

令和元年6月17日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H02491

研究課題名(和文) 多元的構造生物学アプローチによるプロテアソーム形成機構の解明と創薬への展開

研究課題名(英文) Elucidation of the proteasome formation mechanisms through multilateral structural biology approach toward drug discovery

研究代表者

加藤 晃一 (Kato, Koichi)

名古屋市立大学・大学院薬学研究科・教授

研究者番号：20211849

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 34,600,000円

研究成果の概要(和文)：タンパク質分解装置であるプロテアソームは、約70種類のサブユニットからなる巨大で複雑な超分子複合体である。これらのサブユニットは自発的には正しい集合体を形成せず、アッセンブリーシャペロンと呼ばれる幾つかのタンパク質の介助によって集合している。本研究では、プロテアソームの中核的な構成要素である リングに着目し、一連の物理化学的手法を組み合わせた多元的構造生物学的アプローチを通じて、シャペロンを介したヒト リング形成中間体の複合体モデルを精度よく構築することに成功した。これにより、プロテアソームアッセンブリー系を標的とする阻害剤の合理的設計を行うための基盤を整えることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で得られた構造情報は、プロテアソームアッセンブリー系を標的としてその機能を阻害する分子の設計に重要な指針を与える。具体的には、プロテアソーム新生が活発ながん細胞に選択的に作用する医薬品の開発に資することができる。本研究は、プロテアソーム形成過程を標的とする新たな創薬の可能性を切り拓くものであり、その社会的波及効果は極めて大きい。また、本研究を通じて確立された研究戦略はリボソームやウィルスなど、様々な生体超分子の構造研究に応用可能であり、それらを標的とする創薬にも新たな着想をもたらすものと期待される。

研究成果の概要(英文)：The proteasome, a major proteolytic machine comprising approximately 70 subunits, is one of the largest and most complicated biological supramolecular complexes. Assembly of these subunits is not an autonomous process but is assisted by a series of proteasome assembly chaperones. In this study, we focused on the β -ring, which is a core component of the proteasome. By using a multilateral structural biology approach combining various biophysical techniques, we successfully constructed precise three-dimensional models of the human β -ring intermediate complexes mediated by the assembly chaperones. These findings provide an important basis for the rational inhibitor design targeting the proteasome assembly system.

研究分野：構造生物学 生物物理学

キーワード：プロテアソーム アッセンブリーシャペロン

1. 研究開始当初の背景

細胞内のタンパク質分解装置であるプロテアソームは約 70 個以上のサブユニットからなる巨大な酵素複合体であり、選択的なタンパク質の分解を行うことによって、細胞周期・アポトーシス・代謝調節・免疫応答・シグナル伝達・転写制御・品質管理・ストレス応答・DNA 修復など生命現象の諸相で重要な役割を担っている。プロテアソームによるタンパク質分解の破綻は、アルツハイマー病やパーキンソン病などの神経変性疾患を引き起こし、プロテアソーム阻害剤 Velcade® は多発性骨髄腫の特効的な抗がん剤として使用されている。

近年の研究を通じて、真核生物のプロテアソームの 4 次構造形成は自発的な自己組織化ではなく、サブユニット集合を介助する複数の特異的シャペロン分子が関与する極めて複雑なプロセスであることが明らかにされつつある（図 1）。したがって、プロテアソームの形成メカニズムの構造基盤を深く理解することは、新生プロテアソームを特異的に賦活化あるいは阻害する薬物を開発するための重要な糸口を与える。研究開始当初では、プロテアソームのサブユニット集合に関わるアッセンブリーシャペロンの構造生物学的研究は、もっぱら酵母の系を中心に行われていた。例えば、コア触媒ユニットの活性化と機能調節を司る 19S 調節ユニットの形成に携わるアッセンブリーシャペロンの 1 つである Nas2 は、19S 調節ユニットを構成する 6 種類の ATPase サブユニットの中の特定のものに結合して、それらサブユニットが 6 量体リング構造を形成するまでのチェックポイントとして機能していることが明らかとされていた[Satoh *et al.* (2014) *Structure* 22, 731-743]。しかしながら、これまでにヒトをはじめとした哺乳動物のアッセンブリーシャペロンの構造解析研究は殆どなされておらず、プロテアソームアッセンブリー系を標的とする Structure-Based Drug Design による創薬研究はあまり進んでいなかった。こうした状況に鑑みて、我々はヒトプロテアソームの形成機構の解明と創薬への展開を目指した。

