

## 自己評価報告書

平成23年4月28日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2012

課題番号：20370065

研究課題名（和文） プロテアソームの単粒子解析による構造研究

研究課題名（英文） Structural study of proteasome by single particle analysis

研究代表者

光岡 薫 (MITSUOKA KAORU)

独立行政法人産業技術総合研究所・バイオメディシナル情報研究センター・研究チーム長

研究者番号：60301230

研究分野：構造生物学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：プロテアソーム、電子顕微鏡、画像解析

## 1. 研究計画の概要

エピトープタグをプロテアソームサブユニット遺伝子に付加した出芽酵母より高純度の 26S プロテアソームを大量にアフィニティー精製し、その標品を極低温電子顕微鏡で観察、その投影像を撮影する。その画像から 26S 粒子を切り出し、単粒子解析により、その立体構造を再構成する。

エピトープタグを付加した野生型の 26S 複合体以外に、ユビキチン受容サブユニット Rpn10などを欠損した各種変異体の立体構造を得て、それらを比較することで、19S中のサブユニットの位置を特定する。また、分解基質が結合したプロテアソームについても立体構造を決定し、基質を活性部位に輸送する機能に関する知見も得る。

## 2. 研究の進捗状況

酵母より大量調製したプロテアソームについて、20Sや26S、その変異体について、負染色観察による検討や、実際のクライオ電子顕微鏡法による観察を行った。その結果、変異体によって、26S複合体の安定性に違いがあること、比較的安定な変異体についても、グリセロールがない条件では、容易に19Sと20Sに解離することを見いだした。以上のような検討をふまえて、構造解析に用いる試料を、まず野生型と Rpn10欠損変異体とすることとした。

次に、電子顕微鏡試料の作製条件について、通常クライオ電子顕微鏡撮影用の凍結試料以外に、化学架橋と密度勾配遠心を組み合わせた電子顕微鏡試料作製法 (GraFix) を検討した。その結果、この方法を用いることで、より安定な試料が得られ、グリセロール非存在下においても 26S 試料のデータ収集を行

うことが出来る試料条件を確立した。

電子顕微鏡撮影の条件についても検討した。加速電圧については、200kVの方が多少コントラストが良いことを確認したが、300kVの方が高分解能の S/N が良かった。試料温度の違いによるコントラストの変化についても検討し、これについては、現状、明瞭な違いを観察できていない。これら撮影条件については今後も引き続き検討する。

画像解析に関しては、焦点位置を変えて撮影した電子顕微鏡像のペアを用いて、画像のコントラストと向上するシステムを構築した。この結果、通常クライオ試料で 300kV の撮影で粒子を切り出して、三次元再構成が行えるようになった。今後、このシステムを用いて、Rpn10欠損変異体の立体構造を得て、Rpn10サブユニットの位置に関する知見を得る。また、GraFix法を用いた試料から、いろいろな変異体や分解基質結合試料について、その三次元再構成を行う。

## 3. 現在までの達成度

②おおむね順調に進展している。

26Sの全体構造を得るための、データ収集条件をほぼ確立し、現在、野生型と Rpn10欠損変異体の立体構造再構築を進めている。この結果が、期間中に得られる目処が立ち、その結果を用いて、基質複合体の構造解析を行うとともに、機能測定まで研究を進めたい。

## 4. 今後の研究の推進方策

まず、なるべく早く野生型と Rpn10欠損変異体の立体構造を取得し、その結果を報告する。そして、分解基質との複合体へと試料を移行して、構築したシステムでの立体再構築を行う。分解基質との複合体については、

いくつかの候補を用意して、その結合位置を比較するとともに、分解の中間体を、凍結までの時間を変えることで可視化できないか検討する。また、ラベルなどを用いて他のサブユニットの位置も同定出来ないか検討する。これらの構造解析により、基質の結合と分解の機構モデルを作成し、それを用いて、できたら機能解析まで行いたい。

#### 5. 代表的な研究成果

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

##### [雑誌論文] (計 8 件)

- ① Mitsuoka, K. Obtaining high-resolution images of biological macromolecules by using a cryo-electron microscope with a liquid-helium cooled stage. *Micron*, **42**, 100-106, (2011)、査読有
- ② Yamaguchi, T., Fujii, T., Abe, Y., Hirai, T., Kang, D., Namba, K., Hamasaki, N., and Mitsuoka, K. Helical image reconstruction of the outward-open human erythrocyte band 3 membrane domain in tubular crystals, *J Struct Biol* **169**, 406-412, (2010)、査読有
- ③ Saeki, Y., Toh-e, A., Kudo, T., Kawamura, H., and Tanaka, K., Multiple proteasome-interacting proteins assist the assembly of the yeast 19S regulatory particle, *Cell*, **29**, 900-913, (2009)、査読有
- ④ Saeki, Y., Kudo T., Sone T., Kikuchi, Y., Yokosawa, H., Toh-e, A., Tanaka, K., Lysine 63-linked polyubiquitin chain may serve as a targeting signal for the 26S proteasome, *EMBO J.* **18**, 359-371. (2009)、査読有
- ⑤ Yasunaga, T., Wakabayashi, T., Evaluation of a 2k CCD camera with an epitaxially grown CsI scintillator for recording energy-filtered electron cryo-micrographs, *J. Electron Microsc.* **57**, 101-112 (2008)、査読有

##### [学会発表] (計 6 件)

- ① Okuma, Y., Kasuya, D., Mitsuoka, K., Saeki, Y., Yasunaga, T., Single particle analysis of the 26S proteasome by high-resolution electron cryo-microscopy and advanced image analysis, 日本生物物理学会第 48 回年会、2010 年 9 月 21 日、東北大学・川内北キャンパス

- ② 安永卓生、岩崎憲治、宮澤淳夫、電子顕微鏡画像処理システム Eos2 の構築、第 46 回日本生物物理学会、2008 年 12 月 3-5 日、福岡国際センター
- ③ 新名人士、谷口香苗、西野有里、岩崎憲治、高木淳一、宮澤淳夫、光岡薫、安永卓生、多種の処理ツールの統合による半自動 3 次元再構成システムの開発、第 46 回日本生物物理学会、2008 年 12 月 3-5 日、福岡国際センター

##### [図書] (計 1 件)

- ① 安永卓生 (共著)、(株) NTS、「ナノイメージング」第一編ナノイメージングを可能にする顕微鏡法・第 3 章電子顕微鏡を用いたナノイメージング、(2008)、15.

##### [その他]

ホームページ

<http://www.rinshoken.or.jp/activities/t090514.html>