイトーシスなどに働くことが知られていたが、マルチプルモノユビキチン化がプロテアソームによる分解シグナルとして働く例がいくつか報告されている^{42, 44, 45)}。

7. プロテアソームによるユビキチン認識後の分解過程

プロテアソームがユビキチンを認識し基質タンパク質を捕捉した後、30アミノ酸残基以上の長さの非構造領域がATPaseリングで形成されるチャネルに入り込むことで解きほぐしが始まる⁴⁶⁾。非構造領域を持たないユビキチン化タンパク質の場合は、Cdc48によって基質タンパク質が解きほぐされ分解されると考えられているが、Cdc48が基質に先立ってユビキチン鎖の構造を解きほぐすようすが最近報告された⁴⁷⁾。ユビキチン化サイトは非構造領域に多い傾向が報告されているが^{48, 49)}、非構造領域を持たないタンパク質では、ユビキチン化が近傍の局所的なアンフォールドを引き起こし、分解開始点となることも示されている⁵⁰⁾。

近年のクライオ電子顕微鏡による単粒子解析技術の進歩により、ユビキチン認識後の分解の各過程でさまざまなコンホメーションをとる26Sプロテアソームの構造が2.8~3.6Åの高分解能で明らかになり、多数のサブユニットのダイナミックな連携による分解機構の理解が飛躍的に進展した⁵¹⁻⁵³⁾。基質と結合していない待機状態を模倣したATP

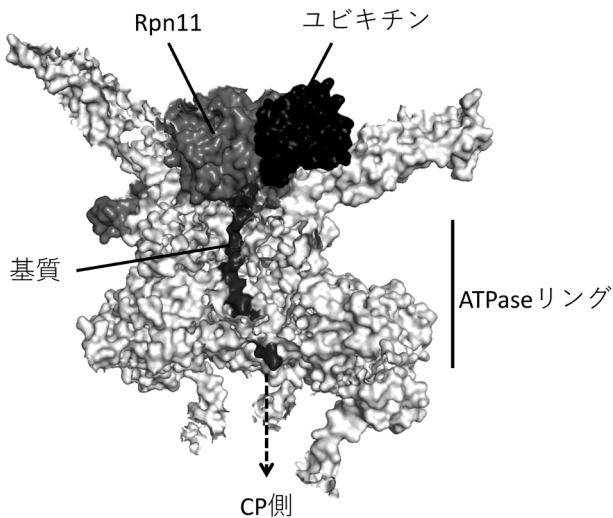


図5 基質タンパク質解きほぐしと連携したRpn11による脱ユビキチン化
ユビキチン化タンパク質（黒色）の解きほぐしを開始されるとともに、ATPaseリング（白色）直上に位置するRpn11（灰色）によりユビキチン鎖が切り離される（PDB ID:6MSGを改変）。

存在下のプロテアソームは、ATPaseリングがらせん階段状にCPチャンネルに傾いて配置し、Rpn11の活性中心はRpt4-Rpt5のコイルドコイルの近くに位置し、活性が阻害されている。しかし、基質と会合した状態を模倣した非加水分解性ATPアナログ（ATP γ S）存在下では、基質タンパク質の解きほぐしに伴いプロテアソームが活性化型になると、RPの構造変化によりRpn11の活性中心がスライドし、ATPaseリングのチャンネル入り口の10Å直上に移動する（図5）。この状態でRpn11がユビキチン鎖を基質タンパク質との結合部から切り離すことで、その後続くATPaseリングによる基質タンパク質の解きほぐしとCPへの送り込みが可能となり、Rpn11による脱ユビキチン化が分解の律速段階として機能する。RPの構造変化に伴い、Rpn1やRpn10の配置も変わることユビキチン鎖の認識効率が変わる可能性も示唆されている。最近、ユビキチン化基質を会合した状態でのヒト26Sプロテアソームの構造が明らかになり、ATPaseリングのATP加水分解サイクルに伴い、基質がCPゲートまで送り込まれるようすが詳細に確認された⁵³⁾。残念ながらRpn13が含まれていない解析であることから、ユビキチン化タンパク質の認識機構については今後の課題である。

