

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 3 月 31 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)

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

研究成果の概要（和文）：タンパク質の分解を行う複合体であるプロテアソームは、細胞周期やシグナル伝達、DNA 修復、免疫応答などの細胞制御過程に関与している。低温電子顕微鏡を用いた単粒子解析による、その制御過程における複合体の立体構造解析を可能とする、電子顕微鏡試料作製法と電子顕微鏡像収集法、画像解析法の開発・改良を行い、機能中のプロテアソームとその制御因子の単粒子解析を可能とした。

研究成果の概要（英文）：The proteasome is a protein complex, which serves to degrade proteins, and is a protease in the major cytosolic proteolytic system with critical functions in cell cycle control, transcription, signal transduction, inflammation and many other biological processes. For the structural analysis of the functioning complex by single particle analysis using cryo-electron microscope, we introduced sample preparation technique and data collection method suitable for proteasome and developed image analysis system, which enable us the structural analysis of proteasome and its interacting factors in function.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2009 年度	3,300,000	990,000	4,290,000
2010 年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2011 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2012 年度	2,500,000	750,000	3,250,000
総計	13,800,000	4,140,000	17,940,000

研究分野：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：構造生物学、プロテアソーム、単粒子解析、電子顕微鏡、三次元再構成

1. 研究開始当初の背景

プロテアソームは、真核細胞の細胞質でタンパク質を分解する、大型のタンパク分解酵素複合体である。プロテアーゼ活性を持つ中央付近の円筒である 20S という部分は、ヘテロな 14 量体が二つ結合した 28 量体であり、その原子モデルが X 線結晶構造解析により決定されている。その円筒の両端は、18 種

類以上のポリペプチド鎖からなる 19S と呼ばれる複合体がふさいでおり、この部分で分解の目印であるユビキチン鎖を認識して、分解すべき基質タンパク質を解きほぐした後、20S 内部に送り込むと考えられている。その全体は 26S と言われている。しかし、その 19S 部分や、さらに 26S の全体構造は原子モデルが得られるような分解能ではまだ明

らかになっていない。

一方、そのような複合体の立体構造を得るのに適した構造解析手法として、電子顕微鏡を用いた単粒子解析を挙げることができる。試料を急速に凍結することで非晶質の氷に閉じこめて、それを低温電子顕微鏡法を用いて観察することで、非常に生に近い複合体の立体構造を得ることができる。また単粒子解析は、いろいろな条件での構造を効率的に収集することができるので、機能中間体の解析にも適している。その分解能も急速に向上してきており、例えばシャペロンである GroEL では、6Å で構造解析が行われており、 α -ヘリックスを観察することができていたので、複合体を構成しているタンパク質分子の原子モデルがわかっているような場合には、その分子を正確に当てはめることができる。それにより、タンパク質分子間の相互作用面などが推定できるので、それを用いて機能解析のための部位指定変異体のデザインなどが容易にできるようになる。

そこで、単粒子解析を用いることで、26S の全体構造を、二次構造が可視化できるような分解能で可視化することを目指し、研究を開始した。

2. 研究の目的

本研究では、まず、機能中のプロテアソームのいろいろな立体構造を得ることができる単粒子解析システムを構築することを目的とした。このようなシステムを構築することで、機能中の中間体などの立体構造を効率的に得ることができるので、ユビキチン鎖の認識機構の詳細を明らかにできることが期待される。また、急速凍結により、寿命の短い中解体の立体構造も決定できるので、19S によるプロテアーゼ活性部位へのタンパク質の送り込み機構を直接的に明らかにできる可能性がある。そして 26S によるタンパク質分解を制御する因子との相互作用を可視化することで、その制御基盤を解明できる可能性がある。

そのようなシステム構築を実現するため、完全な複合体を効率的に電子顕微鏡観察する試料調製法を導入し、プロテアソーム粒子を頻度よく観察できる電子顕微鏡グリッド作製法を検討した。そして、コントラストの低いプロテアソーム粒子の電子顕微鏡像の解析を効率化できる画像解析システムの開発を行った。

