

## ストレスとユビキチンに依存したプロテアソームの液-液相分離

佐伯 泰, 安田 さや香, 土屋 光

### 1. はじめに

プロテアソームはユビキチン化されたタンパク質をATP依存的に分解する2.5 MDaの超分子複合体である<sup>1)</sup>。プロテアソームは細胞質および核質に存在し、増殖中の細胞では核局在が顕著に観察される。プロテアソームはいずれのコンパートメントでも比較的自由に移動でき<sup>2)</sup>、これは細胞の局所に生じたユビキチン化タンパク質を速やかに分解するために有利と考えられる。なお、核内でプロテアソーム分解が起こっているのかについては諸説あったが、転写因子やクロマチン制御分子の分解、核内の変性タンパク質を認識するE3リガーゼが報告されており<sup>3)</sup>、また、最近ではオーキシデグロン法やPROTAC (Protein targeting chimera) が核タンパク質の分解を十分に誘導できることが示されたため<sup>4,5)</sup>、プロテアソームは核内でも機能していることは間違いない。

近年、プロテアソームの上流で機能する分子群の解析が進み、ユビキチン結合タンパク質のRAD23やUBQLNファミリーやユビキチン選択的シャペロンであるp97-UFD1-NPL4複合体 (p97-UN) がプロテアソーム基質の選別に関与することが明確となってきた<sup>6)</sup>。さらにプロテアソームと相互作用するユビキチンリガーゼや脱ユビキチン化酵素が複数存在するため<sup>7)</sup>、従来のモデルのように、プロテアソーム基質はユビキチン化されれば一義的に分解されるわけではなく、ユビキチン化後のプロテアソームへの送達過程やプロテアソーム上でのユビキチン鎖のリモデリングなど分解のための調節がさまざまになされていることがわかってきた。これらのプロテアソーム制御分子は、小胞体関連タンパク質分解 (ER-associated degradation: ERAD) や翻訳品質管理機構 (ribosome-associated protein

quality control: RQC) など、細胞質におけるタンパク質品質管理機構について研究が進んでいるが、核内での機能は不明である。今回我々は、プロテアソームがユビキチン化基質やプロテアソーム制御分子と核内で液-液相分離し、分解のための液滴を形成することを見いだした<sup>8)</sup> ので紹介する。

### 2. プロテアソーム液滴の発見

プロテアソームは異常タンパク質を速やかに分解除去することでプロテオスタシスの維持に貢献しているが、その時空間的な制御機構についてはあまりよくわかっていない。そこで、生細胞でプロテアソームを可視化することで、特にストレス下における細胞内の局所的なタンパク質分解とその制御分子の解析が可能となると考えた。プロテアソームの基本サブユニットにeGFPを融合させたタンパク質を発現するノックイン細胞を作製し、プロテアソームの機能が保持されていることを確認した後、細胞をさまざまなストレスや薬剤で刺激した。その結果、アミノ酸アナログによるアグリソームへの局在化、ATPレベル低下による細胞質顆粒形成、高浸透圧ストレスによる核内顆粒形成など、プロテアソームの局所的な集積が観察された<sup>8)</sup> (図1A, データ未提示)。これらのうち、高浸透圧ストレスはプロテオスタシスの視点からの研究がほとんどなされていなかったこと、プロテアソームの核構造体は核内のタンパク質品質管理への関与が想定されたことなどから興味を持ち、以下の解析を実施することにした。

この核内で生じるプロテアソーム顆粒は、解析の過程で液滴としての性質を持つことがわかったため、以下、“プロテアソーム液滴”と呼ぶことにする。プロテアソーム液滴は、比較的穏やかな高浸透圧ストレス刺激によりユークロマチン領域にわずか数十秒で形成され、刺激後3時間ほどで消失する。プロテアソーム阻害剤 (Bortezomib) やp97阻害剤 (NMS-873) で細胞を処理すると液滴のサイズや数が増加し、消失が大きく遅延する。逆に、ユビキチン活性化酵素E1阻害剤 (TAK-243) で細胞を処理し細胞内のユビキチン化基質を減少させるとプロテアソーム液滴は形成しなかった。なお、プロテアソーム液滴はPMLボディやCajalボディなどの核内ボディとは一致しないが、ユビキチンとよく共局在した。特にプロテアソームの分解シグナ