一方、FRETを利用した*in vitro*での解析によりプロテアソームにおけるユビキチン化タンパク質分解の各過程の速度論をモニターした研究が報告され、基質の非構造領域がbaseリングに引き込まれた後に、基質が脱ユビキチン化とともに順次解きほぐされていく過程が分解の律速段階となっていることが明らかにされた⁵⁴⁾。

8. プロテアソーム、脱ユビキチン化酵素阻害剤

正常細胞に比べ、遺伝子増幅に伴うタンパク質毒性スト

レスの増加を生じるがん細胞はプロテアソーム要求性が高く、プロテアソーム阻害剤（bortezomibおよびcarfilzomib）が難治性の多発性骨髄腫の治療に用いられ効果を挙げている⁵⁵⁾。bortezomibのアナログであるixazomibは初の経口型プロテアソーム阻害剤として開発され、すでに世界的に広く使用されている。bortezomibはNF- κ Bシグナル経路を阻害するとともに、小胞体ストレスを惹起し、細胞にアポトーシスを誘導すると考えられているが、固形がんには効果が乏しいことや副作用として血小板の減少や末梢神経障害が知られ、より効果的かつ副作用の少ない新しい阻害剤の開発が展開されている^{56,57)}。また、懸念されているbortezomib耐性細胞への対抗策として、作用点の異なる阻害剤の探索も盛んに行われている。通常、Rpn13は一部のプロテアソームにのみ含まれるサブユニットであるが、がん細胞などプロテアソーム要求性が高い細胞ではRpn13を高発現し、分解効率を高めていると考えられている。実際、Rpn13阻害剤（RA190, KDT-11）はがん細胞特異的に細胞死を誘導し、bortezomibとの併用効果も確認された^{58,59)}。さらに、Rpn11阻害剤（capzimin）や、Usp14とUch37の二重阻害剤（b-AP15）がユビキチン化タンパク質分解を阻害することにより、bortezomib耐性の骨髄腫や固形がんの動物モデルでの効果が示された^{60,61)}。一方、Usp14選択的阻害剤（IU1）は易凝集性タンパク質のtauやTDP43などの分解を促進したことから、プロテアソーム活性化剤として効果的であるとみなされ、プロテアソーム機能低下が病態発症に深く関与することが知られる神経変性疾患への効果が期待されている⁶²⁻⁶⁴⁾。

9. プロテアソームとオートファジー

細胞の種類や環境によるが、ユビキチン・プロテアソームシステムは80～90%のタンパク質分解に寄与する一方で、長寿命タンパク質や凝集タンパク質およびオルガネラタンパク質を分解するオートファジーは10～20%のタンパク質分解に寄与する^{65,66)}。プロテアソームとオートファジーは必ずしも補完的ではないが協調して働くことが知られ、易凝集性タンパク質は両者の経路で分解されることや、BAG1はhuntingtinなど易凝集性タンパク質をプロテアソームに運ぶ一方、BAG3はオートファジーに基質を運搬するように二つの分解経路を選別する機構も知られる⁶⁷⁾。さらにUBQLN2のオートファジー受容体としての機能も知られており²²⁾、ユビキチン鎖受容体による基質タンパク質の運搬先決定機構が今後の課題である。

最近、機能低下プロテアソームがオートファジーにより分解されることが酵母、シロイヌナズナ、哺乳類細胞で報告され、proteaphagyと命名された⁶⁸⁾。窒素源枯渇やプロテアソーム阻害剤条件下などで機能低下したプロテアソームサブユニットがユビキチン化され、ユビキチン選択的なオートファジーにより分解される。proteaphagyにおいてプロテアソームとオートファゴソームを仲介するユビキチ