3. 研究の方法

(1) 複合体を安定化する電子顕微鏡試料調製法の導入と最適化

酵母由来のプロテアソームを用いて、通常の電子顕微鏡観察を行うと、ある割合の複合体でサブユニットの欠如が観察され、より高

い割合で完全な複合体が電子顕微鏡観察できる条件の検討が、低温電子顕微鏡からの単粒子解析を効率的に進めるために重要であることが明らかになった。そこで、不安定な複合体を安定できる電子顕微鏡飼料用試料作製法として知られている、低い濃度の架橋剤を利用した密度勾配遠心 (GraFix) 法を導入し、プロテアソーム用に条件の最適化を行った。

(2) 複合体を頻度良く観察するための電子顕微鏡グリッド作製法の検討

単粒子解析で二次構造が可視化できる分解能の構造解析を行うためには、対称性のない試料の場合には数万個の粒子を平均化する必要があることが知られている。プロテアソームの場合には、2回対称性はあると考えられるが、それでも1万個以上の粒子を平均化する必要がある。そのような大量の粒子像を効率的に得るためには、複合体が頻度高く観察できる必要がある。そのような条件を実現するため、通常利用されている規則的に穴の空いたカーボン膜のグリッドに、薄いカーボン膜を吸着させ、そこに粒子を吸着して急速凍結することで、観察できる粒子の頻度を上げることを検討した。

また、このように薄いカーボン膜への吸着を用いることで、それを用いない場合と比較して、より薄い氷が作製でき、それによる S/N の向上も期待できると考えた。

(3) コントラストが低い試料の電子顕微鏡像解析のためのシステム開発

そのようにして得られたプロテアソームの電子顕微鏡写真は、自動的に粒子をピックアップできる十分なコントラストを持っていないことが明らかになった。そこで、コントラストが低い試料について、容易に粒子をピックアップできる方法の開発が必要となった。

そのため、解析に適した焦点位置に近い画像と、よりコントラストが高い焦点位置から遠い2つの電子顕微鏡像 (defocus ペア) を撮影することで、焦点位置に近い画像での粒子の位置を特定することとした。

また、画像解析システムを高度化し、そのような defocus ペアから Wiener フィルタを用いて、二つの画像からよりコントラストの高い画像が得られる解析ソフトウェアの開発を行った。

(4) プロテアソームの制御因子の位置特定法の検討

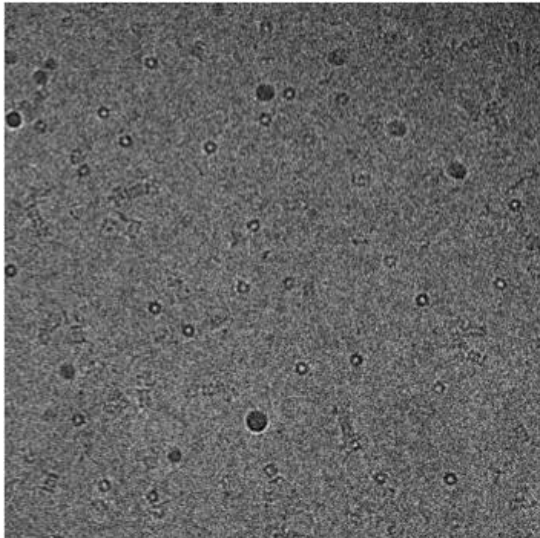
プロテアソーム複合体が機能したり、制御を受けたりするために、いろいろなタンパク質と相互作用していると考えられている。そのような相互作用部位などを特定するため、プロテアソームと相互作用するタンパク質の位置を容易に可視化できる金コロイドを用いた標識システムの開発を行った。

そのため、プロテアソームと相互作用していると考えられる Ubp6 に金コロイド標識を付け、その標識タンパク質とプロテアソームを共存させることで、それらが相互作用した複合体が電子顕微鏡観察により可視化できるかを試みた。