公益財団法人東京都医学総合研究所 蛋白質代謝プロジェクト  
(〒156-8506 世田谷区上北沢2-1-6)

#### Proteasome phase separation for degradation

Yasushi Saeki, Sayaka Yasuda and Hikaru Tsuchiya (Protein Metabolism Project, Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science, 2-1-6 Kamikitazawa, Setagaya-ku, Tokyo 156-8506, 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.2020.920822

© 2020 公益社団法人日本生化学会

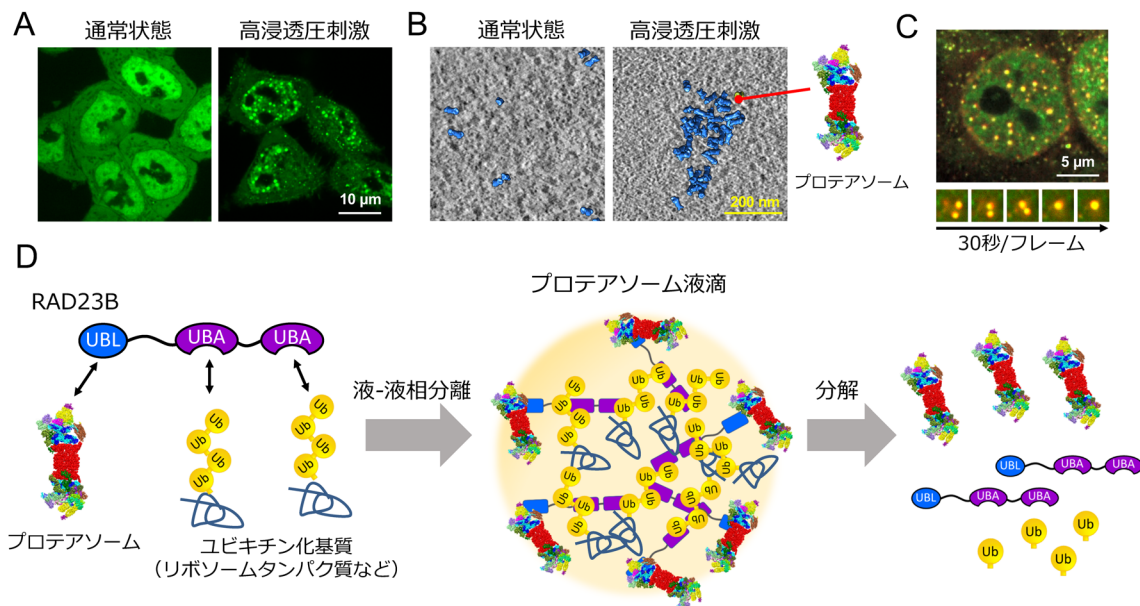


図1 高浸透圧ストレスにより形成するプロテアソーム液滴

(A) プロテアソーム eGFP ノックイン細胞の蛍光顕微鏡イメージ。通常状態ではプロテアソームは核質と細胞質に観察されるが、高浸透圧ストレス刺激により核内に液滴を形成する。(B) 核プロテアソームのクライオ電子線トモグラフィ像。通常状態では分散していたプロテアソームが高浸透圧刺激により集積する。集積の場には足場となるような構造体が存在しない。(C) RFP 融合プロテアソームおよび eGFP 融合ユビキチンを発現させた細胞のタイムラプスイメージング。高浸透圧刺激時に生じるプロテアソーム液滴はユビキチンを含み、融合して肥大化する。(D) プロテアソーム液滴形成のモデル。高浸透圧刺激により核内に大量に生じたユビキチン化タンパク質 (リボソームのオーファンタンパク質など) がシャトル分子 RAD23B と液-液相分離し、RAD23B がプロテアソームを集積させることでプロテアソーム液滴が形成する。RAD23B はユビキチン様ドメイン (UBL) と二つのユビキチン結合ドメイン (UBA) を持ち、プロテアソーム液滴の形成に必要である。プロテアソーム液滴にはユビキチン選択的シャペロン p97 やユビキチンリガーゼ UBE3A も含まれるが本図では省略する。