ン鎖受容体は生物種により異なるようで、その制御機構は興味深い。

10. おわりに

プロテアソームサブユニットや会合因子の具体的な機能はこれまでごく一部しか明らかにされていないが、構造的理解が一気に進んだことで、今後は特に多様なサブユニットで構成されるRPの巧妙な作動機構がより具体的に明らかにされるだろう。プロテアソームサブユニットは進化的に非常に高く保存されているのに比べ、ユビキチン鎖受容体やDUBは進化に伴い分子多様性やアミノ酸構造を変化させていることは興味深く、ユビキチン認識メカニズムの複雑化が多様な生理現象の基盤に寄与していると考えられ、それぞれの分子機能と生理機能を対応させて明らかにすることが求められる。

文 献

- Smith, D.M., Benaroudj, N., & Goldberg, A. (2006) Proteasomes and their associated ATPases: A destructive combination. *J. Struct. Biol.*, **156**, 72–83.
- Rose, C.M., Isasa, M., Ordureau, A., Prado, M.A., Beausoleil, S.A., Jedrychowski, M.P., Finley, D.J., Harper, J.W., & Gygi, S.P. (2016) Highly multiplexed quantitative mass spectrometry analysis of ubiquitylomes. *Cell Syst.*, **3**, 395–403.e4.
- Kim, W., Bennett, E.J., Huttlin, E.L., Guo, A., Li, J., Possemato, A., Sowa, M.E., Rad, R., Rush, J., Comb, M.J., et al. (2011) Systematic and quantitative assessment of the ubiquitin-modified proteome. *Mol. Cell*, **44**, 325–340.
- Xu, P., Duong, D.M., Seyfried, N.T., Cheng, D., Xie, Y., Robert, J., Rush, J., Hochstrasser, M., Finley, D., & Peng, J. (2009) Quantitative proteomics reveals the function of unconventional ubiquitin chains in proteasomal degradation. *Cell*, **137**, 133–145.
- Finley, D., Chen, X., & Walters, K.J. (2016) Gates, channels, and switches: Elements of the proteasome machine. *Trends Biochem. Sci.*, **41**, 77–93.
- Śledź, P. & Baumeister, W. (2016) Structure-driven developments of 26S proteasome inhibitors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **56**, 191–209.
- Grice, G.L. & Nathan, J.A. (2016) The recognition of ubiquitinated proteins by the proteasome. *Cell. Mol. Life Sci.*, **73**, 3497–3506.
- Trempe, J.F. (2011) Reading the ubiquitin postal code. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **21**, 792–801.
- Yu, H. & Matouschek, A. (2017) Recognition of client proteins by the proteasome. *Annu. Rev. Biophys.*, **46**, 149–173.
- Fu, H., Lin, Y.L., & Fatimababy, A.S. (2010) Proteasomal recognition of ubiquitylated substrates. *Trends Plant Sci.*, **15**, 375–386.
- Hamazaki, J., Sasaki, K., Kawahara, H., Hisanaga, S.-i., Tanaka, K., & Murata, S. (2007) Rpn10-mediated degradation of ubiquitinated proteins is essential for mouse development. *Mol. Cell. Biol.*, **27**, 6629–6638.
- Fatimababy, A.S., Lin, Y.L., Usharani, R., Radjacommar, R., Wang, H.T., Tsai, H.L., Lee, Y., & Fu, H. (2010) Cross-species divergence of the major recognition pathways of ubiquitylated substrates for ubiquitin/26S proteasome-mediated proteolysis. *FEBS J.*, **277**, 796–816.
- Hamazaki, J., Hirayama, S., & Murata, S. (2015) Redundant roles of Rpn10 and Rpn13 in recognition of ubiquitinated proteins and cellular homeostasis. *PLoS Genet.*, **11**, e1005401.
- Sakata, E., Bohn, S., Mihalache, O., Kiss, P., Beck, F., Nagy, I., Nickell, S., Tanaka, K., Saeki, Y., Förster, F., et al. (2012) Localization of the proteasomal ubiquitin receptors Rpn10 and Rpn13 by electron cryomicroscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 1479–1484.