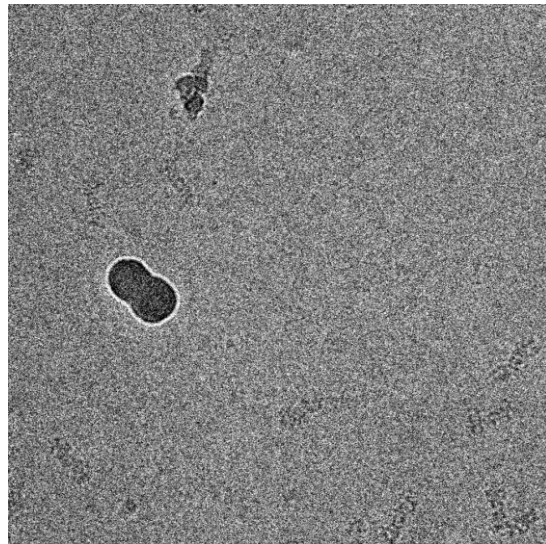
4. 研究成果

(1) 複合体を安定化する電子顕微鏡試料調製法の導入と最適化

GraFix 法を導入し、酵母で発現したプロテアソームを用いて、その条件を最適化した。その結果、0.1%のグルタルアルデヒドにより、以下の様に完全な複合体を頻度高く観察することができた。



GraFix を用いていない試料



GraFix を用いた試料

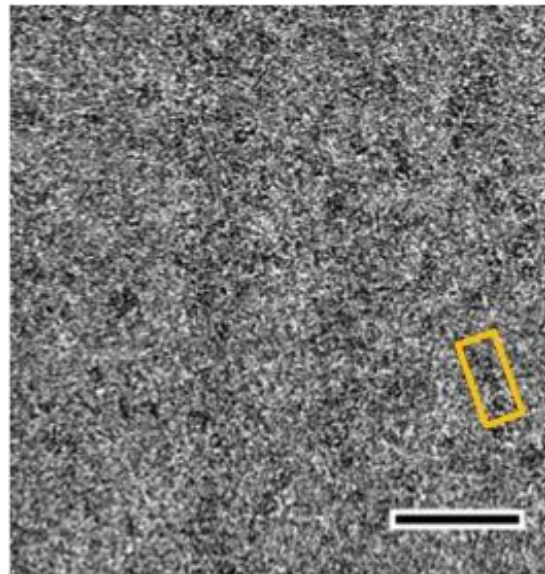
(2) 複合体を頻度良く観察するための電子顕微鏡グリッド作製法の検討

GraFix を用いることで、完全な複合体の割合は向上することができたが、1枚の電子顕微鏡写真中に観察できる複合体粒子の頻度が減少した。それを補うため、薄いカーボ

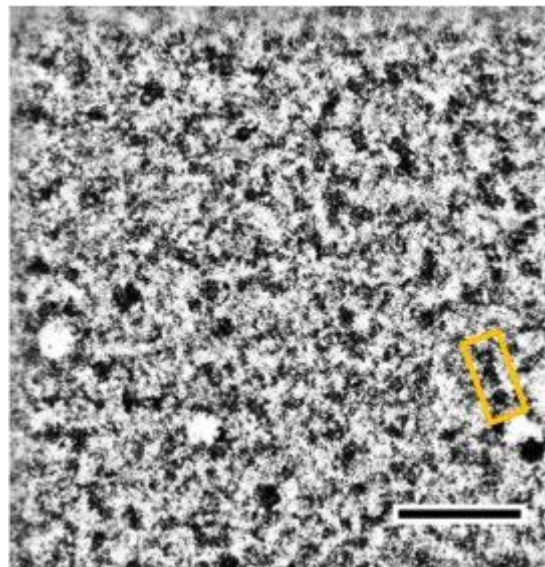
ン膜に複合体を吸着することで、粒子頻度が向上するか検討した。その結果、1枚の電子顕微鏡フィルム上の完全な複合体の数を、10個程度から 3-40 個にすることに成功した。これにより、数百枚の写真を得ることで、目標の粒子数が実現できるようになった。