ルである Lys48 結合型ユビキチン鎖が検出されたため、この液滴は核内のユビキチン化基質が集積し分解される場所であることがわかった。プロテアソーム液滴は球状であり融合してサイズが大きくなること、内部のプロテアソームは高い流動性を持つこと、クライオ電子線トモグラフィによる一分子解析においてもプロテアソームが何の足場もなく集積していたことなどから、液-液相分離で形成する構造体であることが強く示唆された (図 1B, C)。

### 3. プロテアソーム液滴にはプロテアソーム制御分子が集積する

プロテアソーム液滴はユビキチン化酵素 E1 を阻害すると形成されないことから、ストレスにより生じたユビキチン化タンパク質がまず集積し、そこにプロテアソームが呼び込まれることが想定される。そこで、プロテアソーム液滴の形成機構に迫るため、液滴の構成因子を質量分析 (mass spectrometry : MS) で探索した。その結果、上述の p97-UN 複合体、シャトル分子 RAD23B、プロテアソーム結合ユビキチンリガーゼの UBE3A (別称 E6-AP) が同定

され、高浸透圧ストレス刺激時にプロテアソーム液滴に局在化することが明らかとなった。次いで、siRNA ノックダウンや阻害剤を用いた解析を実施したところ、RAD23B と UBE3A はプロテアソーム液滴の形成に、p97-UN 複合体は液滴のクリアランスを制御しており、これらの分子は核内のタンパク質品質管理に関与することが明らかとなった。特に RAD23B ノックアウト細胞では、プロテアソーム液滴はほぼまったく形成せず、驚いたことにユビキチン化タンパク質の集積も観察されなかった。

RAD23B は、二つのユビキチン結合 (ubiquitin-associated : UBA) ドメインとプロテアソームとの相互作用に必要なユビキチン様 (ubiquitin-like : UBL) ドメインを併せ持ち (図 1D)、ユビキチン化基質をプロテアソームへ運搬するシャトル分子である<sup>6)</sup>。UBA 変異体ではノックアウト細胞と同様にプロテアソームおよびユビキチン化タンパク質の集積がみられず、一方、UBL 変異体では核内にユビキチン化タンパク質の凝集様構造体が観察された。このことは、RAD23B 自身がユビキチン化基質を集積させる能力を持つことを意味する。