- Shi, Y., Chen, X., Elsasser, S., Stocks, B.B., Tian, G., Lee, B.-H., Shi, Y., Zhang, N., de Poot, S.A.H., Tuebing, F., et al. (2016) Rpn1 provides adjacent receptor sites for substrate binding and deubiquitination by the proteasome. *Science*, **351**, aad9421.
- Su, V. & Lau, A.F. (2009) Ubiquitin-like and ubiquitin-associated domain proteins: Significance in proteasomal degradation. *Cell. Mol. Life Sci.*, **66**, 2819–2833.
- Zientara-Rytter, K. & Subramani, S. (2019) The roles of ubiquitin-binding protein shuttles in the degradative fate of ubiquitinated proteins in the ubiquitin-proteasome system and autophagy. *Cells*, **8**, 40.
- Zhang, D., Raasi, S., & Fushman, D. (2008) Affinity makes the difference: Nonselective interaction of the UBA domain of Ubiquitin-1 with monomeric ubiquitin and polyubiquitin chains. *J. Mol. Biol.*, **377**, 162–180.
- Tsuchiya, H., Ohtake, F., Arai, N., Kaiho, A., Yasuda, S., Tanaka, K., & Saeki, Y. (2017) In vivo ubiquitin linkage-type analysis reveals that the Cdc48-Rad23/Dsk2 axis contributes to K48-linked chain specificity of the proteasome. *Mol. Cell*, **66**, 488–502.
- Matiuhin, Y., Kirkpatrick, D.S., Ziv, I., Kim, W., Dakshinamurthy, A., Kleifeld, O., Gygi, S.P., Reis, N., & Glickman, M.H. (2008) Extraproteasomal Rpn10 restricts access of the polyubiquitin-binding protein Dsk2 to proteasome. *Mol. Cell*, **32**, 415–425.
- Lipinski, Z., Pál, M., Nagy, O., Deák, P., Hunyadi-Gulyas, E., & Udvardy, A. (2011) Overexpression of Dsk2/dUbqln results in severe developmental defects and lethality in *Drosophila melanogaster* that can be rescued by overexpression of the p54/Rpn10/S5a proteasomal subunit. *FEBS J.*, **278**, 4833–4844.
- Renaud, L., Picher-Martel, V., Codron, P., & Julien, J.-P. (2019) Key role of UBQLN2 in pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. *Acta Neuropathol. Commun.*, **7**, 103.
- Itakura, E., Zavodszky, E., Shao, S., Wohlever, M.L., Keenan, R.J., & Hegde, R.S. (2016) Ubiquilins Chaperone and Triage Mitochondrial Membrane Proteins for Degradation. *Mol. Cell*, **63**, 21–33.
- Hirayama, S., Sugihara, M., Morito, D., Iemura, S.-I., Natsume, T., Murata, S., & Nagata, K. (2018) Nuclear export of ubiquitinated proteins via the UBIN-POST system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **115**, E4199–E4208.
- Dao, T.P., Kolaitis, R.M., Kim, H.J., O'Donovan, K., Martyniak, B., Colicino, E., Hehnly, H., Taylor, J.P., & Castañeda, C.A. (2018) Ubiquitin modulates liquid–liquid phase separation of UBQLN2 via disruption of multivalent interactions. *Mol. Cell*, **69**, 965–978.
- Dao, T.P., Martyniak, B., Canning, A.J., Lei, Y., Colicino, E.G., Cosgrove, M.S., Hehnly, H., & Castañeda, C.A. (2019) ALS-linked mutations affect UBQLN2 oligomerization and phase separation in a position- and amino acid-dependent manner. *Structure*, **27**, 937–951.
- Nowicka, U., Zhang, D., Walker, O., Krutauz, D., Castañeda, C.A., Chaturvedi, A., Chen, T.Y., Reis, N., Glickman, M.H., & Fushman, D. (2015) DNA-damage-inducible 1 protein (Ddi1)

