

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 24 年 5 月 23 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21540417

研究課題名（和文） タンパク質高次構造におけるダイナミクスの解析

研究課題名（英文） Analysis for Dynamics on High Order Structure of Protein

研究代表者

杉山 正明（SUGIYAMA MASAOKI）

京都大学・原子炉実験所・教授

研究者番号：10253395

研究成果の概要（和文）：重水素化試料及び溶媒コントラスト変調法を用いた中性子小角散乱法により、タンパク質の高次構造のダイナミクスの解析法を確立した。同手法を用いて、20S プロテアソームを形成するサブユニットの1つ($\alpha 7$)が単独で作る会合体において、そのサブユニットが交換する現象が存在することを初めて確認し、同時にその Kinetics の解析も行った。

研究成果の概要（英文）：We established an analysis method for dynamics of high order structure of protein by Small-Angle Neutron Scattering utilizing deuterated proteins and solvent contrast variation technique. With the method, we found the subunit exchange between the aggregates consisting of $\alpha 7$ -subunits which are one of subunits of the 20S proteasome, and analyzed its kinetics.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：数物系科学

科研費の分科・細目：物理学・生物物理・化学物理

キーワード：生物物理

1. 研究開始当初の背景

タンパク質が特異的な立体構造を持ち、その構造に基づき機能を発現していることは良く知られている。したがって、タンパク質の立体構造の形成機構を理解することは、生物物理学において非常に重要な課題の1つである。この構造形成の問題は、「階層的な2つの段階」に分離できると考えられる。第1段階は、ポリペプチド鎖自身の立体構造形成の問題で、いわゆる「フォールディング問題」である。これは、ポリペプチド鎖が2次・3次の立体構造形成において、多くのほぼ熱力

学的に等価なパスの中から構造形成のための最適なパスを瞬時に選択している物理原理の解明である。一方、多くのタンパク質は「1本」のポリペプチド鎖からなる3次元構造体ではなく、複数の3次構造体が会合して構成される「複合タンパク質」である。したがって、「構造形成における第2段階の問題」は、この「複数の3次構造体による大規模な会合体形成機構」＝「高次構造形成機構」の解明がもう一つの段階であり、このレベルでの構造形成機構の解明が重要であると考えられる。具体的に述べると、この高次構造体

形成では、いくつかのシャペロンが働く「生物学的な過程」が見られるが、それだけではなく 3 次構造体の会合体が熱平衡状態として「自律的」に形成される純粋な「物理的(熱力学的)な過程」も構造形成に寄与しているのではないかと申請者は考えている。更に、両者は関連しており、物理的な構造形成機構が高次構造体形成の基礎的な駆動力であり、シャペロンなどを用いた生物学的な機構が構造形成の方向付けを行っていると考えられ、まず、物理的な構造形成機構の解明の研究が必要であった。

2. 研究の目的

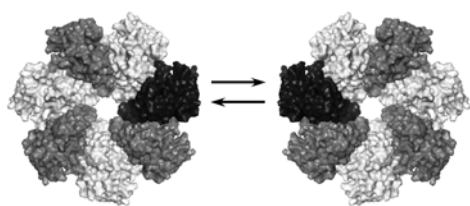
高次構造の形成には、サブユニットレベルでの動的な構造形成機構が存在するのではないか? と考え、

A. 上記のサブユニットスケールで上記の動的機構の存在の有無

B. 動的機構が存在するのならば、その Kinetics の解明

を目指した。

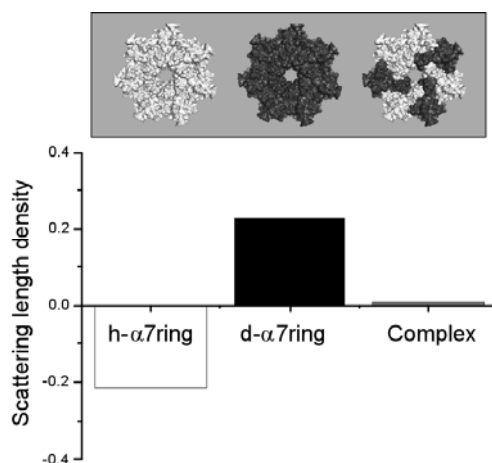
具体的なタンパク質複合体としてタンパク質の代謝において重要な役割を担っている 20S プロテアソームに注目した。20S プロテアソームは、それぞれ異なる 7 つのサブユニット ($\alpha 1-\alpha 7$, $\beta 1-\beta 7$) から成る α リング・ β リングが $\alpha \beta \beta \alpha$ の順に会合した 14 種類・合計 28 個のサブユニットから構成される巨大複合タンパク質である。興味深い点は、 α リングを形成するサブユニットの 1 つである「 $\alpha 7$ 」は、単独で α リングに相同な 7 回回転対称体を自律的に作り、更に、この 7 回回転対称体が 2 つ結合した中間会合体を形成することを明らかにしているが、この $\alpha 7$ リング間でサブユニット交換現象が存在する可能性が指摘されている事である(図参照)。この交換現象の有無と現象が存在した場合の Kinetics 解析を目的とした。