(3) コントラストが低い試料の電子顕微鏡像解析のためのシステム開発

このようにして得られた低温電子顕微鏡像は、図からもわかるように、コントラストが十分ではなかった。そこで、defocus ペアを撮影し、その2枚の画像の用いることで容易に粒子をピックアップできるシステムの構築を行った。さらに、その2つの画像から Wiener フィルタを用いることで、以下の写真に示したようなコントラストの向上を可能とするアルゴリズムを開発した。



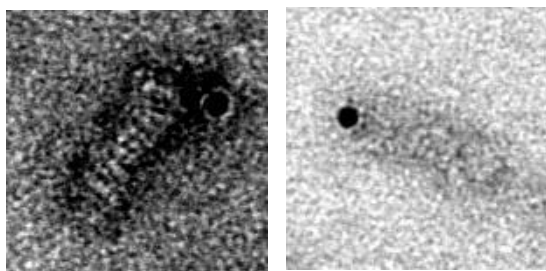
元の画像



Wiener フィルタ後の画像

(4) プロテアソームの制御因子の位置特定法の検討

機能中の中間体での基質や相互作用タンパク質などの位置同定のため、相互作用タンパク質金コロイド標識を付け、それとプロテアソームを共存させることで、サブユニットの位置の可視化ができるか検討した。Ubp6 に金コロイドを標識し、それとプロテアソームを共存させることで、両端に Ubp6 が相互作用していると考えられる電子顕微鏡像を観察することができた。



5. 主な発表論文等

(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 11 件)

- ① Mitsuoka, K., Obtaining high-resolution images of biological macromolecules by using a cryo-electron microscope with a liquid-helium cooled stage, *Micron*, 査読有、vol. 42、2011、100-106
DOI: 10.1016/j.micron.2010.08.006
- ② Yamaguchi, T., Fujii, T., Abe, T., Hirai, T., Kang, D., Namba, K., Hamasaki, N., Mitsuoka, K., Helical image reconstruction of the outward-open human erythrocyte band 3 membrane domain in tubular crystals, *J. Struct. Biol.*, 査読有、vol. 169、2010、406-412
DOI: 10.1016/j.jsb.2009.12.009
- ③ Saeki, Y., Toh-E, A., Kudo, T., Kawamura, H., Tanaka, K., Multiple proteasome-interacting proteins assist the assembly of the yeast 19S regulatory particle, *Cell*, 査読有、vol. 137、2009、900-913
DOI: 10.1016/j.cell.2009.05.005
- ④ Yasunaga, T., Wakabayashi, T., Evaluation of a 2k CCD camera with an epitaxially grown CsI scintillator for recording every-filtered electron cryo-micrographs, *J. Electron Microsc.*, 査読有、vol. 57、2008、101-112
DOI: 10.1093/jmicro/dfn006

[学会発表] (計 10 件)

- ① Wang, Z., Structural analysis of the 26S proteasome by cryo-electron microscopy and single-particle analysis, 第 50 回日本生物物理学会年会、2012 年 9 月 23 日、名古屋大学東山キャンパス (愛知県)
- ② Okuma, Y., 3D structure of the 26S proteasome by high-resolution electron cryo-microscopy, 第 49 回日本生物物理学会年会、2011 年 9 月 11 日、兵庫県立大学姫路書写キャンパス (兵庫県)
- ③ Okuma, Y., Single Particle analysis of the 26S proteasome by high-resolution electron cryo-microscopy and advanced image analysis, 第 48 回日本生物物理学会年会、2010 年 9 月 21 日、東北大学川内北キャンパス (福島県)

[図書] (計 2 件)

- ① Tanaka, K. et al., The proteasome: molecular machinery and pathological roles, *Biological Chemistry*, 2012、15

6. 研究組織

(1) 研究代表者

光岡 薫 (MITSUOKA KAORU)
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

(2) 研究分担者

安永 卓生 (YASUNAGA TAKUO)
九州工業大学・大学院情報工学研究院生命
情報工学系・教授
研究者番号: 60251394
佐伯 泰 (SAEKI YASUSHI)
公益財団法人東京都医学総合研究所・生体
分子先端研究分野・主席研究員
研究者番号: 80462779