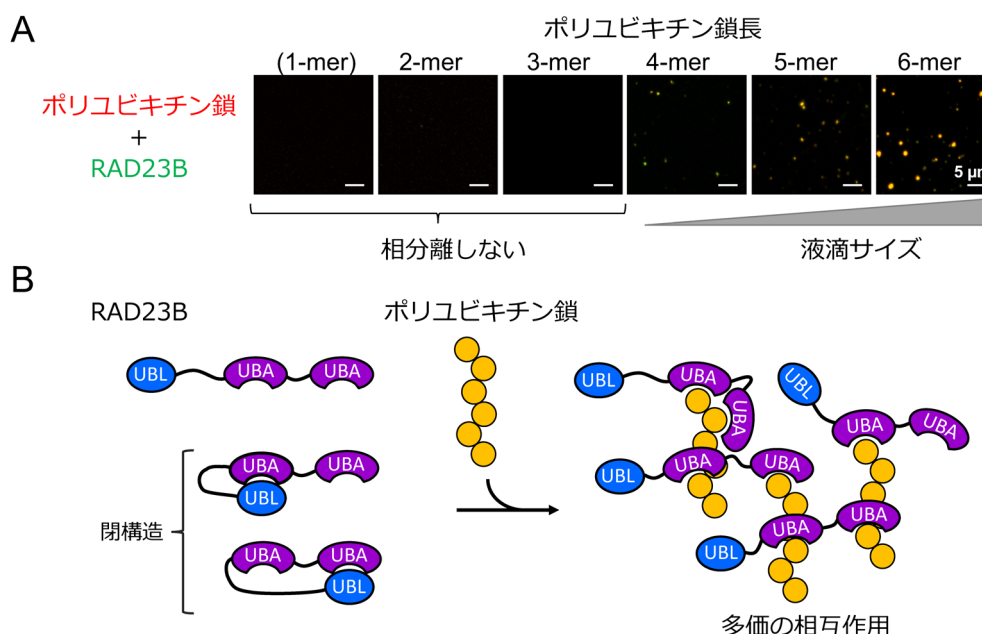


図2 RAD23Bとポリユビキチン鎖は多価相互作用により共相分離する

(A)ポリユビキチン鎖・RAD23B液滴の蛍光イメージ画像。Cy3標識RAD23Bと鎖長の異なるCy5標識Lys48結合型ポリユビキチン鎖を混合し、蛍光顕微鏡により可視化した。(B)RAD23Bとポリユビキチン鎖の液-液相分離のモデル。RAD23Bは通常状態ではUBLドメインがUBAドメインと分子内結合しており、プロテアソーム結合能は抑制されていると考えられている。RAD23Bは二つのUBAドメインにより2本のポリユビキチン鎖と相互作用することが可能で、多価の相互作用により液-液相分離する。また、自由になったUBLドメインはプロテアソームを液滴にリクルートし、さらにプロテアソームを活性化させる。

#### 4. RAD23Bとポリユビキチン鎖の多価の相互作用が液-液相分離を駆動する

ユビキチン修飾の大きな特徴としてポリユビキチン鎖の形成が第一にあげられる。UBAドメインを含む多くのユビキチン結合ドメインは、ユビキチン単量体と1:1で弱く相互作用するが、ポリユビキチン鎖とはユビキチンの数の分、多価で相互作用することで強く結合する。つまりポリユビキチン鎖の長さはユビキチン修飾の機能に大きく影響する。また、RAD23Bは二つのUBAドメインを持ち、1分子で2本のポリユビキチン鎖と相互作用することが可能である。液-液相分離はタンパク質や核酸の多価の相互作用で誘導されるため<sup>9)</sup>、RAD23Bがポリユビキチン鎖と相分離できるのではないかと考えた。そこで、試験管内で解析したところ、RAD23BとLys48結合型ポリユビキチン鎖がそれぞれの濃度に依存して共相分離することがわかった(図2A)。この相分離は、ポリユビキチン鎖の長さに依存しており、四つ以上の長さのポリユビキチン鎖で初めて相分離が起こり、より長いポリユビキチン鎖では液滴のサイズが増大した。もちろん、UBA変異体では液滴は形成せず、また、Lys63結合型ポリユビキチン鎖では微小な液滴しか形成しなかった。よって、RAD23Bはポリユビキチン鎖(特にLys48連結型ポリユビキチン鎖)の長さを識別

し、多価の相互作用により液-液相分離を誘導できるユビキチン結合タンパク質であることがわかった(図2B)。

なお、シャトル分子としてRAD23Bの他にRAD23A、UBQLN1~4が存在するが、プロテアソーム液滴の形成にはRAD23Bのみが関与する。これはRAD23Aの細胞内での発現量がRAD23Bより約10倍低く、相分離を起こすには濃度が低いこと、また、UBQLNタンパク質はUBAドメインを一つしかもたず、複数のユビキチン鎖と同時に相互作用することができないためと考えられる。興味深いことに、UBQLN2はUBAドメイン近傍に非構造領域を持ち単独で液-液相分離してストレス顆粒に局在化すること、ユビキチンがUBAドメインに結合すると相分離が解除され、ストレス顆粒に集積したユビキチン化タンパク質をプロテアソームに運ぶことが報告されている<sup>10)</sup>。酵母のシャトル分子(RAD23とUBQLNホモログのDSK2)は遺伝学的な解析よりリダグダントな機能を持つことが示唆されているが、ヒトではそれぞれの遺伝子が多様化しており、シャトル分子の使い分けが存在するようである。