$\alpha 7$ リングにおけるサブユニット交換モデル。

3. 研究の方法

本研究では、「複合タンパク質におけるサブユニット交換」というこれまで明らかにされていなかった現象を測定することが重要である。そのために申請者らは以下に示すような重水素化試料と中性子小角散乱(SANS)を組み合わせた手法を考案した。



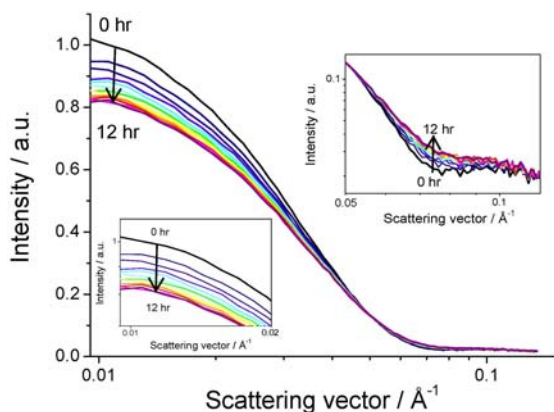
重水素化・軽水素化・複合 $\alpha 7$ 中間会合体のマッチング水溶液におけるコントラスト。

中性子散乱の特徴として、軽水素と重水素とで散乱長が異なることが挙げられる。例えば、軽水素を重水素に置換した重水素化タンパク質(h-タンパク質：黒色・上図中央)と無置換のタンパク質(h-タンパク質：白色・上図左端)では、構造は同じであるが散乱長密度が異なる。したがって、h-サブユニット、d-サブユニットが等量混合したhd-複合タンパク質(上図右端)の場合は、h-タンパク質とd-タンパク質の中間の散乱長密度を持つことになる。一方、水溶液試料からの散乱強度は、「溶媒である水とタンパク質の散乱長密度の差」=「コントラスト」が重要となる。溶媒の散乱長密度は重水と軽水を適量混合すること正值から負値まで変化させることが可能であるから、溶媒の散乱長密度をh-タンパク質とd-タンパク質の中間、すなわちhd-複合タンパク質の散乱長密度と一致させることができる。(この水溶液を「マッチング水溶液」と呼ぶ： $\alpha 7$ 中間会合体のマッチングポイントは、計算により軽水：重水=1:4である。)このマッチング状態でのh-タンパク質・d-タンパク質・hd-複合タンパク質のコントラストを図の棒グラフに示した。中性子小角散乱強度はコントラストの2乗であるから、マッチング水溶液では、h-タンパク質・d-タンパク質は小角散乱を引き起こすが、hd-複合タンパク質からの小角散乱は、コントラストがほぼ零なので非常に弱くなる(厳密にはサブユニットのパッキングによる内部構造に依存した散乱が観測される。)。以上より、hd-複合タンパク質のマッチング条件で、h-タンパク質水溶液とd-タンパク質水溶液を等量混合した場合、サブユニット交換機構が存在するならばh-タンパク質・d-タンパク質はhd-複合タンパク質に置換され、置換率に応じて中性子小角散乱強度が減少するはずである。したがって、散乱強度の減少率から置換率が分かり、更に散乱曲線シミ

シミュレーションを行い、測定された散乱曲線を解析すれば、置換位置の相関などを明らかにすることができる。

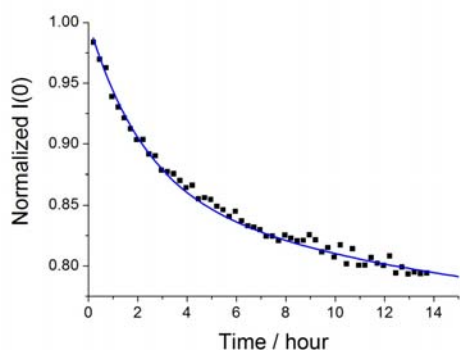
4. 研究成果

下図に中性子小角散乱曲線の経時変化を示す。h体—d体の混合後、明瞭な零点散乱強度の減少が観測され、サブユニット交換現象が存在することが確認できる。この強度現象は、X線小角散乱では観測されず、タンパク質の変性等によるものではない事が確認できている。



更により詳細にこの現象を理解するために下図に示す零点散乱強度の経時変化の解析を行った。零点散乱強度の経時変化の特徴は、

- ① 零点散乱強度の減少は、12 時間経過程度で初期値の 80%程度で停止する
- ② 経時変化は2つの時定数の異なる指数減衰関数の和で表されることが判明した。