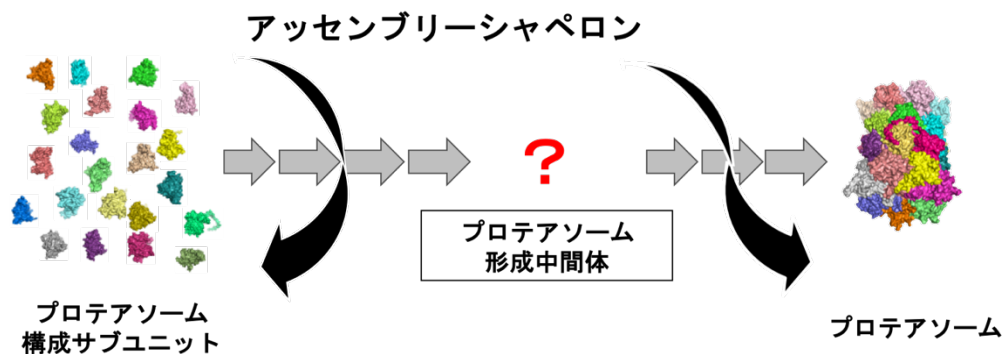


図 1: アッセンブリーシャペロンを介したプロテアソームの 4 次構造形成

プロテアソームは多くのアッセンブリーシャペロンの助けを受けてその 4 次構造を完成させる。プロテアソームの形成中間体はがん等の創薬標的として注目されている。

2. 研究の目的

巨大プロテアーゼ複合体であるプロテアソームは、生命現象の様々な局面で重要な役割を演じており、創薬標的としても注目されている。本研究は、プロテアソームの構造形成がサブユニット集合を介助する一連のシャペロンの関与のもとで進行するプロセスであることに注目し、そのメカニズムを多元的な構造生物学的アプローチによって解明することを目指した。特に、これまで捉えることが困難であったプロテアソームの形成中間体を同定し、それらと一過的に結合するシャペロンとの相互作用様式を解明することを目的とした。こうして得られるタンパク質間の相互作用様式の情報に基づき、プロテアソームアッセンブリー系を標的とする創薬の基盤構築を行った。

3. 研究の方法

これまでのアッセンブリーシャペロンおよびプロテアソームの形成中間体の構造研究は、主に酵母の系を中心に行われてきたが、本研究では創薬への展開を目的として、ヒト由来のものを対象とした。ヒトプロテアソームの形成中間体は複合体として不安定であることが予想されたため、結晶構造解析と NMR に加えて、超分子質量分析、量子ビーム溶液散乱、クライオ電子顕微鏡、高速原子間力顕微鏡 (AFM) 解析などを用いた多元的構造解析を実施した。研究の前半においては、(1) 古細菌由来のプロテアソームをモデル系として用いて新規な計測手法（特に、超分子質量解析、中性子小角散乱計測、高速 AFM 解析）の方法論を磨き上げた。そこで得られた技術基盤をもとに、(2) $\alpha 7$ を起点とした α リング形成中間体の形成中間体を同定し、それらの 3 次元構造を決定した。また、(3) アッセンブリーシャペロンである PAC3 および PAC4 の 3 次元構造を決定するとともに、シャペロンとプロテアソームサブユニットとの相互作用様式を明らかにした。