#### 5. リボソームのオーファンタンパク質がプロテアソーム液滴の分解基質である

高浸透圧ストレスは脱水による細胞容量減少を伴い、分



子クラウディングやイオン強度の上昇により細胞内のタンパク質にダメージを与えることが想定される。しかし、タンパク質分解、特にユビキチン-プロテアソーム系との関連性は不明であったため、MSを用いてユビキチン化タンパク質の網羅的変動解析を実施した。その結果、複数のリボソームタンパク質、リンカーヒストンH1、分子シャペロンのユビキチン化の増加が検出された。

リボソームは、ヒト培養細胞では1分あたり7500個が作られており、構成タンパク質は核小体でrRNAと会合し、複雑な過程を経てリボソーム前駆体を形成した後、核から細胞質へ輸送される。リボソームのユビキチン化は、近年RQCの制御機構として脚光を浴びているが、リボソームの生合成の過程で複合体への取り込みに失敗したオーファンタンパク質の分解にも関与することが知られている<sup>11, 12)</sup>。そこで、高浸透圧ストレス刺激時の細胞の電子顕微鏡画像を確認したところ、核小体内のリボソーム合成のための構造体であるDFC (dense fibrillar component) が消失していることに気がついた。また、高浸透圧ストレスによりrRNAの転写が顕著に抑制されたことから、高浸透圧ストレスは核小体ストレス (リボソームストレスとも呼ばれる) を誘導することが示唆された。rRNAと会合できなかったリボソームタンパク質は核質にとどまりユビキチン-プロテアソーム系で分解されることが報告されており<sup>13)</sup>、実際、高浸透圧ストレス刺激時に、リボソームタンパク質がプロテアソーム液滴に局在化し分解される様子を生細胞タイムラプス解析により捉えることに成功した。このリボソームタンパク質の集積はRAD23B ノックアウト細胞やE1 阻害剤処理時には観察されず、また、プロテアソームやp97の阻害によりリボソームタンパク質の液滴が顕著に肥大化した。よって、リボソーム生合成の過程は高浸透圧ストレスに対して脆弱であり、ストレス下において大量に生じたリボソームのオーファンタンパク質がプロテアソーム液滴の主要な分解基質となることがわかった。

## 6. おわりに

平常時にはプロテアソームはその分解キャパシティの20%ほどしか使っておらず、細胞内で生じたユビキチン化基質を滞りなく分解できるとされる<sup>14)</sup>。しかし、ストレスの負荷により損傷を受けたタンパク質が細胞内に大量に生じた場合、迅速に隔離あるいは分解しないと、他の正常なタンパク質の機能に影響するため細胞機能が破綻する可能性がある。ユビキチン鎖に依存した液-液相分離は、このような有害タンパク質の迅速な隔離と分解を実行する手段として、どちらにも都合がよい。今回、四つ以上の長さのユビキチン鎖とRAD23Bが多価相互作用により共相分離することを見いだしたが、このタイプの液滴はそれぞ

れのタンパク質濃度に応じて互いを呼び込むため、いったん、ユビキチン化基質の液滴ができると次々とRAD23Bが集積し、さらに核内のユビキチン化基質を呼び込むことができる。つまり、ユビキチン化基質の迅速な隔離が可能である。また、RAD23BはUBLドメインを介してプロテアソームを液滴にリクルートするが、UBLドメインはプロテアソームを活性化させることができるため<sup>15)</sup>、液滴内のプロテアソームはユビキチン化基質を速やかに分解することが可能である。プロテアソームがユビキチン化基質を分解する過程でRAD23Bとユビキチン鎖の相互作用が消失すると、空いたRAD23BのUBAドメインが再びユビキチン化基質を呼び込む。そして核内のユビキチン化基質の濃度が減少すると、最終的にプロテアソーム液滴が消失する。もちろん、すべてを実験的に示したわけではなく憶測の域を出ない部分もあるが、プロテアソーム液滴は、液-液相分離を利用したユビキチン-プロテアソーム系の新しい分解様式と考えられる (図1D)。