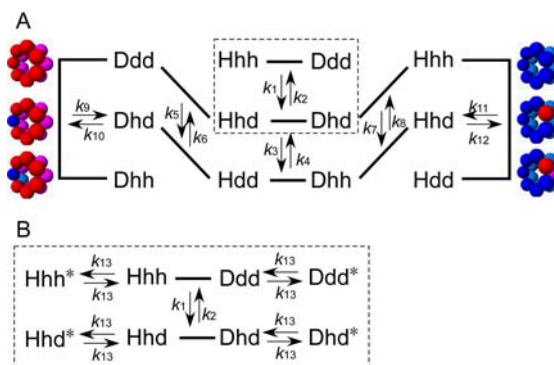


種々のモデルに対してコンピュータによる経時変化のシミュレーション解析行くと、

- ③ 交換可能なサブユニット数は1つのαリングgあたり2つ
- ④ αリングは励起状態と安定状態の2つ

の状態間を遷移しており、励起状態の・7-ring間でのみ交換は起こる。上記の遷移の時定数と交換の時定数の比は1:5.5

と言うモデル(下図参照)でうまく現象を説明するが可能であることが判明した。



本成果は、サブユニットと言う4次構造レベルで、これまで知られていなかった動的な現象が存在する事を初めて明らかにしており、非常に高く評価されている。加えて、本研究でも用いた手法は、他のタンパク質複合系にも適用可能であり、今後の研究の発展に非常に寄与すると考えられる。実際、申請者等のグループは本手法を用いた既に新たなタンパク質の動態研究に取り組んでいる。

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4件)

1. M. Sugiyama, E. Kurimoto, Y. Morimoto, H. Sahashi, E. Sakata, K. Hamada, K. Itoh, K. Mori, T. Fukunaga, Y. Minami and K. Kato, "Assembly State of Proteasome Activator 28 in an Aqueous Solution as Studied by Small-Angle Neutron Scattering", *Journal of the Physical Society of Japan*, **78** (2009) 124802, DOI:10.1143/JPSJ.78.124802. (査読有)
2. M. Sugiyama, N. Fujii, Y. Morimoto, K. Itoh, K. Mori, T. Fukunaga and N. Fujii, "SAXS and SANS Observations of Abnormal Aggregation of Human α-Crystallin", *Chemistry & Biodiversity*, **7** No. 6 (2010) 1380-1386, DOI: 10.1002/cbdv.200900332. (査読有)
3. M. Sugiyama, E. Kurimoto, H. Sahashi, E. Sakata, Y. Morimoto, K. Itoh, K. Mori, T. Fukunaga, Y. Minami and K. Kato, "SANS investigation of assembly state of proteasome activator 28 and the 20S proteasome", *Journal of Physics*, **247** (2010) 012020, DOI : 10.1088

- /1742-6596 / 247 /1/012021. (査読有)
4. M. Sugiyama, E. Kurimoto, H. Yagi, K. Mori, T. Fukunaga, M. Hirai, G. Zaccari and K. Kato, "Kinetic Asymmetry of Subunit Exchange of Homo-Oligomeric Protein as Revealed by Deuteration-assisted Small-Angle Neutron Scattering", *Biophysical Journal*, **110**(8) (2011) 2037-2042, DOI: 10.1016/j.bpj.2011.09.004. (査読有)

[学会発表] (計 7 件)

1. M. Sugiyama, "SANS Investigation of Packing Structure of Proteasome Activator 28 with Deuterated Subunit", XIV International Conference on Small-Angle Scattering, 2009/9/16, Oxford, United Kingdom.
2. 杉山正明, "プロテアソーム複合体におけるサブユニットキネティクスの研究", 日本中性子科学会第 9 回年会, 2009/11/11, いばらき量子ビーム研究センター
3. M. Sugiyama, "Observation of Subunit Kinetics in Proteasome a7 ring with SANS and SAXS", The Fourth Taiwan-Japan Joint Meeting on Neutron and X-ray Scattering, 2010/3/9, Yilan, Taiwan.
4. 杉山正明, "野生型 PA28 における Subunit 配置と解離", 第 10 回日本中性子科学会年会, 2010 年 12 月 11 日, 東北大学 片平さくらホール.
5. M. Sugiyama, "Abnormal Aggregation of alpha-crystallin", The 11th IUMRS-International Conference in Asia, 2010 年 9 月 26 日, Qingdao, China.
6. M. Sugiyama, "High Order Structure of Protein and Its Kinetics with Deuteration-Assisted Small-Angle Neutron Scattering", The International Conference on Advanced Materials and Nanotechnology (招待講演), 2011/10/22, Park Village Resort Hotel, Kathmandu(ネパール).
7. M. Sugiyama, "Observation of Nano-Scale Structure of Protein with Deuteration - Assisted Small-Angle Neutron Scattering", The 12th International Symposium on Biomimetic Materials Processing (招待講演), 2012/1/25, 野依ホール(名古屋大学).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉山 正明 (SUGIYAMA MASAAKI)

京都大学・原子炉実験所・教授
研究者番号：10253395

(2) 研究分担者

加藤 晃一 (KATO KOICHI)
名古屋市立大学・薬学研究科・教授
研究者番号：20211849
森本 幸生 (MORIMOTO YUKIO)
京都大学・原子炉実験所・教授
研究者番号：80200450