4. 研究成果

(1) 多元的構造生物学アプローチの技術基盤構築

古細菌プロテアソームは、真核生物由来のものと比較して極めて限定された種類のサブユニットから構成されており、それらがシャペロン非依存的に自己組織化して4次構造を形成することができるのが特徴である。また、機能未知ながら真核生物のアッセムリーシャペロンのホモログも存在している。したがって、本研究で対象とする真核生物プロテアソームのプロトタイプと位置付けることができる。

本研究では現名古屋大学の内橋貴之博士との共同研究を通じて、古細菌のシャペロン様タンパク質 PbaB と古細菌プロテアソームの高速 AFM 解析を行い、分子集合過程のダイナミクスを追跡するための技術基盤を整えた。また、もう1つのアッセムリーシャペロン様タンパク質である PbaA をターゲットとして、X線結晶構造解析、X線小角散乱解析、高速 AFM 解析を行い、本シャペロン様タンパク質の立体構造ダイナミクスを明らかにした。さらに、構造情報に基づく分子設計および改変を行うことにより、本タンパク質に新たにプロテアソーム結合能を賦与することにも成功した[Yagi-Utsumi *et al.* (2018) *Protein Eng. Des. Sel.* **31**, 29-36]。さらに連携研究者の石井健太郎博士の協力のもと超分子質量分析を実施し、PbaA は単独においてはホモ5量体を形成しているが、その結合パートナータンパク質 PF0014 と相互作用することにより10:10のヘテロ20量体を形成することを見出した。加えて、連携研究者の杉山正明博士、村田和義博士との共同研究を通じて中性子小角散乱およびクライオ電子顕微鏡解析を行い、PbaA/PF0014ヘテロ複合体の立体構造を明らかにした。以上の研究を通じて、本シャペロン様タンパク質はパートナータンパク質との複合体形成に伴い、特徴的なカゴ状構造を形成することを見出した。

以上、古細菌のプロテアソーム関連タンパク質をテスト試料とすることで、超分子質量解析や量子ビーム溶液散乱計測をはじめとした種々の計測手法をプロテアソーム系に応用する際の課題を洗い出し、多元的構造生物学アプローチの技術基盤の構築を行った(図2)。