- contains an uncharacteristic ubiquitin-like domain that binds ubiquitin. *Structure*, **23**, 542–557.
- 28) Koizumi, S., Hamazaki, J., & Murata, S. (2018) Transcriptional regulation of the 26S proteasome by Nrf1. *Proc. Jpn. Acad., Ser. B, Phys. Biol. Sci.*, **94**, 325–336.
 - 29) de Poot, S.A.H., Tian, G., & Finley, D. (2017) Meddling with fate: The proteasomal deubiquitinating enzymes. *J. Mol. Biol.*, **429**, 3525–3545.
 - 30) Mansour, W., Nakasone, M.A., von Delbrück, M., Yu, Z., Kru-
tauz, D., Reis, N., Kleifeld, O., Sommer, T., Fushman, D., &
Glickman, M.H. (2015) Disassembly of Lys11 and mixed linkage
polyubiquitin conjugates provides insights into function of pro-
teasomal deubiquitinases Rpn11 and Ubp6. *J. Biol. Chem.*, **290**,
4688–4704.
 - 31) Lee, B.-H., Lu, Y., Prado, M.A., Shi, Y., Tian, G., Sun, S., Elsass-
er, S., Gygi, S.P., King, R.W., & Finley, D. (2016) USP14 deu-
biquitinates proteasome-bound substrates that are ubiquitinated at
multiple sites. *Nature*, **532**, 398–401.
 - 32) Wilson, S.M., Bhattacharyya, B., Rachel, R.A., Coppola, V., Tes-
sarollo, L., Householder, D.B., Fletcher, C.F., Miller, R.J., Cop-
eland, N.G., & Jenkins, N.A. (2002) Synaptic defects in ataxia
mice result from a mutation in Usp14, encoding a ubiquitin-spe-
cific protease. *Nat. Genet.*, **32**, 420–425.
 - 33) Kim, H.T. & Goldberg, A.L. (2017) The deubiquitinating enzyme
Usp14 allosterically inhibits multiple proteasomal activities and
ubiquitin-independent proteolysis. *J. Biol. Chem.*, **292**, 9830–
9839.
 - 34) Sahtoe, D.D., van Dijk, W.J., El Oualid, F., Ekkebus, R., Ovaa,
H., & Sixma, T.K. (2015) Mechanism of UCH-L5 activation and
inhibition by DEUBAD domains in RPN13 and INO80G. *Mol.
Cell*, **57**, 887–900.
 - 35) VanderLinden, R.T., Hemmis, C.W., Schmitt, B., Ndoja, A.,
Whitby, F.G., Robinson, H., Cohen, R.E., Yao, T., & Hill, C.P.
(2015) Structural basis for the activation and inhibition of the
UCH37 deubiquitylase. *Mol. Cell*, **57**, 901–911.
 - 36) Yau, R. & Rape, M. (2016) The increasing complexity of the
ubiquitin code. *Nat. Cell Biol.*, **18**, 579–586.
 - 37) Haakonsen, D.L. & Rape, M. (2019) Branching out: Improved
signaling by heterotypic ubiquitin chains. *Trends Cell Biol.*, **29**,
704–716.
 - 38) Inn, K.-S., Gack, M.U., Tokunaga, F., Shi, M., Wong, L.-Y.,
Iwai, K., & Jung, J.U. (2011) Linear ubiquitin assembly complex
negatively regulates RIG-I- and TRIM25-mediated type I inter-
feron induction. *Mol. Cell*, **41**, 354–365.
 - 39) Nakamura, M., Tokunaga, F., Sakata, S., & Iwai, K. (2006) Mu-
tual regulation of conventional protein kinase C and a ubiquitin
ligase complex. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **351**, 340–347.
 - 40) Flick, K., Ouni, I., Wohlschlegel, J.A., Capati, C., McDonald,
W.H., Yates, J.R., & Kaiser, P. (2004) Proteolysis-indepen-
dent regulation of the transcription factor Met4 by a single Lys
48-linked ubiquitin chain. *Nat. Cell Biol.*, **6**, 634–641.
 - 41) Martinez-Fonts, K. & Matouschek, A. (2016) A rapid and versa-
tile method for generating proteins with defined ubiquitin chains.
Biochemistry, **55**, 1898–1908.
 - 42) Lu, Y., Lee, B., King, R.W., Finley, D., & Kirschner, M.W.
(2015) Substrate degradation by the proteasome: A single-mole-
cule kinetic analysis. *Science*, **348**, 1250834.
 - 43) Lu, Y., Wang, W., & Kirschner, M.W. (2015) Specificity of the
anaphase-promoting complex: A single-molecule study. *Science*,
348, 1248737.
 - 44) Dimova, N.V., Hathaway, N.A., Lee, B.-H., Kirkpatrick, D.S.,
Berkowitz, M.L., Gygi, S.P., Finley, D., & King, R.W. (2012)
APC/C-mediated multiple monoubiquitylation provides an al-