未解決の課題として、このようなユビキチン依存的なプロテアソームの液滴形成が普遍的に起こっているかどうかがあげられる。最近、クライオ電子線トモグラフィを用いたプロテアソームの細胞内分子イメージングにより、小胞体膜の一部にプロテアソームが液滴を形成し、ERADのためのゾーンを形成していることが報告された<sup>16)</sup>。また、核膜孔の内側にプロテアソームが高度に集積する様子も報告されている<sup>17)</sup>。我々の作製したプロテアソームeGFP ノックイン細胞では、残念ながらそのような微小な集積は確認できていないが、より高度なイメージング法を用いることで、今後、次々とプロテアソーム液滴が見つかる可能性がある。

また、本稿で紹介したプロテアソーム液滴の他にも、選択的オートファジーのユビキチン結合タンパク質SQSTM1 (別称p62) がポリユビキチン鎖と液-液相分離することが報告されている<sup>18)</sup>。ヒトには約250種類のユビキチン結合タンパク質が存在し、ユビキチン結合ドメインを複数持つ分子も多いため、これら二つの分解経路以外でもユビキチン依存的な液-液相分離が起こっている可能性が高い。今後の解析が待たれる。

## 謝辞

本稿で紹介した研究を進めるにあたり、研究室内外の皆様から多くの協力をいただきました。稲田利文先生 (東北大学大学院薬学研究科) にはリボソームに関する解析を、Wolfgang Baumeister博士、Rubén Fernández-Busnadiego博士 (Max Planck Institute of Biochemistry) にはクライオ電子線トモグラフィによる解析をお手伝いいただき感謝いたします。田中啓二先生 (東京都医学総合研究所)、村田茂穂先生 (東京大学大学院薬学系研究科) には多くのご助言、ご指導をいただき、深く御礼申し上げます。