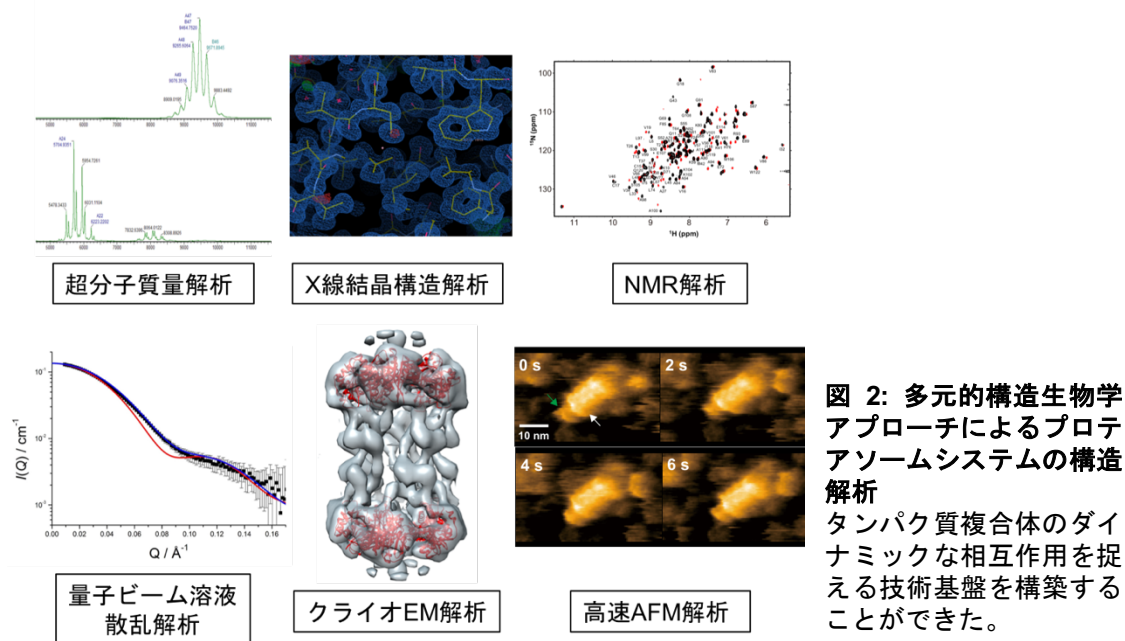


図 2: 多元的構造生物学アプローチによるプロテアソームシステムの構造解析
タンパク質複合体のダイナミックな相互作用を捉える技術基盤を構築することができた。

(2) プロテアソーム形成中間体の構造解析

上記の研究を通じて構築した多元的な構造生物学アプローチにより、プロテアソームの中核的な構成要素である α リングをターゲットとしてその形成過程を探索した。 α リングは $\alpha 1$ – $\alpha 7$ の7種類の異なるサブユニットから成るヘテロ7量体であり、アッセムリーシャペロン PAC1–PAC4 がその集合過程に関与している。そこで、これら構成コンポーネントとシャペロンを組換えタンパク質として調製することを試み、全コンポーネントの発現・精製法を確立した。得られた組換えタンパク質を用いて溶液中における集合状態を解析したところ、 $\alpha 1$ – $\alpha 6$ は単量体である一方で、興味深いことに $\alpha 7$ のみが7量体のリングが2つ重なったホモ14量体を形成することが明らかとなった[Ishii *et al.* (2015) *Sci. Rep.* **5**, 18167; Sekiguchi *et al.* (2019) *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 2308]。さらに興味深いことに、 $\alpha 7$ のホモ14量体は $\alpha 4$ もしくは $\alpha 6$ サブユニットの存在下において、2つの7量体リングに解体されることが見出された。この過程を高速 AFM を用いて観測したところ、 $\alpha 6$ による $\alpha 7$ の2重リングの解体は2段階のプロセスを経ていることが明らかになった。すなわち、 $\alpha 6$ は $\alpha 7$ のダブルリング構造の側面に過渡的に相互作用することでリングを解離させた後、リングの中心部を占有するように結合することで、リング間の再結合を阻害している様子を可視化することができた(図3) [Kozai *et al.* (2017) *Sci. Rep.* **7**, 15373]。このことは、プロテアソームの形成過程において、非天然型の集合体である $\alpha 7$ のホモ14量体構造の形成を阻止するメカニズムが存在する可能性を示唆している。

一方、 $\alpha 7$ のホモ 14 量体の結晶構造情報に基づいて部位特異的変異を施すことで、その集合状態を制御することを試み、 $\alpha 7$ のホモ 14 量体を 7 量体化することや、さらには単量体として安定に存在させることに成功した [Sekiguchi *et al.* (2019) *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 2308]。また、こうして単量体化した $\alpha 7$ を特定のサブユニット同士を組み合わせるによりヘテロ 14 量体を構築することにも成功した。

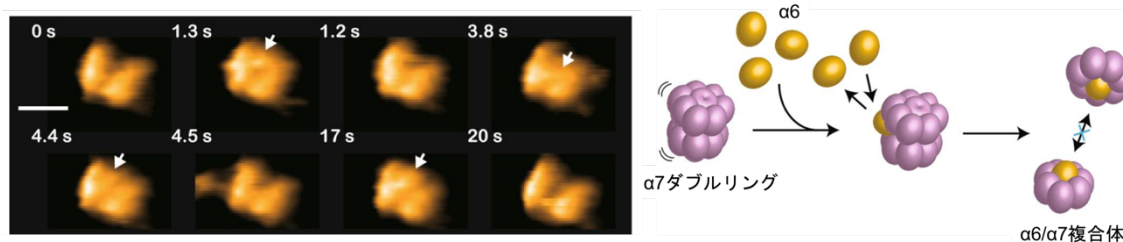


図 3: 高速 AFM 解析によるプロテアソーム $\alpha 7$ ホモ 14 量体の解体のリアルタイム観察
 $\alpha 7$ のホモ 14 量体を 2 つの 7 量体リングに解体し、その中心部を占有するように結合することがわかった。