ternative degradation signal for cyclin B1. *Nat. Cell Biol.*, **14**,
168–176.
 - 45) Shabek, N., Herman-Bachinsky, Y., Buchsbaum, S., Lewinson,
O., Haj-Yahya, M., Hejjoui, M., Lashuel, H.A., Sommer, T.,
Brik, A., & Ciechanover, A. (2012) The size of the proteasomal
substrate determines whether its degradation will be mediated by
mono- or polyubiquitylation. *Mol. Cell*, **48**, 87–97.
 - 46) van der Lee, R., Lang, B., Kruse, K., Gsponer, J., de Groot, N.S.,
Huynen, M.A., Matouschek, A., Fuxreiter, M., & Babu, M.M.
(2014) Intrinsically disordered segments affect protein half-life in
the cell and during evolution. *Cell Reports*, **8**, 1832–1844.
 - 47) Twomey, E.C., Ji, Z., Wales, T.E., Bodnar, N.O., Ficarro, S.B.,
Marto, J.A., Engen, J.R., & Rapoport, T.A. (2019) Substrate pro-
cessing by the Cdc48 ATPase complex is initiated by ubiquitin
unfolding. *Science*, **365**, XXX–XXX.
 - 48) Radivojac, P., Vacic, V., Haynes, C., Cocklin, R.R., Mohan, A.,
Heyen, J.W., Goebel, M.G., & Iakoucheva, L.M. (2010) Identi-
fication, analysis, and prediction of protein ubiquitination sites.
Proteins Struct. Funct. Bioinforma., **78**, 365–380.
 - 49) Hagai, T., Azia, A., Tóth-Petróczy, Á., & Levy, Y. (2011) In-
trinsic disorder in ubiquitination substrates. *J. Mol. Biol.*, **412**,
319–324.
 - 50) Hagai, T. & Levy, Y. (2010) Ubiquitin not only serves as a tag
but also assists degradation by inducing protein unfolding. *Proc.
Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 2001–2006.
 - 51) Bard, J.A.M., Goodall, E.A., Greene, E.R., Jonsson, E., Dong,
K.C., & Martin, A. (2018) Structure and function of the 26S pro-
teasome. *Annu. Rev. Biochem.*, **87**, 697–724.
 - 52) Aufderheide, A., Unverdorben, P., Baumeister, W., & Förster, F.
(2015) Structural disorder and its role in proteasomal degrada-
tion. *FEBS Lett.*, **589**(19 Pt A), 2552–2560.
 - 53) Dong, Y., Zhang, S., Wu, Z., Li, X., Wang, W.L., Zhu, Y., Stoilo-
va-McPhie, S., Lu, Y., Finley, D., & Mao, Y. (2019) Cryo-EM
structures and dynamics of substrate-engaged human 26S protea-
some. *Nature*, **565**, 49–55.
 - 54) Bard, J.A.M., Bashore, C., Dong, K.C., & Martin, A. (2019) The
26S proteasome utilizes a kinetic gateway to prioritize substrate
degradation. *Cell*, **177**, 286–298.e15.
 - 55) Deshaies, R.J. (2014) Proteotoxic crisis, the ubiquitin-proteasome
system, and cancer therapy. *BMC Biol.*, **12**, 94.
 - 56) Wertz, I.E. & Wang, X. (2019) From discovery to bedside: Tar-
geting the ubiquitin system. *Cell Chem. Biol.*, **26**, 156–177.
 - 57) Cromm, P.M. & Crews, C.M. (2017) The proteasome in modern
drug discovery: Second life of a highly valuable drug target. *ACS
Cent. Sci.*, **3**, 830–838.
 - 58) Anchoori, R.K., Karanam, B., Peng, S., Wang, J.W., Jiang, R.,
Tanno, T., Orlowski, R.Z., Matsui, W., Zhao, M., Rudek, M.A.,
et al. (2013) A bis-benzylidene piperidone targeting proteasome
ubiquitin receptor RPN13/ADRM1 as a therapy for cancer. *Can-
cer Cell*, **24**, 791–805.
 - 59) Trader, D.J., Simanski, S., & Kodadek, T. (2015) A reversible
and highly selective inhibitor of the proteasomal ubiquitin recep-
tor Rpn13 is toxic to multiple myeloma cells. *J. Am. Chem. Soc.*,
137, 6312–6319.
 - 60) Li, J., Yakushi, T., Parlati, F., Mackinnon, A.L., Perez, C., Ma,
Y., Carter, K.P., Colayco, S., Magnuson, G., Brown, B., et al.
(2017) Capzimin is a potent and specific inhibitor of proteasome
isopeptidase Rpn11. *Nat. Chem. Biol.*, **13**, 486–493.
 - 61) D'Arcy, P., Brnjic, S., Olofsson, M.H., Fryknäs, M., Lindsten, K.,
De Cesare, M., Perego, P., Sadeghi, B., Hassan, M., Larsson, R.,
et al. (2011) Inhibition of proteasome deubiquitinating activity as