## 文 献

- 1) Livneh, I., Cohen-Kaplan, V., Cohen-Rosenzweig, C., Avni, N., & Ciechanover, A. (2016) The life cycle of the 26S proteasome: From birth, through regulation and function, and onto its death. *Cell Res.*, **26**, 869–885.
- 2) Pack, C.G., Yukii, H., Toh-e, A., Kudo, T., Tsuchiya, H., Kaiho, A., Sakata, E., Murata, S., Yokosawa, H., Sako, Y., et al. (2014) Quantitative live-cell imaging reveals spatio-temporal dynamics and cytoplasmic assembly of the 26S proteasome. *Nat. Commun.*, **5**, 3396.
- 3) Enam, C., Geffen, Y., Ravid, T., & Gardner, R.G. (2018) Protein Quality Control Degradation in the Nucleus. *Annu. Rev. Biochem.*, **87**, 725–749.
- 4) Venegas, A.B., Natsume, T., Kanemaki, M., & Hickson, I.D. (2020) Inducible degradation of the human SMC5/6 complex reveals an essential role only during interphase. *Cell Rep.*, **31**, 107533.
- 5) Zhang, X., Crowley, V.M., Wucherpfennig, T.G., Dix, M.M., & Cravatt, B.F. (2019) Electrophilic PROTACs that degrade nuclear proteins by engaging DCAF16. *Nat. Chem. Biol.*, **15**, 737–746.
- 6) Tsuchiya, H., Endo, A., & Saeki, Y. (2020) Multi-step ubiquitin decoding mechanism for proteasomal degradation. *Pharmaceuticals*, **13**, 128.
- 7) Finley, D. (2009) Recognition and processing of ubiquitin-protein conjugates by the proteasome. *Annu. Rev. Biochem.*, **78**, 477–513.
- 8) Yasuda, S., Tsuchiya, H., Kaiho, A., Guo, Q., Ikeuchi, K., Endo, A., Arai, N., Ohtake, F., Murata, S., Inada, T., et al. (2020) Stress- and ubiquitylation-dependent phase separation of the proteasome. *Nature*, **578**, 296–300.
- 9) Shin, Y. & Brangwynne, C.P. (2017) Liquid phase condensation in cell physiology and disease. *Science*, **357**, 1253.
- 10) Dao, T.P., Kolaitis, R.M., Kim, H.J., O'Donovan, K., Martyniak, B., Colicino, E., Hehnly, H., Taylor, J.P., & Castaneda, C.A. (2018) Ubiquitin modulates liquid-liquid phase separation of UBQLN2 via disruption of multivalent interactions. *Mol. Cell*, **69**, 965–978.
- 11) Ikeuchi, K., Izawa, T., & Inada, T. (2018) Recent progress on the molecular mechanism of quality controls induced by ribosome stalling. *Front. Genet.*, **9**, 743.
- 12) Sung, M.K., Porras-Yakushi, T.R., Reitsma, J.M., Huber, F.M., Sweredoski, M.J., Hoelz, A., Hess, S., & Deshaies, R.J. (2016) A conserved quality-control pathway that mediates degradation of unassembled ribosomal proteins. *eLife*, **5**, e19105.
- 13) Lam, Y.W., Lamond, A.I., Mann, M., & Andersen, J.S. (2007) Analysis of nucleolar protein dynamics reveals the nuclear degradation of ribosomal proteins. *Curr. Biol.*, **17**, 749–760.
- 14) Asano, S., Fukuda, Y., Beck, F., Aufderheide, A., Forster, F., Danev, R., & Baumeister, W. (2015) Proteasomes. A molecular census of 26S proteasomes in intact neurons. *Science*, **347**, 439–442.
- 15) Kim, H.T. & Goldberg, A.L. (2018) UBL domain of Usp14 and other proteins stimulates proteasome activities and protein degradation in cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **115**, E11642–E11650.
- 16) Albert, S., Wietrzynski, W., Lee, C.W., Schaffer, M., Beck, F., Schuller, J.M., Salome, P.A., Plitzko, J.M., Baumeister, W., & Engel, B.D. (2020) Direct visualization of degradation micro-compartments at the ER membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **117**, 1069–1080.
- 17) Albert, S., Schaffer, M., Beck, F., Mosalaganti, S., Asano, S., Thomas, H.F., Plitzko, J.M., Beck, M., Baumeister, W., & Engel, B.D. (2017) Proteasomes tether to two distinct sites at the nuclear pore complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **114**, 13726–13731.
- 18) Sun, D., Wu, R., Zheng, J., Li, P., & Yu, L. (2018) Polyubiquitin chain-induced p62 phase separation drives autophagic cargo segregation. *Cell Res.*, **28**, 405–415.

## 著者寸描

## ●佐伯 泰 (さえき やすし)



公益財団法人東京都医学総合研究所基礎  
医科学研究分野プロジェクトリーダー、  
博士 (薬学)。

■略歴 2003年北海道大学大学院薬学  
研究科博士課程修了，同年日本学術振興  
会特別研究員PD，07年より東京都臨床医  
学総合研究所研究員，研究所改組を経て，  
20年より現職。

■研究テーマと抱負 ユビキチン・プロ

テアソーム系の基本メカニズム解明。質量分析を用いた網羅的  
解析と個々の分子の丁寧な解析を両輪として研究を進め，ユビ  
キチン・プロテアソーム創薬の発展に貢献したいと思っています。

■ウェブサイト <http://www.igakuken.or.jp/pro-meta/>

■趣味 チェロ，ウクレレ (どちらも素人同然)。娘との散歩  
(そろそろ限界？)。