(3) プロテアソーム形成機構の解明と創薬への展開

次に、 $\alpha 1$ - $\alpha 7$ とアッセンブリーシャペロンの *in vitro* 相互作用解析を行なった。その結果、PAC3/PAC4 ヘテロ 2 量体は隣り合う $\alpha 4$ - $\alpha 5$ - $\alpha 6$ の相互作用を介助することが明らかとなり、それら 3 つのサブユニットが正しく配置することを促すマッチメーカーとして働いているものと考察された。さらに、PAC3 および PAC4 ホモ 2 量体の結晶構造解析を行い、それらの立体構造をそれぞれ 0.96 Å および 1.90 Å 分解能で決定することに成功した [Kurimoto *et al.* (2017) *Protein Sci.* **26**, 1080-1085; Satoh *et al.* (2019) *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 2231]。これらの結晶構造はホモ 2 量体であったため、NMR を用いて PAC3 上の PAC4 との相互作用部位を同定した。これにより、PAC3/PAC4 ヘテロ 2 量体の複合体モデルを構築することができた (図 4)。さらに NMR 解析を通じて、PAC3 上の $\alpha 6$ サブユニットの結合部位と予想されるループが柔軟な構造をとることを明らかにした。以上の結果から、*in silico* ドラッグスクリーニングを行う上で、シャペロン分子の構造ダイナミクスを十分に考慮する必要があることが判明した。

本研究を通じて、アッセンブリーシャペロンとして機能する PAC3/PAC4 ヘテロ 2 量体を介した α リング形成中間体の複合体モデルを精度よく構築することに成功した。以上の研究を通じて、プロテアソームアッセンブリー系を標的とする阻害剤の合理的設計を行うための基盤が整い、創薬研究へ展開することができた。

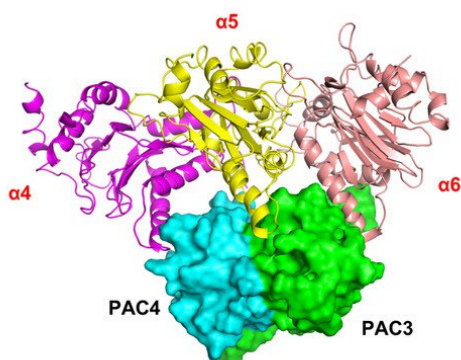


図 4: プロテアソームサブユニット $\alpha 4$ - $\alpha 5$ - $\alpha 6$ とアッセンブリーシャペロン PAC3-PAC4 の 5 者複合体モデル

PAC3/PAC4 ヘテロ 2 量体は隣り合う $\alpha 4$ - $\alpha 5$ - $\alpha 6$ の相互作用を介助することにより、それら 3 つのサブユニットが正しく配置することを促す分子マッチメーカーとして機能する。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 10 件)

- ① Taichiro Sekiguchi, Tadashi Satoh, (5 人省略), Hirokazu Yagi, Saeko Yanaka, (3 人省略), Koichi Kato, Mutational and Combinatorial Control of Self-Assembling and Disassembling of Human Proteasome α Subunits, *Int. J. Mol. Sci.*, 査読有、20 巻、2019、2308
DOI: 10.3390/ijms20092308
- ② Tadashi Satoh, Maho Yagi-Utsumi, (3 人省略), Koichi Kato, Molecular and Structural Basis of the Proteasome α Subunit Assembly Mechanism Mediated by the Proteasome-Assembling Chaperone PAC3-PAC4 Heterodimer, *Int. J. Mol. Sci.*, 査読有、20 巻、2019、2231
DOI: 10.3390/ijms20092231
- ③ 佐藤 匡史、加藤 晃一、集合シャペロンを介したプロテアソーム形成機構、*医学のあゆみ*、査読有、276 巻、2018、949-953
- ④ Koichi Kato, Tadashi Satoh, Structural insights on the dynamics of proteasome formation, *Biophys.*