- a new cancer therapy. *Nat. Med.*, **17**, 1636–1640.
- 62) Lee, B.-H., Lee, M.J., Park, S., Oh, D.-C., Elsasser, S., Chen, P.-C., Gartner, C., Dimova, N., Hanna, J., Gygi, S.P., et al. (2010) Enhancement of proteasome activity by a small-molecule inhibitor of USP14. *Nature*, **467**, 179–184.
- 63) Boselli, M., Lee, B.-H., Robert, J., Prado, M.A., Min, S.-W., Cheng, C., Silva, M.C., Seong, C., Elsasser, S., Hatle, K.M., et al. (2017) An inhibitor of the proteasomal deubiquitinating enzyme USP14 induces tau elimination in cultured neurons. *J. Biol. Chem.*, **292**, 19209–19225.
- 64) Wertz, I.E. & Murray, J.M. (2019) Structurally-defined deubiquitinase inhibitors provide opportunities to investigate disease mechanisms. *Drug Discov. Today. Technol.*, **31**, 109–123.
- 65) Collins, G.A. & Goldberg, A.L. (2017) The logic of the 26S Proteasome. *Cell*, **169**, 792–806.
- 66) Kwon, Y.T. & Ciechanover, A. (2017) The ubiquitin code in the ubiquitin-proteasome system and autophagy. *Trends Biochem. Sci.*, **42**, 873–886.
- 67) Kocaturk, N.M. & Gozuacik, D. (2018) Crosstalk between mammalian autophagy and the ubiquitin-proteasome system. *Front. Cell Dev. Biol.*, **6**, 128.
- 68) Marshall, R.S. & Vierstra, R.D. (2019) Dynamic regulation of the 26S proteasome: From synthesis to degradation. *Front. Mol. Biosci.*, **6**, 40.

著者寸描

●濱崎 純 (はまざき じゅん)



東京大学大学院薬学系研究科蛋白質代謝学教室助教。博士 (理学)。

■略歴 1980年宮城県に生る。2003年東京都立大学理学部卒業。08年首都大学東京大学院博士課程修了 [卒業研究, 修士, 博士課程は東京都臨床医学総合研究所分子腫瘍学部門 (田中啓二室長) にて研究に従事]。日本学術振興会特別研究員 (PD) を経て08年より現職。

■研究テーマと抱負 プロテアソームにおける基質認識機構およびプロテアソーム不全時の生体応答など。

■ウェブサイト <http://www.f.u-tokyo.ac.jp/~tanpaku/>

■趣味 子供に読み聞かせ。