Rev.、査読有、10 卷、2018、597-604

DOI: 10.1007/s12551-017-0381-4

- ⑤ Maho Yagi-Utsumi, (5 人省略), Hirokazu Yagi, Tadashi Satoh, Koichi Kato, Conversion of functionally undefined homopentameric protein PbaA into a proteasome activator by mutational modification of its C-terminal segment conformation, *Protein Eng. Des. Sel.*、査読有、31 卷、2018、29-36
DOI: 10.1093/protein/gzx066
- ⑥ Toshiya Kozai, Taichiro Sekiguchi, Tadashi Satoh, Hirokazu Yagi, Koichi Kato, Takayuki Uchihashi, Two-step process for disassembly mechanism of proteasome $\alpha 7$ homo-tetradecamer by $\alpha 6$ revealed by high-speed atomic force microscopy, *Sci. Rep.*、査読有、7 卷、2017、15373
DOI: 10.1038/s41598-017-15708-8
- ⑦ Eiji Kurimoto, Tadashi Satoh, (3 人省略), Maho Yagi-Utsumi, Keiji Tanaka, Koichi Kato, Crystal structure of human proteasome assembly chaperone PAC4 involved in proteasome formation, *Protein Sci.*、査読有、26 卷、2017、1080-1085
DOI:10.1002/pro.3153
- ⑧ 加藤 晃一, 佐藤 匡史, 生命分子の自己組織化ダイナミクス、化学工業、査読無、66 卷、2015、32-37
- ⑨ 加藤 晃一, 稲垣 直之, 離合集散が織りなす生命分子機能の研究フロンティア、実験医学、査読無、33 卷、2015、1316-1320
- ⑩ Kentaro Ishii, Masanori Noda, Hirokazu Yagi, (2 人省略), Tadashi Satoh, Koichi Kato, Susumu Uchiyama, Disassembly of the self-assembled, double-ring structure of proteasome $\alpha 7$ homo-tetradecamer by $\alpha 6$, *Sci. Rep.*、査読有、5 卷、2015、18167
DOI:10.1038/srep18167

[学会発表] (計 30 件)

- ① Taichiro Sekiguchi, Tadashi Satoh, Kentaro Ishii, Hirokazu Yagi, Koichi Kato, Characterization of the “scrap-and-build” process in the proteasome α ring formation, 第 56 回 日本生物物理学会年会、2018
- ② 石井 健太郎, 関口 太一郎, 矢木 宏和, 佐藤 匡史, 内山 進, 加藤 晃一, 超分子質量分析によるプロテアソーム構成サブユニットの相互作用解析、平成 29 年度中部支部講演会、2018
- ③ 加藤 晃一, 生体分子の集合離散が織りなす細胞機能研究の最前線、第 69 回 日本細胞生物学会大会、2017
- ④ 加藤 晃一, プロテアソーム分子集合の構造生物学、大阪大学蛋白質研究所セミナー・Spring-8 先端利用技術ワークショップ、2017
- ⑤ 小財 稔矢, 佐藤 匡史, 矢木 宏和, 内橋 貴之, 加藤 晃一, 高速 AFM 観察で明らかにされた $\alpha 7$ ホモ 14 量体の $\alpha 6$ による解体過程、第 55 回 日本生物物理学会年会、2017
- ⑥ Toshiya Kozai, Tadashi Satoh, Arunima Sikdar, Hirokazu Yagi, Maho Yagi-Utsumi, Takayuki Uchihashi, Toshio Ando, Koichi Kato, 高速 AFM による 20S プロテアソーム関連タンパク質の動態観察、第 54 回 日本生物物理学会年会、2016
- ⑦ Koichi Kato, Structural basis for dynamic orchestration of proteasomes, The 42nd Naito Conference、2016
- ⑧ Tadashi Satoh, (6 人省略), Hirokazu Yagi, Maho Yagi-Utsumi, Susumu Uchiyama, Takayuki Uchihashi, Koichi Kato, Structural insights into molecular assembly in the proteasomal systems, The 7th Japan-Taiwan Joint Meeting on Neutron and X-ray Scattering、2016
- ⑨ Kentaro Ishii, Masanori Noda, Hirokazu Yagi, (2 人省略), Tadashi Satoh, Koichi Kato, Susumu Uchiyama, Disassembly of the self-assembled, double-ring structure of proteasome $\alpha 7$ homo-tetradecamer by $\alpha 6$, Okazaki Institute for Integrative Bioscience Retreat 2015、2015
- ⑩ 石井 健太郎, 矢木 宏和, 加藤 晃一, 内山 進, Native MS によるプロテアソーム $\alpha 7$ サブユニットの自己会合状態の解析、第 63 回 質量分析総合討論会、2015

[その他]

ホームページ等

<http://www.phar.nagoya-cu.ac.jp/hp/sbk/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：佐藤 匡史

ローマ字氏名：SATO, Tadashi

所属研究機関名：名古屋市立大学

部局名：大学院薬学研究科

職名：准教授

研究者番号 (8桁) : 80532100

研究分担者氏名 : 矢木 宏和
ローマ字氏名 : YAGI, Hirokazu
所属研究機関名 : 名古屋市立大学
部局名 : 大学院薬学研究科
職名 : 講師
研究者番号 (8桁) : 70565423

研究分担者氏名 : 矢木 真穂
ローマ字氏名 : YAGI, Maho
所属研究機関名 : 大学共同利用機関法人自然科学研究機構 (新分野創成センター、アストロバイオロジーセンター、生命創成探究)
部局名 : 生命創成探究センター
職名 : 助教
研究者番号 (8桁) : 40608999

研究分担者氏名 : 谷中 冴子
ローマ字氏名 : YANAKA, Saeko
所属研究機関名 : 分子科学研究所
部局名 : 生命・錯体分子科学研究領域
職名 : 助教
研究者番号 (8桁) : 80722777

研究分担者氏名 : 山口 拓実
ローマ字氏名 : YAMAGUCHI, Takumi
所属研究機関名 : 北陸先端科学技術大学院大学
部局名 : 先端科学技術研究科
職名 : 准教授
研究者番号 (8桁) : 60522430

連携研究者氏名 : 杉山 正明
ローマ字氏名 : SUGIYAMA, Masaaki
所属研究機関名 : 京都大学
部局名 : 複合原子力科学研究所
職名 : 教授
研究者番号 (8桁) : 10253395

連携研究者氏名 : 村田 和義
ローマ字氏名 : MURATA, Kazuyoshi
所属研究機関名 : 生理学研究所
部局名 : 脳機能計測・支援センター
職名 : 准教授
研究者番号 (8桁) : 20311201

連携研究者氏名 : 奥村 久士
ローマ字氏名 : OKUMURA, Hisashi
所属研究機関名 : 大学共同利用機関法人自然科学研究機構 (新分野創成センター、アストロバイオロジーセンター、生命創成探究)
部局名 : 生命創成探究センター
職名 : 准教授
研究者番号 (8桁) : 80360337

連携研究者氏名 : 石井 健太郎
ローマ字氏名 : ISHII, Kentaro
所属研究機関名 : 大学共同利用機関法人自然科学研究機構 (新分野創成センター、アストロバイオロジーセンター、生命創成探究)
部局名 : 生命創成探究センター
職名 : 研究員
研究者番号 (8桁) : 30748380